

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-188024

(P2008-188024A)

(43) 公開日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-107351 (P2008-107351)	(71) 出願人	500055647
(22) 出願日	平成20年4月16日 (2008.4.16)		ゼノジェン コーポレイション
(62) 分割の表示	特願2002-585588 (P2002-585588)		Xenogen Corporation
	の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州945
原出願日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		01 アラメダ, アトランティック・アベ
(31) 優先権主張番号	60/283, 534		ニュー, 860
(32) 優先日	平成13年4月12日 (2001.4.12)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 チトクロム発現に関連するマウスおよびヒト転写制御エレメントの単離および同定

(57) 【要約】

【課題】生存動物においてリアルタイムで P 4 5 0 遺伝子の調節を直接的にモニターする。

【解決手段】本発明は、チロクロム発現に関連するマウス遺伝子およびヒト遺伝子（例えば、それぞれ、C y p 3 A 1 1 および C Y P 3 A 4）由来の転写制御エレメントに関する。単離されたポリヌクレオチド、発現カセット、ベクター、組換え細胞、およびトランスジェニック動物は、本明細書中に記載されるような転写制御エレメントを含み得る。本発明はさらに、このようなレポーター構築物でトランスフェクトされた動物を用いるインビボアッセイに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書中に記載の、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、概して、分子生物学および医学の分野に関する。特に、本発明は、マウス Cyp 3 A 1 1 遺伝子およびヒト CYP 3 A 4 遺伝子のゲノム遺伝子座由来の転写制御エレメント、ならびにそれを使用する方法に関する。本発明はさらに、マウス Cyp 3 A 1 1 遺伝子およびヒト CYP 3 A 4 遺伝子の調節領域由来の単離されたポリヌクレオチド、それらの単離されたポリヌクレオチドを含むレポーター構築物、それらのレポーター構築物で形質転換された細胞、それらのレポーター構築物を含むトランスジェニック動物、ならびにマウス Cyp 3 A 1 1 遺伝子由来の転写制御エレメントおよびヒト CYP 3 A 4 遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介される発現を調節する化合物を同定するためのこのような細胞およびトランスジェニック動物の使用方法に関する。本発明はさらに、このようなレポーター構築物でトランスフェクトされた動物を用いるインビボアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

物質の毒物学研究は、伝統的に、単細胞生物（例えば、Ames 試験または米国特許第 4, 997, 757 号に記載される酵母発癌性アッセイ）または毒性試験およびヒトへの危険についての予測のためのインビトロ系に依存していた。しかし、このようなデータからヒトへの危険を推定することを困難にする多くの要因が存在する。これらの要因としては、物質の細胞親和性、単一細胞と動物全体との間の取り込みおよび分布の差、物質の代謝、ならびに物質の効果が細胞プロセスを介して媒介されるカスケード効果が挙げられる。これらの同一の要因が、動物系における分析物の効果を決定および／または推定することを試みる場合に、薬学的研究および開発の進行にも影響し得る。

【0003】

さらに、伝統的な動物ベースの毒物学研究の目的は、代表的に、LD50（試験動物の 50% が死亡する用量）の決定である。死亡した動物は、さらなる研究（例えば、組織病理学）に供され得るが、そのような分析は、一般的に、労働集約的であり、そして比較的感受性が低い。MacGregor ら（非特許文献 1）は、以下を含む慣用的な毒性試験の分子的目的および方法を概説している：個々の細胞における損傷誘導遺伝子；毒性の細菌モデル；ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応を用いたストレス遺伝子発現のスクリーニング；染色体異常の検出のためのハイブリダイゼーションプローブ；単一細胞電気泳動アッセイ；および動物の屠殺およびその後の組織／細胞損傷の研究を含むインビボ動物研究。

【0004】

P450 酵素は、ステロイドおよびコレステロールの生合成および薬物または生体異物の代謝に関与することが示されている。P450 酵素の誘導は、ステロイドおよびコレステロールのレベルにおける変動または薬物もしくは生体異物への反復的な曝露の結果である。P450 酵素レベルの変化は、代謝される薬物の血漿および／または組織レベルの変化を引き起こし、次いで、それらの薬物の安定性、効果、および毒性に影響する。P450 スーパーファミリーの中で、Cyp 3 A ファミリーは、代表的に、ヒト肝臓ミクロソームに存在する全 P450 の 14～31% および薬物代謝活性の 50～60% を占める（非特許文献 2）。異なる Cyp 3 A 形態をコードするクローンが、ヒト、ラット、モルモット、およびマウスから単離されている。これらとしては、マウスにおける Cyp 3 A 1 1 およびヒトにおける CYP 3 A 4 が挙げられる。従って、P450 酵素の発現、特に Cyp

p 3 Aファミリーの遺伝子の発現は、薬剤の生物利用性および薬物間相互作用の重要な薬理学的パラメータである。

【0005】

現在、P 4 5 0 遺伝子調節のためのアッセイ（例えば、ノザンプロット、ウェスタンブロット、R T - P C R、またはエキソビポレポーターアッセイ）は、労力を要し、そして時間がかかる。さらに、細胞系列におけるP 4 5 0 遺伝子の発現は、困難であることがわかっている。従って、生存動物においてリアルタイムでP 4 5 0 遺伝子の調節を直接的にモニターする必要性が存在する。

【非特許文献1】Fundamental and Applied Toxicology, 26:156-173, 1995

【非特許文献2】Toideら(1997) Arch, Biochem, and Biophysics 338:43-49

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

レポーター配列の発現を調節する分析物を同定するための方法であって、そのレポーター配

列の発現は、生存トランスジェニックげっ歯類において、ヒトCYP3A4遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介され、その方法は、以下：

その分析物を生存トランスジェニックげっ歯類に投与する工程であって、そのトランスジェ

ニックげっ歯類は、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含む発現カセットを含み、そのポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド1～13, 032に対して

少なくとも95%以上の同一性を有し、ここで、(i) そのポリヌクレオチドは、目的のコード配列に作動可能に連結されており、(ii) そのポリヌクレオチドは、少なくとも1

つの転写制御エレメントを含み、そして(iii) その目的のコード配列の発現は、その生存ト

ランスジェニックげっ歯類の肝臓において、デキサメタゾンまたはリファンピシンにより誘導される、工程；および

その目的のコード配列の発現をモニタリングする工程、を包含し、ここで、その目的のコード配列の発現レベルに対する効果は、その分析物が、ヒト

CYP3A4遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介される発現に影響を及ぼすことを示す、方法。

(項目2)

(iv) 上記生存トランスジェニックげっ歯類の肝臓領域における上記コード配列の基礎発現が、その生存トランスジェニックげっ歯類の身体他の領域におけるそのコード配列の基

礎発現よりも大きいかまたは等しい、項目1に記載の方法。

(項目3)

上記トランスジェニックげっ歯類が、機能的hPXP（ヒトリファンピシンコレセプター）をコードする配列を含まない、項目1～2のいずれか1項に記載の方法。

(項目4)

上記目的のコード配列の発現が、上記生存トランスジェニックげっ歯類において、少なくとも1つの化合物によって誘導され、その化合物は、フェノバルビトール、ニフェジピン

10

20

30

40

50

5- プレグネン-3 b- オール-20- オン-16 a- カルボニトリル、およびクロトリ
マゾールからなる群より選択され、ここで、発現の誘導は、その生存トランスジェニック
げ

っ菌類の肝臓領域において観察される、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

上記目的のコード配列の発現が、上記生存トランスジェニックげっ菌類において、50 m
g / k g 体重で投与されたデキサメタゾンによって誘導される、項目1～4のいずれか
1項に記載の方法。

(項目6)

上記目的のコード配列の発現が、上記生存トランスジェニックげっ菌類において、50 m
g / k g 体重で投与されたリファンピシンによって誘導される、項目1～4のいずれか
1項に記載の方法。

(項目7)

上記目的のコード配列の発現の誘導が、デキサメタゾンによる基礎レベルの10倍の誘導
より大きいかまたはそれに等しい、項目5に記載の方法。

(項目8)

上記目的のコード配列の発現の誘導が、リファンピシンによる基礎レベルの2倍の誘導よ
り大きいかまたはそれに等しい、項目6に記載の方法。

(項目9)

上記目的のコード配列の発現が、レポーター配列である、項目1～8のいずれか1項に
記載の方法。

(項目10)

上記レポーター配列が、光発生タンパク質をコードする、項目9に記載の方法。

(項目11)

上記光発生タンパク質が、生物発光タンパク質または蛍光タンパク質である、項目10
に記載の方法。

(項目12)

上記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、項目11に記載の方法。

(項目13)

上記発現カセットが、配列番号17を含む、項目12に記載の方法。

(項目14)

上記蛍光タンパク質が、青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク
質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質からなる群より選択される、項目
11に記載の方法。

(項目15)

上記げっ菌類が、マウスまたはラットである、項目1～14のいずれか1項に記載の方
法。

(項目16)

トランスジェニックげっ菌類であって、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチド
を含む発現カセットを含み、そのポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド1～
1

3, 032に対して少なくとも95%以上の同一性を有し、ここで、(i)そのポリヌク
レ

オチドは、目的のコード配列に作動可能に連結されており、(ii)そのポリヌクレオチ
ド

は、少なくとも1つの転写制御エレメントを含み、そして(iii)その目的のコード配
列

の発現は、生存トランスジェニックげっ菌類の肝臓において、デキサメタゾンまたはリフ
アンピシンにより誘導される、トランスジェニック動物。

10

20

30

40

50

(項目 17)

発現カセットであって、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、その
ポリヌクレオチドは、配列番号 1 2 のヌクレオチド 1 ～ 1 1 , 0 0 2 に対して少なくとも
9 5 % の同一性を有し、そのポリヌクレオチドは、目的のコード配列に作動可能に連結さ
れ
ており、ここで、そのポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの転写制御エレメントを含む
発現カセット。

(項目 18)

発現カセットであって、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、その
ポリヌクレオチドは、配列番号 1 3 の配列または配列番号 1 3 の少なくとも約 1 0 0 個連
続するヌクレオチドのフラグメントに対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するポリヌク
レオチドを含み、そのポリヌクレオチドまたはそのフラグメントは、目的のコード配列に
作
動可能に連結されており、ここで、そのポリヌクレオチドまたはそのフラグメントは、少
な
くとも 1 つの転写制御エレメントを含む、発現カセット。

(項目 19)

上記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 3 のヌクレオチド 5 1 0 4 ～ 6 2 1 8 に対して 9 5
% 以上の同一性を有する第 1 のポリヌクレオチド、および配列番号 1 3 のヌクレオチド 6
7 9 2 ～ 9 3 3 0 に対して 9 5 % 以上の同一性を有する第 2 のポリヌクレオチドを含む、
項目 1 8 に記載の発現カセット。

(項目 20)

上記目的のコード配列の発現が、レポーター配列である、項目 1 8 ～ 1 9 のいずれか 1
項に記載の発現カセット。

(項目 21)

上記レポーター配列が、光発生タンパク質をコードする、項目 2 0 に記載の発現カセッ
ト。

(項目 22)

上記光発生タンパク質が、生物発光タンパク質または蛍光タンパク質である、項目 2 1
に記載の発現カセット。

(項目 23)

上記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、項目 2 2 に記載の発現カセット。

(項目 24)

上記蛍光タンパク質が、青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク
質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質からなる群より選択される、項目
2 2 に記載の発現カセット。

(項目 25)

ベクターであって、

(a) 項目 1 8 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセット；および

(b) ベクター骨格、

を含む、ベクター。

(項目 26)

上記ベクター骨格がさらに、選択マーカーを含む、項目 2 5 に記載のベクター。

(項目 27)

項目 1 8 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを含む、細胞。

(項目 28)

項目 2 5 に記載のベクターを含む、細胞。

10

20

30

40

50

(項目 2 9)

項目 1 8 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを含む、トランスジェニックげっ歯類
。

(項目 3 0)

上記げっ歯類が、マウスまたはラットである、項目 2 9 に記載のトランスジェニックげ
っ歯類。

(項目 3 1)

項目 1 8 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを肝臓を含む、げっ歯類。

(項目 3 2)

上記げっ歯類が、マウスまたはラットである、項目 3 1 に記載のトランスジェニックげ
っ歯類。

(項目 3 3)

レポーター配列の発現を調節する分析物を同定するための方法であって、そのレポーター
配

列の発現は、生存トランスジェニックげっ歯類において、マウス C Y P 3 A 1 1 遺伝子由
来の転写制御エレメントにより媒介され、その方法は、以下：

その分析物を生存トランスジェニックげっ歯類に投与する工程であって、ここで、その
トラ

ンスジェニックげっ歯類は、項目 2 0 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを含む、
工程；および

そのレポーター配列の発現をモニタリングする工程、

を包含し、ここで、そのレポーター配列の発現レベルに対する効果は、その分析物が、マ
ウス

C Y P 3 A 1 1 遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介される発現に影響を及ぼすこ
とを示す、方法。

(項目 3 4)

レポーター配列の発現を調節する分析物を同定するための方法であって、そのレポーター
配

列の発現は、生存げっ歯類において、マウス C Y P 3 A 1 1 遺伝子由来の転写制御エレメ
ントにより媒介され、その方法は、以下：

項目 2 0 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを含むベクター混合物を、生存げっ
歯類に投与する工程；

そのげっ歯類にその分析物を投与する工程；および

そのレポーター配列の発現をモニタリングする工程、

を包含し、ここで、そのレポーター配列の発現レベルに対する効果は、その分析物が、マ
ウス

C Y P 3 A 1 1 遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介される発現に影響を及ぼすこ
とを示す、方法。

(項目 3 5)

上記げっ歯類への上記ベクター混合物の投与が、そのベクター混合物の静脈内注入を含む
。

項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

細胞中でのレポーター配列の発現をモニタリングするための方法であって、そのレポータ
ー

配列の発現は、マウス C Y P 3 A 1 1 遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介され、
その方法は、以下：

細胞中でのレポーター配列の発現をモニタリングする工程であって、その細胞は、項目
2 0 ～ 2 4 のいずれかに記載の発現カセットを含み、ここで、その細胞中でのそのレポ

ーター

10

20

30

40

50

配列の発現は、マウスCYP3A11遺伝子由来の転写制御エレメントにより媒介される発現の指標となる、方法。

(発明の要旨)

本発明は、チロクロム発現に関連するマウス遺伝子およびヒト遺伝子（それぞれ、例えば、Cyp3A11およびCYP3A4）に由来する転写制御エレメントに関する。本発明は、本明細書中に記載される転写制御エレメントを含む、単離されたポリヌクレオチド、発現カセット、ベクター、組換え細胞、肝臓プッシュ（liver-push）非ヒト動物およびトランスジェニック非ヒト動物を含む。

【0007】

1つの局面では、本発明は、チロクロムP450遺伝子（例えば、Cyp3A11およびCYP3A4）に由来する転写制御エレメント、これらの制御エレメントを含む発現カセット、この発現カセットを含む、ベクター構築物、細胞およびトランスジェニック動物、ならびにこの発現カセットを含む細胞およびトランスジェニック動物を、例えば、モデリング系、スクリーニング系および／または試験系として用いる方法に関する。本発明の制御エレメント、発現カセット、細胞、およびトランスジェニック動物を用いる方法としては、毒性および薬物代謝に関する研究、ならびに薬物の代謝、安全性および／または可能な毒性をスクリーニングするための方法が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の実施において有用な例示的な転写制御エレメントとしては、マウスCyp3A11遺伝子座に由来する転写制御エレメントおよびヒトCYP3A4遺伝子座に由来する転写制御エレメントが挙げられる。

【0008】

特に、本発明は、マウスCyp3A11遺伝子およびヒトCYP3A4遺伝子のゲノム遺伝子座に由来する転写制御エレメントに関し、ここで、これらの転写制御エレメントは、レポーター配列に結合している。特に、配列番号12、配列番号13、配列番号14、および配列番号15、ならびにそれらのフラグメントを含む組換え核酸分子が記載される。本発明はさらに、このようなレポーター構築物でトランスフェクトされた動物を用いる、インビボでのアッセイ方法に関する。

【0009】

1つの局面では、本発明は、マウスCyp3A11遺伝子由来のポリヌクレオチド（または代表的には100を超えて連続したヌクレオチドのそのフラグメント）を含み、このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、配列番号12のヌクレオチド1-11、002（またはその対応するフラグメント）に対して少なくとも95%の同一性を有する。ポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、目的のコード配列に作動可能に連結され得る。このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は代表的に、少なくとも1つの転写制御エレメントを含む。発現カセットは、このポリヌクレオチドおよび目的のコード配列を含み得る。

【0010】

別の局面では、本発明は、マウスCyp3A11遺伝子に由来するポリヌクレオチド（または代表的には100を超えて連続するヌクレオチドのそのフラグメント）を含み、このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、配列番号13の配列（または配列番号13のうちの少なくとも約100連続したヌクレオチドのそのフラグメント）に対して少なくとも95%の同一性を有する。このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、目的のコード配列に作動可能に連結され得る。このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は代表的に、少なくとも1つの転写制御エレメントを含む。発現カセットは、このポリヌクレオチドおよび目的のコード配列を含み得る。1つの実施形態では、このポリヌクレオチドは、配列番号13のヌクレオチド5104-6218に対して95%以上の同一性を有する第1ポリヌクレオチドおよび配列番号13のヌクレオチド6792-9330に対して95%以上の同一性を有する第2ポリヌクレオチドを含む。

【0011】

1つの局面では、本発明は、配列番号13の配列（またはそのフラグメント）に対して

少なくとも約 95% の同一性を有し、目的のコード配列に作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチドおよび／または発現カセットを含み、ここで、このポリヌクレオチドまたはそのフラグメントは、少なくとも 1 つの転写制御エレメントを含む。

【0012】

別の局面では、本発明は、配列番号 15 の配列（またはそのフラグメント）に対して少なくとも約 95% の同一性を有し、目的のコード配列に作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチドおよび／または発現カセットを含み、ここで、このポリヌクレオチドまたはそのフラグメントは、少なくとも 1 つの転写制御エレメントを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、目的のコード配列は、レポーター配列（例えば、光生成タンパク質）である。このような光生成タンパク質としては、生物発光タンパク質（原核生物ルシフェラーゼまたは真核生物ルシフェラーゼを含むがこれらに限定されない）および蛍光タンパク質（青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質、ならびにその増強改変体および／または不安定化改変体を含むがこれらに限定されない）が挙げられる。

【0014】

本発明はまた、本発明の単離されたポリヌクレオチドおよび／または発現カセットを含むベクターを含む。このようなベクターは代表的に、ベクター骨格を含み、そして直鎖状または環状であり得、1 以上の複製起点（例えば、シャトルベクター）を含み、部位特異的もしくはランダムに組み込まれ、そして 1 以上の選択マーカーまたはスクリーニング可能マーカーを含む。

【0015】

1 つの実施形態では、本発明は、本発明の発現カセットおよび／またはベクターを含む細胞を含む。別の実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、およびモルモットを含むがこれらに限定されない齧歯動物）は、本発明の発現カセットおよび／またはベクターを含み得る。さらなる実施形態では、本発明は、本発明の発現カセットおよび／またはベクターを含む細胞のサブセットを含む非ヒト動物（例えば、肝臓に本発明の構築物でトランスフェクトされた細胞を含む非ヒト動物）を含む。このような非ヒト動物は、例えば静脈内注射を介した本発明の発現カセットおよび／またはベクターの投与によって作製され得る。

【0016】

なお別の局面では、本発明は、本発明の発現カセット、ベクター、細胞、および非ヒト動物を使用する方法を含む。1 つの実施形態では、本発明は、トランスジェニック生存非ヒト動物において、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子由来転写制御エレメントおよび／またはヒト C Y P 3 A 4 遺伝子由来転写制御エレメントによって媒介される発現（例えば、レポーター配列の発現）を調節する分析物を同定するための方法を含む。このような方法は代表的に、この動物に分析物（例えば、薬物）を投与することを含む。この動物は、代表的にレポーター配列を含む、本発明の発現カセットまたはベクターのうちの 1 以上を含む。レポーター配列の発現がモニタリングされる。レポーター配列の発現レベルに対する影響は、この分析物が、この方法において用いられる発現カセットおよび／またはベクターを構成する転写制御エレメントに対応する遺伝子の発現に影響を与えることを示す。

【0017】

別の方法は、トランスジェニックの生存非ヒト動物において、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子由来転写制御エレメントおよび／またはヒト C Y P 3 A 4 遺伝子由来転写制御エレメントによって媒介される発現（例えば、レポーター配列の発現）を調節する分析物を同定する工程を包含する。この方法では、本発明の発現カセットを含むベクター混合物は、分析物の投与と同時に、投与前に、または投与後に、動物に投与される。このベクター混合物は、レポーター配列を代表的に含む、1 以上の本発明の発現カセットを含む。このレポ

10

20

30

40

50

ーター配列の発現がモニタリングされる。このレポーター配列の発現に対する影響は、この分析物が、この方法において用いられた発現カセットおよび／またはベクターを構成する転写制御エレメントによって媒介される発現に影響を与えることを示す。1つの実施形態では、このベクター混合物は、静脈内注射によって投与される。

【0018】

本発明のさらなる実施形態では、本発明の転写制御エレメントおよびレポーターを含む発現カセットを用いて、細胞中でのマウスCyp3A11遺伝子またはヒトCYP3A4遺伝子の発現がモニタリングされる。この実施形態では、レポーター配列の発現が細胞中でモニタリングされ、そしてレポーター配列の発現は、この方法において用いられる発現カセットおよび／またはベクターを構成する転写制御エレメントに対応する遺伝子の発現に対応する。さらに、分析物は、このような細胞においてスクリーニングされ得、ここで、このレポーター配列の発現に対する影響は、この分析物が、この方法において用いられる発現カセットおよび／またはベクターを構成する転写制御エレメントによって媒介される発現に影響を与えることを示す。

【0019】

別の局面では、本発明は、トランスジェニック非ヒト動物（例えば、齧歯動物）を含む。トランスジェニック非ヒト動物は代表的に、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含む発現カセットを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド1-13, 032（またはそのフラグメント）に対して少なくとも95%以上の同一性を有し、ここで、(i) このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、目的のコード配列に作動可能に連結されている、(ii) このポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）は、少なくとも1つの転写制御エレメントを含む、そして(iii) 目的のコード配列の発現は、デキサメタゾンまたはリファンピシンによって、生存トランスジェニック非ヒト動物の肝臓において誘導される。

【0020】

1つの実施形態では、目的のコード配列の発現は、50mg/kg体重で投与されたデキサメタゾンによって、生存トランスジェニック動物において誘導され、そして／または目的のコード配列の発現は、50mg/kg体重で投与されたリファンピシンによって、生存トランスジェニック動物において誘導される。さらに、目的のコード配列の発現の誘導は、デキサメタゾンによって基底レベルの10倍の誘導以上であり得、そして／または目的のコード配列の発現の誘導は、リファンピシンによって基底レベルの2倍以上の誘導である。

【0021】

1つの実施形態では、生存トランスジェニック非ヒト動物の肝臓領域におけるコード配列の基底発現は、この生存トランスジェニック非ヒト動物の身体の他の領域における基底発現以上である。

【0022】

別の実施形態では、このトランスジェニック非ヒト動物は、機能的hPXR（ヒトリファンピシンコレセプター（coreceptor））をコードする配列を有さない。すなわち、この動物は、機能的ヒトPXR遺伝子産物を発現しない。

【0023】

さらなる実施形態では、目的のコード配列の発現は、フェノバルビタール（phenobarbital）、ニフェジピン、5-ブレッグネン-3b-オール-20-オン-16a-カルボニトリルおよびクロトリマゾールからなる群より選択される少なくとも1つの化合物によって、生存トランスジェニック非ヒト動物において誘導され、ここで、発現の誘導は、生存トランスジェニック動物の肝臓領域において見られる。

【0024】

トランスジェニック非ヒト動物では、目的のコード配列は、例えば、レポーター配列であり得る。このようなレポーター配列は、例えば、光生成タンパク質（例えば、生物発光タンパク質または蛍光タンパク質）をコードし得る。1つの例示的な生物発光タンパク質

10

20

30

40

50

は、ルシフェラーゼである。本発明の1つの実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物は、配列番号17（例示的なCYP3A4／luc導入遺伝子）を含む発現カセットを含み得る。例示的な蛍光タンパク質としては、青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。

【0025】

トランスジェニック非ヒト動物は、齧歯動物であり得、齧歯動物としては、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、またはモルモットが挙げられるがこれらに限定されない。

【0026】

本発明はまた、レポーター配列の発現を調節する分析物を同定するための方法を包含し、ここで、このレポーター配列の発現は、トランスジェニック生存齧歯動物において、例えば、ヒトCYP3A4遺伝子に由来する転写制御エレメントによって媒介される。この方法では、分析物は、上記のトランスジェニック生存非ヒトトランスジェニック動物へと投与される。レポーター配列の発現がモニタリングされる。レポーター配列の発現レベルに対する影響は、この分析物が、転写制御エレメント（例えば、ヒトCYP3A4遺伝子に由来する転写制御エレメント）によって媒介されるものに影響を与えることを示す。

【0027】

本発明のこれらおよび他の実施形態は、本明細書中の開示を考慮すれば、当業者に容易に思いつく。

【0028】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他に示さない限り、分子生物学、微生物学、細胞生物学、トランスジェニック動物操作、および組換えDNAの従来技術を用い、これらの従来技術は、当該分野の技術範囲内にある。例えば、Sambrook, Fritsch, およびManiatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, (F. M. Ausubelら編, 1987); シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. McPherson, B. D. HamesおよびG. R. Taylor編, 1995); ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney編, 1987); 「Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook」, Carl A. Pinkert (編) 第1版, Academic Press; ISBN: 0125571658; および「Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual」, Brigid Hoganら, ISBN: 0879693843, Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 出版日: 1999年9月, 第2版を参照のこと。

【0029】

（1. 定義）

本発明を記載する際に、以下の用語を用い、そして以下に示されるとおりに定義されるべきことが意図される。他に示さない限り、本明細書中で用いられる全ての用語は、本発明の分野の当業者に対して有するのと同じ意味を有する。

【0030】

用語「核酸分子」および「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらのアナログの、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを言及するために交換可能に用いられ、そしてこれらの任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを言及する。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、そして既知または未知の任意の機能を果たし得る。ポリヌクレオチドの非限定的な例として

10

20

30

40

50

は、遺伝子、遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマーが挙げられる。

【0031】

ポリヌクレオチドは代表的に、4つのヌクレオチド塩基の特定の配列から構成される：アデニン (A)；シトシン (C)；グアニン (G)；およびチミン (T) (ポリヌクレオチドがRNAである場合、チミン (T) の代わりにウラシル (U))。従って、用語ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド分子のアルファベットによる表示である。このアルファベットによる表示は、中央処理装置を有するコンピュータ中のデータベースに入力され得、そしてバイオインフォマティクスでの適用 (例えば、機能的ジェノミクスおよび相同性検索) に用いられ得る。

【0032】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列 (または「制御エレメント」) の制御下に置かれた場合、例えば、インビボで、(DNAの場合) 転写され、そしてポリペプチドへと (mRNAの場合) 翻訳される核酸分子である。コード配列の境界は代表的に、5' (アミノ) 末端での開始コドンおよび3' (カルボキシ) 末端での翻訳停止コドンによって決定される。コード配列としては、ウイルス、原核生物または真核生物のmRNA由来のcDNA、ウイルスまたは原核生物のDNA由来のゲノムDNA配列、およびさらには合成DNA配列が挙げられ得るがこれらに限定されない。転写終結配列は、コード配列に対して3'側に配置され得る。他の「制御エレメント」もまた、コード配列に結合し得る。ポリペプチドをコードするDNA配列は、所望のポリペプチドコード配列のDNAコピーを表す、選択された細胞によって好まれるコドンを用いることによって、選択された細胞における発現のために最適化され得る。「コードされる」とは、ポリペプチド配列をコードする核酸配列であって、ここで、このポリペプチド配列またはその一部分が、その核酸配列によってコードされるポリペプチド由来の少なくとも3~5アミノ酸、より好ましくは少なくとも8~10アミノ酸、そしてさらにより好ましくは少なくとも15~20アミノ酸のアミノ酸配列を含む核酸配列をいう。この配列によってコードされるポリペプチドを用いて免疫学的に同定可能であるポリペプチド配列もまた包含される。

【0033】

「転写因子」とは代表的に、特定の遺伝子の転写、従って特定の遺伝子の発現に影響を与えるタンパク質 (またはポリペプチド) をいう。転写因子とは、単一のポリペプチド転写因子、順次もしくは協調して作用する1以上のポリペプチド、またはポリペプチド複合体を言及し得る。

【0034】

代表的「制御エレメント」としては、転写プロモーター、転写エンハンサーエレメント、シス作用性転写調節エレメント (転写調節因子、例えば、遺伝子の転写に影響を与えるシス作用性エレメント、例えば、転写因子が相互作用して遺伝子の発現を誘導または抑制するプロモーター領域)、転写開始シグナル (例えば、TATAボックス)、基本的プロモーター、転写終結シグナル、ならびにポリアデニル化配列 (翻訳停止コドンに対して3'側に位置する)、翻訳開始の最適化のための配列 (コード配列に対して5'側に位置する)、翻訳増強配列、および翻訳終結配列が挙げられるがこれらに限定されない。転写プロモーターとしては、例えば、誘導性プロモーター (ここで、このプロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される)、抑制性プロモーター (ここで、このプロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、調節タンパク質などによって誘導される)、および構成性プロモーターが挙げられ得る。

【0035】

「発現増強配列」はまた、「エンハンサー配列」または「エンハンサー」とも呼ばれ、

代表的には、このような制御エレメント（例えば、プロモーター、プロモーターエンハンサー、エンハンサーエレメント、および翻訳エンハンサー（例えば、シャインーダルガーノ配列））の非存在下での発現レベルと比較して、ポリヌクレオチドの転写または翻訳を改善する制御エレメントをいう。

【0036】

用語「調節」とは、部分的阻害を含め、阻害、ならびに刺激の両方をいう。従って、例えば、レポーター配列の発現を調節する化合物は、部分的もしくは完全にのいずれかでその発現を阻害してもよく、またはその配列の発現を刺激してもよい。

【0037】

「精製されたポリヌクレオチド」とは、そのポリヌクレオチドが天然で会合しているタンパク質を本質的に含まない、例えば、そのタンパク質のうちの約50%未満、好ましくは約70%未満、そしてより好ましくは約90%未満を含む、目的のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントをいう。目的のポリヌクレオチドを精製するための技術は、当該分野で周知であり、そして例えば、カオロピック剤を用いたこのポリヌクレオチドを含む細胞の破壊、ならびにイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび密度による沈降によるポリヌクレオチドとタンパク質との分離を包含する。

【0038】

「異種配列」とは代表的に、(i) 目的の細胞にも生物にも通常見出されない核酸配列、または(ii) ゲノム部位に導入された核酸配列であって、ここで、この核酸配列は、天然ではその部位に通常生じない、核酸配列のいずれかをいう。例えば、ポリペプチドをコードするDNA配列は、酵母から入手され得、そして細菌細胞へと導入され得る。この場合、酵母DNA配列は、細菌細胞のネイティブDNAに対して「異種」である。あるいは、Tie2遺伝子由来のプロモーター配列は、fosB遺伝子のゲノム位置へと導入され得る。この場合、Tie2プロモーター配列は、ネイティブfosBゲノム配列に対して「異種」である。

【0039】

「ポリペプチド」は、その最も広範な意味で使用されて、2以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸アナログ、または他のペプチド模倣物の化合物をいう。このサブユニットは、ペプチド結合によって連結されてもよく、または他の（例えば、エステル、エーテルなどの）結合によって連結されてもよい。用語「アミノ酸」は代表的に、天然および／または非天然もしくは合成のいずれかのアミノ酸（グリシンおよびDまたはLの両方の光学異性体、ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣物を含む）をいう。3以上のアミノ酸のペプチドは、そのペプチド鎖が短い場合、通常、オリゴペプチドと呼ばれる。そのペプチドが長い場合、そのペプチドは代表的に、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

【0040】

「作動可能に連結される」とは、このように記載された構成要素が、それらの通常の機能を果たすように配置される、エレメントの配置をいう。従って、コード配列（例えば、レポーター発現カセット）に作動可能に連結された所定のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、コード配列の発現をもたらし得る。このプロモーターまたは他の制御エレメントは、それらが機能してその発現を指向する限り、コード配列と連続する必要はない。例えば、介在する翻訳されないが転写される配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列はなおも、コード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

【0041】

核酸分子を記載する、「組換え体」とは、その起源または操作によって、以下であるゲノム、cDNA、半合成、または合成の起源のポリヌクレオチドを意味する：(1) 天然で会合しているポリヌクレオチドの全てとも一部分とも会合していない；および／または(2) 天然で連結しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結している。用語「組換え」とは、タンパク質またはポリペプチドに関して用いられる場合、組換えポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドの発現によって産生されるポリペプチドを意味する。「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」および例えば、原核生物微生物または単細胞実体として培養された真核生物細胞株を示す他のこのような用語は、交換可能に用いられ、組換えベクターまたは他の移入DNAについてのレシピエントとして用いられ得るかまたは用いられている細胞を言及し、そしてトランスフェクトされた元の細胞の子孫を包含する。単一の親細胞の子孫は、偶発的または意図的変異に起因して、形態または元の親に相補的なゲノムDNAもしくは総DNAが必ずしも完全に同一でないかもしれないことが理解される。適切な特性（例えば、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在）によって特徴付けられる、親細胞と十分に類似した親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれ、そして上記の用語によって包含される。

10

【0042】

「単離されたポリヌクレオチド」分子は、その分子が天然で見出される生物全体から分離されて不連続の核酸分子；または天然で通常会合している配列を全体的もしくは部分的に含まない核酸分子；または天然に存在するような、しかしそれに会合した異種配列（以下に規定のとおり）を有する配列である。

【0043】

核酸およびアミノ酸の「配列同一性」を決定するための技術もまた、当該分野で公知である。代表的に、このような技術は、遺伝子についてのmRNAのヌクレオチド配列を決定する工程および／またはそれによってコードされるアミノ酸配列を決定する工程、ならびにこれらの配列を第2のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して比較する工程を包含する。一般に、「同一性」とは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ーヌクレオチドまたはアミノ酸対ーアミノ酸の一致をいう。2以上の配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）は、それらの「パーセント同一性」を決定することによって比較され得る。2つの配列のパーセント同一性は、核酸配列またはアミノ酸配列によらず、より短い配列の長さによって除算し、そして100を掛けた、2つの整列した配列の間での正確な一致の数である。核酸配列についてのおよその整列は、SmithおよびWaterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff編, 5補遺3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USAによって開発され、Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 6745-6763 (1986)によって正規化されたスコアリング行列を用いることによってアミノ酸配列に適用され得る。配列のパーセント同一性を決定するこのアルゴリズムの例示的実行は、「BestFit」ユーティリティアプリケーションにおいて、Genetics Computer Group (Madison, WI)によって提供される。この方法のためのデフォルトパラメーターは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)において記載される。本発明の状況においてパーセント同一性を確立する好ましい方法は、University of Edinburghに著作権があり、John F. CollinsおよびShane S. Sturrokによって開発され、そしてIntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)によって配布されるプログラムのMPSRCHパッケージを用いることである。この一式のパッケージから、Smith-Watermanアルゴリズムが用いられ得、ここで、デフォルトパラメーターは、スコアリング表に関して用いられる（例えば、12のギャップオープンペナルティー (gap open penalty)、1のギャップ伸長ペナルティー (gap extension penalty)、および6のギャップ (gap)）。作成したデータから、「一致 (Match)」の値は、「配列同一性 (

20

30

40

50

sequence identity)」を反映する。配列間のパーセント同一性またはパーセント類似性を算出するための他の適切なプログラムは一般に、当該分野で公知であり、例えば、別の整列プログラムは、BLASTであり、デフォルトパラメーターとともに用いられる。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメーターを用いて使用され得る：遺伝暗号 (genetic code) = 標準；フィルター (filter) = なし；鎖 (strand) = 両方；カットオフ (cutoff) = 60；期待値 (expect) = 10；行列 (Matrix) = BLOSUM62；記載 (Descriptions) = 50 配列；ソート (sort by) = ハイスコア (HIGH SCORE)；データベース (Databases) = 非重複の GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスに見出され得る：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。 10

【0044】

当業者は、上記のプログラムにおいて所定の配列について使用するに適切な検索パラメーターを容易に決定し得る。例えば、検索パラメーターは、問題の配列のサイズに基づいて変動し得る。従って、例えば、本発明の代表的実施形態は、X 個連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドを含み、ここで、(i) X 個連続したヌクレオチドは、本明細書中に記載される配列のうちのいずれかに由来する Y 個連続したヌクレオチドに対して少なくとも約 50% の同一性を有する、(ii) X は、Y に等しい、そして (iii) X は、6 から、本明細書中に記載されるとおりの選択された全長配列中に存在するヌクレオチドの数（上記の範囲内に入る全ての整数の値を含む）までに等しい（例えば、実施例、図面、配列表および特許請求の範囲を参照のこと）。ポリヌクレオチドの「フラグメント」とは、本明細書中に記載される、より長いポリヌクレオチドに由来する、任意の長さのポリヌクレオチド分子（すなわち、Y 個連続したヌクレオチド、ここで、ちょうど記載したとおり、X = Y）をいう。例示的なフラグメント長としては、少なくとも約 6 個連続したヌクレオチド、少なくとも約 50 個連続したヌクレオチド、約 100 個連続したヌクレオチド、約 200 個連続したヌクレオチド、約 250 個連続したヌクレオチド、約 500 個連続したヌクレオチド、または少なくとも約 1000 個以上連続したヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されず、ここで、このような連続したヌクレオチドは、連続したヌクレオチドのより長い配列に由来する。 20 30

【0045】

精製されたポリヌクレオチドおよび本発明の発現カセットの構築において用いられるポリヌクレオチドとしては、本明細書中に開示される配列、ならびに約 80% ~ 100% およびこれらの間の整数の値の配列同一性を有する関連のポリヌクレオチド配列が挙げられる。代表的に、本明細書中に開示される配列および本願配列の間のパーセント同一性は、少なくとも約 80 ~ 85%、好ましくは少なくとも約 90 ~ 92%、より好ましくは少なくとも約 95%、そして最も好ましくは少なくとも約 98%（これらの記載された範囲内に入る全ての整数値を含む）の配列同一性である。これらのパーセント同一性は、例えば、本発明の配列が問合せ配列として使用される場合、本願配列、または本発明の他の配列に対するものである。 40

