

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5153983号
(P5153983)

(45) 発行日 平成25年2月27日(2013.2.27)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	
C 12 R 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/21	
		C 12 R 1:19	

請求項の数 38 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2001-585328 (P2001-585328)
(86) (22) 出願日	平成13年5月18日 (2001.5.18)
(65) 公表番号	特表2004-524804 (P2004-524804A)
(43) 公表日	平成16年8月19日 (2004.8.19)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2001/001068
(87) 國際公開番号	W02001/088121
(87) 國際公開日	平成13年11月22日 (2001.11.22)
審査請求日	平成20年5月16日 (2008.5.16)
(31) 優先権主張番号	0012233.3
(32) 優先日	平成12年5月19日 (2000.5.19)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

前置審査

(73) 特許権者	500563371 デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャ ップ D E V G E N n v ベルギー, 9052 ゲントーウィナール デ, テヒノロギーパルク 30
(74) 代理人	100094318 弁理士 山田 行一
(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペクター構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 第一のプロモータと、
 b) 第二のプロモータと、
 を含むDNA構築物であって、
 第一のプロモータ及び第二のプロモータは互いに対立して配位しており、
 c) 第一のプロモータの3'末端下流及び第二のプロモータの3'末端下流に位置する
 、インタープロモータ領域を定義し、
 前記DNA構築物が、
 d) インターパロモータ領域に位置する、少なくとも1つのクローニング部位と、
 e) 2本鎖RNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含み、前記少なくとも1つのクローニング部位に挿入されたDNA断片と、
 f) 第一のプロモータの3'末端側から見て、第一のプロモータの下流及び少なくとも1つのクローニング部位の下流に位置する、少なくとも1つの第一の転写ターミネータとを更に含み、
 前記第一の転写ターミネータは、第一のプロモータに操作的に連結されており、かつ、インターパロモータ領域に位置している、前記DNA構築物。

【請求項 2】

- g) 第二のプロモータの3'末端側から見て、第二のプロモータの下流及び少なくとも1つのクローニング部位の下流に位置する、少なくとも1つの第二の転写ターミネータで

10

20

あって、第二のプロモータに操作的に連結されている前記第二の転写ターミネータを更に含む、請求項1に記載のDNA構築物。

【請求項3】

第二の転写ターミネータ-が、インター-プロモータ領域に位置している、請求項2に記載のDNA構築物。

【請求項4】

第二の転写ターミネータが、第二のプロモータの3'末端側から見て第二のプロモータの下流、少なくとも1つのクローニング部位の下流、及び第一のプロモータの5'末端下流に位置している、請求項2又は3に記載のDNA構築物。

【請求項5】

第二の転写ターミネータの3'末端が、第一のプロモータの5'末端から、2000以下のヌクレオチド隔てられた、請求項4に記載のDNA構築物。

【請求項6】

第一の転写ターミネータが、第一のプロモータの3'末端側から見て、第一のプロモータの下流及び少なくとも1つのクローニング部位の下流に位置しており、第二の転写ターミネータが、第二のプロモータの3'末端側から見て、第二のプロモータの下流及び少なくとも1つのクローニング部位の下流に位置している、請求項3に記載のDNA構築物。

【請求項7】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項1乃至6のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項8】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一である、請求項1乃至7のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項9】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一でない、請求項1乃至7のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項10】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項1乃至9のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項11】

クローニング部位が、少なくとも1つの制限部位を含む、請求項1乃至10のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項12】

クローニング部位が、スタッファー-DNA配列の側面に位置している少なくとも2つの制限部位を含む、請求項11に記載のDNA構築物。

【請求項13】

少なくとも2つの制限部位が同一である、請求項12に記載のDNA構築物。

【請求項14】

少なくとも1つの制限部位又は少なくとも2つの制限部位が、BstXI部位である、請求項11乃至13のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項15】

制限部位がXcmI部位である、請求項11乃至13のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項16】

クローニング部位が、attR1及びattR2組換え配列を更に含む、請求項1乃至15のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項17】

クローニング部位が、ccdBヌクレオチド配列を更に含む、請求項1乃至16のいず

10

20

30

40

50

れか一項に記載のDNA構築物。

【請求項18】

c c d B ヌクレオチド配列が、少なくとも1つのユニークな制限部位を更に含む、請求項17に記載のDNA構築物。

【請求項19】

少なくとも1つのユニークな制限部位が、平滑末端制限部位である、請求項18に記載のDNA構築物。

【請求項20】

平滑末端制限部位がS r f I 部位である、請求項19に記載のDNA構築物。

【請求項21】

少なくとも1つのクローニング部位に挿入されたDNA断片を更に含む、請求項1乃至20のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項22】

プラスミド又はベクターである、請求項1乃至21のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項23】

配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12又は配列番号13に例示されたヌクレオチド配列を有する、請求項22に記載のプラスミド又はベクター。

【請求項24】

a) 第一のプロモータと、

b) 第二のプロモータと、

を含むDNA構築物であって、

第一のプロモータ及び第二のプロモータは互いに対立して配位しており、

c) 第一のプロモータの3'末端下流及び第二のプロモータの3'末端下流に位置している、インタープロモータ領域を定義し、

前記インターパロモータ領域が2本鎖RNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含み、

前記DNA構築物が、d)インターパロモータ領域に位置しており、かつ、第一のプロモータの3'末端側から見て、第一のプロモータの下流に位置する、第一の転写ターミネータ、を更に含み、

前記第一の転写ターミネータが第一のプロモータに操作的に連結されている、前記DNA構築物。

【請求項25】

g)インターパロモータ領域に位置しており、かつ、第二のプロモータの3'末端側から見て、第二のプロモータの下流に位置する、第二の転写ターミネータを更に含み、前記第二の転写ターミネータが第二のプロモータに操作的に連結されている、請求項24に記載のDNA構築物。

【請求項26】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一である、請求項24又は25に記載のDNA構築物。

【請求項27】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一でない、請求項24又は25に記載のDNA構築物。

【請求項28】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項26又は27に記載のDNA構築物。

【請求項29】

RNA阻害に対する2本鎖RNAの生産方法であって、クローニング部位に挿入された

10

20

30

40

50

D N A 断片、又は、2本鎖R N A生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列から2本鎖R N Aを発現させるために、請求項1乃至28のいずれか一項に記載のD N A構築物を使用することを含む、方法。

【請求項30】

請求項1乃至28のいずれか一項に記載のD N A構築物を宿している菌株。

【請求項31】

前記菌株が大腸菌株である、請求項30に記載の菌株。

【請求項32】

R N A阻害に対する2本鎖R N Aの生産のための、請求項30又は31に記載の菌株の使用。

10

【請求項33】

ヒト以外の生物におけるR N A発現の阻害方法であって、前記生物と、請求項1乃至28のいずれか一項に記載のD N A構築物を使用して生成した2本鎖R N Aとを接触させることを含む、方法。

【請求項34】

前記生物が線虫である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記2本鎖R N Aを前記生物に組み込まれるよう前記生物に供与することによって、前記生物と前記2本鎖R N Aとを接触させる、請求項33又は34に記載の方法。

【請求項36】

ヒト以外の生物におけるR N A発現の阻害方法であって、前記生物と、請求項30又は31に記載の菌株とを接触させることを含む、方法。

20

【請求項37】

前記生物が線虫である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記菌株を前記生物に供与することによって、前記生物と前記菌株とを接触させる、請求項36又は37に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、2本鎖R N Aの発現に用いられる改良型ベクター構築物に関し、より詳細には、インピトロおよびインピボでの2本鎖R N Aの発現に用いられる改良型ベクター構築物に関する。

【0002】

発明の背景

2本鎖R N A阻害(R N A i)効果の出現以来、遺伝子発現を制御するツールとして、WO 99/32619およびWO 00/01846に記述されるように、2本鎖R N A(d s R N A)の生成のために設計された専用ベクターの必要性が認識されている。

【0003】

ハイレベルのd s R N Aを生成するために設計されたクローニングベクターについては、過去にPlaetinck他(WO 00/01846)およびTimmons他(Nature誌395~854(1998年))によって説明がなされている。これらのベクターは一般的にはマルチプルクローニング部位(MCS)を含み、向かい合わせの2つの転写プロモータが隣接するMCSに、目的とするD N A断片をクローニングすることができる。基本的に、これらの3つのコンポーネント(プロモータ1、MCSおよびプロモータ2)が全体システムを構成する。適切な発現システムでは、MCSにクローニングされたD N Aが両方向に転写され、それによって2本の相補的R N A鎖が生成されることになる。

40

【0004】

周知のシステムの欠点は、クローニングされた断片以外も転写されてしまうということである。R N Aポリメラーゼによる読み取りによって、ベクター全体が転写され、しかもそ

50

れは両方向での転写となる。クローニングされたDNA断片の転写に限って、RNAiに適した活性dsRNAが得られることになるので、上記ベクター部分の転写は、無用で非効率的なRNAをもたらす。より詳細には、これら転写の80%が非特異的であり、従つて非効果的であるとみなすことができる。

【0005】

先行技術のプラスミドおよび発現システムによって生成される大量の非特異的RNAは、好ましくない副作用をもたらす。第1に、dsRNAを発現するE. coliのような導入媒体を介するC. elegansへのdsRNA導入に基づくRNAiプロトコルにおいて(WO 00/01846参照)、大型のRNA鎖は導入媒体にとって有毒であると考えられる。結果として、E. coliに蓄積する大量のRNAが個体数の大部分を死滅させる。第2に、おそらく更に重要となるであろうが、阻害能力が低下することである。大量の非特異的dsRNAの存在により、特定配列に拮抗的な環境をもたらす。これらの非特異的領域が大きいので、例えばC. elegans細胞内で、テンプレートに従うdsRNA配列の、目的とするタンパク質の発現を阻止する能力は低下する。また、そのような非特異的dsRNAによる阻害については、Tushl他のGenes & Development 13: 3191-3197(1999年)でもショウジョウバエで示されている。遺伝子発現を阻害する能力に影響を及ぼすだけでなく、特異的dsRNAの生成量を制限する。第3に、ベクターバックボーン部の転写、より詳細には、複製および関連構造の起点の転写は、プラスミドの不安定性とプラスミドの再組織化を招くので、dsRNA生成を減少させる。効果的なdsRNAの濃度がこのように比較的低いと、今度は非効率的なRNAiを招くことになる。

10

20

【0006】

結論として、上記ベクターには以下の欠点がある。すなわち、導入媒体にとって有毒である。転写による非特異的生成の比率が高まるほど、その非特異的領域の存在によってdsRNAの阻害能力が低下する。プラスミドが再組織化したり、プラスミドが導入媒体から欠損する率が高い。従って、本発明の目的は、dsRNA生成に関し、先行技術のベクターの欠点を回避する改良型ベクターを提供することである。

【0007】

RNA転写のインビトロ合成、例えばRNAプローブの生成で用いられるベクターは、かねてから当該技術分野では周知であり、普通に用いられてきた(例えば、F. M. Ausubel他(編集人)による Current Protocol in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., 1994年); Jendrisak他の米国特許第4,776,072号、クローン化DNA配列の一方の鎖のRNAコピーをインビトロで生成するためのベクター)。標準的なインビトロ転写プロトコルでは、一般的に、所望の転写物の3'末端に位置する制限部位で転写ベクターを線形化することにより、ベクター配列の転写の読み取り問題を回避する。しかしながら、テンプレートが両方向に転写されることが重要であるインビオ転写またはdsRNA生成にとってこの解決策は適切ではない。

30

【0008】

ここで、本発明は、dsRNA生成のための先行技術のベクターが遭遇する問題に対し、転写ターミネータの活用に基づく新規の解決策を提案する。概要を述べると、この解決策は、少なくとも1つのプロモータに操作的に連結された少なくとも1つの転写ターミネータの活用から成り、ターミネータは、プロモータが開始する転写を阻止する。そしてプロモータの3'末端とターミネータの5'末端との間に挿入されたどのDNA断片も転写され、ベクターバックボーンの望ましくない転写は行わない。以下で更に述べるように、ベクターは2つのプロモータおよび2つのターミネータで構成されることが好ましい。

40

【0009】

従って、本発明の第一の局面によれば、インタープロモータ領域に隣接する向かい合わせの2つのプロモータを含むDNA構築物が提供され、この構築物は更に、前記プロモータのうちの一方のプロモータの転写領域下流に位置する少なくとも1つの転写ターミネータを含む。詳細には、本発明は、以下を含むDNA構築物を提供する:

a)第一のプロモータ、および

50

b) 第二のプロモータ

を含み；

第一および第二のプロモータは相互に反対の配向にあり、かつ

c) 第一のプロモータの3'末端の下流で、かつ第二のプロモータの3'末端の下流に位置するインタープロモータ領域を画成し；

DNA構築物は更に：

d)インターパロモータ領域に位置する少なくとも1つのクローニング部位；および

e)第一のプロモータの下流で、かつ少なくとも1つのクローニング部位の下流に位置する(第一のプロモータの3'末端から見た場合)第一の転写ターミネータ；を含み、第一の転写ターミネータは第一のプロモータに操作的に連結される。

