

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6559063号
(P6559063)

(45) 発行日 令和1年8月14日(2019.8.14)

(24) 登録日 令和1年7月26日(2019.7.26)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A

請求項の数 13 (全 239 頁)

(21) 出願番号	特願2015-511632 (P2015-511632)	(73) 特許権者	508241200
(86) (22) 出願日	平成25年5月7日(2013.5.7)		サンガモ セラビューティクス, インコ
(65) 公表番号	特表2015-516162 (P2015-516162A)		ーボレイテッド
(43) 公表日	平成27年6月11日(2015.6.11)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/039979		チモンド カナル プールバード 5 0 1
(87) 国際公開番号	W02013/169802		ポイント リッチモンド テク センタ
(87) 国際公開日	平成25年11月14日(2013.11.14)		ー スート エー 1 0 0
審査請求日	平成28年3月24日(2016.3.24)	(73) 特許権者	501035309
審判番号	不服2018-1708 (P2018-1708/J1)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
審判請求日	平成30年2月7日(2018.2.7)		ー
(31) 優先権主張番号	61/643,812		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(32) 優先日	平成24年5月7日(2012.5.7)		6 8, インディアナポリス, ジオンス
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ヴィレ ロード, 9 3 3 0
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 導入遺伝子のヌクレアーゼ媒介標的化組み込みのための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

環状 2 本鎖ポリヌクレオチドであって、前記環状 2 本鎖ポリヌクレオチドは、
導入遺伝子と、

第 1 の配列および第 2 の配列と
を含み、

ここで、前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の各々は、1 つ以上の二量体化ジンクフ
ィンガーまたは T A L エフェクタードメインヌクレアーゼに対する左および右標的部
位を含み、前記左および右標的部は哺乳動物細胞または植物細胞のゲノム中に存在する配列
を含み、

ここで、前記左および右標的部は、前記左および右標的部の間にある前記哺乳動物
細胞または植物細胞のゲノム中の少なくとも 1 つのスペーサー配列によって互いに分離さ
れており、前記スペーサー配列は、前記哺乳動物細胞または植物細胞のゲノムであって、
前記左および右標的部に隣接するゲノム中に存在せず、

ここで、前記左および右標的部は、前記導入遺伝子内にはなく、さらに、前記環状 2
本鎖ポリヌクレオチドは、相同アームを含まず、

前記導入遺伝子は、前記第 1 の配列と前記第 2 の配列との間にあり、前記左および右標
的部は、それぞれ、前記哺乳動物細胞または植物細胞の前記ゲノムへの 5 0 未満の塩基
対の相同性を示す、環状 2 本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記導入遺伝子は、少なくとも1 kbの長さである、請求項1に記載の環状2本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記環状2本鎖ポリヌクレオチドは、プラスミドである、請求項1または請求項2に記載の環状2本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記導入遺伝子は、ポリペプチドをコードする、請求項1から3のいずれかに記載の環状2本鎖ポリヌクレオチド。

【請求項5】

前記スペーサー配列は、少なくとも5つのヌクレオチドを含む、請求項1から4のいずれかに記載の環状2本鎖ポリヌクレオチド。

10

【請求項6】

請求項1から5のいずれかに記載の環状2本鎖ポリヌクレオチドを含む哺乳動物細胞または植物細胞。

【請求項7】

哺乳動物細胞または植物細胞の内因性遺伝子座内に導入遺伝子を組み込むための組成物であって、前記組成物は、請求項1から5のいずれかに記載の環状2本鎖ポリヌクレオチドを含み、前記環状2本鎖ポリヌクレオチドが、1つ以上の二量体化ジンクフィンガーまたはTALエフェクタードメインヌクレアーゼと組み合わせて前記哺乳動物細胞または植物細胞内に導入されることを特徴とし、前記ヌクレアーゼは、前記導入遺伝子が、相同性非依存性の機構を介して前記内因性遺伝子座内に組み込まれるように、前記環状2本鎖ポリヌクレオチドおよび前記内因性遺伝子座を切断する、組成物。

20

【請求項8】

前記導入遺伝子は、順方向に組み込まれる、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】

前記導入遺伝子は、逆方向に組み込まれる、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

同じヌクレアーゼが、前記内因性遺伝子座および前記環状2本鎖ポリヌクレオチドを切断する、請求項7から9のいずれかに記載の組成物。

【請求項11】

30

異なるヌクレアーゼが、前記内因性遺伝子座および前記環状2本鎖ポリヌクレオチドを切断する、請求項7から9のいずれかに記載の組成物。

【請求項12】

前記ヌクレアーゼは、前記内因性遺伝子座内に欠失を生成し、前記導入遺伝子は、前記欠失に組み込まれる、請求項7から11のいずれかに記載の組成物。

【請求項13】

前記植物細胞は、双子葉植物細胞または単子葉植物細胞である、請求項7から12のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年5月7日に出願された米国仮特許出願第61/643,812号の利益を主張し、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究でなされた発明に対する権利の記述
該当なし

【0003】

本開示は、ゲノム操作、特に細胞のゲノムの標的化修飾の分野に含まれる。

50

【背景技術】

【0004】

生物および細胞株のゲノム内への外来DNAの組み込みは、生体系の調査および操作のために広く利用されている方法である。従来的是には、導入遺伝子の挿入は、導入遺伝子を有し、また所望の組み込み部位に隣接する実質的なDNA配列同一性を含有するプラスミドの提供により、特定の遺伝子座に標的化される。染色体の自発的破壊、およびそれに続く、プラスミドDNAの相同領域を鋳型として使用した修復は、介在する導入遺伝子のゲノム内への導入をもたらす。例えば、Koller et al. (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86(22):8927-8931、Thomas et al. (1986) Cell 44(3):419-428を参照されたい。この種の相同性指向性の標的化組み込みの頻度は、標的領域近傍での2本鎖切断の意図的な形成により、 10^5 倍まで増加させることができる(Hockemeyer et al. (2009) Nature Biotech. 27(9):851-857、Lombardo et al. (2007) Nature Biotech. 25(11):1298-1306、Moehle et al. (2007) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 104(9):3055-3060、Rouet et al. (1994) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91(13):6064-6068)。

【0005】

2本鎖切断(DSB)またはニックは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)もしくはTALEエフェクタードメインヌクレアーゼ(TALEN)等の部位特異的ヌクレアーゼにより、または特定の切断をガイドするための操作されたcrRNA／トラクトRNA(単一ガイドRNA)を有するCRISPR／Cas9系を使用して形成され得る。例えば、Burgess (2013) Nature Reviews Genetics 14:80-81、Urnov et al. (2010) Nature 435(7042):646-51、米国特許公開第20030232410号、同第20050208489号、同第20050026157号、同第20050064474号、同第20060188987号、同第20090263900号、同第20090117617号、同第20100047805号、同第20110207221号、同第20110301073号および国際公開第2007/014275号を参照されたく、その開示は、全ての目的において参照によりその全体が組み込まれる。多くの生物において、導入遺伝子挿入は、挿入された導入遺伝子が挿入(切断)部位への相同性の領域を含むことを必要とする相同性指向性修復(HDR)プロセスを介して達成され得る。しかしながら、いくつかの生物および細胞株は、従来のHDRプロセスを有さず、標的化組み込みは、主に、相同性非依存性の非相同末端結合(NHEJ)DNA修復機構により生じる。したがって現在まで、HDRプロセスに抵抗する生物および細胞株(例えば、CHO細胞)において、比較的短い(<100bp)オリゴヌクレオチドのみが、標的遺伝子座のヌクレアーゼ媒介切断後に相同性非依存性経路を介して組み込まれていた。例えば、Orlando et al. (2010) Nucleic Acids Res. 38(15):e152および米国特許公開第20110207221号を参照されたい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2003/0232410号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2005/0208489号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、例えば従来の相同性主導的手法のない、またはそれが不十分な生物および細胞株における、より大きな導入遺伝子を含む導入遺伝子の切断部位内への直接的な相同

10

20

30

40

50

性非依存性標的化組み込みのための組成物および方法が、依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

導入遺伝子の相同性非依存性標的化組み込みのための方法および組成物が、本明細書に開示される。

【0009】

一態様において、少なくとも1つのヌクレアーゼを使用したドナーのインビボ切断後の選択された内因性遺伝子座内への組み込みのための2本鎖ドナーポリヌクレオチドが、本明細書に開示される。ドナーポリヌクレオチドは、内因性遺伝子座内に組み込まれる外因性配列（導入遺伝子）を含み、ヌクレアーゼの少なくとも1つの標的部位、例えば、結合部位の近接端を隔てる「スペーサー」配列により隔てられた2つの対になったヌクレアーゼ結合部位を含有する。スペーサーは、任意のサイズであってもよく、例えば、4～20塩基対の間（またはその間の任意の値）であってもよい。複数のヌクレアーゼ標的部位を有するドナーは、同じまたは異なる標的部位、例えば、導入遺伝子に隣接する同じ対部位の2つ、または導入遺伝子に隣接する2つの異なる対部位を有してもよい。ドナーヌクレオチドは、導入遺伝子配列に隣接する相同アームの存在を必要としない。ドナー配列に存在し得る唯一の染色体の相同性は、ヌクレアーゼ結合部位（複数可）である。ヌクレアーゼ標的部位がゲノムとの相同性を示す実施形態において、ゲノムへの相同性は、50から100の連続塩基対（または50から100の間の任意の数の塩基対）未満の長さである。ドナーを切断するために使用されるヌクレアーゼが、染色体を切断するために使用されるヌクレアーゼと同じではないある特定の実施形態において、ヌクレアーゼ（複数可）により切断された染色体座とドナー配列との間の相同性はなくてもよい。さらに、ヌクレアーゼ標的部位（複数可）は、導入遺伝子内にはなく、したがって、標的部位（複数可）に結合するヌクレアーゼ（複数可）によるドナーポリヌクレオチドの切断は、導入遺伝子を修飾しない。ある特定の実施形態において、ドナー核酸は、2つの標的部位を含み、例えばスペーサー配列がゲノム内に存在する2つの標的部位の間のゲノム配列において生じない場合、2つの標的部位の間のスペーサー配列は、非天然型である。ある特定の実施形態において、ドナー分子は、相同性非依存性の機構（例えばNHEJ）を介して内因性遺伝子座内に組み込まれる。他の実施形態において、2本鎖ドナーは、少なくとも1kbの長さの導入遺伝子、ならびにインビボ切断のための導入遺伝子の3'側および／または5'側にヌクレアーゼ標的部位（複数可）を含む。ある特定の実施形態において、ドナーを切断するために使用されるヌクレアーゼ標的部位（複数可）は、例えば対標的部位間のスペーサーが内因性遺伝子座に存在しない、および／または内因性遺伝子座への相同性を示さない場合、導入遺伝子の組み込み後に再形成されない。ドナー分子は、例えば、プラスミドであってもよい。ある特定の実施形態において、ドナーは、内因性遺伝子座のヌクレアーゼ媒介切断後に組み込まれる。ドナー分子の任意のヌクレアーゼ媒介組み込みにおいて、ドナーを切断するために使用されるヌクレアーゼの1つ以上は、内因性遺伝子座を切断するために使用されるヌクレアーゼの1つ以上と同じであってもよい。代替として、ドナーを切断するために使用されるヌクレアーゼの1つ以上は、内因性遺伝子座を切断するために使用されるヌクレアーゼの1つ以上と異なってもよい。

【0010】

いくつかの実施形態において、ドナーは、プラスミド上に含有される。ドナーは、ヌクレアーゼ媒介切断後に組み込まれてもよく、組み込まれる配列（ドナーまたは導入遺伝子）には、プラスミド内で少なくとも2つのヌクレアーゼ切断部位が隣接している。他の実施形態において、ドナーは、プラスミド上に含有され、ドナーは、ヌクレアーゼ媒介切断後に組み込まれてもよく、組み込まれる配列（ドナーまたは導入遺伝子）は、単一のヌクレアーゼ切断部位を含むプラスミドである。ある特定の実施形態において、ドナープラスミド内のヌクレアーゼ切断部位の配列は、標的化される染色体座内のヌクレアーゼ切断部位の配列と同じである。切断部位がドナーとゲノムとの間と同じである実施形態において、切断部位を隔てる配列は、同じまたは異なってもよい。ある特定の実施形態において、

10

20

30

40

50

切断部位を隔てる配列（スペーサー）は、ドナーの切断後に、標的部位が再形成されず、ドナーが同じヌクレアーゼ（複数可）により再び切断され得ないように、ゲノムと比較してドナーにおいて異なる。他の実施形態において、ドナー含有プラスミド上でドナーに隣接するヌクレアーゼ切断部位は、染色体内の切断部位と異なる。さらなる実施形態において、ドナー含有プラスミド内のドナーに隣接するヌクレアーゼ切断部位は同じではなく、また染色体内のヌクレアーゼ切断部位と異なってもよい。さらなる実施形態において、ドナーは、少なくとも2つのヌクレアーゼ切断部位が隣接するプラスミド上に含有されてもよく、2つのヌクレアーゼの作用により形成された染色体内の欠失に組み込まれてもよい。この実施形態において、プラスミド上のドナーに隣接するヌクレアーゼ切断部位および染色体内のヌクレアーゼ切断部位は、同じであってもよく、または異なってもよい。

10

【0011】

ドナー分子の目的配列は、プロモーターありまたはなしで機能性ポリペプチドをコードする1つ以上の配列（例えばcDNA）を含んでもよい。ある特定の実施形態において、核酸配列は、抗体、抗原、酵素、成長因子、受容体（細胞表面または核）、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーター、耐虫性遺伝子、除草剤耐性遺伝子、転写因子、隔離タンパク質または上記のいずれかの機能性断片、および上記の組み合わせをコードする配列を含む。ドナー分子の目的配列は、機能性または構造的RNA、例えばRNAi、sRNAi、および／またはmRNAiをコードするRNA分子をコードする1つ以上の配列を含んでもよい。機能性ポリペプチドコード化配列がプロモーターを含まない実施形態において、組み込まれた配列の発現は、内因性プロモーターまたは目的領域内の他の調節要素により主導される転写により確保される。他の実施形態において、「縦列」カセットがこのようにして選択された部位内に組み込まれ、カセットの第1の構成要素は、上述のプロモーターのない配列に続く転写停止配列、および自律的発現カセットをコードする第2の配列を含む。2Aペプチド、SA部位、IRES等をコードする配列を含むがこれらに限定されない追加的な配列（コード化または非コード化配列）が、ドナー分子に含まれてもよい。ある特定の実施形態において、ドナー核酸（導入遺伝子）は、機能性RNA、例えばmiRNAまたはshRNAをコードする配列を含む。

20

【0012】

別の態様において、相同性非依存性機構を介してドナー核酸（例えば本明細書に記載のドナー分子）を細胞のゲノム内に組み込む方法が、本明細書に記載される。方法は、細胞のゲノム内に2本鎖切断（DSB）を形成することと、ドナー核酸がDSBの部位で組み込まれるように、1つ以上のヌクレアーゼを使用してドナー分子を切断することを含む。ある特定の実施形態において、ドナー核酸は、相同性非依存的方法（例えばNHEJ）を介して組み込まれる。上述のように、インビボ切断後、ドナー配列は、標的化された様式で、DSBの場所で細胞のゲノム内に組み込まれ得る。ドナー配列は、DSBを形成するために使用されるヌクレアーゼの1つ以上に対する同じ標的部位の1つ以上を含み得る。したがって、ドナー配列は、組み込みが望ましい内因性遺伝子を切断するために使用される同じヌクレアーゼの1つ以上により切断され得る。ある特定の実施形態において、ドナー配列は、DSBを誘導するために使用されるヌクレアーゼと異なるヌクレアーゼ標的部位を含む。標的細胞のゲノム内のDSBは、任意の機構により形成され得る。ある特定の実施形態において、DSBは、1つ以上のジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）（例えばその二量体化対）、目的領域内の配列に結合するように操作されたジンクフィンガー結合ドメインを含む融合タンパク質、および切断ドメインまたは切断ハーフトドメインにより形成される。他の実施形態において、DSBは、ヌクレアーゼドメイン（TALEN）に融合した1つ以上のTALE DNA結合ドメイン（天然または非天然）により形成される。さらなる実施形態において、切断は、操作されたcrRNA/tracrRNAを有するCRISPR/Cas等のヌクレアーゼ系を使用して行われる。

30

40

【0013】

さらに、本明細書に記載の方法のいずれにおいても、第1および第2の切断ハーフトドメインは、タイプIIS制限エンドヌクレアーゼ、例えばFokIまたはStsIからの

50

ものであってもよい。さらに、本明細書に記載の方法のいずれにおいても、融合タンパク質の少なくとも1つは、例えば切断ハーフトドメインの偏性ヘテロ二量体が形成されるように、切断ハーフトドメインの二量体化界面のアミノ酸配列内の改変を含み得る。代替として、本明細書に記載の方法のいずれにおいても、切断ドメインは、天然または非天然（操作された）メガヌクレアーゼであってもよい。

【0014】

本明細書に記載の方法のいずれにおいても、細胞は、任意の真核細胞、例えば、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞、ならびにスポドプテラ・フルギペルダ（Sf）等の昆虫細胞、またはサッカロミセス、ピチア、およびシゾサッカロミセス等の真菌細胞を含む、植物細胞または哺乳動物細胞または細胞株であってもよい。ある特定の実施形態において、細胞株は、CHO、MDCK、またはHEK293細胞株である。好適な細胞には、一例として、胚幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞および間葉幹細胞等の幹細胞も含まれる。さらに、細胞は、細胞周期のG2期で停止されてもよい。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態において、細胞は、効率的な相同性ベースDNA修復を有さないもの、例えばCHO細胞であってもよい。ある特定の実施形態において、細胞は、優先的にNH

10

20

【0015】

別の態様において、本明細書に記載の方法のいずれかに従って組み込まれた導入遺伝子を含むトランスジェニック生物（例えば植物または動物）が提供される。一実施形態において、選択された遺伝子に対しヘテロ接合遺伝子型を有する細胞、細胞株またはトランスジェニック生物が構築され、一方別の実施形態において、所望の遺伝子座の両方の対立遺伝子に2つの変異体コピーを有するホモ接合細胞、細胞株またはトランスジェニック生物が作製される。

30

【0016】

また、本発明の方法および組成物を含むキットが提供される。キットは、ヌクレアーゼ（例えば、RNA分子、または好適な発現ベクター内に含有されるZFN、TALENもしくはCRISPR/Cas系コード化遺伝子）、あるいはヌクレアーゼタンパク質のアリコート、ドナー分子、好適な宿主細胞株、本発明の方法を実行するための説明等を含んでもよい。キットはまた、目的ドナー分子（例えば、レポーター遺伝子、特定の導入遺伝子等）を含んでもよい。

【0017】

これらのおよび他の態様は、本開示を全体として考慮すると、当業者に容易に明らかとなる。

40

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

2本鎖ポリヌクレオチドであって、

外因性核酸配列と、

1つ以上のヌクレアーゼに対する1つ以上の標的部位を含む配列とを含み、

前記1つ以上の標的部位は、前記外因性核酸配列内ではなく、さらに、前記2本鎖ポリヌクレオチドは、相同アームを含まない、2本鎖ポリヌクレオチド。

(項目2)

前記外因性核酸配列は、少なくとも1kbの長さである、請求項1に記載の2本鎖ポリ

50

ヌクレオチド。

(項目 3)

前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドは、プラスミドである、請求項 1 または請求項 2 に記載の 2 本鎖ポリヌクレオチド。

(項目 4)

前記外因性核酸配列は、導入遺伝子を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の 2 本鎖ポリヌクレオチド。

(項目 5)

前記配列は、2 つの標的部位、および前記 2 つの標的部位の間の少なくとも 5 つのヌクレオチドのスペーサーを含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の 2 本鎖ポリヌクレオチド。

10

(項目 6)

請求項 1 から 5 のいずれかに記載の 2 本鎖ポリヌクレオチドを含む細胞。

(項目 7)

細胞の内因性遺伝子座内に外因性核酸配列ポリヌクレオチドを組み込む方法であって、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の 2 本鎖ポリヌクレオチドを、前記細胞内に導入する工程と、

1 つ以上のヌクレアーゼを前記細胞内に導入する工程とを含み、前記ヌクレアーゼは、前記 2 本鎖ポリヌクレオチドを切断し、そして前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドが前記内因性遺伝子座内に組み込まれるように、前記内因性遺伝子座を切断する、方法。

20

(項目 8)

前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドは、順方向に組み込まれる、請求項 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドは、逆方向に組み込まれる、請求項 7 に記載の方法。

(項目 10)

同じヌクレアーゼが、前記内因性遺伝子座およびドナーポリヌクレオチドを切断する、請求項 7 から 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 11)

異なるヌクレアーゼが、前記内因性遺伝子座およびドナーポリヌクレオチドを切断する、請求項 7 から 9 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 12)

前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドは、相同性非依存性の機構を介して前記内因性遺伝子座内に組み込まれる、請求項 7 から 11 のいずれかに記載の方法。

(項目 13)

前記 2 つの標的部位および前記スペーサーを含む前記核酸は、前記標的部位が前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドの組み込み後に再形成されないように、非天然型のものである、請求項 7 から 12 のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

前記ヌクレアーゼは、前記内因性遺伝子座内に欠失を生成し、前記外因性核酸配列ポリヌクレオチドは、前記欠失に組み込まれる、請求項 7 から 13 のいずれかに記載の方法。

40

(項目 15)

前記細胞は、真核細胞である、請求項 7 から 14 のいずれかに記載の方法。

(項目 16)

前記細胞は、植物細胞または哺乳動物細胞である、請求項 15 に記載の方法。

(項目 17)

前記植物細胞は、双子葉植物細胞または单子葉植物細胞である、請求項 16 に記載の方法。

(項目 18)

50

請求項7から17のいずれかに記載の方法に従って組み込まれた外因性核酸配列ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック生物。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Aは、各対がスパーサーにより隔てられた2つの対結合部位（全部で4つの結合部位）を有する例となるドナー分子を示す概略図であり、これらの部位はゲノム内に組み込まれる導入遺伝子に隣接している。標的部位は、同じまたは異なっているもよい。

【図1B】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Bは、4つの異なるインビボドナー切断技術を示す概略図である。第1の実施形態において、染色体およびドナープラスミドの両方がZFN切断部位（暗灰色の領域）を含有する場合、ドナーおよび染色体の切断が同期し、染色体内へのドナーの効率的な組み込みが可能となる。組み込みは、それぞれ「AB」および「BA」と呼ばれる順方向および逆方向の両方で生じ得る。第2の実施形態において、ドナーは、2つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含有する。ヌクレアーゼの作用は、DNAの直線断片を解放し、これが染色体内に組み込まれる。第3の実施形態において、染色体は、2つ以上のヌクレアーゼにより切断され、ドナーは、1つのヌクレアーゼにより切断され、染色体内の欠失へのドナーの組み込みがもたらされる。第4の実施形態において、ドナーDNAおよび染色体DNAの両方が、2つ以上のヌクレアーゼにより切断され、染色体内の欠失への直線断片の組み込みがもたらされる。

【図1C】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Cは、導入遺伝子の順方向（AB）組み込みに有利であり、同じヌクレアーゼ標的部位（上パネル）を再形成するドナーと、導入遺伝子の逆方向（BA）組み込みに有利であり、同じヌクレアーゼ標的部位（下パネル）を再形成しないドナーとの比較を示す。結合部位間の配列（スパーサー）に下線が引かれており、切断後に形成された野生型（上パネル）のオーバーハングおよび逆相補（下パネル）スパーサーは、上および下パネルの右側に示されている。左上に示される配列は、配列番号：107および108である。右上に示される配列は、配列番号：109および110である。左下に示される配列は、配列番号：111および112であり、右下に示される配列は、配列番号：113および114である。

【図1D】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Dは、ZFN結合部位（ゲノム内と同じスパーサー配列）の間の野生型（「w. t.」）配列（またはスパーサー）およびZFN結合部位の間の逆相補（「r. c.」）配列を有するドナーからの標的化組み込みの検出を示すゲルである。示されるように、逆補体オーバーハングヌクレオチドにより、BA方向においてより多くのシグナルが見られる。

【図1E】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Eは、AAVS1特異的ZFNによるインビボ切断後のAAVS1でのドナープラスミドの組み込みを示すゲルである。AAVS1 ZFN部位を含有する、または有さないドナープラスミドは、AAVS1特異的ZFNでK562細胞内に共トランスフェクトされた。ABおよびBA方向の両方における組み込みは、染色体ドナー接合点のPCRにより監視した。AB方向での挿入は、左および右の接合点に対しそれぞれ391および423bpのPCR産物を生成し、BA方向での挿入は、左および右の接合点に対してそれぞれ369および471bpの接合点PCR産物を生成する。「A1」は、AAVS1 ZFN部位を増幅するように設計されたPCR反応を指し、「NT」は、DNA鋳型を有さない反応を指す。

【図1F】（パネルA～F）K562細胞におけるAAVS1遺伝子座でインビボで切断された導入遺伝子の捕捉を示す。図1Fは、3倍体AAVS1遺伝子座の概略図およびサザンブロットにより分析された標的化組み込みの調査の結果の両方を示す。3つのクロ-

10

20

30

40

50

ンを2回分析した。3つのクローンからのゲノムDNAを、BglIで切断してAAVS1特異的プローブで精査する(上のゲル)か、または、AccIで切断して、導入遺伝子特異的プローブ(b1a)で精査した。

【図2A】(パネルAおよびB)インビボドナー切断が、2つの異なる細胞型におけるいくつかの遺伝子座での導入遺伝子捕捉を促進することを示す。図2Aは、IL2R γ 、CCR5、およびグルタミン合成酵素(GS)遺伝子座における部位でのNH₂Jを介した標的化組み込みが、ドナープラスミドがトランスフェクションの前に切断されるよりも染色体と同時切断された場合により効率的であることを示している。3つ全ての遺伝子座において、各方向に対して1回の接合点PCRを行ったが、左の接合点はBA方向、右の接合点はAB方向に対するものである。使用した実験条件は、以下のように標示される:「N」は、ドナーがZFN部位を有さないトランスフェクションを指し;「ERV」は、ドナーが細胞内への導入の前にEcoRVで事前に切断された試料を指し;「Y」は、ドナーおよび標的化遺伝子の両方がZFN部位を含有していたトランスフェクションを指し;「NT」は、鋳型DNAのないPCR反応を指す。組み込みに成功したドナーのPCR増幅から推定される単位複製配列サイズは、塩基対の各レーンの下に示される(「推定サイズ、bp」)。示された写真は、臭化エチジウム染色ゲルの色反転画像である。

【図2B】(パネルAおよびB)インビボドナー切断が、2つの異なる細胞型におけるいくつかの遺伝子座での導入遺伝子捕捉を促進することを示す。図2Bは、ドナー切断が、染色体内の標的部位を切断するために使用されるものと同じZFNを用いて行われる必要がないことを示す。染色体標的の内への導入遺伝子組み込みを検出するため、および組み込まれた導入遺伝子の方向を検出するために、接合点特異的PCRアッセイを使用した。これらのアッセイは、導入遺伝子がZFN切断後にいずれの方向においても組み込みし得ることを示した。実験条件は、以下のように標示される:GS、GS特異的ZFNまたはGS-ZFN切断部位を有するドナープラスミド;A1、AAVS1特異的ZFNまたはAAVS1-ZFN切断部位を有するドナー。

【図3-1】(パネルA~C)CHO-K1細胞内のGS遺伝子座における高頻度標的化導入遺伝子組み込みを示す。図3Aは、BA方向に組み込まれた導入遺伝子を示すGS遺伝子座の概略図である。

【図3-2】(パネルA~C)CHO-K1細胞内のGS遺伝子座における高頻度標的化導入遺伝子組み込みを示す。図3Bは、GS遺伝子座におけるドナーの標的化組み込みの細胞クローンのサザンブロットアッセイを示す。エキソンGSプローブはまた、2つのGS偽遺伝子を検出する。クローンの同じパネルを、大腸菌b1a遺伝子に対する精査により、全導入遺伝子組み込みに関して分析した(図3C)。分析した8つのクローンのうちの3つにおけるゲノム内の他の場所における導入遺伝子組み込みと共に、GS遺伝子座における導入遺伝子の組み込みが見られる。

【図4A】(パネルAおよびC)モノクローナル抗体導入遺伝子のZFNおよびTALEN媒介標的化挿入による、CHO-K1細胞におけるアルファ(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)の妨害を示す。図4Aは、接合点特異的PCRによる導入遺伝子挿入について、およびIgG発現についてスクリーニングされたクローンの間の一致を示す、面積比例ベン図を示す。

【図4B】(パネルAおよびC)モノクローナル抗体導入遺伝子のZFNおよびTALEN媒介標的化挿入による、CHO-K1細胞におけるアルファ(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)の妨害を示す。図4Bは、挿入された導入遺伝子(薄灰色で示される)を含有するFUT8遺伝子座の概略図であり、導入遺伝子の方向は「AB」または「BA」の用語のいずれかで標示されており、図4Cは、FUT8における組み込みのサザンブロットによる確認を示す。BAおよびAB方向に挿入された導入遺伝子を含む要素が示されている。

【図4C】(パネルAおよびC)モノクローナル抗体導入遺伝子のZFNおよびTALEN媒介標的化挿入による、CHO-K1細胞におけるアルファ(1,6)-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)の妨害を示す。図4Bは、挿入された導入遺伝子(薄灰色

で示される)を含有するFUT8遺伝子座の概略図であり、導入遺伝子の方向は「AB」または「BA」の用語のいずれかで標示されており、図4Cは、FUT8における組み込みのサザンブロットによる確認を示す。BAおよびAB方向に挿入された導入遺伝子を含有する要素が示されている。

【図5A】(パネルA~C)実施例で説明される実験のZFN活性を示す。図5Aは、AAVS1遺伝子座(上)における、およびドナープラスミド(下)のZFN切断を示す。図5Aにおける図1Dからの対応するレーンは、ゲルの上に示され(例:「1, 12」)、Surveyor(商標)ヌクレアーゼ酵素の存在(「Y」)または非存在(「N」)も同様である。修飾された分子のパーセンテージは、シグナルと共にレーンの下に示されている。

10

【図5B】(パネルA~C)実施例で説明される実験のZFN活性を示す。図5Bは、対応する遺伝子特異的ZFNを使用したIL2RG、CCR5、およびGSでのZFN切断を示す。5Aに関して上述したように、5Bにおける図2Aからの対応するレーンは、ゲルの上に示され、Surveyor(商標)ヌクレアーゼ酵素の存在(「Y」)または非存在(「N」)も同様である。図5Bの上段のゲルは、遺伝子座内への組み込みからの結果を示しているが、図の下段のゲルは、ドナーにおける切断の結果を示している。

【図5C】(パネルA~C)実施例で説明される実験のZFN活性を示す。図5Cは、GSでのZFN切断を示し、左側のゲルは、CHO細胞における遺伝子座からの結果を示し、一方右側のゲルは、ドナーのZFN切断の結果を示している。上述のように、図5Cにおける図2Bからの対応するレーンは、ゲルの上に示され、Surveyor(商標)ヌクレアーゼ酵素の存在(「Y」)または非存在(「N」)も同様である。矢印は、推定される切断産物を示す。

20

【図6】図6は、HEK293およびCHO-K1細胞におけるGFPをコードする導入遺伝子の相同性指向性の標的化組み込みを示すグラフである。GFP陽性である細胞のパーセンテージは、薄灰色(HEK293細胞)または暗灰色(CHO-K1細胞)で示されている。使用されたドナーの量は、各分類の下に示されている。

【図7】図7は、CHO-K1クローンからの接合点PCR産物の部分DNA配列を示し、インビボ切断されたドナーがAAVS1遺伝子座内に組み込まれた。染色体配列は標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている。微小相同性は灰色で網掛けされている。推定されるAB方向の対立遺伝子配列は、AB群の上の段に示され、5'オーバーハングの完全な連結として定義され；推定されるBA方向の対立遺伝子配列は、BA群の上の段に示され、5'オーバーハングの除去に続く連結として定義される。配列識別子が図中に示されている。

30

【図8A】図8(パネルA~C)は、AAVS1(図8A)、CCR5(図8B)、GS(図8C)、およびIL2RG(図8C)における導入遺伝子組み込みを有するCHO-K1細胞プールからの接合点PCRアッセイのDNA配列を示す。染色体配列は、標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている。推定される対立遺伝子配列は上記のように示され、また図7に関して上で定義された通りである。2回以上単離された同一の配列が示され、配列識別子が図中に示されている。

40

【図8B】図8(パネルA~C)は、AAVS1(図8A)、CCR5(図8B)、GS(図8C)、およびIL2RG(図8C)における導入遺伝子組み込みを有するCHO-K1細胞プールからの接合点PCRアッセイのDNA配列を示す。染色体配列は、標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている。推定される対立遺伝子配列は上記のように示され、また図7に関して上で定義された通りである。2回以上単離された同一の配列が示され、配列識別子が図中に示されている。

【図8C】図8(パネルA~C)は、AAVS1(図8A)、CCR5(図8B)、GS(図8C)、およびIL2RG(図8C)における導入遺伝子組み込みを有するCHO-K1細胞プールからの接合点PCRアッセイのDNA配列を示す。染色体配列は、標準文

50

字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている。推定される対立遺伝子配列は上記のように示され、また図7に関して上で定義された通りである。2回以上単離された同一の配列が示され、配列識別子が図中に示されている。

【図9】図9は、GS単一細胞由来クローンからの接合点PCRのDNA配列を示す。染色体配列は標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている。推定されるAB方向の対立遺伝子は、5'オーバーハングの完全な連結として定義され、推定されるBA方向の対立遺伝子は、5'オーバーハングの除去に続く連結として定義される。配列識別子が図中に示されている。

【図10A】（パネルAおよびB）FUT8における組み込みを有する単一細胞由来クローンからの接合点PCRのDNA配列を示す。染色体配列は標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。図10Aは、FUT8標的化ZFNによる切断後の組み込みを示す（ZFN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている）。

10

【図10B】（パネルAおよびB）FUT8における組み込みを有する単一細胞由来クローンからの接合点PCRのDNA配列を示す。染色体配列は標準文字で示され、ドナー配列は斜体で示されている。図10Bは、FUT8標的化TALENによる切断後の組み込みを示す（TALEN結合部位は下線が引かれ、太字で示されている）。配列識別子が図中に示されている。

【図11】図11は、pDAB109350のプラスミドマップを示す。

【図12】図12は、pDAB109360のプラスミドマップを示す。

20

【図13】図13は、pDAS000153のプラスミドマップを示す。

【図14】図14は、pDAS000150のプラスミドマップを示す。

【図15】図15は、pDAS000143のプラスミドマップを示す。

【図16】図16は、pDAS000164のプラスミドマップを示す。

【図17】図17は、pDAS000433のプラスミドマップを示す。

【図18】図18は、pDAS000434のプラスミドマップを示す。

【図19A】（パネルAおよびB）ZFN媒介NHEJ指向性DNA修復を使用したコムギ（*Triticum aestivum*）の小麦ゲノムにおける内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングを示す。図19Aは、第1の導入遺伝子スタックを示し、図19Bは、第2の導入遺伝子スタックを示す。

30

【図19B】（パネルAおよびB）ZFN媒介NHEJ指向性DNA修復を使用したコムギ（*Triticum aestivum*）の小麦ゲノムにおける内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングを示す。図19Aは、第1の導入遺伝子スタックを示し、図19Bは、第2の導入遺伝子スタックを示す。

【図20A】（パネルAおよびB）ZFN媒介HDR指向性DNA修復を使用したコムギ（*Triticum aestivum*）の小麦ゲノムにおける内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングを示す。図20Aは、第1の導入遺伝子スタックを示し、図20Bは、第2の導入遺伝子スタックを示す。

【図20B】（パネルAおよびB）ZFN媒介HDR指向性DNA修復を使用したコムギ（*Triticum aestivum*）の小麦ゲノムにおける内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングを示す。図20Aは、第1の導入遺伝子スタックを示し、図20Bは、第2の導入遺伝子スタックを示す。

40

【図21】図21は、pDAS000435のプラスミドマップを示す。

【図22】図22は、pDAB107827のプラスミドマップを示す。

【図23】図23は、pDAB107828のプラスミドマップを示す。

【図24】図24は、pDAS000340のプラスミドマップを示す。

【図25】図25は、pDAS000341のプラスミドマップを示す。

【図26】図26は、pDAS000342のプラスミドマップを示す。

【図27】図27は、pDAS000343のプラスミドマップを示す。

【図28-1】（パネルAおよびB）プライマーの場所、ならびにFad3Cの開始およ

50

び停止コドンに対するそれらの位置を示す。図28Aは、野生型Fad3C遺伝子座のプライマー部位の場所を示す。図28Bは、ドナー組み込みを確認するためにプライマー部位の場所を示し、またドナーがFad3C遺伝子座内に組み込み得る可能な方向を示す。

【図28-2】（パネルAおよびB）プライマーの場所、ならびにFad3Cの開始および停止コドンに対するそれらの位置を示す。図28Aは、野生型Fad3C遺伝子座のプライマー部位の場所を示す。図28Bは、ドナー組み込みを確認するためにプライマー部位の場所を示し、またドナーがFad3C遺伝子座内に組み込み得る可能な方向を示す。

【図29A】（パネルAおよびB）様々な標的化組み込みの配列アライメントを示す。図29Aは、ZFN 28051-2A-28052により認識される2本鎖切断におけるpDAS000341のtGFPカセットのFad3Cとの接合点から増幅された配列アライメントを示す。示される配列は、上から下に向かって配列番号：480から493である。「：」は、切断部位に位置する欠失を示す。

10

【図29B】（パネルAおよびB）様々な標的化組み込みの配列アライメントを示す。図29Bは、ZFN 28051-2A-28052およびZFN 28053-2A-28054により認識される2本鎖切断におけるpDAS000343のtGFPカセットのFad3Cとの接合点から増幅された配列アライメントを示す。「：」は、切断部位に位置する欠失を示す。示される配列は、上から下に向かって配列番号：494から507である。

【図30】（パネルAおよびB）ZFN 28051-2A-28052により認識される2本鎖切断におけるpDAS000340のhphカセットのFAD3Cとの接合点から増幅された配列アライメントを示す。「：」は、切断部位に位置する欠失を示す。示される配列は、上から下に向かって配列番号：508から523である。図30Aは、5'接合点に対する配列を示し、図30Bに示される配列は、3'接合点に対するものである。

20

【図31】（パネルAおよびB）ZFN 28051-2A-28052および28053-2A-28054により認識される2本鎖切断におけるpDAS00034のhphカセットのFAD3Cとの接合点から増幅された配列アライメントを示す。「：」は、切断部位に位置する欠失を示す。示される配列は、上から下に向かって配列番号：524から532である。図31Aに示される配列は、5'接合点に対するものであり、図31Bに示される配列は、3'接合点に対するものである。

30

【図32】図32は、Corn Event DAS-59132におけるトランスジェニック挿入物のゲノム遺伝子座に結合するように設計されたZFNの関係を示す。酵母アッセイから6つのZFN（E32 ZFN1-6）が同定され、4つのZFNを植物における評価に進めた。

【図33】図33は、pDAB105906のプラスミドマップを示す。

【図34】図34は、pDAB111809のプラスミドマップを示す。

【図35】図35は、pDAB100655のプラスミドマップを示す。

【図36】図36は、植物において一時的に発現したZFNの評価を示すグラフを示す。4つのZFNを、IPP2遺伝子に指向したZFNおよび内部対照ZFNを一時的に発現させることにより、トウモロコシカルスにおいて評価した。ZFN切断部位の周囲の領域からのPCR増幅断片の次世代配列決定後に、配列決定されたPCR増幅断片を、インデルから得られた配列改変体の存在に関してスコア化した。IPP2 ZFN活性と比較した、4つのE32 ZFN対のそれぞれからのインデルの相対的頻度が示されている。25716（'716）および25717（'717）ジンクフィンガー結合ドメインを含有するEvent 32 ZFN6は、対照IPP2ジンクフィンガーヌクレアーゼの380倍の効率で、トランスジェニックCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座を切断した。

40

【図37】図37は、Corn Event DAS-59132のZFN遺伝子座妨害のグラフを示す。

【図38】図38は、トウモロコシゲノムのELP内へのドナー組み込みのために使用さ

50

れた実験系を示す概略図である。

【図39】図39は、eZFNによるゲノム標的DNAの切断を示すグラフである。示されるように、各処理群（それぞれ6つの反復実験試料）からDNAを単離した。TAQMAN（商標）アッセイを使用して、標的DNAの切断を測定した。eZFNの切断活性は、ドナーDNAのみの処理と比べたものである。eZFN（eZFN1およびeZFN3）レベルは、ドナーDNAに対して1：1または1：10の比であった。統計的分類は、小文字で示されている。

【図40】図40は、トウモロコシゲノムのELP遺伝子座内のプライマー結合部位を示す。

【図41】図41は、複製数評価のためのpDAB100651断片のプライマー結合部位を示す。

【図42】図42は、eZFNの切断活性が、ドナーDNAのみの処理と比べたものであることを示す。eZFN（eZFN1およびZFN3）切断レベルは、ドナーDNAに対して1：1または1：10の比であった。統計的分類は、小文字で示されている。

【図43】（パネルAおよびB）インーアウトPCR反応からの接合点配列を示す。左および右の配列は、それぞれAAD1およびELPの部分配列である。eZFN結合部位を修復する挿入から推定される配列は、青色フォントで示されている。eZFN結合部位は、緑色ハイライトであり、欠失は黒色のバーである。順方向（図43A）および逆方向（図43B）に対する配列が示されている。配列は、それらがクローン化されたPCR反応に従うブロック内にある。

【発明を実施するための形態】

【0019】

導入遺伝子のヌクレアーゼ媒介相同性非依存性（例えばNHEJ捕捉）標的化組み込みのための組成物および方法が、本明細書に開示される。オリゴヌクレオチドの挿入は、DNAの適合する5'オーバーハングとの単純な共トランスフェクションにより行うことができるが、ここで、導入遺伝子サイズ断片（例えば>0.5kb）のNHEJ捕捉が、染色体の切断に加えてドナープラスミドのインビボヌクレアーゼ媒介切断により大きく促進されることが示された。このようにして、より大きいサイズ（例えば1kbから14kbの間またはそれ以上の長さ）の導入遺伝子が、標的化された様式で、HDRベースの組み込みに抵抗する生物および細胞株、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞内に組み込まれ得る。例えば、インビボドナー切断は、さもないと大型DNA配列の標的化挿入に抵抗する細胞型である非選択的CHO細胞において、高頻度（6%）での標的化組み込みを可能とした。

【0020】

本明細書に記載の染色体および導入遺伝子含有2本鎖ドナーの同時切断は、選択された宿主細胞における任意の内因性標的遺伝子座内への組み込みの成功をもたらす。本明細書に記載の方法および組成物は、事前に切断されたドナーの単純な共トランスフェクションにより一般には達成不可能である、効率的な非相同性主導的標的化組み込みを可能にする。

【0021】

したがって、本明細書に記載の組成物および方法は、ZFNおよび／またはTALEN等の操作されたヌクレアーゼにより形成される欠失を含むヌクレアーゼ切断部位内への、大型導入遺伝子の相同性非依存性標的化組み込みを可能にする。代替として、導入遺伝子部分がヌクレアーゼ切断後に解放され、標的化された場所で効率的に組み込まれるように、組み込まれる導入遺伝子に隣接するヌクレアーゼ部位を有するドナープラスミドが使用され得る。さらに、細菌または酵母人工染色体等の大型ドナー分子のヌクレアーゼ媒介インビボ切断を可能にする本発明の方法および組成物の使用により、哺乳動物および植物細胞における大型導入遺伝子の標的化組み込みが可能となる。最後に、説明されるインビボ切断組成物および方法は、他の生物および細胞、特に相同性指向性DNA修復を良好には実行しないものの標的化された遺伝子組み換えにおける使用が見出される。

【0022】

概要

本明細書に開示される方法の実践ならびに組成物の調製および使用は、別途指定されない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えDNA、ならびに当該分野の技術の範囲内である関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献に完全に説明されている。例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989および第3版2001、Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987および定期改訂版、METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ、Academic Press, San Diego、Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999、ならびにMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999を参照されたい。

10

20

【0023】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、同義に使用され、線状または環状構造であり、かつ一本鎖または二本鎖形態のいずれかである、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指す。本開示の目的のために、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的であると解釈されるべきではない。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基部分、糖部分および／またはリン酸部分において修飾されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）を包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対形成特異性を有し、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対形成する。

30

【0024】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために交換可能に使用される。この用語はまた、1つ以上のアミノ酸が、対応する天然型アミノ酸の化学的類似体または修飾誘導体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

【0025】

「結合」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的で非共有結合的な相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用の全ての構成要素が配列特異的である必要はない（例えば、DNA骨格内のリン酸残基との接触）。かかる相互作用は、一般に、 10^{-6} M^{-1} 以下の解離定数（ K_d ）によって特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、すなわち、結合親和性の増加は、 K_d の低下と相関している。

40

【0026】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することができるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）、および／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合、それは、それ自体に結合する（そしてホモ二量体、ホモ三量体等を形成する）ことができ、かつ／または、それは、異なるタンパク質（単数または複数）の1つ以上の分子に結合することができる。結合タンパク質は、1つより多くの種類の結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィ

50

ンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性、およびタンパク質結合活性を有する。

【0027】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、亜鉛イオンの配位によってその構造が安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1つ以上のジンクフィンガーを通じて配列特異的な状態でDNAに結合する、タンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、しばしば、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと省略される。

【0028】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALE反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEの、その同族の標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも称される）は、典型的には33～35アミノ酸長であり、天然型TALEタンパク質内の他のTALE反復配列との少なくともある程度の配列相同性を示す。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0029】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然型ジンクフィンガーの認識ヘリックス領域の操作（1つ以上のアミノ酸の改変）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。同様に、TALEは、例えば、DNA結合に関与するアミノ酸（反復可変二残基またはRVD領域）の操作によって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」することができる。したがって、操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、非天然型タンパク質である。DNA結合タンパク質を操作するための方法の非限定的な例は、設計および選択である。設計されたDNA結合タンパク質は、その設計／組成が主として合理的基準によってもたらされる、天然には生じないタンパク質である。設計のための合理的基準は、置換規則の適用、ならびに既存のZFPおよび／またはTALE設計および結合データの情報を格納するデータベース内の情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用を含む。例えば、米国特許第6,140,081号、同第6,453,242号、および同第6,534,261号を参照されたく、国際公開第WO98/53058号、同第WO98/53059号、同第WO98/53060号、同第WO02/016536号、および同第WO03/016496号、ならびに米国公開第20110301073号、同第20110239315号、および同第20119145940号も参照されたい。

【0030】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その産生が、主としてファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択等の実験的プロセスからもたらされる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,200,759号、国際公開第WO95/19431号、同第WO96/06166号、同第WO98/53057号、同第WO98/54311号、同第WO00/27878号、同第WO01/60970号、同第WO01/88197号、および同第WO02/099084号、ならびに米国特許公開第20110301073号、同第20110239315号および同第20119145940号を参照されたい。

【0031】

「組換え」は、非相同末端結合（NHEJ）および相同組換えによるドナー捕捉を含むがこれらに限定されない、2つのポリヌクレオチド間における遺伝子情報の交換のプロセスを指す。本開示の目的のために、「相同組換え（HR）」は、例えば、相同性指向性の修復機構を介して細胞内の2本鎖切断の修復中に起こる、かかる交換の特殊な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、2本鎖切断を経験した分子）の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的へ

の遺伝子情報の伝達をもたらすため、「非交差遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」として様々に知られている。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、かかる伝達は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ修正、および／または、標的の一部になる遺伝子情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存鎖アニーリング」、および／または関連プロセスに参与し得る。かかる特殊なHRは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全てが標的ポリヌクレオチドに組み込まれるように、標的分子の配列の改変をもたらす。HR指向性組み込みにおいて、ドナー分子は、少なくとも50～100塩基対の長さのゲノムに対する相同性の少なくとも2つの領域（「相同アーム」）を含有する。例えば、米国特許公開第20110281361号を参照されたい。

10

【0032】

本開示の方法において、本明細書に記載される1つ以上の標的ヌクレアーゼは、既定の部位において標的配列（例えば、細胞クロマチン）に2本鎖切断を作製し、その切断領域内のヌクレオチド配列と相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドを細胞に導入することができる。2本鎖切断の存在は、ドナー配列の組み込みを容易にすることが示されている。ドナー配列は、物理的に組み込まれてもよいか、または代替として、ドナーポリヌクレオチドは、相同組換えを介した切断の修復のための鋳型として使用され、その結果、ドナー内のヌクレオチド配列の全てまたは一部の細胞クロマチンへの導入をもたらす。故に、細胞クロマチン内の第1の配列は、改変することができ、特定の実施形態において、ドナーポリヌクレオチド内に存在する配列へと変換することができる。故に、「置換する」または「置換」という用語の使用は、あるヌクレオチド配列の、別のヌクレオチド配列による置換（すなわち、情報の意味における配列の置換）を表すと理解することができ、あるポリヌクレオチドの、別のポリヌクレオチドによる物理的または化学的置換は必ずしも必要ではない。

20

【0033】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、細胞内のさらなる標的部位のさらなる2本鎖切断のために、ジンクフィンガータンパク質またはTALENのさらなる対が使用され得る。

【0034】

本明細書に記載の方法のいずれも、任意のサイズのドナーの挿入、および／または目的遺伝子（複数可）の発現を妨害するドナー配列の標的化組み込みによる、細胞内の1つ以上の標的配列の部分的もしくは完全な不活性化に使用され得る。部分的または完全に不活性化された遺伝子を含む細胞株もまた提供される。

30

【0035】

さらに、本明細書に記載される標的化組み込みの方法を使用して、1つ以上の外因性配列を組み込むこともできる。外因性核酸配列は、例えば、1つ以上の遺伝子もしくはcDNA分子、または任意の種類のコードもしくは非コード配列、ならびに1つ以上の調節要素（例えば、プロモーター）を含むことができる。加えて、外因性核酸配列（導入遺伝子）は、1つ以上のRNA分子（例えば、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、阻害性RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）等）を産生し得る。

40

【0036】

「切断」は、DNA分子の共有結合骨格の破壊を指す。切断は、ホスホジエステル結合の酵素加水分解または化学的加水分解を含むが、これらに限定されない、多様な方法によって開始することができる。一本鎖切断も2本鎖切断もいずれも可能であり、2本鎖切断は、2つのはっきりと異なる一本鎖切断イベントの結果として生じ得る。DNA切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの生成をもたらし得る。ある特定の実施形態において、融合ポリペプチドが、標的とする2本鎖DNA切断に使用される。

【0037】

「切断ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なる）と組み合わせ、切断活性（好ましくは、2本鎖切断活性）を有する複合体を形成するポリペプチド配

50

列である。「第1および第2の切断ハーフドメイン」、「+および-切断ハーフドメイン」、ならびに「右および左切断ハーフドメイン」という用語は、二量体化する切断ハーフドメインの対を指すように交換可能に使用される。

【0038】

「操作された切断ハーフドメイン」は、別の切断ハーフドメイン（例えば、別の操作された切断ハーフドメイン）と共に偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾された切断ハーフドメインである。また、米国特許公開第2005/0064474号、同第20070218528号および同第2008/0131962号も参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0039】

「配列」という用語は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、DNAまたはRNAであり得、線状、環状、または分岐状であり得、1本鎖または2本鎖のいずれでもあり得る。「ドナー配列」または「導入遺伝子」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば、2～100,000,000ヌクレオチド長（またはその間のもしくはそれ以上の任意の整数値）、好ましくは、約100～100,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の整数）、より好ましくは、約2000～60,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の値）、さらにより好ましくは、約3～15 kb（またはその間の任意の値）であり得る。

【0040】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にDNA、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核細胞クロマチンの大半は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、ヒストンH2A、H2B、H3、およびH4をそれぞれ2つ含む八量体と会合した約150個の塩基対のDNAを含み、（生物に応じて可変長の）リンカーDNAは、ヌクレオソームコアの間に延在する。ヒストンH1の分子は、概して、リンカーDNAと会合している。本開示の目的のために、「クロマチン」という用語は、すべての種類の細胞核タンパク質（原核および真核の両方）を包含するよう意図される。細胞クロマチンは、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方を含む。

【0041】

「染色体」は、細胞のゲノムのすべてまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、その核型を特徴とし、これは、この細胞のゲノムを含むすべての染色体の集合である。細胞のゲノムは、1つ以上の染色体を含み得る。

【0042】

「エピソーム」は、複製核酸、核タンパク質複合体、または細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む他の構造である。エピソームの例として、プラスミドおよびあるウイルスゲノムが挙げられる。

【0043】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在する場合に結合分子が結合する核酸の一部分を定義する核酸配列である。

【0044】

「外因性」分子は、通常は細胞内に存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって細胞内に導入することができる分子である。「通常は細胞に存在する」かは、細胞の特定の発達段階および環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間だけ存在する分子は、成体筋細胞に対する外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、熱ショックを受けていない細胞に対して外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全型内因性分子の機能型、または正常機能型内因性分子の機能不全型を含むことができる。

【0045】

外因性分子は、とりわけ、小分子（コンビナトリアル化学プロセスによって生成されるもの等）、または高分子（タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタン

10

20

30

40

50

パク質、多糖)、上記分子の任意の修飾誘導体、または上記分子のうちの1つ以上を含む任意の複合体等であってもよい。核酸は、DNAおよびRNAを含み、1本鎖または2本鎖であり得、線状、分岐状、または環状であり得、任意の長さであり得る。核酸には、二重鎖を形成することができる核酸、ならびに三重鎖形成核酸が含まれる。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞内に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または通常は細胞内に存在しない染色体を含むことができる。細胞内に外因性分子を導入するための方法は、当業者に既知であり、脂質介在性導入(すなわち、中性脂質および陽イオン性脂質を含むリポソーム)、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン介在性導入、およびウイルスベクター媒介性導入を含むが、これらに限定されない。外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子でもあり得るが、細胞が由来するものとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列は、本来はマウスまたはハムスターに由来する細胞株に導入され得る。

【0047】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発達段階にある特定の細胞内に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体、もしくは他の細胞小器官のゲノム、または天然型エピソーム核酸を含むことができる。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれ得る。

【0048】

「融合」分子は、好ましくは共有結合的に、2つ以上のサブユニット分子が連結した分子である。サブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例としては、融合タンパク質(例えば、ZFPまたはTALE DNA結合ドメインと1つ以上の活性化ドメインとの間の融合物)および融合核酸(例えば、上記の融合タンパク質をコードする核酸)が挙げられるが、これらに限定されない。第2の型の融合分子の例としては、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

細胞内の融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の細胞への送達からもたらされ得るか、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが細胞に送達され、そのポリヌクレオチドが転写され、その転写物が翻訳されて、融合タンパク質を生成することによってもたらされ得る。トランススプライシング、ポリペプチド切断、およびポリペプチド連結もまた、細胞内のタンパク質の発現に関与する可能性がある。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの細胞への送達方法は、本開示の他の箇所に提示される。

【0050】

本開示の目的のために、「遺伝子」は、遺伝子産物(下記を参照されたい)をコードするDNA領域、および遺伝子産物の産生を制御する全てのDNA領域(かかる制御配列がコード配列および/または転写配列に隣接しているか否かに関わらず)を含む。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列(リボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位等)、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界要素、複製起点、マトリックス付着部位、および遺伝子座調節領域が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0051】

10

20

30

40

50

「遺伝子発現」は、遺伝子内に含まれる情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、もしくは任意の他の種類のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されるタンパク質であり得る。遺伝子産物にはまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集等のプロセスによって修飾されたRNA、ならびに、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチン化、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質も含まれる。

【0052】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の活性における変化を指す。発現の調節には、遺伝子の活性化および遺伝子の抑制が含まれ得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、切断、改変、不活性化、ランダム変異）を使用して発現を調節することができる。遺伝子の不活性化は、本明細書に記載されるZFPを含まない細胞と比較した、遺伝子発現におけるいずれの低減も指す。故に、遺伝子の不活性化は、部分的または完全であり得る。

【0053】

「目的領域」は、細胞クロマチンの任意の領域であり、例えば、外因性分子に結合することが望ましい、遺伝子、または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接する非コード配列等である。結合は、標的化DNA切断および／または標的化組換えの目的のためであり得る。目的領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官のゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染ウイルスゲノム内に存在し得る。目的領域は、遺伝子のコード領域内、転写された非コード領域（例えば、リーダー配列、トレーラー配列、もしくはイントロン等）内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内にあり得る。目的領域は、単一のヌクレオチド対ほど小さいか、または最大2,000ヌクレオチド対長であるか、またはヌクレオチド対の任意の整数値であり得る。

【0054】

「真核」細胞には、真菌細胞（酵母等）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞（例えば、T細胞）が含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

「作動的な連結」および「作動的に連結された」（または「作動可能に連結された」）という用語は、両方の構成要素が正常に機能し、構成要素のうちの少なくとも1つが、他の構成要素のうちの少なくとも1つに対して発揮される機能を媒介できる可能性を許容するように構成要素が配置された、2つ以上の構成要素（配列要素等）の並置を指して交換可能に使用される。例示説明として、転写制御配列が、1つ以上の転写制御因子の有無に応じてコード配列の転写レベルを調節する場合、プロモーター等の転写制御配列がコード配列に作動的に連結される。転写制御配列は、一般に、コード配列と共にシスに作動的に連結されるが、それに直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、たとえそれらが近接していない場合でも、コード配列に作動的に連結された転写制御配列である。

【0056】

融合ポリペプチドに関して、「作動的に連結された」という用語は、構成要素の各々が、そのように連結されていない場合に実行したであろう機能と同じ機能を、他の構成要素との連結において実行するという事実を指すことができる。例えば、ZFP、TALEまたはCas DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALEまたはCas DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および／またはその結合部位に結合することができる一方で、活性化ドメインが遺伝子発現を上方制御することが可能である場合、ZFP、TALEまたはCas DNA結合ドメインと活性化ドメインとは作動的に連結している。ZFP、TALEまたはCas DNA結合ドメインが切断ドメインに融合された融合ポリペプチドの場合、融合ポリペプチドにおいて、ZFP、TALEまたはCas DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および／またはその結合部位に結合可能である一方で、切断ドメインが、標的部位の近傍でDNAを切断可能である場合、ZFP、TALEまたはCas D

10

20

30

40

50

N A結合ドメインと切断ドメインとは作動的に連結している。

【0057】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的断片」は、その配列が、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一ではないが、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同じ機能を保持するタンパク質、ポリペプチド、または核酸である。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多いか、少ないか、もしくは同じ数の残基を有することができる、かつ／または、1つ以上のアミノ酸もしくはヌクレオチドの置換を含有することができる。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、当該技術分野において周知である。同様に、タンパク質の機能を決定するための方法も周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルタ結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、または免疫沈降アッセイによって決定することができる。DNA切断は、ゲル電気泳動によって評価することができる。上記のAusubelらを参照されたい。タンパク質が別のタンパク質と相互作用する能力は、例えば、免疫共沈降、ツーハイブリッドアッセイ、または相補性（遺伝子的相補性もしくは生化学的相補性の両方）によって決定することができる。例えば、Fields et al. (1989) Nature 340: 245-246、米国特許第5,585,245号、およびPCT国際公開第WO98/44350号を参照されたい。

10

【0058】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に導入することが可能である。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子導入ベクター」は、目的とする遺伝子の発現を誘導することができ、かつ遺伝子配列を標的細胞に導入し得る任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニング、および発現ベヒクル、ならびに組み込みベクターを包含する。

20

【0059】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、必ずしも必要でないが好ましくは通例のアッセイにおいて、容易に測定される、タンパク質産物を産生する任意の配列を指す。好適なレポーター遺伝子には、抗生物質耐性（例えばアンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G418耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、有色または蛍光または発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに向上した細胞成長および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）が含まれるが、これらに限定されない。エピトープタグには、例えば、FLAG、His、myc、Tap、HA、または任意の検出可能なアミノ酸配列の1つ以上のコピーが含まれる。「発現タグ」には、目的遺伝子の発現を監視するために所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列が含まれる。

30

【0060】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子が宿主細胞に対するいかなる有害な効果もなしに挿入され得るゲノム内の遺伝子座である。挿入された遺伝子配列の発現が、隣接遺伝子からの任意のリードスルー(read-through)発現により不安定化されないセーフハーバー遺伝子座が最も有益である。哺乳動物細胞におけるセーフハーバー遺伝子座の限定されない例は、AAVS1遺伝子（米国特許第8,110,379号を参照されたい）、CCR5遺伝子（米国特許公開第20080159996号を参照されたい）、Rosa遺伝子座（国際公開第WO2010/065123号を参照されたい）、および／またはアルブミン遺伝子座（米国特許出願第13/624,193号）である。植物細胞におけるセーフハーバー遺伝子座の限定されない例は、ZP15遺伝子座（米国特許第8,329,986号を参照）である。

40

【0061】

ヌクレアーゼ

導入遺伝子を有するドナー分子のインビボ切断に有用な組成物、特にヌクレアーゼ、お

50

よび、導入遺伝子が標的化された様式でゲノム内に組み込まれるような細胞のゲノムの切断のためのヌクレアーゼが記載される。ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼの1つ以上は、天然型である。他の実施形態において、ヌクレアーゼの1つ以上は、非天然型である、すなわち、DNA結合ドメインおよび／または切断ドメインにおいて操作されている。例えば、天然型ヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、選択された標的部位（例えば、同族の結合部位とは異なる部位に結合するように操作されたメガヌクレアーゼ）に結合するように改変され得る。他の実施形態において、ヌクレアーゼは、異種のDNA結合ドメインおよび切断ドメイン（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TAL-エフェクタードメインDNA結合タンパク質、異種の切断ドメインを有するメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン）を含む。

10

【0062】

A. DNA結合ドメイン

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の組成物および方法は、ドナー分子への結合および／または細胞のゲノム内の目的領域への結合に、メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）DNA結合ドメインを使用する。天然型メガヌクレアーゼは、15～40個塩基対の切断部位を認識し、一般的に、LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysボックスファミリー、およびHNHファミリーの4つのファミリーに分類される。例となるホーミングエンドヌクレアーゼには、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、およびI-TevIIIが含まれる。これらの認識配列は既知である。また、米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388、Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118、Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127、Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228、Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180、Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353、およびNew England Biolabsカタログを参照されたい。

20

30

【0063】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物は、操作された（非天然型）ホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を含むヌクレアーゼを使用する。I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIII等のホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの認識配列が知られている。また、米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388、Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118、Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127、Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228、Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180、Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353、およびNew England Biolabsカタログを参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905、Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962、Ashworth et al. (20

40

50

06) Nature 441:656-659, Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66、米国特許公開第20070117128号を参照されたい。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、全体としてのヌクレアーゼという文脈において改変され得るか(すなわち、ヌクレアーゼが同族の切断ドメインを含むように)、または異種の切断ドメインに融合され得る。

【0064】

他の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物において使用されるヌクレアーゼの1つ以上のDNA結合ドメインは、天然型または操作された(非天然型)TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。キサントモナス属の植物病原性細菌は、重要な作物に多くの病害を引き起こすことが知られている。キサントモナスの病原性は、植物細胞内に25を超える異なるエフェクタータンパク質を注入する保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されるタンパク質の中には、植物の転写活性化因子を模倣し、植物のトランスクリプトームを操作する転写活性化因子様(TAL)エフェクターがある(Kay et al. (2007) Science 318:648-651を参照されたい)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含有する。最もよく特徴付けされたTALエフェクターの1つは、キサントモナス・カンペストリス病原型ベシカトリアに由来するAvrBs3である(Bonas et al. (1989) Mol Gen Genet 218:127-136および国際公開第WO2010079430号を参照されたい)。TALエフェクターは、縦列反復の集中ドメインを含有し、各反復が、これらのタンパク質のDNA結合特異性の要である約34個のアミノ酸を含有する。加えて、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(概説についてはSchornack S, et al. (2006) J Plant Physiol 163(3):256-272を参照されたい)。加えて、植物病原性細菌である青枯病菌において、brg11およびhpx17と表記される2つの遺伝子が、青枯病菌の次亜種1系統GM11000および次亜種4系統RS1000において、キサントモナスのAvrBs3ファミリーと相同であることが見出されている(Heuer et al. (2007) Appl and Envir Micro 73(13):4379-4384を参照されたい)。これらの遺伝子は、ヌクレオチド配列において互いに98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおいて1,575bpの欠失分だけ異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物が、キサントモナスのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。例えば、米国特許公開第20110239315号、同第20110145940号および同第20110301073号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0065】

これらのTALエフェクターの特異性は、縦列反復に見出される配列に依存する。反復した配列は、およそ102bpを含み、反復は、典型的に互いに91~100%相同である(Bonas et al., (同書))。反復の多型性は、通常、12および13位に位置し、12および13位の超可変二残基(direct repeats)の正体と、TALエフェクターの標的配列における連続したヌクレオチドの正体との間に1対1の対応関係が存在するように思われる(Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501およびBoch et al. (2009) Science 326:1509-1512を参照されたい)。実験的に、12および13位のHD配列がシトシン(C)への結合をもたらし、NGがTに、NIがA、C、GまたはTに結合し、NNがAまたはGに結合し、INGがTに結合するように、これらのTALエフェクターのDNA認識のための天然コードが決定されている。これらのDNA結合反復を、新たな反復の組み合わせおよび数を用いてタンパク質へと組み立てて、新たな配列と相互作用し、植物細胞内の非内因性レポーター遺伝子の発現を活性化することが可能

10

20

30

40

50

である人工転写因子を作製した(Boch et al, (同書))。操作されたTALタンパク質を、FokI切断ハーフトメインに連結して、酵母レポーターアッセイ(プラスミドベースの標的)において活性を示すTALエフェクタードメインヌクレアーゼ融合(TALEN)を得た。例えば、米国特許公開第20110301073号、Christian et al ((2010) < Genetics epub 10.1534/genetics.110.120717)を参照されたい。

【0066】

他の実施形態において、ヌクレアーゼはCRISPR (クラスタ化された、等間隔にスペーサーが入った、短い回文型の反復(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)) / Cas (CRISPR関連(Crispr Associated))ヌクレアーゼ系を含む系である。CRISPR/Casは、ゲノム操作に使用され得る細菌系に基づいて操作されたヌクレアーゼ系である。それは、多くの細菌および古細菌の適応的免疫応答の一部に基づく。ウイルスまたはプラスミドが細菌に侵入するとき、侵入体のDNAのセグメントは、「免疫」応答によってCRISPR RNA (crRNA)に変換される。このcrRNAは次いで、部分的に相補的な領域を通じて、tracrRNAと呼ばれる別の種類のRNAと会合して、Cas9ヌクレアーゼを、「プロトスペーサー」と呼ばれる標的DNAにおけるcrRNAと相同な領域に導く。Cas9は、DNAを切断して、crRNA転写物内に含有される20ヌクレオチドガイド配列によって指定される部位でDSBの平滑末端を生成する。Cas9は、部位特異的DNA認識および切断のために、crRNAおよびtracrRNAの両方を必要とする。この系は、今では、crRNAおよびtracrRNAが1つの分子に組み合わされ得るように操作されており(「単一ガイドRNA」)、単一ガイドRNAのcrRNAに匹敵する部分は、Cas9ヌクレアーゼが任意の所望の配列を標的とするように導くように操作され得る(Jinek et al (2012) Science 337, p. 816-821、Jinek et al, (2013), eLife 2:e00471、およびDavid Segal, (2013) eLife 2:e00563を参照されたい)。故に、CRISPR/Cas系は、ゲノム内の所望の標的においてDSBを作製するように操作することができ、DSBの修復は、修復阻害因子を使用して誤りがちな(error prone)修復の増加を引き起こすことによって影響を受け得る。

【0067】

ある特定の実施形態において、細胞のゲノムのインビボ切断および／または標的化切断に使用されるヌクレアーゼの1つ以上のDNA結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択の標的部位に結合するように操作されているという点で非天然型である。例えば、例えば、Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141、Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340、Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660、Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637、Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416、米国特許第6,453,242号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,503,717号、同第6,689,558号、同第7,030,215号、同第6,794,136号、同第7,067,317号、同第7,262,054号、同第7,070,934号、同第7,361,635号、同第7,253,273号、および米国特許公開第2005/0064474号、同第2007/0218528号、同第2005/0267061号を参照されたく、全て参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0068】

操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然型ジンクフィンガータンパク質と比較して新規の結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的設計および種々の種

類の選択を含むが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、トリプレット（またはカドラプレット）のヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含み、各トリプレットまたはカドラプレットのヌクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはカドラプレットの配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と会合している。例えば、譲受人共通の米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0069】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッド系を含む、例となる選択方法は、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、および同第6,242,568号、ならびに国際公開第WO98/37186号、同第WO98/53057号、同第WO00/27878号、同第WO01/88197号、そして英国特許第GB2,338,237号に開示される。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化は、例えば、譲受人共通の国際公開第WO02/077227号に記載されている。

10

【0070】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび／またはマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば、5アミノ酸長以上のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して一緒に連結されてもよい。例示の6アミノ酸長以上のリンカー配列については、米国特許6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含んでもよい。

20

【0071】

標的部位の選択、ZFP、ならびに融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築の方法は、当業者に知られており、米国特許第6,140,081号、同第5,789,538号、同第6,453,242号、同第6,534,261号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,200,759号、国際公開第WO95/19431号、同第WO96/06166号、同第WO98/53057号、同第WO98/54311号、同第WO00/27878号、同第WO01/60970号、同第WO01/88197号、同第WO02/099084号、同第WO98/53058号、同第WO98/53059号、同第WO98/53060号、同第WO02/016536号、および同第WO03/016496号に詳述される。

30

【0072】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメインおよび／またはマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば、5アミノ酸長以上のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して一緒に連結されてもよい。例示の6アミノ酸長以上のリンカー配列については、米国特許6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含んでもよい。

40

【0073】

系のRNA構成要素をコードするCRISPR（クラスタ化された、等間隔にスペーサーが入った、短い回文型の反復）遺伝子座、およびタンパク質をコードするcas（CRISPR関連）遺伝子座（Jansen et al., 2002. Mol. Microbiol. 43: 1565-1575、Makarova et al., 2002. Nucleic Acids Res. 30: 482-496、Makarova et al., 2006. Biol. Direct 1: 7、Haft et

50

al., 2005. PLoS Comput. Biol. 1: e60) は、CRISPR/Casヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR関連(Cas)遺伝子、およびCRISPR媒介核酸切断の特異性をプログラムすることができる非コード化RNA要素の組み合わせを含有する。
【0074】

II型CRISPRは、最もよく特徴付けされた系の1つであり、4つの逐次的ステップにおいて、標的化DNA2本鎖切断を行う。第1に、2つの非コード化RNA、pre-crRNAアレイおよびtracrRNAが、CRISPR遺伝子座から転写される。第2に、tracrRNAは、pre-crRNAの反復領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含有する成熟crRNAへのpre-crRNAのプロセッシングを媒介する。第3に、成熟crRNA:tracrRNA複合体は、crRNA上のスペーサーと、標的認識のための追加的な要件であるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の隣の標的DNA上のプロトスペーサーとの間のワトソン-クリック塩基対形成を介して、Cas9を標的DNAに導く。最後に、Cas9は、標的DNAの切断を媒介し、プロトスペーサー内に2本鎖切断を形成する。CRISPR/Cas系の活性は、(i)「適応」と呼ばれるプロセスにおける、将来の攻撃を防止するための、外来DNA配列のCRISPRアレイへの挿入、(ii)関連タンパク質の発現、ならびにアレイの発現および処理、またそれに続く(iii)外来核酸へのRNA媒介干渉という3つのステップを含む。したがって、細菌細胞において、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかは、CRISPR/Cas系の自然の機能に関与し、外来DNAの挿入等の機能において役割を果たす。

【0075】

ある特定の実施形態において、Casタンパク質は、天然型Casタンパク質の「機能性誘導体」であってもよい。天然配列ポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共通した定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能性誘導体」は、これらに限定されないが、天然配列の断片ならびに天然配列ポリペプチドおよびその断片の誘導体を含むが、但し、それら是对応する天然配列ポリペプチドと共通した生物活性を有する。本明細書において企図される生物活性は、DNA基質を断片に加水分解する機能性誘導体の能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列改変体、共有結合修飾、およびその融合物を共に包含する。Casポリペプチドまたはその断片の好適な誘導体は、変異体、融合体、Casタンパク質の共有結合修飾、またはその断片を含むが、これらに限定されない。Casタンパク質またはその断片、およびCasタンパク質またはその断片の誘導体を含むCasタンパク質は、細胞から得ることができる、または化学的に合成され得る、またはこれらの2つの手順の組み合わせにより得ることができる。細胞は、Casタンパク質を自然に産生する細胞、またはCasタンパク質を自然に産生し、内因性Casタンパク質をより高い発現レベルで産生するように、もしくは外部から導入された核酸からCasタンパク質を産生するように操作された細胞であってもよく、その核酸は、内因性Casと同じまたは異なるCasをコードする。いくつかの場合において、細胞は、Casタンパク質を自然に産生せず、Casタンパク質を産生するように遺伝子操作されている。

【0076】

したがって、ヌクレアーゼは、ドナー(導入遺伝子)を挿入することが望ましい任意の遺伝子における標的部位に特異的に結合するDNA結合ドメインを含む。

【0077】

B. 切断ドメイン

任意の好適な切断ドメインをDNA結合ドメインに作動可能に連結して、ヌクレアーゼを形成することができる。例えば、ZFP DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合してZFNが作製されており、これは、その操作された(ZFP)DNA結合ドメインを通じてその意図される核酸標的を認識し、ヌクレアーゼ活性を介してZFP結合部位付近でのDNAの切断を引き起こすことが可能である、機能的実体である。例えば、K

im et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93 (3): 1156-1160を参照されたい。より最近では、多様な生物におけるゲノム修飾のためにZFNが使用されている。例えば、米国特許公開第20030232410号、同第20050208489号、同第20050026157号、同第20050064474号、同第20060188987号、同第20060063231号、および国際公開第WO07/014275号を参照されたい。同様に、TALE DNA結合ドメインをヌクレアーゼドメインに融合して、TALENが作製されている。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたい。

【0078】

上述のように、切断ドメインは、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼの切断ドメイン、またはTALEN DNA結合ドメインおよび切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼDNA結合ドメインおよび異なるヌクレアーゼの切断ドメインに対して異種であり得る。異種切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得られ得る。切断ドメインが由来し得る例となるエンドヌクレアーゼには、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが含まれるが、これらに限定されない。例えば、2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA、およびBelfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388を参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素が知られている（例えば、S1ヌクレアーゼ、マングベーンヌクレアーゼ、臍臓DNase I、小球菌ヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼ；またLinn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993も参照されたい）。これらの酵素（またはそれらの機能的断片）のうちの1つ以上を、切断ドメインおよび切断ハーフドメインの源として使用することができる。

【0079】

同様に、上述のように、切断活性のために二量体化を必要とする切断ハーフドメインは、任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が切断ハーフドメインを含む場合、切断のために2つの融合タンパク質が必要である。代替的に、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質を使用することができる。2つの切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得るか、または各切断ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得る。加えて、2つの融合タンパク質のそれぞれの標的部位への結合が、例えば、二量体化によって、切断ハーフドメインが機能的切断ドメインを形成することを可能にする互いの空間的配向に切断ハーフドメインを配置するように、2つの融合タンパク質のための標的部位は互いに対して好ましく配置される。故に、ある特定の実施形態において、標的部位の近接する端は、5〜8ヌクレオチドまたは15〜18ヌクレオチド分だけ離れている。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位の間に介在し得る（例えば、2〜50ヌクレオチド対またはそれよりも多い対）。一般に、切断部位は、標的部位の間に位置する。

【0080】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多くの種に存在し、（認識部位で）DNAに配列特異的に結合すること、および結合部位またはその付近でDNAを切断することが可能である。ある特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から除去された部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上ではその認識部位から9ヌクレオチドで、また他方の鎖上ではその認識部位から13ヌクレオチドで、DNAの2本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号、同第5,436,150号、および同第5,487,994号、ならびにLi et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4275-4279、Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2764-2768、Kim et al. (

1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 883-887, Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269: 31, 978-31, 982を参照されたい。故に、一実施形態において、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメイン（または切断ハーフドメイン）、および操作されていることもされていないこともある1つ以上のジンクフィンガー結合ドメインを含む。

【0081】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である、例となるIIS型制限酵素は、FokIである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10, 570-10, 575。したがって、本開示の目的のために、開示される融合タンパク質において使用されるFokI酵素の一部分は、切断ハーフドメインとみなされる。故に、ジンクフィンガーFokI融合物を使用した細胞配列の標的化2本鎖切断および／または標的化置換のために、各々がFokI切断ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質を使用して、触媒的に活性な切断ドメインを再構成することができる。代替的に、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFokI切断ハーフドメインを含有する、単一のポリペプチド分子を使用することもできる。ジンクフィンガーFokI融合物を使用した標的化切断および標的化配列改変に対するパラメータは、本開示の他の箇所に提供される。

【0082】

切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、切断活性を保持するか、または多量体化（例えば、二量体化）して機能的切断ドメインを形成する能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

【0083】

例となるIIS型制限酵素は、国際公開第WO07/014275号に記載され、その全体が本明細書に組み込まれる。さらなる制限酵素も、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含有し、これらは本開示によって企図される。例えば、Roberts et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 418-420を参照されたい。

【0084】

ある特定の実施形態において、切断ドメインは、例えば、米国特許公開第20050064474号、同第20060188987号、同第20070305346号および同第20080131962号（これらの全ての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ホモ二量体化を最小限に抑えるかまたは防止する1つ以上の操作された切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン変異体とも称される）を含む。FokIの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、および538位のアミノ酸残基は、全て、FokI切断ハーフドメインの二量体化に影響を及ぼすための標的である。

【0085】

偏性のヘテロ二量体を形成するFokIの例となる操作された切断ハーフドメインには、第1の切断ハーフドメインがFokIの490および538位のアミノ酸残基に変異を含み、第2の切断ハーフドメインが486および499位のアミノ酸残基に変異を含む対が含まれる。

【0086】

故に、一実施形態において、490における変異はGlu(E)をLys(K)に置換し、538における変異はIso(I)をLys(K)に置換し、486における変異はGln(Q)をGlu(E)に置換し、499位における変異はIso(I)をLys(K)に置換する。具体的には、本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインは、1つの切断ハーフドメインにおいて490位(E→K)および538位(I→K)を変異させ、「E490K:I538K」と表記される操作された切断ハーフドメインをもたら

10

20

30

40

50

すことによって、また、別の切断ハーフドメインにおいて486位(Q→E)および499位(I→L)を変異させ、「Q486E:I499L」と表記される操作された切断ハーフドメインをもたらすことによって、調製された。本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインは、異常な切断を最小限に抑えたまたは消滅させた偏性のヘテロ二量体変異体である。例えば、米国特許公開第2008/0131962号を参照されたく、その開示は、参照によりその全体が全目的で組み込まれる。ある特定の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、486、499、および496位(野生型FokIに対して付番)に、変異、例えば、486位の野生型Gln(Q)残基をGlu(E)残基に、499位の野生型Iso(I)残基をLeu(L)残基に、および496位の野生型Asn(N)残基をAsp(D)またはGlu(E)残基(それぞれ、「ELD」および「ELE」ドメインとも称される)に置換する変異を含む。他の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、490、538、および537位(野生型FokIに対して番号付けられた)での変異、例えば、野生型Glu(E)残基を490位でLys(K)残基に、野生型Iso(I)残基を538位でLys(K)残基に、かつ野生型His(H)残基を537位でLys(K)残基またはArg(R)残基(それぞれ、「KKK」および「KKR」ドメインとも称される)に置換する変異を含む。他の実施形態では、操作された切断ハーフドメインは、490および537位(野生型FokIに対する番号付け)での変異、例えば、野生型Glu(E)残基を490位でLys(K)残基に、かつ野生型His(H)残基を537位でLys(K)残基またはArg(R)残基(それぞれ、「KIK」および「KIR」ドメインとも称される)に置換する変異を含む(米国特許公開第20110201055号を参照されたい)。他の実施形態において、操作された切断ハーフドメインは、「Sharkey」および/または「Sharkey'」変異を含む(Guo et al., (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107を参照されたい)。

【0087】

本明細書に記載される操作された切断ハーフドメインは、任意の好適な方法を使用して、例えば、米国特許公開第20050064474号、同第20080131962号、および同第20110201055号に記載されるように野生型切断ハーフドメイン(FokI)の部位特異的な変異誘発によって、調製することができる。

【0088】

代替的に、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を使用して、核酸標的部位においてインビボで組み立てられてもよい(例えば、米国特許公開第20090068164号を参照されたい)。かかるスプリット酵素の構成要素は、別個の発現構築物上で発現されてもよく、または、1つのオープンリーディングフレーム内に連結させることができ、個々の構成要素は、例えば、自己切断2AペプチドまたはIRES配列によって分離される。構成要素は、個々のジンクフィンガー結合ドメインであり得るか、またはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

【0089】

ヌクレアーゼは、例えば、国際公開第WO2009/042163号および同第20090068164号に記載の酵母ベースの染色体系において、使用前に活性化についてスクリーニングすることができる。ヌクレアーゼ発現構築物は、当該技術分野で既知の方法を使用して容易に設計することができる。例えば、米国特許公開第20030232410号、同第20050208489号、同第20050026157号、同第20050064474号、同第20060188987号、同第20060063231号、および国際公開第WO07/014275号を参照されたい。ヌクレアーゼの発現は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーター、例えば、ラフィノースおよび/またはガラクトースの存在下で活性化(抑制解除)され、グルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの調節下にあってもよい。

【0090】

Cas9関連CRISPR/Cas系は、2つのRNA非コード化構成要素、すなわち

10

20

30

40

50

同一の直接反復（DR）により離間したヌクレアーゼガイド配列（スパーサー）を含有する、tracrRNAおよびpre-crRNAアレイを含む。CRISPR/Cas系を使用してゲノム操作を達成するためには、これらのRNAの両方の機能が存在しなければならない（Cong et al, (2013) Science express 1/10.1126/science.1231143を参照されたい）。いくつかの実施形態において、tracrRNAおよびpre-crRNAは、別個の発現構築物を介して、または別個のRNAとして供給される。他の実施形態において、キメラRNAが構築され、操作された成熟crRNA（標的特性を付与する）がtracrRNA（Cas9との相互作用を供給する）に融合されて、キメラcrRNA-tracrRNAハイブリッド（単一ガイドRNAとも呼ばれる）が形成される。（Jinek（同書）およびCong,（同書）を参照されたい）。