【0046】

あるいは、ポリヌクレオチドの間の配列類似性の程度は、相同領域の間で安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて、一本鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化されたフラグメントのサイズ決定によって決定され得る。2つのDNA配列または2つのポリペプチド配列は、これらの配列が、上記の方法を用いて決定した場合、これらの分子の規定の長さにわたって、参照配列に対して少なくとも約 80 ~ 85%、好ましくは 85 ~ 90%、より好ましくは 90 ~ 95%、そして最も好ましくは 98 ~ 100% の配列同一性を示す場合、互いに「実質的に相同」である。実質的に相同とはまた、指定されたDNA配列またはポリペプチド配列に対して完全な同 50

一性を示す配列をいう。実質的に相同であるDNA配列は、その特定のシステムについて規定したとおりの、例えば、ストリンジェントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験において同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当該分野の技術範囲内である。例えば、Sambrookら、前出；DNA Cloning, 前出；Nucleic Acid Hybridization, 前出を参照のこと。

【0047】

2つの核酸フラグメントは、本明細書中に記載されたとおり、「選択的にハイブリダイズする」とみなされる。2つの核酸分子の間の配列同一性の程度は、このような分子の間のハイブリダイゼーション事象の効率および強度に影響を与える。部分的に同一の核酸配列は、完全に同一な配列が、標的分子に対してハイブリダイズすることを少なくとも部分的に阻害する。完全に同一な配列のハイブリダイゼーションの阻害は、当該分野で周知であるハイブリダイゼーションアッセイを用いて評価され得る（例えば、サザンプロット、ノーザンプロット、溶液ハイブリダイゼーションなど、Sambrookら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第2版, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y. を参照のこと）。このようなアッセイは、種々の程度の選択性を用いて、例えば、低いストリンジェンシーから高いストリンジェンシーまで変化する条件を用いて実施され得る。低いストリンジェンシーの条件が用いられる場合、非特異的結合が存在しないことは、一部という程度にすら配列同一性を欠く二次プローブを用いて評価され得（例えば、標的分子との約30%未満の配列同一性を有するプローブ）、その結果、非特異的結合事象の非存在下で、二次プローブは、標的にハイブリダイズしない。

【0048】

ハイブリダイゼーションベースの検出系を利用する場合、標的核酸配列に対して相補的である核酸プローブが選択され、次いで、適切な条件の選択によって、プローブと標的配列とが、「選択的にハイブリダイズ」するか、または互いに結合して、ハイブリッド分子を形成する。「中程度にストリンジェントな」下で標的配列に選択的にハイブリダイズし得る核酸分子は代表的に、選択された核酸プローブの配列と少なくとも約70%の配列同一性を有する、少なくとも約10~14ヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする条件下でハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は代表的に、選択された核酸プローブの配列と約90~95%より高い配列同一性を有する、少なくとも約10~14ヌクレオチド長の標的核酸配列の検出を可能にする。プローブおよび標的が特定の程度の配列同一性を有する、プローブ/標的ハイブリダイゼーションに有用なハイブリダイゼーション条件は、当該分野で公知のように決定され得る（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, B. D. HamesおよびS. J. Higgins編(1985) Oxford; Washington, DC; IRL Pressを参照のこと）。

【0049】

ハイブリダイゼーションについてのストリンジェンシー条件に関して、多数の同等の条件を用いて、例えば、以下の要因を変化させることによって、特定のストリンジェンシーが達成され得ることが当該分野で周知である：プローブおよび標的配列の長さおよび性質、種々の配列の塩基組成、塩および他のハイブリダイゼーション溶液成分の濃度、ハイブリダイゼーション溶液中でのブロック剤の存在または非存在（例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、およびポリエチレングリコール）、ハイブリダイゼーション反応温度および時間のパラメーター、ならびに種々の洗浄条件。特定のセットのハイブリダイゼーション条件の選択は、当該分野における標準的方法に従って選択される（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第2版(1989) Cold Spring Harbor, N. Y. を参照のこと）。

【0050】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞へと移入し得る。代表的に、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」とは、目的の遺伝子の発現を指向し得、かつ遺伝子配列を標的細胞へと移入し得る、任意の核酸構築物を意味する。従って、この用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターを含む。

【0051】

「核酸発現ベクター」または「発現カセット」とは、目的の配列または遺伝子の発現を指向し得るアセンブリをいう。核酸発現ベクターは、目的の配列または遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。他の制御エレメントもまた存在し得る。本明細書中に記載される発現カセットは、プラスミド構築物中に含まれ得る。発現カセットの成分に加えて、このプラスミド構築物はまた、細菌の複製起点、1以上の選択マーカー、プラスミド構築物が一本鎖DNAとして存在するのを可能にするシグナル（例えば、M13の複製起点）、マルチプルクローニング部位、および「哺乳動物」の複製起点（例えば、SV40またはアデノウイルスの複製起点）を含み得る。

【0052】

「発現カセット」は、目的の遺伝子／コード配列の発現を指向し得る任意の核酸構築物を含む。このようなカセットは、発現カセットを標的細胞中に移入するために、「ベクター」、「ベクター構築物」、「発現ベクター」または「遺伝子移入ベクター」中に構築され得る。従って、この用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。

【0053】

種々の「レポーター遺伝子」はまた、「レポーター配列」および「マーカー配列」とも呼ばれ、すなわち、その発現は、レポーター遺伝子または配列が作動可能に連結されている目的のポリヌクレオチド配列の発現を示す遺伝子または配列である。好ましいのは、（好ましくは慣用アッセイにおいて）容易に測定されるタンパク質産物を産生するレポーター配列である。適切なレポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、光生成タンパク質（例えば、lucにコードされる蛍光タンパク質、luxにコードされる蛍光タンパク質）、およびβ-ガラクトシダーゼが挙げられるがこれらに限定されない。便利なアッセイとしては、熱量アッセイ、蛍光測定アッセイおよび酵素アッセイが挙げられるがこれらに限定されない。1つの局面では、細胞内で発現され、かつその細胞外産物が、細胞内媒体または培養細胞株の細胞内媒体の抽出物において直接的に測定される、レポーター遺伝子が用いられ得る。これは、その産物が分泌されるレポーター遺伝子を用いることを超える利点を提供する。なぜなら、分泌の速度および効率は、アッセイの解釈を複雑にし得るさらなる変数を導入するからである。好ましい実施形態では、レポーター遺伝子は、光生成タンパク質である。本明細書中に記載される光生成レポータータンパク質を用いる場合、発現は、上記のように、正確かつ非侵襲的に評価され得る（例えば、Contag, P. R. ら（1998）Nature Med. 4: 245-7; Contag, C. H. ら（1997）Photochem Photobiol. 66: 523-31; Contag, C. H. ら（1995）Mol Microbiol. 18: 593-603を参照のこと）。

【0054】

「光生成タンパク質」または「発光タンパク質」は、代表的には200nm～1100nm、好ましくは可視スペクトル（すなわち、約350nmと800nmとの間）の範囲の光を生成し得る、生物発光タンパク質または蛍光タンパク質である。生物発光タンパク質は、化学反応（代表的には、基質、エネルギー源および酸素を必要とする）をとおして光を生成する。蛍光タンパク質は、（例えば、緑色蛍光タンパク質を用いて）放射線の吸収および再発光をとおして光を生成する。生物発光タンパク質の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：「ルシフェラーゼ」は、他に述べない限り、原核生物（例えば、細菌のluxにコードされる）ルシフェラーゼおよび真核生物（例えば、蛍のlucにコードされる）ルシフェラーゼ、ならびに変動もしくは変化した光学的特性を保有

する改変体（例えば、異なる色の光を生成するルシフェラーゼ（例えば、Kajiyama, N., およびNakano, E., Protein Engineering 4 (6) : 691-693 (1991)）；ならびに「光タンパク質」（例えば、カルシウム活性化光タンパク質（例えば、Lewis, J. C. ら, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (6-7) : 760-768 (2000)）を包含する。蛍光タンパク質の例としては、緑色、黄色、シアン、青色、および赤色の蛍光タンパク質（例えば、Hadjantonakis, A. K. ら, Histochem. Cell Biol. 115 (1) : 49-58 (2001)）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0055】

「生物発光タンパク質基質」は、代表的には、エネルギー源（例えば、ATPまたはFMNH₂）および酸素の添加によって、エネルギー崩壊基質（例えば、ルシフェリン）および光の光子を生成する光生成タンパク質（例えば、ルシフェラーゼ酵素）の基質を記載する。このような基質の例としては、細菌lux系におけるデカナール、蛍ルシフェラーゼ（luc）系における4, 5-ジヒドロ-2-（6-ヒドロキシ-2-ベンゾチアゾリル）-4-チアゾールカルボン酸（または単にルシフェリンと呼ばれる）、生物発光性真菌Panellus stipticus系における「パナール（panal）」（Tetrahedron 44 : 1597-1602, 1988）およびミミズDiplocardia longa系におけるN-イソバレルル-3-アミノプロパノール（Biochem. 15 : 1001-1004, 1976）が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの系では、本明細書中に記載のとおり、アルデヒドを、光生成タンパク質についての基質として用い得る。

【0056】

「光」は、他に述べない限り、約200nm（例えば、UV-Cについて）と約1100nm（例えば、赤外）との間の波長を有する電磁放射と本明細書中で定義される。可視光の波長は、約350nm～約800nm（すなわち、約3,500Åと約8,000Åとの間）の範囲にわたる。

【0057】

「動物」とは代表的に、非ヒト動物（家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）；家庭用哺乳動物（例えば、イヌおよびネコ）；実験動物（クロアシイタチ、ノウサギおよびウサギ、齧歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミおよびモルモット）を含む）を含むがこれらに限定されない）；非ヒト霊長類（チンパンジーを含む）をいう。用語「動物」はまた、以下を包含し得るがこれらに限定されない；鳥類（家庭用鳥類、野生の鳥類および狩猟用鳥類を含む（例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他のキジ類の鳥類、アヒル、ガチョウなど））、ならびに両生類、魚類、昆虫、爬虫類など。この用語は、特定の齢を示さない。従って、成体、胚、胎仔、および新生仔の個体は、包含されることが意図される。

【0058】

「トランスジェニック動物」とは、遺伝子操作された動物または遺伝子操作された動物の子孫をいう。トランスジェニック動物は通常、少なくとも1つの無関係の生物（例えば、ウイルス、微生物、植物または他の動物）由来の物質を含む。用語「キメラ動物」は、異種遺伝子が見出されるか、または異種遺伝子とその動物のいくつかの細胞で発現されるが全ての細胞では発現されない動物を言及するために用いられる。

【0059】

「分析物」とは、その効果（例えば、特異的プロモーターの誘導または抑制）が、本発明の試験動物および方法を用いて評価され得る任意の化合物または物質をいう。このような分析物としては、化合物、薬学的化合物、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチドアナログが挙げられるがこれらに限定されない。多くの組織（例えば、National Institutes of Health, 薬品会社および化学会社）が、天然プロセスもしくは合成プロセス、または発酵プロセスもしくは発酵抽出物由来の化合物または生物学的化合物の大きなライブラリーを有する。このような化合

物／分析物は、本発明の実施において用いられ得る。

【0060】

用語「ポジティブ選択マーカー」とは、遺伝子を保有する細胞のみが、特定の条件下で生存および／または増殖するのを可能にする産物をコードする遺伝子をいう。例えば、導入したネオマイシン耐性（Neor）遺伝子を発現する、植物細胞および動物細胞は、化合物G418に対して耐性である。Neor遺伝子マーカーを保有しない細胞は、G418によって殺傷される。他のポジティブ選択マーカーは、当業者に公知である。代表的に、ポジティブ選択マーカーは、容易にアッセイされ得る産物をコードする。従って、ポジティブ選択マーカーを用いて、特定のDNA構築物が細胞、器官または組織に導入されたか否かを決定し得る。

10

【0061】

「ネガティブ選択マーカー」とは、細胞を特定の条件下で選択的に殺傷するため、および／または細胞の増殖を選択的に阻害するために用いられ得る産物をコードする遺伝子をいう。ネガティブ選択挿入物の非限定的な例としては、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子が挙げられる。活性なHSV-TK遺伝子を含む細胞は、ガンシクロビルまたは類似の薬剤の存在下で増殖することができない。従って、基質に依存して、いくつかの遺伝子産物は、ポジティブ選択マーカーまたはネガティブ選択マーカーとして作用し得る。

【0062】

用語「相同組換え」とは、2つのDNA分子または染色分体の間での、本質的に同一のヌクレオチド配列の部位でのDNAフラグメントの交換をいう。実質的に相同な配列は、ヌクレオチド配列中に挿入、欠失および置換を含み得ることが理解される。従って、ヌクレオチドの直鎖状配列は、ヌクレオチド残基のうちのいくつかが正確には対応せず、整列もしない場合でさえ、本質的に同一であり得る（上記を参照のこと）。

20

【0063】

「ノックアウト」変異とは、標的遺伝子の少なくとも一部の発現の部分的または完全な喪失をいう。ノックアウト変異の例としては、異種配列による遺伝子置換、異種配列による遺伝子破壊、およびその遺伝子の必須エレメント（例えば、プロモーター領域、コード配列の一部）の欠失が挙げられるがこれらに限定されない。「ノックアウト」変異は代表的に、変異によって作製される表現型によって同定される。

30

【0064】

「遺伝子」は、本発明の状況において用いられる場合、遺伝的機能が関連する、遺伝的核酸（染色体、プラスミドなど）におけるヌクレオチドの配列である。遺伝子は、生物のゲノム内の特定の物理的位置（「座」「遺伝子座」または「遺伝的位置」）を占める、ポリヌクレオチド配列（例えば、哺乳動物についてはDNA配列）を含む（例えば、生物の）遺伝単位である。遺伝子は、発現産物（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド（例えば、tRNA））をコードし得る。あるいは、遺伝子は、特定の事象／機能（例えば、タンパク質および／または核酸の結合）についてのゲノム位置（例えば、ファージ結合部位）を規定し得、ここで、この遺伝子は、発現産物をコードしない。代表的に、遺伝子は、コード配列（例えば、ポリペプチドコード配列）および非コード配列（例えば、転写制御エレメント（例えば、プロモーター配列）、ポリアデニル化配列、転写制御配列（例えば、エンハンサー配列））を含む。多くの真核生物遺伝子は、「イントロン」（非コード配列）によって中断された「エキソン」（コード配列）を含む。特定の場合には、遺伝子は、別の遺伝子（例えば、重複遺伝子）と配列を共有し得る。

40

【0065】

遺伝子の「ネイティブな配列」または「野生型配列」は、その遺伝子に対応する遺伝子座を構成するポリヌクレオチド配列（例えば、生物の野生型ゲノムにおいて存在するような、完全に機能的な遺伝子産物の発現に必要な全ての調節配列およびオープンリーディングフレームコード配列）である。遺伝子のネイティブな配列は、例えば、転写プロモーター配列、翻訳増強配列、イントロン、エキソン、およびポリ-Aプロセッシングシグナル部

50

位を含み得る。一般的集団では、野生型遺伝子は、互いに対して配列の変化を含み、なおも認識し得る病理学的影響を引き起こさない、複数の優勢なバージョンを含み得ることが留意される。これらのバリエーションは、「多型」または「対立遺伝子バリエーション」と称される。

【0066】

「置換配列」によって、遺伝子のネイティブまたは野生型の配列の少なくとも一部の代わりとなるポリヌクレオチド配列が意味される。

【0067】

「直鎖状ベクター」または「直鎖化ベクター」は、2つの末端を有するベクターである。例えば、環状ベクター（例えば、プラスミド）は、プラスミド中の1部位で切断する制限エンドヌクレアーゼでの消化によって直鎖化され得る。好ましくは、本明細書中に記載される発現ベクターは、目的の配列内に末端が存在しないように直鎖化される。

10

【0068】

本発明を詳細に記載する前に、本発明が、特定の処方も方法のパラメーターももちろん変動し得るので、特定の処方にも方法のパラメーターにも限定されないことが理解されるべきである。本明細書中で用いられる用語は、本発明の特定の実施形態を記載する目的のためのみであって、限定することを意図しないこともまた理解されるべきである。

【0069】

本明細書中に記載された方法および材料と類似かまたは等価の多数の方法および材料が本発明の実施において用いられ得るが、好ましい材料および方法は、本明細書中に記載される。

20

【0070】

（2．発明を実施する形態）

本願をとおして、種々の刊行物、特許および公開特許出願が、同定する引用によって言及される。本願において援用されるこれらの刊行物、特許、および公開特許明細書の開示は、本発明が属する分野の技術水準を記載するのを助ける。

【0071】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容がそうでないと明らかに示さない限り、複数の言及を含む。従って、例えば、「発現構築物」についての言及は、2以上のこのような因子の混合物を包含する。

30

【0072】

（2．1．0 一般的概観）

1つの局面では、本発明は、チロクロム P 4 5 0 遺伝子（例えば、C y p 3 A 1 1 および C Y P 3 A 4）に由来する転写制御エレメント、これらの制御エレメントを含む発現カセット、この発現カセットを含むベクター構築物、細胞およびトランスジェニック動物、ならびにこの発現カセットを含む細胞およびトランスジェニック動物を例えば、モデリング系、スクリーニング系および／または試験系として使用する方法に関する。本発明の制御エレメント、発現カセット、細胞、およびトランスジェニック動物を用いる方法としては、毒性および薬物代謝に関する研究、ならびに薬物の代謝、安全性および／または可能な毒性についてスクリーニングする方法が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の実施において有用な例示的な転写制御エレメントとしては、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座に由来する転写制御エレメントおよびヒト C Y P 3 A 4 遺伝子座に由来する転写制御エレメントが挙げられる。本発明を支持して実施される実験は、C y p 3 A 1 1 転写制御エレメントまたは C Y P 3 A 4 転写制御エレメントによって媒介される発現の調節に対する化合物の影響が、生存動物において直接的にモニタリングされて、その化合物の影響（例えば、毒性）についての情報を提供し得ることを実証する。

40

【0073】

1つの実施形態では、本発明は、以下に関する：（1）マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子の遺伝子座またはヒト C Y P 3 A 4 遺伝子の遺伝子座に由来する転写制御エレメント（例え

50

ば、プロモーター) ; (2) 遺伝子産物 (例えば、レポーター、タンパク質、ポリペプチド、ホルモン、リボザイム、またはアンチセンスRNA) をコードする遺伝子に作動可能に連結された、このような転写制御エレメントを含む発現カセット、(3) このような発現カセットを含む組換え細胞、(4) このような細胞を用いた安全性および／または可能な毒性についてのスクリーニングの方法 (例えば、本発明の転写制御エレメントによって媒介される発現を調節した化合物の毒性または安全性についてのスクリーニング)、(5) 上記の転写制御エレメント、発現カセット、および／またはベクター構築物を含む動物 (例えば、トランスジェニックまたは「肝臓プッシュ」)、(6) このような動物を用いて安全性および／または毒性をモニタリングする方法、ならびに(7) このような動物を用いて化合物の安全性および／または毒性についてスクリーニングする方法。

10

【0074】

種々の転写制御エレメントは、本発明の実施 (例えば、薬物代謝に関連した遺伝子または遺伝子座由来の転写制御エレメント) において有用である。規定のポリヌクレオチド配列内の選択された転写制御エレメントの特定の位置は、本明細書の教示を考慮して、当業者に公知の方法 (例えば、配列比較、欠失分析、および／またはリンカー挿入変異誘発) によって同定され得る。例示的な転写制御エレメントは、薬物の酸化的代謝に関連した転写制御エレメント (例えば、広範な種々の内因性物質および生体異物を代謝する、P450スーパーファミリーの血液タンパク質) であり得る。このような転写制御エレメントの特定の実施形態としては、マウスCyp3A11遺伝子に関連する転写制御エレメントおよびヒトCYP3A4遺伝子に関連する転写制御エレメントが挙げられる。このようにして、レポーター配列の発現は、例えば、候補薬物の投与後の場合、本発明のトランスジェニック動物において誘導され、そしてその薬物の安全性および／または毒性が、動物全体を用いた非侵襲的画像化方法によって評価され得る。本明細書中に記載される本発明の異なる実施形態の種々の形態は、組み合わせられ得る。

20

【0075】

哺乳動物被験体における発光結合体の非侵襲的画像化および／または検出は、Contagらによる米国特許第5,650,135号および同第6,217,847号 (それぞれ、1997年7月22日発行および2001年4月17日発行) に記載された。この画像化技術は、本明細書の教示を考慮して、本発明の実施において用いられ得る。この画像化方法では、この結合体は、生体適合性実体および光生成部分を含む。生体適合性実体としては、低分子 (例えば、環状有機分子) ; 高分子 (例えば、タンパク質) ; 微生物 (例えば、ウイルス、細菌、酵母および真菌) ; 真核生物細胞 ; 全ての型の病原体および病原性物質 ; ならびに粒子 (例えば、ビーズおよびリボソーム) が挙げられるがこれらに限定されない。別の局面では、生体適合性実体は、画像化される哺乳動物被験体を構成する細胞の全てまたはいくつか (例えば、レポーター配列を発現する、本発明の発現カセットを保有する細胞) であり得る。

30

【0076】

発光能力は、光生成部分の結合体化によって、生物適合性実体に付与される。このような部分としては、蛍光分子、蛍光タンパク質、光子を放出する酵素反応物、および発光物質 (例えば、生物発光タンパク質) が挙げられる。本発明の状況では、発光能力は代表的に、少なくとも1コピーの光生成タンパク質 (例えば、ルシフェラーゼ) の存在を有することによって、標的細胞に付与される。好ましい実施形態では、ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼ活性を有するポリペプチドの発現を促進し得る適切な制御エレメントに作動可能に連結される。ルシフェラーゼの基質は、細胞に対して内因性であっても細胞もしくは系に対して付与されてもよい (例えば、ルシフェラーゼ構築物を保有する細胞を有するトランスジェニックマウスへの、適切なルシフェラーゼ基質 (例えば、ルシフェリン) の注射)。結合体化は、化学的カップリング工程、融合タンパク質の遺伝子操作工程、または光生成タンパク質を発現させるための、細胞、微生物もしくは動物の形質転換を含み得る。

40

【0077】

50

従って、1つの局面では、本発明は、目的の分析物の毒物学研究のための動物試験系および方法に関する。本発明の実施において、2以上のストレス誘導遺伝子の制御エレメント（例えば、プロモーターまたは転写調節配列）が、レポーター遺伝子コード配列（例えば、ルシフェラーゼ）に作動可能に連結されているトランスジェニック哺乳動物または生存プッシュ動物が構築される。レポーター遺伝子産物についての適切な基質は、目的の分析物に加えて、この動物に投与される。これらの2つの物質の投与の順序は、各目的の分析物について経験的に決定され得る。次いで、制御エレメントのいずれかによって媒介される発現の誘導は、動物全体を用いた非侵襲的画像化方法によって評価される。

【0078】

従って、本発明の1つの局面では、本明細書中に記載の動物は、例えば、毒性関連遺伝子（例えば、P450）の発現に対する高生産量（HPV）物の影響を調べることによって、HPVの化学物質のインビボでの効果を評価するために用いられ得る。今日までに、非ポリマー化学物質のセット内に約3,000のHPV化学物質が存在する（ポリマー化学物質は、生物によってほとんど吸収されない傾向があり、従って一般に低い毒性を有する）。本発明の前には、これらの化学物質のインビボでの毒性を評価する慣用的な有効な方法は存在せず、これは、化学物質自体の毒性だけではなく、その代謝産物（例えば、分解産物）の毒性をも考慮する。

【0079】

化学物質の製造業者および輸入業者は、United States Environmental Protection Agency（EPA）によって、それらの高生産量（HPV）の化学物質についての基本的毒性情報を提供するように促されている。HPV化学物質は、1年あたり100万ポンドを超える量で合衆国において産生されるかまたは合衆国へと輸入される化学物質である。自主計画に参加する各化学物質の会社は、その会社が試験に適合する化学物質を同定すると確約する。EPAによって確立されたガイドラインに従って、参加する会社は、以下の作業を行う：既存のデータの妥当性の評価；試験計画の設計および提出；作成された試験結果を提供する；そして各化学物質を特徴付けするデータのまとめを準備する。現在、自主計画は、スクリーニング情報データセット（Screening Information Data Set：SIDS）プログラムによって用いられる、同じ試験、試験プロトコル、および基本情報のまとめの様式を使用する。SIDSは、世界中のHPV化学物質についての基本的毒性情報を補償する、協調的国際的努力である。従って、米国の国内計画のために準備された情報は、国際的努力において受け入れられ得る。

【0080】

米国が輸入また生産する約3,000個の化学物質は、100万lbs./yr.よりも多く、近年のEPA分析は、43%のこれらの高い生産量の化学物質は、基本的な毒性に基づく試験データを有さず、そして7%のみしか完全なセットの基本的な試験データを有さないことを見出す（<http://www.epa.gov/opptintr/chemtrk>）。この試験データの欠除は、環境、家、仕事場、および製品中に見出される化学物質について知る公衆の権利を損なう。

【0081】

毒性についての高い産生量（HPV）化学物質をスクリーニングするための国際的に承諾されている6つの基本的な試験がある。Organization for Economic Cooperation and Development's Screening Information Data Set（OECD/SIDS）プログラムの下で承諾された試験としては、以下が挙げられる：急性毒性；慢性毒性；発生／生殖毒性；変異原性；生態毒性および環境破壊。これらの試験のいくつかは、動物モデルに依存し、ここで動物モデルは、毒性データを入手するために屠殺されなければならない。本明細書中に記載されるトランスジェニック動物は、毒性試験について有用であり、そしてモデルの「最終点での死（death as the end-point）」の必要性を避けるために有用である。従って、毒性を評価するための本発明のトランスジェニック

動物の使用は、毒性試験のより人道的な手段を提供する。さらに、本発明のレポーター発現カセットを保有するトランスジェニック動物を使用すると、「最終点での死」は必ずしも必要でないので、生きた動物における毒性試験に関するコストが削減され得るようである。

【0082】

EPA's Chemical Hazard Data Availability Study は、公的に容易に利用可能である基本的情報における大きなギャップを見出した。大半の消費者は、基本的な毒性試験は、有効であり、そして今日販売されている全ての化学物質は安全であると想定している。近年の EPA 研究は、これは賢明な想定ではないことを見出している。EPA は、公的に利用可能なデータを審査し、そしてこれらの大半は、これらがヒトまたは環境に対してどの程度毒性であるかを決定する試験を全くなされていないことを突き止めた。EPA は、基本的な情報なしで HPV 消費者化学物質の危険 (hazard) および危険性 (risk) の判断を始め得ず、実は、実際により詳細かつ徹底的な試験が、これらの高度に曝露された化学物質を評価するために必要とされる (<http://www.epa.gov/opptintr/chemtrk>)。企業が、この問題により本気で取り組むことが必要であることは、明らかである。

10

【0083】

SIDS 試験は、化学物質の毒性を完全には測定しない。この試験は、化学物質の関連する危険性を決定するため、およびさらなる試験が必要な否かを決定するために使用され得る最小限のセットの情報のみを提供する。しかし、本発明のトランスジェニック動物は、これらの化学物質およびその代謝物の危険性について利用可能な情報を多いに展開し得るインビボ毒性試験についてのモデルを提供する。

20

【0084】

OSHA は、仕事場における危険な化学物質についての可能な曝露制限 (Permissible Exposure Limits) (PEL) を設定する。PEL を伴う化学物質は、ヒト健康効果について少なくとも換算に試験されることが当然期待される。しかし、PEL を伴う高容量の化学物質でさえも、基本的なスクリーニング試験設定のヒト健康部分と有意なデータギャップを有する。PEL を伴うこれらの高容量の化学物質の 53% のみが、4 つ全てのヒト健康指標についての基本的なスクリーニング試験を有する。対照的に、5% の非 PEL HPV 化学物質の 5% のみが、4 つ全ての健康効果試験を有し、そして 49% は、利用可能な健康試験データを有さない (<http://www.epa.gov/opptintr/chemtrk>)。従って、最小限データの PEL 欠損も有さない HPV 化学物質のかさは、労働者を保護する PEL 値の開発を支持するために必要とされる。本発明のトランスジェニック動物は、化学物質それ自体のみだけでなくこれらの化学物質の代謝産物の毒性も考慮するインビボデータを特異的に提供する毒性を試験するための手段を提供する。

30

【0085】

最終的に、消費者の製品に含まれる化学物質は、子供および他の感受性の集団 (例えば、妊婦および健康を損なった個体) へのその曝露の傾向に起因する主な観点である。化学産業が、他の HPV 化学物質よりもこれらの化学物質についてより多く基本的試験を行っているが、本発明のトランスジェニック動物を用いるインビボ毒性のより完全な評価が、所望される。消費者の製品の大きな曝露ポテンシャルを与えるために、有意により多量の試験が、このような化学物質の危険性を評価するために必要とされる。本明細書中に記載されるトランスジェニック動物は、この必要性への対処を助ける。

40

【0086】

本発明の関連する局面において、本明細書中に記載されるトランスジェニック動物は、内分泌攪乱物質 (ED) のインビボでの効果を評価するために使用され得る。ED は、内分泌系の正常な機能に緩衝する代表的な化学物質である (例えば、農薬および肥料が挙げられる)。公的な目的の観点および U. S. Federal Government から試験についての命令の両方において、HPV および潜在的な内分泌攪乱物質の評価に

50

についての必要性の増大は、トランスジェニック動物によって対応され、そして本発明の化合物スクリーニング方法を伴うようである。

【0087】

いくつかのストレス関連遺伝子、およびそのプロモーター／コントロールエレメントは、以下により詳細に記載される。

【0088】

(2.2.0 プロモーター)

本明細書中に記載される発現カセット、ベクター、細胞およびトランスジェニック動物は、検出可能な遺伝子産物をコードする遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子）を含み、転写制御エレメント（例えば、プロモーター）に作動可能に連結される。コノプロモーターは、トランスジェニック動物と同じ種（例えば、トランスジェニックマウスを作製するための構築において使用されるマウスプロモーター）または異なる種（例えば、トランスジェニックマウスを作製するための構築において使用されるヒトプロモーター）に由来し得る。このプロモーターは、目的の任意の遺伝子に由来し得る。本発明の1つの実施形態において、このプロモーターは、その発現が、酸化的代謝（例えば、肝臓を介した薬物のクリアランス）の間に誘導される遺伝子に由来する。従って、薬物が、本発明のベクター構築物を保有するトランスジェニック動物に投与される場合、プロモーターは誘導され、そして動物は、ルシフェラーゼを発現し、これは、インビボでモニターされ得る。

【0089】

本発明の使用についての例示的な転写制御エレメント（例えば、プロモーター）としては、P450-関連遺伝子および遺伝子ファミリー由来のプロモーターが挙げられるがこれらに制限されない。ヒトにおいて、40個の異なるP450遺伝子（「CYP」遺伝子と称される）および13個の偽遺伝子が、現在知られている。これらの遺伝子は、アミノ酸配列類似性に基づいて16のファミリーに分類される。ファミリー1、2および3は、薬物代謝に関連し、そしてヒトにおける90%を超える薬物酸化は、6つのCYP遺伝子（1A2、2C9、2C19、2D6、2E1および3A4）のみに寄与する。1A2、2C9、2D6および3A4が最も寄与し、CYP3A4は活性の50～60%と見積もられる。マウスCyp3A11は、例えば、Yanagimoto Tら（1997）Archives of Biochemistry and Biophysics 340（2）：215～8およびToide Kら、（1997）Archives of Biochemistry and Biophysics 338（1）：43～49に記載される。ヒトCYP3A4は、例えば、Hashimoto H.ら（1993）に記載される。Eur J Biochem. 218（2）：585～95；Goodwin B.ら（1999）Mol Pharmacol. 56（6）：1329～39；およびBertilsson G.ら（1998）Proc Natl Acad Sci USA. 95（21）：12208～13に記載される。本明細書中で、マウスCyp3A11由来の転写制御エレメントおよびヒトCYP3A4由来の転写エレメントが例示される。

【0090】

当業者が、本明細書の技術の観点を理解する場合、転写制御エレメント配列は、本明細書中の技術の観点において当該分野において公知の方法を用いて、例えば、ゲノム配列に由来して、単離され得る。例えば、Cyp3A11の転写制御エレメント配列を、以下の実施例1に記載されるように単離し、そして配列決定した。

【0091】

同様に、肝臓特異的発現を与える配列を、CYP3A4遺伝子から得た。HIF4、COUP-TF/HIF4、GRE、リファンピシン、Dex応答エレメントが、CYP3A4の10.5 kbプロモーター領域に位置することが示唆されている（Goodwinら、前出）。しかし、本出願以前に、この遺伝子座の遠位の2.5 Kb領域の調節エレメントは記載されていない。本明細書中に記載されるように、10.5 Kbおよび13 Kbのプロモーターの活性を、肝臓プッシュ（liver-push）実験およびトランスジ

ェニック動物において比較した場合、13 Kbのプロモーターは、10.5 Kbプロモーターよりも肝臓においてはるかに高い発現を媒介することを見出した。実際、肝臓押出し実験は、13 Kbプロモーター活性は、10.5 Kbプロモーターを用いて観察された活性よりも25倍高いことを示した。さらに、13 Kbプロモーターを含有するトランスジェニックマウスにおけるルシフェラーゼ発現は、ルシフェラーゼレポーターが肝臓において最高であることを示した一方で、10.4 Kbトランスジェニック動物におけるルシフェラーゼ発現は、腸において高い。従って、肝臓押出し実験およびトランスジェニック動物から得られたデータは、CYP3A4プロモーターの約2.5 Kb端のフラグメントが、肝臓特異的遺伝子発現を劇的に増強することを実証する。この2.5 Kbにおける潜在的な転写因子結合部位としては：4つの潜在的なHNF-3b部位（逆方向）および2つのHNF-3b部位（順方向）が挙げられる。

10

【0092】

プロモーター配列単離の別の例示的な方法は、Clontech (Palo Alto, CA) から市販されているGenome Walker（登録商標）キットを用い、そしてこのキットは、Clontechのカatalog (1997~1998) の27ページに記載される。

【0093】

(2.2.1 マウスCyp3A11およびヒトCYP3A4転写制御エレメント配列)

本発明の対象の核酸（例えば、実施例1に記載される）は、広範な種々の適用を見出し、この適用としては、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用、PCRプライマー、化合物スクリーニングに有用な発現カセット、Cyp3A11もしくはCYP3A4遺伝子またはその改変体の存在の検出、遺伝子転写物の存在の検出、さらなるCyp3A11もしくはCYP3A4プロモーター配列またはそのホモログ（および構造的アナログ）をコードする核酸の検出または増幅、ならびに種々のスクリーニングアッセイが挙げられる。

20

【0094】

本発明は、毒性または薬剤を検出するための有効な方法を提供し、この薬剤は、Cyp3A11もしくはCYP3A4遺伝子転写のレベルで活性である。転写発現のための広範な種々のアッセイが、本発明の教示に基づいて使用され得、これらとしては、細胞ベースの転写アッセイ、トランスジェニック動物におけるインビボでのスクリーニング、およびプロモータータンパク質結合アッセイが挙げられる。例えば、開示されたルシフェラーゼレポーター構築物は、細胞ベースの転写アッセイのために細胞をトランスフェクトするために使用される。例えば、初代の内皮細胞は、マイクロタイタープレート上に蒔かれ、そしてルシフェラーゼ発現によってモニターされるように、Cyp3A11またはCYP3A4遺伝子プロモーターの転写調節を調節する化合物についての候補因子のライブラリーをスクリーニングするために使用される（以下の実施例を参照のこと）。

30

【0095】

上記のように、本発明は、組換え核酸分子に関連し、この核酸分子は、マウスCyp3A11遺伝子座またはヒトCYP3A4遺伝子座に由来する転写制御エレメントを含む。特に、配列番号12、配列番号13、配列番号14および配列番号15を含む組換え核酸分子、ならびにそのフラグメントが記載される。このフラグメントは、開示される配列に対して約80%~100%、およびその間の整数値、ならびに参照の配列（すなわち、本発明の配列）に対して少なくとも80~85%、好ましくは85~90%、より好ましくは90~95%、そして最も好ましくは98~100%の配列同一性を有する。本発明としてはまた、上記のポリヌクレオチド配列に実質的に相補的な核酸配列、またはそのフラグメント、および上記のポリヌクレオチド配列もしくはそのフラグメントに特異的にハイブリダイズする核酸配列が挙げられ得る。

40

【0096】

本発明は、本明細書の技術（配列情報および単離方法（例えば、実施例1））が挙げられ

50

るがこれらに限定されない)に基づいて同定された転写制御エレメント配列(例えば、プロモーター配列)をさらに含む。

【0097】

本発明の核酸分子は、トランスフェクト細胞、肝臓押出し動物およびそれ自体が種々の適用において有用であるトランスジェニック動物の生成、ならびにP450一媒介代謝を調節する化合物の安全性および/または可能な毒性のスクリーニングについて有用である(実施例2~4を参照のこと)。

【0098】

当業者は、単離についての分子の標準的な手順、およびCyp3A11およびCYP3A4転写制御エレメントの特徴、その宿主細胞へのトランスフェクション、および上記のCyp3A11またはCYP3A4プロモーターに作動可能に連結した異種DNAの発現を補充した明細書の支持に従って、本発明を実施し得る。例えば、DNAは、リン酸カルシウム媒介遺伝子転移、エレクトロポレーション、リポフェクション、ウイルス感染などによってレシピエントの哺乳動物細胞中に一般に移されるか、または導入される。遺伝子転移および発現のための一般的な方法およびベクターは、例えば、M. Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, Stockton Press (1990)に見出され得る。インビボでの細胞への直接的な遺伝子転移は、例えば、改変されたウイルスベクター(レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびヘルペスウイルス、リボソーム、および特定の細胞型へのDNAの直接注入が挙げられるが、これらに限定されない)によって達成され得る。この様式において、所望の異種遺伝子に作動可能に連結された本発明のCyp3A11およびCYP3A4転写制御エレメントを含む組換え発現ベクターおよび組換え細胞は、インビボで特定の標的細胞に送達され得る。例えば、Wilson, Nature, 365:691~692 (1993); Plautzら, Annals NY Acad. Sci., 716:144~153 (1994); Farhoodら, Annals NY Acad. Sci. 716:23~34 (1994)およびHydeら Nature, 362:250~255 (1993)を参照のこと。さらに、細胞は、エキソビボで形質転換され得、そして注射(例えば、関節内、皮内、筋内など)によって局在的部位に直接導入され得る。さらに、組換え発現ベクターは、例えば、静脈内注射による動物への肝臓押出しを介して送達され得る(以下の実験材料および方法を参照のこと)。