10

【0010】

インターパロモータ領域は更に、以下の領域として画成することも可能である：第一のプロモータの3'末端と第二のプロモータの3'末端との間のDNA領域とし、この領域は、第一のプロモータの下流で、かつ第二のプロモータの下流にあり、第一のプロモータおよび第二のプロモータの5'末端を含まないことが好ましい。向かい合わせの第一のプロモータおよび第二のプロモータは、それぞれの5'末端から3'末端の方向への発現を促して3'末端の下流で転写を開始し、それによってインターパロモータ領域に存在する又クレオチド配列の両鎖の転写が行われる。

【0011】

本発明のDNA構築物内にある2つのプロモータは同一であっても異なっていてもよく、基本的にどのようなタイプであってもよい。この構築物で用いられるプロモータの厳密な性質は、DNA構築物が機能すると予想される発現システムの性質に依存する(例：原核生物対真核生物宿主細胞)。バクテリオファージプロモータ、例えば、T7、T3およびSP6プロモータは、適切なRNAポリメラーゼとの結合にのみ依存する高レベルな転写を可能にする利点を備えているので、本発明の構築物での使用に好ましい。それらのプロモータは個々に独立して選択することができる。また、ファージプロモータは多様な宿主システム、すなわち、原核生物および真核生物宿主の両方で機能できる。但し適切なポリメラーゼが宿主細胞に存在するものとする。

20

【0012】

インターパロモータ領域に隣接する「向かい合わせの」2つのプロモータ構造は、一方のプロモータが転写の開始を促すことによってインターパロモータ領域のセンス鎖が転写され、他方のプロモータが転写の開始を促すことによってインターパロモータ領域のアンチセンス鎖が転写されるようになっており、この構造は、当該技術分野、例えば、Promega Corp(米国ウィスコンシン州マディソン)のベクターのpGEM7シリーズで周知の構造である。

30

【0013】

本発明のDNA構築物が先行技術のそれと異なる点は、一方のプロモータの転写領域下流に位置する少なくとも1つの転写ターミネータが存在することである。以下で説明するように、転写ターミネータは、一方向性または双方向性であり、一方向性あるいは双方向性ターミネータの選択は、インターパロモータ領域の内外のどちらにターミネータを配置するかによって影響を受ける。ターミネータは、原核生物や真核生物由来のターミネータであっても、ファージ由来のターミネータであってもよい。バクテリオファージターミネータ、例えばT7、T3およびSP6ターミネータが特に好ましい。唯一の要件は、ターミネータが転写領域下流に位置することに関連して、プロモータで開始される転写をターミネータが終結させることができなくてはならないことである。実際に、それらはプロモータとターミネータが「機能的組み合わせ」を形成しなくてはならない。すなわち、プロモータで始動するRNAポリメラーゼのタイプに対してターミネータが機能的でなくてはならないことを意味する。一例を挙げると、真核生物RNAPolIIプロモータと真核生物RNAPolIIIターミネータは一般的に機能的組み合わせを形成する。バクテリオファージプロモータおよびターミネータを本発明の構築物に用いる場合、ファージプロモータと

40

50

ターミネータは両方ともポリメラーゼ特有であるので、機能的組み合わせの選択が特に重要な。機能的組み合わせを形成するためには、プロモータとターミネータの両方が同一のポリメラーゼにとって特異的であるのがよい。例えば、T7プロモータとT7ターミネータ、T3プロモータとT3ターミネータ等。

【0014】

一実施の形態において、本発明のDNA構築物は、第一のプロモータの下流で、少なくとも1つのクローニング部位の下流に配置された（第一のプロモータの3'末端から見た場合）単体の転写ターミネータを含み、第一の転写ターミネータは第一のプロモータに操作的に連結され、単体の転写ターミネータはインタープロモータ領域に配置されるようにならてもよい。

10

【0015】

代替の編成では、DNA構築物はインターパロモータ領域外に配置された単体の転写ターミネータを含む。更に別の実施の形態では、DNA構築物が2つの転写ターミネータを含み、それぞれを2つのプロモータの一方の転写領域下流に配置させる。この構造では、何れか一方または両方のターミネータをインターパロモータ領域内に配置してもよい。本発明のDNA構築物におけるこのような様々な実施の形態については、添付図面を参照して以下により詳細に説明する。また、インターパロモータ領域外の第一の転写ターミネータの位置を更に以下のように、すなわち、第一のプロモータの下流で、少なくとも1つのクローニング部位の下流であり、かつ第二のプロモータの5'末端の下流に第一の転写ターミネータが位置する（第一のプロモータの3'末端から見た場合）ように定めてもよい。

20

【0016】

また、インターパロモータ領域外の第二の転写ターミネータの位置を更に以下のように、すなわち、第二のプロモータの下流、少なくとも1つのクローニング部位の下流、および第一のプロモータの5'末端の下流に第二の転写ターミネータが位置する（第二のプロモータの3'末端から見た場合）ように定めてもよい。

【0017】

更に、ターミネータがインターパロモータ領域に配置されない場合、第一のプロモータの5'末端と第二のターミネータの3'末端との距離、または第二のプロモータの5'末端と第一のターミネータの3'末端との距離を短くすることが好ましく、言い換えれば、第一の転写ターミネータの3'末端をヌクレオチド2000個以下分だけ第二のプロモータの5'末端から離間させるが、好ましくはヌクレオチド1000個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド500個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド200個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド100個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド50個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド20個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド10個以下分で、特にヌクレオチド6個以下分である。

30

【0018】

更に、第二の転写ターミネータがインターパロモータ領域外に配置される場合、好ましくは第二の転写ターミネータの3'末端をヌクレオチド2000個以下分だけ第一のプロモータの5'末端から離間させるが、好ましくはヌクレオチド1000個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド500個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド200個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド100個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド50個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド20個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド10個以下分で、特にヌクレオチド6個以下分である。

40

【0019】

先に定義されたように、用語「インターパロモータ領域」は、2つのプロモータ間のDNA配列すべてを意味する。上記で説明したように、本発明の特定の実施の形態では、転写ターミネータがインターパロモータ領域内にあってもよい。インターパロモータ領域は、有利になるようにdsRNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含んでもよい。この配列の厳密な長さおよび性質は本発明において重要ではない。本発明は更に、インターパロモータ領域がクローニング部位を含むDNA構築物を提供する。dsRNA

50

生成用テンプレートを形成するDNA断片を2つのプロモータ間に挿入する際に、クローニング部位はそれを促す機能を有する。従って本発明では、dsRNA生成のためのテンプレートベクターの構築物で汎用的な一連のクローニングベクターを提供する。また、クローニングベクターはクローニング部位へ挿入されたDNA断片を有し、そのようなクローニングベクターに由来するベクターも本発明の適用範囲に含まれる。

クローニング部位は更に、以下を1つ以上含んでもよい：

- 少なくとも1つの制限部位（当該技術分野で周知である）、または1つ以上の更なる制限部位（例：マルチプルクローニング部位を提供する（当該技術分野で周知である））；
- スタッファーDNA（例：2つのBstXI制限部位、または2つのXcmI制限部位等、少なくとも2つの制限部位が隣接する）；
- attR1およびattR2組換え部位；
- ccdBヌクレオチド配列；
- 更にSrfI制限部位等、少なくとも1つの特異的平滑末端制限部位を備えるccdBヌクレオチド；および／または
- 少なくとも1つのクローニング部位に挿入されるDNA断片。

本発明で提供されるすべてのDNA構築物が、有利になるように、例えばプラスミドベクター等の複写可能なクローニングベクターの一部を形成してもよい。向かい合わせのプロモータ、インタープロモータ領域および転写ターミネータだけでなく、ベクター「バックボーン」は更に、複写可能なベクターで共通して見られる特徴、例えば抗生物質耐性遺伝子等の宿主細胞および選択マーカー内での自律複製を可能にする複製起点等を1つ以上有する。選択マーカー遺伝子（例：抗生物質耐性遺伝子）自体はプロモータおよび転写ターミネータを有してもよいが、それらは本発明で必要なプロモータおよびターミネータエレメントとは全く無関係であり、特定のベクターが本発明の適用範囲内に収まるか否かを判定する際に考慮に入れるものでないことは言うまでもない。

【0020】

本発明によるDNA構築物は、当該技術分野において周知の、例えばF. M. Ausubel他（編集人）のCurrent Protocol in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc., 1994年）に記載されるような標準的な組換え技術を用いたコンポーネント配列エレメントから容易に構築され、当該技術分野に精通する者は以下の本発明の詳細な説明および添付の実施例からそれを理解できるであろう。

【0021】

以下の概略図を参照して、本発明によるDNA構築物についてここで詳細に説明する。

【0022】

図を参照すると、図1（A）は本発明による第一のDNA構築物で、向かい合わせの2つのプロモータ、すなわちインタープロモータ領域c）にそれぞれ隣接する第一のプロモータa）および第二のプロモータb）を含むプラスミドベクターを略示し、インターパロモータ領域は第一のプロモータの3'末端の下流で、かつ第二のプロモータの3'末端の下流にある。第一のプロモータおよび第二のプロモータは同一であっても異なっていてもよい。本実施の形態は、第一の転写ターミネータe）および第二の転写ターミネータf）を含み、両者ともインターパロモータ領域内に位置する。この実施の形態では、第一のターミネータおよび第二のターミネータは一方向性ターミネータであることが好ましい。

【0023】

DNA断片を少なくとも1つのクローニング部位d）に挿入してもよい。このような断片が、第一のプロモータa）および第二のプロモータb）の誘導により転写される（すなわち両鎖が転写される）ことで、挿入されたDNA断片の2本鎖RNAと結合する2つのRNA断片が生成される（インビトロおよびインビボの両方で）。

【0024】

ゲノムDNA配列、cDNA配列、その他コード配列等、所望のDNA配列が少なくとも1つのクローニング部位に挿入される。何れの特定の説明に制限されることなく、a）およびe）が機能的組み合わせを形成する場合、a）で転写を開始するRNAポリメラーゼ

10

20

30

40

50

は、少なくとも 1 つのクローニング部位、および少なくとも 1 つのクローニング部位に挿入される DNA 断片を含むインタープロモータ領域を転写し、RNA ポリメラーゼが e) に到達すると転写を終結させられると考えられている。同様に、b) で転写を開始する RNA ポリメラーゼは、少なくとも 1 つのクローニング部位、および少なくとも 1 つのクローニング部位に挿入される DNA 断片を含むインタープロモータ領域を転写し、RNA ポリメラーゼが f) に到達すると転写を終結させられる。ターミネータは、RNA ポリメラーゼが転写を中断、停止して、テンプレートから解離するようにさせる。これによってベクターバックボーンの無制限な転写が阻止され、重要でない DNA の非特異転写を抑制する。

【 0025 】

10

インタープロモータ領域は更に、2 本鎖 RNA 阻害に対して目的に合致したヌクレオチド配列を含む。この配列は目的とする断片に対して「TF」と呼ばれる。dsRNA に転写される場合、この配列は目的とする遺伝子の特異的 2 本鎖 RNA 阻害を担う。目的とする断片はゲノム DNA の断片または目的とする遺伝子の cDNA から形成してもよい。その厳密な長さおよびヌクレオチド配列は本発明において重要ではない。

【 0026 】

図 1 (A) に示す編成において、2 つのターミネータはインターパロモータ領域内で TF の何れかの側に位置する。各ターミネータはそれぞれ一方のプロモータの転写領域下流に位置し、第一のターミネータ e) は第一のプロモータ a) の転写領域下流に位置し、第二のターミネータ f) は第二のプロモータ b) の転写領域下流に位置する。上記のように a) および e) が機能的組み合わせを形成すると考えると、a) で転写を開始する RNA ポリメラーゼは TF まで含むインターパロモータ領域を転写し、e) に到達すると転写を終結する。同様に、b) で転写を開始する RNA ポリメラーゼは反対側の鎖の TF まで含むインターパロモータ領域を転写し、f) に到達すると転写を終結する。ターミネータは、RNA ポリメラーゼが転写を中断、停止して、テンプレートから解離するようにさせる。これによってベクターバックボーンの無制限な転写が阻止され、重要でない DNA の非特異転写を抑制する。

20

【 0027 】

30

このベクターから生じた転写物は、ベクター内のターミネータの厳密な配置に依存し、TF 領域に対応するほぼ完全な特異的 dsRNA である。挿入された DNA 断片の両側にある TF 領域の下流末端にターミネータ配列を直接配置することにより、転写物の長さはテンプレートに従った配列の長さにまで完全に短かくされる。従って、より多くの特異的 dsRNA が得られる。ここで更に、ベクターバックボーンの非転写により DNA 構築物はより安定する。後者の特性（安定性）と、ここで相対的に高くなった特異的転写率とが相まって、より多くの短い特異的 dsRNA 鎖を合成するのに好適なシステムが提供される。このように転写物の量が比例して増加すると、特異的 dsRNA の濃度が高まり、RNAi プロトコルにおける阻害効果が増す。導入媒体における dsRNA の発現に基づく RNAi プロトコルでは、RNA の発現の増加によって導入媒体にもたらされる毒性レベルが、このベクターの使用により最低レベルとなる。

【 0028 】

40

本発明者が RNAi の応用に最適な構造であるとみなしている、図 1 (A) に示すタイプのベクターの特定の実施例は、付帯する実施例で説明するプラスミド pGN9a である。ベクターは向かい合わせの 2 つの T7 プロモータを含むので、pGN9 で用いられる転写ターミネータは T7 RNA ポリメラーゼ特有のターミネータである。しかしながら、T3 または SP6 プロモータ、ターミネータ、ポリメラーゼ、あるいは別の原核生物または真核生物プロモータ、ターミネータに基づく発現システム等、別のシステムを使用することもできる。

