

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4903929号
(P4903929)

(45) 発行日 平成24年3月28日 (2012.3.28)

(24) 登録日 平成24年1月13日 (2012.1.13)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00

請求項の数 21 (全 86 頁)

(21) 出願番号	特願2000-101615 (P2000-101615)	(73) 特許権者	500155615
(22) 出願日	平成12年4月3日 (2000.4.3)		ラルフ バルテンシュラーガー
(65) 公開番号	特開2001-17187 (P2001-17187A)		ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイ
(43) 公開日	平成13年1月23日 (2001.1.23)		ム ナッハ デム アルテン シュロス
審査請求日	平成19年1月16日 (2007.1.16)		2 2
(31) 優先権主張番号	19915178.4	(74) 代理人	100061815
(32) 優先日	平成11年4月3日 (1999.4.3)		弁理士 矢野 敏雄
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 復代理人	100156812
			弁理士 篠 良一
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC2394	(74) 復代理人	100143959
			弁理士 住吉 秀一
		(74) 復代理人	100157451
			弁理士 河辺 幸代
		(74) 復代理人	100167852
			弁理士 宮城 康史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞における複製能力を有するC型肝炎ウイルス (HCV) -RNA-構築物において、HCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRおよび付加的に選択可能なマーカー遺伝子 (選択遺伝子) を少なくともコードする、配列表の配列番号1から配列番号11までのいずれか1つに記載されたヌクレオチド配列を包含し、前記選択可能なマーカー遺伝子が、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子であり、該ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の代わりに、別の抗生物質耐性遺伝子もしくはその他の耐性遺伝子が含まれていてよい、真核細胞における複製能力を有するC型肝炎ウイルス (HCV) -RNA-構築物。

10

【請求項 2】

マーカー遺伝子の代わりに、またはマーカー遺伝子に加えて、組み込まれたリポーター遺伝子を有する、請求項1記載のHCV-RNA-構築物。

【請求項 3】

リポーター遺伝子が、ルシフェラーゼ遺伝子、CAT-遺伝子 (クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ-遺伝子)、lacZ-遺伝子 (ベクターガラクトシダーゼ遺伝子)、GFP-遺伝子 (緑色-蛍光-タンパク質-遺伝子)、GUS-遺伝子 (グルクロニダーゼ遺伝子) およびSEAP-遺伝子 (分泌-アルカリ性-ホスファターゼ-遺伝子) からなる群から選択される、請求項2記載のHCV-RNA-構築物。

【請求項 4】

20

複製に（細胞）代理マーカー遺伝子の発現が影響する、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

【請求項 5】

リポーター遺伝子及び選択可能なマーカー遺伝子が、位置的に、融合タンパク質と一緒に発現するように配置されている、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

【請求項 6】

組み込まれた外来遺伝子を有し、この外来遺伝子の発現に好適である標的細胞中にこの外来遺伝子を導入するために好適である、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

10

【請求項 7】

真核細胞がヒト肝癌細胞であり、かつ導入された H C V - 特異的遺伝子材料が請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物である、導入された H C V - 特異的遺伝子材料を含有する、真核細胞を包含する C 型肝炎ウイルス（H C V）細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから H C V - R N A - 構築物またはその部分を単離することにより得られる、ヌクレオチド突然変異及び／又はアミノ酸突然変異を有し、細胞培養に適合し、高い効率で複製する、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

【請求項 8】

細胞クローンから単離された H C V - R N A - 構築物またはその部分を、新たに少なくとも 1 回継代し、すなわち細胞クローンから単離された H C V - R N A - 構築物またはその部分を、真核細胞がヒト肝癌細胞であり、かつ導入された H C V - 特異的遺伝子材料が請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物である、導入された H C V - 特異的遺伝子材料を含有する、真核細胞を包含する C 型肝炎ウイルス（H C V）細胞培養系の細胞に導入し、この細胞を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから H C V - R N A - 構築物またはその部分を単離する、請求項 7 記載の H C V - R N A - 構築物。

20

【請求項 9】

次に記載するアミノ酸置換、すなわち：

1 2 8 3 a r g → g l y および／または 1 3 8 3 g l u → a l a および
／または 1 5 7 7 l y s → a r g および／または 1 6 0 9 l y s → g l
u および／または 1 9 3 6 p r o → s e r および／または 2 1 6 3 g l u →
g l y および／または 2 3 3 0 l y s → g l u および／または 2 4 4 2 i
l e → v a l

30

〔前記アミノ酸置換の位置は、配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列に基づくものである〕
を 1 個またはそれ以上有し、細胞培養に適合し、高い効率で複製する、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

【請求項 10】

表 3 に記載されたヌクレオチド置換および／またはアミノ酸置換の 1 つまたはそれ以上を有し、この際表 3 は該請求項に包含される、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物。

40

【請求項 11】

導入された H C V - 特異的遺伝子材料を含有する、真核細胞を包含する C 型肝炎ウイルス（H C V）細胞培養系において、真核細胞がヒト肝癌細胞であり、かつ導入された H C V - 特異的遺伝子材料が請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項記載の H C V - R N A - 構築物である、H C V 細胞培養系。

【請求項 12】

H C V - R N A - 構築物を含有する細胞がドイツ微生物保存機関（D S M Z：ブラウンシュバイク、B R D 在）に寄託番号 D S M A C C 2 3 9 4（研究所記号 H u B l 9 - 1 3）として寄託されている、請求項 11 記載の細胞培養系。

50

【請求項 1 3】

H C V－感染の治療剤および／または診断剤の製造および／または評価のための、請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の細胞培養系および／または請求項 1 から 1 0 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物の使用。

【請求項 1 4】

H C V－感染に対するワクチンの製造のための、請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の細胞培養系および／または請求項 1 から 1 0 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物の使用。

【請求項 1 5】

遺伝子治療のための肝細胞特異的遺伝子輸送体の製造のための、請求項 1 から 1 0 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物の使用。

10

【請求項 1 6】

請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物を、この H C V－R N A－構築物の細胞培養に適合した突然変異体の獲得のために用いる使用であって、該突然変異体が前記 H C V－R N A－構築物に比べて高められた複製効率を有する前記使用において、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物を有する請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから H C V－R N A－構築物またはその部分を単離することを特徴とする前記使用。

20

【請求項 1 7】

単離された H C V－R N A－構築物を新たに少なくとも 1 回継代し、すなわち単離された H C V－R N A－構築物を請求項 1 1 または請求項 1 2 記載の細胞培養系の細胞に導入し、この細胞を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンから H C V－R N A－構築物またはその部分を単離する、請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 1 8】

請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の H C V－R N A－構築物を、本来の H C V－全長ゲノム又は H C V－部分ゲノム又は H C V－R N A－構築物と比較して高められた複製効率を有する H C V－全長ゲノム又は H C V－部分ゲノム又は任意の H C V－構築物の突然変異体の製造のために用いる使用であって、

30

－ 請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法により H C V－R N A－構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを単離し、

－ これらの突然変異体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を決定し、本来の H C V－R N A－構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、ヌクレオチド突然変異およびアミノ酸突然変異の種類、数、及び位置を決定し、

－ かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発により、または該当する突然変異を有する配列断片の置換により、（単離された）H C V－全長ゲノムまたは H C V－部分ゲノムまたは任意の H C V－R N A－構築物中へ導入する、ことを特徴とする前記使用。

【請求項 1 9】

40

高い複製効率を有する細胞培養に適合した H C V－R N A－構築物において、ヌクレオチド突然変異及び／又はアミノ酸突然変異により請求項 1 記載の H C V－R N A－構築物から誘導可能であり、かつ請求項 1 6 から 1 8 までのいずれか 1 項記載の方法により得ることができることを特徴とする、高い複製効率を有する細胞培養に適合した H C V－R N A－構築物。

【請求項 2 0】

C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子の作成のための、請求項 1 から 1 0 までのいずれか 1 項又は請求項 1 9 記載の H C V－R N A－構築物の使用。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の C 型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子に感染した細胞。

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、導入されたHCV-特異的遺伝子材料を含有する、つまりHCV-特異的遺伝子材料がトランスフェクションされている主に真核細胞を包含するC型肝炎ウイルス（HCV）細胞培養系に関する。

【0002】

【従来の技術】

C型肝炎ウイルス（HCV）は世界的規模での慢性及び急性の肝疾患の主要な原因である。たいていのHCV感染は認識できる臨床的症状なしで進行し、感染者の80～90%が持続的なウイルスキャリアとなり、この持続的なウイルスキャリアの50%が多様な症状の慢性肝炎になる。この慢性感染者の約20%が10～20年の経過において肝硬変に進行し、その結果第1次肝細胞ガンが生じることがある。この慢性のC型肝炎は今日では肝臓移植が主な感染原因である。原因療法はまだ存在しない。現在提供可能な若干の治療法はインターフェロン-アルファの又はインターフェロン-アルファとプリンスクレオシド類似体のリバビリンとからの組み合わせの高い用量での投与である。全治療者の約60%がこの治療法に効果を示すだけであり、その際に、全ての事例の半分以上が治療の中止後に新たなウイルス血症に至る。

【0003】

工業国においても、罹患率が高く、慢性感染の深刻な結果及び原因療法がないために、HCV-特異的薬療法の発展が製薬学の研究及び開発の重大な目標である。この際の主要な問題は、今まで、真核細胞中でのウイルス複製及び発病の研究を可能にする適当な細胞培養系がなかったことである。

【0004】

血中及び組織中でのわずかなウイルス量のため、適当な細胞培養系又は動物モデル（今日までチンパンジーが唯一可能な試験動物である）がないため、並びにウイルス様の粒子を製造する有効な系もないため、HCV-粒子の分子組成は今日まで詳細には研究もしくは解明されていない。現在存在する結果は次のようにまとめることができる：HCVは、50～60nmの粒子直径及び1.03～1.1g/mlの平均密度を有する外被を有するプラス鎖のRNAウイルスである。これは最初に1989年に分子的にクローニングされ、特性決定された（Choo et al., 1989: Science, 244, 359-362）。このHCV-RNAは約9.6kb（＝9600ヌクレオチド）の長さ及び正の極性を有し、約3010個のアミノ酸の線状ポリタンパク質をコードする唯一のオープンリーディングフレーム（ORF＝open reading frame）を有する（Rice 1996, in Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp. 931-960; Clarke 1997, J. Gen. Virol. 78, 2397; and Bartenschlager 1997, Intervirology 40, 378 and Fig. 1 A参照）。ウイルス複製においてこのポリタンパク質は細胞の及びウイルスのプロテアーゼによって成熟した、機能的に活性のタンパク質の形に分解される。

【0005】

ポリタンパク質の中で、タンパク質は次のように配列されている（アミノ末端からカルボキシ末端へ）：Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B。このコアタンパク質（Core-Protein）はヌクレオキャプシドの主成分である。糖タンパク質E1及びE2は膜貫通タンパク質であり、ウイルス外被の主成分である。このタンパク質は宿主細胞へのウイルスの付着の際におそらく重要な役割があると考えられる。この3種のタンパク質のコア、E1及びE2はウイルス粒子を構築し、従って構造タンパク質として表される。タンパク質p7の機能は未だに明らかではない。タンパク質NS2はおそらくNS2-3プロテアーゼの接触ドメインであり、これはタンパク質NS2とNS3との間のプロセシング（Prozessierung）に関与している。タンパク質NS3は2つの機能を有しており、つまり、アミノ末端のドメインにおいてポリタンパク質プロセ

シングに不可欠のプロテアーゼ活性を有し、かつカルボキシ末端のドメインにおいてはおそらくウイルスRNAの複製の際に重要な役割があると考えられるNTPas e／ヘリカーゼ機能を有する。タンパク質NS4AはNS3－プロテアーゼのコファクターである。タンパク質NS4Bの機能はわかっていない。

【0006】

このオープンリーディングフレームは、5'末端に約340個のヌクレオチドの長さの翻訳されない領域(NTR=non-translated region)があり、これは内部のリボソームエントリー位置(IRES=internal ribosome entry site)として機能し、3'末端には約230個のヌクレオチドの長さのNTRがあり、これは高い可能性でゲノム複製にとって重要である。このような3'NTRはPCT/US96/14033の特許出願の対象である。ポリタンパク質のアミノ末端区域中の構造タンパク質は、宿主細胞のシグナルペプチダーゼにより分解される。非構造タンパク質(NS)2～(NS)5Bは2つのウイルス酵素によって、つまりNS2-3及びNS3/4Aプロテイナーゼによってプロセシングされる。このNS3/4AプロテイナーゼはNS3のカルボキシ末端の向こう側の全ての分解にとって必要である。NS4Bの役割は未だ明らかではない。NS5Aは高度にリン酸化されたタンパク質であり、インターフェロンに対する多様なHCV-遺伝子型の耐性に関与していると考えられ(Enomoto et al. 1995, J. Clin. Invest. 96, 224; Enomoto et al. 1996, N. Engl. J. Med. 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, Virology 230, 217; Kaneko et al. 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 320; Reed et al., 1997, J. Virol. 71, 7187参照)、NS5BはRNA依存性のRNAポリメラーゼとして同定された。

【0007】

この認識をもとにして、RT-PCR(=逆転写ポリメラーゼ連結反応)を用いた患者の血清中でのHCV特異的抗体の検出に基づくか又はHCV特異的RNAの検出に基づく診断系が開発され、この診断系は通常の及び／又は規定に従い全ての保存血液において適用しなければならない。

【0008】

Genoms 1989の最初の記載以来、PCR法を用いてHCVの多数の部分配列及び完全配列がクローニングされ、特性決定された。この配列の比較は、ウイルスゲノムの特にNS5B-遺伝子の領域内での高い変異性を示し、これは最終的に6つの遺伝子系に分類され、これらはさらにサブタイプa、b及びcに細分化される。ゲノムの分散はゲノムにわたって均質に分布していない。従って、5'NTR及び3'NTRの一部は高い確率で維持されているが、一方で特定のコードする配列、特にコートタンパク質E1及びE2は現在きわめて著しく変化している。

【0009】

クローニングされ、特性決定されたHCVゲノムの部分配列及び完全配列はさらに見込みのある抗ウイルス性治療薬のための適当な攻撃標的として研究された。この場合、このような攻撃標的として考えられる3つのウイルス性酵素が発見された。これらは(1)NS3/4Aプロテアーゼ複合体、(2)NS3ヘリカーゼ及び(3)NS5B RNA-依存性RNAポリメラーゼである。NS3/4Aプロテアーゼ複合体及びNS3ヘリカーゼはすでに結晶化され、その3次元構造に関して解明することができており(Kim et al., 1996, Cell, 87, 343; Yem et al., 1998, Protein Science, 7, 837; Love et al., 1996, Cell, 87, 311; Kim et al., 1998, Structure, 6, 89; Yao et al., Nature Structural Biology, 4, 463, Cho et al., 1998, J. Biol. Chem., 273, 15045)、NS5B RNA依存性RNAポリメラーゼの解明が今日までなお成功していない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

この酵素を用いた重要な攻撃標的は慢性HCV感染の治療法の開発のために定義されているにもかかわらず、かつ「合理的ドラッグデザイン」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング」を用いて世界的に適当な阻害剤を集中的に探しているにもかかわらず、

10

20

30

40

50

この治療法の発展は著しい欠乏に直面している、つまり、H C V－R N A又はH C V－抗原を直接、信頼できるかつ実験室で通常の簡単な方法で検出できる細胞培養系又は簡単な動物モデルの欠乏に直面している。このような細胞培養系の不足は、H C V－複製の理解が今日までなお不備でありかつかなりの部分で未だ仮説であることに対する主要な原因である。

【0011】

専門分野の解釈によると、H C Vとフラビウイルス及びペスチウイルスとの間に狭い進化的関連があり、多様な細胞系において簡単に複製することができかつこの場合比較的高い収率が示されている自律複製R N Aについて説明されているにもかかわらず (Khromykh et al., 1997, J. Virol. 71, 1497; Behrens et al., 1998, J. Virol. 72, 2364; Moser et al., 1998, J. Virol. 72, 5318参照)、H C Vを用いた同様な試験は今まで成果が

10

【0012】

H C V含有の高力価の (hochtitrig) 患者の血清で感染させることができる細胞系又は初代細胞培養は多様な刊行物から公知であるが (Lanford et al. 1994, Virology 202, 606; Shimizu et al. 1993, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, Journal of Virology, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, Virus Res. 56, 157; Fournier et al. 1998, J. Gen. Virol. 79, 2376及びそこで引用された文献, Ito et al. 1996, Journal of General Virology, 77, 1043-1054)、ウイルス感染された細胞系又は細胞培養はH C V－R N A又はH C V－抗原は直接検出されなかった。この細胞中のウイルス性のR N Aはノーザンブロット (R N Aの定量的検出のための標準的方法) においても検出できず、ウェスタンブロットにおいて又は免疫沈降を用いてもウイルス性タンパク質は検出できない。著しく煩雑でかつ間接的方法を用いて、H C V複製を証明することができたにすぎない。この不利な状況は、この公知のウイルス感染した細胞系又は細胞培養中での複製が全く不十分であることを明らかに示している。

20

【0013】

さらに、Yoo et al. (1995, Journal of Virology, 69, 32-38)及び Dash et al., (1997, American Journal of Pathology, 151, 363-373) の刊行物から、肝癌細胞系を、クローニングされたH C V－ゲノムのインビトロ転写を用いて得られた合成H C V－R N Aでトランスフェクションできることが公知である。この2つの文献においてこの著者は、ウイルス性H C V－ゲノムがプラス鎖－R N Aであり、このR N Aは細胞中へ導入した後に直接m R N Aとして機能し、これにリボソームが付着し、翻訳プロセスの進行においてウイルスタンパク質を形成し、このタンパク質から最終的に新規のH C V－粒子が形成される (できる) という基本思想から出発している。このウイルス複製、つまり新規に形成されたH C V－ウイルスもしくはそのR N Aは、R T－P C Rを用いて検出された。しかしながら、実施されたR T－P C Rの発表された結果は、記載されたH C V－トランスフェクションされた肝癌細胞内でH C V複製の効率は著しくわずかであり、見込みのある抗ウイルス療法を用いた意図的な影響による複製率における変動を質的に、ましてや定量的に測定するためにはいずれの場合も不十分である。さらに、先行技術において、高保存3' N T R (hochkonservierte 3' N T R) はウイルス複製のために不可欠であることは公知であり (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999)、このことはH C V－ゲノムの確かな3' 末端を知らずに試験したためもっぱら短縮された3' N T Rを有するH C V－ゲノムを使用したYoo et al.及びDash et al.の主張と明らかに矛盾している。

30

40

【0014】

【課題を解決するための手段】

この課題の解決策は、冒頭に記載した種類の細胞培養系を提供することにあり、その際、真核細胞はヒト細胞、特に市販の肝癌細胞系から由来するが、同様に相応する初代細胞培養から得ることができる肝癌細胞であり、その際、導入されたH C V－特異的遺伝子材料

50

がHCV-RNA-構築物であり、この構築物は主にHCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で、及び少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）を包含する。

「NTR」は本願明細書中で「非翻訳領域」を意味し、これは当業者に概念並びに略語として公知及び周知である。「HCV-RNA-構築物」の概念は本願明細書において完全なHCV-ゲノムを含有する構築物でも、単にそのHCV-ゲノムの一部、つまりHCV-サブゲノムを含有する構築物でもある。

【0015】

実際に著しく有利である本発明による細胞培養系の有利な変異形は、DSM ACC 2394の番号の元で（実験室記号HuB19-13）DSMZ（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland）に寄託されている。

10

【0016】

本発明による細胞培養系を用いて初めて、HCV-RNAは細胞内で、自律的に及び十分に大量に複製及び発現され、その結果、HCV-RNA-量並びにHCV-特異的タンパク質の定量的測定を通常の、信頼できる正確な生化学的測定方法を用いて実施することができるインビトロ系が提供される。つまり、抗ウイルス性医薬の開発及び検査のために必要なほぼ信頼できる細胞ベース（cell-based）の複製系が提供される。この試験系は有効なHCV特異的な治療法のための潜在的攻撃標的を同定し、かつHCV化学療法剤を開発及び評価することを可能にする。

20

【0017】

本発明は、少なくとも5'及び3'非翻訳領域（NTR）及び非構造タンパク質（NS）3～5Bを包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）を有するHCV-RNA-構築物で細胞をトランスフェクションした場合に、HCV-RNAの有効な複製が細胞中で行われるという意想外な認識に基づく。構造遺伝子が複製の進行のためにあまり重要でなく、他方でこのトランスフェクションされた細胞がHCV-RNAと結合した選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）により媒介される永続的な選択圧力を被る場合にのみHCV-RNAの有効な複製が引き起こされることは明らかである。マーカー遺伝子（選択遺伝子）は従って、一方でHCV-RNAを生産複製する細胞の選択を誘発させ、他方でRNA-複製の効率を著しく高めると考えられる。

30

【0018】

本発明の対象は、HCV-特異的RNA-断片5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B及び3' NTRを、有利に前記の順序で包含し、さらに選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）を包含するセルフリーのHCV-RNA-構築物でもある。

【0019】

5' NTRもしくはNS3もしくはNS4AもしくはNS4BもしくはNS5AもしくはNS5Bもしくは3' NTRの概念は、本願明細書において、先行技術においてHCVゲノムのそれぞれ該当する機能的断片についてのヌクレオチド配列として記載されている各ヌクレオチド配列を表す。

40

【0020】

このようなHCV-RNA-構築物の提供が、初めて細胞培養中でのHCV-複製、HCV-発病及びHCV-進化の詳細な分析を可能にする。HCV特異的なウイルス性RNAは、完全なゲノムとして又はサブゲノムとして、任意の量で意図的に製造でき、RNA-構築物を操作し、ひいてはHCV-機能を遺伝学的レベルで研究及び解明する可能性が生じる。

【0021】

治療法のための主要な攻撃標的として現在研究されている全てのHCV-酵素、つまりNS3/4Aプロテアーゼ、NS3ヘリカーゼ及びNS5Bポリメラーゼは本発明によるHCV-RNA-構築物中に含まれているため、該当する全ての研究のために使用すること

50

ができる。

【0022】

実地での適用において著しく良好であるHCV-RNA構築物の実施態様は、配列表の配列番号1によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。実地での使用のために同等に良好な特性を有する他の実施態様は、配列表の配列番号2又は配列番号3又は配列番号4又は配列番号5又は配列番号6又は配列番号7又は配列番号8又は配列番号9又は配列番号10又は配列番号11によるヌクレオチド配列を包含することを特徴とする。

【0023】

本発明によるHCV-サブゲノム構築物は、先行技術において今まで未知のヌクレオチド配列、つまり次に記載するヌクレオチド配列(a)～(i)のグループから選択されるヌクレオチド配列を有する3'NTRを備えることができる。

【0024】

【外2】

(a) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTTT
GCTTTTTTTTTTCTTTTTTTTGAGAGAGAGAGTCTCACTCTGTTGCCC
AGACTGGAGT

(b) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GGAGC

(c) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTAATCTTT TTTTTTTTCT TTTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCAGACT GCAGC

(d) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(e) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT

(f) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGAGAGA GAGTCTCACT
CTGTTGCCA GACTGGAGT

(g) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTAGTCT TTTTTTTTTT CTTTTTTTTT GAGAGAGAGA
GTCTCACTCT GTTGCCAGAG CTGGAGT

(h) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTTAAT CTTTTTTTTT TTTTCCTTT TTTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T

(i) ACGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
TTTTTTAATC TTTTTTTTTT TTTCTTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

【0025】

本発明によるHCV-RNA構築物中に含まれる選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）は有利に耐性遺伝子、特に抗生物質耐性遺伝子である。

【0026】

これは、例えば抗生物質耐性遺伝子の場合には該当する抗生物質を細胞培地に添加することによって、この構成物でトランスフェクションされた細胞が、トランスフェクションされていない細胞から容易に選択することができるという利点を有する。「抗生物質」とは

本願明細書中ではトランスフェクションされていない宿主細胞又はH C V－R N Aをわずかな効率でしか複製していない細胞の生存及び成長を阻害する物質、特に細胞毒、例えばピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン (Zeocin)、ブレオマイシン又はブラストサイジンであると解釈される。

【0027】

実地において著しく良好であるとされた特に良好な選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）もしくは耐性遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子である。

【0028】

抗生物質耐性遺伝子の他のものは、例えばH A T－選択を用いて実施することができるチミジン－キナーゼ－遺伝子である。

10

【0029】

選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）もしくは有利な耐性遺伝子もしくは特に有利な抗生物質耐性遺伝子のH C V－R N A－構築物中の位置は、有利にH C V 5' N T Rの後方に、つまり5' N T Rの下流にもしくはH C V－読み枠の上流にある。しかしながら、3' N T Rの領域内又はH C V－ゲノム又はH C V－サブゲノムの他の部位、例えばポリタンパク質の範囲内にあることも考えられる。

【0030】

本発明によるH C V－R N A－構築物のもう一つの実施態様において、選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）、特に抗生物質耐性遺伝子は、リボザイムを介してもしくはリボザイムに対する認識部位を介してH C V－R N AもしくはH C V－ゲノム配列又はサブゲノム配列と結合している。

20

【0031】

このために、H C V－R N Aを産生複製するような細胞の選択を行うことにより、そこから得られた細胞クローンは耐性遺伝子をH C V－サブゲノム配列のリボザイム媒介性分解により分離することができることが、つまりクローニングにより組み込まれたリボザイムの活性化によるか、又はリボザイムに対する認識部位を有する構築物の場合には細胞中へリボザイムを（例えばリボザイム構築物のトランスフェクション又は相応するリボザイムが導入されたウイルス性発現ベクターでの感染により）導入することにより分離できることが有利である。このように、確かな感染性ウイルス粒子の形成が可能である耐性遺伝子を有する確かなH C V－ゲノム－構築物が得られる。

30

【0032】

本発明によるH C V－R N A－構築物のもう一つの有利な実施態様は、構築物が少なくとも1つの組み込まれたリポーター遺伝子を有することにより優れている。

【0033】

リポーター遺伝子とは、このリポーター遺伝子の存在で目的生物中へ導入することにより容易に及び一般的に簡単な生化学的又は組織化学的方法で検出可能である、つまり少量であっても実験室で通常の測定方法を用いて簡単でかつ確実に検出及び定量化することができるタンパク質をコードするような遺伝子であると解釈される。

【0034】

H C V－R N A－構築物のこの変異形は、この構築物の複製の程度がリポーター遺伝子産物によって簡単にかつ迅速に実験室で通常の方法により測定できるという利点を有する。

40

【0035】

このリポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子のグループ、C A T－遺伝子（クロラムフェニコール－アセチル－トランスフェラーゼ－遺伝子）、l a c Z－遺伝子（ベクター－ガラクトシダーゼ遺伝子）、G F P－遺伝子（緑色－蛍光－タンパク質－遺伝子）、G U S－遺伝子（グルクロニダーゼ遺伝子）又はS E A P－遺伝子（分泌－アルカリ性－ホスファターゼ－遺伝子 (Sezernerte-Alkalische-Phosphatase-Gen)）からの遺伝子が有利である。このリポーター遺伝子もしくはその産物、つまり相応するリポータータンパク質は、例えば蛍光、化学ルミネッセンス、比色法又は免疫法（例えばE L I S A）を用いて測定することができる。

50

【0036】

リポーター遺伝子として、代理マーカー遺伝子（Surrogatmarkergen）も挙げられる。この遺伝子は本願明細書において、細胞タンパク質、核酸又は一般にウイルス複製に依存するバリエーションの影響下にあるような機能をコードし、かつその結果HCVもしくはHCV-RNA構築物を増幅する細胞中で抑制又は活性化される遺伝子と解釈される。つまり、この機能の低下もしくは活性化は、ウイルス複製用のもしくはHCV-RNA構築物の複製用の代用マーカーである。

【0037】

リポーター遺伝子及び選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）の位置は、両方の遺伝子産物から形成される融合タンパク質を発現するように選択することができる。この場合、両方の遺伝子がHCV-RNA構築物中に配置されており、両方の発現されたタンパク質は、プロテアーゼ（例えばユビキチン）の切断部位又は自己切断するペプチド（例えばピコルナウイルスの2A-タンパク質）を介して融合されていて、後になってタンパク質分解により再び分離されるという有利な可能性が生じる。

10

【0038】

同様に、この両方の位置は、両方の遺伝子産物が別々に発現されるように相互に隔てられていてもよい（例えば次の順序：マーカー遺伝子もしくは耐性遺伝子-内部のリボソーム結合部位-リポーター遺伝子）。

【0039】

リポーター遺伝子の場合には、リポーター遺伝子がHCV-ゲノム又はHCV-サブゲノムのオープンリーディングフレーム中ヘクロニングにより導入されていて、つまりタンパク質分解のプロセッシングによって活性形に変換されるような実施態様が特に有利である。

20

【0040】

全てのバリエーションにおける本発明による細胞培養系は多様な目的のために使用することができる。これは次のことを包含する：

- ・ 抗ウイルス性に作用する物質の探索。これは例えば、直接又は間接的にウイルス増加に影響する有機化合物（例えばウイルス性プロテアーゼ、NS3-ヘリカーゼ、NS5BRNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤）、HCV-RNA構築物内の任意の標的配列（例えば5' NTR）にハイブリダイズし、ウイルス増加に直接又は間接的に影響するアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば任意のHCV-RNA配列を分解し、それによりウイルス複製を妨害するHCV-ポリタンパク質又はリボエンザイムの翻訳の減少に基づく）。

30

【0041】

- ・ 細胞培養中での抗ウイルス性に作用する各種の物質の評価。このような物質は例えば単離生成された酵素に関して「合理的ドラッグデザイン（rational drug design）」を用いて並びに「高いスループットスクリーニング（high-throughput screening）」を用いて見出すことができる。評価とは、特に相応する物質の阻害特性の測定並びにその作用メカニズムの決定であると解釈される。

【0042】

- ・ HCV特異的抗ウイルス療法のためのウイルス性又は細胞性の起源の新規の攻撃標的の同定。例えば細胞タンパク質がウイルス増殖のために重要である場合には、この細胞タンパク質の阻害によってウイルス増殖に影響を及ぼすことができる。このような補助的因子の探索は本発明による系を用いて可能である。

40

【0043】

- ・ 耐性測定のための使用。HCV-ゲノムの高い突然変異誘発率に基づき治療法に対する耐性が生じることがある。このような耐性は物質の臨床的認可の際に重要であり、本発明による細胞培養系を用いて測定できる。HCV-RNA構築物もしくはHCV-ゲノム又はサブゲノムを複製する細胞系は、相応する物質の濃度を増加させながらインキュベートし、ウイルスRNAの複製を導入したリポーターにより又はウイルス性の核酸又はタ

50

ンパク質の定性的又は定量的測定により決定する。H C V - R N A の（例えば R T - P C R を用いた）再クローニング及び配列分析により治療的耐性に原因のあるヌクレオチドもしくはアミノ酸交換率を算出することができる。

【0044】

・ 診断薬の開発及び／又は評価のための確かなウイルスタンパク質（抗原）の製造。本発明による細胞培養系は細胞培養中での H C V - 抗原の発現を可能にする。この抗原は、特に診断検出法の構築のためにも使用できる。

【0045】

・ 特に治療法及びワクチンの開発及び製造のため並びに診断目的のための H C V ウイルス及びウイルス様粒子の製造。本発明による細胞培養系を用いて製造することができる特

10

【0046】

想定される本発明による H C V - R N A - 構築物は、その全てのバリエーションにおいて多方面の目的のために使用することができる。これには特に次のことが属する：

・ 弱毒化 C 型肝炎ウイルス又は H C V 様粒子の構築及びその細胞培養中での製造：偶然又は意図的に引き起こされた突然変異、例えば点突然変異、欠失又は挿入により、弱毒化 H C V 粒子又は H C V 様粒子を製造することができる、つまり完全に複製能力を有するが、病原性は少ないか又は失っているウイルスもしくはウイルス様粒子を製造すること

20

【0047】

・ 例えば遺伝子治療における肝細胞特異的遺伝子輸送体として使用するための外来遺伝子を組み込まれた H C V - R N A - 構築物の構築。H C V の優れた向肝細胞性及びそのゲノムの一部を異種配列に置き換えできるという理由から、例えば構造タンパク質を治療上有効な遺伝子に置き換えた H C V - R N A - 構築物を製造できる。こうして得られた H C V - R N A - 構築物は欠損する H C V 機能、例えば構造タンパク質を構成的に又は誘導可能に発現する細胞内へ有利にトランスフェクションによって導入される。「トランス相補性（Transkomplementation）」の概念のもとで当業者に公知のこの技術により、H C V - R N A - 構築物が組み込まれたウイルス粒子を製造することができる。こうして得られた粒子は有利に肝細胞に感染させるために使用することができる。この細胞内で治療上有効な外来遺伝子を発現させ、それにより治療作用を発揮させる。

30

【0048】

・ 生産的なウイルスの増加が行われる許容細胞の探索。この目的のために、完全な感染性ウイルスの形成が可能である前記の H C V - R N A - ゲノム構築物の一つを使用するか、又はこれらの構築物は前記の H C V - サブゲノム構築物の一つを使用し前記の例に従って欠損する機能を構成的に又は誘導可能に発現する細胞系中へトランスフェクションされる。この全ての場合に、付加的に H C V - 配列に耐性遺伝子及び／又はリポーター遺伝子を有するウイルス粒子が生じる。H C V を複製することができる細胞を探索するために、この細胞をこうして製造されたウイルスで感染させ、抗生物質により選択するか又は H C V - R N A - 構築物に依存してリポーター遺伝子の発現の検出を調査する。H C V - R N A - 構築物を複製する場合、抗生物質耐性もしくはリポーター遺伝子の発現は検出可能であるため、こうして見出された細胞は許容性でなければならない。このように、ほぼ任意の細胞系又は初代細胞がその許容性について試験され、探索される。

40

【0049】

本発明による細胞培養系は、H C V - R N A - 複製の範囲内で偶然に生じるか又はこの構築物中へ意図的に導入される突然変異に基づき、複製効率の向上を引き起こす H C V - R N A - 構築物の探索を可能にする。H C V - R N A - 構築物の複製を変化させるこのような突然変異は、当業者には適合突然変異（adaptive Mutationen）として公知である。本

50

発明は従って、細胞培養に適した突然変異体を獲得する方法でもあり、その際、この突然変異体はオリジナルのHCV-RNA-構築物と比べて高められた複製効率を有する。本発明はさらに、オリジナルのHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-全長ゲノム又はHCV-RNA-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体の製造方法を並びにオリジナルの構築物、部分ゲノム又は全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有するHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムを包含する。