【0099】

Cyp3A11遺伝子座由来の転写制御エレメントおよびCYP3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのクローニングおよび特徴づけは、以下の実施例1に記載される。CYP3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのクローニングおよび特徴づけについてもまた、以下の実施例に記載される。マウスCtp3A11遺伝子座およびヒトCYP3A4遺伝子座の5'非コード領域のいくつかの領域の特徴は、実施例5に表される(図18および19もまた参照のこと)。

【0100】

本発明は、作動可能に連結した異種遺伝子配列の転写を独身するのに有効なポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、マウスCyp3A11遺伝子の5'非コード領域に由来する。本発明の1つの局面は、約1.3kbの配列(配列番号12)およびそのフラグメントを含み、特に、転写プロモーターおよび/または転写制御配列として機能し得るフラグメントを含む。

【0101】

1つの実施形態において、本発明の転写制御エレメントとしては、配列番号12のヌクレオチド1~11, 002に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むマウスCyp3A11遺伝子由来のポリヌクレオチドを含む。本発明の1つの局面は、約9.3kbの配列(配列番号13)およびそのフラグメントを含み、特に、転写プロモーター

10

20

30

40

50

および／または転写制御配列として機能し得るフラグメントを含む。1つの実施形態において、本発明の転写制御エレメントとしては、配列番号13に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むマウスCyp3A11遺伝子由来のポリヌクレオチドが挙げられる。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントとしては、マウスCyp3A11由来のポリヌクレオチドが挙げられ、このポリヌクレオチドは、配列番号13のヌクレオチド5104～6218に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、マウスCyp3A11遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号13のヌクレオチド6792～9330に90%以上同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、マウスCyp3A11由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号13のヌクレオチド5104～6218に90%以上の同一性を有する第1のポリヌクレオチド、および配列番号13のヌクレオチド6792～9330に90%以上の同一性を有する第2のポリヌクレオチドを含む。

10

【0102】

本発明のポリヌクレオチド（例えば、9.3kbの配列（配列番号13）を含むポリヌクレオチド、またはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド）はまた、基底プロモーター（例えば、基底プロモーターは、転写を促進するために必要な最小単位を含み得る（例えば、TATAボックス））上の特定の調節特徴を与えるために、基底プロモーターと関連し得る。

【0103】

本発明は、単離されたポリヌクレオチド（例えば、記載されるようなポリヌクレオチド）、このようなポリヌクレオチドの使用法、このようなポリヌクレオチドを含むベクター、このようなポリヌクレオチドを含む発現カセット、このようなポリヌクレオチドを含むベクター、このようなポリヌクレオチドを含む組み換え細胞、このようなポリヌクレオチドを含む肝臓押し出し非ヒト動物、およびこのようなポリヌクレオチドを含むトランスジェニック非ヒト動物が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、本発明は、レポーター遺伝子（例えば、光生成タンパク質）に作動可能に連結した3A11由来のポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウス）を含む。

20

【0104】

本発明は、作動可能に連結した異種遺伝子配列の転写を促進するために有効なポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、ヒトCYP3A4遺伝子の5'非コード領域に由来する。本発明の1つの局面は、約13kbの配列（配列番号14）およびそのフラグメントを含み、特に、転写プロモーターおよび／または転写調節配列として機能し得るフラグメントを含む。1つのこのような例示的なフラグメントは、配列番号15によって同定される。1つの実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、配列番号14のヌクレオチド1～13,032に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含むヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含む。

30

【0105】

1つの実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、配列番号14に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド1290～2446に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド2758～4111に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド4424～6010に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写

40

50

制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド6317～9099に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド9401～12998に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチドを含む。なお別の実施形態において、本発明の転写制御エレメントは、ヒトCYP3A4遺伝子由来のポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号14のヌクレオチド1290～2446に90%以上の同一性を有する第1のポリヌクレオチド、配列番号14のヌクレオチド2758～4111に90%以上の同一性を有する第2のポリヌクレオチド、配列番号14のヌクレオチド4424～6010に90%以上の同一性を有する第3のポリヌクレオチド、配列番号14のヌクレオチド6317～9099に90%以上の同一性を有する第4のポリヌクレオチド、および配列番号14のヌクレオチド9401～12998に90%以上の同一性を有する第5のポリヌクレオチドを含む。

10

【0106】

本発明のポリヌクレオチド（例えば、約13kbの配列（配列番号14）を含むポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを含むポリヌクレオチド）はまた、基底プロモーター（例えば、基底プロモーターは、転写を促進するために必要な最小限の単位（例えば、TATAボックス）を含む）上に特定の調節特徴を与えるために基底プロモーターと結合し得る。

20

【0107】

本発明は、単離されたポリヌクレオチド（例えば、記載されるようなポリヌクレオチド）、このようなポリヌクレオチドの使用法、このようなポリヌクレオチドを含むベクター、このようなポリヌクレオチドを含む発現カセット、このようなポリヌクレオチドを含むベクター、このようなポリヌクレオチドを含む組み換え細胞、このようなポリヌクレオチドを含む肝臓押し出し非ヒト動物、およびこのようなポリヌクレオチドを含むトランスジェニック非ヒト動物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0108】

本発明の1つの局面の好ましい実施形態は、トランスジェニック非ヒト動物を含み、これは、（例えば、ルシフェラーゼのような光生成タンパク質をコードする）異種遺伝子配列に作動可能に連結したヒトCYP3A4遺伝子由来の転写制御エレメント（例えば、配列番号14のヌクレオチド1～13,032に90%以上の同一性を有するポリヌクレオチド配列）を含む。1つの実施形態において、トランスジェニック非ヒト動物は、hPXR（ヒトリファンピシンコレセプター）をコードするポリヌクレオチドを含まず、すなわち、トランスジェニック非ヒト動物は、機能的ヒトPXRタンパク質を発現しない。例えば、トランスジェニックげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）は、ヒトCYP3A4遺伝子由来の転写制御エレメントを含むように生成されているが、この動物は、ヒトリファンピシンコレセプターを発現しない（実施例6を参照のこと）。

30

【0109】

（2.3.0 発現カセットおよびベクター）

40

本明細書中に記載される発現カセットは、代表的に以下の成分を含む：（1）レポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチド（例えば、光生成タンパク質をコードする配列）、（2）レポーター遺伝子配列に作動可能に連結した転写制御エレメント、ここで、この制御エレメントは、光生成タンパク質のコード配列（例えば、本発明のCyp3A11配列およびCYP3A4配列）に異種である。本明細書中で提供された配列に由来する転写制御エレメントは、例えば、基底転写プロモーター上のこのような制御エレメントによって提供される調節を与えるための基底転写プロモーターと結合され得る。例示的な発現構築物は、実施例1に記載される。

【0110】

本発明はまた、ベクター中の発現カセットを提供する工程を包含し、このベクターは、

50

例えば、適切なベクター骨格および骨格マーカー（例えば、ポジティブもしくはネガティブな選択マーカー）をコードする必要に応じた配列）を含む。適切なベクター骨格としては、一般に、F1複製起点；colE1プラスミド由来の複製起点；ポリアデニル化配列；抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性）および他の調節もしくは制御エレメントをコードする配列が挙げられる。適切な骨格の非制限的な例としては、以下が挙げられる：pBluescriptSK(Stratagene, La Jolla, CA)；pBluescriptKS(Stratagene, La Jolla, CA)および他の市販のベクター。

【0111】

種々のレポーター遺伝子が、本発明の実施において使用され得る。慣用的なアッセイで容易に測定されるタンパク質産物を生成するものが好ましい。適切なレポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、光生成タンパク質(例えば、ルシフェラーゼ)、およびβ-ガラクトシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。都合のよいアッセイとしては、熱量アッセイ、蛍光アッセイ、および酵素アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。1つの局面において、レポーター遺伝子が使用され、これは、細胞内で発現され、そしてその細胞外産物は、細胞内媒体、または培養された細胞株の細胞内媒体の抽出物で直接測定される。これは、その産物が分泌されるレポーター遺伝子の使用に渡って利点を提供する。なぜならば、この分泌の速度および効率は、アッセイの解釈を完全にし得るさらなる可能性を誘導するからである。好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、光生成タンパク質である。本明細書中に記載される光生成レポータータンパク質を用いる場合、発現は、上記のように迅速かつ非侵襲的に評価され得る(例えば、Contag, P. R., ら(1998) Nature Med. 4:245~7; Contag, C. H., ら(1997) Photochem Photobiol. 66:523~31; Contag, C. H., ら(1995) Mol Microbiol. 18:593~603を参照のこと)。

【0112】

本発明の1つの局面において、光生成体は、ルシフェラーゼである。本発明の実施において有用なルシフェラーゼコード配列としては、lux遺伝子から得られた配列(ルシフェラーゼ活性をコードする原核生物遺伝子)、およびluc遺伝子(ルシフェラーゼ活性をコードする真核生物遺伝子)が挙げられる。同定されている種々のルシフェラーゼコード遺伝子としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：B. A. SherfおよびK. V. Wood, 米国特許第5, 670, 356号(1997年9月23日発行)；Kazami, Jら、米国特許第5, 604, 123号(1997年2月18日発行)；S. Zennoら、米国特許第5, 618, 722号；K. V. Wood, 米国特許第5, 650, 289号(1997年7月22日発行)；K. V. Wood, 米国特許第5, 641, 641号(1997年6月24日発行)；N. KajiyamaおよびE. Nakanano, 米国特許第5, 229, 285号(1993年7月20日発行)；M. J. CormierおよびW. W. Lorenz, 米国特許第5, 292, 658号(1994年3月8日発行)；M. J. CormierおよびW. W. Lorenz, 米国特許第5, 418, 155号(1995年3月23日発行)；de Wet, J. R., ら、Molec. Cell Biol. 7:725~737, 1987；Tatsumi, H. N., ら、Biochim. Biophys. Acta 1131:161~165, 1992；ならびにWood, K. V., ら、Science 244:700~702, 1989。生体発光タンパク質の別の群としては、エクオリン(aequorin)ファミリーの光生成タンパク質が挙げられる(Prasher, D. C., ら、Biochem. 26:1326~1332(1987))。ルシフェラーゼおよびエクオリン様分子は、エネルギー源(例えば、ATP、NAD(P)Hなど)、および基質(例えば、ルシフェリンまたはコエレントリジンおよび酸素)を必要とする。

【0113】

野生型ホタルルシフェラーゼは、典型的には約550nmで発光極大を有する。異なる

発光極大を持つ多くの改変体もまた、研究されている。例えば、KajiyamaおよびNakano (Protein Eng. 4 (6): 691-693, 1991; 米国特許第5,330,906号、1994年7月19日発行)は、Luciola cruciatalルシフェラーゼコード配列に対する単一のアミノ酸変化によって作製される5つの改変体ホタルルシフェラーゼを教示する。これらの改変体は、558nm、595nm、607nm、609nmおよび612nmの発光ピークを有する。約540nmの発光ピークを有する黄緑色ルシフェラーゼは、Promega, Madison, WIから、pGL3の商品名で市販されている。約610nmの発光ピークを持つ赤色ルシフェラーゼは、例えば、Contagら (1998) Nat. Med. 4: 245-247およびKajiyamaら (1991) Port. Eng. 4: 691-693に記載されている。Renilla muelleri由来のルシフェラーゼのコード配列もまた、記載されている (mRNA、GENBANK登録番号AY015988、タンパク質登録番号AAG54094)。

10

【0114】

本発明の別の局面において、光生成タンパク質は、蛍光タンパク質 (例えば、青色蛍光タンパク質、青緑色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質) である。

【0115】

いくつかの光生成タンパク質コード配列が市販されており、このコード配列としては以下が挙げられるが、これらに限定されない。Clontech (Palo Alto, CA) は、ルシフェラーゼおよび種々の蛍光タンパク質 (青色蛍光タンパク質、青緑色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、および赤色蛍光タンパク質を含む) についてのコード配列を提供する。増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 改変体は、哺乳動物系においてよく発現され、そして野生型GFPよりもより明るい蛍光を示す傾向がある。増強蛍光タンパク質としては、増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、増強青緑色蛍光タンパク質 (ECFP)、増強黄色蛍光タンパク質 (EYFP) が挙げられる。さらに、Clontechは、迅速な代謝速度を特徴とする、不安定化増強蛍光タンパク質 (dEGFP) 改変体を提供する。dEGFP改変体のより短い半減期は、その改変体を、反応速度論的研究に有用であり、かつ定量的レポーターとして有用なものにする。DsRedコード配列は、Clontech (<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsD/text/pDsRed.txt>) から入手可能である。DsRedは、発現研究において有用な赤色蛍光タンパク質である。さらに、Fradkov, A. F., らは、Discosoma coral由来の新規の蛍光タンパク質および特有の塩赤外の蛍光を呈するその変異体を記載する (FEB S Lett. 479 (3), 127-130 (2000)) (mRNA配列、GENBANK登録番号AF272711、タンパク質配列、GENBANK登録番号AAG16224)。Promega (Madison, WI) もまた、ホタルルシフェラーゼについてのコード配列を提供する (例えば、pGL3ベクターに含まれるような)。さらに、多くの蛍光タンパク質についてのコード配列は、GENBANKから入手可能である (例えば、登録番号AY015995、AF322221、AF080431、AF292560、AF292559、AF292558、AF292557、AF139645、U47298、U47297、AY015988、AY015994、およびAF292556)。

20

30

40

【0116】

改変されたluxコード配列がまた、例えば、WO01/18195 (2001年3月15日公開、Xenogen Corporation) に記載されている。さらに、例えば、細胞中の発現を評価する場合に、さらなる光生成系が使用され得る。このような系としては、Luminescent β -galactosidase Genetic Reporter System (Clontech) が挙げられるが、これに限定されない。

50

【0117】

陽性選択マーカーとしては、容易にアッセイされ得る生成物である任意の遺伝子が挙げられる。その例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：H P R T 遺伝子（L i t t l e f i e l d, J. W., S c i e n c e 145:709-710 (1964)）、キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（G P T）遺伝子、またはアデノシンホスホリボシルトランスフェラーゼ（A P R T）遺伝子（S a m b r o o kら、前出）、チミジンキナーゼ遺伝子（すなわち「T K」）および特に単純ヘルペスウイルスのT K 遺伝子（G i p h a r t - G a s s l e r, M. ら、M u t a t . R e s . 214:223-232 (1989)）、n p t I I 遺伝子（T h o m a s, K. R. ら、C e l l 51:503-512 (1987)；M a n s o u r, S. L. ら、N a t u r e 336:348-352 (1988)）、またはアミノ酸もしくはヌクレオシドアナログ、または抗生物質などに対する耐性を付与する他の遺伝子（例えば、ジヒドロフォレートレダクターゼ（D H F R）酵素、アデノシンデアミナーゼ（A D A）、アスパラギンシンテターゼ（A S）、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ、もしくはC A D 酵素（カルバミルリン酸シンセターゼ、アスパルテートトランスカルバミラーゼ、およびジヒドロオロターゼ）のような酵素をコードする遺伝子配列）。ポジティブ選択マーカーの適切な基質の添加は、ポジティブ選択マーカーの産物が発現されるか否かを決定するために使用され得、例えば、ポジティブ選択マーカー n p t I I を発現しない細胞は、基質 G 4 1 8（G i b c o B R L L i f e T e c h n o l o g y, G a i t h e r s b u r g, M D）に曝された場合に殺傷される。

【0118】

このベクターは、典型的には目的のポリヌクレオチド配列（例えば、本発明の C y p 3 A 1 1 配列および C Y P 3 A 4 配列）を挿入するための挿入部位を備える。これらの挿入部位は、好ましくは、陽性選択マーカー、ルシフェラーゼおよびプロモーターをコードする配列のいずれかの側における、2つの部位、1つの部位に存在するような部位に含まれる。挿入部位は、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識部位であり、そして例えば、独特の制限部位を示し得る。このように、このベクターは、適切な酵素消化され得、そして目的の配列でベクター中に連結され得る。

【0119】

必要に応じて、このベクター構築物は、ネガティブ選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含み得る。適切なネガティブ選択マーカーとしては、H S V - t k（例えば、M a j z o u b ら（1996）N e w E n g l . J. M e d. 334:904-907および米国特許第5,464,764号）、およびジフテリア毒素、テタナス毒素、コレラ毒素および百日咳毒素を含む種々の毒素をコードする遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。さらなるネガティブな選択マーカー遺伝子は、6-チオグアニン中でのネガティブ選択のためのヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H P R T）遺伝子である。

【0120】

本発明の実施に使用するための例示的なプロモーターは、上に記載される。

【0121】

（ベクター構築物）：本明細書中に記載されるベクターは、本明細書中の教示を考えると、分子生物学の分野で公知の方法論（例えば、A u s u b e l または M a n i a t i s を参照のこと）を使用して構築され得る。上記のように、発現カセットを含むベクター構築物は、所望の成分を適切なベクター骨格に挿入することによって構築される。そのベクター骨格は、例えば、（1）光生成タンパク質（例えば、目的の転写制御エレメントに作動可能に連結されたルシフェラーゼ遺伝子）のようなレポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチド；（2）ポジティブ選択マーカーをコードする配列；および必要に応じて（3）ネガティブ選択マーカーをコードする配列がある。さらに、このベクター構築物は、目的のさらなる配列が、ポジティブ選択マーカーをコードする配列およびルシフェラーゼコード配列に隣接するように容易に挿入され得るような挿入部位を含む。

【0122】

ポリヌクレオチド、適切な制御配列（例えば、プロモーター）を得る好ましい方法は、PCRである。PCRについての一般的な手段は、MacPhersonら、PCR: A PRACTICAL APPROACH, (IRL Press at Oxford University Press, (1991))に教示されるとおりである。各適用反応についてのPCR条件は、経験的に決定され得る。パラメータの数は、反応の成功に影響する。これらのパラメータとしては、アニーリングの温度および時間、伸長時間、Mg²⁺濃度およびATP濃度、pH、ならびにプライマー、テンプレートおよびデオキシリボヌクレオチドの相対濃度がある。例示的なプライマーは、以下の実施例に記載される。増幅後、得られたフラグメントは、アガロースゲル電気泳動、続く臭化エチジウム染色での可視化および紫外線照射によって検出され得る。

10

【0123】

1つの実施形態において、PCRは、ゲノムライブラリ由来のフラグメントを増幅するために使用され得る。多くのゲノムライブラリは、市販されている。あるいは、ライブラリは、当該分野で公知の任意の方法によって作製され得る。好ましくは、DNAが由来する生物は、識別可能な疾患も表現型効果 (phenotypic effect) も有さない。この単離されたDNAは、任意の細胞供給源または体液（例えば、ES細胞、肝臓、腎臓、血球、頬細胞、腔頸管細胞 (cervicovaginal cell)、尿由来の上皮細胞、胎児細胞、または生検、尿、血液、脳脊髄液 (CSF)）によって得られた組織中に存在する任意の細胞および感染部位または炎症部位で浸出する組織）から得られ得る。DNAは、細胞溶解およびDNA精製の公知の方法を使用して細胞または体液から抽出される。次いで、この精製されたDNAを、適切な発現系（例えば、λファージ）に導入する。ポリヌクレオチド（例えば、短く、ランダムなヌクレオチド配列）を得るための別の方法は、例えば、酵素消化によるものである。

20

【0124】

ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を使用してベクター骨格に挿入される。例えば、挿入DNAおよびベクターDNAが、適切な条件下で、互いに対合し得かつリガーゼで連結され得る各分子上で、相補的末端または平滑末端を作製するための制限酵素と接触され得る。あるいは、合成核酸リンカーは、ポリヌクレオチドの末端に連結され、ベクターDNA中の特定の制限部位に対応する核酸配列を含み得る他の手段が公知であり、そして本明細書中の教示を考慮して使用され得る。

30

【0125】

このベクター骨格は、シャトルベクターを提供するために、1種より多い選択された生物中で機能する成分（例えば、細菌の複製起点および真核生物プロモーター）を含み得る。あるいは、このベクター骨格は、組み込みベクター（すなわち、標的ゲノムへのランダムな、または部位特異的な組み込みのために使用されるベクター）を構成し得る。

【0126】

最終的な構築物は、（例えば、ES細胞への導入のため、または肝臓プッシュアッセイ (liver-push assay) のために）すぐに使用され得るか、または使用されるまで（例えば、-20℃で）凍結保存される。いくつかの実施形態において、この構築物は、例えば、適切な制限エンドヌクレアーゼによる消化によって、使用の前に直線化される。

40

【0127】

(2.4.0 レバープッシュ動物)

本発明の発現カセットは、本明細書中に記載される方法を実施するために動物中に（ゲノム外で）導入され得る。高レベルでの外来性遺伝子発現は、裸のプラスミドDNAの直接的な中syを介して筋肉および肝臓中で得られている。さらに、高レベルの発現はまた、肝臓または筋肉に供給する血管中に裸のプラスミドDNAを直接的に、血管内に投与することで達成され得る。Wolfら (1990) Science 247:1465-1468; Budkerら (1996) Gene Ther 3:593-598; Bu

50

dkerら(1998) Gene Ther 5:272-276; Zhangら(1997) Human Gene Ther 8:1763-1772を参照のこと。最近、Zhangら(1999) Human Gene Ther 10:1735-1737によって、高レベルの外來性遺伝子の発現が、裸のプラスミドDNAの尾静脈注射後の肝細胞中で見られることが報告された。

【0128】

従って、好ましい実施形態において、本明細書中に記載される発現カセットは、静脈内(例えば、マウスの尾静脈中)に肝細胞中の発現を達成するのに十分な量、用量および期間で注射される。このような量および容量の決定は、当業者の範囲内である。例えば、DNA注射の容量は、好ましくは、比較的大きく、例えば、約1~10mLの間、より好ましくは、約1~5mLの間、なおより好ましくは約1~3mLの間、および最も好ましくは約2.5mLである。このDNAは、水溶液、またはリンガー溶液のような任意の薬学的に受容可能なビヒクルで投与され得る。他の受容可能なビヒクルは、当業者に公知であり、そして例えば、Remington(前出)に記載される。DNAの量が同様に決定され得、その量は、好ましくは約5~1000μgの間、より好ましくは、約10~500μgの間、そしてなおより好ましくは、10~300μgの間である。さらに、この注入は、比較的迅速であることが好ましく、例えば、2分間未満にわたって全容量が注入され、より好ましくは1分間未満にわたってそしてなおより好ましくは30秒間未満にわたって全体量が注入される。

【0129】

(2.5.0 トランスジェニック動物)

本発明の発現カセットは、本発明の方法を実施する目的のためのトランスジェニック動物を作製するために、動物のゲノムに導入され得る。本発明の好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は、トランスジェニックげっ歯類(例えば、マウス、ラット、またはモルモット)である。光生成タンパク質がレポーターとして使用される場合、画像化が、典型的にはインタクトな生存非ヒトトランスジェニック動物(例えば、生存トランスジェニックげっ歯類(例えば、マウスまたはラット))を使用して実施される。種々の形質転換技術が当該分野において周知である。これらの方法には以下が含まれる。

【0130】

(i) 核への直接微量注射：発現カセットは、機械的に組換えDNAを移入するために、マイクロピペットを使用して動物の細胞核に直接的に微量注射され得る。この方法は、核以外の細胞区画にDNAを曝さない点、および高頻度で安定な組換え体を生じる点に利点を有する。Capecechi, M., Cell 22:479-488(1980)を参照のこと。

【0131】

例えば、本発明の発現カセットは、雄性前核膜の形成後にできる限り早く、および雌性前核接合体によるその処理の前に、接合体の初期雄性前核中に微量注射され得る。従って、この方法に従う微量注射は、雄性前核および雌性前核が十分に分離され、そしてその両方が細胞膜の近くに配置されるときに、行なわれるべきである。例えば、Wagnerらに対する米国特許第4,873,191号(1989年10月10日発行)；およびRicha, J., (2001)「Production of Transgenic Mice,」Molecular Biotechnology, March 2001 vol. 17:261-8を参照のこと。

【0132】

(ii) ES細胞トランスフェクション：本発明の発現カセットを含むDNAはまた、胚性幹(ES)細胞に導入され得る。標的ベクターとの相同組換えを受けるES細胞クローンが同定され、次いでES細胞-マウスキメラが作成される。ホモ接合性動物は、ヘミ接合性キメラ動物の交配によって作製される。手順は、例えば、Koller, B. H. およびSmithies, O., (1992)「Altering genes in animals by gene targeting,」Annual review

of immunology 10:705-30に記載される。

【0133】

(iii) エレクトロポレーション：本発明の発現カセットを含むDNAはまた、エレクトロポレーションによって動物細胞に導入され得る。この技術において、動物細胞は、発現カセットを含むDNAの存在下でエレクトロポレーションされる。高い場の強度の電気インパルスは、生体膜を可逆的に透過させて、DNAの取りこみを可能にする。エレクトロポレーションの間に作製される孔は、DNAのような高分子の取りこみを可能にする。手順は、例えば、Potter, H., ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A. 81:7161-7165 (1984); および Sambrook, ch. 16 に記載される。

10

【0134】

(iv) リン酸カルシウム沈殿：この発現カセットはまた、例えば、リン酸カルシウムを使用して直接取りこむ他の方法によって細胞中に移入され得る。例えば、Graham, F., および A. Van der Eb, Virology 52:456-467 (1973); および Sambrook, ch. 16 を参照のこと。

【0135】

(v) リボソーム：人工膜小胞（リボソーム）内へのDNAのカプセル化、それに続くリボソームと標的細胞膜との融合はまた、動物細胞内へのDNAの導入のために使用され得る。Mannino, R. および S. Gould-Fogerite, BioTechniques, 6:682 (1988) を参照のこと。

20

【0136】

(vi) ウイルスキャプシド：ウイルスおよび空のウイルスキャプシドもまた、動物細胞へのDNAの取りこみおよびDNAの移入のために使用され得る。例えば、DNAは、空のポリオーマウイルスキャプシド中に取り込まれ得、次いで、ポリオーマ感受性細胞に送達され得る。例えば、Slilaty, S. および H. Aposhian, Science 220:725 (1983) を参照のこと。

【0137】

(vii) ポリブレンまたはDEAE-デキストランを使用するトランスフェクション：これらの技術は、Sambrook, ch. 16 に記載される。

【0138】

(viii) プロトプラスト融合：プロトプラスト融合は、典型的には、多数の目的のプラスミドを保有する細菌プロトプラストと培養された動物細胞との融合（通常ポリエチレングリコールで処理することで媒介される）を含む。Rassoulzadegan, M. ら, Nature, 295:257 (1982)。

30

【0139】

(ix) 弾道貫入 (Ballistic penetration)：核酸セグメントの導入の別の方法は、小ビーズまたは小粒子のマトリクス内かまたは表面上へのいずれかの、核酸を有する小粒子による高粘度の弾道貫入である (Klein, ら, Nature, 327, 70-73, 1987)。

【0140】

選択された動物細胞にDNAを導入するために使用され得る任意の技術が使用され得る（例えば、「Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook」, Carl A. Pinkert (編者), 第1版, Academic Press; ISBN:0125571658; 「Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual」, Brigid Hogan ら, ISBN:0879693843, 出版社: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999年9月発行、第2版)。エレクトロポレーションは、容易さの利点があり、そして広範に適用可能であることが見出されているが、かなりの割合の標的化された細胞が、エレクトロポレーションの間に殺傷され得る。従って、敏感な細胞または少数でのみ得られ得る細胞に

40

50

ついて、核への直接的な微量注射が好ましくあり得る。また、高頻度でのDNA取りこみが特に重要である場合、(上記のような)選択マーカーを使用しない形質転換のような、核への直接微量注射が、有利な方法である。なぜなら、典型的には、標的化された細胞の5~25%が、微量注射されたDNAを安定に取り込むからである。レトロウイルスベクターもまた非常に効率的であるが、いくつかの場合において、このレトロウイルスベクターは、Ellis, J., およびA. Bernstein, *Molec. Cell. Biol.* 9:1621-1627 (1989)に記載されるような他の欠点に曝される。エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿またはリポソーム融合のような、より低効率の技術が使用される場合、発現カセット中に選択マーカーを有することが好ましく、その結果、上で議論されたような安定な形質転換体が容易に選択され得る。

10

【0141】

いくつかの場合において、異種DNAの導入は、それ自体が選択可能な表現型を生じ、この場合において、標的化された細胞は、相同な組換えについて直接的にスクリーニングされ得る。例えば、遺伝子`hart`の破壊は、6-チオグアニンに対する耐性を生じる。しかし、多くの場合において、形質転換は、このような容易に選択可能な表現型を生じず、そしてリン酸カルシウム沈殿のような低効率の形質転換技術が使用される場合、発現カセット中に選択マーカーを含むことが好ましく、その結果、ゲノム中の発現カセットの安定な組み込みは、選択可能な表現型を導く。例えば、導入されたDNAが、`neo`遺伝子を含む場合、取りこみについての選択は、G418上で増殖され得る細胞を選択することによって達成され得る。

20

【0142】

上記のように調製されるトランスジェニック動物は、本発明の方法を実施するために有用である。目的のプロモーターの、レポーター配列への作動可能な連結は、当業者が広範な種々の生物学的プロセス(プロモーターが由来する遺伝子の発現を含む)をモニターすることを可能にする。本発明の発現カセットを含む本発明のトランスジェニック動物は、インビボで生じるプロセスの観察、およびこのプロセスが起こるメカニズムの解明のための手段を当業者に提供する。

【0143】

レポーター配列として光生成タンパク質を使用する発現カセットを保有するトランスジェニック動物に関して、非侵襲性の動物全体の画像化を使用するルシフェラーゼレポーター発現カセットの発現のモニタリングが記載されている(Contag, C. ら, 米国特許第5,650,135号および同第6,217,847号、それぞれ1997年7月22日、2001年4月17日の発行、;Contag, P. ら, *Nature Medicine* 4(2):245-247, 1998;Contag, C., ら, *OSA TOPS on Biomedical Optical Spectroscopy and Diagnostics* 3:220-224, 1996;Contag, C. H. ら, *Photochemistry and Photobiology* 66(4):523-531, 1997;Contag, C. H. ら, *Molecular Microbiology* 18(4):593-603, 1995)。このような画像化は、典型的には、少なくとも1つの光検出デバイス要素(例えば、電荷結合素子(CCD)カメラ)を使用する。

30

40

【0144】

従って、1つの例示的な実施形態において、ルシフェラーゼコードレポーター配列に作動可能に連結される、`Cyp3A11`または`CYP3A4`由来の制御エレメントを含む発現カセットを保有するトランスジェニックマウスは、`Cyp3A11`媒介性薬物代謝または`CYP3A4`媒介性薬物代謝をモニターするために使用され得る。本発明の発現カセットを含む本発明のトランスジェニック動物はまた、このような毒性および代謝プロセスを調節し、それによって安全性、毒性の可能性および薬学的用途について化合物を同定しそして特徴付け得る、分析物をスクリーニングするための手段を提供する。

【0145】

50

分析物を投与する方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：注射（皮下、表皮、皮内）、粘膜内（鼻、直腸および膣など）、腹腔内、静脈内、経口または筋肉内。他の投与様式としては、経口投与および肺投与、坐薬、および経皮適用が挙げられる。投薬処置は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールであり得る。例えば、目的の分析物は、用量／応答曲線を決定するために、ある濃度の範囲で投与され得る。この分析物は、一連の試験動物または単一の試験動物に対して投与され得る（ただし、分析物に対する応答は、トランスジェニック動物から証明され得る）。

【0146】

従って、1つの例示的な実施形態において、ルシフェラーゼコードレポーター配列に作動可能に連結されるCyp3A11プロモーターまたはCYP3A4プロモーターを含む発現カセットを有するトランスジェニックマウスは、Cyp3A11またはCYP3A4の発現に対する候補化合物の影響をモニターするために使用され得る。これらの実験の結果は、本発明のトランスジェニックマウスが、効果的な薬学的因子であり得る化合物をスクリーニングするために使用され得る。

【0147】

CYP3A4導入遺伝子を含むトランスジェニック動物の作製および表現型特徴付けは、実施例6に記載される（図22も参照のこと）。実施例6に記載される特徴付けの方法はまた、Cyp3A11導入遺伝子を含むトランスジェニック動物の特徴付けに対しても適用され得る。

【0148】

例えば、ヒトCYP3A4遺伝子の発現に影響を及ぼす化合物をスクリーニングするためのモデルにおいて有用なトランスジェニック動物（例えば、げっ歯類）を選択する基準は、一般に以下のとおりである：

基準1。dexまたはrifでの処置に応答するレポーター遺伝子発現（例えば、肝臓領域からの光の出力によって測定されるルシフェラーゼ遺伝子発現）の増加。デキサメタゾン（例えば、体重1kgあたり50mgで投与される）による肝臓における高度の誘導（好ましくは、基底レベルを超える10倍よりも大きい10倍に等しい誘導）および／またはリファンピシン（例えば、体重1kgあたり50mgで投与される）による肝臓における誘導（好ましくは、基底レベルを超える2倍よりも大きい2倍に等しい誘導）。

【0149】

基準2。動物全体の他の身体領域に対して、肝臓領域におけるより大きい誘導。

【0150】

基準3。肝臓領域中に見られる基底発現は、動物身体の他の領域における基底発現よりも大きいまたはそれに等しい。基底発現および誘導された発現の両方で、肝臓における発現に対して、より低レベルの腸管での発現が好ましい。

【0151】

基準4（必要に応じて適用され得る）。レポーター遺伝子発現（例えば、レポーターとしてのルシフェラーゼ）および以下：フェノバルビトール（Phenob）、ニフェジピン（Nif）、5-プログネン-3b-OL-20-ONE-16a-カルボニトリル（PCN）、およびクロトリマゾール（Clotrim）の群から選択される化合物のうちの少なくとも1つでの処理に対して応答した、肝臓領域からの光の出力によって測定される発現における増加。さらに、プレグネノロン（Preg）が使用され得る。

【0152】

hPXRは、細胞培養物中でのCYP3A4誘導を媒介する生体異物レセプターであることが報告されている。上記の7種の化合物は、細胞培養物中のhPXRを種々の程度まで活性化することが示されている（Xie Wら、2000；Genes Dev. 2000 Dec 1；14（23）：3014-23；Goodwinら、1999；Mol Pharmacol. 1999 Dec；56（6）：1329-39）。Rif、Clotrim、NifおよびPhenobは、CYP3A4発現の比較的良好な誘導物質であったが、Dex、PCNおよびPregは、弱い誘導物質であったようである。しか

し、ヒト肝細胞の研究は、Dexが良いCYP3A4誘導物質であることを示唆した (Lediracら、2000; Drug Metab Dispos. 2000 Dec; 28(12):1391-3)。本明細書中に示される結果は、Clotrim、Dex、PCNおよびNifが、他の3種の化合物よりも良好に導入遺伝子CYP3A4-lucを誘導したことを示す。しかし、Pregを除く全ての薬物は、種々の程度まで導入遺伝子を誘導し、これらのデータは、この動物モデルがCYP3A4誘導物質をスクリーニングするために有用であることを支持する。

【0153】

本発明支持して実施された実験は、機能的hPXR遺伝子産物の存在が、トランスジェニックの非ヒト動物における、またはレバープッシュ実験におけるCYP3A4 (またはCyp3A11) 導入遺伝子レポーターの使用のために重要ではないことを示す (例えば、実施例2および6を参照のこと)。

10

【0154】

チトクロムP450 CYP3A4は、肝臓中で発現される酵素をコードする重要なヒト遺伝子である。このCYP3A4遺伝子産物は、多くの外因性化学物質 (生体異物) (治療剤およびステロイドホルモンのような内因性物質を含むが、これらに限定されない) の代謝に対して極めて重要であると考えられている。CYP3A4遺伝子の発現レベルにおける変化は、薬物の排泄に劇的に影響を与え得、そしてそれ自体薬物の有効性に大きな影響を与える。

【0155】

20

(2.6.0 プロモーター活性のモニタリング)

本発明の発現カセットおよびベクターを含む転写制御エレメント配列の活性は、プロモーターに作動可能に連結されたレポーター配列によってコードされるタンパク質産物を検出および/または定量化することによってモニターされ得る。プロモーター活性をモニターするのに使用される特定の手法は、使用されるレポーター配列に依存し、そしてこの手法としては、例えば、酵素アッセイ法、および光生成タンパク質をコードするレポーター配列の場合には、インビトロまたはインビボでの画像化が挙げられ得る。

【0156】

例えば、本発明の発現カセットを保有するレバープッシュまたはトランスジェニック動物におけるプロモーター活性は、インビボでの生体発光画像化 (Contagら (例えば、Contag, P. R. ら, (1998) Nature Med. 4:245-7; Contag, C. H. ら, (1997) Photochem Photobiol. 66:523-31; Contag, C. H. ら, (1995) Mol Microbiol. 18:593-603を参照のこと) を参照のこと) を使用してモニターされ得る。

30

【0157】

次いで、プロモーター活性をモニターすることにより、このプロモーターが関連する生物学的プロセスをモニターし得る。これは、それらプロセスをプロモーターレベルで調節する分析物をスクリーニングする方法において、さらに使用され得る (以下の節の考察を参照のこと)。

【0158】

40

従って、本発明の1つの局面において、肝臓プッシュ (liver push)、または上記の配列のようなP450関連遺伝子座由来のプロモーター配列を含有する発現カセットを保有するトランスジェニック動物を使用して、薬物代謝および存在し得る毒性をモニターし得る。

【0159】

Cyp3A11またはCYP3A4の発現に対する薬物の効果は、Cyp3A11プロモーターまたはCYP3A4プロモーターの肝臓プッシュまたはトランスジェニック動物のインビボ画像化による、本発明のこの局面のなお別の実施形態である。肝臓プッシュ実験の結果は、本発明の発現構築物を保有する動物を使用して、薬物代謝のプロセスの間の、Cyp3A11プロモーター媒介性遺伝子発現またはCYP3A4プロモーター媒介性

50

遺伝子発現に対する影響によって、薬物の存在し得る毒性および代謝を調査し得ることを、実証する。

【0160】

(2.7.0 分析物のスクリーニング)

上記に考察された、プロモーター活性をモニターする方法は、種々の生物学的プロセスを調節する分析物（例えば、候補薬物）をスクリーニングする目的のために使用され得、その分析物の毒性効果および代謝効果は、プロモーターレベルでの発現を決定することによって評価され得る。スクリーニングを、一過性トランスフェクトされた細胞または安定トランスフェクトされた細胞を使用するインビトロアッセイによって、達成し得、そしてまた、上記で考察された本発明の肝臓プッシュおよび／またはトランスジェニック動物を、単独でか、またはこれらの動物中に導入されている他の野生型もしくはは形質転換した、細胞もしくはは組織と組み合わせるかのいずれかで使用して、スクリーニングを行い得る。プロモーター活性に対する種々の候補化合物の効果を測定するために使用される、特定のアッセイ方法は、使用される細胞または動物によって保有される発現カセット中に存在する特定のレポーター配列によって、決定される。上記で論じられるように、肝臓プッシュ、または光生成タンパク質をコードするレポーター配列を使用する構築物を保有するトランスジェニック動物におけるプロモーター活性は、エキソビボアッセイ方法によってか、または以前に参照されたインビボ画像化技術によって（例えば、生物発光タンパク質レポーターまたは蛍光タンパク質レポーターを使用する）、測定され得る。