【 0029 】

50

図 1 (B) は本発明による更なる DNA 構築物であって、インターパロモータ領域 c) に隣接する向かい合わせの 2 つのプロモータ a) および b) を含むプラスミドベクターを概

略的に示す。このベクターは 2 つの転写ターミネータ e) および f) を含むが、この構造では 2 つのターミネータがインタープロモータ領域外に位置し、実際にここではターミネータエレメントが 2 つのプロモータに隣接する。e) は a) の転写領域下流であり、また f) は b) の転写領域下流となるような構造である。ここで繰り返すが e) は、 a) が開始する転写を終結させ、また f) は、プロモータ b) が開始する転写を終結させる。図 1 (A) のように、プロモータ間にターミネータを配置するために一方向性ターミネータが好ましいとされる構造とは異なり、d) の外側にターミネータを配置することで、一方向性ターミネータだけでなく双方向性ターミネータを用いることが可能となる。本発明に従って多くの双方向性ターミネータを用いることができるが、それらは当該技術分野において周知である。一般的に、これらはポリメラーゼに対して非特異的であるとみなされている。10

【 0 0 3 0 】

図 1 (B) に示す実施の形態では、d s R N A 生成のための先行技術のベクターに対し、図 1 (A) に示す利点と基本的に同様の利点を提供する。図 1 (B) に示すベクターでは、プロモータ領域をも含むわずかに長い転写物となる。このように転写物の長さに比較的小さな相違があっても、それによって、形成された d s R N A は R N A i システムの効率に重大な影響を及ぼすことはない。

【 0 0 3 1 】

図 1 (B) に示す実施例では、プロモータの 5 ' 末端をヌクレオチド 2 0 0 0 個以下分だけ転写ターミネータの 3 ' 末端から離間させるようにターミネータおよびプロモータの位置が近接していることが好ましいが、好ましくはヌクレオチド 1 0 0 0 個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド 5 0 0 個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド 2 0 0 個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド 1 0 0 個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド 5 0 個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド 2 0 個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド 1 0 個以下分で、特にヌクレオチド 6 個以下分である。20

【 0 0 3 2 】

図 1 (C) は本発明による更なる D N A 構築物であって、インタープロモータ領域 c) に隣接する向かい合わせの 2 つのプロモータ a) および b) を含むプラスミドベクターを概略的に示す。本実施の形態では、一方のターミネータ (この場合 e)) は c) の内側に位置し、他方の f) は c) の外側に位置する。繰り返すが、e) は、 a) が開始する転写を終結させ、f) は、プロモータ b) が開始する転写を終結させる。この構造では、一方のターミネータが逆方向のポリメラーゼの活性を阻害するという問題 (例 : f) は b) が開始する転写を妨げる) に対して有効な解決策を提供する。このベクターは基本的に、先行技術に対して図 1 (a) および図 1 (b) に示す様々なベクターと同様の利点を提供する。一方のプロモータを転写することにより転写物の長さに比較的小さな相違があっても、R N A i システムの効率に重大な影響を及ぼすことはない。これは、先に定めたように、インタープロモータ領域 c) の外側に配置されたターミネータがプロモータに近接している場合に、より顕著となる。30

【 0 0 3 3 】

図 1 (D) および図 1 (E) は本発明による更なる 2 つの D N A 構築物を概略的に示す。両方ともインターパロモータ領域 c) に隣接する向かい合わせの 2 つのプロモータ a) および b) を含むプラスミドベクターである。これらの実施の形態は、単体ターミネータだけを含む。図 1 (D) に示す構造では、a) からの転写を終結させる単体ターミネータ e) を c) 外に配置する。I P R の外側にターミネータを配置することにより、このシステムで双方向性ターミネータあるいは一方向性ターミネータの何れであっても用いることができるようになる。図 1 (D) に示す実施の形態では、e) が c) 内に配置される。従って、a) を一方向性ターミネータとすることが好ましい。40

【 0 0 3 4 】

本発明による D N A 構築物の更なる実施の形態については、図 2 (B) 乃至図 2 (E) で概略的に示す。50

【 0 0 3 5 】

これらの実施の形態はすべて、図1(A)に示すプロモータおよびターミネータの最適編成に基づくプラスミドクローニングベクターであり、上記のように、少なくとも1つのクローニング部位へ、DNA断片を挿入することを促すクローニング部位を含む。

【 0 0 3 6 】

これらの実施の形態はすべて、図1(A)に示すプロモータおよびターミネータの最適編成に基づくプラスミドクローニングベクターであり、インタープロモータ領域へ、目的とするDNA断片を挿入することを促すクローニング部位を含む。

【 0 0 3 7 】

図2(A)は、比較のために加えた、先行技術のクローニングベクターの概略図である。このベクターは向かい合わせの2つのプロモータa)およびb)を含むが、両方が同一であっても異なっていてもよく、マルチクローニング部位(MCS)に隣接する。

【 0 0 3 8 】

図2(B)は本発明によるプラスミドクローニングベクターの第一のタイプを示す。ベクターはインターパロモータ領域に隣接する向かい合わせの第一のプロモータa)および第二のプロモータb)を含む。インターパロモータ領域は更に、以下の領域として定めることも可能である。すなわち第一のプロモータの3'末端と第二のプロモータの3'末端との間をDNA領域とし、この領域は、第一のプロモータの下流で、かつ第二のプロモータの下流にあり、第一のプロモータおよび第二のプロモータの5'末端を含まないことが好みしい。インターパロモータのプロモータ領域は更に、マルチクローニング部位(MCS)に隣接するターミネータe)およびf)を含む。MCSは少なくとも1つの単独の制限部位、好みしくは当該技術分野で周知の制限部位を2つ以上含み、その何れもDNA断片の挿入に用いてよい。

【 0 0 3 9 】

図2(C)は本発明によるプラスミドクローニングベクターの更に異なるタイプを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータe)およびf)を含むインターパロモータ領域に隣接する、向かい合わせのプロモータa)およびb)を含む。本実施の形態ではa)およびb)は、PCR断片のクローニングを促すように成されたクローニング部位に隣接し、2つの同一の制限部位(この場合BstXI部位)が隣接するスタッファーDNAを含む。スタッファーDNAの特異的配列はそれほど重要ではない。但し、前記スタッファーDNAが本発明のDNA構築物における所望の効果および/または所望の活性を阻害しないものとする。ここでは、本発明のこのような局面によるベクターの実施例として、プラスミドpGN29について説明する。

【 0 0 4 0 】

BstXI認識部位およびBstXIアダプタを用いるPCR産物のクローニングは、一般的に当該技術分野で周知である。BstXIアダプタは、Invitrogen(Groningen,オランダ)等から市販されている。これらのアダプタはより簡単で効率的にPCR産物をベクターにクローニングするために設計されたノンパリンドローム(非回文)配列のアダプタである。このように、これらのアダプタを用いると、非相補的な(CACAA)オーバーハングを有することにより、アダプタまたはインサートDNA同士の連結が減らされる。スタッファーDNAが組み込まれているのは、単にBstXIで切断されるベクターと切断されないベクターとの差別化を、その大きさに基づき容易に行えるようにするためである。その厳密な長さおよび配列は重要ではない。

【 0 0 4 1 】

図2(D)は本発明によるプラスミドクローニングベクターの更に異なるタイプを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータe)およびf)を含むインターパロモータ領域に隣接する、向かい合わせのプロモータa)およびb)を含む。本実施の形態においてa)およびb)は、制限酵素切断および連結ではなく相同的組換えに基づく「高スループット」クローニングを促すクローニング部位に隣接する。図2(D)で概略的に示すように、クローニング部位は、E.coliに対する致死性遺伝子(この場合ccdB遺伝子)に隣

10

20

30

40

50

接するバクテリオファージラムダの a t t R 1 および a t t R 2 組換え部位を含む。

【 0 0 4 2 】

D N A 断片をこのベクターにクローニングする代替方法（図 2 (D) では不図示）は、このベクターの変形から成り、 c c d B D N A 配列は更に少なくとも 1 つの特異的制限部位を含み、その少なくとも 1 つの特異的制限部位は S r f I 制限部位等の平滑末端制限部位であることが好ましい。その少なくとも 1 つの特異的制限部位へ D N A 断片を挿入すると、 c c d B 遺伝子の不活性化、更には致死性 c c d B 遺伝子の不活性化を招く。

【 0 0 4 3 】

図 2 (D) に示すベクターの更なる変形には、 a t t R 1 および a t t E 2 が存在しない。このようなベクターは少なくとも 1 つのクローニング部位を含み、前記少なくとも 1 つのクローニング部位は c c d B 配列から成り、前記 c c d B 配列は更に少なくとも 1 つの特異的制限部位を含み、その少なくとも 1 つの特異的制限部位は S r f I 制限部位等の平滑末端制限部位であることが好ましい。その少なくとも 1 つの特異的制限部位へ D N A 断片を挿入すると、 c c d B 遺伝子の不活性化、更には致死性 c c d B 遺伝子の不活性化を招く。

【 0 0 4 4 】

c c d B ヌクレオチド配列および / または a t t R 部位 (R 1 および / または R 2) を含むこれらのクローニング部位は、 Life Technologies, Inc. が市販する GatewayTM クローニングシステムから得られる。GatewayTM クローニングシステムについては、 Hartley 他の W O 9 6 / 4 0 7 2 4 (P C T / U S 9 6 / 1 0 0 8 2) で詳細に説明されている。ここに記載の本発明のこの局面によるベクターの実施例は p G N 3 9 である。

【 0 0 4 5 】

図 2 (E) および図 2 (F) は本発明による更に別のタイプのプラスミドクローニングベクターを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータ e) および f) を備えるインタープロモータ領域 c) に隣接する、向かい合わせのプロモータ a) および b) を含む。図 2 (E) に示す実施の形態において e) および f) は、 T ATM クローニングによる P C R 産物の「高スループット」クローニングを促すクローニング部位に隣接する。このクローニング部位は、 2 つの同一の制限部位が隣接するスタッファー D N A を含み、この 2 つの同一の制限部位に特有の酵素は、オーバーハングする T ヌクレオチドを生成する。この場合、制限部位は X c m I 部位であるが、その他に、オーバーハングする T ヌクレオチドを生成するために切断された部位を用いても同様の効果が得られる。オーバーハングする T ヌクレオチドは、オーバーハングする A ヌクレオチドを含む P C R 産物のクローニングを促す。この原理は T ATM クローニングとして周知である。オーバーハングする T ヌクレオチドに酵素トポイソメラーゼを連結させることで、オーバーハングする T ヌクレオチドに、切断されたベクターを「トポメライズ」することができ、図 2 (F) で概略的に示すタイプのクローニングベクターを生成する。また、その結果生じたベクターは、 T O P OTM クローニングとして周知の原理によって P C R 産物のクローニングを促す。

【 0 0 4 6 】

T O P OTM および T ATM クローニングシステムは両方とも本発明で説明したベクターに関するものではないが、 Invitrogen から市販されている。 T O P OTM クローニングシステムについては、 Shuman の W O 9 6 / 1 9 4 9 7 (P C T / U S 9 5 / 1 6 0 9 9) で詳細に説明されている。 T ATM クローニングシステムについては、 Hernstadt 他の W O 9 2 / 0 6 1 8 9 (P C T / U S 9 1 / 0 7 1 4 7) で詳細に説明されている。

【 0 0 4 7 】

図 2 (B) 乃至図 2 (F) では、図 1 (A) で示すタイプのベクター内に別のクローニング部位を組み込んだものを示すが、これらのクローニング部位は本発明の何れの D N A 構築物（図 1 (B) 乃至図 1 (E) で概略的に示される D N A 構築物を含む）にも組み込むことができるることは、当該技術分野に精通した読者であれば容易に理解できよう。

【 0 0 4 8 】

R N A i 技術における本発明の D N A 構築物の用途

10

20

30

40

50

前述のように、本発明のDNA構築物／ベクターは、RNAi技術で用いる2本鎖RNAの生成において主として適用される。詳細には、この構築物はネマトーダ線虫C. elegansのインビオRNAiプロトコルで有用である。

【0049】

C. elegansでは、従来からdsRNAを線虫に注入することによりRNAiを行っていた。これらの方法については、国際出願番号WO 99/32619でFire他により詳細に説明されている。一言で言えば、市販のインビトロ転写キットを用いて、RNAの両鎖をインビトロで生成する。RNAの両鎖はdsRNAを形成することが可能となり、その後dsRNAがC. elegansに注入される。本発明者が開発した新しいベクターシステムは、従来方法に大幅な改良を加えた。第一に、例えばベクターpGN9等は2つの同一プロモータを用いて、1つのステップでRNAを生成することができる。第2に、より重要であるが、ターミネータが存在することで、クローン化された目的の断片に限って転写が行われるので、転写物およびそれに伴って形成されたdsRNAはより特異的となる。この結果、より効率的なRNAiが得られる。

10

【0050】

C. elegansでRNAi実験を行うための更なる方法については、Plaetinck他のWO 00/01846で説明されている。この方法では、dsRNAを生成するバクテリアをC. elegans線虫に与える。あたかもdsRNAが注入されたかのように、dsRNAは線虫の腸バクテリアを通過し、同様のRNAiを誘発する。これらの実験に関しては、E. coli株はHT115(DE3)であることが好ましく、C. elegans株はnuc-1;gun-1であることが好ましい。また、有効なdsRNAに限って生成されるので、以下の実施例で示すように、本発明によって提供される改良型ベクターはこの方法におけるRNAiの効率も向上させる。