10

【0091】

標的部位

上で詳述されるように、DNAドメインは、選択される任意の配列に結合するように操作され得る。操作されたDNA結合ドメインは、天然型DNA結合ドメインと比較して新規の結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的設計および種々の種類の選択を含むが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、トリプレット（またはカドラプレット）のヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含み、各トリプレットまたはカドラプレットのヌクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはカドラプレットの配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と会合している。例えば、譲受人共通の米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。TALエフェクタードメインの合理的設計もまた行うことができる。例えば、米国特許公開第20110301073号を参照されたい。

20

【0092】

ファージディスプレイおよびツーマイブリッドシステムを含む、DNA結合ドメインに適用可能な例となる選択方法は、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、および同第6,242,568号、ならびに国際公開第WO98/37186号、同第WO98/53057号、同第WO00/27878号、同第WO01/88197号、そして英国特許第GB2,338,237号に開示されている。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化は、例えば、譲受人共通の国際公開第WO02/077227号に記載されている。

30

【0093】

標的部位の選択、ヌクレアーゼ、ならびに融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は、当業者に知られており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号および同第20060188987号に詳述されている。

【0094】

加えて、これらおよび他の参考文献に開示されるように、DNA結合ドメイン（例えば、マルチフィンガージンクフィンガータンパク質）は、例えば、5アミノ酸以上のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を使用して一緒に連結されてもよい。例えば、6アミノ酸長以上の例となるリンカー配列については、米国特許第6,479,626号、同第6,903,185号、および同第7,153,949号を参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のDNA結合ドメイン間の好適なリンカーの任意の組み合わせを含んでもよい。米国特許公開第20110301073号も参照されたい。

40

【0095】

上述のように、ヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、任意の遺伝子に標的化され得る

50

。ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼ（DNA結合ドメイン構成要素）は、例示のみを目的として、AAVS1遺伝子（米国特許第8,110,379号を参照されたい）、CCR5遺伝子（米国特許公開第20080159996号を参照されたい）、Rossa遺伝子座（国際公開第WO2010/065123号を参照されたい）、および／またはアルブミン遺伝子座（米国特許出願第13/624,193号を参照されたい）を含む「セーフハーバー」遺伝子座に標的化される。

【0096】

ドナー

選択された場所内への挿入のための、任意のポリヌクレオチドの標的化挿入の方法が、本明細書に開示される。挿入のためのポリヌクレオチドはまた、「外因性」ポリヌクレオチド、「ドナー」ポリヌクレオチドもしくは分子または「導入遺伝子」と呼ぶこともできる。

10

【0097】

驚くべきことに、本明細書において、外因性配列（導入遺伝子）に隣接する相同アームを有さない2本鎖ドナーヌクレオチド（例えばプラスミド）は、2本鎖ドナーのインビボ切断後に、細胞のゲノムの選択された標的領域内に効果的に組み込まれ得る。したがって、2本鎖ドナーは、インビボで（細胞内で）のドナーの切断のための1つ以上のヌクレアーゼ結合部位を含む。ある特定の実施形態において、ドナーは、2つのヌクレアーゼ結合部位を含む。ゲノムの標的領域内に2本鎖切断を形成することにより標的化組み込みが達成される方法において（例えば、米国特許第7,888,121号、同第7,951,925号、同第8,110,379号および米国特許公開第20090263900号、同第20100129869号および同第20110207221号を参照されたい）、標的領域を切断するために使用されたヌクレアーゼの1つ以上は、ドナー分子を切断するためにも使用され得る。

20

【0098】

ある特定の実施形態において、2本鎖ドナーは、1kbを超える、例えば2～200kbの間、2～10kbの間（またはその間の任意の値）の長さの配列（例えば、導入遺伝子とも呼ばれるコード化配列）を含む。2本鎖ドナーはまた、例えば、少なくとも1つのヌクレアーゼ標的部位を含む。ある特定の実施形態において、ドナーは、例えばZFNまたはTALENの対に対する少なくとも2つの標的部位を含む。典型的には、ヌクレアーゼ標的部位は、導入遺伝子の切断のために、導入遺伝子配列の外、例えば、導入遺伝子配列に対し5'および／または3'にある。ヌクレアーゼ切断部位（複数可）は、任意のヌクレアーゼ（複数可）に対するものであってもよい。ある特定の実施形態において、2本鎖ドナー内に含有されるヌクレアーゼ標的部位（複数可）は、切断されたドナーが相同性非依存的方法を介して組み込まれる内因性標的を切断するために使用される同じヌクレアーゼ（複数可）に対するものである。

30

【0099】

上述のように、ドナーは、インビボで切断され、順（「AB」）または逆（「BA」）方向でゲノム内に組み込まれ得る。完全に連結されたAB方向の挿入をもたらすインビボドナー切断を介した標的化組み込みは、部位間の元の間隔を有する対になったヌクレアーゼ（例えば、ZFNまたはTALEN）結合部位を再形成する。そのような再形成された部位は、ヌクレアーゼによる第2ラウンドの切断のための潜在的基質である。再形成された部位におけるヌクレアーゼ切断は、導入遺伝子-染色体接合点におけるDNA欠失（不正確なNH Ejベース修復の結果）またはさらに導入遺伝子の離断をもたらす得る。対照的に、逆（BA）方向挿入は、2つの異なるヌクレアーゼ対結合部位（例えば、左および右のヌクレアーゼのホモ二量体）の形成をもたらす。偏性ヘテロ二量体（EL/KK、ELD/KKR等）FokIヌクレアーゼドメインが使用される場合、再形成された結合部位は共にホモ二量体部位であるため、再形成されたBA部位は再切断可能ではない。図1Cもまた参照されたい。

40

【0100】

50

さらに、野生型（ゲノム）配列と比較して1本鎖5'オーバーハングを構成する導入遺伝子ドナースクレアーゼスパーサーにおけるヌクレオチドを野生型配列の逆相補配列に変化させることは、切断されたドナーのBA方向挿入に有利であり（切断された染色体上のオーバーハングとのワトソン・クリック塩基対形成を介して）、これは再切断不可能な導入遺伝子組み込みを形成する（図1C）。

【0101】

本明細書に記載のドナー配列上に保持される導入遺伝子は、PCR等の当該技術分野において知られている標準的技術を使用して、プラスミド、細胞または他の源から単離され得る。使用のためのドナーは、環状超螺旋、環状弛緩、直線等を含む様々な種類のトポロジを含む。代替として、それらは、標準的なオリゴヌクレオチド合成技術を使用して化学的に合成されてもよい。加えて、ドナーは、メチル化されていてもよく、またはメチル化を有さなくてもよい。ドナーは、細菌または酵母人工染色体（BACまたはYAC）の形態であってもよい。

10

【0102】

本明細書に記載の2本鎖ドナーポリヌクレオチドは、1つ以上の非天然塩基および／または骨格を含んでもよい。特に、メチル化サイトカインによるドナー分子の挿入は、目的領域内の転写休止の状態を達成するために本明細書に記載の方法を使用して行われてもよい。

【0103】

外因性（ドナー）ポリヌクレオチドは、任意の目的配列（外因性配列）を含んでもよい。例となる外因性配列には、任意のポリペプチドコード化配列（例えばcDNA）、プロモーター配列、エンハンサー配列、エピトープタグ、マーカー遺伝子、切断酵素認識部位および様々な種類の発現構築物が含まれるが、これらに限定されない。マーカー遺伝子には、抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G418耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、有色または蛍光または発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに強化された細胞増殖および／または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素）が含まれるが、これらに限定されない。エピトープタグには、例えば、FLAG、His、myc、Tap、HA、または任意の検出可能なアミノ酸配列の1つ以上のコピーが含まれる。

20

30

【0104】

好ましい実施形態において、外因性配列（導入遺伝子）は、その細胞内での発現が望ましい任意のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、抗体、抗原、酵素、受容体（細胞表面または核）、ホルモン、リンホカイン、サイトカイン、レポーターポリペプチド、成長因子、耐虫性、転写因子、および上記のいずれかの機能性断片を含むが、これらに限定されない。コード化配列は、例えば、cDNAであってもよい。

【0105】

例えば、外因性配列は、以下の遺伝的疾患のいずれかを含むがこれらに限定されない遺伝的疾患を有する被験体において欠損している、または非機能的であるポリペプチドをコードする配列を含んでもよい：軟骨形成不全、色覚異常、酸性マルターゼ欠損、アデノシン・デアミナーゼ欠損（OMIM番号102700）、副腎白質ジストロフィー、アイカルディ症候群、 α -1抗トリプシン欠乏、 α -サラセミア、アンドロゲン不感性症候群、アペール症候群、催不整脈性右室異形成、毛細血管拡張性運動失調、バース症候群、 β -サラセミア、青色ゴムまり様母斑症候群、カナヴァン病、慢性肉芽腫症（CGD）、猫鳴き症候群、嚢胞性線維症、有痛脂肪症、外胚葉異形成症、ファンconi貧血、進行性骨化性線維形成異常症、脆弱性X症候群、ガラクトース血症、ゴーシェ病、全身性ガングリオシドーシス（例えばGM1）、ヘモクロマトーシス、 β -グロビン（HbC）の6番目のコドンにおけるヘモグロビンC変異、血友病、ハンチントン病、ハーラー症候群、低ホスファターゼ血症、クライنفエルター症候群、クラッペ病、ランガー・ギーディオン症候群、白血病接着不全症（LAD、OMIM番号116920）、大脳白質萎縮症、QT延長

40

50

症候群、マルファン症候群、メビウス症候群、ムコ多糖症（MPS）、爪・膝蓋骨症候群、腎性尿崩症、神経線維腫症、ニーマン・ピック病、骨形成不全症、ポルフィリン症、ブラダーウィリ症候群、早老症、プロテウス症候群、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、サンフィリポ症候群、重度複合免疫不全症（SCID）、シュワックマン症候群、鎌状赤血球症（鎌状赤血球貧血）、スミス・マゲニス症候群、スティックラー症候群、テイ・サックス病、血小板減少性橈骨欠損症（TAR）症候群、トレチャー・コリンズ症候群、トリソミー、結節硬化症、ターナー症候群、尿素サイクル異常症、フォン・ヒッペル・リンドウ病、ワーデンバーグ症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウィスコット・アルドリッチ症候群、X連鎖リンパ増殖性症候群（XLP、OMIM番号308240）。

10

【0106】

標的化組み込みにより治療され得る追加的な例となる疾患には、後天性免疫不全症、リソソーム蓄積症（例えば、ゴーシェ病、GM1、ファブリ病、およびテイ・サックス病）、ムコ多糖症（例えば、ハンター病、ハーラー病）、異常ヘモグロビン症（例えば、鎌状赤血球病、HbC、 α -サラセミア、 β -サラセミア）、および血友病が含まれる。

【0107】

ある特定の実施形態において、外因性配列は、標的化組み込みを受けた細胞の選択を可能とするマーカー遺伝子（上述）、およびさらなる機能性をコードする連結された配列を含んでもよい。マーカー遺伝子の限定されない例には、GFP、薬物選択マーカー（複数可）等が含まれる。

20

【0108】

挿入され得る追加的な遺伝子配列には、例えば、変異配列を置き換えるための野生型遺伝子が含まれてもよい。例えば、野生型第IX因子遺伝子配列が、遺伝子の内因性コピーが変異している幹細胞のゲノム内に挿入されてもよい。野生型コピーは、内因性遺伝子座で挿入されてもよく、または代替として、セーフハーバー遺伝子座に標的化されてもよい。

【0109】

いくつかの実施形態において、目的ポリペプチドをコードする農作物遺伝子またはヌクレオチド配列を含む外因性核酸配列（導入遺伝子）は、例えば、限定されることなく、有害生物または疾患に対する耐性を付与する遺伝子（例えば、Jones et al. (1994) Science 266:789（クラドスפורウム・フルブムに対する耐性のためのトマトCf-9遺伝子のクローニング）、Martin et al. (1993) Science 262:1432、Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089（シュードモナス・シリングに対する耐性のためのRSP2遺伝子）、PCT国際特許公開第WO96/30517号（大豆シスト線虫に対する耐性）、PCT国際特許公開第WO93/19181号を参照されたい）、バチルス・チューリゲンシスタシタンパク質をコードする遺伝子、その誘導体、またはそれに基づきモデル化された合成ポリペプチド（例えば、Geiser et al. (1986) Gene 48:109（Bt δ -エンドトキシン遺伝子のクローニングおよびヌクレオチド配列；さらに、 δ -エンドトキシン遺伝子をコードするDNA分子は、例えばATCC Accession No. 40098、67136、31995、および31998の下で、American Type Culture Collection（Manassas, VA）から購入可能である）を参照されたい）、レクチンをコードする遺伝子（例えば、Van Damme et al. (1994) Plant Molec. Biol. 24:25（いくつかのクリビア・ミニアータマンノース結合レクチン遺伝子のヌクレオチド配列）を参照されたい）、ビタミン結合タンパク質、例えばアビジンをコードする遺伝子（PCT国際特許公開第US93/06487号（害虫に対する幼虫駆除剤としてのアビジンおよびアビジンホモログの使用）を参照されたい）、酵素阻害剤、例えばプロテアーゼ、プロテイナーゼ阻害剤、またはアミラーゼ阻害剤をコードする遺伝子（例えば、Abe et al. (1987) J. Biol.

30

40

50

Chem. 262:16793 (コメシステインプロテイナーゼ阻害剤のヌクレオチド配列); Huub et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:985 (タバコプロテイナーゼ阻害剤IをコードするcDNAのヌクレオチド配列)、Sumitani et al. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243 (ストレプトミセス・ニトロスポレウス α -アミラーゼ阻害剤のヌクレオチド配列) および米国特許第5,494,813号を参照されたい)、昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン、例えばエクジステロイドもしくは幼若ホルモン、それらの改変体、それに基づく模倣薬、またはその拮抗薬もしくは作動薬をコードする遺伝子(例えば、Hammock et al. (1990) Nature 344:458 (クローニングされた幼若ホルモンエステラーゼ、幼若ホルモンの不活性化剤のバキュロウイルス発現)を参照されたい)、発現後に罹患した有害生物の生理学を妨害する昆虫特異的ペプチドまたは神経ペプチドをコードする遺伝子(例えば、Regan (1994) J. Biol. Chem. 269:9 (発現クローニングは、昆虫利尿ホルモン受容体をコードするDNAを生成する)、Pratt et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (ジプロプテラ・プンタータにおけるアロスタチン)、および米国特許第5,266,317号(昆虫特異的麻痺性神経毒素をコードする遺伝子)を参照されたい)、蛇、蜂または他の生物により自然に生成された昆虫特異的な毒をコードする遺伝子(例えば、Pang et al. (1992) Gene 116:165 (サソリの昆虫毒性ペプチドをコードする遺伝子の植物における異種発現)を参照されたい)、モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または殺虫活性を有する他の分子の過剰蓄積を担う酵素をコードする遺伝子、生物活性分子の翻訳後修飾を含む修飾に参与する酵素、例えば、糖分解酵素、タンパク質分解酵素、脂質分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、アミノ基転移酵素、エステラーゼ、加水分解酵素、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリラーゼ、ポリメラーゼ、エラスターゼ、キチナーゼ、またはグルカナーゼ(天然または合成を問わない)をコードする遺伝子(例えば、PCT国際特許公開第WO93/02197(カラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列);さらに、例えばATCCから、Accession No. 39637および67152の下で、キチナーゼコード化配列を含有するDNA分子を得ることができる;Kramer et al. (1993) Insect Biochem. Molec. Biol. 23:691 (タバコイモムシキチナーゼをコードするcDNAのヌクレオチド配列)、およびKawalleck et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:673 (パセリubi4-2ポリユビキチン遺伝子のヌクレオチド配列)を参照されたい)、シグナル伝達を刺激する分子をコードする遺伝子(例えば、Bottella et al. (1994) Plant Molec. Biol. 24:757 (マングビーンカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列)、およびGriess et al. (1994) Plant Physiol. 104:1467 (トウモロコシカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列)を参照されたい)、疎水性モメントペプチドをコードする遺伝子(例えば、PCT国際特許公開第WO95/16776号(真菌植物病原体を阻害するタキプレシンのペプチド誘導体)、およびPCT国際特許公開第WO95/18855号(疾患耐性を付与する合成抗菌ペプチド)を参照されたい)、膜透過酵素、チャネル形成剤、またはチャネル遮断薬をコードする遺伝子(例えば、Jaynes et al. (1993) Plant Sci 89:43 (トランスジェニックタバコ植物をシュードモナス・ソラナセアラム に対して耐性とするためのセクロピン β 溶解ペプチド類似体の異種発現)を参照されたい)、ウイルス侵襲性タンパク質またはそれに由来する複合毒素をコードする遺伝子(例えば、Beachy et al. (1990) Ann. rev. Phytopathol. 28:451を参照されたい)、虫特異的抗体またはそれに由来するイムノトキシンをコードする遺伝子(例えば、Taylor et al., Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant

10

20

30

40

50

Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994) (トランスジェニックタバコにおける、1本鎖抗体断片の生成を介した酵素不活性化)を参照されたい)、ウイルス特異的抗体をコードする遺伝子(例えば、Tavladoraki et al. (1993) Nature 366:469 (組み換え抗体遺伝子を発現するトランスジェニック植物は、ウイルス攻撃から保護される)を参照されたい)、病原体または寄生生物により自然に産生される発育抑止タンパク質をコードする遺伝子(例えば、Lamb et al. (1992) Bio/Technology 10:1436 (真菌エンドα-1, 4-D-ポリガラクトナーゼは、植物細胞壁ホモα-1, 4-D-ガラクトナーゼを可溶化することにより真菌コロニー化および植物養分放出を促進する)、Toubart et al. (1992) Plant J. 2:367 (豆エンドポリガラクトナーゼ阻害タンパク質をコードする遺伝子のクローニングおよび特性決定)を参照されたい)、植物により自然に産生される発育抑止タンパク質をコードする遺伝子(例えば、Logemann et al. (1992) Bio/Technology 10:305 (オオムギリボソーム不活性化遺伝子を発現するトランスジェニック植物は、真菌疾患に対する増加した耐性を有する)を参照されたい)を含んでもよい。

10

【0110】

いくつかの実施形態において、目的ポリペプチドをコードする農作物遺伝子またはヌクレオチド配列はまた、同時に、および／または代替として、例えば、限定されることなく、除草剤、例えば成長点または分裂組織を阻害する除草剤、例えば、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素に対する耐性を付与する遺伝子(このカテゴリー内の例となる遺伝子は、例えば、それぞれLee et al. (1988) EMBO J. 7:1241、およびMiki et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449により説明されるように、変異体ALSおよびHAS酵素をコードする)；例えば変異体5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSP)遺伝子により付与されるようなグリホセート耐性を付与する遺伝子(組み換え核酸の導入および／または天然EPSP遺伝子の様々な形態のインビボ変異誘発による)；それぞれaroA遺伝子およびグリホセートアセチルトランスフェラーゼ(GAT)遺伝子)；他のホスホノ化合物、例えばストレプトミセス・ハイグロスコピクスおよびストレプトミセス・ビリドロモゲネス)を含むストレプトミセス種からのグルホシネートホスフィホトリンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)遺伝子；ならびにピリジンオキシまたはフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン(ACCase阻害剤コード化遺伝子)を含んでもよい。例えば、米国特許第4,940,835号および同第6,248,876号(植物にグリホセート耐性を付与し得るEPSPの形態のヌクレオチド配列)を参照されたい。変異体aroA遺伝子をコードするDNA分子は、ATCCアクセッション番号39256の下で得ることができる。米国特許第4,769,061号(変異体aroA遺伝子のヌクレオチド配列)もまた参照されたい。欧州特許出願第0333033号および米国特許第4,975,374号は、グルタミン合成酵素遺伝子のヌクレオチド配列を開示しており、これは、L-ホスフィノトリシン等の除草剤に対する耐性を付与し得る。例となるPAT遺伝子のヌクレオチド配列は、欧州特許出願第0242246号、およびDe Greef et al. (1989) Bio/Technology 7:61 (PAT活性をコードするキメラbar遺伝子を発現するトランスジェニック植物の産生)に記載されている。フェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン、例えばセトキシジムおよびハロキシホップに対する耐性を付与する遺伝子の例には、Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435により説明されるように、Acc1-S1、Acc1-S2およびAcc1-S3遺伝子が含まれる。グリホセート耐性を付与することができるGAT遺伝子は、例えば、国際公開第WO2005012515号に記載されている。2,4-D、フェノキシプロピオン酸およびピリジロオキシオーキシン除草剤に対する耐性を付与する遺伝子は、例えば、国際公開第WO2005107437号に記載されている。

20

30

40

50

【0111】

また、目的ポリペプチドをコードする農作物遺伝子またはヌクレオチド配列を含む核酸は、例えば、限定されることなく、光合成を阻害する除草剤、例えばトリアジン（psbAおよびgs+遺伝子）またはベンゾニトリル（ニトリラーゼ遺伝子）に対する耐性を付与する遺伝子を含み得る。例えば、Przibila et al. (1991) Plant Cell 3:169（変異体psbA遺伝子をコードするプラスミドによるクラミドモナスの形質転換）を参照されたい。ニトリラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は、米国特許第4,810,648号に開示されており、これらの遺伝子を含有するDNA分子は、ATCC Accession No. 53435、67441、および67442の下で入手可能である。Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285:173（グルタチオンS-トランスフェラーゼをコードするDNAのクローニングおよび発現）もまた参照されたい。

10

【0112】

いくつかの実施形態において、目的ポリペプチドをコードする農作物遺伝子またはヌクレオチド配列を含む核酸はまた、同時に、および／または代替として、例えば植物のステアリン酸含量を増加させるためにステアリル-ACPデサチュラーゼのアンチセンス遺伝子で植物を形質転換することにより、付加価値のある形質、例えば、限定されることなく、修飾脂肪酸代謝を付与する、またはそれに寄与する遺伝子を含んでもよく（例えば、Knultzon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:2624を参照されたい）；低減されたフィチン酸塩含量、例えば、フィターゼコード化遺伝子の導入は、フィチン酸塩の破壊を促進して、形質転換植物に対しより多くの遊離リン酸塩を付加することができ（例えば、Van Hartingsveldt et al. (1993) Gene 127:87（黒色アスペルギルスフィターゼ遺伝子のヌクレオチド配列）；遺伝子は、トウモロコシにおけるフィチン酸塩含量を低減するために導入することができ、例えば、これは、クローニングし、次いで、低レベルのフィチン酸を特徴とするトウモロコシ変異体の原因となり得る単一対立遺伝子に関連したDNAを再導入することにより達成され得（Raboy et al. (1990) Maydica 35:383）を参照されたい）；また、例えば、デンプンの分枝パターンを改変する酵素をコードする遺伝子で植物を形質転換することにより、修飾された炭水化物組成が実現される（例えば、Shiroza et al. (1988) J. Bacteriol. 170:810（連鎖球菌変異体フルクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列）、Steinmetz et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 20:220（レバンスクラゼ遺伝子）、Pen et al. (1992) Bio/Technology 10:292（ α -アミラーゼ）、Elliot et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:515（トマトインベルターゼ遺伝子のヌクレオチド配列）、Sogaard et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:22480（オオムギ α -アミラーゼ遺伝子）、およびFisher et al. (1993) Plant Physiol. 102:1045（トウモロコシ胚乳デンプン分枝酵素II）を参照されたい）。

20

30

40

【0113】

本明細書の教示に従うそのような発現カセットの構築は、分子生物学の技術分野において周知の方法を使用する（例えば、AusubelまたはManiatisを参照されたい）。トランスジェニック動物を産生するための発現カセットの使用の前に、選択された調節要素に関連したストレス誘導因子に対する発現カセットの反応性は、発現カセットを好適な細胞株（例えば、初代細胞、形質転換細胞、または不死化細胞株）に導入することにより試験され得る。

【0114】

さらに、発現に必要なとされないが、外因性配列（導入遺伝子）は、転写または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、内部リボソーム進入部

50

位、2 A ペプチドおよび／またはポリアデニル化シグナルをコードする配列を含んでもよい。さらに、目的遺伝子の調節要素は、レポーター遺伝子に作動的に連結して、キメラ遺伝子（例えばレポーター発現カセット）を形成し得る。

【0115】

非コード化核酸配列の導入遺伝子の標的化挿入もまた達成され得る。RNA、RNAi、shRNAおよびマイクロRNA (miRNA) をコードする導入遺伝子もまた、標的化挿入に使用され得る。

【0116】

さらなる実施形態において、ドナー核酸は、追加的ヌクレアーゼ設計のための特異的標的部位である非コード化配列を含んでもよい。その後、追加的ヌクレアーゼは、元のドナー分子が切断され、別の目的ドナー分子の挿入により修飾されるように、細胞内で発現され得る。このようにして、ドナー分子の反復的組み込みが形成され得、特定の目的遺伝子座における、またはセーフハーバー遺伝子座における形質のスタッキングが可能となる。

【0117】

標的化導入遺伝子組み込みのための方法

本明細書において開示されるドナー分子は、標的化された相同性非依存的方法を介して細胞のゲノム内に組み込まれる。そのような標的化組み込みのために、ゲノムは、ヌクレアーゼを使用して、所望の場所（複数可）で、例えばDNA結合ドメイン（例えば、ジンクフィンガー結合ドメインまたはTALEドメイン）は、所定の切断部位の、またはその近くの部位に結合するように操作されるとヌクレアーゼドメイン（例えば、切断ドメインまたは切断ハーフドメイン）との間の融合部において切断される。ある特定の
20 実施形態において、それぞれDNA結合ドメインおよび切断ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質が細胞内に発現され、機能性切断ドメインが再構成されてDNAが標的部位（複数可）近傍で切断されるように並置される部位に結合する。一実施形態において、切断は、2つのDNA結合ドメインの結合部位の間に生じる。DNA結合ドメインの1つまたは両方が操作され得る。米国特許第7,888,121号、米国特許公開第20050064474号、ならびに国際特許公開第WO05/084190号、同第WO05/014791号および同第WO03/080809号もまた参照されたい。

【0118】

本明細書に記載のヌクレアーゼは、ポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドとして導入され得る。例えば、それぞれ上述のポリペプチドの1つをコードする配列を含む2つのポリヌクレオチドは、細胞内に導入され得、ポリペプチドが発現してそれぞれその標的配列に結合するときに、標的配列で、またはその近くで切断が生じる。代替として、両方の融合ポリペプチドをコードする配列を含む単一のポリヌクレオチドが細胞内に導入される。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、または任意の修飾形態または類似体またはDNAおよび／またはRNAであってもよい。

【0119】

目的領域における2本鎖切断の導入後、導入遺伝子は、本明細書に記載の2本鎖ドナー分子の線形化の後、相同性非依存的方法（例えば、非相同末端結合（NHEJ））を介して標的化された様式で目的領域内に組み込まれる。2本鎖ドナーは、好ましくは、ヌクレアーゼ、例えばゲノム内に2本鎖破壊を導入するために使用される同じまたは異なるヌクレアーゼの1つ以上により、インビボで線形化される。細胞内の染色体およびドナーの同期切断は、ドナーDNA分解を制限し得る（細胞内への導入前のドナー分子の線形化と比較して）。ドナーの線形化に使用されるヌクレアーゼ標的部位（複数可）は、好ましくは、導入遺伝子（複数可）配列（複数可）を妨害しない。

【0120】

導入遺伝子は、ヌクレアーゼオーバーハングの単純な連結により推定される方向（「順」もしくは「AB」方向と表記される）で、または代替の方向（「逆」もしくは「BA」方向と表記される）で、ゲノム内に組み込まれ得る。ある特定の実施形態において、導入遺伝子は、ドナーおよび染色体オーバーハングの正確な連結後に組み込まれる。他の実施

10

20

30

40

50

形態において、BAまたはAB方向における導入遺伝子の組み込みは、いくつかのヌクレオチドの欠失をもたらす。

【0121】

送達

ヌクレアーゼ、これらのヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載のタンパク質および／またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の好適な手段によってインビボまたはエキスビボで任意の細胞型に送達され得る。

【0122】

好適な細胞には、真核細胞（例えば、動物もしくは植物）および原核細胞および／または細胞株が含まれる。そのような細胞またはそのような細胞から生成される細胞株の非限定的な例としては、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDC K、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/O-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、およびperC6細胞、ならびにヨトウガ（Sf）等の昆虫細胞、またはサッカロミセス属、ピチア属、およびシゾサッカロミセス属等の真菌細胞、ならびにトウモロコシ、大豆、綿、シロイヌナズナ、コムギ、オオムギ、オーツ、サトウキビ、ソルガム、飼料草、アルファルファ、トマト、タバコ、ジャガイモ、コメ、ヒマワリおよびアブラナ属を含むがこれらに限定されない単子葉植物または双子葉植物からの植物細胞が含まれる。ある特定の実施形態において、細胞株は、CHO、MDC K、またはHEK293細胞株である。好適な細胞にはまた、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、ニューロン幹細胞、および間葉系幹細胞等の、幹細胞が含まれる。ある特定の実施形態において、植物細胞は、懸濁培養物、プロトプラスト、または秩序化した組織、例えば、胚、未熟胚、葉片、子葉、ヒポトコール（hypotools）、および小孢子であるが、これらに限定されない。本明細書に記載のヌクレアーゼを送達する方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、同第6,503,717号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,607,882号、同第6,689,558号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および第7,163,824号に記載されており、これらのすべての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0123】

本明細書に記載のヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物も、ジンクフィンガータンパク質（複数可）のうちの1つ以上をコードする配列を含有するベクターを用いて送達され得る。プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター等を含むが、これらに限定されない、任意のベクター系が使用されてもよい。また、米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および同第7,163,824号も参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。さらに、これらのベクターのいずれも、治療に必要とされる配列のうちの1つ以上を含み得ることが明らかとなろう。したがって、1つ以上のヌクレアーゼおよびドナー構築物が細胞に導入される場合、ヌクレアーゼおよび／またはドナーポリヌクレオチドは、同一のベクター上または異なるベクター上に担持され得る。複数のベクターが使用される場合、各ベクターは、1つまたは複数のヌクレアーゼおよび／もしくはドナー構築物をコードする配列を含み得る。

【0124】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法を用いて、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を細胞（例えば、哺乳類細胞）および標的組織に導入することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリ

10

20

30

40

50

ポソームまたはポロキサマー等の送達ビヒクルと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、細胞への送達後にエピソード性または組み込まれたゲノムのいずれかを有するDNAおよびRNAウイルスを含む。操作されたDNA結合タンパク質およびこれらの結合タンパク質を含む融合タンパク質のインビボ送達の総説については、例えば、Rebar (2004) Expert Opinion Invest. Drugs 13 (7) : 829-839、Rossi et al. (2007) Nature Biotech. 25 (12) : 1444-1454、ならびにAnderson, Science 256 : 808-813 (1992)、Nabel & Felgner, TIBTECH 11 : 211-217 (1993)、Mitani & Caskey, TIBTECH 11 : 162-166 (1993)、Dillon, TIBTECH 11 : 167-175 (1993)、Miller, Nature 357 : 455-460 (1992)、Van Brunt, Biotechnology 6 (10) : 1149-1154 (1988)、Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8 : 35-36 (1995)、Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51 (1) : 31-44 (1995)、Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Boehm (eds.) (1995)、およびYu et al., Gene Therapy 1 : 13-26 (1994) 等の一般的な遺伝子送達に関する参考文献を参照されたい。

10

20

【0125】

核酸の非ウイルス性送達の方法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ピロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸結合体、裸のDNA、人工ビリオン、および薬剤によって強化されたDNAの取り込みを含む。例えば、Sonitron 2000システム (Rich-Mar) を使用したソノポレーションも、核酸の送達のために使用することができる。

【0126】

さらなる例となる核酸送達系には、Amaxa Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA)、およびCopernicus Therapeutics Incによって提供されるものが含まれる (例えば、米国公開特許第6008336号を参照されたい)。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号)に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている (例えば、Transfectam (商標) およびLipofectin (商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適である、陽イオン性脂質および中性脂質は、Felgner、国際公開第WO91/17424号、同第WO91/16024号のものを含む。

30

【0127】

免疫脂質複合体等の標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である (例えば、Crystal, Science 270 : 404-410 (1995)、Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2 : 291-297 (1995)、Behr et al., Bioconjugate Chem. 5 : 382-389 (1994)、Remy et al., Bioconjugate Chem. 5 : 647-654 (1994)、Gao et al., Gene Therapy 2 : 710-722 (1995)、Ahmad et al., Cancer Res. 52 : 4817-4820 (1992)、米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第

40

50

4, 837, 028号、および同第4, 946, 787号を参照されたい)。

【0128】

さらなる送達方法は、送達対象の核酸をEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)にパッケージングする使用法を含む。これらのEDVは、二重特異性抗体を用いて標的組織に特異的に送達され、この抗体の一方のアームは、標的組織に対する特異性を有し、他方のアームは、EDVに対する特異性を有する。抗体は、EDVを標的細胞表面に運び、次いで、エンドサイトーシスによりEDVが細胞内に取り込まれる。一旦、細胞内に取り込まれると、その内容物が放出される(MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology 27(7):643を参照されたい)。

【0129】

操作されたZFPをコードする核酸を送達するためのRNAまたはDNAウイルスベースの系の使用は、ウイルスを体内の特定の細胞に対して標的化し、ウイルスのペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを活用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができるか(インビボ)、またはそれらは、インビトロで細胞を処理するために使用することができ、修飾細胞が患者に投与される(エクスピボ)。ZFPを送達するための従来のウイルスベースの系には、遺伝子導入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、および単純ヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。宿主ゲノムへの組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入方法を用いて可能であり、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらすことが多い。さらに、

【0130】

レトロウイルスの指向性は、外来性エンベロープタンパク質を組み込むことによって改変することができ、標的細胞の可能性のある標的集団を拡張する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入するか、または感染させることができ、かつ典型的には高いウイルス力価を生成するレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外来性配列のパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復からなる。ベクターの複製およびパッケージングには、最小限のシス作用性LTRが十分であり、次いでそれらを使用して、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで恒久的な導入遺伝子の発現を提供する。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびそれらの組み合わせに基づくものが含まれる(例えば、Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992)、Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992)、Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990)、Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989)、Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991)、PCT/米国公開第94/05700号を参照されたい)。

【0131】

一過性の発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースの系を使用することができる。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。かかるベクターを用いて、高力価かつ高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純な系において大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターもまた、例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、ならびにインビボおよびエクスピボの遺伝子治療手順のために、標的核酸を用いて細胞に形質導入するために使用される(例えば、West et al., Virology 160:38-47 (1987)、米国特許第4,797,368号、国際公開第WO93/24641号、Kotin, Human Gene T

10

20

30

40

50

herapy 5:793-801 (1994)、Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)を参照されたい)。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)、Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)、Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)、およびSamulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)を含む、いくつかの刊行物に記載される。

【0132】

現在のところ、少なくとも6つのウイルスベクターのアプローチが、臨床治験における遺伝子導入に利用可能であり、それらは、ヘルパー細胞株に挿入される遺伝子による欠陥ベクターの補完を伴うアプローチを利用して、形質導入剤を生成する。

【0133】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床治験に使用されてきたレトロウイルスベクターの例である(Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995)、Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995)、Malech et al., PNAS 94:2212133-12138 (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療治験で使用された最初の治療用ベクターであった。(Blaese et al., Science 270:475-480 (1995))。MFG-Sをパッケージしたベクターについて50%以上の形質導入効率が観察されている。(Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997)、Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997))。

【0134】

組換えアデノ関連ウイルスベクター(rAAV)は、欠損性および非病原性パルボウイルスアデノ関連2型ウイルスに基づく有望な代替の遺伝子送達系である。すべてのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAVの145bpの逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノムへの組み込みに起因する効率的な遺伝子導入および安定した導入遺伝子送達が、このベクター系の主要な特徴である。

(Wagner et al., Lancet 351:91171702-3 (1998)、Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996))。AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAVrh.10を含む他のAAV血清型、ならびに任意の新規なAAV血清型もまた、本発明に従い使用することができる。

【0135】

複製欠損型組換えアデノウイルスベクター(Ad)は、高力価で産生することができ、いくつかの異なる細胞型に容易に感染する。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がAdE1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置換するように操作され、その後、複製欠損型ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスで供給するヒト293細胞内で増殖させられる。Adベクターは、例えば、肝臓、腎臓、および筋肉中に見出されるもの等の非分裂の分化細胞を含む、複数の種類の組織にインビボで形質導入することができる。従来のAdベクターは、高い輸送能力を有する。臨床治験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いた抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド治療を伴った(Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998))。臨床治験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる例としては、Rosenecker et al., Infection 24:15-10 (1996)、Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9:71083-1089 (1998)、Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995)、Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997)、Topf et al., G

10

20

30

40

50

ene Ther. 5:507-513 (1998)、Stermann et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998) が挙げられる。

【0136】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることが可能であるウイルス粒子が形成される。そのような細胞は、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞またはPA317細胞を含む。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする産生細胞株によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要な最小限のウイルス配列を含有し（該当する場合）、他のウイルス配列が、発現対象のタンパク質をコードする発現カセットによって置換される。欠落したウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に使用されるAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージングおよび組込みに必要とされる、AAVゲノムからの逆方向末端反復（ITR）配列のみを有する。ウイルスDNAが細胞株にパッケージングされ、それは他のAAV遺伝子、つまりrepおよびcapをコードするが、ITR配列が欠如しているヘルパープラスミドを含有する。細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染させられる。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。このヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如に起因して、相当な量ではパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、AAVよりもアデノウイルスのほうがより感受性の高い熱処理によって、低減することができる。

【0137】

多くの遺伝子治療の用途において、遺伝子治療ベクターが、特定の組織型に対する高度の特異性をもって送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上のウイルスのコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることにより、所与の細胞型に対して特異性を有するように修飾され得る。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選定される。例えば、Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995) は、モロニーマウス白血病ウイルスを、gp70に融合するヒトヘレグリンを発現するように修飾することができ、この組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現するある特定のヒト乳癌細胞に感染することを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス標的細胞対にまで拡張することができる。例えば、線維状ファージは、実質的にいかなる選定された細胞受容体に対しても特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、FABまたはFv）を提示するように、操作することができる。上記の説明は、主としてウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。かかるベクターは、特異的な標的細胞による取り込みを選好する特異的な取り込み配列を含有するように操作することができる。

【0138】

遺伝子治療ベクターは、下に記載されるように、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内注入）または局所適用による個々の患者への投与によって、インビボで送達することができる。代替的に、ベクターは、個々の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髓穿刺液、組織生検材料）または万能ドナー造血幹細胞等の細胞にエクシボで送達することができ、続いて、通常はベクターを組み込んだ細胞の選択後に、細胞が患者に再移植される。

【0139】

ヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム等）はまた、インビボでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。代替的に、裸のDNAを投与することができる。投与は、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションを含むが、これらに限定されない

、血液または組織細胞との最終的な接触に分子を導入するために通常使用される経路のうちのいずれかによる。かかる核酸を投与する好適な方法は、利用可能かつ当業者に周知であり、特定の組成物を投与するために1つを超える経路が使用されてもよいが、特定の経路が、別の経路より即時的かつより効果的な反応を提供できる場合が多い。

【0140】

本明細書に記載のポリヌクレオチド（例えばヌクレアーゼコード化および／または2本鎖ドナー）の導入に好適なベクターには、非組み込み型レンチウイルスベクター（IDLV）が含まれる。例えば、Ory et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388、Dull et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zuffery et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880、Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25:217-222、米国特許公開第2009/054985号を参照されたい。

10

【0141】

薬学的に許容される担体は、部分的に、投与されている特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、決定される。したがって、下に記載されるように、多種多様な好適な医薬組成物の製剤が利用可能である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照されたい）。

【0142】

ヌクレアーゼコード化配列およびドナー構築物が同一または異なる系を用いて送達され得ることは明らかであろう。例えば、ヌクレアーゼおよびドナーは、同じベクターにより運ばれてもよい。代替として、ドナーポリヌクレオチドは、プラスミドにより運ばれてもよく、一方、1つ以上のヌクレアーゼは、AAVベクターにより運ばれてもよい。さらに、同一または異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内投与および／または筋肉内注射）によって異なるベクターが投与されてもよい。ベクターは、同時にまたは任意の逐次的順序で送達されてもよい。

20

【0143】

したがって、本開示は、治療タンパク質をコードする導入遺伝子の挿入に影響されやすい疾患および状態のインビボまたはエクスビボ治療、例えば第VIII因子（F8）等の凝固因子のヌクレアーゼ媒介組み込みによる血友病の治療を含む。組成物は、血清または標的器官または細胞内の所望の濃度の治療ポリペプチドを得るために効果的な量で、ヒト患者に投与される。投与は、ポリヌクレオチドが所望の標的細胞に送達される任意の手段によるものであってもよい。例えば、インビボおよびエクスビボ法の両方が企図される。門脈への静脈内注射が、好ましい投与方法である。他のインビボ投与様式には、例えば、肝葉または胆管への直接注射、および、例えば肝動脈を通した、肝臓より遠位の静脈内注射、肝実質への直接注射、肝動脈を介した注射、ならびに／または胆道系を通した逆行性注射が含まれる。エクスビボ投与形態には、離断肝細胞または肝臓の他の細胞のインビトロでの形質導入に続く、形質導入された離断肝細胞の、ヒト患者の門脈脈管、肝実質または胆道系への再注入が含まれ、例えば、Grossman et al., (1994) Nature Genetics, 6:335-341を参照されたい。

30

40

【0144】

投与される有効量のヌクレアーゼ（複数可）およびドナーは、患者間で、および目的の治療ポリペプチドにより変動する。したがって、有効量は、組成物を投与する医者によって最も良く決定され、適切な投与量は、当業者により容易に決定され得る。組み込みおよび発現のために十分な時間（例えば、典型的には4～15日）経過させた後、治療ポリペプチドの血清または他の組織中のレベルの分析、および投与前の初期レベルとの比較によって、投与されている量が低すぎるか、適正範囲内であるか、または高過ぎるかが決定される。初期および後続の投与に好適なレジメンもまた変動し得るが、必要に応じて、初期投与に続く後の投与により類型化される。後続の投与は、1日～1年に1回から数年毎ま

50

での範囲の可変の間隔で行われ得る。当業者には、送達ベクターの免疫抑制による、形質導入の阻害または遮断を回避するための適切な免疫抑制技術が推奨されることが認識され、例えば、Vilquin et al., (1995) Human Gene Ther., 6:1391-1401を参照されたい。

【0145】

エキスビボおよびインビボ投与用製剤は共に、液体中の懸濁液または乳化液を含む。有効成分は、多くの場合、薬学的に許容され、かつ有効成分と適合性のある賦形剤と混合される。好適な賦形剤には、例えば、水、食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノール等、およびそれらの組み合わせが含まれる。加えて、組成物は、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、または医薬組成物の有効性を増強する他の試薬等の少量の補助物質を含有してもよい。

10

【0146】

核酸の送達は、本発明の実施形態において、当業者に知られた任意の方法、例えば、限定されることなく、プロトプラストの形質転換により（例えば米国特許第5,508,184号を参照されたい）、乾燥/阻害媒介DNA取り込みにより（例えば、Potrykus et al., (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8を参照されたい）、エレクトロポレーションにより（例えば、米国特許第5,384,253号を参照されたい）、炭化ケイ素繊維との攪拌により（例えば、米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号を参照されたい）、アグロバクテリウム媒介形質転換により（例えば、米国特許第5,563,055号、同第5,591,616号、同第5,693,512号、同第5,824,877号、同第5,981,840号、および同第6,384,301号を参照されたい）、DNA被覆粒子の加速により（例えば、米国特許第5,015,580号、同第5,550,318号、同第5,538,880号、同第6,160,208号、同第6,399,861号、および同第6,403,865号を参照されたい）、ならびに植物細胞にDNA、RNA、ペプチドおよび/もしくはタンパク質または核酸およびペプチドの組み合わせを送達する方法におけるナノ粒子、ナノ担体および細胞透過性ペプチドにより（国際出願第WO201126644A2号、同第WO2009046384A1号、同第WO2008148223A1号）、植物細胞内に導入され得る。

20

【0147】

これらの技術等の技術を適用することにより、事実上いかなる種類の細胞も、安定して形質転換され得る。いくつかの実施形態において、形質転換DNAは、宿主細胞のゲノム内に組み込まれる。多細胞種の場合、トランスジェニック細胞は、トランスジェニック生物に再生され得る。これらの技術のいずれも、例えば、トランスジェニック植物のゲノム内に本発明の1つ以上の核酸配列を含むトランスジェニック植物を生成するために使用され得る。

30

【0148】

植物内に発現ベクターを導入するために最も広く使用されている方法は、アグロバクテリウムの天然形質転換系に基づく。A. ツメファシエンスおよびA. リゾゲネスは、遺伝子的に植物細胞を形質転換する植物病原性土壌細菌である。A. ツメファシエンスおよびA. リゾゲネスのT_iおよびR_iプラスミドは、それぞれ、植物の遺伝子的形質転換を担う遺伝子を有する。T_i（腫瘍誘発）プラスミドは、形質転換植物に移入されるT-DNAとして知られる大きなセグメントを含有する。T_iプラスミドの別のセグメントであるvir領域は、T-DNA移入を担う。T-DNA領域には、それぞれ末端反復ヌクレオチド配列で構成される左側および右側境界が隣接する。いくつかの修飾されたバイナリベクターにおいては、腫瘍誘発遺伝子が欠失しており、vir領域の機能を使用して、T-DNA境界配列が隣接する外来DNAが移入される。T_i領域はまた、例えば、トランスジェニック植物および細胞の効率的な回収のための選択可能マーカー、ならびに、本発明の融合タンパク質をコードする核酸等の、移入のための挿入配列のためのマルチクローニング部位を含有し得る。

40

50

【0149】

したがって、いくつかの実施形態において、植物形質転換ベクターは、A. ツメファシエンスのT_iプラスミド（例えば、米国特許第4, 536, 475号、同第4, 693, 977号、同第4, 886, 937号、および同第5, 501, 967号、ならびに欧州特許第EP0122791号を参照されたい）またはA. リゾゲネスのR_iプラスミドに由来する。追加的な植物形質転換ベクターは、例えば、限定されることなく、Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303:209-13、Bevan et al. (1983) (上記参照)、Klee et al. (1985) Bio/Technol. 3:637-42、および欧州特許第EP0120516号により説明されるもの、ならびに前記のいずれかに由来するものを含む。天然で植物と相互作用するシノリゾビウム、リゾビウム、およびメソリゾビウム等の他の細菌は、多くの多様な植物への遺伝子移入を媒介するように修飾され得る。これらの植物関連共生細菌は、無毒化T_iプラスミドおよび好適なバイナリベクターの両方の獲得により、遺伝子移入に有効とすることができる。

10

【0150】

以下の実施例は、ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)またはTALENを含む本開示の例となる実施形態に関する。これは例示目的のために過ぎず、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼ系もしくは操作されたDNA結合ドメインを有するホーミングエンドヌクレアーゼ(メガヌクレアーゼ)、ならびに／または操作されたホーミングエンドヌクレアーゼ(メガヌクレアーゼ)のDNA結合ドメインおよび異種の切断ドメインの天然に存在する融合物等の他のヌクレアーゼを用いることができることが理解される。

20

【実施例】

【0151】

実施例1：材料および方法

細胞成長、トランスフェクション、およびZFN/TALENアッセイ。

K562(ATCC CCL-243)のトランスフェクションは、Amaxa Solution VおよびプログラムT-016; CHO-K1(ATCC CCL-61)、Amaxa Solution TおよびプログラムU-023を使用した。全てのトランスフェクションは、10⁶細胞および以下のプラスミドを含有した：AAVS1、3 μgの2A-連結ZFNおよびドナー; IL2Rγ およびCCR5、2 μgの各非連結ZFN プラスミドおよび10 μgのドナープラスミド; GS、FUT8、3 μgの2A-連結ZFNおよび10 μgのドナープラスミド。ZFN設計を含むさらなる詳細については、米国特許第8, 110, 379号および米国特許公開第20100129869号および同20090042250号、ならびにDeKelfver et al. (2010) Genome Res. 20(8):1133-1142、Liu et al. (2009) Biotechnol. Bioeng. 106(1):97-105、Malphettes et al. (2010) Biotechnology and Bioengineering 106(5):774-83、Perez et al. (2008) Nature Biotech. 26(7):808-816、Urnov et al. (2005) Nature 435(7042):646-651を参照されたい。

30

40

【0152】

FUT8 TALEヌクレアーゼ対(SBS 101082およびSBS 101086)は、FUT8のエキソン10においてZFN結合部位に直接重複し、Δ152/+63 NおよびC末端切断点を使用して構築された(Miller et al. 2011)。SBS 101082 FUT8 TALEの結合部位は、5'-tgt atc tgg cca ctg at-3' (配列番号:1); SBS 101086, 5'-ttt gtc ttt gcc tcc tt-3' (配列番号:2)である。

【0153】

50

ドナープラスミド設計および構築

AAVS1 (5'-tgt ccc ct c cAC CCC ACA GTG Gg g cca cTA GGG ACA GGA Ttg gtg aca ga-3'、配列番号：3)、離間-反転AAVS1 (5'-tgt ccc ct c cAC CC ACA GTG Ggt ggc cTA GGG ACA GGA Ttg gtg aca ga-3'、配列番号：541)、GS (5'-gac cCC AAG CCC ATT CCT GGG Aac tgg aAT GGT GCA GGC Tgc cat acc aa-3'、配列番号：4)、およびIL2Rγ (5'-gt t tcg tgt tCG GAG CCG CTT Taa ccc ACT CT G TGG AAG tgc tca gca tt-3'、配列番号：5) ZFN対に 10
対するZFN標的部位を含有するオリゴを、50mM NaCl、10 mM Tris pH7.5、および1mM EDTA中でそれらの逆相補配列にアニールした。米国特許公開第20100129869号、ならびに米国特許第7,951,925号および同第8,110,379号も参照されたい。大文字は、ZFN結合部位を指し、一方小文字は、隣接およびスペーサー配列を指す。

【0154】

次いで、2本鎖産物を、pBluescript II KS-ベクター (Agilent) のEcoRV部位にクローニングした。CCR5ドナープラスミドは、pCR2.1 (Invitrogen) へのCCR5 標的部位オリゴヌクレオチド (5'-GTC ATC CTC ATC CTG ATA AAC TGC AAA AGa-3'、 20
配列番号：6)；5-CTT TTG CAG TTT ATC AGG ATG AG G ATG ACa-3' 配列番号：7の挿入から得られた (米国特許第7,951,925号も参照されたい)。第2のAAVS1ドナープラスミド (図1Eを参照されたい) は、pGKプロモーターにより主導されるGFPオープンリーディングフレームも含有するpCR2.1ベースプラスミドのEcoRV部位への、上記AAVS1 標的部位オリゴの挿入により作製された。

【0155】

FUT8ドナープラスミドは、ZFN/TALEN結合部位 (5'-ggc CGT GTA TCT GGC CAC TGA TGA CCC TTC Ttt gtt aAA GGA GGC AAA GAC AAA Gta a-3'、配列番号：8 30
の、IgGおよびピューロマイシン耐性導入遺伝子を含有するドナープラスミドへの挿入により作製された (Moehle et al. (2007) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 104 (9) : 3055-3060)。

【0156】

標的化組み込みのアッセイ

全てのPCR反応は、Accuprime HiFi (商標) ポリメラーゼ (Invitrogen) を使用し、100ngのゲノムDNAをテンプレートとして用いて行った。ゲノムDNAは、Masterpure (登録商標) キット (Epicentre) で精製した。

【0157】

AAVS1 (PPP1R12Cとしても知られる) でのAAVS1 GFPドナープラスミドの標的化組み込みを、PCR増幅により4つ全ての可能な染色体ドナー接合点において分析した。PCR反応は、60°のアニール温度、30秒の伸長時間、30サイクルの増幅、および以下のプライマーを使用した：AB左、AAVS1 CEL-I F (5'-ccc ctt acc tct cta gtc tgt gc-3'、配列番号：9) およびAAVS1 Junction R (5'-ggc gat taa gtt ggg taa cg-3'、配列番号：10)；AB右、AAVS1 Junction F (5'-ggc ct c ttg gtc aag ttg tt-3'、配列番号：11) およびAAVS1 CEL-I R (5'-ctc agg ttc tgg gag agg gta g-3'、配列番号：12)；BA左、AAVS1 50

CEL-I FおよびAAVS1 Junction F; BA右、AAVS1 Junction RおよびAAVS1 CEL-I R。図8Aにおける配列に対しては、以下のプライマーを使用した: AB左、M13F (5'-gt aaaa cga cggcca gt-3'、配列番号: 13) およびAAVS1 CEL-F; BA右、M13FおよびAAVS1 CEL-I R。

【0158】

IL2Rγ、CCR5、およびGSでの標的化組み込みを、PCR増幅により分析した。PCR反応は、58°のアニール温度、30秒の伸長時間、5%のDMSO、26サイクルの増幅、および以下のプライマーと組み合わせてM13Fプライマーを使用した: IL2Rγ BA左、IL2Rγ CEL-I F (5'-acc agt gag ttt tca tta gg-3'、配列番号: 14); IL2Rγ AB右、IL2Rγ CEL-I R (5'-tgg agc aaa aga cag tgg tg-3'、配列番号: 15); CCR5 BA左、R5F (5'-aag atg gat tat caa gtg tca agt cc-3'、配列番号: 16); CCR5 AB右、R5R (5'-caa agt ccc act ggg cg-3'、配列番号: 17); GS BA左、GJC 172F (5'-atc cgc atg gga gat cat ct-3'、配列番号: 18); GS AB右、GJC 173R (5'-gtg tat gtt cgt tca ccc ac-3'、配列番号: 19)。

【0159】

GSでのAAVS1ドナーの標的化組み込み(図2B)を、PCR増幅により分析した。PCR反応は、58°Cのアニール温度、30秒の伸長時間、5%のDMSO、26サイクルの増幅、および以下のプライマーを使用した: AB左、Jcn1F (5'-caa ata gga ccc tgt gaa gga-3'、配列番号: 20) およびJcn1R (5'-gat taa gtt ggg taa cgc cag-3'、配列番号: 21); BA左、Jcn3F (5'-aat agg acc ctg tga agg a-3'、配列番号: 22) およびJcn3R (5'-gtg tgg aat tgt gag cgg ata-3'、配列番号: 23)。

【0160】

FUT8でのIgGドナーの標的化組み込み(図4)を、PCR増幅により分析した。PCR反応は、60°のアニール温度、30秒の伸長時間、30サイクルの増幅(粗溶解物のスクリーニングに関しては35サイクル)、および以下のプライマーを使用した: AB左接合点、GJC 75F (5'-agt cca tgt cag acg cac tg-3'、配列番号: 24) およびSC seqpfzR (5'-aga gtg agg ctg tgt ctg aaa-3'、配列番号: 25); AB右接合点、FUT8ドナーCELI F2 (5'-tac gta tag gct gcg caa ct-3'、配列番号: 26) およびGJC 115R (5'-gca cat gta gtc ttt gat ttt g-3'、配列番号: 27); BA左接合点、GJC 75FおよびFUT8ドナーCELI F2; BA右接合点、SC seqpfzRおよびGJC 115R。

【0161】

AAVS1におけるAAVS1 GFPドナー組み込みのサザンブロットを、前述の通り精査した(DeKellver et al. 2010, 同書)。このサザンブロットから推定される結果は、以下の通りである: AAVS1プローブは、ABおよびBA方向に対して、それぞれ2092または6592bpバンドにハイブリダイズする。野生型3倍体AAVS1遺伝子座は、3287bpバンドとして観察される。ゲノム内の別の箇所でのAAVS1 GFPドナー組み込みのサザンブロットを、GFPの完全オープンリーディングフレームで精査した。AAVS1での組み込みは、ABおよびBA方向に対してそれぞれ3323または4482bpバンドを生成し、ゲノム内の他の箇所での非標的化組み込みは、決定不能なサイズの2次バンドを生成する。GSにおけるGSドナー組み込みのサザンブロットを、5'-ctg cag gtg aag aca gga t

10

20

30

40

50

g-3'および5'-cccc act aga aag aac atg tt-3'により境界されるGS遺伝子の424bp断片で精査した。GSでの組み込みは、2933bpのハイブリダイズするバンドとして明確化され、野生型GS遺伝子座は、1977bpバンドを生成する。ゲノム内の他の箇所におけるGSドナー組み込みのサザンブロットを、大腸菌bla遺伝子のBsaI-ScaI断片で精査した。正しく組み込まれた導入遺伝子は、2055bpバンドを生じ、GS偽遺伝子への組み込みは、偽遺伝子および挿入方向に依存して、4878、4214、10080、および9416bpのバンドを生じ、他の非標的化組み込みは、予測不可能なサイズの単一バンドを生成する。FUT8における組み込みのサザンブロットを、FUT8遺伝子座の407bp HindIII-XmnI断片で精査した。両方のFUT8サザンに対して、ゲノムDNAをHindIIIで切断した。

10

【0162】

カスタムPythonスクリプトを使用して、FUT8、GS、およびGS偽遺伝子を含むコンティグを全CHOゲノム配列決定データから抽出した(Xu et al. (2011) Nat Biotechnol 29(8):735-41)。FUT8は、コンティグAFTD01065932.1上に存在し、GSはコンティグAFTD01107178.1上に存在する。1つのGS偽遺伝子(AFTD01043599.1内に含有される)は、ZFN結合部位の完全な保存、プローブのエキソン5部分に対する120/128(94%)bpの相同性を有し、6333bpのScaI断片内に存在すると推定される。第2のGS偽遺伝子(AFTD01154859.1内に含有される)は、ZFN結合部位に1つのミスマッチ、プローブのエキソン5部分に対する116/128(91%)bpの相同性を有し、13320bpのScaI断片内に存在すると推定される。

20

【0163】

製造者の説明に従いPierce Easy-Titer IgG Assay Kit(23310)を使用して、抗体濃度を測定した。バックグラウンドより少なくとも2倍高いクローンを陽性として分類した。

【0164】

実施例2: 2本鎖ドナーのインビボ切断後の標的化組み込み

A. AAVS1

30

ゲノム標的部位を切断する同じZFNを使用した導入遺伝子のインビボ切断が、ドナーおよび染色体切断を同期化し、分解に対する導入遺伝子の脆弱性を最小化させるかどうかを試験するために、K562細胞を、AAVS1標的化ZFNおよびドナープラスミドのインビボ切断のためのAAVS1 ZFN標的部位を含むドナープラスミドでトランスフェクトした。簡潔に説明すると、実施例1に記載のように、十分特性決定されきわめて活性なAAVS1 ZFNの認識部位を、自立的GFP発現カセットを含有するがAAVS1遺伝子座に対する相同性を有さないドナープラスミドにクローニングした。米国特許第8,110,379号およびDeKelfver et al. (2010) Genome Res. 20(8):1133-1142を参照されたい。ドナープラスミド(ZFN標的部位を有する、または有さない)を、AAVS1 ZFNをコードする第2のプラスミドと共に、K562細胞に共トランスフェクトした。

40

【0165】

染色体AAVS1部位への挿入を、実施例1において上述したようにトランスフェクションから3日後に単離されたゲノムDNAから標的化ドナー組み込みにより形成された固有の接合点のPCR増幅により分析した。

【0166】

図1に示されるように、同族のZFNと共トランスフェクトされると、ZFN部位含有ドナープラスミドおよび染色体の両方の同時切断が生じ、染色体へのプラスミドの挿入が可能となる。ZFNオーバーハングの単純な連結により推定される方向でのドナープラスミドの挿入は、AB方向として表記し、代替の方向は、BA方向として表記した。図1D

50

に示されるように、標的部位間のヌクレオチド（スペーサー）が ゲノム（野生型）配列の逆相補配列である場合、BA（逆）方向が有利である。

【0167】

さらに、図1Dおよび1Eに示されるように（1Eのレーン6、8、10、17、19および21を参照されたい）、切断されたドナーDNAの捕捉の成功と一致して、ABおよびBA方向の両方におけるドナー組み込みにより形成された、推定される5'および3'接合点が検出された。BA方向は、逆相補配列スペーサーに有利であった（図1D）。

（i）AAVS1 ZFN部位を有さないドナーは、AAVS1遺伝子座の効率的な切断にもかかわらず組み込まれず（図1E、レーン5、7、9、ならびにレーン16、18、および20；図5Aを参照されたい）、（ii）対応するZFNの共トランスフェクションのないドナーのトランスフェクションもまた、標的化組み込みをもたらさなかったため、ドナー組み込みにはZFN媒介切断が必要であった。

10

【0168】

ZFNおよびドナーの両方でトランスフェクトされたプールからの限界希釈法により、細胞クローンを得た（レーン8/19）。3つのGFP陽性および接合点PCR陽性クローンを、サザンブロットにより2回分析し、ドナープラスミドの組み込みを確認した。クローンは、3つのクラスに分類される：非挿入対立遺伝子に加えて、クローン1は1つのAB挿入を含有し、クローン2は1つのBA挿入を含有し、クローン3はABおよびBA挿入の両方を含有する（図1F）。

20

【0169】

3つのクローンを、GFP特異的プローブを用いたサザンブロットにより、標的外組み込みについても分析した。クローン1は、AAVS1での推定される挿入のみを含有し、一方クローン2および3は、AAVS1挿入に加えてゲノム内の他の箇所での導入遺伝子挿入を含有した（図1F）。

【0170】

これらの3つの細胞株からの染色体ドナー組み込み接合点のPCR単位複製配列を、クローニングおよび配列決定した。図7に示されるように、クローン1および3は、5'および3'接合点の両方においてドナーおよび染色体オーバーハングの完全な連結を有するAB挿入を含有した。クローン2および3は、左の5'接合点において微小相同性主導的修復により生成された対立遺伝子を有するBA挿入を含有した。

30

【0171】

B. IL2R γ 、GSおよびCCR

切断されたドナーの捕捉が、K562細胞におけるAAVS1内への組み込みに制限されないことを実証するために、K562およびCHO細胞における3つの他の遺伝子座（IL2R γ 、CCR およびGS）において類似の実験を行った。成功した標的化組み込みを、上述のように各方向（ABおよびBA）に対して、1つの染色体ドナー接合点において監視した。

【0172】

ZFN切断の部位に標的化された部位特異的組み込みが、K562細胞における IL2R γ およびCCR5 遺伝子座、ならびにCHO-K1細胞におけるGS遺伝子座に観察された。（図2A、レーン3、7、11、15、19、および23）。AAVS1への組み込みと同様に、IL2R γ 、CCR5、およびGSでの組み込みは、ドナープラスミドにおけるZFN切断部位の含有（図2A、レーン1、5、9、13、17、および21）、ならびにZFN自体の同時送達に依存した。染色体標的およびドナープラスミド上の両方でのZFN活性は、全ての試料にわたって本質的に均一であった（図5B）。

40

【0173】

これらの遺伝子座から、およびAAVS1要素の類似したプールからの染色体ドナー接合点PCR産物の配列決定では、標的化遺伝子座における正しい組み込みと一致する一連の挿入イベントが明らかとなった（図8）。

【0174】

50

したがって、DSBにおけるインビボ切断導入遺伝子ドナーを捕捉する能力は、哺乳動物DNA修復機構の一般的特性であり、特定の標的部位または細胞型に依存しない。

【0175】

実施例3：インビボおよびインビトロ切断

標的化遺伝子挿入の観察されたレベルを支持するにはインビボ切断が必要であることを確認するために、実施例1に記載のように、インビボ切断ドナー、およびEcoRVを使用してインビトロで切断されたドナーを使用して、標的化組み込みの直接比較を行った。

【0176】

図2に示されるように、事前に切断されたドナープラスミドの組み込みが時折検出可能であったが、インビボ切断ドナーと比較して顕著に効率が低かった(図2A、レーン2/3、6/7、10/11、14/15、18/19、および22/23を比較されたい)。さらに、事前に切断されたドナーDNAの使用は、染色体捕捉前のドナーDNA分解のレベルの増加と一致して、接合点PCRサイズの範囲の増加を示した(例えば、図2A、レーン22を参照されたい)。

【0177】

標的化組み込みが2つの異なるヌクレアーゼ(ZFN)の使用により刺激され得ることを確認するために、GS ZFN対(実施例1)を使用してCHO-K1細胞の染色体を切断し、またAAVS1 ZFN対を使用して同じ細胞におけるドナープラスミドを切断した。GS ZFN対が染色体およびドナーを切断した場合(図2Aの場合のように)、ならびにGS ZFNが染色体を切断し、AAVS1 ZFNがドナーを切断した場合(図2B、レーン6および8、レーン15および17)の両方において、GSにおける組み込みが同様の頻度で検出された。ここでも、GSにおける切断効率は、全てのGS ZFNトランスフェクション試料にわたって均一であった(図5C)。

【0178】

したがって、インビボ切断は、ドナー分子の事前切断よりも効率的である。

【0179】

実施例4：CHO細胞への相同性非依存性標的化組み込み

CHO細胞における標的化組み込みは、バイオテクノロジーにおいて特に重要な用途を有するが、CHO細胞は、数キロベースの導入遺伝子のHDRベース標的化組み込みを極めて不十分にしか行わない。この点を強調するために、本質的にMoehle et al. (2007) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 104 (9): 3055-3060に記載されるように、プロモーターを含まないGFP遺伝子をプロモーター含有アクセプター遺伝子座内に送達するように設計された系を使用しして、HEK-293細胞およびCHO-K1細胞両方におけるHDR媒介標的化組み込みを比較した。標的化組み込みは、GFPの発現をもたらし、フローサイトメトリーによる定量化を可能にする。

【0180】

ZFNおよび相同性含有ドナープラスミド(HDRによる組み込みのため)でトランスフェクトした場合、HEK-293細胞の0.5%から3%がGFP陽性となった(図6)。対照的に、CHO-K1細胞はいずれも、同様にトランスフェクトされた場合、GFP陽性とならなかった。CHO細胞はHDRベース標的化組み込みを不十分にしか行わないが、組み換えタンパク質産生における実用性が証明されていることを考慮して、我々は次に、ドナーDNAのインビボ切断がCHO細胞における標的化組み込みを主導するのに利用可能であるかどうか調べた。

【0181】

GSにおける標的化組み込みを有するプールからのCHO-K1細胞(図2A、レーン19/23)を、制限希釈法によりクローニングし、単一細胞由来クローンを、部位特異的組み込みに関してPCRによりスクリーニングした。HDRベースの手法で得られた否定的な結果とは対照的に、インビボ切断ドナーDNAの相同性非依存性捕捉は、左染色体ドナーBA接合点に対しPCR陽性である10%(17/157)の単一細胞由来クロー

ーン、右BA接合点に対し陽性である8% (13) の単一細胞由来クローン、および両方のBA接合点に対し陽性である6% (10) の単一細胞由来クローンを生成した。これらの10のクローンのうち8つを、サザンブロットによる分析のために無作為に選択した。8つ全てのクローンが、GS標的部位における推定標的化導入遺伝子挿入、野生型GS対立遺伝子、および2つのGS偽遺伝子を含むした (図3)。野生型CHO-K1細胞には、野生型GS対立遺伝子および偽遺伝子のみが存在する (図3、レーン9)。さらに、導入遺伝子特異的配列で精査した場合、8つのクローンのうち5つは、GSにおいて導入遺伝子のただ1つのコピーを含むし、3つは、GSにおいて導入遺伝子コピーおよびCHOゲノムの他の部位において1つ以上の無作為に組み込まれたコピーを含むことを示し、その1つは、GS偽遺伝子内への組み込みに対応していた (図3、それぞれレーン10、12、13、16、17およびレーン11、14、15)。染色体-導入遺伝子接合部を配列決定したが、これを図9に示す。

10

【0182】

実施例5：FUT8への標的化組み込みおよびその妨害

導入遺伝子を慣習的にCHO細胞ゲノム内に挿入し、生物薬剤タンパク質、特に抗体を生成する。FUT8遺伝子の欠失を有するCHO細胞は、100倍高い抗体依存性細胞傷害性を有するフコシル化抗体を生成する (Malphettes et al. (2010) Biotechnology and Bioengineering 106 (5): 774-83; Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotech. Bioeng. 87 (5): 614-22)。さらに、FUT8発現のノックアウトを選択することができ、したがって、標的化組み込みをこの選択可能な形質と結合させることができる。したがって我々は、インビボ切断抗体生成カセットの挿入により、FUT8遺伝子を妨害するために、前述のFUT8特異的ZFNを使用した (Moehle et al. (2007) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 104 (9): 3055-3060)。さらに、我々は、インビボ切断ドナーの捕捉が、FUT8に特異的なTALENヌクレアーゼ (TALEN) により生成された2本鎖切断で生じ得るかどうかを決定することを望んだ。

20

【0183】

簡潔に説明すると、FUT8を切断するZFNまたはTALENを、実施例1に記載のようにFUT8ヌクレアーゼ切断部位を含む抗体発現プラスミドで共トランスフェクトした。レンズマメ (Lens culinaris) 凝集素および制限希釈法によりクローニングされた細胞を使用して、トランスフェクトされたプールを2対立遺伝子FUT8ノックアウトのために選択した (Malphettes et al. (2010) Biotechnology and Bioengineering 106 (5): 774-83を参照されたい)。

30

左および右導入遺伝子/染色体接合点の両方のPCRにより、クローンをIgGの分泌およびIgG導入遺伝子の挿入についてスクリーニングした。

【0184】

図4に示されるように、ZFN処理クローン、25/96 (26%) のクローンがIgGを発現し、14/96 (15%) のクローンが完全IgG導入遺伝子の挿入に陽性であった。PCRにより挿入に陽性であった全てのクローンのうち1つを除いて、IgGを発現した。FUT8 TALENに関しては同様の結果が得られ、35/171 (20%) のクローンがIgGを発現し、完全導入遺伝子挿入を有する16 (9%) 全てのクローンが、IgGを発現した。PCRにより検出可能な1つ (ただし両方ではない) の導入遺伝子組み込み接合点を有するクローンが、残りのIgG発現クローンのかなりの割合を占めた (図4A)。

40

【0185】

また、これらの実験を、FUT8に標的化されたTALENヌクレアーゼを使用して行った。FUT8における導入遺伝子組み込みは、TALEN媒介導入遺伝子挿入から得られた10のPCRおよびIgG陽性クローンに対するサザンブロット分析により確認され

50

た（図4Bおよび4C）。さらに、図12は、ZFN（図10A）またはTALEN（図10B）を使用したFUT8組み込みドナーのPCR接合点の配列決定により得られた配列を示す。

【0186】

要約すると、本明細書に記載の方法および組成物は、相同性非依存的方法により、相同性主導的組み込みに対して抵抗性である細胞株（例えばCHO細胞）を含む、大型導入遺伝子の容易な標的化組み込みを提供する。

【0187】

実施例6：小麦AHAS遺伝子座への標的化組み込みおよびその妨害
AHASゲノム標的配列の特性決定および同定

参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許番号第61/809,097号に記載のように、3つの同祖AHAS遺伝子の転写された領域を同定および決定し、ジンクフィンガーヌクレアーゼを、ドナー配列のNH₂J媒介標的化のための部位を結合および切断するように設計した。これらの新規配列は、配列番号：116、配列番号：117、および配列番号：118として列挙される。以前の配列決定研究において、コムギ（*Triticum aestivum*）からのAHAS遺伝子の同祖コピーが同定され、染色体6A、6Bおよび6Dの長腕に遺伝子的にマッピングされた（Anderson et al., (2004) *Weed Science* 52:83-90; およびLi et al., (2008) *Molecular Breeding* 22:217-225）。発現配列タグ（EST）の配列分析およびGenbankにおいて利用可能なゲノム配列（Accession Number: AY210405.1、AY210407.1、AY210406.1、AY210408.1、FJ997628.1、FJ997629.1、FJ997631.1、FJ997630.1、FJ997627.1、およびAY273827.1）を使用して、AHAS遺伝子（配列番号：116~118）の同祖コピーの転写された領域を決定した。

【0188】

転写された領域の上流側および下流側に位置する新規な非コード化AHAS遺伝子配列を、初めて特性決定した。これらの非コード化配列を完全に特性決定するために、AHAS遺伝子の3つの同祖コピーのそれぞれの転写された配列を、BLASTN（商標）クエリーとして使用し、コムギ（*Triticum aestivum*）品種Chinese

Springの全ゲノムショットガン配列決定から生成された、アセンブルされていないROCHE 454（商標）配列リードをスクリーニングした。コムギ（*Triticum aestivum*）品種Chinese SpringのROCHE 454（商標）配列リードは、5倍配列包括度まで生成された。配列アセンブリは、Roche 454（商標）のSequencher software（商標）（GeneCodes、Ann Arbor、MI）を使用して完了させた。有意なBLASTN（商標）ヒット（E値<0.0001）を有する配列リードを使用して、これらの非転写領域を特性決定した。BLASTN（商標）分析および配列アセンブリの反復ラウンドを行った。配列の全てが単一の連続した配列としてコンパイルされるように、各反復は、前の反復からのアセンブルされたAHAS配列を組み込んだ。全体として、それぞれ染色体6A、6Bおよび6D上に位置する同祖AHAS遺伝子のゲノム配列の4,384、7,590および6,205が特性決定された（配列番号：119~121）。

【0189】

コムギ（*Triticum aestivum*）品種Bobwhite MPB26RHから単離されたAHAS遺伝子の配列分析

コムギ（*Triticum aestivum*）品種Bobwhite MPB26RHからAHAS遺伝子の同祖コピーをクローニングおよび配列決定して、高度の特異性で配列に結合することができる特異的ジンクフィンガータンパク質を設計するために好適なヌクレオチド配列を得た。コムギ（*Triticum aestivum*）品種Bobwhite MPB26RHから得られたAHASヌクレオチド配列の配列分析は、Gen

b a n k内に存在するヌクレオチドの注釈およびROCHE 454（商標）AHAS遺伝子配列を確認するために、ならびに品種Bobwhite MPB26RHと、GenbankおよびROCHE 454（商標）配列が得られる他の小麦品種との間の対立遺伝子変異に起因して必要であった。

【0190】

AHAS遺伝子の増幅のために、PCRプライマーのコホートを設計した（表1）。プライマーは、CLUSTALW（商標）を使用して生成された複数の配列アライメントから生成されたコンセンサス配列から設計された（Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Research 22:4673-80）。配列アライメントは、5倍包括度で完了したROCHE 454（商標）配列決定から生成された品種Chinese Spring配列決定データからアセンブルされた。

10

【0191】

表1に示されるように、PCRプライマーは、3つ全ての同祖配列を増幅するように、または単一の同祖配列のみを増幅するように設計された。例えば、AHAS遺伝子の転写された領域を増幅するために使用されるPCRプライマーは、単一の多重PCR反応において3つ全ての同祖コピーを同時に増幅するように設計された。非転写領域を増幅するために使用されるPCRプライマーは、3つ全ての同祖コピーを増幅するように、または単一の同祖コピーのみを増幅するように設計された。PCRプライマーの全ては、18～27のヌクレオチド長であるように、また60～65℃、最適には63℃の融点を有するように設計された。さらに、いくつかのプライマーは、最後から2番目の塩基（ホスホロチオエート連結を含有し、表1においてアスタリスク（*）として示される）を、各小麦部分ゲノムから遺伝子コピーを区別する1ヌクレオチド配列変異上に位置付けるように設計された。表1は、設計および合成されたPCRプライマーを列挙している。

20

【表 1】

【表 1】 AHAS 配列の PCR 増幅のために使用されたプライマー配列

プライマー名	領域	増幅されるゲノム	配列番号	配列(5' →3')
AHAS-p_Fwd5	5' UTR	D	122	TCTGTAAGTTATCGCCTGAATTGCTT
AHAS-p_Rvs6	5' UTR	D	123	CATTGTGACATCAGCATGACACAA
AHAS-p_Fwd4	5' UTR	D	124	AAGCAYGGCTTGCCTACAGC
AHAS-p_Rvs3	5' UTR	D	125	AACCAAATRCCCTATGTCTCTCC
AHAS-p_Fwd1	5' UTR	A、B、および D	126	CGTTCGCCCCGTAGACCATTTC
AHAS-p_Rvs1	5' UTR	A、B、および D	127	GGAGGGGTGATGKTTTGTCTTT
AHAS_1F1_transcribed	コード化	A、B、および D	128	TCG CCC AAA CCC TCG CC
AHAS_1R1_transcribed	コード化	A、B、および D	129	GGG TCG TCR CTG GGG AAG TT
AHAS_2F2_transcribed	コード化	A、B、および D	130	GCC TTC TTC CTY GCR TCC TCT GG
AHAS_2R2_transcribed	コード化	A、B、および D	131	GCC CGR TTG GCC TTG TAA AAC CT
AHAS_3F1_transcribed	コード化	A、B、および D	132	AYC AGA TGT GGG CGG CTC AGT AT
AHAS_3R1_transcribed	コード化	A、B、および D	133	GGG ATA TGT AGG ACA AGA AAC TTG CAT GA
AHAS-6A. PS. 3' .F1	3' UTR	A	134	AGGGCCATACTTGTTGGATATCAT*C
AHAS-6A. PS. 3' .R2	3' UTR	A	135	GCCAACACCCTACACTGCCTA*T
AHAS-6B. PS. 3' .F1	3' UTR	B	136	TGCGCAATCAGCATGATACC*T
AHAS-6B. PS. 3' .R1	3' UTR	B	137	ACGTATCCGAGTCGAGCAA*T
AHAS-6D. PS. 3' .F1	3' UTR	D	138	GTAGGGATGTGCTGTCATAAGAT*G
AHAS-6D. PS. 3' .R3	3' UTR	D	139	TTGGAGGCTCAGCCGATCA*C

UTR = 非翻訳領域

コード化 = 転写された領域用に設計されたプライマー

アスタリスク (*) は、ホスホロチオエート配列の組み込みを示す。

【0192】

部分ゲノム特異的増幅は、最後から 2 番目の塩基（ホスホロチオエート連結を含有する）を、各小麦部分ゲノムから遺伝子コピーを区別する 1 ヌクレオチド配列変異上に位置付けるように設計されたプライマーを用い、オン-オフ PCR を使用して達成された（Yang et al., (2005) Biochemical and Biophysical Research Communications 328:265-72

10

20

30

40

50

）。2つの異なるセットのPCR条件を使用して、品種Bobwhite MPB26RHからのAHAS遺伝子の同祖コピーを増幅した。転写された領域に対して、PCR反応物は、0.2mMのdNTP、1×IMMOLASE PCR（商標）緩衝液（Bioline、Taunton、MA）、1.5mMのMgCl₂、0.25単位のIMMOLASE DNA POLYMERASE（商標）（Bioline、Taunton、MA）、それぞれ0.2μMの順方向および逆方向プライマー、ならびに約50ngのゲノムDNAを含有した。AHAS_1F1およびAHAS_1R1プライマーを含有する反応物に、8%（v/v）DMSOを添加した。非転写領域に対して、PCR反応物は、0.2mMのdNTP、1×PHUSION GC BUFFER（商標）（New England Biolabs Ipswich、MA）、0.5単位のHOT-STAR T PHUSION DNA（登録商標）ポリメラーゼ（New England Biolabs）、それぞれ0.2μMの順方向および逆方向プライマー、ならびに約50ngのゲノムDNAを含有した。PCRは、MJ PTC200（登録商標）サーモサイクラー（BioRad、Hercules、CA）を使用して、最終的な25μl反応体積で行った。PCRサイクリングの後、反応生成物を精製し、PGEM-T EASY VECTOR（商標）（Promega、Madison、WI）を使用して、大腸菌JM109細胞にクローニングした。DNA EASY PLASMID DNA PURIFICATION KIT（商標）（Qiagen、Valencia、CA）を使用してプラスミドDNAを抽出し、ABI3730XL（登録商標）自動化キャピラリー電気泳動プラットフォーム上で、BIGDYE（登録商標）v3.1化学（Applied Biosystems、Carlsbad、CA）を使用してサンガー配列決定を行った。SEQUENCHER SOFTWARE（商標）（GeneCodes、Ann Arbor、MI）を使用して行われる配列分析を使用して、品種Bobwhite MPB26RHからの各同祖遺伝子コピー（配列番号：140、配列番号：141、および配列番号：142）のコンセンサス配列を生成した。CLUSTALW（商標）を使用して、AHAS遺伝子コピー間を区別する同祖配列変異が確認される複数のコンセンサス配列アライメントを生成した。

【0193】

AHAS遺伝子配列に特異的なジンクフィンガー結合ドメインの設計

AHAS遺伝子の同祖コピーの同定されたDNA配列に対して指向性であるジンクフィンガータンパク質を、前述のように設計した。例えば、Urnov et al., (2005) Nature 435:646-551を参照されたい。例となる標的配列および認識ヘリックスを、表2（認識ヘリックス領域設計）および表3（標的部位）に示す。表3において、ZFP認識ヘリックスに接触する標的部位におけるヌクレオチドは大文字で示され、接触していないヌクレオチドは小文字で示されている。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）標的部位は、セリン653アミノ酸残基から約500bp上流側の領域、セリン653アミノ酸残基に隣接する（30bp以内）上流側領域、セリン653アミノ酸残基に隣接する（80bp以内）下流側領域、およびセリン653アミノ酸残基から約400bp下流側の領域の、AHAS遺伝子の4つの領域に対して設計された。様々なZFP設計を開発および試験して、参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許番号第61809097号に記載のように小麦において同定された、22の異なるAHAS標的部位と最も高いレベルの効率で結合したフィンガーを同定した。最も高いレベルの効率でジンクフィンガー認識配列に結合した特異的ZFP認識ヘリックス（表2）を、NHEJ媒介標的化および小麦ゲノムのAHAS遺伝子座内のドナー配列の組み込み（相同性非依存性標的化組み込み）に使用した。

【表 2】

【表 2】 AHAS ジンクフィンガー設計 (N/Aは、「該当なし」を示す)

ZFP#	F1	F2	F3	F4	F5	F6
29730	TSGNLTR_配 列番号 143	HRTSLTD 配 列番号 144	QSSDLSR_配 列番号 145	HKYHLRS_配 列番号 146	QSSDLSR_配 列番号:145	QWSTRKR_ 配列番号 147
29732	RSDSLSA_ 配 列 番 号 148	RSDALAR_ 配列番号 149	RSDDLTR_ 配列番号 150	QKSNLSS_ 配列番号 151	DSSDRKK_配 列番号 152	N/A
30012	HSNARKT_配 列番号 153	QSGNLAR_配 列番号 154	DRSALAR_配 列番号 155	RSDNLST_配 列番号 156	AQWGRTS_ 配 列番号 157	N/A
30018	QSGDLTR_配 列番号 158	MRNRLNR_配 列番号 159	DRSNLSR_配 列番号 160	WRSCRSA_配 列番号 161	QRSNLDS_ 配 列番号 162	N/A