10

【0161】

従って、本発明の1つの局面は、毒性（P450プロモーター活性の誘導を介する）についてのスクリーニングにおける使用のため、または、必然的に転写に先行するシグナル伝達経路に影響することによるか、またはP450遺伝子の転写に直接影響することによるかのいずれかで、P450（例えば、Cyp3A11、CYP3A4など）プロモーター活性の発現を調節する、薬理学的に活性な因子（または化合物）についてのスクリーニングにおける使用のための、発現カセットおよび発現ベクターの使用である。

20

【0162】

スクリーニングの目的のために、適切な宿主細胞（好ましくは、Cyp3A11のプロモーター媒介性発現をモニターするための肝臓細胞）を、本発明のP450（例えば、Cyp3A11またはCYP3A4のいずれか）遺伝子プロモーターと作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む発現ベクターで、形質転換する。次に形質転換された細胞を、種々の試験物質に曝して、次いでそのレポーター遺伝子の発現について分析する。これらの細胞によって提示される発現を、試験物質に曝されていない細胞からの発現と比較し得る。P450プロモーターのプロモーター活性を調節する化合物は、結果としてコントロールに対して、調節されたレポーター遺伝子の発現を生じる。以下の実施例を参照のこと。

30

【0163】

従って、本発明の1つの局面は、P450（例えば、Cyp3A）遺伝子座由来の転写制御エレメント（例えば、プロモーター）によって媒介される、遺伝子発現レベルを調節（すなわち、刺激または阻害）する試験化合物についてスクリーニングすることである。スクリーニングは、例えば、以下によって達成され得る：（i）本明細書中に開示されるP450プロモーターがレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）と作動可能に連結されている宿主細胞を、試験化合物を含む試験培地と、レポーター遺伝子発現を可能とする条件下で接触させる工程；（ii）試験培地の存在下でレポーター遺伝子の発現を測定する工程；（iii）この宿主細胞を、試験化合物を含まないが、それ以外は（i）の試験培地と本質的に同一であるコントロール培地と、（i）で使用される条件と本質的に同じ条件下で接触させる工程；（iv）コントロール培地の存在下でレポーター遺伝子の発現を測定する工程；および（v）（ii）と（iv）との間の発現の差異を、試験化合物がプロモーターの活性に影響する能力と、関連付ける工程。

40

【0164】

50

あるいは、形質転換した細胞を、転写誘導因子（例えば、 $IL-1$ もしくは $TNF-\alpha$ 、フォスホコリン、ジブチリル-cAMP、またはホルボール型の腫瘍促進剤（例えば、PMA））を用いて誘導し得る。転写活性を、既知の活性の薬理的因子（例えば、標準化合物）または推定の毒性の薬理的因子（例えば、試験化合物）の存在下または非存在下で測定する。試験化合物の存在下でのレポーター遺伝子発現レベルの変化を、標準化合物によってもたらされる変化と比較する。この方法において、試験化合物がP450（例えば、Cyp3A11またはCYP3A4）転写に影響する能力、ならびに試験化合物および標準化合物の相対的な毒性を決定し得る。

【0165】

従ってさらなる局面では、本発明は、以下によって、試験化合物がCyp3A11またはCYP3A4の転写を調節する能力を測定する方法を提供する：（i）本明細書中に開示されるCyp3A11プロモーターまたはCYP3A4プロモーターが、レポーター遺伝子に作動可能に連結されている宿主細胞を、レポーター遺伝子の発現を可能とする条件下で、プロモーター活性の誘導因子と、接触させる工程；（ii）試験化合物の非存在下でレポーター遺伝子の発現を測定する工程；（iii）この宿主細胞を誘導因子と接触させる工程の、前、同時または後のいずれかに、宿主細胞を試験化合物に曝す工程；（iv）試験化合物の存在下でレポーター遺伝子の発現を測定する工程；および（iv）（ii）と（iv）との間の発現差異を、Cyp3A11媒介性またはCYP3A4媒介性の転写を調節する試験化合物の能力と関係付ける工程。

【0166】

異なる誘導因子は異なるシグナル伝達様式に影響することが公知であるので、特定のシグナル伝達経路に影響する化合物を、より高い特異性で同定することが可能である。さらに、Cyp3A11またはCYP3A4は、薬物代謝のプロセスにおいて上方制御されることが示されている。従って、このようなアッセイは、Cyp3A11またはCYP3A4に対する化合物の影響によって、化合物の毒性を同定する手段を提供する。

【0167】

本発明はまた、P450（例えば、Cyp3A11またはCYP3A4）遺伝子発現に関する、他の生理学的プロセスおよび病理学的プロセスを研究するためのモデルとして有用な、トランスジェニック動物を提供する。

【0168】

本明細書中に記載される、本発明の異なる実施形態の種々の形態が、組み合わされ得る。

【0169】

（実験）

以下は、本発明を実行するための特定の実施形態の例である。これら例は、単なる例示の目的ために提供され、そして本発明の範囲をいかようにも限定するようには意図されるものではない。

【0170】

（材料および方法）

他に示されない場合、本明細書中に記載される実験は、標準的な方法を使用して実施された。

【0171】

（A. PCR増幅）

PCR増幅については、反応混合物は、 $5\mu l$ の $10\times$ 反応緩衝液（ $MgCl_2$ を含まない）； $4\mu l$ の $25mM MgCl_2$ ； $0.4\mu l$ の $25mM dNTP$ 混合物； $0.5\mu l$ の $10p$ モル/ μl の順方向プライマー； $0.5\mu l$ の $10p$ モル/ μl の逆方向プライマー； $1\mu l$ （ $0.2\mu g$ ）のDNA（BACまたはゲノム）； $38.35\mu l$ の H_2O ；および $0.25\mu l$ のTaqポリメラーゼ（Life Technologies）を含んだ。PCRを以下： $94^\circ C$ で3分； $94^\circ C$ で30秒、 $57^\circ C$ で30秒および $72^\circ C$ で1分30秒を30サイクル； $72^\circ C$ で7分のように実施し；そして $4^\circ C$ で保存した

。

【0172】

(B. サザンブロッティング)

(i) マウス129/SvJゲノムDNA BAC (細菌人工染色体) ライブラリー (Genome Systems, Inc., St. Louis, MO) をPCRスクリーニングするために、プライマーを設計し、そして使用して、Cyp3A11プロモーター配列を単離した。

【0173】

50 kb ~ 240 kb の間に及ぶサイズを有する、平均で120 kb の含有インサートを含むライブラリーを、スクリーニングした。Cyp3A11プロモーター領域を含む巨大なゲノムDNAフラグメントを獲得した。同様に、同様なサイズにされたヒトライブラリーをスクリーニングすることによって、CYP3A4プロモーターを含む巨大なDNAフラグメントを獲得した。

【0174】

Cyp3A11およびCYP3A4のBAC DNAを、CsCl超遠心分離によって単離し、そして種々の制限酵素で2時間消化した。消化されたDNAフラグメントを、1%アガロースゲルで分離した。このゲルを250 mM HCL中で10分間、脱プリン化して、次いで0.5 M NaOHを含む20×SSC中で20分間2回変性した。次いで、DNAを、バキュームブロッティング装置 (Stratagene, La Jolla, CA) を使用して、20×SSCを用いて1~2時間、Hybond N+メンブレン (Amersham, Piscataway NJ) 上に転写した。転写の後、UV Cross-Linker (Stratagene, La Jolla, CA) を使用して、製造業者の指図書に従いこのメンブレンを架橋し、そして5×SSCでリンスした。次いで、このメンブレンを、プレハイブリダイゼーション溶液 (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、60℃で1~6時間プレハイブリダイゼーションした。

【0175】

プローブを、PCRフラグメントまたは単離したDNAを標識することによって調製した。例えば、(例えば、実施例1に記載されるように) PCRによって増幅した1.6 kbのプロモーターフラグメントを、Gene Image Random-Prime Labeling and Detection System (Amersham, Piscataway NJ) を使用して、製造業者の指図書に従って、標識した。変性したプローブを、プレハイブリダイゼーション溶液に添加して、そしてメンブレンを60℃で一晩ハイブリダイゼーションした。

【0176】

ハイブリダイゼーションの後、メンブレンを、予め加温した1×SSC、0.1% SDSを用いて、各々60℃で20分間、2回洗浄した。続いて、このメンブレンを、予め加温した0.5×SSCを用いて、各々60℃で20分間、2回洗浄した。このメンブレンをブロッキング溶液 (Stratagene, La Jolla, CA) を使用して、室温で1時間、ブロッキングし、アルカリホスファターゼと結合体化した抗体と共に、1時間インキュベートした。3回洗浄した後、基質CDP-Starを5分間添加した。このメンブレンを、基質1分と3時間との間、X線フィルムに露光した。

【0177】

(ii) ヒトゲノムDNA BAC (細菌人工染色体) ライブラリー (Genome Systems, Inc., St. Louis, MO) をPCRスクリーニングするために、プライマーを設計して、そして使用して、CYP3A4プロモーター配列を単離した。このライブラリーは、50 kb ~ 240 kb の間の範囲のサイズを有する、平均で120 kb のインサートを含むした。CYP3A4プロモーター領域を含む巨大なゲノムDNAフラグメントを獲得した。PCRフラグメントプローブおよび単離されたDNAプローブがCYP3A4配列特異的であることを除いて、本質的に上記のように、サザンブ

ロット分析を実施した。

【0178】

(C. インビボ発現アッセイ：肝臓プッシュプロトコル)

Cyp3A11またはCYP3A4の調節配列によって媒介されるインビボ遺伝子発現を、「肝臓プッシュ」アッセイによってアッセイした。

【0179】

肝臓プッシュ実験のために投与されるプラスミドを、Liu F. ら(1999) Human Gene Therapy 10:1735-1737の方法に従って、静脈内投与した。例えば、所望のCyp3A11またはCYP3A4のプロモーター構築物を含む、2.2mlのPBS溶液を、8秒未満の間にわたって、尾部静脈内に注射した。

10

【0180】

Cyp3A11およびCYP3A4について、コレセプターがリファンピシンによる誘導に必要であると、以前に考えられた。従って、hPXR(ヒトリファンピシンコレセプター)を発現するプラスミドを、必要に応じて、Cyp3A11-luc構築物またはCYP3A4-luc構築物と一緒に同時投与した。PXR発現プラスミドは、Glaxo-WellcomeのDr. Steven Klierewerから入手した。

【0181】

(D. トランスジェニック動物の調製)

以下に記載されるトランスジェニック動物を、1細胞期の胚へのマイクロインジェクションを使用して調製した(例えば、Wagnerらに対する米国特許第4,873,191(1989年10月10日発行);Richa, J., (2001) Molecular biotechnology 17:261-8を参照のこと)。この胚を、擬似受胎のメスに移植し、そして子孫の選別(screener)を、プライマーlucF1(GCCATTCTATCCGCTGGAGAGATGG;配列番号11)およびプライマーlucR4(CGATTTTACCAACATTTGTAGAGGTTTTACTTGC;配列番号16)を使用するPCRによって行った。動物の画像化を、以下のように行った。

20

【0182】

(E. インビボ画像化)

インビボ画像化を、50mm f 1.2 Nikkorレンズ(Nikon, Japan)を装着した増感CCDカメラ(ICCD;モデルC2400-32, Hamamatsu, Japan)およびイメージ処理装置(Argus 20, Hamamatsu)、または、Living Image(登録商標)ソフトウェア(Xenogen, Corporation, Alameda, CA)を使用して制御される、統合画像化システム(IVISTM Imaging System, Xenogen, Corporation, Alameda, CA.)として利用可能な、50mm f 0.95 Navitarレンズ(Buhl Optical, Pittsburgh, PA)を取り付けた低温冷却カメラ(Roper Scientific, Trenton, NJ)のいずれかを使用して、

30

以前に記載されるように実施した(Contagら、(例えば、Contag, P. R. ら(1998) Nature Med. 4:245-7;Contag, C. H. ら(1997) Photochem Photobiol. 66:523-31;Contag, C. H. ら(1995) Mol Microbiol. 18:593-603;Zhangら(2001) Transgenic Res. 2001年10月;10(5):423-34を参照のこと))。

40

【0183】

基質ルシフェリンを、画像化の約5分前に、体重1kg当り150mg(30mg/mlのルシフェリンストック)の用量で、腹腔内腔に注入した。マウスをネブタール(体重1kg当り25~50mg)を用いるか、またはイソフルラン/酸素の混合を有するガスチャンパー中に置いてそしてイソフルランの配管を動物の鼻に配置するかのいずれかで麻酔して、そして麻酔状態で画像化ステージ上に置いた。マウスを、通常は腹側より1分

50

間画像化した。肝臓領域に渡る相対的な光子放出を、Living Image（登録商標）ソフトウェア（Xenogen, Alameda, CA）を使用して定量化した。

【0184】

これらの画像化方法を使用して、試験の被験体において事象を経時的に追跡し得る。例えば、ある化合物を被験体（光生成レポーターを含有する）に投与し得、そして化合物投与後の被験体からの光子放出を測定し得る。このような測定を、選択された時間間隔で繰り返し得、このことは通常は、被験体におけるレポーター発現レベルに対する化合物の効果を一時間渡り追跡するのに、有効である。

【0185】

（F. ウェスタンブロット分析）

最終的な画像化の後、動物を屠殺し、そしてその肝臓を摘出し、そして直ちに液体窒素で凍結した。次いで、Sonic Dismembrator（Fisher Scientific, PA）を使用して、各々の動物由来の肝臓組織を、4倍量のPBS緩衝液中に別々にホモジナイズした。各々のホモジネートのタンパク質濃度を、Bradford Reagent（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を、製造業者の推奨に従い使用して測定した。組織ホモジネート中のタンパク質を、Laemmli, U. K.（1970）の方法に従い、変性10%ポリアクリルアミドゲルでサイズによって分離し、次いで、ニトロセルロース膜（BioRad, Emeryville, CA）にトランスファーした。

【0186】

Cyp3A11タンパク質を、1次ヤギ抗ラットCyp3A2抗体（GenTest, Woburn, MA, 01801）を使用して検出した。2次抗体は、抗ヤギIgGペルオキシダーゼ結合体化抗体（Sigma, St. Louis, MO）であった。

【実施例】

【0187】

（実施例1）

（ベクター構築）

（A. マウスCyp3A11）

Cyp3A11発現構築物および他の発現構築物を、以下に記載されるように構築した。

【0188】

pBSSK-Cyp3A11S： 図5は、pBSSK-Cyp3A11Sと称する構築物の模式図を示す。簡潔に述べると、この構築物は以下のように作製した。Cyp3A11プロモーターの1.6kbのフラグメント（-1.6kbから+65bpに及ぶ）を、Cyp3A11TopEcoRIプライマー（GTTGAATTCCAGCTAATGAGGGCAAAGTTCTCTCAG、配列番号1）およびCyp3A11BotXhoIプライマー（ATCCTTCGAGCTTCTCTGTGTTCCTCCCTACAAC TG、配列番号2）を使用して、マウスゲノムDNAからPCR増幅した。（また、Toideら（1997）Arch. Biochem. and Biophysics 338：43-49を参照のこと）。pBlueScript SK（Stratagene, La Jolla, CA）をEcoRIおよびXhoIで消化して、そして1.6kbのCyp3A11プロモーターフラグメントをこのベクター中にライゲーションした。

【0189】

pBSSK-Cyp3A11M： この構築物は、マウスCyp3A11プロモーターの6kbのフラグメントを含み、そして以下のように構築した。Cyp3A11F1プライマー（GGTATGTGGTGTCTTGTGTATGCATAC、配列番号3）、およびCyp3A11R2プライマー（CAGATAGGATTGAGTGAGCCAGAGG、配列番号4）と称するプライマーを使用して、マウスゲノムDNAのBACクローンをスクリーニングした（また、上記の材料と方法を参照のこと）。1つのポジティブなBACクローンを選択し、そして1.6kbのプロモーターフラグメントをプローブと

して使用して、上記のように、制限消化およびサザンブロッティングによって分析した。

【0190】

選択されたBACクローンのこれらのサザンプロットを基に、BACクローンのPst Iフラグメントを単離し、配列決定用ベクターにサブクロニングし、そして配列決定した。続いて、このPst IサブクロンをSma I/Pst Iで消化し、そして得られた5.9 kbのXma I/Pst Iフラグメントを単離した。pBSSK-Cyp3A11SをXma I/Pst Iで消化し、そしてこのバックボーン(3' Pst I部位~Xho I部位に及ぶ下流のプロモーター領域を含む)を単離した。この5.9 kbのXma I/Pst Iフラグメントを、Xma I/Pst I消化したpBSSK-Cyp3A11Sバックボーン中にクロニングした。従って、ライゲーション後、得られたpBSSK-Cyp3A11M(図6)は、5.9 kbのSma I/Pst I BACフラグメントと、さらにpBSSK-Cyp3A11Sの3' Pst I部位~Xho I部位に及ぶ下流のプロモーター配列を含んだ。

10

【0191】

pGL3-I-Basic: 208塩基対のイントロンフラグメントを、Intron Top Bgl II. プライマー(TCGAGATCTTGCGGCCGCTTAACCTGCAGAGTTTG、配列番号5)およびIntron Bot Hind III. プライマー(GCCAAAGCTTTGCGGCCGCTTAAGAGCTTG、配列番号6)を使用して、pCAT-Basic(Promega, Madison, WI)から増幅した。約540 nmの放出ピークを有するイエローグリーンルシフェラーゼは、pGL3という名称でPromega, Madison, WIよりプラスミドベクターにおいて市販され、そしてこのプラスミドをBgl IIおよびHind IIIで消化した。次いで、このPCRイントロンフラグメントを、Bgl II-Hind III切断したpGL3ベクター中にライゲーションした。得られたベクターを、pGL3-I-Basicと名付けて、図7に示す。

20

【0192】

pGL3-I-Cyp3A11S: 1.6 kbのCyp3A11Sプロモーターを、Cyp3A11TopKpnI. プライマー(GTTTGGTACCCAGCTAATGAGGGCAAGTTCTCTCAG、配列番号7)およびCyp3A11BotHind III. プライマー(ATCAAGCTTCTTCTCTCTGTGTCTCTCCCTACAACTG、配列番号8)を使用して、Cyp3A11-BACクローンから増幅した。このPCR産物を、KpnIおよびHind IIIで消化しておいたpGL3-I-Basicベクター中にクロニングした。得られた構築物pGL3-I-Cyp3A11Sを、図2に示す。

30

【0193】

pGL3-I-Cyp3A11M: pBSSK-Cyp3A11MをXma IおよびXho Iで消化し、そして得られた6 kbのフラグメントを、Xma IおよびXho Iで予め消化しておいたpGL3-I-Basic中にライゲーションした。得られた構築物を、図3に示す。

【0194】

pGL3-I-Cyp3A11L: 上記のように、1.6 kbのプロモーターフラグメントをプローブとして使用して、選択されたBACクローンについて、サザンブロッティングを実行した。pBSSK-Cyp3A11Mを作製するために使用した6 kbのPst Iフラグメントに加えて、10 kbのKpn Iフラグメントも同定した。この10 kbのKpn Iフラグメントをサブクロニングし、配列決定し、そして配列から制限部位を同定した。この10 kbのフラグメントが5.9 pBSSK-Cyp3A11Mのフラグメントと重なり、そしてまたさらなる上流の配列を含むことを決定した。重なり部分は、Nhe I部位を含んだ(図6)。pGL3-I-3A11Mおよび10 kbのKpn Iサブクロンの両方をNhe IおよびKpn Iで消化した。この結果、ベクターのバックボーン中にNhe IからXho Iに及ぶプロモーターの上流領域を含む、pGL3-I

40

50

ーCyp3A11Mバックボーンを生じた。10 kbのKpnIフラグメントのNheI/KpnIフラグメントを、pGL3-I-Cyp3A11Mバックボーン中にライゲーションした後に、得られたpGL3-I-Cyp3A11Lは、pGL3-I-Cyp3A11Mの内部NheI部位から隣のXhoI部位まで及ぶさらなる下流配列を含む、約9 kbのプロモーター配列を含んだ。得られた構築物を図4に示す。

【0195】

pGL3-I-Cyp3A11XL： 6 kbのPstIサブクローンおよび10 kbのKpnIサブクローンに加えて、11 kbのXmaIフラグメントをまた、3A11BACクローンからサブクローニングした。配列データは、この11 kbのXmaIフラグメントが10 kbのKpnIフラグメントと重なることを示した。2. 1 kbのKpnIフラグメントを、pGL3-I-Cyp3A11LのKpnI部位中の11 kbのサブクローンからクローニングした。2. 1 kbのKpnIフラグメントの向きを、DNA配列決定によって確認した。11 kbのCyp3A11プロモーター領域を含む、得られた新規構築物を、pGL3-I-Cyp3A11XLと称した。

【0196】

本発明の支持に実施された実験は、Cyp3A11遺伝子座のタンパク質コード領域上流に由来する、約9,330塩基対（図1B；配列番号13）の配列を提供した。転写制御エレメントを含むプロモーター領域の配列を、図1A（配列番号12）に提示する。この図は、開始ATGコドンを含むゲノム配列を含む。表1は、Cyp3A11遺伝子座のタンパク質コード領域上流に由来の配列を示し、これは上記の構築物を構成する。表1の開始位置および終結位置を、図1Aに提示される配列に関連して示す。

【0197】

（表1）

【0198】

【表1】

ベクター名	Cyp3A11遺伝子座由来のフラグメントのおよそのサイズ	図1Aに関連したCyp3A11遺伝子座フラグメントの開始位置	図1Aに関連したCyp3A11遺伝子座フラグメントの終結位置
pGL3-I-Cyp3A11S	1.6 kb	9,334	10,978
pGL3-I-Cyp3A11M	6.0 kb	5,024	10,978
pGL3-I-Cyp3A11L	8.9 kb	2,096	10,978
pGL3-I-Cyp3A11XL	11 kb	1	10,978

（B. ヒトCYP3A4）

CYP3A4発現構築物および他の発現構築物を、以下に記載するように構築した。

【0199】

pGL3-I-CYP3A4L： 13 kbのヒトCYP3A4プロモーターを、ヒトBACクローン（プライマー3A4Top（GTTGGTACCCCTGCAGTGACCACTGCCCCATCATTTG、配列番号9）および3A4Botプライマー（ATCAAGCTTCTCTTTCAGCTCTGTGTGTGCTCTTTTGC、配列番号10）を使用して、Incyte Genomics, Inc.によりスクリーニングされた）から構築した。Goodwinら、（WO 9961622 A1、1999年12月2日に公開された）は、13 kbのプロモーター配列のうちの約6 kb～約5.4 kbの由来の、632 bpのCYP3A4プロモーター配列を公開した。およそ13 kb～10.5 kb（KpnI部位～BamHI部位）に対応する領域についての5' DNA配列を、取得した。肝細胞核内因子3b（HNF-3b）の推定結合部位を、この領域中に同定した。得られた構築物を、図9に示す。

【0200】

pGL3-I-CYP3A4M: 10.5 kbのプロモーター領域を含む、pGL3-I-CYP3A4L由来の12.5 kbのBamHIフラグメントを、pBSSK (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローニングした。得られたプラスミドを、pGL3-I-CYP3A4Mと称した。得られた構築物を図8に示す。

【0201】

図17A (配列番号14) は、ヒトCYP3A4遺伝子座のタンパク質コード領域上流に由来する、約13 kbの配列を提示する。この図は、開始ATGコドンを含むゲノム配列を含む。マウス肝臓において肝臓特異的な基本的発現に影響する転写制御エレメント (本明細書中で同定された) を含むプロモーター領域の2.5 kbのフラグメントを、図17B (配列番号15) に提示する。

10

【0202】

表2は、CYP3A4遺伝子座のタンパク質コード領域上流の配列を示し、これは上記の構築物を構成する。表2の開始位置および終結位置を、図17Aに提示される配列に関連して示す。

【0203】

(表2)

【0204】

【表2】

ベクター名	CYP3A4遺伝子座由来のフラグメントのおよそのサイズ	図17Aに関連したCYP3A4遺伝子座フラグメントの開始位置	図17Aに関連したCYP3A4遺伝子座フラグメントの終結位置
pGL3-I-CYP3A4M	10.5 kb	2,461	12,998
pGL3-I-CYP3A4L	13 kb	1	12,998

20

(実施例2)

(肝臓プッシュ (liver push) アッセイ)

30

肝臓プッシュアッセイを、上記に記載されるように実施した。

【0205】

(A. マウスCyp3A11構築物)

簡単には、実施例1Aに記載される発現構築物を、マウスに静脈内注射し、上記のように2週間後に画像化した (前処置群)。各発現構築物について、その後、3匹のマウスを、100 μ lのDMSOで処置し (溶媒コントロール) ; 3匹のマウスを、0.1 mg/gのデキサメタゾン (100 μ l) で処置し ; そして、3匹のマウスを、0.1 mg/gのリファンピシン (100 μ l) で処置した。デキサメタゾンおよびリファンピシンは、Cyp3A11を誘導することが以前に示された (Yanagimotoら、(1997) Arch Biochem Biophys 340 (2) : 215-8)。さらに、マウスを、同じ用量で、単一用量のDMSO、リファンピシン (Rif) およびデキサメタゾン (Dex) で処置した。次いで、薬物投与後、マウスを、種々の時点で画像化した。

40

【0206】

図10に示されるように、5 μ gのCyp3A11Mおよび0 μ gのhPXRを用いた肝臓プッシュに供された画像化マウスは、デキサメタゾン投与の約48時間後、ルシフェラーゼ活性のほぼ5倍の誘導が見られた。DMSO処置マウスは、ほとんど誘導を示さないかまたは全く示さないのに対して、リファンピシン処置マウスは、薬物処置の約48~96時間後に、ルシフェラーゼのいくらかの誘導を示した。

【0207】

50

図12に示されるように、5 μ gのCyp3A11Lおよび1 μ gのhPXRを用いた肝臓プッシュに供された画像化マウスは、リファンピシン投与の約6時間後、ルシフェラーゼ活性のほぼ8倍の誘導が見られた。DMSO処置マウスは、ほとんど誘導を示さないかまたは全く示さないのに対して、デキサメタゾン処置マウスは、薬物処置の約24～48時間後に、ルシフェラーゼの約4倍の誘導を示した。

【0208】

従って、Cyp3A11転写コントロール要素によって媒介される発現の調整は、生育動物において、直接モニタリングされ、化合物の毒性に対する情報を提供し得る。

【0209】

(B. hPXRの滴定)

リファンピシンの取り込みには、リファンピシンコレセプター（例えば、hPXR）の同時投与を必要とすると、以前は考えられた。特に、hPXRは、薬物（デキサメタゾンおよびリファンピシン）によって、ヒト肝細胞におけるCYP3A4発現の誘導を媒介することが示された。Pascussi JMら、Mol Pharmacol (2000 Aug) 58 (2) : 361-72を参照のこと。

【0210】

この概念を試験するために、本発明者らは、実施例1に記載されるように、変動量のhPXRおよびcyp発現構築物を用いて、肝臓プッシュ実験を実施した。図11、13および16に示されるように、PXRは、CYP3A4LまたはCyp3A11Mによって媒介される、リファンピシンの取り込みまたはルシフェラーゼ活性の誘導には必要ではない。実際に、特定の場合において、ルシフェラーゼ発現の誘導は、より高い用量のPXRが使用された場合に、実際に減少した。

【0211】

従って、リファンピシンコレセプターの投与は、リファンピシンの取り込みには必要ではない。

【0212】

(C. ヒトCYP3A4構築物)

簡単には、実施例1Bに記載される発現構築物を、マウスに静脈内注射し、上記のように2週間後に画像化した（前処置群）。各発現構築物について、2.2ml体積のプラスミド混合物（pGL3-I-CYP3A4MまたはpGL3-I-CYP3A4L）を、22gのFVB雌性マウスに、8秒未満の期間にわたって、静脈注射した。画像化のために、基質ルシフェリンを、150mg/体重kg（15mg/mlルシフェリンストック）の用量で、腹腔腔へと注射した。次いで、マウスを、ガスチャンバー中でイソフルラン/酸素で麻酔した。ルシフェリン注射の5分後、鼻に挿管して、イソフルランで麻酔されたマウスを、画像化ステージに配置し、Xenogen IVISイメージングシステムを使用して1分間、腹側から画像化した。肝臓領域全体の相対的光子放出を、Living Imageソフトウェアを使用して定量した。

【0213】

図14に示されるように、5 μ gのpGL3-I-CYP3A4Lおよび0 μ gのhPXRを用いた肝臓プッシュに供されたマウスは、Rif投与の約6時間後、ルシフェラーゼ活性の約15倍の誘導を示した；デキサメタゾン処理の6時間後の、約13倍の誘導を示し、そしてDMSO投与後いつでも、ほとんど誘導しなかったかまったく誘導を示さなかった。図15に示されるように（データは、第1の投与の12日後の第2の投薬について示され、マウスを、第2の用量で処置し、画像化した）、5 μ gのpGL3-I-CYP3A4Lおよび1 μ gのhPXRを用いた肝臓プッシュに供されたマウスは、Rif投与の約12時間後に約40倍のルシフェラーゼ活性の誘導を示し；デキサメタゾン処置の約12時間後に約60倍の誘導を示し、そしてDMSOの投与後いつでもほとんど誘導しなかったかまたは全く誘導を示さなかった。

【0214】

さらに、1.3Kbプロモーター（pGL3-I-CYP3A4L）は、10.5Kbプ

10

20

30

40

50

ロモーター (pGL3-I-CYP3A4M) より、約25倍肝臓中でさらに高い発現を媒介した。

【0215】

(実施例3)

(CYP3A11/CYP3A4プロモーター配列を介するハイスループット毒性スクリーニング)

化合物を、これらの能力をモニタリングすることによって安全性および／または可能な毒性についてスクリーニングし、トランスフェクトされた細胞における、Cyp3A11プロモーター媒介性生物発光またはCYP3A4プロモーター媒介性生物発光を媒介し得る。宿主細胞 (例えば、肝細胞) を、例えば、Cyp3A11-LucまたはCYP3A4-Lucを含有するリポフェクタミン (Promega, Madison, WI) を使用して、トランスフェクトし、96ウェルプレートにプレートし、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングに使用した。トランスフェクションを、製造業者の指示書または標準プロトコールに従って実施した。トランスフェクション後、細胞を、選択された化合物で約36時間処置し、続いてこの細胞を、受動溶解緩衝液 (Promega) で溶解し、そしてDual-Luciferase Reporter Assayシステム (Promega) でルシフェラーゼ活性についてアッセイする。

10

【0216】

(実施例4)

(Cyp3A11媒介性代謝またはCYP3A4媒介性代謝のインビボモニタリング)
(A. マウスCyp3A11)

20

Cyp3A11プロモーター-LucYG-発現カセットを保有するトランスジェニックマウスを、トランスジェニックマウスを作製するための公知の方法を用いて得る (上記考察を参照のこと)。これらの動物 (「親 (founder)」) を、非トランスジェニックマウスと交配させ、同産児 (「F1動物」) を産出した。

【0217】

この親からのF1動物を、上記に記載される方法に従って1~6週齢まで画像化した。観測されたシグナル強度を、定量化した。

【0218】

これらの実験は、本発明の発現カセットおよびトランスジェニック動物を、インビボでのCyp3A11プロモーター媒介性の生物発光をモニターするために使用し得ることを示す。

30

【0219】

(B. ヒトCYP3A4)

トランスジェニックマウスを、pGL3-I-CYP3A4M-luc構築物またはpGL3-I-CYP3A4L構築物を使用して作製した。pGL3-I-CYP3A4Mについて、プラスミドを、BamHIで消化し、10.5KbのCYP3A4プロモーター、キメラのイントロン、および発光飛翔昆虫ルシフェラーゼcDNAを含む12.5kbのフラグメントを、電気溶出によってアガロースゲルから精製した。pGL3-I-CYP3A4Lについて、プラスミドを、PvuIで消化し、13KbのCYP3A4プロモーター、キメラのイントロン、および発光飛翔昆虫ルシフェラーゼcDNAを含む15kbを、電気溶出によってアガロースゲルから精製した。

40

【0220】

次いで、精製されたフラグメントを、単細胞段階のFVB胚へと各々マイクロインジェクションした。次いで、この胚を、偽妊娠マウスへと移植した。親を、PCRおよび画像化によってスクリーニングし、得られたトランスジェニック動物を、上記に記載される方法に従って、1~6週齢まで画像化した。観測されたシグナル強度を、定量化した。ルシフェラーゼレベルは、pGL3-I-CYP3A4L動物の肝臓およびpGL3-I-CYP3A4M動物の腸管において最大であった。

【0221】

50

(実施例 5)

(反復配列およびプロモーター領域の同定)

(A. Cyp3A11におけるプロモーター領域)

図1A(配列番号12)は、マウスCyp3A11遺伝子座由来の転写制御因子のヌクレオチド配列を含む。この図において、この配列は、全部で12,275ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、11,003位~11,005位に位置し、TATAボックスは、10,884位~10,887位に位置し、主要な転写開始部位は、10,914位のCで開始する。Cyp3A11遺伝子の約9.3kb領域は、図1Aのヌクレオチド位1~9,330であり、約9.3kb配列は、図1Bに単独で示される(配列番号13)。本発明はまた、配列番号12のヌクレオチド1~11,002のポリヌクレオチドを含む転写制御因子配列を包含する。

10

【0222】

マウスCyp3A11プロモーター由来の約9.3kb配列を、GenBankのBLAST検索において使用した。1つの検索において、マウスL1要素(反復配列のLINEファミリー)(Locus MUSL1M9)に対する一致が同定された。マウスゲノムにおいて、3つの公知のL1要素のファミリーが存在する(Mears, M. L. およびHutchison, C. A., J Mol Evol 2001年1月; 52(1): 51-62)。L1要素は、マウスにおいてレトロトランスポゾンサブファミリーと関連すると考えられる(例えば、Goodier J. L. ら、Genome Res 2001年10月; 11(10): 1677-85)。この配列と3A11配列との整列は、約91%の同一性を有する領域を同定した(図18を参照)。

20

【0223】

さらに、約9.3kbの3A11配列を、RepeatMaskerプログラム(<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>)を使用して分析した。このプログラムは、公知の反復配列(例えば、LINESElement、SINESElement、およびLTRElement)に高い相同性を有する領域を同定し得る。L1Elementに高い相同性(91%)を有する3つの領域(約1~623、2503~5103、および6129~6791)を、同定した(図18)。別の領域(約623~2503)が、マウスMaLR反復ファミリーに高度に相同性であることを示した(図18)。このMaLR反復ファミリーはまた、哺乳動物レトロトランスポゾン様スーパーファミリーと関連すると考えられる(Kelly, R. G., Genomics 1994年12月; 24(3): 509-15)。

30

【0224】

約9.3kbの3A11配列における2つの一次非反復領域を同定した(約5104~6218および6792~9330)。

【0225】

(B. CYP3A4におけるプロモーター領域)

図17A(配列番号14)は、ヒトCYP3A4遺伝子座由来の転写制御配列のヌクレオチド配列を包含する。この図において、この配列は、全部で13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、13,033~13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901~12,904位に位置し、主要な転写開始部位は、12,930位のAで開始する。CYP3A4遺伝子の約2.5kb領域は、本明細書中に記載される発現に有用であり、図17Aのヌクレオチド位1~2,461であり、約2.5kb配列は、図17Bに単独で示される(配列番号15)。

40

【0226】

上記に記載される配列に対する類似する分析を、約13kbのCYP3A4プロモーター領域で実施した。この分析の結果の概要を、図19に示す。2つの異なる種類の反復配列を同定した: L1要素およびAlu反復。

【0227】

約13kbのCYP3A4プロモーター領域における5つの一次非反復領域を同定した

50

(約1290～2446、2758～4111、4424～6010、6317～9099、および9401～12998)。

【0228】

(実施例6)

(CYP3A4-luc FvBトランスジェニックマウス株の産生)

(A. プラスミド構築物)

CYP3A4-lucレポーターを、本質的には、実施例1Bに記載されるように、簡単には以下のように設計した。ヒトCYP3A4プロモーター領域を包含するBACクローンを、CYP3A4プロモーター領域のヌクレオチド-1105から-1080に対応するプライマー(5'-GTTGGTACCCCTGCAGTGACCACTGCCCCATCATTTG-3'(配列番号9))およびCYP3A4プロモーター領域のヌクレオチド+40から69に対応するプライマー(5'-ATCAAGCTTCTCTTTTCAGCTCTGTGTGTGCTCTTTTGC-3'(配列番号10))を使用して、PCRによってスクリーニングした。これらプライマーをまた、pfuDNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA)を使用して、ヒトゲノムDNAからCYP3A4の1.2kbプロモーター領域を増幅した。PCR生成物を、KpnI/HindIIIを用いて消化し、Geneclean Kit(Qbiogene, Carlsbad, CA)を使用してアガロースゲルから精製した。1.2kbプロモーター領域を改変された発光飛翔昆虫のルシフェラーゼcDNA配列を含有するpGL3-基本型ベクター(Promega, Madison, WI)へとクローニングした。次いで、pCAT-3-基本型ベクター(Promega, Madison, WI)由来のキメラのイントロンを包含する233bpのHindIIIフラグメントを、CYP3A4プロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子との間に挿入した。BACクローンからサブクローニングされた1.88kbのKpnI/BglIIフラグメント、950bpのBglIIフラグメント、および10kbのKpnIフラグメントを、続いて前の構築物へと挿入した。最終構築物pGL3-I-CYP3A4は、13kbのヒトCYP3A4プロモーター領域、233bpのキメラのイントロン、および改変された発光飛翔昆虫のルシフェラーゼcDNAを包含する。この構築物の全ての連結部を、DNA配列決定法によって確認した(Stanford PAN Facility, Stanford, CA)。CYP3A4-luc導入遺伝子の全配列を、図17Cに示す(配列番号17)。

【0229】

(B. CYP3A4-lucトランスジェニック(Tg)マウス)

