

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年3月8日(08.03.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/043303 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/0793* (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/030426

(22) 国際出願日: 2017年8月24日(24.08.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-167263 2016年8月29日(29.08.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 永安 一樹 (NAGAYASU, Kazuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 中澤 敬信 (NAKAZAWA, Takanobu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜T N Kビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SEROTONIN NEURON

(54) 発明の名称: セロトニン神経細胞の製造方法

(57) Abstract: To provide a means for producing a serotonin neuron within a short period of time. A method for producing a serotonin neuron, said method comprising expressing ASCL1 and LMX1B and/or FEV in a pluripotent stem cell.

(57) 要約: 短時間でセロトニン神経細胞を製造する手段を提供すること 多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1B及び/又はFEVとを発現させることを含む、セロトニン神経細胞を製造する方法。



WO 2018/043303 A1

明 細 書

発明の名称：セロトニン神経細胞の製造方法

技術分野

[0001] 神経細胞の製造に関する技術が開示される。

背景技術

[0002] セロトニン神経系は、うつ病や統合失調症などの精神疾患に係わる重要な神経系の一つである。セロトニン神経伝達を調節する化合物が、抗うつ薬や統合失調症の治療薬として有効であることから、これらの疾患の背景に、セロトニン神経系の機能異常が存在することが示唆されている。従って、ヒトのセロトニン神経を用いた解析は、うつ病や統合失調症のメカニズムの解明といった基礎医学的知見、及び、それらの疾患の治療及び予防に有効な物質の探索という実用的な見地から重要である。しかし、ヒトセロトニン神経へのアクセスは困難であり、疾患特異的なヒト i P S 細胞をもちいて患者由来のヒトセロトニン神経細胞を得る試みがなされているが、十分量のセロトニン神経の取得には約6週間といった長期間を要する（非特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Lu et al., Nature Biotechnology, 34, 89-94, 2016

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 上記の現状の下、より短時間でセロトニン神経細胞を製造する手段を提供することが1つの課題である。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、低分子化合物によるセロトニン神経への分化誘導ではなく、セロトニン神経の発生に関与する転写因子の特定の組み合わせを発現させることにより、より短時間でセロトニン神経細胞が得られることが判明した。斯かる知見に基づき、更なる研究を重ね、

下記に代表される発明を完成するに至った。

[0006] 項 1 .

多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1B及び/又はFEVとを発現させることを含む、セロトニン神経細胞を製造する方法。

項 2 .

多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1Bとを発現させることを含む、項 1 に記載の方法。

項 3 .

更に、多能性幹細胞において、FEVを発現させることを含む、項 2 に記載の方法。

項 4 .

多能性幹細胞においてFEVを発現させない、項 2 に記載の方法。

項 5 .

多能性幹細胞がiPS細胞である、項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

項 6 .

ASCL1とLMX1B及び/又はFEVをコードする遺伝子を含む、セロトニン神経細胞製造用発現ベクター。

項 7 .

項 6 に記載の発現ベクターを含む、セロトニン神経細胞製造用キット。

発明の効果

[0007] 短期間でセロトニン神経細胞を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1-1]レンチウイルスベクターLVV505:pFUW-M2rtTAの塩基配列を示す。大文字は、M2rtTAをコードする領域である。

[図1-2]レンチウイルスベクターLVV543:pFUW-Tet0-hASCL1の塩基配列を示す。大文字は、hASCL1をコードする領域である。

[図1-3]レンチウイルスベクターLVV544:pFUW-Tet0-hFEVの塩基配列を示す。大文字は、hFEVをコードする領域である。

[図1-4]レンチウイルスベクターLVV545:pFUW-Tet0-hFOX2A2の塩基配列を示す。大文字は、hFOX2A2をコードする領域である。

[図1-5]レンチウイルスベクターLVV546:pFUW-Tet0-hGATA2の塩基配列を示す。大文字は、hGATA2をコードする領域である。

[図1-6]レンチウイルスベクターLVV547:pFUW-Tet0-hLMX1Bの塩基配列を示す。大文字は、hLMX1Bをコードする領域である。

[図1-7]レンチウイルスベクターLVV548:pFUW-Tet0-hNKX2-2の塩基配列を示す。大文字は、hNKX2-2をコードする領域である。

[図1-8]レンチウイルスベクターLVV549:pFUW-Tet0-hNKX2-8の塩基配列を示す。大文字は、hNKX2-8をコードする領域である。

[図2-1]試験No.1の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-2]試験No.2の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-3]試験No.3の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-4]試験No.4の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-5]試験No.5の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-6]試験No.6の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-7]試験No.7の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-8]試験No.8の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-9]試験No.9の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-10]試験No.10の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

[図2-11]試験No.11の結果を示す。左は5HT（セロトニン）の発現を検出した画像である。中央は、Tuj1（神経細胞マーカー）を検出した画像である。右は5HT及びTuj1と細胞核の検出結果を融合した画像である。

発明を実施するための形態

[0009] セロトニン神経細胞の製造方法は、多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1B及び/又はFEVとを発現させることを含むことが好ましい。ここで、「発現させる」とは、転写因子をコードする核酸を多能性幹細胞に導入し、その産物である転写因子を細胞内で生産させることを意味する。核酸は、DNA及びRNAのいずれでもよい。一実施形態において核酸はDNAであることが好ましく、他の実施形態において核酸はRNAであることが好ましい。

[0010] 多能性幹細胞の種類はセロトニン神経細胞に誘導可能である限り特に制限されない。多能性幹細胞には、例えば、誘導型多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、及び体性幹細胞、受精卵内部細胞塊細胞、及び初期胚細胞等が包含される。これらの多能性幹細胞は、1種のみを用いてもよく、又は必要に応じて2種以上を混合して用いてもよい。iPS細胞には、Nature, 2007, July 19; Vol.448, pp.313-317; Cell, 2006, August 25;

Vol. 126(4), pp. 663-676に記載されている細胞、又はこれに類する細胞が含まれる。一実施形態において、多能性幹細胞は、iPS細胞であることが好ましい。

[0011] 多能性幹細胞の種類（由来）は特に制限されない。例えば、多能性幹細胞は、ヒト、サル、ゴリラ、マウス、ラット、ブタ、又はイヌ等の多能性幹細胞であり得る。一実施形態において、多能性幹細胞は、ヒトの多能性幹細胞であることが好ましく、他の実施形態において多能性幹細胞はマウス又はサルの多能性幹細胞であることが好ましい。一実施形態において、多能性幹細胞は、フィーダーフリー培養において自発的に分化するコロニーがなくなるまで継代した多能性幹細胞（例えば、iPS細胞）であることが好ましい。

[0012] ASCL1とは、中枢神経系の発生における重要な転写因子の一つであり、塩基性ヘリックスループヘリックス転写因子に分類される。ヒトASCL1をコードする塩基配列の一例を配列番号9に示す。ヒトASCL1を発現させるために使用できる塩基配列は、ヒトASCL1をコードする限り特に制限されず、例えば、配列番号9の塩基配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列であって、ヒトASCL1をコードするものを使用することができる。ASCL1は、セロトニン神経細胞を誘導可能である限り、野生型ASCL1に限らず変異型ASCL1であってもよい。多能性幹細胞としてヒト以外の動物由来の多能性幹細胞を使用する場合は、細胞の由来にあったASCL1を使用することが好ましい。

[0013] LMX1Bとは、組織発生における腹側背側軸の形成に重要な転写因子の一つであり、LIMホメオボックス転写因子に分類される。ヒトLMX1Bをコードする塩基配列の一例を配列番号10に示す。ヒトLMX1Bを発現させるために使用できる塩基配列は、ヒトASCL1をコードする限り特に制限されず、例えば、配列番号10の塩基配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列であって、ヒトLMX1Bをコードするものを使用することができる。LMX1Bは、セロトニン神経細胞を誘導可能である限り、野生型LMX1Bに限らず変異型

LMX1Bであってもよい。多能性幹細胞としてヒト以外の動物由来の多能性幹細胞を使用する場合は、細胞の由来にあったLMX1Bを使用することが好ましい。

[0014] FEVとは、ニコチン性アセチルコリン受容体の発現制御およびセロトニン神経発生における重要性が示唆されている転写因子であり、ETS転写因子に分類される。ヒトFEVをコードする塩基配列の一例を配列番号11に示す。ヒトFEVを発現させるために使用できる塩基配列は、ヒトFEVをコードする限り特に制限されず、例えば、配列番号11の塩基配列と80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列であって、ヒトFEVをコードするものを使用することができる。FEVは、セロトニン神経細胞を誘導可能である限り、野生型FEVに限らず変異型FEVであってもよい。多能性幹細胞としてヒト以外の動物由来の多能性幹細胞を使用する場合は、細胞の由来にあったFEVを使用することが好ましい。

[0015] 多能性幹細胞において発現させる転写因子はASCL1とLMX1B及び／又はFEVを含むことが好ましい。多能性幹細胞においてASCL1とLMX1B及び／又はFEVを発現させる場合、更に他の転写因子を当該多能性幹細胞において発現させてもよい。そのような他の転写因子としては、FOXA2、NKX2.2、NKX2.8、及びGATA2から成る群より選択される一種以上を挙げることができる。好適な一実施形態において、上記他の転写因子（特に、FOXA2、NKX2.2、及びNKX2.8）は多能性幹細胞において発現させないことが好ましく、FEV、FOXA2、NKX2.2、NKX2.8、及びGATA2を発現させず、ASCL1及びLMX1Bだけを発現させることがより好ましい。ここで「発現させない」とは、所定の転写因子をコードする核酸をそれが発現可能な状態で多能性幹細胞に導入しないことを意味する。

[0016] 転写因子とは、DNAに特異的に結合するタンパク質の一群であり、DNA上のプロモーターやエンハンサーと呼ばれる転写を制御する領域に結合し、DNAの遺伝情報をRNAに転写する過程を促進又は抑制する。転写因子はこの機能を単独で、または他のタンパク質と複合体を形成することによって発揮する。

[0017] 多能性幹細胞における転写因子の発現は、当該技術分野において知られる任意の手法で行うことができる。例えば、上記特定の組み合わせの転写因子をコードする核酸を発現ベクターを用いて多能性幹細胞に導入することにより、それらが発現させることができる。また、転写因子をコードする mRNA 又はタンパク質の状態の転写因子を直接多能性幹細胞に導入することも可能である。mRNA の状態で多能性幹細胞に導入することは、例えば、mMESSAGE mMACHINE (ThermoFisher 製) を用いて mRNA を作製し、それを Lipofectamine MessengerMAX を用いて細胞内に導入することができる。タンパク質の状態の転写因子の導入は、例えば、細胞内移行性を有するタグ（例えば、tat-ペプチド）を付加することによって可能である。一実施形態において、発現ベクターを用いて転写因子をコードする核酸を導入することが好ましい。

[0018] 発現ベクターの種類は特に制限されず、多能性幹細胞の種類等に応じて、例えば、ウイルスベクター、及びプラスミドベクター等から適宜選択することができる。一実施形態において、発現ベクターとしてウイルスベクターを用いることが好ましい。ウイルスベクターとしては、例えば、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びアデノウイルスベクター等を挙げることができる。一実施形態において好ましいウイルスベクターは、レンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクターであり、より好ましくはレンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを用いることにより転写因子を安定的に発現させることができる。アデノ随伴ウイルスベクター、及びアデノウイルスベクター、並びにプラスミドベクターを用いることにより転写因子を一過的に発現させることができる。

[0019] 発現ベクターの作製は常法に従って行うことができる。例えば、多能性幹細胞において外来遺伝子が発現させるための発現ベクターを作製するためのキット及び試薬が市販されているため、それらを用いて作製することができる。また、例えば、ウイルスベクターは、次の（A）および（B）の工程を含む製造方法により作製することができる：（A）導入遺伝子の翻訳領域の5

’側にプロモーター配列を含む発現コンストラクトを構築する工程；及び（B）ウイルスへの取り込みシグナル配列を含有したベクターを制限酵素で切断し、それに（A）で作製した発現コンストラクトをライゲーションする工程。発現ベクターは、1種類の転写因子をコードするDNAのみを組み込んでいてもよく、2種又は3種の転写因子をコードするDNAを組み込んでいてもよい。

[0020] 上記のようにして得られる転写因子の発現ベクター（又はその組み合わせ）は、セロトニン神経細胞製造用キットとすることができる。当該キットには、多能性幹細胞からセロトニン神経細胞を製造する際に使用する任意の試薬、及び／又は取扱に関する説明書を含めることができる。

[0021] 発現ベクターを用いた多能性幹細胞への転写因子をコードする核酸の導入は常法に従って行うことができる。例えば、ウイルスベクターを用いる場合は、ウイルスベクターで多能性幹細胞を感染させることにより、目的の転写因子を多能性幹細胞内で発現させることができる。プラスミドベクターを用いる場合は、カチオンポリマー、カチオン脂質、又はリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション、或いは、エレクトロポレーション、又はマイクロインジェクションを用いてプラスミドベクターを多能性幹細胞に導入し、転写因子を発現させることができる。

[0022] 転写因子をコードする核酸を導入した多能性幹細胞は、セロトニン神経細胞への分化に適した条件にて培養することが好ましい。神経細胞への分化に適した条件は、特に制限されず、任意に選択することができる。例えば、[DMEM/F12（1：1）に添加因子として2% B27，1% N2を加えたもの]の組成が神経細胞への分化に用いられる培地の基本組成として広く用いられている。B27およびN2は神経細胞培養用の培地添加物であり、神経細胞の培養時に血清の代わりに使用される。これ以外の基本組成も各種知られている。そのような基本組成の培地に、神経細胞の分化誘導に有用な物質（細胞培養基材に固定化されたタンパク質以外の物質）を適宜添加して用いてもよい。例えば、神経細胞への分化誘導においてはレチノイン酸がしばし

ば用いられており、通常 $1\ \mu\text{M}$ 程度の濃度で培地に添加して使用される。また、後述する実施例で採用するように、培養開始後 1～2 日間は、基本培地に Doxycycline を添加することができ、培養開始後 2 日～6 日の間は、更に SB-431542 及び LDN-193189 添加することができる。更に培養開始後 7 日～11 日の間は、Doxycycline、SB-431542 及び LDN-193189 を除いた培地を使用することができる。SB-431542 及び LDN-193189 は ALK 阻害薬であり、一実施形態において、これらの ALK 阻害剤のそれぞれと同種の ALK 阻害剤を用いることもできる。一実施形態において、分化用培地に Wnt シグナルの活性化剤（例えば、CHIR-99021）及び／又は阻害薬（例えば、IWP-2）を添加することが好ましい。

[0023] 多能性幹細胞の培養は、通常、細胞の培養に使用されるプレート（例えば、24 ウェルプレート、6 ウェルプレート）上で行うことができる。培養液中の多能性幹細胞の量（濃度）は特に制限されないが、例えば、 $10^2 \sim 10^8\ \text{cells/ml}$ 、又は $10^3 \sim 10^6\ \text{cells/ml}$ とすることができる。培養温度は、特に制限されず、例えば、約 37°C とすることができる。また、 CO_2 細胞培養装置などを利用して、5% 程度の CO_2 濃度雰囲気下で培養することが好ましい。

[0024] 培養期間は、セロトニン神経細胞への分化が誘導される限り特に制限されず、例えば、4 日以上、5 日以上、6 日以上、1 週間以上、2 週間以上、3 週間以上、4 週間以上培養することができる。一実施形態において、セロトニン神経細胞を短期間で製造するという観点から、培養期間は、好ましくは、5 週間以内、4 週間以内、3 週間以内、2 週間以内、12 日以内、又は 11 日以内である。

[0025] 多能性幹細胞がセロトニン神経細胞に分化されたか否かは、任意の指標を用いて行うことができる。例えば、後述する実施例で採用したように、抗セロトニン抗体及び神経細胞を特異的に認識する抗体（例えば、抗 Tuj1 抗体）で培養後の細胞を染色して確認することができる。

[0026] 本発明の細胞培養基材上で分化誘導した神経細胞は、ピペッティング、セルスクレーパーによる物理的な剥離により、または酵素処理（トリプシン、

ディスパーゼ等)により回収して所望の用途に使用することができる。

実施例

[0027] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

[0028] 1. 分化誘導用レンチウイルスベクター作製

分化誘導用レンチウイルスベクターは、Takahashi et al., (Takahashi et al., PLoS One. 2014 Apr 16;9(4):e94657.) の方法に準拠して行った。10cm dishに25% confluencyでLenti-X 293T細胞 (Clontech) を播種し、37℃、CO₂5%環境下で終夜培養した。一方、300μLのDMEM (Life technologies)に5.2 μgのpNHP、2.1 μgのpHEF-VSVG、0.43 μgのpCEP4-tat、及び2.6 μgのshuttle vector(pFUW-M2rtTA or pFUW-Tet0-GeneX)を加えた。これをボルテックスで懸濁し、7.5 μLのpolyethyleneimine溶液 (polysciences社製)を加え、再度ボルテックスで懸濁して常温で20分放置した。懸濁液を37℃で予熱した5mLの10%FBS添加DMEMに加え転倒混和した。これを、培地を除去した培養細胞 (Lenti-X 293T細胞)に加え、37℃、CO₂5%環境下で終夜培養した。培養上清を除去し、PBSで2回洗浄し、6 mLのEssential 8 basal medium(Life technologies社製)を加え、37℃、CO₂ 5%環境下で終夜培養した。培養上清を回収し、0.45 μm孔径のフィルターを通し清澄化した。これを500 μLずつ分注し、-80度で保存し、セロトニン神経誘導試験において各転写因子を強制発現させるためのウイルスベクターとして使用した。

[0029] 2. セロトニン神経細胞の誘導

2-1. 試薬等

本試験では下記の試薬等を使用した。

- ・ hiPS cells (454E2) : RIKENから提供され、フィーダーフリー培養へ移行後、自発的に分化するコロニーがなくなるまで継代したhiPS cellsを使用した。
- ・ Essential 8 + Supplement (Life technologies)
- ・ Matrigel growth factor reduced (BD Biosciences)

- ・ Accutase (Stempro)
- ・ Y-27632 (Y: 10mM stock. use 1 μ L/1 mL media)
- ・ DMEM/F12 (Life technologies 11330-032, HEPES+, Gln+, sodium bicarbonate+)
- ・ N2 supplement (Wako, アポトランスフェリンタイプ)
- ・ NEAA (MEM, Life technologies)
- ・ B27 supplement (Life technologies)
- ・ PD-0332991 (PD: 10 mM)
- ・ hBDNF (100 μ g/mL, 10 μ L/tube, -20degC)
- ・ hGDNF (100 μ g/mL, 10 μ L/tube, -20degC)
- ・ SB-431542 (SB: 10 mM, 100 μ L/tube, -20degC)
- ・ LDN-193189 (LDN: 10 mM)
- ・ Doxycycline (Clontech) dissolved in ddH2O (20 mg/mL), フィルターで滅菌
- ・ Lentiviral vectors (いずれも上記 1 で作製したもの)
 - LVV505:pFUW-M2rtTA (Addgene#20342)
 - LVV543:pFUW-Tet0-hASCL1
 - LVV544:pFUW-Tet0-hFEV
 - LVV545:pFUW-Tet0-hFOX A2
 - LVV546:pFUW-Tet0-hGATA2
 - LVV547:pFUW-Tet0-hLMX1B
 - LVV548:pFUW-Tet0-hNKX2-2
 - LVV549:pFUW-Tet0-hNKX2-8

これらのベクターの配列を図 1 に示す。各配列において大文字は転写因子のコーディング領域を示す。

- ・ 分化培地

分化培地A (DMEM/F12+N2+NEAA(1:100)+B27(1:50)+Y (1:1000)+20 ng/mL hBDNF+20 ng/mL

hGDNF+1 μ M PD+1 μ g/mL Doxycycline)

分化培地B (DMEM/F12+N2+NEAA(1:100)+B27(1:50)+Y (1:1000)+20 ng/mL hBDNF+20 ng/mL

hGDNF+1 μ M PD+1 μ g/mL Doxycycline+0.1 μ M LDN+2.5 μ M SB)

分化培地C (DMEM/F12+N2+NEAA(1:100)+B27(1:50)+Y (1:1000)+20 ng/mL hBDNF+20 ng/mL hGDNF+1 μ M PD)

[0030] Day -3 : 細胞を接着させるため、24-well plateを30倍希釈したMatrigel(BD Biosciences社製)でコートした。6-wellプレートにおいてsubconfluentな状態のhiPSC培養から、培養上清を除去した。2mL/wellのPBSでwell plateを2回洗浄した。細胞を剥離するため、予熱したAccutaseを1mL/wellで加え、37℃で5分間インキュベートした。1mL/wellのPBSを加え、1mLのピペットマンでピペティングしながら細胞を剥がした。2well分の培養液全量を15mLの遠沈管に移し、一部を細胞濃度測定用に採取した。遠沈管に6mLのPBSを加え、300g、4分、4℃で遠心分離し、Accutaseを除去した。遠心中に細胞数をカウントした。遠心上清を吸引除去し、沈殿をEssential 8 +Sup+ Y 1mLに懸濁した。8x10⁴cells/mLになるようにE8+Sup+Yで薄めた。24-well plateからマトリゲルを吸引除去し、そこに500 μ L/well (= 4x10⁴ cells/well)で希釈した細胞を播種した。

[0031] Day -2 : well plateの培養液を500 μ LのEssential 8 + Sup + Yに交換した。レンチウイルスベクター(LVV505:pFUW-M2rtTA (Addgene社製) を40 μ L/wellで添加し、レンチウイルスベクターLVV543~LVV 550を下記の表1に示す組み合わせで40 μ L/well添加し、ピペティングで懸濁した後、37℃、CO₂5%環境下で終夜培養した。

[0032]

[表1]

試験No.	転写因子又はその組み合わせ
1	なし
2	ASCL1
3	ASCL1, FEV
4	ASCL1, LMX1B
5	ASCL1, FEV, LMX1B
6	ASCL1, FEV, LMX1B, FOXA2
7	ASCL1, FEV, LMX1B, NKX2. 2
8	ASCL1, FEV, LMX1B, NKX2. 8
9	ASCL1, FEV, LMX1B, GATA2
1 0	FEV, LMX1B
1 1	ASCL1, NKX2. 2, NKX2. 8, FOXA2

[0033] Day -1 : 培養液を500 μ LのEssential 8 + Sup + Yに交換し、37℃、CO₂5%環境下で終夜培養した。

Day 0 : 培養液を500 μ Lの分化培地Aに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で2日間培養した。Day 2 : 培養液を500 μ Lの分化培地Bに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で2日間培養した。Day 4 : 培養液を500 μ Lの分化培地Bに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で2日間培養した。Day 6 : 培養液を500 μ Lの分化培地Bに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で終夜培養した。Day 7 : 培養液を500 μ Lの分化培地Cに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で2日間培養した。Day 9 : 培養液を500 μ Lの分化培地Cに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で2日間培養した。Day 11 : 培養液を500 μ Lの分化培地Cに交換し、37℃、CO₂ 5%環境下で終夜培養した。

[0034] その後、下記の手順で細胞を固定し、免疫染色した。

- (1) 培地を吸引除去した。
- (2) 細胞を500 μ L/wellのPBSで2回洗浄した。
- (3) 4% パラホルムアルデヒド溶液 500 μ L/wellを加えた。
- (4) 室温で10分間静置し、細胞を固定した。
- (5) 細胞を500 μ L/wellのPBSで3回洗浄した。
- (6) 0.1% Triton X-100溶液を加えた (200 μ L/well)。
- (7) 室温で10分間静置することで、膜透過処理を行った。
- (8) 細胞を500 μ L/wellのPBSで3回洗浄した。

- (9) 1% BSA/PBS溶液を加えた (200 μ L/well) 。
- (1 0) 室温で 3 0 分間静置することで、抗体の非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行った。
- (1 1) 1% BSA/PBS溶液を除去した。
- (1 2) 一次抗体液 (0.4 μ L/well 5-HT 抗体 + 0.4 μ L/well TUJ1 抗体を加えた (200 μ L/well 1% BSA/PBS) 。
- (1 3) 4℃で終夜静置した。
- (1 4) 翌日、一次抗体液を除去した
- (1 5) 細胞を 500 μ L/well の PBS で 3 回洗浄した
- (1 6) 二次抗体液を加えた (1 μ L/well Alexa FluorR 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody + 1 μ L/well Alexa FluorR 594 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody + 1 μ L/well Hoechst 33342 in 200 μ L/well 1% BSA/PBS) 。
- (1 7) 室温で 2 時間静置した。
- (1 8) 細胞を 500 μ L/well の PBS で 3 回洗浄した。
- (1 9) 200 μ L/well PBS を加えて蛍光顕微鏡 (オリンパス社製 BZ-9000) で観察した。結果 (図 2) は、下記のとおりである。

[0035] 試験No. 1

Tuj1陽性の神経細胞数は少なく、その突起の長さも極めて短く、神経細胞への分化が不十分であることが示唆された。また、5-HT (セロトニン) 陽性の神経細胞は観察されなかった。

試験No. 2

Tuj1陽性の神経細胞が多数観察され、その突起長も長く、試験No. 1と比較すると神経細胞への分化が誘導されていることが示唆された。しかし、5-HT陽性の神経細胞は観察されなかった。

試験No. 3

Tuj1陽性の神経細胞が観察され、神経細胞への分化が誘導されていることが示唆された。また、5-HT陽性の神経細胞が観察された。

試験No. 4

Tuj1陽性の神経細胞が観察され、その突起長も長く、神経細胞への分化が誘導されていることが示唆された。また、5-HT陽性の神経細胞が試験No. 3よりも更に多く観察された。

試験No. 5

Tuj1陽性の神経細胞が観察され、神経細胞への分化が誘導されていることが示唆された。また、5-HT陽性の神経細胞が観察された。

試験No. 6

数は少ないもののTuj1陽性の神経細胞が観察された。5-HT陽性の神経細胞がわずかに観察された。

試験No. 7

試験No. 5の結果と同等の結果であった。

試験No. 8

試験No. 5の結果と同等の結果であった。

試験No. 9

試験No. 5の結果と同等の結果であった。

試験No. 10

数は少ないもののTuj1陽性の神経細胞が観察された。一方、5-HT陽性の神経細胞は観察されなかった。

試験No. 11

試験No. 10の結果と同様の結果であった。

請求の範囲

- [請求項1] 多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1B及び/又はFEVとを発現させることを含む、セロトニン神経細胞を製造する方法。
- [請求項2] 多能性幹細胞において、ASCL1とLMX1Bとを発現させることを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 更に、多能性幹細胞において、FEVを発現させることを含む、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 多能性幹細胞においてFEVを発現させない、請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] ASCL1とLMX1B及び/又はFEVをコードする遺伝子を含む、セロトニン神経細胞製造用発現ベクター。
- [請求項7] 請求項6に記載の発現ベクターを含む、セロトニン神経細胞製造用キット。

[図1-1-1]

cgataatcaacctctggallacaaaatttgtgaaagattgacitgglatteittaactatgtitgctccitlttaacg
 ctatgtggalacgetgtctttaatgcciligtatcatgtatitgtctccgtatggctitcattttctctctct
 tgtataaatcttggltgtctgtctctttatgaggagltgtggccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcac
 tgtgtttgtctgacgcaacccccacitggltggggcatitgccaccacctgtcagctccitltccgggacitltcgt
 itccccctccctattgccacggcggaacitcagcccgctgcttgcctgtcgtggacaggggtctggctgt
 tgggactgacaaliccgtggltgttgcggggaaatcagctccitltccitlggtgtctgcctgtgttgcac
 ctggattctgcgcgggacgtccitltgtctacgtcccttggccctcaatccagcggaccitccitltccgcggc
 ctgtcgtccggtctgtgcggctctltccgcgtcttgccttgcctctcagacgagtcggatctccitltgggcgg
 cctccccgcagctgatacgtctgacctcagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagc
 taccaatgtctgattgttgcctggctagaagcacaagaggaggaggagggtgggtlttccagtcacacctcaggta
 ccttlaagaccaatgacttacaaggcagctgttagatcttagccactlttlaaaagaaaaggggggactggaag
 ggctaaltcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggtctctccitga
 itggcagaactacacaccagggccagggatcagatatccactgaccttggatgggtgtctacaagctaglacca
 gttgagcaagagaaggtagaagaagccaatgaaggagagaacaccgcctgttaccacctgtgagcctgcatg
 ggalggatgacctcgagagagaagtallagagltggagggttgcagcccgcttagcatltcaltcatalggcccg
 agagctgcatccgactgtactgggtctctctgtttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacta
 gggaaccctgtcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgtctcaagtagtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 actctggtaactagagatccctcagaccttttagtctagltgtggaaaaatctctagcagggcccggtttaaacc
 gctgaltcagcctcagctgtgtctcttagttgtccagccatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 cctgggaaggtgccactcccatgtctcttcttaataaaaatgaggaaaatgtcagctcagctgtgtgtgtgtgt
 catctctatcttgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggatitgggaagacaatagcaggcatgtga
 gcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccglaaaaaggccggttgcctggcgttttccataggctccgcccc
 ctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaggtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataccaggc
 gtttccccctgggaagctccctcgt
 ctccccctgggaagcgttggcgtttctctatagctcagctgttaggtatctcagttcgggtgttaggtgtgtgt
 ccaagctgggt
 gtccaaccgggtgaagacacgacttalcgccactggcagcagccactgttlaacaggattagcagagcagggtat
 gtaggcgggtgtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacaglatlttggtatct
 gcgtctgtctgaagccagttaccttgggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctgg
 tagcgggtgggtttttgtttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccitltgalt
 tttctacggggctgtacgtcagtggaacgaaaactcagcttlaagggaatlttggtcatgagattatcaaaaa
 ggatcttccctagatctctttaaattaaaaatgaagttttaaatacaatcaaaagtataataglaaaactgt
 gtctgacagttaccaatgtcttaatacagtgaggcaccatctcagcagatctgtctatltcgttcatccatagtt
 gccitgactccccgtctgttagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgatac
 cgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgcagaag
 tggctctgcaactttatccgctccatccagctctatattgttgcggggaagctagagtaagtagtltgccca
 gtttaatagtttgcgcaacgttgttgcctatgtctacaggeatcgtgggtgtcagctcgtctgttgggtatggctt
 cattcagctccgggttcccaacgatacaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgtcaaaaaagcggltagctc
 ctltgggtccctccgactgttgtcagaagtaagttggccgcagltgttactcactatgggttatggcagcactgcat
 aatltcttactgtcatgccatccgttaagatgtcttctgtgactggltgagttactcaaccaagtcattctgag
 aatagttgtatgcggcgaccgagttgtcttgcggcggtcaatacgggataaataccgcgccacatagcagaac
 tttaaaaagltgtcatcatltggaaaacgttcttccggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgtttagatcc
 agttcgatgttaaccactcgtgcacccaactgatctcagcattctttactttaccagcgttcttgggtgag
 caaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgttgaatactcatactctt
 cctttttcaatattattgaagcatttatacagggttatgtctctatgagcggatacatatttgaatgtatttag
 aaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcagcggatcgggagatc
 tcccgatccccctatgggtgactctcagtaacaatctgtctctgatgccgcatagtttaagccagtatctgtctcct
 gcttgtgtgttggagggtcgtgagtagtgcgcgagcaaaaatlaagctacaacaaggcaaggcttgaccgaca

[図1-1-2]

attgcatgaagaatctgcttagggtagggcttttgcgctgcttcgcatgtacgggcccagatatagcggttg
 acattgattattgactagttatlaaatagtaaatcaattacggggcatttagttcatagcccatatagggattc
 cgcgttacataacttacggtaaatggcccgctggctgacgcgccaacgacccccgcccattgacgtcaataa
 tgacglaltgttcccatagtaacgccaatagggtacattccattgacgtcaatgggtggagtalattacggtaaac
 tggccacatggcagtlacatcaagtgatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatgg
 cccgctggcatttatggccagtlacatgacctatgggacatttcttacttggcagtlacatcactgatttagtca
 tgcattataccaatgggtgatgggttttggcagtlacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggall
 tccaagtcaccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacggggacatttccaaaatgt
 cgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggctggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagcgct
 tttggcgtgactgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacagggaaccac
 tgcitaaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtggtgtgctggcgtctgttgtgtgactctggtaa
 cttagagatccctcagacctttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtggcgccccgaacagggtattgaaag
 cgaaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggacatcggttgcctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggg
 gcggcgactgggtgagtlacgcaaaaattttgactagcgaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtc
 agtattaaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatata
 aattaaaacalalagtalgggcaagcagggtagaaacgattcgcatgtaatcctggcctgllagaacatc
 agaaggctgtagacaaatctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattat
 tataatcacagtagcaacctctatttgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaagggaagctttagaca
 agatagagggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcgccgctgattctcagacctggaggag
 gagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaaatataaagtagtaaaaattgaaccallagggttagc
 accaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtggaataggagctttgttcccttggg
 ttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgltcaatgacgtgacggtacaggccagacaattattgt
 ctgggtalagtgacgcagcagaacaatttgcctgagggtctattgaggcgcaacagcattctgttgcaactcacagt
 ctggggcatcaagcagctccaggcaagaatccctggcctgggaaagataccctaaaggatcaacagctccctgggg
 atttgggggttgcctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgcttgggaatgcttagttggagtaataaatctc
 tggaaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtgaggacagagaaattacaattacacaagcttaataca
 ctcccttaattgaagaatcgcaaaaaccagcaagaaaaagaatgaacaagaattatttggaaatagataaatgggca
 agtttgttggaaattgggttlaacataacaaattggctgttggtalataaaattattcataatgatagtaggaggt
 tggtaggtttaagaatagtttttgcctgacttctctatagtgaaatagagttlaggcagggtatctaccattatc
 gtttcagaccaccctcccaaccccgagggggacccgcacaggcccgaaaggaaatagaagaagaagggtggagagaga
 gacagagacagatccattcgatttagtgaacggatcggtcgtgcgccaattctgcagacaaaatggcagta
 tctatccacaatttttaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgacaggggaaagaatagtagacataatag
 caacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcggggttattacaggga
 cagcagagatccagtttgggtlaattaaaccgtgtcggtccagatctggcctccgcgcgggttttggcgct
 cccgcgggcgccccctctctcagcgcgagcgctgccacgtcagacgaaggcgcgagcgagcgctccgatccct
 ccgccccggacgtcaggacagcgccccgctgctcatalaagactcggtcctllagaaccccagtlacagcagaagga
 catttttaggacgggacttgggtgactcttagggcactgggtttctttccagagagcggaacaggcgaggaaaag
 tagtcccttctcgggcattctcgggagggtatctcggtggggcggtgaacgcgatgattatataaggacgcgc
 cggtgttggcacagctagttccgtcgcagccgggtttgggtcgcggttcttgtttgttggatcgctgtgatcg
 tcaattgggtgagtagcgggctgctgggttggccggggcttctgtggccgcccggcgctcggttgggacggaag
 cgtgttggagagaccgccaagggtgttagtctgggtccgagcaagggttggccctgaactgggggttgggggga
 gcgcagcaaaaatggcggtgttcccgagcttgaatggaaagacgttgttggggcggtgtgtgaggtcgttga
 acaagggtggggggcatggtgggcggcaagaacccaagggtcttggaggtctcgctaatgggggaaagctcttat
 tgggtgagatgggttggggcaccatctggggacctgacgtgaagtttgtcactgactggagaactcggttt
 gtgctgtgttggggggcggtcagttatggcggttgcgttgggcagtgacccgtlacccttgggagcgcgcgcc
 ctgctgtgtgtgacgtcaccgttctgttggcttataatgcagggtggggccacctgccggtagggtgtgcg
 gtaggcttttctccgtcgcaggacgcagggttggggccagggttaggtctctctgaatcgacaggcgccggac
 ctctgggtgaggggagggtataagtgaggcgctcagtttcttgggtcggttttatgtacctatctcttaagtagc
 tgaagctccggttttgaactatgcgtcgggggttggcgagtggttttgtgaagtttttttaggcaccttttga

[図1-1-3]

aatgtaatcatttgggtcaatatgtaattttcagtggttagactagtaaattgtccgctaaattctggccgttt
ttggcttttttgttagacgaagcttggggcccggaattaattcaccATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTC
ATAAACGGCGCTCTGGAATTACTCAATGGAGTCGGTATCGAAGGCCTGACGACAAGGAACTCGCTCAAAAGC
TGGGAGTTGAGCAGCCTACCCTGTACTGGCACGTGAAGAACAAGCGGGCCCTGCTCGATGCCCTGCCAATCGA
GATGCTGGACAGGCATCATACCCACTTCTGCCCCCTGGAAGGCGAGTCATGGCAAGACTTTCTGCGGAACAAC
GCCAAGTCATTCCGCTGTGCTCTCCTCTCACATCGCGACGGGGCTAAAGTGCATCTCGGCACCCGCCAACAG
AGAAACAGTACGAAACCCTGGAAAATCAGCTCGCGTTCCTGTGTCAGCAAGGCTTCTCCCTGGAGAACGCACT
GTACGCTCTGTCCGCCGTGGGCCACTTTACACTGGGCTGCGTATTGGAGGAACAGGAGCATCAAGTAGCAAAA
GAGGAAAGAGAGACACCTACCACCGATTCTATGCCCCACTTCTGAGACAAGCAATTGAGCTGTTGACCGGC
AGGGAGCCGAACCTGCCTTCCTTTTCGGCCTGGAACATAATCATATGTGGCCTGGAGAAACAGCTAAAGTGCGA
AAGCGGCGGGCCGGCCGACGCCCTTGACGATTTTGACTTAGACATGCTCCCAGCCGATGCCCTTGACGACTTT
GACCTTGATATGCTGCCTGCTGACGCTCTTGACGATTTTGACCTTGACATGCTCCCCGGGTAAActaagtaagg
atcaattcgatatcaagcttat (配列番号1)

[図1-2-1]

aattgcatgaagaatctgcttagggllaggcglttttgcgcigcttcgcgatgtacggggccagatatacgcgtt
gacattgattatlgaclagttatataagtaatacaattacgggggtcattagttcatagcccatataatggagtt
ccgcgttacataacttacggtaaatggccccgcttggtgaccgcecaacgacccccgccccatlgacgtcaata
algaagtaatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagtaattacgglaaa
ctgcccactlggcagtaacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctatlgacgtcaatgacggtaaatg
gccccgctggcattatgcccagtaacalgaaccttatgggactttcttacttggcagtaacatctacgtattagtc
alcgtattaccatgggtgatgcggttttggcagtaacatcaatgggcglggalagcggtttgactcaccggggat
ttccaagtcctccaccccatlgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaaatcaacgggactttccaaaatg
tcgtatacaactccgccccatlgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtagggaggtctatataagcagcgcg
tttllgcccgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagccllgggagctctctggctaactagggaaccca
ctgcttaagcctcaataaagctllgctttagtgccttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggta
actagagatccctcagaccttttagtcagttgggaaaaatctctagcagtaggcgccccgaacagggaacttgaaa
gcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgagg
ggcgcgactggtgagtagcgcacaaaaatlltactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt
cagtaattaaagcgggggagaaatagatcgcgatgggaaaaaatccggtlaaggccagggggaagaaaaaataat
aaattaaaacataataglatgggcaagcagggaactagaacgattcgcagttaatccctggcctgttagaaacat
cagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataatacagtagcaacctctattgtgtgcatacaaggatagagataaaagacaccaaggaagcilltagac
aagatagaggaagagcaaaaacaaaaglaagaccaccgcacagcaagcggcgctgacttccagacctggagga
ggagatatgagggacaattggagaagtgaaattatataataataaagtagtaaaaatgaaccatlaggagtag
caccaccaaggcaagagaagagtaggtgcagagagaaaaaagagcagtaggggaataggagctttgttcccttg
gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatlgacgtgacggtagcggccagacaattattg
ctlggtatagltgcagcagcagaacaatttgcgtgagggctattgagggcgaacagcactctgttgcaactcacag
cttggggcatcaagcagctccaggcaagaatccctggctgttgaaagataacctaaaggatcaacagctccctggg
gatttgggggttgcctctggaaaaactcatlltgcaccactgctgtgcttgggaatgctagttggagtaataaatct
ctggaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtagggacagagaaaatlaacaattacacaagcttaatac
actcccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaaatgaacaagaattattggaattagataaatgggc
aaglltltggaattgggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggc
ttggtaggtttaagaatagtttlltgcgtacttctatagltgaatagagtagggcagggalatccaccattat
cgllcagaccaccctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaagggaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgattagltgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaatggcagt
attcaccacaatttttaaaagaaaaggggggattggggggtagcagtagcaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaatccaaaatllcgggtttattacaggg
acagcagagatccagtttgggtatcgagtttaccactccctatcagltgatagagaaaagtgaaagtcgagttt
accactccctatcagltgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagltgatagagaaaagtg
aagtcgagtttaccactccctatcagltgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagltga
gagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagltgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactcc
tactagltgatagagaaaagtgaaagtcgagctcggtaccgggtcgagtaggcgtgtacggtagggagggcctat
ataagcagagctcgtttagltgaaccgtcagatcgcttgagagacgccatccacgctgttttgacctccatagaa
gacaccgggacggatccagcctccgcgccccgaattaccATGGAAAGCTCTGCCAAGATGGAGAGCGGCGGC
GCCGGCCAGCAGCCCCAGCCGCAGCCCCAGCAGCCCTTCTTGCCGCCCGCAGCCTGTTTCTTTGCCACGGCCG
CAGCCGCGGGCCGCAGCCGCCGCAGCGGCAGCGCAGAGCGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGGCGCCGCAGCTGAGACCGGCGGCCGACGGCCAGCCCTCAGGGGGCGGTCAACAAGTCAGCGCCCAAG
CAAGTCAAGCGACAGCGCTCGTCTTCGCCCGAACTGATGCGCTGCAAAACGCCGGCTCAACTTCAGCGGCTTTG
GCTACAGCCTGCCGCAGCAGCAGCCGGCCGCCGTGGCGCGCCGCAACGAGCGCGAGCGCAACCGCGTCAAGTT
GGTCAACCTGGGCTTTGCCACCCCTTCGGGAGCACGTCCCCAACGGCGCGGCCAACAGAAGATGAGTAAGGTG
GAGACACTGCGCTCGGCGGTGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAGCATGACGCGGTGAGCG
CCGCTTCCAGGCAGGCGTCTGTGCCCCACCATCTCCCCAACTACTCCAACGACTTGAACCTCATGGCCGG
CTCGCCGGTCTCATCTACTCGTCGGACGAGGGCTCTTACGACCCGCTCAGCCCCGAGGAGCAGGAGCTTCTC

[図1-2-2]

GACTTCACCAACTGGTTCTGAaattcgatatacaagcttategataatcaaccctcggattacaaaatttctga
 aagattgactggatttcttaactatgttgcctcttttacgctatgaggatacgcctgcttaalgcccttctgat
 catgctattgcctcccgatggccttcaatcttctctctcttctataaaatccctggctgctctcttctatgagg
 agttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtggtgtgcacgtgtgttctgacgcaacccccacgggtgggg
 cattgccaccacctgtcagctctcttccgggacttctgcttctccccctccctatggccacggcggaactcacc
 gccgctgccttggccgctgtcggacaggggctcggtctgttgggcacgacaattccgtgggtgttctggggga
 aatcactgctcttcttggcgtcctgctgcttggccacctggattctgcgcgggagcctctctgctacgt
 ccttctggccctcaatccagcggaacctctcttcccgcgccctgtcggcgctctgcggcctctctcgcgctctt
 cgccttctggccctcagacgagtcggatctctcttggggcgccctccccgcacgataaccgtcgacctcgagacc
 tagaaaaacatggagcaatcacaaagtagcaatcacagcagctaccaatgcctgattgtctggcttagaagcaca
 agaggaggaggaggtgggttttccagtcacacctcaggctacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgta
 gactttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatalact
 ttgactgttggaacttaccacacacaaggctacttctctgattggcagaactacacaccagggccagggatcag
 atatccactgaccttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagcaagagaaggtagaagaagccaatgaa
 ggagagaacaccccgctgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacctggagagagaagtaallagag
 ggaggtttgacagcccgcttagcaattctacacatggcccgagagctgcatccggactgtactgggtctctctg
 gttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttg
 ccttgagtgtctcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacctttt
 agtcagtggtgaaaatctcttagcagggcccggttaaaccgcctgactcagcctcgactgtgcttctagttgcc
 agccatctgtgtgttggccctccccgctgcttcttgaacctggaagggtgccactccactgtcttctctta
 ataaaatgaggaaaattgcacgcatgtctgagtaggtgtcattctatctgggggggtgggggtggggcaggac
 agcaagggggaggatgggaagacaatagcaggcatgtctgggatgctgggtgggtctctatggcttctgaggcgg
 aaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgcctgttagcggcgcatlaagcgcggcggtgtgtgt
 ggttacgcgcagcgtgacctacacttggcagcgccctagcgcgcctctcttctgcttcttctctctctt
 ctgcccagcttgcgcggcttctcccgctcaagctctaaatcgggggctctctttaggggtccgatttagtgtct
 tacggcactctgacccccaaaaaacttgattaggggtgattgttctacgttagtgggccatcgccctgatagacgt
 ttttgcctttagcgttggagtcacgttctttaaagtagtgactctgttccaaactggaacaacactcaac
 cctatctcggtctattcttttgattataagggaatttgcgatttccggcctatgggtlaaaaaatgagctga
 ttaacaaaaatttaacgcgaatttaattctgtggaatgtgtgtcagttaggggtgtggaaagtcctccaggtcc
 ccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaatttagtcagcaaccagggtgtggaaagtcctccaggtccc
 cagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaatttagtcagcaaccatagtcctcgcccttaactccgcccct
 cccgccccctaacctcgcccagctcgcgccttctcgcgcctatggctgactaattttttttattatgcagag
 gccgaggccgctctgctctgagctatccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggcttltgca
 aaaagctcccgggagcttcttatctcatttctggatctgactcagcagctgttgacaattaatcctggcatag
 tatctggcatagtataatacagacaaggtaggaactaaacctggccaagttgaccagtgccgttccgggtgc
 tcaccgcgcgcgagctcgcggagcggctcagattctggaccgaccggctcgggtctctccgggacttctgtgga
 ggacgacttgcgcgtgtgtgtcgggacgacgtgacctgttctcagcgcggctccaggaccaggtgtgtgcg
 gacaacaccttgccctgggt
 cgaacttccgggacgctcggggcggccatgaccgagatcggcgagcagccgtggggggcgggagttcgccct
 gcgcgacccggcggaactgcgtgcacttctgtggcgaggagcaggactgacaagctgtacgagattctgat
 tccaccgcgccttctatgaaagggtgggtctcggaactgttctccgggacgcccgtggatgactctccagc
 gcggggatctcatgtgtgagttcttctgcccaccccaactgttttatttgcagcttataatggttacaataaag
 caatagcatcacaatttcaacaataaagcaatttttctactgcattctagtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
 aatgtatcttatacgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaactcatgtgtcatagctgttct
 ctgtgtgaaattgttattcgcctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggg
 tgcctaatgagttagcttaactcacaattaatgt
 tggcagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttctgctattggggcgctcttccgcttctt
 cgtctacgtgactcgtgtgcgtcgggt
 gttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacct

[図1-2-3]

aaaaagccgcgttgcctggcglttttccataggtctcgeccccctgaacagcatcacaaaaatcgacgctcaa
 gtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcglttccccctgggaagctccctcgctgcgtc
 tctgttccgaccccgccgttaccggataacctgtccgcctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcat
 agctcacgctgttaggtatctcagtlcgggtgtaggtcglttgcctccaagctgggcgtgtgtgcacgaacccccg
 ttacgcccgaacgctgcgccttatccggtaactatcgltttaglccaacccggtaagacacgacttatcgcc
 actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagaggtatgttaggcgglgclacagagttcttgaagtgg
 tggcctaactacggctacactagaagaacagttatttgggtatctgcgctcgtcgaagccagttaccilcggaa
 aaagagttggtagctcttgateccggcaaaacaaaccacgcctggtagcgglggtttttttgtttgcaagcagca
 gallacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttagatctttctacggggctcgaacgtcagttggaac
 gaaaactcacgttaagggailllgggtcatgagattatcaaaaaggatcttaccctagatccittttaattaaa
 aatgaagtttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaccttggctcgaacagttaccaatgcttaatacagtga
 ggcacctatctcagcgatctgtctatcttctgttccatagtttgcctgaactccccgctcggtgtagataactacg
 atacggggagggttaccatctggccccagtcgtcgaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatt
 tatcagcaataaaccagccagccgggaaggcgccgagcgcagaagtggctctgcaacillatccgctccatcca
 gtctatlaaillgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcctll
 gctacaggcatcgttgggtgcacgctcgltcglllgggtatggcllcatlccagctccgggttcccaacgatcaaggc
 gagllacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcccgatcgttgtcagaagtaac
 gttggccgcagtgllatcactcatggllalggcagcactgcataattctcttactgtcatgceatecgttaaga
 tgcitttctgtgactgggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtglatgcggcgaccgagllgccltll
 gccggcgctcaatacgggataataccgcgcacatagcagaactttaaaagtgtcctcatcttggaaaacgttct
 ttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgcagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaac
 tcatcttcagcatctlllactllcaccagcglttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaa
 aggaataaaggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttctttttcaatatlaillgaagcatllalca
 gggllallgtctcatgagcggatacataatttgaatgtatllagaaaaataaacaalaggggttccgcgcaca
 tttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccatgggtgcactctcagtlac
 aatctgctctgatgccgcatagttaagccagttatctgctccctgcttgtgtgttggaggctcgctgagtagtgc
 gcgagcaaaalltaagctacaacaaggcaaggcttgaccgac (配列番号2)

[図1-3-1]

aattgcaigaagaatctgcttagggtagggcttttgcgcgtgcttcgcgatgtacggggccagatatagcggtt
gacattgattattgactagittaliaataglaatcaattacgggggtcattagttcalageccatatattggagtt
cegcgttacataacttacggtaaatggccccgcctggctgaccgccccaaacgacccccgccccattgacgtcaata
atgacgtatgttcccataglaacgccaatagggactttccattgacgtcaaalgggtggagttatttacgglaaa
ctgcccacttggcagtlacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatg
gccccctggcatttatgcccagtlacatgaccttatgggactttcctacttggcagtlacatctacgtallagtc
atgcctattaccatgggtgatgcggttttggcagtlacatcaatgggcgtggalagcggtttagctacggggat
ttccaagtcctccaccccatgacgtcaaalgggagtttgttttggcaccaaaaatcaacgggactttccaaaatg
tcgtlaacaactccgccccattgacgtcaaalgggcgttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagcgcg
ttttagccgttactgggtctctctgggttagaccagatctgagccgtgggagctctctggctaaactagggaaacca
ctgcttaagcctcaataaagcctggccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggta
actagagatccctcagaccccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgggcgccgaacagggacttga
gcgaaagggaaaccagaggagctctctcagcgcaggactcggcttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgagg
ggcgcgacgtgtgagtlacgccccaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt
cagtaataagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaatccggttaagggcagggggaaagaaaaaatat
aaattaaaacatatagttatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatccctggcctgttagaaacat
cagaagcctgttagacaaatctgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcatt
alatalacagtagcaacccctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagccttagac
aagatagaggaagagcaaaacaaaaglaagaccaccgcacagcaagcggccgcgtgacttcagacctggagga
ggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaatigaaccattaggagtag
caccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtggggaataggagctttgttcccttg
gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgtgacggtlacaggccagacaattattg
tctggtatagtgacgcagcagaacaatttgcgtgagggctattgagggcgaacagcactcgttgcaactcacag
tctggggcactcaagcagctccaggcaagaatccctggctgttgaaagataccataaggatcaacagctccctggg
gatttgggggttgcctctggaaaactcaatttgcaccactgctgtgcttgggaatgctagttggagtaataaatct
ctggaacagatttgggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaaatlaacaattacacaagcttaatac
actccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattatttgggaattagataaatgggc
aagtttgtggaattgggttlaacataacaaaatggcctgtggtatataaaaattatcataatgatagtaggagc
ttggtaggtttaagaatagtttttgcgtgactttctatagtgaaatagagtttaggcagggaattaccattat
cglttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaaggaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgatttagtgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaatggcagtl
attcatccacaatttttaaaagaaaaggggggatttggggggtacagtgccaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaacataaagaattacaaaaacaaatlaaaaaatttccgggtttattacaggg
acagcagagatccagtttggttatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactcc
talcagtgatagagaaaagtgaagtcgagctcggtlaccgggtcgagtaggcgtgtacgggtgggagggcctat
ataagcagagctcggtttagtgaaccgtcagatcgcttggagacgccatccacgctgttttagacctccatagaa
gacaccgggacggatccagcctccgcggccccgaattaccATGAGACAGAGCGGCGCCTCCAGCCCCTGCTG
ATCAACATGTACCTGCCAGATCCCGTCGGAGACGGTCTCTTCAAGGACGGGAAGAACCCGAGCTGGGGGCCG
TGAGCCCCGCGGTTTCAGAAAGGCAGCGGACAGATCCAGCTGTGGCAGTTTCTGCTGGAGCTGCTGGCTGACCG
CGCGAACGCCGGCTGCATCGCGTGGGAGGGCGGTACGGCGAGTTCAAGCTCACGGACCCGGACGAGGTGGCG
CGGCGGTGGGGCGAGCGCAAGAGCAAGCCCCAACATGAACACGACAAGCTGAGCCGCGCCCTGCGCTACTACT
ACGACAAGAACATCATGAGCAAGGTGCATGGCAAGCGCTACGCCTACCGCTTCGACTTCCAGGGCCTGGCGCA
GGCCTGCCAGCCGCCGCCGCCGCGCACGCTCATGCCGCCGCCGAGCTGCTGCCGCCGCCGCGGCCGCCAGGAC
GGCGCGCTCTACAAGCTGCCCGCGCGCCTCGCCCCGCTGCCCTTCCCCGGCCTCTCCAACTCAACCTCATGG
CCGCCTCGGCCGGGTGCGCGCCCGCGGCTTCTCCTACTGGCCGGGCCCGGGCCCCCGCCGCCACCGCTGCCGC
CGCCACCGCCGCGCTCTACCCAGTCCCAGCTTGACGCCCCCGCCGGGCCCTTCGGGGCCGTGGCCGACGC

[図1-3-2]

TCGCACTTGGGGGGCCATTACCACTAGaattcgatatacaagcattatcgataatcaacctctggattacaaaal
 ttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgcctcclllacgctatgtggatacgcctgcllilaatgcct
 ttgtatcatgctatltgccllcccgataggctttcattttctctctcttgtataaaacctgggttgcctgctctt
 atgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgtgcactgtgttgcctgacgcaacccccactgg
 ttggggcatlgtccaccacctgtcagccttltccgggactttcgctltccccctccctattgtccacggcgga
 ctcatcgccgcctgccttgccegcctgtcaggacaggggctcggtgtlgtgggcactgacaattccgtgggtgtgt
 cggggaaatcctgctcclllccctlgtgtcgcctgtgttgcceactggattctgcgcgggacgclcttctg
 clacgtcccttgggcccctcaatccagcggaccllctltcccgcgccctgtcgtccggctctgcggcctctlccg
 cgtcttgcctltgcctctcagacgagtcggatctcccttltgggcgcctccccgcctcgataccgtcgacctc
 gagacctagaaaaacatggagcaatcacaaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctaga
 agcacaagaggaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtaccttlaagaccaatgacttacaaggca
 gctgtagatcttagccactllltaaaagaaaaggggggactggaagggttaattcacctcccaacgaagacaag
 atactcttgatctgtggatctaccacacacaaggtacttccctgattggcagaactacacaccaggggccagg
 gatcagatatacctgaccttltggatgggtgttacaagctagtaccagltgagcaagagaaggtagaagaagcc
 aatgaaggagagaacacccgcctgttacacctgtgagcctgcctgggatggatgacccggagagagaaglat
 tagagtggaggtltgacagccgcctagcatttcatcacatggccccgagagcgtgcalccggactgtactgggtc
 lclctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaccctgcttlaagcctcaataa
 agcttgccttgagtgtctcaagtagtgtlgtcccgctgtlgtlgtgactctggtaactagagatccctcagac
 cllltagtctagttgtgaaaatctctagcagggcccggtttaaaccgcctgatacagcctcgactgtgcctlcl
 gttgccagcctctgtlgtlgtccctcccccgctgccttcttgcacctggaagggtgccactccctgtctct
 tltctaaataaaatgaggaaaattgcctcgcattgtctgagttaggtgtcaltctaltcltgggggggtgggggtggg
 caggacagcaagggggaggatltgggaagacaatagcaggcatgtcgtgggatgcgggtgggtctctatggcttctg
 aggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgcctgttagcggcgcatlaagcgcggcggg
 tgtgggtgtltagcgcagcgtgacccgtacactltgccagcgccttagcgcgcctctcttctgccttcttccct
 tcttltctgcacgtltgcgcggcllccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttaggggttccgattt
 gtgtlttaccggcactctgacccccaaaaaacttgatttaggggtgattgttccagtagtgggcatcgccctgala
 gacgggttttgccttltgacgtltggagltccaggtlcltlaatagltggactcllgtlccaaactggaacaaca
 ctcaacctatctcggtctattcttltgatitataagggttttgcgcgatttccggcctattgggttaaaaaatg
 agctgattttaaataaaatlttaacgcgaaltlaaltcltltggaatgtlgtlgtcaglttaggggtgtggaaagtcccc
 ggtccccagcaggcagaagtagtcaaaagcatgcactctcaatttagtcagcaaccagggtgtggaaagltccccag
 gcctccccagcaggcagaagtagtcaaaagcatgcactctcaatttagtcagcaaccatagtccegcgccttaactcc
 gcccctccgcgccttaactccgcgcagttccgcgcctctctccgcgcctatggctgactaaatlllcllcllcll
 gcagaggccgagggcgctctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttltggaggcctaggct
 tltgcaaaaagctccccgggagcttgtatataccatttccggatctgatacagcaggtgtgacaattaatcatcg
 gcatagtagtatacgccatagtagtataatcagacaaggtaggaactaaacctaggccaagttgaccagtgccgtt
 cgggtgtcaccgcgcgcgacgtlccgggagcgggtcgagttctggaccgacgggtcgggttctccccgggactt
 cgtggaggagcagcttgcgcgggtgtlgtlccgggacgacgtgacctgtlctcagcgcggltccaggaccagggtg
 gtgcgggacaacaccttggcctgggtgtlgtlgtgcggcctggacgagcgtgacgccgagtggtcggagggtcg
 gtgccacgaacttccgggacgcctccgggcccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtlgggggcccgggagtt
 cgccttgcgcgacccggcggcaactgcgtlgtcacttctgtggccgaggagcaggactgacacgtlgtacgagat
 ttcgattccaccgcgccttctatgaaagggtgggttccggaatcggttltccgggacgccggctggatgatacc
 tccagcgcggggatctcatgtgtggagttcttgcgccaccccaacttgtttattgcagcttataatgggttaca
 alaaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttctactgcattctagttgtgtgttltgtccaaa
 ctcatcaatgtatcttatactgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcglaatcatgggtcatagc
 gtlttctgtgtgaaattgtttatccgtctacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagc
 ctgggggtgcctaatgagttagctaaactcacalttaattgcgtlgtcgtctcactlccccgtlccagtcgggaaac
 ctgtcgtlgtcagctgcatttaattgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttltgcgtattgggcgtcttccg
 ctltctcgtcactgactgcctlgtcgtcgttgcgtlgtcggcgagcgglatcagctcactcacaaggcggt
 aataggttataccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagg

[図1-3-3]

aaccgtaaaaagggcggttgctggcglttttccataggetccgccccctgacgagcaicacaaaaatcgac
gctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagalaccaggcglttccccctggaagctccctcgt
gcgtctcctgttccgacccctgccgcltaccggataacctgtccgcctttctcccllccgggaagcgtggcgctt
tctcatagctcaecgtgtaggtatctcagttccgggtgtaggctcgllcgctccaagctgggctgtgtgcacgaac
ccccgltcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgctcttgaglcacaacccggtaagacacgactt
atcgccactggcagcagccactggtaacaggallagcagagcgaggatgttaggcgggtgtacagagltcttg
aaglggtggcctaactacggctacactagaagaacagtaatttgggtalcgtcgctctgtcgaagccagttacct
tcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgcgtggtagcggltggtttttttgtttgcaa
gcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggctcgaecctcag
tggaacgaaaaactcaggttaagggttttgggtcatgagattalcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa
attaaaaatgaagtttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaccttgggtcagacagttaccaalgcclaat
cagtgaggcaccttatctcagcgatcgtctatllcglttcatccatagttgcccgtgactccccgtcgtgtagata
actacgatacggggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctc
cagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgcagaagtggtccctgcaactttatccgcctc
catccagctctatlaattgttggcggaagctagagtaagtagttcgccagttaataglllgegcacagttgtt
gccattgctacaggcatcgltggltgcacgcctcgltglttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgat
caaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctcccllccgltcctccgatcgttgtcag
aaglaagttggcgcgagtggttatcactcatgggtatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatcc
gtaagatgcttttctgtgactgggtgagtaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagtt
gctcttggccggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaa
acgttcttccggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccacactcgtgca
cccaactgatcttcagcactctttactttcaccagcglttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg
caaaaaagggaataagggcgacacggaaatgltgaatactcatactcttctttttcaatatattatgaagcat
ttatcagggttattgtctcatgagcggatacataattgaatgtatttagaaaaataaacaatatagggtlccg
cgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgaaggatcgggagatctcccgatccccatgggtgcactct
cagtacaatctgctctgaltgccgcatagttlaagccagtaatcgtctccctgcttgggtgttggaggctcgtgag
tagtgccgagcaaaaattlaagctacaacaaggcaaggcttgaccgac (配列番号 3)

[図1-4-1]

aattgcatgaagaatctgcttagggtagggcttttgcgcctgcttcgcgatgtacggggccagatatacgcgtt
gacattgattatlgactagittatataataglaaatcaattacgggggtcattagttcalageccatataatggagtt
ccgcgttacataacttacggtaaalggccccctggctgaccgcecaacgacccccgcccattgacgtcaata
algaegtatgttcccatagtaacgccaatagggacttccattgacgtcaatgggtggagtatattacggtaaa
ctgcccacttggcagtaacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatg
gccccctggcattatgcccaglacatgaccttattgggaacttctctacttggcagtaacatctacgtallagtc
atcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtaacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggat
tcccaagtcctccaccccatgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatg
tcgtaaaactccgccccallgacgcaaalgggcggtaggcgtgtacggtagggaggtctatataagcagcgcg
ttttgcctgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagccgggagcctctggctaactagggaaacca
ctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgtctcaagttagtgtgtgcccgtctgttgtgtgaccttggt
actagagatccctcagaccttttagtcagttggaaaatctctagcagtaggcgcccgaacagggacttgaaa
gcgaaagggaaccagaggagcctctctgacgcaggactcggttgcctgaagcgcgacaggcaagaggcgagg
ggcgcgactggtagtagtgcgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt
cagttatgaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaallcggtlaagggcagggggaaagaaaaaatat
aaallaaaacatatagttatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatccctggcctgttagaaacat
cagaaggctgttagacaaatactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataalacagtagcaacccctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaaagacaccaaggaagctttagac
aagatagaggaagagcaaaacaaaaglaagaccaccgcacagcaagcgcccgctgatcttcagacctggagga
ggagatatgagggacaattggagaagtgaaattatataataataaagttagtaaaaattgaaccattaggagtag
caccaccaaggcaagagaagagtaggtgcagagagaaaaaagagcagtagggaataggagcttcttcccttgg
gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtagggccagacaattattg
cttgggtatagtgcagcagcagaacaatttgcctgagggctattgagggcgaacagcatctgttgcacacag
cttggggcatcaagcagctccaggcaagaatccctggctgtggaaagataacctaaaggatcaacagctccctggg
gatttgggggttgccttggaaaactcatitgcaccactgctgtgcttggaaatgctagttggagtaataaatct
ctggaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaallacaattacacaagcttaatac
actccctlaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaattgaacaagaattattggaattagataaatgggc
aagtttgtggaattgggtttaaataacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggggc
ttggtaggtttaagaatagtttttgcctgacttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattat
cgtttcagaccaccctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaaggaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgattagtgaaaggatcggcactgctgtcgccaattctgcagacaaatggcagt
attcatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgccaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaaatttccgggttattacaggg
acagcagagatccagtttgggtatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccct
tatecagtgatagagaaaagtgaagtcgagctcggttaccgggtcgagtaggcgtgtacggtagggagggctat
ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcttggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaa
gacaccgggacggatccagcctccgcgccccgaattaccATGCTGGGAGCGGTGAAGATGGAAGGGCACGAG
CCGTCCGACTGGAGCAGCTACTATGCAGAGCCCGAGGGCTACTCCTCCGTGAGCAACATGAACGCCGGCCTGG
GGATGAACGGCATGAACACGTACATGAGCATGTGCGGGCCGCCATGGGCAGCGGCTCGGGCAACATGAGCGC
GGGCTCCATGAACATGTCGTCGTACGTGGGCGCTGGCATGAGCCCGTCCCTGGCGGGGATGTCCCCGGCGCG
GGCGCCATGGCGGGCATGGGCGGCTCGGCCGGGGCGGGCGGCGTGGCGGGCATGGGGCCGCACTTGAGTCCCA
GCCTGAGCCCGCTCGGGGGGCAGGCGGCCGGGGCCATGGGCGGCTGGCCCCCTACGCCAACATGAACTCCAT
GAGCCCCATGTACGGGCAGGCGGGCCTGAGCCGCGCCCGGACCCCAAGACCTACAGGCGCAGCTACACGCAC
GCAAAGCCGCCCTACTCGTACATCTCGCTCATCACCATGGCCATCCAGCAGAGCCCCAACAAAGATGCTGACGC
TGAGCGAGATCTACCAAGTGGATCATGGACCTCTTCCCCTTCTACCGGCAGAACCCAGCAGCGCTGGCAGAACTC
CATCCGCCACTCGCTCTCCTTCAACGACTGTTTCTGAAGGTGCCCGCTCGCCCGACAAGCCCGGCAAGGGC

[図1-4-2]

TCCTTCTGGACCCCTGCACCCCTGACTCGGGCAACATGTTTCGAGAACGGCTGCTACCTGCGCCGCCAGAAGCGCT
 TCAAGTGGCAGAAGCAGCTGGCGCTGAAGGAGGCCGCGAGGCCGCCGCCGCGCAGCGGCAAGAAGGCGGCCGCCGG
 GGCCAGGCCTCACAGGCTCAACTCGGGGAGGCCGCCGGGCCGCCCTCCGAGACTCCGGCGGGCACCAGAGTCG
 CCTCACTCGAGCGCCTCCCCGTGCCAGGAGCACAAGCGAGGGGGCCTGGGAGAGCTGAAGGGGACGCCGGCTG
 CGGCGCTGAGCCCCCAGAGCCGGCGCCCTCTCCCGGGCAGCAGCAGCAGGCGCGGCCACCTGCTGGGCCC
 GCCCCACCACCCGGGCCTGCCGCCTGAGGCCCACCTGAAGCCGGAACACCACTACGCCTTCAACCACCCGTTT
 TCCATCAACAACCTCATGTCTCGGAGCAGCAGCACCACCACAGCCACCACCACCAGCCCCACAAAATGG
 ACCTCAAGGCCTACGAACAGGTGATGCACTACCCCGGCTACGGTTCCCCCATGCCTGGCAGCTTGGCCATGGG
 CCCGGTCACGAACAAAACGGGCCTGGACGCCTGCCCCCTGGCCGCAGATACCTCTACTACCAGGGGTGTAC
 TCCCGGCCCATATTGAACCTCTCTTAAaattcgatatcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaat
 ttgtgaaagattgactggatatttlaactatgtttgctctttttacgctatgtggatacgttgccttlaaigcct
 ttgtatcatgtatttgccttccgctatggctttcattttctctctcttctgtataaaacctggttgctgtctcttt
 atgaggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgggtgtgcactgtgtttgtctgacgcaacccccacgtg
 ttggggcatgtccaccacctgtcagctcctttccgggaclllccgtttccccctccctattgccacggcgga
 ctcategcgcgcttgccttgcgcgtgtctggacaggggtcggcgtgttgggcactgacaallccgltggtgtgt
 cggggaaatcatgtcctttcttggctgtctgcctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtctctctg
 ctacgtccttctggccctcaatccagcggaaccttcttccgcggcctgtctgcggctctgcggcctcttccg
 cgtcttgccttgcgcctcagacgagtcggatctccttttgggcgccttccccgcctcgataccgtcgacctc
 gagacctagaaaaacatggagcaatcacaaagtagcaalacagcagctaccaatgtctgattgtgcctggctaga
 agcacaagaggaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgacttacaaggca
 gctgtagatcttagccactllltaaaagaaaaggggggacgtggaagggtlaattcacctcccaacgaagacaag
 atactcttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattggcagaactacacaccaggggccagg
 galcagatactccactgaacctttggatgggtctacaagctagtaccagttgagcaagagaaggtagaagaagcc
 aatgaaggagagaacaccccgcttgttacacctgtgagcctgcattgggatggatgacctggagagagaagtat
 tagagtggaggtttgacagccgccttagcatttctacatggccccgagagctgcaltccggactgtactgggtc
 tctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacctagggaaccacctgtcttaagcctcaataa
 agcttgccttgagtgtctcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagac
 ccttttagtcagttgtgaaaaatctctagcagggccccgtllaaaccccgctgactcagcctcagctgtgccttcta
 gttgccagccatctgtgttttgccttcccccgctgccttcttgaacctggaagggtgccactcccaactgtcct
 ttccataaaaaatgaggaaaattgcategcattgtctgagtaggtgtcattctctatcttgggggggtgggggtgggg
 caggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcagggcatgtctggggatgcggltgggtctctatggctctg
 aggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgcctttagcggcgcatlaagcgcgggcggg
 tglgtgtgttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcacgcgccttagcgcgcgccttcttctcttcttcttct
 tcttctctgcacggttgcgcgccttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttaggggtccgattta
 gtgttttacggcacctcgacccccaaaaaacttgatttaggggtgattgttcaagtagtgggcatcgccctgata
 gacgglllctgccttttgacgttggagtcacgttctlltaatagttggactcttlttccaaactggaacaaca
 ctcaacctatctcggtctattcttttgatttataagggaattttgcgatttccggcctatttggttaaaaaatg
 agctgattttaaaaaaatttaacgcgaatttaattctgttggaaatgtgtgtcagtttaggggtgtggaaagtcccc
 ggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattctcaattagtcagcaaccagggtgtggaaagtccccag
 gctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcattctcaattagtcagcaaccatagtccegccectaaactcc
 gccatccccgccectaaactccgcceagttccgcceattctccgccecatggctgactaattttttttattttat
 gcagaggccgagggcgctctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctlllgtggagccctaggct
 ttgtcaaaaagcttccgggagcttgtatataccatttccggaatctgacagcagctgttgacaatttaateatcg
 gcatagtatatcgccatagttataatacagacaagggtgaggaactaaacctggccaagttgaccagtgccgttcc
 cggltgtcaccgcgcgcgacgttgcgcggagcgggtcaggttctggaccgacggctcgggttcttccgggactt
 cgtggaggacgacttgcgcgggtgtgtgtcgggacgacgtgacctgttctcagcgcgggtccaggaccagggtg
 gtgccggacaacaccttggcctgggtgtgtgtgtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagltgggtcggagggtcg
 gtgccacgaacttccgggacgcttccgggccccggaatgaccgagatcgggcagcagccgtggggggcgggaggtt
 cgccctgcgcgacccggcggaactgcgtgcacttctgtggccgaggagcaggactgacacgtgtctacagat

[図1-4-3]

ttccgattccaccgcccgccttctatgaaaagggtgggccttcggaatcgltttccgggacgcccggctggatgateg
 tccagcgccgggagtcctcatgctggagttcttcgcccaccccaactlglilaligcagcttataatgggttaca
 ataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcaattttttccactgcattctagllgtgggttltgccaaa
 ctcacatcaatgtatcttatacatgtctgtataaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatgggtcalagc
 tgtttccctgtgtgaaattgttatccgctcacaaattccacacacatacagagccgggaagcataaagtgtaaagc
 ctgggggtgcctaaatgagtgagctaacacatttaattgctgttgcgtcactgcctccgctttccagtcgggaaac
 ctgtcgtgcagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcggttltgcgtattgggcgctcttccg
 ctctctgcgtcactgcactgcgtgcgtcgggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggt
 aatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccagg
 aaccgtaaaaaggccgcgttgcctggcggtlililccalaggctccgccccccctgacgagcatcacaaaaatcgac
 gctcaagtcagaggtggcgaaaccccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaaagctccctcgt
 gcgtctctctgttccgacctgcgcgttaccggalacctgltccgcttltccccctcgggaagcggtggcgctt
 tctcatagctcacgctgttaggtatctcagttcgggtgttaggtcgttgcgtcccaagctgggctgtgtgcacgaac
 cccccgttcagccccgaccgtgcgccttataccggtaactatcgtcttgagtcacaaccggtaagacacgactt
 atcgccacttggcagcagccacttggtaacaggatllagcagagcgaggtaatglaggcggtgtctacagagttcttg
 aagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagttatltgggtatctgcgtctgtctgaagccagttacct
 tccgaaaaaagagttggtagctcttgcagccgcaaacaaaccaccgctggtagcggtgggttttttltgtttgcaa
 gcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttltgaactlililcctacggggctgtacgctcag
 tggaaacgaaaactcaggttaagggtatlttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa
 attaaaaatgaagtttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgtacagttaccaatgcttaal
 cagtgaggcaccatctcagcgatctgtctatlttgcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagata
 actacgatacgggagggcttaccatctlggccccagtgctgcaatgataaccgcgagacccacgctcaccggctc
 cagatttatacagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgcagaagtggtccctgcaactttatccgctc
 calccagctctalilalilgtlgtccgggaagctlagaglaagtlagltccgagtliaatagltlgtcgcaacgtlgtt
 gccattgtctacagggcatcgttgggtgtcagctcgtcgttltgggtatggcttcatcagctccgggttcccaacgat
 caaggcgagttacatgatecccccatgtlgtgcaaaaaagcggttagctctctcgggtcctccgagctgtgtcag
 aagtaagttggccgcagtggttatcactcatgggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatcc
 gtaagatgcttttctgtgactgggtgagtaactcaaccaagtcattcttgagaatagtgatgcggcgaccgagtt
 gctctltgccccggcgtcaatacgggataataccgcgcacalagcagaactltaaaagtgtctcatcatltggaaa
 acgttcttccggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgtca
 cccaactgatcttcagcatcttttacttccaccagcggttcttgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg
 caaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttctcttttcaatattattgaagcat
 ttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggggttccg
 cgcacatltccccgaaaagtgcaccctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccctatgggtgcactct
 cagtacaatctgtctctgatgcgcagtagttaagccagttatctgtctccctgcttgtgtgttggagggtcgtgtgag
 tagtgcgcgagcaaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgcaccgac (配列番号4)

[図1-5-1]

aattgcatgaagaatctgcttagggtagggcttttgcgcctgcttcgcgatgtacggggccagatatagcggtt
gacattgattatigactagttatataagtaaatcaattacgggggtcattagttcatagcccatatattggagtt
ccgcgttacataacttacggtaaatggccccctggctgaccgccccacgacccccgcccaattgacgtcaata
atgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggaggagattttacggtaaa
ctgcccacttggcagtaacatcaagtgatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatg
gccccctggcattatgcccagtaacatgaccttatgggaccttccctacttggcagtaacatctacgtatttagtc
ategctatttaccatggtagtgcggttttggcagtaacatcaatgggcgtggatagcgggttggactacggggat
ttccaaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggaccttccaaaatg
tcgtacaacctccgccccattgacgcaaatgggcggtagggcgtgacggtagggaggtctatataagcagcgcg
ttttgcctgtactgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacatagggaaccca
ctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtggtgctgccccgtctgttgtgtgactcttggt
actagagatccctcagaccttttagtcagtgtaggaaaatctctagcagtgggcggccgaacagggaacttga
gcgaaagggaaccagaggagctctctcagcgcaggactcggttgcgtgaagcgcgcacggcaagaggcgagg
ggcgcgactggtagtagtgcgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt
cagttatlaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaagaaaaaata
aaattaaaacatatagttatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatccctggcctgttagaaacat
cagaaggctgttagacaaatactgggacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataatacagtagcaacctctatgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagac
aagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccacgcacagcaagcggccgctgacttccagacctggagga
ggagatatgagggacaattggagaagtgaaatataataataaagtagtaaaaatgaaccattaggagtag
caccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgagggaataggagctttgttcccttg
gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtagggccagacaattattg
tctgggtatagtgacgagcagaacaatttgcctgagggctattgagggcgaacagcactctgttgcacacacag
tctggggcatcaagcagctccaggcaagaatccctggctgttgaaagataacctaaaggatcaacagctccctggg
gatttgggggttgccttggaaaaactcaatttgcaccactgctgtgcttgggaatgctagttggagtaataaatct
ctggaacagatttgggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaaattaacaattacacaagcttataac
actccctlaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattatttgaattagataaatgggc
aagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggc
ttggtaggtttaagaatagtttttgcctgactttctatagtgaaatagagttaggcagggataattcaccattat
cgttcagacccaccleccaaccccgaggggacccgacagggccgaagggaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgattagtgaaaggatcggaactgcgtgcgccaattctgcagacaaatggcagt
attcatccacaallllaaaagaaaaggggggallggggggtagcagtgaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttccgggttatttacaggg
acagcagagatccagtttggttatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtg
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactcc
talcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagctcggtaccgggtcgagtagggcgtgtacggtagggaggcctat
ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcttgagacgccaatccacgctgttttgacctccatagaa
gacaccgggacggatccagcctccgcgccccgaattaccATGGAGGTGGCGCCCGAGCAGCCGCGCTGGATG
GCGCACCCGGCCGTGCTGAATGCGCAGCACCCCGACTCACACCACCCGGGCCTGGCGCACAACTACATGGAAC
CCGCGCAGCTGCTGCCTCCAGACGAGGTGGACGTCTTCTTCAATCACCTCGACTCGCAGGGCAACCCCTACTA
TGCCAACCCCGCTCACGCGCGGGCGCGCTCTCTACAGCCCCGCGCACGCCCGCCTGACCGGAGGCCAGATG
TGCCGCCACACTTGTGTCACAGCCCGGGTTTGGCTGGACGGGGGCAAGCAGCCCTCTCTGCCGCTG
CGGCCACCAACACAACCCCTGGACCGTGAGCCCCCTTCTCAAGACGCCACTGCACCCCTCAGCTGCTGGAGG
CCCTGGAGGCCACTCTCTGTGTACCCAGGGGCTGGGGGTGGGAGCGGGGAGGCAGCGGGAGCTCAGTGGCC
TCCCTACCCCTACAGCAGCCCACTCTGGCTCCCACTTTTCGGCTTCCCAACCCACGCCACCCAAAGAAGTGT
CTCCTGACCCTAGCACACGGGGGCTGCGTCTCCAGCCTCATCTTCCGCGGGGGGTAGTGCAGCCCGAGGAGA
GGACAAGGACGGCGTCAAGTACCAGGTGTCACTGACGGAGAGCATGAAGATGGAAAGTGGCAGTCCCTGCGC

[図1-5-2]

CCAGGCCTAGCTACTATGGGCACCCAGCCTGCTACACACCACCCCATCCCCACCTACCCCTCCTATGTGCCGG
 CGGCTGCCCACGACTACAGCAGCGGACTCTTCCACCCCGGAGGCTTCCTGGGGGGACCGGCCTCCAGCTTCAC
 CCCTAAGCAGCGCAGCAAGGCTCGTTCCTGTTTCAAGAGCCGGGAGTGTGTCAACTGTGGGGCCACAGCCACC
 CCTCTCTGGCGGGCGGGACGGCACCAGGCTACTACCTGTGCAATGCCTGTGGCCTCTACCACAAGATGAATGGGC
 AGAACCGACCACTCATCAAGCCCAAGCGAAGACTGTGCGCCGCCAGAAGAGCCGGCACCTGTTGTGCAAATTG
 TCAGACGACAACCACCACCTTATGGCGCCGAAACGCCAACGGGGACCCCTGTCTGCAACGCTGTGGCCTCTAC
 TACAAGCTGCACAATGTTAACAGGCCACTGACCATGAAGAAGGAAGGGATCCAGACTCGGAACCGGAAGATGT
 CCAACAAGTCCAAGAAGAGCAAGAAAAGGGCGGAGTGTTCGAGGAGCTGTCAAAGTGCATGCAGGAGAAGTC
 ATCCCCCTTCACTGCAGCTGCCCTGGCTGGACACATGGCACCTGTGGGCCACCTCCCGCCCTTCAGCCACTCC
 GGACACATCCTGCCCCTCCGACGCCCATCCACCCCTCCTCCAGCCTCTCCTTCGGCCACCCCCACCCGTCCA
 GCATGGTGACCGCCATGGGCTAGaaticgatatcaagcttatcgataateaacctctggattacaaaatttgt
 gaaagattgactggatttcttaactatgttgcctcttttaegetatgtggatacgccttcttaaatgcttttgt
 atcatgctattgtcttccgctatggctttcatttctctctcttgtatataatcttggttgcctgtctcttcttctga
 ggagtttgtgcccgttgtcaggcaacgttggtgtgtgcactgtgtttgtcagcaacccccacttggttgg
 ggcattgccaccacctgtcagccttctccgggacttctgcttccccctccctatttgccacggcggaactca
 tcgcccgttgccttgcctgtgtcaggacaggggtcggcgttgtgggcactgacaattccgttggtgttgtcggg
 gaaatcactgcttcttcttggctgtctgctgtgttgcacctggattctgctgaggagcttcttctgtctac
 gtccttctggccctcaatccagcgaccttcttctccggcgcttctgctgctgctgctgcttcttctgctgct
 tctgcttctgcttctgctgctgctgctgcttcttctgctgcttcttctgctgcttcttctgctgcttcttctgct
 cctagaaaaacatggagcaalcacaagtagcaatcacagcagctaccaatgctgatgtgtcttggcttagaagca
 caagaggaggaggagggtgggttttccagtcacacctcaggtacctttaaagaccaatgacttacaaggcagctg
 tagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatat
 ccttgatctgtggatctaccacacacaaggctaccttcttgattggcagaactacacaccaggggcagggtac
 agatctccactgacctttggatgggtgtctacaagcttagtaccagttgagcaagagaaggtagaagaagccaatg
 aaggagagaacacccgcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacctggagagagaagttataga
 gtggaggtttgacagccgcttagcatctcactacatggcccagagagctgcatccggactgtactgggtctctc
 tgggttagaccagatctgagcctgggagctctctgtgcttaactaggaacecactgcttaagcctcaataaagct
 tgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacctt
 ttagtcagtgtggaaaatctcttagcaggggcccgtttaaacecctgctgagcctgagctgtgcttcttagttg
 ccagccatctgttgttttggccccccccgtgcttcttggaccttggaagggtgcccactcccactgtcttctc
 taataaaatgaggaaattgcatcgcatgtgtgagtaggtgtctattcttctggggggtgggttggggcagg
 acagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcaatgtggggaatgggtgggtctctatggcttcttaggc
 ggaaagaaccagctggggctctagggggtatccccacgcgcccgttagcggcgcatlaagcggcggggtgtg
 gtggttacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgccttagcggcgctcttctgcttcttcttcttcttct
 tctctgccaagttctgcccgttctccccgtcaagctctaaatcgggggcctccctttaggggttccgatttagtgc
 ttacggcaccctgacccccaaaaaacttgattaggggtgattgttctacgtagtgggcatcgccctgatagacg
 gttttctgcccctttgacgttggagtcacgttctttaaagtagtgagctctgttccaaactggaacaacactca
 accctatctcggtctatcttttgaattataagggttttggcgatttgggctatgggttaaaaaatgagct
 gatttaacaaaaatttaacgcgaattaatctgttggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtcctccaggct
 cccagcaggcagaagtagtcaaagcatgcatctcaatttagtcagcaaccagggtgtggaaagtcctccaggctc
 cccagcaggcagaagtagtcaaagcatgcatctcaatttagtcagcaaccatagtcctcccccctaacctccgccc
 atccgccccctaacctccgcccagttccgcccattctccgcccctatggctgactaattttttttatattatgcag
 aggcagaggcgcctctgctctgagctattccagaagtagtgaggaggttttttggaggttaggttttgg
 caaaaagctccgggagcttgtatataccatttctggatctgactgacagctgttgacaattaatcatcggcatt
 agtatatcggcattagtataatacagacaagggtgaggaactaaaccttgcccaagttgaccagtgccgttccggt
 gctcaccgcgcgcagctcgcggagcggtcgagttctggaccgaccggctcgggttctccgggacttctgtg
 gaggaagacttctgcccgtgtgtgtcgggacgacgtgacctgttctcagcgcgttcaggaccaggtgtgtg
 cggacaacaccttgccctgggt
 cacgaacttccgggagccttccgggcccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtggggggcgggagttcgc

[図1-5-3]

ctgcgcgacccggcggcaactgcgtgcacitcgtggccgaggagcaggacigacacgtgctacgagatttcg
 attccaccgccccttctatgaaaagggtgggcttcggaatcggttccgggacgcccgtggatgalectcca
 gcgcggggatctcatgcitggagttcttcgcccaccccaacttgtttattgcagcllataatgggttacaataa
 agcaatagcatcacaaatttcacaaaalaaagcatttttttcaactgcattctagttgtgtttgtccaaactca
 lcaatgtatcttcatgtctgtataccgtcgaccctlagclagagcttggcgtaatcatgggtcatagcigt
 tctgtgtgaaattgtttatecgcctacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgg
 gggtccataatgagtgagclaaclcacattaatgtgcgttgcgtctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgt
 cgtgccagctgcattaatgaaicggccaacgcgcggggagagcggttggcgtaattgggcgtcttccgcttc
 ctgcctcactgactgcctgcgtcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggttaata
 cggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaacc
 glaaaaaggccgcgttgcctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctc
 aagtcagaggtggcgaaaccgcaggaactataaagataccaggcggttccccctggaaagctcccctcgtgcgc
 tctcctgttccgacctgcgcctaccggataccgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgcttctctc
 alagctcagctgttaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 cgttcagcccgcacgcctgcgccttaccggtaactatcgtcttgagtcacaaccggtaagacacgacttatcg
 ccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatglaggcggtgclacagagttcttgaagt
 ggtggcctaactacggclacacilagaagaacaglatttgggtatctgcgtctgtctgaagccagttaccttcgg
 aaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgcctggtagcggtgggttttttgtttgcaagcag
 cagattacgcgcagaaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggctgacgctcagttgga
 acgaaaactcaggttaagggatttgggtcaltgagattalcaaaaaggatctcaccatagatccttttaattta
 aaaatgaagtttttaatecaatctaaagtataatagtagtaaaccttggctcagacagtlaccaatgcllaatcagt
 gaggcacclalcacagcagctgtctatcttctgttccatagttgccctgactccccgtcgtgtagataacta
 cgatacggggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccaga
 ttlatcagcaalaaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagttggctcgaacttlatecgctccatc
 cagttctatlaattgttggccgggaagctlagaglaagtagttcgccagtttaatagtttgcgcaacgttgttgcga
 ttgclacaggcactcgtgggtgacgctcgtcgttttgggtatggcttcattcagctccgggttcccaacgatcaag
 gcgagttacatgatecccccatgttltgcaaaaaaagggtttagctcccttcggltccctccgategttgtcagaagt
 aagttggccgcagttgttatacctcatgggtatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgttaa
 gatgtctttctgtgactgggtgagtaclcaaccaagtcaltctgagaatagtgtaigcggcgaccgagttgtctc
 ttgccccggctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcctcatcatlggaaaacgt
 tcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatglaaccactcgtgcaccca
 actgatcttcagcatcttttactttcaccagcgttctcgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaalgcgcgaaa
 aaagggaataaaggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttctttttcaatatattatgaagcatttat
 cagggttatltgtctcatgagcggatacataattgaatgtatllagaaaaataaacaalaggggttcgcgcga
 catttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccctatgggtgactctcagtl
 acaatctgctctgatgcgcctagttlaagccagttatctgtctccctgcttgtgtgttggaggctcgctgagtagl
 gcgcgagcaaaaatttaagclacaacaaggcaaggcttgaccgac (配列番号5)

[図1-6-1]

aattgcatgaagaatctgcttagggllaggcggttttgcgcgtgcttcgcgatglacggggccagatatacgcgtt
gacatlgaattatigactagttatataatagtaatacaattacgggggcaatagttcatagecccatataatggagtt
ccgcgttacataacflacggtaaatggccccgcctggctgaccgccccacgacccccgccccattgacgtcaata
atgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaacttccatlgacgtcaatgggtggagttatttacggtaaa
clgcccacttggcagtaacatcaagtgatcatatgccaaaglacgccccctatlgacgtcaatgacggtaaatg
gccccctggcattatgcccagtaacatgaccttatgggacttctctacttggcaglacatctacgtattagtc
atcgctattaccatgggtgatgcgglltggcagtaacatcaatgggcgtggatagcggtttgacacacggggat
tcccaagtcctccaccccatlgacgtcaatgggagtttlltlltggcaccaaaaatcaacgggacttcccaaatg
tcgtaacaacccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggltgggaggtctataaagcagcgcg
tttggcctgtactgggtctctctgglltagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacatagggaaccca
clgcttaagcctcaataaagcctggccttgagtgcctcaagtagtggtggtgccccgctglltgggtgactctggta
actagagatccctcagaccttlltagtcagltgtgaaaatctcttagcagtgggcgccccgaacagggacttgaaa
gcgaaagggaaccagaggagctctctcagcgcaggacccggcctlgcctgaagcgcgcacggcaagaggcgagg
ggcgcgacactggtgagtacgccccaaaattttagctagcggaggcctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt
cagttatgaagcgggggagaaatagatcgcgatgggaaaaaatccggttaaggccagggggaagaaaaaata
aaattaaaacatatagttatgggcaagcagggagctagaacgaltcgcagllaalccctggcctgttagaaacat
cagaaggcctgtagacaaatactgggacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataatacagtagcaacctctatltgtgtgcalcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagccttagac
aagalagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcccgctgatcttcagacctggagga
ggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaaatgaaccattaggagtag
caccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtggggaataggagccttlltlltlltgg
gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgclgacggtaacagccagacaattattg
cttgggtatagtgacgacgagacaatttgcctgagggtatctgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacag
cttggggcatcaagcagctccaggcaagaatccctggctgttgaaagataacctaaaggatcaacagctccctggg
gatttgggggttgcctctggaaaaactcatllgcaccactgctgtgcttgggaatgctagllggagtaataaatct
ctggaacagatttgggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagccttaatac
actcccttaattgaagaatcgcaaaaaccagcaagaaaagaalgaacaagaattatlggaattagataaatgggc
aagtlitlggaattgglttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggc
ltggtaggtttaagaatagtttttgcctgtacttctatagltgaatagaglttaggcagggatattaccattat
cgtttcagaccacccctcccaaccccgaggggacccgacagggcccgaaaggaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgallagltgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaatggcagt
attcaccacaaattttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgccaggggaaagaatagtagacataala
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttccgggtttattacaggg
acagcagagatccagtttgggtatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccct
tatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagctcggtaccgggtcgagtaggcgtgtacgggtgggagggcctat
alaagcagagctcgltttagltgaaccgtcagatcgccctggagacgccatccacgcctgttttgcacctccatagaa
gacaccgggacggatccagcctccgcgggccccgaattaccATGGATATAGCAACAGGTCCCGAGTCGCTGGAG
AGGTGCTTCCCTCGCGGGCAGACGGACTGCGCCAAGATGTTGGACGGCATCAAGATGGAGGAGCACGCCCTGC
GCCCCGGGCCCCGCCACTCTGGGGGTGCTGCTGGGCTCCGACTGCCCCGATCCCGCCGTCTGCGAGGGCTGCCA
GCGGCCCATCTCCGACCGCTTCCCTGATGCGAGTCAACGAGTCGTCTTGGCACGAGGAGTGTTCAGTGCCTG
GCGTGTGAGCAAGCCCTCACCACCAGCTGCTACTTCCGGGATCGGAACTGTACTGCAAACAAGACTACCAAC
AGCTCTTCGCGGCCAAGTGCAGCGGCTGCATGGAGAAGATCGCCCCCACCAGTTCGTGATGCGGGCGCTGGA
GTGCGTGTACCACCTGGGCTGCTTCTGCTGCTGCGTGTGTGAACGGCAGCTACGCAAGGGCGACGAATTCGTG
CTCAAGGAGGGCCAGCTGCTGTGCAAGGGTGACTACGAGAAGGAGAAGGACCTGCTCAGCTCCGTGAGCCCCG
ACGAGTCCGACTCCGTGAAGAGCGAGGATGAAGATGGGGACATGAAGCCGGCCAAGGGGCAGGGCAGTCAGAG
CAAGGGCAGCGGGGATGACGGGAAGGACCCGCGGAGGCCCAAGCGACCCCGGACCATCTCACCACGCAGCAG

[図1-6-2]

CGAAGAGCCTTCAAGGCCTCCTTCGAGGTCTCGTCGAAGCCTTGCCGAAAGGTCCGAGAGACACTGGCAGCTG
AGACGGGCCTCAGTGTGCGCGTGGTCCAGGTCTGGTTTCAGAACCAAAGAGCAAAGATGAAGAAGCTGGCGCG
GCGGCACCAGCAGCAGCAGGAGCAGCAGAACTCCCAGCGGTGGGCCAGGAGGTCTGTCCAGCCGCATGGAG
GGCATGATGGCTTCTACACGCCGCTGGCCCCACCACAGCAGCAGATCGTGGCCATGGAACAGAGCCCCCTACG
GCAGCAGCGACCCCTTCCAGCAGGGCCTCACGCCGCCCAAATGCCAGGTGACCACATGAACCCCTATGGGAA
CGACTCCATCTTCCATGACATCGACAGCGATACCTCCTTAACCAGCCTCAGCGACTGCTTCCTCGGCTCCTCA
GACGTGGGCTCCCTGCAGGCCCGCGTGGGGAACCCCATCGACCGGCTCTACTCCATGCAGAGTTCTACTTTCG
CCTCCTGAaattcgatatacaagcitalcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggg
attcttaactatgttgcctctttacgctatgiggatagcctgctttaaagccttgtatcatgctattgctt
cccgataggctttcatlltccctcttgtataaatcttggttgctgctctttaaagaggattgtggcccg
tgtcaggcaacgtggcggtgggtgacacgtgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacc
tgtcagcctcttccgggactttgccttccccctccctattgccacggcggaactcctgcgcgcctgccttg
cccgctgctggacaggggctcggtctgtgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaaatcctgctctt
tcttgggtgctgcctgtgttgccaccctggattctgcgcgggacgtctctgctacgtcccttcggccctc
aatccagcggacttcttcccgggcctgctgcgcgcctctgcgcgcctcttccgcgtcttgccttgcctc
agacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcctcgataccgctcgaccctcgagacctagaaaaacatgg
agcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcttggttagaagcacaagaggaggaggag
gtgggttttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttaacaggcagctgtagatcttagccact
ttttaaagaaaaggggggacttggaagggttaattcacctcccaacgaagacaagataccttgatctgtggat
ctaccacacacaaggctacttccctgattggcagaactacacaccaggggccagggtcagatctccactgacc
tttggatgggtgctacaagctagtaggagttgagcaagagaaggtagaagaagccaatgaaggagagaacaccc
gcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtagataggagggtttgacag
ccgcttagcatttctacacatggccccgagagctgcacccggactgtacgtgggtctctctggttagaccagatc
tgagcctgggagctctctggctaacctagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgtctc
aagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaacttagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaa
aatctctagcagggcccggttaaacccgcctgacagcctcgactgtgctctctagttgccagccactgttgt
ttggccctccccctgcttcttgcacctggaagggtgccaactcccaactgctcttcttaataaaaatgaggaa
attgcatcgcatgtgtctgagtagggtgcatctctctctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggagg
attgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggtctctatggcttctgaggcggaagaaccagctg
gggtcttaggggggtatccccacgcgcccgttagcggcgcatlaagcgcggcggggtgtgggtgttacgcgcagc
gtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcttctgcttcttctctctctctctctctctctctctct
ccggcttccccgtcaagctcaaatcgggggcctctttaggggttcgatttagtctttagcgcacctcga
ccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtatgggccaatgccttgatagacgglllllccgccccttg
acgttggagtcacgttctttaaagtgagctctgttccaaactggaacaacacccaacctatctcggtct
attctlllgatttataagggttttgcggatttgcgctatttgggtlaaaaaatgagctgatttacaacaaatt
taacgcgaattaatctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaagtcctccaggctccccagcaggcagaa
gtatgcaaagcatgcactcctaatagtcagcaaccagggtgtggaagtcctccaggctccccagcaggcagaag
tatgcaaagcatgcactcctaatagtcagcaaccaggttccgccccctaacctccgccccctccgccccctaac
ccgcccagttccgcccccttctccgccccatggctgactaattttttttatttattatgcagaggccgagggccct
ctgcccctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggccctaggcttttgcaaaaagctccccggg
agcttgtatataccatttccggatctgacagcagctgttgacaattaatcctcggcatagtatatacggcatag
tataatacgacaagggtgaggaactaaaccatggccaagttgaccagtgccgttccgggtgctcaccgcgcgcga
cgctcgccggagcgggtcgagttctggaccgaccggctcggggtctcccgggacttctggaggagcacttgcgc
gggtgtgggtccgggacgacgtgacctgttcatcagcgcggtccaggaccagggtgggtgcccggacaacaccttg
cctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgcgagtggttcggagggtcgtgtccacgaacttccggga
cgccctccgggcccggcatgaccgagatcggcgagcagcgttggggggcgggagttcgcccctgcgcgacccggcc
ggcaactgcgtgcaacttcttgcccgaggagcaggactgacacgtgtctacgagatttccgattccaccgcccct
tctatgaaaggttgggcttcggaatcggttttccgggacgcggcctggatgactctccagcgcggggatctcat
gctggagttcttcccccaccccaacttgtttatttgcagcttataatgggttacaaalaagcaatagcatcaca

[図1-6-3]

aatttcacaaataaageatttttttccactgcattctagttgtggtttgtccaaactcaatgtatcttate
atgtctgtataaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatacatggcatagctgtttccctgtgtgaaatlg
ttatccgctcacaattccacacacatacgagccggaagcataaagtgtaaagccgggggtgctaatgagtg
agctaactcacaattaatgtcggttgcgctcactgcccgccttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatt
aatgaatcggccaaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgccttccgcttccctcgctcactgactc
gctgcgctcggtcggttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggttaatacgggttatccacagaa
tcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaacctgtaaaaaggccgcgt
tgctggcggtttttccatagggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcg
aaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctgggaagctccctcgctgcgcctcctgttccgacc
ctgcgccttaccggataaccgtccgccttctcccttccgggaagcggtggcgcttctcctatagctcagctgtga
ggatctcagttcggtgttaggtcgcttccgaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgctcagcccgaccg
ctgcgccttaccggtaactatcgctttagtccaaacccggtaagacacgacttaccgcaactggcagcagcc
actggtaacaggatttagcagagcgaggtatgtaggcggtgtcagaggttcttgaagtgggtggcctaaactacg
gctacactagaagaacagttatttggtaactgcgctctgtgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtag
ctcttgatccggcaaaacaaaccaccgcgtggtagcggtgttttttgttttgaagcagcagattacgcgcaga
aaaaaaggatctcaagaagatcccttgatcttcttaccggggtctgacgcctcagtggaacgaaaaactcaggtt
aagggttttggtaactgagattatcaaaaaggatcttccactagatcccttttaaatlaaaaatgaagttttaa
atcaactaaagtataatagtaaaacttggcttgacagttaccaatgcttaatacagtgaggcaccctatctca
gcatctgtctatcttcttccatagttgcttgactcccccgctgtgtagataactacgatacgggagggct
taccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaa
ccagccagccggaaggcgagcgagcagaagtggctcgaactttatccgctccatccagctctatlaattgt
tgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttggcattgctacaggcatcg
tgggtgcacgctcgctgtttggatgggttcattcagctccgggttcccaacgataaggcgagttacatgact
ccccatgttgtgcaaaaaagegggttagctcccttgggtccctccgactgtgttcagaagtaagttggccgcagtg
ttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtga
ctggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtaaat
acgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcatatggaaaacgttcttccggggcgaaaa
ctctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcat
cttttactttcaccagcglttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaaagggaataagggc
gacacggaaatgttgaatactcatactcttccctttcaataattatgaagcatlatacagggttatgtctc
atgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatataggggttccgcgcacatttccccgaaaag
tgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccctatgggtgcactctcagtaacaactgcctcgtat
gccgcatagttaagccagtatctgcctccctgttgtgtgttggaggctcgctgagtagtgcgcgagcaaaattt
aagctacaacaaggcaaggcttgaccgac (配列番号6)

aatgtcattgaagaatctgctttagggctaggcgcttllgcgcctgccttcgcgaatgtacggggccagatatacgcgctt
gacatttgatttattgactagttatttaataaglaaalcaattacgggggtcatttagttcaatagcccatatatatggagtt
ccgcgcttacalaacctacgggtaaatggccccgccttggctgaccgccccaacgacccccgccccatttgacgtcaata
atgacgtatgttcccataglaacgccaataggggacitccattgacgtcaatgggtggagttatttacgggtaaa
ctgccccacttggcagttacatcaagtgatcatatgccaaagtacgccccctatttgacgtcaatgacggglaaatg
gccccgcctggcatttatgcccagttacatgaccttatgggacitlccctacttggcagttacatctacgtatttagtc
atcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggat
ttccaaagttctccacccccattgacgtcaatggggagtttgttttggcaccaaaateaacggggacitlccaaaatg
tcglaacaactccgccccatttgacgcaaaatgggcggtagggcgtgtacgggtgggagggtctatataagcagcgcg
ttttgcctgtactgggtctctctgtgttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaacca
ctgcttaagcctcaataaaagcttggccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtttgtgtgactctggla
actlagagatccctcagacccttttagtctagttgtggaaaaatctctagcagttggcgccccgaacaggggacttgaaa
gcgaaagggaaccagaggagctctctcagcgcaggacitcggttgcctgaagcgcgcacgggaagaggcgagg
ggcgggcagctgggtgagtacgccccaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgctgagagcgt
cagttatlaagcggggggagaatttagatcgcgatgggaaaaaatctgggttaaggccagggggaaagaaaaaatat
aaattaaaacatfatagttatgggcaagcaggggagctagaacgattcgcagttlaatcctggcctgttagaaacat
cagaaggctgttagacaatacttgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataatcacgttagcaacccctctatttgtgtgcateaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagac
aagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgactctcagacctggagga
ggagatatlaggggacaatttgagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaaatgaaccattaggagtag
caccaccaaggcaaaagagaagagttgggtgcagagagaaaaaagagcagttgggaataggagctttgttcccttgg
gtlcttggggagcagcaggaagcacatgggcgcagcgtcaatgacgcctgacgggtacaggccagacaaattattg
tctgggtatagtgacgcagcagaacaatttgcctgagggctatlgaggcgcaacagcattctgttgcaactcacag
tctggggcactcaagcagctccaggcaagaatccttggctgtlgaaaagatacctaaaggatcaacagctccctggg
galltgggggttgcctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgcttgggaatgctagttggagtaataaatct
ctggaaacagatttggaaatcacacgacctgggatggagltgggacagagaaatlaacaattacacaagcttaatac
actccttaattgaagaatcgcaaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattatttggaaattagataaatgggc
aagtttltggaattlggtltaacataacaaatttggctgttggtatataaaattatttcataatgatagtaggaggc
ttggtaggtttaaagaatagtttttgcctgtactttctatagtgaaatagagtttaggcagggaattaccacattat
cgtttcagaccccacctcccaacccccgagggggacccgcacaggccccgaagggaatagaagaagaaggttggagagag
agacagagacagatccattcgatttagtgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaaatggcagtt
allcatccacaatttttaaaagaaaaggggggatttggggggtacagtgacggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaatlcaaaattttcgggtttatttacaggg
acagcagagatccagtttgggttatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagltgaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagltgaagtcgagtttaccactccct
tatcagtgatagagaaaagltgaagtcgagctcggtlaccgggctcgagtlaggcgtgtacgggtgggaggccctat
ataagcagagctcgitttagtgaaccgtcagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaa
gacaccgggacccgatccagcctcccgccgccccgaattaccATGTCGCTGACCAACACAAAGACGGGGTTTTTCG
GTCAAGGACATCTTAGACCTGCCGGACACCAACGATGAGGAGGGCTCTGTGGCCGAAGGTCCGGAGGAAGAGA
ACGAGGGGGCCCGAGCCAGCCAAGAGGGCCGGGCCGCTGGGGCAGGGCGCCCTGGACGCGGTGCAGAGCCTGCC
CCTGAAGAACCCTTCTACGACAGCAGCGACAACCCGTACACGCGCTGGCTGGCCAGCACCGAGGGCCTTCAG
TACTCCCTGCACGGTCTGGCTGCCGGGGCGCCCCCTCAGGACTCAAGCTCCAAGTCCCCGGAGCCCTCGGCCG
ACGAGTCACCGGACAATGACAAGGAGACCCCGGGCGGGCGGGGGGACGCCGGCAAGAAGCGAAAGCGGCGAGT
GCTTTTCTCCAAGGCGCAGACCTACGAGCTGGAGCGGGCGCTTTCGGCAGCAGCGGTACCTGTGCGCGCCCGAG
CGCGAACACCTGGCCAGCCTCATCCGCCTCACGCCCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCAGAACCCACCGCTACA
AGATGAAGCGCGCCCGGGCCGAGAAAGGTATGGAGGTGACGCCCCCTGCCCTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGCC
CGTCTTGGTTCAGGGACGGCAAACCATGTACGCGCTCAAAAGCCCAGGACCTGGCAGCCGCCACCTTCCAGGCG

[illegible]

[図1-7-3]

cggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaaga
 acatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgtggcggtttttccataggct
 ccgccccctgacgagcatecaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaacccgacaggacataaaga
 taccaggcggtttcccccgggaagctccctegtgcgctctcctgttccgacctgcegettaccggataccgtg
 ccgcttttctcccttcgggaagcgtggcgcttttctcatagctcagctgtiaggtatctcagttcgggtgttaggt
 cgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggttcageccgaccgctgcgcttataccggtaaclat
 cgtcttgagtcgaacccggtaagacacgacttatcgccactggcgagcagccactggtaacaggatttagcagag
 cgaggatatgtaggcggtgtctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatt
 tgggtatctgcgctctgtctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaacc
 accgctggtagcggtgggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatc
 clttgatcttttctacggggctgtacgctcagtggaacgaaaactcagttaaagggttttgggtcatgagatt
 atcaaaaaggatcttcacctagatcccttttaattaaaaatgaagttttaaataatctaaagtatatatgag
 taaacttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcaccatctcagcgatctgtctatltctgttcat
 ccatagttgectgactccccgtcgtlglagalaactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgc
 aatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaalaaaccagccagccggaaggcgccgag
 cgcagaagtggtccctgcaactttatccgcctccatccagttctattaatgtttgcccgggaagctagagtaagta
 gttcggcagttaatagtttgcgcaacgtttgttgcatttgtacaggcatcgtgggtgtcagctcgtctgttgg
 talggttcatctcagctccgggttcccaacgatacaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcg
 gttagctccttcggctcctcgatcgttgtcagaaglaagtlggccgcagtggtatcactcatggttatggcag
 cactgcalaattctcttactgtcatgccatccgttaagaatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtc
 attctgagaalagtglatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacal
 agcagaactttaaaagtgtctcatcatlggaaaacgttcttcggggcgaaaactcgaaggatcttaccgctgt
 lgagatccagttcgaigttaacccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagegttct
 tgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaalgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaaatgttgaatactc
 alactcttccctttttcaatatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatlgagcggatataatattgaat
 gtatttagaaaaataaacaatataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatc
 gggagatctcccgatccccatgggtgcactctcagtaacaatctgtctctgatgccgcalagttlaagccagttatc
 tgcctccctgcttgtgtgttggaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaaatttaagctacaacaaggcaaggctt
 gaccgac (配列番号7)

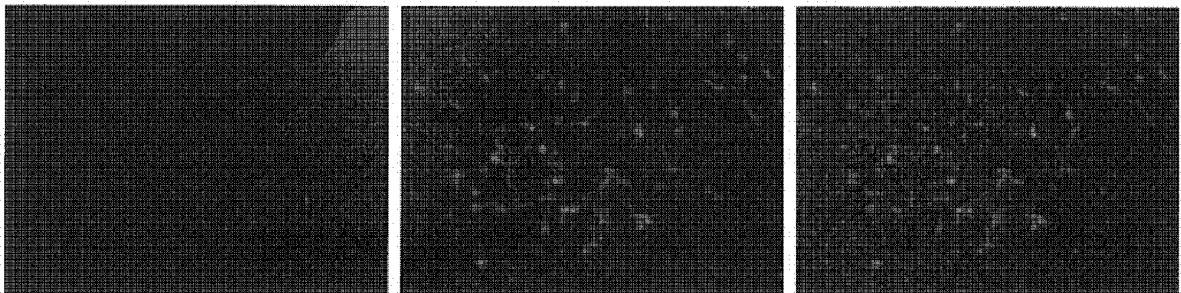
aatgtcattgaagaalctgctttagggcttaggcgttttgcgcctgcttcgcgaatgacgggcccagatatacgcgtt
gacattgattattgactagttatttaatatagtaaalcaatlacgggggtcatttagttcatagcccataatattggagtt
ccgcgttacataacclacggtaaatggccccgccttggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaata
atgacgtatgttcccataagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagttatttacggtaaa
ctgcccaccllggcagtaacatcaagtgtatcatatgccaaaglacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatg
gccccgcctggcatttatgcccaglacatgaccttatgggacttttctacttggcaglacatctacgtattagtc
atcgclattlaccattgggtgatgcggtttttggcaglacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggat
ttccaagtcctccacccccattgacgtcaatgggagtttggtttggcaccaaaatcaacggggactttccaaaatg
tcgtacaacactccgccccattgacgcgaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggctctatataagcagcgcg
ttttgcctgtactgggtctctcttgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacttagggaaccca
ctgcttaagccctcaalaaagcttgccttgagtgtctcaagtagtggcggcgtctgttgggtgactctggta
actagagatcccctcagacccttttagtctagtggtggaaaatctctagcagtgggcgccgaacagggacttgaaa
gcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgcctgaagcgcgcacggcaagaggcgagg
ggcgggcagclgggtgagtacgccccaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgt
cagttattaagcggggggagaatttagatcgcgatgggaaaaaaalcggttaaggccagggggaaagaaaaaatat
aaatlaaaacataatagttatgggcaagcaggggagctagaacgattcgagttlaalcttggcctgtttagaaacat
cagaaggcgtgtagacaaatactgggacagctacaaccaatcccctcagacaggatcagaagaacttagatcatt
atataatacagtagcaacccctctatttgggtgacacaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagac
aagatagaggaaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgacttccagacctggagga
ggagatatgaggggacaattggagaagtgaattatataaaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtag
caccaccaaggcaaaagagaagagtggtgacagagagaaaaaagagcagtggaataggagctttgttcccttgg
gttcttggggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattg
tctgggtatagtgacgcagcagaacaatttgcctgagggctattgagggcgaacagcacttcttgcacactcacag
tctggggcactcaagcagctccaggcaagaatccttggctgtggaaaagatacctaaaggatcaacagctccttggg
gatttgggggttgccttggaaaactcaatttgcaccacttgccttgggaatgcttagttggagtaataaatct
ctgggaacagatttggaaacacacgaccttggatggagtgggacagagaaatlaacaattacacaagcttaatac
actccttaattgaagaatcgcaaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattatttgggaattagataaatgggc
aagtttgggaattgggtttaacataacaaatttggctgtgggtatataaaattattcataatgalagtagggaggc
tggtaggtttaagaatagtttttgcctgactttctatagtgaaatagagtttaggcagggataattcaccattat
cgtttcagaccccacttcccaaccccagaggggaccgcacaggccccgaaggaaatagaagaagaaggtggagagag
agacagagacagatccattcgatttagtgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaaatggcagt
attcatccacaatttlaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgacggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaalicaaaatllcgggttatttacaggg
acagcagagatccagtttgggttatcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagttt
accactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtga
aagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgata
gagaaaagtgaagtcgagtttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtttaccactccct
tatcagtgatagagaaaagtgaagtcgagtcgggtacccgggtcgagtaggcgtgtacgggtgggaggccctat
ataagcagagctcggtttagtgaaccgtcagatcgccctgggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaa
gacaccgggaccgatccagcctccggggccccgaattaccATGGCCACCTCTGGACGCCTGAGCTTCACCGTG
CGCAGCCTTCTAGATTTACCCGAGCAGGACGCGCAACACCTGCCGAGGCGGGAGCCAGAACCACGCGCCCCC
AGCCCGACCCCTGCGCCGCTGGCTGGATTCCGAGCGCGGCCACTACCTTCTCGGACGAGAGCAGCCTGGA
GACCAGCCCGCCAGACTCGTCGACGCGGCGTCCGCTAGGCCCCGCGTCTCCGGGCTCGGACGCCGAGAAAAGG
AAGAAGCGGCGGGTGCTATTCTCCAAGGCGCAGACGCTGGAGTTGGAGCGGCGCTTCCGGCAGCAGCGGTACC
TGCTGCGCCCGAGCGCGAGCAGCTGGCGAGCCTGCTTCGCCTCACGCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCA
GAATCATCGCTACAAGCTGAAGCGCGCTCGCGCTCCAGGGGCGGCGGAGTCGCCTGACCTGGCAGCATCCGCC
GAGCTGCACGCCGCGCCCGGCTGCTGCGTGCCTGGTGGTGCCGGTGCTTGTTCGCGACGGGCAGCCGTGCG
GCGGCGGCGGCGGTGGCGAGGTGGGAACCGCGCGGCCAGGAGAAGTGCGGCGCCCTCCAGCGCGCGCCTG
CCCTCTGCCGGGCTACCCCTGCCTTCGGTCCCGGCTCGGCGCTTGGCCTCTTCCCCGCCTACCAGCACTTAGCA

[illegible]

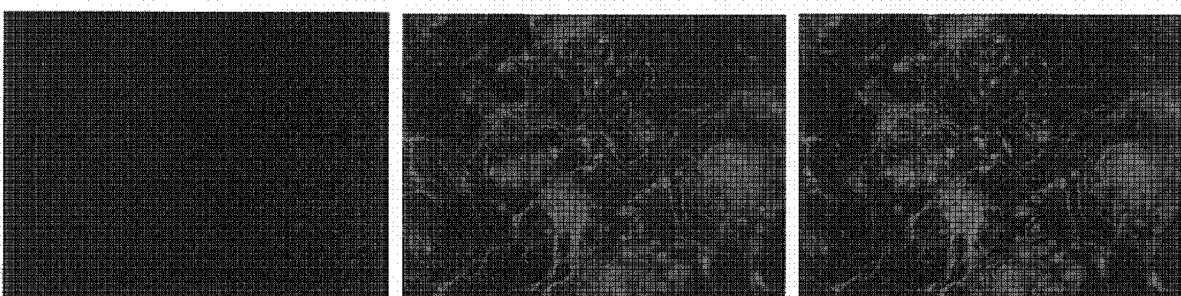
[図1-8-3]

aggaacccgtaaaaaggccgcgttgcctggcggtttttccataggtccgccccctgacgagcattacaaaaatc
 gacgtcgaagtcagaggctggcgaaacccgacaggacataaagalaccaggcglttccccctggaagctccct
 cgtgcgcctcctgttccgacctgccgcttaaccggataacctgtccgcttttctcccttcgggaagcgtggcg
 ctttctcatagctcacgcctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgcctccaagciggcgctgiglgcacg
 aaccccccggttcagcccgaccgcctgcgccttaccggtaactatcgcttgagtccaacccggtaagacacga
 ctlatcgccactggcagcagccaciggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcggtgctacagagttc
 ttgaagtggctggcctaacctacggctacactagaagaacaglatatgggtatctgcgcctcgtctgaagccagtta
 ccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacacacccaccgctggtagcggtgggttttttgglttg
 caagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgt
 cagtggaacgaaaaacacagtttaagggaatgggtcattgagattatcaaaaaaggatcttaccctagatccttt
 taaattaaaaatgaagtttttaataatctaaagtatatatgagtaaacctgggtctgacagttaccaatgctt
 aatcagtgaggcaccctatctcagcgaatcgtctatllcgltcallecatagttgcttgaatccccgtcgtgtag
 ataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgcctaccgg
 ctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggcgccagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgc
 ctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagtccgagllaatagtttgcgcaacgtt
 gttgccattgctacaggcactcgtgggtgcacgtcgtcgtttgggtatggctcaltcagctccgggttcccaac
 gatcaaggcgagttacatgatcccccatgttggtgcaaaaaagcggttagctccttcgggtcctccgatcgttgt
 cagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgltcaltgcca
 tccgtaagatgcttttctgtgaciggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccga
 gttgctcttggccggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttlaaaagtgctcaltcaltgg
 aaaacgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgcgttgagatccagttcgatgtaaccacactcgt
 gcacccaactgatcttcagcaltcttllactllcaccagcglttclgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatg
 ccgcaaaaaagggaataaggcgacacgggaatgttgaatactcatactcttcttcttcaatatatttgaag
 catttatcagggttatgtgtcatgagcggalacataatllgaatglattagaaaaaataaacaatatagggtt
 ccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatctcccgatccccatgggtgcac
 tctcagtaacaatctgctctgaltgcgcatagttaagccagtatctgtctccctgcttgggtgttggagggtcgt
 gagtgtgcgcgagcaaaaatlaagctacaacaaggcaaggcttgaccgac (配列番号8)

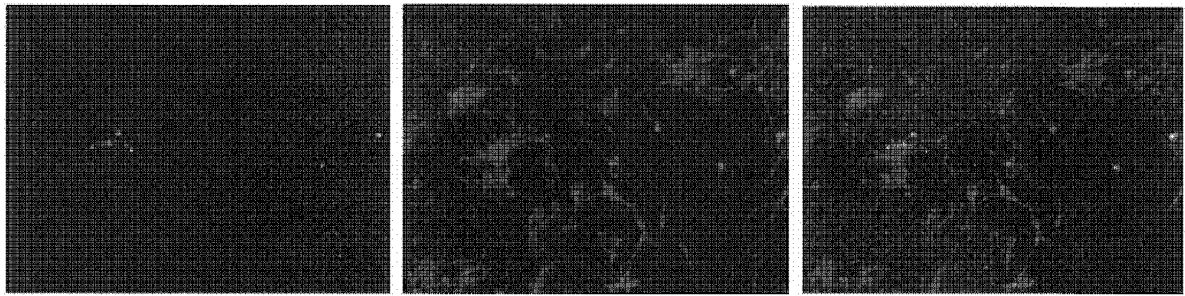
[図2-1]



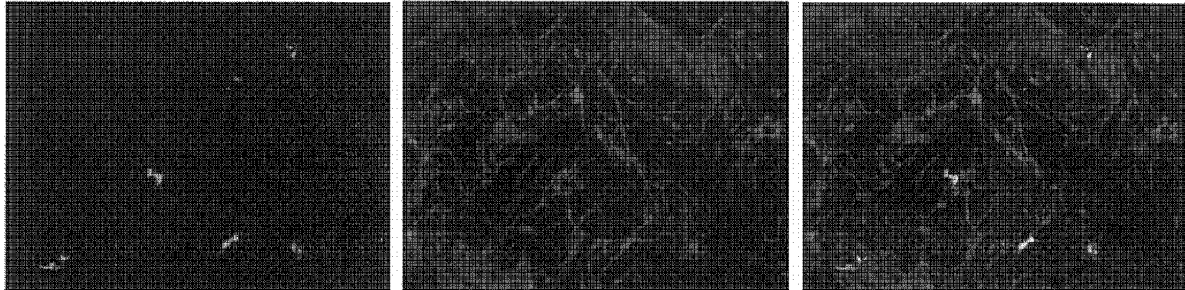
[図2-2]



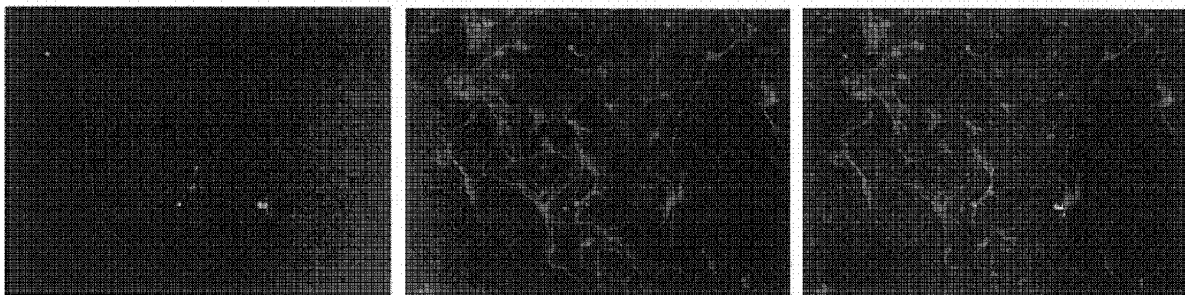
[図2-3]



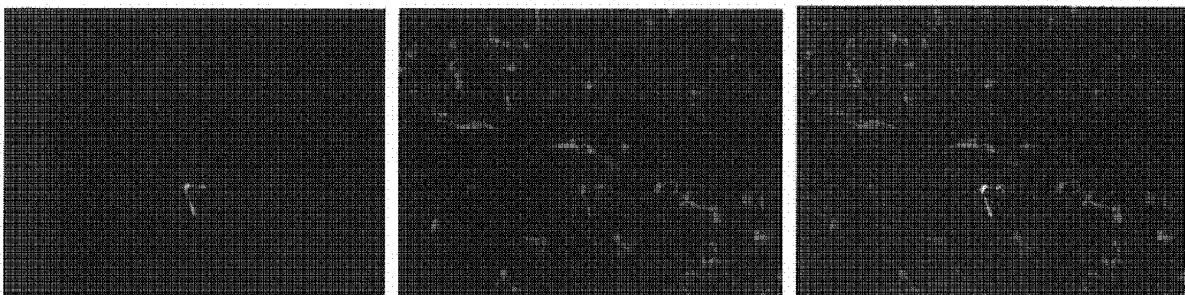
[図2-4]



[図2-5]



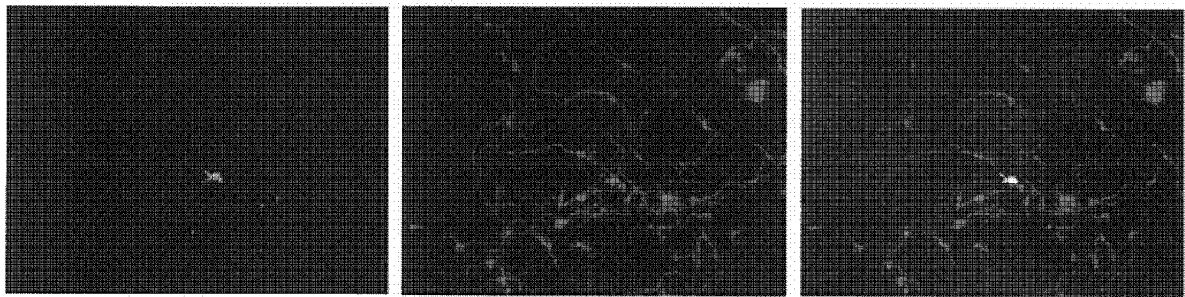
[図2-6]



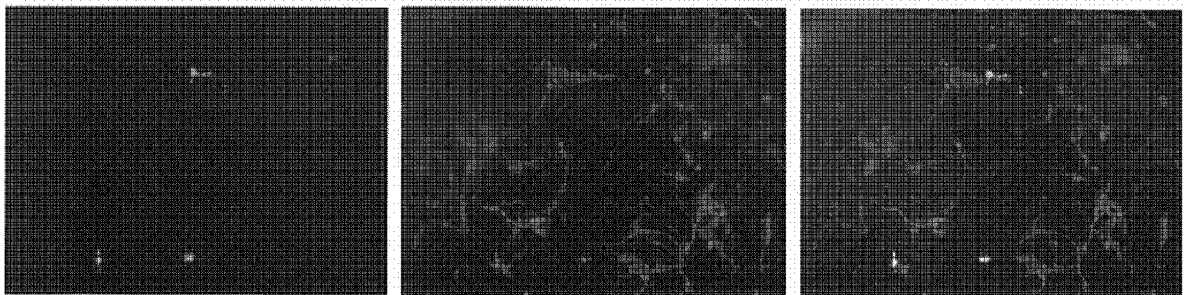
[図2-7]



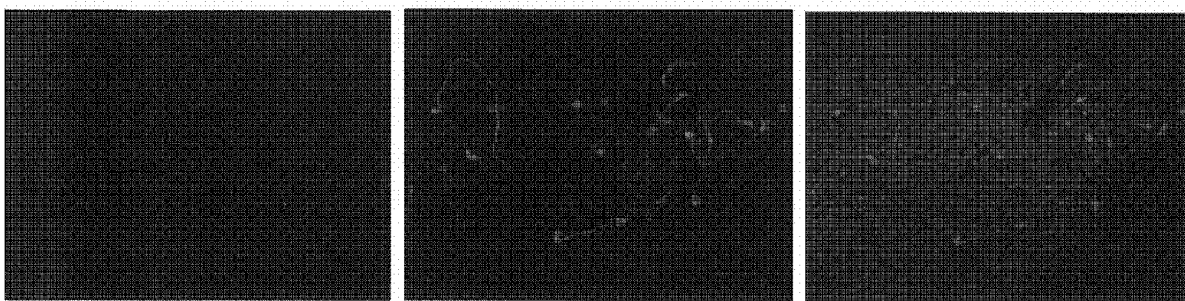
[図2-8]



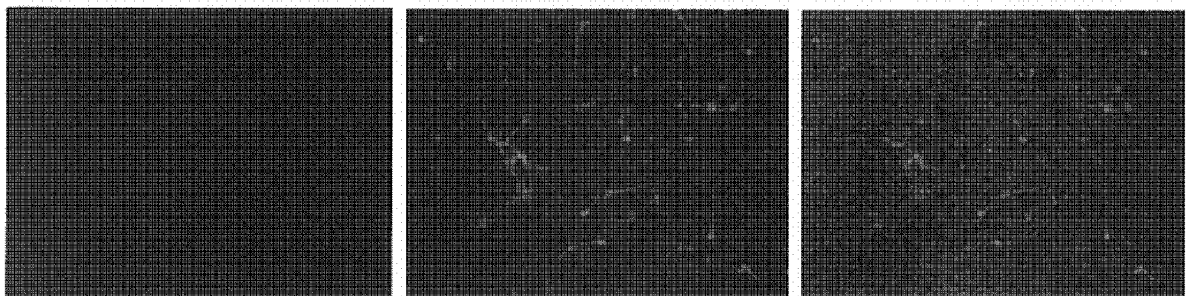
[図2-9]



[図2-10]



[図2-11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/030426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N5/0793(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N5/0793

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Japanese Published Examined Utility Model Applications 1922-1996

Japanese Published Unexamined Utility Model Applications 1971-2017

Japanese Examined Utility Model Registrations 1996-2017

Japanese Registered Utility Model Specifications 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU, Z. et al., Direct conversion of human fibroblasts to induce serotonergic neurons, Molecular Psychiatry, 28 July 2015, (2016), vol. 21, pp. 62-70, 28 July 2015, doi:10.1038/mp. 2015.101, 2017/11/09 searched the entire text, abstract, fig. 1, p. 63, right column, pp. 68-69, DISCUSSION	1-7
Y	VADODARIA, K. C. et al., Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts, Molecular Psychiatry, 14 July 2016, vol. 21, pp. 49-61, abstract	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☐ See patent family annex.
--	---

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 November 2017	Date of mailing of the international search report 28 November 2017
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/030426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PANG, P. Z. et al., Induction of human neuronal cells by defined transcription factors, Nature, vol. 476, 2011, pp. 220-223, abstract, p. 220, left column, fig. 1	1-7
A	DOLMAZON, V. et al., Forced expression of LIM homeodomain transcription factor 1b enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into serotonergic neurons, Stem Cells and Development, 2011, vol. 20, no. 2, pp. 301-311	1-7
A	LU, J. F. et al., Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells, Nature Biotechnology, 14 December 2015, (2015), vol. 34, no. 1, pp. 89-94, doi:10.1038/nbt.3435, 2017/11/09 searched	1-7
A	SHIMADA, Takeshi et al., A simplified method to generate serotonergic neurons from mouse embryonic stem and induced pluripotent stem cells, Journal of Neurochemistry, 2012, vol. 122, pp. 81-93	1-7
A	MERTENS, J. et al., Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience, Nature Reviews Neuroscience, July 2016, vol. 17, pp. 424-437	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/0793(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/0793

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	XU, Z. et al., Direct conversion of human fibroblasts to induce serotonergic neurons, Molecular Psychiatry, 2015.07.28, (2016), Vol. 21, p. 62-70, 2015.07.28, doi:10.1038/mp.2015.101, 2017/11/09 検索 全体、abstract, Figure1, p. 63 右欄, p. 68-69 DISCUSSION	1-7
Y	VADODARIA, K. C. et al., Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts, Molecular Psychiatry, 2016.07.14, Vol. 21, p. 49-61, abstract	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.11.2017

国際調査報告の発送日

28.11.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

濱田 光浩

4N

3763

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	PANG, P. Zhiping et al., Induction of human neuronal cells by defined transcription factors, Nature, Vol. 476, 2011, p. 220-223, abstract, p. 220 左欄, Figure 1	1-7
A	DOLMAZON, Virginie et al., Forced Expression of LIM Homeodomain Transcription Factor 1b Enhances Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Serotonergic Neurons, STEM CELLS AND DEVELOPMENT, 2011, Vol. 20, No. 2, p. 301-311	1-7
A	LU, JIANFENG et al., Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells, Nature Biotechnology, 2015.12.14, (2015), Vol 34, No. 1, p. 89-94, doi:10.1038/nbt.3435, 2017/11/09 検索	1-7
A	SHIMADA, Takeshi et al., A simplified method to generate serotonergic neurons from mouse embryonic stem and induced pluripotent stem cells, Journal of Neurochemistry, 2012, Vol. 122, p. 81-93	1-7
A	MERTENS, Jerome et al., Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience, NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE, 2016.07, Vol. 17, p. 424-437	1-7