【0050】

突然変異体がHCV-RNA-構築物に比べて高められた複製効率を有する本発明によるHCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得するための本発明による方法は、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が請求項2から8までのいずれか1項記載の選択遺伝子を有するHCV-RNA-構築物である請求項1記載の細胞培養系を、選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、この細胞クローンからHCV-RNA-構築物を単離することを特徴とする。

10

【0051】

この製造方法の有利な実施態様において、単離されたHCV-RNA-構築物は新たに少なくとも1回継代される、つまり請求項1による細胞培養系の細胞に導入され、導入されたHCV-特異的遺伝子材料が選択遺伝子を有する単離されたHCV-RNA-構築物である請求項1によるその際得られた細胞培養系を選択遺伝子に応じた選択培地上／中で培養し、成長した細胞クローンを収穫し、このクローンからHCV-RNA-構築物を単離する。

20

【0052】

この変更された方法を用いて適合突然変異の程度ひいては複製効率の程度は該当するHCV-RNA-構築物中でなお高めることができる。

【0053】

オリジナルのHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又はHCV-RNA-構築物と比較して高められた複製効率を有するHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物の突然変異体を製造する本発明による方法は、前記の2つの製造方法を用いて、HCV-RNA-構築物の細胞培養に適合した突然変異体を製造し、これを細胞から単離し、先行技術において公知の方法でクローニングし、配列決定し、オリジナルのHCV-RNA-構築物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列と比較して、突然変異の種類、数、及び位置を決定し、かつこの突然変異を意図的な突然変異誘発又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により、（単離された）HCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノム又は任意のHCV-RNA-構築物中へ導入することを特徴とする。

30

【0054】

実際に複製を変化させる及び特に複製を向上させる突然変異の検出もしくは照合のために、特定のヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換をオリジナルのHCV-RNA-構築物内へ導入し、これを再び細胞培養中へ導入する試験を実施することができる。導入された突然変異が実際に複製を向上させる場合には、選択可能なマーカー遺伝子を有するHCV-RNA-構築物の場合に、人工的に突然変異誘発された構築物において耐性の細胞クローンの数が未処理の構築物の際よりも明らかに高くなる。

40

【0055】

高められた複製効率を有する本発明による細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、ヌクレオチド置換及び／又はアミノ酸置換により請求項2から8のいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物から誘導可能であり、2つの前記製造方法を用いて得ることができることを特徴とする。

【0056】

この細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物は、高められた複製効率を有する任意のHCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又は部分ゲノムを製造するために使用する

50

ることができる。この場合、選択可能な耐性遺伝子を有する構築物並びにこのような耐性遺伝子なしのもしくは選択可能なリポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼ）を有する構築物を製造することができる、それというのも細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物の高い複製効率に基づき、この複製を選択されていない細胞中でも検出することができるためである。

【0057】

オリジナルのHCV-RNA-構築物又はオリジナルのHCV-全長ゲノムと比較して高められた複製効率を有する、HCV-RNA-構築物又はHCV-全長ゲノム又はHCV-部分ゲノムの本発明による細胞培養に適合した突然変異体は、細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物中に、配列分析及び配列比較により、突然変異の種類及び数を決定し、この突然変異をHCV-RNA-構築物中へ、特に請求項2から8までのいずれか1項記載のHCV-RNA-構築物中へ意図的な突然変異誘発によるか又は該当する突然変異を有する配列断片の置換により導入する方法により得られることを特徴とする。

10

【0058】

高いか又は著しく高い複製効率及び実地の適用のために著しく良好な適性を有する特に有利なHCV-RNA-構築物、HCV-全長ゲノム及びHCV-部分ゲノムのグループは、これが表3に記載した全てのアミノ酸置換もしくはヌクレオチド置換及び／又は次の1以上のアミノ酸置換：

1283 arg → gly、1383 glu → ala、1577 lys → arg、1609 lys → glu、1936 pro → ser、2163 glu → gly、2330 lys → glu、2442 ile → val（この数はHCV-単離体con1のポリタンパク質のアミノ酸位置に関する、表1参照）を有することを特徴とする。

20

【0059】

配列表に示される配列の個々の特性

配列番号：1

名称：I389/Core-3'/wt

構造（ヌクレオチド位置）：

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～10842：コアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質
6. 2386～2961：コートタンパク質1（エンベロープタンパク質1）；構造タンパク質
7. 2962～4050：コートタンパク質2（エンベロープタンパク質2）；構造タンパク質
8. 4051～4239：タンパク質p7
9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）
13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）
14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RN

30

40

50

A ポリメラーゼ

15. 10846～11076：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：2

名称：I377/NS2-3'/wt

構造（ヌクレオチド位置）：

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1181：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1190～1800：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする 10
4. 1801～8403：非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1801～2451：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ
6. 2452～4344：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
7. 4345～4506：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
8. 4507～5289：非構造タンパク質4B（NS4B）
9. 5290～6630：非構造タンパク質5A（NS5A） 20
10. 6631～8403：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

11. 8407～8637：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：3

名称：I389/NS3-3'/wt

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする 30
4. 1813～7767：非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～3708：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
6. 3709～3870：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871～4653：非構造タンパク質4B（NS4B）
8. 4654～5994：非構造タンパク質5A（NS5A）
9. 5995～7767：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ 40

10. 7771～8001：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：4

名称：I377/NS3-3'/wt

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1181：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1190～1800：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする 50

4. 1801～7758：非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質

5. 1801～3696：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ

6. 3697～3858：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター

7. 3859～4641：非構造タンパク質4B（NS4B）

8. 4642～5982：非構造タンパク質5A（NS5A）

9. 5983～7755：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

10

10. 7759～7989：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：5

名称：I389／NS2-3'／wt

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域

2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー

3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする

4. 1813～8418：非構造タンパク質2から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質

20

5. 1813～2463：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ

6. 2464～4356：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ

7. 4357～4518：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター

8. 4519～5301：非構造タンパク質4B（NS4B）

9. 5302～6642：非構造タンパク質5A（NS5A）

10. 6643～8415：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

30

11. 8419～8649：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：6

名称：I389／NS3-3'／9-13F

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域

2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー

3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする

40

4. 1813～7767：細胞培養に適合した突然変異体9-13Fの非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質

5. 1813～3708：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ

6. 3709～3870：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター

7. 3871～4653：非構造タンパク質4B（NS4B）

8. 4654～5994：非構造タンパク質5A（NS5A）

9. 5995～7767：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

50

10. 7771～8001：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：7

名称：I389/core-3'/9-13F

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～10842：細胞培養に適合した突然変異体9-13Fのコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質
6. 2386～2961：コートタンパク質1（エンベロープタンパク質1）；構造タンパク質
7. 2962～4050：コートタンパク質2（エンベロープタンパク質2）；構造タンパク質
8. 4051～4239：タンパク質p7
9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ
10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）
13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）
14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846～11076：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：8

名称：I389/NS3-3'/5.1

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～7767：細胞培養に適合した突然変異体5.1の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～3708：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
6. 3709～3870：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871～4653：非構造タンパク質4B（NS4B）
8. 4654～5994：非構造タンパク質5A（NS5A）
9. 5995～7767：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

10. 7771～8001：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：9

名称：I389/core-3'/5.1

構造（ヌクレオチド位置）

10

20

30

40

50

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～10842：細胞培養に適合した突然変異体5. 1のコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質
6. 2386～2961：コートタンパク質1（エンベロープタンパク質1）；構造タンパク質
7. 2962～4050：コートタンパク質2（エンベロープタンパク質2）；構造タンパク質
8. 4051～4239：タンパク質p7
9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2－3プロテアーゼ
10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）
13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）
14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
15. 10846～11076：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：10

名称：I389／NS3－3'／19

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする
4. 1813～7767：細胞培養に適合した突然変異体19の非構造タンパク質3から非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質
5. 1813～3708：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ
6. 3709～3870：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター
7. 3871～4653：非構造タンパク質4B（NS4B）
8. 4654～5994：非構造タンパク質5A（NS5A）
9. 5995～7767：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ
10. 7771～8001：HCVの3'非翻訳領域

配列番号：11

名称：I389／core－3'／19

構造（ヌクレオチド位置）

1. 1～341：HCVの5'非翻訳領域
2. 342～1193：HCVのコアタンパク質－ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合タンパク質；選択可能なマーカー
3. 1202～1812：脳心筋炎ウイルスの内部のリボソーム結合部位；その下流に

10

20

30

40

50

位置するHCVオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする

4. 1813～10842：細胞培養に適合した突然変異体19のコアから非構造タンパク質5BまでのHCVポリタンパク質

5. 1813～2385：HCVコアタンパク質；構造タンパク質

6. 2386～2961：コートタンパク質1（エンベロープタンパク質1）；構造タンパク質

7. 2962～4050：コートタンパク質2（エンベロープタンパク質2）；構造タンパク質

8. 4051～4239：タンパク質p7

9. 4240～4890：非構造タンパク質2（NS2）；HCVのNS2-3プロテアーゼ 10

10. 4891～6783：非構造タンパク質3（NS3）；HCVのNS3プロテアーゼ／ヘリカーゼ

11. 6784～6945：非構造タンパク質4A（NS4A）；NS3プロテアーゼのコファクター

12. 6946～7728：非構造タンパク質4B（NS4B）

13. 7729～9069：非構造タンパク質5A（NS5A）

14. 9070～10842：非構造タンパク質5B（NS5B）；RNA依存性RNAポリメラーゼ

15. 10846～11076：HCVの3'非翻訳領域 20

本発明を以下に実施例ならびにそれに付属する表および図に基づいて詳細に説明する。挙げられる図は以下のことを示す。

【0060】

図1A：本発明によるHCV-RNA構築物の構造

一番上に、完全な親HCVゲノムの構造の略図をポリタンパク質内の分割産物コア、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5Bのための遺伝子の位置、ならびに5'および3'非翻訳領域（5'NTRおよび3'NTR）（水平のバーとして示した）、およびサブゲノム構築物の製造のために選択される両方の位置、すなわちNS5B RNAポリメラーゼの“GDD触媒ドメイン”の位置（GDD）およびHCV-IRESの3'境界部の位置（ヌクレオチド位置1～377もしくは1～389）（ゲノム略図の上方に示した）と一緒に与えた。ゲノム略図の下方の数字は相当するヌクレオチド位置を示している。 30

【0061】

前記略図の下に、5'HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Neor^R）、EMCV-IRES（E-I）およびNS2もしくはNS3から確かな3'末端までのHCV配列からなる本発明による2つの改変したHCV-RNA構築物（サブゲノム）の略図を示している。NS5BポリメラーゼGDDモチーフを含む10アミノ酸の欠失位置をそれぞれ三角形（Δ）で印す。

【0062】

図1B：トランスフェクションして継代培養されたHu h-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果 40

HCV特異的RNAの位置（矢印）および28S rRNAの位置をレーン12の右側に示し、RNAマーカー（M）のサイズ（ヌクレオチド数）をレーン1の左側に示した。

【0063】

図1C：選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン1およびレーン2はポジティブコントロールを示し、レーン13はネガティブコントロールを示している。レーン1の左に示された数字はヌクレオチドマーカー分子のサイズを明示している。 50

【0064】

図2A：HCV-RNA構築物を有する細胞クローン（9-13）における導入されたレプリコンDNA（プラスミド分子I₃₇₇/NS3-3'/wt）の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果

レーン7～レーン11は細胞クローン9-13の全DNAを添加しない構築物I₃₇₇/NS3-3'/wtのDNA分子の検量の結果を表し、かつレーン2～レーン6はPCR前にその都度1μgの9-13DNAを添加した（DNA調製におけるPCRのインヒビターの排除のため）同一のプラスミド分子を表す。レーン13はネガティブコントロール（DNAプローブ無しでのPCR）を表す。

レーン1は細胞クローン9-13の全DNA1μgを使用して得られた結果を示している。

10

【0065】

図2B：HCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量的ためのノーザンブロット試験の結果

矢印はレプリコンRNAの位置を印している。“プラス”および“マイナス”の移行はゲル上に載せられたRNAコントロールの正（プラス）の極性もしくは負（マイナス）の極性を表す。“マイナス鎖”および“プラス鎖”は放射性RNAプローブの特異性を表す。

【0066】

図2C：HCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果

20

図3A：代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出

レーン7～レーン9は確かなサイズマーカー（Hu h-7細胞中でのHCV-RNA構築物の一過性発現後に得られた）を表し、同定されたHCVタンパク質はレーン1の左端に印し、分子量（キロダルトン）はレーン9の右側に示した。

【0067】

図3B：HCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果

図4：5' HCV-IRE S、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Ne o^R）、異種の、例えば脳筋炎ウイルスのIRE S-エレメント（E-I）、完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物（完全なゲノム）の構造の略図

30

図5：ポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子（単シストロン性RNA）（A）および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子（2シストロン性RNA）（B）を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図6：NS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（A）（そのリポータータンパク質は最終的にはウイルスまたは細胞のプロテアーゼによってポリタンパク質から分離され、かつ選択可能なマーカー遺伝子（選択遺伝子）もしくは耐性遺伝子は同時トランスフェクションによって細胞中に導入される）、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子（例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子）からなる融合遺伝子の一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（B）、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子（例えばネオマイシンホスホトランスフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質のための遺伝子）からなるレプリコンの一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（C）（これらはプロテアーゼによって分解できるかまたは自己分解（自己触媒）活性を有するアミノ酸配列（斜線の範囲）をコードするヌクレオチド配列中を介して結合している）、自体の内部のリボソーム結合部位（IRE S）から発現される独立の遺伝子（ここでは緑色蛍光タンパク質）として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（D）（耐性遺伝子（ここではネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子）は自体の内部のリボソーム結合部位

40

50

(IRES) から独立して同様に発現される) (複シストロン性構築物) の略図

図7: 耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図

太い線はHCVの5'および3'のNTRを意味し、E-Iは耐性遺伝子の発現のために必須の異種の内部リボソーム結合部位であり、灰色の正方形はリボザイムもしくはリボザイムの認識部位を意味する。

【0068】

図8: 耐性遺伝子および組み込まれた外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図

図9: 全RNAとインビトロ転写物との比感染力 (形成した細胞コロニーの数として示した) の比較のための方法プロセス

HCV-RNAを相応のRNA構築物のインビトロ転写によって製造し、260nmでの光学密度 (OD_{260nm}) の測定によって定量した。これらの分子の規定された数をナイーヴHu h-7細胞の全RNAの一定量と混合し、かつこれらの混合物をエレクトロポレーションを使用してナイーヴHu h-7細胞中に導入した。それに並行して、図1に記載される方法によって製造された細胞クローンの全RNAを従来の技術において公知の方法で単離し、かつそれに含有されるHCV-RNAの量をHCV特異的なRNAプローブを使用するノーザンブロットおよび引き続きのホスホイメージャー (Phosphoimager) による定量によって決定する。全RNAの規定された量をインビトロ転写物と類似にネイティブなHu h-7細胞中にトランスフェクションさせた。次いで両方のバッチ中の細胞はG418選択を実施し、かつ形成したコロニーの数を、固定およびクーマシーブリリアントブルーでの染色の後に計数することによって決定した。トランスフェクション効率の決定のために、各トランスフェクションバッチにルシフェラーゼの発現を可能にするプラスミド1μgを添加した。トランスフェクションした細胞のアリコートをも24時間後に収穫し、かつ各細胞溶解物中のルシフェラーゼ活性を決定した。コロニーの数はその都度ルシフェラーゼ発現に基づいて規格化した。

【0069】

図10: 9-13クローンの配列分析

HCV-RNA構築物I377/NS3-3'のトランスフェクションによって生じる細胞クローン9-13の全RNAを従来の技術において公知の方法を使用して単離し、かつヌクレオチド位置59~9386までのHCV-RNA構築物を“長距離RT-PCR (long-distance RT-PCR)”を使用してプライマーS59およびA9413の使用下に増幅させた。PCR断片をクローニングし、かつ11個のクローン (9-13A~Kと呼ぶ) を完全に配列決定し、その際、クローンDおよびクローンI、クローンEおよびクローンGならびにクローンHおよびクローンJは同一であると証明された。再クローニングされたHCV-RNAと親構築物の間のNS3-5B領域におけるアミノ酸差異の位置はそれぞれのクローンにおいて太い垂線で印した。各クローンを制限酵素SfiIで消化し、かつそれぞれの断片を親構築物に挿入した。これらのクローンをそれぞれのHu h-7細胞にトランスフェクションし、該細胞を図1に記載のように選択した。各構築物によって得られる細胞クローンの数は各構築物の右隣に印した。

【0070】

図11A: リポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理

この図の上方部分においては、HCV5'NTR (ヌクレオチド位置1~389)、ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc)、脳筋炎ウイルスのIRES、HCVNS3-5Bおよび3'NTRからなるHCV-DNA構築物I₃₈₉/Luc/NS3-3'が示されている。不活性化するアミノ酸の交換が導入されたNS5B RNAポリメラーゼの活性中心の位置は“GND”で示した。複製能力のあるHCV-RNA構築物もしくは欠失HCV-RNA構築物をコードするプラスミドをScaIで消化し、かつT7RNAポリメラーゼによるインビトロ転写において使用した。鋳型DNAの除去後に、それぞれのHCV-RNA構築物をエレクトロポレーションによってナイーヴHu h-7細胞中に導入し、これ

10

20

30

40

50

らを規則的な間隔で収穫した。

【0071】

図11B：親HCV-RNA構築物 $I_{389}/Luc/NS3-3'/wt$ (wt) または以下の変異体：不活性RNA (318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5.1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較

細胞を、トランスフェクション後の6時間（示されていない）、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間および168時間に収穫し、かつルシフェラーゼ活性を発光測定的に決定した。

【0072】

図12：選択可能なHCV全長ゲノム（構築物 $I_{389}/core-3'/5.1$ および $I_{389}/core-3'/9-13F$ ）

（A）全長構築物の略図。制限酵素 *Sfi*I のための2つの示される認識部位間の範囲は高度に適合したRNA変異体5.1または9-13Fの配列に相当する。

【0073】

（B）Aに示される構築物 $I_{389}/core-3'/5.1$ のインビトロ転写されたRNA各0.1 μ gでH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数。代表的な試験の結果を挙げている。

【0074】

（C）相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV-全長RNAの検出。図はneo耐性遺伝子およびHCV5'NTRに対するプローブとハイブリダイズしたノーザンブロットのオートラジオグラムを示している。レーン1およびレーン2に示されるコントロールは、ナイーヴH7細胞からの全RNAと混合された挙げられるインビトロ転写物の各 10^8 分子に相当する。ネガティブコントロールはナイーヴH7細胞（レーン3）からの全RNAを専ら有している。レーン4～9は、インビトロ転写された $I_{389}/core-3'/5.1$ -RNAもしくは $I_{389}/core-3'/9-13F$ -RNAでトランスフェクションした後に得られたG418耐性細胞クローンからの全RNA3～10 μ gを含有している。選択のために使用されるG418濃度をその都度挙げている。示される5個の細胞クローンは高度に適合したRNA変異体5.1（レーン4～8）を有し、1個の細胞クローンは適合したRNA変異体9-13F（レーン9）を有している。

【0075】

図13：1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物。（A）2シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子を別々のIRESを使用して翻訳した。（B）単シストロン性HCV-RNA構築物。リポーター遺伝子産物をHCVタンパク質との融合タンパク質として発現させた。2つの成分をウイルスのプロテアーゼもしくは細胞のプロテアーゼのための融合された2つのタンパク質成分のタンパク質分解による分離を可能にする認識配列を介して結合させる。示される例ではリポーター遺伝子産物およびそれぞれのHCVタンパク質をユビキチン（Ub）のための認識配列を介して融合させた。

【0076】

図14：耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV-全長RNA構築物。

【0077】

図15：耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物。耐性遺伝子（RG）は融合タンパク質として活性であるか、または該遺伝子を、耐性遺伝子産物がHCV成分の細胞性もしくはウイルス性のプロテアーゼによって分解されるように、HCV成分を有するタンパク質分解可能な配列と融合する。示される例では、耐性遺伝子を、ユビキチン（Ub）をコードする配列を介してそれぞれのHCV成分と融合させた。

【0078】

【実施例】

10

20

30

40

50

例 1：H C V－R N A－構築物の製造

(A) R T－P C Rを用いた完全H C V－コンセンサスゲノムの合成およびクローニング
慢性に感染した患者の肝臓から、H C V－ゲノム、つまりH C V－R N Aを以下の通りに
単離した：

肝臓約 1 0 0 m g からChomczynskiおよびSacci(1987, Anal. Biochem. 162, 15)の方法により完全R N Aを単離した。単離したこのR N A 1 μ gを用いて、プライマーA 6 1 0 3 (G C T A T C A G C C G G T T C A T C C A C T G C)またはA 9 4 1 3 (C A G G A T G G C C T A T T G G C C T G G A G)を有し、かつエキスパンドリバーストランスクリプターゼ(expand reverse transcriptase)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いた逆転写を製造元の指示に従って実施した。この逆転写(R T)生成物を用いて、10
ポリメラーゼ連鎖反応(P C R=polymerase chain reaction)を、エキスパンドロングテンプレート(expand long template)システム(Boehringer Mannheim、ドイツ)の使用下で実施し、その際、ジメチルスルホキシド2%の含有率を有する緩衝液を使用した。4 2℃で1時間の後、この反応バッチの1／8を、プライマーA 6 1 0 3およびS 5 9 (T G T C T T C A C G C A G A A A G C G T C T A G)、またはA 9 4 1 3およびS 4 5 4 2 (G A T G A G C T C G C C G C G A A G C T G T C C)とともに第一のP C Rのサイクルにおいて使用した。4 0サイクル後に、この反応バッチの1／1 0を、プライマーS 5 9およびA 4 9 1 9 (A G C A C A G C C C G C G T C A T A G C A C T C G)、またはS 4 5 4 2およびA 9 3 8 6 (T T A G C T C C C C G T T C A T C G G T T G G)とともに第二のP C Rのサイクルにおいて使用した。3 0サイクル後に分離用アガロースゲル20
電気泳動を用いてP C R生成物を精製し、かつその際に溶離した断片をベクターp C R 2 . 1 (Invitrogen)またはp B S K I I (Stratagene)中でライゲーションした。それぞれの断片からの4つのクローンを分析し、かつ配列決定し、かつコンセンサス配列を確認した。この目的のためにD N A配列を相互に比較した。断片の1つの配列が残りのものと異なる位置を、不所望の突然変異と見なした。配列が多義性である場合、該当する領域の自体オーバーラップしている比較的短いP C R断片を増幅し、かつ複数のクローンを配列決定した。このようにしてそれぞれの断片中の数多くの潜在的な突然変異を同定し、ひいては単離物－特異的なコンセンサス配列を確定することができた。確定されたこのコンセンサス配列もしくはこのゲノムは、世界的に普及している遺伝子型1 bに属する。3'末端における翻訳されなかった領域(=3' N T R)が通常のP C Rにより得られ、その際30
、従来技術において公知の「X－テール(X-tails)」(Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744およびRice, P C T／U S 9 6／1 4 0 3 3)の最後の2 4のヌクレオチドを覆うアンチセンスプライマーを使用した。P C Rを用いてT 7プロモーターの鎖の下流の5'－末端(=5' N T R)における確立された非翻訳領域を発生させ、その際、一方では短縮したT 7プロモーター(T A A T A C G A C T C A C T A T A G)およびH C Vの第一の8 8のヌクレオチドに相当するオリゴヌクレオチドを使用し、かつ他方ではゲノムの5'断片の1つを有する前記のプラスミドを使用した。非コンセンサス交換の数が極めて少ないサブゲノム断片から、完全H C V－コンセンサスゲノムを構成し、かつ改変したp B R 3 2 2－ベクターに挿入した。部位特異的突然変異(site-directed mutagenesis)を用いてコンセンサス配列からの差異を排除した。確定40
された3'末端を有する「ラン－オフ(run-off)」転写を製造するために、単離物の3'－N T R(末端T G Tを有する)をA G Tに変性し(Kolykhalov et al., 1996, J. Viro l. 70, 3363による遺伝子型3＝クローン' W S'の配列による)、かつさらに付加的なヌクレオチド交換を位置9 5 6 2において行い、A T塩基対を3' N T R(Kolykhalov et al., ibid.)の3'末端におけるヘアピン構造中に保持した。酵素S c a 1のための内部の制限部位を排除するために、さらにいわゆる発現しない(silent)ヌクレオチド交換を行った。適合した5' N T Rおよび3' N T Rを有する全長のゲノムの連結後に、完全H C V配列を調査した。その際、不所望のヌクレオチド交換は発見されなかった。

【0 0 7 9】

このようにして製造したH C Vゲノムは、定義によれば向肝性(hepatotrop)であるべきで50

ある。

【0080】

(B) 選択可能なHCV-サブゲノム構築物の合成

(A)に記載したコンセンサスゲノムの使用下に、抗生物質耐性遺伝子のネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ(NPT)および内部のリボソーム結合部位(IRES)の2つの配列を有するHCV-サブゲノム-構築物を製造した。このために使用した生化学的なプロセス技術は、当業者に公知であり、かつ周知である(次の文献を参照のこと:Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, Molecularcloning: a laboratory manual., 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1-3, John Willey & Sons Inc., New York)。抗生物質耐性遺伝子を直接5' NTRの後ろに挿入し、このことにより2シストロンのRNAが得られた(図1Aを参照のこと)。しかしまた抗生物質耐性遺伝子はHCV-サブゲノム-構築物の別の部位、例えばポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列の内部にもまた同様に良好に挿入することができ、このことにより単シストロンのRNAが得られる(図5Aを参照のこと)か、または3' NTR中に挿入する(図5Bを参照のこと)。IRES-エレメントは一方では両方のHCV-IRES-変異体ヌクレオチド1-377またはヌクレオチド1-389の1つであり、かつ他方ではNS2またはNS3に関する遺伝子の鎖の下流にゲノムの確かな3'末端までHCV配列の翻訳を制御するエンゼファロマイオカルディティス(Enzephalyomyocarditis)ウイルスのIRESである。

【0081】

前記の両方のHCV-IRES-変異体を以下の通りに確認した:

HCV-IRESの3'境界部の欠失分析法(Reynolds et al., 1995, EMBO J. 14, 6010)に基づいて、5' NTRの種々の断片をNPT遺伝子と融合し、かつT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含有しているプラスミドとの同時トランスフェクションに基づいて、形成されたコロニーの最大数に関して分析した。1-377および1-389のHCV配列で最良の結果が得られた。HCVポリタンパク質のAUG出発コードは位置342に存在し、ひいてはIRES配列中に含有されているので、HCV-コアタンパク質(コアタンパク質(Core-Proteins))の12個もしくは16個のアミノ酸とネオマイシンホスホトランスフェラーゼとが融合する(図1Aを参照のこと)。

【0082】

従ってこの改変されたHCV-サブゲノム-構築物は名称I₃₇₇/NS2-3'(またはI₃₇₇/NS3-3')およびI₃₈₉/NS2-3'(またはI₃₈₉/NS3-3')を有していた。これらは図1Aに図示されている。

【0083】

これらの改変された親HCV-サブゲノム-構築物I₃₇₇/NS2-3'(またはI₃₇₇/NS3-3')およびI₃₈₉/NS2-3'(またはI₃₈₉/NS3-3')のインビトロ-転写を用いて、ヒトの肝細胞の種々の細胞系および一次細胞培養をトランスフェクションした。

【0084】

すべてのトランスフェクション実験に並行するネガティブコントロールとして、それぞれの改変親HCV-サブゲノム-構築物に対して、1つの相応して改変したが、しかしサブゲノムは読み枠中で、NS5B RNAポリメラーゼの活性中心を含む10個のアミノ酸の欠失を有していることにより親サブゲノムから区別される欠損サブゲノムを構成した(Behrens et al., 1996, EMBO J. 15, 12; およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 8416)。

【0085】

(C) 選択可能なHCV-ゲノム-構築物の合成

5'末端でルシフェラーゼ遺伝子の断片および完全EMCV-IRESと結合しているNS2-3'サブゲノム構築物を、NcoIおよびSpeIで制限し、かつ分離用アガロー

スゲル電気泳動を用いて精製した。このようにして得られたベクターを3ファクターライゲーションにおいて、NcoI/NotI-HCV-断片を用いてHCV-ゲノムのヌクレオチド位置342~1968に相応して、およびNotI/SpeI-断片を用いてヌクレオチド位置1968~9605に相応してライゲーションした。その後、完全HCV-読み枠および3' NTRがルシフェラーゼ遺伝子断片およびEMCV-IRESの下流に存在している得られた構築物を、PmeIおよびSpeIで制限し、かつ同様に制限したI₃₈₉/NS3-3'/wt-サブゲノム構築物ベクターを用いてライゲーションした。選択可能なこのHCV-ゲノム構築物が図4に記載されている。

【0086】

(D) HCV-RNA-構築物に相応したインビトロ転写物の製造

前記の精製したプラスミドDNAを、ScaIを用いて直線状にし、かつフェノール/クロロホルム-抽出およびイソプロパノール-沈殿後に次の成分の使用下にインビトロ転写反応で使用した：HEPES 80 mM、pH 7.5、MgCl₂ 12.5 mM、スペルミジン 2 mM、ジチオトレイトール 40 mM、それぞれのNTPから2 mM、RNasin 1 ユニット/μl、制限DNA 50 μg/ml およびT7 RNAポリメラーゼ約2 ユニット/μl。37℃で2時間後にT7ポリメラーゼの半量を添加し、かつ反応バッチをさらに2時間インキュベーションした。DNAの除去のために、該混合物を酸性フェノールで抽出し(U. Kedzierski, J.C. Porte, 1991, Bio Techniques 10, 210)、イソプロパノールで沈殿し、ペレットを水中に溶解し、かつDNase (DNA μgあたり2 ユニット) とともに37℃で60分間インキュベーションした。酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いたその後の抽出およびイソプロパノール-沈殿の後、溶解したRNAを光学密度測定により定量化し、かつその不確定性をホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により調査した。

【0087】

例2：肝癌細胞系Hu h-7を用いたトランスフェクション実験

すべてのトランスフェクション実験において、それぞれの鋳型DNAをあらかじめ除去して、該DNAがトランスフェクションした細胞に導入され、かつHCVの複製とは無関係にこれらにネオマイシン耐性を媒介することができるということを回避することに慎重に注意を払った。従ってインビトロ転写(例1D)に引き続き、DNA μgあたり、DNase 2 ユニットを用いて反応混合物を37℃で60分間処理し、かつ酸性フェノール、酸性フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムを用いて抽出した。トランスフェクションのための使用前に、ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動を用いて沈殿したRNAを分析した。

【0088】

高度に分化したヒト肝癌細胞系Hu h-7を用いて3つの別々のトランスフェクション実験を実施した(Nakabayashi et al., 1982, Cancer Res. 42, 3858)。その際、エレクトロポレーションを用いてその都度RNA 15 μgを8×10⁶ Hu h-7細胞中に導入し、かつこれらの細胞を引き続き直径10 cmの培養皿に播種した。播種の24時間後に、ネオマイシン(=G418)を最終濃度1 mg/mlで添加した。培地を週に2回交換した。3~5週間後に小さいコロニーが認識され、これを単離し、かつ同一の培養条件下で継代した。

【0089】

第一の実験の経過において得られた細胞クローンを単離し、かつ継代培養した。この手順においてほとんどのクローンが死滅し、かつ最終収率は親HCVサブゲノム構築物でトランスフェクションされていた細胞クローンがわずか9および欠損HCV-ゲノム構築物、つまり欠損NS2-3' HCV-RNAでトランスフェクションされていた細胞クローン1(クローン8-1)であった。短縮された倍增時間および不規則に形成された細胞が時折出現すること以外に、これらの9の細胞クローンと1の細胞クローン(クローン8-1)又は親Hu h-7細胞の間には安定した形態学的な相違は見られなかった。

【0090】

機能性HCVゲノム構築物に関する主な基準は、正確な大きさを有するウイルスRNAの形成およびG418耐性を転写されたか、もしくは媒介された可能性のある（組み込まれた）プラスミドDNAの不在である。

【0091】

Huh-7細胞中でHCV-RNAを決定するために、全RNAを単離し、かつ慣用のノーザンブロット法を用いてプラス鎖-特異的なリボプローブ(Ribosonde) (RNA-プローブ)の使用下に分析した。このためにChomczynskiおよびSacci, 1987, Anal. Biochem. 162, 156の方法によりそれぞれの細胞クローンから全RNAを単離し、変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動法を用いて全RNA含有率0.5~1×10⁶細胞に相当するRNA10μgを分離した(図1Bのレーン3~12)。確かな配列を有するサイズマーカーとして、I₃₈₉/NS2-3'/wtまたはI₃₈₉/NS3-3'/wtレプリコンRNAに相応する10⁹のインビトロ複写を同時に分離した(レーン1もしくはレーン2)。分離したRNAをナイロンメンブランに移し、かつヌクレオチド377~ヌクレオチド1の完全NPT-遺伝子およびHCV-IRESに対して相補性に放射性標識したプラス鎖-特異的なRNA-プローブを用いてハイブリダイゼーションした。HCV-特異的なRNA(矢印)および28SrRNAの位置は、レーン12の右側に記載されており、RNAマーカーの大きさ(ヌクレオチドの数)は、レーン1の左側に記載されている。RNAマーカーの断片は、HCV配列を有しており、かつ従ってリボプローブとハイブリダイゼーションする。この分析の結果は図1Bに記載されている。