トランスジェニック株を、FVBドナー胚を使用して、マイクロインジェクション法によって作製した(例えば、Wagnerらの米国特許第4,873,191号(1989年10月10日に公開された);およびRicha, J., (2001)「Production of transgenic mice」Molecular biotechnology 2001年3月第17巻:261-8を参照のこと)。

【0230】

(C. Tgマウスのスクリーニング)

18匹の親マウスを、LucF1プライマーおよびLucR4プライマー、またはLuc3プライマー(5'-GAAATGTCCTTCGGTTTGGCAGAAAGC-3'(配列番号18))およびLuc4プライマー(5'-CCAAAACCGTGATGGAATGGAAACAACA-3'(配列番号19))を使用して、PCRによってスクリーニングした。これら同一のプライマーを、Tgの子孫をスクリーニングするためにもまた使用した。

【0231】

((i) PCRスクリーニング)

図20は、CYP3A4-luc Tgマウスの例示的なPCRスクリーニングの結果を示す。この図において以下のとおりである: レーン1、DNAラダー; レーン2、ネガティブ同産児; レーン3、ポジティブ同産仔。この結果は、CYP3A4-luc Tg

マウスの同定を示す。

【0232】

((i i) サザンハイブリダイゼーション分析)

全ルシフェラーゼ cDNA (Promega Corp.) を包含する pGL3-基本型由来の 1.8 kb の HindIII / XbaI フラグメントを、サザンハイブリダイゼーションのためのプローブとして使用した。10 µg の異型接合ゲノムDNAを、BamHI で消化し、17 pg の pGL3-基本型を、ポジティブコントロールとして供した (図 21) 。導入遺伝子の期待される大きさは、12 kb であった。例示的なハイブリダイゼーション分析の結果を、図 21 に示す。この図において以下のとおりである：図 21 には、サザンハイブリダイゼーションによる FVB / N-TgN (CYP3A4-luc) の例示的なスクリーニングの結果を示す。この図において以下のとおりである：レーン 1、10 µg の CYP3A4-luc Tg ゲノムDNA；レーン 2、17 pg の pGL3-基本型ポジティブコントロール。これらの結果は、トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子の存在を示す。

10

【0233】

(D. 選択基準に適用された表現型データ)

動物株を評価するための一般的な方法は、以下のとおりである。Tg 親を、野生型 FVB マウスと交配して、F1 マウスを作製した。雌性トランスジェニック親を、野生型 FVB オスと交配し、雄性トランスジェニック親を、数匹の野生型 FVB メスと交配した。

【0234】

30 mg / ml のルシフェリンストック溶液を、滅菌 PBS 中に調製した。ルシフェリンを、Biosynth AG, Switzerland から D-ルシフェリンカリウム塩 (カタログ番号 XR-1001、ロット番号 14021 / 2) として購入した。

20

【0235】

デキサメタゾン (カタログ番号 ; D1756) 、リファンピシン (カタログ番号 ; R3501) 、プレグネノロン (カタログ番号 ; P9129) 、クロトリマゾール (カタログ番号 ; C6019) 、ニフェジピン (カタログ番号 ; N7634) 、5-プレグネン-3b-OL-20-ONE-16a-カルボニトリル (カタログ番号 ; P0534) 、およびフェノバルビタール (カタログ番号 ; P3761) を全て、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。フェノバルビタールを、PBS 緩衝液中に調製し、その他を、DMSO 中に調製した。

30

【0236】

薬物およびルシフェリンの投与経路は、IP であった。ルシフェリン基質および薬物の試薬投与用量は、以下のとおりであった。ルシフェリンの用量 (150 mg / kg の 30 mg / ml のルシフェリンストック) を、IVISTM (Xenogen Corporation, Alameda, California) システム中で画像化する前に 5 分間、IP 投与した。化学物質の用量は以下のとおりであった：フェノバルビタールを除く全ての薬物を、DMSO 中に調製し、50 mg / kg (フェノバルビタールを 100 mg / kg で PBS 中に調製した) の用量で IP 注射した。DMSO を、ビヒクルコントロールとして調製した。処置の持続時間は、代表的には 2 ~ 3 日間であった。

40

【0237】

ルシフェリンの投与後に、動物を、気体麻酔法 (イソフルラン) を使用して麻酔し、画像化のために IVISTM ボックス (Xenogen Corporation, Alameda, California) に配置した。全ての動物を、化学物質の投与前および後に、画像化し、オスおよびメスそれぞれについて、10 秒間または 1 分間、高分解能 (ビンニング (binning) 2) で画像化した。

【0238】

代表的な CYP3A4 誘導体 (デキサメタゾン (50 mg / 体重 kg) およびリファンピシン (50 mg / 体重 kg)) による CYP3A4-luc の誘導を、動物において評価した。各親からの F1 マウス (すなわち、導入遺伝子の存在に対して PCR ポジティブ

50

なマウス)を、DMSO、デキサメタゾン (Dex)、またはリファンピシン (Rif) のT = 0 (処置前)ならびにT = 3時間後およびT = 6時間後に画像化した。これを、18のうち9の親株由来の3匹のマウス (両方の性を含む) の群で実施した。Dex処置およびRif処置から得られた一次スクリーニングの結果を、以下に記載する。

【0239】

(a) 75株、195株、230株、および240株は、肝臓の基礎発現よりも、より高い腸管基礎発現を有する、腸管領域中での誘導を示した。

【0240】

(b) 225株は、肝臓および腸管において、DexおよびRifによる誘導を示したが、肝臓の基礎発現よりも、より高い腸管基礎発現を有した。

10

【0241】

(c) 233株は、DexおよびRifによって、小腸における強い誘導および肝臓における僅かな誘導を示した。この株は、高い腸管基礎発現を有した。

【0242】

(d) 株221は、いずれの薬物によっても誘導を示さず、非常に低いレベルの基礎発現を有した。

【0243】

(e) 株82および株208は、他の領域においてよりも肝臓において、DexおよびRifによるより強い誘導を示し、肝臓における基礎発現は、小腸における基礎発現よりも、より高く；オスは、メスよりも強く応答した。

20

【0244】

このデータを、本明細書において前に記載された選択基準に対して評価した；(i) 肝臓における遺伝子発現の誘導—225株、233株、82株および208株は、この基準を満たした；(ii) 他の領域 (例えば、腸管) においてよりも肝臓領域においてのより高い誘導—82株および208株は、この基準を満たした；および(iii) 体の他の部分における基本的な発現よりもより高いまたはそれに等しい、肝臓における基礎発現—82株および208株は、この基準を満たした。

【0245】

上記基準を満たすマウスを、代表的には、以下の分析のために選択した。82株および208株は、肝臓においてDexおよびRifによる強い誘導を示し、雄性肝臓領域においてより高い基本ルシフェラーゼレベルを有したので、これら株を、二次スクリーニングに選択した。

30

【0246】

(二次スクリーニング)

82株および208株は、基準の第1のセットを満たし、特に、導入遺伝子 (CYP3A4-luc) 発現を、DexおよびRifによって、肝臓領域に誘導し、そして動物における導入遺伝子発現は、少なくともオスにおいて、より高い肝臓基礎発現を示した。これらの2つの株は、一次スクリーニングにおいてほぼ同一に見えた。株82は、さらに、CYP3A4発現を誘導すると考えられている7つの化合物を使用して特徴付けられた。この化合物としては、プレグネノロン (Preg)、フェノバルビタール (Phenob)、リファンピシン (Rif)、ニフェジピン (Nif)、5-プレグネン-3β-OH-20-ONE-16α-カルボニトリル (PCN)、デキサメタゾン (Dex) およびクロトリマゾール (Clotrim) が挙げられる。発現を、両方の性について評価した。例示的な結果を、以下に示される図22、パネルA~Dに示される。株82は、肝臓内で、ほとんどのCYP3A4誘導物質に応答し、この細胞株を、最終株として選択し、FVB/N-TgN (CYP3A4-luc) と命名した。

40

【0247】

TgマウスにおけるCYP3A4-luc導入遺伝子の誘導の例示的な分析の結果は、図22、パネルA~Dに示される。この図において、マウスを、DMSO、プレグネノロン (Preg)、フェノバルビタール (Phenob)、リファンピシン (Rif)、ニ

50

フェジピン (Nif)、5-ブregネン-3b-OL-20-ONE-16a-カルボニトリル (PCN)、デキサメタゾン (Dex) およびクロトリマゾール (Clotrim) の投与 T=0 (処置前) および T=6 時間後、画像化した。NTは、非処置コントロールである。各画像化セッションの前に、マウスを、150mg/kg シフエリンで i.p. 注射した。パネルAは、9匹のオスマウスについての例示的な誘導データを示し、各マウスは、パネルCの下の説明文に示される化合物で処置した。パネルCは、9匹の雌性マウスについての例示的な誘導データを示し、各マウスは、パネルCの下の説明文に示される化合物で処置した。パネルBは、類似する誘導実験を示す棒グラフを示し、ここでこの結果は、3匹の雌性マウスの群に適用された場合の各処置に対する結果 (パネルDの下に示される) を示す。各マウスに対する測定を、上記に記載されるように実施した。付随するエラーバーを示す。パネルDは、類似する誘導実験を示す棒グラフを示し、ここでこの結果は、3匹の雌性マウスの群に適用された場合の各処置に対する結果 (パネルDの下に示される) を示す。各マウスに対する測定を、上記に記載されるように実施した。付随するエラーバーを示す。

10

【0248】

この分析の結果は、上記の基準に概略されるように、所望の表現型を有する CYP3A4-luc Tg マウスが、本明細書中に教示される方法によって同定され得る。

【0249】

当業者に明らかなように、上記実施形態の種々の改変およびバリエーションを、本発明の精神および範囲を逸脱することなくし得る。これらの改変およびバリエーションは、本発明の範囲内にある。

20

【図面の簡単な説明】

【0250】

【図1-1】図1A (配列番号12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計12,275ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11,003~11,005位に位置し、TATAボックスは、10,884~10,887位に位置し、主要転写開始部位は、10,914位のCで開始する。Cyp3A11 遺伝子の約9.3kbの領域は、図1Aのヌクレオチド1~9,330位由来であり、そして約9.3kb配列は、図1B (配列番号13) に単独で示される。

30

【図1-2】図1A (配列番号12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計12,275ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11,003~11,005位に位置し、TATAボックスは、10,884~10,887位に位置し、主要転写開始部位は、10,914位のCで開始する。Cyp3A11 遺伝子の約9.3kbの領域は、図1Aのヌクレオチド1~9,330位由来であり、そして約9.3kb配列は、図1B (配列番号13) に単独で示される。

【図1-3】図1A (配列番号12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計12,275ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11,003~11,005位に位置し、TATAボックスは、10,884~10,887位に位置し、主要転写開始部位は、10,914位のCで開始する。Cyp3A11 遺伝子の約9.3kbの領域は、図1Aのヌクレオチド1~9,330位由来であり、そして約9.3kb配列は、図1B (配列番号13) に単独で示される。

40

【図1-4】図1A (配列番号12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計12,275ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11,003~11,005位に位置し、TATAボックスは、10,884~10,887位に位置し、主要転写開始部位は、10,914位のCで開始する。Cyp3A11 遺伝子の約9.3kbの領域は、図1Aのヌクレオチド1~9,330位由来であり、そして約9.3kb配列は、図1B (配列

50

番号 13) に単独で示される。

【図 1-5】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-6】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-7】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-8】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-9】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-10】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-11】図 1 A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-12】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

【図 1-13】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

10

【図 1-14】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

20

【図 1-15】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

【図 1-16】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

30

【図 1-17】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

40

【図 1-18】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（A T G）は、11, 003～11, 005 位に位置し、T A T A ボックスは、10, 884～10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。C y p 3 A 1 1 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1 A のヌクレオチド 1～9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1 B（配列番号 13）に単独で示される。

【図 1-19】図 1 A（配列番号 12）は、マウス C y p 3 A 1 1 遺伝子座由来の転写制

50

御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1B (配列番号 13) に単独で示される。

【図 1-20】図 1A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1B (配列番号 13) に単独で示される。

10

【図 1-21】図 1A (配列番号 12) は、マウス Cyp3A11 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 12, 275 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (ATG) は、11, 003~11, 005 位に位置し、TATA ボックスは、10, 884~10, 887 位に位置し、主要転写開始部位は、10, 914 位の C で開始する。Cyp3A11 遺伝子の約 9.3 kb の領域は、図 1A のヌクレオチド 1~9, 330 位由来であり、そして約 9.3 kb 配列は、図 1B (配列番号 13) に単独で示される。

20

【図 2】図 2 は、1.6 kb Cyp3A11 プロモーター配列を含む pGL3-I-3A11S ベクター構築物の概略図である。

【図 3】図 3 は、6.0 kb Cyp3A11 プロモーター配列を含む pGL3-I-3A11M ベクター構築物の概略図である。

【図 4】図 4 は、9.0 kb Cyp3A11 プロモーター配列を含む pGL3-I-3A11L ベクター構築物の概略図である。

【図 5】図 5 は、1.6 kb Cyp3A11 プロモーター配列を含む pBSSK-3A11S ベクター構築物の概略図である。

【図 6】図 6 は、6 kb Cyp3A11 プロモーター配列を含む pBSSK-3A11M ベクター構築物の概略図である。

30

【図 7】図 7 は、pGL3-I-Basic ベクター構築物の概略図である。

【図 8】図 8 は、10 kb CYP3A4 プロモーター配列を含む pGL-I-3A4M ベクター構築物の概略図である。

【図 9】図 9 は、13 kb CYP3A4 プロモーター配列を含む pGL-I-3A4L ベクター構築物の概略図である。

【図 10】図 10 は、肝臓プッシュ (liver push) 実験の結果を示す。5 µg の pGL3-I-3A11M 構築物および 0 µg の hPXR プラスミドを用いて、FVB マウスを肝臓プッシュさせた。

【図 11】図 11 パネル A~D は、5 µg の pGL3-I-3A11M と同時投与される hPXR プラスミドの量を最適化するために実施した、hPXR 力価測定実験の結果を示す。パネル A、0 µg hPXR+5 µg 3A11M-luc、パネル B、1 µg hPXR+5 µg 3A11M-luc、パネル C、2 µg hPXR+5 µg 3A11M-luc、パネル D、5 µg hPXR+5 µg 3A11M-luc。

40

【図 12】図 12 は、肝臓プッシュ実験の結果を示す。5 µg の pGL3-I-3A11L 構築物および 1 µg の hPXR プラスミドを用いて、FVB マウスを肝臓プッシュさせた。

【図 13】図 13 パネル A~D は、5 µg の pGL3-I-3A11L と同時投与される hPXR プラスミドの量を最適化するために実施した、hPXR 力価測定実験の結果を示す。パネル A、0 µg hPXR+5 µg 3A11L-luc、パネル B、1 µg hPXR+5 µg 3A11L-luc、パネル C、2 µg hPXR+5 µg 3A11L-luc、パネル D、5 µg hPXR+5 µg 3A11L-luc。

50

L-luc、パネルD、5 μ g hPXR+5 μ g 3A11L-luc。

【図14】図14は、肝臓プッシュ実験の結果を示す。5 μ gのpGL3-I-3A4L構築物および0 μ gのhPXRプラスミドを用いて、FVBマウスを肝臓プッシュさせた。

【図15】図15は、肝臓プッシュ実験の結果を示す。5 μ gのpGL3-I-3A4L構築物および1 μ gのhPXRプラスミドを用いて、FVBマウスを肝臓プッシュさせた。

【図16】図16パネルA～Dは、5 μ gのpGL3-I-3A4Lと同時投与されるhPXRプラスミドの量を最適化するために実施した、hPXR力価測定実験の結果を示す。パネルA、0 μ g hPXR+5 μ g 3A4L-luc、パネルB、1 μ g hPXR+5 μ g 3A4L-luc、パネルC、2 μ g hPXR+5 μ g 3A4L-luc、パネルD、5 μ g hPXR+5 μ g 3A4L-luc。

【図17-1】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN(CYP3A4-luc)マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーン配列全体を示す。

【図17-2】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN(CYP3A4-luc)マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーン配列全体を示す。

【図17-3】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN(CYP3A4-luc)マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーン配列全体を示す。

【図17-4】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン(ATG)は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN(CYP3A4-luc)マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーン配列全体を示す。

10

20

30

40

50

ウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

【図 1 7 - 5】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

10

【図 1 7 - 6】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

20

【図 1 7 - 7】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

30

【図 1 7 - 8】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

40

【図 1 7 - 9】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

50

ウスを作製するために使用される CYP3A4-luc のトランスジーンの配列全体を示す。

【図17-10】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（ATG）は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN（CYP3A4-luc）マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーンの配列全体を示す。

10

【図17-11】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（ATG）は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN（CYP3A4-luc）マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーンの配列全体を示す。

20

【図17-12】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（ATG）は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN（CYP3A4-luc）マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーンの配列全体を示す。

30

【図17-13】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（ATG）は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN（CYP3A4-luc）マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーンの配列全体を示す。

40

【図17-14】図17A（配列番号14）は、ヒトCyp3A4遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計13,035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン（ATG）は、13,033～13,035位に位置し、TATAボックスは、12,901～12,904位に位置し、主要転写開始部位は、12,930位のAで開始する。Cyp3A4遺伝子の約2.5kbの領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図17Aのヌクレオチド1～2,461位由来であり、そして約2.5kb配列は、図17B（配列番号15）に単独で示される。図17C（配列番号17）は、FVB/N-TgN（CYP3A4-luc）マウスを作製するために使用されるCYP3A4-lucのトランスジーンの配列全体を示す。

50

マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

【図 1 7 - 1 5】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

10

【図 1 7 - 1 6】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

20

【図 1 7 - 1 7】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

30

【図 1 7 - 1 8】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

40

【図 1 7 - 1 9】図 1 7 A (配列番号 1 4) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 1 3, 0 3 5 ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、1 3, 0 3 3 ~ 1 3, 0 3 5 位に位置し、T A T A ボックスは、1 2, 9 0 1 ~ 1 2, 9 0 4 位に位置し、主要転写開始部位は、1 2, 9 3 0 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2. 5 k b の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 1 7 A のヌクレオチド 1 ~ 2, 4 6 1 位由来であり、そして約 2. 5 k b 配列は、図 1 7 B (配列番号 1 5) に単独で示される。図 1 7 C (配列番号 1 7) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

50

マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

【図 17-20】図 17 A (配列番号 14) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 13, 035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、13, 033~13, 035 位に位置し、T A T A ボックスは、12, 901~12, 904 位に位置し、主要転写開始部位は、12, 930 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2.5 kb の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 17 A のヌクレオチド 1~2, 461 位由来であり、そして約 2.5 kb 配列は、図 17 B (配列番号 15) に単独で示される。図 17 C (配列番号 17) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

10

【図 17-21】図 17 A (配列番号 14) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 13, 035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、13, 033~13, 035 位に位置し、T A T A ボックスは、12, 901~12, 904 位に位置し、主要転写開始部位は、12, 930 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2.5 kb の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 17 A のヌクレオチド 1~2, 461 位由来であり、そして約 2.5 kb 配列は、図 17 B (配列番号 15) に単独で示される。図 17 C (配列番号 17) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

20

【図 17-22】図 17 A (配列番号 14) は、ヒト C y p 3 A 4 遺伝子座由来の転写制御エレメントのヌクレオチド配列を含む。この図において、配列は、合計 13, 035ヌクレオチドを示し、翻訳開始コドン (A T G) は、13, 033~13, 035 位に位置し、T A T A ボックスは、12, 901~12, 904 位に位置し、主要転写開始部位は、12, 930 位の A で開始する。C y p 3 A 4 遺伝子の約 2.5 kb の領域は、本明細書中に記載されるように発現を促進するのに有用であり、図 17 A のヌクレオチド 1~2, 461 位由来であり、そして約 2.5 kb 配列は、図 17 B (配列番号 15) に単独で示される。図 17 C (配列番号 17) は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) マウスを作製するために使用される C Y P 3 A 4 - l u c のトランスジーンの配列全体を示す。

30

【図 18】図 18 は、マウスゲノムにおいて C y p 3 A 11 コード配列の 5' 側に位置する約 9.3 kb プロモーター領域配列の概略図を示す。図は、2つの公知のファミリー由来の反復エレメントのおよその位置を示す。

【図 19】図 19 は、ヒトゲノムにおいて C y p 3 A 11 コード配列の 5' 側に位置する約 13 kb プロモーター領域配列の概略図を示す。図は、2つの公知のファミリー由来の反復エレメントのおよその位置を示す。

【図 20】図 20 は、C Y P 3 A 4 - l u c T g マウスの P C R スクリーニングの代表的な結果を示す。

40

【図 21】図 21 は、F V B / N - T g N (C Y P 3 A 4 - l u c) についての代表的なサザンハイブリダイゼーション分析を示す。

【図 22】図 22 パネル A、B、C、および D は、T g F v B マウスの #82 系統における C Y P 3 A 4 - l u c の発現に対する生体異物の効果の代表的な結果を示す。

【図 1 - 1】

FIGURE 1A (1/12頁)

GGTACCTGGT ATCTGTCCAG AAATTCATCC ATTTCATCCA GGTITTCAG TTTGTGTGAG 60
TATAGCTTTT TGTAGAAGGA TCTGATGGTG TTTTGGATT CTTCAGGATC TGTGTGTATG 120
TCTCCCTTTT CATTTCGTAT TTTGTTAATT AGGATGTTGT CCTGTGCCC TCTAGTGAAT 180
CTAGCTAAGG GTTTATCTAT CTGTGTGATT TTCTCAAAGA ACCAACTCCT CGTTTGTTTA 240
ATTCTTTTAA TAGTCTTCT TGTTCACCT TGGTGTGATT CACCCCTGAG TTTGATTATT 300
TCTGTCTGTC TACTCCTCTT GGGTGAATTT TCTTCCTTTT TTTTCTAGAG CTTTTAGATG 360
TGTGTCTAAG CTGCTAGTGT ATGCCCTCTC CAGTTTCTTC TTGGAGGCAC TCAGAGCTAT 420
GAGTTTCCTT CTTAGAATAG CTTCATGTT GTCCCATAGG TTTGGGTATG TGTGTGCTTC 480
GTTTTCATTA AACTCTAAAA AGTCTTTAAT TTCTTTCTTT ATTCTCTCTT TGACCAAGGT 540
ATCATTGAGA AGAGTGTGT TCAAGTTCCA TTGAAATGTT TGTCTCCAT TATTTAATGT 600
TGCCCTAGTC CATGTGTGTC TGTGTCTTAG TCAGGGTTTC TTTCTCTGCA CAAACATCAT 660
GACCAAGAAA CAAGTTGGGG ATGAAAGGTT TTATTACAGT TACACTTCCA TGCTCTGTTT 720
CATCACAAA GGAAGTCAGG ACTGGAAGTC AAACAGATCA GGGAGCAGGA GCTGATGCA 780
AGGCCATGGA GGGATGTTCT TTAAGGCTT GCCTTCCTG GCTTGTCTAG CTTGTCTCT 840
TATAGATCC AAGACTACCA GCCCAGAGAT GGCACACACC ACAAGGGGCC TTTCCCTCTT 900
GATCACTAAT TGAGAAAAAT CTTACAGTT GGATCTCATG GAGGCATTTC CTCACTGAA 960
GCTCCTTCTT CTGTGATATC TCCAGCTGTG TCAAGTTGAC ACAAAGTAG CCAGTACAA 1020
TGACCCCTTG TCAACTGTAC ACACAAACAC ATCACTAGTA ACCCTCAACC CTTACATCT 1080

【図 1 - 3】

FIGURE 1A (3/12頁)

GGGAGGAAA GGGTTTATTT AGCTTACAT TCCATGCTGC TGTTCATCAC CAAAGGAAGT 2220
CAGGACTGGA ACTCAAACAG CTCAGGGAGC AGGAGCTGAT GCAGAGGCCA TGGAGGGAGT 2280
TTCTTTACTG GCTTGCTTTC CTTGCTTTC TCAGCCTGCA CTCTTATAGA ATCCAAGACT 2340
ACCAAGCCAG AGATGACACC ACCCAAGG GGCCTTTCCC CTTGTATCAC TAATTGAGAA 2400
AATGCCITAC AGTTGATCT CATGAGGCA TTTCTCAAC TGAAGCTCCT TTCTCTGTGA 2460
TATCTCCAGC TGTGTCAAGT TGACACAAA CTAGCCAGTA CAGTCTGATA GGATGCATG 2520
GACAAATTCA ATATTTTGT ATCTGTGAG GCTTGTGTTG TGACCAATTA TATGTTAAT 2580
TTTGGAGAAG GTTCCGTGAG GTGCTGAGAA GTATATCAAT TTGTTTAGG ATAAATGTT 2640
CTGTAGATAT CTGTCAAATC CATTGTTC ATCACTCTTG TTAGTTTAC TGTGTCTGT 2700
TTAGTTTCTG TTTTCATGAT CTGTCCACT ATGAAAGTGG TGTGTGAAG TCTCCACTA 2760
TTATTGTGTG AGGTGCAATG TGTGCTTTGA GCTTTACTAA AGTGTCTTTA ATGAATGTG 2820
CTGCCCTTGC ATTTGAGCA TAGATATTCA AAATTGAGAG TTCTCTTGG AGGATTTTAC 2880
CTTTGATGAG TATGAAGTGT CCCTCCTTGT CTTTTTGAT AACTTTGGTT TGGAGTTGA 2940
TTTTATTGA TATTAGAATG GCTACCCAG CTGTCTCTT CAGACCAATT GCTTGGAAA 3000
TTGTTTTCCA GCCTTTCCT CTGAGGTAGT GTCTGTCTTT TTCCCTGAGA TGGGTTCTCT 3060
GTAAGCAGCA GAATGTTGGG TCCTGTTTGT GTAGCCAGTC TGTATGCTA TGTCTTTTA 3120
TTGGGAATT GAGTCCATG ATATTAAGAG ATATTAAGGA AAAGTAATG TGTCTCTTA 3180
TTATTTTGT TGTAGAGTT GGCATTCTGT TCTTTTGCT GTCTCTTTT TGGCTTGTG 3240

【図 1 - 2】

FIGURE 1A (2/12頁)

TATTCATCCC CAAGATCTAA ATAACTTTAA AAGTCCACA GTCTTTACAT ATTCTTAAAA 1140
TTCAATCTC TTAAAAATAT CCATCTCTTT TAAATCCAA AGTCTTTTTA CAATTAAAA 1200
TCTCTTAAT ATGGCTCCA CTAAACAGT TTCTCTCTC AAGAGGGAAA ATATCAGGGC 1260
ACAGTCAAG CAAAAATCAA TCTCCAACTA TCCATGTCT GGGATCCAA TCACATCTT 1320
CTGACTCTT CCAAGGGCTT GTGTCACTTC TCCAGCCATG CCTTTGTAG CACAGGTGTC 1380
ATCTCTTAGG TTCCAGATGC CTGTACTCCA CTGATGCTGC TGCTCTTGGT GGTCACTCA 1440
TGTACTGTC ATCTCCAAA CACTGCATG CCCCTTCAGT CCTGGGCTT CAATTGCAAC 1500
TGAGGCTGCA CCGTACCAA TGGCTTCCA TGCCCTCTCA CAGTCCGAG CCTCAGCTGC 1560
TGTGCTGAC CCCTTCATGC CTCAAAACC AGTACCCTT GGGTACCCT TATACATTAC 1620
CAGTCCAC TGACAGAGA GTACAACCTT GGCTATCTT GGAACACAG CTCTTTGTG 1680
TTTCAGAAA CACTTCCCAG AAGATGTCAC CTCACAGAG CTGGTCTCTT CTTAATCAC 1740
GATAATTCT TAGCTCCAG TAACAGCAT CAATAGTAT AGTAATGAA GGTTTTGCTT 1800
TAGTAGTCT GGTATCTGT TAATCAGAT TGATTTCTA GCCCAGCTA ACCAGACTA 1860
CAGAAATTT ACAATCAAAA CAGCAATGG CCTGAAAGA GTCTTTAAT TTCCCTCTGA 1920
AATTCACAA GCCAGACCT CATCTCTGC ACTGTCTCA ACATATCTT CTAGCTCTT 1980
ACACAACAT TGACAGAGT CTTAACAAT AACGATCTT CAAGCCGAA GTTCCAAAGT 2040
CCTTCCACAG TCCTCCCAA AACATGGTCA GGTGTGACA GGAATACCC ACTCTGTGA 2100
CCAATTTGTC TTAGTCAGG TTTCTATTCC TGCACAAA TCATGGCCA GAAACAGTT 2160

【図 1 - 4】

FIGURE 1A (4/12頁)

AGGATTACT TTCTTGCTTT TTCTAGGCG TGATATCTGT CCTTGATTT TTTTCTGT 3300
TATTATCTT TGAAGGGCTG GATTCGTGAA AGATAATGT TGAATTTGT TTTGTATG 3360
AATACTTGG TTCTCCATC TATGTAAAT GAGAGTTGG CCGGTATAG TAGCCTGGC 3420
TGGCTTTTT TTGTCTCTT AGTGTCTGA TAACATCTGT CCAGCTCTT CTGCTTTCA 3480
TAGTCTCTG TGAAGAGTCT GGTGAATTC TGATAGGCT GCCTTTATAT GTTACTTGAC 3540
CTTCTCCCG TACTGCTTT AATATCTCT CTTTATTAG TGCATTGTT GTTCTGATTA 3600
TTGTGTGTG GGAGGAATCT CTTTCTGTT CAGCTCTATA TGGAGTCTG TAGGCTCTT 3660
GTATGTTAT GGGCATGTCA TTCTTTAGT TCGGGAAGTT TTCTCTATA ATTTGTGTA 3720
AAATATTGC TGGCCCTTA AGTTGAAAT CTTCACTCT ATCACTCTT ATTATCTGA 3780
GGTTTGGCT TCTCATGTG TCCTGGAAT CCTGATGTT TTGAGTAGG ACCTTTTGT 3840
GTTTGTATT ATCTTTGATT GTGTCTGTA TGTCTCTAT GGAATCTCT GCACCTGAGA 3900
TTCTCTCTC CATCTTTGT ATCCTGTGC TGATGCTAC GTCTATGGT CCAGATTCT 3960
TTCTAGAGT TTCTATCTC AGCGTGCCT CACTTTGGT TTTCTTATT GTGCTACTT 4020
CCCTTTTAG GTCTAGTAG GCTTTGTCA TTCCATCAC CTGTTTGGAT GTGTTGCT 4080
GTTTTCTAT GAGGACTCT ACCTGTTGG TGTGTTTTC TGTCTATCT TTAAGGATT 4140
GTAACCTTT AGCAGTGGT TCCTGTATT CTTTAAAGTA GTTATTAAAG TCCTCTTGA 4200
TGTCTCTAC CATCATCAT AGATATGCT TTAATAACG GTCTACTTT ACAGTGTGT 4260
TGGGTGCC AGGACTAGG GGGGTGGG TGCTGCATC TGATGATGT GAGTGTCTT 4320

【図 1 - 5】

FIGURE 1A (5/12頁)

GATTTCTGTT AGTAGGATTC TTACGTTTTTCTTTTGGCAT CTGTAATCT CTGGAGTTAT 4380
 TTGTTATAGT AGTCTCTGGT TAGAGCTTGT TCCTCAGGTG ATTCTGTTAT GCTCTATCAG 4440
 CAGACCTGGG AGACTAGCTC TATCCTTAGT TTCAGTGGTC AGAGTACTCT CTGCAGGCAA 4500
 GCTCTCTCTCT TGCAGGGAAG GTGCCCAGAT ATCTGGTGTG TGAACCTGCC TCCTGCAGCA 4560
 AGTTGTGTTC TACTCACCAT AGGTCTTTAAG ATCCCATGGT TGGTCTGTG TGGTTCCTTG 4620
 CGTGTGTCCG GAGACTCCCC GGGCCAGGGT CCCTGGTGAT TGGAGGGGAC TTGTGCACCG 4680
 GATCAGGCCA GGTATCTGA TTCTCTTAAT AATGCAGTCT CAGGTCCCGT GCGGATTAAT 4740
 TGGAGCAGGC GCTGTGTTC ACTCACCAGA GGTCTTAGGA TCCTGTGGAG GATCCTGTGT 4800
 GGGTCTCTGC GGGTGTCTGC AGACTCCCC GGGCAGGGAC CATGGTGCTG CAGTGGGCCG 4860
 GAAGGGACTT GAGCCCTGGA TCATGCCGGA TTATCTGCTT CCTTAATTAA TGCACTCTCA 4920
 GGTCTGTGCG ATTGGATTGG AGCAGGCGCT GTGTCCACT CACCAGAGGC CTTAGAATCC 4980
 CGTGC CGAT CCTGTGTGG TCCTTAGGG TGTCCGAGA CTCGCCGGG CTAGGGACCA 5040
 CGTGTCTCCA GTGGGCCGGA AGGGACTTGA GCCCGGAT AGGCCGGATT ATCTGCTTCC 5100
 TTAATCTCTG ATAGCTTTTT AAAAGTAAAC TTATAGTTAG ACACTGTACA CAGGTATATA 5160
 ATACATTTTA ATATTTCTCT CACTATGCCA GGTGTATCA TATAAGAACT TTTGAATATA 5220
 TTTCTTAAAG ATTAAATTTA ATATTTTAGT CTCTTAACT ATGCTTAATT CCCAAGAAT 5280
 ATTTGTATG TTTTGAACA ATTTACTCTT CAACATTANA TATAGGATTC ACAGTTATAG 5340
 ATAGTATTAA ATGTCCATTA ATGATATTTT TAGGGTATAA AAGGATATGA ATATAAAGT 5400

【図 1 - 7】

FIGURE 1A (7/12頁)

GCTAAAGGGA TCTGCATCC TATAGGTGGA ACAACATTAT GAACTAACCA GTACCCCGGA 6540
 GCTCTTGAAT CTAGCTGCAT ATGTATCAAA AGATGGCCTA GTAGACCATC ACTGGAAGA 6600
 GAGGCCCATT GGACACGCAA ACTTTATAT CCCAGTACA GGGGAACGCC AGGGCCAAAA 6660
 AAACAAAAAA CAAAAAATA TGGGAATGGG TGGGTAGGGA AGTGTGGGG AGGGTATGGG 6720
 GGACTTTTGG GATAGCATTG GAAATGTAA TGAAGAAAT ACGTAATAAA AAATATTAAA 6780
 AAAAAACCTA CATAGAGCAG ACAGGCCAAC ATTTTAGGAC AACCTTGCT CCAGTTGTTA 6840
 GGGGACCCAT ATGAAGATAT ACCTTTATAT TTGTTACATA TCTGTGGGTG TTGGAGGATC 6900
 TAAGTCCAGC CCATCTATTC TCTTTGGTTG GTGGCTCCAT GAGAGCTCCC ACGGTCTAG 6960
 GTTATTGAC TGTGTGCTC CCTGTGAGT TCCTACCCAG TTGGGGCCCC TCAAAATTTT 7020
 TCTCAGTTTT CTCTCANAG CTCTGAACT CCATCCAGTT TTGGCTGTG AATATCTGCA 7080
 TCTTCTGAG TAAGCTTTTG GATAGAGCCT CTAGAGGAC AACCATACTA GGCTCTGTG 7140
 TCCAAGTTTA AATGTATCAT TAATAGTGTG AGAGATTGAT GCTTGCCCAT GGGATTGGTG 7200
 TCAAGTTGGA CCAGTTAATG GTTAGCAATT CCTCAGTCT CTGCTCATC TTGTCCCTG 7260
 CATTTCTTAT AAACAGACCA ATTTTGTGTT CAAAAGTTTT ATGAGTGGGT TGGTGTGTTT 7320
 ATACCTCCAT TGGGGATCCT GCCTGATCCT GGGGAGATGG CCTTCTCAGG TTCCATATCC 7380
 CCTTACTAT GATTCTCTAC TAAGTCAAT TACATTGATA TCGAGGTCT TTCTTTATTC 7440
 TGGGTCTCTG GCTTCTCCTA GAGATGCCCC AATCCCTCAC TCCTAGCAGC TGTAGATTTC 7500
 TATTCACTCT CCTGGCCCTC TGGCTTTCAC TCCTGTCTCT TCCTCACCA CATCCTGAAC 7560

【図 1 - 6】

FIGURE 1A (6/12頁)

TGAACAAAA AGAGGGGATG GCCATAAAG AATATATCCA TATGTATATA TATATGTGAA 5460
 TAATTCAAAG AATAAATAA TATAATTTTA AAAAGCAGCA GGTATCCCC CCAAAATACA 5520
 GTTGTGARG TGCTTGTGA TAGAACCTTG TCAATGATA AACCAAGAA ATACCAACTA 5580
 CCCACCCAGC CACCAAGAG ATGGATTAGA GTCAGTGGAT TATTCAGGGT GTGGAGCCT 5640
 GAGGATAAAA AATCAGAACC CCAGACCCCC TAAAAAGST ATGCAGACCG TACAGCCATT 5700
 TTATAGTTTT GTGTTGAGCT TCATTGAGCG GGAATCTGGG TACACATGGC TTGTGTGGG 5760
 GTGTGTTGAC AACCTGCAAG TGTTCAATCC TAAGCTGATA TACACACAAG CACATAAGTA 5820
 GCACTAAATG GTCTGTGACC TTGCTTTGGG TGGGGACAA GTATGTTTGG CAGGGCTAA 5880
 ATGATAGAAC CACTAAGTTT AGGGCTGTG GAGAGACAGA GATAATAAAT NGATAGGGCC 5940
 CACATTTTCA GCAGTATACA TTTGTGCCAA GCAGTGTGAA TAGAGGCAAG TTCTAATGGT 6000
 ATTGGCGAAG TGCTTGATA TTTTATCCAT GGATTCGAAA GTGTGGGAG TGGGATGGTA 6060
 ACTTGATCCC TCCAGGAGCA AAGGAGGGTA GAAAAGGAGA CCAGGAGTGG GATGTTGTG 6120
 ACAGATCCCA GGGAAAAGCC AGGTGGAACA GAAGGGAGCT GGGAGAGTCT AGAGTCCGTG 6180
 CAATAGCTCC TGGGCAAGGC AGAATGTGCT TATAAACTA CAGAGACAAA GTTTGGAGCT 6240
 GTGACGAAG GATGGACCAT CTAGAGACTG CCATATCCAG GGGATCCAT CCATATCAG 6300
 CTTCTAAAG CTGACACCAT TGCATACACT AGCAAGATT TGCTGAAAG ACCAGATAT 6360
 AGTGTCTCT ATATGTGAGA CTATGCTGG GCCTAGCAA CACAGAAGT GATGCTCACA 6420
 GTCAGCTATT GGATGGATCA CAGGCTCCCC AATGGAGGAG CTAGAGATAG TACCCAGGA 6480