20

【0051】

また、RNAiを行う別 の方法が、Plaetinck他のWO 00/01846で説明されている。一言で言うと、この方法は線虫自体でdsRNAを生成することに基づくものである。これは、上記のベクターに線虫プロモータを用いることによって行うことができる。またベクターに存在する非C. elegansプロモータに対して特異的なポリメラーゼを発現するトランスジェニック(形質転換)線虫を用いることもでき、このポリメラーゼがdsRNAの転写を促すようとする。プロモータは、T7、T3、SP6 RNAプロモータ等、周知のバクテリオファージRNAプロモータから選択することが好ましく、それによって適切なポリメラーゼの結合にのみ依存する高レベル転写を実現させる利点を提供する。

30

【0052】

幾つかの方法によってプラスミドベクターDNAを線虫に導入することができる。第一に、従来の注入方法(EpsteinおよびShakes編集のMethods in Cell Biology, Vol 48, C. elegans Modern Biological Analysis of an organism)によってDNAを導入することができる。第二に、DNA供給によりDNAを導入することができる。WO 00/01846でPlaetinck他が示すように、プラスミドの宿主であるE. coli株を線虫に与えることにより線虫にプラスミドDNAを導入することができる。E. coli株はOP50またはMC1061もしくはHT115(DE3)であることが好ましいが、その他の株でも本目的に適する。C. elegans株はnuc-1変異株またはnuc-1;gun-1株であることが好ましい。E. coliのプラスミドDNAは腸バクテリアを通過してネマトーダに導入され、その結果、dsRNAが発現する。上記の他のRNAi方法と同様に、新しいベクターシステムを用いることで、特異的dsRNAに限定して生成することができ、RNAiを向上させる。

40

【0053】

下記のその他の図と共に、以下の実験例を参照して本発明は更に理解されるだろう。

【0054】

実施例1 - ベクター構築物

ここで例示するベクター構築物の開始点は、プラスミドpGN1であった。このプラスミ

50

ド（出願人の同時係属国際出願番号WO 00/01846に記載）はマルチクローニング部位に隣接する向かい合わせの2つのT7プロモータを含む。

【0055】

ベクター構築物は、当該技術分野において周知の、例えばF. M. Ausubel他(編集人)のCurrent Protocols in Molecular Biology(1994年John Wiley & Sons, Inc.)で説明される標準的な分子生物学技術に従って実行された。

【0056】

1) pGN9の構築物

最初に、制限酵素EcoRIおよびKpnIによってpGN1を切断した。オリゴヌクレオチドoGN27およびoGN28(図7)をアニーリングすることで2本鎖断片を生成し、その後EcoRI/KpnIで切断されたベクターに結合させた。その結果生じたプラスミドを、XbaIおよび HindIIIによって再び切断した。オリゴヌクレオチドoGN29およびoGN30をアニーリングすることで2本鎖断片を生成し、その後XbaI/HindIIIで切断されたベクターにアニーリングさせた。その結果生じたベクターはpGN9と呼ばれた(図4および図10)。

10

【0057】

2) 更なるクローニングベクター構築物

pGN9のMCSを、BstXI部位が隣接するスタッファーDNAに置換することによってpGN29(図9(A);図11)が生成された。BstXIアダプタは、Invitrogen(Groningen,オランダ)から市販されている。

20

【0058】

pGN39(図9(B);図12)は以下のステップで生成された：pGN29をBstXIで切断した。BstXIアダプタ(Invitrogen (Groningen オランダ))がGATEWAY TMシステム(Life Technologies, Inc.)によって提供されたCassette Aに結合された。Cassette AはattR1, CmR, CcdA, CcdB, attR2を含む。アダプタを有するCassette Aは、その後切断したpGN29に結合され、pGN39Aとなる。pGN39AはccdB遺伝子に特異的SrfI部位を含む。

【0059】

Topo RNA iベクター(図9(C);図13)は以下の方法で生成された：pGN29をBstXIで切断した。プライマoGN103およびoGN104ならびにテンプレートpCDM8(Invitrogen (Groningen, オランダ))を用いてPCRを行い、XcmI部位を含むスタッファーが生成された。PCR産物にBstXIアダプタが結合され、その結果生じたライゲーション産物はBstXIによって切断したpGN29ベクターに結合し、Topo RNA iベクターとなる。

30

oGN103: 5' TACCAAGGCTAGCATGGTTATCACTGATAAGTTGG 3'

oGN104: 5' TACCAAGGCTAGCATGGCCCTGCCTGAAGGCTGC 3'

である。

【0060】

pGN49Aを構築して特異的非平滑制限部位を追加して挿入し、CmR遺伝子pGN39を消失させた。オーバーラップPCRを行った。1回目のPCRはプライマoGN126およびoGN127ならびにテンプレートとしてpGN39Aを用いて行った。プライマoGN128およびoGN129ならびに同様のテンプレートを用いて、第2断片を生成した。その結果生じた断片およびプライマoGN126PおよびoGN129Pを用いてオーバーラップPCRを行い、最終PCR産物を得た。このような最終PCR産物を得るために、BstXIアダプタを結合させ、BstXIで切断したpGN29にライゲーション産物を結合させた。その結果生じたベクターはpGN49Aと呼ばれる。

40

【0061】

コントロールベクターを生成し、pGN49Aクローニングベクターの効率を試験した。このようなベクターはT7ターミネータではなくT7プロモータを含むものとする。この

50

ため p G N 4 9 A の X b a I インサートは切り離され、同様の制限酵素で切断した p G N 1 にクローニングされた。その結果生じたベクターは p G N 5 9 A と呼ばれる。

```
oGN126 pGATCTGGATCCGGCTTACTAAAGCCAGATAACAGTATGC
oGN127 GGAGACTTTATCGCTTAAGAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACC
oGN128 :
CCAGTGCACGTCTCTTAAGCGATAAAGTCTCCCGTGAACTTACCCGGTGG
oGN129 pGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTATTCAGGAG
```

である。

【 0 0 6 2 】

実施例 2 - R N A における改良型ベクターの実用性を示す

10

この実験の目的は、先行技術で周知のベクターと比較して、2本鎖 R N A 阻害における本発明の改良型ベクターの効率が向上したことを見ることであった。生成される d s R N A が有効であるほど、R N A i 機能も向上するので、システム効率の大幅な上昇が見込まれた。コンセプト実験のこのような実証に関する実験システムは、d s R N A を供給した p G N - 2 (- ターミネータ) および p G N - 1 2 (+ ターミネータ) と共にコントロール兼ダイリュータとしての P G N - 1 (空ベクター) を用いた sup 3 5 の R N A i によって、n u c - 1 / p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s C. elegans 变異体中 2 5 での C. elegans 生存率を測定することである。p h a - 1 t s / sup - 3 5 变異については Schnabel の W O 9 9 / 4 9 0 6 6 で詳細に説明されている。

【 0 0 6 3 】

20

C. elegans の n u c - 1 变異によって、野生型 C. elegans よりも優れた取り込み能力 (d s R N A 複合体の取り込み等) を示す C. elegans 株を提供する。この变異体を主要 D N A se で消失させる。本発明者は先の同時係属出願で、ネマトーダに d s R N A を供給することにより、この C. elegans 株が R N A i の向上をもたらすと証明している。

【 0 0 6 4 】

p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 变異によって、变異体 C. elegans 株に 1 5 で生存し、2 5 で死滅する表現型を提供する。sup - 3 5 発現の阻害によってこの致死性を抑制できる。従って、sup - 3 5 の R N A i は、2 5 で p h a - 1 (e 2 1 2 3) の生存を助けるものがよい。sup - 3 5 から d s R N A を発現させる場合、本発明のベクターは、2 5 での p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 变異体の生存率では、ターミネータを含まないベクターと比較して sup - 3 5 R N A i の効率を上昇させるものがよい。

30

【 0 0 6 5 】

空ベクターとしてベクター p G N 1 が用いられた。ベクター p G N 2 (- ターミネータ) は sup - 3 5 D N A の宿主となり、適切な宿主に導入された場合に sup - 3 5 d s R N A を発現させるベクターである。このベクターには転写ターミネータを挿入しない。ベクター p G N 1 2 (+ ターミネータ) は上記のようなベクターで、転写ターミネータを含み、それによって適切な宿主に導入された場合に改良型 d s R N A が生成される。従って、このベクターは 2 つの一方向性転写ターミネータを有し、両ターミネータともインターモータ領域内に配置され、sup - 3 5 断片に隣接する。後者のベクターを用いることで、システム効率の上昇 (ここでは 2 5 で p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 变異体の生存率が向上することを意味する) が見込まれた。

40

【 0 0 6 6 】

実験条件

1 2 ウェルのマイクロタイプラートを 1 ウェルにつき約 2 m l の N G M アガード満たした。(1 リットルの N G M アガード：アガード 1 5 g と、ペプトン 1 g と、N a C l 3 g と、コレステロール溶液 1 m l (5 m g / m l i n E t O H) とをオートクレーブした後、0 . 1 M C a C l 2 9 . 5 m l と、0 . 1 M M g S O 4 9 . 5 m l と、1 M K H 2 P O 4 / K 2 H P O 4 バッファ (p H 6) 2 5 m l と、アンピシリン (1 0 0 μ g / 1) と、0 . 1 M I P T G 5 m l と、ナイスタチン溶液 5 m l (1 : 1 E t O H : C H 3 C O O N H 4 7 . 5 M に 1 0 m g / m l で溶解) とを無菌状態で加える。

50

【 0 0 6 7 】

プラスミドによって形質転換したバクテリア H T 1 1 5 (D E 3 : Fire A, Carnegie Institution、メリーランド州ボルチモア) の一夜培養液約 5 0 μ l を乾いたプレートにたらす。1日目は、生育段階 L 4 のネマトーダをそれぞれ 1 つずつウェルに載せた。各ウェルにネマトーダ (P 1) 1 個とする。2日目に、P 1 ネマトーダを新しいウェルにのせ、一日放置して培養させる。同様の手順を 3 日目も繰り返した。すべてのプレートを 2 5 度更に培養し、子孫を形成させた。子孫数をカウントして、S u p 3 5 R N A i に誘発された生存数を測定した。

【 0 0 6 8 】結果

10

S u p - 3 5 d s R N A を発現させる E. coli を与え、C. elegans n u c - 1 / p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 変異体における R N A i 実験である。

【 0 0 6 9 】**【表 1】**

セットアップ:

コントロールとしてのpGN1

pGN2 (sup 35 - Term.)

pGN12 (sup 35 + Term.)

pGN2 + pGN1 希釀 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 10
 pGN12 + pGN1 希釀 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

条件:

インキュベーション温度 25°C

読み出し:

子孫のカウント (成体雌雄同株)

20

pGN1 (コントロール)

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN2 (希釀なし)

pGN12 (希釀なし)

30

1日目	12	4	48	32
2日目	24	23	80	85
3日目	5	0	9	16

1日目	16	29	37	14
2日目	27	22	57	2
3日目	1	2	4	1

pGN 2+1, 1/2 希釀

pGN 12+1, 1/2 希釀

40

1日目	0	7	0	2
2日目	9	10	0	3
3日目	0	2	0	0

1日目	22	28	103	61
2日目	36	45	53	40
3日目	3	3	25	1

pGN 2+1, 1/4 希釀

1日目	28	23	0	0
2日目	6	3	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/4 希釀

1日目	*	6	36	5
2日目		24	55	3
3日目				

10

pGN 2+1, 1/8 希釀

1日目	0	0	4	0
2日目	0	0	11	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/8 希釀

1日目	31	12	16	38
2日目	4	5	37	4
3日目	0	0	2	1

20

pGN 2+1, 1/16 希釀

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	1 少量
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/16 希釀

1日目	1	0	0	0
2日目	2	0	0	1
3日目	0	1	1	1

30

pGN 2+1, 1/32 希釀

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/32 希釀

1日目	0	0	1	0
2日目	0	L2	3	0
3日目	2	0	L3-L4	0

40

* 母死

結論

予測したように、pGN 1 の宿主であるバクテリアを与えた線虫では、この温度での pH a - 1 変異の致死効果に因り、生存能力のある子孫は確認されなかった。pGN 2 または pGN 12 の宿主である E. coli をネマトーダに与えると、何れの場合も生存能力のある子孫が確認された。これは sup - 35 の dsRNA を線虫に与えたことによる。2つの

50

供給実験における顕著な違いは希釈列において見られる。pGN2の宿主であるバクテリアを、pGN1の宿主であるバクテリアで希釈する場合、1/2の低希釈度であっても子孫数は激減する。この希釈列は、適切なRNAiを誘発するためには高レベルdsRNAが必要であることを示唆する。pGN12の宿主であるバクテリアを用いた供給実験では、1/8の希釈度でもかなりの数の子孫が観察されている。これは、pGN12の宿主であるバクテリアにおいて、より一層効果的なdsRNAが形成されることを示唆する。ベクターに上記のようなdsRNAを発現させるターミネータ配列を加えることで、RNAi効果の発生において大きな利点を提供することを、この実験が明確に示している。