【0092】

欠損HCVゲノム構築物を用いてトランスフェクションしたクローン8-1を例外として、すべての細胞クローンは正確な長さの均質なHCV-RNAを産出した(NS2-3'の場合、約8640のヌクレオチドおよびNS3-3'レプリコンの場合、約7970のヌクレオチド)。この調査は、機能性レプリコンもしくは機能性HCVゲノム構築物が、G418耐性を転写するということの指標である。G418耐性が、Huh-7宿主細胞のゲノムに組み込まれており、かつ細胞プロモーターのコントロール下で転写されるプラスミドDNAに起因するということを排除するために、NPT遺伝子特異的なPCRを用いてそれぞれのクローンからDNAを調査した。この場合、選択されたHuh-7細胞クローンから、10mM Tris、pH7.5、1mM EDTA、0.5% SDS中のプロテインキナーゼK(40μg/ml、1h、37℃)を用いた消化および引き続きフェノール、フェノール/クロロホルムを用いた抽出およびイソプロパノール沈殿によりDNAを単離した。DNA沈殿物を10mM Tris(pH7.5)および1mM EDTA中に溶解し、かつRnaseAを用いて1時間インキュベーションした。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿に引き続き、4~8×10⁴細胞に相応するDNA1μgを、NPT-遺伝子-特異的なプライマー(5'-TCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC-3'および5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGC-3')の使用下にPCRを用いて分析し、かつ379のヌクレオチドからなるDNA断片が得られた。PCR生成物の特異性をサザンブロット法を用いて検出し、その際、NPT遺伝子に相応するジゴキシゲニン標識したDNA断片を使用した。ポジティブコントロールとして、10⁷のプラスミド分子またはネオマイシン耐性遺伝子を用いて安定にトランスフェクションされたBHK細胞系からのDNA1μgを用いてPCR法を実施し、かつネガティブコントロールとして、同一であるがしかしDNAを添加しなかった反応試薬を用いてPCRを実施した。

【0093】

この調査の結果は図1Cに記載されている。レーン1および2は、ポジティブコントロールを表し、レーン13は、ネガティブコントロールを表す。レーン1の左側の数の表示は、ヌクレオチドマーカー分子の大きさを表している。NS2-3'レプリコン/NS2-3'HCVゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン7-3(図1C、レーン3)中、および欠損HCVゲノム構築物を用いたトランスフェクションによる細胞に由来するクローン8-1(図1C、レーン12)中以外に

は、いずれの細胞クローンでもNPT-DNAを検出できなかった。この調査は、ほとんどのクローンのG418耐性が複製されたHCV-RNAにより媒介されたということのためのさらなる指標である。しかしこの結果とは無関係に、正確な大きさを有するHCV-RNAを組み込まれたプラスミドDNAから製造することはあり得ない。というのもインビトロ転写のために使用されるプラスミドは、真核生物プロモーターもポリアデニル化シグナルも有していないからである。従ってクローン7-3の場合、耐性はおそらくHCV-RNA-構築物もしくは複製するHCV-RNAによっても、組み込まれたNPT-DNA配列によっても媒介される可能性は極めて高く、その一方でクローン8-1の細胞の耐性はもっぱら導入されたプラスミドDNAに起因する。

【0094】

G418耐性が自律的に複製するHCV-RNAにより媒介されていることを証明するためにクローン9-13（図1B、レーン11）をさらに試験した。NPT-遺伝子の導入されたコピーを有するクローン8-1をあらゆるところでネガティブコントロールとして使用した。クローン9-13中のNPT-DNAの存在を徹底的に排除するという目的で、40000以下の細胞中のNPT-遺伝子-コピー1000未満の検出を可能にするPCRを実施した。このPCRの結果は図2Aに記載されている。このPCRの場合、詳細には以下の通りに行った：

その都度 $10^6 \sim 10^2$ のプラスミド分子（I₃₇₇/NS3-3'/wt）を、直接（レーン7~11）またはその都度 $1 \mu\text{g}$ の9-13 DNAの添加後（レーン2~6）に試験で使

【0095】

この高感度な方法を用いても細胞クローン9-13のDNA μg 中にプラスミドDNAは検出されなかった（レーン1）。これらの細胞中のHCV-プラス鎖およびマイナス鎖のRNAの量を評価するために、プラス鎖およびマイナス鎖特異的な放射性標識したリボプローブ(Ribosonde) (= RNAプローブ)の使用下にノーザンブロット法を用いて全RNAの希釈系列を分析した。このために、その都度、細胞クローン9-13および8-1から単離された全RNA $8 \mu\text{g}$ 、 $4 \mu\text{g}$ または $2 \mu\text{g}$ を、ノーザンブロット法で公知量のプラス鎖またはマイナス鎖極性（コントロールRNA）を有する類似のインビトロ転写と並行して分析し、かつ引き続きハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、完全NPT遺伝子およびHCV-IRESを覆うプラス鎖特異的なリボプローブ（上部の図版の「プラス鎖」）を用いるか、またはNS3-配列に対して相補的なマイナス鎖特異的なRNAプローブ（下部の図版の「マイナス鎖」）を用いて実施した。矢印はレプリコンRNAの位置を標識している。この分析の結果は図2Bに記載されている。

【0096】

プラス鎖の場合、約 10^8 コピー/全RNA μg が検出され、これは細胞あたり1000~5000のHCV-RNA-分子に相当するが、その一方でマイナス鎖RNAの量は5~10倍低かった。この結果は、マイナス鎖RNAは、プラス鎖分子の合成のための装入物として使用される複製中間体もしくは中間コピーであるという仮定と一致する。

【0097】

反応は実質的にウイルスRNAに依存したRNAポリメラーゼにより触媒されるので、HCV-RNAの合成は、DNA鋳型からのRNA合成を選択的に抑制するが、しかしRNA鋳型からのRNA合成を抑制しない抗生物質であるダクチノマイシンに対して耐性であるべきである。この推測を裏付けるために、 $[^3\text{H}]$ ウリジンを用いて細胞をダクチノマイシンの存在下でインキュベーションし、放射性標識したRNAを抽出し、変性アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、かつ $[^3\text{H}]$ 感光板の使用下に市販のバイオイメージャー(Bio-Imager)を用いて分析した。このためにその都度、クローン9-13および8-1の細胞約 5×10^5 をC i $[^3\text{H}]$ ウリジン 100μ を用いてダクチノマイシン(Dact)の不在下(-)または $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下(+)に16時間インキュベーションし

た。この標識反応に引き続き、全RNAを調整し、かつホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。両方の第一のレーン中で、全RNAの1/10が表示されているのみである。放射性標識したRNAを、BAS-2500バイオイメージャー（フジ(Fuji)社）を用いて目視できるようにした。

【0098】

この分析の結果は図2Cに記載されている。NS5Bポリメラーゼのインヒビタープロフィールとの一致において (Behrens et al., 1996, EMBOJ. 15, 12およびLohmann et al., 1997, J. Virol. 71, 8416)、HCV RNAの複製はダクチノマイシンにより影響を受けることはないが、その一方で細胞RNAの合成は抑制された。ウイルスRNAの同一性を確認するために、複製した配列の再クローニングのためにRT-PCRを実施した。再クローニングしたRNAの配列分析は、クローン9-13中のRNAがHCV-特異的であり、かつHCV-構築物 I₃₇₇/NS3-3'/wt の転写した転写物と一致することを示した。

10

【0099】

ウイルスタンパク質の分析のために該当する細胞をまず代謝的に [³⁵S] メチオニン/システインを用いて放射性に標識し、引き続き溶解し、かつその後、免疫沈降を用いてHCV特異的なタンパク質を細胞-溶解産物から単離した。この分析の結果は図3Aに記載されている。その際、詳細には以下の通りに行った：細胞クローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、当業者に公知であり、かつ市販のタンパク質標識混合物（例えばNEN Life Science）を用いて16時間処理することにより代謝的に放射性標識した。非変性条件下（例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol, 69, 7519による）または3つの異なった抗血清の使用下（3/4, 5A, 5B、レーン1～12の上部の末端における標識による）に免疫沈降 (IP) を用いて、HCV特異タンパク質を細胞-溶解産物から分離した。トリシンSDS-PAGEを用いて免疫複合体を分析し、かつオートラジオグラフ法を用いて目視できるようにした。確定された大きさのマーカーを得るために、相同レプリコン構築物 I₃₇₇/NS3-3'/wt をワクシニアウイルスT7-ハイブリッド系を用いてHu h-7細胞中で一過性発現させた。その際に得られた生成物をサイズマーカー（レーン7～9）として、クローン9-13および8-1の細胞と並行して処理した。同定されたHCVタンパク質は、レーン1の左の端に標識されており、分子量（キロダルトン）は、レーン9の右側の端に記載されている。使用されるNS3/4特異的な抗血清（'3/4'）は、有利にはNS4AおよびNS4Bと反応し、これはNS3の下位表示 (Unterrepräsentation) につながることがわかる。

20

30

【0100】

すべてのウイルス抗原は明確に検出可能であり、かつその見かけの分子量は、2シストロンのHCV-RNA-構築物の一過性発現により本来のHu h-7細胞中で確認された分子量に対する差異を示さなかった。ウイルス抗原の細胞内分布を決定するために、NS3およびNS5A特異的な抗血清の使用下に免疫蛍光法-検出反応を実施した（例えばBartenschlager et al., 1995, J. Virol, 69, 7519による）。このためにクローン9-13 (wt) および8-1 (Δ) の細胞を、播種の24時間後にメタノール/アセトンを用いてカバーガラス上に固定し、かつポリクローナルNS3またはNS5A特異的な抗血清とともにインキュベーションした。結合した抗体を市販のFITC-共役した抗ウサギ抗血清を用いて目視できるようにした。非特異的な蛍光シグナルの抑制のために、細胞を色素「エバンスブルー (Evans Blue)」で色分けした。

40

【0101】

この検出の結果は図3Bに記載されている。両方の抗血清を用いて細胞質中の強い蛍光を検出することができた。NS5A特異的な抗血清はさらに弱い細胞核の蛍光につながり、このことは、この抗原の少なくとも少量が細胞核にも達したことを暗示している。しかし細胞質中のウイルス抗原の一般に優勢な存在は、HCV-RNA複製が、多くのRNAウイルスの場合に該当するように、細胞質中で行われていることに関する著しい指標である。

50

【0102】

これらの結果は、ここに記載されている試験バッチを用いてHCVのための細胞培養系の構築が成功しており、その効率はすべて従来公知のサイズのオーダーに勝っており、かつ通例の、かつ実証済みの生化学的方法で初めてウイルス性の核酸およびタンパク質の検出を可能にしたことを明らかに裏付けている。この効率は初めてHCVの発病学の完全に詳細な調査、種々のHCV機能の発生学的分析およびウイルス／宿主細胞の相互作用の精密な研究を可能にし、このことにより抗ウイルス治療法の開発のための手がかりを定義することができる。

【0103】

例3：HCVゲノム構築物を用いたHu h-7細胞のトランスフェクション

10

例2に記載したようにHu h-7細胞をトランスフェクションし、かつ選択したが、しかしその際、ここで完全なウイルスゲノムを有している選択可能な構築物を使用した。得られた細胞クローンを例2と同様にしてHCV-DNAの不在下にPCRを用いて調査し、かつその後、HCV-RNAの産生複製を、ダクチノマイシンの存在下にノーザンブロット、 $[^3\text{H}]$ ウリジン標識、ウイルスタンパク質もしくは抗原の検出を用いて、有利にはウエスタンブロット、免疫沈降法または免疫蛍光法を用いて検出した。例2に記載されているバッチとは対照的に、ここに記載されている構築物を用いて、さらに完全で、かつ極めて感染力の高いウイルスが得られるが、これは該部位（例2中）に記載されているサブゲノム構築物の場合、該当しない。細胞および細胞培養上清中に存在しているこれらのウイルスは、例えば超遠心分離、免疫沈降またはポリエチレングリコールを用いた沈殿により濃縮し、かつすべての外因性、つまりウイルス粒子中に構築されていない核酸を、ヌクレアーゼ（RNase、DNase、単球菌ヌクレアーゼ）を用いたインキュベーションにより消化する。このようにして、保護ウイルス粒子中に含有されていないすべての汚染性の核酸を除去することができる。保護されたウイルスRNAをヌクレアーゼのインキュベーション後に、例えばプロテイナーゼKを用いたインキュベーションを用いてSDS含有緩衝液中でフェノールおよびフェノール／クロロホルムを用いた抽出により単離し、かつHCV特異的なプライマーの使用下にノーザンブロットまたはRT-PCRを用いて検出する。この試験バッチでも前記のHCVコンセンサスゲノムと選択マーカーとの組み合わせはウイルスRNA、ウイルスタンパク質ひいてはHCV粒子の効果的な生産にとって決定的である。

20

30

【0104】

例4：耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-サブゲノム配列と結合しているHCV-RNA構築物の製造および適用

例1または例3によりHCV-RNA構築物を製造し、その際、抗生物質耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合している。このような構築物は、図7に図示されている。Hu h-7細胞は、例えば例2に記載されているように、これらのHCV-RNA構築物でトランスフェクションされている。細胞へのトランスフェクション後に、まず、相応する抗生物質を用いた選択を行う。その際に得られる細胞クローン中で、単一クローン性リボザイムが活性化されるか、またはリボザイムのための認識部位を有する構築物の場合、リボザイムが細胞中に導入される（例えばリボザイム構築物のトランスフェクションまたはその中で相応するリボザイムが使用されたウイルス発現ベクターを用いた感染による）。両方の場合においてリボザイム媒介された分解により耐性遺伝子はHCV-RNA配列から分離される。その結果は、HCV-ゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していない確立されたHCV-ゲノムであり、これは確立された感染性ウイルス粒子の形成のための能力がある。HCV-サブゲノム構築物の場合、耐性遺伝子を有していないHCVレプリコンが生じる。

40

【0105】

例5：別々のルシフェラーゼトランスフェクション構築物を用いたHCV-RNA構築物の同時トランスフェクション

例1（A）または例3または例4によりHCV-RNA構築物を製造する。これと並行

50

して、ルシフェラーゼ遺伝子を含むトランスフェクション構築物を製造し、その際、HCV-プロテアーゼ（例えばNS3-プロテアーゼ）分割部位に関してコードする第一のヌクレオチド配列を用いて、このルシフェラーゼ遺伝子と、その他のタンパク質またはその他のタンパク質の一部をコードする第二のヌクレオチド配列とが結合している。HCV-RNA-構築物およびトランスフェクション構築物を、任意の宿主細胞、有利には肝癌細胞、特にHuH-7細胞に導入する。これは例2に記載の方法で行うことができる。改変されたルシフェラーゼ遺伝子の生成物は、その中でルシフェラーゼが外来成分との融合に基づいて不活性化するルシフェラーゼ-融合タンパク質である。高いHCV-複製を有するトランスフェクションした細胞中で、HCV-プロテアーゼのための切断部位を有する融合タンパク質を分離し、ひいては発光測定(luminometrische Messung)により決定することができるルシフェラーゼの活性型を遊離する。HCV-RNA-構築物の複製を抑制すると、融合タンパク質は分離せず、かつ活性ルシフェラーゼは遊離しない。従って、ルシフェラーゼの定量的な測定はHCV-サブゲノム-構築物の複製のための尺度である。ルシフェラーゼ遺伝子の代わりに、同様にして修飾されているその他のリポーター遺伝子も同様に使用することができるので、このリポーター遺伝子がHCV-サブゲノム-構築物の成分ではなくても、その発現はウイルス複製に依存する。HCV-タンパク質または核酸により不活性化または活性化される細胞タンパク質もまたいわゆる代理マーカー(Surrogatmarker)として使用することができる。この場合、この代理マーカーの発現もしくは活性化は、ウイルスDNAの複製のための尺度である。

【0106】

例6：遺伝子治療のために肝癌細胞特異的な遺伝子輸送体として使用するための導入された外来遺伝子を有するHCV-サブゲノム-構築物の製造

この組み換え型および選択可能なHCV-サブゲノム-構築物を、トランス相補性ヘルパー細胞系、つまり誘発可能な、または構造的に欠けている機能を発現する細胞系（例えば構造タンパク質）にトランスフェクションする。機能的なHCV-サブゲノム-構築物を有する細胞クローンを相応する選択により確立することができる。宿主細胞により発現したウイルス-構造タンパク質は、その中へHCV-サブゲノム-構築物のRNAを導入するウイルス粒子の形成を可能にする。その結果はつまり単一クローンした外来遺伝子も含めて本発明によるHCV-サブゲノム-構築物を含有し、かつこれを感染によりその他の細胞に移すことができるウイルス様粒子である。このような構築物の例は図8に記載されている。ここに記載した、組み込まれた外来遺伝子を有する本発明によるHCV-サブゲノム-構築物を直接発現ベクターとして使用する可能性もまた生じる。その場合、前記の方法と同様に行うが、しかしトランス相補性の因子を発現する細胞系をトランスフェクションすることが異なっている。この場合、HCV-構築物は単に発現ベクターとして使用されるのみである。

【0107】

例7：細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物の製造

(A) 単離法

適合した突然変異の測定および細胞培養に適合したHCV-RNA-構築物の製造のために、以下の通りに行った：細胞をHCV-RNA-構築物を用いて例1および2に記載されているようにトランスフェクションし、かつG418-耐性細胞クローンを製造した。複製能力（これはこの関連において、トランスフェクションしたHCV-RNAもしくはHCV-RNA-構築物1μgあたりに得られるG418-耐性細胞クローンの数と解釈する）の測定のために模範的に9-13（図1B、レーン11）と称する細胞クローンの1つからの全RNAを単離し、かつその中に含有されているHCV-RNAの量を図2Bに記載されているようにノーザンブロットを用いて測定した。引き続き、HCV-RNAを約 10^9 分子含有している全RNAの10μgをエレクトロポレーションによりナイーヴHuH-7細胞に導入した（図9）。これと並行してナイーヴHuH-7細胞から単離した全RNAを用いて10μgの全RNA量に満たした類似のneo-HCV-RNAのインビトロ転写 10^9 を、ナイーヴHuH-7細胞にトランスフェクションした。G41

8を用いた選択後に、両方のバッチ中の細胞コロニーの数を測定し、これをRNA μ gあたりのコロニー形成単位(colony forming units(cfu))で表した。選択媒体中、G418 500 μ g/mlの濃度の場合、単離した全RNA中に含有されているHCV-RNAにより得られたコロニーの数はHCV-RNA μ gあたり約100000cfuであった。これに対してインビトロ転写された同量のHCV-RNAを用いてわずか30~50コロニーが得られたのみであった。この結果は、細胞コロニーから単離されたHCV-RNAの特異的な感染力が、類似のインビトロ転写の感染力よりも約1000~10000倍高いことを証明している。方法論的プロセスは図9に記載されている。

【0108】

「長距離RT-PCR(long-distance RT-PCR)」を用いて、9-13細胞の全RNAからのHCV-RNAを増幅し、PCR増幅物をクロニングし、かつ数多くのクローンを配列決定した。この再クロニングしたRNAの配列と、本来ナイーヴHu h-7細胞に導入されたRNAの配列との比較は、再クロニングしたRNAが全HCV-配列にわたって分布している数多くのアミノ酸交換を占有していることを明らかにした(図10)。この再クロニングした突然変異体のSfiI-断片を、本来のレプリコン構築物の類似のSfiI-断片との交換でこの中に導入し、かつそれぞれの突然変異体のRNAをナイーヴHu h-7細胞に導入した。次いでG418を用いた選択後に、それぞれのHCV-RNA-突然変異体に関して形成されたコロニーの数を測定した。出発RNAではRNA μ gあたりわずか30~50のコロニーが得られたのみであったが、再クロニングした変異体の2つの場合にはコロニー数が明らかにより高かった(図10)。HCV-RNA-構築物9-13Iおよび9-13Cの場合、特異的感染力はRNA μ gあたり100~1000cfuであり、かつ9-13Fレプリコンの場合、それどころかRNA μ gあたり1000~10000であった。この結果は、突然変異体9-13I、9-13Cおよび特に9-13Fが複製能力の明らかな上昇につながることを示している。これに対してすべてのその他のHCV-RNA-構築物(9-13A、B、G、HおよびK)は、もはや複製能力がなく、従って致命的な突然変異を有していた。

【0109】

9-13F-構築物中のアミノ酸交換のいずれが複製の増加につながるかという問いへの回答のために、交換を単独で、または組み合わせて出発HCV-RNA-構築物に導入し、かつ相応するRNAをナイーヴHu h-7細胞に導入する。これらのRNAを用いたトランスフェクションの結果は、第1表にまとめられている。ここから本実施例では高い複製能力が複数の突然変異により制限されていることが明らかである。HCV-RNA-断片NS5AおよびNS4B中のアミノ酸交換が大いに貢献している。NS3-領域における個々の交換もまた、おそらくこの個別交換の相助作用に基づいて貢献している。この調査は、neo-HCV-RNA-構築物でトランスフェクションされた細胞のG418-選択により、明らかにより高い複製能力を有するHCV-RNAを富化した。ここに記載された試験バッチを用いて極めて異なった複製効率を有するHCV-RNA-構築物を選択することができる。その中/上でHCV-RNA-構築物含有細胞が選択のために培養される選択媒体中の抗生物質濃度が高いほど、細胞が成長することができるためには適応突然変異の程度、ひいては該当するHCV-RNA-構築物中での複製効率は高くなくてはならない。低い抗生物質濃度での選択を実施すると、よりわずかな適合突然変異およびよりわずかな高い複製効率を有する細胞もまた生き残り、かつ増殖することができる。

【0110】

複数の適合突然変異を有する従来記載されていたHCV-RNA-構築物9-13Fは、疑う余地なく親HCV-RNAより高い複製効率を有していた。さらに高い複製を有するHCV-RNAを細胞培養中で得るために、選択された細胞クローンの全RNA中に含有されていたHCV-RNAを数回、ナイーヴHu h-7細胞中で継代した。この選択された細胞クローンは、5-15と呼ばれ、HCV-RNA-構築物I₃₈₉/NS3-3'を用いたトランスフェクションにより得られる(図1)。これは十分に、22のヌクレオチドの分だけ短いHCV-IRISを有するHCV-RNA-構築物を用いたトランスフェ

クションにより製造された細胞クローン 9-13 に相当する ($I_{377}/NS3-3'$ 、図 1)。細胞クローン 5-15 から単離された全 RNA 10 μ g を、エレクトロポレーションを用いてナイーヴ HuH-7 細胞に導入し、かつ G418 1 mg/ml を用いて細胞を選択した。このようにして得られた細胞クローンから、再度、全 RNA を単離し、ナイーヴ HuH-7 細胞中にトランスフェクションし、かつ同様にして選択した。この工程を合計して 4 回繰り返した。4 回目の継代の後で、細胞クローンから全 RNA を単離し、かつ「長距離 RT-PCR」を用いて neo-HCV-RNA を増幅した。増幅した DNA-断片を制限酵素 SfiI で消化し、かつ SfiI 制限された出発構築物 $I_{389}/NS3-3'$ に挿入した。合計して 100 を越える DNA-クローンが得られ、かつまず制限消化を用いて分析した。インビトロで転写した約 80 のこれらのクローンの RNA をその都度ナイーヴ HuH-7 に導入し、かつ G418 500 mg/ml を用いて選択した。調査した 80 の neo-HCV-RNA-変異体から、大部分が複製欠陥であることが判明した。しかし 5.1 および 19 と呼ばれる 2 つの突然変異体の場合、RNA マイクログラムあたりの「コロニー形成単位」と呼ばれる特異的な感染力は、極めて明らかに増大した (第 2 表)。細胞培養中での RNA の複数回の継代により、明らかに、その複製効率が、複数のサイズオーダーの突然変異 (いわゆる「適合突然変異」) に基づいて本来患者からクローンした RNA のものよりも高い HCV-RNA を製造することができる。

【0111】

(B) 改変方法。

【0112】

(A) により製造し、かつ同定された適合突然変異を、わずかに複製能力のある HCV-RNA-構築物に移すことができ、かつこの構築物の複製の著しい向上につながる。この向上は極めて高いので、これにより明白に、選択可能なマーカー遺伝子をもはや有していない HCV-RNA を細胞培養中で複製することができる。図 12 は、HCV-RNA の複製効率の比較を示しており、これは出発配列または適応配列 9-13 F もしくは 5.1 に相応していた。容易な測定のために、neo-遺伝子を除去し、かつルシフェラーゼのための遺伝子により交換した。ネガティブコントロールとして、再び、NS5B RNA-ポリメラーゼの不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のある HCV-RNA-構築物を使用した。トランスフェクションの 24 時間後にすでに、欠損 RNA と 9-13 F もしくは 5.1-構築物の間のルシフェラーゼ活性における明らかな違いが認識される一方で、欠損 RNA (318 DN) と、適合突然変異を有していない出発-RNA-構築物 (wt) との間にはほとんど違いを見ることはできない。全観察時間の間、最も高いルシフェラーゼ活性ひいては最も高い 5.1-RNA を有する複製が得られた。この調査は、この RNA の高い複製効率を証明するのみではなく、適応 HCV-RNA-構築物を用いて、そのために選択可能な遺伝子の存在がもはや必要ではない細胞培養系を構築することが可能であることもまた示している。出発構築物と、突然変異体 9-13 F、5.1 および 19 の間のヌクレオチドおよびアミノ酸の違いの包括的な概要は、第 3 表に示されている。

【0113】

例 8：細胞培養に適合した HCV-RNA-全長ゲノムの製造

例 1~7 では常に、p7 もしくは NS2 までを含むコアの全構造タンパク質領域が欠けているサブゲノムの HCV-RNA を使用した。この例 8 では、適合した NS3-5B-配列を用いて細胞培養中の HCV-全長ゲノムを複製することが可能であることを示している。この目的のために、まず例 7 に従って製造され、高度に適合した HCV-RNA 5.1 の SfiI-断片を、選択可能な HCV-全長ゲノムにトランスフェクションした (図 12)。この HCV-ゲノムをナイーヴ HuH-7 細胞にトランスフェクションし、かつ異なった G418-濃度で選択した。(G418 濃度の) 選択強度に依存して、異なった大きさの細胞クローンの数が得られた (図 12 B)。これと比較して、適合突然変異を受けなかった未変化の HCV-全長ゲノムではクローンは得られず、また NS5B RNA-ポリメラーゼにおける不活性化突然変異に基づいて複製欠陥のあるネガティブコントロールでも同様であった。生じた細胞クローンが実際に自律的に複製する HCV-全長構築

物を有していることに対する証明のために、全RNAを複数の細胞クローンから単離し、かつノーザンブロットを用いて分析した。すべての細胞クローンにおいてHCV-全長RNAは明確に検出可能であった（図12）。これにより細胞培養に適合したHCV-配列を用いて、高い効率で、および自律的に細胞系で複製するHCV-全長ゲノムを製造することができる、つまり本発明による系を用いて適合したHCV-全長ゲノムを製造することが可能であることが明確に証明される。さらにこのクローンは、完全なHCV-配列、つまりウイルス粒子の形成のために必要な構造タンパク質もまた有しているので、この系を用いて大量の感染ウイルス粒子を細胞培養中で製造することが可能である。これらのウイルスの検出のために、細胞不含で、複製HCV-全長ゲノムを有する細胞の上清をナイーヴHu h-7細胞に添加し、かつこうして感染させた細胞をG418で選択する。前記の条件下で成長するそれぞれの細胞クローンは、感染した細胞に起因する。しかし複製するHCV-全長ゲノムを有する細胞の細胞培養上清中のウイルスは、従来技術で公知の種々の方法、例えば超遠心分離またはマイクロ透析(Mikrodialyse)で富化し、かつ生成し、かつ次いでナイーヴ細胞の感染のために使用することができる。この方法で、本発明によるHCV-細胞培養系を用いて、細胞中で高い効率で複製し、かつ感染性のウイルスを産出する細胞培養に適合したHCV-全長ゲノムを製造することができることが明確に示されている。これらは同様に試験動物、有利にはチンパンジーの感染により検出することができる。

10

【0114】

例9：リポーター遺伝子を有するHCV-全長-構築物およびHCV-サブゲノム-構築物の製造

20

HCV-RNA-構築物を製造したが、その際、抗生物質耐性遺伝子の代わりにリポーター遺伝子を挿入する（図13）。その際、リポーター遺伝子もしくはリポーター遺伝子産物の量もしくは活性に基づいて複製を決定することができる。リポーター遺伝子は、有利にはルシフェラーゼ遺伝子の群、CAT-遺伝子（クロラムフェニコール-アセチルトランスフェラーゼ-遺伝子）、lacZ-遺伝子（β-ガラクトシダーゼ-遺伝子）、GFP-遺伝子（緑色蛍光タンパク質(green fluorescence protein)遺伝子）、GUS-遺伝子（グルクロニダーゼ-遺伝子）またはSEAP-遺伝子（分泌された(sezernierte)アルカリ性ホスファターゼ-遺伝子）からの遺伝子である。これらのリポーター遺伝子もしくはこれらの産物、つまり相応するリポータータンパク質を、例えば蛍光法、化学発光法、比色法により、または免疫学的方法（例えば固相酵素免疫測定法、ELISA）を用いて測定することができる。リポーター遺伝子は、固有のIRESにより発現させるか、またはそのまま活性であるか、もしくはタンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりHCV-タンパク質と結合している融合タンパク質の形で発現させることができるので、これは細胞性またはウイルス性（HCV）プロテアーゼによりタンパク質から分離される。

30

【0115】

例10：遺伝子治療のための肝細胞特異的な遺伝子輸送体としてまたは発現ベクターとしての使用のための導入された外来遺伝子を有するHCV-全長-構築物の製造

構築物（図14）を細胞内に導入し、かつここでその他の細胞の感染のために使用することができるHCV-ウイルス粒子を形成させる。ウイルス粒子は外来遺伝子を有するRNAを包んでいてもよいので、この外来遺伝子によりコードされたタンパク質の産生のためにこのようにして感染させた細胞中で外来遺伝子を使用することができる。構築物でトランスフェクションされた細胞は、同様に外来遺伝子を発現する。

40

【0116】

例11：耐性遺伝子産出がHCV-割合を有する融合タンパク質として発現する単シストロンのHCV-RNA-構築物の製造

特定の調査にとって、HCV-RNA-構築物が異種IRES-エレメントを有していない場合には有利である。このような調査は例えばインターフェロン耐性の決定である。HCV-RNA-構築物を有する細胞をインターフェロン-αまたはインターフェロン-β

50

を用いてインキュベーションすると、これはHCV-RNAの複製の減少につながる。作用機構の解明のために、HCV-RNA-構築物が異種IRESを有していないことが必要である。というのもさもないとインターフェロン媒介された抑制がHCV-複製の抑制により媒介されるのか、または異種IRESの抑制により媒介されるのか決定することができないからである。従って、耐性遺伝子がHCV-タンパク質と融合する構築物を製造する。(図15)。融合タンパク質がそのまま活性であるか、または細胞性またはウイルス性(HCV-)プロテアーゼによりここから分離するように耐性遺伝子産物がタンパク質分解により分解可能なアミノ酸配列によりHCV-タンパク質と結合している。

【0117】

【表1】

第1表: 9-13F突然変異体において発見され、かつ親HCV-RNA-構築物
1389/NS3-3'/wtに導入された適応突然変異を用いたHCV-RNA
-構築物の特異的な感染性 (cfu/μg RNA)

アミノ酸交換 ¹	HCV-タンパク質	cfu/μg RNA ²
なし		30 ~ 60
1283 arg -> gly	NS3	200 ~ 250
1383 glu -> ala	NS3	30 ~ 60
1577 lys -> arg	NS3	30 ~ 60
1609 lys -> glu	NS3	160 ~ 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 ~ 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 ~ 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000 ~ 5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 ~ 60
2442 ile -> val	NS5B	30 ~ 60
合計		5000

¹ HCV-単離物 Con-1 (EMBL-Genbank No.AJ238799) のポリタンパク質中のアミノ酸交換
アミノ酸は3文字のコードで記載されている

² G418 500μg/mlの選択の際のコロニー形成単位(細胞コロニーの数)

【0118】

【表2】

10

20

30

第2表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
変異体9-13C、9-13I、9-13F、5.1および19の
特異的感染性 (cfu/μg RNA)

トランスフェクションしたRNA-変異体	cfu/μg RNA ¹
野生型	30 ~ 50
9-13 C	100 ~ 1.000
9-13 I	100 ~ 1.000
9-13 F	1.000 ~ 10.000
5.1	50.000 ~ 100.000
19	50.000 ~ 100.000

¹ G418 500μg/mlの選択の際のコロニー形成単位（細胞コロニーの数）

【0119】

【表3】

第3表：親HCV-RNA-構築物1389/NS3-3'/wtおよび
突然変異体9-13I、9-13F、5.1および19の間の
ヌクレオチドおよびアミノ酸の相違

HCV 突然変異体	ヌクレオチド位置	ヌクレオチド交換	アミノ酸交換
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
9-13 F	3866	C > T	-
	4188	A > G	Arg > Gly
	4489	A > C	Glu > Ala
	4562	G > A	-
	4983	T > C	-
	5071	A > G	Lys > Arg
	5166	A > G	Lys > Glu
	6147	C > T	Pro > Ser
	6829	A > G	Glu > Gly
	7329	A > G	Lys > Glu
	7664	A > G	Ile > Val
	8486	C > T	-
	8991	C > G	Arg > Gly
NK5.1	4180	C > T	Thr > Ile
	4679	C > T	-

【0120】

【表4】

	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
	6666	A > G	Asn > Asp
	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
NK19	3946	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

10

20

30

【0121】

記載は、出発-HCV-RNA-配列Con1 (EMBL-遺伝子バンク (Genbank) No. AJ238799) および細胞培養に適合したHCV-RNAの配列との間のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の違いである。数はHCV-単離物Con1のヌクレオチド位置およびアミノ酸位置に関する。

40

【0122】

【外3】

SEQUENCE LISTING

<110> Bartenschlager, Ralf

<120> Hepatitis C Virus cell culture system

<130> ba-1

<140> 199 15 178.4

<141> 1999-04-03

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11076

<212> DNA

<213> Hepatitis C Virus

<400> 1

```

gccagccccc gattgggggg gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaecggg gactacaccg gaattgccag 180
gacgacccgg tcccttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gggagactgc tagccaggtg gtcttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagccag aatccataaac 360
ctcaaaagaaa aacaaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctatlugg clatgaclyg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgac gccgtgttcc ggctgtcage gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgccaagac cgaacgttcc ggtgccctga atgaactgca ggaacaggca gcgcgctat 600
cgtggctggc cagcagccgg gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggaact gctgctattg gcggaagtgc cggggcagga tctctgttca tctcaccttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcgctgcat acgcttgatc 780
cggtacactg cccattcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagcccg tcttgctgat caggatgac tggaacgaag gcacagggg ctccgcacag 900
ccgaactgtt cgcacggctc aaggcgccga tgcacagcg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgctttctt ggattcatcg 1020
actgtggcgc gctggglgtg gcggaacgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatgcgcg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gcctctatc gccttcttga cagttcttcc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa ccgtttccct ctacgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gccgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccaccatct tgcgtctctt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctt 1380
acgagcatct ctagggttct tccccctc gcacaaaggaa tgcaggctct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacccct 1500
tgcagcgagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacacaccc cagtgcacag ttgtgagtgt gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta tcaacaagg ggctgaaggga tgcacagaag 1680
gtaccccatc gtatgggata tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaagaa aaacaaaacg taacaccaac 1860
cgccgcccac aggaacgtcaa gttcccgggc ggtggtcaga tctcggttg agtttaacct 1920
ttgcgcgcga ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcgctc 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatcccc aagctctgcc agcccgaggg tagggcctgg 2040
gctcagcccc ggtacccctg gccctcttat ggcattgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac ccggtggtc tcggcctagt tggggcccca cggacccccc gcgtaggctc 2160
cgcaattttg gtaaggctat cgataccctc acgtgcggct tgcgcgatct catgggttac 2220
attccgctcg tccgcgcgcc cclagggggc gclgcaggg cccgtgcgca tggcgctccg 2280
gttctggagg accggtgtaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgctc cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt caagaaacac tgcctcaacg caagcaattg gtatgaggca 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgtc gtgcctgcg ttggggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgtcac tccacgctc gcggccagga acgctagcgt cccactaacg 2580
acgatacagc gccatgtcga tttgctggtt gggcggtgtg ctctctgctc cgcctatgtac 2640
gtgggagatc tctggcgatc tgttttctc gtgcgccagc tgttcaacct ctccgctcgc 2700