【図 1 - 8】

FIGURE 1A (8/12頁)

CCCCATCTC CCTTCTCCA CATTCATGG TACATTTTTT AAATCCAGA ACACAGRAG 7620
 CAGAAGCAGC CAGATCTCTA CAAGTTTAT GCAAGCCTG TCTATAGAC AAATTCAGG 7680
 ATGGCCAGGG CTACACAGTG AAACCTATC TTAATAACA AAAAAACAA ATAGATTAT 7740
 TATTACATAT TTAATTGTTT ATATGTAAGC ATATATGTT GGGGGCTGAA GAGACAGAA 7800
 GACAAGTTGT GGAAATTCAT TCTTCTGTC CATCACATAG ATGCTGGGAA TTAATACAG 7860
 GTTGTCTGGT TTGGAGACAG GTGACTTTGT TGTCTGAGCT TCCTTGAGAG CCTATAAGTT 7920
 TTTCTTTCAT TGTATGTGT CTAGCTGATA TCCATATGT TTTCTGTGT AGGTATCCTG 7980
 AATTCCAGTT GAGTCCACAT GTCATGGAAT GTCTCTTAC AACTCTGCC ACTGGTTTT 8040
 GTTCTTACT ATTTAACTTA GGACTTTTTT TTTGTAGTG ATTCTTACAA GAAAGTACA 8100
 CATACATTTT TCTTTTTTGA GTTTGATTG GATCAAGTTA TAATCTGCA AGTCATGCTG 8160
 CCCTCTTAC TAAGTCTCTA GGTGCTATG GCTTTGTGAA AACTTTTGA TTTTATCTA 8220
 AAAAAAATAT AATTAAAAA AATCCAGTA ACAATCACT TGTGCACAT TATTCCTAAG 8280
 CTATAAGTTT CCATTTCTGT AACGTAGGTA TTTGAGATTG AAGAAGAAAT CTTTATGTT 8340
 ATGGGTGTTT TGCTGGCATG CATATCCTTG CACTATGTT ATATCTGGT GCCTGTGAAG 8400
 GCCAATATAT GACTACAAA ACCCAGGAGC TGGAGCTAAA GACCATTGTG AGCCACCAGA 8460
 AGGGTACTGG GAATTGAATC CAGTCCCTTT ACAGCAGTGG ACAATAGATG TTAAGTCTG 8520
 AGCCATATCT TTAGCTCTAA CATGGGAGCA ATAGCTTACT TATCCCTAGG ACTTATCATG 8580
 AGGACCCCAA AGAGAGTGAA AAGTACTTAT AAGATATGAT GTCTTATCCT CTAGAGCAAG 8640

【図 1 - 9】

FIGURE 1A (9/12頁)

AAAGCCAGAG AGGAATCCT GCTTATTTT TTTTATGTA CTCATTGTCA GCTTGTGCT 8700
CTCCCTTACT TTGTCCCTGC TTAGAGGGAT GAGTGTGGG TTTTATTAC CCATTGGGG 8760
AACATCCCAA TTGGAATGAG GTGCTGGTTT CTGACTAAT CCTGTATGAC ACCAAGAAG 8820
TATGAATCTG TTAAGGTGA AAATTTGGC ATCAACAAC CAACTTCAT ACTTAAGTCT 8880
CAGAGAATAC AGAGGAAGAG GGCCAGTAAT ATATTAAGAG TTAGAGGACT AGGAATCTG 8940
CTCTCAGATG GTGTCTCCAA GAAATGGAGG CAGGACCAGA CACATTAAAT ATCAACAATC 9000
TATACAAGAT ACAATGAAAT CTCAATAGG CATGTAAAG AATATATATA TATATAACAC 9060
AATAATAATA ATCGCAAAGA AGCCATGAAT TTGATAGGA GTTGCGAGAT GGAAGAAGAT 9120
GGAGGGAGGA GATGAAAGAA GATGATCTAA TTTCATTGTA GTTAATAATT TTAAGAAGAT 9180
AAGAACTTGA ACTTTAGAAC AACATGTCT CTGAGATCT GGTTCATTAA AGGATTTATT 9240
ATGTAACCTT GATTGAATCA GTTATCATTT GGGTATGCT TTGTTCACTT GTGACAGAT 9300
TATCCCTCAC AACATTGCAG GGTATGATG ATCAGCTAAT GAGGCAAAG TTCTCAGGAC 9360
TGTAATATTT AGCAATCATT CTGTGATGTA ATCTTGGTGG GTATGTGGTG CTGTGTATG 9420
CATACACCTG TGGTTGTATG GCACCTTGTA CTCTGGAGTT TCAGTTGAGA AACATGAAT 9480
TTTITAGACT CAAGGCCACA GTGTGTGTTT CTAAATCCA TCTCTTTTT TTTTCAGTAT 9540
TCTGTCTAC ACTCAGTAAC CATTGCATCT TGGTGGGCT TGGAGACTTT GTTGTTTTT 9600
TCTACTTAAT CTTTTTTTCA AAAAAAAAA TATATTGGT AGCAGCAACA CCGCTCCTCT 9660
ATCCTCCCAG TCCCAGCCTC ACAAATCCCT CTCCCATTAC TCTCTCCCAT TCTTTTCAGA 9720

【図 1 - 1 1】

FIGURE 1A (11/12頁)

TAGAGAAGAG AGTACCAAAG TCCAGTATG CAAAGGTGAT CCACTACTG GCTTGATCCC 10860
TGGTGCCGCC CATTCTCCCA GCATATAATT ACTGCAAGCT GTCCTCAGTG CAGCAGAGTG 10920
GGCAGAGGGA AGCATTGAGG AGGATCACAC ACACAGTTGT AGGGAGAACA CAGAGAAGTA 10980
AATTGTCTGAC AAACAAGCAG GGATGGACCT GGTTCAGCT CTCTCACTGG AAACCTGGGT 11040
GCTCCTAGCA ATCAGCTTGG TGCTCTCTTA CCGTAAGTG ATCTTTACAT TTCTTCCCA 11100
TACCATGTCT TGAGGATCAG GGTGATACTC AGACATCTAT TCTGTTATTA TTGGGAGGCT 11160
CAAAATGATT ATCAGAACCA GCAGCTGGAG AGCCGATGGC TCAGTGGTTA AGGTCACTTG 11220
CTGCTCTTTC AGAGTACTCA AGTTTTAAGC CCAACATCCA CAAGCAGCTC AGAATCATCT 11280
GTAACATAG CTCCAGGGAA TCTGACACCT TCCACAGGCA TAGTTAGTAT GGTATTTAAT 11340
GGTGTAGCT TTTGTAACCT GGCTAGCTCC TAAATAATTG GGACAGAGAC CTATTAAGTT 11400
TATTAGCAAT TTTTAAGCAC TATGATTGGG CAGGTTCAAA GCTGTTTTAG CCCAAGAGC 11460
TATCTACATC CCAGCTATAG GCTCAGTTTT ACTTGCACTG TGACTGTTTC CCTGGCTTGC 11520
TCTGTCCAT GTGTGTCTC ATGGTGAAGT CTTTGATGA CTCCTTCCCA TGTCTGACCT 11580
CATGGGAACC TTCTTCTTCC TCCAGCTTCT TCTGGCCCTT CTGCTCCTAG ACCCTCATGG 11640
GCCTGTGGC CAACAACTTC TCTCTGCCC AGTCATTTGA TCTTCAGTTT ATTATCCACC 11700
AATCAGAGAT AATTGGGGAA CATTCTTTAT ACCACATTGA TATAGGAGAT TCCTCATTAG 11760
TCATGACAA ACAGTCCAGA CTGTATCGAT GTCTCAGGTT ACAGAAACCA GCATCTGAAT 11820
ACACAGAGTG AAAGACCCTC CTCCAACAGA GAGCAGAAGT TGAATTTAAG TCTTGCAGAA 11880

【図 1 - 1 0】

FIGURE 1A (10/12頁)

GAAGGTGAAG CCCCTCTTG AGTATCTTTC CTGGGACACC AAGTCTCAGC AGAACTAGGT 9780
ATATCTCTTC CCACTGAGGC CATCTGGGT AGTCCAGATA TGGGAAGGGG ATCTTATGGC 9840
ATGCAAAAGT CAGAGACAGT CCCTGCTTCA ATTGTTGGG GACCATTATG AAGACCAAGC 9900
TGTGCACTG TTATATAAGT TTAGGGGCC TAGGTCCAGC CCCTTCATAC TGTGTGGTGT 9960
GTGTTTCAGT TTTTGTCACT CCATAGTTT CAGGTTTGT GACTGTAGAT TTTCTGTGG 10020
TGTCTTGAG CCCTCTGGCT CACTCAATCC TATCTGTAC CGTTCACAA GAATCCTTGG 10080
GCTTCTGTG AAGTTTGACT GTGGCTGGCT ACATTCCATA GCTAATTTTT AAATCAATC 10140
TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTGTGTGTG 10200
TGTGTGTGT TCTGACAACT GTATGTGTGT ATAGAATGCA TTCTGATTAA ATTTTCCCA 10260
CTCTCTTACC CTATCCCTAT CAGCCTCTGT CCTTCCATA TTCATGACTT GTTTTGTGTT 10320
CTGAAGACTT TAGTGCCATC TGTGTGACTG TGGGTTTGA ACTATCCACT AGAGCCTGTG 10380
GCTCACCAGT CACCAGGGGA TCACAACTGA GTACAATACC TCCTCTTTC TCAGCAGTGA 10440
GTGCGAGGCG TTGTTTCTTC CTCACCTGACA CAATTGTCAA GGGATGGCAG GTGTGGATT 10500
TTTGTGGATA GATGTAGTAG AGTATTTTT GAGACATGTA CTCCCTTATC CAATGCTTGT 10560
CTCAAACTAT ATTTTGCTTT GAACCTTGTG TGTGAACCTC TGATCCCTCT GCTTCTACTG 10620
TCTGAGTGA TTTTGAATG AAGCCAGCCT TGGTGAAGG GTATTGTTG TTGAATTGTC 10680
TTGAATTTCT TATAAAAACC AAGAACCTTT ACCCATCTGG CACTGTTGTT TACTGATGCC 10740
ACACAGAATG TTAGCTCAA GTAGGTCAAG TTGGGCTGTG GATGAATAT ACGAATGCC 10800

【図 1 - 1 2】

FIGURE 1A (12/12頁)

AGTTTTGAA ATTTCATGTT TTTAATTATT GTGGTTAGG ACAGCGCATG TGAGTGTGTG 11940
TGTGTGTGT TGTGTGTGT TGTGTGTGT TGTGTGTATT TGTGTATGCA GGTGAGGGA 12000
CAACTTTTCA GAGAGTTCTC TCCTCTCATG TTGGTCTGA AGACCAAATC CAGATTATCA 12060
ACATTATCCA TCAATGCCTT TACTTGTGGA GTCATCTCAA AGGTCCAAGA TGAATGAGG 12120
ACTGAGTTAA TTTTGCAATT TAATGTTTT GCAGTATGGA GATCAAGTC AGAGTTTATA 12180
TATGCTAGGC ACACCTTCA CTCTTAGCT ATATTCCAG TGGTACTAAC TCTTATTAA 12240
GCTCACTAG ATGTTCTGCA GATCTTTTGG GTACC 12275

【図 1 - 1 3】

FIGURE 1B (1/9頁)

GGTACCTGGT ATCTGTCCAG AAATTCATCC ATTTCATCCA GGTITTCAG TTTTGTGAG 60
 TATAGCTTTT TGTAGAAGGA TCTGATGGTG TTTTGGATT CTTCAGGATC TGTGTATG 120
 TCTCCCTTTT CATTTCGTAT TTTGTTAATT AGGATGTTGT CCTGTGCCC TCTAGTAGT 180
 CTAGCTAAGG GTTATCTAT CTGTGTGATT TTCTCAAAGA ACCAACTCCT CGTTTGTTA 240
 ATTCTTTTAA TAGTTCTTCT TGTTCACACT TGGTTGATT CACCCCTGAG TTIGATTATT 300
 TCCTGCTGTC TACTCCTCTT GGGTGAATTT TCTTCCCTTT TTTTCTAGAG CTTTTAGATG 360
 TGTGTCAAG CTGCTAGTGT ATGCCCTCTC CAGTTTCTTC TTGAGGCAC TCAGAGCTAT 420
 GAGTTTCCCT CTTAGAATG CTTTCATTGT GTCCCATAGG TTTGGGTATG TTGTGGCTTC 480
 GTTTTCAITA AACTCTAAAG AGTCTTAAT TTCTTCTTCT ATTCCCTCCT TGACCAAGGT 540
 ATCATTGAGA AGAGTGTGT TCAAGTTCCA TTGAAATGTT TGCTTTCCAT TATTTAATGT 600
 TGCTTAGTGC CATGGTGGTC TGTGCTTAG TCAGGGTTTC TTTTCTGCA CAAACATCAT 660
 GACCAAGAAA CAAGTTGGGG ATGAAGGGT TTATTCAGCT TACACTTCCA TGCTGCTGT 720
 CATCACAAA GGAAGTCAGG ACTGGAAGTC AAACAGATCA GGGAGCAGGA GCTGATGAG 780
 AGGCCATGGA GGGATGTTCT TTACTGCTCT GCCTTCCCTG GCTTGCTCAG CCTGCTCTCT 840
 TATAGAATCC AAGACTACCA GCCCAGAGAT GGCACACCC ACAAGGGGCC TTTCCCCCTT 900
 GATCACTAAT TGAGAAAATG CCTTACAGTT GGAATTCATG GAGGCATTTT CTCAACTGAA 960
 GCTCCTTTCT CTGTGATATC TCCAGCTGTG TCAAGTTGAC ACAAACTAG CCACTACAAT 1020
 TGACCCCTTG TCAACTTGAC ACACAAACAC ATCACTAGTA ACCCTCAACC CTACATTCT 1080

【図 1 - 1 5】

FIGURE 1B (3/9頁)

GGGAGAGAAA GGGTTTATTT AGCTTACACT TCCATGCTGC TGTTCATCAC CAAAGGAAGT 2220
 CAGGACTGGA ACTCAAACAG CTGAGGAGC AGGAGCTGAT GCAGAGGCCA TGGAGGGATG 2280
 TTCTTTACTG GCTTGCTTTC CCTGCTTGC TCAGCCTGCA CTCTTATAGA ATCCAAGACT 2340
 ACCAGCCGAG AGATGSCACC ACCCACAAGG GGCCTTTCCC CCTTGATCAC TAATTGAGAA 2400
 AATGCCCTAC AGTTGATCT CATGAGGCA TTCTCTCAAC TGAAGCTCCT TTCTCTGTGA 2460
 TATCTCCAGC TGTGTCAAGT TGACACAAA CTAGCCAGTA CAGTCTGATA GATGATGAG 2520
 GACAATTICA ATATTTTTGT ATCTGTTTGA GCTGTTTTG TGACCAATTA TATGTTAAT 2580
 TTTGAGAGAG GTTCCGTGAG GTGCTGAGAA GTATATCATT TTGTTTTAGG ATAAAATGTT 2640
 CTGTAGATAT CTGTCAAATC CATTGTGTTT ATCACTTCTG TTAGTTTCAC TGTGCTCTGT 2700
 TTAGTTCTTG TTTTCATGAT CTGTCCACTG ATGAAGTGG TGTGTGAAG TCTCCCACTA 2760
 TTATTGTGTG AGGTGCAATG TGTGCTTTGA GCTTTACTAA AGTGTCTTTA ATGAATGTGG 2820
 CTGCCCTTGC ATTGAGGCA TAGATAITCA AAATTGAGAG TTCTCTTGG AGGATTTTAC 2880
 CTTTGATGAG TATGAAGTGT CCTCCCTTCT CTTTTTTGAT AACTTTGGTT TGGAGTTGA 2940
 TTTTATTGTA TATTAGAATG SCTACCCGAG CTGTGTTCTT CAGACCAATT GCTTGGAAA 3000
 TTGTTTTCCA GCCTTTCACT CTGAGTAGT GTCTGTCTTT TTCCCTGAGA TGGGTTCCCT 3060
 GTAAGCAGCA GAATGTTGGG TCCTGTTTGT GTAGCCAGTC TGTAGTCTA TGTCTTTTA 3120
 TTGGGGAATT GAGTCCATTG ATATTAAGAG ATATTAAGGA AAAGTAATTG TTGCTTCTTA 3180
 TTATTTTTGT TGTAGAGTT GGCATTCTGT TCTTTTGGCT GTCTTCTTTT TGGCTTGTG 3240

【図 1 - 1 4】

FIGURE 1B (2/9頁)

TATTCATCCC CAAGATCTAA ATAACCTTAA AAGTCCACA GTCTTTACAT ATTCTTAAAA 1140
 TTTCATCTC TTTAAATAT CCATCTCTTT TAAATCCAA AGTCTTTTAA CAATTAAAC 1200
 TCTCTTAACT ATGGCCTCCA CTAAACAGT TTCTTCTTC AAGAGGGAAA ATATCAGGGC 1260
 ACAGTCAAG CAAAATCAA TCTCCAACA TCCAATGTCT GGGATCCAAC TCACAATCTT 1320
 CTGACTCCT CCAAGGGCTT GTGTCACTTC TCCAGCATG CCCTTTGTAG CACAGGTGTC 1380
 ATCCTCTAGG TTCCAGATGC CTGTACTCCA CTGATGCTGC TGCTCTTGGT GGTCACTCA 1440
 TGTACTTGGC ATCTCCAAA CACTGCATGC CCCCTCAGT CCTGGGCCCT CAATTGCAAC 1500
 TGAGGCTGCA CGTCAACAA TGGCTTCCA TGCCCTCTCA CAGTGCCGAG CCTCAGTGC 1560
 TGTGATGAC CCCTTCATGC CTTCAAAACC AGTACCACCT GGGTACCCT TATACATTAC 1620
 CAAGTCCCAC TGCAGCAGGA GTACAACCTT GGCTATCTCT GGAACACAGC CTCTTTGTGC 1680
 TTTCAAGAAA CACTTCCCAG AAGATGTCA CTCAACGAG CTGGTCTCTT CTTAATCACC 1740
 GATAATTTCT TAGCTCCAGC TAACCAGCAT CAATAGTCAT AGTAATGCAA GGTTTTGCTT 1800
 TAGTAGTTCT GGTATCTTGT TAATCACAGT TGATTCTTCA GCCCAGCTA ACCAGAATA 1860
 CAGAAATTTT ACAATCAAAA CAGCAATGGC CCTGAAAGA GTCTTTAATT TTCCCTCTGA 1920
 AATTTCACAA GCCAGACCTC CATCTTCTGC ACTGTCTCA ACATTATCTT CTAAGCTCCT 1980
 ACACAACATC TGACAGAGCT CTTAACAATG AACGATCTT CAAGCCGAAA GTTCCAAAGT 2040
 CCTTCCACAG TCCTCCCCAA AACATGGTCA GGTGTGACA GGAATACCCC ACTCTGGTGA 2100
 CCAATTTGTC TTAGTCAGGG TTTCTATTC TGCACAACA TCATGGCCAA GAAACAAGTT 2160

【図 1 - 1 6】

FIGURE 1B (4/9頁)

AGGAATTACT TTCTTGCTTT TTCTAGGGCG TGATATCTGT CCTTGTATTT TTTTTCGTG 3300
 TATTATCTTT TGAAGGGCTG GATTCTGAA AGATAATGTG TGAATTGGT TTTGTATGG 3360
 AATACTTTTG TTTCTCCATC TATGGTAATT GAGAGTTTGG CCGGGTATAG TAGCCTGGGC 3420
 TGGCTTTTTT TTGTCTCTTT AGTGTCTGTA TAACATCTGT CCAGGCTCTT CTGGCTTTCA 3480
 TAGTCTCTGG TGAAGAOTCT GGTGTAATTC TGATAGGCTT GCCTTTATAT GTTACTTGAC 3540
 CTCTCTCCCG TACTGCTTTT AATATCTCTT CTTTATTAG TGCATTGTGT GTTCTGATTA 3600
 TTGTGTGTG GAGGGAATCT CTTTCTGTT CCAGTCTATA TGGAGTCTG TAGGCTCTTT 3660
 GTATGTTTAT GGGCATGTCA TTCTTTAGGT TCGGGAAGTT TTCTCTATA ATTTTGTGA 3720
 AAATATTTGC TGGCCCTTTA AGTTGAAAAT CTTATCTCTC ATCACTCTCT ATTATCTGTA 3780
 GGTTTGGTCT TCTCATGTG TCCGTGATTT CCTGGATGTT TTGAGTTAGG ACCTTTGTG 3840
 GTTTTGTATT ATCTTTGATT GTGTCTCTGA TGTCTCTAT GGAATCTTCT GCACCTGAGA 3900
 TTCTCTCTC CATCTTTTGT ATCTGTGTC TGATGCTCAC GTCTATGGT CCAGATTCTT 3960
 TTCTAGAGT TTCTATCTCC AGCGTTCCT CACTTTGGGT TTCTTTTATT GTGTCTACTT 4020
 CCCTTTTAG GTCTAGTAG GCTTTGTCA TTCCATCAC CTGTTTGGAT GTGTTGGCT 4080
 GTTTTCTAT GAGGACTTCT ACCGTGTTGG TTGTGTTTTT CTGCTATTCT TTAAGGATT 4140
 GTAACCTTT AGCAGTGGTC TCCTGTATTT CTTTAAAGTA GTTATTAAAG TCCTCTTGA 4200
 TGTCTCTAC CATCATCATG AGATATGCTT TTAATACAG GTCTACCTTT ACGTGTGTG 4260
 TGGGTGCCC AGGACTAGGT GGGGTGGAG TGCTGCATTC TGATGATGGT GAGTGTCTT 4320

【図 1 - 17】

FIGURE 1B (5/9頁)

GATTCTCTGTT AGTAGGATTC TTACGTTTTC CTTTGGCCAT CTGGTAATCT CTGGAGTTAT 4380
TTGTTATAGT AGTCTCTGGT TAGAGCTTGT TCCTCAGGTG ATTCTGTAT GCTCTATCAG 4440
CAGACCTGGG AGACTAGCTC TATCCTTAGT TTCAGTGGTC AGAGTACTCT CTGCAGGCAA 4500
GCTCTCCTCT TGCAGGGAAG GTGCCAGAT ATCTGGTGT TGAACCTGCC TCCTGGCAGA 4560
AGTTGTGTTC TACTCACCAT AGTCTTAAAG ATCCCATGGT TGGTCCTGTG TGGTTCCTTG 4620
CGTGTGTCCG GAGACTCCCC GGGCCAGGGT CCCTGGTGAT TGAAGGGAC TTGTGCACCG 4680
GATCAGGCCA GGTATATCGA TTCTCTAATT AATGCAGTCT CAGGTCCCGT GCGATTGAAT 4740
TGGAGCAGGC GCTGTGTCC ACTCACCAGA GGTCTTAGGA TCCTGTGGAG GATCCTGTGT 4800
GGTCTCTTCG GGTGTCTGC AGACTCCCC GGCAGGGAC CATGGTGTCT CAGTGGGCCG 4860
GAAGGGACTT GAGCCCTGGA TCATGCOGGA TTATCTGCTT CCTTAATTAA TGCAGTCTCA 4920
GTCCTCTGCG ATTGGATTGG AGCAGGCGCT GTGTCCACT CACCAGAGGC CTTAGAATCC 4980
CGTGGCGGAT CCTGTGTGG TCCTTATGGG TGTCCGAGGA CTCGCCGGG CTAGGAGCCA 5040
CGTGTCTCCA GTGGGCCGGA AGGGACTTGA GCCCCGGATC AGGCCGGATT ATCTGCTTCC 5100
TTAATCTCTG ATAGTCTTTT AAAAGTAAAC TTATAGTTAG ACACTGTACA CAGGTATATA 5160
ATACATTTTA AATATCTCT CACTATGCCA GGTGGTADCA TATAAGAACT TTTGAATATA 5220
TTTCTTAAAG ATTAAITTTA ATATTTTAIG CTCCTATACT ATGCTTAATT CCCAAGAAT 5280
ATTTGTATG TTTTGAACA ATTTACTCTT CAACATTANA TATAGGATTC ACGTTATAG 5340
ATAGTATTAA ATGTCCATTA ATGATATTTT TAGGGTATAA AAGGATATGA ATATAAAGT 5400

【図 1 - 19】

FIGURE 1B (7/9頁)

GCTAAAGGA TCTGCAATCC TATAGTGGA ACAACATTAT GAACTAACCA GTACCCCGGA 6540
GCTCTTGACT CTAGCTGCAT ATGTATCAA AGATGGCCTA GTAGACCATC ACTGGAAGA 6600
GAGGCCCATT GGACAGCAA ACTTATATTT CCCAGTACA GGGGAACGCC AGGGCCAAAA 6660
AAACAAAAAA CAAAAAAA TGGAATGGG TGGGTAGGA AGTGTGGGG AGGGTATGG 6720
GGACTTTTGG GATAGCATTG GAAATGTAAT TGAGGAAAT ACCTAATAAA AAATATTAAA 6780
AAAAACCTA CATAGAGAC ACAGCAACC ATTTTAGGAC AACCTTGCT CCAGTTGTTA 6840
GGGACCCAT ATGAAGATAT ACCTTTATAT TTGTTACATA TCTGTGGTG TTGAGGATC 6900
TAAGTCCAGC CCATCTATTC TCTTTGGTTG GTGGCTCCAT GAGAGCTCCC ACGTTCTAG 6960
GTATTTGAC TGTGTGCTC CTGTGGAGT TCCTACCCAG TTTGGGCCCC TCAAAATTT 7020
TCTCAGTTT CTCTCANAG CTCTGAAC CTATCCAGTT TTTGGCTGTG AATATCTGCA 7080
TCTTCTGAG TAAGCTTTTG GATAGAGCCT CTAGAGGAC AACCATACTA GGTCTTTGTC 7140
TCCAAGTTTA AATGTATCAT TAATAGTGC AGAGATTGAT GCTTGCCCAT GGGATTGGT 7200
TCAAGTTGGA CCAATTAAAT GTGATCAAT CCCTCAGTCT CTGCTTATC TTTGTCCTG 7260
CATTTCTTAT AAACAGACCA ATTTTGTGTT CAAAAGTTT ATGAGTGGGT TGGTGTGTTT 7320
ATACCTCCAT TGGGGATCCT GCTTCATCCT GGGGAGATGG CCTCTTCAGG TTCCATATCC 7380
CCTTTACTAT GATTCTCTAC TAAGTCAAT TACATTGATA TCGAGGTCTT TTCTTTATTC 7440
TGGGTCTCTG GCTTCTCCTA GAGATGCCCC AATCCCTCAC TCCTAGCAGC TGTGAATTC 7500
TATTCACTCT CCTGGCCCTC TGGCTTTCAC TCCTGTCTCT TCCTCACCA CATCCTGAAC 7560

【図 1 - 18】

FIGURE 1B (6/9頁)

TGAACAAAA AGAGGGGATG GGCCATAAG AATATATTCA TATGTATATA TATATGTGAA 5460
TAATTCAAAG AATAAATAA TATAATTTTA AAAAGCAGCA GGTATCCCC CCAAAATACA 5520
GTTGTTGAAG TGCCTTGTGA TAGAACCTTG TCAATGATA AACCAAGAA ATACCAACTA 5580
CCCCCCAGC CACCCAGAG ATGSAATAGA GTCAGTGGAT TATTAGGGT GTGGGAGCCT 5640
GAGGATAAAA AATCAGAACC CCAGACCCCC TAAAAAGGT ATGCAGACCG TACAGCCATT 5700
TTATAGTTTT GTGTTGAGCT TCAITCAGCG GGAATCTGGG TACACATGGC TTGTGTGGG 5760
GTGTGTTGAC AACCTGCAAG TGTTCATTCC TAAGCTGATA TACACACAG CACATAAGTA 5820
GCACTAAATG GTCTGTACC TTGCTTTGGG TGGGGACAA GTATGTTTGG CAGGGCTAA 5880
ATGATAGAAC CACTAAGTTT AGGGCTGTGG GAGAGACAGA GATAATAAAT NGATAGGCC 5940
CACATTTTCA GCAATATACA TTTGTCCAA GCAAGTGTGA TAGAGGCAAG TTCTAATGTT 6000
ATTGGCGAAG TGCTTGATA TTTTATCCAT GGATTCGAAA GTGTTGGGAG TGGGATGTA 6060
ACTTGATCCC TCCAGGAGCA AAGGAGGGTA GAAAGGAGA CCAGAGATGG GATGTTTGTG 6120
ACAGATCCCA GGGAAAGGC AGGTGGAACA GAAGGAGCT GGGAGAGTC AGATCCCTG 6180
CAATAGCTCC TGGGCAAGGC AGAATGTCT TATAAACTA CAGAGACAAA GTTTGGAGCT 6240
GTGACGAAAG GATGGACCAT CTAGAGACTG CCATATCCAG GGGATCCAT CCATATCAG 6300
CTTCTAAACG CTGACACCAT TGCATACACT AGCAAGATT TGTGAAAGG ACCAGATAT 6360
AGTTGTCTCT ATATGTAGA CTATGCTGGG GCCTAGCAA CACAGAAGTG GATGCTACA 6420
GTCAGCTATT GGATGGATCA CAGGGCTCCC AATGGAGAG CTAGAGATAG TACCAAGGA 6480

【図 1 - 20】

FIGURE 1B (8/9頁)

CCCCATACT CCTTCTCCA CATTCATGGG TACATTTTTT AAATCCCAGA ACACAGAAG 7620
CAGAAGCAGG CAGATCTCTA CAAGTTTLAG GCAAGCCTGG TCTATAGAGC AAATTCAGG 7680
ATGGCCAGGG CTACACAGTG AAATCTATC TTAATAACA AAAAAACAA ATAAGTTATT 7740
TATTACATAT TTACTTGTTT ATATGTAAGC ATATATGTGT GGGGGCTGAA GAGACCAGAA 7800
GACAAGTTGT GGAATTCAT TCTTCTGTC CATCACATAG ATGCTGGGAA TTAAATCAG 7860
GTTGTGCGGT TTGAGACAG GTGACTTTGT TGTCTGAGCT TCCTTGAGAG CCTATAAGTT 7920
TTTCTTTTAT TGTTAGTGTG CTAGCTGATA TCCATATGTT TTTCTGTGCT AGGTATCCTG 7980
AATTCAGTGT GAGTCCACAT GTCATGGAAT GTCTCTTAC AAATCTGCC ACTGGTTTTT 8040
GTTTCTACT ATTTAACTTA GGAATTTTTT TTTGGTAGTG ATCTTACAA GAAAGGTACA 8100
CATACATTTT TCTTTTTTGA GTTGATTGTT GATCAAGTTA TAATCGTGCA AGTCATGCTG 8160
CCCTCTTAC TAAGTCTCTA GGTGCTATG GCTTTGIGAA AACTTTTGGA TTTTATCCTA 8220
AAAAAATAT AATTAATAA AATCCAGTA ACAATCACTT TGTGACATT TATCTCTAG 8280
CTATAAGTT CCATCTCTG AACGTAGTA TTTGAGATTG AAGAGAAAT CTTTATGTT 8340
ATGGGTGCTT TGCTGGCATG CATATCCTTG CACTATGTT ATATCTGGGT GCTGTGAAG 8400
GCCAATATT GACTACAAA ACCCAGGAGC TGGAGCTAAA GACCATTTGT AGCCACCAGA 8460
AGGGTACTGG GAATGAATC CAGTCTCTT ACAGCAGTGG ACAATAGATT TTAAGTCTG 8520
AGCCATATCT TTAGCTCTAA CATGGGACA ATAGCTTACT TATCCCTAGG ACTTATCATG 8580
AGGACCCCAA AGAGAGTGAA AAGTACTTAT AAGATATGAT GTCTTATCCT CTAGAGCAA 8640

【図 1 - 2 1】

FIGURE 1B (9/9頁)

```

AAAGCCAGAG AGGAAATCCT GCTTTATTTT TTTTITAGTA CTCATTGTCA GCTTGCTGCT 8700
CTCCCTTACT TTGTCCTGTC TTAGAGGGAT GAGTGTGGGG TTTTITATTAC CCATTGSGGG 8760
AACATCCCAA TTGGAATGAG GTGCTGTTTT CTGACTAAT CCTGTATGAC ACCAAAGAAG 8820
TATGAATCTG TTAAGGTGA AAATTTTGCC ATCAACAACC CAACCTTCAT ACTTAAGTCT 8880
CAGAGANTAC AGAGGAAGAG GCCCAGTAAT ATATTAAGAG TTAGAGGACT AGGAATTCCTG 8940
CTCTCAGATG GTGTCCTCAA GAAATGGAGG CAGGACCAGA CACATTAAAT ATCAACAATC 9000
TATACAAGAT ACAATGAAAT CTCAAATAGG CATGGTAAAG AATATATATA TATATAACAC 9060
AATAATAATA ATGCAAGAAG AGCCATGAAT TTGATAGGGA GTTGCAGAGT GGGAAGAAGT 9120
GGAGGGAGGA GATGAAAGAA GATGATCTAA TTTCATTGTA GTTAATAATT TTAAGAAGATG 9180
AAGAACTTGA ACTTTAGAAC AACATGGTCT CTGGATCCTT GGTTCATTAA AGGATTATTT 9240
ATGTAACCTT GATTGAATCA GTTATCATTT GGGGTATGGT TTGTTCACTT GTGACAGAGT 9300
TATCCCTCAC AACATTGCAG GGTAGATGAT 9330

```

【図 2】

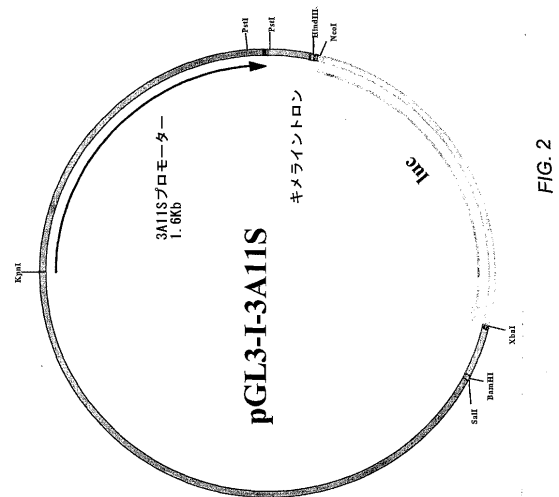


FIG. 2

【図 3】

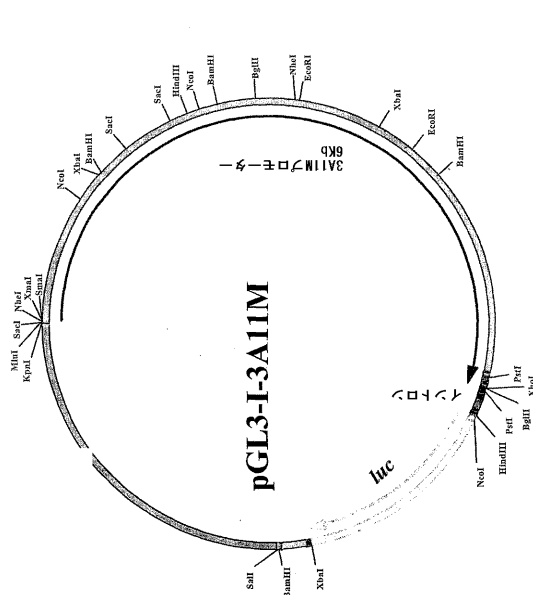


FIG. 3

【図 4】

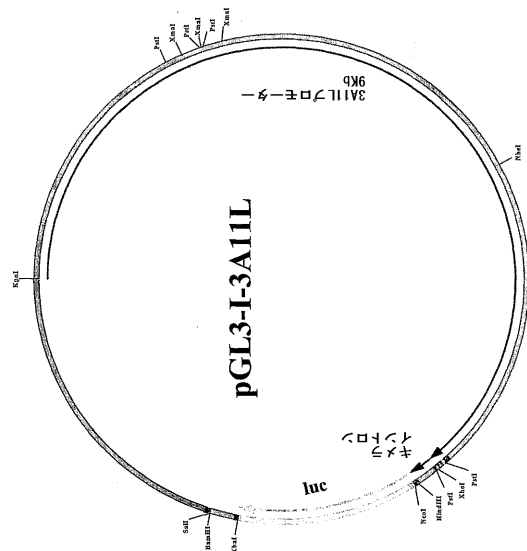


FIG. 4

【図 9】

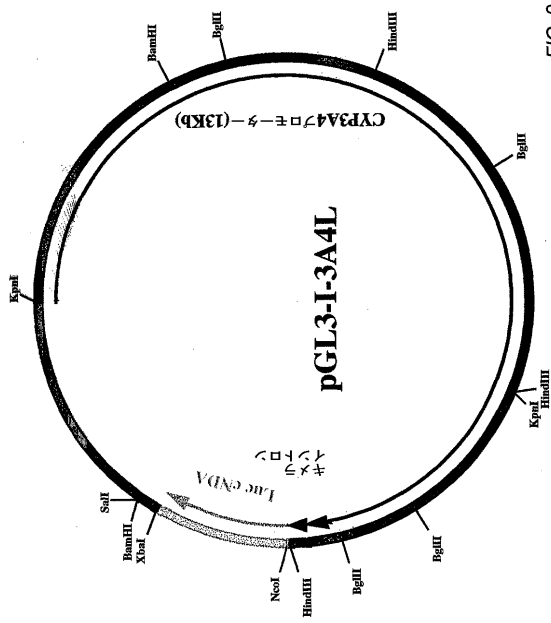


FIG. 9

【図 10】

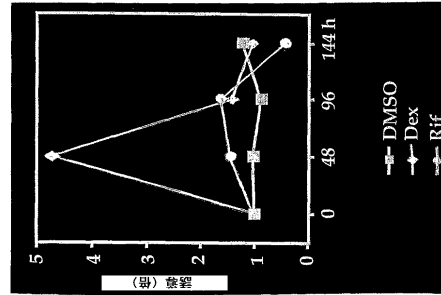


FIG. 10

【図 11】

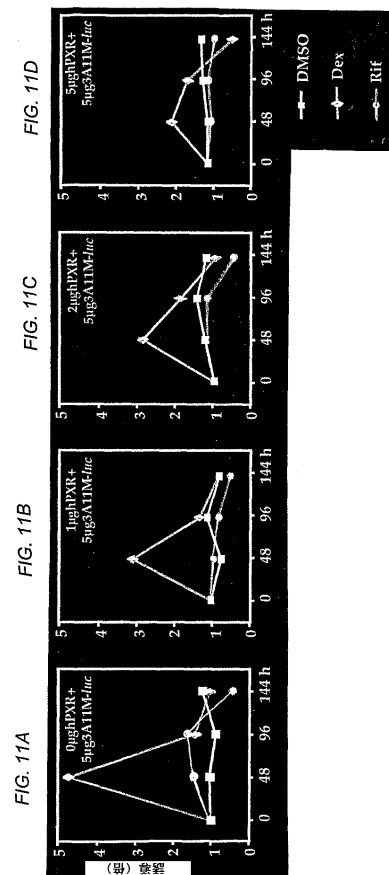


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

FIG. 11D

【図 12】

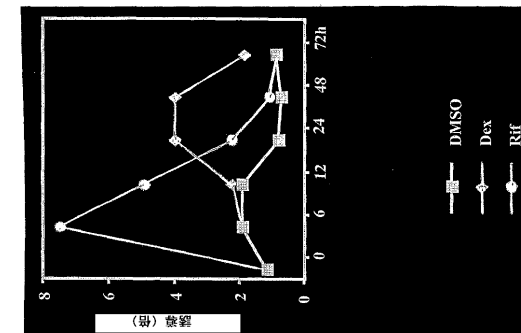
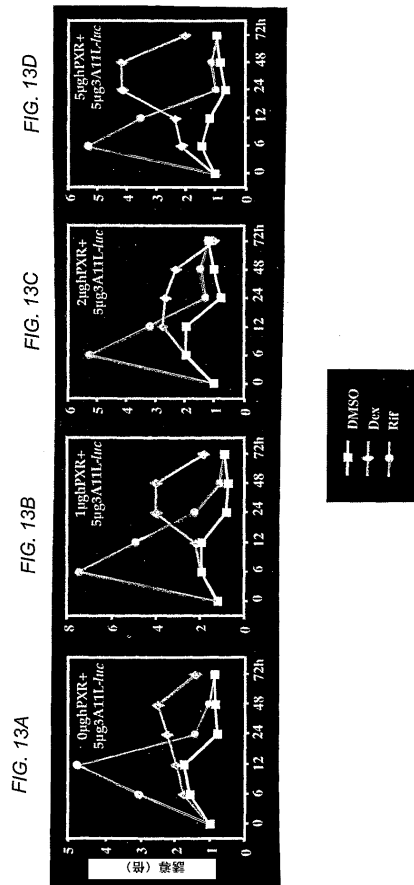
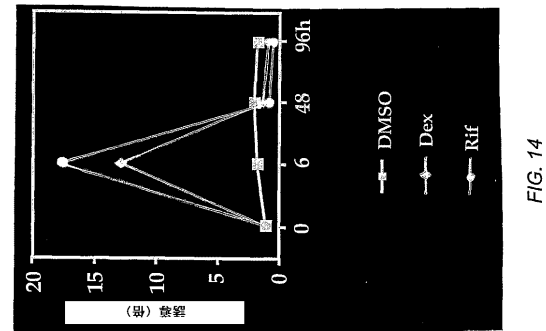