【0070】

実施例3：T7ターミネータ（pGN49対pGN59）を用いた場合と、用いない場合のベクターのRNAi効率を比較する

3種類の異なる遺伝子をベクターpGN49AおよびpGN59Aにクローニングした。平滑末端を作るPfuI DNAポリメラーゼで遺伝子断片を増幅してクローニングを行うようにし、これらのベクターでクローニングを促した。このようなPCR断片はSrfIで切断したベクターにクローニングされた。クローンに正しい断片が挿入されたことがPCRによって確認された。ds発現およびRNAiによって、子孫の表現型が致死性となるよう断片を選択する。この手順によって素早く容易にRNAiにおける2つのベクター（pGN49、pGN59）の効率を比較することが可能となる。

【0071】

【表2】

10

20

プラスミド	遺伝子(acedb)	ベクター バックボーン5
pGW5	B0511.8	pGN49A
pGW9	C01G8.7	pGN49A
pGW11	C47B2.3	pGN49A
pGW17	B0511.8	pGN59A
pGW21	C01G8.7	pGN59A
pGW23	C47B2.3	pGN59A

30

40

標準的手法によって、すべてのプラスミド(pGW系列)をE.coli AB301-105(DE3)バクテリアで形質転換させる。その後LB/amp中で37℃に保ち、14~18時間バクテリアを繁殖させる。これらの培養物を遠心分離機にかけ、バクテリアのペレットは1mM IPTGおよび100μg/μlアンピシリンを含有するS完全バッファに溶解した。

【0072】

100μlのS-完全バッファ（終濃度1mM IPTGおよび100μg/μlアンピ

50

シリンを含有する)および10μlのバクテリア溶液を含む96ウェルプレートにおいて、3個のネマトーダを各ウェルに入れた。ネマトーダはL1生育段階のものであった。プレートは25℃で5~6日間培養された。幼虫の発育や子孫F1の発生についてプレートを毎日検査する。

【0073】

結果

構築された各プラスミドに対して8倍の効率でRNAiが行われた。この結果は、T7ターミネータをベクターバックボーンに挿入すると、予測された表現型が100%発生することを示す。T7ターミネータを用いない場合、再現性は最大50%まで低下することもある。その前の実験と同様に、結果では、ターミネータを追加することによりRNAi機能が著しく向上することを示す。10

DNA断片	B0511.8	B0511.8	C01G8.7	C01G8.7	C47B2.3	C47B2.3
ベクター	pGN49A	pGN59A	PGN49A	pGN59A	pGN49A	pGN59A
発生プラスミド	PGW5	PGW17	PGW9	PGW21	PGW11	PGW23
致死率	100	75	100	87.5	100	50
子孫発生率	0	25	0	12.5	0	50

【0074】

【表3】

20

テンプレート pCDM8上で、oGN103及びoGN104プライマーによって
作り出されたPCR断片

TACCAAGGCT AGCATGGTTT ATCACTGATA AGTTGG
 ATAAGTTGGT GGACATATTA TGTTTATCAG TGATAAAAGTG TCAAGCATGA
 CAAAGTTGCA GCCGAATACA GTGATCCGTG CCGGCCCTGG ACTGTTGAAC 10
 GAGGTCGGCG TAGACGGTCT GACGACACGC AAACCTGGCGG AACGGTTGGG
 GGTGCAGCAG CGGGCGCTTT ACTGGCACTT CAGGAACAAG CGGGCGCTGC
 TCGACGCACT GGCGAAGCC ATGCTGGCGG AGAACATAC GCTTCGGTGC
 CGAGAGCCGA CGACGACTGG CGCTCATTTC TGATCGGGAA TCCCGCAGCT
 TCAGGCAGGC CCATGCTAGC CTTGGTACCA GCACAAATGG

20

pGN49Aを作り出すために使われた、オーバーラップ
PCR断片

gatctggatccggcttactaaaagccagataacagtatgcgtattgcgcgctg
 atttttcggtataagaatatatactgatatgtataccgaagtatgtcaaaaa
 gaggtgtgctatgaaggcagcgtattacagtacagttgacagcgcacagctatca
 gttgctcaaggcatatatgtcaatatctccggctggtaagcacaaccatg
 cagaatgaagccgtcgctgcgtgccgaacgctggaaagcggaaaatcaggaa 30
 gggatggctgaggtcgccccggttattgaaatgaacggcttttgctgacgag
 aacaggactggtaaatgcagttAACCTATAAAAGAGAGAGCCG
 ttatcgctgttgtggatgtacagagtatattgacacacgcccggcga
 cggatggtgatccccctggccagtgcacgtctttaagcgataaagtctccc
 gtgaactttaccgggtggtgcataatcgggatgaaagctggcgatgtac
 caccgatatggccagtgtgccgtccgttatcgaaaagaagtggctgat
 ctcagccaccgcggaaaatgacatcaaaacgccattaacctgatgttctggg
 gaatataaatgtcaggctcccttatacacacagc 40

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1】(A)乃至(E)は、本発明によるDNA構築物のそれぞれ異なる実施の形態の概略図であり、プロモータおよび転写ターミネータエレメントの相対的配置を示す。

【図2】(A)は、比較のために付した、先行技術のクローニングベクターの概略図で

50

ある。(B)乃至(E)は、本発明によるDNA構築物の更なる実施の形態の概略図であり、インター・プロモータ領域内の異なるクローニング部位の活用を示す。

【図3】 pGN1を図示(プラスミドマップ)する。

【図4】 pGN9を図示(プラスミドマップ)する。

【図5】 プラスミドpGN1の断片のヌクレオチド配列を図示し、向かい合わせのT7プロモータの位置を示すために注釈をつけた。

【図6】 T7転写ターミネータのヌクレオチド配列を示す。

【図7】 T7転写ターミネータをpGN1に挿入するために用いるオリゴヌクレオチド配列、oGN27、oGN28、oGN29、oGN30を示し、T7polターミネータ配列の位置および様々な制限部位の位置がマークされている。 10

【図8】 プラスミドpGN9の断片のヌクレオチド配列を図示し、向かい合わせのT7プロモータおよびT7転写ターミネータの位置を示すために注釈をつけた。

【図9】 (A)は、pGN29を図示(プラスミドマップ)し、(B)はpGN39を図示(プラスミドマップ)し、(C)はプラスミドTopoRNAiを図示(プラスミドマップ)する。

【図10】 プラスミドpGN9の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図11】 プラスミドpGN29の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図12】 プラスミドpGN39の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図13】 プラスミドTopoRNAiの完全なヌクレオチド配列を示す。

【図14】 プラスミドpGN49Aの完全な配列を示す。 20

【図15】 プラスミドpGN59Aの完全な配列を示す。

【図16】 pGN49Aを図示(プラスミドマップ)する。

【図17】 pGN59Aを図示(プラスミドマップ)する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DEVGEM NV
<120> VECTOR CONSTRUCTS
<130> SCB/55178/001
<140>
<141>
<160> 21
<170> PatentIn Ver. 2.0 10
<210> 1
<211> 160
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fragment of pGN1 containing opposable T7 promoters

<400> 1
ttgttaatacg actcaactata gggcgaattc gagctcggtt cccggggatc ctcttagagtc 60
gaaagttctt cgccctatacg tgagtcgtat tacagtttgta gtattctata gtgtcaccta 120
aatagttgg cgtaatcatg gtcatacg 160

<210> 2 20
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: DNA sequence containing a T7 terminator

<400> 2
actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg 49

<210> 3
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN27

<400> 3
aattcaaaaa acccctcaag acccggttag aggcggcaag gggtttatgtt agtgaattct 60
gcagcggtac 70

<210> 4
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 40

Oligonucleotide oGN28

<400> 4
cgctgcagaa ttcactagca taaccccttg gggcctctaa acgggtcttg agggggttttt 60
tg 62

<210> 5
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN29

<210> 6
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide cGN30

<400> 6
agctcaaaaa acocctcaag acccgtttag aggccccaaag gggttatgct agtaagctta 60
ccgtt 65

<210> 7
<211> 230
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fragment of
plasmid pGN9 containing opposable T7 promoters and
T7 transcription terminators

```
<400> 7
ttgttaatacgtt actcaactata gggcgaaatcc aaaaaaccccccc tcaagaccccg ttttagaggcc 60
ccaagggggtt atgctagtgtt atttcgtcagg gtacccggggg atcctctaga cgcgttaagct 120
tactagcata acccccttgggg gcctctaaac gggtcttgat gggttttttt agctctcgc 180
ccctataqtgtt gtcgtattac agcttqagta ttctatactt tcacctaataat 230
```

```
<210> 8
<211> 3323
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGNA

<400> 8
gagtgccacca tatgcggtgt gaataccgc acagatcggt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcggaaatgt taaacgttaa tattttgtta aaatttcgggt taaaatatttgc 120
tcatttttttta accaaataggc cggaaatcggt cggaaatccgtt ataaaatccaaa agaatagacc 180
ggatcgttgggt tgatgttgtt tcggatgttg aacaatcgctt cactattaaatggatcgac 240

tccaaacgtca	aaggcgaaa	aaccgtctat	cagggcgatg	gcccaactacg	tgaaccatca	300
cccaaataa	gtttttgcg	gtcgaggcgc	cgttaagctc	taaatcgaa	ccctaaagg	360
agcccccgat	tttagagctt	acggggaaag	ccggcgacg	tggcgagaaa	ggaagggaag	420
aaagcgaaag	gagcgccgc	tagggcgctg	gcaagtgtag	cggtcacgc	g cogtaacc	480
accacacccg	cogcgctta	tgcgcgccta	cagggcgctg	ccattcgcca	ttcaggctgc	540
gcaactgtt	ggaaggcgca	tcggtgccgg	cctcttcgtt	attacgccc	ctggcgaaag	600
ggggatgtc	tgcaaggcga	ttaagtgggg	taacgcccgg	gttttccag	tcacgacgtt	660
gttaaacacac	ggccactgtt	ttgttaatc	actctacta	ggcgaaattc	aaaaaacccc	720
tcaagaccc	tttagaggcc	ccaaagggggtt	atgttagtga	attctcgagg	gtacccgggg	780
atccctctaga	cgcgtaaat	tactagcata	accccttggg	gcctctaaac	gggtcttgag	840
gggtttttt	agcttctcgc	cctatagtga	gtcgattac	agctttagta	ttctatagt	900
tcacctaata	agcttggct	aatcatggtc	atagctgtt	cctgtgtgaa	atttgttatcc	960
gtccacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaaag	tgtaaaagct	gggggtgccta	1020
atgagtgagc	taactcacat	taattgcgtt	gcgcactctg	cccgctttcc	agtccggaaa	1080
cctgtcgctc	cagctgcatt	aatgaatcg	ccaaacgcgc	gggagaggcg	gtttgcgtat	1140
tgggcgcct	tccgcgttct	cgctcaactg	ctcgctcgcc	tcggtgcttc	ggctgcggcg	1200
agccgtatca	gtcactca	aggcggttac	acggttatcc	acagaatc	ggataacgc	1260
aggaaagaac	atgtgagca	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	1320
gtggcggtt	ttcgcgttgc	tccgcgttcc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	1380
tcagagggtt	cgaaacccga	caggactata	aaatccatc	gcgttcccc	cttggaaagct	1440
cctcgctgc	tctccgttcc	cgaccctg	gcttaccgg	tacctgtcc	ccttctccc	1500
ttcgggaa	gtggcgctt	ctcatagctc	acgctgtt	ttatctcgtt	cggtgttaggt	1560
cggtcgctcc	aagctggct	gtgtgcacga	accccccgtt	cagcccgacc	gctgcgcott	1620
atcccgtaac	tatcgctt	atgtccaaaccc	gtttaagacac	gacttacgc	cactggcagc	1680
agccacttgg	aacaggatta	gcagagcgc	gtatgttagc	ggtgtacag	agttcttgaa	1740
gtggggcc	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgc	ctctgtcaa	1800
gcccgttacc	ttcgaaaaaa	gagttggtag	ctcttgcattt	ggcaaaacaaa	ccacccgtgg	1860
tagcggtgt	ttttttgtt	gcaaggcagca	gattacgccc	agaaaaaaag	gatctcaaga	1920
agatccctt	atctttctt	cgggtctga	cgctcgttgg	aacgaaaact	caogttaaagg	1980
gatttggc	atgagattt	caaaaaggat	cttacccat	atcctttttt	ataaaaatgt	2040
aagttttaaa	tcaatctaa	gtatata	gtaaacttgg	tctgcacgtt	accatgttt	2100
aatcgttgc	gcacccatct	cagcgatct	tctatttctt	tcatccatag	ttgcctgact	2160
ccccgtcg	tagataacta	cgatacggg	gggttacca	tctggccca	gtgctgcaat	2220
gataccgg	gaccacgc	caccggctt	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	2280
aaggccgag	cgcagaaatg	gtccctgcaac	tttatccgc	tccatccagt	cttataattt	2340
ttgcgggaa	gttagagtaa	gtatgtcgcc	agttatagt	ttgcgcac	ttgttggcat	2400
tgctacaggc	atcggtgtt	cacgctcg	gtttggat	gcttcattca	gctccgggtt	2460
ccaaacgatca	aggcgaggta	catgatcccc	catgttgc	aaaaaaacgc	ttagctcc	2520
cggtccctcc	atcggttca	gaagtagtt	ggccgcagtg	tttactac	tggttatggc	2580
agcactgc	aattcttta	ctgtcatgc	atccgtaa	tgctttctg	tgactgggt	2640
gtactcaacc	aagtcttct	gagaatacc	cgcccgccg	ccgagggtct	tttgcggc	2700
gtcaatacgg	gataatagt	tatgacatag	cagaacttt	aaagtgc	tcatggaaa	2760
acgttcttgc	ggcgaaaac	tctcaaggat	cttacccgt	ttgagatcc	gttgcgtt	2820
accactctgt	gcacccaact	gatcttc	atctttact	ttcaccagcg	tttgcgggt	2880
agcaaaaaca	ggaaggc	aaatgcgaaa	aaagggata	agggcgacac	gaaaatgtt	2940
aatactata	ctcttc	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	3000
gagcggtat	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaca	atagggtt	cgccgcacatt	3060
tcccccggaa	gtgcaccc	acgtctaa	aaccattt	atcatgacat	taacccatata	3120
aaataggcg	atoacggc	cccttcgtt	cgccgtt	ggtgtatgac	gtaaaaaccc	3180
ctgacacat	cagctcccg	agacggtcac	agttgtct	taagcggat	ccgggagcc	3240
acaagccgt	caggccgcgt	cagcggtgt	tggcggtgt	cgggcttgc	ttaactatgc	3300
ggcatcagag	cagattgtac	tga			3323	

<210> 9
<211> 3774
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN29