```

【 0 1 2 3 】

【 外 4 】

cggcagcaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatato ccggccacgt gacagggtcac 2760
 cgtatggcctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt ggtatcgag 2820
 ttaactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atgggtggcg gggcccattg gggagtccta 2880
 gcggggccttg cctactatct catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
 ctctttgcg gegttagcgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaaacac 3000
 ctccgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatccaga aaatccagct tgtaaacac 3060
 aacggcagct ggacacatcaa caggacigcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
 ttctttgctg cgtcgttcta cgtgcacaag tccaactcat ctggatgcc agagcgcatg 3180
 gccagctgca gccccatoga cgggttcgct caggggtggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcactacg cccccggcc gtgcggatc 3300
 gtaccccgcg cgcaggtgtg tggteccagt tactgcttca ccccaagccc tgcgtgggtg 3360
 gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagtggg gggagaatga gacggacgtg 3420
 ctgcttctta acaaacgcg gccgcgcaa ggcaactggg ttggctgtac atggatgaat 3480
 agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccgctgta acatcgggg gatcggaat 3540
 aaaaacctga cctgccccac ggaactgctc cgggaagcac ccgaggccac ttacaccaag 3600
 ttgtggttcg tgccttggtt gacacccaga tgccttgctc actaaccata caggctttgg 3660
 cactacccct gcaactgtcaa ctttaccatc ttcaaggta ggatgtacgt ggggggagtg 3720
 gaggcacagg tcgaagccgc atgcaattgg actcgaggag agcgttgtaa cctggaggac 3780
 agggacagat cagagcttag cccgctgctg ctgtctacaa cggaglgga ggtattgcc 3840
 tgttcttcta ccaacctacc ggetctgtcc actggtttga tccatctcca tcagaacgtc 3900
 gtggacgtac aatacctgta cggtataggg tcggcggttg totcctttgc aatcaaatgg 3960
 gagtatgtcc tgttgcctct ccttcttctg cgggacggc gcgtctgtgc ctgcttgtg 4020
 atgatgctgc tgatagctca agctgaggcc gccctagaga acctgggtgg cctcaacgcg 4080
 gcatccgtgg ccggggcgca tggcattctc tcttctctcg tgttctctg tgcgtcctg 4140
 tacatcaagg gcaggtggt cctgggggc gcataatgcc tctacggcgt atggccgcta 4200
 tctctgtctc tgcgtggcgt accaccacga gcatacgcca tggaccggga gatggcagca 4260
 tctgtcgagg agcgggtttt atactcttga ccttgtcacc gactataag 4320
 ctgttctctc ctaggctcat atgggtggtta caatatTTTA tcaccagggc cgaggcacac 4380
 ttgcaagtgt ggtccccccc cctcaacgtt cygggggggc gggatgcgt catcctctc 4440
 acg-gcgcga tccacccaga gctaatcttt accatcacea aaatcttgc cgccatactc 4500
 ggtccactca tgggtctcca accaaagtgc cgtactctg ggcgcacac 4560
 gggtctatc gtgcatgeat gctggtgcg aaggttgcg ggggtcatta tgtccaatg 4620
 gctctcatga agttggccgc actgacagg cgtacgttt atgaccatc caccctactg 4680
 ccgggactgg ccacccggc cctacgagac cttgcgggtg cagttgagcc cgtcgtctc 4740
 tctgatagg tatcacctg ggggcagaca ccgcggcgtg tggggacac 4800
 atcttgggoc tgcocgtctc cgcocgcagg gggagggaga tacatctgg accggcagac 4860
 agccttgag ggcagggtg gcgactctc ggcctatta cggcctaact ccaacagacg 4920
 cgaggccctac ttggctgcat ccatcactgc ctacagggc gggacaggaa ccaggctcag 4980
 gggtgggtcc aagtggctc caccgcaaca caatctttc tggcgacctg cgtcaatgg 5040
 gtgtgttgg ctgtctatca tgggtccggc tcaaagacc ttgccggccc aaagggccca 5100
 atcacccaaa tgtacacca tgtggaccag gacctcgtc gctggcaagc gccccccgg 5160
 ccggttctc tgacacctg agctcggacc tttacttgg cactgagcat 5220
 gccgatgtca ttcgggtgc cggcggggc gacagcagg ggagcctact ctccccagg 5280
 cccgtctct acttgaagg cctctgggc ggtccactgc totgccctc ggggcacgt 5340
 gtgggcatct ttcgggtgc cgtgtgcacc cgaaggcgtt ggaactttgta 5400
 cccgtcagat ctatggaa cactatgcg tcccggctc taecggacaa ctctccct 5460
 ccggccgtac cgcagacatt ccagggtgce catctacacg cccctaactg tagcggcaag 5520
 agcactaagg tgcggctgc gtatgcagc caagggtata aggtgcttgc cctgaaccg 5580
 tccgtcgcg ccacctagg tttcggggc tatatgtcta aggcacatg tatcgacct 5640
 aacatcagaa ccgggttaag gacctacac acgggtgccc ccatcacgta ctccacctat 5700
 ggcaagtctc ttgcgcagg tggttgctc gggggcgcc atgacatcat aatatgtgat 5760
 gagtgcact caactgact gaccaactat ctgggcatcg gcacagctc ggaccaagc 5820
 gagcggctg gaggcgact cgtcgtgct gccaccgla cgcctccgg atcggtaac 5880
 gtgcacate caaacatcga gtaggtggc ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat 5940
 ggcaaaagca tccccatoga gacctcaag ggggggagg accctatttt ctgccaltc 6000
 aagaagaat gtgatgagc cgcgcgaag ctgtccggc tccgactcaa tgcgttagca 6060
 tattaccgg gccttgatg atccgtcata gagagctcat tgcgttagca 6120
 acggacgtc laalgacgg ctttaecgg cgtttcgaat cagtgatcga ctgcaatca 6180
 tgtgtcacc agacagtca cttcagcct gaccagacct tcaccattga gacgacgac 6240
 gtgccacaag acgggtgtc acgctcgag cggcgaggca ggaactgtag gggcagatg 6300
 ggcatttaca ggtttgtgac tccaggagaa cggcctcgg gcatgttcca tctctcgtt 6360
 ctgtgcagat gctatgacg gggctgtgct tggtaagag tcacgcccgc cgagaccta 6420
 tttaggttgc gggcttacct aaacacacca gggltgccc tctgcaggga ccatctggag 6480
 tbtgggaga gctctttac aggcctcacc cccatttctb gtcccagact 6540
 aagcagcag gagacaact cccctacct gtagcatacc aggtacggt gtgcgcagg 6600
 gctcaggctc cactccatc gtgggaccaa atgtggaagt gtctcatac gctaaagcct 6660

10

20

30

40

【0 1 2 4】

【外 5】

acgctgcacg ggccaaagcc cctgcctglat aggetgggag cegttcaaaa cgaggttact 6720
 accacacacc ccataaccaa atacatcatg gcatgcatgt cggctgacct ggaggtcgte 6780
 acgagcacccl gyytgetggt aggcggagtc ctacgagetc tggcccgcta ttgacctgaca 6840
 acaggcagcg tggctattgt gggcaggatc atcttgtccg gaaagccggc calcaltccc 6900
 gacagggaag tcttttaacg ggagttcgat gqatggaaag aqtgcccttc acacctccct 6960
 tacatcgaa cagggaalga gctgcgcgaa caaltcaaac agaaggcaat cgggttgctg 7020
 caaacagcca ccaagcaagc ggaggtcgct gctcccgtag tggaaatcaa gtggcggacc 7080
 ctogaagcct tctgggggaa gcatatgttg aatttcataa cggggatata atatttagca 7140
 ggccttgcca ctctgcctgg caaccccgcy atagcatcac tgatggcatt cacagcctct 7200
 atcaccagcc cgtcaccac ccaacatacc ctctgttta acatccctgg gggatgggtg 7260
 gccgcccaac ttgctctctc cagcgtgctc tclgtcttcg tagggccggg catcgctgga 7320
 gggctgtttg gcagcatagg ccttgggaag gtgcttgtag atattttggc aggttatgga 7380
 gcaggggttg caggcgctct cgtggcctlt aaggtcatga cggcgagat gccctccacc 7440
 gaggacctgg ttaacctact cctgctatc ctctccctg cgcctcctag cgtcgggtc 7500
 gtgtgcgcag cgtactcgc tgcgcagtg ggcacaggg agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccgctga tagcgttcg ttccgggggt aaccagctc ccccaagca ctatgtgct 7620
 gagagcgacg ctgcagcag gtcactcag atctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagaggg ltcaccagtg gatcaacgag gactgctcca cggcatgctc cggctcggtg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcag gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaaagctc tgcgcgatt gcccggagtc ccttctctc caagtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagctcggc gggcgagcg calcatgcaa accacctgce catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgagatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtgg 7980
 catggaaat tccccattaa cggctacacc accggccctc gcacgcctc cccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgtctgt cgggggtgct gctgaggagt acgtggaggt taocgggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaaag taaagtgcac gtgtcaggtt 8160
 cggcccccgc aattcttcc agaaglggt tgggtgctg tgcacaggta cgtccagcg 8220
 tgcaaacccc tctcagggg ggaggtcaca ttctgtctg ggtcfaatca atacctggtt 8280
 gggctcacag tcccatgcca gccgaaccg gacgtagcag tctcacttc catgtctacc 8340
 gagccctccc acattacggc ggagacgct aagcglaggc lggccagggg atctccccc 8400
 tctttggcca gctcaccag tagccagctg tctgcgctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 acccgtcatg acctcccgga cgtgacctc atcgaggcca acctctgtg cggcgaggag 8520
 atggggcgga acatcaccg cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactctttc 8580
 gaggcgctcc aagcggagga ggtgagaggt gaagtatcc ttccggcgga gatcctggg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggcac gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaagga cccggactac gtccctccag tgggtacagg gtgtccattg 8760
 ccgctgcca cggccctcc gatccacct ccacggagga agaggacggt tgtcctgtca 8820
 gaatctaccg tgtctctgc cttggcgag ctgcaccaaa agacctcgg cagctccgaa 8880
 tctgtggcgg tgcacagcgg cagggcaacg gctctctctg accagccctc cgaacagggc 8940
 gagcgggat cggactaagg gtcgtactcc tccatgcctc ccltgaggg ggagcgggg 9000
 gatcccgatc tcagcgacgg gtcttggtct accgtaagcg agggagctag tgaggacgtc 9060
 gctgtctgct cgtgtgctca ccatggaca ggcgcctga tcaagccatg cgtcgaggag 9120
 gaaaccaag tgcctactaa tgcactgagc aactcttgc tccgtcacca caacttggtc 9180
 tatgtctcaa cctctgcag cggcaagcgt cggcagaaga aggtcactt tgacagactg 9240
 caggtcctgg accaccacta cccggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gttaaggcta aactctctat cgtggaggaa gctgttaagc tgacgcccc acattcggcc 9360
 agatctaaat ttgctatagg ggcgaaggac gtcgggaacc tatccagcaa ggcgttaac 9420
 cacatccgct cctgttgcaa ggaacttgct gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggl tttctgctc caaccagaga agggggggcg caagccagct 9540
 cgccttaccg tattcccgga tttgggggtt cgtgtgtgct agaaaaatgg cctttaagat 9600
 gtgtctccca cctccctca ggcctgtatg gctctctcat acggattcca atactctct 9660
 ggacagcggg tccagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaaatgcct tatgggttc 9720
 gcatacgaca cccgtgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctacc aatgttclga cltggccccc gaagccagac aggcataag gtcgtccaca 9840
 gagcggcttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgggtcccgcg cagcgggtgt actgacgacc agctgggla alaccctcac atgttacttg 9960
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag cccaggact gcacgatgct cgtatcgga 10020
 gacgaccttg tggttatctg tgaagcggcg gggacccaag aggacgagcg gagcctacgg 10080
 gccttcacgg aggtatgac tagatactct gccccctg gggacccgca caaacagaa 10140
 taagacttgg agthgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgtgcactct 10200
 ggcaaaaggg lglactatct caccctgac cccaccacc ccltgcgcg gctgctgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggtaggcca acatcatcat gtatgcgccc 10320
 accllgtgg caagatgat cctgatgact catctctct cctactctct agctcaggaa 10380
 caacttgaaa aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tcagccactt 10440
 gacclacctc agatcatlca acgactccat ggccttagcg caltttcaat ccatagttac 10500
 tccccaggtg agatcaatag ggtggctlca tgcclcagga aactlgggt accgcccttg 10560
 cgaqlctgaa cacatcgggc cagaagtgtc cgcgtaggc tactgtccca gggggggagg 10620

10

20

30

40

【0 1 2 5】

【外 6】

```
getgccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
ccaatcccggt ctgcgtecca gttggattta tccagctggg tcgttgctgg ttacagcggg 10740
ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgct ggllcalgtg glgcctactc 10800
ctactttctg taggggtagg catctatcta ctccccaacc gatgaacggg gagctaaaca 10860
ctccaggcca ataggecatc ctgttttttt cctttttttt tttctttttt tttttttttt 10920
tttttttttt tttttttttt tctctttttt ttctcttttt tttctttttt tttcttttgg 10980
tggctccatc ttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
agagagtgcg gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076
```

【 0 1 2 6 】

【 外 7 】

<210> 2
 <211> 8637
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 2
 gccagccccc galgggggg gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tytcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tccctttctg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttgtaact gctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtclogta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
 ctcaagaaaa aaccaaaggg cgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggtc atgactgggc acaacagaca atcggtctgt 480
 ctgatgcgcg cgtgttcggg ctgtcagcgc agggggcgcc ggttcttttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gggctatcg tggtggcca 600
 cgacggcggt tccctgcca gctgtgctcg acgttgccac tgaagcggga agggactggc 660
 lgcatttggg cgaagtgcg gggcaggatc tccgtgcac tcacctgtct cctgcgcaga 720
 aagtatccat tatcgttgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 cattogacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcagc tactcggtg gaagccggtc 840
 ttglogatca ggtgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 900
 ccaggtccaa ggcgcgcag ccgcagcgcg aggatctcgt cgtgaccat ggcgatgcct 960
 gcttgccgaa tatcgttgat gaaaatggcg gctttctctg attcatcgac tgtggccggc 1020
 tgggtgtggc ggacgcclat caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
 ttggcggcca atgggtgac cgttctctcg lgccttacgg tatcgccgt cccgattcgc 1140
 agcgcatacg cttctatcgc cttcttgacg agttctctcg agtttaaca gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct tgggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttattttc caccatattg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcgcgaaa cctggccctg tcttcttgac gacattct 1380
 aggggtcttt aacctctcgc caaaggatg caaggtctgt tgaalgtcgt gaaggaagca 1440
 gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag cgacctttg caggcagcgg 1500
 aacccccac ctggcgacag glgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct 1560
 gcaaaaggcg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa 1620
 tggctgtcac cccctctata caaagggatg ctgaaggatg ccagaaggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc cagcgggacg tggttgcaca tgccttacat gtgtttagtc gaggttaaaa 1740
 aacgctatag cccccgaac cagcgggacg tggtttctct ttgaaaaaca cgataatacc 1800
 atggaccggg agatggcagc acgttgccga ggcgcggtt togtaggctc gatactcttg 1860
 acctgttcac cccctctata gctgttctc gctaggctca tatggtggtt acaatatttt 1920
 atcaccaggg ccgaggcaca cctgcaagtg tggatccccc cctcaacgt tcgggggggc 1980
 cgcgatgcg tcactctctc cactgtgcgc atcccccag agctaattt taccatcacc 2040
 aaaatcttgc tgcgcatact cgggtccact atggtgctcc aggetggtat aaccaaagt 2100
 ccgtactctc tgcgcgcaca cgggtcatt cglgcatgca tgcgtggtcg gaaggttgc 2160
 gggggtcatt atgtccaaat ggcctctcat aagttggccg cactgacagg tacgtacgtt 2220
 tatgaccatc tcaccccact ggggacttg gccacgcgg cctaocgaga ccttgccgtg 2280
 gcagttgagc ccgtctctct ctctgatag gagaccaagg tlatcacctg gggggcagac 2340
 accgcggcgt gtggggacat catcttgggc ctgcccgtct ccgccgcag ggggagggag 2400
 atacatctgg gaccggcaga cagccttgaa gggcaggggt ggcgactcct cgcgcctatt 2460
 accgctactl cccaacagac gcgaggccta cttggtgcca tcatcactag cctcacagge 2520
 cgggacagga accaggtcga gggggagggc caagtggctc ccaccgcaac acaatctttc 2580
 ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg actgtctate atggtgcgg atggtggaca ggacctcgtc 2640
 cttgcgggcc caaaggggcc aalcaaccaa atgtacacca atgtggaca gcacctgcgc 2700
 ggctggcaag cgcgcccggg ggccggttcc ttgacaccat gcacctgcgc 2760
 ctttacttgg tcacgaggca lgcgatgtc attccggtgc gccggcggg cgacagcagg 2820
 gggagcctac tctcccccag gccgtctcc tacttgaagg gctcttgggg cgttccactg 2880
 ctctgcacct cggggcagcg tgtgggcata tttcgggctg ccgtgtgcac ccgaggggtt 2940
 gcgaaggcgg tggactttgt acccgtcgag tctatggaaa ccactatgcg gtccccggtc 3000
 ttcaaggaca actcgtcccc tcggccgta ccgcagacat tccaggtggc ccattctaac 3060
 gccctactg gttagcgcaa gaggacaaag gtgcccgtcg cgtatgcagc ccaagggtat 3120
 aaggtgcttg tccctaaacc gtcgtgcgc gccacctag gtttcggggc gttatgtct 3180
 aaggcacatg gtatgcaccc taacatcaga accggggtaa ggaccatcac caggggtgcc 3240
 cccatcacgt actccaccta tggcaagtct cttgcgcagc gtggttgcgc tgggggcgc 3300
 tatgacatca taatatgtga tgagtgcac tcaactgact cgacctat cctgggcac 3360
 ggacagttcc tggaccaagc ggagacggcl ggagcgcagc tctgtgtgt cgcacccgt 3420
 acccctccgg gatcggtcac cgtgccacat ccaacatcg aggaggtggc tctgtccagc 3480
 actggagaaa tcccttttta tggcaagcc atccccatg agaccatcaa gggggggagg 3540

10

20

30

40

【0 1 2 7】

【外 8】

cacctcattt tctgccattc caagaagaaa tgtgatgagc tcgccgcgaa gctgtccggc 3600
ctcggactca atgtctgtage atattacogg gcccttgatg tatecgtcat accaactagc 3660
ggagacgtca ttgtctgtage aacggacgct ctaatgacgg gctttaccgg cgatttcgac 3720
tcagtgtatc actgcaatac atgtgtcacc cagacagtcc acttcagcct ggaccogacc 3780
ttcaccattg agacgacgac cgtgccacaa gacgoggtgt cagcgtcgca gcggcgaggc 3840
aggactggta ggggcaggat gggcatttac aggtttgtga ctccaggaga acggccctcg 3900
ggcatgttcg attcctcggt tctgtgcgag tcttatgacg cgggctgtgc ttggtacgag 3960
ctcaccgccc cgagacctc agttagggtg cgggcttacc taaacacacc agggttgccc 4020
gtctgccagg accatctgga gttctgggag agcgtcttta caggcctcac ccacatagac 4080
gccatttct tgtcccagac taagcaggca ggagacaact tccctacct ggtagcatac 4140
caggctacgg tgtgcgccag ggctcaggct ccacctecat cgtgggacca aatgtggaag 4200
tgtctcatac ggtctaaagg taagctgcac ggcccaacgc cctgtctgta taggtctgga 4260
gccgttcaaa acgaggttac taaccacac ccataacca aatacatcat ggcatgcatg 4320
tcggctgacc ttgaggtcgt cagcagcacc tgggtgctgg taggcggagt cctagcagct 4380
ctggccggct attgctgac aacaggcagc gtgttcattg tgggcaggat catcttgctc 4440
ggaaagccgg ccacatctcc cgacagggaa gtcttttacc gggagttcga tgagatggaa 4500
gagtgcctcc cacactctcc ttacatcgaa cagggaatgc agctogccga acaattcaaa 4560
cagaagccaa tggggttctc gcaaacagcc accaagcaag cggaggtctc tgctcccggt 4620
gtggaatcca agtggcgagc cctogaagcc ttctggcgga agcatatgtg gaatttcttc 4680
agcgggatac aatattttagc aggtttgtcc actctgctcg gcaaccccgc gatagcatca 4740
ctgatggcat tcacacctc taccaccagc ccctcaccca cccaacatac cctcctgctt 4800
aacatctctg ggggatgggt ggccgcccaa ctgtctctc ccagocgtgc ttctgcttct 4860
gtaggcccg gcacgtctgg agcggctgtt ggcagcatag gccctgggaa ggtgcttctg 4920
gatatttttg caggttatgg agcaggggtg gcaggccgcg tcgtggcctt taaggctcatg 4980
agcggcgaga tgcctccac cgaggacctg gttaacctac tccctgctat cctctccctt 5040
ggcgccctag tctgtggggt cgtgtgcgca gcgatactgc gtcggcactg gggcccaggg 5100
gagggggctg tgcagtggat gaaccggctg atagcgttcg ctccggggg taaccaactg 5160
tcccacacgc actatgtgac tgagagcgac gctgcagcac gtgtcactca gatcctctct 5220
agtcttccca tcaactcagc gctgaagagg cttcaccagt ggatcaacga ggaactgctc 5280
acgccatgct ccggctctgt gctaaagagat gtttgggatt ggatagcac ggtgttgact 5340
gatttcaaga cctggctcca ggtcaagctc cgtccggagt tgcggggagt ccccttcttc 5400
tcattgtcaac gtcgggtacaa gggagtctgg ccatcatgca accaacctgc 5460
ccatgtggag cacagatcac cggacatgtg aaaaacgggt ccatgaggat cgtggggcct 5520
aggacctgta gtaacacgtg gcatggaaca ttcccattta accggtacac caccggcccc 5580
tgacgcctcc cccggcgccc aaattattct agggcgctgt ggccgggtggc tgcctgaggag 5640
tacgtggagg ttacgcgggt gggggatttc cactacgtga cgggcattgac cactgacac 5700
gtaaagtgc cgtgtcagggt tccggccccc gaattcttca cagaagtgga tgggggtgccc 5760
ttgcacaggt acgctccagc gtgcacaccc ctccatgag agcccgaaac ggaogtagca 5820
gggtctcaatc aatacctggt tgggtcacag ctccatgag cggagacggc taagcgtagg 5880
gtgtcactt ccattgtcac cgacccctcc cacattacgg cggagacggc gtctgcccct 6000
ctggccaggg gatctccccc ctcccttgcc gactcccggt accgtgaact catcgaggcc 6060
tccttgaagg caacatgcac tacccgtcat aacatcaccc cgttgaggct agaaaataag 6120
aacctcctgt ggcggcagga gatggcgagg caagcggagg aggatgagag ggaagtatcc 6180
gtagtaattt tggactcttt cgagccgctc caagcggagg gacgatgccc catatgggca 6240
gttccggcgg agatcctgag gaggctcagg aaattccctc gacgatgccc cgtccctcca 6300
cgcccggaat acaacccctc actgttagag tccgtggaag acccggaacta tccacggagg 6360
ctgggtacac ggtgtccatt gccgctgccc aaggccctcc cgtatccacc tccacggagg 6420
aagaggacgg ttgtctctgc agaactacac gtgtctctct gtcgacagcg gcaacggcac ggcctctcct 6480
aagaccttcc cgcagctccga atcgtcgccc tccgacgttg agtcgtactc ctccatgccc 6540
gaccagccct ccgacgacgg cgacgcggga tccagcgttg ggtcttggtc taccgttaagc 6600
cccttgagg gggagccggg ggtatccgat ctacagcagc tccagatgct acacatggac aggcgcctg 6660
gaggaggtca gtaggagcgt cgtctgctgc tccatgtcct atgcactgag caactcttg 6720
atcacgceat gcgctgcgga ggaacacaa ctatgtctca acatctcgca gcgcaagcct gcgacagaag 6780
ctccgtcacc acaacttgg ttgacagact gcaggctcct gacgaccact accgggactg gctcaaggag 6840
aaggctacat ttgacagact agttaaggct aaacttctat ccgtggagga agcctgtaag 6900
atgaaggcga aggcgtccac cagatctaaa tttggctatg gggcaaaagg cgtccggaac 6960
ctgacgcccc caccctcgcc ccacatccgc tccgtgtgga aggaactgct ggaagacact 7020
gatcacccaa ttgacaccac catcatggca aaaaatgagg tttctctcgt ccaaccagag 7080
aaggggggcc gcaagccagc tcgccttacc gtattcccag atttgggggt tccgtgtgtg 7140
gagaaaatgg ccttttacga tgtgtgtctc acctccctc aggcctgatg gggctcttca 7200
taaggattcc aatactctcc tggacagcgg gtccagttcc tgggtaatgc ctggaaagcg 7260
aagaaatgcc ctatgggctt cgcatalgac acccgctgtt ttgactcaac ggtcactgag 7320
aatgacatcc gttgttagga gtcaatctac caatgttgtg acttggcccc cgaagccaga 7380
caggccataa ggtgtctcac agagcggctt tacatcggg gccccctgac taattctaaa 7440
gggcagaacl ggggtatctc ccgggtgcgc gcgagcgggt tactgacgac cagctgcggt 7500

10

20

30

40

【0 1 2 8】

【外 9】

```

aataccctca catgttactt gaaggccgct ggggectgtc gagctgcgaa gctccaggac 7560
tgacagatgc tegtatgcgg agacgacctt gtcttlatct gtgaaagcgc ggggacccaa 7620
gaggacgagg cgagcctacg ggccttcacg gaggctatga ctagatactc tgccccccct 7680
ggggacccgc ccaaaccaga atacgacttg gagttgataa catcatgctc ctccaatgtg 7740
tcagtgcgcgc acgatgcacg tggcaaaaagg qtgtactatc tcaccctga cccaccacc 7800
ccccctgcgc gggctgcgtg ggagacagct agacacactc cagtcaatc ctggctaggc 7860
aacatcatca tgtatgcgc cacttggtgg gcaaggatga tectgatgac tcatttcttc 7920
tccatccttc tagctcagga acaacttgaa aaagccctag attgtcagat ctacgggggc 7980
tgttactcca ttgagccact tgacctacct cagatcattc aacgactcca tggccttagc 8040
gcattttcac tccatagtta ctctccaggg gagatcaata ggggtggctc atgcctcagg 8100
aaacttgggg caccgccctt gcgagtctgg agacatcggg ccagaagtgt ccgcgctagg 8160
ctactgtccc agggggggag ggctgccact tgtggcaagt acctcttcaa ctgggcagta 8220
aggaccaagc tcaaaactcac tccaatcccg gctgcgtccc agttggattt atccagctgg 8280
ttcgttgctg gttacagcgg gggagacata taccacagcc tgtctcgtgc ccgacccgc 8340
tggttcatgt ggtgcctact cctactttct gtaggggtag gcctctatct actcccaac 8400
cgatgaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat cctgtttttt tccctttttt 8460
ttttctttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ctctttttt tttctcttt 8520
ttttctttt ctttctttt gtggctccat cttagcccta gtcacggcta gctgtgaaag 8580
gtccgtgagc cgcttgactg cagagagtgc tgatactggc ctctctgcag atcaagt 8637

```

10

【0 1 2 9】

【外 1 0】

<210> 3
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 3

```

gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagoca tagtggtctg cggaaaccgt gagtacacc gaattgccag 180
gacgaccggg tcccttcttg gatcaaccog ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccagta gtgtgggtgc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctctga gaccgtgcac catgagcacg aatccataac 360
ctcaaaagaaa aaccaaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tcgggcggct tgggtggaga ggtatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc caccacgggc gtctcttgcg cagctgtgct cgacgttgc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctctgttca tctcaacttg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcact acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgctgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgcaa 900
ccgaactggt cgcacggctc aaggcgcgca tgcgcagcgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgc gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtgaaga gcttggcgcc gaatgggctg accgcttct cgtgttttac ggtatgcgcg 1140
ctcccgatcc cgacgcgcat gccctctatc gcccttctga cgagttcttc tgagttttaa 1200
cagacacaaa cggcttccct ctacggggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg cgcgaagcgc cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tcaccatata tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctttg 1380
acgagcattc ctagggtctt ttccctcttc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggtga accggtctct tgaagacaaa caacgtctgt agcgaacctt 1500
tgcaggcagc ggaaccccc acclggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatcac ctcgaaaggc ggcacaacc cagtgcacg ttgtgagttg gatagtgtgt 1620
gaaagatca aatggctctc ttcaacaagg ggtggaagg catgctttac atgtgtttag 1680
gtaccccat gtatgggac tgcctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcctcccg accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca agcccggaac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagt 1920
gtctccaccg caacacaaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcggtgt 1980
tatcatggtg ccgctcaaaa gaccttgcc ggcctaaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgttg gcaccgagg ggttgcaag gcgggtgact ttgtaccgt caggtctatg 2100
ccatgcacct gggcgagctc ggacctttac ttggtcagc ggcatgcga lgtcatlccg 2160
gtgcgcgggc gggcgagcag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg ctactacttg 2220
aagggtctct cggcggttcc actgctctgc cctcgggggc acgctgtggg catctltcgg 2280
gctgcggtgt gcaccgagg ggttgcaag gcgggtgact ttgtaccgt caggtctatg 2340
gaaaccacta tgcggtcccc ggtcttccag gacaactcgt cccctccggc cglaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgccct actggtagcg gcaagagcac taaggtgcgc 2460
gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgtccgt cgcgcgcaac 2520
ctaggtttcg ggcgtatat gtataaggca catggtatcg accctaaccat cagaaccggg 2580
gtaaggacca tcaccacggg tgcctccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtccctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
cgactcgctg tgcctgcacc cgtacgcct ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcaactga gaaatccctc tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc atttctctgc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctgcgcg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgtgt tagcatatta ccggggccct 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaatt 3060
acgggtctta cggcgattt cgaactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcttggaacc gaccttacc attgagacga cgacgtgccc acaagacgcg 3180
gtgtcacgct cgcagcgcg aggcaggact ggtagggga ggatgggcat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctcgggcatg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgcctt 3300
gacgcgggct gtgcttggtc cgaactcag ccgcggaga cctcagttag gttgcgggct 3360
tacctaaaaa caccagggtl gcccgltgc caggaccatc tggagtctct ggagagcgtc 3420
tttacaggcc tcaccacat agacgccatc ttcttgtccc agactaagca ggcaggagac 3480
aacttccct accctgttagc ataccaggct acgggtgtgc ccagggtcra ggctccacct 3540