FIG. 12

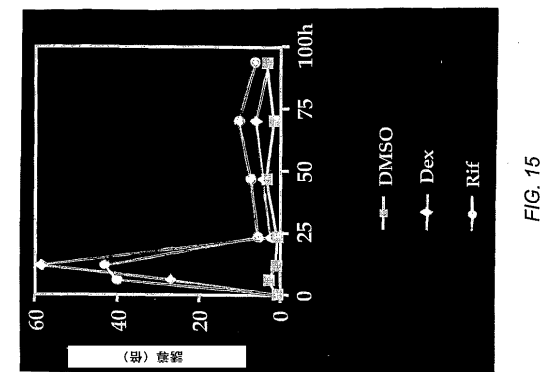
【図 13】



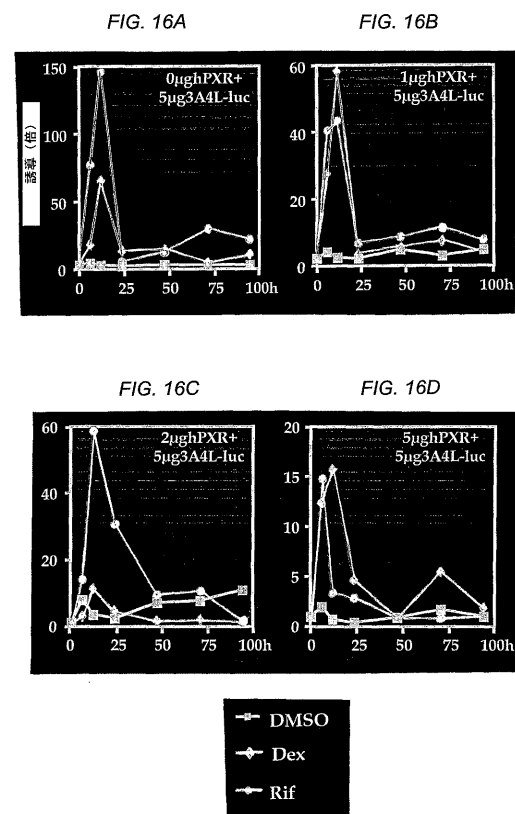
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【図 17 - 1】

FIGURE 17A (1/12頁)

GGTACCTGCT TATCTATG GACTGGTTGG ACAAGAGGGT GCAGCCCACG GAGGGTGAGC 60
 CRAACAGGGT GGGGCGTCGC CTCACCTGGG AAGCACAAGG GGTCTGGAA TTTTCTCC 120
 TACCCAGGA AAGCCATAAG GGA CTGAGCC TGAGGAAGCTG TGCACTCTGG CCCAGATACT 180
 GCACTTTTCC CATGGCTTTT GCAACCCGCA GACCAGGAGA TTCCCTCCGG TGCTATGCC 240
 ACCAGGSCCC TGGGTTTCAA GCACAAACT GSGCAGCCAT TTGGGCGAGC ACCGAACTAG 300
 CTGCAGGAGT TTTTTTTTTT TTTTCCATA CCCATTGGC ACCTGGAACG CCACTGAGAC 360
 AGAACCGTTC ACTCCCTGG AAAGGGGGCT GAAACAGGG ATCCAAGTGG TCTGGCTCGG 420
 TGGGCCCCAC CCCCATGGAG CCCAGCAAC AAAGATTAC TGGCTTGAA ATTCTGCTG 480
 CCAGCAGAGC AGCAGTCTGA GATTGACCTG GGAACCTCGA ACTTGGTTGG GTGCTGTGG 540
 GGGGCATCTT CCATTGCTGA GGCTTGAGTA GGTGGTTTGA CCTTCGCGGT GTAAACAAAG 600
 CTGCTGGGAA GTTGAAGCTG GGTGAGCTC ACCACAGCTC AGTAAGGCCA CTGTGCGCAG 660
 ACTGCCTCTC TGGATTCTC CTCTCTGGGA AGGATATCTC TGAAAAAAG GCAGCAGCCC 720
 CAGTCAGGGA CTTATAGATG AAACCCCAT CTCCCTGGGA CAGAGCCCTC CGGGGAAGAG 780
 GTGGCTTCCA CCATTGTGGA AGACTGTGTG GCAATTCTCT ACAGATTATG AACTAGAGAT 840
 ACCATTGAC CCAGCAATCC CATTACTGGG TGTATACCA TAGGATTATA AATCATTCTA 900
 CTATAAAGC ACATGCACAC TTATGTTTAT TGTAACTA TTTACAATAG CAATGACCTG 960
 GAACCAATCC AAAAGCCCAT CAATGATAGA CTGAATAAG AAAATGTGGC ACATATACAC 1020
 TGTGAATAC TATGCAGCCA TAAAAAGGA TGAGTTCATG TCCTTTGCGAG AGACATGGAT 1080
 GAAGCTGGAA ACCATCATTC TCAGCAAACT AGCACAATPA CAGAAAACCA AACATGCAT 1140

【図 17 - 2】

FIGURE 17A (2/12頁)

GTGTCTACTC ATAAGTGGGA GTTAAACAAT GAGAACACAT GGACACAGGG AGGGGAACGT 1200
CACACACTGG GGCATGTGCG GGAGTGGGGG CCTACGGGAG GGTATGCATT AGCAGAAATA 1260
CCTAATGTAG GTGAOGGGTT GATGGGTGCA GCARACCACC ATGGCACATA TACACCTATG 1320
TAATAAAACT GCACGTTCTG CACATGTACC CCAGAACTTA AAGTATAAAT AATAATAATA 1380
ATAATTCTG GGCATGTAG TAGCTGTCTT TCAGGTTCTA CTTTGATACA TATTCTGAGA 1440
GAATTAAACC TGTCAAAGAA ACCTTGACTT TCAATGGCAG GCACTGGAAT TGACCTTAAT 1500
AATGTGTTTT GGGTAAGCC TACTCATATT CTCAACCTGT CTGCAGTAGT CGTTAGAATC 1560
TGAACCTCCT GAAGTTCATG TGCAAGTTG AGTTAAATGT TTAATATTCA ACAAGGATTA 1620
TGCCAGTAAG ATGGTAGGAA AATATTAGAT ATGTGTCATC ACTGCTGGTA TTATTTAAAC 1680
TGCAACATAT TTTAGCTGGC TGCTGATCTC AGCCACCATG CCTGCATTTT ATCTCTGTCT 1740
CGTGGTCTGC AACCTTGGAA GCTTTGAAC TAGCTCATAG AATCCTTGGC ATCAAGAACA 1800
TGTGTTCTA ATGGCTAGAT AGGGAATGAG AGTAAAGGA TTTTCCAC GGTCAOGTGA 1860
GTAAACAACA GATTTGGAGG GGTCTGGACT ACTGTGATGA CTTCACTCTG ACAATATGTT 1920
CCAGTGTCC TTTCATTTC TCCTAATCAC ATGTTTGGTC TGATTTGGCT GTTTCACCAC 1980
TTCCAATTCC TGCTTCTCC AATGCTCCCT TCCGTAGGTC ACTCTGTGGC TCAGAGACCC 2040
TGCTTAGCAA GCGCCCAACC TTTCATTTAT TTGTTCAAGT AAACCTGAAC TCAATGCTCC 2100
CCTTCTTGAT AAAAAGAAAA TACGTTATGT AATGTCGGT TACTCTATA CTCTGTCTCT 2160
GTCTCTCGGC AACTAGTGA CTAAGTGTTC TCATATTGAG CAACGTTTA TGAAGGACT 2220

【図 17 - 4】

FIGURE 17A (4/12頁)

TTGTGTTCTA TCCATACAAT GGAATATTAT TCGGCCATAA ATGGAATGAA GTACTGACGC 3360
ATGCTACAGA ATGGATGAAC CGCAAAAAA ATGGATGAAC ACATGCTACA GAATGGATAG 3420
CCTCACATTA CTATGAAGTG AAGGCCAGAA ACGAAGTCCA TATATTGCAT CATAAAAAAT 3480
ATCCAGAAGA GGGGAAGCCCA CAGAGACAGA ATGTGCAATG GTGGATGCCA GGGTCTGGGG 3540
AGAGGGGAGA GTGGGGAGAA ACTGCTCAAC TGSTACAGGC TTTATTTTGG AATGATGGGA 3600
ACATTTTGCA ACTAGATAGA GGTAGTGATT GCAGAACACA GAATGTACTG AATTCCACTG 3660
ATTTTITTTCA CCTTAAATG GTTAATTTTC AGTCTGAGA TTGGATAATC ATAAAAAAT 3720
GGTTAATTTT ATGTTATGTG AATTTCATCC CTATACATAT TTTAAACCTC AGAATATATC 3780
ACTAGCAGGC ATGGAACAGG TCACTGTGGT GCCTGCCAAG CCGGTGATG TTATCTGGGG 3840
TCCCCGGCCA GCCTTAAGCC TCTTGCTGAC CGGTGGAGGG CAGAACCTTT GCCCTAAAAA 3900
TATAATATCC ACATGCTGAC ATGATCTCTG GCCAGATGGC TTCTTTATTA GCAGTAATTG 3960
AAACTGCCTC GATACAGACA CTGTACCTTG CAACCAAAAA ATGACTCAAC AATGATAATA 4020
AGGGTTAAGC TGGGCTTTTC TCTTTTGGC AGTTAAATTA TATTTATTTAT AGCTTGACAT 4080
GAAAAACAAA GCAACTCCAA CAGGTATCAC AAGGCCAAG GACATGAACA TTTTATCATA 4140
GAAGAAATGC AGCTGTCAAA AATACAGAAA TATTCAACCT TGTTCATTAAT AAGTGTGCTG 4200
GGCTCAGTGG TTCAATGCTG TAATCCCAAG GCTTTGCAAG GCTGAGACAG GAGGATCATT 4260
TGAAGCCAGA AGTTCAAGAC CATCTTAGGC AAGTCAGTTC AATACCAGAC TTCAATGCTA 4320
CAAAACATCA AAAAATTAGC CAGGCATGGT GATGCATGCC TGTGTCCCA GCTACTCAGG 4380
AGGCTGAGGC AGGAGAATTG CTGAGCCTG GGAGGCTGCG GTGGCGGTGA GCCATGATTG 4440

【図 17 - 3】

FIGURE 17A (3/12頁)

GCCAAGAGTC AGGTACTAGG CTTGGTAATA TTCCCGTTC TCTCTAGTCA AAGCCAACAC 2280
CAGCCAGACT TGCAGATCTA GGTCCCAAGC CCACTGCAGA TCACAGGCCA GGGTCTGGTC 2340
TCCTCTGAGC TCCTTTGGGA GGGAAAGACA GAATTATTAA CACCCATTTT GTAGATTAGG 2400
CAACTGAGGC TGAGGAAGTT TAAATAACTC AGACAGGGCC TGCACGTGAG TCATATTCCA 2460
AGGATCCCTA CTCACGTCTC TCTCTCTACA GAACGAGATG TCTCTGGAGT CCATAGAAAG 2520
CCCAGGAGCC TGGCTGGCA CGGTGGCTCC TGCTGTAAAT CCCAGCACTT TGGGAGGCCG 2580
AGGCAGGCAG ATCACCTGAG CTCAGGAGTT CAAGACCAGC CTGGGCAACA TGGCAAAACC 2640
CCATCTCTAC TAAAAATACA AAAAATTAGC TGGCGTGGT GGTGCATGCC TCTAATCCCA 2700
GCTACTTGGG AGGCTGAGGC ACAAGAATTG CTTGAGCCCA GGAGGCAGCA GTTGCASTGA 2760
GCTGAGATTG TGCCAGTGCA CTCACGCTG GGCAACAGAG CAAGATTCCA TTCAAAAAAC 2820
AAAAACAAAC ACRAACAAAC AAACAAAAAT AGAAGGCCCA GGGACCACCT GCGTCAGGTT 2880
CCCAGCCACA CCTTTTTCTT GTCTCTCTCT GTCTCTGGCA TCTTCTACA GGTTCCTAAT 2940
TGTTTGTTGT TGCACAAAT CAAAATCCCA GAAAAATTAC CACTTCACAC CCACTCAGAT 3000
GGCTATTTT TTTTGAAGG AAGATAACAA GTGTGACAA GAACATGGAG AAATTTGAAT 3060
TCTCACCCAT TGCTGTGAG AATGTAATAC GGTGCTGCTG CTATGGAAAA CAGCTTGGAG 3120
TTTCTCAAA AAGTTCAACA GAATTTCAAT GTGACCCAGC AATTCCTCTC TAAGTTATAG 3180
ATCTGAGAGG ATTAAAAACA GTTACTAAAA TACACGAGCT CACATATTTT TAACAGTCCA 3240
ATTCACAAGG GCCAAAAGGT GCTAATAGCC CACATGTCCA TCGATGTGATG GATAAATAAA 3300

【図 17 - 5】

FIGURE 17A (5/12頁)

TGCCATTGTA TCACAGCCTG GGCAATGCAG CAAGACTGTC TAAATAACAA AAATAATAGT 4500
AAAGAAAAGG ATTGGGATGC CATTACTCTG CGTATTCAAT ACACAGAGTT AAAAGTAATT 4560
TCTACGTTTT CTATTTTTTT ATTACTAAAA AAGCTGGAC CATTCTCACA GCTGAAATG 4620
CTTCTCACTT TCCCTCTTTC TGTCCTCAACA CTCTCTATG ATAATGCAAA CAGTCACTCC 4680
TTTAGGAAGA CTTACCCCCA GGTAGTTCCA GATCCCTTAA TCTCTGCTT CCCAGAACTC 4740
CTGTTGTCTC TCCAGTCCC TCCGTGTGGT GAAGTACCCT ACCTAGGTT TCAGTATGGC 4800
TCTGTCTGCA AAGGTCTTGT TCACACCTTC CCTTATGGTT CTGTTGCCCT GTGTGTGTC 4860
ATAGCACAGG GCACAGTGA GAACCCATTC AACTGTATG AGAGGGCCCC ATGTCTCTGG 4920
AGATAACCAT GTACCCGATC AGAATAAGGC ATTGAGGGCT GGTGTTCAGG CTTGGCTGTC 4980
ACTTGGGTGG GCAGGTCCCC TGGAAAGTCA CTGGTTTGG CAAGCTTCTC AGTAACATGT 5040
CTCTCTGGG TCCCTCTTGG AACTTCATGC AAAAATGCTG GTTGCTGGTT TATTCTAGAG 5100
AGATGGTTCA TTCTTTTCAT TTGATTATCA AAGAACTCA TGTCCCAATT AAAGTTCATA 5160
AAGCCAGTT TGTAACTGA GATGATCTCA GCTGAATGAA CTGTCTGACC CTCTGCTTTC 5220
CTCCAGCCTC TCGGTGCCCT TGAAATCATG TCGTTCAAG CAGCTCATG AGGCATTACA 5280
AAGTTAATT ATTTCAATGA TTATTAAACC TTGTCTGTG TTGACCCAG GTGAATCACA 5340
AGCTGAACCT CTGACAGAA CAAGCTATCA TATCTTTTC AATTACAGAA AAAAGTAAGT 5400
TAATTGATAG GATTTTTTTT GTTAAAAAA AATGTTACTA GTTTTGAAGA GGTAAATATG 5460
GCACATGTA AACACTAAGA AGGTATAAGA GCATAATGCT TTTACTACT TAAGAATAAT 5520

【図 17-6】

FIGURE 17A (6/12頁)

GTTCCTCTA AGTTTTTTT GGTAGTGCT TTCATCAGAT TAAGAAAATT CCCTGCTATT 5580
AGTTGTTGAA GGTTTTATA TCATAAATGA AAGTTGAATA TTATTATCAT ATATTATTAA 5640
TATATTGTTA TTGAACATC AAAGCCTTTT CCTAAAACCA TTGAGATGAT CTTATAACCA 5700
TTCTCCTTTA ACCCTTTGAC GAGATCATTG GTATTTATAC TATTTCTCTG TTAACCATTC 5760
TTGAGTCTCA GGTTTAAATT CAACTTGCTC ATGGTGTGTC ATCTTTGATC ATTGCTGTCT 5820
GTGGCTTGCT ACTGTTTTTG TTAGGATTTT TGCATCTGAT CTCATCAATG AGACTGGCAT 5880
GCCATCTTCC TTGCGAGTCC TGATTTTTTT CTGATTTGGA TCAATGTGTT ATGGCCCTCA 5940
TGGAAAGAGT TGGGCATGAT GCTTTTTTTT CATGCTCTCT GATTGATGGG ACACCTTTGGA 6000
TTCTCTCAG ATGGCCCTCA ATGGTCCCTG CCTCTCAAT GTTAGGCCCC TGGGCAAGCC 6060
CTTCTCAITT CTGCTAGGCC CAGGAACCTG TGGGGGTTTT GTTTGTTTGT TTGTTCTCTG 6120
AGTCGGAGTC TCACCTTGTC ACCCAGGCTG GAGTTGAGT GCAATGGCCC GATCTTGGCT 6180
CACTGCAACC TCCACCTCCC AGATTCAAGC AATCTCCTG CCTCAGCCTC CTGATGAGCT 6240
GGAATTACAG GCACCCACCG ACACACCTCG CTAATTTTTG TATTTTTAGT ACAGATGGGG 6300
TTTCACAATA TTGGCCAAGC TGGTCTCGAA CTCCTGATCT CATGATCTGC CCGGCTTGGC 6360
CTCCCAAAGT GTTGAGATTA CAAGCATGAG CCACCAACCC CAGTGAACCT GTGGTTTTTA 6420
GAAGCTCCCC ATGCTGTGA ATGCTGTGAG CATCCACGGA TGACAGCCAC TGTGTGTTCA 6480
GCTGTTGGAA CTGTGAGAAA GCACCACTGG GACCTTCTCC AGCACCTGCC TGCTGAGTTC 6540
ATGGAAGAGG CTTGTTGGGG AGATGATGCC CTGCTGACT CCTGAAGGAT GGTTAGGAAT 6600

【図 17-8】

FIGURE 17A (8/12頁)

TTATAAGAA AAGAGTTTA ATTGACTCAC AGTTCCATAT GGCTGGGGAG GCCTCGGGAA 7800
ACTCTCAGTC ATAGCAGGAG GCAAGGGGA AGAAGGCACC TTCTTCACAA GGGCGCAGGA 7860
GAGAGAGAGC TCCTGTTCTT TTTTGTCATA AAGTCTACAG AAGTGTCTAT ACTTCAGGAC 7920
AAGGGCAGGC AGAGAGAAGG AAGGACATTG CTTCAACCCCA GCCCTCACTG ACGAGTTTGC 7980
TAGGGGACCT CACTTTGTCC CAGAGTAGGG CAGAACTCTG GCCACTACCC ATTCAAGAG 8040
CCTGGGCTGC ACTGCTAGTT CCTCACTAAC TCTGTGTGTC CTTGGGCAAG GTTGGGCGTG 8100
TGTTAACAGA TTATGACCTT GGGCTCTCAA GCTAGAGGAT CTAATTTTGA ATCTCGGCTC 8160
TGCTAAAGCA ATTAGTGATG TAAACTTTAA TGGGTCAAGT AACCTTCCTG TGGCTTAGTT 8220
TGCTCATCTG TAAATAGGG ATCATAACAG TATCAATACC ACATGATTGT TGGACAGATT 8280
GAATCAGTTA ATGCAAGGGA AGTACTTAGC ATGACAAGTA TTCACTATCA TTTCTGGAG 8340
TAAGAGCTGT GTGTGAGTGG GTGTGAGCAT GTGTGAAACC TTTTCTCTGC AATCTCAGTT 8400
AAGAAACCAA TCCAGAATTT AAAGTTCAGG GCCTAAATGG GTGGTTATCT TCTCCAGTT 8460
CCATCTATC CCACCTTTTG TCTTCTCCC GCCACAGGA GCTGTGTGTC CTTGATTGGG 8520
CTGGAAGACC TGGTGGACCC TAAGTGATCT ATAAGAGGAG AATAGAGAAC AGGGAATGTC 8580
TTCAAAATC TAGAGGGACA CAGAGGCTGA GAGGCAGGCA GTCCCTGCAGG GTCTCTGAT 8640
TGGGACAAGG AGAACCTTGG TCTTCACAGG CCAATTCTGG TCAGTTTCCC CCATGGACAG 8700
ATGAGGAAC AGGCCACGA ATATCCAAGG TCTCACACTT CCATCTGTCT AAGCTTGTGT 8760
GATTCTGTG TATTCATGTC TCTCAAGGG AGATAGAGTT TAGGGAAGAA AGAAGATCA 8820

【図 17-7】

FIGURE 17A (7/12頁)

GCACCAGATG GAAGCTGGGT TGGACCCACT CTATGCTGAA GAACAGCTTG TGTGGACACA 6660
AGGAGACACG GATATGTCAT TTTTGTAGAG CTTGAGGAGT GTCCAATCAC ACCATTGCT 6720
TAAACATCA TGCACACTTG GAAAAGTGA CTGAGACCGA ATGAAGAAGC TAACAGTGGC 6780
CAGATCAGAA AGGGTCTGT GTTACTTCTT AGAGATACTT AGATTTTATC CTGTGGGTGA 6840
TAGGAGCAGT TGGAGGGACT GAAGACAAGG AAAGAAACAT GTTCAAGAT CTATGTTTTT 6900
CAAGACGCTT TTCTGTTGGC TGAGTAGGGA ATTCCCTGGA TAAGTCTGTC CCAGGTCAG 6960
GCAAAACAAG TTAGGGGTTT ACTGAAATAA GGAGTATGAG AAATGGTGTG GGTGTGCTG 7020
ACGTTTTGTA ACACATCTCA TGATGATCTT CATTTCTCTT ACTAATTTC TGTTCATTA 7080
ATTCCCTTCC ACGTGTCTTT CTGAAATTTG CCTCACATTC TCTGATTTCT CTTTACCTG 7140
TTGGTTTTCAT CACCTTTTAC TTTTGTCTTT CTGGAACA CAAATGATTC TGATGTGAC 7200
ATGTCAGAAT TATTTGCAAC ATTTGCCTTT CTGCTGAAAC CATGAGTTCA CTGAATCAC 7260
AATTAGTAA AGTGTAGGAT GCACATGTCT TTTTCTGGT CACAACCAGC TCTGTAGCAT 7320
TTTATACTA CACTGGCAGT GTGCTGGGAG GTGTAGAGAG AAATATTTAT CACATGTGT 7380
GCTGACACAA CCGCCAAGT TATTTTAGGA GCTCCTTGG AATCCACGA AGAATGCTAC 7440
CGGCACATTT TGTAATCACA GCATCCTGCT CCATGCGTTG GCTTCATGTC ATAGTCACTT 7500
CTGCAAGTCT CTTTCCAGCT GTCTGTCCC ATGCTATATA AGTATGAGTT AAATCATCTT 7560
AACACTACTC ATCTTACAAA GTTTTCTTGC TGATGTTAAG AGAGTTGGGA AAGAACTGTA 7620
TAAACTGTGA AGTGCCATGG AGATGTTAGT GGTACTTTTA TCAAGAAATA GACACTCTAG 7680
AATGGAGTAG AAAGCCAACA GTTATGATTG AGTCTCTCTC CTCTCTCTCT TTTTATTAAT 7740

【図 17-9】

FIGURE 17A (9/12頁)

ACTGTGTCTG ATACCACCTG GAGCTTAAAT AAAGGGTTCT TTTACTTTCAT AGCATTTATC 8880
CCAATTGTGA ATTCAGTATT ATTTGTGTGG CTGTTTGTGT TCTCTTTCTC CTATATGAT 8940
GCTAGCTTCA TAAGGGCAAG GATTTTGATT CTTTATATTT TAGTCTTGC CACATGCTCT 9000
GAACACAGCA GGCATACAGG CTAACCAACA TACAGTGGCA TGAAAGTCAT GAAAGTGAGA 9060
CACCTACCTC CTCCAGTGCC AAGAGAGCAT AACCATGCAC CTGTCACTCT CCTCAACCC 9120
ACCCCCAAGC ATGAGGCCCA AAAGCATTAG CTAATCCCTT CCTCCAGCCA CTAAACTTTA 9180
AAGGCCAGGT GTGTGTGCTC CCATCTGAAA TCCCAAGACT TCAGGAGACA GCAGCAGGAG 9240
GATCACTTGA GGCCAGGAGT TTGAGATCAG CCTGGGCAAC ATAGTATAGT CCCATCTGTA 9300
CTAAAAATTA GCTGGGCGTT GTTGCAATGCC TGTAGTCCCA GCTACTAAGG AGGCTGAGGT 9360
GGGAGATCA CTTGAGCCCA GGAGGTGGA ACAACAGTAA GCTATAATCA CAGACTGAA 9420
CTCTAGCCTG GGCAACAGAG TGACACCCTG CCTCAAAACA ATTTTAAAAA TAAATAAGAG 9480
CAAAACTTAG ATACCAGTG GTCAACCCAA CATGCAAAAT CAAGTTTTCC CCTACTGAGA 9540
AGAATGGGGA CTTGACAGCT GAGTTACAGA GAGATAATCT TCTTCTTCTT TTTTTTTTTT 9600
TGGTTTACAT CCTCAAGATC ATGACTTGTG AAATTTGAT CGAATACACA TGTAATCCA 9660
GAGCAATGTT GCCTCGCAT ACCATCAGCA ATTCACTTGG CTACTGGAAG TCAGGATAG 9720
CTTCCAGAA GAGAGGTACC ACTTGGGCTA CCAATATAAA AGGATGAAAA TATCAGAGTG 9780
ATGTTGTTCT TTACAAGTT GAGTCCCTGG ACAGCTGTCT CACTGATGCT GATATCTGAG 9840
CCTAATGCTT CTCTGAATGT TGAGATTGAA CTTTGATCCA ATGAAACTAG AACGAGAAAG 9900

【図 17 - 10】

FIGURE 17A (10/12頁)

AAGATAAGTC TTTCATTGTT GATAGGACA TTATGTTTCT CATACTTGTA TGATTATTTT 9960
TCCTTAGCTG TACTATAATT ATCTGCTTAT TTGTCTCTGC TCTATGTGCT TAGGGTACAA 10020
AGTTGACCAA GACCAACTTT GGTGGAAGC ATAGTACTAA GAGCACAGTA CTGAGAGCAC 10080
AGTATTGAGA GCACAGCTTT AAAAACAATG ATGAAGGCTT TAATACAGGA AATGAGCAGG 10140
GGAGAGGCAT GTGGTGGTGG GATGTATCTT CCTTGACACA GTCAGTGCGG CTCTCAGTAG 10200
TCAAGTCCCT ACATGTTAGA AGATGTTACC TTCTGTGGAA TTAAGTGGCA GAACTTGCCT 10260
TCAATTATTT TCCTTTGCGG AACACACCA ACTGCATTAG TTAGGACACA GTGCTGGCTG 10320
CAITTTAAGTC CCAAGCGATG ATTAGTCTCT CACTGTTGGT ATAGATTCAA ACCAATCAGA 10380
CCACCTCCTA AAGTTTGTAG GGCAGGTAAA TCCTCATCTT AGAATAAAAA TCATCTTACC 10440
AAGTATGTGT TTTAGAGGCA AGAAGAAAAC ATATTTGTTT CTGTAAGAGT TTTGTTTAAA 10500
AAAAATATAA GAAAGGCTCT CGGTTTAGGT GAGGTAATGA AGTTGTTGAT AGTTATCAGA 10560
TGACACTGGA ATCTTTACTT CTCTGACGCT GTTCTGTGCA TCTCTCAGTG TGGGAACATA 10620
GAGAGGGAGA TCCTCCAGCA ATGCCACTGA TATGTCGAGA AACTGCATCT TTCTTCTCC 10680
CTGCTGAGAT GAGATGGAGT CCTTTGTTCT AGAAGACCCA TGGTGGTGCC GCTGGGAGTA 10740
ACCCCTGAGA CAGGAACACA AATCCCAACC AATTTGTGTT TGCAGCCTTG AGTCTCACTA 10800
TTTCCCATAG TGATGCGTAG CAGGGAATGG CAGGTGCACC AGAGCAGGAG AGGACCTAAT 10860
ATCTCCCTTC CTGTAGCTT TTTATAAGT TTTATTTGTA TCAGTAGCAG TTGGGAAGCT 10920
ACTTGCACTC ACTGAGCCTC AGTTTCTACA TCTGTAAACT GGGGATAGTA GCATGCGCCC 10980
TACTTAATGT GCTCAGCAAA GCCACTGAAA GGAGACAGAA ATGTATCTAA ATTACCCTGG 11040

【図 17 - 12】

FIGURE 17A (12/12頁)

GCCTGAAAGT GCAGAGACAG CAGCTGAGGC ACAGCCAAGA GCTCTGCTG TATTAATGAC 12180
CTAAGAAGTC ACCGAAAGT CAGAAGGGAT GACATGCGA GGCACAGCAA TCTCAGCTAA 12240
GTCAACTCCA CCAGCCTTTC TAGTTGCCCA CTGTGTGTAC AGCACCTCGG TAGGGACCAG 12300
AGCCATGACA GGAATAAGA CTAGACTATG CCTTGAAGGA GCTCACCTCT GTTCAGGGAA 12360
ACAGGCGTGG AAACACAATG GTGGTAAGA GGAAGAGGGA CAATAGGATT GCATGAAGGG 12420
GATGGAAGGT GCCCAGGGGA GGAATGGGTT ACATCTGTGT GAGGAGTTTG GTGAGGAAAG 12480
ACTCTAAGAG AAGGCTCTGT CTGTCTGGGT TTGGAAGGAT GTGTAGGAGT CTCTAGGGG 12540
GCACAGGCAC ACTCCAGGCA TAGGTAAGA TCTGTAGTGT TGGCTTGTG GATGAATTT 12600
CAAGTATTTT GGAATGAGGA CAGCCATAGA GACAAGGCGA AGAGAGAGGC GATTTAATAG 12660
ATTTTATGCC AATGGCTCCA CTGAGTTTC TGATAAGAAC CCAGAACCCT TGGACTCCCC 12720
AGTAACATTG ATTGAGTTGT TTATGATACC TCATAGAATA TGAACCTAAA GGAGGTCAGT 12780
GAGTGGTGTG TGTGTGATTC TTTGCCAACT TCCAAGGTGG AGAAGCCTCT TCCAACCTGCA 12840
GGCAGAGCAC AGGTGGCCCT GCTACTGCGT GCAGCTCCAG CCCTGCCTCC TTCTCTAGCA 12900
TATAAACAA TCCAAGCCT CACTGAATCA CTGCTGTGCA GGGCAGGAAA GCTCCATGCA 12960
CATAGCCCAG CAAAGAGCAA CACAGAGCTG AAGGGAAGAC TCAGAGGAGA GAGATAAGTA 13020
AGGAAGTAG TGATG 13035

【図 17 - 11】

FIGURE 17A (11/12頁)

ACTTTTATCC TACCTCTCTT GGGGATTGTC ACCACCTTCC CATGTTTGTC CTTTTGGTT 11100
TGATGCTTGC TGTCACTTCT TTCCTTAGGT GCCTCTCTGT ACGGCTCTTT TATCCAGAGG 11160
ATTCCAGAGT TACAGCACAT GCATACCACC ATCCAAGCAT GTTTATTTGT CTCCTGCTTC 11220
ACTAGGCTGT CCCCAAGGAA CATGTGGCTC CCGGCACACA CCTGGCACAA CACTGCACAT 11280
GACATTCACC CACTTGGCCT TGAATCTGAC AAGGAATCTG GCATGATGTT CACCCACTCA 11340
GGCCAGGTGC CGAGCAGCCC TGGAGGCTTA GGGGCCAGAG GATGAGGAAA AGGTGTCTTT 11400
CTGGGTGAG TATCAGTTTC TGCAGGAGGG CTGAATGTGA GAAAGAATAA AGAGAGAAGG 11460
AAGCGAACAA GCACAGCTTA AACATCGCCT ATTTCTATTG AGTTTAAAGA ACGCTGTGAT 11520
TTTGTTTGTC ATGCAATCCA TTCATCAGGC CAGGCAGACA CAGAACTTGG GTGTGAGTGA 11580
CGATAATGAG CTGATATAAT TTTCACACC TCATCATGTA GATCTCTCCC ATCAGGAATG 11640
GGTCAGGGAG CTCACAGGTG GCAGCAACTG CTATTACAGG CCTCATCTCT ACCAGCTCCT 11700
GGGGCCTGCC CTCCTCCCAT TAGAAAATCC TCCACTTGTG AAAAAGGAAG CCAITTTGCTT 11760
TGAACCTCAA TTCCACCCCC AAGAGGCTGG GACCATCTTA CTGGAGTCCT TGATGCTGTG 11820
TGACCTGAGC TGACCACTGC CCCATCATTG CTGGCTGAGG TGGTTGGGGT CCATCTGGCT 11880
ATCTGGGCGC CTGTTCTCTT CTCTCCTTTC TCTCCTGTTT CCAGACATGC AGTATTTCCA 11940
GAGAGAAGGG GCCACTCTTT GGCACAAAGAC CTGTCTAATC TGCTATCTAT GGCAGGACCT 12000
TTGAAGGGTT CACAGGAAGC AGCACAAATT GATACTATTC CACCAAGCCA TCAGCTCCAT 12060
CTCATCCATG CCTGTCTCT CTCTTAGGGG TCCCTTGCC AACAGAATCA CAGAGGACCA 12120

【図 17 - 13】

FIGURE 17B (1/3頁)

GGTACCTGGT TATCTATTGG GACTGGTTGG ACAAGAGGGT GCAGCCCACG GAGGGTGAGC 60
CAAGCAGGGT GGGGCGTGGC CTCACCTGGG AAGCACAGG GGTCTGTGAA TTTTCTCCCC 120
TACCCAGGGA AAGCCATAAG GGAATGAGCC TGAGGAAGT TGCACTGTGG CCCAGATACT 180
GCACTTTCCC CATGCTCTTT GCAACCCGCA GACCAGGAGA TTCCCTCCGG TGCTATGCC 240
ACCAAGGGCC TGGGTTTCAA GCACAAAAT GGGCAGCCAT TTGGGCAGAG ACCGAAGTAG 300
CTGAGGAGT TTTTTTTTTT TTTTCCATA CCCCATTGGC ACCTGGAACG CAGTGTAGAC 360
AGAACCCTTC ACTCCCTGGG AAGGGGGCT GAAACAGGG ATCCAAGTGG TCTGGCTCGG 420
TGGCCCCAC CCCCATGGAG CCCAGCAAAC AAGATTCAC TTGGCTTGA AATCTGTCTG 480
CCAGCAGAGC AGCAGTCTGA GATTGACCTG GGACCTCGA ACTTGGTTGG GTGCTGTGG 540
GGGCACTCTT CCATTGCTGA GGCTTGAATA GGTGGTTTTA CCTTGGCGGT GTAAACAAAG 600
CTGCTGGGAA GTTTGAAGT GGTGGAGCTC ACCACAGCTC AGTAAGGCCA CTGTGCCCAG 660
ACTGCTCTC TGGATTTCTC CTCTCTGGGA AGGATATCTC TGAATAAAG GCAGCAGCCC 720
CAGTCAGGGA CTTATAGATG AAACCCCAT CTCCCTGGGA CAGAGCCCTC CGGGGAAGAG 780
GTGGCTTCCA CCATTGTGGA AGACTGTGTG GCAATCTCTC ACGGATTTAG AACTAGAGAT 840
ACCATTTGAC CCAGCAATCC CATTACTGGG TGTATACCA TAGGATTATA AATCATTTCTA 900
CTATAAGAC ACATGCACAC TTATGTTTAT TGTAACTA TTTACAATG CAATGACCTG 960
GAACCAATCC AAAAGCCCAT CAATGATAGA CTGAATAAG AAAATGTGGC ACATATACAC 1020
TGTGAATAC TATGCAGCCA TAAAAAGGA TGAGTTGATG TCCTTTGCGG AGACATGGAT 1080