```
tcgcgcgttt cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta 3660  
cagcttgtct gtaaggcgat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcggtgt 3720  
ttggcggttg tcggggctgg cttaaactatg cggtatcaga gcagattgtt ctga 3774
```

<210> 10
<211> 5148
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN39

<400> 10
 taatacgaact cactataggg cgaattcaaa aaaccctca agaccgttt agaggcccc 60
 aggggttatg ctatgttaatt ctgcagcggt acccgggat cctctagaga tccctcgacc 120
 tcgagatcca ttgtgttgcgaa aagatcacaa gtttgcataaa aaaagctgaa cgagaaacgt 180
 aaaatgatataaatatcaat atattaattt agatgttgcataaaaaacag actacataat 240
 actgtaaaac acaacatcatc cagtcaactat accttgcgttgcataatgtgtg 300
 aggactaag gaagctaaaa tgagaaaaaa aatctgcataatccaccgg 360
 ccaatggcat cgtaaagaac atttgcggc 420
 ccagaccgtt cagctggata ttacggcc 480
 gttttatccgcgcctt acatcttcgcataatggatgt 540
 tatggcaatg aaagacggtg agctggatgt 600
 ttccatcatgaa caaactgaaa cgttttcataatggatgt 660
 gcagtttgcataat cacaatattt cgcagaatgt 720
 ccctaaagggttatttgcataat atatgtttt 780
 cagtttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 840
 cttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 900
 cttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 960
 cttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1020
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1080
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1140
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1200
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1260
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1320
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1380
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1440
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1500
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1560
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1620
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1680
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1740
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1800
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1860
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1920
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 1980
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2040
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2100
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2160
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2220
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2280
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2340
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2400
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2460
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2520
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2580
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2640
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2700
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2760
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2820
 gttttgcataatggatgttgcataatggcaatattt acgcggcgcgcaaaagggt 2880

```
<210> 11  
<211> 3715  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid
TopoRNAi

```

<400> 11
gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatac 60
ggcggaaattt taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatcagc 120
tcatttttt accaataggc cggaaatcgcc aaaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
gagatagggt tgagttgtgt tcaggatggg aacaagagt cacttataa gaacgtggac 240
tccaaacgtca aaggggcgaaa aaccgtctat caggggcatg gcccactacg tgaaccatca 300
ccccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtgc cgtaaagctc taaatcgaaa ccctaaaggg 360
agccccctgt tttagacttg acggggaaag cccgcgaacg tggcgagaaa ggaaggggaaag 420
aaagcgaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cgggtacgcgt ggcgtaaacc 480
accacacccg ccgcgtttaa tgccgcgtta caggggcggt ccattcgcca ttcaaggctgc 540
gcaactgttg ggaaggggcgta tcgggtgcggg cctcttcgtt attacgcccag ctggcgaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcgta ttaagtggg taacgcagg gttttcccg tcaacgacgtt 660
gtaaaaacgac ggccagtgaa ttgtataacg actcactata gggcgaattt aaaaaacccc 720

```

tcaagaccgg ttttagaggcc ccaagggtt atgctagtga attctgcagg gtacccgggg 780
 atccctttaga gatccctcgat cctcgagatc catttgtgggtt gaatttctacc aaggctagca 840
 tgggcagccg aatacagtga tcctgtccgg ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga 900
 cggctctgacg acacgaaac tggcggaaacg gttgggggtt cagcagccgg cgctttactg 960
 gcacttcagg aacaagccgg cgctgtcgat cgcactggcc gaagccatgc tgccggagaa 1020
 tcatacgctt cgggtcccgag agccgacgac gactggcgct cattttgtat cggaaatccc 1080
 gcagccatgc tagcccttggt aagaattccac cacaatggat ctgcagggtt ctccatacc 1140
 taccaggttt gogotcgcg gtcgcggccg cgactctota gacgctaaatg cttaactagca 1200
 taacccttg gggccttaaa acgggtcttg agggttttt tgagtttccgcctataatg 1260
 gagtcgtttaa acatgttag tatctatag tgcacccat aaatgtggc gtaatcatgg 1320
 tcatacgctgt ttccctgtgt aaattgttat ccgcacacaa ttccacacaa catacgagcc 1380
 ggaagcataa aqgttaaago ctggggtgcc taatgatgt gctaactcac attaattgcg 1440
 ttgcgctcac tgccccgtt ccagtcggga aaccctgtcg tccagctgca ttaatgaatc 1500
 ggccaacccg cggggagagg cggttgcgtt atggggcgctt ctccgcgttact 1560
 gactcgctgc gtcgggtcgat tcggctcggtt cgagcggtat cagctactaa aaaggccgtt 1620
 atacggttat ccacagaatc aggggataaac gcagggaaaga acatgtggc aaaaggccag 1680
 caaaaaggccca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgtccgggtt ttttgcataatg gtcggccccc 1740
 cctgacgacgat atcacaaaaaa tcgacgtcata gtcgggttgcgtt ccgcgttgcgtt 1800
 taaaagatacc aggcgttcc ccctggaaatc ccttcgtgtt ccgcgttgcgtt 1860
 ccgcgttaccat gatacgtcgc cgccttcttc ttgcgtgttgcgtt ccgcgttgcgtt 1920
 tcacgtgtat ggtatctcg ttccgggttgcgtt gtcgttgcgtt ccaagctggg ctgtgtgcac 1980
 gaaccccccgg ttcagcccgat ccgcgtgcgc ttatccgttactatgtct tgagtccaaac 2040
 ccggtaagac acgacttatac gcaactggca aggtatgtat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt 2100
 aggtatgtat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga 2160
 agacagttat ttggtatctg cgcgttgcgtt aagccagttt ccgcgttgcgtt 2220
 agctcttgcgtt ccgcgttgcgtt aaccacccgtt ggtacgggtt gttttttgtt ttgcgttgcgtt 2280
 cagattacgc gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt aagatctcaatg gtcgttgcgtt 2340
 gacgttgcgtt ccgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt aagatctcaatg gtcgttgcgtt 2400
 atcttcacccat agatctttt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2460
 gatgttttttccat agatctttt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2520
 tgcttatttc gttcatccat agttgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2580
 gaggggttac catctggccc cagtgtcgat ccgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt 2640
 ccagattttat cagaataaaa ccagccagcc actttatccgc cctccatccat gtcgttgcgtt 2700
 ccgttataat gtttgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2760
 tggatgttccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2820
 cccatgttgtt gcaaaaaaaagg gtttagctcc tggatgttccat gtcgttgcgtt 2880
 ttggcccgat gtttacatccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 2940
 ccatccgtaa gatgttgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3000
 cgcgcggccgc gaccggatgtt ccgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3060
 agcagaacctt taaaatgtgttccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3120
 atcttaccgc tggatgttccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3180
 gcatctttat ctttccacccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3240
 aaaaaggggaa taaggccgcac accggaaatgt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3300
 tattgaagca ttatcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3360
 aaaaataaaac zaatagggttccgcgcaca tggatgttccat gtcgttgcgtt 3420
 gaaaccatca ttatcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3480
 ctccgcgtt tggatgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3540
 acagctgttgcgtt ccgcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3600
 tggatgttccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3660
 gttggcggtt gtcggggcttccat gtcgttgcgtt ccgcgttgcgtt tggatgttccat gtcgttgcgtt 3715

```
<210> 12
<211> 4107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN49A

<400> 12
tgcataatcg a ctcactatag ggcgaattca aaaaacccct caagaccggt ttagaggccc 60

40

caagggggtta	tgcgtatgtaa	ttctcgacgg	gtacccgggg	atcccttaga	gatccctcga	120
cctcgagatc	catttgctg	gaaaggatct	ggatccggct	tactaaaagc	cagataacag	180
tatgcgtatt	tgcgcgctg	tttttgcgggt	ataagaatat	atactgatata	gtataccgg	240
agtatgtcaa	aaagagggtgt	gctatgaagc	agcgttattac	agtacaggtt	gacagcgaca	300
gctatcgtt	gctcaaggca	tatatgtgt	caatacttcc	ggtcgttggaa	gcacaaccat	360
gcagaatgaa	gcccgtcgct	tgcggtccga	acgctggaaa	gccccaaatc	aggaaggggat	420
ggctgagggtc	gccccgttta	ttgaaatgaa	cggcttcttt	gctgacgaga	acaggactg	480
gtgaaatgtca	gtttaagggtt	tacacctata	aaagagagag	ccgttacgt	cttttgtgg	540
atgtacagag	tgatattatt	gacacgcccc	ggcgcacggat	ggtgtatccc	ctggccagg	600
cacgttctt	aaggataaa	gtctccctgt	aactttaccc	ggtggtgcata	atcggggatg	660
aaagctggcg	catgtgacc	accgatata	ccagtgccc	ggtctccgtt	atcggggaaag	720
aagtggctga	tctcagccac	cggaaaaatg	acataaaaaa	cgccattaac	ctgtatgttct	780
ggggaaatata	aatgtcaggc	tcccttatac	acagccttcc	cagcacaatg	gatctcgagg	840
gatcttcat	acctaccgt	tctgcgcctg	cagggtcggg	ccgcgactct	agacgcgtaa	900
gcttactatgc	ataaccctt	ggggcctcta	aacgggtctt	gaggggtttt	tttagcttct	960
cgccttatag	tgagtgctgt	tacagcttga	gtattctata	gtgtacccata	aatagcttgg	1020
cgttaatctg	gtcatagctg	tttcctgtgt	gaaattgtata	tcgcgtacata	attccacaca	1080
acatacggc	cggaaagcata	aagtgtttaag	cctgggggtgc	ctaatagtg	agctaactca	1140
cattatgtt	gttgcgtca	ctgcccgtt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	1200
attaatgaat	cggccaaacgc	gccccggagag	ggggtttgcg	tattggggc	tcttcgcctt	1260
cctcgctcac	tgactcgctg	cgcctggcgt	ttcggctgcg	gccccggta	tcagctca	1320
caaaggccgt	aatacgttta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	1380
caaaggccca	gaaaaaggcc	agaaccgtt	aaaaggccgc	gttgcgtggc	tttttcgata	1440
ggctccggcc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgc	aagttaggg	tgccgaaacc	1500
cgacaggact	ataaaagatac	caggcggttc	ccccctggaa	ctccctcg	cgctcttcgt	1560
ttccgcaccc	gcccgttacc	ggataccgtt	ccgcctttct	cccttgcgg	agogtggcgc	1620
tttctcatgt	ctcagcgtgt	agytatctea	ttcgggtgt	gttcgttgc	tccaagctgg	1680
gctgtgtgc	cgaaaccccc	gttcagcccc	accgtgcgc	cttattccgt	aactatcg	1740
tttagtccaa	ccccgttaga	cacgacttat	cgccactg	agcaggact	ggttacagga	1800
tttagcagagc	gaggatgtta	ggccgtgtca	caagatctt	gaagttgtgg	cctaactacg	1860
gctacactag	aaggacacgt	tttggtatct	gctctctgt	gaagcagtt	accttcggaa	1920
aaagagttgg	tagcttctg	tccggcaaac	aaaccaccgc	ttgttagccgt	gttttttttg	1980
tttgcaagca	gcagattacg	cgccggaaaa	aaggatctca	agaagatct	tttagctttt	2040
ctacggggtc	tgacgtctcg	tgaacggaaa	actcacgtt	agggattttt	gtcatgagat	2100
tatcaaaaaag	gatcttcacc	tagatctttt	taaattaaaa	atgaattttt	aatcaatct	2160
aaagtatata	tgagtaaact	tgtctgtaca	gttaccaatg	cttaatcg	gaggcaccta	2220
tctcagcgtat	ctgtcttattt	ctgtcatccca	tagtgcgtt	actcccccgc	gtgtatgataa	2280
ctacgatacg	ggagggttta	ccatctggcc	ccagttgtct	aatgtatcc	cgagacccac	2340
gctcaccggc	tccaggttta	tcagcaataa	accagccage	cggaaggggc	gagcgcagaa	2400
gtggtcctgc	aactttatcc	gcctccatcc	agtcttattaa	ttgttgcgg	gaagctagag	2460
taagtagttc	gccagttaat	agtttgcgca	acgttgttgg	cattgttaca	ggcatcg	2520
tgtcacgtc	gtcggttgg	atggcttcat	tcagtc	ttcccaacga	tcaaggc	2580
ttacatgatc	ccccatgttg	tgcggggaaa	cggttagctc	cttcgttct	ccgatcg	2640
tcagaagttaa	gttgcgcgca	gtgttacatc	tcatgttta	ggcagactg	cataattctc	2700
ttatgtgtat	gccatccgt	agatgtttt	ctgtgtactgg	tgtagtact	accaagtcat	2760
tctgagaata	ccgcggccgg	cgaccgagtt	gtcttgc	ggcgttataa	cggataata	2820
gtgtatgaca	tagcagaact	ttaaaaatgtc	tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggc	2880
aactctcaag	gatcttaccc	ctgttgagat	ccagttcgat	gttacccact	cgtgcaccca	2940
actgatcttc	agcatctttt	actttcacca	gcgttctgg	gtgagcaaaa	acaggaaggc	3000
aaaatgcgc	aaaaaaggga	ataagggcga	cacggaaatg	ttgaatactc	ataacttcc	3060
tttttcaata	ttattgttgc	atttatcagg	gttattgtct	catgagcg	tacatatttg	3120
aatgtatata	aaaaataaaa	caaatagggg	ttccgcgcac	atttccccga	aaatgtccac	3180
ctgacgtcta	agaaaaccatt	attatcatga	cattaaacct	taaaaatagg	cgtatcac	3240
ggccottctc	tctcgccggt	ttcggtatg	acggtgaaa	cctctgacac	atgcagtc	3300
cgagagacgtt	cacagttgt	ctgttaagcg	atgcggggag	cagacaagcc	cgtcaggcc	3360
cgtcagccgg	tgttgcgggg	tgcggggct	ggcttaacta	tcggccatca	gagcaggat	3420
tactgagat	gcaccatatg	cgtgtgtaaa	taccgcacag	atgcgtt	agaaaatacc	3480
gcatcaggcg	aaattgtaaa	cgttaatatt	ttgttaaaat	tcgcgtt	tatttgtt	3540
atcagctcat	tttttaacca	ataggccgaa	atcgcaaaa	tccctataa	atcaaaagaa	3600
tagaccgaga	taggttgcg	tgttgttcc	gtttggaaaca	agagtcact	attnaaagaac	3660
gtggacttca	acgtcaaaagg	cgaaaaacc	gtctatcagg	gcgtatggcc	actacgt	3720