```

10

20

30

40

【0 1 3 0】

【外 1 1】

ccacgctggg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctacgct gcacgggcca 3600
 accgcccctgc tgtatagcgt gggagccgtt caaaacgagg ttaactaccac acaccccata 3660
 accaaatana tcatggcatg catgtcggct gacctggagg tcgtcacgag caccctgggtg 3720
 ctggttagcgg gagtcctagc agctctggcc gcgtatcgcc tgacaaacagg cagcgtgggtc 3780
 atttggggca ggtatcatctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccctt 3840
 taacgggagt tcgatgagat ggaagagtgc gcctcacacc tccctacal cgaacaggga 3900
 atgcagctgt ccgaacaatt caaacagaag gcaatcgggt tgctgcaaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtgggtggaa tccaagtggc ggaacctoga agcctctctg 4020
 gcgaagcata tgtggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat ggggtggccg ccaacttctt 4200
 cctcccagcg ctgcttctgc tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaagggtgt tgtggatatt ttggcaggtt atggagcagg ggttggcagg 4320
 gcgctcgttg cctttaagggt catgagcggc gagatgcctt ccaccgagga cctgggttaac 4380
 ctactccctg ctatcctctc ccctggcgcc ctagtctctg ggtctcgttg cgcagcgata 4440
 ctgctctggc accgtgggccc aggggagggg gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg 4500
 ttgctcttgc ggggttaacca cgtctccccc acgcactatg tgcttgagag cgaagctgca 4560
 gcacgtgtca ctacagatcct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggtctcac 4620
 cagtggatca acgaggactg ctccacgcca tgctccggct cgtggctlaag agatgttttg 4680
 gattggatag gcacgggtgtt gactgatttc ctctctatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4740
 cgattgcccgt gagtcccttt ctgcccctgt ggagcacaga tcaccggaca tctggcgggg 4800
 gacggcatca tgcacaacac gcttaggacc cctctcccggt ccccaaatla ttctaggcgg 4860
 ggttccatga ggtcgtggg gccttaggacc cctctcccggt ccccaaatla ttctaggcgg 4920
 attaacgcgt acaccacggg ggagtacgtg gaggttaacc ggggtggggg ttctccctac 5040
 ctgtggcggg tgctgtctga caacgtaaag tgcccgctgc aggttccggc ccccgaaatc 5100
 gtgacgggca tgaccactga gcgggttgca aggtacgctc cagcglgcaa acccctccta 5160
 ttccacagaag tggatggggt ggtcgggctc aatcaatacc tggttgggtc acagctccca 5220
 cgggaggagg tcacattcct agcagtgtct acttccatgc tcaccgaccc ctccacatt 5280
 tgccgagccc aaacggaggt taggttgccc aggggatctc cccctcctt ggccagctca 5340
 acggcggaga cgctaaagg gccttctctg aaggcaacal gcactaccog tcatgaactc 5400
 tcagctagcc agctgtctgc ggccaacctc ctgtggggc aggagatggg cgggaacatc 5460
 ccggacgtcg acctcatcga agtggttagta atlltgact ctctcagacc 5520
 acccgctgg agtcagaaaa atccgttccg gggagatccc tgccgaggtc caggaaatc 5580
 gaggaggatg agagggaagt ggcacgccc galtaacac ctccactgtt agagtcttg 5640
 cctcgagcga tgcccatatg tccagtggta caggggtgtc cattgcccgc tgccagggc 5700
 aaggacccgg actacgtccc tccagtggta aggttggtc tgccagaatc taccgtgtct 5760
 cctccgatac cactccacg cacaagaacc ttccgacgt ccgaatcgtc ggcgtctgac 5820
 tctgcttgg cggagtctgc tccgtaccag cccctccgac acggcgacgc gggatccgac 5880
 agcggcacgg actcctcat gccccctctt gagggggagc cgggggatcc cgtctctcag 5940
 gacgggtctt ggtctacgtt aagcgaggag gctagtagg acgtcgtctg ctgctctatg 6000
 tctacacat ggacaggcgc cctgatcag ccatgctgtg cggaggaaac caagtctccc 6060
 atcaatgcac tgagcaactc ttgtctcgtl caccacaact tggctctatg tacaacatct 6120
 ccgacgcaa gcttgcggca gaagaagggt acccttgaca gactgcaggt cctggacgac 6180
 cactaccggg acgtgtctaa ggagtgaag ccccaacatl ccacagttaa ggcataactt 6240
 ctatccgtgg aggaagcctg taagctgacg ccccaacatl ccacagttaa ggcataactt 6300
 tatggggcaa aggacgtccg gaacctatcc agcaaggccg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tgaaggact tgctggaaga cactgagaca ccaattgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gagggtttct gcgtccaaac agagaagggg ggcgcgaage cagctcgcct tatcttatc 6480
 ccagattttg gggttcgtgt gtgcgagaaa atggcccltt arcgatgtgt ctccacctc 6540
 cctcaggccg tgatgggctc ttcatagcga ttccaatact cctctggaca gcgggtcag 6600
 ttcttggtga atgctggaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttgcata tgacacccg 6660
 tgttttgact caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcaat ctaccaatgt 6720
 tgtgacttgg ccccggaagc cagacaggcc ataaggtcgc leacagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgactaatc taaaggcgag aactgoggct atcgccggtg ccgcgcgagc 6840
 ggtgtactga ccaccagctg cggtaatacc ctacatgtt acttgaaggc cgtgcccggc 6900
 tgtcagctg cgaagctcca ggactgcacg atgtctgtat ggcgagacga ccttctgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gagcgagccc tacgggctt cagggaggt 7020
 atgactagat actctgcccc cctgggggac ccgcccacac cagaalacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tgtgtcagtc gcgcagatg catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcaccg gtgacccac cccccctt gcgcgggtg cgtgggagac agclagacac 7200
 actccagtea attcctggct agggcaacatc atcatgtat gcgccactt gtgggcaagg 7260
 atgatctcga tgactcattt ctctccatc ctctagctc aggaacaacl lgaaaaagcc 7320
 ctgattgtc agatctacgg ggctgttac tccattgagc caactgacct acctagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tcactccata gtaactccl aggtgagatc 7440
 aatagggtg ctctatgctt caggaaactt ggggtacccg ccttgcaggt ctggagacat 7500

10

20

30

40

【0 1 3 1】

【外 1 2】

```

cgggcccagaa gtgtccgcgc taggtactg tcccagggg ggagggtgc cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactccat cccggctggc 7620
tcccagttgg atttatccag ctggttcgtt gctggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccgcgc ccgctgggtc atgtggtgcc tactcctact ttctgtaggg 7740
gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatcctgtt tttttccctt ttttttttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt tttttttcct ctttttttcc ttttctttcc tttggtggct ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggctcgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
tggcctctct gcagatcaag t 8001

```

【 0 1 3 2 】

【 外 1 3 】

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 4
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct aqccatggcg ttagtatgag tgtcgtgag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgacgggg tecttletlg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gctgataagg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
 ctcaaagaaa aaccaaaggg ccgcgccatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 oggcgcgttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggtctgt 480
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggcgcc ggttcttttt gtcaagaccg 540
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagg gcggtatcgg tggctggcca 600
 cgaaggcggt tecttgcca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 660
 tgcatttggg cgaagtgcgg ggcaggatc tctgtcacc tcaccttgcct cctgcggaga 720
 aagtatccat catggctgat gcaatggcgc ggtgcatac gcttgatccg gctacctgcc 780
 cattcgacca ccagcgaaa catcgcatcg agcagcacg tactcggatg gaagccggtc 840
 ttgtcgatca ggtgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 900
 ccagggtcaa ggcgcgcatg ccgcagcggt aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 960
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 1020
 tgggtgtggc ggaccgcat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1080
 ttggcgccga atgggtgac cgttctctcg tgccttaccg tatcgccgt cccgattcgc 1140
 agcgcacgcg ctctatcgcc ctctctgacg agtctctctg agtttaaaac gaccacaacg 1200
 gtttccctct agcgggatca attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc 1260
 cgaagccgct tggataaagg ccggtgtgcy ttgtctata tgttatttcc caccatattg 1320
 ccgtcttttg gcaatgtgag ggcgcggaaa cctggccctg tcttcttgac gacattcct 1380
 aggggtcttl cccclctcgc caaaggaaatg caaggctctgt tgaatgtcgt gaaggaaagc 1440
 gttctcttgg aagctctctg aagacaaaac acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg 1500
 aacgtctagg ccccccgaac cacggggagc ggcacaaagc cactgtgata agataacact 1560
 atggcgccca ttaaggccca ctcccaacag acgcgaggcc tacttggctg catcatcact 1620
 agcctcacag gccgggacag gaaccaggtc gagggggagg tccaagtgtt ctccaccgca 1680
 acacaattct tectggcgac ctgcgtcaat ggctgtgttt ggactgtcta tcatgggtgc 1740
 ggctcaaaag ccttggccgg cccaaagggc ccaatcacc aaatgtacac caatgtggac 1800
 caggacctcg tgggtggcca agcgcgcctc gggggcgctt ccttgacacc atgcacctgc 1860
 ggcagctcgg acctttactt ggtcacagg catgcccgtg tcattecggt gcgcggcg 1920
 ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggcgcgtct cctacttgaa gggctctcg 1980
 ggoggtccac tgcctgccc ctgggggacg gctgtgggca tctttcgggc tgcctgtgc 2040
 acccgagggg ttgcgaaggc ggtggacttt gtaccgctg agtctatgga aaccactatg 2100
 cggctcccgg tcttcaggga caactcgtcc cctccggccg taaccagac attccaggtg 2160
 gcccatctac acgcccctac tggtagcggc aagagcacta aggtgcgggc tgcgtatgca 2220
 gcccaagggt ataagggtgt tgtcctgaac ccgtccgtcg ccgccaccct aggtttcggg 2280
 gcgtatatgt ctaaggcaca tggtagcag cctaacatca gaaccggggt aaggaccatc 2340
 accacgggtg ccccatcac gtaactccac tatggcaagt ttcttgccga cgggtgttgc 2400
 tctggggggc cctatgacat cataatatgt gatgagtgc actcaactga ctcgaccact 2460
 atcctgggca tgggcacagt cctggaacaa gcggagacgg ctggagcgcg actcgtctg 2520
 ctgcgccacg ctacgcctcc gggatcggtc accgtgccac atocaaacat cgaggaggtg 2580
 gctctgtcca gcactggaga aatccccttt tatggcaag ccatecccat cgagaccatc 2640
 aaggggggga ggcacctcat tttctgccat tccaagaaga aatgtgatga gctcgcccg 2700
 aagctgtccg gcctcgact caatgctgta gcatattacc ggggcttga tgtatccgtc 2760
 ataccaacta gcggagacgt cattgtcgta gcaacggagc ctotaatgac gggctttacc 2820
 ggcgatttcc actcagtgat cgaactgcaat acatgtgtca cccagacagt cgaactcagc 2880
 ctggaccgca ccttcacat ttagacagcg accgtgccac aagacgggt gtcacgctcg 2940
 cagcggcgag gcaggactgg taggggcagg atgggcatlt acaggttgt gactccagga 3000
 gaacggccct cgggcattgt cgattctcgt gttctgtcgt agtgcctatga cgcgggctgt 3060
 gcttggtagc agctcagccc cgcgagacc tcagttagggt tgcgggctta cctaaacaca 3120
 ccagggttgc ccgtctgcca ggaccatctg gagttctggg agagcgtctt tacaggccctc 3180
 accacatag acgcccattt cttgtccag actaagcagg caggagacaa ctccctac 3240
 ctggtagcat accaggctac ggtgtgcgcc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 3300

10

20

30

40

【0 1 3 3】

【外 1 4】

caaatgtgga agtgtctcat acggctaaag cctacgctgc acgggccaac gccctgctg 3600
 tataggctgg gaggcgttca aaacgaggtt actaccacac accccataac caaataacac 3660
 atggcatgca tctcgggtga cctggagglt gtcaagagca cctgggtgct ggtaggcgga 3720
 gtccatgacg ctctggcgcg gtattgcctg acaacaggca gcgtggtcat tgtgggcagg 3780
 atcatcttgt ccggaagcc ggccatcatt ccgacagggg aaglccttta ccgggagttc 3840
 gatgagatgg aagagtgcgc ctacacctc ccttacatcg aacagggaat gcagctcgcc 3900
 gaacaattca aacagaaggg aatcgggttg ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct 3960
 gctgctcccg tgggtggaat caagtggcgg accctogaag ccttctgggc gaagcatatg 4020
 tggaatttca tcagcgggat acaatattta gcaggcttgt ccactctgcc tggcaacccc 4080
 gcgatagcat cactgatggc attcacagcc tctatcacca gcccgctcac caccacaacat 4140
 accctcctgt ttaacatcct ggggggatgg gtggcgcgcc aacttgctcc tccagcgct 4200
 gcttctgtct togtaggcgc cggcatcgct ggagcggctg ttggcagcat aggccttggg 4260
 aaggtgcttg tggatatttt ggcaggttat ggagcagggg tggcaggcgc gctcgtggcc 4320
 ttcaaggtca tgaagcggca gatgccctcc accgaggacc tggttaacct actccctgct 4380
 atccgtctcc ctggcgccct agtcgtcggg gtctgtgctg cagcgatact gcgtcggcac 4440
 gtgggcccag gggagggggc tgtgcagtgg atgaaccggc tgatagcgtt cgcttcggcg 4500
 ggtaaccacg tctcccccac gcactatgtg cctgagagcg acgctgcage acgtgtcact 4560
 cagatcctct ctagtcttac catcactcag ctgtggaaga ggcttcacca gtggatcaac 4620
 gaggactgct claggacctg ctccggctcg lggctaagag atgtttggga ttggatatgc 4680
 acggtgttga ctgatttcaa gacctggctc cagtccaagc tcttgccggc attgcccggg 4740
 gtccctctct tctcatgtca acctgggtac aaggaggtct ggcggggcga cggcatcatg 4800
 caaaccacct gcccatgtgg agcacagatg accggacatg tgaanaacgg ttccatgagg 4860
 atogtgggtg claggacctg tagtaaacg tggcatggaa cattcccat taacgcgtac 4920
 accacgggcc cctgcacgcc ctcccggcg ccaaattatt ctaggggcgt gtggcgggtg 4980
 gctgctgagg agtaactgga ggttacggcg gtgggggatt tccactacgt gacggycatg 5040
 accactgaca acgtaaagtg cccgtgtcag gttccggccc ccgaattctt cacagaagtg 5100
 gatgggtgct ggttgacacg gtacgctcca gctgcaaac cctcctacg ggaggaggtg 5160
 acattcctgg tgggctcaa tcaatacctg gttgggtcac agctcccatg cgagcccgaa 5220
 ccggacgtag cagtgtctac ttccatgctc acugacccct ccacattac ggcggagacg 5280
 gctaagcgta ggctggccag gggatctccc cctccttgg ccagctcacc agctagccag 5340
 ctgtctgcgc ctcccttgaa ggcaacatgc actacccgtc atgactccc ggaocgtgac 5400
 ctcatcgagg ccaacctcct gtggcggcag gagatgggcg ggaacatcac ccgctggag 5460
 tcagaaaata aggtagtaat tttggactct ttcgagccgc tccaagcgga ggaggatgag 5520
 agggaaagtat ccgttcggcg ggagatctcg cggaggtcca ggaaattccc tcgagcgatg 5580
 cccatagggg acgtcccgga ttacaacctt ccactgttag agtcttggaa ggaacccgac 5640
 tacgtccctc cagtgttaca cgggtgtcca ttgcgcctg ccaaggcccc tccgatacca 5700
 cclccacgga ggaagaggac ggttgtctcg tcagaatcta ccgtgtcttc tgccttggcg 5760
 gagctcgcca caaagacctt cggcagctcc gaatcgtcgg ccgtcgacag cggcacggca 5820
 accgctctct ctgaccagcc ggcagcgcg ggccagcgcg gatccgacgt tgagtcgtac 5880
 tctccatgct ccccccctga gggggagccg ggggatcccg atctcagcga cgggtcttgg 5940
 tctaccgtaa gcgaggaggc tagtgaggac gtctgtctgt gctcgatgct ctacacatgg 6000
 acaggcgccc ggtacacgcc atcgctgcg gaggaaaaca agctgcccat caatgcactg 6060
 agcaactctt tgcctcgtca ccacaacttg gtctatgcta caacatctcg cagcgcaagc 6120
 ctgcggcaga agaaggtcac ctttgacaga ctgcagggtc ttggacgacca ctaccgggac 6180
 gtgctcaagg agatgaaggc gaaggcgtcc acagttaagg ctaaaacttt atccgtggag 6240
 gaagcctgta agctgacgcc ccacattcg gccagatcta aatttggtta tggggcaag 6300
 gacgtccgga acctatccag caaygcctll aaccacatcc gctccgtgtg gaaggacttg 6360
 ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc accatcatgg caaaaaatga ggttttctgc 6420
 gtccaaccag agaagggggg ccgcaagcca gctcgcctta tctgtattccc agattlgggg 6480
 gttcgtgtgt gcgagaaaat ggccttttac gatgtggtct ccacctccc tcaggccgtg 6540
 atgggtctct catacggatt ccaatactct cctggacagc gggctcagtt cctggtgaat 6600
 gcttgaaag cgaagaaatg ccttatgggc ttccatcatg acacccgctg ttttgactca 6660
 acggtcactg agaatgacat ccgtgttgag gactcaatct accaatgttg tgacttggcc 6720
 ccggaagcca gacaggccat aaggtcgtc acagagcggc tttacatcgg gggcccccgt 6780
 actaattcta aagggcagaa ctgcggctat cgcgggtgcc gcgcgagcgg tgtactgacg 6840
 accagctgct gtaataccct cacatgttac ttgaaggccg ctgcggcctg tcgagctgct 6900
 aagctccagg actgcacgat gctcgtatgc ggagacgacc ttgtcgttat ctgtgaaagc 6960
 gcggggaccc aagaggacga ggcgagccta cgggcttcca cggaggctat gactagatac 7020
 tctgcccccc ctggggaccc gcccaaacca gaatacgact tggagttgat aacatcatgc 7080
 tctccaatg tgtcagtcgc gcacgatgca tctggcaaaa ggggtgacta tctcaccctg 7140
 gaacccacca ccccccttgc gggggtgctg tgggagacag ctagacacac tccagtcaat 7200
 tctgtgctag gcaacatcat catgtatgcg cccacttgt gggcaaggat gatcctgatg 7260
 actcatttct tctccatcct tctagctcag gaacaacttg aaaaagccct agattgtcag 7320
 atctacgggg cctgttactc cattgagcca ctgacctac ctcagatcat tcaacgactc 7380
 calggcctta ggcatttttc actccatagt tactctccag gtgagatcaa tagggtggct 7440
 tcatguctca ggaaacttgg ggtaccgccc ttgcgagtct ggagacatcg ggcacgaagt 7500

10

20

30

40

【0 1 3 4】

【外 1 5】

```

gtccgcgcta ggetactgtc ccaggggggg agggctgcca ctgttggaac gtacctctc 7560
aactgggcag taaggaccaa gctcaaacctc actccaatcc cggctgcgtc ccagttggtat 7620
ttatccagct ggttcgttgc tgggtacagc gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt 7680
gcccagcccc gctgggttcac gtggtgccta ctccactttt ctgtaggggg aggcattctat 7740
ctactcccca accgatgaac ggggagctaa acactccagg ccaataggcc atcctgtttt 7800
tttccctttt tttctttctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttctctttt 7860
tttttctctt ttttttctct ttttttctct tgggtggtcc atcttagccc tagtcaaggg 7920
tagctgtgaa aggtccgtga gccgttgac tgcagagagt gctgatactg gcctctctgc 7980
agatcaagt 7989

```

【0135】

10

【外16】

```

<210> 5
<211> 8649
<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus

```

```

<400> 5
gccagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaaccgt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gctgcccc 240
gogagactgc tagccaghta gtgttggtgc gcgaaaggcc ttgtggtact gctgatagg 300
gtgcttcgga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcagc aatcctaacc 360
ctcaaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggccgcccac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tcggccgct tgggtggaga ggtatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgatgcc ggcgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgactgttcc ggtgcccctga atgaactgca ggacgaggca ggcggctat 600
cgtggctggc ccagcagggc gttcttggcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg ggccaggtgc cggggcagga tctcctgta tctcactttg 720
ctcctgcgga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag gggctgcat acgcttgatc 780
cggtacactg ccatttcgac caccagcgga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag 900
ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcgcagcgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcgg aatcatgagg tggaaaaatg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgccttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc cgagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagtctctc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttaact ggcgaagcgg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tcacacatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tcttctctt 1380
acgagcatcc ctagggttct ttcctctctc gccaaaggaa tgcagggtct gttgaatgtc 1440
gtgaaggaa gctgttctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac aggtgctctc gcggccaaaa gccacglgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ccacaaaccg cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgtc ttcaacaagg gctgaagga tgcaccaga 1680
gtaccccat gtatgggata tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaacgttcta ggcacccgga acccggttct cgtgttttct ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccattgacgg ggagatggca gcatcgtgag gaggcgggt tttcgtagg 1860
ctgatactct tgaccttctc accgcactat aagctgttcc tgcctaggct catatgggtg 1920
ttacaatatt tlatcaacc ggcggaggca cacttgcagg tgtggatccc cccctcaac 1980
gttcgggggg gcgcgcatgc cgtcatctc ctcacgtgag cgateccacc agagctaate 2040
tttaccatca ccaaaatctt gctcgccata ctcggtccac tcatggtgct ccaggttgt 2100
ataaccaaag tgcgtactt cgtgcgcgca caggggtcct ttcgtgcatg catgctggt 2160
cgaagggttg ctgggggtct ttagtctcaa atggctctca tgaagttggc cgcactgaca 2220
gglacgtacg tttatgacca tctcacccca ctgcccgaat gggccacgc gggcctacga 2280
gaacttgcgg tggcagttga gcccgctgtc tctctgata tggagaccaa ggtlatcac 2340
tggggggcag acaccggcgg gtgtggggac atcatcttgg gectgcctgt ctccgccc 2400
agggggaggg agatacatct gggaccggca gacagccttg aaggcgagg gttggcactc 2460
ctcgcccta ttacggccta ctcccaacag acggaggcc tacttggtg ccatcact 2520
agcctcacag gccgggacag gaaccaggtc gagggggagg tccaaagtgt ctccaccga 2580
acacaatctt tcctggcgac ctgcgtcaat ggcgtgtgtt ggactgtcta tcatggtg 2640
ggctcaaaag cccttgcggg cccaaagggc ccaatcccc aaatgtacac caatgtgg 2700
caggacctcg tcygclygca agcyccccc gggcgccgtt ccttgacacc atgcacctg 2760
ggcagctcgg accttactt ggtcacgagg catgcccgt tcatccggg gcgcggcg 2820
ggcgacagca gggggagcct actctcccc aggcocgtct cctacttgaa ggcctcttg 2880
ggcgggtcac tgcctgtccc ctgggggac gctgtgggca tctttcgggc tgcggtgtg 2940
accggagggg ggtggaactt gtaccogtgc agtctatgga aaccactatg 3000
cggctcccgg tcttcacgga caactcgtcc cctccggccg taccgcagac attccaggtg 3060
gcccatctac agcccccctac tggtagcggc aagagcacta aggtgcgggc tgcgtatgca 3120
gcccaagggt ataagggtgc tgcctgaac ccgtccgtcg ccgcaacct aggtttcgg 3180
gggtatatgt ctaaggcaca tgggtatgac cctaacatca gaaccgggtt aaggaccatc 3240
accacggglt ccccatccac gtactccacc tatggcaagt ttcttgccga cgggtgttgc 3300
tctggggggc ccatgacat cataatatgt gatgagtc actcaactga ctgaccact 3360
atcctgggca tcggcaacgt cctggaccaa gcggagacgg ctggagcgcg actcgtctg 3420
ctcgccaccg ctacgcctcc gggatcggtc accgtgccac atccaaacat cgaagggtg 3480
gctctgacca gcactggaga aalccccctt tatggcaaa ccatcccatc cgagaccatc 3540

```

20

30

40

50

【0 1 3 6】

【外 1 7】

aaggggggga ygcaccccat tttctgccat tccaagaaga aatgtgatga gctcgcgcgc 3600
 aagclgtccg gccctgggact caatgctgta gcatattacc ggggccttga tgtatccgtc 3660
 ataccaacta ggggagagct cattgtcgla gcaacggagc ggtctaatgac ggyctttacc 3720
 ggcgatttccg acctcagtgat cgactgcaat acatgtgtca cccagacagt cgacttcagc 3780
 ctggaccoga ccttcaccat tgagacgacg accgtgccac aagacggcgt gtcacgctcg 3840
 cagcggcgag gcaggactgg taggggcagc atgggcattt acagggttgt gactccagga 3900
 gaacggccct cgggcatgtt ngattcctcg gttctgtgag agtgctatga ccggggctgt 3960
 gcttggttac agctcagcgc ccgcgagacc tcagttaggt tgcgggctta cctaaacaca 4020
 ccagggllgc ccgtctgcca ggacacatcg gagttctggg agagcgtctt tacaggcctc 4080
 accacacatg acgcccattt cttgtccacg actaagcagg caggagacaa ctcccccac 4140
 ctggttagcat accaggctac ggtgtgcgcc agggctcagg ctccacctcc atcgtgggac 4200
 caaatgttga agtgtctcat acggctaaag cctacgctgc acgggccaac gcccttgcgc 4260
 tataggctgg ccggacttca aaacgaggtt actaccacac accccataac caaatacac 4320
 atggcatgca tctcgctga cctggaggtc gtcacgagca cctgggtgct ggtaggcgga 4380
 gtcctagcag ctctggccgc gtattgcctg acaacaggca gctggtctat tctggggcag 4440
 atcatcttgt ccggaaagcc ggccatcatt ccgacaggg aagtccttca ccgggagttc 4500
 gatgagatgg aagagtgcgc ctccacacctc ccttacatcg aacagggaat gcagctcgcc 4560
 gaacaattca aacagagcgc aatcgggttg ctgcaaacag ccaccaagca agcggaggct 4620
 gctgtctccg tggctggaag accctcgaaag cccctcgaaag ccttctgggc gaagcatatg 4680
 tggaaattta tcagcgggat acaatattta gcaggcttgt ccactctgcc tggcaacccc 4740
 gcgataagcat cactctggc attccacagc gctatcaaca gcccgctcac caccacacat 4800
 accctcctgt ttaacatcct ggggggatgg gtggccgcgc aacttgcctc tccacgcgt 4860
 gcttctgctt tctaggcgc cggcatcgct ggagcggctg ttggcagcat aggccttggg 4920
 aagggtgcltg tggatattt ggaggttat ggagcagggg tggcaggcgc gctcgtggcc 4980
 ttttaaggta tgagcggcga gatgcctcc accgaggacc tgggttaact actccctgt 5040
 atcctctccc agtgcgcctc gtcgtgtgag cagcgatact gcgtcggcac 5100
 gtgggcccag gggagggggc tgtgcagtgg atgaacgggc tgatagcgtt cgcttcggcg 5160
 ggtaaccacg tctcccccac gcaactatgt cctgagagcg acgtgcagc acgtgtcaat 5220
 cagatctctc tagtcttac calcaactcag ctgctgaaga ggttcaaca gtggatcaac 5280
 gaggaactgt ccacggcatg ctccggctcg tggctaagag atgtttggga ttggatatgc 5340
 acggtgttga ctgatttcaa gaactggctc cagtccaagc tccgtgcgcg attgcgggga 5400
 gleeccctct tctcatgtca acgtgggtac aagggagtct ggcggggcga cggcatcatg 5460
 caaacacacg gccatgcgg agcacagatc accggacatg tgaaaaaacy ttccatgagg 5520
 atcgtggggc ctaggacatg tagtaacacg tggcatggaa cattcccat taacgcgtac 5580
 accacgggac cctgcacgac ctccccggcg ccaaattatt ctagggcgt gtggcgggtg 5640
 gctgtctagg agtaacgtga ggttaacggc gtgggggatt tccactacgt gacgggcatg 5700
 accactgaca acgtlaagtg ccctgtctag gttccggccc ccgaattctt cacagaagtg 5760
 gatgggggtg ggttgacacg gtaacgtcca gcgtgcaaac cctcctacg ggaggaggte 5820
 acattctcgg tccggctcaa lcaataactg gttgggtcac agtcccatg ccagcccgaa 5880
 ccggacgtag cagtgtcac ttccatgtct accgaacctt ccacattac ggcggagacg 5940
 gctaaacgtg ggttgacacg ggttatcgcc cctccttgg ccagctcatc agctagccag 6000
 ctgtctgcgc ctctcttgaa ggaacatgc actaccgtc atgactccc ggaactgac 6060
 ctcatcgagg ccaacctcct gtgccggcag gagatcgccg ggaacatcac ccgctggag 6120
 tcagaaaata aggtagtaat ttggactct ttccagccgc tccaagcgga ggaggatgag 6180
 agggaggtat ccgttcggc ggagatcctg ccagggtcca ggaattccc tcgagcgatg 6240
 cccatattgg cagcccgga ttacaacctt cactgttag agtccggaa ggaccggac 6300
 taactccctc cagtgttaca cgggtgtcca ttgcgcctg ccaaggccc tccgatacca 6360
 cctccacgga ggaagaggac ggttgtctg tcagaatcta ccgtgtctt tccttggcg 6420
 gagctcgcca caaagacatt cggcagctcc gaatcgtcgg ccgtcgacag cgcacggca 6480
 accgctctc ctgaccagcc ctccagagac gggaacggg gatccgacgt tgagtctac 6540
 tctccatgc ccccccctga ggggagcgc ggggatcccg atctcagcga cgggtcttgg 6600
 totacogtaa gcgaggaggc tagtgaggac gtcgtctgt gctcgalgt ctacacatgg 6660
 acaggcgccc tgatcacgcc atgcgctgcg gaggaacca agctgcccac caatgcaact 6720
 agcaactctt tgcctcgta ccacaactg gtctatgcta caacatctcg cagcgcaagc 6780
 ctgcgcgaga agaaggctac ctttgacaga ctgcaggltc lggacgacca ctaccgggac 6840
 gtgctcaagg agatgaaggc gaaggcgtcc acagttaagg ctaaaactct atccgtggag 6900
 gaagcctgta agctgacgcc cccacattcg gccagatcta aatttggcla lggggcaag 6960
 gacgtcggga acctatccag caaggccgtl aaccacatcc gctcgtgtg gctcgtgtg gaaggactt 7020
 ctggaagaca ctgagacacc aattgacacc accatcatgg ctaaaaaatga ggttttctgc 7080
 gtccaacag aqaagggggg ccgcaagcca gctcgcctta tcglatlcc agatltggg 7140
 gttcgtgtgt gcgagaaaal ggcctlltac gatgtgtct ccacccctcc tccaggccgt 7200
 atgggtctct cacaaggatt scaatactct cctggacagc gggtcaggt cctggtgaat 7260
 gcttggaag cgaagaaatg cctatgggc ttgcclalag acaccgctg ttttgactca 7320
 accgtcactg agaatgacat ccgtgttgag gagtcaatct accaatgtt tgaactggcc 7380
 ccggaagcca gacagcccat aaggtcgtct acagagcggc tttacatcg gggccccc 7440
 actaattcta aagggcagaa ctgcggctat cgcgggtgc gcggagcgg tqtactgac 7500

10

20

30

40

【0 1 3 7】

【外 1 8】

```

accagctgcg gtaataccct cacatgttac ttgaaggccg ctgcggcctg tcgagctgcg 7560
aagctccagg actgcacgat gctcgtatgc ggagacgacc ttgtcgttat ctgtgaaagc 7620
ggggggaccc aagaggacga ggcgagccta cgggccttca cggaggctat gactagatac 7680
tctgcccccc ctggggaccc gcccaaacca gaatacgact tggagttgat aacatcatgc 7740
tctccaatg tgtcagtcgc gcacgatgca tctggcaaaa ggggtgacta tctcaccctg 7800
gaccccacca ccccccttgc gcgggctgcg tgggagacag ctagacacac tccagtcaat 7860
tcttggttag gcaacatcat catgtatgcg cccaccttgt gggcaaggat gatcctgatg 7920
actcatttct tctccatcct tctagctcag gaacaacttg aaaaagccct agattgtcag 7980
atctacgggg cctgttactc cattgagcca cttgacctac ctcagatcat tcaacgactc 8040
catggcctta gcgcattttc actccatagt tactctccag gtgagatcaa taggggtggct 8100
tcatgectca ggaaacttgg ggtaccgccc ttgcgagtcg ggagacatcg ggccagaagt 8160
gtccgcgcta ggctactgtc ccaggggggg agggctgcca cttgtggcaa gtacctcttc 8220
aactgggcag taaggaccaa gctcaaacct actccaatcc cggctgcgtc ccagttggat 8280
ttatccagct ggttcgttgc tggttacagc gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt 8340
gcccgacccc gctggttcat gtggtgcta ctctacttt ctgtaggggt aggcacttat 8400
ctactcccca accgatgaac ggggagctaa acactccagg ccaataggcc atcctgtttt 8460
tttccctttt tttttttctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttctcctttt 8520
tttttctctt ttttttctt ttctttctt tgggtgctcc atcttagccc tagtcacggc 8580
tagctgtgaa aggtccgtga gccgcttgac tgcagagagt gctgatactg gcctctctgc 8640
agatcaagt 8649