【図 17 - 14】

FIGURE 17B (2/3頁)

GAAGCTGGAA ACCATCATTC TCAGCAAACT AGCAACAATA CAGAAAACCA AACACTGCAT 1140
GTTGTCACTC ATAAGTGGGA GTTAAACAAT GAGAACACAT GGACACAGGG AGGGGAACGT 1200
CACACACTGG GGCATGTGCG GGAGTGGGG CCTACGCGAG GGATAGCATTT AGCAGAAATA 1260
CCTAATGTAG GTGACGGGTT GATGGGTGCA GCAAAACACC ATGGCACATA TACACCTAIG 1320
TAATAAACT GCACGTCTCG CACATGTACC CCAGAAGCTA AAGTATAATT AATAATAATA 1380
ATAATTTCTG GGCATGTAAG TAGCTGTCTT TCAGGTTCTA CTTTGATACA TATTCTGAGA 1440
GAATTAAACC TGTCAAAGAA ACCTTGACTT TCAATGCGAG GCACGTGATAT TGACCTTAAT 1500
AATGTGTTTT GGGGTAAGCC TACTCATATT CTCAACCTGT CTGCAGTAGT CGTTAGAATC 1560
TGAACCTCCT GAAGTTCATG TGCAAAAGTTG AGTTAATTGT TTAATATTCA ACAAGGATTA 1620
TGCCAGTAAG ATGGTAGGAA AATATTAGAT ATGTGTCATC ACTGCTGTGA TTAATTTAAAC 1680
TGCAACATAT TTTAGCTGGC TGCTGATCTC AGCCACCATG CCTGCATTTT ATCTCTGTCT 1740
CGTGGCTGCG AACCTTGAAA GCTTTGAAC TAGCTCATAG AATCCTGGGC ATCAAGAAACA 1800
TGTGGTTCTA ATGGCTAGAT AGGGAATGAG AGTAAAGGA TTTTGCCAC GGTCACTGTA 1860
GTAAACAACA GATTGAGAG GGTCTGGACT ACTGTGATGA CTTCAATCTG ACAATATGTT 1920
CCAGTTGTCC TTTCAATTC TCCTAATCAC ATGTTTGGTC TGATTGGCT GTTCCCAACC 1980
TTCCAATTCC TGCTCTCTCC AATGCTCCCT TCCGTAGGTC ACTCTGTGCG TCAGAGACCC 2040
TGCTTAGCAA GCGCCCAACC TTTCAATTAT TTGTTTCAGTA AACTTGAAC TCATGTCTCC 2100
CCTCTCTGAT AAAAAGAAA TACGTTATGT AATGTGCGGT TACTCTATAA CTCTGTCTCT 2160

【図 17 - 16】

Figure 17C (1/7頁)

GGTACCTGGTTATCTATTGGGACTGGTTGGACAAGAGGGTGCAGCCCCAG
GAGGGTGAGCCAAGCAGGGTGGGGCGTCCGCTCACTTGGGAAGCACAAG
GGGTCTGGAAATTTCTCCCTACCCAAGGAAGCCATAAGGGACTGAGC
CTGAGGAACTGTGCACTCTGGCCAGATACTGCATTTTCCCATGTCTTT
GCAACCCGACAGACAGGAGATTCCCTCCGGTGCCTATGCCACAGGGGCC
TGGGTTTCAAGCACAAAACCTGGGCAGCCATTGGGCAGACCCGAACTAG
CTGCAGGAGTTTTTTTTTTTTTTTCCATACCCCATTTGGCACCTTGGAAACGCC
AGTGAGACAGAACCCGTTCACCTCCCTGGAAAGGGGGCTGAAACCAAGGA
TCCAAGTGGTCTGGCTCGGTGGGCCCCACCCCATGGAGGCCAGCAAAACA
AAGATTCACTTGGCTTGAATTCCTTGGTGGCCAGCAGCAGCAGCTCTGAG
ATTGACCTGGGACCTTCGAACCTTGGTGGGTGCTGTGGGGGGGCATCTCC
ATTGCTGAGGCTTGAGTAGGTGGTTTTACCTTCGGGTGTAAACAAAGCTG
CTGGGAAGTTTGAACCTGGGTGGAGCTCACCCAGAGCTCAGTAAGGCCACTG
TGGCCAGACTGCCTCTCTCGGATTTCTCTCTCTGGGAAGGATATCTCTGAA
AAAAAGGCAGCAGCCCCAGTCAGGAGCTTATAGATGAAACCCCATCTCC
CTGGGACAGAGCCCTCGGGGAAGAGGTGGCTTCCACCATTTGTGGAAGAC
TGTGTGCAATTTCTCAGGATTTTGAACATAGAGATACCATTTTGAACCCAGC
AATCCCATTTACTGGGTGATATACCATAGGATTTAATACTATTCTACATAA
AGACACATGCACTATTATGTTATTTGAACATATTACATATAGCAATGAC
CTGGAACCAATCCAAAGCCCATCAAGCTATAGACTGAATAAAGAAAATGT
GGCACATATACACTGTGGAATACTATGCAAGCCATAAAAAAGGATGAGTTT
ATGTCTTTTGCAGAGACATGGATGAAAGCTTGGAAACCATCAITTCAGCAA
ACTAGCACAAATAACAGAAAACCAAACTGCATGTTGTCTCACTCAATAAGTG
GGAGTTAAACAATAGAAACCATGGACACAGGGAGGGGAACGTCACACA
CTGGGGCATGTGGGGAGTGGGGGCTCAGGGAGGGATAGCATTAGCAG
AAATACCTAATGTAGGTGACGGGTTGATGGGTGCAGCAAAACCCATGGG
ACATATACACCTATGTAATAAAAACTGCACGTTTGCACATGTACCCAGA
ACTTAAAGTATAATTAATAATAATAATTTCTGGGCATGTAAGTAGCTG
TCITTCAGGTTCTACTTTGTGATACATATCTGAGAGAAATTAACCTGTCAAA
GAAACCTTGACTTTCAATGGCAGGCCTGGAATTGACCTTAATAATGTGTT
TTGGGGTAAGCCTACTCATATTTCTCTGTCGTGGTCTGCAACCTTGGAAAGC
CTGAACCTCTCTGAAGTTCATGTGCAAGTTGAGTTAATTGTTTAAATTTCA
ACAAGGATTATGGCAGTAAGATGGTAGGAAAATATTAGATATGTGTCATC
ACTGCTGGTATTATTTAACTGCAACATATTTAGCTGGCTGCTGATCTCA
GCCACCATGGCTGCAITTTATCTCTGTCGTGGTCTGCAACCTTGGAAAGC
TGTGAACCTAGCTCATAGAACTCTGGGCATCAAGAACATGTGTTTCAATG
GCTAGATAGGGAATGAGAGTAAAGGATTTTGGCCACGGTCAAGTGAAGTA
ATAACAGATTTGGAGGGGTCTGGACTACTGTGATGACTTCATTTCTGACA
AATGTTCCAGTTGTCTTCAITTTCTCTCTAATCAATCATGTTTGGCTGATT
TGGGTGTTTCCACCTTCCAATTTCTGCTCTTCTCCAATGCTCCCTTCCGTAG
GTCACTCTGGGCTCAGAGACCTTCTTAGCAAGCGGCCAACCTTTCAATT
ATTGTTTCAGTAAACCTTGAACCTCATGTCTCCCTCTTGTATAAAAAAGAA
ATACGTTATGTAATGTGGGTTTACTCTAATCTTGTCTGTCTCTCTCGGC
AACTAGTGAACCTAGCTTTTCAATTTGAGCAAAACGTTTATGGAAGGACT
GCCAAGAGTCAAGGTACTAGGCTTGGTAATATTCCCGTTCTCTAGTCAA
AGCCAACCCAGAGCTTGCAGATTTCTCTCTAATGCCAAGCCCATGACAGAT
CACAGGCCAGGGTCTGTCTCTCTGAGCTCCTTTGGGAGGGGAAGACAG

【図 17 - 15】

FIGURE 17B (3/3頁)

GTCTCTCGGC AACTAGTGAA CTAACGTGTT TCATATTGAG CAACGTTTA TGAAGGACT 2220
GCCAAGAGTC AGGTACTAGG CTTGGTAATA TTCCCGGTC TCTCTAGTCA AAGCAACAC 2280
CAGCCAGACT TGCAGATCTA GTTCCCAAGC CCACCTGCAGA TCACAGGCCA GGTCTGTGTC 2340
TCCTCTGAGC TCCTTTGGGA GGGAAAGACA GAATTATTA CACCCATTTT GTAGATTAGG 2400
CAACTGAGGC TGAGGAAGTT TAAATAACT AGACAGGGCC TGCACTGACG TCATATTCCA 2460
A 2461

【図 17 - 17】

Figure 17C (2/7頁)

AATTATTAACACCCATTTTGTAGATTAGGCAACTGAGGCTGAGGAAGTTT
AAATAACTCAGACAGGGCTGCAGCTCAGTCATATTTCCAAGGATCCCTAC
TCACTGTCTTCTCTCTACAGAACGAGATGTCTCTGGAGTCCATAGAAAGCC
CAGGAGCCTGGCTGGGCACGGTGGCTCCTGCCTGTAATCCCAGCACTTTG
GGAGGCCGAGGCAGGCAGATCACTGAGCTCAGGAGTTCAAGACCAAGCC
TGGGCAACATGGCAAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCT
GGGCGTGGTGGTGCATGCTCTAATCCCAGCTACTTTGGGAGGCTGAGGCA
CAAGAAATTGCTTGAGCCAGGAGGCAGCAGTTGCAGTGAGCTGAGATTGT
GCCAGTGCCTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGATTCCATTTCAAAAAACA
AAAAACAAACACAAACAAACAAACAAATAGAAAGCCAGGACCACT
GCCTCAGGTTCCAGCCACACCTTTTCTGTCTCTCTGTCTCTGGCATC
TTCTCACAGGTTCTAATTTGTTGGTTGCACAAAATTCAAAAATCCCAGAA
AAATTTACCACTTCACACCCACTCAGATGGCTATTTTTTTTTTGAAGGAAGA
TAACAAGTGTGACAGAACATGGAGAAATTTGGAATTTCTCACCCATTGCT
GTGAGAATGTAAATACGGTGTCTGCTGCTATGGAAACAGCTTGGAGTTTC
CTCAAAAGTTCAACAGAAATTTCAATGTGACCCAGCAATTTCCCTCTAAGT
TATAGATCTGAGAGGATTAAAAACAGTTACTAAAAATACACGGACTCACAT
ATTTCTAACAGTCCAATTCACAGGGCCAAAGGTTGCTAATAGCCACAT
GTCCATCGGATGGATGGATAAATAAATTGTTGGTCTATCCATACAATGGAAT
ATTATTCGGCCATAAATGGAATGAAGTACTGACGCTGCTACAGAAATGGA
TGAAACCGCAAAAAAATGGAATGAACATGCTACAGAAATGGAATAGCCT
ACTTTACTATGAAGTGAAGGCCAGAAAGCAAGTCCATATATTGCAATCAT
CAAAATATCCAGAGAGGGAAGGCCACAGAGACAGAAATGTGCAATGGTG
GATGCCAGGCTCTGGGGAGAGGGGAGAGTGGGGAGAAATGCTCAACTG
GTACAGGCTTTATTTTGGAAATGATGGGAACATTTTGCACATGATAGAGG
TAGTGATTGCAGAACACAGAAATGTACTGAATTCACCTGATTTTTTCACT
TAAATGGTTAATTTTCACTCCTGAGATTGGATAATCAAAAAAATGGTT
AATTTTATGTTATGTGAATTTTCACTCCCTATACATATTTTAAACCTCAGAAA
TATACACTAGCAGGCATGGAACAGGTCAGTGTGGTGCCTGCCAAGCCCGG
TGATGTTATCTGGGGTCCCGGCCAGCCTTAAGCCCTCTGCTGACCGGTGG
AGGGCAGAACCTTTGCCCTAAAAATATAATATCCACATGCTGGCATGATT
CTGTGCCAGATGGCTCTTTATTAGCAGTAATTTGAACTGCTCGATACAG
ACCTGTACCTTGCACCAAAAAATGACTCAACAAATGATAATAAGGGTTA
AGCTGGGCTTTCTCTCTTTGCCAGTTAAATTTATATTTATTATGCACTTGACA
TGAAAAACAAAGCAACTCCAACAGGTATCAAAAGGGCAAGGACATGAA
CATTTTATCAAGAGAAGAAATGCAGCTGTCAAAAAATACAGAAATATTCAAC
CTGTGTTCAATAAAGTGGTGGGCTCAGTGGTTCATGCCTGTAATCCCAG
TGCTTTGCAAGGCTGAGACAGGAGGATCATTTGAAGCCAGCAAGTTCTCAAGA
CCATCTAGGCCAAGTCAGTTCAATACAGACATTCATGTCTCAAAACATC
AAAAAAATAGCCAGGCATGGTATGCAATGCTGCTGTTGCCAGCTACTCAG
GAGGCTGAGGCAGGAGAATTTGCTGAGCCTGGGAGGCTGGGTTGGGGT
GAGCCATGATTGTGCCATTTGACTCCAGCTGGGCAATGCAAGCAAGCTG
TCTAAATAACAAAAAATAAGTAAGAGAAAGGATTTGGGATGCCAATTTACT
TGCGTATTCAATACAGAGATTAAAAAGTAATTTCTACGTTTCTATTTTTTT
ATTACTAAAAAAGCTGGACCAITCTCACAGCTGAAAGTGGCTCTCACTTT
CCCTTCTCTGTCCAAACACTTCTCTATGATAATTGCAAAACAGTCACTCTTT
AGGAAGACTTCAACCCAGGTAGTTCCAGATCCCTTATCTCTGCTCTCCCA
GAACTCCTGGTGTCTCCAGTTCCCTCCGTGGTGGTGAAGTACCTACCTA

【図 17 - 18】

Figure 17C (3/7頁)

GGGTTTCAGTATGGCTCTGTCTGCAAGGCTTGTTCACACCTTCCCTTAT
GGTCTCTGTGCCCTGTGTGTGTCATAGCAGGGGCACAGTGGAGAACCC
ATTACACTGATAGAGAGGGGCCCATGGTCTGGAGATAACCATGTAAACC
GATCAGAATAAGGCATTTGAGGGCTGGGTGTACGGCGTGGGCTGCACCTGG
GTGGGCAGGTCCCCCTGGAAAGTCACTGGGTGTGGCAAGCTTCTAGTAAC
ATGTCTCTCTGGGGTCCCCCTTGGAACTTCAATGCAAAAAATGCTGGTGTCTG
GTTTATTCTAGAGAGATGGTTCATTCCTTTCATTGTATATCAAGAAACT
CATGTCCCAATTAAAGGTCTAAAGGCCAGTTTGTAACTGAGATGATCT
CAGCTGAATGAACCTTGTGACCCCTGTCTTCTCCAGCCTCTCGGTGCC
TTGAAATCATGTGGTTCAGCAAGCCTCATGAGGCAITACAAAGTTTAATT
ATTTCACTGATTATTAACCTTGTCTGTGTGACCCAGGTGAATCACAA
GCTGAACCTTCGACAAGAACAGCTATCATATTTCTTTCAATTACAGAAAA
AAGTAAGTTAATGATAGGATTTTTTTGTTTAAAAAAATGTTACTAGTT
TTGAAAGGTAAATGTGACATGGTAACACTAAGAGGTATAGAGCA
TAATGCTTTTATACTACTAAGAAATATGTTTCTCTAAGTTTTTTTGGTAG
ATGCTTTTCATCAGATTAAAGAAATTCCTGCTATTAAGTTGTGAAGGTTT
TATATCATAAATGAAGTTGAATTAATTAATCATATTAATTAATTAATG
TTATGAACTATAACAGCCTTTTCTAAAACCATTTGAGATGATCTTTAAAC
CAITCTCTTTAAACCTGTGACGAGATCAITGGTATTTATACTATTTCTCTG
TTAACCATTTCTGAGTCTCAGGTTTAAATCAACTTGGTCATGGTGTGTCA
TCTTTGATCACTGCTGTCTGTGGCTTGTCTACTGTTTTTGGTATTTTGTG
ACTGATGCTCATCAATGAGACCTGGCATGCCATCTTCTTTCAGTCTGTGAT
TTTTTCTGATTTGAGTATCATGTGTTATGGCCCTCATGGAATGAGTTGGGC
ATGATGCCCTTTTTCTCATGTCTCTGAGATTGATGGGACACTTGTGATTTCTCT
CAGATGGCCCTCAATGGTCCCTGCTCTCATTTGTTAGGCCCTGGGCAAG
CCCTTCTCATTTCTGGTAGGGCCAGGAACCTGTGGGGTGTGTTGTTGTTGT
TTGTTTCTGTGAGTCTGAGTCTCACTCTGTCAACCCAGGCTGGAGTTGGAGT
CAATGGCCCGATCTTGGCTGACCTCAACCTCCACTCCAGATTCAAGCAA
TTCTCTGCTCAGCCTCTGAGTCTGAGTCTGGAATTACAGGCACCCACCGCA
CACCTCTGCTAATTTTTGATTTTTTAGTACAGATGGGGTTTCAAAATTTGG
CAAAGCTGGTCTCGAAGCTCTGATCTCATGATCTGCCCCGCTTGGCCTCCC
AAAGTGTGAGATTCAAGCATGAGCCACCCACACCCAGTGAACCTGTGGT
TTTTAGAGAGTCCCATGATGATGAATGCTGTGAGCATCCAGAGATGACA
GCCACTGTGTGTTGAGCTGTGTGGAAGTGTGAGAAAGCAGTGGGAGCT
TCTCCAGCACTGCCTGTGAGTTCATGGAAGAGGCTTGTGGGGAGATG
ATGCCCTGGCTGACTCTCAAGAGGATGTTTAGGAATGCAACAGATGGAGG
TGGGTTGGACCACTCTATGCTGAGAAGACAGCTTGTGTGACACAAAGGAG
ACACGGATATGTCATTTTGTGATGGCTGAGGAGGTGTCCAATCACACCAT
TGCTTTAAACATCATGCACACTTGGAAAGTGGAGTGAAGCCGAAATGAAG
AAGTAAACAGTGGCCAGATCAGAAAGGTTCTGTGTTACTCTAGAGAT
ACCTAGATTTTCTCTGTGGGTGATAGGAGCAGTGGAGGGAGTGAAGAC
AAGAAAGAAACATGTTTAAAGATCTATGTTTTTCAAGACGCTTTCTGGT
GGCTGAGTAGGGAATTCCTGGATAAGTCTGCCAGGCTCAGGCAAAAC
AAGTTAGGGGTTACTGAAATAAGGAGTATGAGAAATGGTGTAGGTTGTG
CTGACGTTTGTAAACCATCTAGATGATGATCTCATTTCTCTCACTAATTT
CTGTTTCAATTAATTCCTTCCAGTGTCTCTCTGAAATTTGGCCTCACTTCT
CTGATTTCTCTTTCACTGTGGTTTCAATCACTTTTACTTTTGTCTTCTG
GAAACACAAATGATTTCTGATTGTGACATGTCAGAATTAATTGCAACATTG

【図 17 - 20】

Figure 17C (5/7頁)

ACACATGTAATTCAGAGCAATGTTGCCCTCCGCATACCATCAGCAATTCAC
TTGGCTACTGGAAGTCAAGGTAAGCTTCCAGAGAGAGAGGTAACCATTCAG
GCTACCAATATAAAAGGATGAAATATCAGAGTGATGGTGTCTTTTACAA
CGTGTAGTCCCTGAGACGCTGTCCACTGTGATATCTGAGCCTAATG
CTTCTCTGAATGTTGAGATTGAACCTTGTATCAATGAAACTAGAACGAGA
AAGAAAGATAAGTCTTTTCACTGTGTTGAGAGGACATTATGTTTCTCATCTG
TATGATTTTCTTCTTACGTCTACTATAATTATCTGCTTATTTGTCTCTGC
TCTATGTGCTTAGGTAAGCAAGTTCAGCAACGACCACTTGGTTGGAAGT
ATGATTAAGAGCACAGTACTGAGAGCACAGTATGAGAGCACAGCTTT
AAAAACATGATGAAGGCTTTAATACAGGAAATGAGCAGGGGAGAGCA
TGTGGTGGTTGGATGTATCTCTTGACACAGTCACTGAGCTCTCAGTAG
TCAAGTCCCTCAATGTTAGAGAGTGTACCTTCTGTGGAATTAAGTGGCAG
AAGTGGCTTCAATTTTCTTCTTGGACAGCAACACCACTGCATTAGT
AGGACACAGTGTCTGCTGATTTAAGTCCCAAGCGATGATTAGTCTCTCA
CTGTGTTGATAGATTAAAAACCATGACAGCACTTCTTGGTTGGAAGG
AGGTAAATCTCATCTTAGAATAAAAAATCATCTTACCAAGTATGTTTGA
GAGGCAAGAGAAACATATTTTGTCTGTAAGAGTTTGTGTTAAAAA
ATATAAGAAAGGCTCTCGGTTTAGGTGAGGTAATGAAGTTGTGATAGT
ATCAGATGACACTGTGGAATTTCTTCTCTGAAAGTGTCTCTGATCTCT
CAGTGTGGGACATAGAGAGGGAGATCTCTCAGCAATGCCACTGATATGG
TCAGAAACTGCATCTTTCTTCTCCCTGCTGAGATGAGATGGAGTCTTGT
TTCTAGAAGACCCATGGTGGTGGCGCTGGGAGTAAACCTTGTAGACAGGA
CACAAATCCCAACCAATTTGTGGTGGACGCTTGAATCTCACTTTTCCCA
TAGTGTAGCGTAGAGGAAATGGCAGGTGACACAGAGCAGGAGAGGACC
TAATATCTCCCTTCTGTTAGCTTTTATAAGGTTTATTTGTGATCAGTAGC
AGTTGGGAAGCTACTGACAGCTGAGCCTCAGTTCTACATCTGTAAAC
TGGGATAGTAGCATGGGCCCTACTTAATGTGCTCAGCAAAAGCCACTGAA
AGGAGACAGAAATGATCTAAATACAGGCTGACTTTTATCCTACCTCTCT
GGGGATTGTACACCACTTCCCATGTTTGTCTTTTGGTTGTGATGCTTGTG
TCACTTCTTCTTCTTAGTGGCTCTCTGTGACGGCTCTTTTATCCAGGGAATC
CAGAGTTACAGACATGATACCAACCATCAAGCATGTTTATTTGTCTCTCT
GCTTCACTAGGCTGTCCCAAGGAACTGTGGCTCCCGGCACACACTGG
CACAACTGACATGACATCAACCATCAACCTTGGCCTTGAATCTGACAAAG
ATCTGGCATGATGTTTACACCATCAAGGCCAGGTGCGGAGCAGCCGGAG
GCTTAGGGGCCAGAGGATGGGAAAGGTTGCTTTCTGGGGTGTGATATCA
GTTTCTGACAGGAGGCTGAATGTGAGAAAGAAATAAGAGAGAGAGGAAGC
GAACAAGCACAGCTTAAACATCGCTCTTCTTATTTAGGTTTAAAGAACGCT
GTGATTTTGTGTTGTGATCAATCCATTCATCAGGCCAGGACAGACACAGCT
TGGGTTGTGAGTGAAGATAATGAGCTGATATAATTTTACACCCCTCATCAC
TGAGATCTCTCCCATCAGAAATGGTCAGGAGCTCAGAGGTGGGCGCA
CTGCTATTACAGGCTCATCTTACCAGCTCTGGGCGCTGCCCTTGGCCT
ATTAGAAAATCTCCACTTGTCAAAAGGAGGCCATTTGCTTTGAATCTCA
ATTCACCCCAAGAGTGTGGAGCTTACTGGAGTCTTGTGATGCTGTG
TGACCTGACAGTACCACTGCCCCATCTGTGGCTGAGGTGGTGGGGTCA
CATCTGGCTATCTGGGAGCTGTTTCTTCTCTCTTCTCTCTGTTTCCA
GACATGACGATATTTCAGAGAGAGAGGGGCACTTTTGGCAAGAAACCTG
TCTAAGCTGCTATGCTGAGGAGGCTTGAAGGGTTCACAGGAAGCAGC
ACAAATGATACTATTCCCAAGCCATCAGCTCCATCTCATCCATGCCCT

【図 17 - 19】

Figure 17C (4/7頁)

CCTTTCTGCTGAAACCATGAGTTCAGTGAATACACAAATTAGTAAAGTGTA
GTATGCACATGTCGTTTTCGTGGTCAACACAGCTCTGTAGCAATTTATA
CTACCTGGCAGTGTGCTGGGAGGTGTAGAGAGAAATATTATTCATAGT
GTGGCTGACACAACTGCCAAGTTATTTTAGGAGCCTCTTGGATCCAG
CAAGAATGCTACCGGCACAAATTTGTAATCAGACACTCTGCTCCATGCCCT
GGCTTCATGGCATAGTCACITTCGCAAGTCTCTTCCAGCTCTGCTGTTC
ATGTCTATAAAGTATGAGTTAAATCATCTTAACTACTACTCTTACAAAG
TTTTCTGTGATGTTAAGAGAGTGGGAAAGAACTGTATAAAGCTGTGAA
GTGCCATGGAGATGTTAGTGGTTACTTTATCAAGAAATAGACACTCTAGA
ATGGAGTAGAAAGCCACAGTTATGATTGAGTCTCTCTCTCTTCTTCTT
TTATTAATTTATAAAGAAAGAGGTTTAAATGACTCAGAGTTCCATATGGC
TGGGAGGCTCGGGAAACTCTCAGTCAAGCAGGAGGCAAGGGGGAAG
AAGGCACCTTCTCACAAGGGCGGAGGAGAGAGAGCTCTGTTCTTTT
TTGTATAAAGTCTACAGAAAGTCTTATACCTTCAGGACAAGGGCAGGCA
ATGGAGTGAAGGACATTTGCTTACCACAGCCTCACTGACGAGTTTGTCTA
GGGAGCTCACTTTGTCCAGAGTAGGGCAGAACTCTGGCCACTACCCAT
TCGAAGGCTGGGCTGCACTGCTAGTCTCTCACTAATCTGTGTGGGCTT
GGCAAGGTTGGGCTGTGTTAACAGATTATGACCTGGGCTCTCAAGCT
AGAGGATCTAAATTTGAATCTGGCTCTGCTGACAGCAATTAGTGATGA
ACTTTAATGGGTCAGTTAACCCTCTGTGGCTTAGTTTGTCTATCTGTAAAA
ATAGGATCATAAACAGTATCAATACCCAGATGTTGTGACAGATTGAAT
CAGTTAATGACAGGGAAGTACTAGCATGACAGCTATTCATATCATTTCTC
TGGAGTAAGAGCTGTGTGTGAGTGGGTGTGAGCATGTGTGAAACCTTTTC
TCTGCAATCTCAGTTAAGAAACCAATCCAGAATTTAAAGTTCAGGGCCTA
AATGGGTGGTTATCTTCTCCAGTTCCACTATCCACCTTTGTCTCTCTCT
CCCGCCACAGGAGCTGTGTGCTTGTATTGGGCTGGAAGACTGGTGGA
CCCTAAGTGTCTATAAGAGGAGAAATAGAGAACAGGCAATGTCTTCAAAA
ATCTAGAGGACACAGAGGCTGAGAGGCAAGGAGTCTGCAAGGCTCTTCT
GATTGGGACAAGGAGAACCTTGGTCTTTCAGGGCAATCTGTGCTGATTT
CCCCATGACAGATGAGGAAACAGGCCAGGAATTCGAAGTCTCTACA
TCTCCACTGTCTCAAGTCTGTGTTGATTTCTGTTTATCTGTTCTCAAGG
GAGATAGAGTTTAGGGAAGAAAGAGGATCAAGTGTGTCTGATACCACTG
GGAGCTTAAGTAAGGGTCTTTTACTCATGACATTATCCCAATTTGTA
ATTCAGTATTATTTGTGTGGCTGTGTGGTGTCTTTCTCTTATATGAGTG
TAGCTCTATAAGGGCAAGGATTTTGTGTTCTTTAATATTAGTGTCTGCCAC
ATGCCCTGAACACAGCAGGCTACAGGCTAACCAACATACAGTGGCATGA
AAGTCATGAAAGTGAGACACCTACCTCTCCAGTGGCAAGAGAGCAATAAC
CTGTACCTGTCTCTCTCAACACCCAGGCTTCTGATGTTGCTGCTGAA
GCATTAGCTAATCCCTCTCTCCAGGCACTAAAACCTTAAAGGGCAGGTGTG
TGGGCTCCCATCTGAAATCCCAAGAACTTCAGGAGCAGGAGGAGGAGT
CACTTGAGGCCAGGAGTTTGTGATCAGCCTGGGCAAGCTAGTATGGTCCC
ATCTGTACTAAAAATTAGCTGGGCTGTGTGATCTGAGTCTGAGTCTGAGT
CTAAGGAGGCTGAGGTTGGGAGGATCACTTGAGCCGAGGAGGTGGAAGCA
ACAGTAAGCTATAATACAGCACTGAACCTCTAGCTTGGGCAACAGAGTGA
CACCTGCTCAAAACAAATTTAAAAATAAATAAGAGCAAACTTAGATA
CCAGTGGTCAACCAACATGCAAAATCAAGTTTCCCTACTGAGAAGA
ATGGGAGCTTGACAGCTGAGTTACAGAGAGATAATCTTCTCTCTTTT
TTTTTTGGTTTACATCTCAAGATCATGACTGTGAAATTTGAATCGAAT

【図 17 - 21】

Figure 17C (6/7頁)

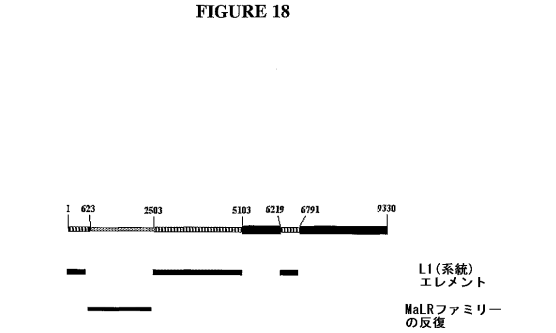
GTCTCTCTTTAGGGGTCCCCTTGCCAACAGAAATCAGAGGACCCAGCCT
GAAAGTGCAGAGACAGCAGCTGAGGCAACAGCAAGAGCTCTGGCTGTATT
AATGACCTAAGAAAGTACCAGAAAGTCAAGAGGATGACATGCAGAGGC
CCAGCAATCTCAGCTAAGTCAACTCCACAGCCTTTCTAGTTGCCACTGT
GTGTACAGCACCCCTGGTAGGGACAGGCAATGACAGGGAATAAGACTA
GACTATGCCCTTGAGGAGCTCACCCTGTCTGTTGAGGAAACAGGGGTGGA
CACAATGGTGGTAAAGAGGAAAGAGGACATAGGATTGATGAAGGGGA
TGAAGGTGCCAGGGGAGGAAATGGTTACATCTGTTGAGGAGATTGGT
GAGGAAAGACTCTAAGAGAAGGCTCTGTCTGTGGGTTTGGAAAGGATGT
GTAGGAGTCTTCTAGGGGACAGGCACTCCAGGCTAGGTAAGTAAGATG
TGTAGGTGTGGCTTGTGGGATGAATTTCAAGATTGTTGAAATGAGCA
GCCATAGAGACAAGGGCAAGAGAGAGGCGATTATATAGATTATAGCCAA
TGGCTCCACTGTGAGTTTCTGATAAGAACCCAGAACCTTGGACTGGGCT
AACATTTGATTGAGTTGTTTATGATACCTCATGAATATGAAGTCAAGGGA
GGTCAGTGAGTGGTGTGTGTGTGTTCTTTGAGGTTTCAAGGTTGGAGA
AGGCTCTTCAACTGCAGGACAGGACAGGTTGGCCCTGCTACTGGCTGCA
GCTCCAGCCTGCTCTCTTCTAGCATATAACCAATCAACAGCTCACT
GAATCACTGCTGTGACAGGCAAGGAAAGTTCATGACATAGCCAGCAAA
GAGCAACACAGAGCTGAAAGGAGCTTGGCGGCTTAACTCTGAGAAGT
GGTGTGAGGCACTGGGCAAGTAAATGTAAGTTTCAAGACAGACTGTTAA
GGAGCAATAGAAACTGGGCTTTCGAGAGAGAGAGACTTCTGCTTGT
CTGATAGGCACTTATGTTCTTACTGACATCCACTTGGCTTTCTCTCCACA
GGTCTCACTCCAGGTTCAATTAAGCTCTTAAGGGCGGCAAGCTTGGC
ATTCGGGTACTGTTGGTAAAGCCACATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
AAAGGCCCGGCGCATTTCTATCCGTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCA
ATGTCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTCTCTGGAACAAITGCTT
TTACAGATGACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAA
ATGTCGGTTCCGTTGGCAGAAAGCTATGAACAGTATGGGCTGAATACAAA
TCACAGAAATCGTGTATGACAGTGAACACTCTTCTCAATTTCTTATCCGGT
GTTGGCGCGGTTATTTATCGGAGTTGAGTTGGCGCGGCAAGCACTATTA
TAATGAACGTTAATGCTCAACAGTATGGGCAATTCGCAAGCTACCGGTGG
TGTCTGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAAGCTCAAAAAAG
CTCCCAATCATCCAAAAAATTATTAATGATGGATTCTAAACCGGATACCA
GGATTTCAGTGAATGACAGTTCGTCACATCTCACTTCTCTCTCTCTCTT
AATGAATACGATTTTGTGCAAGAGTCTCTGATAGGACAGAGCAATGTC
ACTGATCACTGCTCTGATCTACTGCTCTGCTCTCAAGGTTGTGCTCT
GCCTCATAGAACTGCTGCTGCTGATGATCTGCTGATGCGAGAGATCTATTT
TGGCAATCAAAATCAITTCGGGATCTGCGATTATTAAGTGTGTGCTCATCA
TCACGGTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTTGTTG
AGTCTCTTAATGATAGATTGGAAGAGAGCTTCTTCTGAGGAGGCTTCA
GGATTACAAGATTCAAGAGTGGCTGCTGCTGCTGCAACCTTATCTCTCTT
CGGCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACAGAA
TTGCTTCTGTTGGGCTCTCCCTCTCTAAGGAAGTGGGGAAGCGGTTGCCA
AGAGGTTTCAATCTGCGAGGATACAGGCAAGGATAGGGCTCACTGAGACT
ACATCAGCTATTCTGATTAACCCGAGGGGGATGATGAATACCCGGGCGGT
CGGTAAGTGTGTTCAATTTTGAAGCGAAGGTTGTGATCTGGAATACCGG
GAAACAGCTGGGCTTAACTCAAGAGGCGCACTGTGTGAGAGGCTCTA
TGATTATGTCGGGTTATGTAACAAATCCGGAAGCGCACCAAGCCTTGATT

【 図 1 7 - 2 2 】

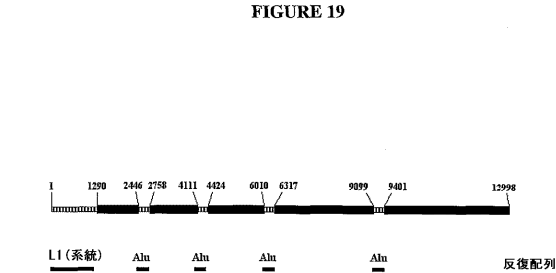
Figure 17C (7/7頁)

GACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGA
CGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAAG
CTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCA
CATCTTCGACGCAGGTGTCGAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAAAC
TTCCCGCCGCCGTTGTGTGTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAA
GAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGGAAAAAAGTTGCG
CGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGGTCTTACCGAAAAAC
TCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGG
AAAGATCGCCGTGTAATTCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGAGCAG
ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACTAGAAATGCAG
TGAAAAAAATGCTTTATTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTGTA
ACCAATTATAAGCTGCAATAAACAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTT
ATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAA
CCTCTACAAATGTGGTAAAAATCGATAAGGATCGATCCGTCGAC

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

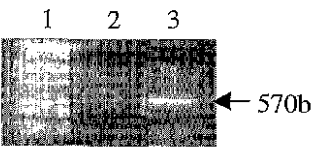


Figure 20

【 図 2 1 】

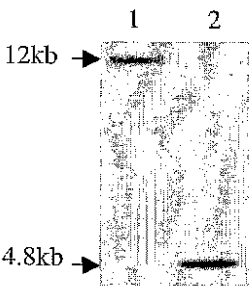


Figure 21

【図 22】

Tg.FvBマウスにおけるCYP3A4-lucの発現に対する
生体異物の効果

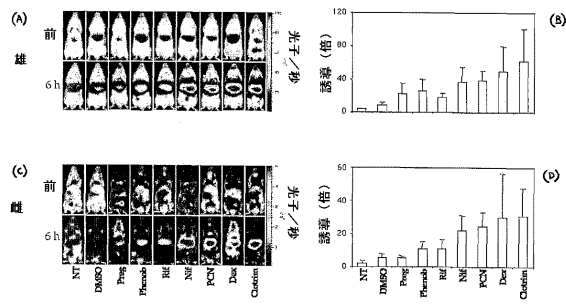


Figure 22 (パネルA～D)

【配列表】

2008188024000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

(72)発明者 ウェイシェング ゼアング
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 9, フレモント, ラビット コート 1 8 8

(72)発明者 パメラ コンタグ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 2 9, サン ホセ, ボリンガー ロード 6 1 1 0

(72)発明者 アンソニー プルチオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 1, アラメダ, ウェストライン ドライブ 3 1
0 ナンバービー 3 1 6

(72)発明者 サンディー ハシマ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2, サン ディエゴ, カミノ ジョナタ 7 8 9
8

(72)発明者 シェリー マ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, ダッフィ テラス 3 4 2 6 7

(72)発明者 ケビン ナウotka
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 1, アラメダ, アトランティック アベニュー
8 6 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA08 BA80 CA01 CA12 DA02 EA04 GA11 HA08
HA12
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ22 QQ42 QQ53 QQ79 QR08
QR32 QR36 QR42 QR50 QR55 QR57 QR62 QR72 QR77 QS25
QS28 QS34 QS36 QS38 QS39 QX02
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 BD03 CA24 CA44 CA46