```

ccatcaccca aatcaagttt ttgcggctcg aggtgcgcgtaa aagctctaaa tcggaaccct 3780
aaaggggagcc cccgatttag agcttgacgg gaaaaaggccgg cgaacgtggc gagaaggaa 3840
ggaaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg ggcgtggcaa gtgttagcggt cacgctgcgc 3900
gtAACccca caccggccgc gtttaatgtgg cgcgtacagg ggcgcgtccat tgcgcattca 3960
ggctgcggca ctgtttggaa gggcgatcgg tgccccccctc ttgcgtata ccgcagctgg 4020
cgaaagggggg atgtgtgcga aaggcgtttaa gttgggttaac gccagggttt tcccaagtac 4080
gacgttgtaa aacgcacggcc agtgaat 4107

```

```
<210> 13
<211> 4001
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGPN59A

10

20

30

40

cggaaaactca cggttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2700
 ccttttaaat taaaaatgaa gtttttaaato aatctaaagt atatatgagt aaacttggc 2760
 tgacagttac caatgtttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttgcgttc 2820
 atccatagtt gcctgactcc ccgtcggtta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 2880
 tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca cccgctccag atttatcage 2940
 aataaaccag ccagccggaa gggccggagcg cagaagtggg cctgcaactt tatccgcctc 3000
 catccagtct attaattgtt gcccggaaagc tagtagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3060
 ggcgaacgtt gttggcattt ctacaggcat cgtgggtca cgctcgctcg ttggtatggc 3120
 ttcaattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaa tgatccccca tggtgtgcaa 3180
 aaaagcggtt agctcccttcg gtccctccat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagttt 3240
 atactctatg gttatggcag cactgcataa ttcttctact gtcatgcccatt ccgtaaatg 3300
 cttttctgtg actgggtgatc actcaaccaa gtcatgtga gaataccgcg cccggcgacc 3360
 gagttgtct tgcccgccgt caatacggga taatagtgtt tgacatagca gaactttaaa 3420
 agtgctcatc attggaaaac gttttccgg gggaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 3480
 gagatccagt tcgatgtaac ccactcggtc acccaactga ttttcagcat cttttacttt 3540
 caccagcggtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaaa agggaataag 3600
 ggcgacacgg aaatgttcaa tactcataact cttccctttt caatattattt gaagcattta 3660
 tcagggttat tgtctcatga gcgatatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaat 3720
 aggggttccg cgcacatttc cccgaaaaatg gccaacctgac gtctaagaaa ccattattat 3780
 catgacatca acctataaaa ataggcgatc caccggggcc tttcgctctcg cgcgtttcgg 3840
 tgatgacggt gaaaacactt gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgtt 3900
 acggatgcc gggagcagac aaggccgtca gggcgctca gccgggtgtt gccgggtgtcg 3960
 gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg a 4001

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN103

<400> 14

taccaaggct agcatggttt atcaactgata agttgg

36

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN104

<400> 15

taccaaggct agcatggggcc tgcctgaagg ctgc

34

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN126

<400> 16

gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc

40

<210> 17

10

20

30

40

<211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN127

 <400> 17
 ggagacttta tcgcttaaga gacgtgcact ggccaggggg atcacc 46

 <210> 18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN128

 <400> 18
 ccagtgcacg tctcttaaagc gataaaagtct cccgtgaact ttacccggtg g 51

 <210> 19
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN129 20

 <400> 19
 gctgtgtata agggagcctg acatttatat tccccag 37

 <210> 20
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR fragment
 generated by primers oGN103 and OGN104 on pCDM8

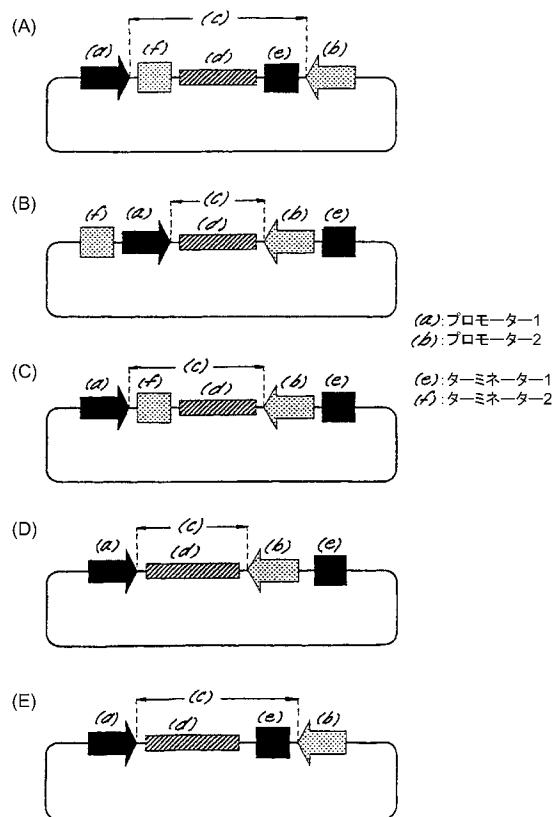
 <400> 20
 taccaaggct agcatggttt atcactgata agttggataa gttgggtggac atattatgtt 60
 tatcagtgt aaagtgtcaa goatgacaaa gttgcagccg aatacagtga tccgtgcogg 120
 ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga cggtctgacg acacgc当地 180
 gttgggggtg cagcagccgg cgcttactg gcacttcagg aacaaggcggg cgctgctcga 240
 cgcactggcc gaagccatgc tggcgagaaa tcatacgctt cgggtgccgag agccgacgac 300
 gactggcgct catttcgtat cggaaatccc gcagcttcag gcaggcccat gctagccctt 360
 gtaccagcac aatgg 375

 <210> 21
 <211> 670
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

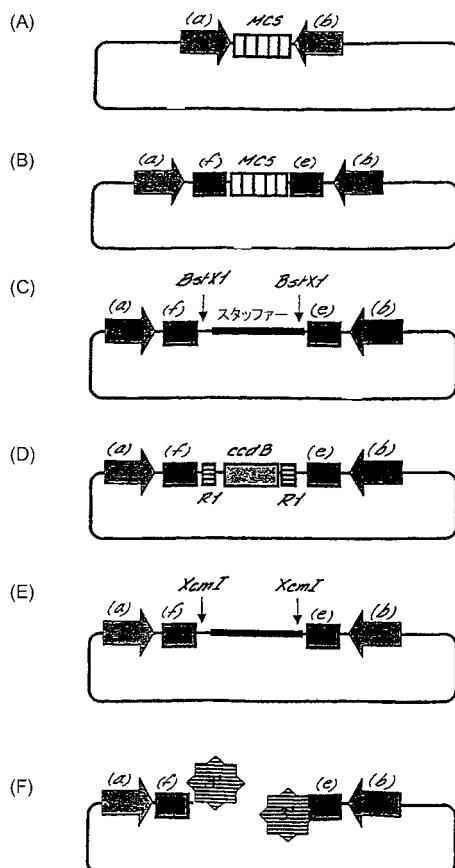
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR fragment 40

 <400> 21
 gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc gtatttgcgc gctgattttt 60
 gcggtataag aatatataact gatatgtata cccgaagttat gtcaaaaaga ggtgtgttat 120
 gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat cagttgtca aggcatatat 180
 gatgtcaata tctccggctt ggttaagcaca accatgcaga atgaagcccg tcgttgtcgt 240
 gccgaaacgctt gaaaaagcggaa aatcaggaa gggatggctg aggttcgccccg gtttatttggaa 300
 atgaaacggctt cttttgtctt cggaaacagg gactgggtgaa atgcaggatata aggttttacac 360
 ctataaaaaga gagaggccgtt atcgtgtttt tggatgtat cagagtgtata ttatttgacac 420
 gccccggcga cggatgttgc tccccctggc cagtgcacgt ctcttaagcg ataaaagtctc 480
 ccgtgaaacctt taccgggtgg tgcatatcgg ggtatggaaatcgg tggcgatgtatc tgaccacccgaa 540
 tatggccatgtt gtcgggtctt cggatgtatcgg ggtatggaaatcgg tggcgatgtatc gtcggatgtatc 600
 aatgacatc aaaaacgccta ttaacctgtat gttctggggatataaatgtt caggctccctt 660
 tatacacacg 670

【図1】

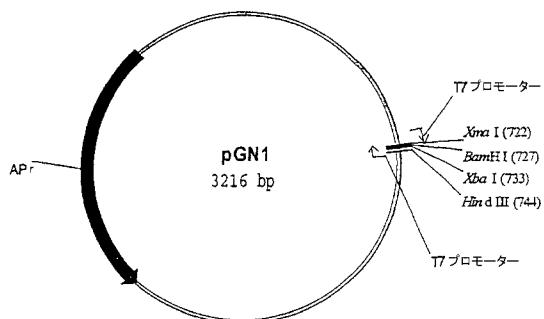


【図2】



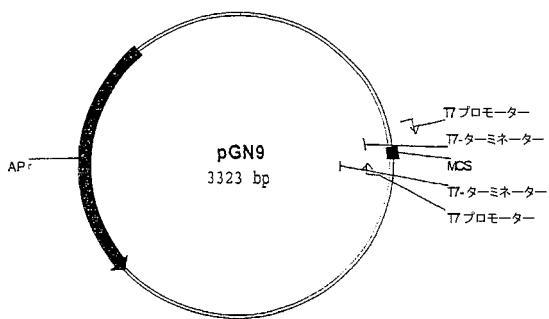
【図3】

T7ターミネーターとのRNAiベクターの構築

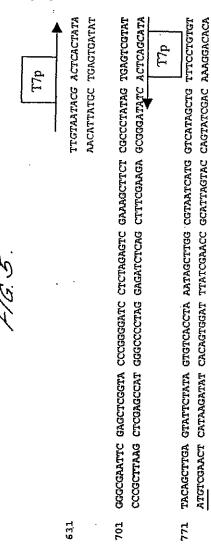


【図4】

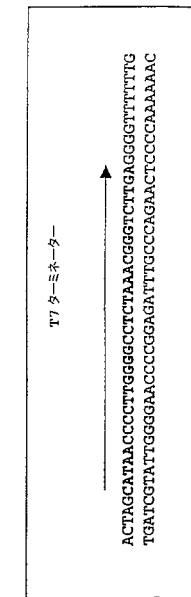
T7ターミネーターとのRNAiベクターの構築



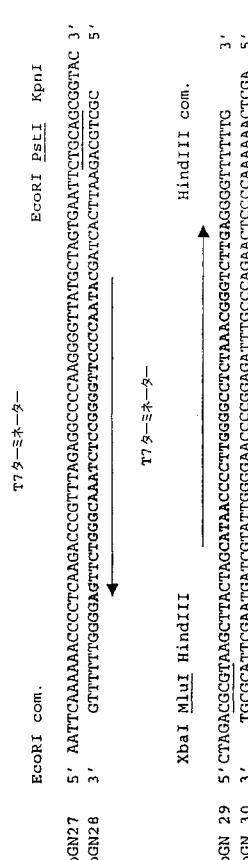
(5)