```

10

【0 1 3 8】

【外 1 9】

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 6

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
ccccctcccc gggagagccca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccc gaattgccag 180
gacgaccggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcggtcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaet gectgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacc aatcctaaac 360
ctcaagaaaa aaccaaaccg aacaccaacc ggccgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggaagaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaaggagctt gctgttattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcttgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcacagggg ctcgggccag 900
ccgaactggt aagcgcgcca tggccgacgg cgaggatctc gtctgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaaatg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgctgaaga ctgtggcgcc gaatggctgc accgttctct cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctccgattc gcagcgatc gccttctatc gccttcttga cgagtctctc tgagttaaaa 1200
cagaccacaa cgttttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg gcgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
tccacctat tgcogtcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctttg 1380
acgagcattc ctagggtctt tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttcctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcagccctt 1500
tgacggcagc ggaaccccc accctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ccgctcaagg cagtgccacg ttgtgagttg gatagtgtg 1620
gaaagagtc aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggtgaagga tgccagaag 1680
tgaccccat gtatgggatc tgatctgggg cctcgggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaaagttta accacgggga cgtgttttct ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac aqacgcgagg cctacttggc 1860
tgcatcatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagtg 1920
gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acctcgctca atggcggtg ttggaactgtc 1980
tatcatggtg ctgcaaggcc gaccttgcc ggcccaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
accaatgtgg accaggacct cgtcggctgg caagcgcgcc ccggggcgcg ttcttgaca 2100
ccatgcacct ggcgcagctc ggacctttac ttgttcacga ggcattgccg tgtcattccg 2160
gtgcgcgggc ggggcgacac cagggggagc ctactctccc ccaggcccggt ctcctacttg 2220
aagggtctt cgggcggtcc actgctctgc cctcgggggc atgtgtggg catcttctcg 2280
gctgcggtgt gcacccgagg ggttgcaag gcggtggaat ttgtaccggt cgagtctatg 2340
gaaaccatac tgcggtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taagggtccg 2460
gctgcgcatg cagcccaagg gtataagggt cttgtcctga acccgctcgt cgccgccacc 2520
ctaggtttcg ggcgttatat gtctaaggca catggtatcg acctaacat cagaaccggg 2580
gtagggacca tcaccaaggg tgcgcccatc acgtaactca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
gacggtggtt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagtg ccaactcaact 2700
gactcgacca ctatcctggg catcggcaca gtctggacc aagcggagac ggctgcagcg 2760
cgactcgtcg tgcctgcacc cgtacgcct cgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggctctgtc cagcaactgga gaaatccct tttatggcaa agccatcccc 2880
atcgcgacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
gagctcgccg cgaagctatc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
acgggtttta ccggcgattt cgaactcagt atcgactgca ataatgtgt caccagaca 3120
gtcgacttca gcttggaacc gaacttcacc attgagacga cgaccgtgcc acaagacgcy 3180
gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggaaggccat ttacaggttt 3240
gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttcatctct cggctctgtg cgagtctat 3300
gacgcgggct gtgcttqgta cagctcacc cccgcgaga cctcagtlag gttcgggct 3360
tacctaaaca caccagggct gccggtctgc caggaccatc tggagtctc ggagagcgtc 3420
tttacaggcc taccacacat agacgcccat ttcttgtccc agactaggca ggcaggagac 3480
aacttccctt acctggtagc ataccaggct acggtgtgcy ccagggtca ggtccacct 3540

```

10

20

30

40

【0 1 3 9】

【外 2 0】

ccacgtgtgg accaaatgtg ggagtgtctc atacggttaa agcctacgct gcaagggtcc 3600
 acgcccctgc tgtataggct gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaataca tcatggcatg catgtcggtt gacctggagg tcgtcacgag cacctgggtg 3720
 ctggtagggc gaggctctag agctotggcc gcgtaattgc tgaccaacagg cagcgtgtgtc 3780
 attgtgggca ggaatcatct gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtctct 3840
 taccgggagt tcgatgagat ggaagagtgc gcctcacacc tcccttacat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag qcaatcggtt tgctgcaaac agccacaaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtgtgtgaa lccaaagtgg ggaacctcga agcctctctg 4020
 gcaagcataa tgtggaattt catcagcggg atacaatatt gcattccacg cctctatcac cagcccgctc 4080
 cctggcaacc ccgcatagac atcaactgat ctggggggat ggggtggccg ccaactlgtc 4140
 accacccaac ataccctctt gtttaacatc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4200
 cctcccagcg ctgctctctg tttcgtaggg gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaaggtgct tgtggatatt ttggcagggt atggagcagg ggttggcagg 4320
 gcgctcgttg cctttaaggt catgagcggc gagatgcccc ccaccgagga cctgggtaac 4380
 ctactccctg ctatcccttc cctggcgccc ctagtctctg gggctgtgtg cgcagcgata 4440
 ctgctcggcg acgtgggccc aggggagggg gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg 4500
 ttgccttcga ggggtaaaca cgtctccccc acgcactatg tgtctgagag cgcagctgca 4560
 gcacgtgtca ctccagatcc ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttcac 4620
 cagtggatca acgaggactg ctccacgcca tgctccggct cgtggctaag agatgttttg 4680
 gattggatat gcacgtgtgt gactgatctc aagacctggc tccagtccaa gctctgccc 4740
 cgattgcccg gtagctccct cttctcatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gacggcatga tgcaaacacc ctgccatgtt ggagcacaga tcaccggaca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggaatcgtgg gccatggacc ttagtaaca cgtggcatgg aacatlcacc 4920
 attaacgcgt acaccacggg cccctgcacg cctcccccgg cgccaaatta ttctaggggc 4980
 ctgttggcgg tggctcgtga ggaatcgtg gaggttacgc ggggtgggga tttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga caacgtaaag tgcccgctgc aggttccggc ccccgaaatc 5100
 ttacacaga tggatggggt gcggttgcac aggtacgctc cagcgtgcaa accctctcta 5160
 cgggagggag tcaatctctt ggtcgggctc aatcaatacc tgggttgggt acagctccca 5220
 tgccggcccg aacggagcgt agcagtgctc acttccatgc tcaccgacc ctcccacatt 5280
 acggcggaga cggctaagcg taggtctggc aggggatctc cccctcctt ggccagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gccctctctg aaggcaacat gcaatacccg tcalgactcc 5400
 ccggaacgtc accctcatga ggccaaacct ctgtggcggc aggagatggg cgggaacatc 5460
 acccgcggtg agtcagaaaa taaggtagta attttggact ctttcgagcc gctccaagcg 5520
 gaggaggtg agagggaagt atccgttccg gcggagatcc tgccgagggt caggaaatcc 5580
 cctcagcgca tggccatatt ggcaacggcg gattacaacc ctccactggt agagtctctg 5640
 aaggaccccg actacgtccc tccagtggta caccgggtgc cattgccggc tgccaaggcc 5700
 cctccgatac cactccacag gaggagagg acggttctgc tgtcagaatc taccgtgtct 5760
 tctgccttgg cggagctctc caaaaagac ttccggcagc ccgaatcgtc ggccgtcgac 5820
 agcggcagg caacggcctc tctgacag ccctccgacg acggcgagcg gggatccgac 5880
 gttgagtcgt actcctccat gcccccctt gagggggagc cgggggatcc cgtctcagc 5940
 gacgggtctt ggtctacgtt aagcagggag gctagtggg acgtctctg ctgctcagc 6000
 tctacacat cctcagggcg cctgatcacg ccatgcctg cggaggaac cagctgccc 6060
 gtcaatgcac tgagcaactc tttgctcgtt caccacaact tggctctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gctcggcga gaagaaggtc accttgaca gactgcaggt cctggacgac 6180
 cactacccgg acgtgtcaaa ggagatgaag ccgaaggcgt ccacagttaa ggcataaact 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg cccccacatt cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaagtcct gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tggaggagat tgcgtgaaga cactgagaca ccaattgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gagggtttct cgttccaaac agagaagggg ggcgcgaagc cagctcgctc tatcgtattc 6480
 ccagatttgg gggttcgtgt gtgcgagaaa atggcccttt acgatgttgt ctccaccctc 6540
 cctcaggccg tgatgggtc ttcatatcga ttccaatact ctcctggaca ggggttcgag 6600
 ttctgtgtga atgcttgaa agcgaagaaa tgccctatgg gcttcgcata tgacacccgc 6660
 tgttttgact caacggtcac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcaat ctaccaatgt 6720
 tgtgacttgg ccccgaaagc cagacaggcc ataaggtcgc tcacagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgactaatlc taaaggcgag aactgcggct atcgccgtg ccgcgcgagc 6840
 ggtgtactga cgaacagctg cgtataatcc ctcacatggt atttgaaggc cgtgcgggcc 6900
 tgtcagctg cgaagctcca ggaactgcag atgctcgtat cgggagacga ccttgcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gaggcgagcc tacgggctt caccgaggt 7020
 atgactagat actctgcccc cctgggggac ccgcccacac cagaatacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tgtgicagtc gcgcacgat catctgcaaa aagggtgtac 7140
 tatctcacc gtgacccccc caccccctt gcgcgggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actccagtc atctctggt agggcaacat atcatgtat cgcaccaact gtgggcaagg 7260
 atgactcga tgaactatct cttctagct cttctagct aggaacaact tgaaaaagcc 7320
 ctgattgttc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc cactlgaccl acctcagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt teactccata gttactctcc aggtgagatc 7440
 aatagggtg cttcangcct caggaaaact ggggtaccgc ccttgcgagt ctggaqacat 7500

10

20

30

40

【0 1 4 0】

【外 2 1】

```

cgggccagaa gtgtccgcgc taggtactg tcccagggg ggagggtgc cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcaactcaat cccgggtgcg 7620
tcccagttgg atttatccag ctggttcggt gctggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccgacc ccgctgggtc atgtgggtgc tactcctact ttctgtaggg 7740
gtaggcctct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatcctggt tttttccctt tttttttttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt tttttttcct cttttttttc tttttcttcc tttgggtggc ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggtcctg gaggccttg actgcagaga gtgtgtgatac 7980
tgccctctct gcagatcaag t

```

【0 1 4 1】

【外 2 2】

<210> 7
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 7

```

gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccoctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaocggg gactacaccg gaattgocag 180
gacgaccggg tcccttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgttggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
ctcaaagaaa aaccaaaagt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcgctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
cgtggctggc caccaggggc gttcccttgc cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
gaaggagctg gctgctattg ggcgagtgcc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
ctcctgcoga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggctacctg cccattcgac caccagcgca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctocgcocag 900
ccgaactgtt cgcacggctc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatga 1020
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
ttgtgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gcttcttga cgagtcttcc tgagttttaa 1200
cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caatccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgtttactg gccgaagccg cttggaataa ggcgggtgtg cgtttgtcta tatgttatt 1320
tccaccatat tccgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
acgagcatte ctagggtctt ttcctctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg ccacaaacc cagtgcacgc ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gaaagagta aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagg tgcacagaag 1680
gtaccccat gtatgggac tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcocccoga accacgggga cgtggtttcc ctttgaaaaa 1800
cacgataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaacc taacaccaa 1860
cgccgccac aggaagtcac gttcccgggc ggtggtcaga tcgtcggtgg agtttacctg 1920
ttgcgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg 1980
caacctcgtg gaaggcgaca acctatccc aaggctcgcc agcccgaggg tagggccttg 2040
gctcagcccg ggtacccttg gccctctat ggcaatgagg gcttgggggtg ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac cccgtggctc tggcctagt tggggcccca cggacccccc gctgaggtac 2160
cgcaatttgg cgataccctc acgtcggtct tcgccgatct catggggtac 2220
attccgctcg tggcgccccc cctagggggc gctgccaggg ccttggcgca tggcgtccgg 2280
gttctggagg acggcggtga ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgcct cttttctatc 2340
ttccttttgg ctttgcgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgccgaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt caccgaacgc tgcctcaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
gcggacatga teatgcatac ccccggtgct gtgccctggc ttcgggagaa caactcctcc 2520
cgctgctggg tagcgctcac tcccacgctc gcggccagga acgctagcgt cccactaacg 2580
acgatacgac gccatgtcga tttgctcggt gggcgcgctg ctctctgctc cgtatgtac 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtcgccacgc tgttccctt ctcgcctcgc 2700
cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatatc ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggett gggatatgat gatgaactgg tcacctacg cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg yggccattg gggagtcta 2880
gcgggccttg cctactattc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgcta 2940
ctctttgccc gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
ctcgggatta cgtccctctt ttcacccggg tcatccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060
aacggcagct ggcaatcaa caggactgcc ctgaactgca atgactccct caacactggg 3120
ttccttgcgt cgctgttcta cgtgcacaag ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gcccacatga cgcgttcgct cagggtgggg ggcacatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccctattgt tggcactacg caccocggcc gtcgggtatc 3300
qlaccccgcg tggtcagtg tactgcttca cccaagccc tgtcgtgggtg 3360
gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctta acaacacggg gccgcgcgaa ggcaactggt ttggctgtac atggatgaat 3480
agcaclgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccggtgta acatcggggg gatcggaat 3540

```

10

20

30

40

【0 1 4 2】

【外 2 3】

aaaaccttga cctgcccac ggaactgttc cggaagcacc cagagggcac ttacaccaag 3600
 tgtgtgttcgg ggccttggtt gacaccacaga tgettggtcc actaccacata caggttttgg 3650
 cactacccctt gcaactgtcaa ctttaaccatc ttcaagggtta ggaatgacgt ggggggagtg 3720
 gagcacagggc togaagccgc atgcaatttg actcagaggag agcgttgtaa cctggaggac 3780
 agggacagat cagagcttag ccgcctgctg ctgtctacaa cggagtgcca qgtattgccc 3840
 tgttccttca ccacccatac ggcctgtgtc actggtttga tccatctcca tcagaacgtc 3900
 gtggagctac aatacctgta cggtataggg tcggcggttg tctcctttgc aatcaaatgg 3960
 gagtatgtcc tgttgcctct ccttcttctg gcggacggcg gcgtctgtgc ctgcttgttg 4020
 atgatgtgtc tgatagctca agctgaggcc gccctagaga acctggttgt cctcaacggc 4080
 gcacccgtgg ccggggcgca tggcattctc tccctcctcg tgttctctg tgcgtcctgg 4140
 tacatcaagg gcaggctggg cacttggttc gcatatgccc tctacggcgt atggccgcta 4200
 ctccctgctcc tgcctggcgtt accaccacga gcatacgcca tggaccggga gatggcagca 4260
 tgcgtcggag gcgcgggttt cgttaggtctg atactcttga ccttgtaacc gcaataaag 4320
 ctggtcctcg ctaggctcat atggtggtta caatatttta tcaccagggc cagggcacac 4380
 ttgcaagtgt ggaacccccc cctcaacgtt cggggggggc gcgatgcctt catcctctc 4440
 acgtgcggca tccacccaga gctaatcttt accatcacca aaatcttgc ctgcatactc 4500
 ggtccactca tgggtctcca ggttggtata accaaagtgc cgtacttctg gcgcgcacac 4560
 gggctcattc gctgggtcgg aaggttgctg ggggtcatta tgtccaaatg 4620
 gctctcatga agttggccgc actgacaggt acgtacgttt atgacctct caccctactg 4680
 cgggactggg ccacgcgggg cctacgagac cttgcgggtg cagttgagcc cgtcgtcttc 4740
 tctgatattg agaccaaggt tatcactgg ggggcagaca ccgcggcgtg tggggacatc 4800
 atcttgggccc tgcctgtctc cgcccgagg gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860
 agccttgaag ggcagggggt ggcactcttc ggcctatta cggcctactc ccaacagacg 4920
 cgaggcctac ttggtgtcat catcactagc ctacagggcc gggacaggaa ccaggctcag 4980
 ggggaggtcc aagtgggtct caccgcaaca caatcttctc tggcgacctg cgtcaatggc 5040
 gtgtgttggg ctgtctatca tgggtccggc tcaaagaccc ttgcggggcc aaaggggcca 5100
 atcacccaaa tgtacaccaa tgtggaccag gacctcgtcg gctggcaagc gcccccgggg 5160
 gcgcgttctt tgacacccat cactcgggc agctcggacc tttacttggc cagaggcat 5220
 gccgatgtca ttccgtgtgc ccggcggggc gacagcaggg ggagcctact ctccccagg 5280
 cccgtctctc acttgaaggg ctcttcgggc ggtccactgc tctgccccctc ggggcatgct 5340
 gtgggcatct ttccgggtgc cglgtgcacc cgaggggttg cgaaggcggg ggactttgta 5400
 cccgtcaggt ctatggaaac cactatgcgg tcccgggtct tcaccgacaa ctgctccct 5460
 ccggccgtac cgcagacatt ccagggtggc calctacacg cccctactgg tagcggcaag 5520
 agcactaagg tgcggctgc gtatgcagcc caagggtata aggtgcttgt cctgaacccg 5580
 tccgtcggcc ccacccatag tttcggggcg gacctaccc acgggtgccc scatcaagta ctccacctat 5640
 aacatcagaa ccgggttagg tgggtgtctt gacctatc cctggcatcg atgacatcat aatatgtgat 5700
 ggcaagtctc caactgactc cgtcgtgtct gccaccgcta cgtccggg gaaccaagcg 5760
 gagtgccact gagcggctg ccaacatcga ggaggtggct ctgtccagca ctggagaaat ccccttttat 5820
 ggtccacatc tcccctatgc gtgatgagc gacctcaag ggggggaggc acctcatttt ctgccattcc 5880
 aagaagaaat gtgatgagc atccgtcata ccaactagcg gatttcgact cagtgatcga ctgcaataca 5940
 tattaccggg cccctgtatg ctttaccggc cttcagcccg gacccgacct tcaccattga gacgaagacc 6000
 acggacgctc agacagtga accgtcgcag cgcctcgcag ggaactggtag gggcaggatg 6060
 tgtgtcaccg gtgcacaa ggtctgtgac tccaggagaa cggccctcgg gcatgttcga ttccctgggt 6120
 gtgtgcaggt gctatgagc ggtgtgtgtc gggctgtgtc tggtaagagc tcacgcccgc cagagacctca 6180
 gttagggttc gggcttaact aggcctttac aggcctcacc cccatttctt gtcccagact 6240
 ttctgggaga gagacaactt cccctactcg gtgggaccaa atgtgggagt gtctcatacg gctaaagcct 6300
 aggcaggcag cactccatc ggcacaacgc cctgtgtat aggtgggag cgtttcaaaa cagggttact 6360
 gctcaggctc cactaaccac atacatcat gcatgcatgt cggctgacct cggctgacct ggaggtcgtc 6420
 accacacacc ggggtgtgtt aggcggaglc ctacagctc tggccggcta ttgctgaca 6480
 acaggcagcg tggctcatgt gggcaggatc atcttgtccg gaaagccggc catcattccc 6540
 gacagggaag tcccttaacg ggagttcgat gagatggaag agtgccctc acacctccct 6600
 tacatcgaa cagggaatga gctgcgcgaa caattcaaac agaaggcaat cgggttgctg 6660
 caaacagcca ccaagcaagc gtaggctgtg gctcccgtgg tggaaacca ggggataca atattttagc 6720
 ctogaagcct cctggggcga gcatatgtgg caaccccgc ctaqcalcac tgatggcatt cacagcctct 6780
 ggcctgtcca cctgtcctgg cagcctgctt cctgtttctg laqgcgcgg catcgtgga 6840
 atcaccagcc cgtcaccac ttgctcctcc ccttgggaag gtgcttgtgg atattttggc aggttatgga 6900
 gccgcacac tgcctcctcc cgtggccttt aaggtcatga gcqgcagat gccctcacc 6960
 gaggacctgg ttaacctact cctgctatc ctctccctg gcgcctagt cgtcggggtc 7020
 7080
 7140
 7200
 7260
 7320
 7380
 7440
 7500

10

20

30

40

【0 1 4 3】

【外 2 4】

gtgtgagcag	cgatactgag	tgggcaogtg	ggcccagggg	agggggctgt	gcagtggatg	7560
aacgggctga	tagcgttgcg	ttcggggggt	aaccacgtct	ccccacgca	ctatgtgtct	7620
gagagcgacg	ctgncagcaag	tgtcaactcag	atcctctctta	gtcttaccat	cactcagctg	7680
ctgaagagggc	ttcaccagtg	gatcaacgag	gactgctcca	cgccatgctc	cggctcgtgg	7740
ctaagagatg	tttgggattg	gatatgcacg	gtgttgactg	atctcaagac	ctggctccag	7800
tccaagctcc	tggcgcgatt	ggcgggagtc	cccttcttct	catgtcaacg	tgggtacaag	7860
ggagtctggc	ggggcgacgg	catcatgcaa	accacctgcc	catgtggagc	acagatcacc	7920
ggacatgtga	aaaacggttc	catgaggatc	gtggggccta	ggacctgtag	taacacgtgg	7980
catggaacat	tccccattaa	cgcgtacacc	acgggcccct	gcacgcccct	cccgcgccca	8040
aattatttcta	gggcgctgtg	gcgggttggt	gctgaggagt	acgtcgaggt	tacgcgggtg	8100
ggggatttccc	actacgtgac	gggcatgacc	actgacaacg	taaagtgcgc	gtgtcagggt	8160
ccggcccccgc	aattcttca	agaagtggat	gggttgccgt	tgcacaggta	cgtccagcg	8220
tgcaaaccccc	tctacggga	ggaggtcaca	ttcttggtcg	ggctcaatca	atacctggtt	8280
gggtcacagc	tcccatgggg	gcccgaaccg	gacgtagcag	tgtctacttc	catgtccacc	8340
gacccctccc	acattacggc	ggagacggct	aagcgtaggc	tggccagggg	atctccccc	8400
tccttggcca	gctctcaagc	tagccagctg	tctgcgcctt	ccttgaaggc	aacatgcact	8460
accogtcagt	atccccgga	cgtgacctc	atcgaggcca	acctcctgtg	gcggcaggag	8520
atggggcgga	acatcacccg	cgtggagtca	gaaaataagg	tagtaatttt	ggactctttc	8580
gagccgctcc	aagcggagga	ggatgagagg	gaagtatccg	ttccggcgga	gatcctgcgg	8640
aggtccagga	aattccctcg	agcgtgccc	atatgggcac	gcccggatta	caaccctcca	8700
ctgttagagt	cctgggaagg	cccggaactac	gtccctccag	tgttacacgg	gtgtccattg	8760
ccgcctgcca	aggccctccc	gataccacct	ccacggaggg	agaggacggg	tgtcctgtca	8820
gaatctacgg	tgtcttctgc	cctggcggag	ctcgccacaa	agaccttcgg	cagctccgaa	8880
tcgtcgcccg	tcgacagcgg	cacgcaacg	gctctctctg	accagccctc	cgcgcagggc	8940
gacgcgggat	ccgagctaga	gtcgtactcc	tccatgcccc	cccttgaggg	ggagccgggg	9000
gatcccgatc	tcagcagcgg	gtcttggtct	accgtaagcg	aggaggctag	tgaggacgtc	9060
gtctgctgct	cgatgtccta	cacatggaca	ggcgccctga	tcacgccatg	cgtgcgggag	9120
gaaaccaagg	tgccccgcaa	tgcaactgagc	aactctttgc	tcctgcacca	caacttggtc	9180
tatgtacaaa	catctcgcag	cgcgaagcctg	cggcagaaga	aggtcacctt	tgacagactg	9240
caggtccctgg	acgaccacta	ccgggacgtg	ctcaaggaga	tgaaggcgaa	ggcgtccaca	9300
gttaaggcta	aacttctatc	cgtggaggaa	gctgttaagc	tgacgcccc	acattcgccc	9360
agatctaaat	ttggctatgg	ggcaaaggac	gtccggaaac	tatccagcaa	ggccgttaac	9420
cacatccgct	ccgtgtggaa	ggacttgctg	gaagacactg	agacaccaat	tgacaccacc	9480
atcatggcaa	aaaatgaggt	ttctgcgtc	caaccagaga	agggggggcg	caagccagct	9540
cgccttatcg	tattcccaga	tttgggggtt	cgtgtgtgcg	agaaaatggc	cctttacgat	9600
gtggtctcca	ccctccctca	ggcgtgatg	ggctcttcat	acggattcca	atactctctt	9660
ggacagcggg	tcgagttcct	ggtgaatgcc	tggaaagcga	agaaatgccc	tatgggcttc	9720
gcatatgaca	cccgctggtt	tgactcaacg	gtcactgaga	atgacatccg	tgttgaggag	9780
tcaatctacc	aatgttgtga	ccttgccccc	gaagccagac	aggccataag	gtcgtccaca	9840
gagcggcttt	acatcggggg	ccccctgact	aattctaaag	ggcagaactg	cggctatcgc	9900
cgggtgcggc	cgagcgggtg	actgacgacc	agctgcggta	ataccctcac	atgttatttg	9960
aaggccgctg	cggcctgtcg	agctgcgaag	ctccaggact	gcacgatgct	cgtatgcgga	10020
gacgaccttg	tcgttatctg	tgaagcgcg	gggacccaag	aggacgagcg	gagcctacgg	10080
gccttccagg	aggetatgac	tagatactct	gccccccctg	gggaccggcc	caaacagaa	10140
taagacttgg	agttgataac	atcatgctcc	tccaatgtgt	cagtccggca	cgatgcactc	10200
ggcaaaaggg	tgtactatct	cacccgtagc	cccaccaccc	cccttgccgg	ggctcgttgg	10260
gagacagcta	gacacactcc	agtcaattcc	tggctaggca	acatcatcat	gtatgcggcc	10320
accttgtggg	cctgatgact	catttcttct	ccatccttct	ccatccttct	agctcaggaa	10380
caacttgaaa	aagccctaga	ttgtcagatc	tacggggcct	gttactccat	tgagccactt	10440
gacctacctc	agatcattca	acgactccat	ggccttagcg	cattttcact	ccatagttac	10500
tctccaggtg	agatcaatag	ggtggetcca	tgcctcaggga	aacttggggt	accgcccctg	10560
cgagtctgga	gacatcgggc	cagaagtgtc	cgcgttaggc	tactgtccca	gggggggagg	10620
gctgccactt	gtggcaagta	cctcttcaac	tgggcagtaa	ggaccaagct	caactcact	10680
ccaatcccg	ctgcgtccca	gttggaatta	tccagctggg	tcgttgcctg	ttacagcggg	10740
ggagacatat	atcacagcct	gtctcgtgac	cgaccccgct	ggttcagtgt	gtgcctactc	10800
ctactttctg	taggggttagc	catctatcta	ctccccaacc	gatgaacggg	gagctaaaca	10860
ctccaggcca	ataggccate	ctgttttttt	cccttttttt	ttttcttttt	tttttttttt	10920
tttttttttt	tttttttttc	tccttttttt	ttctcttttt	tttccctttt	tttccctttg	10980
tggctccatc	ttagccctag	tcacggctag	ctgtgaaagg	tccgtgagcc	gcttgactgc	11040
agagagtgc	gatactggcc	tctctgcaga	tcaagt			11076

10

20

30

40

【0 1 4 4】

【外 2 5】

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 8
 gccagccccc gattgggggg gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tellacagca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag ttgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gctgataggg 300
 gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcagc aatcctaaac 360
 ctcaagaaa aacaaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggltc tccggcgctg tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtcg ctctgatccc gcctgttccc ggetgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccttga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccttggc cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
 ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatggc gcggtgcac acgcttgatc 780
 cggctacctg cctattcgac caccaaagca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tgggaagcgg gcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcacag 900
 ccgaactgtt cgcaggctcc aaggcgcgca tgcccagcgg caggatctc gtctgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttcc ggattcatcg 1020
 actgtggcgg gctgggtgtg gggagccgct atcaggacat agcgtgggtc acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcgcc gaatggctg accgcttccc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagtctctc tgagtttaaa 1200
 cagaccacaa cggtttccct ctagcgggat caattccgcc cctctccccc cccccccct 1260
 aacgtttactg gccgaagccg cttggaataa ggcggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcattc ctagggtctt tcccccctcc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
 gtgaaggaa gcttctctct ggaagcttct tgaagacaaa caacgctgt agcagccctt 1500
 tgcaggcagc ggaaccccc acctgcgac aggtgcctcc gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcaaaagg ggcacaaacc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 gaagaggtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcaccagaag 1680
 gtaccccatt gtatgggato tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tcgaggttaa aaacgtcta ggcccccga accacgggga cgtggctttc ctttgaaaaa 1800
 cagcataata ccatggcgcc tattacggcc tactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
 tgcacatca ccaaccac aggcgggac aggaaccaag tcgaggggga ggtccaaagt 1920
 gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acctgcgtca atggcgtgtg ttggactgtc 1980
 tatcatgttg ccggtcctaa gaccttgcc ggcctaaagg gcccaatcac ccaaatgtac 2040
 accaatgttg accaggacct cgtcggttgg caagcgcccc ccggggcgcg tctcttgaca 2100
 ccatgcacct cggcgagctc ttggtcacga ggccttgcca ggccttgcca tctcattccg 2160
 gtgcgcgggc gggcgagcag cagggggagc ctactctccc ccaggcccggt cctcacttgg 2220
 aagggtcttt cggcggttcc actgctctgc cctcgggggc acgctgtggg catcttctcg 2280
 gctgcggtgt gcaccgag ggttgcaag gcggtggaat ttgtaccggt cgagtctatg 2340
 gaaacaccta tgcggtcccc ggtcttcacg gacaactcgt cccctccggc cgtaccgcag 2400
 acattccagg tggcccatct acacgcccct actggtagcg gcaagagcac taagggtgcc 2460
 gctgcgtatg cagcccaagg gtataagggt cltgtcctga acccgtccgt ccgcgcacc 2520
 ctacgttttc gggcgatat gtctaaggca catggtatcg accctaact cagaatcggg 2580
 glaaggacca taccacggg tgcccccac acgtactcca cctatggcaa gtttcttggc 2640
 gacggtgtgt gctctgggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagt ccactcaact 2700
 gactcgacca ctatcctgg catcgacaca gtcttggaac aageggagac ggtggagcg 2760
 cgactcgtcg tgcctgcac cgtacgcct ccgggatcgg tcaccgtgcc acatccaaac 2820
 atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
 atcgagacca tcaagggggg gaggcacctc attttctgcc attccaagaa gaaatgtgat 2940
 gagctgcggc cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
 jatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcaltgtcg tagcaacgga cgtctaatg 3060
 acgggcttta ccggtgactt cgaactcagt atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
 gtcgacttca gectggaccc gacttccacc attgagacga cgaacgtgcc acaagacgg 3180
 gtgtcacgct cgcagcggcg aggcaggact ggtaggggca ggalgggcat ttacaggttt 3240
 gtgactccag gagaacggcc ctggggcatg ttcgattccc cggttctgtg cgaagtctat 3300
 gacgcgggct gtgcttggta cgagctcaay ccgcgcgaga cctcaagttag gttgcgggct 3360
 tacctaaaca caccagggtt gccggtctgc caggaccatc tggagttctg yagagcgte 3420
 tttacaggcc tcaaccacat agacgcccct ttcttqtccc agactaagca ggcaggagac 3480
 aacttcccc acctggtage ataccaggct aagggtgtgg ccagggtcca ggtccacct 3540

10

20

30

40

【0 1 4 5】

【外 2 6】

ccatcgtggg accaaatgtg gaagtggttc alacggctaa agcctacgct gcaaggcca 3600
 acgcccctgc tgtataggct gggagccgtt caaaacgagg ttactaacac aaccccata 3660
 accaaataca tcatggcctt catgtcggtt gacctggagg tgcacacag cactcggtg 3720
 ctggtagggc gagtcctagc agctctggcc gcgtattgcc tgacaacagg cagcgtggtc 3780
 attgtgggca ggtatcatct gtccggaaa cgggccatca ttcccgacag ggaagtctt 3840
 tacggggagt tcatcgagat ggaagagtgc gctcacacc tccctacat cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaant caaacagaag gcaatcgggt tgcgcgaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggtggaa tccaaagtgc ggaccatcga agcctctctg 4020
 gcgaagcata tgttgaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcacgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accaccacac ataccctcct gtttaacatc ctggggggat ggggtggccg ccaacttgct 4200
 cctccagcgg ctgctctctg ttctctaggg ccgggcctcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaaggctgt ttgtgatat ttggcaggtt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gcgctcgttg cctttaaggc catgagcggc gagatgcctt ccaccgagga cctggttaac 4380
 ctactcctct ctatcctctc cctcgccgcc ctagtctctg gggctcgtgc cgcagcgata 4440
 ctgcgtcggc acgtgggccc aggggagggg gcctgacagt ggtgaaccg gctgatagcg 4500
 ttgccttcgc ggggtaacca cgtctccccc acgcactatg tgcctgagag cgacgtgca 4560
 gcaacgtgca cctagatcct ctctagtctt accatcactc agctgctgaa gaggcttcac 4620
 cagtggatca acgaggaatg ctccacgcca tgcctcggtt cgtggctaag agatgtttgg 4680
 gattggatat gcacgctgtt qactgatttc aagacctggc tccagtcaca gctcctgccc 4740
 cgattgcggc gattccccct ctctcctatg caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gacggcatca tgcaaacacc ctgcccattg ggggcacaga tcacgggaca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggtatcgtgg gcttaggacc ttagtaaca cgtggcatgg aacatlcacc 4920
 attaacgcgt acaccacggg cccctgcacg cctccccgg cgccaaatta ttctagggcg 4980
 ctgtggcggg tggctgctga gtagtacgtg gaggttacgc gggctggggg tttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga cgcgttaaa tgcctgtgtc aggttccggc cccgaattc 5100
 ttacacagaag tggatggggg ggggttgca aggtacgtcc cagcgtgcaa accctccta 5160
 cgggaggagg tcacatctct ggtcgggctc aatcaatacc tgggttgggt acagctccca 5220
 tgcagcggc aaccggatgt agcagtgcct acttccatgc tcaccgaccc ctccacatt 5280
 acggcggaga cggctaagcg taggtcggcc aggggatctc ctccccctt ggccagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gcttccctg aaggcaacat gcactaccg tcatgactcc 5400
 ccggacgctg acctcatcga ggccaacctc ctgtggcggc aggagatggg cgggaacatc 5460
 acccgctgg agtcagaaaa taaggtagta attttgact ctctcgagcc gctcaagcg 5520
 gaggagatg agagggaagt atcgttccg gcggagatcc tgcggagggtc caggaaattc 5580
 cctcgagcga tgcctcatat gccacgccc gattacaacc ctccactgtt agagtccctg 5640
 aaggaccccg actacgtccc tccagtgtga cagggtgtc cattgcgccc tgccaaggcc 5700
 cctccgatac cacttccacg gaggaagagg acggttgtcc tglcagaatc taccgtgtct 5760
 totgctctgg ccgagctcgc cacagagacc ttccgcagct ccgaatcgtc ggccgtcgac 5820
 agcggcaagg caacggcctc tctgaccag cctccgacg acggcgacgc gggatccgac 5880
 gttgagtctg actctcccat gcccccttt gagggggagc cgggggatcc cgtctcagc 5940
 gacgggtctt ggtctacggt aagcggagg gctagtagg acgtcgtctg cgtctcgatg 6000
 tctacacat ggacaggcgc cctgatcag ccatgcctg cggaggaac caagctgcc 6060
 atcaatgcac tgagcaactc ttgtctcgt caaccacat tggctctatg tacaacatct 6120
 cgcagcgcaa gctcgggca gaagaaggte accttgaca gactgcagggt cctggacgac 6180
 cactacgggg acgtgctcaa ggaagtgaag gcgaaggcgt ccacagttaa ggctaaactt 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg ccccaacatt cggccagatc taaatttggc 6300
 tatggggcaa aggaagctcg gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat ccgctccgtg 6360
 tggaaggact tgcgtggaag cactgagaca ccaattgaca ccaccatcat ggcaaaaaat 6420
 gaggttttct gcgtccaaac agagaagggg ggcggcaagc cagctcgctt tatcgtatc 6480
 ccagatttgg gggttcgtgt gtgcgagaaa atggcccttt ctccacctc 6540
 cctcaggccg tgatgggctc ttcatacgga ttccaatact ctccggaca gcggtcgag 6600
 ttctcgttga atgctggaa agcgaagaaa tgcctatgg gcttcgcata tgacacccgc 6660
 tgttttgact caacggtcac tgagaatgac atcgtgttg aggagtcaat ctaccaatgt 6720
 tctgacttgg ccccggaagc cagacaggcc ataaggctcg tcacagagcg gctttacatc 6780
 gggggccccc tgactaattc taaggggcag aactgoggct atcgccggtg ccgcggagc 6840
 ggtgtactga cgaacagctg cggtaataac ctacatgtt acttgaaggc cgtgcccgc 6900
 tctcgagctg cgaagctcca ggaactgac atgctcgtat gcggagacga ccttgcgtt 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaagaggac gaggcgagcc tacgggctt caccgaggct 7020
 atgactagat actctgcccc cctggggac ccgcccacac cagaatacga cttggagttg 7080
 ataacatcat gctcctccaa tglcagtc ggcacgatg calctgycaa aagggtgtac 7140
 tatctcacc cgtgacccac cccccctt gcggggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actcagtc atctcgtgt aggcacate atcatgtat gcgccactt gtgggcaagg 7260
 atgatctga tgaotcattt cttctccatc cttctagctc aggaacaaact tgaaaaagcc 7320
 ctgattgtc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc caettgaact acctcagatc 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgcattt tcaotcata gttacctcc aggtgagatc 7440
 aatagggtg cttcatgctt caggaaactt ggggtaccgc ccttgcgagt ctggagacat 7500

10

20

30

40

【0 1 4 6】

【外 2 7】

```

cgggccagaa gtgtccgcgc taggetactg tcccaggggg ggaggggtgc cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat ccgggtgcg 7620
tcccagttgg atttatccag ctgggttcgtt gctgggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccgacc ccgctggttc atgtgggtgcc tactcctact ttctgtaggg 7740
gtaggcactc atctactccc caaccgatga acggggagct aaacaactcc ggccaatagg 7800
ccatcctgtt tttttccctt ttttttttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt tttttttcct ctttttttcc ttttttttcc ttgggtggct ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
tggcctctct gcagatcaag t 8001

```

【 0 1 4 7 】

【外 2 8 】

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 9
 gccagccccc gattggggggc gacactccac catagatcac tccccgtgga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgctct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaecggg gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgacggg tcttttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcca gtgcccggg aggtctcgla gaccgtgcac catgagcagc aatcctaaac 360
 ctcaagaaaa aacaaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggctc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtg ctctgalgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 540
 ttgtcaagtc cgaactgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccctggc cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcaggga lctcctgtca lctcaacttg 720
 ctccctgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcgctgcat acgcttgatc 780
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tggagccgg tcttgtcgat caggatgato tggacgaaga gcacagggg ctccgcgccg 900
 ccgaactggt ccgcaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg caggatctc gtcgtgacct 960
 atggcgatgc ctctgtgcc gccctgatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
 actgtggcgg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcgcc gaattggctg accgttctct cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgcatc gccctctatc gccctcttga cgaattcttc tgagtttaaa 1200
 cagacacaaa cggtttccct cttagcggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttactg gccgaagccg ctttgaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatat tgcgtcttt ttgcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg 1380
 acgagcattc ctaggggctc ttccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
 gtgaaggaa cagttctctt ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
 tgaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgctctc gcgcgcaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcaaggc gccacaaccc cagtgcacg ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 gaagagtc aatggctc ctcaagcga ttcaacaagg ggctgaagga tgccagaaag 1680
 gtacccatt gtatgggac tgaclgggg cctcgggtga catgctttac atgtgtttag 1740
 tcgaggttaa aaaacgtcta ggcgcccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
 cagcataata ccattgggac gaatcctaaa cctcaagaaa aaacacaaac taacacaaac 1860
 cgcgcgccac aggaagctaa gttcccgggc ggtggtcaga tctcgggtg agtttacctg 1920
 ttgcgcgcca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcggtc 1980
 caacctctg gaaggcgaca acctatcccc aaggtctgcc agcccgaggg tagggcctg 2040
 gctcagccg ggtacccctg gccctctat ggcaatgagg gcttgggtg gccaggatg 2100
 ctccgtgtac cccgtggctc tggccctagt tggggcccca cggaccccc gcgtaggctc 2160
 cgaatttgg gtaaggctcat cgataccctc acgtgcggct tcgcgatct catgggtac 2220
 attccgctc tgggcgcgcc cctagggggc gctgccaggg ccttggcgca tggcgtccg 2280
 gttctggag acggcgtgaa ctatgcaaca gggaaatctg ccggttgcct ctttctatc 2340
 ttcccttttg ctttctgtc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
 gtatccgag tgtaccatgt caccgaacga tgcctcaacg caagcattgt gtatgaggca 2460
 gcggacalga lcatgcatac ccccggtggt gtgcccgtg ttccggagaa caactcctc 2520
 cgtcgtggg tagcgtcac tcccagctc gcggccagga acgctagcgt cccactacg 2580
 acgatacgac gccatgtcga ttgtctcgt qggcggtgt cctctcgtc cgtatgtac 2640
 gtgggagatc tctgcggatc tgttttctc gtgcgccagc tgttcaact ctcgctcgc 2700
 cggcacgaga cagtacagga ctgcaattgc tcaatatat ccggccacgt gacaggtaac 2760
 cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacg cagccctagt ggtatcgag 2820
 ttaactccga tcccacaagc tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagctca 2880
 gcgggccttg cctactatcc catggtggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgta 2940
 ctcttttgcg cgttgacgg gggaaactat gtgacaggg ggaagatgg caaaaacac 3000
 ctccggatta cgtccctctt ttcaaccggg tcatcccgga aaatccagct tgtaaacac 3060
 aacggcagct gccacatcaa caggactgac ctgaactgca atgactccct caacactgg 3120
 ttccctgctg cgtgttcta cgtgcacaag ttcaactca cttgatgcc agagcgcat 3180
 gccagctgca gccccatcac cagggttggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
 tcacacagct cggaccagag gccattatgt tggcactac cccccggcc gtgcggtac 3300
 gtaccccgcg ccgaggtgt tggctcagtg tactgttca ccccaagccc tglcglgglg 3360
 qggagaccc accggttcgg cgtccctacg tacagttggg gggagaatga gacggacgt 3420
 ctgcttctta acaacacgg gcccgcccaa ttggctgtac atggatgaat 3480
 agcaactgggt tcaaccaagc gtgcgggggc ccccgltga acatcgggg gatcggcaat 3540

10

20

30

40

【0 1 4 8】

【外 2 9】

aaaacottga	cctgcccac	ggactgcttc	cggaagcacc	ccgaggccac	ttacaccaag	3600
tgtgggttcg	ggccttggtt	gacacccaga	tgettggctc	actacccata	caggcttttg	3660
cactacccct	gcactgtcaa	ccttaaccate	ttcaaagltta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
gagcacaggg	tcgaagccgc	atgcaattgg	actcagaggag	agcgttgtaa	cctggaggac	3780
agggacagat	cagagcltag	cccgtctgtg	ctgtctacaa	cggaaggcca	ggtattgccc	3840
lgltcccttca	ccacccctacc	ggctctgtcc	actggtttga	tcacatctca	tcagaacgic	3900
glggagctac	aataccctgta	cggatatagg	tcggcggttg	tctcctttgc	aatcaaatgg	3960
gagtatgtcc	tgttgcctct	ccttcttctg	gggaacgcgc	gcgtctgtgc	ctgcttgttg	4020
atgatgctgc	tgatagctca	agctgaggcc	gccttagaga	acctgggtgt	cctcaacgcg	4080
gcatecgtgg	ccggggcgca	tggpattctc	tccttctctg	tgttcttctg	tgtgccttg	4140
tacatcaagg	gcagggtggt	ccctggggcg	gcatacgccc	tctacggcgt	atggccgcta	4200
ctcctgctcc	tgcctggcgt	accaccacga	gcatacgcca	tggaccggga	gatggcagca	4260
tcgtgcggag	gcgcgggttt	cgtaggctcg	atactcttga	ccttgtcacc	gcactataag	4320
ctgttccctg	ctgagctcat	atggttggtta	caatatattta	tcaccagggc	cgaggcacac	4380
ttgcaagtgt	ggatccccc	cctcaacgtt	cgggggggcc	gcgatgcctg	catectctc	4440
acgtgcgcga	tcaccccaga	gctaattctt	accatcacca	aaatcttgct	cgccatactc	4500
ggtccactca	tggtgctcca	ggctggtata	accaaagtgc	cgtacttctg	gcgcgcacac	4560
ggcctcattc	gtgcattgcat	gctggtgcgc	aaggttgctg	ggggtcatta	tgtccaaatg	4620
gctctcatga	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgttt	atgaccatct	caccccaactg	4680
cgggactggg	cccacgcggg	cctacgagac	cttgcgggtg	caqltgagcc	cgctcgtctc	4740
tctgatattg	agaccaaggt	tatcaactgg	ggggcgagaca	ccgcggcggt	tggggacatc	4800
atcctggggg	tgcgcgtctc	cgcgcgcagg	ggggaggaga	tacatctggg	accggcagac	4860
agccttgaag	ggcagggggtg	gcgactcctc	gcgcctatta	cgccctactc	ccaacagacg	4920
cgaggccctac	ttggctgcat	catcactagc	ctcacaggcc	gggacaggaa	ccaggctcag	4980
ggggagggtca	aagtgggtctc	caccgcaca	caatcttctc	tgccgacctg	cgtcaatggc	5040
gtgtgttgga	ctgtctatca	tggtgcgggc	tcaaagaccc	ttgcggggcc	aaagggccca	5100
atcacccaaa	tgtacaccaa	tgtggaccag	gaactcgtcg	gctggcaagc	gccccccggg	5160
gcgcgttctc	tgacaccatg	caactgcggc	agctcggacc	tttacttggt	cacgaggcat	5220
gcgatgtca	ttccgggtgc	ccgcgggggc	gacagcaggg	ggagcctact	ctccccagg	5280
cccgctctct	acttgaaggg	ctcttcgggc	ggtccactgc	tctgccccct	ggggcacgct	5340
gtgggcatct	ttcgggctgc	cgttgccacc	cgagggggtg	cgaaggcggt	ggactttgta	5400
cccgctcgat	ctatggaaac	caactatgcg	tccccggtct	tcacgggaca	ctcgtcccc	5460
ccggccgtac	cgcagacatt	ccaggctggc	catctacacg	cccctactgg	tagcggcaag	5520
agcactaagg	tgccgctgct	gtatgcagcc	caagggtata	aggtgcttgt	cctgaacccg	5580
tcctgtcccg	ccacccctagg	tttcggggcg	tatatgtcta	aggcacatgg	tatcgacctt	5640
aacatcagaa	tcggggtaag	tggttgcctc	acgggtgccc	ccatcaogta	ctccacctat	5700
ggcaagtttc	ttgcggacgg	tggttgcctc	ggggggcgct	atgacatcat	aatatgtgat	5760
gagtgccact	caactgactc	gaccactatc	ctgggcatcg	gcacagctct	ggaccaagcg	5820
gagacggctg	gagcgcgact	cgtcgtgctc	gccaccgcta	cgcctccggg	atcggtoacc	5880
gtgcacatc	caaacatcga	ggaggtggct	ctgtccagca	ctggagaaat	ccccctttat	5940
ggcaagccca	tcccctatcga	gaccatcaag	ggggggaggc	acctcatttt	ctgcccattc	6000
aagaagaat	gtgatgagct	cgcgcggaag	ctgtccggcc	tccgactcaa	tgctgtagca	6060
tattaccggg	atccgtcata	ccaactagcg	ccaactagcg	gagacgtcat	tgtcgtagca	6120
acggacgctc	taatgacggg	ctttaccggg	gacttcgact	cagtgatcga	ctgcaataca	6180
tgtgtcacc	agacagtcca	cttcagccgt	gacccgacct	tcaccattga	gacgacgacc	6240
gtgcacaca	acgcggtgtc	acgcctcgag	cggcgaggca	ggactggtag	gggcaggatg	6300
ggcattttaca	ggtttgtgac	tccaggagaa	cggccctcgg	gcattgttga	ttcctcgggt	6360
ctgtgcgagt	gctatgacgc	gggctgtgct	tggtacgagc	tcacgcgcgc	cgagacctca	6420
gttaaggttg	gggcttacct	aaacacacca	gggttgcccg	tctgcaggga	ccatctggag	6480
ttctggggaga	gcgcttttcc	aggcctcacc	cacatagacg	ccattttctt	gtcccagact	6540
aagcaggcag	gagacaaact	cccctacctg	gtagcatacc	aggctaagg	gtgcgccagg	6600
gctcaggctc	caactccatc	gtgggaacaa	atgtggaagt	gtctcatacg	gctaaagcct	6660
acgctgcacg	ggccaaacgc	cctgttgtat	aggctgggag	ccgttcaaaa	cgaggttact	6720
accacacacc	ccataaccaa	atacatcatg	gcattgcatt	cggctgacct	ggaggtctgc	6780
acgagcacct	gggtgctggg	aggcggagtc	ctagcagctc	tgcccgcgta	ltgcclgaca	6840
acaggcagcg	tggtcattgt	gggcaggatc	atcttgtccg	gaaagccggc	catcattccc	6900
gacagggaag	tcctttaccg	ggagttcgat	gagatggaag	agtgccgctc	acacctccct	6960
tacatcgaac	agggaaatga	gctcgcgcga	caattcaaac	agaaggcaat	cgggttgctg	7020
caaacagcca	ccaagcaagc	ggaggtgctc	gctcccggtg	tggaaatcaa	gtggcggacc	7080
atcgaagcct	tctggggcga	gcatactgtg	aatctcatca	gcgggataca	atatttagca	7140
ggcctgttca	ctctgcctgg	caaccccgcg	ataggcatcac	tgatggcaat	ccacgcctct	7200
atcaccagcc	cgctcaccac	ccaacatacc	ctcctgttta	acatccclgg	gggahgggtg	7260
gcgcgccaac	ttgtcctctc	cagcgtgctc	ctcgtttctg	taggcgcggg	catcgtctga	7320
gcgctgtgtg	gcagcatagg	ccttgggaag	qlgcttcttg	atatctttgg	aggttatgga	7380
gcagggggtg	caggcgcgcl	cgttggccttt	aaggtcatga	gcggcgagat	gcctccacc	7440
gaggaccttg	ttaacctact	ccctgctatc	ctctcccttg	gcgcctagt	cgttgggggtc	7500

10

20

30

40

【0 1 4 9】

【外 3 0】

gtgtgcgcag cgatactgcg tcggcacgtg ggcccagggg agggggcgt gcagtggatg 7560
 aacogcgctga tagcgcttgc ttgcgggggt aaccacgtct ccccaacgca ctatgtgccl 7620
 gagagcgacg ctgcagcacg tgtcactcag atctctctta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagaggc ttccaccagt gatcaacgag gactgtctca cgcctatgctc cggctcgttg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcacg gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc lgccgcgatt gccgggagtc ccttcttctc catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc ggggcgacgg catcatgcaa accactgccc catgtggggc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaaoggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgttg 7980
 catggaacat tccccattaa cgcgtacacc acgggcccct gcacgcctc cccggcgcca 8040
 aattattteta gggcgctgtg gcgggtggt gctgaggagt acgtggaggt tacgggggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacgacg taaagtccc gtgtcaggtt 8160
 cccgcccccg aattcttcaa agaagtggat ggggtgcggg tgcaacaggta cgtccagcg 8220
 tgcaaaacccc tccacggga ggaggtcaca ttctgggtcg ggctcaatca atacctggtt 8280
 ggggtcacagc tcccatgcga gcccgaaacg gatgtagcag tgcctacttc catgtctacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcgtaggc tgccacgggg atctctccc 8400
 cctttggcca gctcatcagc tagccagctg tctgcgctt ccttgaaggc aacatgcat 8460
 acccgctcatg actccccgga cgtgacctc atcgaggcca acctcctgtg gcggcaggag 8520
 atggggcgga acatcacccg cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactctttc 8580
 gagccgctcc aagcggagga ggatgagagg gaagtatccg ttccggcgga gactcctg 8640
 aggtccagga aattccctcg accgactac gtcctccag gcccgatta caacctcca 8700
 ctgttagagt cctggaaggc cccggactac tgctccattg gtgtccattc 8760
 ccgctgcca aggcctccc gataccacct tcacggagga agaggacggg tgtcctgtca 8820
 gaactacccg tgtctctg cttggcggag ctgcacacag agaccttcgg cagctccgaa 8880
 tegtgcggcg tcgacagcg cccgcaacg gctctctctg accagccctc cgacgacggc 8940
 gacgcgggat ccgacgttga gtctactcc tccatgccc ccttgaggg ggagccggg 9000
 gatcccgatc tcagcgacg gtctcgtct acctgaagg aggaggtag tgaggcctg 9060
 gtctgtctgt cgatgtctc cacatggaca ggcgcctga tcacgccaat cgtgcggag 9120
 gaaaccaagc tgcccatcaa tgcaactgac aactctttgc tccgtccaca caacttggtc 9180
 tatgtacaaa catctcgag cgcaagcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 9240
 caggctcctg acgaccacta ccgggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gttaaaggcta aactctatc cgtggaggaa gctgtgaagc tgacgcccc acattcgcc 9360
 agatctaaat ttggctatgg ggcaaggac gtccggaacc tatccagcaa ggccgttaac 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggacttctg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt tttctcgctc caaccagaga aggggggccc caagccagct 9540
 cgccttatcg tattcccaga ttgggggtt cgtgtgtgcg agaaaatggc cctttacgat 9600
 gtgtctccca cctccctca ggcctgtatg gctcttcat acggtattca atactctct 9660
 ggacagcggg tcgagttcct ggtgaatgcc tggaaagcga agaatgccc tatgggcttc 9720
 gcatatgaca cccgctgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctacc aatgttgtga cttgcccccc gaagccagac aggcataaag gtcgtccaca 9840
 gagcggcttt acatcgggg cccctgaat aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgggtccgcg cgagcgtgt actgacgacc agctgcggtg atacccctac atgttaactg 9960
 aaggccgtg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 10020
 gacgaccttg tcttatctg tgaaagcgg gggacccaag aggaagaggc gagcctacgg 10080
 gccctcacgg aggtatgac tagatactct gccccccctg gggacccgcc caaaccagaa 10140
 tacgacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcggcca cgtatctct 10200
 ggcaaaaggg tgtactatct caccgtgac cccaccaccc ccttgcgcg ggtcgtgtg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgcc 10320
 acctgtggg caaggatgat cctgatgact cattcttct ccatccttct agctcaggaa 10380
 caacttgaaa aagccotaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 10440
 gacctacctc agatcattca acgactccat ggcttagcg cattttcact ccatagttac 10500
 tctccagggt agatcaatag ggtggcttca tgcccaagga aacttgggg accgcccctg 10560
 cagctctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgtaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgccactt gtggcaagta cctcttcaa tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
 ccaatcccgg ctgcgtccca gttggattta tccagctgg tegtgtctg ttacagcg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgc cgaccccgct ggttcattgt gtgcctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catctatcta ctcccaacc gatgaacgg gagctaaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgtttttt ccttttttt tttcttttt ttttttttt 10920
 ttttttttt ttttttttt tcttttttt tctcttttt tttcttttt tttcttttt 10980
 tggtccatc ttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagaqtgct gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

10

20

30

40

【0 1 5 0】

【外 3 1】

<210> 10
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 10
 gccagccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttatgatgag tgctgtgcag cctccaggac 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggtctg cggaaacggg gactacaccg gaattgcccag 180
 gacgacccgg tcccttcttg galcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 ggcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaacc 360
 ctcaaaagaaa aaccaaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcagggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggggc ccggttcttt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccttga atgaactgca ggacgaggca gcgcgctat 600
 cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcc cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 660
 gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 720
 ctcttgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcac acgcttgatc 780
 cggtacactg ccatttcgac caccaagcga aacatgcac cgagcgagca cglactcgga 840
 tgggaagccg tcttgtcgat caggatgac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgcag 900
 ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggatttcacg 1020
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 1080
 ttgctgaaga gcttggcgcc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
 ctcccgatcc gcagcgcatc gccctctatc gccctcttga cgagttcttc tgagttttaa 1200
 cagacacaaa cggcttccct ctaggggat caattocgcc cctctccctc cccccccct 1260
 aacgttactg cgcgaagccg cttggaataa ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatct tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
 acgagcattc ctagggtctt tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
 gtgaagggaag cagttctctc ggaagcttct tgaagacaaa caacgtctgt agcgacctt 1500
 tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgctctt gcggccaaaa gccacgtgta 1560
 taagatacac ctgcaaaggc ggcaacaacc cagtgcacgc ttgtgagttg gatagttgtg 1620
 gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaa 1680
 gtaccccatc gtatgggac tgatctgggg cctcggtgca catgctttac atgtgtttag 1740
 tcgaggttaa aaaacgtcta ggcccccgga accacgggga cgtgggtttc ctttgaaaaa 1800
 cacqataata ccatggcgcc tattaccggc tactcccaac agaagcgagg cctacttggc 1860
 tgcacatca ctagcctcac aggcggggac aggaaccagg tcgaggggga ggtccaagt 1920
 gtctccaccg caacacatc tttcctggcg acctgcgtca atggcggtgt ttggactgtc 1980
 tateatggtg ccggtcctaa gaccttgcc ggcccaagg gccaatcac ccaaagtata 2040
 accaatgtgg accaggacct cgtggctgg caagcgcccc ccggggcgcg ttccttgaca 2100
 ccatgcacct gggcagctc ggacctttac ttggtcagga ggcatgcga tgtcatccg 2160
 gtgcgcgggc gggcgagcag cagggggagc ctactctccc ccaggcccg tctactctg 2220
 aagggtctct cggcggtctc actgctctgc cctcggggc acgctgtggg catcttctg 2280
 gctgcggtgt gcaccgagg ggttggaag gcggtggact ttgtaccgcl cgagtctatg 2340
 ggaaccacta tgcggtcccc ggtcttcaag gacaactcgt cccctccggc cglaccgag 2400
 acattccagg tggcccatct acacgcccc actggtagcg gcaagagcac taaggtgccc 2460
 gctgcgtatg caggccaaag gtataaggta cttgtcctga acccgctcgt cgcgcacac 2520
 ctagggttct ggcggtatat gtctaaggca catggtatcg accctaacat cagaatccgg 2580
 gtaaggacca tcaccacggg tgcccccatc acgtactcca cctatggcaa gtttcttgcc 2640
 gacgggtggt gctctggggg cgcctatgac atcataatat gtgatgagt ccaactcaact 2700
 gactcgacca ctatcctggg catcgccaca gtctctggac aagcggagac ggctggagcg 2760
 cgactcgtcg tgetcgccac cgctacgcct ccgggatcgg tcaccggtgc acatccaaac 2820
 atcgaggagg tggctctgtc cagcactgga gaaatcccc tttatggcaa agccatcccc 2880
 atcgagacca tcaagggggg gaggcactc attttctgac attccaagaa gaaatgtgat 2940
 gagctcgccg cgaagctgtc cggcctcgga ctcaatgctg tagcatatta ccggggcctt 3000
 gatgtatccg tcataccaac tagcggagac gtcattgtcg tagcaacgga cgctctaatt 3060
 acgggcttta ccggcgactt cgactcagtg atcgactgca atacatgtgt caccagaca 3120
 gtgcacttca gctggagacc gaccttcacc attgagacga cgaccglccc acaagacgg 3180
 gctgcacgct cgcagcgccg aggcaggact ggtaggggca ggatggccal ttacaggtt 3240
 gctgactccag gagaacggcc ctccggcatg ttcgattcct cggttctgtg cgagtgcct 3300
 gacgcgggct gtgcttggtg cgaagcaccg ccgcgcgaga cctcagttag gttgcgggct 3360
 tacctaaaca caccaggtt gccctctgc caggaccatc tggagttctg ggagagcgtc 3420
 tttcagggcc taaccacat agacgcccat ttcttgctcc agactaagca ggcaggagac 3480
 aacttcccc acctggtagc ataccaggct acgggtgtgg ccagggtcga ggctccacct 3540

10

20

30

40

【0 1 5 1】

【外 3 2】

ccacgtggtg accaaatgtg gaagtgtctc atacggctaa agcctaagct gcacgggcca 3600
 acgccccctg Lgtataggt gggagccgtt caaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaataca tcatggcatg catgtcgggt gacctggagg tcttaccag acactgggtg 3720
 ctggtagggc gagtcctagc agctctggcc gogtattgac tgacacagag cagcgtggtc 3780
 attgtgggca ggaatcatct gtccggaaaag ccggccatca tcccgacag ggaagtcctt 3840
 tacgggaggt tcatgagat ggaagagtg gctcacacc tcccttacc cgaacaggga 3900
 atgcagctcg ccgaacaatt caaacagaag gcaatcgggt tcttgcaaac agccaccaag 3960
 caagcggagg ctgctgctcc cgtggtggaa tccaaagtgc ggaccatoga agccttcttg 4020
 gccaagcata tgggaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaacc ccgcgatagc atcactgatg gcattcacag cctctatcac cagcccgctc 4140
 accacccaac ataccctcct gtttaacatc ctggggcgat gggtggcgcc ccaacttgct 4200
 cctccacggc ctgcttctgc tttcgtaggc gccggcatcg ctggagcggc tgttggcagc 4260
 ataggccttg ggaaggtgt tgtgatatatt ttggcagggt atggagcagg ggtggcaggc 4320
 gcgctcgttg cctttaaggc catgagcggc gagttgccct ccacggagga cctggttaac 4380
 ctactccctg ctactcctct ccctggcgcc ctagtctgct gggtcgtgtg ccgagcgata 4440
 ctgctcggc acgtgggccc aggggagggg gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg 4500
 ttctgtccgc ggtgtaacca cgtctccccc acgcactalg tgcctgagag cgcgctgca 4560
 gcacgagtc ctcagatctt ctctagtctt accatcactc agctgtgaa gaggtctcac 4620
 cagtggatca acgaggactg ctccacggca tctcgggt cgtggctaag agatgttttg 4680
 gattggatat gcaagggtgt gactgatttc aagacctggc tccagtccaa gctcctgccc 4740
 cgattgcctg ggaaggtgt cttctcatgt caacgtgggt acaaggaggt ctggcggggc 4800
 gacggcatca tgcacacac ctgcccctgt ggagcacaga tcccggaaca tgtgaaaaac 4860
 ggttccatga ggaatcgtgg gcctaggacc tgtagtaaca cgtggcatgg aacattcccc 4920
 attaacgcgt acaccacggg ccctgcacg ccctcccgcg cgcacaaatta ttctaggcg 4980
 ctgtggcggt taggtctgta ggagtacgtg gaggttacgc gggtggggga ttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga caacgtaaag tgcctgtgtc aggttccggc ccccgaaatt 5100
 ttacagaaag tggatggggt gcggttgcac aggtacgctc cagcgtgcaa acccctccta 5160
 cgggaggagg tcaatctct agcagtgtct aatcaatacc tgggtgggtc acagctccca 5220
 tgcgagcctg aaccggatgt acttccatgc taccggacc ccccccctt cccacatt 5280
 acggcggaga cggctaagcg taggctggcc aggggatctc cccccctt gcacagctca 5340
 tcagctagcc agctgtctgc gccttccctt aaggcaacat gcaactaccg tcatgactcc 5400
 ccggacgtg acctcactga ggccaaacct ctgtggcggc agggagatgg cgggaacatc 5460
 acccgcgtg agtcagaaaa taaggtagta attttgact ctttcgagcc gctccaagcg 5520
 gaggaggatg agaggggagt atccgttccg gcggagatcc tgcggaggte caggaaattc 5580
 cctcgagcga tgcctatag ggcacgccc cacttggtta ctttcgagcc aggttcctgg 5640
 aaggaccgg cactcctccc gaggaagagg gattacaacc ctttcgagcc aggttcctgg 5700
 cctccgatac cactcctccc gaggaagagg tccagtggtt tgctcagaatc 5760
 totgcttggt cggagctcgc cactagagacc ttccgagct ccgaatctgc 5820
 agcggcacgg caacggcctc tctgaccag ccctccgagc agggcgacgc 5880
 gttgagctgt acctcctccg gcccctcctt gagggggagc cgggggatcc 5940
 gacgggtctt ggtctacgtt aagcggagg agctcgtctg cgtcgtgatg 6000
 tctacacat ggacaggcgc cctgatacag ccctcgtctg cggaggaaac caagctgccc 6060
 atcaatgcac tgaccaactc tttgctcctt caccacaact tggctctatg 6120
 cgcagcga cactcctccc gaagaaggta acctttgaca gactgcaggt cctggagcag 6180
 cactaccggg acgtgctcaa ggagatgaag gccaaggcgt ccacagttaa ggctaaactt 6240
 ctatccgttg aggaagcctg taagctgacg ccccacatt cggccagatc 6300
 tatggggcaa aggaagctcg gaacctatcc agcaaggcgg ttaaccacat 6360
 tgggaaggct tgcgtgaaga cactgagaca ccaattgaca ccacatcat 6420
 gaggtttct cgttccaacc agagaagggg ggcggcaagc cagctcgcct 6480
 ccagatttg ggttctgtgt gtgcgagaaa atggcccttt acgatgtggt 6540
 cctcaggcgg tgatgggtc ttcatcggga ttccaatact ctctggaca 6600
 ttcttggtga atgcttgaa agcgaagaaa tgcctatgg gtttcgata 6660
 tgttttgact caacggctac tgagaatgac atccgtgttg aggagtcaat 6720
 tgtgacttg ccccggaagc cagacaggcc ataaggctgc tcacagagcg 6780
 gggggccccc tgactaatc taaagggcag aactgcggct atcgccgtg 6840
 ggtgtactga cgaacagct cgttaatacc ctacatggtt acttgaaggc cgtcggggc 6900
 tgtcagctg cgaagctcca ggaactgac atgctcgtat gcggagacga 6960
 atctgtgaaa gcgcggggac ccaaggagac gaggcgagc tacgggctt 7020
 atgactagat actctgcccc ccclggggac ccgccaacag cagaatacga 7080
 ataacatcat gctcctccaa tqtgtcagtc gcgcacgat catctggcaa aagggtgtac 7140
 tatctcacc gtgacccac cccccctt gcggggctg cgtgggagac agctagacac 7200
 actccagtc attcctggct aggcacatc atcatgtat cgcacactt gtgggcaagg 7260
 atgactctga tgaactcatt cttctccatc cttctagctc aggaacaact tgaaaaagcc 7320
 ctgattgtc agatctacgg ggcctgttac tccattgagc cacttgacct acctcagac 7380
 attcaacgac tccatggcct tagcgtattt tcaactcata gttactctcc aggtgagac 7440
 aatagggtgg cttcatgct caggaaactt ggggtacgc ccttgcaggt ctggagacat 7500

10

20

30

40

【0 1 5 2】

【外 3 3】

```

cgggccagaa gtgtccgccc taggtactg tcccaggggg ggagggtgc cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaal cccggtgcy 7620
tcccagttgg atttatccag ctggttcggt gctggttaca gggggggaga catatatca 7680
agcctgtctc gtgcccgaac ccgctgggtc atgtgggccc tactcctact ttctgtaggg 7740
gtaggcctct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatcctggt tttttccctt tttttttttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt tttttttcct ctttttttcc ttttttttcc tttggtggct ccactctagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaagggtccg gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
tggcctctct gcagatcaag t 8001

```

【 0 1 5 3 】

【 外 3 4 】

<210> 11
 <211> 11075
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 11

```

gccagccccc gattgggggg gacactccac calagatcac tccccgtgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc ggagagagca tagtggtctg cggaaacggg gactacaccc gaattggccag 180
gacgacccgg tccctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgccccc 240
gcgagactgc tagccagata gtgttggttc ccgaaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgoga gtgccccggg aggtctctga gaccgtgcac catgagcagc aatcctaaac 360
ctcaaaagaa aaccaaactg aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 420
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggcatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
caatcggtcg ctctgalgac gcctgttctc ggtgtcagc gcaggggggc ccggtttctt 540
ttgtcaagac ccacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcgcctat 600
cgtggtgggc cagcaggggc gttcccttgc cagctgtgct cgaactgttc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgctattg cgggaagtgc cggggcagga tctctgtca tctcaccctg 720
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 780
cggclactcg cccattcgac caccaaagca aacatgcgat cgaagcagca cgtactcggg 840
tggaagccgg tcttgcctga caggatgac tggacgaaga gcacaggggg ctgcgcgcag 900
ccgaactggt cgcacggctc aaggcgcgca tgcgcgacgg cgaagatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgcttgcgg aatatactgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 1020
actgtggcgg gctgggtgtg cgggaacgct atcaggacat agecgtggct acccgtgata 1080
ttgtctgaaga gcttggcgcc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcagcgatc gcttctctat gccttcttga cgaactcttc tgagtttaaa 1200
cagaccacaa cggtttccctc cttagcggat caattccgcc cctctccctc cccccccct 1260
aacgttactg taggaagccg cttaggaataa ggcggtgtg cgttctgcta tatgttattt 1320
tccaccatat tgcgctcttt tggcaatgtg agggcccgga aacctggccc tgtctctctg 1380
acgagcattc ctaggggctc tccccctctc gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc 1440
gtgaagggaag cagttctctc ggaagcttct tgaagacaaa caactgttgt agcgaccctt 1500
tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta 1560
taagatacac ctgcaaaagg gcacaaaccc cagtgcacag ttgtgagttg gatagttgtg 1620
gtaccccaatc aatggctctc ctcaagcgta ttcaacaagg gcttgaagga tgcacagaag 1680
tcgaggttaa aaaacgtcta ggcaccccgga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa 1800
cagcataata ccatgggcac gaatcctaaa cctcaaaaga aaaccaaacc taacaccaac 1860
cgcgcgcac aggaagtcac gttcccgggc ggtggtcaga tctcgggtg agtttacctg 1920
ttgcgcgcga ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgaagcgtcg 1980
caacccctgt gaaggcgaca acctatcccc aaggtcgcgc agcccgaggg tagggcctg 2040
gctcagcccg ggtacccctg gccctcttat ggcaatgagg gcttgggggt ggcaggatgg 2100
ctcctgtcac ccctgggctc tgggcttagt tggggcccca cggacccccg gcgtaggtcg 2160
cgaatcttgg gtaaggctat cgtatccctc acgtgcggct tgcgcgatct catggggtac 2220
attccgctcg tggcgcccc cctagggggc gctgccaggg ccttggcgca tggcgcccg 2280
gttcttgagg acggcgtgaa ctatgcaaca gggaatctgc ccggttgcct cttttctatc 2340
ttccttttgg ctctgtgtgc ctgtttgacc atcccagctt ccgcttatga agtgcgcaac 2400
gtatccggag tgtaccatgt cagcaacgac tgcctcaacg caagcattgt gtaggagga 2460
gcggacatga tcatgcatac ccccggtgac gtgccttgcg ttccggagaa caactcctc 2520
cgtgctgtgg tagcgtcac tcccacgtcc gcggccagga acgctagcgt ccccaactac 2580
acgatacagc gccatgtcga tttgtctgtl gtgcgccagc tgttccactt ctcgcctcgc 2640
gtgggagatc tctgcggatc tgttttctcc ctgcacagga cgggccacgt gacaggtcac 2700
cggcacgaga caglacagga ctgcaattgc tcaatatata ccggccacgt gacaggtcac 2760
cgtatggctt gggatatgat gatgaactgg tcaactacag cagccctagt ggtatcgag 2820
ttactccgga tcccaacaag tgtcgtggat atggtggcgg gggccattg gggagtccca 2880
gcgggccttg cctactatc catggtgggg aactgggcta aggttctgat tgtgatgta 2940
ctcttggcgg gcgttgacgg gggaaacctat gtgacagggg ggacgatggc caaaaacacc 3000
cccggtatla cgtccctctt ttcacccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaaacac 3060
aacggcagct ggcacatcaa caggactgcc ctgaaactgca atgaactcct caacactggg 3120
ttcctgtgtg cgtgttctca cgtgcacaaq ttcaactcat ctggatgccc agagcgcatg 3180
gccagctgca gccccatcga ccgcttctgt caggggtggg ggcccatcac ttacaatgag 3240
tcacacagct cggaccagag gccctattgt tggcactacg cccccgggc gtgcggtatc 3300
gtaccccgcg ccgaggtgag tggtecagtg tactgttcca ccccaagccc tgtcgtggtg 3360
gggacgacgg accggttcgg cgtccctacg tacagtggg gggagaatga gacggacgtg 3420
ctgcttctla acaaacggcg gcgcgcgcaa ggcactggt ttggctgtac atggatgaat 3480
agcaactggg tcaccaagac gtggcggggc cccccgtgta acatcggggg gatcggcaat 3540

```

10

20

30

40

【0 1 5 4】

【外 3 5】

```

aaaacottga cctgccccac ggacigtctt cggaagcacc ccgaggccac ttacaccaag 3630
tgttggttcg ggcttgggtl gacaccaga tgcttgggtc actaccata caggctttgg 3660
cactaccccl gcactgtcaa ctttaccatc ttcaaaggtta ggatgtactt ggggggagtg 3720
gagcaacagg ccgaagccgc atgcaatttg actcgaggag agcgttataa cctggaggac 3730
agggacagat cagagcttag ccgctgcclg ctgtctacaa cggagtggca ggtattgccc 3840
tgttccctca ccacccatac ggctctgtcc actggtttga tccatctoca tcagaacgtc 3930
gtggacgtac aatacctgta cggtataggg tcggcggttg tctcctttgc aatcaaatgg 3960
gaglatgtcc tgttgctctt ccttctcttg gcggaacggc gcgtctgtgc ctgcttgttg 4020
atgatgtgtc tgatagctca agctgagggc gccctagaga acctgggtgtt gcttctcttg 4140
gcatacgttg ccggggcgca tggcattctc tcttctcttg gcatactgcc tctacggcgt 4230
tacctcaagg gcaggctggt ccctggggcg gcatactgcc tggaccggga gatgggagca 4260
ctcctgtctc tgcctggcgtt accaccacga gcatacggca ccttgtcacc gcaactataag 4320
tcgtgcggag gcgcgggttt cgtaggtctg atggttggtt caatatctta tcaccagggc cgaggccacac 4380
ctgttctctg cttaggtctc cctcaacgtt cgttggtctg aaggttcttg ggggtcttta ggtccaaatg 4420
ttgcaagtgt ggaaccccca gctaactctt acctacacca aaatcttctt cggcctaactc 4500
acgtgcggca ggtccactca tgggtctcca ggtctgtata acctaaagtc cgtactctgt ggcgcacac 4560
gggtccactc ggtcactgat ggtcactgat actgacaggt acgtactgtt atgacctctt cagttgagcc 4620
cggtctctga agtggcgccg cctacagagc cttgctgttg ccgctggcgt tggggacatc 4680
cgggactggg agaccaaggt agcccgaggt gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860
atcttggggc tgcctgtctc ggcactcttc cgcctcttta cggcctactc ccaacagacg 4920
agccttgaag ggcaggggtg cgtactcttc catcactagc ctacacggcc gggacaggaa ccaggctcag 4980
cgaggcctac tggctgtctc aagtgtgtct cactctcttc caatcttctc tggcgacctg cgtcaatggc 5040
ggggaaggtc ctgtctatca tgggtgcggc gacctcgtcg gctggcaagc gcccccggg 5100
gtgtgttggg atcacacca tgtggaccag agctctggac tttacttggg cagcaggcat 5220
atcacccaaa ggccttctct ttcgggtgag ccggcggggc gacagcaggg ggagcctact ctccccagg 5280
gcgatgtca ttcgggtgag acttgaaggg ctcttcgggc ggtccactgc tctgccccctc ggggcacgt 5340
ccgctctctt ctggggtgag cgtgtgcacc cactatgcgg tccccgggtc tcacggacaa ctgcctccct 5400
gtgggcatct ctatgggtgc ccagggtggc catctacacg caagggtata aggtgcttgt 5460
ccgctcaggt ctatgggtgc ccagggtggc catctacacg caagggtata aggtgcttgt 5520
ccggcctgac tgcgggtgag ttcggggcgg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5580
agcactaagg tgcgggtgag ttcggggcgg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5640
tccgtgcggc caaccctagg ttcggggcgg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5700
aacatcagaa tccgggtgag ttcggggcgg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5760
ggcaagtttc tlgccagcgg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5820
gagtgccact caactgactc gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5880
gagacggctg gagcggactc gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 5940
gtgcccactc caaacatgca gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 6000
ggcaagcaca tccccatgca gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 6060
aagaagaaat gtgatgagct atcggctata gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 6120
tattacgggg gcttgcgtgt taatgacggg ctttaccggc gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 6180
acggacgctc agacagtcga cttcagcctg gacctacacc acgggtgccc aggtgcttgt 6240
tgtgtccacc acggcgtgtc acggcgtgtc tccaggagaa cggcctcggg tggtacgagc 6300
gtgcccacaa ggtttgtgac tccaggagaa cggcctcggg tggtacgagc 6360
ggcaatllaca cgtctgcagc gggctgtgct aagctacggc tctgcccagg tctgcccagg 6420
cgtctgcagc gggcttaact aggctcacc cccctacctg gtgggaccaa atgtggaagt 6480
gttaggttgc ggtcttttac aggctcacc cccctacctg gtgggaccaa atgtggaagt 6540
ttctgggaga ggtcttttac aggctcacc cccctacctg gtgggaccaa atgtggaagt 6600
aagcaggcag gacacacactt gctcaggtc cctgctgtat atacatcatg gcatgcatgt 6660
gctcaggtc cctcaggtc cctgctgtat atacatcatg gcatgcatgt 6720
acgctgcacg ccataaccaa atacatcatg gcatgcatgt 6780
accacacacc ggggtgctgt aggcggagtc gcatgcatgt 6840
acaggcagcg tggctcattgt gggcaggatc atcttctctg gagatggaag 6900
gacagggaag tcttcttaac ggtctctgag gctcggcgaa gctcggcgaa 6960
tacctcgaac aggaatgca ggtggtgct gcatatgtgg aatttcatca 7020
caaacagcca ccaagcaagc gcatatgtgg aatttcatca 7080
atcgaagcct tctgggcgaa atagcatcac ctcctgttta 7140
ggcttctcga cgtcaccac caaacatcac ctcctgttta 7200
atcaccagcc tctgctctcc cagcgtgct tctgctctcc 7260
gcggcccaac tctgctctcc cagcgtgct tctgctctcc 7320
gcgggtgttg gacgcatagg ccttgggaag gtgcttgttg 7380
gcagggttg caggcgcgtc cgtggccttt aaggtcatga 7440
gaggacctgg tlaacctact ccttgcctat ccttgcctat 7500

```

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

gtgtgcgcag cgatactgcg tccgacgctg gggccagggg agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccggctga tagcgttcgc ttccgggggt aaccacgtct ccccccacga ctatgtgcct 7620
 gagagcgacg ctgcagcacg agtcactcag atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagagggc ttaccacgtg gatcaacgag gactgtctca cgcctatgctc cggctcgtgg 7740
 ctaagagatg tttgggattg gatatgcacg gtgttgactg atttcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc tgccgcgatt gccgggagtc ccttcttctc catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc ggggcgacgg catcatgcaa accacctgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggccta ggacctgtag taacacgtgg 7980
 catggaacat tccccattaa cgcgtacacc acggggccct gcacgcctc ccggcgcca 8040
 aattattcta gggcgctgtg gccggtaggt gctgaggagt acgtggaggt tacgggggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaacg taaagtgcc gtgtcagggt 8160
 ccggcccccg aattcttccac agaagtggat ggggtgcggt tgcacaggta cgtccagcg 8220
 tgcaaacccc tctacggga ggaggtcaca ttctgtgtcg ggtcfaatca atacctgtt 8280
 gggtcacagc tcccatcgga gctgaaccg gatgtagcag tgctcacttc catgtcacc 8340
 gacccctccc acattacggc ggagacggct aagcgtaggc tggccagggg atctccccc 8400
 ccttggcca gctcatcagc tagccagctg tctgcgctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 accgtcatg actccccgga cgtgacctc atcgaggcca acctcctgtg cggcgaggag 8520
 atggcgggga acatcacccg cgtggagtca gaaaataagg tagtaatttt ggactcttct 8580
 gagccgctcc aagcggagga ggaatgaggg ggaatctccg ttccggcgga gatctgcgg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtgccc atatgggac gcccgatta caaccctcca 8700
 ctgttagagt cctggaagga ccgggactac gtccctccag tggtaacag gtgtccattg 8760
 ccgcttccca agggccctcc gataccacct tcacggagga agaggacgggt tgtctgttca 8820
 gaatctaccg tgtcttctgc ctggcgagag ctgcgcacag agaccttcgg cagctccgaa 8880
 tctgcggcgg tgcacagcgg cagggcaacg gcctctctcg accagccctc cgacgacggc 8940
 gagcggggat ccgagcttga tctgtactcc tccatgcccc ccttggaggg ggagccgggg 9000
 gatccccgac tcagcgacgg gtcttgggtct accgtaagcg agggagctag tgaggacgtc 9060
 gtctgtctgt cgtatgtcta cacatggaca ggccgcttga tcacgccaatg cgtcgcggag 9120
 gaaaccaagc tgcccatcaa tgcactgagc aactctttgc tccgtacca caacttggtc 9180
 tatgtacaa catctgcag cgcaaacctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg 9240
 caggtctctg acagaccaata ccgggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gttaaagcta aacttctatc cgtggaggaa gcctgtaagc tgacgcccc acattcgcc 9360
 agatctaaat ttggtatagg ggcaaggac gtccggaacc tatccagcaa ggcggttaac 9420
 cacatccgct ccgtgtggaa ggaactgtct gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaa aaaatgaggt ttctgcgtc caaccagaga agggggcgcg caagccagct 9540
 cgcttctatc tattccacga tttgggggtt cgtgtgtgct agaaaaatgc cctttacgat 9600
 gtggtctcca cctccctca ggcgctgatg ggtcttctat accgattcca atactctct 9660
 ggacagcggg tcgagttcct gtgaaagcga agaaatgcc tatgggcttc 9720
 gcatatgaca ccgctgtttt tgactcaacg gtcaactgaga atgacatccg tgttgaggag 9780
 tcaatctacc aatgttgtaga cttggcccc gaagccagac aggcataag gtcttcaca 9840
 gagcggcttt acatcggggg cccctgact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgtgcccggc cgagcgtgtg actgacgacc agctgcggta ataccctcac atgttacttg 9960
 aaggccgctg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgatgct cgtatgcgga 10020
 gacgaccttg tctttatctg tgaagcgcg gggacccaag aggcagggc gagcctacgg 10080
 gccttcacgg aggtatgac tagatactct gccccccctg gggacccgccc caaacagaa 10140
 tacgacttgg agttgataac atcatgctcc tccaatgtgt cagtcgcgca cgtatcatct 10200
 ggcaaaaggg tgtactatct caccctgtac cccaccaccc ccttgcgctg ggtcgcgtgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc 10320
 accttgtggg caaggatgat cctgatgact catctcttct ccatccttct agctcaggaa 10380
 caacttgaag aagccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgagccactt 10440
 gacctaactc agatcattca cgcactccat ggccttagcg catcttact ccatagttac 10500
 tctccagggt agatcaatag ggtggcttca tgccctcagga aacttgggtt accgcccctg 10560
 cgagtctgga gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgccactt gtggcaagta cctcttcaac tgggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
 ccaatcccggt ctgcgtccca gttggattta tccagctgggt tctgttctgg ttacagcggg 10740
 ggagacatat atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgct ggttcatgtg gtgcctactc 10800
 ctactttctg taggggtagg catotatcta ctccccaaac gatgaacggg gagctaaaca 10860
 ctccaggcca ataggccatc ctgttttttt cctttttttt ttttcttttt tttttttttt 10920
 tttttttttt tttttttttt tctttttttt ttctcttttt ttctcttttt ttctcttttt 10980
 tggctccatc ttgcccctag tcaaggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
 agagagtgtc gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

10

20

30

<210> 12
 <211> 3010
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 12

```

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1           5           10           15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20           25           30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35           40           45
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
 50           55           60
Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly
 65           70           75
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
 85           90           95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100          105          110
Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115          120          125
Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
130          135          140
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145          150          155          160
Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165          170          175
Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr
180          185          190
Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
195          200          205
Asn Ala Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
210          215          220
Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val
225          230          235          240
Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr
245          250          255

```

10

20

30

Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys
 260 265 270
 Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ala
 275 280 285
 Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
 290 295 300
 Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp
 305 310 315 320
 Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ser Gln
 325 330 335
 Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
 340 345 350
 Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
 355 360 365
 Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly Gly
 370 375 380
 Thr Tyr Val Thr Gly Gly Thr Met Ala Lys Asn Thr Leu Gly Ile Thr
 385 390 395 400
 Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
 405 410 415
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
 420 425 430
 Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val His Lys Phe Asn
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Ser Pro Ile Asp Ala
 450 455 460
 Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Asn Glu Ser His Ser Ser
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
 485 490 495
 Val Pro Ala Ala Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525
 Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr Arg Pro
 530 535 540

10

20

30

Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 545 550 555 560
 Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ile Gly Asn
 565 570 575
 Lys Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 580 585 590
 Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu
 595 600 605
 Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
 610 615 620
 Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635 640
 Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu Asp
 645 650 655
 Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
 660 665 670
 Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
 675 680 685
 Leu Ile His Leu His Gln Asn Val Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
 690 695 700
 Ile Gly Ser Ala Val Val Ser Phe Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
 705 710 715 720
 Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys Leu Trp
 725 730 735
 Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
 740 745 750
 Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Ala His Gly Ile Leu Ser Phe
 755 760 765
 Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro
 770 775 780
 Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 785 790 795 800
 Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Asp Arg Glu Met Ala Ala
 805 810 815
 Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Val Gly Leu Ile Leu Leu Thr Leu Ser
 820 825 830

10

20

30

Pro His Tyr Lys Leu Phe Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr
 835 840 845
 Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu
 850 855 860
 Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Thr Cys Ala Ile
 865 870 875 880
 His Pro Glu Leu Ile Phe Thr Ile Thr Lys Ile Leu Leu Ala Ile Leu
 885 890 895
 Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 Val Arg Ala His Gly Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Val
 915 920 925
 Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Leu Met Lys Leu Ala Ala Leu
 930 935 940
 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955 960
 His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 965 970 975
 Ser Asp Met Glu Thr Lys Val Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 980 985 990
 Cys Gly Asp Ile Ile Leu Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
 995 1000 1005
 Glu Ile His Leu Gly Pro Ala Asp Ser Leu Glu Gly Gln Gly Trp Arg
 1010 1015 1020
 Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu
 1025 1030 1035 1040
 Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Arg Asn Gln Val Glu
 1045 1050 1055
 Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr
 1060 1065 1070
 Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys
 1075 1080 1085
 Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val
 1090 1095 1100
 Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu
 1105 1110 1115 1120

10

20

30

Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His
 1125 1130 1135
 Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu
 1140 1145 1150
 Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro
 1155 1160 1165
 Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val
 1170 1175 1180
 Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser
 1185 1190 1195 1200
 Met Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro
 1205 1210 1215
 Pro Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr
 1220 1225 1230
 Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly
 1235 1240 1245
 Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe
 1250 1255 1260
 Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr
 1285 1290 1295
 Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile
 1300 1305 1310
 Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly
 1315 1320 1325
 Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val
 1330 1335 1340
 Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro
 1345 1350 1355 1360
 Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Lys Ala Ile Pro Ile Glu Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile
 1380 1385 1390
 Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser
 1395 1400 1405

10

20

30

Gly Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser
 1410 1415 1420
 Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Ile Val Val Ala Thr Asp Ala Leu
 1425 1430 1435 1440
 Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
 1445 1450 1455
 Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
 1460 1465 1470
 Glu Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg
 1475 1480 1485
 Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Met Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro
 1490 1495 1500
 Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys
 1505 1510 1515 1520
 Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Ser
 1525 1530 1535
 Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln
 1540 1545 1550
 Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
 1555 1560 1565
 Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro
 1570 1575 1580
 Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro
 1585 1590 1595 1600
 Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro
 1605 1610 1615
 Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln
 1620 1625 1630
 Asn Glu Val Thr Thr Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys
 1635 1640 1645
 Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly
 1650 1655 1660
 Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val
 1665 1670 1675 1680
 Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro
 1685 1690 1695

10

20

30

Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala
 1700 1705 1710
 Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe
 1715 1720 1725
 Lys Gln Lys Ala Ile Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu
 1730 1735 1740
 Ala Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Thr Leu Glu Ala Phe
 1745 1750 1755 1760
 Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala
 1765 1770 1775
 Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala
 1780 1785 1790
 Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln His Thr Leu Leu
 1795 1800 1805
 Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser
 1810 1815 1820
 Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly
 1825 1830 1835 1840
 Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly
 1845 1850 1855
 Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu
 1860 1865 1870
 Met Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser
 1875 1880 1885
 Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg
 1890 1895 1900
 His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile
 1905 1910 1915 1920
 Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
 1925 1930 1935
 Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr
 1940 1945 1950
 Ile Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys
 1955 1960 1965
 Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile
 1970 1975 1980

10

20

30

Cys Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu
 1985 1990 1995 2000
 Pro Arg Leu Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys
 2005 2010 2015
 Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly
 2020 2025 2030
 Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly
 2035 2040 2045
 Pro Arg Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala
 2050 2055 2060
 Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg
 2065 2070 2075 2080
 Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val
 2085 2090 2095
 Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys
 2100 2105 2110
 Pro Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val
 2115 2120 2125
 Arg Leu His Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
 2130 2135 2140
 Val Thr Phe Leu Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu
 2145 2150 2155 2160
 Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
 2165 2170 2175
 Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg
 2180 2185 2190
 Gly Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
 2195 2200 2205
 Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr Arg His Asp Ser Pro Asp Ala
 2210 2215 2220
 Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
 2225 2230 2235 2240
 Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
 2245 2250 2255
 Glu Pro Leu Gln Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala
 2260 2265 2270

10

20

30

Glu Ile Leu Arg Arg Ser Arg Lys Phe Pro Arg Ala Met Pro Ile Trp
 2275 2280 2285
 Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Asp Pro
 2290 2295 2300
 Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Ala Lys
 2305 2310 2315 2320
 Ala Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Ser
 2325 2330 2335
 Glu Ser Thr Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe
 2340 2345 2350
 Gly Ser Ser Glu Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Ser
 2355 2360 2365
 Pro Asp Gln Pro Ser Asp Asp Gly Asp Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser
 2370 2375 2380
 Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu
 2385 2390 2395 2400
 Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val
 2405 2410 2415
 Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro
 2420 2425 2430
 Cys Ala Ala Glu Glu Thr Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser
 2435 2440 2445
 Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala
 2450 2455 2460
 Ser Leu Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp
 2465 2470 2475 2480
 Asp His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr
 2485 2490 2495
 Val Lys Ala Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro
 2500 2505 2510
 Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg
 2515 2520 2525
 Asn Leu Ser Ser Lys Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Lys Asp
 2530 2535 2540
 Leu Leu Glu Asp Thr Glu Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys
 2545 2550 2555 2560

10

20

30

Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala
 2565 2570 2575
 Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met
 2580 2585 2590
 Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser
 2595 2600 2605
 Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val
 2610 2615 2620
 Asn Ala Trp Lys Ala Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe Ala Tyr Asp Thr
 2625 2630 2635 2640
 Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu
 2645 2650 2655
 Ser Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile
 2660 2665 2670
 Arg Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser
 2675 2680 2685
 Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu
 2690 2695 2700
 Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ala Ala
 2705 2710 2715 2720
 Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly
 2725 2730 2735
 Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Glu
 2740 2745 2750
 Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro
 2755 2760 2765
 Pro Gly Asp Pro Pro Lys Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser
 2770 2775 2780
 Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val
 2785 2790 2795 2800
 Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp
 2805 2810 2815
 Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile
 2820 2825 2830
 Met Tyr Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe
 2835 2840 2845

10

20

30

Phe Ser Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys
 285C 2855 2860
 Gln Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln
 2865 2870 2875 2880
 Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr
 2885 2890 2895
 Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly
 2900 2905 2910
 Val Pro Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala
 2915 2920 2925
 Arg Leu Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu
 2930 2935 2940
 Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala
 2945 2950 2955 2960
 Ala Ser Gln Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly
 2965 2970 2975
 Gly Asp Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met
 2980 2985 2990
 Trp Cys Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro
 2995 3000 3005
 Asn Arg
 3010

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは本発明によるHCV-RNA構築物の構造を示している。Bはトランスフェクションして継代培養されたHuH-7細胞クローンにおける複製されたプラス鎖RNAの検出のための変性ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。Cは選択された大部分の細胞クローンにおいて導入されたレプリコンDNAが存在しないことを証明するための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。

【図2】AはHCV-RNA構築物を有する細胞クローン（9-13）における導入されたレプリコンDNA（プラスミド分子I₃₇₇/NS3-3'/wt）の高感度の排除のための引き続きのサザンブロットによるPCR試験の結果を示している。BはHCVのプラス鎖RNAおよびマイナス鎖RNAの定量的ためのノーザンブロット試験の結果を示している。CはHCV-RNA複製のダクチノマイシンに対する耐性を証明するための細胞内で複製されたHCV-RNAの放射性標識後のホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動の結果を示している。

30

【図3】Aは代謝放射性標識後の免疫沈降による選択された細胞クローンにおけるHCV特異抗原の検出を示している。BはHCV抗原の細胞内での所在の検出のための免疫蛍光試験の結果を示している。

【図4】図4は5' HCV-IRES、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Neo^R）、異種の完全なHCV読み枠および確実な3' NTRからなる、本発明による選択可能なHCV-RNA構築物（完全なゲノム）の構造の略図である。

40

【図5】図5はポリタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入された抗生物質耐性遺伝子（単シストロン性RNA）（A）および3' NTR内に挿入された抗生物質耐性遺伝子（2シストロン性RNA）（B）を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図6】図6はNS3からNS5BまでのHCVレプリコンの一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（A）、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなる融合遺伝子の一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（B）、耐性遺伝子およびリポーター遺伝子からなるレプリコンの一部として挿入されたりポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造（C）、自体の内部のリボソーム結合部位（IRES）から発現される独立の遺伝子として挿入されたり

50

ポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造(D)の略図である

【図7】図7は耐性遺伝子がリボザイムもしくはリボザイムのための認識部位を介してHCV-RNA配列と結合しているHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図8】図8は耐性遺伝子および導入された外来遺伝子を有するHCV-RNA構築物の構造の略図である。

【図9】図9は全RNAとインビトロ転写物との比感染力の比較のための方法プロセスを示している。。

【図10】図10は9-13クロンの配列分析を示している。

【図11】Aはリポーター遺伝子の使用による複製アッセイの原理を示している。Bは親HCV-RNA構築物 I₃₈₉/Luc/NS3-3'/wt (wt) または以下の変異体
：不活性RNA (318DN)、変異体9-13Fもしくは変異体5.1でトランスフェクションした細胞におけるルシフェラーゼ活性の比較を示している。

【図12】図12は選択可能なHCV全長ゲノム(構築物 I₃₈₉/core-3'/5.1および I₃₈₉/core-3'/9-13F)を示しており、Aは全長構築物の略図であり、BはAに示される構築物 I₃₈₉/core-3'/5.1のインビトロ転写されたRNA各0.1 μgでHUH7細胞にトランスフェクションした後に得られるコロニーの数を示しており、Cは相応のインビトロ転写物のトランスフェクション後に得られるG418耐性細胞クローンにおける自律的に複製されるHCV-全長RNAの検出を示している。

【図13】図13は1つのリポーター遺伝子を有するHCV-RNA構築物を示しており、Aは2シストロン性HCV-RNA構築物を示し、Bは単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

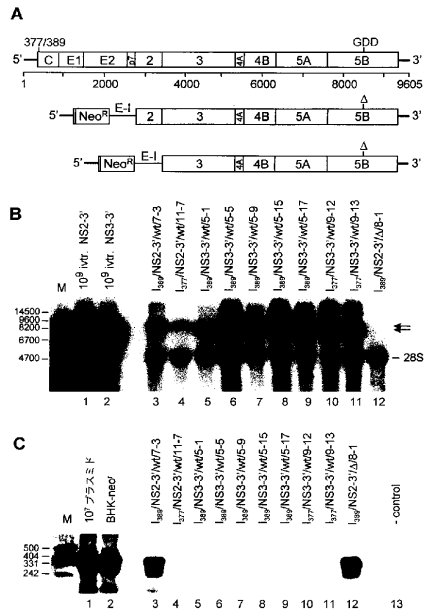
【図14】図14は耐性遺伝子に付加的に、挿入された外来遺伝子を有している3シストロン性のHCV-全長RNA構築物を示している。

【図15】図15は耐性遺伝子がHCV成分を有する融合タンパク質として発現する単シストロン性HCV-RNA構築物を示している。

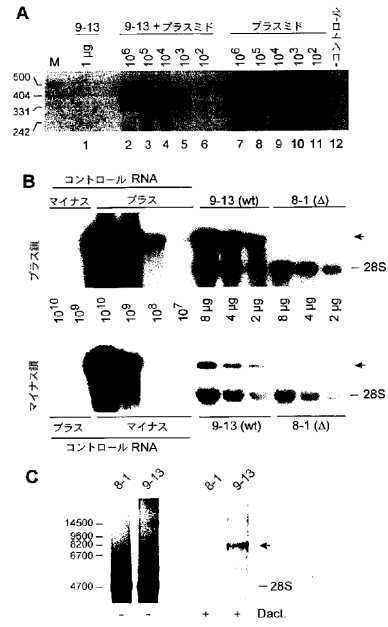
10

20

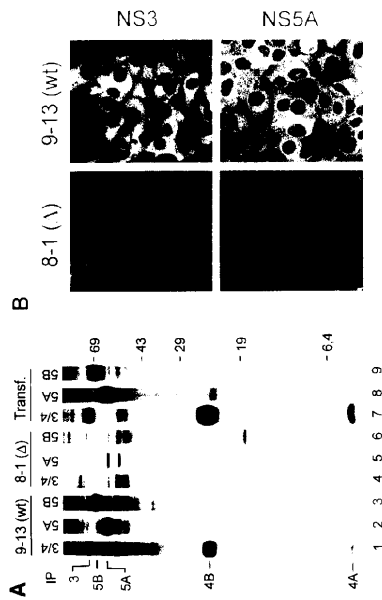
【図 1】



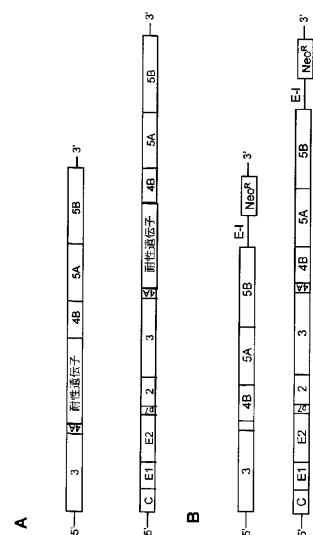
【図 2】



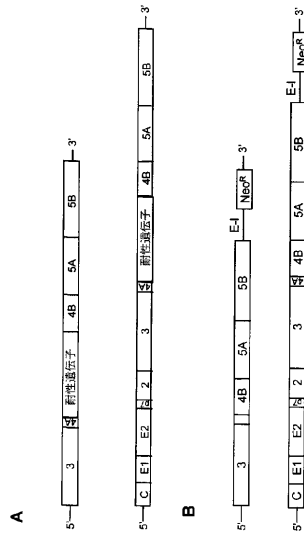
【図 3】



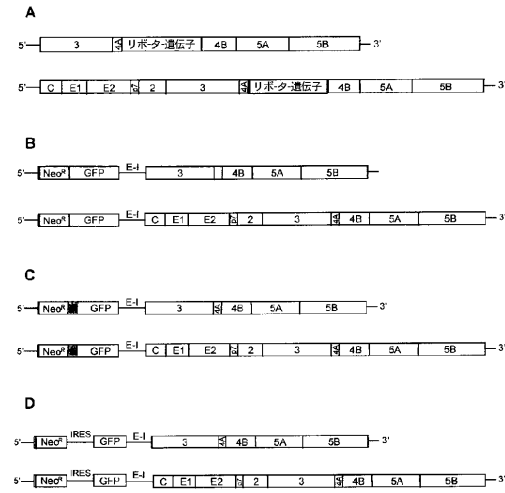
【図 4】



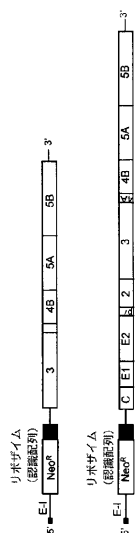
【図 5】



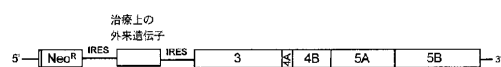
【図 6】



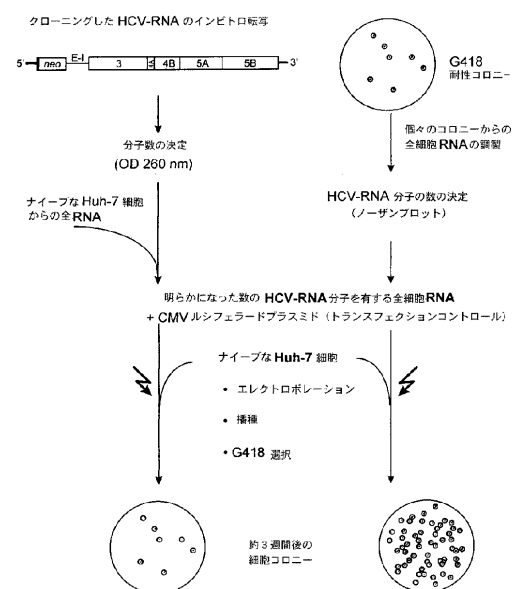
【図 7】



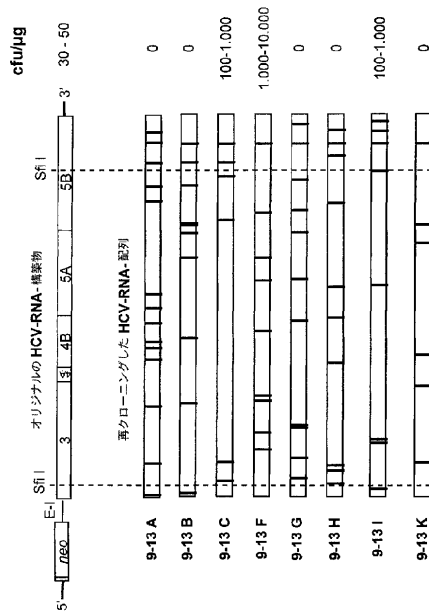
【図 8】



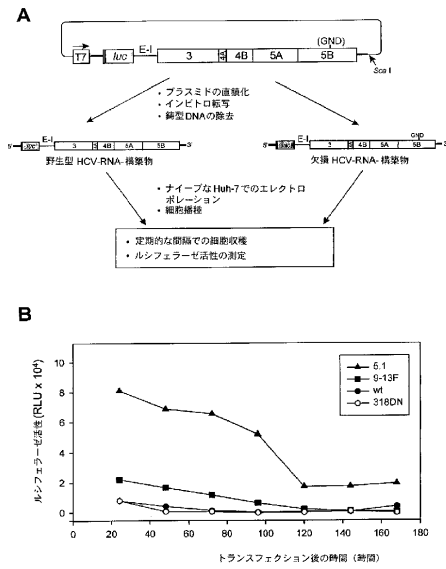
【図 9】



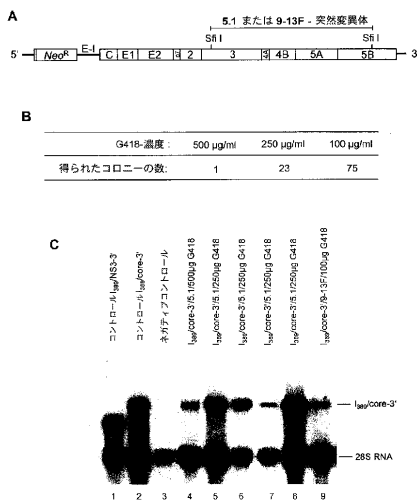
【図 10】



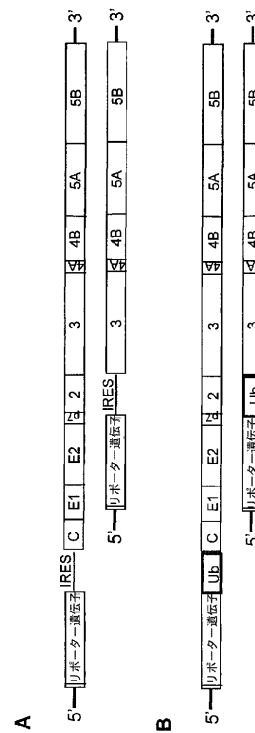
【図 11】



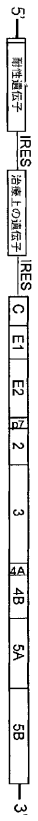
【図 12】



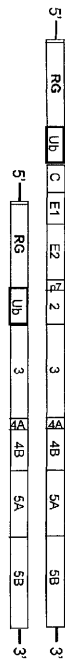
【図 13】



【図 1 4】



【図 1 5】



フロントページの続き

(74)復代理人 100114292

弁理士 来間 清志

(74)代理人 100099483

弁理士 久野 琢也

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 ラルフ バルテンシュラーガー

ドイツ連邦共和国 ガウーオーデルンハイム ナッハ デム アルテン シュロス 22

審査官 小川 明日香

(56)参考文献 国際公開第98/039031 (WO, A1)

国際公開第97/008310 (WO, A1)

国際公開第99/004008 (WO, A1)

J Virol., 1995年, Vol.69, pp.32-38

Am J Pathol., 1997年, Vol.151, pp.363-373

J Virol., 1998年, Vol.72, pp.2364-2372

J Virol., 1997年, Vol.71, p.1497-1505

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12N 5/10

C12N 7/00

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス細胞培養系、C型肝炎ウイルス－RNA－構築物、細胞培養系または構築物の使用、C型肝炎ウイルス－RNA－構築物の細胞培養に適合した突然変異体を獲得する方法、C型肝炎ウイルス－全長ゲノム、C型肝炎ウイルス－部分ゲノム、または任意のC型肝炎ウイルス－構築物の突然変異体の製法、細胞培養に適合したC型肝炎ウイルス－構築物、その突然変異体、C型肝炎ウイルス－全長ゲノムの突然変異体、C型肝炎ウイルス粒子またはウイルス様粒子、およびこれで感染した細胞