10

【表 3】

【表 3】 AHAS ジンクフィンガーの標的部位

ZFP	AHAS 領域	標的部位 (5' →3')	配列番号:
29730	S653 から上流 30bp 以内	agGCAGCACGTGCTCCTGATgcgggact	163
29732	S653 から上流 30bp 以内	gaTCCCAAGCGGTGGTGctttcaaggac	164
30012	S653N から下流 80bp 以内	tcTTGTAGGTCGAAATTcagtagcagg	165
30018	S653N から下流 80bp 以内	taCAAgTGTGACaTGCgCAatcagcatg	166

20

30

【0194】

AHAS ジンクフィンガー設計は、CCHC 構造を有する少なくとも 1 つのフィンガーを有するタンパク質をコードするジンクフィンガー発現ベクター内に組み込まれた。米国特許公開第 2008/0182332 号を参照されたい。特に、各タンパク質における最後のフィンガーは、認識ヘリックスの CCHC 骨格を有していた。非正準ジンクフィンガーコード化配列を、IIS 型制限酵素 FokI のヌクレアーゼドメイン (Wah et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10564-10569 の配列のアミノ酸 384~579) に、4 アミノ酸 ZC リンカーおよびトウモロコシ (Zea mays) に由来する opaque-2 核局在化シグナルを介して融合させ、AHAS ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を形成した。米国特許第 7,888,121 号を参照されたい。

40

【0195】

以前に活性ヌクレアーゼを同定することが示された出芽酵母ベースの系を使用して、最適なジンクフィンガーを切断活性について検証した。例えば、米国特許出願公開第 2009/0111119 号; Doyon et al., (2008) Nat Biotechnology 26:702-708; Geurts et al., (2009) Science 325:433 を参照されたい。様々な機能性ドメインに対するジンクフィンガーを、インビボでの使用のために選択した。多くの ZFN が、設計され、

50

生成され、推定されるA H A Sゲノムポリヌクレオチド標的部位への結合について試験された。上記表2に記載のZ F Nは、高レベルでインビボ活性を有するものとして特定され、植物体内の固有のA H A Sゲノムポリヌクレオチド標的部位を効率的に結合および切断することができる特徴付けられた。

【0196】

トランジェントアッセイを使用したA H A S遺伝子のジンクフィンガーヌクレアーゼ切断の評価

Z F N構築物アセンブリ：前述のように酵母アッセイを使用して同定されたZ F N遺伝子発現構築物を含有するプラスミドベクターを設計し、当該技術分野において一般的に知られている技術および技法を使用して完成させた。（例えば、AusubelまたはManiatisを参照されたい）。各Z F Nコード化配列を、ジンクフィンガーヌクレアーゼの上流側に位置するopaque-2核局在化シグナルをコードする配列に融合させた（Maddaloni et al., (1989) Nuc. Acids Res. 17:7532）。

【0197】

融合タンパク質の発現は、トウモロコシ（Zea mays）ユビキチン遺伝子（5'非翻訳領域（UTR）を含む）からの強力な構成的プロモーターにより主導された（Tokiet al., (1992) Plant Physiology 100;1503-07）。また、発現カセットは、トウモロコシ（Zea mays）ペルオキシダーゼ5遺伝子（Per5）遺伝子からの3' UTR（転写ターミネーターおよびポリアダニル化部位を含む）を含んでいた（米国特許出願公開第2004/0158887号）。Thosea asignaウイルスからのヌクレオチド配列をコードする自己加水分解性2A（Szymczak et al., (2004) Nat Biotechnol. 22:760-760）を、構築物にクローニングされた2つのジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質の間に追加した。

【0198】

IN-FUSION（商標）Advantage Technology（Clontech、Mountain View、CA）を使用して、プラスミドベクターをアセンブルした。制限エンドヌクレアーゼは、New England Biolabs（Ipswich、MA）から入手し、T4 DNA Ligase（Invitrogen、Carlsbad、CA）をDNA連結に使用した。プラスミド調製は、供給業者の説明に従い、NUCLEOSPIN（登録商標）Plasmid Kit（Macherey-Nagel Inc.、Bethlehem、PA）またはPlasmid Midi Kit（Qiagen）を使用して行った。アガローストリス-酢酸ゲル電気泳動後に、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT（商標）（Qiagen）を使用してDNA断片を単離した。全ての連結反応のコロニーを、まずミニプレップDNAの制限酵素消化によりスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミドDNAは、商業的な配列決定業者（Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL）により配列決定された。配列データをアセンブルし、SEQUENCHER（商標）ソフトウェア（Gene Codes Corp.、Ann Arbor、MI）を使用して分析した。

【0199】

代表的プラスミドpDAB109350およびpDAB109360を図11および図12に示すが、これらは、制限酵素消化およびDNA配列決定により確認された。

【0200】

トランスフェクションのためのZ F N構築物DNAの調製

コムギ（Triticum aestivum）プロトプラストへの送達の前に、供給業者の説明に従い、PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM（登録商標）（Promega Corporation、Madison、WI）またはPLASMID MAXI KIT（登録商標）（Qiagen、Valenc

10

20

30

40

50

i a、C A) を使用して、各 Z F N 構築物のためのプラスミド D N A を大腸菌の培養物から調製した。

【0201】

コムギ葉肉プロトプラストの単離

コムギ系統品種 B o b w h i t e M P B 2 6 R H からの葉肉プロトプラストを、ポリエチレングリコール (P E G) 媒介 D N A 送達を使用したトランスフェクションのために以下のように調製した。

【0202】

成熟種子を、80% (v / v) エタノール中に30秒間含浸し、水道水で2回濯ぎ、続いて、旋回振とう機で140 r p m で20分間、20% D O M E S T O S (登録商標) (0 . 8 % v / v 有効塩素) 中で洗浄することにより、表面殺菌した。デカンテーションにより D O M E S T O S (登録商標) を除去し、種を滅菌水で4回濯いだ。種を W H A T M A N (商標) 濾紙上に置くことにより、過剰の水を除去した。種を、数枚の湿った滅菌 W H A T M A N (商標) 濾紙上の滅菌 P E T R I (商標) 皿内に置き、24℃で24時間インキュベートした。インキュベーション後、15% D O M E S T O S (登録商標) 中で15分間振とうし、続いて前述のように滅菌水で濯ぐことにより、種を再び表面殺菌した。種を、ムラシゲ・スクーグ (M S) 凝固培地上に、24℃で24時間置いた。最後に、10% D O M E S T O S (登録商標) 中で10分間振とうし、続いて前述のように滅菌水で濯ぐことにより、種に対し三回目の表面殺菌を行った。しわの側を下にして、P E T R I (商標) 皿当たり10個の種で M S 凝固培地上に種を置き、24℃で14～21日間、暗所で発芽させた。

【0203】

発芽した種から、約2～3グラムの葉材を2～3cmの長さに切断し、事前に秤量した P E T R I (商標) 皿内に入れた。葉鞘および黄変した葉材は廃棄した。約10mLの葉酵素消化ミックス (0 . 6 M マンニトール、10mM M E S 、 1 . 5 % w / v セルラーゼ R 1 0 、 0 . 3 % w / v マセロザイム、1mM C a C l ₂ 、 0 . 1 % ウシ血清アルブミン、0 . 0 2 5 % v / v プルロニック酸、5mM β -メルカプトエタノール、pH 5 . 7) を P E T R I (商標) 皿にピペットで入れ、鋭いメスの刃を使用して葉材を1～2mmのセグメントに横に切断した。葉材の乾燥からもたらされる細胞の損傷を防止するために、葉消化ミックスの存在下で葉材を切断した。P E T R I (商標) 皿に、新鮮な葉材の重量グラム当たり10mLの体積まで追加の葉酵素消化ミックスを添加し、真空 (2 0 " H g) 圧力に30分間曝露した。P E T R I (商標) 皿を P A R A F I L M (登録商標) で封止し、穏やかな回転振とうで、28℃で4～5時間インキュベートした。

【0204】

消化懸濁液を100ミクロンメッシュを通して50mL採取管内に通過させることにより、葉のセグメントから酵素消化ミックス内に放出された葉肉プロトプラストを、植物残骸から単離した。プロトプラストの収量を最大化するために、消化された葉材を3回洗浄した。各洗浄は、10mLの洗浄緩衝液 (20mM K C l 、 4mM M E S 、 0 . 6 M マンニトール、pH 5 . 6) を P E T R I (商標) 皿に加え、1分間穏やかに旋回し、続いて洗浄緩衝液を100ミクロンの篩を通して同じ50mLの採取管内に通過させることにより行った。次に、濾過されたプロトプラスト懸濁液を、70ミクロンの篩に、続いて40ミクロンの篩に通過させた。次に、濾過されたプロトプラスト懸濁液の6mLのアリコートをし、蓋付きの12mLの丸底遠心管に移し、12℃で10分間、70gで遠心分離した。遠心分離後、上澄みを除去し、プロトプラストペレットをそれぞれ7mL洗浄緩衝液中に再懸濁させた。上述のように遠心分離によりプロトプラストを再びペレット化した。プロトプラストをそれぞれ1mL洗浄緩衝液中に再懸濁させ、2つの遠心管にプールした。洗浄緩衝液の体積を各管内に7mLの最終体積に調節してから、上述のように遠心分離を行った。上澄みの除去後、プロトプラストペレットを1mL洗浄緩衝液中に再懸濁させ、単一の管にプールした。葉肉プロトプラストの収量は、N e u b a u e r 血球計を使用して推定した。E v a n s B l u e 染色を使用して、回収された生細胞の割合を決定

した。

【0205】

葉肉プロトプラストのPEG媒介トランスフェクション

約 10^6 の葉肉プロトプラストを、12 mLの丸底管に加え、70 gでの遠心分離によりペレット化してから上澄みを除去した。70 μ gのプラスミドDNAを含有する600 μ l洗浄緩衝液中に、プロトプラストを穏やかに再懸濁させた。プラスミドDNAは、上述のジンクフィンガーヌクレアーゼ構築物からなっていた。次に、等体積の40%PEG溶液(40%w/v PEG 4,000、0.8 Mマンニトール、1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、pH 5.6)を、管の穏やかな回転による混合と同時にプロトプラスト懸濁液にゆっくりと添加した。プロトプラスト懸濁液を、一切攪拌せずに室温で15分間インキュベートした。

10

【0206】

追加の6 mL体積の洗浄緩衝液を、1 mL、2 mLおよび3 mLの逐次的アリコートでプロトプラスト懸濁液にゆっくりと添加した。同時の穏やかな混合を使用して、それぞれの逐次的アリコートに対して均質な懸濁を維持した。プロトプラスト懸濁液の半分を第2の12 mL丸底管に移し、さらなる3 mL体積の洗浄緩衝液を、穏やかな混合と同時に各管にゆっくりと添加した。プロトプラストを、70 gで10分間の遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。プロトプラストペレットを、それぞれ1 mL洗浄緩衝液中に再懸濁させてから、対となった丸底管からのプロトプラストを、単一の12 mL管にプールした。追加の7 mL洗浄緩衝液を、プールしたプロトプラストに添加してから、上述のように遠心分離した。上澄みを完全に除去し、プロトプラストペレットを2 mLのQia oの培地(0.44%w/v MSおよびビタミン、3 mM MES、0.0001%w/v 2,4-D、0.6 Mグルコース、pH 5.7)中に再懸濁させた。プロトプラスト懸濁液を滅菌3 cm PETRI (商標)皿に移し、24°Cで72時間、暗所でインキュベートした。

20

【0207】

葉肉プロトプラストからのゲノムDNA単離

トランスフェクトされたプロトプラストを、3 cm PETRI (商標)皿から2 mL微量遠心管に移した。細胞を70 gでの遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。トランスフェクトされたプロトプラストの回収を最大化するために、PETRI (商標)皿を1 mLの洗浄緩衝液で3回濯いだ。各濯ぎは、洗浄緩衝液をPETRI (商標)皿内で1分間旋回攪拌し、続いて液体を同じ2 mLの微量遠心管に移すことにより行った。各濯ぎの最後に、細胞を70 gでの遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。ペレット化されたプロトプラストを液体窒素中で急速凍結してから、LABCONCO FREEZONE 4.5 (登録商標) (Labconco, Kansas City, MO)内で-40°Cおよび 133×10^{-3} mBarの圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥された細胞を、製造者の説明に従いDNEASY (登録商標) PLANT DNA EXTRACTION MINIキット(Qiagen)を使用してDNA抽出に供し(但し組織破壊は必要ではない)、プロトプラスト細胞を溶解緩衝液に直接添加した。

30

40

【0208】

ZFN配列切断のためのプロトプラストゲノムDNAのPCRアッセイ

AHAS遺伝子座用に設計されたZFNの切断有効性および標的部位特異性の調査を可能とするために、1つ以上のZFN標的部位が捕捉される300 bp断片まで増幅するようにPCRプライマーを設計した。プライマーの1つは、捕捉されたZFN標的部位(複数可)の100 bpウィンドウ以内となるように設計された。この設計戦略により、Illuminaショートリード技術を使用して、トランスフェクトされたプロトプラストにおける標的ZFN部位の完全性を評価することができた。さらに、PCRプライマーは、Illumina配列リードが、それらが由来する小麦部分ゲノムに明白に帰属され得るように、AHAS遺伝子の3つの同祖コピーを増幅し、同祖体間を区別するヌクレオチド

50

配列変異を捕捉するように設計された。

【0209】

全部で4セットのPCRプライマーが、ZFN標的部位遺伝子座を増幅するように設計された(表4)。各プライマーセットは、Illuminaショートリード配列決定化学との適合性を提供するために、順方向および逆方向プライマーの5'末端にそれぞれIllumina SP1およびSP2配列を有するように合成された。合成されたプライマーはまた、最後から2番目の5'および3'ヌクレオチドにホスホロチオエート連結を含有した(表4においてアスタリスク(*)として示される)。5'ホスホロチオエート連結は、Illumina SP1およびSP2配列のエキソヌクレアーゼ分解に対する保護を提供し、一方3'ホスホロチオエート連結は、オン-オフPCRを使用した標的AHAS配列の増幅のためのPCR特異性を改善した(Yang et al., (2005))。全てのPCRプライマーは、18~27のヌクレオチド長であるように、また60~65℃、最適には63℃の融点を有するように設計された。

【0210】

表4において、AHAS遺伝子に特異的なヌクレオチドは、大文字の書体で示され、Illumina SP1およびSP2配列に対応するヌクレオチドは、小文字の書体で示されている。各プライマーセットは、PCR増幅産物のサンガーベースの配列決定により、3つの同祖AHAS遺伝子コピーの増幅に関して実験的に試験された。

【表 4】

【表 4】 AHAS ZFN切断有効性および標的部位特異性を評価するために使用されたプライマー配列

プライマー名	AHAS 領域	プライマー配列 (5' →3')	配列番号
AHAS-500ZFN. F3	S653 から 500bp 上流	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctTCCTCTAGGAT TCAAGACTTTTG*G	167
AHAS-500ZFN. R1	S653 から 500bp 上流	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTGGCCGCT TGTAAGTGTA*A	168
AHASs653ZFN. F1	S653 から上流 30bp 以内	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctGAGACCCAGG GCCATACTT*G	169
AHASs653ZFN. R3	S653 から上流 30bp 以内	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCAAGCAAAC AGAAAACGCATG*G	170
AHASs653ZFN. F5	S653N から下流 80bp 以内	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctATGGAGGGTGA TGGCAGGA*C	171
AHASs653ZFN. R1	S653N から下流 80bp 以内	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGACAGCAC ATCCCTACAAAAG*A	172
AHAS+400ZFN. F1	S653 から 400bp 下流	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctAACAGTGTGCT GGTTCCTTTCT*G	173
AHAS+400ZFN. R3	S653 から 400bp 下流	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctTYTYYCCTCC CAACTGTATTAG*A	174

アスタリスク (*) は、ホスホロチオエートを示すために使用されている。

【0211】

トランスフェクトされた小麦葉肉プロトプラストから抽出されたゲノムDNAからのZFN標的部位遺伝子座のPCR増幅を使用して、Illuminaベースの合成による配列決定 (sequencing-by-synthesis) 技術のための正しい形式で必要な遺伝子座特異的DNA分子を生成した。各PCRアッセイは、200ngの開始DNA (約12,500細胞相当のコムギ (*Triticum aestivum*) ゲノム) に作用するように最適化された。十分なコムギ (*Triticum aestivum*) ゲノムのコピーがZFN効率および標的部位特異性の信頼性のある評価のために分析されることを確実にするために、トランスフェクトされた試料当たり複数の反応を行った。トランスフェクトされた試料当たり、個々のプロトプラストから採取された200,000

10

20

30

40

50

0 コピーのコムギ (*Triticum aestivum*) ゲノムに相当する約 16 の PCR アッセイを行った。トランスフェクトされた試料それぞれに対して、単一の PCR マスターミックスを調製した。ZFN 標的部位の最適な PCR 増幅を確実にするために (すなわち、PCR 試薬が限定的となることを防ぐため、および PCR が指数関数的増幅段階に維持されることを確実に)、定量的 PCR 法を使用して最初のアッセイを行い、標的組織に対して行う最適サイクル数を決定した。最初の PCR は、MX3000P

THERMOCYCLER (商標) (Stratagene) 上で必要な陰性対照反応を用いて行った。定量的 PCR 機器から収集されたデータ出力から、蛍光の相対的増加をサイクル間からプロットし、過剰サイクルおよび一般的分子の偏った増幅を低減する試みにおいて、十分な増幅を提供しながら反応が試薬により制限されないようにするアッセイ当たりのサイクル数を決定した。未使用のマスターミックスは、定量的 PCR 分析が終了し、最適サイクル数が決定されるまで氷上に維持した。次いで、残りのマスターミックスを所望の数の反応管内 (ZFN アッセイ当たり約 16) に等分し、PCR 増幅を最適サイクル数だけ行った。増幅後、同じ ZFN 標的部位の試料と一緒にプールし、ZFN 当たり 200 μ l のプールされた生成物を、製造者の説明に従い QIAQUICK MINIELUTE PCR PURIFICATION KIT (商標) (Qiagen) を使用して精製した。

【0212】

Illumina ショートリード技術を使用して試料が配列決定されることを可能とするために、追加ラウンドの PCR を行って、Illumina P5 および P7 配列を増幅された DNA 断片上に導入し、配列リードをそれらが由来する試料に明白に帰属させるために使用され得る配列バーコードインデックスを導入した。これは、第 1 ラウンドの増幅において追加された SP1 および SP2 配列に部分的に相補的であるが、試料インデックスならびに P5 および P7 配列を含有するプライマーを使用して達成された。一般的断片を過剰増幅することなく追加の配列をテンプレートに追加するために必要な PCR サイクルの最適数は、上述のように、定量的 PCR サイクル分析により決定された。増幅後、形成された生成物を、1:1.7 の DNA 対ビーズ比を有する AMPURE MAGNETIC BEADS (登録商標) (Beckman-Coulter) を使用して精製した。製造者の説明に従い、PCR ベースライブラリ定量キット (KAPA) を使用して、精製された DNA 断片を Illumina ショートリード技術による配列決定のために滴定した。cBot クラスター生成キット (Illumina) を使用して、試料を配列決定のために調製し、製造者の説明に従い、ILLUMINA GAII_x (商標) または HISEQ2000 (商標) 機器 (Illumina) 上で配列決定して、100 bp の対末端配列リードを生成した。

【0213】

標的 ZFN 部位における NHEJ を検出するためのデータ分析

トランスフェクトされた葉肉プロトプラストのために調製された試料ライブラリのための Illumina ショートリード配列データの生成後、バイオインフォマティクス分析を行って、標的 ZFN 部位における欠失したヌクレオチドを同定した。そのような欠失は、非相同末端結合 (NHEJ) DNA 修復から得られる植物体内 ZFN 活性の指標であることが知られている。

【0214】

NHEJ 欠失を有する配列リードを同定するために、HISEQ2000 (商標) 機器 (Illumina) 上で生成された配列データの処理のための製造者により提供されているスクリプトを使用して、まずショート配列リードを、それらが由来するプロトプラスト試料に演算により帰属させた。試料帰属は、前述のように、ライブラリ調製の間に導入されたバーコードインデックス配列に基づいた。ライブラリを調製するために使用された 6 bp バーコードインデックスは、少なくとも 2 ステップの配列差により互いから区別されたため、正しい試料帰属が確保された。

【0215】

試料帰属後、全ての配列にわたり品質フィルタが通された。品質フィルタは、特別に開発されたPERLスクリプトに実装された。配列リードは、4つ以上の不明瞭な塩基が存在する場合、またはメジアンPhredスコアが20未満である場合、または20未満のPhredスコアを有する3つ以上の連続塩基が存在する場合、または配列リードが40ヌクレオチド超より短い場合除外した。

【0216】

次に、品質調整された配列を、それらが由来するコムギ部分ゲノムに帰属させた。これは、第2の特別に開発されたPERLスクリプトを使用して達成され、部分ゲノム帰属は、上述のようにAHAS遺伝子の3つの同祖コピーを増幅するために使用されたPCRプライマーにより捕捉されたヌクレオチド配列改変体のハプロタイプから決定された。

10

【0217】

最後に、第3の特別に開発されたPERLスクリプト、およびMicrosoft Excel 2010 (Microsoft Corporation)での手作業のデータ操作を使用して、各試料に対して部分ゲノム帰属配列リード内のZFN切断部位でのNHEJ欠失の頻度を決定した。これは、各試料中の各部分ゲノム上での特有のNHEJ欠失の頻度を数えることにより達成された。

【0218】

試験したZFNの切断効率および特異性を評価するために、2つの手法が使用された。切断効率は、ZFN標的部位にNHEJ欠失を含有する部分ゲノム帰属配列の割合として(100万リードあたりの部で)表現された。観察された切断効率によるZFNの等級序列を使用して、部分ゲノム特異的な様式でAHAS遺伝子の4つの標的領域のそれぞれに対して最良の切断活性を有するZFNを同定した。

20

【0219】

試験したZFNは全て、植物体内ZFN活性に対して推定されるものと一致するNHEJ欠失サイズ分布を示した。切断特異性は、3つの部分ゲノムにわたり観察された切断効率の比として表現された。データ分析における生物学的反復実験試料の含有は、試験したZFNの切断活性および特異性の等級序列に実質的に影響しなかった。

【0220】

これらの結果から、3つの小麦部分ゲノムのそれぞれにおける有意なそのゲノムDNA切断活性の特性を考慮して、プラスミドpDAB109350上にコードされたZFN(すなわち、ZFN29732および29730)ならびにpDAB109360上にコードされたZFN(すなわち、ZFN30012および30018)を、後の実験における植物体内標的化に選択した。

30

【0221】

トランジェントアッセイを使用したZFN媒介AHAS遺伝子編集のためのドナー設計の評価

小麦における内因性AHAS遺伝子座でのZFN媒介ゲノム編集を調査するために、一連の実験を行って、非相同末端結合(NHEJ)指向性DNA修復の効率に対するドナーデザインの効果を評価した。これらの実験は、小麦における内因性AHAS遺伝子座においてイミダゾリノンクラス除草剤(Liet al., (2008) Molecular Breeding 22:217-225)に対する耐性を付与する前述のS653N変異のZFN媒介付加、または代替として、標的化ZFN切断により内因性AHAS遺伝子において形成された2本鎖DNA切断における、EcoRI制限エンドヌクレアーゼ配列部位のZFN媒介導入の効率を監視するために、トランジェントアッセイを使用した。

40

【0222】

NHEJ指向性DNA修復のドナー設計

2種類のドナーDNA設計を、NHEJ指向性DNA修復に使用した。

【0223】

第1の種類のドナー設計は、小麦における内因性AHAS遺伝子との相同性を共有しな

50

い41bpの配列を含む直鎖の2本鎖DNA分子であった。2つのドナーDNA分子は、それぞれAHAS遺伝子の3つの同祖コピーを標的化するように設計された。両方のドナーDNA分子が、ZFN媒介NHEJ指向性DNA修復を促進するための連結オーバーハングを提供するために、突出した5'および3'末端を有していた。2つのドナーDNA分子は、それらの突出3'末端における配列が異なっていた。第1のドナーDNA分子、pDAS000152（配列番号：175および配列番号：176）は、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）による内因性AHAS遺伝子の切断によって生成されるものと適合する連結オーバーハングを提供するように、またNHEJ指向性DNA修復を介した2本鎖DNA切断の部位での内因性AHAS遺伝子内への41bpドナー分子の挿入をもたらしように設計された。第2のドナーDNA分子pDAS000149（配列番号：177および配列番号：178）は、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）ならびにZFN30012および30018（プラスミドpDAB109360上にコードされている）による内因性AHAS遺伝子の二重切断によって生成されるものと適合する連結オーバーハングを提供するように、またNHEJ指向性DNA修復を介したZFNにより形成された2つの2本鎖DNA切断間に含有される内因性AHAS配列の41bpドナー分子との置き換えをもたらしように設計された。

10

【0224】

第2の種類のドナーは、小麦における内因性AHAS遺伝子との相同性を共有せず、内因性AHAS遺伝子において2本鎖DNA切断を形成するために使用されたZFN（複数可）により認識された配列によりいずれかの側に隣接した41bpの配列を含有するプラスミドDNAベクターであった。このドナー設計により、内因性AHAS遺伝子内の標的部位を切断するために使用された同じZFN（複数可）による、プラスミドDNA分子からの固有の41bp配列の植物体内放出、およびNHEJ指向性DNA修復を介した内因性AHAS遺伝子内への放出された41bp配列のオーバーハング連結に好適な突出末端の同時生成が可能であった。2つのプラスミドドナーDNA分子は、それぞれAHAS遺伝子の3つの同祖コピーを標的化するように設計された。第1のプラスミドドナー分子、pDAS000153（配列番号：179および配列番号：180）（図13）は、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）による内因性AHAS遺伝子の切断によって生成されるものと適合する、放出された41bpDNA断片上の連結オーバーハングを提供するように設計された。第2のプラスミドドナー分子、pDAS000150（配列番号：181および配列番号：182）（図14）は、一方の端部でZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）により生成されるものと適合し、他端部でZFN30012および30018（プラスミドpDAB109360上にコードされている）により生成されるものと適合する、放出された41bpDNA断片上の連結オーバーハングを提供するように設計された。この設計により、ZFN29732および29730ならびにZFN30012および30018により形成された2つの2本鎖DNA切断の間に含有された内因性AHAS配列の、41bpドナー分子との置き換えが可能であった。

20

30

【0225】

NHEJ指向性DNA修復のためのドナーDNAの合成

当業者により一般的に知られている標準的クローニング方法を使用して、プラスミドベクターを構築した。コムギ（*Triticum aestivum*）への送達の前に、各ドナー構築物のためのプラスミドDNAを、供給業者の説明に従い、PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM（登録商標）（Promega Corporation、Madison、WI）またはPLASMID MAXI KIT（登録商標）（Qiagen、Valencia、CA）を使用して、大腸菌の培養物から調製した。

40

【0226】

標準的なホスホラミダイト化学を使用して、2本鎖DNAドナー分子（Integra

50

ted DNA Technologies、Coralville、IA)を合成的に合成した。各ドナー分子に対して、植物体内エンドヌクレアーゼ分解に対する保護を提供するためにそれぞれ5'末端に2つのホスホロチオエート連結を有する1対の相補的1本鎖DNAオリゴマーを合成した。1本鎖DNAオリゴマーを、高速液体クロマトグラフィーにより精製して、全長分子を濃縮し、 Na^+ 交換を使用した合成ステップからの化学的キャリーオーバーから精製した。当業者に一般的に知られている標準的方法を使用して、等モル量の2つの相補的1本鎖DNAオリゴマーをアニールすることにより、2本鎖ドナー分子を形成した。コムギ(*Triticum aestivum*)への送達の前に、2本鎖DNA分子を滅菌水中で必要な濃度まで希釈した。

【0227】

10

体細胞胚発生カルスに由来する小麦プロトプラストの単離

ドナー小麦系統品種Bobwhite MPB26RHからの体細胞胚発生カルス (SEC) に由来するプロトプラストを、ポリエチレングリコール (PEG) 媒介DNA送達を使用したトランスフェクションのために以下のように調製した。

【0228】

ドナー小麦系統の実生を、1秒当たり800mmol m^2 で提供される照明とともに18/16℃(昼/夜)および16/8時間(昼/夜)の光周期で維持された環境制御成長室内で成長させた。麦穂を開花から12~14日後に回収し、70%(v/v)エタノール中に1分間浸漬することにより表面殺菌した。穂を脱穀し、未熟種子を17%(v/v)漂白剤中で穏やかに振とうさせながら15分間殺菌した後、滅菌蒸留水で少なくとも3回濯いだ。解剖顕微鏡下で、胚を無菌状態で未熟種子から単離した。鋭いメスを使用して胚軸を除去し、廃棄した。TIMENTIN(商標)を含まない2~4培地を含有する9cm PETRI(商標)皿内に、切断されていない胚盤を上方に向けて胚盤を入れた。全部で25の胚盤をそれぞれの9cm PETRI(商標)皿に播種した。24℃で3週間暗所でインキュベートすることにより、体細胞胚発生カルス (SEC) 形成を開始した。3週間後、非胚発生カルスからSECを分離し、TIMENTIN(商標)を含まない新鮮な2~4培地上に置き、24℃でさらに3週間暗所でインキュベートした。SECの二次培養を全部で3回繰り返してから、プロトプラスト調製に使用した。

20

【0229】

カルスの脱水を防止するために約10mLの小麦カルス消化ミックス(2.5%w/vセルラーゼRS、0.2%w/vペクトリアーゼY23、0.1%w/v DRISELASE(登録商標)、14mM CaCl_2 、0.8mM MgSO_4 、0.7mM KH_2PO_4 、0.6Mマンニトール、pH5.8)を含有する10cm PETRI(商標)皿内で、鋭いメスの刃を使用して約1グラムのSECを1~2mmの切片に切断した。PETRI(商標)皿に、新鮮なカルスの重量グラム当たり10mLの体積まで追加のカルス消化ミックスを添加し、真空(20" Hg)圧力に30分間曝露した。PETRI(商標)皿をPARAFILM(登録商標)で封止し、30~40rpmでの穏やかな回転振とうで、28℃で4~5時間インキュベートした。

30

【0230】

消化懸濁液を100ミクロンメッシュを通して50mL採取管内に通過させることにより、カルスから放出されたSECプロトプラストを単離した。プロトプラストの収量を最大化するために、消化されたカルス材を3回洗浄した。各洗浄は、10mLのSEC洗浄緩衝液(0.6Mマンニトール、0.44%w/v MS、pH5.8)をPETRI(商標)皿に加え、1分間穏やかに旋回し、続いてSEC洗浄緩衝液を100ミクロンの篩を通して同じ50mLの採取管内に通過させることにより行った。次に、濾過されたプロトプラスト懸濁液を、70ミクロンの篩に、続いて40ミクロンの篩に通過させた。次に、濾過されたプロトプラスト懸濁液の6mLのアリコート、蓋付きの12mLの丸底遠心管に移し、12℃で10分間、70gで遠心分離した。遠心分離後、上澄みを除去し、約0.5mLの上澄みを後に残し、プロトプラストペレットをそれぞれ7mLの22%スクロース溶液中に再懸濁させた。2つの溶液が混合しないことを確実にしながら、スクロ

40

50

ース／プロトプラスト混合物を2 mLのSEC洗浄緩衝液で慎重に覆った。上述のように遠心分離によりプロトプラストを再び遠心分離した。SEC洗浄緩衝液とスクロース溶液との間に観察されるプロトプラストのバンドを、ピペットを使用して回収し、清浄な12 mL丸底管内に入れた。7 mLのSEC洗浄緩衝液をプロトプラストに添加し、上述のように管を遠心分離した。上澄みを除去し、SECプロトプラストを単一の管に合わせ、最終体積1～2 mLのSEC洗浄緩衝液に再懸濁させた。SECプロトプラストの収量は、Neubauer血球計を使用して推定した。Evans Blue染色を使用して、回収された生細胞の割合を決定した。

【0231】

SECプロトプラストのPEG媒介トランスフェクション

10

約200万のSECプロトプラストを、12 mLの丸底管に加え、70 gでの遠心分離によりペレット化してから上澄みを除去した。70 gのDNAを含有する480 μ l SEC洗浄緩衝液中に、プロトプラストを穏やかに再懸濁させた。DNAは、上述のジンクフィンガーヌクレアーゼおよびドナーDNA構築物からなり、各構築物は、行われている実験に必要なモル比で存在した。次に、720 μ lの50%PEG溶液(50%w/v PEG4000、0.8 Mマンニトール、1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、pH 5.6)を、管の穏やかな回転による混合と同時にプロトプラスト懸濁液にゆっくりと添加した。プロトプラスト懸濁液を、一切攪拌せずに室温で15分間インキュベートした。

【0232】

追加の7 mL体積のSEC洗浄緩衝液を、1 mL、2 mLおよび3 mLの逐次的アリコートでプロトプラスト懸濁液にゆっくりと添加した。同時の穏やかな混合を使用して、各逐次的アリコートに対して均質な懸濁を維持した。プロトプラスト懸濁液の半分を第2の12 mL丸底管に移し、さらなる3 mL体積のSEC洗浄緩衝液を、穏やかな混合と同時に各管にゆっくりと添加した。プロトプラストを、70 gで10分間の遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。プロトプラストペレットを、それぞれ1 mL SEC洗浄緩衝液中に再懸濁させてから、対となった丸底管からのプロトプラストを、単一の12 mL管にプールした。追加の7 mL SEC洗浄緩衝液を、プールしたプロトプラストに添加してから、上述のように遠心分離した。上澄みを完全に除去し、プロトプラストペレットを2 mLのQiaの培地中に再懸濁させた。プロトプラスト懸濁液を滅菌3 cm PETRI (商標) 皿に移し、24 $^{\circ}\text{C}$ で72時間、暗所でインキュベートした。

20

30

【0233】

未熟接合小麦胚からの胚盤の単離

ドナー小麦系統品種Bobwhite MPB26RHからの未熟接合小麦胚の胚盤を、バイオリスティック媒介DNA送達を使用したトランスフェクションのために以下のように調製した。

【0234】

ドナー小麦系統の実生を、1秒当たり800 mmol m^2 で提供される照明とともに18/16 $^{\circ}\text{C}$ (昼/夜) および16/8時間 (昼/夜) の光周期で維持された環境制御成長室内で成長させた。麦穂を開花から12～14日後に回収し、70% (v/v) エタノール中に1分間浸漬することにより表面殺菌した。穂を脱穀し、未熟種子を17% (v/v) 漂白剤中で穏やかに振とうさせながら15分間殺菌した後、滅菌蒸留水で少なくとも3回濯いだ。解剖顕微鏡下で、胚を無菌状態で未熟種子から単離した。鋭いメスを使用して胚軸を除去し、廃棄した。浸透MS (E3 マルトース) 培地を含有する9 cm PETRI (商標) 皿内に、切断されていない胚盤を上方に向けて胚盤を入れた。全部で20の胚盤をそれぞれ9 cm PETRI (商標) 皿に播種した。調製された胚を、26 $^{\circ}\text{C}$ で最低4時間暗所で前培養してから、バイオリスティック媒介DNA送達を使用したトランスフェクションを行った。

40

【0235】

バイオリスティック媒介DNA送達による未熟接合小麦胚の胚盤のトランスフェクション

50

40 mgの0.6ミクロンコロイド金粒子(BioRad)を1.5 mL微細管内の1 mLの滅菌水に添加することにより、バイオリスティック媒介DNA送達のための金粒子を調製した。5分間ボルテックスすることにより、金粒子を再懸濁させた。10回の照射に十分な材料を調製するために、金粒子懸濁液の50 µLのアリコート、5 µLの滅菌水中に再懸濁された5 µgのDNAを含有する1.5 mL微細管に移した。ボルテックスによる完全な混合の後、50 µLの2.5 M CaCl₂および20 µLの0.1 M スペルミジンを微細管に添加し、各試薬の添加後に完全に混合した。DNA被覆金微粒子を、卓上型微量遠心分離機内で、最大速度で1分間の遠心分離によりペレット化した。上澄みを除去し、1 mLの100%エタノールを添加して、金粒子を洗浄および再懸濁させた。金粒子を上述のように遠心分離によりペレット化し、上澄みを廃棄した。DNA被覆金粒

10

【0236】

PDS-1000/HE PARTICLE GUN DELIVERY SYSTEM (商標)(BioRad)を使用して、バイオリスティック媒介DNA送達により未熟接合小麦胚の胚盤をトランスフェクトした。DNA被覆金粒子の送達は、以下の設定を使用して行った：ギャップ2.5 cm、停止板開口0.8 cm、標的距離6.0 cm、真空度91.4~94.8 kPa、真空流速5.0および通気流速4.5。未熟接合小麦胚の胚盤は、900 psiラプチャーディスクを使用して照射した。20の胚盤を含有する各PETRI (商標)皿を1回照射した。照射された胚盤を26℃で16時間暗所でインキュベートしてから、カルス誘導のための培地上に移した。胚盤を、26℃で7日間、カルス誘導培地上で暗所で培養した。

20

【0237】

SECプロトプラストからのゲノムDNA単離

葉肉プロトプラストに関して前述した手順を使用して、ゲノムDNAをSECプロトプラストから抽出した。トランスフェクションに使用したドナーDNAの存在を低減するために、追加の精製ステップを行った。これは、トランスフェクションに使用したドナーDNAからのSECプロトプラストからゲノムDNAを分離するためのゲル電気泳動を使用して達成された。抽出されたDNAは、0.5X TBEを使用して、0.5%アガロース

30

【0238】

未熟接合胚の胚盤からのゲノムDNA単離

各バイオリスティック媒介DNA送達のためにトランスフェクトされた未熟接合小麦胚の20の胚盤を、15 mL管に移し、液体窒素中で急速凍結してから、LABCONCO FREEZONE 4.5 (登録商標)(Labconco、Kansas City、MO)内で、-40℃および133×10⁻³ mBarの圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥されたカルスを、製造者の説明に従いDNEASY (登録商標) PLANT DNA EXTRACTION MAXI (商標) キット (Qiagen) を使用してDNA抽出に供した。

40

【0239】

トランスフェクションに使用したドナーDNAの存在を低減するために、追加の精製ステップを行った。これは、トランスフェクションに使用したドナーDNAからのカルスからゲノムDNAを分離するためのゲル電気泳動を使用して達成された。抽出されたDN

50

Aは、0.5X TBEを使用して、0.5%アガロースゲル中で3時間電気泳動された。DNAは、SYBR（登録商標）SAFE染色により可視化し、カルスからのゲノムDNAに対応するバンドを離断した。製造者の説明に従い、QIAQUICK（商標）DNA PURIFICATIONキット（Qiagen）を使用してゲノムDNAをアガロースゲルから精製したが、但しQIAQUICK（商標）DNA精製カラムを、DNEASY（登録商標）PLANT DNA EXTRACTION MAXI（商標）キット（Qiagen）製のDNA結合カラムと置き換えた。

【0240】

ZFN媒介AHAS編集のためのゲノムDNAのPCRアッセイ

NHEJ指向性DNA修復を使用した小麦における内因性AHAS遺伝子におけるZFN媒介ゲノム編集を調査するために、および各DNA修復経路の有効性に対するドナーDNA設計の効果を評価するために、PCRアッセイを使用して、トランスフェクトされた小麦細胞のゲノムDNAからの標的AHAS領域を増幅した。前述のようにPCR分析を行って、Illuminaベースの合成による配列決定（sequencing-by-synthesis）技術のための正しい形式に必要な遺伝子座特異的DNA分子を生成した。各アッセイは、AHAS遺伝子の3つの同祖コピーのそれぞれに対し、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）ならびにZFN30012および30018（プラスミドpDAB109360上にコードされている）により標的化された領域を増幅するように設計された、前述のプライマー対（配列番号：160および配列番号：170）を使用して行った。コムギ（*Triticum aestivum*）ゲノムの十分なコピーがZFN媒介遺伝子編集の信頼性のある評価のために分析されることを確実にするために、トランスフェクトされた試料当たり複数の反応を行った。トランスフェクトされたSECプロトプラストに対して、トランスフェクトされた試料当たり、個々のプロトプラストから採取された200,000コピーのコムギ（*Triticum aestivum*）ゲノムに相当する16までのPCRアッセイを行った。未熟接合胚のトランスフェクトされた胚盤に対して、トランスフェクトされた試料当たり、個々のプロトプラストから採取された600,000コピーのコムギ（*Triticum aestivum*）ゲノムに相当する約48のPCRアッセイを行った。CBOT CLUSTER GENERATION KIT（商標）（Illumina）を使用して、それぞれのトランスフェクトされた試料を配列決定のために調製し、前述のように、ILLUMINA GAII_X（商標）またはHISEQ2000（商標）機器（Illumina）上で配列決定して、100bpの対末端配列リードを生成した。

【0241】

AHAS遺伝子におけるZFN媒介NHEJ指向性編集を検出するためのデータ分析

トランスフェクトされたSECプロトプラストおよび未熟接合小麦胚の胚盤のために調製された試料ライブラリのためのIlluminaショートリード配列データの生成後、標的ZFN部位におけるZFN媒介NHEJ指向性編集の分子的な証拠を特定するために分析を行った。

【0242】

NHEJ指向性遺伝子編集の分子的な証拠を有する配列リードを特定するために、前述のようにショート配列リードをまず演算処理して、各リードを試料およびそれらが由来する部分ゲノムに帰属させ、高品質の配列のみが後の分析に使用されることを確実にするために品質フィルタリングを行った。次に、特別に開発されたPERLスクリプト、およびMicrosoft Excel 2010（Microsoft Corporation）での手作業のデータ処理を使用して、トランスフェクションに使用したドナーDNA分子および内因性AHAS遺伝子座の両方に対する配列を含有するリードを特定した。編集頻度（100万リードあたりの部で表現される）は、ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集の証拠を示す部分ゲノム帰属配列リードの割合として計算された。

【0243】

各直鎖2本鎖DNAドナー設計に対して行われた3つの生物学的反復実験試料の結果から、配列リードの濃縮に対して分子レベルの証拠が得られ、小麦における内因性AHAS遺伝子の3つの同祖コピーにおけるZFN媒介NHEJ指向性編集が示された(表7および表8)。pDAB109350およびpDAS000152でトランスフェクトされた未熟接合胚のSECプロトプラストおよび胚盤の両方の試料での、ZFN29732および29730によるAHAS遺伝子の同祖コピーの切断によって形成された2本鎖DNA切断の位置における直鎖2本鎖41bpドナー分子の組み込みに関して、強固な分子レベルの証拠が得られた。これらの試料において、3つの小麦部分ゲノムにわたって同様の編集効率が観察された。対照的に、pDAB109350およびpDAS000153でトランスフェクトされた未熟接合胚のSECプロトプラストおよび胚盤の試料は、ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集の乏しい証拠を示し、これは、恐らくは、プラスミド骨格からの41bpドナー配列の植物体内放出のための前提必要条件に起因する。41bpドナー分子での内因性AHAS配列の置き換えの分子レベルの証拠は、pDAB109350、pDAB109360およびpDAS000149でトランスフェクトされた未熟接合胚のSECプロトプラストおよび胚盤の両方において観察された。しかしながら、編集の頻度は、pDAB109350およびpDAS000152を使用して行われたトランスフェクションにおいて観察されたものより大幅に低かったが、これは恐らくは内因性AHAS配列の二重ZFN切断の必要性に起因する。pDAB109350、pDAB109360およびpDAS000150でトランスフェクトされた未熟接合胚のSECプロトプラストおよび胚盤の試料におけるプラスミド骨格からの植物体内放出を必要とする41bpドナー分子での内因性AHAS配列の置き換えにおいては、得られる証拠が限られていた。

10

20

【表 7 - 1】

【表 7】 直鎖 2 本鎖ドナー DNA 設計でトランスフェクトされた胚盤 の 3 つの生物学的反復実験試料にわたる、パーツパーミリオン (ppm) での平均 NHE J 編集頻度。「n a」は、「該当なし」を示す。

ドナー	ZFN	ドナー 対 ZFN モル比	小麦部分ゲノム における編集頻度	編集頻度 (ppm)
pDAS000152	n/a	n/a	A	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	A	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	A	131
pDAS000152	n/a	n/a	B	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	B	47
pDAS000152	n/a	n/a	D	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	D	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	D	75
pDAS000153	n/a	n/a	A	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	A	4
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	A	0
pDAS000153	n/a	n/a	B	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	B	0

10

20

30

【表 7 - 2】

	29730			
pDAS000153	n/a	n/a	D	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	D	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	D	0
pDAS000149	n/a	n/a	A	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	A	23
pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	A	9
pDAS000149	n/a	n/a	B	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	B	7
pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	B	3
pDAS000149	n/a	n/a	D	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	D	7
pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	D	0
pDAS000150	n/a	n/a	A	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	A	1
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	A	0
pDAS000150	n/a	n/a	B	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	B	0
pDAS000150	n/a	n/a	D	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	D	4
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	D	0

10

20

30

40

【表 8 - 1】

【表 8】 直鎖 2 本鎖ドナー DNA 設計でトランスフェクトされた SEC プロトプラストの 3 つの生物学的反復実験試料にわたる、パーツパーミリオン (ppm) での平均 NHE J 編集頻度。「n/a」は、「該当なし」を示す。

ドナー	ZFN	ドナー 対 ZFN モル比	小麦部分ゲノム における編 集頻度	編集頻度 (ppm)
pDAS000152	n/a	n/a	A	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	A	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	A	6717
pDAS000152	29732-2A- 29730	20:1	A	5404
pDAS000152	n/a	n/a	B	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	B	6306
pDAS000152	29732-2A- 29730	20:1	B	4106
pDAS000152	n/a	n/a	D	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	5:1	D	0
pDAS000152	29732-2A- 29730	10:1	D	7911
pDAS000152	29732-2A- 29730	20:1	D	4059
pDAS000153	n/a	n/a	A	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	A	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	A	0

10

20

30

【表 8 - 2】

	29730			
pDAS000153	29732-2A- 29730	20:1	A	0
pDAS000153	n/a	n/a	B	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	B	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	20:1	B	0
pDAS000153	n/a	n/a	D	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	5:1	D	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	10:1	D	0
pDAS000153	29732-2A- 29730	20:1	D	0
pDAS000149	n/a	n/a	A	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	A	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	A	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	20:1	A	344
pDAS000149	n/a	n/a	B	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	B	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	20:1	B	210
pDAS000149	n/a	n/a	D	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	5:1	D	4

10

20

30

40

【表 8 - 3】

pDAS000149	29732-2A- 29730	10:1	D	0
pDAS000149	29732-2A- 29730	20:1	D	24
pDAS000150	n/a	n/a	A	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	A	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	A	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	20:1	A	0
pDAS000150	n/a	n/a	B	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	B	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	B	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	20:1	B	0
pDAS000150	n/a	n/a	D	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	5:1	D	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	10:1	D	0
pDAS000150	29732-2A- 29730	20:1	D	0

10

20

30

【0 2 4 4】

総合的に、結果は、小麦における内因性A H A S 遺伝子座での正確なZ F N媒介N H E J 指向性編集の強力な分子レベルの証拠を示している。これらの結果は、3つ全ての部分ゲノムが単一のZ F Nおよびドナーにより標的化され得ることを示している。結果は、プラスミドドナーDNA設計と比較してより高い頻度の、直鎖ドナーDNA設計の編集を明確に実証している。恐らくは、これらの結果は、N H E J 指向性DNA修復に関与することができる前の、プラスミドドナー分子の植物体内直鎖化の前提必要条件に起因する。結果はまた、部分ゲノム特異的媒介N H E J 指向性遺伝子編集が、2本鎖切断により促進されることを示している。2本鎖DNA切断を誘発するように設計されたZ F Nは、ドナーDNAと共にコムギ (*T r i t i c u m a e s t i v u m*) 植物細胞に送達されると、部分ゲノム特異的媒介N H E J 指向性遺伝子編集をもたらした。

40

【0 2 4 5】

A H A S 編集植物を生成するための形質転換系の開発

小麦における内因性A H A S 遺伝子座は、Z F N媒介遺伝子編集により誘導される正確なゲノム修飾を有する植物を生成するための形質転換系を開発するためのモデル遺伝子座として選択された。内因性A H A S 遺伝子は、選択可能な表現型（すなわち、グループB除草剤-A L S 阻害剤への耐性）を生成するその能力、部分ゲノム特異的遺伝子コード化

50

配列の前提条件情報の知識、および、A H A S 遺伝子における化学的に誘導された変異を有する小麦の特性決定からのグループB除草剤に耐性を付与する特定の変異の知識により、モデル遺伝子座として選択された。イミダゾリノンクラスの除草剤に対する耐性を付与するS 6 5 3 N変異は、正確に編集されたイベントを強化する化学的選択系を開発するための陽性対照として使用され得るS 6 5 3 N変異を有する、市販の小麦種の利用可能性に起因して、Z F N媒介遺伝子編集の標的として選択された。

【0246】

コムギ (T r i t i c u m a e s t i v u m) 品種C l e a r f i e l d J a n z の分子特性決定

D-ゲノムにS 6 5 3 N変異を有する市販のパン用小麦種であるコムギ (T r i t i c u m a e s t i v u m) 品種 C l e a r f i e l d J a n z は、Z F N媒介遺伝子編集により生成されるA H A S編集小麦植物を強化する化学的選択戦略を開発するための陽性対照としての使用に選択された。純粋な遺伝子種ストックを生成するために、M u l t i p l e x - R e a d y P C R技術 (H a y d e n e t a l . , (2008)

B M C G e n o m i c s 9 ; 8 0) を使用して、48の実生を96マイクロサテライト (S S R) マーカーでスクリーニングした。同一のS S Rハプロタイプを有する実生を使用して、後の実験において使用される種を生成した。

【0247】

種を生成するために使用された小麦植物がS 6 5 3 N変異を有することを確実にするために、小麦のD-ゲノムからの変異を有するA H A S遺伝子の領域を増幅するためのP C Rアッセイを開発した。部分ゲノム特異的増幅は、最後から2番目の塩基 (ホスホロチオエート連結を有する) を、A H A S遺伝子の同祖コピー間を区別するヌクレオチド配列変異上に位置付けるように設計されたプライマーA H A S - P S - 6 D F 2およびA H A S - P S - 6 D R 2 (配列番号: 183および配列番号: 184) を用い、オン-オフP C Rを使用して達成された (Y a n g e t a l . , (2005) B i o c h e m i c a l a n d B i o p h y s i c a l R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n s 328: 265-72)。P C Rプライマーは、18~27のヌクレオチド長であるように、また60~65℃、最適には63℃の融点を有するように設計された。増幅されたP C R産物は、Q I A Q U I C K M I N I E L U T E P C R P U R I F I C A T I O N K I T (商標) (Q i a g e n) を使用して精製され、直接的サンガー配列決定法を使用して配列決定された。配列決定する産物は、B I G D Y E (登録商標) v 3 . 1プロトコル (A p p l i e d B i o s y s t e m s) に従ってエタノール、酢酸ナトリウムおよびE D T Aで精製され、A B I 3 7 3 0 X L (登録商標) 自動化キャピラリー電気泳動プラットフォーム上で電気泳動が行われた。

【0248】

S E Q U E N C H E R v 3 . 7 (商標) (G e n e C o d e s , A n n A r b o r , M I) を使用した増幅されたA H A S遺伝子配列の分析では、S 6 5 3 N変異の分離が明らかとなり、また、S 6 5 3 N変異に対しホモ接合性 (N 6 5 3 / N 6 5 3) およびヘテロ接合性 (N 6 5 3 / S 6 5 3) である、または除草剤感受性対立遺伝子に対しホモ接合性 (S 6 5 3 / S 6 5 3) である植物の同定が可能となった。個々の植物からの種の収集は、品種C l e a r f i e l d J a n z 遺伝的背景において、S 6 5 3 N変異に対する異なるレベルの接合性を有する種子源を提供した。

【0249】

I M A Z A M O X (商標) に基づく化学的選択条件の最適化

A H A S編集小麦植物を再生するための最適選択条件を決定するために、一連の実験を行った。これらの実験は、確立された小麦形質転換系のカルス誘導、植物再生および発根段階における、ドナー小麦系統品種B o b w h i t e M P B 2 6 R H (S 6 5 3 / S 6 5 3 遺伝子型) のI M A Z A M O X (商標) に対する基本的耐性の試験に基づいた。異なる量のS 6 5 3 N変異を有する品種C l e a r f i e l d J a n z 遺伝子型、すなわちN 6 5 3 / N 6 5 3 およびS 6 5 3 / S 6 5 3 遺伝子型を有する植物の基本的耐性および

抵抗性を決定するために、同様の実験を行った。

【0250】

カルス誘導段階における、IMAZAMOX（登録商標）に対するドナー小麦系統品種 Bobwhite MPB26RH の基本的耐性および品種 Clearfield Janz（N653/N653）遺伝子型の基本的抵抗性は、以下のように決定された：各小麦系統からの未熟接合胚の胚盤を前述のように単離し、それぞれ0、50、100、200、300、400および500nMのIMAZAMOX（登録商標）を添加したCIM培地を含有する10cm PETRI（商標）皿内に入れた。各PETRI（商標）皿内に20の胚盤を入れた。ドナー小麦系統品種 Bobwhite MPB26RH および品種 Clearfield Janz 遺伝子型のそれぞれから全部で60の胚盤を、各IMAZAMOX（登録商標）濃度で、基本的耐性および基本的抵抗性反応について試験した。24℃で4週間の暗所でのインキュベーション後、各IMAZAMOX（登録商標）濃度での体細胞胚発生カルス形成（SEC）の量を記録した。結果は、品種 Bobwhite MPB26RH のSEC形成が、100nMのIMAZAMOX（登録商標）において、未処理試料と比較して約70%低減されたことを示した。品種 Clearfield Janz 遺伝子型のカルス形成は、試験された任意のIMAZAMOX（登録商標）濃度において、未処理対照と比較して影響されなかった。

10

【0251】

植物再生段階におけるドナー小麦系統品種 Bobwhite MPB26RH のIMAZAMOX（登録商標）に対する基本的耐性は、以下のように決定された：ドナー小麦系統からの未熟接合胚の胚盤を前述のように単離し、CIM培地を含有する10cm PETRI（商標）皿内に入れた。24℃で4週間暗所でインキュベートすることにより、体細胞胚発生カルスを形成させた。それぞれ0、100、200、300、400、500および1000nMのIMAZAMOX（登録商標）を添加したDRM培地を含有する10cm PETRI（商標）皿にSECを移した。各PETRI（商標）皿内に20のCIMを入れた。全部で60のCIMを、各IMAZAMOX（登録商標）濃度で、基本的耐性反応について試験した。成長室内で16/8（明/暗）時間の光周期での24℃で2週間のインキュベーション後、再生反応を記録した。結果は、植物再生が、200nMのIMAZAMOX（登録商標）において、未処理試料と比較して約80%低減されたことを示した。

20

30

【0252】

植物再生段階における、IMAZAMOX（登録商標）に対する品種 Clearfield Janz（S653/S653）遺伝子型の基本的耐性および品種 Clearfield Janz（N653/N653）遺伝子型の基本的抵抗性は、品種 Clearfield Janz が組織培養物内で低い植物再生反応（すなわち、低い胚形成）を有することが観察されたため、修正された手法を使用して決定された。各品種 Clearfield Janz 遺伝子型の種は、小麦葉肉プロトプラストの生成に関して上述した無菌手法を使用して発芽させた。発芽した実生を、増殖培地上での二次培養によりインビトロで増殖させた。増殖後、それぞれ0、100、300、600、900、1200、1500および3000nMのIMAZAMOX（登録商標）を添加した植物成長培地（MS+10μM BA+0.8%寒天）を含有する10cm PETRI（商標）皿に、各遺伝子型の植物を移した。10の植物を、各PETRI（商標）皿内に入れた。遺伝子型当たり全部で30の植物を、各IMAZAMOX（登録商標）濃度における基本的反応について試験した。成長室内で16/8（明/暗）時間の光周期での24℃で3週間のインキュベーション後、成長反応を記録した。結果は、品種 Clearfield Janz（S653/S653）遺伝子型の植物成長が、少なくとも200nMのIMAZAMOX（登録商標）を含有する培地中で、未処理試料と比較して大幅に低減されたことを示した。この反応は、品種 Bobwhite MPB26RH（S653/S653）遺伝子型に対して観察された反応と同様であった。対照的に、品種 Clearfield Janz（N653/N653）遺伝子型の植物成長は、IMAZAMOX（登録商

40

50

標)濃度が2,000 nMを超えるまでは、未処理試料に比べて大きくは抑制されなかった。

【0253】

植物発根段階におけるドナー小麦系統品種Bobwhite MPB26RHのIMAZAMOX(登録商標)に対する基本的耐性は、以下のように決定された:ドナー小麦系統からの未熟接合胚の胚盤を前述のように単離し、CIM培地を含有する10cm PETRI(商標)皿内に入れた。24℃で4週間暗所でインキュベートすることにより、体細胞胚発生カルスを形成させた。DRM培地を含有する10cm PETRI(商標)皿にSECを移し、16/8(明/暗)時間の光周期で24℃で2週間インキュベートし、植物再生を生じさせた。それぞれ0、100、200、300、400、500 nMのIMAZAMOX(登録商標)を添加したRM培地を含有する10cm PETRI(商標)皿に、再生された植物を移した。20の再生された植物を、各PETRI(商標)皿内に入れた。全部で60の再生された植物を、各IMAZAMOX(登録商標)濃度で、基本的耐性反応について試験した。成長室内で16/8(明/暗)時間の光周期での24℃で3週間のインキュベーション後、根形成反応を記録した。結果は、根形成が、試験された全てのIMAZAMOX(登録商標)の濃度において、未処理試料と比較して大幅に制限されたことを示した。

10

【0254】

植物発根段階における、IMAZAMOX(登録商標)に対する品種Clearfield Janz(S653/S653)遺伝子型の基本的耐性および品種Clearfield Janz(N653/N653)の基本的抵抗性は、品種Clearfield Janzが組織培養物内で低い植物体再生反応(すなわち、低い胚形成)を有することが観察されたため、修正された手法を使用して決定された。各品種Clearfield Janz遺伝子型の種は、小麦葉肉プロトプラストの生成に関して上述した無菌手法を使用して発芽させた。発芽した実生を、増殖培地上での二次培養によりインビトロで増殖させた。増殖後、それぞれ0、50、100、200および250 nMのIMAZAMOX(登録商標)を添加した植物発根培地(1/2MS、0.5mg/L NAA、0.8%寒天)を含有する10cm PETRI(商標)皿に、各遺伝子型の植物を移した。3つの植物を、各PETRI(商標)皿内に入れた。遺伝子型当たり全部で6つの植物を、各IMAZAMOX(登録商標)濃度における基本的反応について試験した。成長室内で16/8(明/暗)時間の光周期での24℃で2週間のインキュベーション後、根形成反応を記録した。

20

30

【0255】

結果は、品種Clearfield Janz(N653/N653)遺伝子型の根形成が、250 nMのIMAZAMOX(登録商標)において、未処理試料と比較して制限されたことを示した。根形成は、品種Clearfield Janz(S653/S653)遺伝子型において、試験された全てのIMAZAMOX(登録商標)の濃度において、未処理試料と比較して大幅に制限された。

【0256】

ZFN媒介AHAS遺伝子編集のためのドナーDNAの設計および合成

40

ドナーDNA分子を、小麦における内因性AHAS遺伝子での正確なZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集を促進するように設計した。ドナー設計により、イミダゾリノンクラス除草剤(Liet al., (2008) Molecular Breeding 22:217-225)に対する耐性を付与することが知られているS653N変異の導入が可能となった。

【0257】

第1の設計は、ZFN29732および29730(プラスミドpDAB109350上にコードされている)による内因性AHAS遺伝子の同祖コピーの切断により形成された2本鎖DNA切断の位置における、95bpの2本鎖ドナー分子の組み込みに基づいた。ドナーDNA分子、pDAS000267(配列番号:423および配列番号:424

50

）は、組み込みドナーポリヌクレオチドの2つの部分を含んでいた。5'末端は、標的ZFN切断部位から開始してAHAS停止コドンで終了する、D-ゲノム内にコードされた内因性AHAS遺伝子とほぼ同一の配列を含有した。6つの意図的変異がこの配列に導入されたが、2つの変異はS653N変異（AGC→AAT）をコードし、4つの変異は同義的であった（サイレント変異がドナー配列内に組み込まれていた）。ドナー分子の3'末端は、ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集イベントを検出するための診断PCRに使用され得る固有配列を含有していた。ドナー分子は、ZFN媒介NHEJ指向性DNA修復を促進するための連結オーバーハングを提供するために、突出した5'および3'末端を有するように設計された。

【0258】

第2の設計は、ZFN標的部位の対の間に位置する内因性AHAS配列の、79bp 2本鎖ドナー分子との置き換えに基づいた。具体的には、ドナーは、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）ならびにZFN30012および30018（プラスミドpDAB109360上にコードされている）によるAHAS遺伝子の同祖コピーの二重切断後にクロマチンから放出された内因性AHAS配列を置き換えるように設計された。ドナー分子、pDAS000268（配列番号：425および配列番号：426）は、ZFN29732および29730の切断部位から開始してZFN30012および30018の切断部位で終了する、D-ゲノム内にコードされた内因性AHAS遺伝子とほぼ同一の配列を含んだ。この配列内に、10の意図的な変異を導入した。6つの変異は、ドナーの5'末端に位置したが、2つの変異はS653N変異（AGC→AAT）をコードし、4つの変異は同義的であった。4つの変異はドナーの3'末端に位置し、非コード化配列に位置した。ドナー分子は、ZFN媒介NHEJ指向性DNA修復を促進するための連結オーバーハングを提供するために、突出した5'および3'末端を有するように設計された。

【0259】

標準的なホスホラミダイト化学を使用して、2本鎖DNAドナー分子（Integrated DNA Technologies）を合成的に合成した。各ドナー分子に対して、植物体内エンドヌクレアーゼ分解に対する保護を提供するためにそれぞれ5'末端に2つのホスホロチオエート連結を有する1対の相補的1本鎖DNAオリゴマーを合成した。1本鎖DNAオリゴマーを、高速液体クロマトグラフィーにより精製して、全長分子を濃縮し、Na⁺交換を使用した合成ステップからの化学的キャリアオーバーから精製した。当業者に一般的に知られている標準的方法を使用して、等モル量の2つの相補的1本鎖DNAオリゴマーをアニールすることにより、2本鎖ドナー分子を形成した。コムギ（*Triticum aestivum*）への送達の前に、2本鎖DNA分子を滅菌水中で必要な濃度まで希釈した。

【0260】

AHAS（S653N）をコードするバイナリベクターの設計および生成

バイナリベクターpDAS000143（配列番号：185）（図15）の構築において、標準的クローニング方法を使用した。AHAS（S653N）遺伝子発現カセットは、トウモロコシ（*Zea mays*）由来ユビキチン（Ubi）遺伝子からのプロモーター、5'非翻訳領域およびイントロン（Tokiet al., (1992) Plant Physiology 100; 1503-07）に続く、アミノ酸残基653におけるセリン（S）からアスパラギン（N）へのアミノ酸変化を誘導するためにCGからATに変異した塩基対1880および1181を有するコムギ（*T. aestivum*）からのAHAS遺伝子のコード化配列（1935bp）からなる。AHAS発現カセットは、A. ツメファシエンズpT15955からのノパリンシンターゼ遺伝子（nos）の3'非翻訳領域（UTR）を含んでいた。（Fraleley et al., (1983) Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 80(15); 4803-4807）。選択カセットは、アジアイネ（*Oryza sativa*）由来アクチン1（Act1）遺

伝子からのプロモーター、5'非翻訳領域およびイントロン (McElroy et al., (1990) The Plant Cell 2 (2); 163-171) に続く、ホスフィノトリシン、グルホシネート、およびピアラホスを含むグルタミン合成酵素の阻害剤に対する抵抗性を付与するタンパク質をコードする、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネスから単離されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 遺伝子の合成植物最適化型を含んでいた (Wohlleben et al., (1988) Gene 70 (1); 25-37)。このカセットは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35S遺伝子からの3'UTRで終端された (Chenault et al., (1993) Plant Physiology 101 (4); 1395-1396)。

10

【0261】

選択カセットは、商業的な遺伝子合成業者により合成され (GeneArt、Life Technologies)、Gateway有効化バイナリベクターにクローニングされ、RfA Gatewayカセットは、トウモロコシ (Zea mays) 由来ユビキチン (Ubi) 遺伝子と、A. ツメファシエンズ pTi15955由来ノパリンシンターゼ遺伝子 (nos) の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む、3'非翻訳領域 (UTR) との間に位置した。AHAS (S653N) コード化配列は、隣接 attB 部位で増幅され、pDONR221にサブクローニングされた。得られたENTRYクローンを、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 発現カセットをコードする Gateway 有効化バイナリベクターとの LR CLONASE II (商標) (Invitrogen、Life Technologies) 反応において使用した。全ての連結反応で形質転換された大腸菌細胞のコロニーを、まずミニプレップ DNA の制限酵素消化によりスクリーニングした。制限エンドヌクレアーゼは、New England Biolabs および Promega から入手した。プラスミド調製は、製造者の説明に従い、QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (商標) または PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM (商標) (Promega Corporation、WI) を使用して行われた。選択されたクローンのプラスミド DNA を、ABI Sanger Sequencing および BIG DYE TERMINATOR v3.1 (商標) サイクル配列決定プロトコル (Applied Biosystems、Life Technologies) を使用して 30 配列決定した。配列データをアセンブルし、SEQUENCHER SOFTWARE (商標) (Gene Codes Corporation、Ann Arbor、MI) を使用して分析した。

20

30

【0262】

AHAS 編集小麦植物を生成するためのバイオリスティック媒介形質転換系

ドナー小麦系統品種 Bobwhite MPB26RH からの未熟接合胚の約 23,000 の胚盤を、前述のようにバイオリスティック媒介 DNA 送達のために調製した。DNA 被覆金粒子を、以下の製剤を使用して、上述のように調製した。pDAS000267 を使用して行われるトランスフェクションにおいては、ドナー DNA を pDAB109350 (ZFN29732 および 29730 をコードする) に対するプラスミド DNA と 5 : 1 モル比で混合した。pDAS000268 を使用して行われるトランスフェクションにおいては、ドナー DNA を DAB109350 (ZFN29732 および 29730 をコードする) ならびに pDAB109360 (ZFN30012 および 30018 をコードする) に対するプラスミド DNA と 10 : 1 : 1 モル比で混合した。pDAS000143 を使用して行われるトランスフェクションは、pDAS000143 に対するプラスミド DNA のみで被覆された金粒子を使用して行われた。

40

【0263】

バイオリスティック媒介トランスフェクションは、前述のように行われた。全部で 15,620 の胚盤に、pDAS000267 を含有する DNA で被覆された金粒子を照射し、全部で 7,310 の胚盤に、pDAS000268 を含有する DNA で被覆された金粒

50

子を照射し、全部で2, 120の胚盤に、pDAS000143で被覆された金粒子を照射した。照射後、トランスフェクトされた胚盤を26℃で16時間暗所でインキュベートしてから、カルス誘導のための培地上に移した。

【0264】

IMAZAMOX（登録商標）に基づく4つの異なる化学的選択戦略を使用して、ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集により内因性AHAS遺伝子の1つ以上の同祖コピーに正確に組み込まれたS653N変異を有する、再生された小麦植物を濃縮した。4つの化学的選択戦略を、表9に記載する。各戦略において、胚盤を、24℃で2週間、カルス誘導培地上で暗所で培養した。得られたカルスを、新鮮なカルス誘導培地上で1回二次培養し、さらに2週間、同じ条件に維持した。体細胞胚発生カルス（SEC）を植物再生培地上に移し、成長室内で、16/8（明/暗）時間の光周期で24℃で2週間培養した。再生された小植物を、発根培地上に写し、同じ条件下で2～3週間培養した。S653N変異を有する再生された植物の選択のためのストリンジェンシーを増加させるために、再生された植物の根を除去し、植物を再び同じ条件下で発根培地上で二次培養した。再び発根する小植物を土壌に移し、温室封入条件下で成長させた。異系交配を防止するために個々の穂を袋に入れた後、個々の植物からT₁種を収集した。

【0265】

pDAS000143で被覆された金粒子を照射された胚盤外植片を使用して、AHAS S653N変異を有する小麦植物を再生するための4つの化学的選択戦略にわたる選択ストリンジェンシーを監視した。pDAS000143で形質転換された植物を、上述のプロセスを使用して再生した。

【表9】

【表9】 ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集により内因性AHAS遺伝子の1つ以上の同祖コピーに正確に組み込まれたS653N変異を有する小麦植物を再生するため

に使用された化学的選択戦略。（IMI = IMAZAMOX（商標））

植物再生段階	戦略1	戦略2	戦略3	戦略4
カルス誘導(CIM)	150 nM IMI	250 nM IMI	150 nM IMI	250 nM IMI
植物再生(DRM)	150 nM IMI	0 nM IMI	250 nM IMI	250 nM IMI
発根(RM)	200 nM IMI	200 nM IMI	200 nM IMI	200 nM IMI

【0266】

全体として、14の推定ZFN媒介NHEJ指向性AHAS編集小麦植物を、ドナー小麦系統品種Bobwhite MPB26RHからの未熟接合胚の22, 930の胚盤のトランスフェクションから回収した。推定編集植物を、pDAS000267を含有するDNAで被覆された金粒子を照射された胚盤の4つ全ての選択戦略から得た。2つの推定編集植物を、pDAS000268を含有するDNAで被覆された金粒子を照射された胚盤の第2の選択戦略から得た。AHAS（S653N）ドナーポリヌクレオチドの少なくとも1つの無作為に組み込まれたコピーを有する、全部で129の推定形質転換小麦植物が、4つの化学的選択戦略にわたって回収された。

【0267】

編集小麦植物の分子特性決定

S653N変異をコードするドナーポリヌクレオチドによる照射から得られた小麦植物を得、ゲノム2本鎖切断部位におけるドナー組み込みの結果生じたS653N変異の組み込みを含む小麦部分ゲノムを同定するために分子的に特性決定した。2つのシリーズの照射を完了した。第1のセットの実験は、pDAS000143を用いて完了し、第2のセットの実験は、pDAS000267およびpDAS000268を用いて完了した。両方のセットの実験から個々の小麦植物を得、S653N変異をコードするAHASドナーポリヌクレオチドの組み込まれたコピーを含有する植物を同定するための分子的方法により分析した。

【0268】

定量的PCR分析のための加水分解プローブアッセイ（TAQMAN（登録商標）ベースアッセイに類似）を使用して、pDAS000143を照射された回収された小麦植物が、S653N変異をコードするAHASドナーポリヌクレオチドの少なくとも1つの無作為に組み込まれたコピーを有することを確認した。サンガー配列分析による確認では、pDAS000267およびpDAS000268を用いて行われた照射から回収された小麦植物が、ZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集が期待される位置に、AHAS遺伝子の同祖コピーの少なくとも1つにおけるS653Nドナーポリヌクレオチドを含んでいることが示された。

【0269】

再生された小麦植物からのゲノムDNA単離

ゲノムDNAを、再生されたそれぞれの小麦植物から収集されたフリーズドライ葉組織から抽出した。新しく収集された葉組織を液体窒素中で急速凍結し、LABCONCO FREEZONE 4.5（登録商標）（Labconco、Kansas City、MO）内で-40℃および 133×10^{-3} mBarの圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥された材料を、製造者の説明に従いDNEASY（登録商標）PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT（商標）（Qiagen）を使用してDNA抽出に供した。

【0270】

S653N変異をコードするAHASドナーポリヌクレオチドの無作為な組み込みを確認するためのPCRアッセイ

pDAS000143を用いて行われた照射からの再生された小麦植物が、S653N変異をコードするAHASドナーポリヌクレオチドの少なくとも1つの無作為に組み込まれたコピーを有することを確認するために、二重加水分解プローブqPCRアッセイ（TAQMAN（登録商標）に類似）を使用して、内因性単一コピー遺伝子、6倍体小麦のDゲノムからのプロインドリン-b（Pinb）（Gautier et al., (2000) Plant Science 153, 81-91；順方向および逆方向プライマーならびにプローブ配列に対してそれぞれ配列番号：186、配列番号：187および配列番号：188）、およびpDAS000143上に存在するアクチン（Act1）プロモーターの領域（順方向および逆方向プライマーならびにプローブ配列に対してそれぞれ配列番号：189、配列番号：190および配列番号：191）を増幅した。加水分解プローブqPCRアッセイは、4つの化学的選択戦略のそれぞれから回収された24の無作為に選択された小麦植物に対して行った。pDAS00143の存在およびその推定コピー数の評価は、Livak and Schmittgen (2001) Methods 25(4): 402-8に記載の方法に従って行った。

【0271】

結果から、S653N変異をコードするAHASドナーポリヌクレオチドの少なくとも1つのコピーの、試験された小麦植物それぞれのゲノムへの組み込みの決定的な証拠が得られた。これらの結果は、4つの化学的選択戦略が、S653N変異を発現する植物の回収のためのストリンジェントな選択を提供したことを示している。

【0272】

ZFN媒介AHAS編集のためのゲノムDNAのPCRアッセイ

回収された小麦植物における部分ゲノム位置およびZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集の結果を特性決定するために、プライマーAHAS_3F1およびAHAS_3R1（配列番号：192および配列番号：193）を用いたPCRを使用して、AHAS遺伝子の同祖コピーからの標的領域を増幅した。得られたPCR産物は、プラスミドベクターにクローニングし、ABI3730XL（登録商標）自動化キャピラリー電気泳動プラットフォーム上で、BIGDYE（登録商標）v3.1化学（Applied Biosystems）を使用してサンガー配列決定を行った。内因性AHAS同祖体における各対立遺伝子が配列決定されることを確実にするために、120までの独立したプラスミドクロ

10

20

30

40

50

ーンのサンガー配列決定を行った。SEQUENCHER SOFTWARE（商標）を使用して行われる配列分析を使用して、回収された小麦植物のそれぞれにおけるAHAS遺伝子の3つの同祖コピーの各対立遺伝子のコンセンサス配列を生成し、それぞれの編集された対立遺伝子の部分ゲノムの起源および配列を決定した。

【0273】

結果から、内因性AHAS遺伝子座における正確なZFN媒介NHEJ指向性遺伝子編集の決定的な証拠が、pDAB109350およびpDAS000267を使用して形質転換された12の回収された小麦植物のうち11に対して（表10）、ならびにpDAB109350、pDAB109360およびpDAS000268を使用して形質転換された回収された小麦植物の両方（表11）に対して実証された。（1）完全な部分ゲノム特異的対立遺伝子編集を有する独立したイベント、（2）A-ゲノム、B-ゲノムおよびD-ゲノムにおける単一の完全な編集を有するイベント、（3）複数の部分ゲノムにおける同時編集を有するイベント、ならびに（4）半接合体およびホモ接合体部分ゲノム特異的対立遺伝子編集を示すイベントを含む、一連の編集結果を有する植物が観察された。小麦植物の3つ全てのゲノム内の遺伝子座を変異させるために使用され得る方法が、初めて開示される。S653N変異をコードする組み込まれたAHASドナーポリヌクレオチドを含む小麦植物が例示され、ポリヌクレオチド配列の組み込みは、イミダゾリノンクラス除草剤に対する耐性を提供する。小麦における内因性遺伝子座でのZFN媒介ゲノム編集の使用によって、3つ全ての部分ゲノムに形質を移入するために必要な時間の量を増加させ得る戻し交配および遺伝子移入ステップを必要とする、時間のかかる小麦育種技術なしで、（変異を介して）農業形質を導入することができる。編集小麦植物の各部分ゲノムに存在する対立遺伝子のコンセンサスサンガー配列は、表10および11において配列番号：194～277として記載される。

【表10-1】

【表10】 pDAB109350およびpDAS000267を使用して形質転換された小麦植物における、ZFN媒介NHEJ指向性AHAS編集の結果

		A-ゲノム		B-ゲノム		D-ゲノム		配列番号
		対立遺伝子1	対立遺伝子2	対立遺伝子1	対立遺伝子2	対立遺伝子1	対立遺伝子2	
植物番号1	状態	PE	NHEJ	IE	UE	IE	UE	194-199
	クローン数 ¹	13	20	12	19	14	22	
植物番号2	状態	NHEJ	UE	UE	nd	IE	UE	200-205
	クローン数 ¹	9	3	16	0	75	17	
植物番号3	状態	PE	UE	UE	nd	UE	nd	206-211
	クローン数 ¹	7	11	29	0	35	0	
植物番号4	状態	PE	UE	IE	UE	PE	IE	212-217
	クローン	6	11	44	30	6	11	

【表 10-2】

	数 ¹							
植物 番号 5	状態	PE	UE	NHEJ	UE	UE	nd	218-223
	クローン 数 ¹	10	9	15	26	21	0	
植物 番号 6	状態	UE	nd	PE	UE	UE	nd	224-229
	クローン 数 ¹	22	0	11	18	43	0	
植物 番号 7	状態	PE	UE	UE	nd	UE	nd	230-235
	クローン 数 ¹	5	12	26	0	22	0	
植物 番号 8	状態	UE	nd	UE	nd	UE	nd	236-241
	クローン 数 ¹	32	0	40	0	26	0	
植物 番号 9	状態	PE	nd	IE	UE	UE	nd	242-247
	クローン 数 ¹	24	0	13	21	33	0	
植物 番号 10	状態	PE	UE	UE	nd	UE	nd	248-253
	クローン 数 ¹	10	19	37	0	29	0	
植物 番号 11	状態	UE	nd	UE	nd	PE	UE	254-259
	クローン 数 ¹	35	0	37	0	15	11	
植物 番号 12	状態	UE	nd	UE	nd	IE	NHEJ	260-265
	クローン 数 ¹	34	0	40	0	14	8	

¹配列決定された独立したプラスミドクローンの数。

PE＝完全な編集；すなわち、ZFN媒介NHEJ指向性ゲノム編集は、予測された結果をもたらした。

IE＝不完全な編集；すなわち、ZFN媒介NHEJ指向性ゲノム編集は、予測外の結果をもたらした。

UE＝未編集対立遺伝子；すなわち、対立遺伝子は野生型配列を有していた。

nd＝非検出；すなわち、代替対立遺伝子が存在せず、遺伝子座が単一对立遺伝子に対しホモ接合であると結論付けるのに十分な独立したプラスミドクローンが配列決定された。

NHEJ＝非相同末端結合；すなわち、ZFN切断部位におけるドナー分子の組み込みをもたらさなかった非相同末端結合DNA修復結果の証拠。

10

20

30

40

【表 1 1】

【表 1 1】 pDAB109350、pDAB109360およびpDAS000268
を使用して形質転換された小麦植物における、ZFN媒介NHEJ指向性AHAS編集の
結果。

		A-ゲノム		B-ゲノム		D-ゲノム		配列番号
		対立 遺伝 子 1	対立 遺伝 子 2	対立 遺伝 子 1	対立 遺伝 子 2	対立 遺伝 子 1	対立 遺伝 子 2	
植物番 号 12a	状態	IE	UE	UE	nd	IE	nd	266-271
	クローン 数 ¹	5	14	53	0	1	24	
植物番 号 13a	状態	IE	UE	UE	nd	UE	nd	272-277
	クローン 数 ¹	10	12	49	0	18	0	

¹配列決定された独立したプラスミドクローンの数。

IE＝不完全な編集；すなわち、ZFN媒介NHEJ指向性ゲノム編集は、推定外の結果
をもたらした。

UE＝未編集対立遺伝子；すなわち、対立遺伝子は野生型配列を有していた。

nd＝非検出；すなわち、代替対立遺伝子が存在せず、遺伝子座が単一对立遺伝子に対し
ホモ接合であると結論付けるのに十分な独立したプラスミドクローンが配列決定された。

【0 2 7 4】

P197アミノ酸残基をコードするAHAS遺伝子における領域に特異的なジンクフィン
ガー結合ドメインの設計

AHAS遺伝子の同祖コピーのDNA配列に指向性のジンクフィンガータンパク質を、
前述のように設計した。例となる標的配列および認識ヘリックスを、表12（認識ヘリッ
クス領域設計）および表13（標的部位）に示す。表13において、ZFP認識ヘリックス
に接触する標的部位におけるヌクレオチドは大文字で示され、接触していないヌクレオ
チドは小文字で示されている。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）標的部位は、プ
ロリン197（P197）アミノ酸残基をコードするAHAS遺伝子における領域の上流
側（2～510ヌクレオチド上流側）に設計された。

【表 1 2】

【表 1 2】 AHAS ジンクフィンガー設計 (N/Aは「該当なし」を示す)

ZFP 番号	F1	F2	F3	F4	F5	F6
34470	配列番号 278 RSADLSR	配列番号 279 RSDHLSA	配列番号 280 QSSDLRR	配列番号 160 DRSNLSR	配列番号 281 RSDDRKT	N/A
34471	配列番号 158 QSGDLTR	配列番号 282 RRADRAK	配列番号 150 RSDDLTR	配列番号 283 TSSDRKK	配列番号 284 RSADLTR	配列番号 285 RNDDRKK
34472	配列番号 284 RSADLTR	配列番号 286 DRSNLTR	配列番号 287 ERGTAR	配列番号 150 RSDDLTR	配列番号 288 DRSDLSR	配列番号 289 DSSTRRR
34473	配列番号 290 RSDHLSA	配列番号 291 HSRTRTK	配列番号 292 RSDTLSE	配列番号 293 NNRDRTK	配列番号 287 ERGTAR	配列番号 155 DRSALAR
34474	配列番号 287 ERGTAR	配列番号 150 RSDDLTR	配列番号 294 DRSDLSR	配列番号 289 DSSTRRR	配列番号 286 DRSNLTR	N/A
34475	配列番号 296 RSDHLSR	配列番号 297 QQWDRKQ	配列番号 298 DRSHLTR	配列番号 152 DSSDRKK	配列番号 160 DRSNLSR	配列番号 299 VSSNLTS

10

20

【表 1 3】

【表 1 3】 AHAS ジンクフィンガーの標的部位

pDAB 番号	AHAS Pro-197 に対する近似 的切断部位	ZFP 番号および結合部位 (5' →3')	配列番 号
pDAB111850 (34456-2A-34457)	499bp 上流	34456: cnGCGGCCATGGCGGCGGCGagggtttg	300
		34457: acCTCccCGCCGTCGCAAttctcnggcg	301
pDAB111855 (34470-2A-34471)	109bp 上流	34470: ggCCGACGCGCGGGCGtancgagcgc	302
		34471: cgTCGGCGTCTGCGTCGCCAcctccggc	303
pDAB111856 (34472-2A-34473)	99bp 上流	34472: acGCCGACGCGGCCgGACGCGcgggcgt	304
		34473: gcGTCGCCaCCTCCGGCCCGggggccac	305
pDAB111857 (34474-2A-34475)	96bp 上流	34474: caGACGCCGACGCGGCCggagcgcggg	306
		34475: gtCGCCACcTCCGGCCCGGGGgccacca	307
pDAB111858 (34476-2A-34477)	90bp 上流	34476: gcGACGACGACGCCGACgcggccggacg	308
		34477: ccTCCGGCCCGGGGCCaccaacctcgt	309
pDAB111859 (34478-2A-34479)	24bp 上流	34478: ggGATGGAGTCGAGGAGngcgtcngcga	310
		34479: tgGTCGCCATCACGGCCAGgtcccccgc	311
pDAB111860 (34480-2A-34481)	18bp 上流	34480: acCATGGGGATGGAGTCGAGgagngcgt	312
		34481: ccATCACGGGCCAGGTCccccgcgcgat	313
pDAB111861 (34482-2A-34483)	16bp 上流	34482: cgACCATGGGGATGGAGTCGaggagngc	314
		34483: caTCACGGGCCAGGTCCccccgcgcgatg	315

10

20

【0 2 7 5】

AHAS ジンクフィンガー設計は、ジンクフィンガー発現ベクター内に組み込まれ、前述のように出芽酵母系を使用して切断活性について検証された。設計され、生成され、推定AHASゲノムポリヌクレオチド標的部位への結合が試験された数々のZFNのうち、上述のZFNは、高レベルでインビボ活性を有するものとして特定され、さらなる実験に選択された。これらのZFNは、3つの同祖AHASに結合するように設計され、植物体内で固有AHASゲノムポリヌクレオチド標的部位を効率的に結合および切断することができる特徴付けられた。

30

【0 2 7 6】

トランジェントアッセイを使用したAHAS遺伝子のジンクフィンガーヌクレアーゼ切断の評価

ZFN構築物アセンブリ；前述のように、酵母系を使用して切断活性が検証されたZFN発現構築物を含有するプラスミドベクターが、設計および完成された。得られたプラスミド構築物；pDAB111855（ZFN34470-2A-34471）、pDAB111856（ZFN34472-2A-34473）、およびpDAB111857（ZFN34474-2A-34475）は、制限酵素消化およびDNA配列決定により確認された。

40

【0 2 7 7】

トランスフェクションのためのZFN構築物からのDNAの調製

コムギ（*Triticum aestivum*）プロトプラストへの送達の前に、各ZFN構築物のためのプラスミドDNAを、供給業者の説明に従い、PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM（登録商標）（Promega Corporation、Madison、WI）またはPLASMID MAXI KIT（登録商標）（Qiagen、Valencia、CA）を使用して、大腸菌の培養物

50

から調製した。

【0278】

小麦葉肉プロトプラストの単離およびトランスフェクション

ドナー小麦系統品種Bobwhite MPB26RHからの葉肉プロトプラストを、前述のようにポリエチレングリコール（PEG）媒介DNA送達を使用して調製およびトランスフェクトした。

【0279】

ZFN配列切断のためのプロトプラストゲノムDNAのPCRアッセイ

トランスフェクトされたプロトプラストからゲノムDNAを単離し、前述のように、P197をコードするAHAS遺伝子の領域に対して設計されたZFNの切断効率および標的部位特異性を評価するためのPCRアッセイに使用した。アスタリスク（*）で示されるホスホロチオエート連結を含有する5セットのPCRプライマーを使用して、ZFN標的部位遺伝子座を増幅した（表14）。各プライマーセットは、前述の基準に従い設計された。

【表14】

【表14】 AHAS ZFN切断の有効性および標的部位特異性を評価するために使用されたプライマー配列。

プライマー名	プライマーセット	プライマー配列(5' → 3')	配列番号
AHAS-P197ZFN. F2	Set 1	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctTCCCAAT TCCAACCTCT*C	316
AHAS-P197ZFN. R1	Set 1	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTCAGC GCCTGGTGGATC*T	317
AHASs653ZFN. F5	Set 2	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctGCCGTCC GAGCCCGCA*A	318
AHASs653ZFN. R1	Set 2	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTCAGC GCCTGGTGGATC*T	319
AHASs653ZFN. F7	Set 3	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctGCGCTCGC CCGTCATCA*C	320
AHASs653ZFN. R5	Set 3	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGGGGA TGGAGTCGAGGA*G	321
AHAS+400ZFN. F9	Set 4	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctCTTCGCC ACGAGCAGG*G	322
AHAS+400ZFN. R5	Set 4	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGGGGA TGGAGTCGAGGA*G	323
AHAS+400ZFN. F11	Set 5	a*cactctttccctacacgacgtcttccgatctTCGTCTCC GCGCTCGCTG*A	324
AHAS+400ZFN. R6	Set 5	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctTCCACTA TGGGCGTCTCCT*G	325

【0280】

標的ZFN部位におけるNHEJを検出するためのデータ分析

トランスフェクトされた葉肉プロトプラストのために調製された試料ライブラリのためのIlluminaショートリード配列データの生成後、バイオインフォマティクス分析（前述の通り）を行って、標的ZFN部位における欠失したヌクレオチドを同定した。そのような欠失は、非相同末端結合（NHEJ）DNA修復から得られる植物体内ZFN活

性の指標であることが知られている。

【0281】

試験したZFNの切断効率および特異性を評価するために、2つの手法が使用された。切断効率は、ZFN標的部位にNHEJ欠失を含有する部分ゲノム帰属配列の割合として（100万リードあたりの部で）表現された（表15）。観察された切断効率によるZFNの等級序列を使用して、部分ゲノム特異的な様式でAHAS遺伝子の標的領域に対して最良の切断活性を有するZFNを同定した。試験したZFNは全て、植物体内ZFN活性に対して推定されるものと一致するNHEJ欠失サイズ分布を示した。切断特異性は、3つの部分ゲノムにわたり観察された切断効率の比として表現された。

【表15】

【表15】ZFN 切断の有効性（100万リード当たりのNHEJイベントの数として表現される）および標的部位特異性。

ZFN	A-ゲノム	B-ゲノム	D-ゲノム
pDAB111855 (34470-2A-34471)	177,866	156,139	134,694
pDAB111856 (34472-2A-34473)	119,857	100,300	87,770
pDAB111857 (34474-2A-34475)	248,115	251,142	202,711

【0282】

これらの結果から、3つの小麦部分ゲノムのそれぞれにおける有意なそのゲノムDNA切断活性の特性を考慮して、プラスミドpDAB111855（34470-2A-34471）、pDAB111856（34472-2A-34473）およびpDAB111857（34474-2A-34475）上にコードされたZFNを、後の実験における植物体内標的化に選択した。

【0283】

トランジェントアッセイを使用した、内因性AHAS遺伝子座におけるZFN媒介外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングの分子的な証拠の生成

相同性指向性DNA修復によるコムギ（*Triticum aestivum*）細胞のゲノム内の内因性AHAS遺伝子座におけるZFN媒介逐次的な外因性マーカー不含導入遺伝子スタッキングの、トランジェントアッセイを使用した分子的な証拠の生成が、以下のように達成された。

【0284】

ドナーpDAS000267およびプラスミドpDAB109350上にコードされたジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた形質転換により生成されたAHAS（S653N）編集小麦植物は、小麦のゲノムにおける内因性AHAS遺伝子座での逐次的な外因性マーカー不含導入遺伝子スタッキングのための第1のステップを示す。これらの編集植物を使用して、前述の方法を使用したトランスフェクションのための外植片材料（例えば、プロトプラストまたは未熟接合胚の胚盤）を生成した。外植片材料は、その後、ドナーDNA分子、およびP197アミノ酸残基をコードする領域の上流側のAHAS遺伝子に位置するジンクフィンガー結合部位を標的化するように設計されたZFN（例えば、pDAB111855、pDAB111856またはpDAB111857）をコードするプラスミドで共トランスフェクトされる。ZFNは、AHAS遺伝子座を切断し、ドナー分子は、相同性指向性修復によりコムギ（*Triticum aestivum*）細胞のゲノム内に組み込まれる。NHEJ媒介ドナー分子組み込みの結果、スルホニル尿素クラス除草剤に対する耐性を付与するAHAS（P197S）変異が内因性AHAS配列に導入され、同時に、第1ラウンドの導入遺伝子スタッキングにおいて導入されたAHAS（S653N）変異が除去される。その結果、内因性AHAS遺伝子の発現が、イミダゾリノンに対

する耐性およびスルホニル尿素への感受性の付与（第1ラウンドの導入遺伝子スタッキングにおける正しく標的化されたコムギ細胞の表現型）から、イミダゾリノンへの感受性およびスルホニル尿素への耐性の付与へと変化し、そのようにして、スルホニル尿素選択試薬を使用した正しく標的化された細胞の再生が可能となる。ドナーDNAの組み込みおよび正しく標的化された小麦細胞の生成の分子的な証拠は、前述の方法を使用して確認される。

【0285】

1つ以上の導入遺伝子を含有するドナーDNA分子およびジンクフィンガースクレアーゼをコードするプラスミドによる小麦細胞の共トランスフェクションは、倍数体植物種における複数のゲノムにわたる複数の対立遺伝子の同時編集を含む、正確に同じゲノム位置における植物ゲノム内の並行的（同時）または逐次的導入遺伝子組み込み（導入遺伝子スタッキング）の両方を可能とすることが、当業者に理解される。

【0286】

小麦における内因性AHAS遺伝子座での逐次的な外因性マーカー不含導入遺伝子スタッキングのための形質転換系の開発

小麦における内因性AHAS遺伝子は、1つ以上の導入遺伝子が同じゲノム位置に正確に位置した植物を生成するための、ZFN媒介外因性マーカー不含形質転換系を開発するためのモデル遺伝子座として選択された。形質転換系は、グループB除草剤に対する耐性を付与するAHAS遺伝子における既知の変異を利用することにより、複数の部分ゲノムにわたる複数の対立遺伝子での同時並行または逐次的スタッキングを含む、正確に同じゲノム位置での並行的（1つ以上の導入遺伝子の同時組み込み）または逐次的スタッキング（1つ以上の導入遺伝子の連続的組み込み）を可能とする。ドナーDNAの野生型（除草剤感受性）AHAS遺伝子座へのZFN媒介組み込みを使用して、イミダゾリノンに対する耐性を付与する内因性AHAS遺伝子に、導入遺伝子（複数可）および変異が導入され、そのようにして、イミダゾリノン選択試薬を使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。AHAS遺伝子座における第2の導入遺伝子（複数可）のスタッキングは、1つ以上の追加の導入遺伝子を導入し、イミダゾリノンに対する感受性を付与するがスルホニル尿素には耐性を付与するドナーDNAの組み込みにより達成され、そのようにして、スルホニル尿素選択試薬を使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。第3の導入遺伝子のスタッキングは、さらなる導入遺伝子（複数可）を導入し、スルホニル尿素に対する感受性およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するドナー分子の組み込みにより達成することができ、そのようにして、イミダゾリノン選択試薬を使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。したがって、イミダゾリノンおよびスルホニル尿素選択試薬の間の異なるサイクルで内因性AHAS遺伝子において導入遺伝子（複数可）および変異を導入するドナーDNAの使用により、逐次的導入遺伝子スタッキングの継続的ラウンドが可能である。導入遺伝子は、AHAS遺伝子内に組み込み、NHEJ経路を介してスタックすることができる。NHEJ修復および組み換え経路は、ドナー導入遺伝子の設計により決定され得る。一実施形態において、AHAS遺伝子内に組み込まれスタックされる導入遺伝子は、ペイロード（例えば、AHAS変異および目的遺伝子）に隣接する単一または二重切断ZFN部位を含有するように設計される。したがって、そのような設計は、染色体内へのドナーポリヌクレオチドの組み込みおよびスタッキングのために、NHEJ経路を使用する。

【0287】

AHAS（P197S）発現構築物を有する低コピー無作為組み込みT-DNA小麦植物の生成

AHAS（P197S）発現およびPAT選択カセットを含有するバイナリベクターpDAS000164（配列番号：326、図16）を設計し、当該技術分野において一般的に知られている技術および技法を使用してアセンブルした。AHAS（P197S）発現カセットは、トウモロコシ（Zea mays）由来ユビキチン（Ubi）遺伝子からのプロモーター、5'非翻訳領域およびイントロン（Tokiet al., (19

10

20

30

40

50

92) *Plant Physiology*, 100; 1503-07) に続く、プロリン (P) からセリン (S) へのアミノ酸変化を誘導するために C から T に変異したヌクレオチド 511 を有するコムギ (*T. aestivum*) 品種 Bobwhite MPB26RH からの AHA S 遺伝子のコード化配列 (1935 bp) からなる。AHA S 発現カセットは、A. ツメファシエンス pTi15955 からのノパリンシンターゼ遺伝子 (nos) を含む 3' 非翻訳領域 (UTR) を含んでいた (Frale y et al., (1983) *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* 80 (15): 4803-4807)。選択カセットは、アジアイネ (*Oryza sativa*) 由来アクチン 1 (Act1) 遺伝子からのプロモーター、5' 非翻訳領域およびイントロン (McElroy et al., (1990) *The Plant Cell* 2 (2): 163-171) に続く、ホスフィノトリシン、グルホシネート、およびビアラホスを含むグルタミン合成酵素の阻害剤に対する抵抗性を付与するタンパク質をコードする、ストレプトミセス・ピリドクロモゲネスから単離されたホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 遺伝子の合成植物最適化型を含んでいた (Wohlleben et al., (1988) *Gene* 70 (1): 25-37)。このカセットは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S 遺伝子からの 3' UTR で終端された (Chenault et al., (1993) *Plant Physiology* 101 (4): 1395-1396)。

【0288】

選択カセットは、商業的な遺伝子合成業者により合成され (例えば、GeneArt、Life Technologies 等)、トウモロコシ (*Zea mays*) 由来ユビキチン (Ubi) 遺伝子と、A. ツメファシエンス pTi15955 由来ノパリンシンターゼ遺伝子 (nos) の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む、3' 非翻訳領域 (UTR) との間に位置する RfA Gateway カセットを有する GATEWAY (登録商標) 有効化バイナリベクターにクローニングされた。AHA S (P197S) コード化配列は、隣接 attB 部位で増幅され、pDONR221 にサブクローニングされた。得られた ENTRY クローンを、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT) 発現カセットをコードする Gateway 有効化バイナリベクターとの LR CLONASE II (登録商標) (Invitrogen、Life Technologies) 反応において使用した。全てのアセンブルされたプラスミドのコロニーを、まずミニプレップ DNA の制限酵素消化によりスクリーニングした。制限エンドヌクレアーゼは、New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) および Promega (Promega Corporation、WI) から入手した。プラスミド調製は、供給業者の説明に従い、QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (登録商標) (Qiagen、Hilden) または PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM (登録商標) (Promega Corporation、WI) を使用して行われた。選択されたクローン のプラスミド DNA を、ABI Sanger Sequencing および BIG DYE TERMINATOR V3.1 (登録商標) サイクル配列決定プロトコル (Applied Biosystems、Life Technologies) を使用して配列決定した。配列データをアセンブルし、SEQUENCHER (商標) ソフトウェア (Gene Codes Corporation、Ann Arbor、MI) を使用して分析した。

【0289】

得られたバイナリ発現クローン pDAS000164 を、アグロバクテリウム・ツメファシエンス株 EHA105 に形質転換した。無作為に組み込まれた T-DNA を有するトランスジェニック小麦植物は、Wu et al., (2008) *Transgenic Research* 17: 425-436 と同様のプロトコルに従い、ドナー小麦系統品種 Bobwhite MPB26RH を使用して、アグロバクテリウム媒介形質転換

により生成された。A H A S (P 1 9 7) 発現構築物を発現する推定 T₀ トランスジェニックイベントを、ホスフィノトリシン (P P T) 耐性、P A T 選択可能マーカーにより付与される表現型のために選択し、土壌に移した。T₀ 植物を温室封入条件下で成長させ、T₁ 種を生成した。

【0290】

各 T₀ 植物からのゲノム DNA を上述のように葉組織から抽出し、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの存在、および A H A S (P 1 9 7 S) をコードする T-DNA の組み込まれたコピーの数について試験した。A. ツメファシエンスの存在は、二重加水分解プローブ q P C R アッセイ (T A Q M A N (商標) に類似) を使用して行い、小麦ゲノム由来内因性ユビキチン遺伝子 (順方向および逆方向プライマーならびにプローブ配列に対してそれぞれ配列番号: 327、配列番号: 328、および配列番号: 329)、および p T i B o 5 4 2 由来 v i r C (順方向および逆方向プライマーならびにプローブ配列に対してそれぞれ配列番号: 330、配列番号: 331、および配列番号: 332) を増幅した。組み込まれた T-DNA コピーの数は、前述のように、6 倍体小麦の D ゲノムからのプロインドリン-b (P i n b) および p D A S 0 0 0 1 6 4 上に存在するアクチン (A c t 1) プロモーターの領域に基づき、二重加水分解プローブ q P C R アッセイを使用して推定された。全体として、無作為に組み込まれた T-DNA のコピーが 3 未満である 35 の独立した T₀ イベントが生成された。

【0291】

スルホメツロンメチルに基づく化学的選択条件の最適化

スルホニル尿素クラス除草剤に対する耐性を付与する A H A S (P 1 9 7 S) 変異を発現する小麦植物を再生するための最適な選択条件を決定するために、一連の実験を行った。これらの実験は、確立された小麦形質転換系のカルス誘導、植物再生および発根段階における、野生型ドナー小麦系統品種 B o b w h i t e M P B 2 6 R H (スルホニル尿素に対する感受性を付与する P 1 9 7 / P 1 9 7 遺伝子型) の基本的耐性の試験に基づいた。スルホニル尿素選択試薬に対する耐性を付与する A H A S (P 1 9 7) 変異を発現する T-DNA が無作為に組み込まれたトランスジェニック品種 B o b w h i t e M P B 2 6 R H イベントの基本的耐性を決定するために、同様の実験を行った。

【0292】

カルス誘導段階における野生型ドナー小麦系統のスルホメツロンメチルに対する基本的耐性は、以下のように決定された: 未熟接合胚の胚盤を前述のように単離し、それぞれ 0、100、500、1000、1500 および 2000 nM のスルホメツロンメチルを添加した C I M 培地を含有する 10 cm P E T R I (商標) 皿内に入れた。各 P E T R I (商標) 皿内に 20 の胚盤を入れた。全部で 60 の胚盤を、各スルホメツロンメチル濃度で試験した。24 °C で 4 週間の暗所でのインキュベーション後、各スルホメツロンメチル濃度での体細胞胚発生カルス形成 (S E C) の量を記録した。結果は、品種 B o b w h i t e M P B 2 6 R H の S E C 形質転換が、100 nM のスルホメツロンメチルにおいて、未処理試料と比較して約 70 % 低減されたことを示した。

【0293】

植物再生段階における野生型ドナー小麦系統のスルホメツロンメチルに対する基本的耐性は、以下のように決定された: ドナー小麦系統からの未熟接合胚の胚盤を単離し、C I M 培地を含有する 10 cm P E T R I (商標) 皿内に入れた。24 °C で 4 週間暗所でインキュベートすることにより、体細胞胚発生カルスを形成させた。それぞれ 0、100、500、1000、1500、2000、2500 および 3000 nM のスルホメツロンメチルを添加した D R M 培地を含有する 10 cm P E T R I (商標) 皿に S E C を移した。各 P E T R I (商標) 皿内に 20 の C I M を入れた。全部で 60 の C I M を、各スルホメツロンメチル濃度で、基本的耐性反応について試験した。成長室内で 16 / 8 (明 / 暗) 時間の光周期での 24 °C で 2 週間のインキュベーション後、再生反応を記録した。結果は、植物再生が、2000 nM のスルホメツロンメチルにおいて、未処理試料と比較して約 80 % 低減されたことを示した。

【0294】

植物発根段階における野生型ドナー小麦系統のスルホメツロンメチルに対する基本的耐性は、以下のように決定された：未熟接合胚の胚盤を単離し、C I M培地を含有する10 cm P E T R I（商標）皿内に入れた。24℃で4週間暗所でインキュベートすることにより、体細胞胚発生カルスを形成させた。D R M培地を含有する10 cm P E T R I（商標）皿にS E Cを移し、16/8（明/暗）時間の光周期で24℃で2週間インキュベートし、植物再生を生じさせた。それぞれ0、100、200、250、300、400、500、1000および2000 nMのスルホメツロンメチルを添加したR M培地を含有する10 cm P E T R I（商標）皿に、再生された植物を移した。10の再生された植物を、各P E T R I（商標）皿内に入れた。全部で30の再生された植物を、各スルホメツロンメチル濃度で、基本的耐性反応について試験した。成長室内で16/8（明/暗）時間の光周期での24℃で3週間のインキュベーション後、根形成反応を記録した。結果は、スルホメツロンメチルの濃度が400 nMを超えると、根形成が非処理試料と比較して大幅に阻害されたことを示した。

10

【0295】

植物発根段階における、A H A S（P 1 9 7 S）変異を発現する無作為に組み込まれた低コピー（ ≤ 3 ）T-DNAを有するトランスジェニック小麦イベントの、スルホメツロンメチルに対する基本的耐性は、以下のように決定された：4つの独立したトランスジェニックイベントを無作為に選択し、増殖培地上での二次培養によりインビトロで増殖させた。増殖後、それぞれ0、400、450、500、550および600 nMのスルホメツロンメチルを添加したR M培地を含有する10 cm P E T R I（商標）皿に、各イベントに対する植物を移した。4つの植物（4つのイベントのそれぞれから1つ）を、各P E T R I（商標）皿内に入れた。イベント当たり全部で3つの植物を、各スルホメツロンメチル濃度で、基本的耐性について試験した。成長室内で16/8（明/暗）時間の光周期での24℃で2週間のインキュベーション後、根形成反応を記録した。結果は、根形成が、試験された全ての濃度において、未処理対照と比較して制限されないことを示したが、これは、A H A S（P 1 9 7 S）変異がスルホメツロンメチルに対する高い耐性を付与したことを示している。

20

【0296】

N H E J指向性DNA修復を使用した内因性A H A S遺伝子座における第1の逐次的導入遺伝子スタッキングのためのドナーDNAの設計および合成

30

第1ラウンドの導入遺伝子スタッキングのためのドナーDNAは、Z F N媒介N H E J指向性修復による内因性A H A S遺伝子座における正確なドナー組み込みを促進するように設計される。設計は、Z F N 2 9 7 3 2および2 9 7 3 0（プラスミドp D A B 1 0 9 3 5 0上にコードされている）による内因性A H A S遺伝子の同祖コピーの切断により形成された2本鎖DNA切断の位置における、2本鎖ドナー分子の組み込みに基づく。ドナー分子（p D A S 0 0 0 4 3 3；配列番号：333、図17）は、ポリヌクレオチド配列のいくつかの部分を含む。5'末端は、標的Z F N切断部位から開始してA H A S停止コドンで終了する、D-ゲノム内にコードされた内因性A H A S遺伝子とほぼ同一の配列を含有する。7つの意図的変異をこの配列に導入するが、2つの変異は、S 6 5 3 N変異およびZ F N 2 9 7 3 2の結合部位にわたって位置する5つのコドン最適化同義変異をコードし、組み込まれたドナーの再切断を防止する。停止コドンの後に、A H A S同祖体にわたる保存された3'非翻訳領域（3' U T R）に対応する316 bpの非コード化配列がある。3' U T R配列の後に、Z F N 3 4 4 8 0および3 4 4 8 1（プラスミドp D A B 1 1 1 8 6 0上にコードされている）ならびにZ F N 3 4 4 8 2および3 4 4 8 3（プラスミドp D A B 1 1 1 8 6 1上にコードされている）に対するジンクフィンガー結合部位がある。これらのジンクフィンガー結合部位は、次のラウンドの導入遺伝子スタッキング中に内因性遺伝子座において組み込まれたドナー由来A H A S（コード化および3' U T R）配列の自己離断を可能にする。自己離断ジンクフィンガー結合部位の後に、2つの固有の制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接し、ドナー分子への導入遺伝子発現カセット

40

50

(例えば、前述のようなPAT発現カセット)の挿入を可能にする、いくつかの追加的なジンクフィンガー結合部位(そのそれぞれは100bpの無作為配列により隔てられている)がある。追加的なジンクフィンガー結合部位は、逐次的マーカー不含導入遺伝子スタッキングにより、または交互スタッキング方法を使用した同じゲノム位置における継続的な逐次的導入遺伝子スタッキングにより、AHAS遺伝子座において組み込まれた導入遺伝子の将来の離断を可能にする。

【0297】

ドナーカセットは、商業的遺伝子サービス業者により(例えば、GeneArt、Life Sciences等)、内因性AHAS遺伝子座の切断後に、ZFN29732および29730(プラスミドpDAB109350上にコードされている)により生成された連結オーバーハングに適合する、突出した5'および3'末端を有するドナー分子の生成を可能とするために、5'および3'末端における短く伸びた追加的な隣接配列を有するように合成される。突出した5'および3'末端を有するドナー分子は、当業者に知られている標準的方法を使用して、ドナー分子を含有するプラスミドDNAを、制限エンドヌクレアーゼBbsIで消化させることにより生成される。

【0298】

NHEJ指向性DNA修復を使用した内因性AHAS遺伝子座における第2の逐次的導入遺伝子スタックのためのドナーDNAの設計および合成

第2ラウンドの導入遺伝子スタッキングのためのドナーDNAは、ZFN媒介NHEJ指向性修復による第1の導入遺伝子スタックにおいて標的化される同じAHAS遺伝子座における正確なドナー組み込みを促進するように設計される。設計は、ZFN34480および34481(プラスミドpDAB111860上にコードされている)またはZFN34482および34483(プラスミドpDAB111861上にコードされている)による第1のスタックされた導入遺伝子を含有するAHAS遺伝子コピーの切断によって形成された2本鎖DNA切断における、2本鎖ドナー分子の組み込みに基づく。ドナー分子(pDAS000434;配列番号:334、図18)は、ポリヌクレオチド配列のいくつかの部分を含む。5'末端は、標的ZFN切断部位から開始してAHAS停止コドンで終了する、D-ゲノム内にコードされた内因性AHAS遺伝子とほぼ同一の配列を含有する。いくつかの意図的変異、すなわちP197S変異ならびにZFN34481および34483の結合部位にわたって位置するコドン最適化同義変異をこの配列に導入し、組み込まれたドナーの再切断を防止する。停止コドンの後に、AHAS同祖体における保存された3'非翻訳領域(3'UTR)に対応する316bpの非コード化配列がある。3'UTR配列の後に、ZFN34474および34475(プラスミドpDAB111857上にコードされている)ならびにZFN34476および34477(プラスミドpDAB111858上にコードされている)に対するジンクフィンガー結合部位がある。これらのジンクフィンガー結合部位は、次のラウンドの導入遺伝子スタッキングにおいて内因性遺伝子座に組み込まれたドナー由来AHAS(コード化および3'UTR)配列の自己離断を可能にする。自己離断ジンクフィンガー結合部位の後に、固有の制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接し、導入遺伝子発現カセット(例えば、特許出願第13757536号に記載のようなDGT-28発現カセット)の挿入を可能にする、いくつかの追加的なジンクフィンガー結合部位(そのそれぞれは100bpの無作為配列により隔てられている)がある。追加的なジンクフィンガー結合部位は、逐次的マーカー不含導入遺伝子スタッキングにより、または交互スタッキング方法を使用した同じゲノム位置における継続的な逐次的導入遺伝子スタッキングにより、AHAS遺伝子座において組み込まれ得る導入遺伝子の将来の離断を可能にする。ドナーカセットは、商業的遺伝子サービス業者により(例えば、GeneArt、Life Sciences)、内因性AHAS遺伝子座の切断後に、ZFN34474および34475(プラスミドpDAB111857上にコードされている)またはZFN34476および34477(プラスミドpDAB111858上にコードされている)により生成された連結オーバーハングに適合する、突出した5'および3'末端を有するドナー分子の生成を可能とするために、5'およ

10

20

30

40

50

び3'末端における短く伸びた追加的な隣接配列を有するように合成される。突出した5'および3'末端を有するドナー分子は、当業者に知られている標準的方法を使用して、ドナー分子を含有するプラスミドDNAを、制限エンドヌクレアーゼBbsIで消化させることにより生成される。

【0299】

NHEJ指向性DNA修復を使用した小麦における内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングのための形質転換系

ドナーpDAS000433ならびにZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）を用いた形質転換による外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングによって、同じ内因性AHAS遺伝子座にスタックされた複数の導入遺伝子によるトランスジェニック小麦イベントが生成される。正確なZFN媒介NHEJ指向性ドナー組み込みにより、第1の導入遺伝子およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するS653N変異がAHAS遺伝子座に導入され、そのようにして、前述のようにIMAZAMOX（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。図19aは、その組み込みを示す。ドナーpDAS000434ならびにZFN34480および34481（プラスミドpDAB111860上にコードされている）を用いた、第1の導入遺伝子のスタックイベントに由来する小麦細胞のその後の形質転換は、P197の上流側に位置するZFN結合部位と、ドナー分子による第1の導入遺伝子スタックの間に組み込まれた自己離断部位との間に位置する内因性クロマチンの置き換えをもたらす。これは、第2の導入遺伝子およびスルホニル尿素に対する耐性を付与するP197S変異の組み込みをもたらし、そのようにして、スルホメツロンメチルを選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。同時に、第2のドナーの組み込みによりS653N変異が除去され、そのようにしてイミダゾリノンに対する感受性が回復する（図19B）。第3の導入遺伝子のスタッキングは、適切なジンクフィンガーヌクレアーゼ、ならびに追加的な導入遺伝子を含有し、スルホニル尿素に対する感受性およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するドナーを用いた形質転換により達成することができ、そのようにして、IMAZAMOX（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。同時に、第2のドナーの組み込みによりS653N変異が除去され、そのようにしてイミダゾリノンに対する感受性が回復する（図19B）。第3の導入遺伝子のスタッキングは、適切なジンクフィンガーヌクレアーゼ、ならびに追加的な導入遺伝子を含有し、スルホニル尿素に対する感受性およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するドナーを用いた形質転換により達成することができ、そのようにして、IMAZAMOX（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。同時に、第2のドナーの組み込みによりS653N変異が除去され、そのようにしてイミダゾリノンに対する感受性が回復する（図19B）。第3の導入遺伝子のスタッキングは、適切なジンクフィンガーヌクレアーゼ、ならびに追加的な導入遺伝子を含有し、スルホニル尿素に対する感受性およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するドナーを用いた形質転換により達成することができ、そのようにして、IMAZAMOX（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。したがって、イミダゾリノンおよびスルホニル尿素選択試薬の間の異なるサイクルで内因性AHAS遺伝子において導入遺伝子および変異を導入するドナーを用いた形質転換により、逐次的導入遺伝子スタッキングの継続的ラウンドが可能である。

【0300】

HDR指向性DNA修復を使用した内因性AHAS遺伝子座における第1の逐次的導入遺伝子スタッキングのためのドナーDNAの設計および合成

第1ラウンドの導入遺伝子スタッキングのためのドナーDNAは、ZFN媒介修復による内因性AHAS遺伝子座における正確なドナー組み込みを促進するように設計される。設計は、ZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）による内因性AHAS遺伝子の同祖コピーの切断により形成された2本鎖DNA切断の位置における、2本鎖ドナー分子の組み込みに基づく。ドナー分子（pDAS000435；配列番号：335、図21）は、配列がpDAS000433（配列番号：333）と同一である。

【0301】

HDR指向性DNA修復を使用した小麦における内因性AHAS遺伝子座での外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングのための形質転換系

ドナーpDAS000435ならびにZFN29732および29730（プラスミドpDAB109350上にコードされている）を用いた形質転換による外因性マーカー不含逐次的導入遺伝子スタッキングによって、同じ内因性AHAS遺伝子座にスタックされた複数の導入遺伝子によるトランスジェニック小麦イベントが生成される。正確なZFN媒介HDR指向性ドナー組み込みにより、第1の導入遺伝子およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するS653N変異がAHAS遺伝子座に導入され、そのようにして、前述

のように I M A Z A M O X（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。図 20 a は、その組み込みを示す。ドナー p D A S 0 0 0 4 3 6 ならびに Z F N 3 4 4 8 0 および 3 4 4 8 1（プラスミド p D A B 1 1 1 8 6 0 上にコードされている）を用いた、第 1 の導入遺伝子のスタックイベントに由来する小麦細胞のその後の形質転換は、P 1 9 7 の上流側に位置する Z F N 結合部位と、ドナー分子による第 1 の導入遺伝子スタックの間に組み込まれた自己離断部位との間に位置する内因性クロマチンの置き換えをもたらす。これは、第 2 の導入遺伝子およびスルホニル尿素に対する耐性を付与する P 1 9 7 S 変異の組み込みをもたらす、そのようにして、スルホメツロンメチルを選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。同時に、第 2 のドナーの組み込みにより S 6 5 3 N 変異が除去され、そのようにしてイミダゾリノンに対する感受性が回復する（図 20 b）。当業者には明らかなように、第 3 の導入遺伝子のスタッキングは、適切なジンクフィンガーヌクレアーゼ、ならびに追加的な導入遺伝子を含む、スルホニル尿素に対する感受性およびイミダゾリノンに対する耐性を付与するドナーを用いた形質転換により達成することができ、そのようにして、I M A Z A M O X（登録商標）を選択試薬として使用した正しく標的化された植物の再生が可能となる。したがって、イミダゾリノンおよびスルホニル尿素選択試薬の間の異なるサイクルで内因性 A H A S 遺伝子において導入遺伝子および変異を導入するドナーを用いた形質転換により、逐次的導入遺伝子スタッキングの継続的ラウンドが可能である。

10

【0302】

正確なゲノム修飾の特定の組み合わせを有するトランスジェニック植物を回収するための、人工交雑および分子分析

20

ドナー DNA およびジンクフィンガーヌクレアーゼ構築物を用いた形質転換により生成されるコムギ (*Triticum aestivum*) イベントは、標的内因性遺伝子座の 1 つ以上のコピーにおけるドナー分子配列の組み込みをもたらす。以前に示したように、Z F N 媒介ゲノム修飾は、複数の部分ゲノムにわたる複数の対立遺伝子の同時編集を含み得る。その後、形質転換イベントの人工交雑が、正確なゲノム修飾の特定の組み合わせを選択するために使用され得る。例えば、S 6 5 3 N 変異で正確に修飾された A H A S 遺伝子を有する、生成された形質転換イベントの人工交雑を使用して、特定の部分ゲノム上、複数の部分ゲノム上、または 3 つ全ての部分ゲノム上に S 6 5 3 N 変異を有する小麦植物を生成することができる。その後の形質転換イベントの人工交雑は、正確なゲノム修飾の特定の組み合わせを有する植物の生成を促進する。当業者は、例えば前述のような分子アッセイを展開して、その後の世代における人工交雑の間の特定のゲノム修飾の遺伝を追跡することができる。

30

【0303】

実施例 7：セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) オメガ 3 脂肪酸デサチュラーゼ (Fad3) への標的化組み込みおよびその妨害

Fad3C および Fad3A に特異的なジンクフィンガー結合ドメインの選択

同祖 Fad3 遺伝子の転写された領域を同定および特性決定し、本明細書に記載のドナー配列の N H E J 媒介標的化のためのそれらの部位を結合および切断するように設計されたジンクフィンガーヌクレアーゼを、設計および構築した。参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許番号第 6 1 / 6 9 7, 8 5 4 号を参照されたい。Fad3 配列の同祖体からの DNA 配列に指向性のジンクフィンガータンパク質 (ZFP) を設計し、米国仮特許番号第 6 1 / 6 9 7, 8 5 4 号において以前に説明されたように試験した。的確な活性を示す ZFP から、Fad3 標的を高効率で切断するジンクフィンガータンパク質を選択した：ZFP 2 8 0 5 1 - 2 A - 2 8 0 5 2 は、配列番号：3 3 6 5' - G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G C C A T C T T C G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T - 3' を認識し、Fad3C ゲノム遺伝子座を特異的に結合および切断することが以前に示された。同様に、ジンクフィンガータンパク質 2 8 0 5 3 - 2 A - 2 8 0 5 4 は、配列番号：3 3 7 5' - A G C G A G A G A A A G C T T A T T G C A A C T T C A A C T A C T T G C T G G T C G A T C G T G T T G G C C A C T C

40

50

ー 3' を認識し、F a d 3 A および F a d 3 C ゲノム 遺伝子座を特異的に結合および切断することが以前に示された。Z F P 認識ヘリックスに接触する標的部位におけるヌクレオチドを、表 1 6 に示す。

【表 1 6】

【表 1 6】 F a d 3 C (2 8 0 5 1 - 2 A - 2 8 0 5 2) または F a d 3 A および F a d 3 C (2 8 0 5 3 - 2 A - 2 8 0 5 4) に特異的なジンクフィンガータンパク質結合部位。Z F P 認識ヘリックスに接触する標的部位におけるヌクレオチドは大文字で示され、接触していないヌクレオチドは小文字で示される。F a d 3 C とは異なる F a d 3 のコピーにおけるヌクレオチドは、下線により特定される。

28051-2A- 28052	配列 番号	配列番号 356 gcccaaggaacCCTTTTCTGGGCCATct cgTACTCGGCCACGactggttaatttaaat	配列番号 357
Fad3C	338	GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGACTCGGCCACGACTGGTAATTTAAT	
Fad3A	339	GCCCAAGGAACCCCTGTTCTGGGCTATCTTCGACTCGGCCACGACTGGTAATTTAAT	
Fad3C'	340	GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTCTCGGCCACGACTGGTAAAGTTTC	
Fad3A'	341	GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTCTCGGCCACGACTGGTAAAGTTTC	
Fad3A''	342	GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTCTTGGCCACGACTGGTAAATTAAA	
Fad3C''	343	GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTCTTGGCCACGACTGGTAAATTAAA	

28053-2A- 28054	配列 番号	配列番号 358 agcgagagaaAGCTTAtTGCAACTTCaa acTTGCTGGTCGATCGTGTggccactc	配列番号 359
Fad3C	344	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGTCGATCGTGTGGCCACTC	
Fad3A	345	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGTCGATCATGTTGGCCACTC	
Fad3C'	346	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGTCCATAATGTTGGCCATTTC	
Fad3A'	347	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCGACTACTTGCTGGTCCATAATGTTGGCAATTTC	
Fad3A''	348	AGCGAGAGGAAGCTTATTGCAACTTCAACAAGCTTGCTGGTCCATAATGTTGGCCACTC	
Fad3C''	349	AGCGAGAGGAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGTCCATAATGTTGGCCACTC	

【 0 3 0 4 】

F a d 3 C および F a d 3 A に特異的なジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする発現ベクターの設計および構築

F a d 3 ジンクフィンガー設計は、C C H C 構造を有する少なくとも 1 つのフィンガーを有するタンパク質をコードするジンクフィンガー発現ベクター内に組み込まれた（米国特許公開第 2 0 0 8 / 0 1 8 2 3 3 2 号）。具体的には、各タンパク質における最後のフィンガーは、認識ヘリックスの C C H C 骨格を有していた。非正準ジンクフィンガーコード化配列を、I I S 型制限酵素 F o k I のヌクレアーゼドメイン（Wah et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10564-10569 の配列のうち、アミノ酸 384-579）に、4 アミノ酸 Z C リンカーおよび s o p 2 核局在化シグナルを介して融合させた。Those et al. からのヌクレオチド配列をコードする自己加水分解性 2 A (Szymczak et al., 2004) を、2 つのジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質の間に添加した。Z F N の発現は、キャッサバ葉脈モザイクウイルス（Cassava Vein Mosaic Virus）からの強力な構成的プロモーターおよび 5' 非翻訳領域（UTR）により主導され（Verdaguer et al., Plant Molecular Biology 1996, 31 (6); 1129-1139）、これには、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ p T i 1 5 9 5 5 のオープンリーディングフレーム 2 3 (O R F 2 3) からの 3' UTR（転写ターミネーターおよびポリアデニ

ル化部位を含む)が隣接していた(Barker et al., Plant Molecular Biology 1983, 2(6); 335-50)。

【0305】

IN-FUSION (商標) Advantage Technology (Clontech、Mountain View、CA)を使用して、ベクターをアセンブルした。制限エンドヌクレアーゼは、New England BioLabs (NEB; Ipswich、MA)から入手し、T4 DNA Ligase (Invitrogen)をDNA連結に使用した。プラスミド調製は、供給業者の説明に従い、NUCLEOSPIN (登録商標) Plasmid Kit (Macherey-Nagel Inc.、Bethlehem、PA)またはPLASMID MID KIT (商標) (Qiagen)を使用して行った。アガローストリス-酢酸ゲル電気泳動後に、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (商標) (Qiagen)を使用してDNA断片を単離した。アセンブルされたプラスミドのコロニーを、まずミニプレップDNAの制限消化によりスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミドDNAは、商業的な配列決定業者(Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL)により配列決定された。配列データをアセンブルし、SEQUENCHER (商標) ソフトウェア (Gene Codes、Ann Arbor、MI)を使用して分析した。得られたプラスミド構築物:pDAB107827 (ZFN28051-2A-28052、図22、配列番号:350)、およびpDAB107828 (ZFN28053-2A-28054、図23、配列番号:351)は、制限酵素消化およびDNA配列決定により確認された。

【0306】

NHEJ指向性DNA修復のための「ドナー」ベクターの設計および構築

Fad3へのDNAの組み込みの2つの戦略、すなわち発現カセットが単一ZFN誘導2本鎖切断内に挿入される遺伝子スプライシング、および遺伝子の一部が2つのZFN誘導2本鎖切断の使用により除去され、ギャップを修復するために発現カセットが挿入される遺伝子編集を行った。

【0307】

各組み込み方法、遺伝子スプライシングまたは遺伝子編集に対し、2つのベクターを構築した。第1のベクターは、turboGFP (tGFP) 遺伝子発現カセットをコードし、第2のベクターは、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与するための遺伝子発現カセットをコードした。tGFP発現カセットは、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) ポリユビキチン10 (UBQ10) 遺伝子からのプロモーター、5' 非翻訳領域およびイントロン (Norris et al., Plant Molecular Biology 1993, 21(5), 895-906) に続く、tGFPコード化配列 (Evrogen、Moscow、Russia) からなっていた。tGFPコード化配列は、双子葉植物における発現に対してコドン最適化され、3' 非翻訳領域 (UTR) は、A. ツメファシエンズ pTi15955のオープンリーディングフレーム23 (ORF23) の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含んだ (Barker et al., Plant Molecular Biology 1983, 2(6), 335-50)。ハイグロマイシン抵抗性遺伝子発現カセットは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) からの5' UTRを含む19Sプロモーター (Cook and Penon Plant Molecular Biology 1990 14(3), 391-405) に続く、ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ (hph) 遺伝子からなっていた (Kaster et al Nucleic Acids Research 1983 11(19), 6895-6911)。hph遺伝子は、双子葉植物における発現のためにコドン最適化され、A.

ツメファシエンズ pTi15955のオープンリーディングフレーム1 (ORF1) の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む3' UTRが隣接していた (Barker et al., Plant Molecular Biology 1983,

2 (6), 335-50)。カセットは両方とも、商業的遺伝子合成業者により合成された (Gene Art、Life Technologies、Regensberg、Germany)。

【0308】

遺伝子スプライシングのためのベクターは、ベクター pDAB10782 内にコードされた ZFN により標的化された ZFN 認識配列の 2 つの縦列コピーをクローニングすることにより構築された。遺伝子編集のためのベクターは、ベクター pDAB107827 および pDAB107828 内にコードされた ZFN により標的化された ZFN 認識配列のそれぞれの 1 つのコピーをクローニングすることにより構築された。いずれの場合も、2 つの ZFN 認識配列は、BamHI および NotI 制限エンドヌクレアーゼの認識配列により隔てられていた。tGFP および HPH カセットを、各ベクターの BamHI および NotI 部位にクローニングし、4 つの「ドナー」ベクター：pDAS000340 (ハイグロマイシン抵抗性遺伝子スプライシングドナー：配列番号：352、図 24)、pDAS000341 (tGFP レポーター遺伝子スプライシングドナー：配列番号：353、図 25)、pDAS00342 (ハイグロマイシン抵抗性遺伝子編集ドナー：配列番号：354、図 26) および pDAS000343 (tGFP レポーター遺伝子編集ドナー：配列番号：355、図 27) を得た。

【0309】

アセンブルされたプラスミドのコロニーを、まず、大腸菌の一晩の培養から精製された DNA の制限エンドヌクレアーゼ消化によりスクリーニングした。制限エンドヌクレアーゼは、New England BioLabs (NEB、Ipswich、MA) および Promega (Promega Corporation、WI) から入手した。プラスミド調製は、供給業者の説明に従い、QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (商標) (Qiagen、Hilden、Germany) または PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM (商標) (Promega Corporation、WI) を使用して行われた。得られた断片のアガロースゲル電気泳動により制限断片が確認された後、選択されたクローンのプラスミド DNA を、ABI Sanger Sequencing および BIG DYE TERMINATOR V3.1 (商標) サイクル配列決定プロトコル (Applied Biosystems、Life Technologies) を使用して配列決定した。配列データをアセンブルし、Sequencher (商標) ソフトウェア (Gene Codes、Ann Arbor、MI) を使用して分析した。

【0310】

プロトプラスト単離のための植物材料の維持

葉肉由来プロトプラストを、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) (DH10275) の 3 週齢無菌苗条培養物から単離した。対応する種を本明細書に記載の方法に従い発芽させた。70%エタノールを 1 分間使用して種を表面殺菌し、穏やかに振とうし、続いて滅菌再蒸留水中で 3~4 回濯いだ。その後、20%漂白剤および 10 μ l の Tween 20 を使用して殺菌した。種をさらに卓上振とう機上で約 100 RPM で 15 分間漂白剤で処理し、続いて滅菌再蒸留水中で 3~4 回濯ぎ、種を滅菌濾紙に慎重に移して過剰の水分を除去し、種発芽培地 (1/2 強度 MS/B5 ビタミン + 1% スクロース + 0.8% 寒天、pH 5.8) 上に播種した。

【0311】

約 50~60 ml の培地を各 PETRI (商標) 皿 (15 $\times$ 100 mm) 内に注ぎ、支持体を使用して若干角度を付けて設置した。プレート当たり約 50 の種を置いた。プレートを 16 時間/日の光 (20 μ mol m⁻² s⁻¹) で 22 $^{\circ}$ C で 6 日間、立ててインキュベートした。0.5 cm のサイズの胚軸セグメントを、6 日齢の実生から切除し、苗条誘導培地 (MS/B5 ビタミン + 3% スクロース + 500 mg/L MES + BAP (13 μ m) + Zeatin (5 μ m) + 硝酸銀 (5 mg/L) + 0.8% 寒天 (pH 5.8)) 上で培養した。培地を 100 $\times$ 20 mm の滅菌 PETRI (商標) 皿に注ぎ、ブ

レート当たり約20の外植片を置いた。3～4週間後に現れた苗条分裂組織を、苗条伸長培地（MS/B5ビタミン+2%スクロース+500mg/L MES+BAP（2μm）+GA-3（0.1μm）+0.8%寒天（pH5.8）、250mlの培養容器に注いだもの）に移し、培養物をこの培地内で1ラウンドの二次培養を間に挟んで4週間維持した。次いで、2～3cmの高さの苗条を、根の成長のために発根開始培地（1/2強度MS/B5ビタミン+1%スクロース+500mg/L MES+IBA（2.5μm）+0.6%寒天（pH5.8）、700ml培養容器に注いだもの）に移した。使用前2～3ラウンドの間、茎切断部として、発根した苗条を新鮮な発根開始培地中で3～4週間間隔で二次培養した。培養物を期間中ずっと16時間/日の光（30μmol m⁻² s⁻¹）で22℃で維持した。

10

【0312】

葉肉プロトプラストの単離および精製

インビトロ成長DH12075セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）植物を、葉肉プロトプラストを単離するための外植片源として使用した。プロトプラストを単離するために、3～4週齢の小植物からの第3から第4の上部の完全に開いた葉を、鋭いメスを用いてプロトプラスト単離用の小ストリップ（0.5～1mm）に切断した。250～500mgの葉材を、25mlの消化緩衝液（K4培地に溶解した1.2%（w/v）セルラーゼ「ONOZUKA（商標）」R10および0.2%（w/v）MACEROZYME（登録商標）R10（供給元—Duchefa））で処理することにより、酵素消化を行った（Spangenberg et al., 1998）。葉材および消化緩衝液を含有するPETRI（商標）皿を、PARAFILM（商標）で封止し、室温で12～15時間、暗所でインキュベートした。一晩のインキュベーション後、消化物をBD（登録商標）細胞濾過器（メッシュサイズ70μm）を通して濾過した。14mlの丸底管内に収集されたプロトプラスト懸濁液（5～6ml）の上に、1mlのW5洗浄緩衝液（154mM NaCl、125mM CaCl₂、5mM KClおよび5mMグルコース；pH5.8、Menzel et al.（1981））を重ねた。

20

【0313】

プロトプラスト懸濁液をさらに400RPMで10分間遠心分離した。遠心分離後、中間相中に浮遊するプロトプラストを採取し、10mlのW5緩衝液を使用した400RPMで10分間の遠心分離により洗浄した。最終洗浄後、単離されたプロトプラストを、W5緩衝液のml当たり1×10⁶プロトプラストの密度で再懸濁させ、トランスフェクション前に1時間インキュベートした。

30

【0314】

プロトプラストの収量および生存能力の評価

プロトプラストの収量を、Sambrook and Russell,（2006）の方法に従い、血球計を使用して評価した。細胞の生存能力を、Huang et al.（1996）により説明されるように、プロトコルにいくつか小さな修正を加えて、0.5Mのマニトールに溶解した400mg/LのEvansブルー染料を使用して試験した。

【0315】

PEG4000媒介DNA送達

セイヨウアブラナ（*B. napus*）プロトプラストへの送達前に、各ドナーおよびZFN構築物のプラスミドDNAを、大腸菌の培養物から、供給業者の説明に従いPURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM（登録商標）（Promega Corporation、Madison、WI）を使用して調製した。ドナーおよびZFNプラスミドDNAのアリコートは、1:1（30μgの各プラスミド）、5:1（ドナープラスミド対ZFNプラスミド、全部で30μgまでのプラスミドDNA）および10:1（ドナープラスミド対ZFN プラスミド、全部で30μgまでのプラスミドDNA）の3つのモル比で調製した。さらに、ドナーのみ、およびZFNのみのアリコート（30μg）を対照として調製した。PEG4000媒介形質転換によりセ

40

50

イヨウアブラナ (B. napus) プロトプラストに送達されたDNAの量を、表17に要約する。

【表17】

【表17】 プロトプラストに送達されたZFNおよびドナーDNAの量

	プラスミドDNAのモル比	100万プロトプラストに送達されたDNAの総量 (μg)
スプライシング	ドナープラスミドのみ	30
	ZFN プラスミドのみ (pDAB107827)	30
	1:1 ドナー:ZFN	60
	5:1 ドナー:ZFN	30
	10:1 ドナー:ZFN	30
編集	ドナープラスミドのみ	30
	1:1: ZFN プラスミド (pDAB107827 および pDAB107828)	30
	1:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	90
	5:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30
	10:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30

【0316】

プラスミドDNAの各アリオートを、100 μlの形質転換緩衝液 (15 mM MgCl₂、0.1% (w/v) モルホリノエタンスルホン酸 (MES) および0.5 M マンニトール; pH 5.8)、続いて150 μlのPEG溶液 (0.4 M マンニトールおよび0.1 M Ca(NO₃)₂ (pH 6~7) 中の40% (w/v) PEG 4000) に懸濁された100万プロトプラスト (生存率 ≥ 95) に適用した (Spangenberg and Potrykus (1995))。室温で10~15分のインキュベーション後、5 mlのW5緩衝液を滴下により添加し、プロトプラストを穏やかに混合した。プロトプラスト懸濁液に、さらに5 mlのW5緩衝液をゆるやかな流れとして添加した。プロトプラストを穏やかに混合し、400 RPMで10分間遠心分離し、W5上澄みを慎重に除去して、プロトプラストをペレットの形態で残した。次いで、トランスフェクトされたプロトプラストを、ビーズ型培養物中に埋没するまで、1 mlのW5緩衝液中で室温でインキュベートした。トランスフェクトされたプロトプラストを、後述のようにアルギン酸ナトリウム法に従って埋没させた。

【0317】

生存可能なマイクロカスを回収するための、葉肉由来プロトプラストの培養

トランスフェクトされたプロトプラストを埋没させる前に、400 RPMで10分間遠心分離し、W5緩衝液を慎重に除去した。次いで、プロトプラストを1.0 mlの0.5 M マンニトール中に再懸濁させ、氷上でインキュベートした。これに、等体積の1.0% アルギン酸ナトリウムを添加し、穏やかに混合した。プロトプラスト懸濁液を、埋没するまで氷上でインキュベートした。血清用ピペットを使用して、ビーズ形成溶液 (0.4 M マンニトール + 50 mM CaCl₂ (pH 5.8)) を、滅菌6ウェルプレートに移した (ウェル当たり3~4 ml)。1 mlピペットを使用して、正確に1.0 mlのプロトプラスト懸濁液をビーズ形成溶液に滴下により添加し、ウェル当たりそれぞれのトランスフェクトされた試料 (約5 × 10⁵ プロトプラスト) を埋没させた。プロトプラスト懸濁液を室温で1~2時間インキュベートして、アルギン酸ナトリウムビーズを形成した。インキュベーション期間後、ビーズ形成溶液を慎重に除去し、1.5 mg/Lのハイグロマイシンを添加したK3+H:A培地 (Spangenberg et al 1998) の1:2混合物4~5 mlと置き換えた。振とう機 (50 RPM) 内で、プロトプラスト

を22℃で3～4週間、暗所で培養した。3～4週間後、解重合緩衝液（0.3 Mマンニトール+20 mMクエン酸ナトリウム（pH 5.8））で処理することにより抵抗性マイクロカルス（0.5～1.0 mm）が放出された。液体培地を除去した後、3～4 mlの解重合緩衝液を、ビーズ型培養物を含有する各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。滅菌鉗子を使用してビーズを穏やかに混合し、マイクロカルスの効率的放出を促進した。次に、滅菌1.0 mlピペットを使用して、解重合緩衝液中に放出されたゲル化剤を穏やかに混合し、その後除去した。5 mlの液体A培地を使用してマイクロカルス（1 mlの沈殿細胞体積（SCV：これは全ての放出されたマイクロカルス）を滅菌50または15 mlファルコン管に移し、5分間沈殿させた後に測定された）に対し50 mlの液体Aを使用した）にマイクロカルスを再懸濁させた。マイクロカルスを均一に混合した後、液体A培地に懸濁した0.5 mlのマイクロカルスをB1培地（MS/MSビタミン+3.5%スクロース+500 mg/L MES+BAP（5 μm）+NAA（5 μm）+2,4-D（5 μm）+1.5 mg/Lハイグロマイシン+0.7%アガロースI型（pH 6.0）100×20 mm滅菌PETRI（商標）皿に注いだもの）に移し、1～2 mlの追加の液体A培地を使用して、マイクロカルスをB1培地内に均一に分布させ、過剰の液体A培地を各プレートから慎重に除去した。プレートをマイクロポアテープを使用して封止し、これにより胚成熟が促進された。培養物を16時間/日の光（30 μmol m⁻² s⁻¹）で22℃で維持した。

10

【0318】

葉肉由来プロトプラストからの苗条の増殖および再生

20

2～3週間のインキュベーション後、ハイグロマイシン抵抗性コロニーをB1培地（SAおよびSP法の両方から得られたマイクロカルス）から採取し、B2培地（MS/MSビタミン+3.0%スクロース+500 mg/L MES+500 mg/L PVP+5 mg/L硝酸銀+5 mg/L 2iP+NAA（0.5 μm）+GA-3（0.3 μm）+1.5 mg/Lハイグロマイシン+0.7%アガロースI型（pH 5.8）、100×20 mm滅菌PETRI（商標）皿に注いだもの）に移した。プレート当たり約25～30のカルスを置き、PARAFILM（商標）を使用してプレートを封止し、16時間/日の光（30 μmol m⁻² s⁻¹）で22℃でインキュベートした。その後、2週間間隔の5～6ラウンドのB2中での二次培養後に、ハイグロマイシン抵抗性コロニーを回収した。プレート当たりのカルスの数は、第3ラウンドの二次培養後に12～15に低減された。10～12週間後に現れた苗条原基を残留カルスと共に慎重に回収し、苗条伸長培地（MS/B5ビタミン+2%スクロース+500 mg/L MES+BAP（2 μm）+GA-3（0.1 μm）+300 mg/Lチメンチン+1.5 mg/Lハイグロマイシン+0.8%寒天（pH 5.8）、250 mlの培養容器に注いだもの）に移した。2～3ラウンドのハイグロマイシン選択後に生存した苗条を発根培地（1/2強度MS/B5ビタミン+1%スクロース+500 mg/L MES+IBA（2.5 μm）+1.5 mg/Lハイグロマイシン+0.6%寒天（pH 5.8）、700 ml培養容器に注いだもの）に移した。

30

【0319】

葉肉プロトプラストからのゲノムDNAの単離

40

トランスフェクトされたプロトプラストを、3 cm PETRI（商標）皿から2 mL微量遠心管に移した。細胞を70 gでの遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。トランスフェクトされたプロトプラストの回収を最大化するために、PETRI（商標）皿を1 mLの洗浄緩衝液で3回濯いだ。各濯ぎは、洗浄緩衝液をPETRI（商標）皿内で1分間旋回攪拌し、続いて液体を同じ2 mLの微量遠心管に移すことにより行った。各濯ぎの最後に、細胞を70 gでの遠心分離によりペレット化し、上澄みを除去した。ペレット化されたプロトプラストを液体窒素中で急速凍結してから、LABCONCO FREEZONE 4.5（登録商標）（Labconco, Kansas City, MO）内で-40℃および133×10⁻³ mBarの圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥された細胞を、製造者の説明に従いDNEASY（登録商標）PLANT D

50

NA EXTRACTION MINIキット (Qiagen) を使用してDNA抽出に供し (但し組織破壊は必要ではない)、プロトプラスト細胞を溶解緩衝液に直接添加した。

【0320】

カルス組織からのゲノムDNAの単離

個々のカルスを液体窒素中で急速凍結してから、LABCONCO FREEZONE 4.5 (登録商標) (Labconco、Kansas City、MO) 内で -40°C および $133 \times 10^{-3} \text{ mBar}$ の圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥されたカルスを、製造者の説明に従いDNEASY (登録商標) PLANT DNA EXTRACTION MAXIキット (Qiagen、Hilden、Germany) を使用してDNA抽出に供した。

10

【0321】

葉組織からのゲノムDNAの単離

再生された植物からの30mgの若い葉組織を液体窒素中で急速冷凍してから、LABCONCO FREEZONE 4.5 (登録商標) (Labconco、Kansas City、MO) 内で -40°C および $133 \times 10^{-3} \text{ mBar}$ の圧力で24時間フリーズドライした。凍結乾燥されたカルスを、製造者の説明に従いDNEASY (登録商標) PLANT DNA EXTRACTION MAXIキット (Qiagen、Hilden、Germany) を使用してDNA抽出に供した。

20

【0322】

Fad3CのNHEJ媒介スプライシングおよび編集のためのゲノムDNAのPCRアッセイ

セイヨウアブラナ (*B. napus*) のFad3C遺伝子に対するドナーDNAの組み込みの検出を、一連のPCRにより行ったが、少なくとも1つのプライマーはFad3C遺伝子座に特異的であり (表18)、第2のプライマーはgfpカセットのプロモーターまたはターミネーターのいずれかに特異的であった (表18および図28A)。最後の塩基対が、Fad3Cゲノム配列をFad3遺伝子の他のコピーから差別化するSNPに整列させ、アスタリスク (*) により示されるこの塩基対の前のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むオリゴヌクレオチドを設計することにより、特異性が得られた。この設計は、校正活性を有するポリメラーゼと組み合わせて使用すると、各Fad3CまたはFad3A対立遺伝子の特異的増幅を誘導し、述べたような他のFad3コピーを除外した。各プライマーセットは、野生型セイヨウアブラナ (*B. napus*) から得られたPCR増幅産物のサンガーベースの配列決定により、正しい遺伝子コピーの増幅に関して実験的に試験された。

30

【表 18】

【表 18】 ZFN誘導2本鎖切断へのDNAの組み込みを検出するために使用されたオリゴヌクレオチド配列

	プライマー名	プライマー配列	配列番号	特異性
1	FAD3CNHEJ-L4-F2	gattcctaagcattgttgggt*c	360	Fad3C のみ
2	FAD3CNHEJ-L4-R2	gaaaatctcatatcgaacgtgcg*t	361	Fad3C のみ
3	FAD3CNHEJ-L6-F1	cgcttaccctctctatctggta*a	362	Fad3C' も Fad3C' 'も増幅しない
4	FAD3CNHEJ-L6-R2	ccttgccctctgtaccaaggca*g	363	Fad3C のみ
5	19SPNHEJ-R2	gtgtgtgggaatcttatcttcgg	364	n/a
6	AtORF1NHEJ-F1	caagtcaggtattatagtccaagca	365	n/a
7	AtUbiNHEJ-R1	caagaatatcctgatccgttgac	366	n/a
8	AtORF23tNHEJ-F1	tggcagttgaaataactcaaacc	367	n/a
9	FAD3aCNHEJ-L4-F1	gtcctttgagatccatgagcta*t	368	Fad3A のみ
10	FAD3aCNHEJ-L4-F2	gattcctaagcattgttgggt*a	369	Fad3A のみ
11	FAD3aCNHEJ-L4-R1	tgcgttcaagaaatcaaagac*a	370	Fad3A のみ
12	FAD3aCNHEJ-L4-R2	gaaaatctcatatcgaacgtgcg*g	371	Fad3A のみ
13	FAD3aCNHEJ-L6-F1	tctggtaaatecctaattcct*c	372	Fad3A のみ
14	FAD3aCNHEJ-L6-R2	ccttgccctctgtaccaaggca*a	373	Fad3A のみ
15	FAD3aCNHEJ-L6-R1	cttgccctctgtaccaaggcaactt*c	374	Fad3C を除外する

*は、F a d 3 CまたはF a d 3 Aの特異的増幅を、述べたようなF a d 3の他のコピーの除外に誘導するホスホロチオエートヌクレオチド間連結（校正ポリメラーゼと共に）を示す。各プライマーセットは、野生型セイヨウアブラナ（*B. napus*）から得られたPCR増幅産物のサンガーベースの配列決定により、正しい遺伝子コピーの増幅に関して実験的に試験された。

【0323】

プロトプラストにおける非相同末端結合によるF a d 3 Cへの遺伝子付加の検出

ゲノムDNAを、機能性tGFPレポーターカセット（pDAS000341もしくはpDAS000343）をコードするドナーDNA、ZFN DNA（pDAB107827もしくはpDAB107828）またはドナーおよびZFN DNAの混合物が24時間前に送達されたプロトプラストプール（プール当たり100万プロトプラスト）から抽出した。形質転換のために送達されたDNAの量は、上述の通りである。PCR産物は、プラスミドベクターにクローニングされた。ゲノム編集は、プラスミドベクターへのクローニングにより、各細胞において独立して生じ、様々な異なる挿入イベントを引き起こし、各ゲノム編集は、明確に配列決定され得る。いくつかのクローンを、ABI3730XL（登録商標）自動化キャピラリー電気泳動プラットフォーム上で配列決定した。遺伝子配列の分析は、SEQUENCHER SOFTWARE V5.0（商標）（GeneCodes、Ann Arbor、MI）を使用して行った。

【0324】

編集またはスプライシングによる F a d 3 C 遺伝子座への遺伝子付加の証拠は、表 1 8 に記載のプライマーを使用してプロトプラストから抽出されたゲノム DNA からの、5' および 3' F a d 3 C カセット接合点の両方の増幅により提供された。プライマー「F A D 3 C N H E J - L 4 - F 2」および「A t U b i N H E J - R 1」による PCR 増幅の産物を、t G F P カセットおよび F a d 3 C の 5' 接合点を増幅するように完了した。プライマー「F A D 3 C N H E J - L 4 - R 2」および「A t O R F 2 3 t N H E J - F 1」による PCR 増幅は、t G F P カセットおよび F a d 3 C の 3' 接合点を増幅するように完了した。プライマー「F A D 3 C N H E J - L 4 - F 2」および「F A D 3 C N H E J - L 4 - R 2」による PCR 増幅は、Z F N 2 8 0 5 1 - 2 A - 2 8 0 5 2 により誘導された 2 本鎖切断にわたり増幅するように完了した。Z F N プラスミドまたはドナープラスミドのみが送達されたプロトプラストからは、増幅は観察されなかった。全ての接合点配列は、N H E J 媒介修復経路による F a d 3 C 遺伝子座における t G F P カセットの挿入を示した。ゲノムおよびカセットのいずれかまたは両方からの様々な長さの欠失が観察されると共に、ベクター骨格（ドナーまたは Z F N からの）に由来する配列の付加が、ゲノムとカセットとの間に挿入された。

10

【0325】

プロトプラストから再生されたカルス組織における非相同末端結合による F a d 3 C への遺伝子付加の検出

F a d 3 C 遺伝子座のスプライシングおよび編集のさらなる証拠は、h p h カセットをコードするドナー DNA (p D A S 0 0 0 3 4 0 もしくは p D A S 0 0 0 3 4 2)、Z F N DNA のみ (p D A B 1 0 7 8 2 7 もしくは p D A B 1 0 7 8 2 8) またはドナーおよび Z F N DNA が送達された（送達される DNA の量は表 1 7 に示される）選択後のプロトプラストから再生された（上述のように 1. 5 m g / L ハイグロマイシン）カルス組織から得られた。プロトプラストトランスフェクションから 4 週間後に、カルスが生存しなかった編集の 1 : 1 : 1 を除く各比に対して約 8 0 のカルスから DNA を抽出した。

20

【0326】

セイヨウアブラナ (B. n a p u s) ゲノムへの h p h カセットの組み込み (f w a t F a d 3 C または無作為) は、h p h 遺伝子に特異的なプライマー（配列番号：4 0 2 ; F - 5' C T T A C A T G C T T A G G A T C G G A C T T G 3'、配列番号：4 0 3 ; R - 5' A G T T C C A G C A C C A G A T C T A A C G 3'）およびプローブ（配列番号：4 0 4 ; 5' C C C T G A G C C C A A G C A G C A T C A T C G 3'）を使用した T A Q M A N（商標）q P C R により確認された。これらのプライマー-プローブ対を、A ゲノム上の単一コピーとして存在するセイヨウアブラナ (B. n a p u s) 高移動度群タンパク質 I / I (H M G I / Y) に特異的なプライマー（配列番号：4 0 5 ; F - 5' C G G A G A G G G C G T G G A A G G 3'、配列番号：4 0 6 ; R - 5' T T C G A T T T G C T A C A G C G T C A A C 3'）およびプローブ（配列番号：4 0 7 ; 5' A G G C A C C A T C G C A G G C T T C G C T 3'）を用いた二重反応において使用した (W e n g e t a l., 2 0 0 4, P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y R e p o r t e r)。増幅は、C 1 0 0 0 サーマルサイクラー上で、C F X 9 6 または C F 3 8 4 R E A L - T I M E P C R D E T E C T I O N S Y S T E M（商標）(B i o R a d、H e r c u l e s、C A) により行なった。C F X M A N A G E R（商標）(B i o R a d) ソフトウェアパッケージを使用して、結果を分析した。2^{-ΔΔCt} 法 (L i v a k a n d S c h m i t t g e n, 2 0 0 1) に従って相対的定量を計算したが、これはゲノムに挿入された h p h カセットのコピーの数の推定値を提供した。F a d 3 C の N H E J 媒介スプライシングおよび編集の証拠は、F a d 3 C に特異的な 1 つのプライマーおよび h p h カセットのプロモーターまたはターミネーターに特異的な第 2 のプライマーを用いて PCR アッセイを行うことにより得られた（表 1 7 および図 2 8 B）。カルス組織から得られる限定された量の DNA に起因して、センス方向における組み込みのみが分析された。PCR 産物は、Q I A Q

30

40

50

UICK MINIELUTE PCR PURIFICATION KIT (商標) (Qiagen) を使用してゲル精製され、直接的サンガー配列決定法を使用して配列決定された。配列決定する産物は、BIGDYE (登録商標) v3.1 プロトコル (Applied Biosystems) に従ってエタノール、酢酸ナトリウムおよび EDTA で精製され、上述のように配列決定および分析された。

【0327】

各実験におけるドナーカセットを含有するカルスの数を、表18に示す。編集および／またはスプライシングによる Fad3C 遺伝子座へのドナー遺伝子付加の証拠は、ZFN 切断部位、ならびに 5' および 3' Fad3C-hph カセット接合点の両方にわたる PCR 増幅 (プライマーは表19に示される) により提供された。hph プラスミド (pDAS000340 および pDAS000342) のみ、または ZFN プラスミド (pDAB107827 および pDAB107828) のみで形質転換された対照プロトプラストから回収されたカルス組織から単離されたゲノム DNA の PCR 増幅は、PCR 増幅産物の生成をもたらさなかった。

【0328】

5' および 3' Fad3C-hph カセット接合点の増幅から生成された PCR 単位複製配列をアガロースゲルから精製し、Fad3C ゲノム遺伝子座内の組み込みの特異性を確認するために配列決定した。PCR 産物の配列決定分析の結果は、個々に形質転換されたプロトプラストから生成されたそれぞれの単離されたカルスは、単一の PCR 増幅産物を生成するのみであり、混合遺伝子型の細胞を含有しないことを示した。

【0329】

Fad3C ゲノム遺伝子座内のドナー配列の NHEJ 媒介組み込み実験において、標的遺伝子座への付加の頻度 (標的遺伝子座から増幅されているドナー DNA ベクターの任意の部分により定義される) は、1:1、5:1、および 10:1 (ドナー DNA:ZFN DNA) の DNA 濃度に対してそれぞれ 42%、46% および 32% であった。表20を参照されたい。的確なスプライシングの頻度は、両方のカセット接合点が増幅可能であるかどうかを分析することにより、および PCR 産物の配列決定から決定された。これらの結果は、カセットが、正しい方向で標的遺伝子座に挿入されたことを実証した。組み込みの頻度は、1:1、5:1 および 10:1 のドナープラスミド DNA:ZFN プラスミド DNA 濃度に対して、それぞれ 4%、3% および 3% と計算された。遺伝子編集実験において、標的遺伝子座から増幅されているドナー DNA ベクターの任意の部分により定義される標的遺伝子座への付加の頻度は、5:1:1 および 10:1:1 のドナープラスミド DNA:ZFN プラスミド DNA 濃度に対してそれぞれ 66% および 65% であった。表21を参照されたい。的確な編集の頻度は、増幅可能であり、PCR 産物の配列を生成する両方のカセット接合点により決定される。これらの結果は、カセットが、5:1:1 および 10:1:1 のドナープラスミド DNA:ZFN プラスミド DNA 濃度に対してそれぞれ 3% および 6% の頻度で、正しい方向で標的遺伝子座に挿入されたことを実証した。プロトプラストアッセイにおいて観察されたように、ZFN によるゲノム遺伝子座の切断の結果、塩基対が欠失するか、または追加的な塩基がゲノムとカセットとの間に挿入された (図30~31)。

【0330】

ある特定の場合において、PCR 産物は、標的遺伝子座内のヌクレオチド配列の追加をもたらすか、PCR 産物がないか、または野生型試料において観察されたものより大きい PCR 産物が観察された。切断部位に隣接するプライマーを使用した PCR 増幅から生成されたこれらの結果は、染色体の両方の対において遺伝子座が妨害されたことを示していた (図30~31)。ある場合においては、スプライス接合点において2つ以上のバンドが増幅され (図30~31) たが、これは、異なる挿入がゲノムのそれぞれのコピーにおいて独立して生じたことを示している。

【表 19】

【表 19】 選択から 4 週間後の *hph* の存在について陽性であるカルスの数

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNA のモル比	採取されたカルスの数	選択から 4 週間後の <i>hph</i> について陽性であるカルスの数
pDAS000340 DAB107827	1:1	88	76
	5:1	88	35
	10:1	87	37
pDAS000342 DAB107827 DAB107828	1:1:1	—	—
	5:1:1	80	38
	10:1:1	79	52

10

【表 20】

【表 20】 ZFN28051-2A-28052により誘導されたDSBにおけるFadC遺伝子座でのスプライシングにより挿入された *hph* を有するカルスの数

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNA のモル比	選択から 4 週間後の <i>hph</i> について陽性であるカルスの数	少なくとも 1 つのスプライシング境界が増幅されたカルスの数	少なくとも 1 つの完全な*境界が増幅されたカルスの数	両方のスプライシング境界が増幅されたカルスの数
pDAS000340 + DAB107827	1:1	76	32	0	3
	5:1	35	16	0	1
	10:1	37	12	0	1

20

30

* 切断部位において塩基対が欠失していない、または追加の塩基対が挿入されていない

【表 2 1】

【表 2 1】 ZFN28051-2A-28052およびZFN28053-2A-28054により誘導された切断部位におけるFadC遺伝子座での編集により挿入されたhphを有するカルスの数

送達されたベクター	ドナー DNA:ZFN DNA のモル比	選択から 4 週間後の hph について陽性であるカルスの数	少なくとも 1 つのスプライシング境界が増幅されたカルスの数	少なくとも 1 つの完全な*境界が増幅されたカルスの数	両方の編集境界が増幅されたカルスの数
pDAS000342 +	5:1:1	38	25	2	1
DAB107827 + DAB107828	10:1:1	52	34	2	3

*切断部位において塩基対が欠失していない、または追加の塩基対が挿入されていない

【0 3 3 1】

植物における非相同末端結合によるFad3Cへの遺伝子付加の検出

プロトプラストから再生された植物からDNAを抽出し、栽培培地に移した（上述の通り）。回収された植物の過半数は、ドナーDNAにコードされたhphカセットのわずか1～2つのコピーを含有すると推定された。カルス組織について説明したのと同じ一連のアッセイ、およびカセットがアンチセンス方向に挿入された、またはドナーがFad3A遺伝子座で組み込まれたかを決定するためのアッセイにより、植物を分析した。

【表 2 2】

【表 2 2】 プロトプラストから再生された植物の推定コピー数。各比において、100万プロトプラストの3つのトランスフェクションが行われた。

送達されたベクター	ドナー DNA:ZFN DNA のモル比	1～2 コピーの hph を有する植物の数	3～4 コピーの hph を有する植物の数	5 以上のコピーの hph を有する植物の数
pDAS000340 DAB107827	1:1	28	10	22
	5:1	14	6	17
	10:1	24	12	10
pDAS000342 DAB107827 DAB107828	1:1:1	1	0	0
	5:1:1	22	7	10
	10:1:1	24	13	26
合計	---	109	48	85

【0 3 3 2】

hphカセットがいずれかの方向でFad3Cに挿入された的確なスプライシングの頻度は、1:1、5:1および10:1の濃度でのドナーDNA:ZFN DNAに対して、それぞれ51%、32%および56%であった（表 2 3）。これらの結果のうち、35

％、32％および50％（1：1、5：1および10：1）は、順方向に挿入された（表23）。

【0333】

hphカセットがいずれかの方向でFad3Cに挿入され、エリアが遺伝子座4から遺伝子座6に置き換えられた的確な編集の頻度は、5：1：1および10：1：1の濃度でのドナーDNA：ZFN DNA：ZFN DNAに対して、それぞれ2％および0％であった（表24）。さらに、両方のZFNが5：1：1で送達された場合、2％が遺伝子座4にスプライスされ、また10％が遺伝子座6にスプライスされ、また両方のZFNが10：1：1で送達された場合、10％が遺伝子座4にスプライスされ、15％が遺伝子座6にスプライスされた。

10

【0334】

得られたバンドは、完全な境界の数を決定するために配列決定され得る。さらに、植物を的外れの挿入に関してスクリーニングし、Fad3以外の部位でのhphの組み込みの頻度、およびFad3CではなくFad3Aにおける組み込みの頻度を決定することができる。

【表23】

【表23】 ZFN28051-2A-28052により誘導されたDSBにおけるFadC遺伝子座でのスプライシングにより挿入されたhphを有する植物の数

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNAのモル比	分析された植物の数 (hphに対して陽性)	少なくとも1つのスプライシング境界が増幅された植物の数 (順/逆/いずれか)	両方のスプライシング境界が増幅された植物の数 (順/逆/いずれか)
pDAS000340 +	1:1	60	21/23/31	4/7/8
	5:1	37	12/4/12	3/1/3
DAB107827	10:1	46	23/12/26	4/4/7

20

30

*切断部位において塩基対が欠失していない、または追加の塩基対が挿入されていない

【表 2 4】

【表 2 4】 ZFN28051-2A-28052およびZFN28053-2A-28054により誘導された切断部位におけるFadC遺伝子座での編集により挿入されたhphを有する植物の数

送達されたベクター	ドナー DNA:ZFN DNA:ZFN DNAの モル比	分析された植物 の数 (hph に対して 陽性)	少なくとも1つの スプライシング 境界が増幅され た植物の数 (順/逆/いずれ か)	両方の編集境界 が増幅された植 物の数 (順/逆/いずれ か)
pDAS000342 +	5:1:1	39	17/11/24	0/1/1
DAB107827 +	10:1:1	63	27/27/34	0/0/0
DAB107828				

*切断部位において塩基対が欠失していない、または追加の塩基対が挿入されていない

【0335】

実施例 8: Corn Event DAS-59132 への標的化組み込みおよびその妨害

遺伝子標的化のための内因性ゲノム遺伝子座の特性決定

Corn Event DAS-59132 のゲノム遺伝子座は、国際特許出願第 WO 2009/100188A2 号に記載されている。Corn Event DAS-59132 は、Cry34Ab1、Cry35Ab1、および PAT 導入遺伝子発現カセットを含む。これらの導入遺伝子発現カセットは、全長 T 鎖挿入物として、Hi-II トウモロコシ生殖質の B73 トウモロコシゲノム由来領域の染色体 8 に組み込まれた (D. D. Songstad, W. L. Petersen, C. L. Armstrong, American Journal of Botany, Vol. 79, pp. 761-764, 1992)。さらに、トランスジェニック遺伝子座の周囲のゲノム DNA は、天然 B73 配列に比べ任意の大きな欠失を有さず、一般に、単一の小さな反復要素以外の反復要素を含まない。

【0336】

Corn Event DAS-59132 が組み込まれたゲノム遺伝子座は、遺伝子標的化のための内因性ゲノム遺伝子座として選択された。この内因性ゲノム遺伝子座の選択は、Corn Event DAS-59132 の特性決定に基づいた。このイベントは、内因性ゲノム遺伝子座への T 鎖の組み込み、およびその後の 3 つの導入遺伝子発現カセットの発現から得られた。さらに、Corn Event DAS-59132 を含むトウモロコシ植物の正常な成長および発達の改変は最小限であった。イベントは、農業および育種特性を維持し、農業上の性能において非形質転換対照植物に匹敵した。

【0337】

本開示の実施形態は、導入遺伝子の組み込みのために標的化され得るポリヌクレオチド配列を含む。Corn Event DAS-59132、ゲノム隣接配列の 3' 末端、および PHI17662A/3' トウモロコシゲノム接合点を形質転換するために使用された全長 DNA 分子 (PHI17662A) が、国際特許出願第 WO 2009/100188A2 号の開示において説明され、この出願においてそれぞれ配列番号: 427、配列番号: 428 および配列番号: 429 として開示された。ゲノム隣接配列の 5' 末端、および Corn Event DAS-59132 がトウモロコシゲノムに組み込まれたゲ

ノム遺伝子座は、この出願においてそれぞれ配列番号：430および配列番号：431として開示されている。配列番号：431として列挙されるゲノム遺伝子座を使用して、遺伝子標的化のためのジンクフィンガータンパク質を設計した。

【0338】

Corn Event DAS-59132に対するゲノム遺伝子座を結合させるように設計されたジンクフィンガータンパク質の生成

Corn Event DAS-59132に対するゲノム遺伝子座を含むDNA配列に対して指向性であるジンクフィンガータンパク質（図32を参照されたい）を、前述のように設計した。例えば、Urnov et al. (2005) Nature 435:646-651を参照されたい。例となる標的配列および認識ヘリックスを、表25A（認識ヘリックス領域設計）および表25B（標的部位）に示す。表25Bにおいて、ZFP認識ヘリックスに接触する標的部位におけるヌクレオチドは大文字で示されている。

【表25A】

【表25A】 Corn Event DAS-59132結合ジンクフィンガー設計に対する遺伝子座

ZFP 番号	F1	F2	F3	F4	F5
25716	RSDDLK 配列番号 533	QSGSLTR 配列番号 534	RSDNLRE 配列番号 535	QSGDLTR 配列番号 158	DTGARLK 配列番号 536
25717	RSADRKT 配列番号 537	DRSHLSR 配列番号 538	TSGNLTR 配列番号 143	RSDDLRS 配列番号 539	QSANRTK 配列 番号 540

【表25B】

【表25B】 ジンクフィンガータンパク質に対する標的配列

ジンクフィンガー番号	配列番号	標的配列
25686	432	caCAACAAGACTGCGGGTtcggtggcgc
25687	433	gaTAGGTGGCAGTGGCAgtggcactggc
25688	434	taTCGGCACAACAAGACTgcggttcgg
25689	435	tgGCAGTGGCAGTGGCActggcacggca
25692	436	caGCAGATGAGcGGAGCGatcgatcgcg
25693	437	caGTGGATAGAGCAGCGttggccgttg
25710	438	agGAAGCCGGCGGTGAAtgtcgccgtgt
25711	439	cgTCGCCAcTCGGCACAaggetcatcag
25712	440	atCGGGCATCGGCGACTgatgagccttg
25713	441	gaTCAACGGAAGCGGATGGCccgcttct
25716	442	tgATCGCAcCGGGCATCGcgactgatg
25717	443	cgGAAGCGGATGGCCCGcttcttagaa

【0339】

Corn Event DAS-59132ジンクフィンガー設計は、CCHC構造を有する少なくとも1つのフィンガーを有するタンパク質をコードするベクターに組み込まれた。米国特許公開第2008/0182332号を参照されたい。特に、各タンパク質における最後のフィンガーは、認識ヘリックスのCCHC骨格を有していた。非正準ジンクフィンガーコード化配列を、IIS型制限酵素FokIのヌクレアーゼドメイン（Wa

h et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 95:10564-10569の配列のアミノ酸384~579)に、4アミノ酸Z
Cリンカーおよびトウモロコシ (Zea mays) に由来するopaque-2核局在
化シグナルを介して融合させ、Corn Event DAS-59132ジンクフィン
ガーヌクレアーゼ (ZFN) を形成した。Shukla et al. (2009)
Nature 459:437-441において説明されるような、2Aリボソーム断続
シグナルを使用した2シストロン性発現構築物における融合タンパク質の発現は、CsV
MVプロモーター等の比較的強力な構成的および異所性プロモーターにより主導される。

【0340】

以前に活性ヌクレアーゼを同定することが示された出芽酵母ベースの系を使用して、最
適なジンクフィンガーを切断活性について検証した。例えば、米国特許公開第20090
111119号; Doyon et al. (2008) Nat Biotechnol. 26:702-708; Geurts et al. (2009) Scien
ce 325:433を参照されたい。様々な機能性ドメインに対するジンクフィンガー
を、インビボでの使用のために選択した。設計され、生成され、推定Corn Event
DAS-59132ゲノムポリヌクレオチド標的部位への結合が試験された数々のZ
FNのうち、4つの対のZFNは、高レベルでインビボ活性を有するものとして特定され
、さらなる実験に選択された。表25Aを参照されたい。これらのZFNは、植物体内で
4つの固有のCorn Event DAS-59132ゲノムポリヌクレオチド標的部位
を効率的に結合および切断することができると特徴付けられた。

【0341】

図1は、4つのZFN対のZFNポリヌクレオチド結合/標的部位に対する、Corn
Event DAS-59132遺伝子座のゲノム構成を示す。第1の3つのZFN対
(E32 ZFN1、E32 ZFN2、およびE32 ZFN3)は、Corn Ev
ent DAS-59132 T鎖挿入物の上流側に結合し、第2の3つのZFN対(E
32 ZFN4、E32 ZFN5、およびE32 ZFN6)は、Corn Ev
ent DAS-59132 T鎖挿入物の下流側に結合する。出芽酵母アッセイにおいてZ
FN対を試験した後、Corn Event DAS-59132遺伝子座に最適に結合
したZFN対を、一時的トウモロコシ形質転換アッセイにおける試験に進めた。

【0342】

トウモロコシにおける発現のためのジンクフィンガーヌクレアーゼ構築物

実施例2に記載のように酵母アッセイを使用して同定された、4つの例となるジンクフ
ィンガーヌクレアーゼのZFN発現構築物を含有するプラスミドベクターを設計し、当該
技術分野において一般的に知られている技術および技法を使用して完成させた。各ジンク
フィンガーコード化配列を、ジンクフィンガーヌクレアーゼの上流側に位置するopaq
ue-2核局在化シグナルをコードする配列に融合させた(Maddaloni et
al. (1989) Nuc. Acids Res. 17(18):7532)。

【0343】

次に、opaque-2核局在化シグナル::ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合配列
を、相補的opaque-2核局在化シグナル::ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合配
列と対にした。したがって、各構築物は、Thosea asignaウイルスからの2
A配列により隔てられた2つのopaque-2核局在化シグナル::ジンクフィンガー
ヌクレアーゼ 融合配列を含む単一オープンリーディングフレームからなっていた(Ma
ttion et al. (1996) J. Virol. 70:8124-812
7)。ZFNコード化配列の発現は、高発現性の構成的なトウモロコシ (Zea may
s) ユビキチン1プロモーターにより主導され(Christensen et al.
(1992) Plant Mol. Biol. 18(4):675-89)、ト
ウモロコシ (Zea mays) Per 5 3' ポリA非翻訳領域が隣接した(米国
特許第6, 699, 984号)。得られた4つのプラスミド構築物は、制限酵素消化およ
びDNA配列決定により確認された。図33および34は、完成されたプラスミド構築物

の図形表現を示す。プラスミド構築物、pDAB105906（図33）内に発現したZFNは、野生型FokIエンドヌクレアーゼである「Fok-Mono」を含有する。プラスミド構築物、pDAB111809（図34）内に発現したZFNは、修飾されたFokIエンドヌクレアーゼである「FokI-ELD」を含有する。修飾されたFokIエンドヌクレアーゼは、Doyon Y., Vo T., Mendel M., Greenberg S., Wang J., Xia D., Miller J., Urnov F., Gregory P., and Holmes M. (2010) Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architecture. *Nature Methods*, 8(1); 74-79 に記載のような変更を含有する。

10

【0344】

ドナー構築物は、Corn Event DAS-59132ゲノム遺伝子座のZFN切断ゲノムDNAに組み込まれるように設計された。図35は、単一遺伝子発現カセットからなるドナー構築物、pDAB100655を示す。この単一遺伝子発現カセットは、トウモロコシ（Zea mays）ユビキチン1プロモーター（Zm Ubi1プロモーター）：：aad-1コード化配列（AAD1；米国特許第7,838,733号）：：により主導され、トウモロコシ（Zea mays）Per 5'3'非翻訳領域（ZmPer 5'3'UTR）により終端される。構築物は、aad-1遺伝子発現カセットの下流側に含まれる反復E32 ZFN6結合配列の対を含有する。様々な遺伝子要素が、高いコピー数のpUCベースプラスミドでアセンブルされた。

20

【0345】

ZFN効率を決定するためのトウモロコシの一時的形質転換

トウモロコシHi-II胚発生培養物を、米国特許第7,179,902号に記載のように生成し、異なるZFNの効率を評価および試験するために使用した。pDAB105901、pDAB105902、pDAB105903、pDAB105904、pDAB105905およびpDAB105906からなるプラスミドDNAを、トウモロコシカルス細胞に一時的に形質転換して、米国特許出願第2011/0119786号に記載のようにトウモロコシゲノム内のイノシトールポリリン酸2-キナーゼ遺伝子座に対して設計された標準的な被試験ZFN、pDAB7430に対する異なるZFNの切断頻度を比較した。

30

【0346】

培養物から、事前に凍結保存された細胞株からの12mLの充填細胞容積（PCV）および28mLの馴化培地を、500mLエルレンマイヤーフラスコ内で、80mLのGN6液体培地（N6培地（Chu et al., (1975) *Sci Sin.* 18:659-668）、2.0mg/L 2,4-D、30g/Lスクロース、pH6.0）中で二次培養し、28℃で125rpmの振とう機上に設置した。このステップは、全部で36mLのPCVが3つのフラスコにわたり分配されるように、同じ細胞株を使用して2回繰り返した。24時間後、内容物を滅菌PETRI（商標）皿内に注ぎ、GN6液体培地を除去した。若干湿らせたカルスを、濾紙を含有するGN6 S/M固体培地（N6培地（Chu et al., (1975) *Sci Sin.* 18:659-668）、2.0mg/L 2,4-D、30g/Lスクロース、45.5g/Lソルビトール、45.5g/Lマンニトール、100mg/L myo-イノシトール、2.5g/Lゲルライト、pH6.0）上の直径2.5cmの円に移した。プレートを、28℃で4時間、暗所でインキュベートした。

40

【0347】

金マイクロ粒子（0.6ミクロン、BioRad、Hercules、CA）を、21mgを滅菌シリコン処理1.7mL微小遠心管（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）内に量り取ることによりDNA沈殿用に調製し、350μLの氷冷100%エタノールを添加し、1分間ボルテックスした。MINISPIN（商標）遠心分

50

離機 (E p p e n d o r f、H a u p p a u g e、N Y) を使用した 10,000 rpm で 15 秒間の遠心分離により、金をペレット化した。上澄みを除去した後、350 μ L の氷冷滅菌水を添加し、ピペットで吸引および排出して混合し、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した。洗浄ステップをもう一度繰り返してから、金を 350 μ L の氷冷滅菌水に懸濁させた。次いで、洗浄された金を、必要となるまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

【0348】

各 DNA 沈殿において、シリコン処理 1.7 mL 微小遠心管 (S i g m a - A l d r i c h、S t. L o u i s、M O) 内に、50 μ L 水中 3 mg の金を等分した。プラスミド DNA (2.5 μ g のプラスミド p D A B 105901、p D A B 105902、p D A B 105903、p D A B 105904、p D A B 105905 または p D A B 105906 内の E32 ZFN および 2.5 μ g のプラスミド p D A B 7430 内の I P P K 2 ZFN) を、0.6 mL 微小遠心管 (F i s h e r S c i e n t i f i c、N a z a r e t h、P A) 内で事前に混合し、金懸濁液に添加して、ピペットにより穏やかに 5 ~ 10 回吸引および排出し、完全に混合した。次いで、20 マイクロリットル (20 μ L) の低温 0.1 M スペルミジンを添加し、ピペットにより穏やかに 5 ~ 10 回吸引および排出することにより混合した。50 マイクロリットル (50 μ L) の氷冷 2.5 M 塩化カルシウムをゆっくりと添加し、ピペットにより穏やかに 5 ~ 10 回吸引および排出することにより混合した。次いで、管に蓋をし、室温で 10 分間インキュベートした。10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した後、上澄みを慎重に除去し、60 μ L の氷冷 100% エタノールを添加した。ピペットにより穏やかに 5 ~ 10 回吸引および排出することにより、金 DNA 混合物を再懸濁させた。

【0349】

マイクロ粒子照射のために、滅菌マクロキャリア (B i o R a d、H e r c u l e s、C A) をステンレススチールホルダ (B i o R a d、H e r c u l e s、C A) に装着し、オートクレーブ処理した。9 マイクロリットル (9 μ L) の金/DNA 懸濁液を、アリコート間で懸濁液の十分な混合が維持されるように確実にピペットにより吸引および排出しながら、マクロキャリアの中央に均一に伸ばした。次いで、マクロキャリアを、140 $\times$ 25 mm のガラス P E T R I (商標) 皿内の 8 メッシュ D R I E R I T E (商標) (W. A. H a m m o n d D r i e r i t e C o.、X e n i a、O H) のベッド上の滅菌 125 mm W h a t m a n #4 濾紙 (G E H e a l t h c a r e、B u c k i n g h a m s h i r e、U K) の切片上に置いた。金/DNA を、約 5 ~ 10 分間完全に乾燥させた。ラプチャーディスク (1100 p s i、B i o R a d、H e r c u l e s、C A) を、イソプロピルアルコール中に数秒間浸漬することにより殺菌し、次いで、マイクロ粒子照射デバイス (P D S - 1000、B i o R a d、H e r c u l e s、C A) の保持キャップ内に装填した。オートクレーブ処理した停止スクリーン (B i o R a d、H e r c u l e s、C A) および装填されたマクロキャリアを、発射アセンブリ内に設置し、蓋をねじ込み、ノズルの真下にある照射チャンバ内にスライドさせた。標的を含有する P E T R I (商標) 皿のカバーを取り、ノズルから 6 cm 下の照射チャンバ内に設置した。真空に引き (-0.9 バール)、デバイスを作動させた。ブラストされる各標的に対し、ステップを繰り返した。同じブラスト培地上で、標的を 28 $^{\circ}$ C の温度で 24 時間暗所でインキュベートした。ブラストされた細胞を、回収 G N 6 固体回収培地 (N 6 培地 (C h u e t a l., (1975) S c i S i n. 18:659-668)、2.0 mg/L 2, 4-D、30 g/L スクロース、2.5 g/L ゲルライト、pH 6.0) に移し、さらに 28 $^{\circ}$ C で 48 時間、暗所でインキュベートした。照射から 72 時間後、細胞を 2 mL の E P P E N D O R F M I C R O F U G E S A F E L O C K T U B E S (商標) 内に採取し、V I R T I S M O D E L # 50 L V I R T U A L X L - 70 L Y O P H I L I Z E R (商標) (S P S c i e n t i f i c、G a r d i n e r N Y) 内で 48 時間凍結乾燥した。

【0350】

一時的に形質転換されたトウモロコシの次世代配列決定 (N G S) 分析

10

20

30

40

50

一時的に形質転換されたトウモロコシカルス組織を分析して、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質の切断効率を決定した。

【0351】

試料調製

ZFN構築物および2つの対照ベクター、pDAB100664およびpDAB100665で一時的に形質転換されたトウモロコシカルス組織を、2mLのEPPENDORF（商標）管に収集し、48時間凍結乾燥した。製造者の仕様書に従い、QIAGEN PLANT DNA EXTRACTION KIT（商標）（Valencia, CA）を使用して、凍結乾燥された組織からゲノムDNA（gDNA）を抽出した。単離されたgDNAを200μlの水に再懸濁し、NANODROP（登録商標）分光光度計（Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用して濃度を決定した。0.8%アガロースエーゲル（Invitrogen）上で全ての試料を泳動することにより、DNAの完全性を推定した。全てのgDNA試料は、PCR増幅のために正規化し（25ng/μl）、ILLUMINA（商標）配列決定（San Diego, CA）により分析される単位複製配列を生成した。

10

【0352】

それぞれの試験されたZFN切断部位および対照試料にわたるゲノム領域の増幅のためのPCRプライマーは、Integrated DNA Technologies（Coralville, IA）から購入した。プライマーの最適な増幅条件は、23.5μLの反応物中の0.2μMの適切なプライマー、ACCUPRIME PFX SUPERMIX（商標）（1.1X, Invitrogen）および100ngのテンプレートゲノムDNAを使用したグラジエントPCRにより特定された。サイクリングパラメータは、95℃（5分）における最初の変性に続く、35サイクルの変性（95℃、15秒）、アニール（55～72℃、30秒）、伸長（68℃、1分）および最終伸長（72℃、7分）であった。増幅産物を、3.5%TAEアガロースゲル上で分析した。最適アニール温度を特定した後、各セットのPCRプライマーを検証するため、およびILLUMINA（商標）配列決定単位複製配列を生成するために、調製PCR反応を行った。

20

【0353】

調製PCRのために、上述の条件を使用して各テンプレートに対し8つの個々の小規模PCR反応を行い、得られたPCR産物を一緒にプールし、製造者の推奨に従いQIAGEN MINELUTE GEL EXTRACTION/PURIFICATION KIT（商標）を使用して3.5%アガロースゲル上でゲル精製した。ゲル精製された単位複製配列の濃度を、NANODROP（商標）により決定し、ILLUMINA（商標）配列決定試料を、ZFN標的化および対応する野生型対照からの約100ngのPCR単位複製配列をプールすることにより調製した。PCR単位複製配列生成に使用されたプライマーを、以下の表26に示す。

30

【表 2 6】

【表 2 6】 ZFN結合部位の増幅のためのオリゴヌクレオチド

Corn Event DAS- 59132 ジンクフィン ガー番号	方向/ 配列番号	プライマー配列
25686/25687 および 25688/25689	順方向//配列番 号 444	5' -CAGGCAGCGCCACCGAAC-3'
	逆方向//配列番 号 445	5' -CGATCGATCGCGTGCCGT-3'
256892/256893	順方向//配列番 号 446	5' -CTGGCACGGCACGCGATC-3'
	逆方向//配列番 号 447	5' -CGGAGATCCGGCCCCAAC-3'
25710/25711	順方向//配列番 号 448	5' -GACACGGCACACACGGCG-3'
	逆方向//配列番 号 449	5' -TCGGGCATCGGCGACTGA-3'
25712/25713 および 25716/25717	順方向//配列番 号 450	5' -ACTCGGCACAAGGCTCAT-3'
	逆方向//配列番 号 451	5' -CCTGTGCCAATTCTAAAG-3'
9149/9215	順方向//配列番 号 452	5' -GCAGTGCATGTTATGAGC-3'
	逆方向//配列番 号 453	5' -CAGGACATAAATGAACTGAATC-3'

【0 3 5 4】

ILLUMINA（商標）配列決定および分析：

ZFNを、トランスジェニックCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内の特定のDNA配列を認識、結合および修飾するように設計した。4つのZFNがゲノム遺伝子座を切断する効率を分析して、どのZFNが最も効率的に切断したかを決定した。ILLUMINA（商標）配列決定は、Cofactor Genomics（St. Louis, MO）において行われ、配列分析スクリプトを使用して配列が分析された。低品質の配列はフィルタにより除去し、固有DNA配列識別子に従った配列を解析した。次いで、固有DNA配列識別子を参照配列と整列させ、挿入／欠失（インデル）についてスコア化した。切断活性のレベルを決定するために、ZFN切断部位の周囲の領域を、INDELから得られた配列改変体の存在についてスコア化した。研究における各ZFNの切断活性は、インデルを有する配列／1M高品質配列の数として、またはインデルを有する高品質配列のパーセントとして計算された。次に、米国特許公開第2011/0119786号に記載のIPP2-K遺伝子に指向されたZFNの活性で切断活性のZFNレベルを正規化することにより、切断効率のレベルが決定された。図36および表27は、試験されたZFNの切断効率を示す。

【0 3 5 5】

25716および25717ジンクフィンガー結合ドメインを含有するEvent 32 ZFN6は、トランスジェニックCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座を最も高い効率で切断した。このZFNは、対照IPPK2ジンクフィンガー

ヌクレアーゼの380倍の効率で機能した。Event 32 ZFN6の驚異的に高いレベルの切断活性を考慮して、このZFNは、非相同末端結合によるゲノム遺伝子座へのドナーDNA断片の組み込みの試験に進むために選択された。

【表27】

【表27】 試験されたeZFNの切断効率

E32 ZFN 番号	% IPPK2 ZFN 活性
「686/687」として示される 25686/25687	32
「688/689」として示される 25688/25689	108
「712/713」として示される 25712/25713	69
「716/717」として示される 25716/25717	380

10

【0356】

プロトプラストにおけるZFNの形質転換

20

Corn Event DAS-59132の内因性ゲノム遺伝子座を標的化し、トウモロコシにおけるドナー標的化パラメータを最適化するために、遺伝子標的化のためのシステムを確立した。Corn Event DAS-59132におけるゲノム内に2本鎖切断を形成し、非相同末端結合（NHEJ）または相同性依存的修復（HDR）により修復した。

【0357】

プロトプラスト単離：

トウモロコシHi-II胚発生懸濁培養物を得、3.5日維持スケジュールで維持した。50mLの滅菌円錐管内で、10mLの滅菌6%（w/v）セルラーゼ溶液および10mLの滅菌0.6%（w/v）ペクトリナーゼ酵素溶液を、10mLピペットチップを使用して円錐管内に滴下した。次に、消化溶液を含有する50mLの管内に4充填細胞容積（PCV）のHi-II懸濁細胞を添加し、パラフィルムで包装した。管をプラットフォームロッカー上に一晩室温で約16～18時間置いた。翌朝、管を振とう機から取り出した。滅菌50mL円錐管内で、細胞および酵素溶液を100μm細胞濾過器を通してゆっくりと濾過した。次に、100μm細胞濾過器を使用して、濾過器を通して10mLのW5培地を滴下することにより、細胞を濯いだ。滅菌50mL円錐管内で、細胞および酵素溶液を70μm細胞濾過器を通してゆっくりと濾過した。この濾過ステップに続いて、第2の濾過ステップを行い、40μm細胞濾過器を通して細胞および酵素溶液を50mL円錐管内にゆっくりと濾過した。10mLピペットチップを使用して、40μm細胞濾過器を10mLのW5培地で濯いで40mLの最終体積とし、管を反転させた。非常にゆっくりと、8mLのスクロースクッションをプロトプラスト/酵素溶液の底に添加した。スイングアーム式バケットロータを備える遠心分離機を使用して、管を1500rpmで15分間回転させた。5mLの狭口径ピペットチップを使用して、プロトプラスト細胞を除去した。プロトプラストペーンとして観察されるこれらの細胞（7～8mL）を非常にゆっくりと除去し、滅菌50mL円錐管内に入れた。次に、25mLのW5培地を使用して、管を洗浄した。W5培地を添加し、管をゆっくりと反転させ、1500rpmで10分間遠心分離した。上澄みを除去し、10mLのMMG溶液を添加し、管をゆっくりと反転させてプロトプラストペレットを再懸濁させた。血球計を使用してプロトプラストの密度を決定し、4PCVで約3000万のプロトプラストが得られた。

30

40

【0358】

50

プロトプラスト形質転換：

MMG溶液を使用してプロトプラスト細胞をm l 当たり1 6 0 万のプロトプラストに希釈した。管をゆっくりと反転させることにより、プロトプラストを静かに再懸濁させた。次に、3 0 0 μ L のプロトプラスト（約5 0 0 k のプロトプラスト）を滅菌2 m L 管に添加し、管を反転させてプロトプラスト細胞を均一に分布させた。T E 緩衝液中に懸濁させた約4 0 ~ 8 0 μ g の濃度のプラスミドD N A を、プロトプラストに添加した。異なる実験条件を、表2 8 に記載する。管をゆっくり回転させてD N A とプロトプラストを懸濁させ、管を室温で5 ~ 1 0 分間インキュベートした。次に、3 0 0 μ L のP E G 溶液をプロトプラスト／D N A 溶液に添加した。全てのP E G 溶液が添加されたら、管を静かに反転させることによりP E G 溶液をプロトプラスト溶液と混合した。定期的に管（複数可）を反転させながら、カクテルを室温で1 5 ~ 2 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、1 m L のW 5 溶液を管にゆっくりと添加し、管を静かに反転させた。最後に、溶液を1 0 0 0 r p m で1 5 分間遠心分離した。細胞ペレットを乱さないように、上澄みを慎重に除去した。最後に、1 m L の洗浄／インキュベーション溶液を添加した。管を静かに反転させて、細胞ペレットを再懸濁させた。管をアルミニウム箔で覆っていかなる光への曝露も排除し、管の側面を下にしてラック上に置き、一晩インキュベートした。形質転換から2 4 時間後、分子分析のために細胞を採取した。

【表 2 8】

【表 2 8】 異なる処理群を、プロトプラスト細胞の形質転換に使用した。形質転換に使用した異なる濃度のDNAを、以下に記載する。

処理群	ドナーDNA pDAB100651 (μg)	E32 ZFN6 pDAB105906 (μg)	pUC19 フィ ラー (μg)	サケ精子 DNA フィラ ー (μg)	全 DNA (μg)
E32 ドナーのみ+酵 素対照なし(フィラ ー1)	pDAB100651 (40 μg)	N/A (0 μg)	pUC19 (40 μg)	N/A (0 μg)	80
E32 ドナーのみ+酵 素対照なし(フィラ ー2)	pDAB100651 (40 μg)	N/A (0 μg)	N/A (0 μg)	ssDNA (40 μg)	80
E32 ドナーのみの対 照(フィラーなし)	pDAB100651 (40 μg)	N/A (0 μg)	N/A (0 μg)	N/A (0 μg)	40
E32 ZFN6 のみの対 照(ドナーなし)フ ィラー1	N/A (0 μg)	pDAB105906 (4 μg)	pUC19 (76 μg)	N/A (0 μg)	80
E32 ZFN6 のみの対 照(ドナーなし)フ ィラー2	N/A (0 μg)	pDAB105906 (4 μg)	N/A (0 μg)	ssDNA (76 μg)	80
E32 ZFN6 wt FokI のみの対照(ドナー なし) フィラーな し	N/A (0 μg)	pDAB105906 (40 μg)	N/A (0 μg)	N/A (0 μg)	40
E32 ZFN6 wt FokI+E32 ドナー (1:10)フィラー1	pDAB100651 (40 μg)	pDAB105906 (4 μg)	pUC19 (36 μg)	N/A (0 μg)	80
E32 ZFN6 wt FokI+E32 ドナー (1:10)フィラー2	pDAB100651 (40 μg)	pDAB105906 (4 μg)	N/A (0 μg)	ssDNA (36 μg)	80

【0 3 5 9】

標的化の配列検証

上述の次世代配列決定プロトコルを使用して、トウモロコシプロトプラストにおける ZFN 切断活性の結果を確認した。配列決定された PCR 増幅断片を、インデルから得られた配列改変体の存在に関してスコア化した。Event 32 ZFN6 は、トランスジェニック Corn Event DAS-59132 のゲノム遺伝子座を、約 1.5% の NHEJ/10ng の標的化単位複製配列で切断した。

【0 3 6 0】

非相同末端結合 (NHEJ) を介した Hi-IT 1 トウモロコシトランスジェニック細胞懸濁液中のトランスジェニック Corn Event DAS-59132 のゲノム遺伝子座への AAD-1 ドナーカセットの標的化を、インーアウト PCR 反応により確認した。第 1 の PCR 反応が AAD-1 ドナーおよびトランスジェニック Corn Event DAS-59132 のゲノム遺伝子座の接合点を増幅するように設計されたインーアウ

トPCR反応を完了させた。得られた単位増幅配列を、プライマーが第1の単位増幅配列内で内部的に結合するように設計された第2のPCR反応に供した。2つの独立したPCR反応の組み合わせは、偽陽性となり得るバックグラウンド増幅の除去をもたらした。プロトプラスト形質転換実験のインーアウトPCRの結果は、トランスジェニックCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座が、DNA (pUC19プラスミドDNAまたはサケ精子DNAを含むフィラーDNAを含む、および含まない) の1:10 μg の比で、5.3 kb AAD1プラスミドドナーおよびE32 ZFN6ジンクフィンガーヌクレアーゼで再現可能に標的化され得ることを示した。NH EJ法による標的化は、両方向でのAAD-1ドナーカセットの挿入により明らかとなった。PCR反応から生成された配列データは、3例のドナーDNAの完全な組み込みをもたらした。したがって、NH EJ-DSB修復機構による、ZFNを使用した内因性トウモロコシ遺伝子座へのドナー標的化を実証することができた。

10

【0361】

標的化組み込みのためのZFNおよびドナーのWHISKERS (商標) 媒介安定形質転換

トランスジェニックイベントを、Corn Event DAS-59132の内因性ゲノム遺伝子座に標的化した。実施例2に記載の構築物は、ドナー配列 (pDAB100655) およびEvent 32 ZFN 6 (pDAB105906) を含む。

【0362】

事前に凍結保存された細胞株からの12 mLの充填細胞容積 (PCV) および28 mLの馴化培地からなるトウモロコシカルス細胞を、500 mLエルレンマイヤーフラスコ内で、80 mLのGN6液体培地 (N6培地 (Chuet al., (1975) Sci Sin. 18:659-668)、2.0 mg/Lの2, 4-D、30 g/Lスクロース、pH 5.8) 中で二次培養し、28°Cで125 rpmの振とう機上に設置した。このステップは、全部で36 mLのPCVが3つのフラスコにわたり分配されるように、同じ細胞株を使用して2回繰り返した。24時間後、GN6液体培地を除去し、72 mLのGN6 S/M浸透培地 (N6培地、2.0 mg/L 2, 4-D、30 g/Lスクロース、45.5 g/Lソルビトール、45.5 g/Lマンニトール、100 mg/L myo-イノシトール、pH 6.0) で置き換えた。フラスコを、適度に攪拌しながら (125 rpm)、28°Cで30~35分間暗所でインキュベートした。インキュベーション期間中、炭化ケイ素WHISKERS (商標) (Advanced Composite Materials, LLC、Greer、SC) の50 mg/mL懸濁液を、8.1 mLのGN6 S/M液体培地を405 mgの滅菌炭化ケイ素WHISKERS (商標) に添加することにより調製した。

20

30

【0363】

GN6 S/M浸透培地中でのインキュベーション後、各フラスコの内容物を250 mL遠心ボトル内にプールした。フラスコ内の全ての細胞が底に沈殿した後、約14 mLのGN6 S/M液を上回る内容物体積を取り出し、将来の使用のために滅菌1 Lフラスコ内に回収した。事前に湿潤させたWHISKERS (商標) の懸濁物を、ボルテックス上で最大速度で60秒間混合し、次いで遠心ボトルに加えた。

40

【0364】

この例において、159 μg のpDAB100655 (ドナー配列) および11 μg のpDAB10506 (ZFN) プラスミドDNAを各ボトルに加えた。プラスミドDNAを添加したら、改良されたRED DEVIL 5400 (商標) 商用塗料混合器 (Red Devil Equipment Co., Plymouth、MN) 内にボトルを速やかに設置し、10秒間攪拌した。攪拌後、細胞、培地、WHISKERS (商標) およびプラスミドDNAのカクテルを、125 mLの新鮮なGN6液体培地と共に1 Lフラスコの内容物に添加し、浸透圧調節物質を低減した。細胞を、125 rpmに設定された振とう機上で2時間回復させた。6 mLの分散懸濁液を、ボトル当たり60のフィルタが得られるように、家庭用真空ラインに接続されたガラスセル回収器ユニットを使用して、

50

Whatman #4濾紙(5.5cm)上で濾過した。フィルタをGN6固体培地(2.5g/Lのゲルライトゲル化剤以外GN6液体培地と同じ)の60×20mmプレート上に置き、28℃で1週間、暗所条件下で培養した。

【0365】

Corn Event DAS-59132ゲノム遺伝子座内に組み込まれた推定標的化イベントの特定および単離

DNA送達から1週間後、選択剤を含有するGN6(1H)選択培地(N6培地、2.0mg/L 2,4-D、30g/Lスクロース、100mg/L myo-イノシトール、2.5g/Lゲルライト、pH5.8)の60×20mmプレートに、濾紙を移した。これらの選択プレートを、28℃で1週間、暗所でインキュベートした。暗所で1週間
10
の選択後、各プレートからの細胞の1/2を、37~38℃に保持された3.0mLのGN6アガロース培地(N6培地、2.0mg/L 2,4-D、30g/Lスクロース、100mg/L myo-イノシトール、7g/L SEAP LAQUE(登録商標)アガロース、pH5.8、121℃で10分間オートクレーブ処理された)を含む管内にかき出すことにより、組織を新鮮な培地上に埋没させた。

【0366】

アガロース/組織混合物をスパチュラにより破壊し、その後3mLのアガロース/組織混合物を、GN6(1H)培地を含有する100×25mm PETRI(商標)皿の表面上に均一に注いだ。このプロセスを各プレートの半分の両方に対して繰り返した。全ての組織が埋没したら、プレートを28℃で10週間まで、暗所条件下でインキュベートした。これらの選択条件下で成長した推定形質転換分離株を、埋没したプレートから取り出し、60×20mmプレート内の新鮮な選択培地に移した。約2週間後に持続的な成長が明らかである場合、イベントは、適用した除草剤(選択剤)に抵抗性であると見なされ、その後遺伝子型分析のために細胞のアリコート采取了。この例において、処理された6つのボトルから24のイベントが回収された。Corn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内のAAD-1遺伝子の組み込みを確認するために、これらのイベントを分子分析に進めた。

【0367】

Corn Event DAS-59132ゲノム遺伝子座のNHEJ標的化の分子分析

上述のようにWHISKERS(商標)媒介形質転換から回収された24のイベントを、いくつかの異なる分子確認ツールを使用して分析した。分析の結果、Corn Event DAS-59132ゲノム遺伝子座内に組み込まれた1コピーのAAD-1導入遺伝子を含有するイベントが特定された。まず、24の様々なイベントが、1コピーのAAD-1導入遺伝子を含有することを確認し、次に、イベントを、1コピーのAAD-1導入遺伝子を示唆するCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座がNHEJによりトウモロコシ細胞のゲノム内に組み込まれたかどうかを決定するために分析した。Corn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内に1コピーのAAD-1導入遺伝子を含有することが特定されたイベントを、さらにイン-アウトPCRおよびサザンブロット反応により確認した。これらのアッセイにより、イベントが、NHEJ
40
機構によりCorn Event DAS-59132ゲノム遺伝子座内に組み込まれた1コピーのAAD-1導入遺伝子を含有することが確認された。

【0368】

DNA抽出：製造者の推奨に従い、QIAGEN BIOSPRINT 96(商標)DNA単離キットを使用して、凍結乾燥されたトウモロコシカルス組織からDNAを抽出した。自動化抽出のために事前に定義されたプログラムを使用し、DNAを200μlの1:1 TE緩衝液/蒸留水中に溶出した。2マイクロリットル(2μL)の各試料を、THERMOSCIENTIFIC NANODROP 8000(商標)上で定量し、QIAGEN BIOROBOT 3000(商標)を使用して試料を100ng/μLに正規化した。正規化されたDNAを、さらなる分析まで4℃で保存した。

10

20

30

40

50

【0369】

コピー数推定：TAQMAN（登録商標）アッセイに類似した加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子コピー数決定を、LIGHTCYCLER（登録商標）480システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を使用したリアルタイムPCRにより行った。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）Probe Design Software 2.0を使用して、AAD-1および内部標準遺伝子インペルターゼ用に設計された増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480 Probes Masterミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を、0.4 μMの各プライマーおよび0.2 μMの各プローブを含有する10 μL体積多重反応物中の最終濃度×1で調製した（表29）。蛍光捕捉により、60℃で40秒間の伸長で2段階増幅反応を行った。リアルタイムPCRコピー数データの分析は、相対定量モジュールを使用してLIGHTCYCLER（登録商標）ソフトウェアリリース1.5を使用して行い、またΔΔCt法に基づく。このため、単一コピー標準物質および既知の2コピーチェックからのgDNAの試料が、各試行に含まれた。

【表29】

【表29】 AAD1および内部標準（Inv）の加水分解プローブアッセイのためのプライマー／プローブ配列。

プライマー名	配列	検出
GAAD1F	配列番号 454; 5' TGTCGGTCCCTCTACCA 3'	---
GAAD1R	配列番号 455; 5' CAACATCCATCACCTTGACTGA 3'	---
GAAD1R	配列番号 456 ; 5' CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA 3'	FAM
IVF-Taq	配列番号 457 ; 5' TGGCGGACGACGACTTGT 3'	---
IVR-Taq	配列番号 458; 5' AAAGTTTGGAGGCTGCCGT 3'	---
IV-Probe	配列番号 459; 5' CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC 3'	HEX

【0370】

Corn Event DAS-59132 ゲノム遺伝子座妨害アッセイ：

Corn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座妨害アッセイを、LIGHTCYCLER（登録商標）480システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を使用したリアルタイムPCRにより行った。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）Probe Design Software 2.0を使用して、Event 32 ZFN6（25716/25717）がCorn Event DAS-59132 遺伝子座のゲノム配列、および内部標準遺伝子IVFに結合および切断する特異性を監視するように設計された。増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480 Probes Masterミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を、0.4 μMの各プライマーおよび0.2 μMの各プローブを含有する10 μL体積多重反応物中の最終濃度×1で調製した（表30）。蛍光捕捉により、55℃で30秒間の伸長で2段階増幅反応を行った。標的対標準比を使用して、妨害アッセイのための分析を行った（図37）。8つのイベントのうち4つが、Corn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座に組み込まれたAAD-1導入遺伝子を含有するものとして特定された。Corn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内のAAD-1導入遺伝

子の組み込みを確認するために、Event 100655/105906 [1] - 001、Event 100655/105906 [5] - 013、Event 100655/105906 [5] - 015、およびEvent 100655/105906 [3] - 018からなるイベントを、さらなる分子分析に進めた。

【0371】

Corn Event DAS-59132 遺伝子座特異的インーアウトPCR：

NHEJによるCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内のAAD-1ドナーの挿入は、2つの方向のうちの1つで生じ得る。AAD-1導入遺伝子の組み込みおよびこの組み込みの方向を、インーアウトPCRアッセイで確認した。インーアウトPCRアッセイは、Corn Event DAS-59132 標的配列のゲノム遺伝子座に結合するように設計された「アウト」プライマーを使用する。さらに、「イン」プライマーは、AAD-1ドナー配列に結合するように設計された。これらのプライマーを使用して完了された増幅反応は、標的部位に挿入されたドナー遺伝子のみを増幅した。得られたPCR単位複製配列は、2つのプライマーから生成され、挿入の接合点にわたる配列からなっていた。各試料に対して、2セットのインーアウトPCRプライマーが1つの反応に多重化され、2つの異なる方向のうちの1つで生じ得るNHEJ媒介ドナー挿入を検出するために使用された。陽性および陰性対照がアッセイに含まれた。2つの陽性対照プラスミド、pDAB100664およびpDAB100665を構築して、2つの異なる方向のうちの1つでのCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座におけるドナー挿入をシミュレートした。

【0372】

蛍光検出能力を有するサーモサイクラー上でリアルタイムで増幅を検出するために、DNA挿入染料SYTO-13をPCRミックス中に使用した。さらに、融点(T_m)分析プログラムを通常のPCRプログラムに組み合わせ、増幅産物とそのT_mプロファイルについて分析され得るようにした。未知試料と陽性対照試料との間のT_mプロファイルにおける類似性は、未知試料が陽性対照と同じ増幅産物を有することを強く示唆している。PCR反応は、10 ngのテンプレートゲノムDNA、0.2 μMのdNTP、0.2 μMの順方向および逆方向プライマー、4 μMのSYTO-13ならびに0.15 μlのEx Taq HSを使用して行った。反応は2つのステップで完了したが、第1のステップは、94℃(2分)での1サイクル、ならびに98℃(12秒)、66℃(30秒)および68℃(1.3分)での35サイクルからなり、第2のステップは、60~95℃に続く65℃(30秒)および72℃(10分)を含むT_mプログラムであった(表30)。単位複製配列を配列決定に送り、AAD-1遺伝子がCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座内に組み込まれたことを確認した。

【0373】

ABIソフトウェアを使用して、リアルタイムインーアウトPCR単位複製配列の結果を可視化した。これらの結果は、単位複製配列を1.2%TAEゲル上で泳動したゲルシフトアッセイを使用してさらに確認された。推定される単位複製配列サイズは、第1の方向(pDAB100664のように)において約1.8 kbであり、第2の方向(pDAB100665のように)において2 kbであった。ゲルシフトアッセイの結果により、リアルタイム、インーアウトPCR反応データが確認された。両方のデータのセットは、1コピーのAAD-1導入遺伝子がNHEJによりCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座においてトウモロコシ細胞のゲノム内に組み込まれたことを示唆していた。

【表 3 0】

【表 3 0】 トウモロコシ細胞におけるCorn Event DAS-59132での
NHE J 媒介標的化を検出するためのイン-アウトPCRのプライマー

プライマー 名	配列	推定単位複製配列 サイズ/対照
E32-3R2 NJ-AAD1- Pri2	順方向プライマー配列番号 460 5' GCC CTT ACA GTT CAT GGG CG 3' 逆方向プライマー配列番号 461 5' GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A 3'	1.8 kB pDAB100664
E32-5F1 NJ-AAD1- Pri2	順方向プライマー配列番号 462 5' ACA AAC ACG TCC TCC AAG GCT 3' 逆方向プライマー配列番号 463 5' GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A 3'	2.0 kB pDAB100665

10

【0374】

サザンブロット分析：サザンブロットアッセイを使用して、上で特定されたトウモロコシカルスイベントをさらにスクリーニングした。このアッセイは、AAD-1 導入遺伝子がNHEJによりCorn Event DAS-59132のゲノム遺伝子座においてトウモロコシ細胞のゲノム内に組み込まれたことをさらに確認するために使用した。サザンブロット分析実験により、大豆ゲノム内のAAD-1 導入遺伝子の組み込みおよび完全性を実証するデータが生成された。

20

【0375】

DNA抽出：それぞれの個々のイベントから採取されたカルス組織から、ゲノムDNAを抽出した。まず、組織試料を2mL管に収集し、2日間凍結乾燥した。KLECO TISSUE PULVERIZER（商標）およびタングステンビーズ（Kleco、Visalia、CA）を用いて、組織浸軟を行った。組織浸軟後、製造者の提案するプロトコルに従いDNEASY PLANT MINI KIT（商標）（Qiagen、German town、MD）を使用してゲノムDNAを単離した。

30

【0376】

サザンブロット：QUANT-IT PICO GREEN DNA ASSAY KIT（商標）（Molecular Probes、Invitrogen、Carlsbad、CA）を使用して、ゲノムDNA（gDNA）を定量した。定量したgDNAを、サザンブロット分析のために4μgに調節した。次いで、NcoI制限酵素（New England Biolabs、Ipswich、MA）を使用して37℃で一晩DNA試料を消化させ、続いて、製造者の提案するプロトコルに従いQUICK-PRECI P（商標）（Edge BioSystem、Gaithersburg、MD）を使用して清浄化した。DNAを1×染料に再懸濁させ、低温の部屋で、0.8% SEAKEM LE AGAROSE GEL（商標）（Lonza、Rockland、ME）上で110ボルトで5時間電気泳動させた。ゲルを変性させ、中和し、次いでナイロン荷電膜（Millipore、Bedford、MA）に一晩移し、UV STRATA LINKER 1800（商標）（Stratagene、La Jolla、CA）を使用してDNAを膜に架橋させ、ブロットを20mLのPERFECTHYB PLUS（商標）（Sigma、St. Louis、MO）でプレハイブリダイズした。製造者の提案するプロトコルに従いPRIME-IT RMT RANDOM（商標）（Stratagene、La Jolla、CA）を使用して、226bpプローブ（配列番号：464）を標識化し、製造者の提案するプロトコルに従いPROBE QUANT G-

40

50

50 MICRO COLUMNS (商標) (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) を使用して精製した。約 20,000,000 cpm の標識化プローブをロットに添加し、一晚インキュベートした。ロットを、洗浄当たり 15 分間、2 回洗浄し、蛍光体画像スクリーン上に 24 時間置き、STORM 860 SCANNER (商標) (Molecular Dynamics) により分析した。

【0377】

NcoI 消化およびプローブによる推定および観察された断片サイズは、既知の制限酵素部位 AAD-1 および Corn Event DAS-59132 に基づいてサザンブロットから得られた。これらの消化およびハイブリダイゼーションから、2 つの DNA 断片を特定した。約 2.9 および 5.5 kb のサイズのバンドを有する結果を生成したサザンブロットは、AAD-1 導入遺伝子が、NHEJ 機構により Corn Event DAS-59132 のゲノム遺伝子座に組み込まれたことを示していた。

10

【0378】

実施例 9： トウモロコシ操作ランディングパッドの標的化組み込みおよび妨害 ELP ゲノム標的配列の特性決定

操作されたランディングパッド (ELP) が組み込まれた遺伝子座を、遺伝子標的化のための内因性ゲノム遺伝子座として選択した。ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質に加え、ジンクフィンガー結合部位 (eZFN1 および eZFN3)、ならびにジンクフィンガー結合部位に隣接する約 1.0 kb の無作為人工配列を含む ELP 配列の構築は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第 WO2011091317 号に記載されている。ELP 遺伝子座内の NHEJ 媒介標的化組み込みを試験するために、2 つのドナー DNA を構築し、それらは共に、除草剤ハロキシホップに対する耐性を付与する aad-1 遺伝子を含む 5.3 kb プラスミド内の 2 つの eZFN 結合部位のうちの 1 つを含有する。図 38 は、組み込みの代表的な概略図を示す。

20

【0379】

ELP を含むトランスジェニック植物イベントの再生

pDAB100640、pDAB100641 および pDAB106685 (各 ELP に対し 2 つ) の形質転換から生成された 4 つのトランスジェニック ELP イベントを、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第 WO2011091317 号に記載のように生成した。イベントが得られ、単一コピーであり、ELP を含有する無傷 PTU を含有することが確認された。これらのイベントを再生して、標的化のためのドナー材料を生成した。健康な成長組織をまず 28 (1H) (MS 培地 (Murashige and Skoog (1962) Physiol Plant 15:473-497)、0.025 mg/L 2,4-D、5 mg/L BAP、1.0 mg/L Herbicide、30 g/L スクロース、2.5 g/L ゲルライト、pH 5.7) に移し、低光量下 ($14 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{秒}$ 16 時間光周期) で 7 日間、続いて高光量下 ($89 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{秒}$ 16 時間光周期) でさらに 7 日間インキュベートした。緑化構造を、28 (1H) から BAP および 2,4-D を抜いたものと同じである 36 (1H) に移し、苗条構造が温室への移植に十分な根を発達させるまで、高光量下 ($40 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{秒}$ 16 時間光周期) でインキュベートした。95% METRO-MIX 360 (登録商標) および 5% クレイ/ローム土のミックスを使用して、植物を温室内で成熟するまで成長させ、植物の健康に依存して受粉させた。活発に成長した植物を自家受粉または同種交配させ (同じイベントからの植物)、より活発でない植物を Hi-II または A188 と交配させて、ドナー材料の胚発生能を維持した。T₁ 種を 4 インチの鉢に植え、発芽した実生を接合性について qPCR によりスクリーニングした。PAT 遺伝子に対しホモ接合性であると決定された実生を、5 ガロンの鉢に移し、生殖期まで成長させ、Hi-II に異種交配させ、T₂ 胚を NHEJ 媒介組み込みによる標的化に使用した。

30

40

【0380】

ELP プロトプラストの NHEJ 標的化

トウモロコシ (Zea mays) Hi-II プロトプラストを入手し、前述のプロト

50

プラスト形質転換プロトコルを使用して形質転換した。p D A B 1 0 0 6 5 1 のドナープラスミド DNA を、p D A B 1 0 5 9 4 1 の Z F N プラスミド DNA で形質転換した。同様に、p D A B 1 0 0 6 5 2 のドナープラスミド DNA を、p D A B 1 0 5 9 4 3 の Z F N プラスミド DNA で形質転換した。ドナー DNA を、ジンクフィンガーヌクレアーゼで E L P トランスジェニック植物に形質転換した。ドナー DNA および e Z F N の導入後、ゲノム標的 DNA 内に組み込まれたドナー DNA および E L P 遺伝子座の両方を切断した。その後、ドナー DNA をゲノム標的に挿入した。E L P ゲノム遺伝子座内のドナー DNA の挿入は、いずれの方向においても生じ得る。順方向でのドナー DNA の挿入は、Z F N 切断から生成された 4 b p の 1 本鎖相補末端の推定されるアニールおよび連結に対応する接合点配列をもたらず。接合点における挿入および欠失（インデル）は一般的である。逆方向でのドナー DNA の挿入は、インデルを含有する両方の接合点部分をもたらず。

10

【0381】

プロトプラスト単離：トウモロコシ H i - I I 胚発生懸濁培養物を得、3. 5 日維持スケジュールで維持した。50 mL の滅菌円錐管内で、10 mL の滅菌 6 % (w/v) セルラーゼ溶液および 10 mL の滅菌 0. 6 % (w/v) ペクトリナーゼ酵素溶液を、10 mL ピペットチップを使用して円錐管内に滴下した。次に、消化溶液を含有する 50 mL の管内に 4 充填細胞容積 (P C V) の H i - I I 懸濁細胞を添加し、パラフィルムで包装した。管をプラットフォームロッカー上に一晚室温で約 16 ~ 18 時間置いた。翌朝、管を振とう機から取り出した。滅菌 50 mL 円錐管内で、細胞および酵素溶液を 100 μ m 細胞濾過器を通してゆっくりと濾過した。次に、100 μ m 細胞濾過器を使用して、濾過器を通して 10 mL の W5 培地を滴下することにより、細胞を濯いだ。滅菌 50 mL 円錐管内で、細胞および酵素溶液を 70 μ m 細胞濾過器を通してゆっくりと濾過した。この濾過ステップに続いて、第 2 の濾過ステップを行い、40 μ m 細胞濾過器を通して細胞および酵素溶液を 50 mL 円錐管内にゆっくりと濾過した。10 mL ピペットチップを使用して、40 μ m 細胞濾過器を 10 mL の W5 培地で濯いで 40 mL の最終体積とし、管を反転させた。非常にゆっくりと、8 mL のスクロースクッションをプロトプラスト/酵素溶液の底に添加した。スイングアーム式バケットロータを備える遠心分離機を使用して、管を 1500 rpm で 15 分間回転させた。5 mL の狭口径ピペットチップを使用して、プロトプラスト細胞を除去した。プロトプラストベーンとして観察されるこれらの細胞 (7 ~ 8 mL) を非常にゆっくりと除去し、滅菌 50 mL 円錐管内に入れた。次に、25 mL の W5 培地を使用して、管を洗浄した。W5 培地を添加し、管をゆっくりと反転させ、1500 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みを除去し、10 mL の MMG 溶液を添加し、管をゆっくりと反転させてプロトプラストペレットを再懸濁させた。血球計を使用してプロトプラストの密度を決定し、4 P C V で約 3000 万のプロトプラストが得られた。

20

30

【0382】

プロトプラスト形質転換：MMG 溶液を使用してプロトプラスト細胞を mL 当たり 160 万のプロトプラストに希釈した。管をゆっくりと反転させることにより、プロトプラストを静かに再懸濁させた。次に、300 μ L のプロトプラスト (約 500 k のプロトプラスト) を滅菌 2 mL 管に添加し、管を反転させてプロトプラスト細胞を均一に分布させた。T E 緩衝液中に懸濁させた約 80 μ g の濃度のプラスミド DNA を、プロトプラストに添加した。Z F N およびドナープラスミド構築物の両方を形質転換した。e Z F N 発現プラスミド (p D A B 1 0 5 9 4 1 および p D A B 1 0 5 9 4 3) を、e Z F N 1 および e Z F N 3 処理のそれぞれにおいて、単体またはドナー DNA (p D A B 1 0 0 6 5 1 および p D A B 1 0 0 6 5 2) 対 e Z F N DNA の 1 : 1 もしくは 10 : 1 比の組み合わせで添加した。e Z F N の有効性は以前に試験されており、国際特許出願第 WO 2011091317 号においてより詳細に説明されており、図 39 は、ドナー DNA に対する e Z F N の表現として示されている。管をゆっくり回転させて DNA とプロトプラストを懸濁させ、管を室温で 5 ~ 10 分間インキュベートした。次に、300 μ L の P E G 溶液をプロトプラスト/DNA 溶液に添加した。全ての P E G 溶液が添加されたら、管を静かに反転させることにより P E G 溶液をプロトプラスト溶液と混合した。定期的に管 (複数可)

40

50

を反転させながら、カクテルを室温で15～20分間インキュベートした。インキュベーション後、1 mLのW5溶液を管にゆっくりと添加し、管を静かに反転させた。最後に、溶液を1000 rpmで15分間遠心分離した。細胞ペレットを乱さないように、上澄みを慎重に除去した。最後に、1 mLの洗浄／インキュベーション溶液を添加した。管を静かに反転させて、細胞ペレットを再懸濁させた。管をアルミニウム箔で覆っていかなる光への曝露も排除し、管の側面を下にしてラック上に置き、一晚インキュベートした。形質転換から24時間後、NHEJ媒介DNA修復により組み込まれたドナーを含有するELP遺伝子座を特定する分子分析のために細胞を採取した。

【表31】

【表31】 トウモロコシ細胞内に形質転換され、ELP遺伝子座内に組み込まれたeZFNおよびドナープラスミドDNAのDNA濃度

処理群	ドナー DNA (pDAB)	量 (μg)	eZFN (pDAB)	量 (μg)	フィラ ー プラ スミド (μg)	全 DNA (μg)
eZFN1 ドナーのみ	100651	40	---	---	40	80
eZFN1 のみ	---	---	105941	40	40	80
eZFN1 ドナー +eZFN1 (1:1)	100651	40	105941	40	0	80
eZFN1 ドナー +eZFN1 (10:1)	100651	40	105941	4	36	80
---	---	---	---	---	---	---
eZFN3 ドナーのみ	100652	40	---	---	40	80
eZFN3 のみ	---	---	105943	40	40	80
eZFN3 ドナー +eZFN3 (1:1)	100652	40	105943	40	0	80
eZFN3 ドナー +eZFN3 (10:1)	100652	40	105943	4	36	80

【0383】

プロトプラストにおけるNHEJによるトウモロコシELP標的化の分子確認

DNA抽出：Qiagen BIOSPRINT 96（商標）ロボットを使用して、自動化によりトウモロコシ組織からDNAを抽出し、DNAを200 μlの1:1 TE緩衝液／蒸留水中に溶出した。各試料のDNAを、THERMOSCIENTIFIC NANODROP 8000（商標）上で定量し、QIAGEN BIOROBOT 3000（商標）を使用して試料を100 ng／μLに正規化した。正規化されたDNAを、さらなる分析まで4℃で保存した。

【0384】

ELP遺伝子座妨害アッセイ：24時間の時点でプロトプラストを採取した後、DNAを抽出し、妨害アッセイ、PCRを使用した接合点分析、および接合点PCRにより生成されたDNAの配列決定を使用して分析した。妨害アッセイは、相対的eZFN切断活性の間接的測定法である。TAQMAN（商標）ベースアッセイは、末端の連結後に生じ得るDNA末端の不適切な修復に起因することが推定されるような、標的DNAにおける無傷eZFN結合部位の喪失を決定する。

【0385】

TAQMAN（商標）ベースアッセイからのデータは、eZFN1が、eZFN3よりも高い活性を有すること、またさらに、ドナー単体試料と比較したeZFN試料におけるシグナルの統計的に有意な低減により実証されるように、eZFNによる標的DNAの有意な切断があることを示唆している。

【0386】

eZFNによるゲノム標的DNAの切断。示されるように、各処理群（それぞれ6つの反復実験試料）からDNAを単離した。Taqmanアッセイを使用して、標的DNAの切断を測定した。LIGHTCYCLER（登録商標）480システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を使用して、リアルタイムPCRによりELP遺伝子座妨害アッセイを行った。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）Probe Design Software 2.0を使用して、ELP1内のeZFN1およびeZFN3結合配列ならびに内部標準遺伝子IVFを監視するように設計された。増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480 Probes Masterミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を、0.4 μMの各プライマーおよび0.2 μMの各プローブを含有する10 μL体積多重反応物中の最終濃度×1で調製した（表33）。蛍光捕捉により、55℃で30秒間の伸長で2段階増幅反応を行った。標的対標準比を使用して、妨害アッセイのための分析を行った。プライマーの場所を、図40に示す。

【表33】

【表33】 妨害アッセイのためのプライマーおよびプローブ配列

プライマー名	配列	検出
MAS622	配列番号 471; 5' TAGGAGTCTCTTTATGCCACCC 3'	---
MAS621	配列番号 472; 5' CCTTGGGATTTTCAGTTGGTAGGTT 3'	---
UPL67 プローブ	Roche Biosciences、Indianapolis、IN から入手	FAM
IVF-Taq	配列番号 473; 5' TGGCGGACGACGACTTGT 3'	---
IVR-Taq	配列番号 474 ; 5' AAAGTTGGAGGCTGCCGT 3'	---
IV-プローブ	配列番号 475; 5' CGAGCAGACCGCCGTGACTTCTACC 3'	HEX

【0387】

遺伝子座特異的インーアウトPCR：NHEJ媒介修復を使用した推定ELP部位でのドナー挿入は、2つの異なる方向で生じ得る。2つの陽性対照プラスミド、pDAB100660およびpDAB100662を構築し、植物内に形質転換して、ELP部位内のドナー挿入をシミュレートした。pDAB100660およびpDAB100662対照構築物で生成されたトランスジェニック植物を、インーアウトPCR設計を使用してアッセイし、インーアウトPCRアッセイのための条件を、これらの植物材料に対して決定した。

【0388】

インーアウトPCRアッセイはELP配列内に「アウト」プライマーを有し、一方「イン」プライマーはドナー配列内に位置し、ドナーが標的部位に挿入された時のみ2つのプライマーが挿入の接合点にわたる配列を増幅するようにする（表34）。各試料に対して、2つの異なる方向を有するドナー挿入を検出するために、2つのインーアウトPCR反応を使用した。陽性および陰性対照がアッセイに含まれた。

【0389】

蛍光検出能力を有するサーモサイクラー上でリアルタイムで増幅を検出するために、DNA挿入染料SYTO-13をPCRミックス中に使用した。さらに、融点（Tm）分析プログラムを通常のPCRプログラムに組み合わせ、増幅産物とそのTmプロファイルについて分析され得るようにした。未知試料と陽性対照との間のTmプロファイルの類似性

は、未知試料が陽性対照と同じ増幅産物を有することを強く示唆している。リアルタイム、インーアウトPCRアッセイにおいて特定された陽性標的化試料を、ゲルシフト分析を使用してさらに可視化した。推定される単位複製配列サイズは、方向1（pDAB100662のように）において約1.5 kbであり、方向2（pDAB100660のように）において約1.4 kbである。

【表34】

【表34】 トウモロコシにおけるELP1でのNHEJ媒介標的化を検出するためのインーアウトPCRのプライマー

プライマー名	配列	推定される単位複製配列サイズ/対照
ELP1-PriF1	配列番号 476 5' AGA CCT ACC ACC CAT TAG GGC 3'	1.5 kb
NJ-AAD1-Pri2	配列番号 477 5' GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A 3'	pDAB100662
NJ-AAD1-Pri2	配列番号 478 5' GAC CAA GTC CTT GTC TGG GAC A 3'	1.4 kb
ELP2-PriR1	配列番号 479 5' GAT GGT GGT TAT GAC AGG CTC CT 3'	pDAB100660

【0390】

PCR反応は、10 ngのテンプレートゲノムDNA、0.2 μMのdNTP、0.2 μMの順方向および逆方向プライマー、4 μMのSYTO-13ならびに0.15 μlのEx Taq HSを使用して行った。反応は2つのステップで完了したが、第1のステップは、94℃（2分）での1サイクル、ならびに98℃（12秒）、66℃（30秒）および68℃（1.3分）での35サイクルからなり、第2のステップは、60～95℃に続く65℃（30秒）および72℃（10分）を含むTmプログラムであった。ABIソフトウェアを使用して、および1.2% TAEゲル上で泳動することにより、産物を可視化した。

【0391】

ドナーDNAのみ、eZFNのみ、またはドナーDNAおよびeZFN DNA（1：1もしくは10：1のいずれかの比）を含むドナー処理のNHEJ指向性標的化のeZFN1およびeZFN3に対するインーアウトPCR接合点分析を、アガロースゲル上で行った。結果は、ドナーおよびeZFN DNAのPCR単位複製配列サイズが、NHEJ標的化イベントに対して推定されるものであることを示した。

【0392】

標的／ドナー接合点の配列：インーアウトPCR分析により確認されたELP標的化イベントから、PCR単位複製配列産物を配列決定により確認し、標的ドナー接合点を、標準サンガー配列決定により検証した。簡潔に説明すると、各処理群の全ての反復実験試料に対して接合PCR分析を行った。PCRプライマーは、順方向または逆方向のいずれかである挿入接合点配列の片側を増幅するように選択された。PCR産物は、eZFNおよびドナーDNA試料から生成された試料において観察されたが、ドナーDNA単体またはeZFN単体試料を含む対照試料から生成された試料においては観察されなかった。PCR産物は、使用したeZFNおよびドナーDNAの両方の比からの反復実験試料の過半数において明らかであった。

【0393】

PCR産物の代表的試料をクローニングおよび配列決定した。順方向および逆方向の両方に対し、4つの異なる反応からのPCR産物の配列を図41に示す。接合末端への不適切な修復から推定されるように、順方向の挿入物について、9つの固有ハプロタイプが観察された。16の配列のうち3つが、挿入されたドナーDNAおよび標的配列の無傷末端

のアニールおよび連結から推定される配列に整列した。ドナーDNAおよび標的DNAの一本鎖末端は相補的ではないため、逆方向のPCR産物の全ての配列は、推定されるように接合点においてインデルを有していた。

【0394】

トウモロコシプロトプラストにおけるNH₂J媒介ドナー標的化の結果

レポーター遺伝子の高度の再現可能な発現を示す、トウモロコシプロトプラストベースのトランジェントアッセイ系を開発した。DASで発生させたHi-11トウモロコシ懸濁培養物から、プロトプラストを得た。ELPの挿入物を内包するトウモロコシのトランスジェニック系統（トウモロコシ系統106685 [1] - 007）を、ドナーDNA配列のNH₂J媒介組み込みに使用した。

10

【0395】

マイクロ粒子照射によるELP胚のNH₂J標的化

マイクロ粒子照射の3日前に、1.5~2.2mmの胚を表面殺菌された穂から単離し、2.0mg/L 2,4-D、2.8g/Lプロリン、30g/Lスクロース、100mg/Lカゼイン酵素加水分解物、100mg/L myo-イノシトールおよび4.25mg/L硝酸銀を含む、2.5g/L Gelzan (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) で固化されたN6基礎培地およびビタミン (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) 上に（胚盤を上にして）置いた。マイクロ粒子照射の4時間前に、約35~40の胚を、36.4g/Lソルビトールおよび36.4g/Lマンニトールを添加した同じ培地を含有する100×15mm Petri皿の中央に（胚盤を上にして）置いた。

20

【0396】

金マイクロ粒子（0.6ミクロン、BioRad, Hercules, CA）を、15mgを滅菌シリコン処理1.7mL微小遠心管（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）内に量り取るによりDNA沈殿用に調製し、500μLの氷冷100%エタノールをゆっくりと添加した。FS-14超音波水浴（Fisher Scientific, Nazareth, PA）内での15秒間の超音波照射後、金を室温で30分間沈殿させてから、MiniSpin（Eppendorf, Hauppauge, NY）を使用して、3,000rpmで60秒間遠心分離した。上澄みを除去した後、1mLの氷冷滅菌水を添加し、ピペットで吸引および排出して混合し、3~5分間沈殿させてから、3,000rpmで60秒間遠心分離した。洗浄ステップをもう一度繰り返してから、金を500μLの氷冷滅菌水に懸濁させた。次いで、ピペットで吸引および排出することにより、管の間で金が十分混合された状態を維持するように気を付けながら、洗浄された金を別個の1.7mL滅菌シリコン処理微小遠心管（管当たり50μL）に等分した。次いで、洗浄された金（50μL当たり約1.5mg）を、必要となるまで-20℃で保存した。

30

【0397】

DNA沈殿のために、照射されるそれぞれの10個の標的に対し、50μL水中約1.5mgの金を含有する1つの管を解凍し、超音波水浴内で15秒間超音波照射し、次いで氷上に置いた。プラスミドDNA（0.5μgのZFN+4.5μgのドナー）を、0.6mL微小遠心管（Fisher Scientific, Nazareth, PA）内で事前に混合し、金懸濁液に添加して、ピペットにより穏やかに数回吸引および排出し、完全に混合した。50μLの氷冷2.5M塩化カルシウムを添加し、ピペットにより穏やかに数回吸引および排出することにより混合した。次いで、20μLの低温0.1Mスペルミジンを添加し、ピペットにより穏やかに数回吸引および排出することにより混合した。次いで、管に蓋をし、Vortex Genie 2（Scientific Instruments Inc., Bohemia, NY）上に置き、10分間混合し（「振とう2」に設定）、その後混合物を3~5分間沈殿させた。5,000rpmで15秒間遠心分離した後、上澄みを慎重に除去し、250μLの氷冷100%エタノールを添加し

40

50

、管に蓋をし、手で激しく混合してペレットを除去した。5,000rpmで15秒間の第2の遠心分離後、120 μ Lの氷冷100%エタノールを添加し、管に蓋をし、手で激しく混合してペレットを除去した。

【0398】

マイクロ粒子照射のために、滅菌マクロキャリア (BioRad、Hercules、CA) をステンレススチールホルダ (BioRad、Hercules、CA) に装着し、オートクレーブ処理した。10 μ Lの金/DNA懸濁液を、十分な混合を維持するために確実にピペットにより吸引および排出しながら、マイクロキャリアの中央に均一に伸ばし、次いで、140 $\times$ 25mmのガラスPetri皿内の8メッシュDrierite (W. A. Hammond Drierite Co., Xenia, OH) のベッド上の滅菌125mm Whatman #4濾紙 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) の切片上に置いた。金/DNAを、約10分間完全に乾燥させた。ラプチャーディスク (650psi、BioRad、Hercules、CA) を、イソプロピルアルコール中に数分間浸漬することにより殺菌し、次いで、マイクロ粒子照射デバイス (PDS-1000、BioRad、Hercules、CA) の保持キャップ内に装填した。オートクレーブ処理した停止スクリーン (BioRad、Hercules、CA) および装填されたマクロキャリアを、発射アセンブリ内に設置し、蓋をねじ込み、ノズルの真下にある照射チャンバ内にスライドさせた。スクリーンで覆った葉標的を含有するPetri皿のカバーを取り、ノズルから6cm下の照射チャンバ内に設置した。真空に引き (-0.9バール)、デバイスを作動させた。

【0399】

翌日 (照射から16~20時間後)、照射された胚を、2.0mg/L 2,4-D、2.8g/Lプロリン、30g/Lスクロース、100mg/Lカゼイン酵素加水分解物、100mg/L myo-イノシトールおよび4.25mg/L硝酸銀を含む、2.5g/L Gelzan (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) で固化されたN6基礎培地およびビタミン (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) に (胚盤を上にして) 移した。照射から7日~8日後、培養開始から11日後に、胚を、2.0mg/L 2,4-D、2.8g/Lプロリン、30g/Lスクロース、100mg/Lカゼイン酵素加水分解物、100mg/L myo-イノシトール、4.25mg/L硝酸銀および0.0362mg/L R-ハロキシホップ酸を含む、2.5g/L Gelzan (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) で固化された選択培地、N6基礎培地およびビタミン (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) に移した。2週間後、胚を、2.0mg/L 2,4-D、2.8g/Lプロリン、30g/Lスクロース、100mg/Lカゼイン酵素加水分解物、100mg/L myo-イノシトール、4.25mg/L硝酸銀および0.181mg/L R-ハロキシホップ酸を含む、2.5g/L Gelzan (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) で固化された新鮮な選択N6基礎培地およびビタミン (Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) に移し、さらに2週間後、それらを同じ組成の新鮮な培地に移した。

【0400】

0.181mg/L R-ハロキシホップ上で成長するカルスを、分子分析のために採取した。採取は、PCR分析用に約50mgを1.2mLクラスター管に、またはサザンブロット分析用に約200mgを2.0mL Safe Lock管 (Eppendorf, Hauppauge, NY) (急速冷凍のためにドライアイスで囲まれている) に入れることを含む。次いで、管を3Mマイクロポアテープ (Fisher Scientific, Nazareth, PA) で覆い、Virtual XL-70 (VirTis, Gardiner, NY) 内で48時間凍結乾燥した。組織が凍結乾燥されたら、管に

蓋をして、分析まで 8℃で保存した。

【0401】

植物における NHEJ による トウモロコシ ELP 標的化の分子確認

DNA抽出：Qiagen BIOSPRINT 96（商標）ロボットを使用して、自動化により トウモロコシ組織から DNA を抽出し、DNA を 200 μl の 1:1 TE 緩衝液／蒸留水中に溶出した。各試料の 2 μL を、THERMOSCIENTIFIC NANODROP 8000（商標）上で定量し、QIAGEN BIOROBOT 3000（商標）を使用して試料を 100 ng/μL に正規化した。正規化された DNA を、さらなる分析まで 4℃で保存した。

【0402】

コピー数推定：TAQMAN（登録商標）アッセイに類似した加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子コピー数決定を、LIGHTCYCLER（登録商標）480 システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を使用したリアルタイムPCRにより行った。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）PROBE DESIGN SOFTWARE 2.0 を使用して、aad-1 導入遺伝子および内部標準遺伝子インペルターゼ用に設計された。増幅のために、LIGHTCYCLER（登録商標）480 Probes Master ミックス（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を、0.4 μM の各プライマーおよび 0.2 μM の各プローブを含有する 10 μL 体積多重反応物中の最終濃度×1 で調製した（表32）。蛍光捕捉により、60℃で40秒間の伸長で2段階増幅反応を行った。リアルタイムPCRコピー数データの分析は、相対定量モジュールを使用して LIGHTCYCLER（登録商標）ソフトウェアリリース1.5を使用して行い、また ΔΔCt 法に基づく。このため、単一コピー標準物質および既知の2コピーチェックからの gDNA の試料が、各試行に含まれた。プライマーの場所を、図41に示す。

【表32】

【表32】 AAD1 および内部標準（Inv）の加水分解プローブアッセイのためのプライマー／プローブ配列

プライマー名	配列	検出
GAAD1F	配列番号 465; 5' TGTCGGTTCCTCTACCA 3'	---
GAAD1R	配列番号 466; 5' CAACATCCATCACCTTGACTGA 3'	---
GAAD1R	配列番号 467; 5' CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA 3'	FAM
IVF-Taq	配列番号 468; 5' TGGCGGACGACGACTTGT 3'	---
IVR-Taq	配列番号 469 ; 5' AAAGTTTGGAGGCTGCCGT 3'	---
IV-Probe	配列番号 470; 5' CGAGCAGACCGCGTGTACTTCTACC 3'	HEX

【0403】

ELP 遺伝子座妨害アッセイ：上で前述したように、LIGHTCYCLER（登録商標）480 システム（Roche Applied Science、Indianapolis、IN）を使用して、リアルタイムPCRにより ELP 遺伝子座妨害アッセイを行った。アッセイは、LIGHTCYCLER（登録商標）Probe Design Software 2.0 を使用して、ELP1 内の eZFN1 および eZFN3 結合配列ならびに内部標準遺伝子 IVF を監視するように設計された。標的対標準比を使用して、妨害アッセイのための分析を行った。結果を図42に示す。

【0404】

遺伝子座特異的インーアウトPCR：インーアウトPCRアッセイは、上で前述したように完了した。ドナーDNAのみ、eZFNのみ、またはドナーDNAおよびeZFN DNA（1：1もしくは10：1のいずれかの比）を含むドナー処理のNH EJ指向性標的化のeZFN1およびeZFN3に対するインーアウトPCR接合点分析を、アガロースゲル上で行った。結果は、ドナーおよびeZFN DNAのPCR単位複製配列サイズが、NH EJ標的化イベントに対して推定されるものであることを示した。

【0405】

標的／ドナー接合点の配列：インーアウトPCR分析により確認されたELP標的化イベントから、PCR単位複製配列産物を配列決定により確認し、標的－ドナー接合点を、標準サングー配列決定により検証した。簡潔に説明すると、各処理群の全ての反復実験試料に対して接合PCR分析を行った。PCRプライマーは、順方向または逆方向のいずれかである挿入接合点配列の片側を増幅するように選択された。PCR産物は、eZFNおよびドナーDNA試料から生成された試料において観察されたが、ドナーDNA単体またはeZFN単体試料を含む対照試料から生成された試料においては観察されなかった。PCR産物は、使用したeZFNおよびドナーDNAの両方の比からの反復実験試料の過半数において明らかであった。

【0406】

PCR産物の代表的試料をクローニングおよび配列決定した。順方向および逆方向の両方に対し、4つの異なる反応からのPCR産物の配列を図43に示す。接合末端への不適切な修復から推定されるように、順方向の挿入物について、9つの固有ハプロタイプが観察された。16の配列のうち3つが、挿入されたドナーDNAおよび標的配列の無傷末端のアニールおよび連結から推定される配列に整列した。ドナーDNAおよび標的DNAの一本鎖末端は相補的ではないため、逆方向のPCR産物の全ての配列は、推定されるように接合点においてインデルを有していた。

【0407】

サザンブロットアッセイ：最初に遺伝子座特異的妨害アッセイおよびインーアウトPCRアッセイによりELP遺伝子座内に組み込まれたドナー配列を含有するものとして特定されたトウモロコシカルスを、標的化組み込み（TI）サザンブロットによるさらなる分析に選択した。T₁サザンのために、DNAを標的遺伝子座において酵素およびプローブで消化および精査した。サザン用のDNA抽出のために、組織試料を2mlエッペンドルフ管（Eppendorf）に収集し、2日間凍結乾燥した。Kleco組織粉碎機およびタングステンビーズ（Kleco、Visalia、CA）を用いて、組織浸軟を行った。組織浸軟後、製造者の提案するプロトコルに従いDNEASY PLANT MINI KIT（商標）（Qiagen、Germantown、MD）を使用してゲノムDNAを単離した。

【0408】

QUANT-IT PICO GREEN DNA（商標）アッセイキット（Molecular Probes、Invitrogen、Carlsbad、CA）により、ゲノムDNA（gDNA）を定量した。定量したgDNAを、サザンブロット分析のために4μgに調節した。次いで、PmeI制限酵素（New England Biolabs）を使用して37℃で一晩DNA試料を消化させ、続いて、製造者の提案するプロトコルに従いQUICK-PRECIPI（商標）（Edge Biosystem、Gaithersburg、MD）を使用して清浄化した。次いでDNAを1×染料に再懸濁させ、低温の部屋で、0.8% SEAKEM LEアガロースゲル（Lonza、Rockland、ME）上で110ボルトで5時間電気泳動させた。ゲルを変性させ、中和し、次いでナイロン荷電膜（Millipore、Bedford、MA）に一晩移し、UV STRATA LINKER 1800（商標）（Stratagene、La Jolla、CA）を使用してDNAを膜に架橋させ、ブロットを20mLのPERFECT HYB PLUS（商標）（Sigma、St. Louis、MO）でプレハイブリダイズした。製造者の提案するプロトコルに従いPRIME-IT RMT（商標）ランダ

10

20

30

40

50

ム (Stratagene、La Jolla、CA) を使用してプローブを標識化し、製造者の提案するプロトコルに従い PROBE QUANT G-50 MICRO COLUMNS (商標) (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) を使用して精製した。約 20,000,000 cpm の標識化プローブをプロットに添加し、一晚インキュベートした。プロットを、洗浄当たり 15 分間、2 回洗浄し、蛍光体画像スクリーン上に 24 時間置き、STORM 860 SCANNER (商標) (Molecular Dynamics) により分析した。結果は、標的化組み込みのための推定されるバンドを示した (約 6.9 kB)。

【0409】

NHEJ 媒介組み込みによる ELP 遺伝子座標的化の結果

10

この試験の結果は、標的 DNA およびドナー DNA のインビボ ZFN 生成切断後の、NHEJ によるドナー DNA プラスミドのトウモロコシにおける正確な挿入を実証する。ドナー DNA の標的化は、2 つの異なるドナー DNA (どの eZFN 結合配列が ELP 内に含有されたかにより異なる)、ならびにプロトプラストおよびトウモロコシ胚内の 2 つの異なる eZFN を使用して生じた。NHEJ 修復機構による ELP 遺伝子座内の組み込みは、両方の方向で生じた。ドナー DNA 挿入物は、試験された試料において、これらの方向の両方で検出された。

【0410】

異なる植物種の組織における NHEJ 修復機構を使用した遺伝子の正確な標的化は、相同性組み換え媒介修復等の既知の修復機構に勝る大きな利点を提供する。NHEJ 修復機構は、植物組織の全てではないが、そのほとんどにおいて機能する支配的な修復機構である。逆に、相同性組み換え媒介修復経路の活性は、植物における細胞周期の G2 期にわたり機能する。その結果、形質転換可能な多くの植物組織は、活発に細胞分裂せず、したがって、相同性組み換え媒介修復経路による遺伝子標的化を支持しない。植物のゲノム内のドナー挿入のための NHEJ 修復媒介経路の別の利点は、NHEJ 媒介修復が、相同性組み換え媒介修復経路とは異なり、広範囲の相同性領域を必要としないことであり、これにより、ゲノム挿入に必要なドナー DNA 配列のサイズが低減される。最後に、相同性組み換え媒介修復経路と比較して、NHEJ 修復媒介経路を使用し、より大きなサイズのドナー DNA 配列がゲノム遺伝子座内に成功裏に挿入され得る。相同性組み換え媒介修復経路によるゲノム遺伝子座内のドナー DNA 媒介組み込みには、DNA ポリメラーゼが、ドナー DNA 内に含有される DNA テンプレートをコピーすることが必要である。対照的に、NHEJ 修復媒介経路は、ドナー DNA と標的 DNA との 2 つの点 (それらの末端) での相互作用のみを必要とし、テンプレート依存的 DNA 合成を必要としない。従って、NHEJ 修復媒介経路を使用して、より大きなサイズのドナー DNA 配列を標的化ゲノム遺伝子座内に組み込むことができる。

20

30

【0411】

実施例 10: 例となる配列

配列番号 116

T C G C C C A A A C C C T C G C C G C C G C C A T G G C C G C A G C C A C C T C
C C C C G C C G T C G C A T T C T C G G G C G C C A C C G C C G C C G C C A T G
C C C A A A C C C G C C C G C C A T C C T C T C C C G C G C C A C C A G C C C G
T C T C G C G C C G C G C G C T C C C C G C C C G C G T C G T C A G G T G T T G
C G C C G C G T C C C C C G C C G C C A C C T C C G C C G C G C C T C C C G C A
A C C G C G C T C C G G C C A T G G G G C C C G T C C G A G C C C C G C A A G G
G C G C C G A C A T C C T C G T C G A G G C G C T C G A G C G C T G C G G C A T
C G T C G A C G T C T T C G C C T A C C C C G G C G G C G C C T C C A T G G A G
A T C C A C C A G G C G C T G A C G C G C T C G C C C G T C A T C A C C A A C C
A C C T C T T C C G C C A C G A G C A G G G G A G G C G T T C G C G G C G T C
C G G C T A C G C C C G C G C G T C C G G C C G C G T C G G C G T C T G C G T C
G C C A C C T C C G G C C C G G G G G C C A C C A A C C T C G T C T C C G C G C

40

50

TCGCCGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCGCCCAT
 CACGGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGACGCG
 TTCCAGGAGACGCCCATAGTTGGAGGTACGCGCTCCATCA
 CCAAGCACAACTACCTGGTCCCTTGACGTGGAGGATATCCC
 CCGCGTCAATCCAGGAAGCCTTCTTCCCTTGCAATCCTCTGGC
 CGCCCCGGGGCCGGTGTAGTTGATATCCCCAAGGACATCC
 AGCAGCAGATGGCTGTGCCCGTCTGGGACACTCCAATGAG
 TTTGCCAGGGTACATCGCCCCGCTGCCCAAGCCACCATCT
 ACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCCTGCGTCTGGTTGGCGAGT
 CACGGCGCCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGC
 GTCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTGAGCTTACTGGG
 ATTCCAGTTACAACCTACTCTGATGGGCTTGGCAACTTCC
 CCAGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGGATGCA
 TGGCACTGTGTATGCAAAATTATGCAGTAGATAAGGCTGAC
 CTGTTGCTCGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGA
 CTGGGAAAAATCGAGGCTTTTGCAGAGGTCCAAGATTGA
 GCACATTGACATTGACCCAGCTGAGATTGGCAGAACAAAGC
 AGCCACATGTCTCCATTTGTGTCAGATGTTAAGCTTGTCTT
 ACAGGGGTTGAATGATCTATTAAATGGGAGCAAAGCACAA
 CAGGGTCTGGATTTTGGTCCATGGCACAAGGAGTTGGATC
 AGCAGAAGAGGGAGTTTCCCTCTAGGATTCAAGACTTTTGG
 CGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGAT
 GAGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATTGCCACTGGTGTG
 GGCAGCACCCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAA
 GCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGGCA
 ATGGGATTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGG
 CCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGTGG
 TAGTTTCCCTCATGAACATTCAAGGAGTTGGCGTTGATCCGC
 ATTGAGAACCTCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACC
 AGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTA
 CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAA
 AATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTA
 AAGGATTCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAG
 CGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCA
 GGGCCATACTTGTGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGC
 ACGTGCTGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGTCTTCAAGGA
 CATGATCATGGAGGGTGTGAGGACCTCGTACTGAAAT
 TTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAG
 CATGATGCCCGCGTGTGATCAACTACTAGGGGTTC AAC
 TGTGAGCCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCTATA
 TAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGT
 GTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATG
 TCATGCAAGTTTTCTTGTCTTACATATCAATAATAAGTACT
 TCCATGNAANAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

30

40

【0412】

配列番号117

TCGCCCAAACCCCTCGCCGCGCCGCATGGCCGCGAGCCACCTC
 CCGCGCGTGCATTTCTCGGGCGCCGCGCGCGCGCGCGC
 GCCATACCCAAACCCGCGCCGCGCAGCCTCTCCCGCGCGCAC

50

AGCCCGCCTCGCGCCGCGCGCTCCCCGCCCGCATCGTCAAG
GTGCTGCGCCGCGTCCCCCGCGCGCCACCTCCGTGCGGCCCT
CCCGCCACCGCGCTCCGGCCGTGGGGCCCCCTCCGAGCCCC
GCAAGGGCGCCGACATCCTCGTTCGAGGGCGCTGGAGCGCTG
CGGCATCGTTCGACGTCTTTCGCGCTACCCCTGGCGGGCGCGTCC
ATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCGCCAGTCAATCA
CCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGGGAGGCGTTTCGC
GGCGTCCGGGTACGCCCGCGCGGTCCGGCCGCGTCCGGCGTCC
TGCCTCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCT
CCGCGCTTCGCCGACGCTCTCTCTCGACTCCATCCCCATGGT
CGCCATCACGGGGCCAGGTCCCCCGCGCGCATGATCGGCCACG
GATGCGTTCCAGGAGACGCCCATCGTGGAGGTACGCGCGCT
CCATCACCAAGCACAACTACCTGGTCCCTTGACGTGGAGGA
TATCCCCCGCGTCAATCCAGGAAGCCTTCTTCTCGCATCC
TCTGGCCCGCCCCGGGGCCGGGTGCTGGTTGATATCCCCAAGG
ACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCGCTGTCTGGGACACGCC
GATGAGTTTGCCAGGGTACATCGCCCCGCGCTGCCCAAGCCA
CCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCCTGCGTCTGGTTG
GCGAGTCAACGGCGCCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGGCTG
CGCTGCATCTGGTGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTC
ACTGGGATTTCCAGTTACAACCTACTCTTATGGGCCCTTGGCA
ACTTCCCCAGTGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTGGG
GATGCATGGCACTGTGTATGCAAATTAATGCAGTAGATAAG
GCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGTGTGCGGTTTGTATGATC
GTGTGACCGGGGAAAATCGAGGCTTTTGTCAAGCAGGTCCAA
GATTGAGCACATTTGACATTTGACCCAGCTGAGATTGGCAGA
ACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGTGCAGATGTTAAGCT
TGCTTTACAGGGGTGGAATGCTCTAATTAATGGGAGCAA
GCACAACAGGGTCTGGATTTTGGTCCATGGCACAAGGAGT
TGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCCTCTAGGATTCAAGAC
TTTTTGGTGAGGCCATCCCCGCCGCAATATGCTATCCAGGTA
CTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATTGCCACCG
GTGTTGGGCAGCATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACAC
TTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGG
GGTGCAATGGGATTTGGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCGCTG
CTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGG
GGATGGTAGTTTCCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTG
ATCCGTATTTGAGAACCTCCCAAGTGAAGGTGATGATATTGA
ACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAG
GTTTTTACAAGGCCAACCCGGGCGCACACATACCTTGGCAAC
CCAGAAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGA
TTGCTAAAGGATTTCAACGTTCCGGCAGTTCTGTGTGACGAA
GAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTTGAG
ACCCCAAGGGCCATACTTGTGTTGGATATCATTGTCCCGCATC
AGGAGCACGTGCTGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTT
TAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTAC
TGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGC
AATCAGCATGATACCTGCGTGTGTTGTATCAACTACTGGGGG
TTCAACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTC
TTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGT

10

20

30

40

50

TTTGTAGTCTCTGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCA
AAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCCCTACATATCAATAATA
AGCACTTCCATGNAANAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【0413】

配列番号118

TCGCCCAAACCCCTCGCCGCGCCCATGGCCGCGNGCCACCTC
CCCCGCGCGTCCGCAATTCCTCGGGCGCCNCCGCGCGCCGCCATN
CCCAAACCCCGCCCGCCANCCCTCTCCCGCGCCACCCAGCCCG
NCTCGCGCGCGCGCGCTCCCCCGCGCCGCGCNTCGTCAGGTGNTG
CGCCGCGGTCCCCCGCGCGCCACCTCCGCGCGCGCCCCCGCGC
ACCGCGCTCCGGGCCCTGGGGGCCCGTCCGAGCCCCGCAAGG
GCGCCGACATCCTCGTCGAGGCGCTCGAGCGCTGCGGGCAT
CGTCGACGTATTGCGCTACCCCGGGCGGCGGTCCATGGAG
ATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCGCCCGTCAACCAACC
ACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGGGAGGCGTTCGCGGGCGTC
CGGCTACGCCCGCGCGGTCCGGCCGCGTCCGGCGTCTGCGTC
GCCACCTCCGGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGC
TCGCTGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCCGCAAT
CACGGGGCCAGGTCCCCCGCGCGCATGATCGGCACGGACGCG
TTCCAGGAGACGCCCATAGTGGAGGTACGCGCTCCATCA
CCAAGCACAACTACCTGGTCTTTGACGTGGAGGATATCCC
CCGCGTCAATCCAGGAAGCCTTCTTCCCTCGCGTCCCTCTGGC
CGCCCGGGGGCCGGTGCTGGTTGATATCCCCAAGGATATCC
AGCAGCAGATGGCCGTGCCCTATCTGGGACACGCCGATGAG
TTTGCCAGGGGTACATCGCCCGCCCTGCCCAAGCCACCATCT
ACTGAATCGCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGT
CACGGCGGCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGC
ATCCGGCGAGGAGTTGCGCGCGCTTTGTTGAGCTCACTGGG
ATTCCGGTTTACAACCTACTCTGATGGGGCCTTGGCAACTTCC
CCAGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGGATGCA
TGGCACTGTGTATGCAAAATTATGCAGTCGATAAGGCTGAC
CTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGCGTGA
CTGGGAAAATCGAGGCCCTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGA
GCACATTGACATTGACCCAGCTGAGATTGGCAGAAACAAGC
AGCCACATGTCTCCATTTGTGCGAGATGTTAAGCTTGCTTT
ACAGGGGTTGAATGCTCTATTAAATGGGAGCAAAGCACAA
CAGGGTCTGGATTTTGGTCCATGGCACAAAGGAGTTGGATC
AGCAGAAGAGGGAGTTTCCCTCTAGGATTCAAGACTTTTGG
CGAGGCCATCCCGCGCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGAT
GAGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATTTGCTACTGGTGTG
GGCAGCACCCAGATGTGGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAA
GCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCTGCTGTTTGGGGGGCA
ATGGGATTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGG
CCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGG
TAGTTTCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTTGATCCGT
ATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACC
AGCATCTGGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTA
CAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAA
AATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTA

10

20

30

40

50

AAGGATTCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAG
CGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCA
GGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGC
ACGTGCTGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGA
CATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAAT
TTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAG
CATGGTGCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTC AAC
TGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCTATA
TAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGT
GTCTATGCTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATA
TCATGCAAGTTTTCTTGTCTCTACATATCAATAATAAGTACT
TCCATGNAANAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

【0414】

配列番号119

CGTTGTGCCCTTGGCAGTCTCAGGTTTGAGCCCTCACCATTTG
AAGTAGCATGGGTCAATTGGATTGACCCGATTTGACGGCGG
ATCTATTGGATCTTCCCTTTGTGTGCTTTTATACTGGTAT
AGATGTTTAAACACATATTTGGAAAAATATATTCAAAACATG
TTTTCTATAAAAAAGTTTAAACTATACATGTATAATGGAAG
TCATTTTATAAGAAATGTTTTTACATGTATAAAAGATGTACA
TCATATGTGCAAAAGTAGACATGTGTTAGAAAAAATAAAC
AAACAAATACATAAAAAGAAAAATCAAAGAAAAAACACCC
AAAAAACCAAAGAAAAATAAAGAAAGAAAGAAAAAGAGAA
AAAAACATTGAAAAATCAAAGAAAGAAAAAACATAAAGAAAA
GAAAAACCGAAAAATACTGGCAAAAAACACACAAAAAATGAA
AAGAAAAAATAAAGAAAAACCGGACTTTACCAATCGAACGG
AGCGATCGGACACGAATGAGCGAAGGCATGCATCGAGCAA
CACCGCTAATTGACCGGCCCGTAGTCTGCTCGCCCGTAGAC
CATTCATAAGAATCGGTATCGGAGAGACATAGGGGTTCCTT
TGGTTTTCTAACCATATCTTGTACACACTTTACCATACATCA
CCTTAGTCAAATCTGATCAAATTAGGTGAGTATTTGGTTTC
TAGCCACATCTAAGGCAAGATTTGTTTTTCTGAGCAGTGA
ACCCCATATGTCTATAGACAGAAAAAATTGTGAAAAGATTCC
TTTAGACGGTCAAAGCGTGTTTAAACAATTTAATCAACTCA
AGTAAGATAAATGCGATAAATGTGACAAAAATAATGTGTT
ATAGAAGTATGACAAAAATAATCACAAATCCAAACAGTCTG
ATAGCTTGGCGAGTGCAAAATAGATACGAAATCTCTGGTG
ATATCACACGGGTCCAAAAATAATTGCTTGTTTGAGCATCA
GCCTTTCTGCACAAAAAAGCTAGCCCAAACAAACGAGTG
GCGTCCCATCTGAACCAACACGCTCACCCGCGCGGTGACAG
CGCCAAAGACAAAAACCATCACCCCTCCCAATTCCAAACCC
TCTCTCCGCTCTACAGAAATCTCTCCCTCGCCCAAACCC
TCGCGCGCCGCCATGGCCGCGCGCCACCTCCCCCGCCGTCGC
ATTCTCCGGCGCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCATGCCCAAG
CCCGCGCCGCGCAGCCTCTCCCGCGCGCCACAGCCCGCCTCGC
GCCGCGCGCTCCCCGCGCCGCGCTCGTCAAGGTGCTGCGCCGC
GCCCCCCGCTGCTGCCACCTCGCGCGCGCCCCCGCCACCC
GCGCTCCGGCCCTGGGGCCCGTCCGAGCCCCGCAAGGGCG
CCGACATCCTCGTCGAGGCGCTCGAGCGCTGCGGCATCGT

20

30

40

50

CGACGTATTTCGCCTACCCCGGCGGGCGCGTCCATGGAGATC
CACCAAGGCGCTGACGCGCTCGCCCGTCAACCAACCAACC
TCTTCCGCCACGAGCAGGGGGAGGCGTTCGCGGGCGTCCGG
CTACGCCCGCGCGTCCGGCCGCGTCCGGCGTCTGCGTCCGCC
ACCTCCGGGCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCG
CTGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTCCGCCATCAC
GGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGACGCGTTTC
CAGGAGACGCCCATAGTGGAGGTACGCGGCTCCATCACCA
AGCACAACTACCTGGTCCCTTGACGTGGAGGATATCCCCCG
CGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCTCTTGGCCGC
CCGGGGGCCGGTGCTGGTTGATATCCCCAAGGATATCCAGC
AGCAGATGGCCGTGCCATCTTGGGACACGCCGATGAGTTT
GCCAGGGTACATCGTCCCGCCCTGCCCAAGCCACCATCTAC
TGAATCGCTTGAGCAGGTCCCTGCGTCTGGTTGGYGAGTCA
CGGCGGCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCAT
CCGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTCACTGGGAT
TCCGGTTACAACCTACTCTGATGGGCCCTTGGCAACTTCCCC
AGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGGATGCATG
GCACTGTGTATGCAAAATTATGCAGTTCGATAAGGCTGACCT
GTTGCTTGCATTTGGTGTGCGGTTTGATGATCGCGTGACT
GGGAAAATCGAGGCCCTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGC
ACATTGACATTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCA
GCCACATGTCTCCATTTGTGTCAGATGTTAAGCTTGCTTTA
CAGGGGTTGAATGCTCTATTAAATGGGAGCAAAGCACAAAC
AGGGTCTGGATTTTGGTCCATGGCACAAAGGAGTTGGATCA
GCAGAAGAGGGAGTTTCCCTCTAGGATTTCAAGACTTTTGGC
GAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATG
AGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATTGCTACTGGTGTGG
GCAGCACCCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAG
CGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGGCAA
TGGGATTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGC
CAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGT
AGTTTCTCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTA
TTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCA
GCATCTGGGAATGGTGGTGCATGGGAGGATAGGTTTTTAC
AAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAA
ATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAA
AGGATTTCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGC
GAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAG
GGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCA
CGTGCTGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGAC
ATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATT
TCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGC
ATGGTGGCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACT
GTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTTCATAT
AAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAG
TCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATAT
CATGCAAGTTTTCTTGTCCCTACATATCAATAATAAGTACTT
CCATGGAATAATTCTCAGTTCTGTTTTGAATTTTGCATCT
TCTCACAAACAGTGTGCTGGTTCCCTTCTGTTACTTTACA

10

20

30

40

50

TGTCTGCCGTGTCCGGTTATGACATAATGACCGATGGAGG
GTGGTTCAGCAGGTTTTAGACGGGGAGTTGAAACTTTTTTT
TGGGGGGAAGAAATCTGAATACAGTTGGGAGGAAAGATAA
AAGCATATACCTTGATTAAATTTATTGAGCCCAATATCCAG
CCTAATTTATCAAGCAATAGGCGAGTGTAGGGTGTGTCAT
TCTTCTCTTCTTCTTCTGAGATCTGGTGTCTGGGACCCCGATTCT
AAGTCACACCGATCTAGCATGTAAACACCTCATATCACTTT
GCGGCCTCACGCGACGGTATCCTCACGGGTGTCTGCTTACC
ATGGGCCCGGGACCGTTTTGCGCCTTTTTGGCTCACGTATATG
ATGGTGTCTGCTAGYATCCATATGACAGAGAACCCTGGGCGG
ACATRGTCTAGTCGTGAACCCCAAAGCGGCACAGACCTATGG
AGACAGGCATACATGAATCACATCGAGCATGTCGGTCAAC
AGCGTATGAATCCGGGGCTGTAGCACTGGGGCTAACAGGACT
CCGGGGGAACCCGGGGCTGTAGCAGGCTAGGCGAGGACTCCGG
AAGTCACCGCGTGAACATTTCCCGGAAGGGACAGACATAGG
AACGAAGTGGAACACATGCCCGGCCAGTCAAGTGTCTCTGAG
CAGTAGTGCTGGGGCTAGCAGGACTCCGGGTGAACCGGGCTG
TAGCGGACTACTATGGCTCTGAGGTAGCACTAGACTACATTT
TCCCCATAAAGAGAGGCTKCCAAGGATAAGCAACTAGATTTG
TCGGRTCYCRSRYWTTGTCTCCGTGTGTGTTGTTATTGTTGT
CATGCAAGTATGTGTTGTACAACATGGCATCACAAACATAA
CGCAAACCTCATATAGATATAGGCTCAGAGAGCCACATAGC
ATTAATACGAACAGGGTCACATGACCCATCATTCAGAGCA
TACAGCATGAAGCATCATGTCTGAGTACAGACACTAC

10

20

【0415】

配列番号120

CTGAAAATTTCAATATGGCCCTCTGGGGCACCAATGCTCTTTGC
TTCCAATTTTTCATAATTTCCCATTTTGTAAAAAACACACCAC
AAAAATCACACTGTAGTAATCTACATGTTTTGTTGAGCCTA
TAAATCTTTCATAAAATAATTTGAGATTAAATGCGGTTTTGTGC
AAAAATATGGGGTTGGTTCATGTTTTCTACATATTTCTATTT
GCATTTTCGTTAACTGGTGTCTTGTATTTTTTGTACATAATG
CATATCTCATTTGTTATTTATTTTTTAACCTTTTTGAGATGGTA
ACGAAGATCCAAACATGCATAGATGATTTCTCCGGATGATTT
TTTTTGTAGCCTGCACCTAGGAACCTCCCAAGAGCCAGAAAGGT
TGGGTTTTGTACAAGATAACATTTGTTTTGAACACACTCATA
ACCTGCATGTGACATACATGACGTAACCTTATAGTGATGAT
TCGACAAAATGTCTCTTTGTCCAATTTTGTATATATATCCCG
TGGCAACGCGACGGGCATTCTGACTAGTATATGTAAAGATAT
CAATGTGACGAGTCCCCATGGTCTGTTGCGCTTGTCCACTA
CCGGCTCTGCTAGAGGCGACTCTCACCTAGAAAGTCGCTACG
AGCAATACATAGTCGTTCTGGGCGCAGCTATGTTCTGCTT
TTTGTGACGCTCAGGCACGGCTTGCCTACAGCCTGAGGGT
CGGGCTAGGAACCACTAATTGTGTTCATGCTGATGTCACAA
TGACATCATGCATATTTTTTATTTTTCGTTTTTTCGCTTTCTC
TTTAATTTTTATTTGTATTTTCAAAAATATTTTTATATTTTTT
TGAATTTTTTTCAATGTTGTATTTGAAAAATGTTAAACCTG
TATAGAGAAAAATATTTTTTGATATATATAAAAGTATATAA
CATGAATGAAAAATGTATAAATGTTAATTATGTGTACCAA
AAATGTTGATAACAAATTAGCAGTCTCACATATTTCAAAAT

30

40

50

AAATGTATGTGGAATTAAAAAATATGTGTATTTAAGTTTAA
AAAAAAATGTTTCATGTAATGTTTCGTAAAAATGTTTGATACA
TTCAATAAAAAATTATGTCACATTTGAATAATTCTTCTCAA
GCTTAACAAATGCGCTCATTTATATTATCAAAAAATTGTCTG
TACAGTGTACACAAATGTTTATGTAGTTCAAAAAAAATGT
TTTTTTCAGTAAAAAATATATTTTGATCATGTATTTTATAAAA
AACTGTTTAATATATATTTTAGAAAAATATATTCAAAAACATG
TTTCTGTAAAAAGTTAAAAACTATACATGTATAATGTAAGT
CATTTATAATAAATGTTTTCATGTATAAAAAAATGTACAA
CATATGTGCAAAAGTAGACATGTGTTGAAAAAAATAAACAA
ATAACTAAATAAAAAAGAAAAATCAAAAGAAAAACACCAAAAA
CCAAAGAAAAATAAATAAAAACCAAGTATAAAGAAGARRAAA
GGAGAAAAAAACATTTGAAAAATCAAAAGARAAAAACATAAGA
AGAAAAAAACCGAAGAAAAACTAGCAAAAAAACACACACACA
AAAAAAGAAAAATGAAAAAGAAAAATAATAAAGAAAGCCGGACTG
AACCGATCAAAACGCAGCGATCGAACATGGATGAGCTAAGG
CATGCATCGAACAACACGGCTAATTGGCCGGCCCGTAGTCT
GTTTCGCCCGTAGACCATTTCTTACGAATCGGTACCGGAGAG
ACATAGGGGGCTGTATGGTTCCTAACCATACCTTGCCACAC
TTTGTCACACCTCATCTTAGGCCAAATTTAATCAAGTTATG
TAGGTGTTTGGTTTTAGCCACATCTAAGGCAAGATTTATT
TTCCTGAGCAGTGAACCCCATATGTTATAGACATAAAAAAG
TGTGGGAAGATTCCCTTTAGTCAAACTGTGGCTAACAAATT
TATTAAGAATTAACTTAAGTAAGATAGGTGCAACAAATGT
AGCAAAAAATAATGTGGTATATATATAGCAAAAGATAGCCACAA
CCGCGAGTGGAAATACCAGATACGAGATCTCTGGTTCATAT
CACACGAGTCCAAATTAAATTGCTTTGTTTGAGGTTCAGCC
TTTTTGCATAAAAAAGCTAGCCCAAACAAACGAGTGGCGTCT
CCATCTGAACCAACACACTCACCCGCGCGGTGACAGCGCCA
AAGACAAAAACCATCACCCCTCCCCAAATTCCAACCCCTCTCT
CTGCCTCACAGAAATCTCTCCTCGCCCAAACCCCTCGCCG
CCGCCATGGCCGCGAGCCACCTCCCCCGCGCTCGCATTTCTC
GGGCGCCCGCCGCGCCGCGCCGCGCCATACCCAAACCCGCGC
CGCCAGCCTCTCCGCGCGCCACAGCCCGCCTCGCGCCGCG
CGCTCCCCCGCCCGCATCGTCAAGGTGCTGCGCCGCGCTCCC
CGCCGCGCACCTCCGTCGCGCCTCCCGCCACCGCGCTCCGG
CCGTGGGGCCCCCTCCGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCC
TCGTGAGGCGCTGGAGCGCTGCGGCATCGTCAAGCTCTT
CGCCTACCCCTGGCGGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCG
CTGACGCGCTCGCCAGTCAATCAACCAACCACTCTTCCGCC
ACGAGCAGGGGGAGGCGTTCGCGGGCGTCCGGGTACGCCCG
CGCGTCCGGCCGCGTCCGGCGTCTGCGTCCGCCACCTCCGGC
CCGGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGCTC
TCCTCGACTCCATCCCCATGGTCCGCCATCACGGGGCCAGGT
CCCCCGCCGCATGATCGGCACGGATGCGTTCCAGGAGACG
CCCATCGTGGAGGTCACGCGCTCCATCAACCAAGCACAACT
ACCTGGTCCCTTGACGTGGAGGATATCCCCCGCGTCAATCCA
GGAAGCCTTCTTCTCTCGCATCTCTGGCCGCGCCGGGGCGG
GTGCTGGTTGATATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGG
CTGTGCCTGTCTGGGACACGCGCGATGAGTTTGCCAGGGTA

10

20

30

40

50

CATCGCCCCGCTTGCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTT
GAGCAGGTCCTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCAA
TTCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCATCTGGTGAGGA
GTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTCACTGGGATTCCAGTTACA
ACTACTCTTATGGGCCCTTGGCAACTTCCCCAGTGACGACC
CACTGTCTCTGCGCATGCTGGGGATGCATGGCACTGTGTAT
TGCAAATTAATGCAGTAGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCA
TTTGGTGTCGGGTTTGATGATCGTG TGACCGGGAAAATCG
AGGCTTTTGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACAT
TGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTC
TCCATTTGTGCAGATGTTAAAGCTTTGCTTTACAGGGGGTTGA
ATGCTCTATTAAATGGGAGCAAAGCACAAACAGGGTCTGGA
TTTTGGTCCATGGCACAAAGGAGTTGGATCAGCAGAAGAGG
GAGTTTCCCTCTAGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGCCATCC
CGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAA
AGGGGAGGCGATCATTTGCCACCGGTGTTGGGCAGCATCAG
ATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGC
AGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGG
GTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGT
GTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTCTCTCA
TGAAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCT
CCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCTGGGA
ATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCCAACCC
GGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGAGTGA
GATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAAC
GTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTG
CAGCAATCAAGAAGATGCTTTGAGACCCAGGGCCATACTT
GTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCCT
ATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAAGGACATGATCATGG
AGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACA
AGACCTACAAGTG TGACATGCGCAATCAGCATGATACCTG
CGTGTTGTATCAACTACTGGGGGGTTCAACTGTGAACCATG
CGTTTTTCTAGTTTTGCTTTGTTTTCAATTAAGCTTGTGT
TACTTAGTTCCGAACCGTG TAGTTTTTGTAGTCTCTGTCTCT
CTTTTGTAGGGATGTGCTGT CATAAAGATATCATGCAAGTT
TCTTGTCTTACATATCAATAATAAGCACTTCCATGGAATA
ATTCTCAGTTCTGTTTTTGAATTTTCAATCTTCTCACGAAC
AGTGTGCTGGTTCTTTCTGTTTACTTTACATGCCCTGCCGT
GTCAGGTTATGACATAACGACCGATGGAGGATTGGAGGGT
GGTCGGCTGGTTTTAGACGGGGGAATTGAAACATTTTTCTG
GAAGAAATCTGAATACAGTTGGGAGGGGAAATGGAAGCAT
ATATTTATCGAGCCCGCTATCCAGGCTAATTTATCAAGCA
CTAGACAGTG TAGGGTGTTGGCATTTCTTCTCTTCTTGAT
ATCCGGCTTGAGAGGAGAGATTGAGGCTTCGGCTGTGTTG
GTTGCTGATTTCTACAGCATTTTGGAGAGAGAGAGAGAT
GTTGCAACTGTGTTTTGTCTTTGGTTGCTTGTACAGAGAAA
GAGATGACATTTAGAGATATGCAGATCGTTTACCAGTTGT
GCTGCGTTTTATTCGTACTGATTGTTGTTATTGTTGCTATC
ATGTGCAAAATTGTTGTGATGGAAAATCAACAAAATTTTGA
TATTTTGC AAAGCGAGTTGGATTGAATGATTTGAGAAATG

10

20

30

40

50

GTGACTTGTTGAGTGGCCTTGAGAAATTGGTGTTTTCATAGG
TGTGCAGTTGGTAATGAAAGGCGGGCCTTGAAATTTCCG
AAAGGCAGGCAATGATACTTTCTGAAAGTGATGTTTTTTC
TTCCAGGTTTCCGGTGGAAACAAGTCTACGTTGAGCCAATG
T

TTGTCAGCTTATTCTGCTCTTTAGTTTTCAGTTGTTTTGTT 10
CACAGATTGCTGGGCAGAGCCCCATGATCGGCTGAGCCCTC
CAGGAGATCCTTGATTGCTCGACTGCGGATACGTTGAATC
CTTTAAAATACTATAAGCTCCCTAGTTTTTAGTTTTAGAGA
ACTGAGAAATCAATTGAGGGGCAACATTAGTCGATTTTGGCT
TCCGATTTTGGACTGGGTGCGCTCCCTGGGTCTCTACAGT
TTTGTGGGCCCTATATGTAAGTGCCCCAGTGTTGTGGGCT
TTCTGGTCTTTTCTGATGAAAGCGGCGTGGTGGCTGGGGG
CTTTAGAAATATTTTCATTGATTAACTAAAACAAATCAGATC
CCTTTTTTCCCTGCTTCAATGTGTGTTTGACCAATCTTTTTT 20
AAAAATTTCTTTGATTTTATATTTGATGGAGTAAATCTGG
CTGTGTCAACGGTAGTCCATTGAAACCTGGAAATCGAAA
TCATTGTACTGCAGGTCTGTTGCCGTGTTAGTTTTGTTCTTA
TATAAGATCTTTGACAGTTTTATGAATTTGTCTTTGGAATT
TGTATAAAGTTTTACAGATAGACAGGCCCTGTTGTTAAAT
ACGTTTCGTGCAATTAAAGTGTA AACATATCTGCCAGTGATT
TTTTCTCGGCTCGCATTAGTACGCATAAATTTTTTAGCACTT
CTCTGAATTTTCTCATATGCAGACCACCTATGAAAAAAAC
GACATGCAAGTAAATAAAAACGATTTTCAGGTTCAATTTAGTA
GCAAACCGTTTTTTATGTCCTTTAAAAATCAATTAGCAGAG
CCACTCCATTACACCGGTGAGCAGAAAAAGAAGCATGTGTGT 30
GTTTTTTGGGCTATCATAGAGCTAAATAAATTTGATTCCCA
TCTGTAAATGTTTCATCGTTGTTTACATCAGTGTTGGCTGTC
GTGTGGTTCGTGGAGACTAGCCTGTTTCAGACAATATGTTTG
ACAAGAGTGTTGTTTTGTGAGATGCGGATGCGGTGCTTGC
ATCTGTACTTGTTTTTGTGAATACCAGTTAGATGATCAGT
TTTTTGTCACCTTCTTGCCATGAATGGCTGTTAAATTTGTCA
CTTTTTTAGGAACCTTGTGTCGTAATATCAATTAAATAATC
AATTTTTTGTGCATGGTATATCAATTAGATGGTCAATTTTTT
TCTAGTAGAGATGTCATATACATGCCAATGCAATGTTTCAGA
GTTGTTCAAGGTCTCGACGGCGCGGCAAAGCGCGTCCAT 40
GCTTCTAGTTTTAAGATGACAACCAAACACGACCCAAGTGT
ATGCTATGCTCATCCGGTTGGTCCCTTGTGATGTTCAATG
GGCGTGCTCTCATGGGCATCGACGGCGACAATGTTATCTT
CTTCAACTGTCTGCTATATGCTCATTTGGCATTTTTTGAAAC
TTTTGCAAGCAAGGTGATAACTTGGTCTGGGGATGTTGAC
GCCCCATATGTATCTAGATTAGGGTGATGCTCCCGCCAGTA
TTTTTTTGGACGATTATCAACATTTGCGGCTGGTATACTAT
TGTGGCTAATCAACAAGGTTTTTTTTTGTGTGTGGCTAATCA
ACAAGGTTTTGGCGCTCGATGTTTTTTTTTAATGTATTTTCGAT
GACTCAATTTCTACGTCTGAACATTTTCATTGAGCCAAGAG 50

GCAGAACAAACAGGTCACATGTAACCGCCAGTGAAAAAGGT
TCAAAGAAGAAAAAGATACGAACGACAGCGAGTTTGTATK
KCAGTTTTTCGAACATAAGAGTAACACGGAGTRCAGTAGTAC
GATCCTTGTGTMYTTCTGTATTTGGWTAKTTTTTTTCCGG
AGTTGAGTATTWGWAACTTTCTTGTGCTTTTTTTTAAACATTT
AGTACAGATGCAAGTGCTCATACATACGCGCTTTTTTGTATT
TGTAACAATAATTATGAAAGACGTAGTAATTATGTTTGCAG
ATCAATAAAGCTAGCCATCGTGTGGTGTTCCTCAAGAAAAA
GATATTCACATATAGATTCACTACATCTTCTAAAAAAACTA
CACTGTAGATTCACTACAGACCAACAGAATAATTCATGGTTC
ACGTGGATAAAAACTTACTTTTTTGAAGTCTCAAGCATTTT
GGTTTTGATTTTAAAGAAAAAATAACTGACTCTATTTTTTGTG
TACTCCTTGCAACGAACCTGGATAAAGATGGAGCCAGTCC
GTTCCCTGGTTACTAGGAGTATCCATTTTCTGAAGACCATG
GAGCAACCACGGCGGATCGGGCGATCGGCAGCCTCCCAGC
CGGCGACCATGGCGGATGCCACGAGCGCAGGAGCGACGCC
TCTCCTCCCTGGCCTCCTCGACGACATCGTAATCTGTGAG
ATCCTTGTCCGCCCTCGCCCCCCTCAAAGCCATCCTCCGCTGC
CGCGCCGTCACGCCGTGCCCTGGCGCCGCAACCACCTCCACC
CGCGACTTCCTCCTCGCCCCACCAACGCCCGCCAGCCCGCCC
TCCTCATCACCTCCGGCCACAGTT

10

20

【0416】

配列番号121

AAATTTTTTATAATAATTGTTTTTTCCAAATTTTTATGTTTTAA
CTCATTTTTTTGTTCAATTTTTTTTGTGAATAATATTTTTAATCCA
TTGATAGATTTTTGAAAAATATAATAAATTTTTTCCAAACATTT
CTATAAATTTTCATAAACCTTTTTTAAACATTTTCAGAATAAGA
TTAGGAAATTTTTGATTCTTAAAAATATATTTTTTAATCTTGC
AACTACATTTTTTATATACAATTACATGAGCCAATTTATTTT
TGGTAGAAATCAACTGAAAAAACAAAAGAAAAAAATTGGA
TAGCGGGAGTTCTCTGCGCGAACTTGGGGGGGGGGGGGGCGA
CAACCCCTCTATCAATGAGCTAGGGATTCTCTATTACATCTC
GCCTACAAGCCGCACTAGTTTTTTTTTYCCCATTTGTTTTTATA
TCGGTTTTTTTTACTACTTTTTTGACCGGTTTTTCTTCTGGTAT
TATTTTCATTTTTCTTCTATACTTTCTGTGTGTTTTCTTCGT
TTCCCCCTCCTGTTTTTTTTTGTCTTTTTTCTACAGTTTCTCTT
GTTTCTTTCTTTTGGTTTTTCAACGATTTACTTTGTTTTTTCA
CGTTTTTTAAATTTTTTAATTTTTTAATCTTCAGATACATAATTA
ACATTCATTAAATTTATATACTTTTTATGTCAAGTTTTTTTTCA
TACACATTGTGCATTTTTATACATATTAGGATTCCTTAAATA
CATGATTAAATATTTTTATTCAGACATAGAGTACTTGTTTTTG
AACACTTTTTTCAAATACATGTTGAAATAAATTTATTTTTATG
ATATGAAATATGTTTTTTTTTATTTATGCAACATTTTTTTATAC
ACTTTATGTTTTTTTTTGAAATATTACAAAATTTTTTGCTTGA
AACGTGTGAACATTTTTTTTAAATGTAAACATAATTTTTTTGA
ATGGTATGAAACTTTTTTTTGAACCTGCGCGAACATTTTTTTT
ACATTTGTATATTTATTTTTGATTCATTTTCTGTAAAGTTATCG
CCTGAATTGCTTGA AAAACGTGATTTTTTTTTTAAATGCCAC
ATATATTTGTTTTTTGAATGGTTTCATGCATTTTTCTGAAAGTT
GATCGAACATGTTTTTTATATTGCATTTTTTAAATGTAAATA

30

40

50

ACCAC TTTT GAAAA TTAAC TAA TGTAT TTTT CATAA TATAT
GTATTT AATA TTAT TAAAA ATA AAAAAA AGGTAAA AGAAA
AAACAG ATCAAC GCGAT GAGAC CCCCAT GGT TGT TGC GCTT
GTCCAC TACCG GCTCA CTGA AGAC GTCTCT CACAG TAGGA
GTCGCT ACGA AGA ATAC ATAG TCGCG CTGGG CGCG GTTAT
GTTCCG CCTG TTGCG ACGCC CAAGCAT GGCTT GCCTAC AG
CTAGAG GGT C GGGCT AGGA ACCACT AATTGT GTCAT GCTG
ATGTCACA ATGAC ATCAT ACATG CTTTT ATTTT AATTTTT
CGCTTT TCTCT TTA AATTTTT TTTTGT ATTTT CAAAA ATATTCTG
TTTTTT TTAAGA ATGCT AGTAT TTGTAT TTTT GAAAA ATGTTAA
ACCTGT ATAGAAAA ATATA TAACAT GAATG AAAAA ATGTAT
AGATGT TAATCAT GTGTAC AAAAAA ATGATT GTGACA ATTA
AGAA TGTCAC ATATTT CAAAA TAAAT GTATGT GGAATTTT
GAAAAA ATGTGT ATATA ATTTTT TAAAT GGT CATGT AATTT
TAAAAA ATGTGT GATAC ATTCAAC AAAAAA ATATTT CACA
TTTGA ATAAT TCTTCT TGAGCT TAAGA AATGT GTTCA TTA
TGTTAT CAATTTTT TTTGTAC AGTGTAC AAAAA ATGTTTACA
TAGTTT CAAAAA ATGTTTT TTAGTAAA ATTACATTT CATTT
GTGTAT TTTA ATATTT TAACAC ACATTT GGAAA ATATATTT
GAAAC ATGTTTT TGTAAAA AAAAAA TTTTAA AACTAT GCTTG
TACTCC CTCCGT CCGAAAA AGGTTT ACATGT ATAAA AGTT
TTTTTC GGAGGG AGGGATT ATAAT GTTAGT CATTT ATAAGA
AATGTTTT ACATGT ATGAAAA TGTA TAGCAT ATGTGT AAA
AGTAGAC ATGTGT TGA AAAAAA AAGTAAA ACAACCC AAA
AAACCA ATGAAAA TAAAA TAAAA ACCAA AGTACCA AGAAGA
AGAAA AGGAGA ATAA ACCATT GAAAA ACAAGAAA ATAAA
AAACATAA AGAAGAAA AGAAA ACCCAA AGAAA ACTGG CAAAA
ATTAGAC ACAGAAA AGAAAA ACGAAAAA ATATAA TAAA
RAAAA ACCGG ACTGA ACCGATCG GACAC GGTATG AGCGA AGG
CATGC ATCGAG CAACAC AGCTA ATTGG CCGGCC CATAGTC
GTTCG CCGCGC AGACCATTC ATACGA ATCGGT ACCGG AGAG
ACATAG GGGCTATTT GGTTTGT AGCCACATTTT GTCATAC
TTTGTG ACACCG CATCTT ATGCA AGTTTG ACCAA ATTAGG
TGGATG TTTTAG TTCTA ACCACATG TAAGGGA AGATTTTTT
TTTATG AGCATTTGA ACCCGTAG ACACAAA AGTGTAGGAA
GATTACTTTT AAACA AGCTAA AGTGTGGCTAAC AATTTAAG
CATCTC AGGTAAAG ATAAGT GCGACAAA ATAGGC AAAAAA TA
ATGTGGT ATATATG ACAAA AGATAGT CACAATCC AAACAGC
CCATAG CCTGGCG AGTGCA AATAGATAC GAGATCTCTGGT
GATATC ACAACCGT CCAAATTA ATTGCTTGT TTCAGCATC
AGCCTTTTTT GCATAA AGAAGCTAG CCAAATCTGA ACCACA
CACTCAC CCGCGCGT GACAGCG CCAAAGAC AAAAAA CATC
ACCCCT CCCCCA ATTC CAACCCCTCTCTCT GCTCACAGAAA
TCTCCCCCTCG CCAAAACCCTCG CCGCGCCATGG CCGC
CGCCACCT CCCCCG CCGT CGCATTC TCGGG CGCCACCGCC
GCCGCC ATGCCCAA ACCCGCCCGCCATCCTCT CCGCGCC
ACCAGCCCGTCTCG CGCGCGCGCT CCGCGCCCGCGTCTGT
CAGGTGTTG CGCGCGCT CCGCGCGCCACCT CCGCGCGG
CCTCCCGCA ACCGCGCT CCGGCCCTGGGG CCGCTCCGAGC
CCCGCA AGGGCGCGC GACATCCTCGT CGAGGCGCTCGAGCG

10

20

30

40

50

CTGCGGCATCGTCGACGTCTTCGCCCTACCCCGGC GGC GGC
TCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCGCCCGTCA
TCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGGGAGGCGTT
CGCGGCGTCCGGCTACGCCCGCGCGTCCGGCCGCGTCCGGC
GTCTGCGTCCGCCACCTCCGGGCCCGGGGGCCACCAACCTCG
TCTCCGCGCTCGCCGACGCCCTCCTCGACTCCATCCCCAT
GGTCGCCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGC
ACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTGGAGGTACGCG
GCTCCATCACCAAGCACAACTACCTGGTCCCTTGACGTGGA
GGATATCCCCCGCGTCAATCCAGGAAGCCTTCTTCCCTTGCA
TCCTCTTGGCCGCCCGGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCCCCA
AGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCCGTCTGGGACAC
TCCAATGAGTTTGCCAGGGGTACATCGCCCGCCTGCCCAAG
CCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCCTGCGTCTGG
TTGGCGAGTCAAGGCGCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGG
CTGCGCTGCGTCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTTGTTGAG
CTTACTGGGATTCCAGTTACAAC TACTCTGATGGGCGCTTG
GCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCATGCT
TGGGATGCAATGGCACTGTGTATGCAAAT TATGCAGTAGAT
AAGGCTGACCTGTTGCTCGCATTTGGTGTGCGGTTTGTATG
ATCGTGTGACTGGGAAAATCGAGGCTTTTGTGCAAGCAGGTC
CAAGATTGTGCACATTGACATTGACCCAGCTGAGATTGGC
AAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGTGCAAGATGTTA
AGCTTGTCTTTACAGGGGTGTAATGATCTATTA AATGGGAG
CAAAGCACAAACAGGGTCTGGATTTTTGGTCCATGGCACAAAG
GAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTAGGATTCA
AGACTTTTGGCGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTATCCA
GGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATTTGCC
ACTGGTGTGTTGGGCAAGCACCAAGATGTGGGCGGGCTCAGTATT
ACACTTACAAGCGGCCACGGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGG
TTTGGGGGCAATGGGATTGTTGGGT TACCAGCTGCAGCTGGC
GCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACATTG
ATGGTGATGGTAGTTTCTCTCATGAACATTCAGGAGTTGGC
GTTGATCCGCAATTGAGAACCCTCCAGTGAAGGTGATGATA
TTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGG
ATAGGTTTTTACAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCTTGG
CAACCCAGAAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTG
ACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTCCAGCAGTTCCGAGTGA
CGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCT
TGAGACCCCAAGGGCCATACTTGTGATATCATAGTCCCG
CATCAGGAGCACGTGCTGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTG
CTTTC AAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTC
GTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACAT
GCGCAATCAGCATGATGCCCGCGGTGTTGTATCAACTACTA
GGGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGT
TTCATTTCAATAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTG
TAGTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTG
TCATAAGATGTCATGCAAGTTTCTTGTCTCTACATATCAAT
AATAAGTACTTCCATGGAATAATTCTCAGTTCTGTTTTGA
ATTTTGCATCTTCTCACAAACAGTGCTGGTTCCTTTCT

10
20
30
40
50

GTTACTTTACATGTCTGCTGTGTCAGGTTCTGACATAACG
A

CCGATGGAGGGTGGTCGGCAGGTTTTAGAAAGGGGAATTGA
AACTTTTTTTTTGGGAAGAAGTCTGAATACAGTTGGGAGGA
AAAATAGAAGTATATACTTCGATTAAATTTATCAAGCCCGC
TATCCAGTCTAATTTATCAAGCACTAGACAGTGTAGGGTG 10
TTGGCATTCTTCTCTTCCTTGAGATCCGGCTTGAGAGGAG
AGACCGAGGCCTTCGGCTGTGTTGGTTGCTGATTTCTACAG
CTTTTTTGAGATAGAGAGAGAGATCCTGCAACTGTGGTTTG
TCTTGCTGCTTGTACAGCGAGAGAGACATTGAGAGATATG
TAGATCGTTTTACCAGTTGTGCTGCTGTTATTCGTACTGGT
ACTGATTGTTGTTACTGTTGCTATCATGTGCAAAATTGTTG
TGATGGAAAATCAACAAAATTTTGATATTTTGCAAAGCGA
GTTGGATTGAATGATTTGAGAAATGGTGACTGCTTTCCCT
CAGACTTGTTGAGTGGCCTTGAGAAATTGGTGTTTTCATAGG
TGGTGATATGCAGTTGCTAATGAAAGGCGACGGCTTGAAAT 20
TTCCGAAAGGCAGCCAATGATACCTTCTGAAAGTGATGTT
TTTTTTCGTCCAGGTTTCCGGGTGGAGCAAAGTCTAGACACAC
GTTGAGCCAAATGTTTGTTCAGCTTATTCCTGCTCTTTAGTTT
CAGTTTLAGGTGCAGTTGTTTTGTTTTACAGATTGCTGGGCA
GAGCCCCGTGATCGGCTGAGCCTCCAAGAGATCCTTGCTT
GCTCGACTGCGGATACGCTGAATCCTTTAAACGCTCCCT
AGTTTTTAAGTTTTTAGAGAACTGAGAAATCAATTGGGGGGCAA
CATTACTGGGTGCGCCTCCCTGGGGCTCTACAGTTTTGTGG
GCCCTATATGTAAAGTGCCCCAGTGTTGTGGGGATTGTGCGG
CGTGGCGGGCGGCATTTGCGTCCCTCTCTTCGGCGGCGCTG 30
TTTCCCCCTCCTTCTTGCTGCTTCTTGAGGAGGTGGTCGG
CGGCGGGTGTTGTGGGGGGTCCGCAATTGGAGCGGCGCGAAC
GCCGGTCCCTGCTGCATCTGCCGCCAATTGGTTGTT

【0417】

配列番号140

CGTTTCGCCCCGTAGACCATTTCATAAGAATCGGTATCGGAGGA
GACATAGGGGTTCCTTTGGTTTCTAACCATATCTTGTCACA
CTTTACCATACATCACCTTAGTCAAATCTGATCAAATTAG
GTGAGTATTTGGTTCTAGCCACATCTAAGGCAAGATTTGT
TTTTCTGAGCAGTGAACCCCATATGTCATAGACAGAAAAA 40
TTGTGAAAAGATTCTTTAGACGGTCAAAGCGTGGTTAAC
AATTTAATCAACTCAAGTAAGATAAAATGCGATAAAATGTGA
CAAAAAATAATGTGTTATAGAAGTATGACAAAAATAATCAC
AATCCAAACAGTCTGATAGCTTGGCGAGTGCAAAATAGAT
ACGAAATCTCTGGTGATATCACACGGGTCCAAAAATAATTG
CTTGTTTGAGCATCAGCCTTTCTGCACAAAAAAAGCTAGC
CCAAACAAACGAGTGGCGTCCCATCTGAACACACGCTCA
CCCGCCGCGTGACAGCGCCAAAGACAAACCATCACCCCT
CCCCAATTCCAACCCTCTCTCCGCCCTCACAGAAATCTCTC
CCCTCGCCCCAAACCTCGCCGCGCGCCATGGCCGCGCGCCAC 50

CTCCCCCGCCGTCGCATTCTCCGGCGCCGCGCCGCGCCGCGC
GCCGCCATGCCCAAGCCCGCCCGCCAGCCTCTCCCGCGCGC
ACCAGCCCCGCTCGCGCCGCGCGCTCCCCGCGCCGCGTCTGT
CAGGTGCTGCGCCGCGCCCCCGCTGCTGCCACCTCCGCGC
GCGCCCCCGCCACCGCGCTCCGGGCCCTCGGGGCGCCGTCC
GAGCCCCGCAAGGGCGCGCGACATCCTCGTCGAGGCGCTCG
AGCGCTGCGGGCATCGTCGACGTATTCTGCCTACCCCGCGCG
CGCGTCCATGGAGATCCACCAAGGCGCTGACGCGCTCGCGCC
GTCATCACCAACCAACCTCCTTCCGCGCCACGAGCGAGGGGGA
GGCGTTTCGCGGGCGTCCGGGCTACGCCCGCGCGTCCGGGCGC
GTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCCGGGCCCGGGGGCCACCA
ACCTCGTCTCCGCGCTCGCTGACGCCCTCCTCGACTCCAT
CCCCATGGTCGCCATCACGGGGCCAGGTCCCCCGCGCGCATG
ATCGGCACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTGGAGG
TCACGCGCTCCATCACCAAGCACAACTACCTGGTCTCTTGA
CGTGGAGGATATCCCCCGCGTCAATCCAGGAAGCCTTCTTC
CTCGCGTCTCTGGCCGCGCCCGGGGCGCGGTGCTGGTTGATA
TCCCCAAGGATATCCAGCAGCAGATGGCCCGTGCCTATCTG
GGACACGCCGATGAGTTTGCCAGGGTACATCGTCCCGCGCT
GCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCTTG
CGTCTGGTTGGCGAGTCAACGGCGCGCCCAATTCTGTATGTTG
GTGGTTGGCTGCGCTGCATCCGGCGAGGAGTTGCGCCGCTT
TGTTGAGCTCACTGGGATTCGGGTTACAACCTACTCTGATG
GGCCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTCTGCG
GCATGCTTGGGATGCATGGCAGTGTGTATGCAAATTAATGC
AGTCGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGTGTGCGG
TTTGATGATCGCGTGACTGGGAAAAATCGAGGCCCTTTGCAA
GCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGACATTTGACCCAGCTGA
GATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCATTTGTGCA
GATGTTAAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGCTCTATTAA
ATGGGAGCAAAGCACAAACAGGGTCTGGATTTTGGTCCATG
GCACAAGGAGTTGGATCAGCAGAAAGAGGGAGTTTCTCTTA
GGATTCAAGACTTTTGGCGAGGCCATCCCGCGCGCAATATG
CTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCGAT
CATTTGCTACTGGTGTGGGGCAGCACCAAGATGTGGGCGGGCT
CAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTT
CGTCTGGTTGGGGGCAATGGGATTTGGGGTTACCAGCTGCA
GCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTG
ACATTTGATGGAGATGGTAGTTTCTCTCATGAACATTCAGGA
GTTGGCATTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTG
ATGATATTGAACAACCAAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAT
GGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCCAATCGGGCGCGCACACATA
CCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGAT
TTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAAACGTTCCGGGCAGTTC
GTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAA
GATGCTTGAGACCCCAAGGGCCATACCTTGTGGATATCATC
GTCCCGCATCAGGAGCACGCTGCTGCCATATGATCCCAAGCG
GTGGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAG
GACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTG
TGACATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTGTGATCAA

10

20

30

40

50

CTACTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTT
GCTTGTTCATTTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGA
ACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGAT
GTGCTGTCAATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCCCTACAT
ATCAATAATAAGTACTTCCATGGAATAATTCTCAGTTCTG
TTTTTGAATTTTGCATCTTCTCACAAACAGTGTGCTGGTTTC
CTTTCTGTTACTTTACATGTCTGCCGTGTCCGGTTATGAC
ATAATGACCGATGGAGGGTGGTTCAGCAGGTTTTTAGACGGG
GAGTTGAAACTTTTTTTTGGGGGGGAAGAAATCTGAATACA
GTTGGGAGGAAGATAAAAGCATATACCTTGATTAAATTTA
TTGAGCCCAATATCCAGCCTAATTTATCAAGCAATAGGCA
GTGTAGGGTGTG

10

【0418】

配列番号141

CGTTCGCCCCGTAGACCATTTCCTACGAATCGGTACCGGAGA
GACATAGGGGCTGTATGGTTCCTAACCATACCTTGCCACA
CTTTGTCAACACCTCATCTTAGGCCAAATTTAATCAAGTTAT
GTAGGTGTTTTGGTTTTAGCCACATCTAAGGCAAGATTTAT
TTTCCTGAGCAGTGAACCCCATATGTTATAGACATAAAAA
GTGTGGGAAGATTCCCTTTAGTCAAACCTGTGGCTAACAAAT
TTATTAAAGAAATTAACCTTAAGTAAGATAGGTGCAACAAATG
TAGCAAAAAATAATGTGGTATATATAGCAAAGATAGCCACA
ACCGCGAGTGGAAATACCAGATACGAGATCTCTGGTTCATA
TCACACGAGTCCAAATTAATTGCTTTTGTTTGAGGTTCAGC
CTTTTTTGCATAAAAAAGCTAGCCCAAACAAACGAGTGGCG
TCCCATCTGAACACACACTCACCCGCGCGGTGACAGCGC
CAAAGACAAAACCATCACCCCTCCCCAATTCCAACCCCTCT
CTCTGCCCTCACAGAAATCTCTCCTCGCCCAAACCCCTCGC
CGCCGCGCATGGCCGCGAGCCACCTCCCCCGCGCTCGCATTC
TCGGGCGCCGCGCGCGCGCGCGCCATACCCAAACCCG
CCCGCCAGCCTCTCCCCGCGCCACAGCCCGCCTCGCGCGCG
CGCGCTCCCCCGCCCGCATCGTCAAGGTGCTGCGCCGCGTCC
CCCGCGCGCCACCTCCGTGCGCGCTCCCCGCGCACCGCGCTCC
GGCCGTGGGGGCCCTCCGAGCCCGCAAGGGCGCGCGACAT
CCTCGTTCGAGGCGCTGGAGCGCTGCGGCATCGTTCGACGTC
TTCGCTTACCCCTGGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGG
CGCTGACGCGCTCGCCAGTCAATCAACCAACCACTCTTCCG
CCACGAGCAGGGGGAGGCGTTTCGCGGCGTCCGGGTACGCC
CGCGCGTCCGGCGCGGTGCGCGTCTGCGTCCGACCTCCG
GCCCGGGGGCCACCAACCTCGTCTCCGCGCTCGCCGACGC
TCTCCTCGACTCCATCCCCATGGTTCGCCATCACGGGGCCAG
GTCCCCCGCCGCATGATCGGCACGGATGCGTTCCAGGAGA
CGCCCATCGTGGAGGTCAACGCGCTCCATCAACCAAGCACAA
CTACCTGGTCTTTGACGTGGAGGATATCCCCCGCGTCAATC
CAGGAAGCCTTCTTCTCGCATCCTCTGGCCGCGCCGGGGC
CGGTGCTGGTTGATATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGAT
GGCTGTGCCCTGTCTGGGACACGCGCGATGAGTTTGCCAGGG
TACATCGCCCGCCTGCCCAAGCCACCATCTACTGAATCGC
TTGAGCAGGTCTGCGTCTGGTTGGCGAGTCAAGGCGCCC
AATTCCTGTATGTTGGTGGTGGCTGCGCTGCATCTGGTGAG

20

30

40

50

GAGTTGCGCCGCTTTGTTGAGCTCACTGGGATTCCAGTTA
CAACTACTCTTATGGGCTTGGCAACTTCCCCAGTGACGA
CCCAGTGTCTCTGCGCATGCTGGGGATGCATGGCACTGTG
TATGCAAAATTATGCAGTAGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTG
CATTTGGTGTGCGGTTTGTATGATCGTGTGACCGGGAAAAAT
CGAGGCTTTTGGCAAGCAGGTCCAAGATTGTGCACATTGAC
ATTGACCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATG
TCTCCATTTGTGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGGGTT
GAATGCTCTATTAAATGGGAGGCAAAAGCACAAACAGGGTCTG
GATTTTGGTCCATGGCACAAAGGAGTTGGATCAGCAGAAGA
GGGAGTTTCTCTAGGATTCAAGACTTTTGGTGAGGGCCAT
CCCGCCGCAATATGCTATCCAGGTACTGGATGAGCTGACA
AAAGGGGAGGGCGATCATTGCCACCGGTGTTGGGCAGCATC
AGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCAGGCCACG
GCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGATTT
GGGTGCGCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACCCAG
GTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTCTCT
CATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAAC
CTCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACAGCATCTGG
GAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAA
CCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGAGT
GAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCA
ACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCAC
TGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGGAGACCCAGGGCCATAC
TTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGC
CTATGATCCCAAGCGGTGGTGTCTTTTAAGGACATGATCAT
GGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTA
CAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGATACC
TGCGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAACCA
TGCGTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTATATAAGCTTGT
GTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTGTAGTCTCTGTT
CTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATATCATGCAAG
TTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGCACTTCCATGGAA
TAATTCTCAGTTCTGTTTTTGAATTTTACATCTTCTCACGA
ACAGTGTTGCTGGTTCCTTTCTGTTACTTTACATGCCCTGCC
GTGTCAGGTTATGACATAACGACCGATGGAGGATTGGAGG
GTGGTTCGGCTGGTTTTAGACGGGGAAATTGAAACATTTTTC
TGGAAGAAATCTGAATACAGTTGGGAGGGGAAATGGAAGC
ATATATTTATCGAGCCCGCTATCCAGGCTAATTTATCAAG
CACTAGACAGTGTAGGGTGTGGCATTCCTTCTCTTCTTG
ATATCCGGCTTGAGAGGAGAGATTGAGGGCTTCGGCTGTGT
TGGTTGCTGATTTCTACAGCATTTTGGAGAGAGAGAGAG
ATGTTGCAACTGTGTTTTGTCTTGGTTGCTTGTACAGAGA
AAGAGATGACATTTAGAGATATGCAGATCGTTTACCAGTT
GTGCTGCGTTTATTCGTACTGATTGTTGTTATTGTTGCTA
TCATGTGCAAAATTGTTGTGATGGAAAATCAACAAAATTTT
GATATTTTGGCAAGCGAGTTGGATTGAATGATTTGAGAAA
TGGTGACTTGTGTGAGTGGCCTTGAGAATTGGTGTTTTCATA
GGTGTCAGTTGGTAATGAAAGGCGGCGGCTTGAAATTTTC
CGAAAGGCAGGCCAATGATACCTTCTGAAAGTGATGTTTTT

10

20

30

40

50

TCTTCCAGGTTTTCGGGTGGAACAAGTCTACGTTGAGCCAA
TGTTTGTGTCAGCTTATTCTGCTCTTTAGTTTTCAGTTGTTTT
GTTTACAGATTGCTGGGCAGAGCCCCATGATCGGCTGAGC
CTCCAGGAGATCCTTGATTGCTCGACTGC

【0419】

配列番号142

CGTTCGCCCCGTAGACCATTCATACGAATCGGTACCGGAGA
GACATAGGGGGCTATTTGGTTTGTAGCCACATTTTGTCTATA
CTTTGTGACACCGCATCTTATGCAAGTTTGATCAAATTAG
GTGGATGTTTTAGTTCTAACCCACATGTAAGGGAAGATTTTT
TTTTTTTATGAGCATTGAAACCCGTAGACACAAAAGTGTAG
GAAGATTACTTTAAACAAGCTAAAGTGTTGGCTAACAAATTT
AAGCATCTCAGGTAAGATAAGTGCAGACAAATATGGCAAAA
ATAATGTGGTATATATGACAAAGATAGTCACAAATCCAAAC
AGCCCATAGCCTGGCGAGTGCAAATAGATACGAGATCTCT
GGTGATATCACAAACCGTCCAAATTAATTGCTTGTTCAGC
ATCAGCCTTTTTTGCATAAAGAAGCTAGCCCAATCTGAACC
ACACACTCACCCGCGCGGTGACAGCGCCAAAGACAAAACC
ATCACCCCTCCCCAATTCCAACCCCTCTCTCTGCTCTCACAG
AAATCTCCCCCTCGCCCAAAACCCCTCGCCGCGCCCATGGC
CGCCGCGCACCTCCCCCGCGCGTGCATCTCGGGCGCCACC
GCCGCGCGCCATGCCCAAACCCGCGCCCATCTCTCCCGC
GCCACCAGCCCGTCTCGCGCGCGCGCTCCCCGCGCCGCGT
CGTCAGGTGTTGCGCGCGGTCCCCCGCGCCACCTCCGCC
GCGCCTCCCGCAACCGCGGTCTCGGGCCCTGGGGCCCGTCCG
AGCCCCGCAAGGGCGCCGACATCTCTCGTCGAGGCGCTCGA
GCGCTGCGGGCATCGTCGACGTCTTCGCCTACCCCGGCGGC
GCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCGCCCG
TCATCACCAACCACTCTTTCGCGCACGAGCAGGGGGAGGC
GTTGCGGGCGTCCGGCTACGCCCGCGCGTCCGGCCGCGGTC
GGCGTCTGCGTCCGCCACCTCCGGCCCGGGGGCCACCAACC
TCGTCTCCGCGCTCGCCGACGCCCTCTCTGACTCCATCCC
CATGGTTCGCCATCACGGGCGCAGGTCCCCCGCGCATGATC
GGCACGGACGCGTTCCAGGAGACGCCCATAGTGGAGGTCA
CGCGCTCCATCACCAAGCACAACTACCTGGTCCCTTGACGT
GGAGGATATCCCCCGCGTCATCCAGGAAGCCTTCTTCTCTT
GCATCCTCTGGCCGCGCCGGGGCCGGTGCTAGTTGATATCC
CCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCCGTCTGGGA
CACTCCAATGAGTTTGGCCAGGGTACATCGCCCGCCTGCC
AAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGCAGGTCCCTGCGTC
TGGTTGGCGAGTCAAGGCGCCCAATTCTGTATGTTGGTGG
TGGCTGCGCTGCGTCTGGCGAGGAGTTGCGCGCGCTTTGTT
GAGCTTACTGGGATTCCAGTTACAACCTACTCTGATGGGCC
TTGGCAACTTCCCCAGCGACGACCCACTGTCTCTGCGCAT
GCTTGGGATGCATGGCACTGTGTATGCAAAATATGCAGTA
GATAAGGCTGACCTGTTGCTCGCATTTGGTGTTGCGGTTTG
ATGATCGTGTGACTGGGAAAATCGAGGCTTTTGCAGCAG
GTCCAAGATTGTGCACATTGACATTGACCCAGCTGAGATT
GGCAAGAACAGCAGCCACATGTCTCCATTTGTGCAGATG
TTAAGCTTGCTTTACAGGGGTTGAATGATCTATTAAATGG

10

20

30

40

50

GAGCAAAGCACAAACAGGGTCTGGATTTTGGTCCATGGCAC
AAGGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTAGGAT
TCAAGACTTTTGGCGAGGCCATCCCGCCGCAATATGCTAT
CCAGGTACTGGATGAGCTGACAAAAGGGGAGGCGATCATT
GCCACTGGTGTGGGAGCACACAGATGTGGGCGGCTCAGT
ATTACACTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGTC
TGGTTTGGGGGCAATGGGATTTGGGTACCAGCTGCAGCT
GGCGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGACA
TTGATGGTGATGGTAGTTTCCTCATGAACATTCAGGAGTT
GGCGTTGATCCGCAATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGATG
ATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGG
AGGATAGGTTTTTACAAGGCCAATCGGGCGCACACATACCT
TGGCAACCCAGAAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTT
GTGACGATTGCTAAAGGATTTCAACGTTCCAGCAGTTTCGAG
TGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGAT
GCTTGAGACCCCAAGGGCCATACTTGTTGGATATCATAGTC
CCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTTGA
CATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGTTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGTTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATGTCATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATATC
AATAATAAGTACTTCCATGGAATAAATTCCTCAGTTCTGTTTT
TGAATTTTGCATCTTCTCACAAACAGTGTTGCTGGTTCCTT
TCTGTTACTTTACATGTCCTGCTGTGTGTCAGGTTCTGACATA
ACGACCGATGGAGGGTGGTCCGGCAGGTTTTTAGAAGGGGAA
TTGAAACTTTTTTTTGGGAAGAAGTCTGAATACAGTTGGG
AGGA AAAATAGAAGTATATACTTCGATTAAATTTATCAAGC
CCGCTATCCAGTCTAATTTATCAAGCACTAGACAGTGTAG
GGTGTTGGCATTCTTCTCTTCTTGAGATCCGGCTTGAGA
GGAGAGACCGAGGCTTCGGCTGTGTTGGTTGCTGATTTCT
ACAGCTTTTTTGGAGATAGAGAGAGAGATCCTGCAACTGTGG
TTTTGTCCTTGCTGCTTGTACAGCGAGAGAGACATTTGAGAGA
TATGTAGATCGTTTTACCAGTTGTGCTGCTGTTATTCGTAC
TGGTACTGATTGTTGTTACTGTTGCTATCATGTGCAAAATT
GTTGTGATGGAAAATCAACAAAATTTTGATATTTTGCAAA
GCGAGTTGGATTGAATGATTTGAGAAAATGGTGACTGCTTT
CCCTCAGACTTGTTGAGTGGCCTTGAGAAATTGGTGTTTTCA
TAGGTGGTGTATGCAGTTGCTAATGAAAGGCGACGGCTTG
AAATTTCCGAAAGGCAGCCAATGATACTTTCTGAAAGTG
TGTTTTTTTTCGTCCAGGTTTCCGGTGGAGCAAGTCTAGAC
ACACGTTGAGCCAATGTTTTGTCAGCTTATTCTGCTCTTTA
GTTTTCAGTTTAGGTGCAGTTGTTTTGTTTTACAGATTGCTG
GGCAGAGCCCCGTGATCGGCTGAGCCTCCAAGAGATCCT

10

20

30

40

【0420】

配列番号175

t n a n t g g t t a g g t g c t g g t g g t c c g a a g g t c c a c g c c
g c c a a c t a c g

50

【0421】

配列番号176

CNANTACGTAGTTGGCGGCGTGGACCTTCGGACCACCAGC
ACCTAAC

【0422】

配列番号177

TNANTGGTTAGGTGCTGGTGGTCCGAAGGTCCACGCCGCC
AACTACG

【0423】

配列番号178

ANGNGTCGTAGTTGGCGGCGTGGACCTTCGGACCACCAGC
ACCTAAC

【0424】

配列番号179

TGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTAT
GATCCCAAGCGGTGGTGGTTCGAAGGACATGATCATGGGT
TAGGTGCTGGTGGTCCGAAGGTCCACGCCGCCAACTACGT
GGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATG
ATCCCAAGCGGTGGTGGTTCGAAGGACATGATCATGG

【0425】

配列番号180

CCATGATCATGTCCTTGAAAGCACCCACCGCTTGGGATCAT
AGGCAGCACGTGCTCCTGATGCGGGGACTATGATATCCACG
TAGTTGGCGGCGTGGACCTTCGGACCACCAGCACCTAACCC
CATGATCATGTCCTTGAAAGCACCCACCGCTTGGGATCATTA
GGCAGCACGTGCTCCTGATGCGGGGACTATGATATCCA

【0426】

配列番号181

TGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTAT
GATCCCAAGCGGTGGTGGTTCGAAGGACATGATCATGGGT
TAGGTGCTGGTGGTCCGAAGGTCCACGCCGCCAACTACGG
ATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTGACCTACAAGACCT
ACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGT

【0427】

配列番号182

ACGCGGGGCATCATGCTGATTGCGCATGTCACACTTGTAGG
TCTTGTAGGTGGAATTTAGTACGAGGTCTGCCATCCG
TAGTTGGCGGCGTGGACCTTCGGACCACCAGCACCTAACCC
CATGATCATGTCCTTGAAAGCACCCACCGCTTGGGATCATTA
GGCAGCACGTGCTCCTGATGCGGGGACTATGATATCCA

【0428】

配列番号183

GGAGTTGGCGTTGATCCGNC

【0429】

配列番号184

AACTACAGGGTTTCGGAACTAAGTAANT

【0430】

配列番号185

tggcaggatatattgtggtgtaaacaaattgacgcttaga
caacttaataacacattgcggacgtttttaatgtactgaa

10

20

30

40

50

t t a a c g c c g a a t t g a a t t c g a g c t c g g t a c c a c t g g a t t t
t g g t t t t a g g a a t t a g a a a t t t t a t t g a t a g a a g t a t t t t
a c a a a t a c a a a t a c a t a c t a a g g g t t t c t t a t a t g c t c a a
c a c a t g a g c g a a a c c c t a t a a g a a c c c t a a t t c c c t t a t c
t g g g a a c t a c t c a c a c a t t a t t c t g g a g a a a a t a g a g a g
a g a t a g a t t t g t a g a g a g a g a c t g g t g a t t t t t g c g g a c t
c t a t t a g a t c t g g g t a a c t g g c c t a a c t g g c c t t g g a g g a
g c t g g c a a c t c a a a a t c c c t t t g c c a a a a a c c a a c a t c a t
g c c a t c c a c c a t g c t t g t a t c c a g c t g c g c g c a a t g t a c c
c c g g g c t g t g t a t c c c a a a g c c t c a t g c a a c c t a a c a g a t
g g a t c g t t t g g a a g g c c t a t a a c a g c a a c c a c a g a c t t a a
a a c c t t g c g c c t c c a t a g a c t t a a g c a a a t g t g t g t a c a a
t g t g g a t c c t a g g c c c a a c c t t t g a t g c c t a t g t g a c a c g
t a a a c a g t a c t c t c a a c t g t c c a a t c g t a a g c g t t c c t a g
c c t t c c a g g g c c c a g c g t a a g c a a t a c c a g c c a c a a c a c c
c t c a a c c t c a g c a a c c a a c c a a g g g t a t c t a t c t t g c a a c
c t c t c g a g a t c a t c a a t c c a c t c t t g t g g t g t t t g t g g c t
c t g t c c t a a a g t t c a c t g t a g a c g t c t c a a t g t a a t g g t t
a a c g a t a t c a c a a a c c g c g g c c a t a t c a g c t g c t g t a g c t
g g c c t a a t c t c a a c t g g t c t c c t c t c c g g a g a c a t g g c t t
c t a c c t a c a a a a a a g c t c c g c a c g a g g c t g c a t t t g t c a c
a a a t c a t g a a a a g a a a a a c t a c c g a t g a a c a a t g c t g a g g
g a t t c a a a t t c t a c c c a c a a a a a g a a g a a a g a a a g a t c t a
g c a c a t c t a a g c c t g a c g a a g c a g c a g a a a t a t a t a a a a a
t a t a a a c c a t a g t g c c c t t t t c c c c t c t t c c t g a t c t t g t
t t a g c a t g g c g g a a a t t t t a a a c c c c c c a t c a t c t c c c c c
a a c a a c g g c g g a t c g c a g a t c t a c a t c c g a g a g c c c c a t t
c c c c g c g a g a t c c g g g c c g g a t c c a c g c c g g c g a g a g c c c
c a g c c g c g a g a t c c c g c c c c t c c c g c g c a c c g a t c t g g g c
g c g c a c g a a g c c g c c t c t c g c c c a c c c a a a c t a c c a a g g c
c a a a g a t c g a g a c c g a g a c g g a a a a a a a a a c g g a g a a a g
a a a g a g g a g a g g g g c g g g g t g g t t a c c g g c g c g g c g g c g g
c g g a g g g g g a g g g g g a g g a g c t c g t c g t c c g g c a g c g a g
g g g g g a g g a g g t g g a g g t g g t g g t g g t g g t g g t a g g g
t t g g g g g g a t g g g a g g a g a g g g g g g g t a t g t a t a t a g t g
g c g a t g g g g g g c g t t t c t t t g g a a g c g g a g g g a g g g c c g g
c c t c g t c g c t g g c t c g c g a t c c t c c t c g c g t t t c c g g c c c
c c a c g a c c c g g a c c c a c c t g c t g t t t t t t c t t t t t c t t t t
t t t t c t t t c t t t t t t t t t t t t g g c t g c g a g a c g t g c g g t
g c g t g c g g a c a a c t c a c g g t g a t a g t g g g g g g g t g t g g a g
a c t a t t g t c c a g t t g g c t g g a c t g g g g t g g g t t g g g t t g g
g t t g g g t t g g g c t g g g c t t g c t a t g g a t c g t g g a t a g c a c
t t t g g g c t t t a g g a a c t t t a g g g g t t g t t t t t g t a a a t g t
t t t g a g t c t a a g t t t a t c t t t t a t t t t a c t a g a a a a a t
a c c c a t g c g c t g c a a c g g g g g a a a g c t a t t t t a a t c t t a t
t a t t g t t c a t t g t g a g a a t t c g c c t g a a t a t a t a t t t t t c
t c a a a a a t t a t g t c a a a t t a g c a t a t g g g t t t t t t t a a a g
a t a t t t c t t a t a c a a a t c c c t c t g t a t t t a c a a a a g c a a a
c g a a c t t a a a a c c c g a c t c a a a t a c a g a t a t g c a t t t c c a
a a a g c g a a t a a a c t t a a a a a c c a a t t c a t a c a a a a a t g a c

10

20

30

40

50

g t a t c a a a g t a c c g a c a a a a a c a t c c t c a a t t t t t a t a a t
a g t a g a a a a g a g t a a a t t t c a c t t t g g g c c a c c t t t t a t t
a c c g a t a t t t t a c t t t a t a c c a c c t t t t a a c t g a t g t t t t
c a c t t t t g a c c a g g t a a t c t t a c c t t t g t t t t a t t t t g g a
c t a t c c c g a c t c t c t t c t c a a g c a t a t g a a t g a c c t c g a g
t a t g c t a g t c t a g a g t c g a c c t g c a g g g t g c a g c g t g a c c
c g g t c g t g c c c c t c t c t a g a g a t a a t g a g c a t t g c a t g t c
t a a g t t a t a a a a a a t t a c c a c a t a t t t t t t t g t c a c a c t
t g t t t g a a g t g c a g t t t a t c t a t c t t t a t a c a t a t a t t t a
a a c t t t a c t c t a c g a a t a a t a t a a t c t a t a g t a c t a c a a t
a a t a t c a g t g t t t t a g a g a a t c a t a t a a a t g a a c a g t t a g
a c a t g g t c t a a a g g a c a a t t g a g t a t t t t g a c a a c a g g a c
t c t a c a g t t t t a t c t t t t t a g t g t g c a t g t g t t c t c c t t t
t t t t t t g c a a a t a g c t t c a c c t a t a t a a t a c t t c a t c c a t
t t t a t t a g t a c a t c c a t t t a g g g t t t a g g g t t a a t g g t t t
t t a t a g a c t a a t t t t t t t a g t a c a t c t a t t t t a t t c t a t t
t t a g c c t c t a a a t t a a g a a a a c t a a a a c t c t a t t t t a g t t
t t t t t a t t t a a t a a t t t a g a t a t a a a a t a g a a t a a a a t a a
a g t g a c t a a a a a t t a a a c a a a t a c c c t t t a a g a a a t t a a a
a a a a c t a a g g a a a c a t t t t t c t t g t t t c g a g t a g a t a a t g
c c a g c c t g t t a a a c g c c g t c g a c g a g t c t a a c g g a c a c c a
a c c a g c g a a c c a g c a g c g t c g c g t c g g g c c a a g c g a a g c a
g a c g g c a c g g c a t c t c t g t c g c t g c c t c t g g a c c c c t c t c
g a g a g t t c c g c t c c a c c g t t g g a c t t g c t c c g c t g t c g g c
a t c c a g a a a t t g c g t g g c g g a g c g g c a g a c g t g a g c c g g c
a c g g c a g g c g g c c t c c t c c t c c t c t c a c g g c a c g g c a g c t
a c g g g g g a t t c c t t t c c c a c c g c t c c t t c g c t t t c c c t t c
c t c g c c c g c c g t a a t a a a t a g a c a c c c c c t c c a c a c c c t c
t t t c c c c a a c c t c g t g t t g t t c g g a g c g c a c a c a c a c a
a c c a g a t c t c c c c c a a a t c c a c c c g t c g g c a c c t c c g c t t
c a a g g t a c g c c g c t c g t c c t c c c c c c c c c c c t c t c t a c
c t t c t c t a g a t c g g c g t t c c g g t c c a t g g t t a g g g c c c g g
t a g t t c t a c t t c t g t t c a t g t t t g t g t t a g a t c c g t g t t t
g t g t t a g a t c c g t g c t g c t a g c g t t c g t a c a c g g a t g c g a
c c t g t a c g t c a g a c a c g t t c t g a t t g c t a a c t t g c c a g t g
t t t c t c t t t g g g g a a t c c t g g g a t g g c t c t a g c c g t t c c g
c a g a c g g g a t c g a t t t c a t g a t t t t t t t t g t t t c g t t g c a
t a g g g t t t g g t t t g c c c t t t t c c t t t a t t t c a a t a t a t g c
c g t g c a c t t g t t t g t c g g g t c a t c t t t t c a t g c t t t t t t
t g t c t t g g t t g t g a t g a t g t g g t c t g g t t g g g c g g t c g t t
c t a g a t c g g a g t a g a a t t c t g t t t c a a a c t a c c t g g t g g a
t t t a t t a a t t t t g g a t c t g t a t g t g t g t g c c a t a c a t a t t
c a t a g t t a c g a a t t g a a g a t g a t g g a t g g a a a t a t c g a t c
t a g g a t a g g t a t a c a t g t t g a t g c g g g t t t t a c t g a t g c a
t a t a c a g a g a t g c t t t t t g t t c g c t t g g t t g t g a t g a t g t
g g t g t g g t t g g g c g g t c g t t c a t t c g t t c t a g a t c g g a g t
a g a a t a c t g t t t c a a a c t a c c t g g t g t a t t t a t t a a t t t t
g g a a c t g t a t g t g t g t g t c a t a c a t c t t c a t a g t t a c g a g
t t t a a g a t g g a t g g a a a t a t c g a t c t a g g a t a g g t a t a c a
t g t t g a t g t g g g t t t t a c t g a t g c a t a t a c a t g a t g g c a t

10

20

30

40

50

a t g c a g c a t c t a t t c a t a t g c t c t a a c c t t g a g t a c c t a t
c t a t t a t a a t a a a c a a g t a t g t t t t a t a a t t a t t t t g a t c
t t g a t a t a c t t g g a t g a t g g c a t a t g c a g c a g c t a t a t g t
g g a t t t t t t t a g c c c t g c c t t c a t a c g c t a t t t a t t t g c t
t g g t a c t g t t t c t t t t g t c g a t g c t c a c c c t g t t g t t t g g
t g t t a c t t c t g c a g g a g g a t c a c a a g t t t g t a c a a a a a a g
c a g g c t a t g g c c g c c g c c a c c t c c c c c g c c g t c g c a t t c t
c g g g c g c c a c c g c c g c c g c c a t g c c c a a a c c c g c c c g c c a
t c c t c t c c c g c g c c a c c a g c c c g t c t c g c g c c g c g c g c t c
c c c g c c c g c g t c g t c a g g t g t t g c g c c g c g t c c c c c g c c g
c c a c c t c c g c c g c g c c t c c c g c a a c c g c g c t c c g g c c c t g
g g g c c c g t c c g a g c c c c g c a a g g g c g c c g a c a t c c t c g t c
g a g g c g c t c g a g c g c t g c g g c a t c g t c g a c g t c t t c g c c t
a c c c c g g c g g c g c c t c c a t g g a g a t c c a c c a g g c g c t g a c
g c g c t c g c c c g t c a t c a c c a a c c a c c t c t t c c g c c a c g a g
c a g g g g g a g g c g t t c g c g g c g t c c g g c t a c g c c c g c g c g t
c c g g c c g c g t c g g c g t c t g c g t c g c c a c c t c c g g c c c g g g
g g c c a c c a a c c t c g t c t c c g c g c t c g c c g a c g c c c t c c t c
g a c t c c a t c c c c a t g g t c g c c a t c a c g g g c c a g g t c c c c c
g c c g c a t g a t c g g c a c g g a c g c g t t c c a g g a g a c g c c c a t
a g t g g a g g t c a c g c g c t c c a t c a c c a a g c a c a a c t a c c t g
g t c c t t g a c g t g g a g g a t a t c c c c c g c g t c a t c c a g g a a g
c c t t c t t c c t t g c a t c c t c t g g c c g c c c g g g g c c g g t g c t
a g t t g a t a t c c c c a a g g a c a t c c a g c a g c a g a t g g c t g t g
c c c g t c t g g g a c a c t c c a a t g a g t t t g c c a g g g t a c a t c g
c c c g c c t g c c c a a g c c a c c a t c t a c t g a a t c g c t t g a g c a
g

10

20

30

g t c c t g c g t c t g g t t g g c g a g t c a c g g c g c c c a a t t c t g t
a t g t t g g t g g t g g c t g c g c t g c g t c t g g c g a g g a g t t g c g
c c g c t t t g t t g a g c t t a c t g g g a t t c c a g t t a c a a c t a c t
c t g a t g g g c c t t g g c a a c t t c c c c a g c g a c g a c c c a c t g t
c t c t g c g c a t g c t t g g g a t g c a t g g c a c t g t g t a t g c a a a
t t a t g c a g t a g a t a a g g c t g a c c t g t t g c t c g c a t t t g g t
g t g c g g t t t g a t g a t c g t g t g a c t g g g a a a a t c g a g g c t t
t t g c a a g c a g g t c c a a g a t t g t g c a c a t t g a c a t t g a c c c
a g c t g a g a t t g g c a a g a a c a a g c a g c c a c a t g t c t c c a t t
t g t g c a g a t g t t a a g c t t g c t t t a c a g g g g t t g a a t g a t c
t a t t a a a t g g g a g c a a a g c a c a a c a g g g t c t g g a t t t t g g
t c c a t g g c a c a a g g a g t t g g a t c a g c a g a a g a g g g a g t t t
c c t c t a g g a t t c a a g a c t t t t g g c g a g g c c a t c c c g c c g c
a a t a t g c t a t c c a g g t a c t g g a t g a g c t g a c a a a a g g g g a
g g c g a t c a t t g c c a c t g g t g t t g g g c a g c a c c a g a t g t g g
g c g g c t c a g t a t t a c a c t t a c a a g c g g c c a c g g c a g t g g c
t g t c t t c g t c t g g t t t g g g g g c a a t g g g a t t t g g g t t a c c
a g c t g c a g c t g g c g c t g c t g t g g c c a a c c c a g g t g t t a c a
g t t g t t g a c a t t g a t g g t g a t g g t a g t t t c c t c a t g a a c a

40

50

t t c a g g a g t t g g c g t t g a t c c g c a t t g a g a a c c t c c c a g t
g a a g g t g a t g a t a t t g a a c a a c c a g c a t c t g g g a a t g g t g
g t g c a g t g g g a g g a t a g g t t t t a c a a g g c c a a t c g g g c g c
a c a c a t a c c t t g g c a a c c c a g a a a a t g a g a g t g a g a t a t a
t c c a g a t t t t g t g a c g a t t g c t a a a g g a t t c a a c g t t c c a
g c a g t t c g a g t g a c g a a g a a g a g c g a a g t c a c t g c a g c a a
t c a a g a a g a t g c t t g a g a c c c c a g g g c c a t a c t t g t t g g a
t a t c a t a g t c c c g c a t c a g g a g c a c g t g c t g c c t a t g a t c
c c a a a t g g t g g t g c t t t c a a g g a c a t g a t c a t g g a g g g t g
a t g g c a g g a c c t c g t a c t g a t a c c c a g c t t t c t t g t a c a a
a g t g g t g a t c c t a c t a g t a g a a g g a g t g c g t c g a a g c a g a
t c g t t c a a a c a t t t g g c a a t a a a g t t t c t t a a g a t t g a a t
c c t g t t g c c g g t c t t g c g a t g a t t a t c a t a t a a t t t c t g t
t g a a t t a c g t t a a g c a t g t a a t a a t t a a c a t g t a a t g c a t
g a c g t t a t t t a t g a g a t g g g t t t t t a t g a t t a g a g t c c c g
c a a t t a t a c a t t t a a t a c g c g a t a g a a a c a a a a t a t a g c
g c g c a a a c t a g g a t a a a t t a t c g c g c g c g g t g t c a t c t a t
g t t a c t a g a t c g a a a g c t t a g c t t g a g c t t g g a t c a g a t t
g t c g t t t c c c g c c t t c a g t t t a a a c t a t c a g t g t t t g a c a
g g a t a t a t t g g c g g g t a a a c

10

20

【0431】

配列番号186

A T T T T C C A T T C A C T T G G C C C

【0432】

配列番号187

T G C T A T C T G G C T C A G C T G C

【0433】

配列番号188

A T G G T G G A A G G G C G G T T G T G A

【0434】

30

配列番号189

C T C C C G C G C A C C G A T C T G

【0435】

配列番号190

C C C G C C C C T C T C C T C T T T C

【0436】

配列番号191

A A G C C G C C T C T C G C C C A C C C A

【0437】

配列番号192

A Y C A G A T G T G G G C G G C T C A G T A T

【0438】

配列番号193

G G G A T A T G T A G G A C A A G A A A C T T G C A T G A

【0439】

配列番号194

A C C A G A T G T G G G C G G C T C A G T A T T A C A C T T A C A A G C G G C C
A C G G C A G T G G C T G T C T T C G T C T G G T T G G G G G C A A T G G G A T
T T G G G T T A C C A G C T G C A G C T G G C G C T G C T G T G G C C A A C C C
A G G T G T T A C A G T T G T T G A C A T T G A T G G A G A T G G T A G T T T C

50

CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCATATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTC AAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGGCCCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTC AACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGT TACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCTCTACATATC
【0440】

配列番号195

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTCT
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTTCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATCATGG
AGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCCTACA
AGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTGGCCG
CGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAACCATG
CGTTTTTCTAGTTTTGCTTGT TTTTCATTCATATAAGCTTGTGT
TACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTTGTAGTCTATGCTCT
CTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATATCATGCAAGTT
TCTTGTCTCTACATATC

【0441】

配列番号196

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG

AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGA
a t G G c G G c G C T T T C A A G G A C A T G A T C A T G G A G G G T G A T G G
CAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGAAGGTCCACGCCGCC
AACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGAC
ATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATT
TCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGC
ATGATACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACT
GTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTTCATAT
AAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAG
TCTCTGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATAT
CATGCAAGTTTTCTTGTCCCTACATATC

10

【0442】

配列番号197

ATCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCCTACATATC

20

30

【0443】

配列番号198

ACCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC

40

50

TGCCTAa tGGcGGcGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGG
TGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGAAGGTCCAC
GCCGCCAACTACGAGTCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGA
CATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAAT
TTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAG
CATGATGCCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTC AAC
TGTGAGCCATGCGTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTCTATA
TAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAG
GTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATG
TCATGCAAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

10

【0444】

配列番号199

ACCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCTGCTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGCTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACCTGTGAG
CCATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTCTATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

20

30

【0445】

配列番号200

ACCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCTGCTCTGGTTTGGGGGCAATGGGAT
TTTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCTGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCAC AAGCG
GTGGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAG
GACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTG
TGACATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTTGTATCAA
CTACTAGGGGTTC AACCTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTT

40

50

GCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGA
ACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGAT
GTGCTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCCTACAT
ATC

【0446】

配列番号201

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCTCCGTCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0447】

配列番号202

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTC AACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

30

40

【0448】

配列番号203

50

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTGTCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0449】

配列番号204

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCG
AAGGTCCACGCCCGCCAACCTACGAGTCCCAAGCGGTGGTGC
TTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCG
TACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATG
CGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGTGTGATCAACTACTAG
GGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTCTAGTTTGTCTTGT
TCATTCATATAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGT
AGTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGT
CATAAGATGTGATGCAAGTTTCTTGTCCTACATATC

30

40

【0450】

配列番号205

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT

50

CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTTGTTTTCATTCATATAAGCT
TGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

【0451】

配列番号206

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTTCATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATATC

20

30

40

【0452】

配列番号207

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA

50

GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCGTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCTACATATC

10

【0453】

配列番号208

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTACATATC

20

30

【0454】

配列番号209

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC

40

50

CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0455】

配列番号210

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCC GCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0456】

配列番号211

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCC GCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

30

40

50

【0457】

配列番号 2 1 2

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC CAGGGCCAT
ACTTGT TTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAa tGGcGGcGCTTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTC AACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0458】

配列番号 2 1 3

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC CAGGGCCAT
ACTTGT TTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTTTCATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCCTACATATC

30

40

【0459】

配列番号 2 1 4

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA

50

TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTTGGATATCATTTGTCGCCGATCAGGAGCACGTGC
TGTAGTTTGGCGGCGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGT
GATGKCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGAAGGTCCACG
CCTCGTATGAAATGGTCCGAAGGTCCACGCCGCCAACTAC
GAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTATGATT
CCCAATGGCGGCTTCCCAATGGCGGCGCTTTTCAAGGACAT
GATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGT
CCGAAGGTCCACGCCGCCAACTACGATGATCCCAAGCGGT
GGTGCTTTTTAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGA
CCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTTG
ACATGCGCAATCAGCATGATACCTGCGTGTGTATCAACT
ACTGGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGC
TTGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAAC
CGTGTAGTTTTTGTAGTCTCTGTTCTCTTTTGTAGGGATGT
GCTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCTCTACATAT
C

10

20

【0460】

配列番号215

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTTGGATATCATTTGTCGCCGATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

30

40

【0461】

配列番号216

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC

50

ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCG
AAGGTCCACGCCCGCCAACCTACGAGTATGATCCCAAGCGGT
GGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGA
CCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTG
ACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGTTGTATCAACT
ACTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTTCTAGTTTTGC
TTGTTTTCATTCATATAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAAC
CCTGTAGTTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGT
GCTGTCATAAGATGTCATGCAAGTTTCTTGTCTTACATAT
C

10

20

【0462】

配列番号217

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATTCCCAATGGCGGGCGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCC
GAAGGTCCACGCCCGCCAACCTCGTACTGAAATGGTCCRAAG
GTCCACGCCCGCCAACCTACGAGTATGATCCCAAGCGGTGGT
GCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCT
CGTACTGARATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACA
TGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGTTGTATCAACTACT
AGGGGTTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTG
TTTTCATTCATATAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAACCCCT
GTAGTTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCT
GTCATAAGATGTCATGCAAGTTTCTTGTCTTACATATC

30

40

【0463】

配列番号218

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC

50

ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCA ACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGC CCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTC AACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGT TACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCTTACATATC
【0464】

10

20

配列番号219

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC TTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGT TTTTCATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCTTACATATC
【0465】

30

40

配列番号220

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGC AATGGGA
TTTTGGGTGTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG

50

AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATGCTTTTAAGGACA
TGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTT
CGACCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCA
TGATACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTG
TGAACCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTTCATATA
AGCTTGTTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGT
CTCTGTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATC
ATGCAAGTTTCTTGTCCCTACATATC

10

【0466】

配列番号221

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTTGC
TGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCCTACATATC

20

30

【0467】

配列番号222

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTTGC

40

50

TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTTGTCTACATATC

【0468】

配列番号223

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTTGTCTACATATC

【0469】

配列番号224

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGAGATGGTAGTTTT
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG

CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCCTACATATC

【0470】

配列番号225

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGTCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTGT
CCCGCGTGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0471】

配列番号226

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGGA
TTTGGGTGTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATtCCcAa tGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCG
AAGGTCCACGCCCGCCAACCTACGAGTATGATCCCAAGCGGT
GGTGTCTTTTAAGGACATGATCATGGAGGGGTGATGGCAGGA
CCTCGTACTGAAATTTTCGACCCTACAAGACCTACAAGTGTG
ACATGCGCAATCAGCATGATACCTGCGTGTGTGTATCAACT
ACTGGGGGTTC AACTGTGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTGC
TTGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAAC
CGTGTAGTTTTTGTAGTCTCTGTCTCTTTTGTAGGGATGT
GCTGTTCATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATAT
C

30

40

【0472】

50

配列番号 2 2 7

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTTGTTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTCTTGTCTACATATC

【0473】

配列番号 2 2 8

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGATATCATTCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGT
GCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTTGTTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCTACATATC

【0474】

配列番号 2 2 9

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG

AACCTCCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCATATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTAATTAAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

【0475】

配列番号230

ACCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGGCCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTGCT
TGTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATATC

20

30

【0476】

40

配列番号231

ACCAGATGTGGGCGGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT

50

CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTGT
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGGCTTGTTTTCATTATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCTACATATC

10

【0477】

配列番号232

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTGGCTTGTTTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGC
AAGTTTCTTGTCTACATATC

20

30

【0478】

配列番号233

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT

40

50

ACCTGCGTGTGTGATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AAGTTTCTTGTCTTACATATC

【0479】

配列番号234

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCTTACATATC

【0480】

配列番号235

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCTTACATATC

【0481】

10

20

30

40

50

配列番号 2 3 6

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTTCATTATATAAGCTTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0482】

配列番号 2 3 7

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTTCATTATATAAGCTTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0483】

配列番号 2 3 8

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG

AACCTCCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

【0484】

配列番号239

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTTGGGTGTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

20

30

【0485】

配列番号240

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTTGGGTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA

40

50

TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

【0486】

10

配列番号241

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

20

30

【0487】

配列番号242

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCAATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA

40

50

CATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATC
【0488】

配列番号 243

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGCCCGCGTGTTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCTACATATC
【0489】

配列番号 244

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCtGcGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGC
AGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGAAGGTCCACGCCGCCA
ACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAAGGACA
TGATCATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTT
CGACCTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCA
TGATACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTG
TGAACCATGCGTTTTTCTAGTTTGCTTGTTCATTCATATA

AGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGT
CTCTGTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATC
ATGCAAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0490】

配列番号245

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCGCCGATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTGGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0491】

配列番号246

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTTCTAGTTTGGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATGTCAATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

30

40

【0492】

配列番号247

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC

50

ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATGTCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

【0493】

配列番号248

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCGA
AGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGTG
GTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGAC
CTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTGA
CATGCGCAATCAGCATGGTGGCCGCGTGTGTATCAACTA
CTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTTTGCT
TGTTTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGAACC
CTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGATGTG
CTGTCAATAAGATATCATGCAAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

【0494】

配列番号249

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA

ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTAC AAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC CAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTCTGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGTATCAACTACTAGGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCTACATATC

10

【0495】

配列番号250

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTTGGGTGTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC CAGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTCTGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGTATCAACTACTGGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTACATATC

20

30

【0496】

配列番号251

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTTGGGTGTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC CAGGGCCA

40

50

TACTTGTGGATATCATTTGTCCTCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

【0497】

10

配列番号252

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATGTTCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

20

30

【0498】

配列番号253

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCT

40

50

TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCCTACATATC

【0499】

配列番号254

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC TTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGT TTTCAATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCCTACATATC

10

20

【0500】

配列番号255

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC TTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTC AACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGT TTTCAATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCCTACATATC

30

40

【0501】

配列番号256

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC

50

ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

10

【0502】

20

配列番号257

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTCTACATATC

30

40

【0503】

配列番号258

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC

50

CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATtCCcAa tGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCG
AAGGTCCACGCCGCCAACTACGAGTATGATCCCAAGCGGT
GGTGCTTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAGGA
CCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTGTTG
ACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGTGTATCAACT
ACTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTTCTAGTTTTGC
TTGTTTTCATTTCAATAAGCTTGTATTACTTAGTTCCGAAC
CCTGTAGTTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTTGTAGGGATGT
GCTGTCATAAGATGTCATGCAAGTTTCTTGTCTACATAT
C

10

【0504】

配列番号259

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTTTCATTTCAATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCTGTAGTTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCTACATATC

20

30

【0505】

配列番号260

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTT
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTTGATCCGTATTTGAGA
ACCTCCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC

40

50

ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCTACATATC

10

【0506】

配列番号261

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTGATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCAATAAGATATCATGCA
AGTTTCTTGTCTACATATC

20

30

【0507】

配列番号262

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTGATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA

40

50

CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0508】

配列番号263

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0509】

配列番号264

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGT
CCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGT
GATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACC
TACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCGTGT
TGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCGTTTT
TCTAGTTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCTTGTTACTT
AGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTTGTAGTCTATGTTCTCTTTT
GTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGCAAGTTTTCTTG
TCCTACATATC

【0510】

配列番号265

10

20

30

40

50

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
 ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
 TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
 CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT
 CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
 AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
 TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTACAAGGC
 CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
 AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
 TCAACGTTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
 CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
 TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
 TGCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
 CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATGGTCCG
 AAGGTCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGATCATGGAG
 GGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAG
 ACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCG
 TGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCG
 TTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTATTA
 CTTAGTTCCGAACCCTGTAGTTTGTAGTCTATGTTCTCT
 TTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGCAAGTTTC
 TTGTCTTACATATC

10

20

【0511】

配列番号266

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
 ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGAT
 TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
 AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
 ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
 GGGAAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTACAAGGCC
 AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
 GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTT
 CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
 ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGGCCAT
 ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
 GCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
 ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTg c A g G
 GTGGTGGCTTTCAAGGACATGATCATGGAGGGTGATGGCAG
 GACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAGACCTACAAGTG
 TGACATGCGCAATCAGCATGGTGGCCGCGTGTGTATCAA
 CTACTAGGGGTTCAACTGTGAACCATGCGTTTTCTAGTTT
 GCTTGTTCATTCATATAAGCTTGTGTTACTTAGTTCCGA
 ACCCTGTAGCTTTGTAGTCTATGCTCTCTTTTGTAGGGAT
 GTGCTGTCATAAGATATCATGCAAGTTTCTTGTCTTACAT
 ATC

30

40

【0512】

配列番号267

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
 ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGAT

50

TTGGGTTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGC AATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCAT
ACTTGTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC TTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGGTG
CCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC
CATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCTACATATC

【0513】

配列番号268

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC TTTTAAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTTCTAGTTTGTCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCTACATATC

【0514】

配列番号269

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAAATGAG

AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCGGCAGTTCGTGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGTCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATAGCT
TGTGTTACTTAGTTC CGAACCGTGTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

10

【0515】

配列番号270

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATtCCcAatGGcGGcGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATgggtccg
aagggtCAAGCGGTGGTGTCTTTCAAGGACATGATCATGGAG
GGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCTACAAG
ACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGATGCCCGCG
TGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAGCCATGCG
TTTTCTAGTTTTGCTTGTTCATTATAGCTTGTATTA
CTTAGTTCCGAACCTGTAGTTTTGTAGTCTATGTTCTCT
TTTTGTAGGGATGTGCTGTCTATAAGATGTCTATGCAAGTTTC
TTGTCTACATATC

20

30

【0516】

配列番号271

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGTGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTTCCAGCAGTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC

40

50

TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTTGCTTGTTTTCATTATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCTACATATC

【0517】

配列番号272

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTTGCTAAAGGATTT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATtCCcAa tGGcGGcGCTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTg c A g g
TACAAGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGATCA
TGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACCT
ACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTGC
CCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAACC
ATGCGTTTTTCTAGTTTTGCTTGTTTTCATTATATAAGCTTG
TGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATGTC
TCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATATCATGCAA
GTTTCTTGTCTACATATC

【0518】

配列番号273

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTGGGGGCAATGGGAT
TTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAAACCC
AGGTGTTACAGTTGTTGACATTTGATGGAGATGGTAGTTTTC
CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGTATTTGAGA
ACCTCCCTGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATCT
GGGAATGGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGCC
AATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAGA
GTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTTGCTAAAGGATTT
CAACGTTTCCGGCAGTTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTC
ACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGGCCAT
ACTTGTGGATATCATCGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCT
GCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCTTTTCAAGGACATGATC
ATGGAGGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGACC
TACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGGTGC
CCGCGTGTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAAC

CATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCTT
GTGTTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGCTTTGTAGTCTATG
CTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGCA
AGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0519】

配列番号274

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0520】

配列番号275

ATCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCATCCGGTTTGGGTGCAATGGGA
TTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGGGATGGTAGTTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTTACAAGGC
CAACCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGCCTTTTAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGCAATCAGCATGAT
ACCTGCGTGTTGTATCAACTACTGGGGGTTCAACTGTGAA
CCATGCGTTTTCTAGTTTGCTTGTTTCATTTCATATAAGCT
TGTGTTACTTAGTTCCGAACCGTGTTAGTTTTGTAGTCTCT
GTTCTCTTTTTGTAGGGATGTGCTGTTCATAAGATATCATGC
AAGTTTTCTTGTCCTACATATC

【0521】

配列番号276

10

20

30

40

50

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGGCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCCCTACATATC

10

20

【0522】

配列番号277

ACCAGATGTGGGCGGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGGCC
ACGGCAGTGGCTGTCTTCGTCTGGTTTGGGGGCAATGGGA
TTTGGGTTACCAGCTGCAGCTGGCGCTGCTGTGGCCAACC
CAGGTGTTACAGTTGTTGACATTGATGGTGATGGTAGTTT
CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCATTGAG
AACCTCCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAGCATC
TGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTACAAGGC
CAATCGGGCGCACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGAG
AGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGAT
TCAACGTTCCAGCAGTTTCGAGTGACGAAGAAGAGCGAAGT
CACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCAGGGCCA
TACTTGTGGATATCATAGTCCCGCATCAGGAGCACGTGC
TGCCCTATGATCCCAAGCGGTGGTGGCTTTCAAGGACATGAT
CATGGAGGGTGATGGCAGGACCTCGTACTGAAATTTTCGAC
CTACAAGACCTACAAGTGTTGACATGCGCAATCAGCATGAT
GCCCGCGTGTTGTATCAACTACTAGGGGTTCAACTGTGAG
CCATGCGTTTTCTAGTTTGGCTTGTTCATTTCATATAAGCT
TGTATTACTTAGTTCCGAACCCCTGTAGTTTTGTAGTCTAT
GTTCTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCATAAGATGTCATGC
AAGTTTCTTGTCCCTACATATC

30

40

【0523】

配列番号299

TCCAAGGTTGCGGCGCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGC
CAT::::TACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATTTTCAA
TTTATTT

【0524】

配列番号326

tggcaggatataattgtggtgtaaacaaattgacgcttaga

50

c a a c t t a a t a a c a c a t t g c g g a c g t t t t a a t g t a c t g a a
t t a a c g c c g a a t t g a a t t c g a g c t c g g t a c c a c t g g a t t t
t g g t t t t a g g a a t t a g a a a t t t t a t t g a t a g a a g t a t t t t
a c a a a t a c a a a t a c a t a c t a a g g g t t t c t t a t a t g c t c a a
c a c a t g a g c g a a a c c c t a t a a g a a c c c t a a t t c c c t t a t c
t g g g a a c t a c t c a c a c a t t a t t c t g g a g a a a a t a g a g a g
a g a t a g a t t t g t a g a g a g a g a c t g g t g a t t t t t g c g g a c t
c t a t t a g a t c t g g g t a a c t g g c c t a a c t g g c c t t g g a g g a
g c t g g c a a c t c a a a a t c c c t t t g c c a a a a a c c a a c a t c a t
g c c a t c c a c c a t g c t t g t a t c c a g c t g c g c g c a a t g t a c c
c c g g g c t g t g t a t c c c a a a g c c t c a t g c a a c c t a a c a g a t
g g a t c g t t t g g a a g g c c t a t a a c a g c a a c c a c a g a c t t a a
a a c c t t g c g c c t c c a t a g a c t t a a g c a a a t g t g t g t a c a a
t g t g g a t c c t a g g c c c a a c c t t t g a t g c c t a t g t g a c a c g
t a a a c a g t a c t c t c a a c t g t c c a a t c g t a a g c g t t c c t a g
c c t t c c a g g g c c c a g c g t a a g c a a t a c c a g c c a c a a c a c c
c t c a a c c t c a g c a a c c a a c c a a g g g t a t c t a t c t t g c a a c
c t c t c g a g a t c a t c a a t c c a c t c t t g t g g t g t t t g t g g c t
c t g t c c t a a a g t t c a c t g t a g a c g t c t c a a t g t a a t g g t t
a a c g a t a t c a c a a a c c g c g g c c a t a t c a g c t g c t g t a g c t
g g c c t a a t c t c a a c t g g t c t c c t c t c c g g a g a c a t g g c t t
c t a c c t a c a a a a a a g c t c c g c a c g a g g c t g c a t t t g t c a c
a a a t c a t g a a a a g a a a a a c t a c c g a t g a a c a a t g c t g a g g
g a t t c a a a t t c t a c c c a c a a a a a g a a g a a a g a a a g a t c t a
g c a c a t c t a a g c c t g a c g a a g c a g c a g a a a t a t a t a a a a a
t a t a a a c c a t a g t g c c c t t t t c c c c t c t t c c t g a t c t t g t
t t a g c a t g g c g g a a a t t t t a a a c c c c c a t c a t c t c c c c c
a a c a a c g g c g g a t c g c a g a t c t a c a t c c g a g a g c c c c a t t
c c c c g c g a g a t c c g g g c c g g a t c c a c g c c g g c g a g a g c c c
c a g c c g c g a g a t c c c g c c c c t c c c g c g c a c c g a t c t g g g c
g c g c a c g a a g c c g c c t c t c g c c c a c c c a a a c t a c c a a g g c
c a a a g a t c g a g a c c g a g a c g g a a a a a a a a a c g g a g a a a g
a a a g a g g a g a g g g g c g g g g t g g t t a c c g g c g c g g c g g c g g
c g g a g g g g a g g g g g a g g a g c t c g t c g t c c g g c a g c g a g
g g g g g a g g a g g t g g a g g t g g t g g t g g t g g t g g t a g g g
t t g g g g g a t g g g a g g a g a g g g g g g g t a t g t a t a t a g t g
g c g a t g g g g g c g t t t c t t t g g a a g c g g a g g g a g g g c c g g
c c t c g t c g c t g g c t c g c g a t c c t c c t c g c g t t t c c g g c c c
c c a c g a c c c g g a c c c a c c t g c t g t t t t t t c t t t t t c t t t t
t t t t c t t t c t t t t t t t t t t t t g g c t g c g a g a c g t g c g g t
g c g t g c g g a c a a c t c a c g g t g a t a g t g g g g g g g t g t g g a g
a c t a t t g t c c a g t t g g c t g g a c t g g g g t g g g t t g g g t t g g
g t t g g g t t g g g c t g g g c t t g c t a t g g a t c g t g g a t a g c a c
t t t g g g c t t t a g g a a c t t t a g g g g t t g t t t t t g t a a a t g t
t t t g a g t c t a a g t t t a t c t t t t a t t t t t a c t a g a a a a a a t
a c c c a t g c g c t g c a a c g g g g g a a a g c t a t t t t a a t c t t a t
t a t t g t t c a t t g t g a g a a t t c g c c t g a a t a t a t a t t t t t c
t c a a a a a t t a t g t c a a a t t a g c a t a t g g g t t t t t t t a a a g
a t a t t t c t t a t a c a a a t c c c t c t g t a t t t a c a a a a g c a a a
c g a a c t t a a a a c c c g a c t c a a a t a c a g a t a t g c a t t t c c a

10

20

30

40

50

a a a g c g a a t a a a c t t a a a a a c c a a t t c a t a c a a a a a t g a c
g t a t c a a a g t a c c g a c a a a a a c a t c c t c a a t t t t t a t a a t
a g t a g a a a a g a g t a a a t t t c a c t t t g g g c c a c c t t t t a t t
a c c g a t a t t t t a c t t t a t a c c a c c t t t t a a c t g a t g t t t t
c a c t t t t g a c c a g g t a a t c t t a c c t t t g t t t t a t t t t g g a
c t a t c c c g a c t c t c t t c t c a a g c a t a t g a a t g a c c t c g a g
t a t g c t a g t c t a g a g t c g a c c t g c a g g g t g c a g c g t g a c c
c g g t c g t g c c c c t c t c t a g a g a t a a t g a g c a t t g c a t g t c
t a a g t t a t a a a a a a t t a c c a c a t a t t t t t t t g t c a c a c t
t g t t t g a a g t g c a g t t t a t c t a t c t t t a t a c a t a t a t t t a
a a c t t t a c t c t a c g a a t a a t a t a a t c t a t a g t a c t a c a a t
a a t a t c a g t g t t t t a g a g a a t c a t a t a a a t g a a c a g t t a g
a c a t g g t c t a a a g g a c a a t t g a g t a t t t t g a c a a c a g g a c
t c t a c a g t t t t a t c t t t t t a g t g t g c a t g t g t t c t c c t t t
t t t t t t g c a a a t a g c t t c a c c t a t a t a a t a c t t c a t c c a t
t t t a t t a g t a c a t c c a t t t a g g g t t t a g g g t t a a t g g t t t
t t a t a g a c t a a t t t t t t t a g t a c a t c t a t t t t a t t c t a t t
t t a g c c t c t a a a t t a a g a a a a c t a a a a c t c t a t t t t a g t t
t t t t t a t t t a a t a a t t t a g a t a t a a a a t a g a a t a a a a t a a
a g t g a c t a a a a a t t a a a c a a a t a c c c t t t a a g a a a t t a a a
a a a a c t a a g g a a a c a t t t t t c t t g t t t c g a g t a g a t a a t g
c c a g c c t g t t a a a c g c c g t c g a c g a g t c t a a c g g a c a c c a
a c c a g c g a a c c a g c a g c g t c g c g t c g g g c c a a g c g a a g c a
g a c g g c a c g g c a t c t c t g t c g c t g c c t c t g g a c c c c t c t c
g a g a g t t c c g c t c c a c c g t t g g a c t t g c t c c g c t g t c g g c
a t c c a g a a a t t g c g t g g c g g a g c g g c a g a c g t g a g c c g g c
a c g g c a g g c g g c c t c c t c c t c c t c t c a c g g c a c g g c a g c t
a c g g g g g a t t c c t t t c c c a c c g c t c c t t c g c t t t c c c t t c
c t c g c c c g c c g t a a t a a a t a g a c a c c c c c t c c a c a c c c t c
t t t c c c c a a c c t c g t g t t g t t c g g a g c g c a c a c a c a c a
a c c a g a t c t c c c c c a a a t c c a c c c g t c g g c a c c t c c g c t t
c a a g g t a c g c c g c t c g t c c t c c c c c c c c c c c c t c t c t a c
c t t c t c t a g a t c g g c g t t c c g g t c c a t g g t t a g g g c c c g g
t a g t t c t a c t t c t g t t c a t g t t t g t g t t a g a t c c g t g t t t
g t g t t a g a t c c g t g c t g c t a g c g t t c g t a c a c g g a t g c g a
c c t g t a c g t c a g a c a c g t t c t g a t t g c t a a c t t g c c a g t g
t t t c t c t t t g g g g a a t c c t g g g a t g g c t c t a g c c g t t c c g
c a g a c g g g a t c g a t t t c a t g a t t t t t t t g t t t c g t t g c a
t a g g g t t t g g t t t g c c c t t t t c c t t t a t t t c a a t a t a t g c
c g t g c a c t t g t t t g t c g g g t c a t c t t t t c a t g c t t t t t t
t g t c t t g g t t g t g a t g a t g t g g t c t g g t t g g g c g g t c g t t
c t a g a t c g g a g t a g a a t t c t g t t t c a a a c t a c c t g g t g g a
t t t a t t a a t t t t g g a t c t g t a t g t g t g t g c c a t a c a t a t t
c a t a g t t a c g a a t t g a a g a t g a t g g a t g g a a a t a t c g a t c
t a g g a t a g g t a t a c a t g t t g a t g c g g g t t t t a c t g a t g c a
t a t a c a g a g a t g c t t t t t g t t c g c t t g g t t g t g a t g a t g t
g g t g t g g t t g g g c g g t c g t t c a t t c g t t c t a g a t c g g a g t
a g a a t a c t g t t t c a a a c t a c c t g g t g t a t t t a t t a a t t t t
g g a a c t g t a t g t g t g t g t c a t a c a t c t t c a t a g t t a c g a g
t t t a a g a t g g a t g g a a a t a t c g a t c t a g g a t a g g t a t a c a

10

20

30

40

50

t g t t g a t g t g g g t t t t a c t g a t g c a t a t a c a t g a t g g c a t
a t g c a g c a t c t a t t c a t a t g c t c t a a c c t t g a g t a c c t a t
c t a t t a t a a t a a a c a a g t a t g t t t t a t a a t t a t t t t g a t c
t t g a t a t a c t t g g a t g a t g g c a t a t g c a g c a g c t a t a t g t
g g a t t t t t t t a g c c c t g c c t t c a t a c g c t a t t t a t t t g c t
t g g t a c t g t t t c t t t t g t c g a t g c t c a c c c t g t t g t t t g g
t g t t a c t t c t g c a g g a g g a t c a c a a g t t t g t a c a a a a a a g
c a g g c t a t g g c c g c c g c c a c c t c c c c c g c c g t c g c a t t c t
c g g g c g c c a c c g c c g c c g c c a t g c c c a a a c c c g c c c g c c a
t c c t c t c c c g c g c c a c c a g c c c g t c t c g c g c c g c g c g c t c
c c c g c c c g c g t c g t c a g g t g t t g c g c c g c g t c c c c c g c c g
c c a c c t c c g c c g c g c c t c c c g c a a c c g c g c t c c g g c c c t g
g g g c c c g t c c g a g c c c c g c a a g g g c g c c g a c a t c c t c g t c
g a g g c g c t c g a g c g c t g c g g c a t c g t c g a c g t c t t c g c c t
a c c c c g g c g g c g c c t c c a t g g a g a t c c a c c a g g c g c t g a c
g c g c t c g c c c g t c a t c a c c a a c c a c c t c t t c c g c c a c g a g
c a g g g g g a g g c g t t c g c g g c g t c c g g c t a c g c c c g c g c g t
c c g g c c g c g t c g g c g t c t g c g t c g c c a c c t c c g g c c c g g g
g g c c a c c a a c c t c g t c t c c g c g c t c g c c g a c g c c c t c c t c
g a c t c c a t c c c c a t g g t c g c c a t c a c g g g c c a g g t c t c c c
g c c g c a t g a t c g g c a c g g a c g c g t t c c a g g a g a c g c c c a t
a g t g g a g g t c a c g c g c t c c a t c a c c a a g c a c a a c t a c c t g
g t c c t t g a c g t g g a g g a t a t c c c c c g c g t c a t c c a g g a a g
c c t t c t t c c t t g c a t c c t c t g g c c g c c c g g g g c c g g t g c t
a g t t g a t a t c c c c a a g g a c a t c c a g c a g c a g a t g g c t g t g
c c c g t c t g g g a c a c t c c a a t g a g t t t g c c a g g g t a c a t c g
c c c g c c t g c c c a a g c c a c c a t c t a c t g a a t c g c t t g a g c a
g

10

20

30

g t c c t g c g t c t g g t t g g c g a g t c a c g g c g c c c a a t t c t g t
a t g t t g g t g g t g g c t g c g c t g c g t c t g g c g a g g a g t t g c g
c c g c t t t g t t g a g c t t a c t g g g a t t c c a g t t a c a a c t a c t
c t g a t g g g c c t t g g c a a c t t c c c c a g c g a c g a c c c a c t g t
c t c t g c g c a t g c t t g g g a t g c a t g g c a c t g t g t a t g c a a a
t t a t g c a g t a g a t a a g g c t g a c c t g t t g c t c g c a t t t g g t
g t g c g g t t t g a t g a t c g t g t g a c t g g g a a a a t c g a g g c t t
t t g c a a g c a g g t c c a a g a t t g t g c a c a t t g a c a t t g a c c c
a g c t g a g a t t g g c a a g a a c a a g c a g c c a c a t g t c t c c a t t
t g t g c a g a t g t t a a g c t t g c t t t a c a g g g g t t g a a t g a t c
t a t t a a a t g g g a g c a a a g c a c a a c a g g g t c t g g a t t t t g g
t c c a t g g c a c a a g g a g t t g g a t c a g c a g a a g a g g g a g t t t
c c t c t a g g a t t c a a g a c t t t t g g c g a g g c c a t c c c g c c g c
a a t a t g c t a t c c a g g t a c t g g a t g a g c t g a c a a a a g g g g a
g g c g a t c a t t g c c a c t g g t g t t g g g c a g c a c c a g a t g t g g
g c g g c t c a g t a t t a c a c t t a c a a g c g g c c a c g g c a g t g g c
t g t c t t c g t c t g g t t t g g g g g c a a t g g g a t t t g g g t t a c c
a g c t g c a g c t g g c g c t g c t g t g g c c a a c c c a g g t g t t a c a

40

50

g t t g t t g a c a t t g a t g g t g a t g g t a g t t t c c t c a t g a a c a
t t c a g g a g t t g g c g t t g a t c c g c a t t g a g a a c c t c c c a g t
g a a g g t g a t g a t a t t g a a c a a c c a g c a t c t g g g a a t g g t g
g t g c a g t g g g a g g a t a g g t t t t a c a a g g c c a a t c g g g c g c
a c a c a t a c c t t g g c a a c c c a g a a a a t g a g a g t g a g a t a t a
t c c a g a t t t t g t g a c g a t t g c t a a a g g a t t c a a c g t t c c a
g c a g t t c g a g t g a c g a a g a a g a g c g a a g t c a c t g c a g c a a
t c a a g a a g a t g c t t g a g a c c c c a g g g c c a t a c t t g t t g g a
t a t c a t a g t c c c g c a t c a g g a g c a c g t g c t g c c t a t g a t c
c c a a g c g g t g g t g c t t t c a a g g a c a t g a t c a t g g a g g g t g
a t g g c a g g a c c t c g t a c t g a t a c c c a g c t t t c t t g t a c a a
a g t g g t g a t c c t a c t a g t a g a a g g a g t g c g t c g a a g c a g a
t c g t t c a a a c a t t t g g c a a t a a a g t t t c t t a a g a t t g a a t
c c t g t t g c c g g t c t t g c g a t g a t t a t c a t a t a a t t t c t g t
t g a a t t a c g t t a a g c a t g t a a t a a t t a a c a t g t a a t g c a t
g a c g t t a t t t a t g a g a t g g g t t t t t a t g a t t a g a g t c c c g
c a a t t a t a c a t t t a a t a c g c g a t a g a a a c a a a a t a t a g c
g c g c a a a c t a g g a t a a a t t a t c g c g c g c g g t g t c a t c t a t
g t t a c t a g a t c g a a a g c t t a g c t t g a g c t t g g a t c a g a t t
g t c g t t t c c c g c c t t c a g t t t a a a c t a t c a g t g t t t g a c a
g g a t a t a t t g g c g g g t a a a c

10

20

【0525】

配列番号327

g c g a a g a t c c a g g a c a a g g a

【0526】

配列番号328

c t g c t t a c c g g c a a a g a t g a g

【0527】

配列番号329

t t c c c c c g g a c c a g c a g c g t

30

【0528】

配列番号330

c c g a c g a g a a a g a c c a g c a a

【0529】

配列番号331

c t t a a g t t g t c g a t c g g g a c t g t

【0530】

配列番号332

t g a g c c t c t c g t c g c c g a t c a c a t

【0531】

40

配列番号333

c c a c t c t t g c c c t a c a c g a c a c t g a a g a c c t t a t g a t t c c
a a a c g g c g g c g c c t t c a a g g a c a t g a t c a t g g a g g g t g a t
g g c a g g a c c t c g t a c t g a a a t t t c g a c c t a c a a g a c c t a c
a a g t g t g a c a t g c g c a a t c a g c a t g g t g c c c g c g t g t t g t
a t c a a c t a c t a g g g g t t c a a c t g t g a a c c a t g c g t t t t c t
a g t t t g c t t g t t t c a t t c a t a t a a g c t t g t g t t a c t t a g t
t c c g a a c c c t g t a g c t t t g t a g t c t a t g c t c t c t t t t g t a
g g g a t g t g c t g t c a t a a g a t a t c a t g c a a g t t t c t t g t c c
t a c a t a t c a a t a a t a a g t a c t t c c a t g g a a t a a t t c t c a g

50

t t c t g t t t t g a a t t t t g c a t c t t c t c a c a a a c a g t g t g c t
g g t t c c t t t c t g t t c g c t g a c g c c c t c c t c g a c t c c a t c c
c c a t g g t c g c c a t c a c g g g c c a g g t c c c c c g c c g c a t g a t
c g g t a g c g a c t t c g t g g g c g a g g a a a g c c t t t c g t c c a a g
g t g g t c c c t c c t c g c a a t c t t g t t g g a t g g t g a a t a t t a t
a a a a g c c t g c c c t t c t c g c g g g t a a g a c t c c c g c c c a t c c
a g g a t g a g g a t g a c c a g c c t t t t g c a g t t t a t c c a c t a g g
g a c a g g a t t g c a t c c t g c c g a a a c c c t g c c a a g c t t g a g g
t a g c c t c c a a t t t g a c g g t g c c g c c a g c g a c g c c g t c t g g
a a c t g t c c t t t t t g a g g a c c a c t c c g t t t g t c t a g a g g t a
c c t g g a g a t c a t g a c a t t a a g g a t g a c c a g t t c g t a a a g g
t c c t g c g g t g t c t a t t g c t t t t c a t a g g t t a a t a a g t g t t
t g c t a g a c t g t g g t g a a a g g c c a a g a c t c c c g c c c a t c t c
t c t a t g c c c g g g a c a a g t g c c a c c c c a c a g t g g g g c a g g a
t g a g g a t g a c c a a a g a c t c c c g c c c a t c t c a c t a g g g a c a
g g a t t g g c c t t t t g c a g t t t a t c t c t a t g c c c g g g a c a a g
t g t a t c c g a a g t a a a t a a a a c c a t c g g a c t c t c g t a t a a g
a c t g t c g a c t c g a c c g g c c g a c g c a t a g g t t c a t t t g a a g
c t g c t a t t c t a t t t a a a t t g a a a c t c g g a c g g t a g c a g t g
t g g t a t g a g g t c t t c a g c a c a c t c g g t a a c t c c a g t c a c

10

20

【0532】

配列番号334

c c a c t c t t g c c c t a c a c g a c a c t g a a g a c g t c g c c a t t a c
c g g g c a a g t g a c c c g c c g c a t g a t c g g c a c g g a c g c g t t c
c a g g a g a c g c c c a t a g t g g a g g t c a c g c g c t c c a t c a c c a
a g c a c a a c t a c c t g g t c c t t g a c g t g g a g g a t a t c c c c c g
c g t c a t c c a g g a a g c c t t c t t c c t t g c a t c c t c t g g c c g c
c c g g g g c c g g t g c t a g t t g a t a t c c c c a a g g a c a t c c a g c
a g c a g a t g g c t g t g c c c g t c t g g g a c a c t c c a a t g a g t t t
g c c a g g g t a c a t c g c c c g c c t g c c c a a g c c a c c a t c t a c t
g a a t c g c t t g a g c a g g t c c t g c g t c t g g t t g g c g a g t c a c
g g c g c c c a a t t c t g t a t g t t g g t g g t g g c t g c g c t g c g t c
t g g c g a g g a g t t g c g c c g c t t t g t t g a g c t t a c t g g g a t t
c c a g t t a c a a c t a c t c t g a t g g g c c t t g g c a a c t t c c c c a
g c g a c g a c c c a c t g t c t c t g c g c a t g c t t g g g a t g c a t g g
c a c t g t g t a t g c a a a t t a t g c a g t a g a t a a g g c t g a c c t g
t t g c t c g c a t t t g g t g t g c g g t t t g a t g a t c g t g t g a c t g
g g a a a a t c g a g g c t t t t g c a a g c a g g t c c a a g a t t g t g c a
c a t t g a c a t t g a c c c a g c t g a g a t t g g c a a g a a c a a g c a g
c c a c a t g t c t c c a t t t g t g c a g a t g t t a a g c t t g c t t t a c
a g g g g t t g a a t g a t c t a t t a a a t g g g a g c a a a g c a c a a c a
g g g t c t g g a t t t t g g t c c a t g g c a c a a g g a g t t g g a t c a g
c a g a a g a g g g a g t t t c c t c t a g g a t t c a a g a c t t t t g g c g
a g g c c a t c c c g c c g c a a t a t g c t a t c c a g g t a c t g g a t g a
g c t g a c a a a a g g g g a g g c g a t c a t t g c c a c t g g t g t t g g g
c a g c a c c a g a t g t g g g c g g c t c a g t a t t a c a c t t a c a a g c
g g c c a c g g c a g t g g c t g t c t t c g t c t g g t t t g g g g g c a a t
g g g a t t t g g g t t a c c a g c t g c a g c t g g c g c t g c t g t g g c c
a a c c c a g g t g t t a c a g t t g t t g a c a t t g a t g g t g a t g g t a
g t t t c c t c a t g a a c a t t c a g g a g t t g g c g t t g a t c c g c a t

30

40

50

t g a g a a c c t c c c a g t g a a g g t g a t g a t a t t g a a c a a c c a g
c a t c t g g g a a t g g t g g t g c a g t g g g a g g a t a g g t t t t a c a
a g g c c a a t c g g g c g c a c a c a t a c c t t g g c a a c c c a g a a a a
t g a g a g t g a g a t a t a t c c a g a t t t t g t g a c g a t t g c t a a a
g g a t t c a a c g t t c c a g c a g t t c g a g t g a c g a a g a a g a g c g
a a g t c a c t g c a g c a a t c a a g a a g a t g c t t g a g a c c c c a g g
g c c a t a c t t g t t g g a t a t c a t a g t c c c g c a t c a g g a g c a c
g t g c t g c c t a t g a t c c c a a g c g g t g g t g c t t t c a a g g a c a
t g a t c a t g g a g g g t g a t g g c a g g a c c t c g t a c t g a a a t t t
c g a c c t a c a a g a c c t a c a a g t g t g a c a t g c g c a a t c a g c a
t g g t g c c c g c g t g t t g t a t c a a c t a c t a g g g g t t c a a c t g
t g a a c c a t g c g t t t t c t a g t t t g c t t g t t t c a t t c a t a t a
a g c t t g t g t t a c t t a g t t c c g a a c c c t g t a g c t t t g t a g t
c t a t g c t c t c t t t t g t a g g g a t g t g c t g t c a t a a g a t a t c
a t g c a a g t t t c t t g t c c t a c a t a t c a a t a a t a a g t a c t t c
c a t g g a a t a a t t c t c a g t t c t g t t t t g a a t t t t g c a t c t t
c t c a c a a a c a g t g t g c t g g t t c c t t t c t g t t c t a c g c c c g
c g c g t c c g g c c g c g t c g g c g t c t g c g t c g c c a c c t c c g g c
c c g g g g g c c a c c a a c c t c g t c t c c g t a g c g a c t t c g t g g g
c g a g g a a a g c c t t t c g t c c a a g g t g g t c c c t c c t c g c a a t
c t t g t t g g a t g g t g a a t a t t a t a a a a g c c t g c c c t t c t c g
c g g g t g a g t c c a t g c t c a a c a c c g t g c a c t a g g g a c a g g a
t t g g c c t t t t g c a g t t t a t c c a c t a g g g a c a g g a t t g c a t
c c t g c c g a a a c c c t g c c a a g c t t g a g g t a g c c t c c a a t t t
g a c g g t g c c g c c a g c g a c g c c g t c t g g a a c t g t c c t t t t t
g a g g a c c a c t c c g t t t g t c t a g a g g t a c c t g g a g a t c a t g
a c a t t a a g g a t g a c c a g t t c g t a a a g g t c c t g c g g t g t c t
a t t g c t t t t c a t a g g t t a a t a a g t g t t t g c t a g a c t g t g g
t g a a a g g c c g c c t t t t g c a g t t t a t c t c t a g a a a g a c t g g
a g t t g c a g a a a g a c t c c c g c c c a t c c a g g a t g a g g a t g a c
c a t a t c c g a a g t a a a t a a a a c c a t c g g a c t c t c g t a t a a g
a c t g t c g a c t c g a c c g g c c g a c g c a t a g g t t c a t t t g a a g
c t g c t a t t c t a t t t a a a t t g a a a c t c g g a c g g t a g c a g t g
t g g t a t g a g g t c t t c a g c a c a c t c g g t a a c t c c a g t c a c

10

20

30

【0533】

配列番号335

t g a g a t t g g c a a g a a c a a g c a g c c a c a t g t c t c c a t t t g t
g c a g a t g t t a a g c t t g c t t t a c a g g g g t t g a a t g a t c t a t
t a a a t g g g a g c a a a g c a c a a c a g g g t c t g g a t t t t g g t c c
a t g g c a c a a g g a g t t g g a t c a g c a g a a g a g g g a g t t t c c t
c t a g g a t t c a a g a c t t t t g g c g a g g c c a t c c c g c c g c a a t
a t g c t a t c c a g g t a c t g g a t g a g c t g a c a a a a g g g g a g g c
g a t c a t t g c c a c t g g t g t t g g g c a g c a c c a g a t g t g g g c g
g c t c a g t a t t a c a c t t a c a a g c g g c c a c g g c a g t g g c t g t
c t t c g t c t g g t t t g g g g g c a a t g g g a t t t g g g t t a c c a g c
t g c a g c t g g c g c t g c t g t g g c c a a c c c a g g t g t t a c a g t t
g t t g a c a t t g a t g g t g a t g g t a g t t t c c t c a t g a a c a t t c
a g g a g t t g g c g t t g a t c c g c a t t g a g a a c c t c c c a g t g a a
g g t g a t g a t a t t g a a c a a c c a g c a t c t g g g a a t g g t g g t g
c a g t g g g a g g a t a g g t t t t a c a a g g c c a a t c g g g c g c a c a

40

50

c a t a c c t t g g c a a c c c a g a a a a t g a g a g t g a g a t a t a t c c
a g a t t t t g t g a c g a t t g c t a a a g g a t t c a a c g t t c c a g c a
g t t c g a g t g a c g a a g a a g a g c g a a g t c a c t g c a g c a a t c a
a g a a g a t g c t t g a g a c c c c a g g g c c a t a c t t g t t g g a t a t
c a t a g t c c c g c a t c a g g a g c a c g t g c t g c c t a t g a t t c c a
a a c g g c g g c g c c t t c a a g g a c a t g a t c a t g g a g g g t g a t g
g c a g g a c c t c g t a c t g a a a t t t c g a c c t a c a a g a c c t a c a
a g t g t g a c a t g c g c a a t c a g c a t g g t g c c c g c g t g t t g t a
t c a a c t a c t a g g g g t t c a a c t g t g a a c c a t g c g t t t t c t a
g t t t g c t t g t t t c a t t c a t a t a a g c t t g t g t t a c t t a g t t
c c g a a c c c t g t a g c t t t g t a g t c t a t g c t c t c t t t t g t a g
g g a t g t g c t g t c a t a a g a t a t c a t g c a a g t t t c t t g t c c t
a c a t a t c a a t a a t a a g t a c t t c c a t g g a a t a a t t c t c a g t
t c t g t t t t g a a t t t t g c a t c t t c t c a c a a a c a g t g t g c t g
g t t c c t t t t c t g t t c g c t g a c g c c c t c c t c g a c t c c a t c c c
c a t g g t c g c c a t c a c g g g c c a g g t c c c c c g c c g c a t g a t c
g g t a g c g a c t t c g t g g g c g a g g a a a g c c t t t c g t c c a a g g
t g g t c c c t c c t c g c a a t c t t g t t g g a t g g t g a a t a t t a t a
a a a g c c t g c c c t t c t c g c g g g t a a g a c t c c c g c c c a t c c a
g g a t g a g g a t g a c c a g c c t t t t g c a g t t t a t c c a c t a g g g
a c a g g a t t g c a t c c t g c c g a a a c c c t g c c a a g c t t g a g g t
a g c c t c c a a t t t g a c g g t g c c g c c a g c g a c g c c g t c t g g a
a c t g t c c t t t t t g a g g a c c a c t c c g t t t g t c t a g a g g t a c
c t g g a g a t c a t g a c a t t a a g g a t g a c c a g t t c g t a a a g g t
c c t g c g g t g t c t a t t g c t t t t c a t a g g t t a a t a a g t g t t t
g c t a g a c t g t g g t g a a a g g c c a a g a c t c c c g c c c a t c t c t
c t a t g c c c g g g a c a a g t g c c a c c c c a c a g t g g g g c a g g a t
g a g g a t g a c c a a a g a c t c c c g c c c a t c t c a c t a g g g a c a g
g a t t g g c c t t t t g c a g t t t a t c t c t a t g c c c g g g a c a a g t
g t a t c c g a a g t a a a t a a a a c c a t c g g a c t c t c g t a t a a g a
c t g t c g a c t c g a c c g g c c g a c g c a t a g g t t c a t t t g a a g c
t g c t a t t c t a t t t a a a t t g a a a t c c c a a g c g g t g g t g c t t
t c a a g g a c a t g a t c a t g g a g g g t g a t g g c a g g a c c t c g t a
c t g a a a t t t c g a c c t a c a a g a c c t a c a a g t g t g a c a t g c g
c a a t c a g c a t g a t g c c c g c g t g t t g t a t c a a c t a c t a g g g
g t t c a a c t g t g a g c c a t g c g t t t t c t a g t t t g c t t g t t t c
a t t c a t a t a a g c t t g t a t t a c t t a g t t c c g a a c c c t g t a g
t t t t g t a g t c t a t g t t c t c t t t t g t a g g g a t g t g c t g t c a
t a a g a t g t c a t g c a a g t t t c t t g t c c t a c a t a t c a a t a a t
a a g t a c t t c c a t g g a a t a a t t c t c a g t t c t g t t t t g a a t t
t t g c a t c t t c t c a c a a a c a g t g t g c t g g t t c c t t t c t g t t
a c t t t a c a t g t c t g c t g t g t c a g g t t c t g a c a t a a c g a c c
g a t g g a g g g t g g t c g g c a g g t t t t a g a a g g g g a a t t g a a a
c t t t t t t t t g g g a a g a a g t c t g a a t a c a g t t g g g a g g a a a
a a t a g a a g t a t a t a c t t c g a t t a a t t t a t c a a g c c c g c t a
t c c a g t c t a a t t t a t c a a g c a c t a g a c a g t g t a g g g t g t t
g g c a t t c t t c t c t t c c t t g a g a t c c g g c t t g a g a g g a g a g
a c c g a g g c t t c g g c t g t g t t g g t t g c t g a t t t c t a c a g c t
t t t t g a g a t a g a g a g a g a g a t c c t g c a a c t g t g g t t t g t c
t t g c t g c t t g t a c a g c g a g a g a g a c a t t g a g a g a t a t g t a

10

20

30

40

50

g a t c g t t t a c c

【0534】

配列番号350

CCAGAAAGGTAAATTATCCAAGATGTAGCATCAAGAAATCCAA
TGTTTACGGGAAAAACTATGGAAGTATTATGTAAGCTCAG
CAAGAAAGCAGATCAATATGCGGCACATATGCAACCTATGT
TCAAAAATGAAGAATGTACAGATACAAGATCCTATACTGC
CAGAAATACGAAGAAAGAAATACGTAGAAAATTGAAAAAGAA
ACCAGGCGGAAGAAAGAAATCTTGAAGACGTAAGCACTGAC
GACAACAATGAAAAGAAAGAAAGATAAAGGTCGGTGATTGTGA
AAGAGACATAGAGGACACATGTAAAGGTGGAAAAATGTAAAGG
GCGGAAGGTAAACCTTATCACAAAGGAATCTTATCCCCCAC
TACTTATCCTTTTATATTTTTTCCGTGTCATTTTTTGCCCTT
GAGTTTTTCTTATATAAGGAACCAAGTTCGGCATTTGTGAA
AACAAAGAAAAAATTTGGTGTAAGCTATTTTTCTTTGAAGTA
CTGAGGATACAACCTTCAGAGAAATTTGTAAAGTTTGTAGAT
CTCCATGGCTCCAAGGAAGAGGAAGGAGTCTAACAGGGAG
TCAGCTAGGAGGTCAAGGTACAGGAAGGTGGGTATCCACG
GGGTACCCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTGCG
AATCTGCATGCGTAACCTTCAGTCGTAGTGACAACCTGAGC
AACCAACATCCGCACCCACACAGGCGAGAAAGCCTTTTGCCCT
GTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCACCAGCAGCAGCCG
CATAAACCATACCAAGATACACACGGGCGAGCCAAAAGCCC
TTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGTAACCTTCAGTCGTAGTG
ACAACCTGAGCGAACAACATCCGCACCCACACAGGCGAGAA
GCCTTTTGGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAAATTTGCCGCC
AGCAAGACCCGCCAAAAACCATACCAAGATACACACGGGCG
AGAAAGCCCTTCCAGTGTGGAATCTGCATGCGTAAGTTTGC
CCGCTCCGACGCCCTGACCCAGCATGCCCAGAGATGCGGA
CTGCGGGGATCCCAACTTGTGAAATCAGAAATTGGAAGAGA
AAAAAGTCTGAGCTTAGACACAAATTTGAAGTACGTTCCACA
TGAATATATCGAACTTATCGAGATTGCTAGGAACTCAACA
CAGGACAGAAATTTTGGAGATGAAGGTTATGGAGTTCTTTA
TGAAAGTGTAACGGATATAGGGGAAAGCACCTTGGTGTTTC
TAGGAACCTGATGGTGCAATCTACACTGTGGGATCACCT
ATTGACTATGGTGTTATCGTGGATACAAAGGCATACTCTG
GTGGATACAAATTTGCCAATCGGACAAAGCTGACGAAATGCA
GAGATATGTTGAAGAGAACCACAAACTAGAAACAAACATATT
AATCCAAATGAATGGTGGAAGGTGTATCCTTCATCTGTTA
CAGAGTTCAAATTCCTTTTTTGTGTCTGGACACTTTAAGGG
TAACTACAAAGCACAGCTTACTAGGTTGAACCATATTACA
AATTGCAATGGTGCTGTGTGTGTCAGTTGAAGAGCTTTTGA
TCGGAGGTGAAATGATTAAAGGCAGGAACACTTACTTTGGA
GGAAGTTAGAAAGAAAAATTCAACAACGGTGAAATCAATTTT
AGATCTGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACAT
GCGGTGACGTGGAGGAGAAATCCCGGCCCTAGGATGGCTCC
AAGGAAGAGGAAGGAGTCTAACAGGGAGTCAGCTAGGAGG
TCAAGGTACAGGAAGGTGGGTATCCACGGGGTACCCGCCCG
CTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCGAATCTGCATGCG
TAACTTCAGTCGTAGTGACACCCCTGAGCACGCACATCCGC

10

20

30

40

50

ACCCACACAGGCGAGAAGCCCTTTTGGCCTGTGACATTTGTG
GGAGGAAATTTGCCGACAGGAGCAGCCGCATAAAGCATAC
CAAGATACACACGGGATCTCAGAAGCCCTTCCAGTGTCTGA
ATCTGCATGCGTAACCTTCAGTCGCTCCGACGACCTGTCCA
AGCACATCCGCACCCACACAGGCGAGAAGCCCTTTTGGCCTG
TGACATTTTGTGGGAGGAAGTTTGGCCGACAACCTCCAACCGC
ATCAAGCATGCCCAGAGATGCGGACTGCGGGGATCCCAAC
TTGTGAAATCAGAAATTGGAAGAGAAAAAGTCTGAGCTTAG
ACACAAATTTGAAGTACGTTCACACATGAATATATCGAACTT
ATCGAGATTGCTAGGAACCTCAACACAGGACAGAATTTTGG
AGATGAAGGTTATGGAGTTCTTTTATGAAAGTGTACGGATA
TAGGGGAAAGCACCTTGGTGGTTCTAGGAAACCTGATGGT
GCAATCTACACTGTGGGATCACCTATTGACTATGGTGTTA
TCGTGGATACAAAGGCATACCTCTGGTGGATACAAATTTGCC
AATCGGACAAAGCTGACGAAATGCAGAGATATGTTGAAGAG
AACCAAACTAGAAACAAACATATTAAATCCAAATGAATGGT
GGAAGGTGTATCCTTCATCTGTTACAGAGTTCAAATTCCT
TTTTTGTGTCTGGACACTTTTAAGGGTAACTACAAAGCACAG
CTTACTAGGTTGAACCATATTACAAATTTGCAATGGTGTCTG
TGTTGTCTCAGTTGAAGAGCTTTTGTATCGGAGGTGAAATGAT
TAAGGCAGGAACACTTACTTTGGAGGAAGTTAGAAGAAAA
TTCAACAACGGTGAAATCAATTTTTTGATAACTCGAGCTCG
GTCACCAGCATAAATTTTTTATTAAATGTACTAAATTAATGTT
TTGTTAAATGCAATTTTTTGCTTTCTCGGGATTTTAAATATCA
AAATCTATTTTAGAAATACACAATATTTTGTGTCAGGCTTG
CTGGAGAATCGATCTGCTATCATAAAAATTACAAAAAAAT
TTTATTTTGCCCTCAATTTATTTTAGGATTGGTATTAAAGGACG
CTTAAATTTATTTGTCTGGGTCACTACGCATCATTTGTGATTG
AGAAGATCAGCGATACGAAATATTTCGTAGTACTATCGATA
ATTTATTTGAAAAATTCATAAGAAAAAGCAAACGTTACATGA
ATTGATGAAACAATACAAAGACAGATAAAGCCACGCACAT
TTAGGATATTGGCCGAGATTACTGAATATTGAGTAAGATC
ACGGAATTTCTGACAGGAGCATGTCTTCAATTCAGCCCAA
ATGGCAGTTGAAATACTCAAACCGCCCCATATGCAGGAGC
GGATCATTTCAATTGTTTGTGTTTGGTTGCCCTTTGCCAACATGG
GAGTCCAAGGTT

【0535】

配列番号351

CCAGAAGGTAATTATCCAAGATGTAGCATCAAGAATCCAA
TGTTTTACGGGAAAAACTATGGAAGTATTATGTAAGCTCAG
CAAGAAGCAGATCAATATGCGGCACATATGCAACCTATGT
TCAAAAAATGAAGAATGTACAGATACAAAGATCCTATACTGC
CAGAATACGAAGAAGAATACGTAGAAAAATTGAAAAAGAAGA
ACCAGGCGAAGAAAAAGAATCTTGAAGACGTAAGCACTGAC
GACAACAATGAAAAAGAAGAAGATAAGGTCTGGTGATTGTGA
AAGAGACATAGAGGACACATGTAAGGTGGAAAAATGTAAGG
GCGGAAGTAACCTTATCACAAAGGAATCTTATCCCCCAC
TACTTATCCTTTTTATATTTTTTCCTGTCTATTTTTTGCCCTT
GAGTTTTTCTTATATAAGGAACCAAGTTCGGCATTTGTGAA
AACAAAGAAAAAATTTGGTGTAAAGCTATTTTCTTTGAAGTA

10

20

30

40

50

CTGAGGATACAACCTTCAGAGAAATTTGTAAAGTTTGTAGAT
CTCCATGGCTCCAAGGAAGAGGAAGGAGTCTAACAGGGAG
TCAGCTAGGAGGTCAAGGTACAGGAAGGTGGGTATCCACG
GGGTACCCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCTG
AATCTGCATGCGTAACCTTCAGTCAAGTCTTCCGACCTGTCC
CGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAAGCCTTTTGCCT
GTGACATTTGTGGGAGGAATTTGCCCAGGCCGGCAACCT
GTCCAAGCATACCAAGATACACACGCATCCCAGGGCACCT
ATTCCCAAGCCCTTCCAGTGTCTGAATCTGCATGCGTAAGT
TTGCCCAGTCCGGCGACCTGACCCGCCATACCAAGATACA
CACGGGCGAGAAAGCCCTTCCAGTGTCTGAATCTGCATGCGT
AACTTCAGTACCTCCGGCTCCCTGTCCCGCCACATCCGCA
CCCACACCGGCGAGAAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGG
GAGGAATTTGCCCAGTCCGGCAACCTGGCCCGCCATGCC
CAGAGATGCGGACTGCGGGGATCCCAACTTGTGAAATCAG
AATTGGAAGAGAAAGAGTCTGAGCTTAGACACAAATTGAA
GTACGTTCCACATGAATATATCGAACTTATCGAGATTGCT
AGGAACCTCAACACAGGACAGAAATTTTGGAGATGAAGGTTA
TGGAGTTCTTTATGAAAGTGTACGGATATAGGGGAAAGCA
CCTTGGTGGTTCTAGGAAACCTGATGGTGCATCTACACT
GTGGGATCACCTATTGACTATGGTGTATTCTGTGGATACAA
AGGCATACTCTGGTGGATACAAATTTGCCAATCGGACAAGC
TGACGAAATGCAGAGATATGTTGAAGAGAACCAAACTAGA
AACAAACATATTAATCCAAATGAATGGTGGAAAGGTGTATC
CTTCATCTGTTACAGAGTTCAAAATTCCTTTTGTGTCTGG
ACACTTTAAGGGTAACCTACAAAGCACAGCTTACTAGGTTG
AACCATATTACAAATTGCAATGGTGTCTGTGTTGTCTAGTTG
AAGAGCTTTTGTATCGGAGGTGAAATGATTAAAGGCAGGAAC
ACTTACTTTTGGAGGAAGTTAGAAAGAAAATTCACAACCGGT
GAAATCAATTTTAGATCTGGCGGGCGGAGAGGGCAGAGGAA
GTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAAATCCCGGCCCC
TAGGATGGCTCCAAGGAAGAGGAAGGAGTCTAACAGGGAG
TCAGCTAGGAGGTCAAGGTACAGGAAGGTGGGTATCCACG
GGGTACCCGCCGCTATGGCTGAGAGGCCCTTCCAGTGTCTG
AATCTGCATGCGTAACCTTCAGTACCTCCGGCTCCCTGTCC
CGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAAAGCCTTTTGCCT
GTGACATTTGTGGGAGGAATTTGCCCTGCGCCAGACCCCT
GCGCGACCATACCAAGATACACACGGGCGAGCCAAAAGCCC
TTCCAGTGTCTGAATCTGCATGCGTAACCTTCAGTACCTCCG
GCAACCTGACCCGCCACATCCGCACCCACACCGGCGAGAA
GCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGAATTTGCCCGAC
CGCTCCGCCCTGGCCCGCCATACCAAGATACACACGGGAT
CTCAGAAAGCCCTTCCAGTGTCTGAATCTGCATGCGTAACCT
CAGTCGCTCCGACGTGCTGTCCGAGCACATCCGCACCCAC
ACCGGCGAGAAAGCCTTTTGCCTGTGACATTTGTGGGAGGA
AATTTGCCCGCAACTTCTCCCTGACCATGCATGCCCAGAG
ATGCGGACTGCGGGGATCCCAACTTGTGAAATCAGAAATTG
GAAGAGAAAAAGTCTGAGCTTAGACACAAATTGAAAGTACG
TTCCACATGAATATATCGAACTTATCGAGATTGCTAGGAA
CTCAACACAGGACAGAAATTTTGGAGATGAAGGTTATGGAG

10

20

30

40

50

TTCTTTTATGAAAGTGTACGGATATAGGGGAAAGCACCTTG
GTGGTTCTAGGAAACCTGATGGTGCAATCTACACTGTGGG
ATCACCTATTGACTATGGTGTTATCGTGGATACAAAGGCA
TACTCTGGTGGATACAAATTTGCCAATCGGACAAGCTGACG
AAATGCGAGAGATATGTTGAAGAGAACC AA ACTAGAAACAA
ACATATTAAATCCAAATGAATGGTGGAAAGGTGTATCCTTCA
TCTGTTACAGAGTTCAAATTCCTTTTTTGTGTCTGGACACT
TTAAGGGTAACTACAAAGCACAGCTTACTAGGTGTAACCA
TATTACAAATTTGCAATGGTGTCTGTGTGTCAGTTGAAGAG
CTTTTGTATCGGAGGTGAAATGATTAAGGCAGGAACACTTA
CTTTGGAGGAAGTTAGAAGAAAATTCACAACGGTGAAAT
CAATTTTTTGATAACTCGAGCTCGGTCACCAGCATAATTTT
TATTAATGTACTAAATTA CTGT TTTGT TAAATGCAATTTT
GCTTTCTCGGGATTTTAAATATCAAAAATCTATTTAGAAATA
CACAAATATTTTGTGTCAGGCTTGCTGGAGAATCGATCTGC
TATCATAAAAATTACAAAAAAATTTTATTTGCCCTCAATTA
TTTTAGGATTGGTATTAAGGACGCTTAAATTAATTTGTCTGG
GTCACTACGCATCATTTGTGATTGAGAAGATCAGCGATACG
AAATATTTCTAGTACTATCGATAAATTTATTTGAAAATTC
TAAGAAAAGCAAACGTTACATGAATTGATGAAACAATACA
AAGACAGATAAAGCCACGCACATTTAGGATATTGGCCGAG
ATTACTGAATATTGAGTAAGATCACGGAATTTCTGACAGG
AGCATGTCTTCAATTCAGCCCCAAATGGCAGTTGAAATACT
CAAACCGCCCCCATATGCAGGAGCGGATCATTCATTGTTTG
TTTGGTTGCTTTTGCCAACATGGGAGTCCAAGGTT

10

20

【0536】

配列番号352

GCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGGCCATCTTCGTACTCGGGC
ACGACTGGTAATTTAAATGGATCCAACCGACAACCACTTTG
CGGACTTCCCTTTCAAGAGAATTCAATAAGGTTAATTCCTA
ATTGAAATCCGAAGATAAGATTCCACACACTTGTGGCTG
ATATCAAAAAGGCTACTGCCCTATTTAAACACATCTCTGGAG
ACTGAGAAAATCAGACCTCCAAGCATGAAGAAGCCTGAGC
TTACTGCTACTTCTGTGTGAGAAGTTCCCTCATCGAGAAGTT
CGATTCTGTGTCTGATCTTATGCAGCTCTCTGAGGGGTGAG
GAATCAAGAGCTTTCTCTTTTCGATGTTGGTGGAAAGAGGAT
ACGTTCTCAGAGTTAACTCTTGCCTGACGGATTCTACAA
GGATAGATACGTGTACAGACACTTTCGCTTCAGCTGCTCTC
CCTATCCCTGAAGTTCTTTGATATCGGAGAGTTCTCTGAGT
CTCTTACCTACTGTATCTCAAGAAGGGCTCAGGGTGTTAC
TCTTCAAGATCTTCCCTGAGACTGAGCTTCCCTGCTGTTCTT
CAACCTGTTTGCTGAGGCTATGGATGCTATCGCTGCTGCTG
ATCTTTCTCAAACCTTCTGGATTTCGGACCTTTTCGGTCTCTCA
GGGAATCGGACAGTACACTACTTTGGAGAGATTTTCATCTGC
GCTATCGCTGATCCTCATGTTTACCATTTGGCAGACCGTTA
TGGATGATACCGTTTCTGCTTCTGTTGCTCAAGCTCTTGA
TGAGCTTTATGCTTTTGGGCTGAGGATTGTCCTGAGGTTAGA
CATCTTGTTTCACGCTGATTTTCGGATCTAACAACGTTCTCA
CCGATAACGGAAGAATCACCGCTGTTATCGATTGGTCTGA
GGCTATGTTTCGGAGATTCTCAATACGAGGTGGCCAACATA

30

40

50

TTCTTTTGGAGGCTTGGCTTGCTTGATGGAACAACAGAC
CTAGATACTTCGAGAGAAGGCATCCTGAGCTTGCTGGATC
TCCTAGACTTAGAGCTTACATGCTTAGGATCGGACTTGAT
CAGCTTTTACCAGTCTCTCGTTGATGGAAACTTCGATGATG
CTGCTTGGGCTCAGGGAAGATGTGATGCTATCGTTAGATC
TGGTGCTGGAACCTGTTGGAAGAAGCTCAAATCGCTAGAAGA
TCTGCTGCTGTTTTGGACTGATGGATGTGTTGAAGTTCTCG
CTGATTCTGGAAACAGAAGGCCTTCTACTAGACCTAGAGC
CAAGAAGTGAAGATCGGCGGGCAATAGCTTCTTAGCGCCAT
CCCGGGTTGATCCTATCTGTGTTGAAATAGTTGCGGTGGG
CAAGGCTCTCTTTTCAGAAAGACAGGCGGCCAAAGGAACCC
AAGGTGAGGTGGGCTATGGCTCTCAGTTCCTTGTGGAAGC
GCTTGGTCTAAGGTGCAGAGGTGTTAGCGGGATGAAGCAA
AAGTGTCGATTTGTAAACAAGATATGTTGATCCTACGTAAAG
GATATTAAAGTATGTATTCATCACTAATAATCAGTGTA
TTCCAATATGTACTACGATTTCCAATGTCTTTATTGTGCGC
CGTATGTAATCGGCGTCACAAAATAATCCCCGGTGACTTT
CTTTTAATCCAGGATGAAATAATATGTTATTATAATTTTT
GCGATTTTGGTCCGTATATAGGAATTGAAGTGCTTGCGGT
CGCCACCACCTCCCATTTTCATAATTTTACATGTATTTGAAA
AATAAAAAATTTATGGTATTCAATTTAAACACGTATACTTG
TAAAGAATGATATCTTGAAAGAAATATAGTTTAAATATTT
ATTGATAAAAAATAACAAGTCAGGTATTATAGTCCAAGCAA
AACATAAAATTTATTGATGCAAGTTTAAATTCAGAAATATT
TCAATAAAGTATATATCAGCTGGTACATTGCCGTAGATG
AAAGACTGAGTGCGATATTATGGTGTAATACATAGCGGCC
GCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTACTCGG
CCACGACTGGTAATTTAAT

【0537】

配列番号353

g c c c a a g g a a c c c t t t t c t g g g c c a t c t t c g t a c t c g g c c
a c g a c t g g t a a t t t a a t g g a t c c a c t a g t a a c g g c c g c c a
g t g t g c t g g a a t t c g c c c t t c g t c g a c c t g c a g g t c a a c g
g a t c a g g a t a t t c t t g t t t a a g a t g t t g a a c t c t a t g g a g
g t t t g t a t g a a c t g a t g a t c t a g g a c c g g a t a a g t t c c c t
t c t t c a t a g c g a a c t t a t t c a a a g a a t g t t t t g t g t a t c a
t t c t t g t t a c a t t g t t a t t a a t g a a a a a t a t t a t t g g t c
a t t g g a c t g a a c a c g a g t g t t a a a t a t g g a c c a g g c c c c a
a a t a a g a t c c a t t g a t a t a t g a a t t a a a t a a c a a g a a t a a
a t c g a g t c a c c a a a c c a c t t g c c t t t t t a a c g a g a c t t g
t t c a c c a a c t t g a t a c a a a a g t c a t t a t c c t a t g c a a a t c
a a t a a t c a t a c a a a a a t a t c c a a t a a c a c t a a a a a a t t a a
a a g a a a t g g a t a a t t t c a c a a t a t g t t a t a c g a t a a a g a a
g t t a c t t t t c c a a g a a a t t c a c t g a t t t t a t a a g c c c a c t
t g c a t t a g a t a a a t g g c a a a a a a a a c a a a a a g g a a a a g a
a a t a a a g c a c g a a g a a t t c t a g a a a a t a c g a a a t a c g c t t
c a a t g c a g t g g g a c c c a c g g t t c a a t t a t t g c c a a t t t t c
a g c t c c a c c g t a t a t t t a a a a a a t a a a a c g a t a a t g c t a a
a a a a a t a t a a a t c g t a a c g a t c g t t a a a t c t c a a c g g c t g
g a t c t t a t g a c g a c c g t t a g a a a t t g t g g t t g t c g a c g a g

t c a g t a a t a a a c g g c g t c a a a g t g g t t g c a g c c g g c a c a c
a c g a g t c g t g t t t a t c a a c t c a a a g c a c a a a t a c t t t t c c
t c a a c c t a a a a a t a a g g c a a t t a g c c a a a a c a a c t t t t g c
g t g t a a a c a a c g c t c a a t a c a c g t g t c a t t t t a t t a t t a g
c t a t t g c t t c a c c g c c t t a g c t t t c t c g t g a c c t a g t c g t
c c t c g t c t t t t c t t c t t c t t c t a t a a a a c a a t a c c c a
a a g a g c t c t t c t t c t t c a c a a t t c a g a t t t c a a t t t c t c a
a a a t c t t a a a a a c t t t c t c t c a a t t c t c t c t a c c g t g a t c
a a g g t a a a t t t c t g t g t t c c t t a t t c t c t c a a a a t c t t c g
a t t t t g t t t t c g t t c g a t c c c a a t t t c g t a t a t g t t c t t t
g g t t t a g a t t c t g t t a a t c t t a g a t c g a a g a c g a t t t t c t
g g g t t t g a t c g t t a g a t a t c a t c t t a a t t c t c g a t t a g g g
t t t c a t a g a t a t c a t c c g a t t t g t t c a a a t a a t t t g a g t t
t t g t c g a a t a a t t a c t c t t c g a t t t g t g a t t t c t a t c t a g
a t c t g g t g t t a g t t t c t a g t t t g t g c g a t c g a a t t t g t c g
a t t a a t c t g a g t t t t t c t g a t t a a c a g a t g a g a g g a t c t g
g a t c t g a g t c t g a t g a g t c t g g a c t t c c t g c t a t g g a a a t
c g a g t g t a g a a t c a c t g g a a c c c t t a a c g g t g t t g a g t t c
g a g c t t g t t g g a g g t g g t g a g g g a a c t c c t g a g c a g g g a a
g a a t g a c t a a c a a g a t g a a g t c t a c c a a g g g t g c t c t t a c
c t t c t c t c c a t a c c t t c t t t c t c a c g t t a t g g g a t a c g g a
t t c t a c c a c t t c g g a a c t t a c c c a t c t g g a t a c g a g a a c c
c t t t c c t t c a t g c t a t c a a c a a c g g t g g a t a c a c c a a c a c
t a g g a t c g a g a a g t a c g a g g a t g g t g g t g t t c t t c a c g t t
a g c t t c t c t t a c a g a t a c g a g g c t g g a a g a g t g a t c g g a g
a t t t c a a g g t t a t g g g a a c t g g a t t c c c t g a g g a t t c t g t
t a t c t t c a c c g a c a a g a t c a t c a g g t c t a a c g c t a c t g t t
g a g c a t c t t c a t c c t a t g g g a g a t a a c g a t c t c g a t g g a t
c t t t c a c c a g a a c c t t c t c a c t t a g a g a t g g t g g t t a c t a
c t c t t c t g t g g t g g a t t c t c a c a t g c a c t t c a a g t c t g c t
a t c c a c c c t t c t a t c c t t c a a a a c g g t g g a c c t a t g t t c g
c t t t c a g a a g a g t t g a g g a a g a t c a c t c t a a c a c c g a g c t
t g g a a t c g t t g a g t a c c a a c a t g c t t t c a a g a c c c c t g a t
g c t g a t g c t g g t g a g g a a t g a t a a t a t c a a a a t c t a t t t a
g a a a t a c a c a a t a t t t t g t t g c a g g c t t g c t g g a g a a t c g
a t c t g c t a t c a t a a a a a t t a c a a a a a a t t t t a t t t g c c t
c a a t t a t t t t a g g a t t g g t a t t a a g g a c g c t t a a a t t a t t
t g t c g g g t c a c t a c g c a t c a t t g t g a t t g a g a a g a t c a g c
g a t a c g a a a t a t t c g t a g t a c t a t c g a t a a t t t a t t t g a a
a a t t c a t a a g a a a a g c a a a c g t t a c a t g a a t t g a t g a a a c
a a t a c a a a g a c a g a t a a a g c c a c g c a c a t t t a g g a t a t t g
g c c g a g a t t a c t g a a t a t t g a g t a a g a t c a c g g a a t t t c t
g a c a g g a g c a t g t c t t c a a t t c a g c c c a a a t g g c a g t t g a
a a t a c t c a a a c c g c c c c a t a t g c a g g a g c g g a t c a t t c a t
t g t t t g t t t g g t t g c c t t t g c c a a c a t g g g a g t c c a a g g t
t g c g g c c g c g c c c a a g g a a c c c t t t t c t g g g c c a t c t t c g
t a c t c g g c c a c g a c t g g t a a t t t a a t

【0538】

配列番号354

G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G C C A T C T T C G T A C T C G G C C

10

20

30

40

50

ACGACTGGTAATTTAATGGATCCAACCGACAACCACTTTG
CGGACTTTCCTTTCAAGAGAATTCAATAAGGTTAATTCTTA
ATTGAAATCCGAAGATAAGATTCCCACACACTTGTGGCTG
ATATCAAAAAGGCTACTGCCATTTTAAACACATCTCTGGAG
ACTGAGAAAATCAGACCTCCAAGCATGAAGAAGCCTGAGC
TACTGCTACTTCTGTTGAGAAGTTCTCATCGAGAAGTTT
CGATTCTGTGTCTGATCTTATGCAGCTCTCTGAGGGTGAG
GAATCAAGAGCTTTCTCTTTTCGATGTTGGTGGAAGAGGAT
ACGTTCTCAGAGTTAACTCTTGCCTGACGGATTCTACAA
GGATAGATACGTGTACAGACACTTTCGCTTCAGCTGCTCTC
CCTATCCCTGAAGTTCTTGATATCGGAGAGTTCTCTGAGT
CTCTTACCTACTGTATCTCAAGAAGGGCTCAGGGTGTTAC
TCTTCAAGATCTTCTCTGAGACTGAGCTTCTCTGCTGTTCTT
CAACCTGTTGCTGAGGCTATGGATGCTATCGCTGCTGCTG
ATCTTTCTCAAACCTTCTGGATTTCGGACCTTTTCGGTCTCTCA
GGGAATCGGACAGTACACTACTTGGAGAGATTTCATCTGC
GCTATCGCTGATCCTCATGTTTACCATTGGCAGACCGTTA
TGGATGATACCGTTTCTGCTTCTGTTGCTCAAGCTCTTGA
TGAGCTTATGCTTTTGGGCTGAGGATTGTCCTGAGGTTAGA
CATCTTGTTTACGCTGATTTTCGGATCTAACAAACGTTCTCA
CCGATAACGGAAGAATCACCGCTGTTATCGATTGGTCTGA
GGCTATGTTTCGGAGATTCTCAATACGAGGTGGCCAACATA
TTCTTTTGGAGGCTTGGGCTTGCCTTGATGGAACAACAGA
CTAGATACTTCGAGAGAAGGCATCCTGAGCTTGCTGGATC
TCCTAGACTTAGAGCTTACATGCTTAGGATCGGACTTGAT
CAGCTTTACCAGTCTCTCGTTGATGGAAACTTCGATGATG
CTGCTTGGGCTCAGGGAAGATGTGATGCTATCGTTAGATC
TGGTGCTGGAACCTGTTGGAAGAACCTCAAATCGCTAGAA
TCTGCTGCTGTTTGGACTGATGGATGTGTTGAAGTTCTCG
CTGATTCTGGAAACAGAAGGCCTTCTACTAGACCTAGAGC
CAAGAAGTGAAAGATCGGCGGGCAATAGCTTCTTAGCGCCAT
CCCGGGTTGATCCTATCTGTGTTGAAAATAGTTGCGGTGGG
CAAGGCTCTCTTTTCAGAAAGACAGGCGGCCAAAGGAACCC
AAGGTGAGGTGGGCTATGGCTCTCAGTTCTCTTGTTGGAAGC
GCTTGGTCTAAGGTGCAGAGGTGTTAGCGGGATGAAGCAA
AAGTGTC CGATTGTAAACAAGATATGTTGATCCTACGTAAG
GATATTAAAGTATGTATTTCATCACTAATAATCAGTGTA
TTCCAATATGTACTACGATTTCCAATGTCTTTATTGTCGC
CGTATGTAATCGGCGTCACAAAAATAATCCCCGGTGACTTT
CTTTTAAATCCAGGATGAAATAATATGTTATTATAATTTTT
GCGATTTGGTCCGTTATAGGAATTGAAGTGTGCTTGCGGT
CGCCACCCTCCCATTTCTATAATTTTACATGTATTTGAAA
AATAAAAAATTTATGGTATTCAATTTAAACACGTATACTTG
TAAAGAATGATATCTTGAAAGAAATATAGTTTAAATATTT
ATTGATAAAAATAACAAGTCAAGGTATTATAGTCCAAGCAAA
AACATAAAATTTATTGATGCAAGTTTAAATTCAGAAATATT
TCAATAACTGATTATATCAGCTGGTACATTGCCGTAGATG
AAAGACTGAGTGC GATATTATGGTGTAATACATAGCGGCC
GCAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTG
GTCGATCGTGTTGGCCACTC

10

20

30

40

50

【0539】

配列番号355

G C C C A A A G G A A C C C T T T T C T G G G C C A T C T T C G T A C T C G G C C
A C G A C T G G T A A T T T A A T G G A T C C A C T A G T A A C G G C C G C C A
G T G T G C T G G A A T T C G C C C T T C G T C G A C C T G C A G G T C A A C G
G A T C A G G A T A T T C T T G T T T A A G A T G T T G A A C T C T A T G G A G
G T T T G T A T G A A C T G A T G A T C T A G G A C C G G A T A A G T T C C C T
T C T T C A T A G C G A A C T T A T T C A A A G A A T G T T T T G T G T A T C A
T T C T T G T T A C A T T G T T A T T A A T G A A A A A A T A T T A T T G G T C
A T T G G A C T G A A C A C G A G T G T T A A A T A T G G A C C A G G C C C C A
A A T A A G A T C C A T T G A T A T A T G A A T T A A A T A A C A A G A A T A A
A T C G A G T C A C C A A A C C A C T T G C C T T T T T A A C G A G A C T T G
T T C A C C A A C T T G A T A C A A A A G T C A T T A T C C T A T G C A A A T C
A A T A A T C A T A C A A A A A T A T C C A A T A A C A C T A A A A A A T T A A
A A G A A A T G G A T A A T T T C A C A A T A T G T T A T A C G A T A A A G A A
G T T A C T T T T T C C A A G A A A T T C A C T G A T T T T A T A A G C C C A C T
T G C A T T A G A T A A A T G G C A A A A A A A A C A A A A A G G A A A A G A
A A T A A A G C A C G A A G A A T T C T A G A A A A T A C G A A A T A C G C T T
C A A T G C A G T G G G A C C C A C G G T T C A A T T A T T G C C A A T T T T C
A G C T C C A C C G T A T A T T T A A A A A A T A A A A C G A T A A T G C T A A
A A A A A T A T A A A T C G T A A C G A T C G T T A A A T C T C A A C G G C T G
G A T C T T A T G A C G A C C G T T A G A A A T T G T G G T T G T C G A C G A G
T C A G T A A T A A A C G G C G T C A A A G T G G T T G C A G C C G G C A C A C
A C G A G T C G T G T T T A T C A A C T C A A A G C A C A A A T A C T T T T C C
T C A A C C T A A A A A T A A G G C A A T T A G C C A A A A A C A A C T T T G C
G T G T A A A C A A C G C T C A A T A C A C G T G T C A T T T T A T T A T T A G
C T A T T G C T T C A C C G C C T T A G C T T T C T C G T G A C C T A G T C G T
C C T C G T C T T T T C T T C T T C T T C T T C T A T A A A A C A A T A C C C A
A A G A G C T C T T C T T C T T C A C A A T T C A G A T T T C A A T T T C T C A
A A A T C T T A A A A A C T T T C T C T C A A T T C T C T C T A C C G T G A T C
A A G G T A A A T T T C T G T G T T C C T T A T T C T C T C A A A A T C T T C G
A T T T T G T T T T C G T T C G A T C C C A A T T T C G T A T A T G T T C T T T
G G T T T A G A T T C T G T T A A T C T T A G A T C G A A G A C G A T T T T C T
G G G T T T G A T C G T T A G A T A T C A T C T T A A T T C T C G A T T A G G G
T T T C A T A G A T A T C A T C C G A T T T G T T C A A A T A A T T T G A G T T
T T G T C G A A T A A T T A C T C T T C G A T T T G T G A T T T C T A T C T A G
A T C T G G T G T T A G T T T C T A G T T T G T G C G A T C G A A T T T G T C G
A T T A A T C T G A G T T T T T C T G A T T A A C A G A T G A G A G G A T C T G
G A T C T G A G T C T G A T G A G T C T G G A C T T C C T G C T A T G G A A A T
C G A G T G T A G A A T C A C T G G A A C C C T T A A C G G T G T T G A G T T C
G A G C T T G T T G G A G G T G G T G A G G G A A C T C C T G A G C A G G G A A
G A A T G A C T A A C A A G A T G A A G T C T A C C A A G G G T G C T C T T A C
C T T C T C T C C A T A C C T T C T T T C T C A C G T T A T G G G A T A C G G A
T T C T A C C A C T T C G G A A C T T A C C C A T C T G G A T A C G A G A A C C
C T T T C C T T C A T G C T A T C A A C A A C G G T G G A T A C A C C A A C A C
T A G G A T C G A G A A G T A C G A G G A T G G T G G T G T T C T T C A C G T T
A G C T T C T C T T A C A G A T A C G A G G C T G G A A G A G T G A T C G G A G
A T T T C A A G G T T A T G G G A A C T G G A T T C C C T G A G G A T T C T G T
T A T C T T C A C C G A C A A G A T C A T C A G G T C T A A C G C T A C T G T T
G A G C A T C T T C A T C C T A T G G G A G A T A A C G A T C T C G A T G G A T

10

20

30

40

50

CTTTCACCCAGAACCTTCTCACTTAGAGATGGTGGTTACTA
CTCTTCTGTGGTGGATTCTCACATGCACTTCAAGTCTGCT
ATCCACCCCTTCTATCCTTCAAAACGGTGGACCTATGTTCTG
CTTTCAGAAAGAGTTGAGGAAGATCACTCTAACACCGAGCT
TGGAATTCGTTGAGTACCAACATGCTTTCAAGACCCCTGAT
GCTGATGCTGGTGGGAATGATAAATATCAAAATCTATTTA
GAAATACACAATATTTTGTGTCAGGCTTGCTGGAGAATCG
ATCTGCTATCATAAAAATTACAAAAAAATTTTATTTGCTT
CAATTATTTTAGGATTGGTATTAAAGGACGCTTAAATTAATT
TGTCGGGCTCACTACGCATCATTTGTGATTGAGAAGATCAGC
GATACGAAATATTCGTAGTACTATCGATAATTTATTTGAA
AATTCATAAGAAAAAGCAAACGTTACATGAATTGATGAAC
AATACAAAGACAGATAAAGCCACGCACATTTAGGATATTG
GCCGAGATTACTGAATATTGAGTAAGATCACGGAATTTCT
GACAGGAGCATGTCTTCAATTTCAGCCCAAATGGCAGTTGA
AATACTCAAACCGCCCCATATGCAGGAGCGGATCATTCAT
TGTTTTGTTTTGGTTGCCTTTGCCAAACATGGGAGTCCAAGGT
TGC GGCCGCAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTA
CTTGCTGGTTCGATCGTGTGTTGGCCACTC

10

【0540】

20

配列番号375

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT
GGGCCATCTTTCGTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGG
ATCCACTAGTAA

【0541】

配列番号376

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT
GGGCCATCTTTCGTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGG
ATCCACTAGTAA

【0542】

30

配列番号377

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT
GGGCCATC:CAGTCGTGGCCGAGTACGAAGATGGCCCAAGA
:::TACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCCACTAG
TAA

【0543】

配列番号378

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT
GGGCCATC:::GTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGG
ATCCACTAGTAA

40

【0544】

配列番号379

【0545】

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT
TAGG:::::TATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCC
AAGCTGGGCTGCGTGCACGAAC:CGTACTCGGCCACGACT
GGTAATTTAATGGATCCACTAGTAA

【0546】

配列番号380

TTCTGGCCTCTTTTATTGGGGCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCT

50

【 0 5 4 7 】

【 0 5 4 8 】

10

【 0 5 4 9 】

【化 1】

:CGTACTCGGGCCACGACTGGTAATTTAATTTTCAATTTATTT

20

TCCAAGGTTGCGGCCGCGCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTC.....TG
GTAATTTAATTTTCAATTTATTTTT

30

TCCAAGGTTGCGGCCGCGCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTACGAGC
GTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACATATCCC
AGCCACGACT:::G:GTAATTTAATTTTCAATTTATTT

【 0 5 5 0 】

40

【 0 5 5 1 】

【 0 5 5 2 】

【 0 5 5 3 】

50

TCAACTTCGTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATC
CACTAGTAA

【0554】

配列番号392

TAGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACT
TCAACTAT::GTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGA
TCCACTAGTAA

【0555】

配列番号393

TAGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACT
TCA:::TACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCC
ACTAGTAA

10

【0556】

配列番号394

AGGTAAATTTAATGGATCCACTAGTAA

【0557】

配列番号395

TCCAAGGTTGCGGCCGCGAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAAC
TTCAACTACTTGCTGGTCGATCGTGTTG GCCACTCTT
GTTTATCTATCA

20

【0558】

配列番号396

TCCAAGGTTGCGGCCGCGAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAAC
TTCA:::ACTTGCTGGTCGATCGTGTTGGCCACTCTTGTT
TATCTATCA

【0559】

配列番号397

TCCAAGGTTGCGGCCGCG:::~
:::GCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCAT
TATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAG
GTCACTATCAGTCAAA:ACTTGCTGGTCGATCGTGTTGGC
CACTCTTGTTTATCTATCA

30

【0560】

配列番号398

TCCAAGGTTTTCGCGGCCGCGAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAA
:::CTTC:ACTTGCTGGTCGATCGTGTTGGCCACTCT
TGTTTATCTATCA

【0561】

配列番号399

TCCAAGGTTGCGGCCGCGAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAAC
TTCA::GATAAAAGTTGCTCGCCTGTGTGGGTGTGGATGCT
T:ACTTGCTGGTCGATCGTGTTGGCCACTCTTGTTTATCT
ATCA

40

【0562】

配列番号400

TCCAAGGTTGCGGCCGCGAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAAC
TTCAACTACACTACTTGCTGGTCGATCGTGTTGGCCACTC
TTGTTTATCTATCA

【0563】

配列番号401

50

T C C A A G G T T G C G G C C G C A G C G A G A G A A A G C T T A T T G C A A C
T T C A A C T A C T T G C T G G T C G A T C G T G T T G G C C A C T C T T G T T
T A T C T A T C A

【0564】

配列番号402

C T T A C A T G C T T A G G A T C G G A C T T G

【0565】

配列番号403

A G T T C C A G C A C C A G A T C T A A C G

【0566】

配列番号404

C C C T G A G C C C A A G C A G C A T C A T C G

【0567】

配列番号405

C G G A G A G G G C G T G G A A G G

【0568】

配列番号406

T T C G A T T T G C T A C A G C G T C A A C

【0569】

配列番号407

A G G C A C C A T C G C A G G C T T C G C T

【0570】

配列番号408

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G G C C A T C T T C G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T G G
A T C C A A C C G A C A A C C A C T T

【0571】

配列番号409

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T : : :
: : : : : : : : : : : : T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T G G
A T C C A A C C G A C A A C C A C T T

【0572】

配列番号410

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G : : : : : : : : : : T C G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T G G
A T C C A A C C G A C A A C C A C T T

【0573】

配列番号411

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G

【0574】

配列番号412

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G G C C A T C T : : : : : : : : C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T G G
A T C C A A C C G A C A A C C A C T T

【0575】

配列番号413

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G G C C A T : : T C G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T G G
A T C C A A C C G A C A A C C A C T T

10

20

30

40

50

【0576】

配列番号414

T T C T G G C C T C T T T A T T G G G C C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T
G G G C C A T C T

【0577】

配列番号415

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G
C C A T C T T C G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0578】

10

配列番号416

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G
C C A T : : : : : : : : : : G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0579】

配列番号417

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G
C C A T C T : : : : : : : : : : : : G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0580】

20

配列番号418

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G
C C A T C T : : : : : : : : : : : : G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0581】

配列番号419

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T T C T G G G
C C A T : : : : G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0582】

30

配列番号420

: : G T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T T T T : : : : : : : :
: : : T C T T T C A A C T T C T T A

【0583】

配列番号421

G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A : : : : : : : : : : : : : :
: : : : : : : : T A C T C G G C C A C G A C T G G T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0584】

配列番号422

40

T G T A A T A C A T A G C G G C C G C G C C C A A G G A A C C C T T T A C T C G
G C C A : T A A T T T A A T T T T C A
A T T T A T T T T T T C T T C A A C T T C T T A

【0585】

配列番号423

t n a n t g a t t c c c a a t g g c g g c g c t t t c a a g g a c a t g a
t c a t g g a g g g t g a t g g c a g g a c c t c g t a c t g a a a t g g
t c c g a a g g t c c a c g c c g c c a a c t a c g a g

【0586】

配列番号424

50

cnantactcg tagttggcgg cgtggacctt cggacca
ttt cagtacgagg tcctgccatcacccctccatg atca
tgtcct tgaaagcggc gccattggga at

【0587】

配列番号425

tnantgattc ccaatggcgg cgcctttcaag gacatga
tca tggagggtga tggcaggacc tcgtactgaa att
tgcagggt acaag

【0588】

配列番号426

angngtcttg taccctgcaaa tttcagtacg aggtcct
gcc atcacccctcc atgatcatgtccttgaaagc gccg
ccattg ggaat

【0589】

配列番号427

gtttaccgcgccaatatatcctgtcacaacactgatagtttta
aactgaaggcgaggaaacgacaatctgatcatgagcggagga
attaaaggaggtcacgttatgacccccgccgatgacgcggg
acaagccgttttacgtttggaaactgacagaaccgcaacgt
tgaaggagccactcagcaagccttactagtagcgcctgtttta
aacgcctcttcaactggaagagcggttaccgcggaccgaagc
ttgcatgccctgcagtgacgcgtgacccgggtcgtgccccctc
tctagagataatgagcattgcatgtctaatgttataaaaaa
ttaccacataattttttttgtcacaccttggttgaaagtgcag
tttatctatctttatacatataatttaaacctttactctacg
aataatatataatctatagtaactacaataatatcagtggtttt
agagaatcataataaatgaacaggttagacatgggtctaaagg
acaatttgagtatttttgacaacaggactctacagttttatc
ttttttagtgtgcatgtgttctccttttttttttgcaaatag
cttcacctaataataacttcatccattttattagtaacatc
cattttagggttttaggggttaattgggtttttatagactaattt
tttttagtacaatctattttatttctatttttagcctctaaatt
aagaaaaactaaaaactctatttttagttttttttattttaataa
tttagataataaaaatagaataaaaataaagtgaactaaaaaat
aaacaaaatacccttttaagaaaattaaaaaaaactaagggaac
attttttcttggtttcgagtagataatgccagcctgtttaaac
gccgtcgcagcaggtctaaacggacacccaacagcgaaccagc
agcgtcgcgtcgggcacaagcgaagcagacgggcacggcatc
tctgtcgcgtgccctctggacccccctctcgagagttccgcctcc
accgttggacttgctccgcctgtcggcatccagaaaattgcg
tggcgggagcgggcagacgtgagccgggcacgggcaggcggcct
cctcctcctctcacgggcacccgggcagctacggggggaattcct
ttcccacccgctccttctgcctttcccttctcgcgcccgccgta
ataaatagacacccccctccacacccctctttccccaacctc
gtgttggttcggagcgcacacacacacacacacagatctcccc
caaatccaccccgctcgggcacctccgccttcaagggtacgcgc
tcgtcctccccccccccccctctctaccttctctagatcg
gcgttccgggtccatgggttagggcccggtagttctacttct
gttcatgtttgtgttagatccgtgtttgtgttagatccgt
gctgctagcgttcgtacacgggatgcgacctgtacgtcaga

10

20

30

40

50

c a c g t t c t g a t t g c t a a c t t g c c a g t g t t t c t c t t t g g g g
a a t c c t g g g a t g g c t c t a g c c g t t c c g c a g a c g g g a t c g a
t t t c a t g a t t t t t t t g t t t c g t t g c a t a g g g t t t g g t t t
g c c c t t t t c c t t t a t t t c a a t a t a t g c c g t g c a c t t g t t t
g t c g g g t c a t c t t t t c a t g c t t t t t t t g t c t t g g t t g t g
a t g a t g t g g t c t g g t t g g g c g g t c g t t c t a g a t c g g a g t a
g a a t t c t g t t t c a a a c t a c c t g g t g g a t t t a t t a a t t t t g
g a t c t g t a t g t g t g t g c c a t a c a t a t t c a t a g t t a c g a a t
t g a a g a t g a t g g a t g g a a a t a t c g a t c t a g g a t a g g t a t a
c a t g t t g a t g c g g g t t t t a c t g a t g c a t a t a c a g a g a t g c
t t t t t g t t c g c t t g g t t g t g a t g a t g t g g t g t g g t t g g g c
g g t c g t t c a t t c g t t c t a g a t c g g a g t a g a a t a c t g t t t c
a a a c t a c c t g g t g t a t t t a t t a a t t t t g g a a c t g t a t g t g
t g t g t c a t a c a t c t t c a t a g t t a c g a g t t t a a g a t g g a t g
g a a a t a t c g a t g t a g g a t a g g t a t a c a t g t t g a t g t g g g t
t t t a c t g a t g c a t a t a c a t g a t g g c a t a t g c a g c a t c t a t
t c a t a t g c t c t a a c c t t g a g t a c c t a t c t a t t a t a a t a a a
c a a g t a t g t t t t a t a a t t a t t t t g a t c t t g a t a t a c t t g g
a t g a t g g c a t a t g c a g c a g c t a t a t g t g g a t t t t t t t a g c
c c t g c c t t c a t a c g c t a t t t a t t t g c t t g g t a c t g t t t c t
t t t g t c g a t g c t c a c c c t g t t g t t t g g t g t t a c t t c t g c a
g g t c g a c t c t a g a g g a t c c a c a c g a c a c c a t g t c c g c c c g
c g a g g t g c a c a t c g a c g t g a a c a a c a a g a c c g g c c a c a c c
c t c c a g c t g g a g g a c a a g a c c a a g c t c g a c g g c g g c a g g t
g g c g c a c c t c c c c g a c c a a c g t g g c c a a c g a c c a g a t c a a
g a c c t t c g t g g c c g a a t c c a a c g g c t t c a t g a c c g g c a c c
g a g g g c a c c a t c t a c t a c t c a a t t a a t g g c g a g g c c g a g a
t c a g c c t c t a c t t c g a c a a c c c g t t c g c c g g c t c c a a c a a
a t a c g a c g g c c a c t c c a a c a a g t c c c a g t a c g a g a t c a t c
a c c c a g g g c g g c t c c g g c a a c c a g t c c c a c g t g a c c t a c a
c c a t c c a g a c c a c c t c c t c c c g c t a c g g c c a c a a g t c c t g
a g t c a t g a g t c a t g a g t c a g t t a a c c t a g a c t t g t c c a t c
t t c t g g a t t g g c c a a c t t a a t t a a t g t a t g a a a t a a a a g g
a t g c a c a c a t a g t g a c a t g c t a a t c a c t a t a a t g t g g g c a
t c a a a g t t g t g t g t t a t g t g t a a t t a c t a g t t a t c t g a a t
a a a a g a g a a a g a g a t c a t c c a t a t t t c t t a t c c t a a a t g a
a t g t c a c g t g t c t t t a t a a t t c t t t g a t g a a c c a g a t g c a
t t t c a t t a a c c a a a t c c a t a t a c a t a t a a a t a t t a a t c a t
a t a t a a t t a a t a t c a a t t g g g t t a g c a a a a c a a a t c t a g t
c t a g g t g t g t t t t g c g a a t g c g g c c g c g g a c c g a a t t g g g
g a t c t g c a t g a a a g a a a c t g t c g c a c t g c t g a a c c g c a c c
t t g t c a c t t t c a t c g a a c a c g a c c t g t g c c c a a g a t g a c g
g t g c t g c g g t c t a a g t g a g g c t g a a t t g c c t t g g a c a g a a
g c g g a c t c c c t a c a a t t a g t t a g g c c a a a c g g t g c a t c c a
t g t g t a g c t c c g g g c t c g g g c t g t a t c g c c a t c t g c a a t a
g c a t c c a t g g a g c t c g t t c c a t g t a g t t g g a g a t g a a c c a
a t g a t c g g g c g t g t g g a c g t a t g t t c c t g t g t a c t c c g a t
a g t a g a g t a c g t g t t a g c t c t t t c a t g g t g c a a g t g a a a t
t t g t g t t g g t t t a a t t a c c c c t a c g t t a g t t g c g g g a c a g
g a g a c a c a t c a t g a a t t t a a a g g c g a t g a t g t c c t c t c c t

10

20

30

40

50

g t a a t g t t a t t c t t t t g a t g t g a t g a a t c a a a a t g t c a t a
t a a a a c a t t t g t t g c t c t t t a g t t a g g c c t g a t c g t a g a a
c g a a a t g c t c g t g t a g c g g g g c t a c g a g c c t a t g a c g c a a
t a a c a c t g g t t t g c c g g c c c g g a g t c g c t t g a c a a a a a a
a g c a t g t t a a g t t t a t t t a c a a t t c a a a a c c t a a c a t a t t
a t a t t c c c t c a a a g c a g g t t c a c g a t c a c a c c t g t a c c t a
a a a a a a c a t g a a g a a t a t a t t a c t c c a t t a t t a t g a g a t
g a a c c a c t t g g c a a g a g t g g t a a g c t a t a t a a a a a a a t g a
a c a t t a t t a c g a g a t g t t a t a t g c c a t t a t a t t g a t t c g a
a g a t a t a t g t t t c t t t c t c c c a c g g g c a c c t a a c g g a t a c
a t g a t a a g g c c a a g g c a g a t c a c g g g a a a t t a t t c g a a t a
c a t g t t a c g c c c t a t t g c c g g a a a a a a a a t g c a g g g c a g g
t g t t g g c c g t a g c g a t t t a a g c a c t t a a g c t g g a g g t t g c
c a c a c t t g g a t g c a a g c g t c t g a c c c t t c t a a a a a a t c g g
c g g c t t t g t c c g t a t c c g t a t c c c c t a t c c a a c a t c t a g c
t g g c c a c a c g a c g g g g c t g g g c a g a t c g t g g a t g c c g g g t
c g a c g t c g a t c g t c a g c c a t c a t a g a c c a a t c g a c c a t c t
g t t a t g g a t g c t t g c t a g c t a g a c t a g t c a g a c a t a a a a t
t t g g a t a c t t t c t c c c a a c t g g g a g a c g g g g a c t g a t g t g
c a g c t g c a c g t g a g c t a a a t t t t t c c c t a t a a a t a t g c a t
g a a a t a c t g c a t t a t c t t g c c a c a g c c a c t g c c a c a g c c a
g a t a a c a a g t g c a g c t g g t a g c a c g c a a c g c a t a g c t c t g
g a c t t g t a g c t a g g t a g c c a a c c g g a t c c a c a c g a c a c c a
t g c t c g a c a c c a a c a a g g t g t a c g a g a t c a g c a a c c a c g c
c a a c g g c c t c t a c g c c g c c a c c t a c c t c t c c c t c g a c g a c
t c c g g c g t g t c c c t c a t g a a c a a g a a c g a c g a c g a c a t c g
a c g a c t a c a a c c t c a a g t g g t t c c t c t t c c c g a t c g a c g a
c g a c c a g t a c a t c a t c a c c t c c t a c g c c g c c a a c a a c t g c
a a g g t g t g g a a c g t g a a c a a c g a c a a g a t t a a t g t g t c a a
c c t a c t c c t c c a c c a a c t c c a t c c a g a a g t g g c a g a t c a a
g g c c a a c g g c t c c t c c t a c g t g a t c c a g t c c g a c a a c g g c
a a g g t g c t c a c c g c c g g c a c c g g c c a g g c c c t c g g c c t c a
t c c g c c t c a c c g a c g a g t c c t c c a a c a a c c c g a a c c a g c a
a t g g a a c c t g a c g t c c g t g c a g a c c a t c c a g c t c c c g c a g
a a g c c g a t c a t c g a c a c c a a g c t c a a g g a c t a c c c g a a g t
a c t c c c c g a c c g g c a a c a t c g a c a a c g g c a c c t c c c c g c a
g c t c a t g g g c t g g a c c c t c g t g c c g t g c a t c a t g g t g a a c
g a c c c g a a c a t c g a c a a g a a c a c c c a g a t c a a g a c c a c c c
c g t a c t a c a t c c t c a a g a a g t a c c a g t a c t g g c a g a g g g c
c g t g g g c t c c a a c g t c g c g c t c c g c c c g c a c g a g a a g a a g
t c c t a c a c c t a c g a g t g g g g c a c c g a g a t c g a c c a g a a g a
c c a c c a t c a t c a a c a c c c t c g g c t t c c a g a t c a a c a t c g a
c a g c g g c a t g a a g t t c g a c a t c c c g g a g g t g g g c g g c g g t
a

10

20

30

40

c c g a c g a g a t c a a g a c c c a g c t c a a c g a g g a g c t c a a g a t
c g a g t a t t c a c a t g a g a c g a a g a t c a t g g a g a a g t a c c a g

50

g a g c a g t c c g a g a t c g a c a a c c c g a c c g a c c a g t c c a t g a
a c t c c a t c g g c t t c c t c a c c a t c a c c t c c c t g g a g c t c t a
c c g c t a c a a c g g c t c c g a g a t c c g c a t c a t g c a g a t c c a g
a c c t c c g a c a a c g a c a c c t a c a a c g t g a c c t c c t a c c c g a
a c c a c c a g c a g g c c c t g c t g c t g c t g a c c a a c c a c t c c t a
c g a g g a g g t g g a g g a g a t c a c c a a c a t c c c g a a g t c c a c c
c t c a a g a a g c t c a a g a a g t a c t a c t t c t g a g t c a t g a g t c
a t g a g t c a g t t a a c c t a g a c t t g t c c a t c t t c t g g a t t g g
c c a a c t t a a t t a a t g t a t g a a a t a a a a g g a t g c a c a c a t a
g t g a c a t g c t a a t c a c t a t a a t g t g g g c a t c a a a g t t g t g
t g t t a t g t g t a a t t a c t a g t t a t c t g a a t a a a a g a g a a a g
a g a t c a t c c a t a t t t c t t a t c c t a a a t g a a t g t c a c g t g t
c t t t a t a a t t c t t t g a t g a a c c a g a t g c a t t t c a t t a a c c
a a a t c c a t a t a c a t a t a a a t a t t a a t c a t a t a t a a t t a a t
a t c a a t t g g g t t a g c a a a a c a a a t c t a g t c t a g g t g t g t t
t t g c g a a t t c c c a t g g a g t c a a a g a t t c a a a t a g a g g a c c
t a a c a g a a c t c g c c g t a a a g a c t g g c g a a c a g t t c a t a c a
g a g t c t c t t a c g a c t c a a t g a c a a g a a g a a a a t c t t c g t c
a a c a t g g t g g a g c a c g a c a c g c t t g t c t a c t c c a a a a a t a
t c a a a g a t a c a g t c t c a g a a g a c c a a a g g g c a a t t g a g a c
t t t t c a a c a a a g g g t a a t a t c c g g a a a c c t c c t c g g a t t c
c a t t g c c c a g c t a t c t g t c a c t t t a t t g t g a a g a t a g t g g
a a a a g g a a g g t g g c t c c t a c a a a t g c c a t c a t t g c g a t a a
a g g a a a g g c c a t c g t t g a a g a t g c c t c t g c c g a c a g t g g t
c c c a a a g a t g g a c c c c c a c c c a c g a g g a g c a t c g t g g a a a
a a g a a g a c g t t c c a a c c a c g t c t t c a a a g c a a g t g g a t t g
a t g t g a t a t c t c c a c t g a c g t a a g g g a t g a c g c a c a a t c c
c a c t a t c c t t c g c a a g a c c c t t c c t c t a t a t a a g g a a g t t
c a t t t c a t t t g g a g a g g a c a g g g t a c c c g g g g a t c c a c c a
t g t c t c c g g a g a g g a g a c c a g t t g a g a t t a g g c c a g c t a c
a g c a g c t g a t a t g g c c g c g g t t t g t g a t a t c g t t a a c c a t
t a c a t t g a g a c g t c t a c a g t g a a c t t t a g g a c a g a g c c a c
a a a c a c c a c a a g a g t g g a t t g a t g a t c t a g a g a g g t t g c a
a g a t a g a t a c c c t t g g t t g g t t g c t g a g g t t g a g g g t g t t
g t g g c t g g t a t t g c t t a c g c t g g g c c c t g g a a g g c t a g g a
a c g c t t a c g a t t g g a c a g t t g a g a g t a c t g t t t a c g t g t c
a c a t a g g c a t c a a a g g t t g g g c c t a g g a t c c a c a t t g t a c
a c a c a t t t g c t t a a g t c t a t g g a g g c g c a a g g t t t t a a g t
c t g t g g t t g c t g t t a t a g g c c t t c c a a a c g a t c c a t c t g t
t a g g t t g c a t g a g g c t t t g g g a t a c a c a g c c c g g g g t a c a
t t g c g c g c a g c t g g a t a c a a g c a t g g t g g a t g g c a t g a t g
t t g g t t t t t g g c a a a g g g a t t t t g a g t t g c c a g c t c c t c c
a a g g c c a g t t a g g c c a g t t a c c c a g a t c t g a g t c g a c c t g
c a g g c a t g c c c g c t g a a a t c a c c a g t c t c t c t c t a c a a a t
c t a t c t c t c t c t a t a a t a a t g t g t g a g t a g t t c c c a g a t a
a g g g a a t t a g g g t t c t t a t a g g g t t t c g c t c a t g t g t t g a
g c a t a t a a g a a a c c c t t a g t a t g t a t t t g t a t t t g t a a a a
t a c t t c t a t c a a t a a a a t t t c t a a t t c c t a a a a c c a a a a t
c c a g g g c g a g c t c g g t a c c c g g g g a t c c t c t a g a g t c g a c
c t g c a g g c a t g c c c g c g g a t a t c g a t g g g c c c c g g c c g a a

10

20

30

40

50

g c t t c g g t c c g g g c c a t c g t g g c c t c t t g c t c t t c a g g a t
g a a g a g c t a t g t t t a a a c g t g c a a g c g c t c a a t t c g c c c t
a t a g t g a g t c g t a t t a c a a t c g t a c g c a a t t c a g t a c a t t
a a a a a c g t c c g c a a t g t g t t a t t a a g t t g t c t a a g c g t c a
a t t t g t t t a c a c c a c a a t a t a t c c t g c c a

【0590】

配列番号428

G a g g c c g a c a c g g c a c a c a c g g c g a c a t t c a c c g c c g g c t
t c c t c c g t c g c c a c t c g g c a c a a g g c t c a t c a g t c g c c g a
t g c c c g a t g c g a t c a a c g g a a g c g g a t g g c c c g c t t c t t t
a g a a t t g g c a c a g g a a c a c t g g c c a c t g c c c t t g a t g t g c
a a t t a t g c c t g c g a a a g c c t a g g c a a c a c a c g c g a a t a a a
c g a g c g a a t g a c a c g g a a a g c t g a t g t g g t a t g a a t t a t a
c a a c a t t a t g g g c c a a a a t a t t a t t c t a t c c a c c a t t g t g
t a g c c a c a g c a t c g g t a t t t g a g t t g t g c g a g g a c a a a t c
c c t c g t g a g g t c a a a a a c a g c a a a t a a t a a a c c c a t c t c c
t g a a g a c a c c a a a a a a a g g a g c a g c t c c t c g t g t c a a t g
a a c a a g c g t c a c a a g a a a a g g g a g c a c g t a a a t a a c c t c t
t c a a t t g c t t c a g c a t g a a a a g a a c g g g a a g a a a t g c a a g
t c t a c a g a g g a a a g t g c a g c t g t t t c g g c t g c c a t g g c a a
g t t c c t a c a t g g g c g a g g a a a a g c t g a a c t g g a t t c c a g t
c t t c g c g c t g t c a t g c t c a g c t t g c t t t a g g a t g c g g c a a
t a g t t c a c c t g g a t g a a a a a g a t a c a a g t t a g t c t t g a a g
c a g t c g a g t g g a c a t c c a a a g t a t c a a a a t c g a a a g c t t g
t a a a t g g g g a a g g a a a t a t a c c t c t a c c c g g a a a a g t t t g
g t a g g c a a a a t a a t c c c a a c g c c a g c a g a g c t c

【0591】

配列番号429

c g t g c a a g c g c t c a a t t c g c c c t a t a g t g a g t c g t a t t a c
a a t c g t a c g c a a t t c a g t a c a t t a a a a a c g t c c g c a a t g t
g t t a t t a a g t t g t c t a a g c g t c a a t t t g t t t a c a c c a g a g
g c c g a c a c g g c a c a c a c g g c g a c a t t c a c c g c c g g c t t c c
t c c g t c g c c a c t c g g c a c a a g g c t c a t c a g t c g c c g a t g c
c c g a t g c g a t c a a c g g a a g c g g a t g g c c c g c t t c t t t a g a
a t t g g c a c a g g a a c a c t g g c c a c t g c c c t t g a t g t g c a a t
t a t g c c t g c g a a a g c c t a g g c a a c a c a c g c g a a t a a a c g a
g c g a a t g a c a c g g a a a g c t g a t g t g g t a t g a a t t a t a c a a
c a t t a t g g g c c a a a a t a t t a t t c t a t c c a c c a t t g t g t a g
c c a c a g c a t c g g t a t t t g a g t t g t g c g a g g a c a a a t c c c t
c g t g a g g t c a a a a a c a g c a a a t a a t a a a c c c a t c t c c t g a
a g a c a c c a a a a a a a a g g a g c a g c t c c t c g t g t c a a t g a a c
a a g c g t c a c a a g a a a a g g g a g c a c g t a a a t a a c c t c t t c a
a t t g c t t c a g c a t g a a a a g a a c g g g a a g a a a t g c a a g t c t
a c a g a g g a a a g t g c a g c t g t t t c g g c t g c c a t g g c a a g t t
c c t a c a t g g g c g a g g a a a a g c t g a a c t g g a t t c c a g t c t t
c g c g c t g t c a t g c t c a g c t t g c t t t a g g a t g c g g c a a t a g
t t c a c c t g g a t g a a a a a g a t a c a a a g t t a g t c t t g a a g c a g
t c g a g t g g a c a t c c a a a g t a t c a a a a t c g a a a g c t t g t a a
a t g g g g a a g g a a a t a t a c c t c t a c c c g g a a a a g t t t g g t a
g g c a a a a t a a t c c c a a c g c c a g c a g a g c t c

【0592】

配列番号430

agttgggaaggcaaaacgaatatagtgcatctcggaattac
tgtttagtgcaggtcatatttaaggaaattcatgtgtaaatgt
tctaaccctaaccctaagtatttaggcagctatggctgatatg
gatctgataggacttgatttatccatgataagttttaagag
caactcaaagagggttaggtatataatgggttttgtaaaaggta
aattttagttaatattagaaaaaaaagggtgatccaatagg
ctctataaaacaactcttcaaattttagtggctttctatcca
tccaccctttgctctctatttttgggatagcctgatttactc
tctattcagtcctaggtttaatgagtcgttggaattagc
ctacactttttctgtaaaaatctatttttagatagtagctaa
atcagtaaaatttggttagtatttttagctattctcttgga
gttttgctataagaccagaaacatgtaaaattggaagtttgtg
gacccgggacgagaatgcatagacaaatccagagttattgatg
atggaaattcacctatttttaaccgactcttccattgtgtcc
atttctcatcatccccgggcgctttctgcattccgggtacag
ctgacatgacacgtttcacgcgttacatggctgatggctca
caagtcacccccacatgtctagtggttcgcccaggcagatc
gtcctcggcctgcgcgtgcgcgtgctcttgccgcccgttgct
tggggccctgctggcgcccgctgcccgatcacacggcctacg
cgggtgcaggcagcgcacccgaacccgcagtccttggtgtgc
cgatagggtggcagtggcagtggcacactggcacggcacgcga
tcgatcgcctccgctcatctgctgacagtggaatagagcagc
gttggccgttggggcccggaatctccgtgaagcgggtcgtccc
tgctgtactgtgcccgttatggcggtgtcgctttcgccatgt
tttcttttctttttttttttttcttttttgctaggggcg
gtttctcgttcgctgggtaaacagggaacaccttcgggttgatc
cgtttgaattttactgaaagagatgggaatgggtcgctgtgcc
cggggacattgaatgagatgttgtgtgaagtgaatatggcctt
tagcccttttgcgagtggggaatggatgctaaacgaacacaa
accgggttttaaacagaggccgacacggcacacacggcga
cattcacccgcccggcttccctccgtcggccacctcggcacaaagg
ctcatcagtcgcccgatgcccgatgcgatcaacgggaagcgg
atggcccgccttcttttagaatttggcacagggaacacctggcca
ctgccccttgatgtgcaatttatgcccgtcgaaagccctaggga
acacacgcggaataaacgagcgaatgacacgggaagcctgat
gtgggtatgaattatacaaacatttatggggccaaaatatatt
ctatccaccattgtgtagccacagcatcgggtattttgagtt
gtgcgaggacaaatccctcgtgagggtcaaaaaacagcaaat
aataaaaccatctcctgaagacaccaaataaaaggagcag
ctcctcgtgtcaatgaacaaagcgtcacaaagaaaaagggaagc
acgtataataacctcttcaatttgcttcagcatgaaaaagaac
gggaagaaaatgcaagtcctacagaggaaaagtgcagctgttt
cggctgccattggcaagttctctacatggggcgaaggaaaagct
gaactggattccagtccttcgcgcgtgtcatgctcagcttgcc
tttaggatgcggcaaatagtttcacccgtggatgaaaaagatac
aagtttagtcctgaagcagtcgagtggaacatccaaagtatc
aaaaatcgaaaagcttgtaaatgggggaaggaaaatatacctct
acccggaaaagtttggtagggcaaaaataatcccaacgccag

10

20

30

40

50

c a g a g c t c c g g a a c g t t t g c c g a a a t t c a g a a g c c g a a a a
g t t c t t g t a c t c a c c c t c c g a c a g t t t c g c a a g g t t t c c a
g c a g t a a g g a a t g c g t g g c c a t g g a t t c c a g c g t c t c t g a
a t a t c t t g a g g g g c a g a t c a a a a g a a a g g t c a g c g a a g g c
a g a c a c g g c c a g a t c a c c t c c c a a g t a a t c c c t t c c a g g g
t c a g c c g a g c c a c t c t c c g a g t t a t t a a g g a c a t g c c t c c
g c g c c t c t g t t g g g c c a a c t c c c c t t a a t c t g a a a c c c a g
c a g a g a t g a c g g t c c g c c c a a g c t g c a c a c t g g a g a a g a a
t t a c c t c c a a g a t a a a a c c t c t c t g g c a c t g a t g a a g t c g
a a t t c a t g a a t c c c c c t g c a a g c g g t a a a a t g a c a c c c g c
t c c t a c a c c a a c g t t g a g a g c a g c a c t a t a a a a t c c c a a a
g g c a c a g c a c c a c g t a c a t c g a a c t c c t g a g a g c a a a c c c
a a c g g c a a t a t t t t c t a a c g g a c a c c a a c c a g c g a a c c a g
c a g c g t c g c g t c g g g c c a a g c g a a a g c a g a c g g c a c g g c a t
c t c t g t c g c t g c c t c t g g a c c c c t c t c g a g a g t t c c g c t c
c a c c g t t g g a c t t g c t c c g c t g t c g g c a t c c a g a a a t t g c
g t g g c g g a g c g g c a g a c g t g a g c c g g c a c g g c a g g c g g c c
t c c t c c t c c t c t c a c g g c a c c g g c a g c t a c g g g g g a t t c c
t t t c c c a c c g c t c c t t c g c t g t c c c t t c c t c g c c c

10

【0593】

20

配列番号431

a g t t g g g a a g g c a a a a c g a a t a t a a g t g c a t t c g g a t t a c
t g t t t a g t c g a g t c a t a t t t a a g g a a t t c a t t g t a a a t g t
t c t a a c c t a a c c t a a g t a t t a g g c a g c t a t g g c t g a t a t g
g a t c t g a t t g g a c t t g a t t t a t c c a t g a t a a g t t t a a g a g
c a a c t c a a a g a g g t t a g g t a t a t a t g g t t t t g t a a a g g t a
a a t t t a g t t a a t a t t a g a a a a a a a a g t g t a t c c a a t a g g
c t c t a t a a a c a a c t c t t c a a a t t t a g t g g c t t t c t a t c c a
t c c a c c t t t g c t c t c t a t t t t t g g a t a g c c t g a t t t a c t c
t c t a t t c a g t c c g t a g g t t t a a t g a g t c t g t t g g a t t a g c
c t a c a c t t t t t c t g t a a a a t c t a t t t t a g a t a g t a g c t a a
a t c a g t a a a t t t g g c t a g t a t t t t t a g c t a t t c t c t t g g a
g t t t g c t a t a a g a c c a g a a c a t g t a a a t t g g a a g t t t g t g
g a c c c g g a c g a g a a t g c a t g a c a a a t c c a g a g t a t t g a t g
a t g g a a t t c a c c t a t t t t a c c c g a c t c t t c c a t t g t g t c c
a t t t c t c a t c a t c c c c g g g c g c t t t c t g c a t c c g g t a c a g
c t g a c a t g a c a c g t t c a c g c g t t a c a t g g c t g a t g g c t c a
c a a g t c a c c c c c a c a t g t c t a g t g t t c g c c c a g g c a g a t c
g t c c t c g g c c t g c g c t g c c g t g c t c t t g c c g c c g c t t g c t
t g g g c c c t g c t g g c g c c c g c t g c c g a t c a c a c g g c c t a c g
c g g t g c a g g c a g c g c c a c c g a a c c c g c a g t c t t g t t g t g c
c g a t a g g t g g c a g t g g c a g t g g c a c t g g c a c g g c a c g c g a
t c g a t c g c t c c g c t c a t c t g c t g a c a g t g g a t a g a g c a g c
g t t g g c c g t t g g g g c c g g a t c t c c g t g a a g c g g t c g t c c c
t g c t g t a c t g t g c c g c t a t g g c g t g t c g c t t t c g c c a t g t
t t t c t t t t c t t t t t t t t t t c t t t t t g c t a g g g c g
g t t t c t c g t t c g c t g g t a a c a g g g a c c a c t t c g g t t g a t c
c g t t g a a t t t a c t g a a a g a g a t g g g a a t g g t c g c t g t g c c
c g g g a c a t t g a a t g a g a t g t t g t g t a a g t g a a t a t g g c t t
t a g c c t t t t g c g a g t g g g g c g g c a a t g c a c g g c a t g a a c t

30

40

50

a t a a t t t c c g g t c a a a c t t t t g t g t g g a a a t g g a t g c t a a
a c g a a c a c a a a c c g g g t t t a a a c c a g a g g c c g a c a c g g c a
c a c a c g g c g a c a t t c a c c g c c g g c t t c c t c c g t c g c c a c t
c g g c a c a a g g c t c a t c a g t c g c c g a t g c c c g a t g c g a t c a
a c g g a a g c g g a t g g c c c g c t t c t t t a g a a t t g g c a c a g g a
a c a c t g g c c a c t g c c c t t g a t g t g c a a t t a t g c c t g c g a a
a g c c t a g g c a a c a c a c g c g a a t a a a c g a g c g a a t g a c a c g
g a a a g c t g a t g t g g t a t g a a t t a t a c a a c a t t a t g g g c c a
a a a t a t t a t t c t a t c c a c c a t t g t g t a g c c a c a g c a t c g g
t a t t t g a g t t g t g c g a g g a c a a a t c c c t c g t g a g g t c a a a
a a c a g c a a a t a a t a a a c c c a t c t c c t g a a g a c a c c a a a a a
a a a g g a g c a g c t c c t c g t g t c a a t g a a c a a g c g t c a c a a g
a a a a g g g a g c a c g t a a a t a a c c t c t t c a a t t g c t t c a g c a
t g a a a a g a a c g g g a a g a a a t g c a a g t c t a c a g a g g a a a g t
g c a g c t g t t t c g g c t g c c a t g g c a a g t t c c t a c a t g g g c g
a g g a a a a g c t g a a c t g g a t t c c a g t c t t c g c g c t g t c a t g
c t c a g c t t g c t t t a g g a t g c g g c a a t a g t t c a c c t g g a t g
a a a a a g a t a c a a g t t a g t c t t g a a g c a g t c g a g t g g a c a t
c c a a a g t a t c a a a a t c g a a a g c t t g t a a a t g g g g a a g g a a
a t a t a c c t c t a c c c g g a a a a g t t t g g t a g g c a a a a t a a t c
c c a a c g c c a g c a g a g c t c c g g a a c g t t t g c c g a a a t t c a g
a a g c c g a a a a g t t c t t g t a c t c a c c c t c c g a c a g t t t c g c
a a g g t t t c c a g c a g t a a g g a a t g c g t g g c c a t g g a t t c c a
g c g t c t c t g a a t a t c t t g a g g g g c a g a t c a a a a g a a a g g t
c a g c g a a g g c a g a c a c g g c c a g a t c a c c t c c c a a g t a a t c
c c t t c c a g g g t c a g c c g a g c c a c t c t c c g a g t t a t t a a g g
a c a t g c c t c c g c g c c t c t g t t g g g c c a a c t c c c c t t a a t c
t g a a a c c c a g c a g a g a t g a c g g t c c g c c c a a g c t g c a c a c
t g g a g a a g a a t t a c c t c c a a g a t a a a a c c t c t c t g g c a c t
g a t g a a g t c g a a t t c a t g a a t c c c c c t g c a a g c g g t a a a a
t g a c a c c c g c t c c t a c a c c a a c g t t g a g a g c a g c a c t a t a
a a a t c c c a a a g g c a c a g c a c c a c g t a c a t c g a a c t c c t g a
g a g c a a a c c c a a c g g c a a t a t t t t t g t a a t a g t g a t g g t c
a g a a c t g a g a a g a t c a g a t a a a a t t a t a c a c t g a t g c a a t
t a t t t c a t a g t t t c g c c c a t g a a c t g t a a g g g c t a g a c a a
a g c a a a a a g t a a g a c a t g a a g g g c a a g a g a a t a a c c t g c c
g g a a a t a t c t c a a t c c t t t g c t a t t c c a t a g a c c a c c a a c
t t g a g a a g t t g a c t g a a a c g c a t a t c c t t t c g t t g g c c t a
a g a t g t g a a t c c c t c t t a t c a a t c t t g t a t g t g t a c t t c a
a t g c a g a a a g a a g g t t a t g c c c t a a c t g c c t c c t t a t g g c
c t t t g a t g a g a c a c g t g a t g g a t c a g t t a a g g t a c g c c a c
g c a a g g t t g t a t g a c a a g t c a t g g t t c c t t g t t g a c a g c a
a a c c a a a t g a a a g g c c a a g t a g g c g c t c c t t g t a t g a t g a
a a a c t t c a g c c a a t c t t g t g a t g a c a a a g a t g c c c g a g c c
a t c a a t g g t g t t g g t a t t g a t t t a a a c c t c g g t a g g c a g a
c t c c a a c a c c a a c c t c t g t t g t t t g g t c c c a a c c a a a g g a
t c c t g a t g c a t c c c a g a t g t c a c c a t a g c c a a a c a a g t t c
t t c a a c t t a a g t g a c c c t t c c a g c g a c c a a g a t c t t g c c t
a c a a g a g t g g c a a g c a c a g t c a

【0594】

10

20

30

40

50

配列番号 4 6 4

g t g c a t t c g g a t t a c t g t t t a g t c g a g t c a t a t t t a a g g a
a t t c a t t g t a a a t g t t c t a a c c t a a c c t a a g t a t t a g g c a
g c t a t g g c t g a t a t g g a t c t g a t t g g a c t t g a t t t a t c c a
t g a t a a g t t t a a g a g c a a c t c a a a g a g g t t a g g t a t a t a t
g g t t t t g t a a a g g t a a a t t t a g t t a a t a t t a g a a a a a a a
a g t g t a t c c a a t a g g c t c t a t a a a c a

【0595】

本明細書において言及された全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0596】

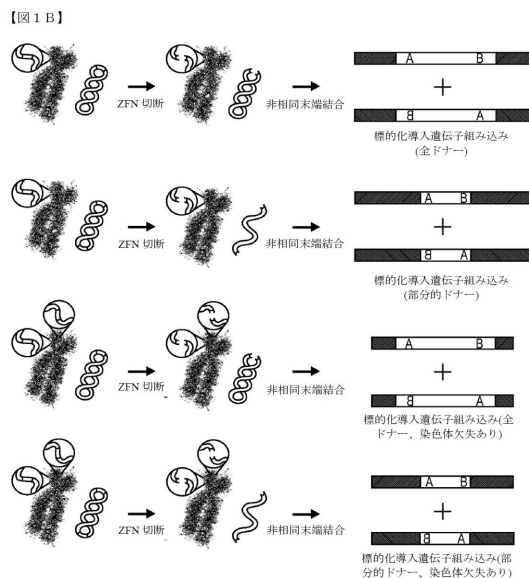
理解の明確さを目的として、例示説明および実施例を用いてある程度詳細に開示を提供してきたが、当業者には、本開示の趣旨または範囲から逸脱することなく、種々の変更および修正が実施され得ることは明白であろう。したがって、前述の説明および実施例は、限定的であると解釈されるべきではない。

10

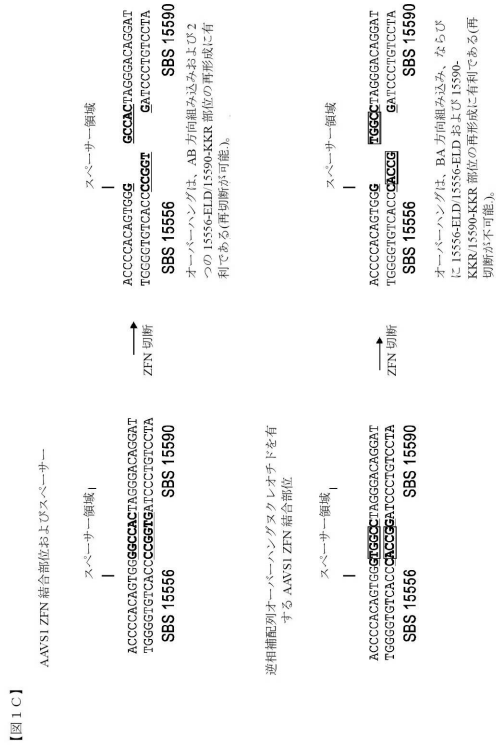
【図 1 A】



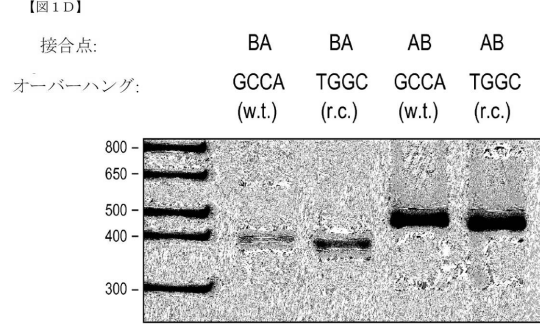
【図 1 B】



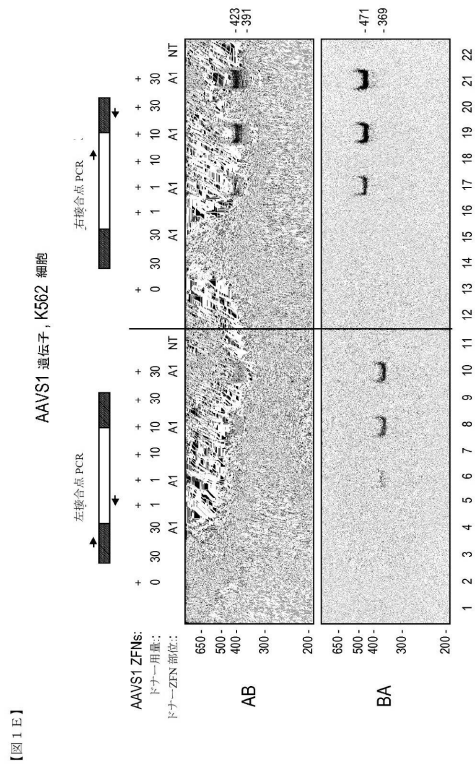
【図 1 C】



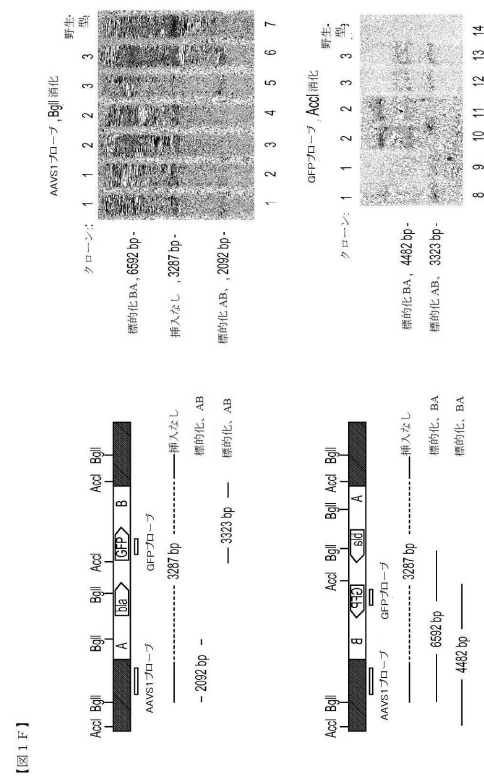
【図 1 D】



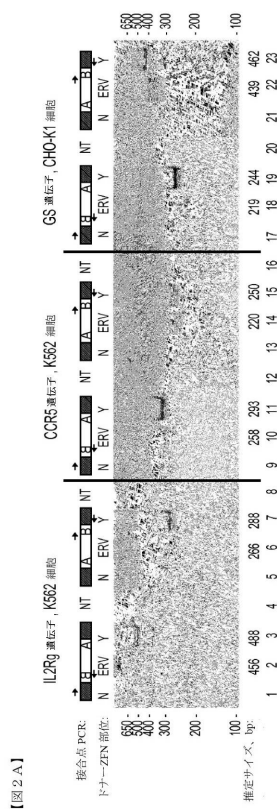
【図 1 E】



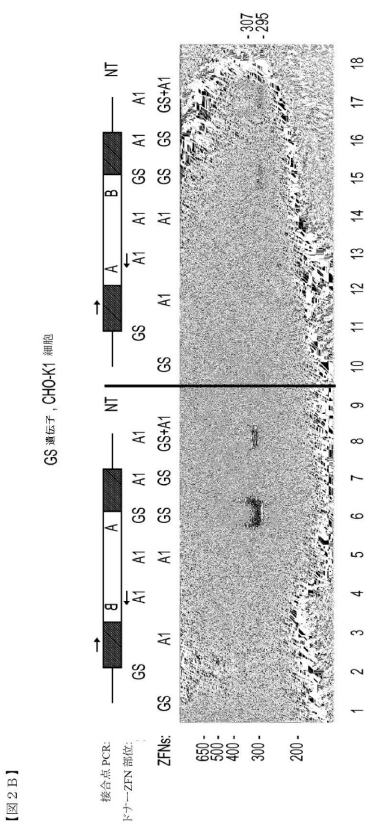
【図 1 F】



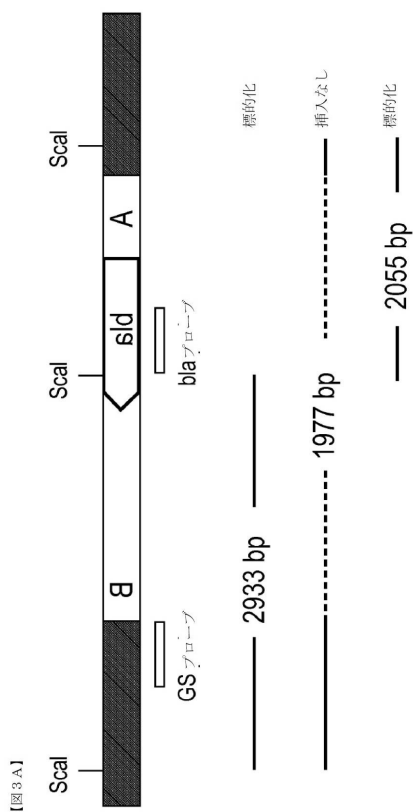
【図 2 A】



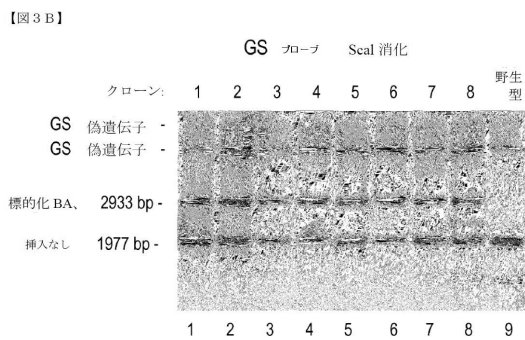
【図 2 B】



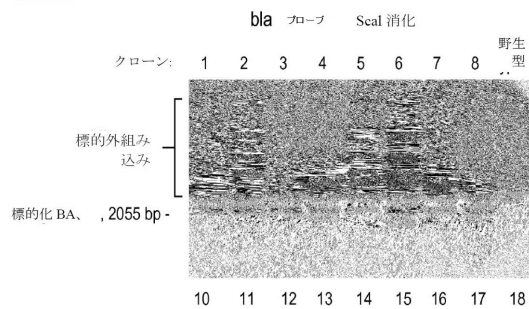
【図 3-1】



【図 3-2】



【図 3 C】



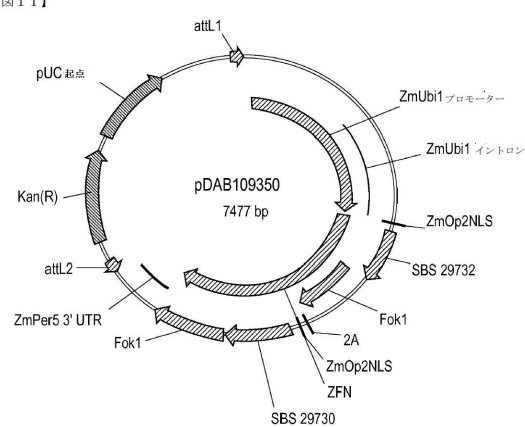
【図 10 A】

【図 10 A】
FUT8 単一細胞由来クローン、AB 方向、ZEN により切断
左(5')接合点
推定
配列番号
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106

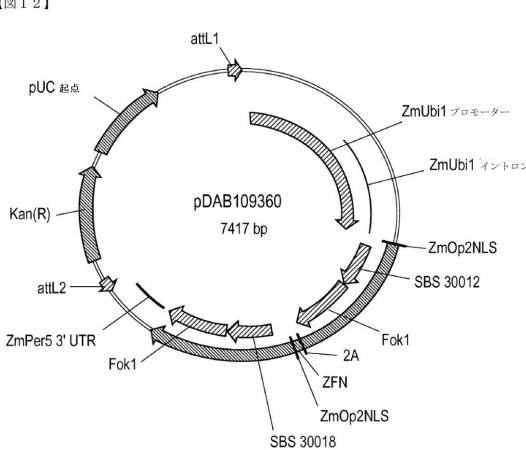
【図 10 B】

【図 10 B】
FUT8 単一細胞由来クローン、AB 方向、TALEN により切断
左(5')接合点
推定
配列番号
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106

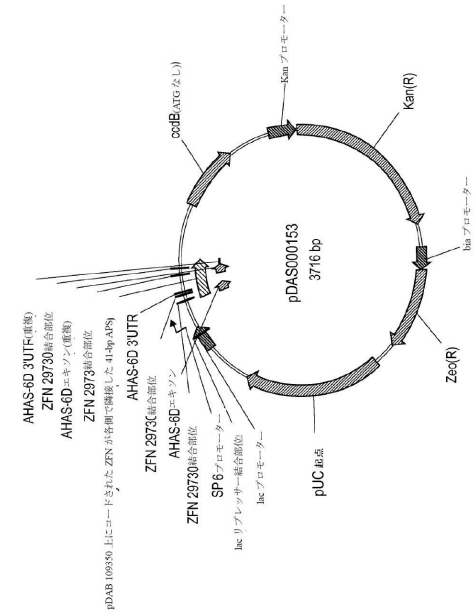
【図 11】



【図 12】

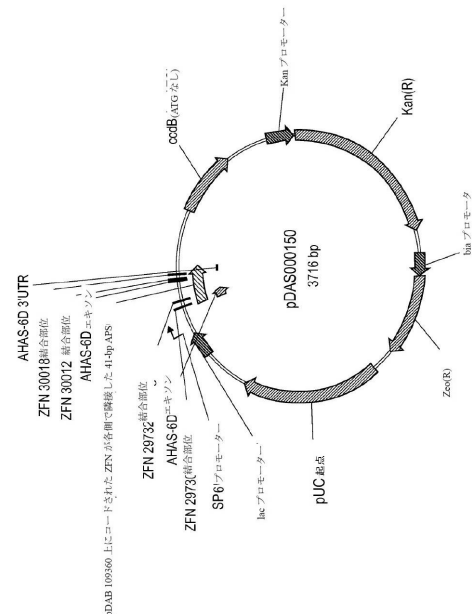


【図 1 3】



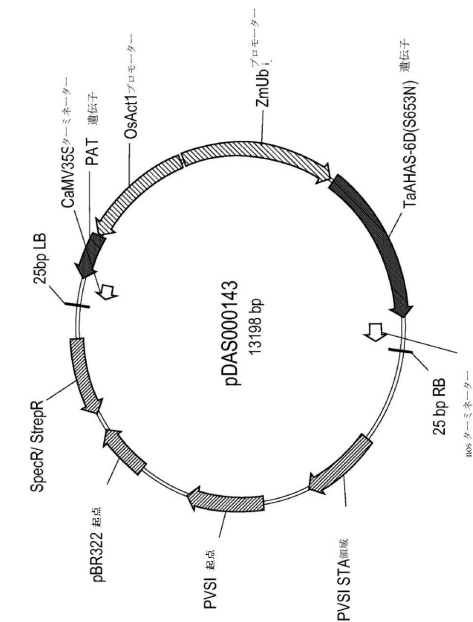
【図 1 3】

【図 1 4】



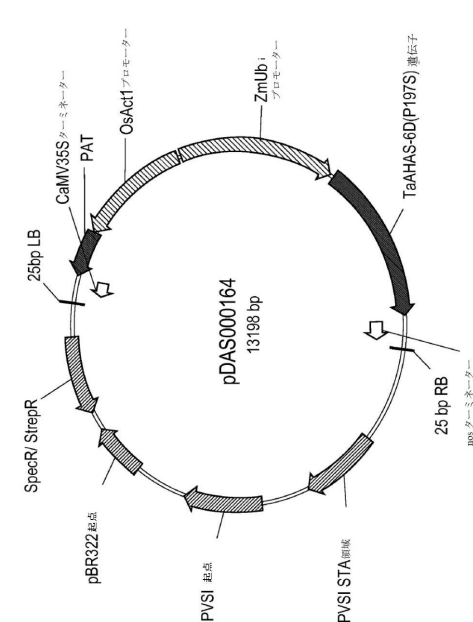
【図 1 4】

【図 1 5】



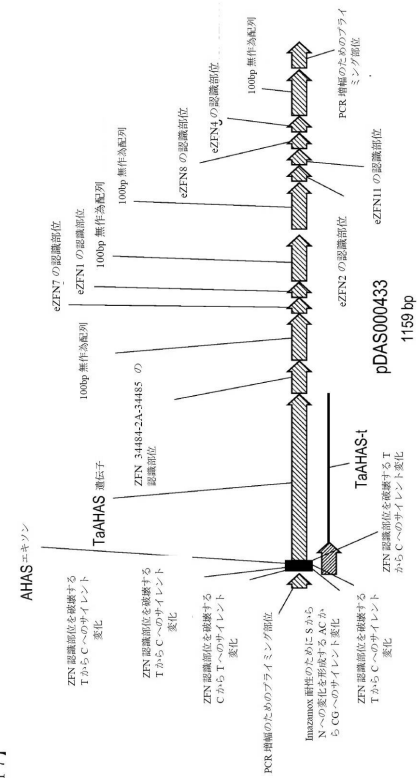
【図 1 5】

【図 1 6】

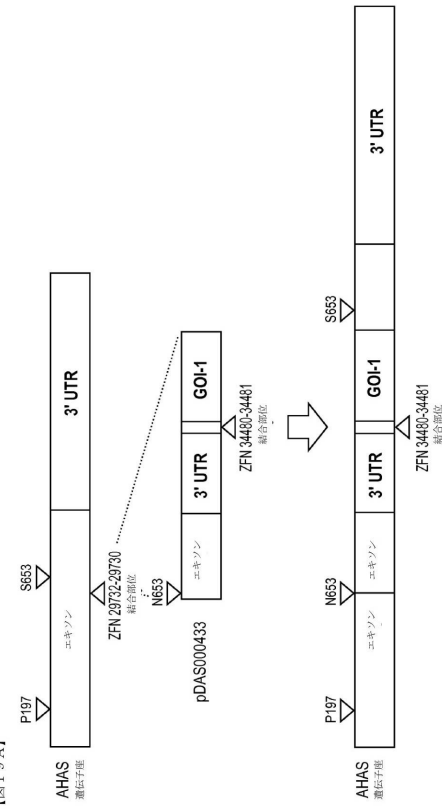


【図 1 6】

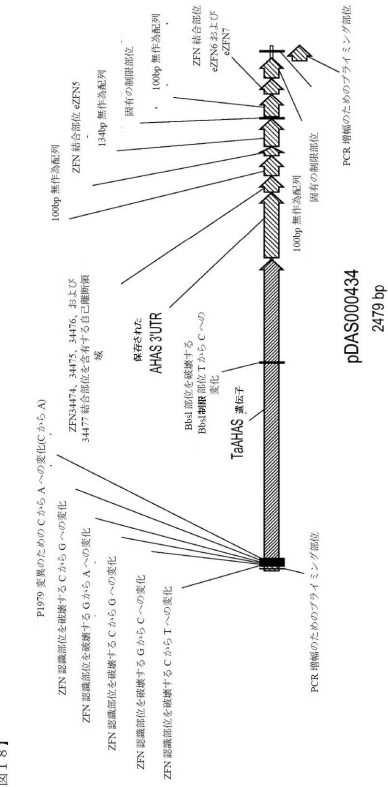
【図 17】



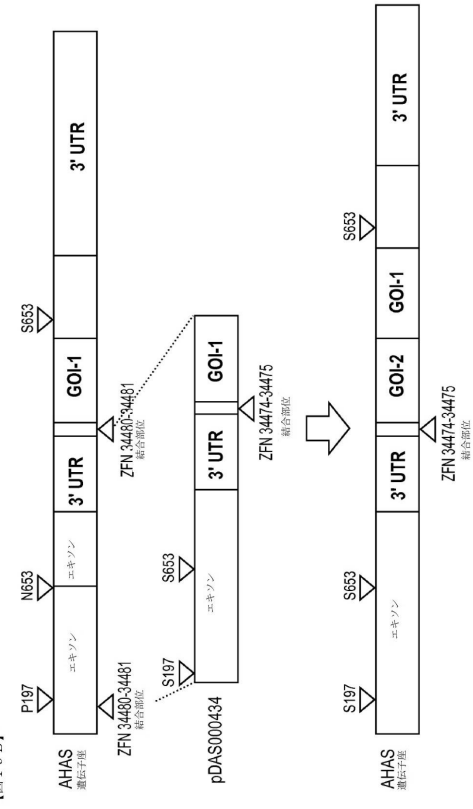
【図 19 A】



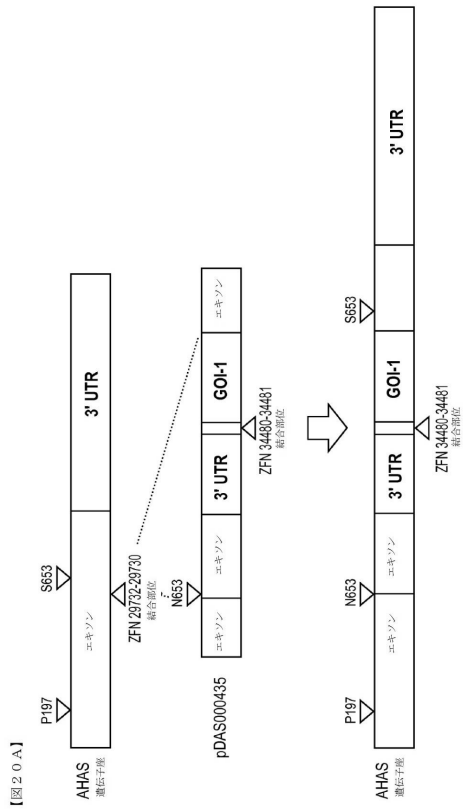
【図 18】



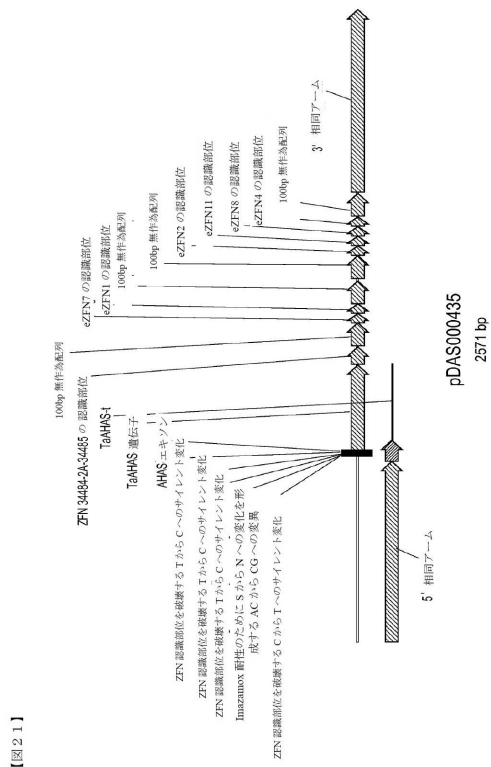
【図 19 B】



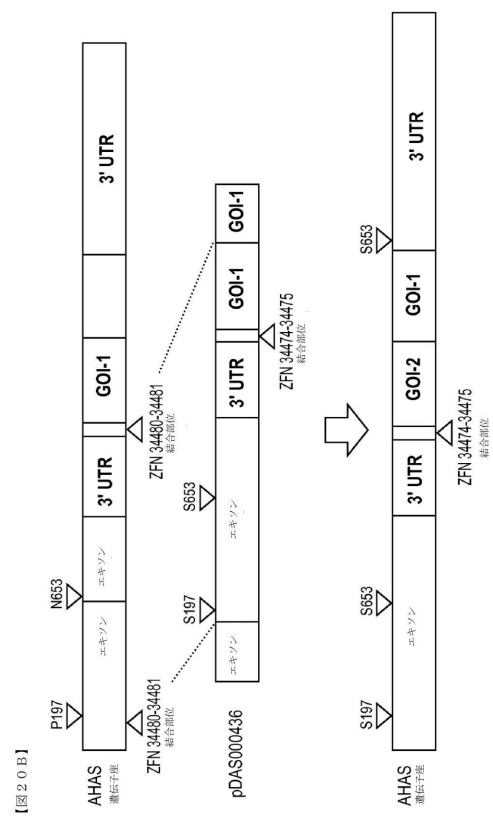
【図 20 A】



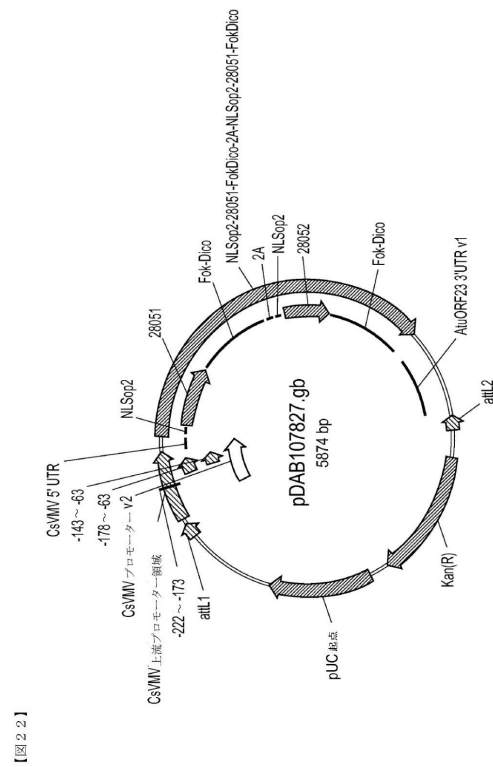
【図 21】



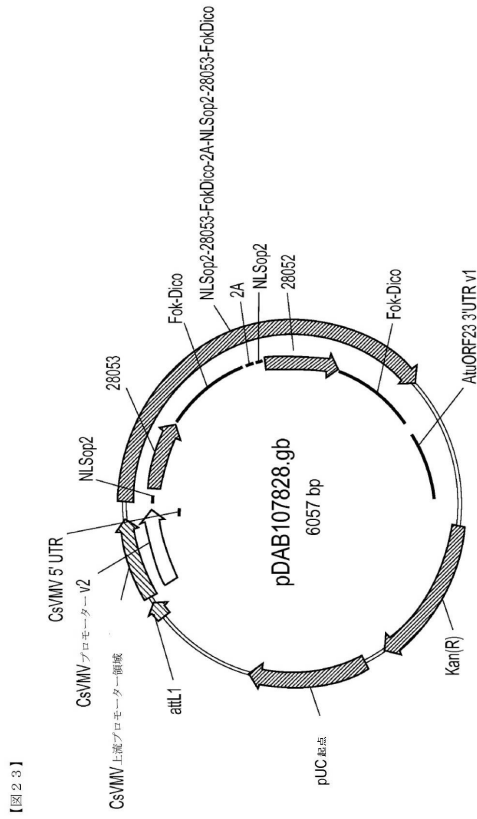
【図 20 B】



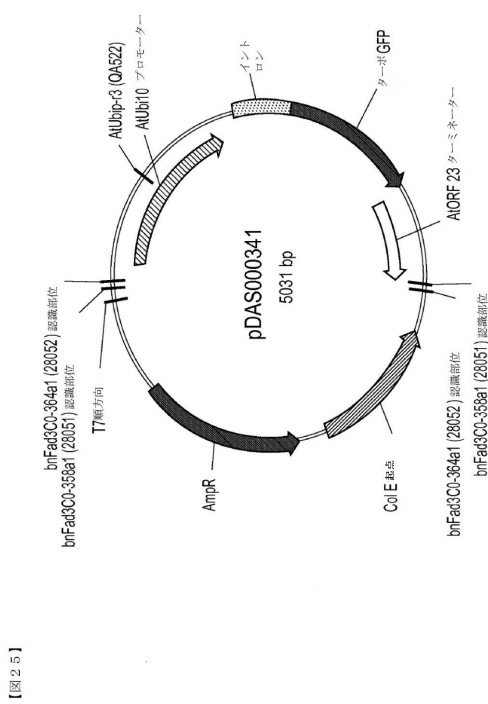
【図 22】



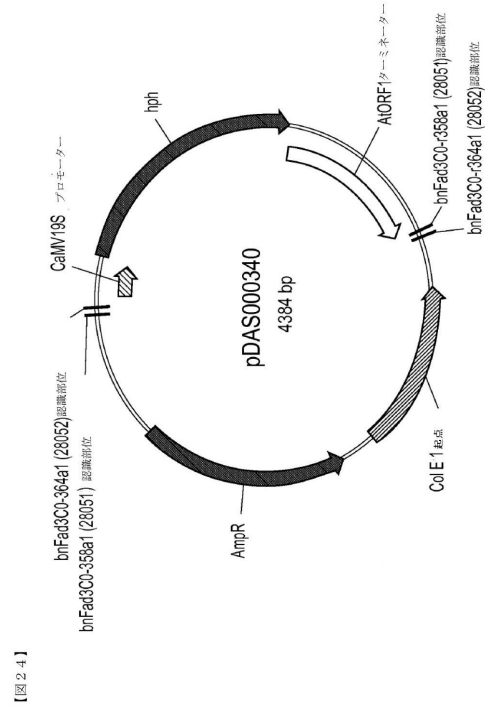
【図 2 3】



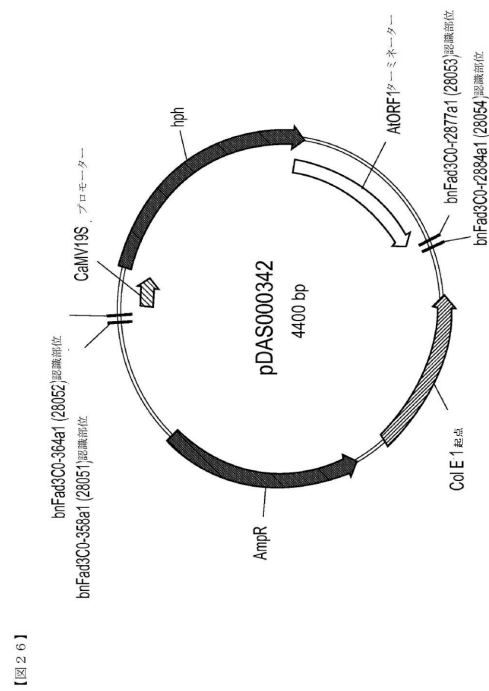
【図 2 5】



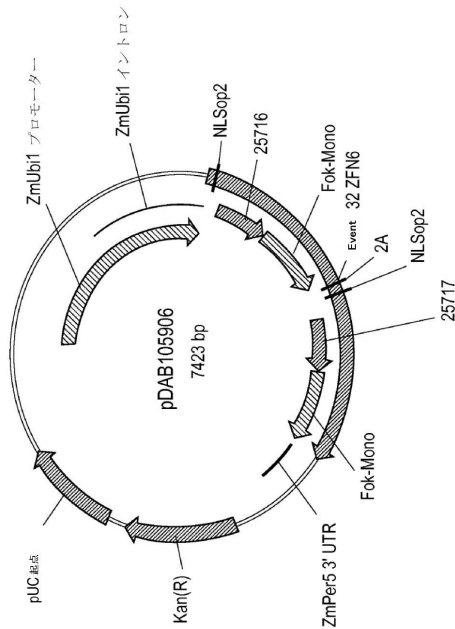
【図 2 4】



【図 2 6】

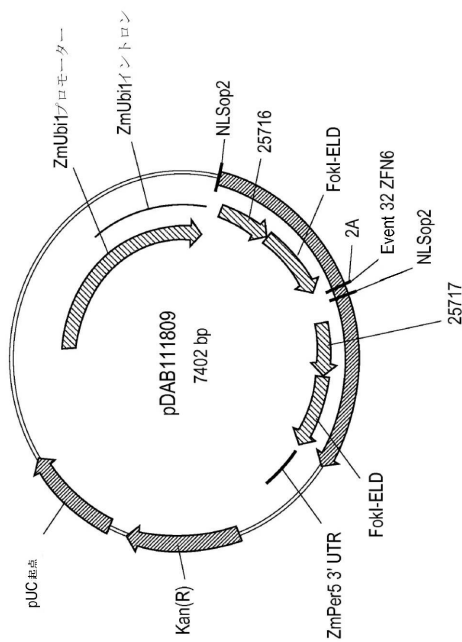


【図 3 3】



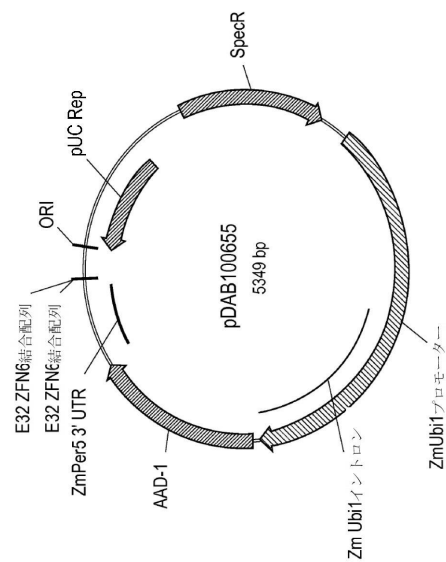
【図 3 3】

【図 3 4】



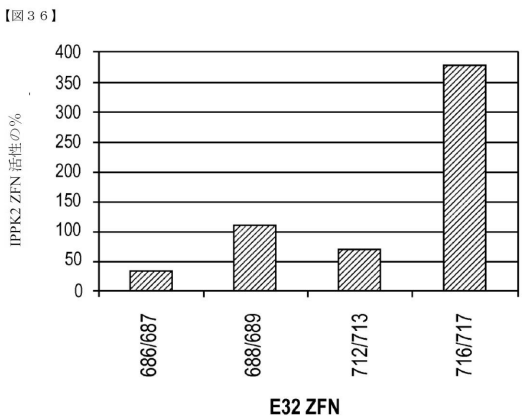
【図 3 4】

【図 3 5】

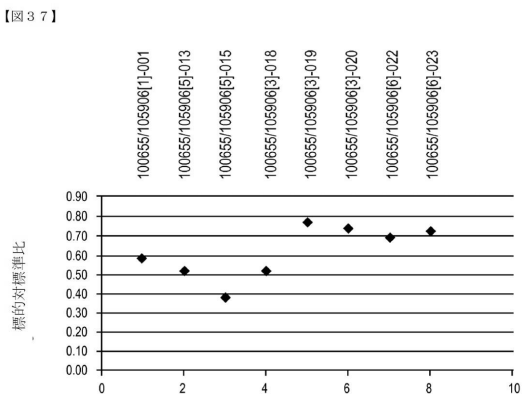


【図 3 5】

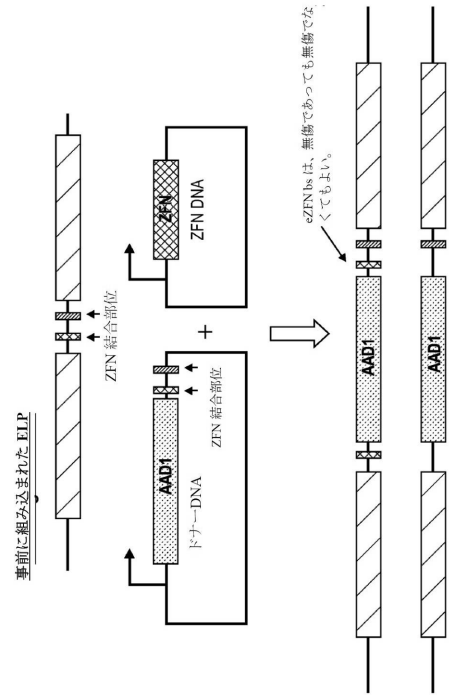
【図 3 6】



【図 3 7】

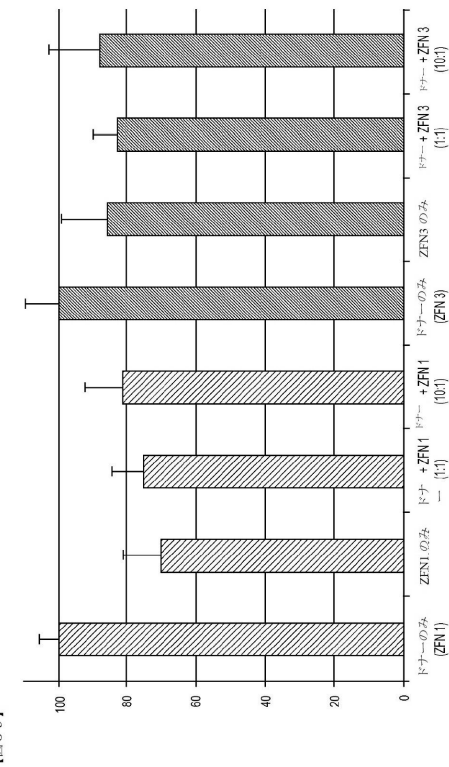


【図 38】



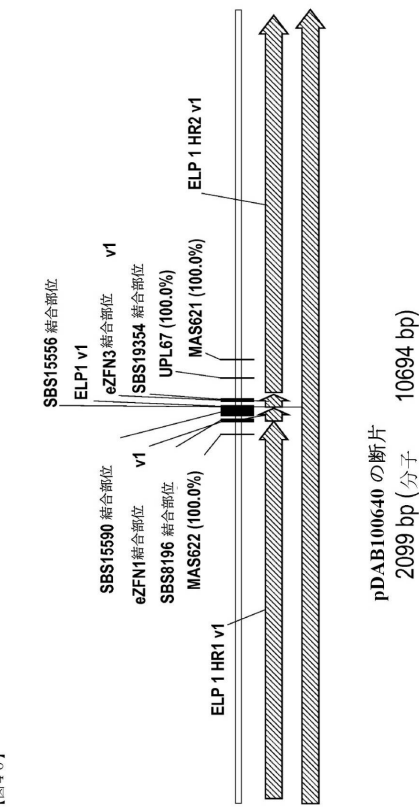
【図 38】

【図 39】



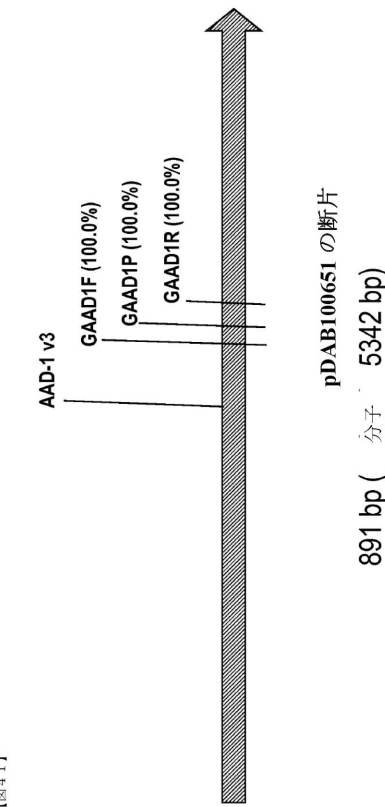
【図 39】

【図 40】



【図 40】

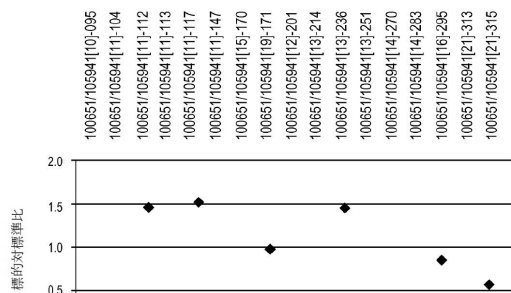
【図 41】



【図 41】

【図 4 2】

【図 4 2】



【図 4 3】

【図 4 3】

A	配列番号: 480	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	A9-1 配列番号: 481	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	A9-2 配列番号: 482	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	A9-5 配列番号: 483	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	A9-6 配列番号: 484	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-1 配列番号: 485	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-2 配列番号: 486	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-5 配列番号: 487	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-6 配列番号: 488	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-1 配列番号: 489	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
B	配列番号: 490	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-2 配列番号: 491	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-6 配列番号: 492	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G9-1 配列番号: 493	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	H9-2 配列番号: 494	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	H9-5 配列番号: 495	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	H9-6 配列番号: 496	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	配列番号: 497	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	A3 配列番号: 498	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	F1 配列番号: 499	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
C	配列番号: 500	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G1 配列番号: 501	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G2 配列番号: 502	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	G4 配列番号: 503	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	H1 配列番号: 504	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC
	H4 配列番号: 505	CGCGCGCGCTTTGCAAGTTT	TAGGGACAGGATTGCCACC

フロントページの続き

- (74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 コスト, グレゴリー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル プールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スイート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ウルノフ, フィオードル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル プールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スイート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 アインリー, ウィリアム エム.
アメリカ合衆国 インディアナ 46268-1054, インディアナポリス, ザイオンズビル ロード 9330, ダウ アグロサイエンス エルエルシー 気付
- (72)発明者 ペトリーノ, ジョセフ エフ.
アメリカ合衆国 インディアナ 46268-1054, インディアナポリス, ザイオンズビル ロード 9330, ダウ アグロサイエンス エルエルシー 気付
- (72)発明者 サミュエル, ジャヤクマール ポン
アメリカ合衆国 インディアナ 46268-1054, インディアナポリス, ザイオンズビル ロード 9330, ダウ アグロサイエンス エルエルシー 気付
- (72)発明者 ウェブ, スティーブン アール.
アメリカ合衆国 インディアナ 46268-1054, インディアナポリス, ザイオンズビル ロード 9330, ダウ アグロサイエンス エルエルシー 気付
- (72)発明者 サストリーデント, ラクシュミ
アメリカ合衆国 インディアナ 46268-1054, インディアナポリス, ザイオンズビル ロード 9330, ダウ アグロサイエンス エルエルシー 気付

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 小暮 道明

審判官 大宅 郁治

- (56)参考文献 国際公開第2010/143917 (WO, A2)
国際公開第2011/072246 (WO, A2)
Nucleic Acids Research, 2010, Vol. 38, No. 15, e152
Nucleic Acids Research, 2007年, Vol. 35, No. 15, p. 5192-5202
Plant Physiology, 2003年, Vol. 133, No. 3, pp. 1011-1023
Plant Physiology, 2003年, Vol. 133, No. 3, pp. 956-965
Plant Biotechnology Journal, 2012年1月3日, Vol. 1

0, pp. 373-389

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/

CAPlus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)