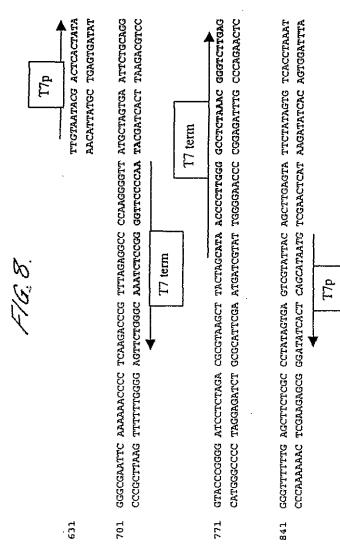
【図6】



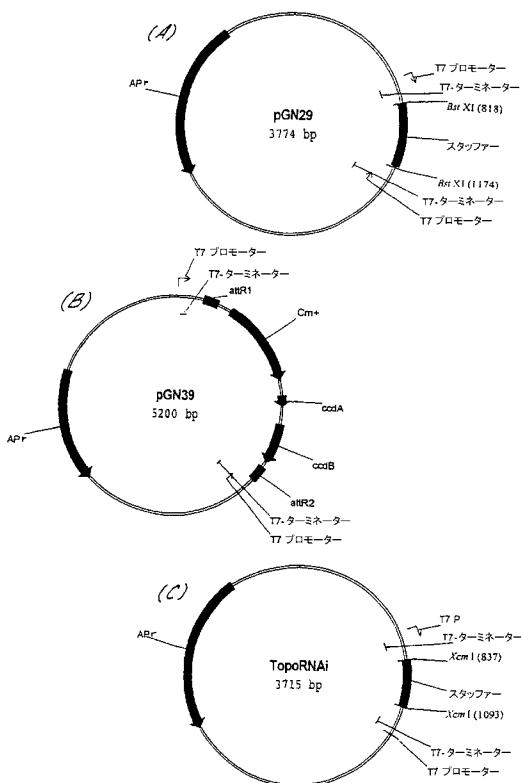
【 义 7 】



【圖 8



【 四 9 】



【 図 1 0 】

FIG. 10.

【図11】

FIG. 11.

PGN29

【 図 1 2 】

FIG. 12

TAATAGGACT CACTATAGGG CGAATCTCAA AAACCCCTCA AGAACCGCTT
AGAGGGCCCA AGGGGTATTAG CTGGTAGATT CTGCAGGGGT ACCCGGGGAT
CTCTTGAGGA TCCCTTGACG TGAGGATTTG TTGTGCTGGAA GAGATGCTC
GTTTGTGACAA AAGAAGTCGA CGAAAAGCCT ATAAAGTGAT AAATATGCAAT
ATATAATGAT AGATTTTGCA TAAAGAACNG ACTACATAGT ACTGATGAA
ACRACATATC CAGTCATCT GGSGGGCGCA TTAGCACCAC GCGGTTTAC
ACTTGTGAT TC CGGGCTGTG ATATGTTGG GATTTGGT TAGGTGATCCG
CGAGGTTTC AGGGACTTG GANGGTAAAGA TGGGAAAAGA ATACACTGAA
TATACCCCGG TTGATMWTAC CTCATGGCT CGTAAAGACG ATTITGGAGSC
NITTGCTGTA GTTGTGCTGG ACCTACATAGT CGAGGCGCT CAGCTGCTG
TTAGGGCTT TTAAAGACCG GTAAAGAAAAT AACAGACNA TTTTATTCG
GCTTGTATC ACATTTGTCG CGGGCTGTG ATATGCTGCT CGGAACTTC
TATGGCAGT AAAAGGGCTG AGCTGGTGTG ATGGTGTGAT
GTTACACGGT TTTCATGAGG CAAGTCAGA GGTTCCTGAT GTCCTGGAGT
GAATACCCGG AGATTTGCTC CGAGTTCTCA CACATATATC CCGAAGATG
GGCTGTGTTG GTGTTAAAGCC TGGTCTTATTG CCTTAAAGGTT TTTATTTGAT
ATATGTTTTT CTCCTGCAACG AATCTTGGG GNGTTACGCT TATTTGGAT
TTAAACGGCTG CGCATATAGGA CGAACCTTCG GGGCGGCTT TCAAGGGG
CAATATATAT CAGGCAAGGCG CAACTGGCT GTCGGCGTG GCGATTCAGG
TTCATCATGG CGTCTGCTGTTG GGCTCCATAG TGGAGGAAAT GCTTAATGGA
TTCAGACGT ACTTCGAGA CGTGGCGGG GGGSGCTAA GATGCTGGATC
CGCTTACTA AAAGGCGAGAT AACAGTAGTC TATTTGUCG GCGTTATGG
GGCTGATAG ATATATGATGATGATUATGTT CGGCGAGAT GTCAAAAGA
GOTGTTGCTA GAGACGGCTG ATTACAGTA GCTTGTGAC CGAACAGCT
CAGTGTGCTC AGGCGCTTCA GATGCTAAT CTCGGCTGT GGTAAAGCC
ACCAGCAGA ZAAGGAACTCCG TCGCTGCTGG CGCGACGCT AGAACGGCA
AAATACAGGA GGGATGGCTG AGGTGCGCCG GTTATGAGA ATGGAGCGCT
CTTTGGCTG CGCAACAGACG TGTGGGAGA ATGCAAGTTA AGGTTCATTC
CTTAAAGAA GGGAGGCGCTT AGTCATGTTG TTGGGAGAAGA CAGACTGATA
TTATGGACM CGGGGGCGGA CGGGTGGAGA TCCCCTGGC TGGCCCTGGC AGCTGAGAC
CTGGCTGCTG ATTAAGCTTC CGGTGAACTT TACCGGGTGG TSGCATATCG
GGATGAAACG GGGGGCTGATC TGAGGAGGAGA CGGGAGGAGA TGGGGCGCT
CGGTGTTGGT GGGAGAAGTO GGTGAGCTCA GCCACCGGGAA AATAGCHIC
AAJAAACSCCA TTAACTGGT GTTCTGGGAA ATATAAGTAT CAGGGTCTCTT
TATACACCGC CAGTCGCTGG GTGGACCGAA GTGATCAGGT ATGTTGTTGG
TTACAGCTT ATGTTGATCG TTCTTGTGG AAAATCTAT TTAATATAT
GATATTTATA TCAATTTGCG TTTCCTGCTC AGCTTCTTCG TAACTAGGT
TGTGTTCTTC AGCAGCAAGGG CGGGAGGAGG ATTCCTTCA CCTAACAGGT
CTGGCCCTG AGGGTGGCGG CGGCAACTCA CCTAACCTCA CCTAACCTGA
TAACCCCTGG GGGCTGGCTT AGGGCTGCTG AGGGCTGTTG TTGGCTCTTA
GCGCTTATAGT GAGCTGTTATT ACAGCTTCTG TAACTTCTATG TTGGCTCTTA
ATAGCTGGT GTATGCTAAGG TCACTAGCTG TTCTCTGTTG AATTTGTTG
CGCTGCTACA TCTACACAGA CTCAGGGC GGGAGGAGG TGGGGCTCT
GGGGCTGCTG TGGGGCTGAGG TGGGGCTGAGG TGGGGCTGAGG

FIG. 12 (CONTINUED 1)

FIG. 12 (CONTINUED 2)

【 図 1 3 】

FIG. 13.

【図14】

FIG. 14.

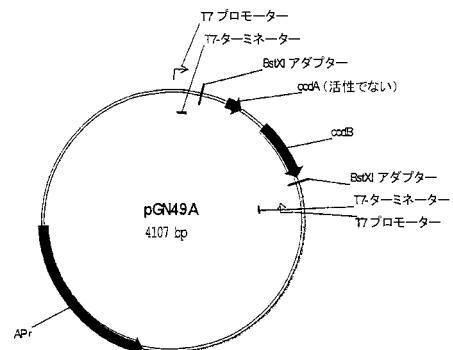
FIG. 14 (CONTINUED)

〔 図 15 〕

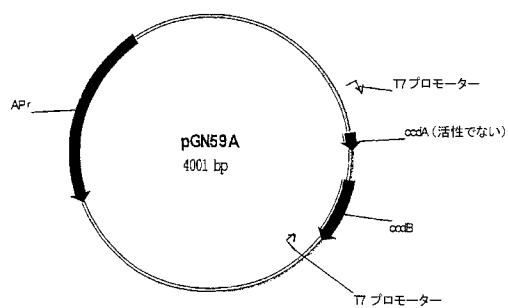
FIG. 15 (CONTINUED).

CAGTACGCTAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTGG GGTGATTGGC TTGGCTCCCA
 GCTGGGTGCGT GTCGACGACG CGGCCGGTGA CGGCCGCGGC TGCGCCCTTAT
 CGGCGAAATCA TCGTCTTGCA TAACTACCGG TATGACACSA CTATGGCA
 CGTCGACGAGC GCGGAGGAGA CAGGATGAA AGGGACGAGT ATGAGTGGG
 TGTGACTAGAGG TCTGTGAGT GTGGCTCTAA CTACGGGAGC ATGAGGAG
 CAGTATGGTGG TATGCTGGCT CGCTGCTTAA CAGTGGTGTG CGGAGGAG
 GTTGTGCTGCT GTGATGCTAA CAAACAAAC CGGGCTTGTG GGGGGTGGTT
 TTTGGTGTG AAGCGACGA TAACTCCGG AAAAAGGAGG ATCTGAGGAG
 ATCTTGCTGAG CTTCCTTGGC TGCGTGTGAG CGAACCTGGG
 CGTGAAGGGG TTTGCGTGC GAGGATTTAG AAAAGGAGG ATCTACCTGG
 CCTTGTAAATTA TAAAGAGGA GTTTTAAATC ATTTCTAAATG AAATAGATG
 AACATCTGTG TCAGGATGTC ATACGGTCTA TGAGCTGGG ACCTTGGG
 GCGGCTGCTG TTATGGCTTC ATTCAGTGGT GCGGCTTCG CGCGGCTG
 GTATGATGAG CGATAGGAGG GTCTTACCATC TGCGGCCGTG GTGCGATG
 TACCGGGAA CGCGCGCA CGCGCTTCGAA ATTTGGCTGG ATTAACAGG
 CCAGCGCGAA CGCGCCGGGCGG AGGAGGAGG TGCGCAACTA TATCGCG
 CTCAGCGCTA ATTTAGGTT GCGGGAGGAGA TGAGTAGGG AGTTGGG
 TTTAAGGTT GCGCGATG GTGGCGATG CTACGAGCG CGTGGTGTCA
 CGCGTGTGCT GTGATGAGG TTCTTCTGGC CGGGCTTGTG AAGCGGCTG
 GCGGATGTTA TAACTGGCC TTGTGGTGTG CGGGCTTGTG AGCGGCTG
 GTTCTGGGGG CAGTGTGGTGTG AGGTAGGTTG CGGGCTTGTG ATTCAGG
 CTTTGGGGGG TGCTGGTGTG ACTACCGCA CGATCTGGC GAATAGGCG
 CGGGCGGGCA CGATGTTGGTGTG TGCGCCGGCG ATACGGGCGA TATAGGAG
 TGATCATGCC CGGGGGGGAA ATGGTGGTGTG ATTGGAGGG GTTCTGGGG
 CGGAAACATCA TCAAGGAGCT TACCGCTGGT GGAGGCGCTG TGATGATG
 CGACCTGGC ACCGACGAGA TTCTGAGGCT TTCTTCTGGT CACCGAGG
 TCTGGGGGGG GAAAACAGG AAGGGAAATAN CGGGCGAAAAGG AGGGGAGG
 GGGCGACGAGG BANTGGTGA TACTGCTCATC CTGCGTCTT CAATTTGTT
 GAGGATTTCA TCGGGGGTGTG TGCTCCCATG CGCGACATTC ATTTGAGT
 ATTTGAGAAGG ATTAACAAAT AGGGGGTTCGG CGCGACATTC CGGCGAATTC
 CGGGGGGGAT GTCGAGGAAAGA CTAAATTTAGA CATGAGCTA ACCTATTAAGA
 ATAGGGCGATGAT CGAGGGGGGG TTTCGGTCTG CGGGCTTGTG TGAGGCG
 AACGAAACCTTC GCGGGCGAGA GTCTCCGGAG ACGGCGCTG CTGTCGTTG
 AGCGGATGCC CGGGAGCAGC AGGGCGCTCA CGGGCGCTG GGGGGGGTGG
 CGGGGGTTCGG CGGGGGGGCTT AACTATGCGG CATCGAGCA GATTTGAGC

【図 16】



【図17】



フロントページの続き

(74)代理人 100139000

弁理士 城戸 博兒

(74)代理人 100152191

弁理士 池田 正人

(72)発明者 ブレターンク, ギアー

ベルギー, ベー-9820 メルビック, ポンストラート 16

(72)発明者 レナード, ジャン-ピエール

ベルギー, ベー-9050 ゲンブルグ, ピーター ベノートラーン 141

(72)発明者 ボガート, ティエリー

ベルギー, ベー-8500 コルトレイク, ウォルヴァンドリーフ 26ゲー

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 國際公開第00/009747 (WO, A1)

國際公開第00/001846 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed