

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4598954号
(P4598954)

(45) 発行日 平成22年12月15日 (2010.12.15)

(24) 登録日 平成22年10月1日 (2010.10.1)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 3 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-577196 (P2000-577196)	(73) 特許権者	301034267
(86) (22) 出願日	平成11年10月6日 (1999.10.6)		フラー・ス・インテルユニフェルシタイル
(65) 公表番号	特表2002-528392 (P2002-528392A)		・インステイチュート・フォル・ビオテ
(43) 公表日	平成14年9月3日 (2002.9.3)		キノロヒー・ヴェーゼットウェー (ヴェー
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/007800		イーバー・ヴェーゼットウェー)
(87) 国際公開番号	W02000/023471		VLAAMS INTERUNIVERS
(87) 国際公開日	平成12年4月27日 (2000.4.27)		ITAIR INSTITUUT VOO
審査請求日	平成18年10月5日 (2006.10.5)		R BIOTECHNOLOGIE VZ
(31) 優先権主張番号	98203529.7		W (VIB VZW)
(32) 優先日	平成10年10月20日 (1998.10.20)		ベルギー国、ペー9052 ツウェイナ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ールデ、レイフィスヘストラート 120
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸炎処置のためのサイトカイン産生性ラクトコッカス株の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

炎症性腸疾患を処置するための医薬の調製のための IL-10、可溶性TNFレセプター、TNFアンタゴニスト、IL-12アンタゴニスト、インターフェロンγアンタゴニスト、IL-1アンタゴニスト又はEBV BCRF1産生性ラクトコッカス属の使用であって、該処置が炎症を少なくとも50%低減し、及び／又は該炎症の発生を予防する、該ラクトコッカス属の使用。

【請求項 2】

ラクトコッカス属が、ラクトコッカス・ラクチスである、請求項1記載のラクトコッカス属の使用。

【請求項 3】

腸疾患が、慢性大腸炎、クローン病又は潰瘍性大腸炎である、請求項1又は2記載のラクトコッカス属の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

大腸炎を処置するためのサイトカイン産生性ラクトコッカス株の使用。

発明の概要

本発明は、経口経路によるIL10及び／又は溶解性TNFレセプターのような、サイトカイン、好ましくは酸感受性抗炎症剤の腸粘膜における送達のための投与方策に関する。本発明による好ましい特徴は、それぞれのタンパク質を産生するために操作されている、

生存するリコンビナントラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 細胞の懸濁液の接種である。例として、硫酸デキストランナトリウム (DSS) の投与によって結腸末端の慢性炎症を誘導したマウスを用いた。組織学的評価によって記録された処置は、明らかに炎症及び疾病症状の回復をもたらした。この発見は、経口投与後に直腸で活性を発揮するために、送達系は胃及び小腸の上部の酸性環境を通過する必要があることから、全く予想外のことである。

【0002】

哺乳類の免疫系は、多様かつ複雑であり、そして自然及び適応の、免疫メカニズム及び反応を含む。免疫系は、しばしば液性免疫応答又は細胞性免疫応答のいずれかの用語で記載されている。液性免疫は、抗体産生及びB細胞による作用をひろく意味し；細胞性免疫は、T細胞、樹状細胞、好中性白血球、単球及びマクロファージによって媒介される。

10

【0003】

免疫系が通常作用しそれ自体を調節することによるメカニズムの一つは、いわゆるサイトカインの産生を含む。サイトカインがいくつかの正及び負の免疫応答を介在することは公知である。サイトカインは、通常、標的細胞上のレセプターに結合することによって作用する。サイトカインの活性は、いくつかの方法、例えば可溶性レセプター（レセプターの細胞外ドメイン）又はサイトカイン類似物若しくは誘導物の投与によって干渉することができる。

【0004】

IL-10は、多くの作用又は効果を介在することができるサイトカインである。IL-10が異なるクラス又はTh細胞（Tヘルパー細胞）のサブセットの免疫応答のコントロールにかかわることは、公知である。

20

【0005】

炎症性腸疾患（IBD）は、消化管の部分の慢性非特異的炎症を特徴とする消化管障害の群をいう。潰瘍性大腸炎（UC）及びクローン病（CD）は、ヒトにおけるIBDの最も顕著な例である。それらは、小児における成長遅延、直腸脱、便中の血液（例えば、下血及び／又は血便）、消耗、鉄欠乏、及び貧血例えば鉄欠乏性貧血及び慢性的疾患若しくは慢性的炎症の貧血を含む、多くの症状及び合併症に関連している。IBDの病因は、不明瞭である。これに関しては、Wyngaarden and Smith (ed.) *Cecil's Textbook of Medicine* (W.B. Saunders Co. 1985), Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, 1982), and Harrison's *Principles of Internal Medicine*, 12th Ed., McGraw-Hill, Inc. (1991)を参照されたい。

30

【0006】

IBDの発生率は、地理的な位置で大きく変動する。欧州の共同研究では、10000人当たりの発生率が、UCで10.4人及びCDで5.6人を示し、南部地方における発生率と比べて北部中央地方におけるUC及びCDの発生率は、それぞれ40%及び80%高率である。UC及びCDの両者は、長期間の疾患であることから、クオリティオブライフの文字とおりの妨害である。クローン病は、20歳及び50歳の発生率における著しいピークを示す、発症の二頂性の年齢分布を有する。より高い発生率及びより悲惨な疾病特性は、若年齢におけるピークに関連する。これが、CDを、苦しむ青年のように特に辛いものとし、そして若年成人は、人生の大きな期待を実質的に奪われ、このように、特にこの社会集団に関連する。

40

【0007】

潰瘍性大腸炎は、主として結腸粘膜における症状を有する、慢性、非特異的、炎症性、そして潰瘍性の疾患である。しばしば、観血的下痢、腹部の鋭痛、便中の血液及び粘液、倦怠感、熱、貧血、摂食障害、体重減少、白血球増加症、低アルブミン血症、及び赤血球沈降速度（ESR）の増大を特徴とする。合併症は、出血、中毒性大腸炎、中毒性巨大結腸症、場合により直腸腔瘻、そして結腸がん発生の危険性の増加である。

【0008】

潰瘍性大腸炎は、関節炎、強直性脊椎炎、仙腸関節ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、結節性

50

紅斑、壊疽性膿皮症のような結腸から離れた合併症とも関連する

処置は、疾患の重篤度及び期間を考慮して変動する。例えば、脱水症状や電解質平衡異常を予防するための輸液療法は、しばしばひどい発作を表す。更に、特別食事測定が有用な場合もある。薬剤は、種々のコルチコステロイド及びその誘導体のいくつか、そして場合により免疫抑制物質を含む。

【0009】

クローン病は潰瘍性大腸炎と共通する多くの特性を有する。クローン病は、かなり拡散している潰瘍性大腸炎の損傷と対照的に、近接する正常な腸からはっきりと区別できる傾向にある損傷であることで区別される。更に、クローン病は、優先的に回腸（回腸炎）、及び回腸と結腸（回大腸炎）を冒す。時として、結腸のみが病気となり（肉芽腫性大腸炎）、そして時々小腸全体が含まれる（空回腸炎）。まれに、胃、十二指腸、又は食道が含まれる。病変は、臨床例のおよそ半分が類肉腫型類上皮肉芽腫である。クローン病の病変は、閉塞、瘻孔形成同じく膿瘍形成をもたらすことができる深い潰瘍形成を含める経壁の浮腫及び線維症を含む。これは、通常非常に浅い病変を生じる潰瘍性大腸炎と対照的であるが、時々、線維症、閉塞、瘻孔形成及び膿瘍も同様に潰瘍性大腸炎において見られる。

10

【0010】

処置は両疾病ともに同様であり、ステロイド、スルファサラジン及びその誘導体、並びにシクロスポリンA、メルカプトプリン及びアザチオプリンのような免疫抑制剤を含む。より新しく開発された処置は、いくつかはまだ臨床試験中であるが、TNF抗体又はTNFレセプターのようなTNF遮断化合物の全身投与（注入による）を含む。

20

【0011】

IBDは、病因処置の不在のために公衆衛生における真の問題を示す。多くの患者は、抗炎症コルチコステロイド処置のような従来医薬治療により十分に処置されるが、殆どは疾患の再発活性を有し、そして三分の二は手術が必要となる。

【0012】

炎症性腸疾患の原因は、知られていない。CD及びUCの病因は、恐らく細菌因子のような遺伝的因子及び環境的因子の両方の相互作用を含むが、明らかな病因因子は従来明らかにされていない。恐らく腸管微生物フローラがもたらす異常免疫応答がIBDを生じるのが、主要な説である。しかし、T細胞が病因において重要な役割を奏していることは十分確立されている。活性化T細胞は、抗炎症性サイトカイン及び親炎症性サイトカインの両者を産生することができる。研究中の知識を用いて、IBDを合理的方法で弱めることができる。中和モノクローナル抗体又は抗炎症性サイトカインの使用を生じる新規抗炎症性治療は、IBDの原因である免疫非調節（disregulation）を調整する可能性を示す。高度に顕著及び効果的な新規治療は、上記のとおり抗TNFモノクローナル抗体を用いる全身処置である。単回静脈内投与量は、cA2インフリキシマブ抗体5～20mg・kg⁻¹の範囲であり、活性のクローン病における飛躍的な臨床的改善をもたらす。1日当たり0.5～25μg・kg⁻¹の範囲の投与量を用いる処置療法で7日間全身投与されたりコンビナントIL-10の使用は、減少したクローン病活性測定値及び増加した寛解を示した。多くの極めて将来有望な治療である、親炎症性サイトカインのタングリング又はT細胞の浸潤の確立のいずれかが、実験モデルから今明らかになっている。しかし、これら全ての方策は、全身投与を必要とする。IBDの重篤な合併症は、全身を重篤に衰弱させ、そして最終的には死因となり得る。

30

40

【0013】

発明の詳細な説明

Schering Corp.に譲渡された米国特許5,368,854においては、IL-10を用いる哺乳動物における炎症性腸疾患を処置する方法が開示されている。この方法において、サイトカインは、IBD（炎症性腸疾患）を有する哺乳動物に投与される。この引例に記載されているようにIL-10の投与は、血管内、そして好ましくは静脈内のような非経口である。

【0014】

50

しかし、IBDに罹患している（ヒト）患者のためのこのような投与経路は、欠点が無いわけではない。非常に容易かつより簡便な方法は、同様の治療的活性を有する、IL-10又はサイトカインアンタゴニストのようなサイトカインを含む医薬品の経口投与である。より重要なことには、治療剤の局部的放出がより高効率及び全身投与が原因の不要な副作用の低減を可能にする。

【0015】

Cambridge University Technical Services Ltd.に譲渡されたWO 97/14806には、体内、特に粘膜におけるポリペプチドの鼻腔内投与による生物学的に活性なポリペプチド及び／又はラクトコッカスのような非侵入性細菌を用いる抗原を送達する方法が開示されている。

10

【0016】

しかし、酸感受性であるIL-10のようなサイトカインを用いる、慢性大腸炎又はクローン病のような炎症性腸疾患の処置は、極めて扱いにくくそして達成が困難な仕事である。したがって、活性化合物（例えば、サイトカイン又は可溶性レセプター）が、化合物が多くのサイトカイン、特にIL-10の酸感受性の問題を考慮に入れその活性を発揮することが期待される場所に直接的に送達され、そして経口投与後に送達媒体が胃の酸性環境を通過する必要があることの要望を満たすシステムの開発が望まれている。また、種々の消化酵素は胃及び腸を通過することからポリペプチドを分解する。最後であるが重要な問題として、薬剤のその場所での（in situ）投与は、全身的毒性又は他の制限のためより全身的な経路の投与による達成が困難である、治療的に有効な濃度を到達させることができる。

20

【0017】

IBDに罹患している患者の回復を達成するためには、損傷した細胞、及び該損傷細胞を含む器官、例えば結腸を回復する必要がある。

【0018】

上記技術的問題に対する解決手段は、請求項に特徴づけられる実施態様を与えることによって達成される。

【0019】

我々の発明は、医薬品の調製のための、サイトカイン産生性グラム陽性菌株又はサイトカインアンタゴニスト産生性グラム陽性菌株を使用し、炎症性腸疾患を処置することである。

30

細菌宿主株によって産生される該サイトカイン又はサイトカインアンタゴニストは、例えば、IL-10、可溶性TNFレセプター又はIL-12誘導p40ホモダイマー（IL-12アンタゴニスト）のようなサイトカイン類似物、インターフェロン γ アンタゴニスト、IL-1アンタゴニスト又はEBV BCRF1（Baer et al., 1984）のようなウイルスコード化サイトカイン類似物であり、ここでグラム陽性菌株は、ラクトコッカス属（*Lactococcus species*）、そしてより好ましくはラクトコッカス・ラクチス（*Lactococcus lactis*）である。

本発明の目的のために用いられる他のグラム陽性菌株は、バチルス・ズブチルス（*Bacillus subtilis*）、ストレプトコッカス・ゴルドニイ（*Streptococcus gordonii*）、スタフィロコッカス キシローサス（*Staphylococcus xylosus*）、又は*Lactobacillus bulgaricus*、*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus delbrueckii*若しくは*Lactobacillus plantarum*のようなラクトバチルス種（*Lactobacillus spec.*）である。

40

慢性腸炎、クローン病又は潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患が、活性サイトカイン化合物、好ましくは、IL-10又は可溶性TNFレセプターの適切な投与量を用いて本発明にしたがって処置されることができ、そして病気の結腸の予想外の回復し、明らかに正常および健康な状態を提供する。

【0020】

IL-10は、単独か、又は少なくとも一つの付加的治療剤と組み合わせて投与すること

50

ができる。該薬剤の例は、コルチコステロイド、スルファサラジン、スルファサラジン誘導物、シクロスポリンAのような免疫抑制剤、メルカプトプリン、アザチオプリン、及び別のサイトカインを含む。共投与とは、通常は、複数の（2種以上）治療が、特定の時間間隔の間に受容者に存在することをいう。通常は、もし第二の薬剤が第一の薬剤の半減期内に投与されるとすれば、この2種の薬剤は、共投与されたとみなされる。

【0021】

ここに開示される本発明は、したがって、リコンビナントL.Lactisによるin situ合成によるIL-10の局部的送達に関する。その結果として、炎症は、DSSで誘導された慢性大腸炎において50%まで減じられ、そしてIL-10-/-129Sv/Evマウスにおける大腸炎の発生を予防する。したがって、この方法は、抗炎症性タンパク質の全身投与を基にする強力な、定評のある、認められた治療に比べて、同等に有効である。ここで用いられるベクターであるL. lactisは、グラム陽性の食品用生物であり、完全に無害である。それは、非コロニー形成微生物である。ここに示される処置中の正確な投与量及びタイミングは、極めて重要であり、したがって容易に得ることができる。

10

【0022】

ベクターの生存度の重要な必要条件は、本発明に示されている。これは、IL-10のin situ合成の必要性を示す。ベクターは、実際に、結腸内でIL-10のデノボ(de novo)合成を示すことによってこれを達成することができる。

【0023】

腸管内における処置に基づくタンパク質についての有効な新規概念が、ここに開示される。この処置は、薬学的処方として最も望まれる経口経路によって与えられることができる。用いる経路のために内因性の感受性を有する化合物を用いる遠位結腸に至るまで効果を発揮することができる。この方法は、全身投与の必要性を回避する。これは、不安定又は大量に産生することが困難である物質の局所的送達の可能性を開く。これは、元来極めて費用有効的である。

20

この方法は、潜在性の副作用に関する、望ましいか又はたとえ全身的送達によって達成し得るより高い濃度で治療におけるIL-10の持続性かつ局在性の存在の疑問を解決することができる。

【0024】

本記載中で用いられるいくつかの用語は、明瞭性のために、下記で説明される。

30

【0025】

一般的には、用語「症状」とは、疾病又は患者の状態のあらゆる主観的徴候をいう。これは、患者によって認知されるような徴候を含む。IBDの症状の例は、下痢、腹痛、発熱、下血、血便及び体重減少を含む。

【0026】

一般的には、用語「徴候」は、通常は、診察する医師、又は超音波検査若しくはX線撮影テストのような実験室評価若しくは別のテストにおいてそれら自身を明らかにする特徴によって認められるような疾病又は状態のあらゆる客観的徴候をいう。IBDの徴候のいくつかの例は、腹腔質量、舌炎、アフタ性潰瘍、裂肛、肛門周囲瘻孔、貧血、吸収不良、及び鉄欠乏を含む。時々、徴候及び症状は共通する。例えば、患者が血便を訴え（症状）、かつ便サンプルの臨床検査が血液陽性である（徴候）。

40

【0027】

熟語「適切な投与量」又は「有効量」は、自己免疫状態又は所望しない若しくは不適切な炎症性若しくは免疫応答の症状若しくは徴候を回復するために十分な量若しくは投与量をいう。特定の患者に対する有効量は、処置される状態、患者の全体的健康状態、投与の経路及び投与量、及び副作用の重篤度のような因子によって変動することができる。

【0028】

「サイトカイン」は、ある範囲の細胞型によって一過的に産生されるポリペプチド因子を意味し、通常局所的に作用し、そして細胞表面レセプターに結合することによって特定遺伝子の発現を活性化する。

50

【0029】

「アンタゴニスト」は、レセプターに結合するが活性化しない化合物をいい、したがってアゴニストの作用を拮抗的に阻害する。

「アゴニスト」は、レセプターに結合しそして活性化する化合物である（例えば、ホルモン及び神経伝達物質のような内因性リガンド、化学的合成化合物、アルカロイド様天然産物）。

【0030】

本発明において持ちられる方法の詳細な説明

培地

GM17は、0.5w/v%のグルコースを添加したM17 (Difco, St. Louis) である。GM17Eは、5 µg/mlのエリスロマイシンを添加したGM17である。BM9は、1リットル当たりNa₂HPO₄ 6 g、KH₂PO₄ 3 g、NH₄Cl 1 g、NaCl 20.5 g、MgSO₄ 2 mmol、NaHCO₃ 2.5 mmol、Na₂CO₃ 2.5 mmol、CaCl₂ 0.1 mmol、グルコース 5 g及びカジトン (Difco) 5 gを含有する。BM9Eは、5 µg/mlのエリスロマイシンを添加したBM9である。

10

【0031】

リコンビナントDNA技術

DNAのPCR増幅は、製造者によって推奨される条件を用いて、VENTポリメラーゼを用いて行われた。DNA修飾酵素及び制限エンドヌクレアーゼは、標準条件下及び製造所によって推奨されるバッファー内で用いられた。一般的分子クローニング技術並びにDNA及びタンパク質の電気泳動は、原則的に記載されたとおりに行った (Sambrook et al., 1990)。L. lactisは、グリシン存在下で成長した細胞のエレクトロポレーションによってトランスフォームされた (Wells et al., 1993)。

20

【0032】

発現プラスミドの構築

プラスミド pT1MIL10 (図1) は、プライマー (CAGTACAGCCGGGAAGACAAT及びGCACTAGTTAGCTTTTCATTTTGAT) を用いて得られ、そしてmIL10コード配列を含有するcDNAクローンに行ったPCRフラグメントのサブクローニングによって構築した。この方策の設計のために、我々は、EMBL受託番号M37897と提出したとおりのmIL10 cDNA配列の使用を利用した。上記プライマーを利用することによって、mIL10フラグメントは、キナーゼ及びSpeIでの処置後に、pTREX1誘導物であるNa e I-SpeI開裂プラスミドpT1NX (図1) 内に、ブラントーSpeIフラグメントとして、サブクローニングすることができた (Wells and Chofield in: Lactic Acid Bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications. F. Bozoglu & R. Bibek, Eds., Nato ASI Series H, Vol.98, p.37. Springer-Verlag, 1996)。プラスミド pT1TR5AH (図1) は、プライマー (CTGGTCCCTTCTCTTGGTGAC及びCCACTAGTCTATT AATGATGATGATGATGATGCGCAGTACCTGAGTCCTGGG) を用いて得られ、そしてTNFr55コード配列を含有するcDNAクローン上に行われたPCRフラグメントのサブクローニングによって構築された。この方策の設計のために、我々は、EMBL受託番号L26349と提出したとおりのmIL10 cDNA配列の使用を利用した。上記プライマーを利用することによって、sTNFr55フラグメントは、3'末端に6hisタグを与え、そしてキナーゼ及びSpeIでの処置後に、Na e I-SpeI開裂プラスミドpT1NX内に、ブラントーSpeIフラグメントとしてサブクローニングすることができた。両プラスミドは、Usp45の分泌リーダー (Van Asseldonk et al., Gene, 95, 155-160, 1990) の間に融合遺伝子のためのラクトコッカスのP1プロモーターの下流にmIL10及びsTNFr55それぞれをコードする。分泌の際は該リーダー配列は切り離される。

30

40

【0033】

リコンビナントタンパク質の同定

リコンビナントmIL10及びmsTNFr55は、それぞれMG1363 [pT1MI

50

L10〕及びMG1363〔pT1TR5AH〕の上清中に認めることができる(図2)。このテストについて、培養のアリコート5mLをフェノール2mLで抽出し、続いてタンパク質をエタノール10mLでの沈殿による有機相から調製した。培養上清の1mLに相当する沈殿の一部分をSDS-15%PAGE及びイムノブロットングに付した。培養サンプルを下記のとおり細菌の成長中に適切な時期に採取した。

【0034】

MG1363〔pT1MIL10〕の培養上清は、平均で、 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のマウスIL10を含有した。上清のマウスIL-10活性をマウスマスト細胞株MC/9を用いて測定した(Thompson-Snipes, L. et al., J. Exp. Med. 173, 507, 1991)。トランスフェクション実験で示されたように、ヒトIL-10は、マウスIL-10Rに結合する(Ho, A.S.Y et al., PNAS 90, 11267, 1993; Liu, Y. et al., J. Immunol. 152, 1821, 1994)。 $1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ のIL-10は、conA活性化脾細胞のIFNガンマ産生のレベルを50%阻害することができるIL-10の量として同定される(Fiorentino, D.F. et al., J. Exp. Med. 170, 2081, 1989)。この効果のED50は、通常は $0.3\sim 0.6\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ である。活性既知の標準物質と一緒に測定したとき、MG1363〔pT1MIL10〕培養上清は、約 $8000\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ の活性を示した。Berg et al. (J. Clin. Invest 98, 1010-1020)は、リコンビナントmIL10の非活性が約 $1.0\times 10^7\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ であると報告している。これらを考慮し、そして用いた方法の多様性を考慮すると、我々は、MG1363〔pT1MIL10〕培養上清中に存在するリコンビナントmIL10は、完全な生物活性を示したと結論する。少しのIL10活性もコントロール培養であるMG1363又はMG1363〔pTREX1〕の上清中において検出することができなかった。

【0035】

菌株MG1363〔pT1TR5AH〕の培養上清は、平均で、 $200\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ のmsTNFr55を含有する。Loetscher et al. (1991)は、sTNFr55によるTNF細胞毒性活性の完全な阻害は、sTNFr55:TNFのモル比が1000:1以上でのみ得られることを示した。MG1363(pT1TR5AH)の培養上清から回収された可溶性リコンビナントTNFr55は、常在性産物について報告されているように、TNFに対する同等の阻害効果を示した。これは、混合によって証明され、したがってTNFの滴定系列とリコンビナントsTNFrの滴定系列とは拮抗し、そして記載されているように細胞毒性アッセイにおいてTNF活性を測定する(Espevik, T and Nissen-Meyer, 1986)。

【0036】

マウスの前処置

慢性大腸炎の誘導のために、マウスをKojouharoff et al. Clin Exp Immunol 107, 353, 1997に記載されるように前処置した。6~8週齢雌Balb/cマウスをDSSを用いて4サイクルの処置に付した。各サイクルは、7日間の飲用水中の5%DSS、続いて正常飲用水を与える10日間の間欠期からなる。最後のDSSサイクル完了の4~6週間後に、マウスを記載したとおりのL. lactis株で処置した。

【0037】

【実施例】

更なる開示そして本発明を明瞭にするためにいくつかの実施例を下記に示す。

【0038】

実施例1

生L. lacticeを用いるマウスの処置

発現菌株の保存

新たにストリークしたL.lactis発現菌株を発現プラスミドの不在又は存在によってGM17又はGM17Eの10mL中に摂取し、そして 30°C で一晩成長させた。一晩培養を新しいGM17又はGM17Eで1/100に希釈し、そして 30°C で3時間再成長させた。細胞を遠心によって回収し、次いでプラスミドの存在に応じてBGM9又はBGM9Eに再懸濁させた。この培養を 30°C で5時間成長させた。この培養のタンパク質プロフィー

10

20

30

40

50

ルをそれぞれ s T N F r 5 5 又は I L 1 0 に対する抗血清のいずれかを用いる培養上清 1 mL相当物のウェスタンイムノブロッティングを行うことによって分析した。タンパク質プロファイルは、適切なレーンにおいて s T N F r 5 5 及び I L 1 0 の存在を示した (図 2)。もとの G M 1 7 又は G M 1 7 E 一晚培養 5 mL にグリセリン 5 mL を添加し、 -20°C で保存した。このストックをいくつかの実験で発出物質として用いた。一連の各実験を通したタンパク質分析は、リコンビナントタンパク質の産生における高い再現性がこの方法によって得ることができることを示した。

【0039】

第 1 週及び第 2 週

L. lactis 菌株の保存溶液を G M 1 7 又は G M 1 7 E の 1 0 mL で 1 / 2 0 0 に希釈し、 30°C で一晚成長させた。細胞を遠心によって回収し、次いで B M 9 又は B M 9 E の 1 mL に再懸濁させた。コントロールである健常マウス及び大腸炎を誘導したマウスに 1 日当たりこの細胞懸濁液のアリコート 1 0 0 μL を接種した。

【0040】

第 3 週及び第 4 週

L. lactis 菌株の保存溶液を G M 1 7 又は G M 1 7 E の 1 0 mL で 1 / 2 0 0 に希釈し、 30°C で一晚成長させた。この培養を B M 9 又は B M 9 E の 1 0 mL で希釈し、 30°C で 3 時間成長させた。マウスに 1 日当たりアリコート 2 0 0 μL を胃内 (経口的) に投与した。

【0041】

実施例 2

組織学的スコアの判定

組織学的スコアは、基本的に、Kojouharoff et al. Clin Exp Immunol 107, 353, 1997 によって記載されているとおりに判定した。

マウスを頸椎脱臼によって屠殺した。結腸を摘出し、そして P B S で洗浄した。結腸の遠位 3 分の 1 を縦方向に切断し、ろ紙上に置き、そして 1 0 % ホルマリンを含む P B S で一晚固定した。パラフィン包埋材料の切片を縦方向に作製した。3 個の 3 μm 切片を 2 0 0 μm の間隔をおいて切り出した。切片をヘマトキシリン-エオシンで染色した。組織学的分析をブラインド方法で行った。マウスを個々にスコアし、そして各スコアを 3 個の切片の平均で示した。

【0042】

組織像を下記のようにスコアした。

浸潤: 0、浸潤無し; 1、陰窩底部周辺の浸潤; 2、粘膜筋板に達する浸潤; 3、広範な粘膜筋板に達する浸潤及び大量の浮腫を有する粘膜の肥厚; 4、粘膜下組織の浸潤。

【0043】

上皮損傷: 0、正常形態; 1、杯状細胞の損傷; 2、広範囲の杯状細胞の損傷; 3、陰窩の損傷; 広範囲の陰窩の損傷及び/又はポリプロイド再生の病巣。

【0044】

結腸長を解剖そしてペーパータオル上に設置した直後に測定した。

【0045】

他のパラメーターの中でも慢性大腸炎の病理は、結腸の長さの減少並びに上皮損傷及び事実上実質的な程度のリンパ球の浸潤を特徴とした。

【0046】

図 3 は、M G 1 3 6 3 [p T 1 M I L 1 0] を用いた炎症性マウスの処置後の結腸長の増加を明らかに示すが、M G 1 3 6 3 [p T 1 T R 5 A H] でのマウスの処理後はより少ない程度であった。

【0047】

図 4 及び 5 は、M G 1 3 6 3 (p T 1 M I L 1 0) で処置したマウスにおける慢性腸炎の回復の開始は、M G 1 3 6 3 [p T 1 T R 5 A H] で処置したマウスに比べてより大幅に改善したように見えた。

【0048】

共に上記で記載しているとおりに測定した、図5が炎症性浸潤を示すのに対し、図4は、上皮損傷の組織学的スコアを示した。

【0049】

図6は、炎症しそして処置した組織に比べた、正常組織の組織像を示した。

【0050】

正常組織像においては、等しい長さの陰窩の連続配列を認めることができた。陰窩においては、多くの杯細胞を認めることができた。少ない数のリンパ球が粘膜に存在した。粘膜下組織には、リンパ球は全く存在しなかった。炎症組織においては、長さの相違から構造の全くの不在までにおよぶ、組織化された陰窩構造の消失を認めることができた。また、陰窩の残存物においては、杯細胞は全く存在しなかった。リンパ球の大量の浸潤によって、粘膜の厚さの大幅な増加を観察することができた。リンパ球は、潰瘍を形成する傾向にある。重篤な場合には、リンパ球の浸潤は、粘膜下組織においても観察することができた。しかし、上皮は、無傷なままであった。MG1363 (pTREX1) を用いる処置の陰性コントロールは、ひどく炎症した組織の病理を連想させる病理を示した。MG1363 (pT1MIL10) で処置したマウスは、正常組織像のほぼ完全な回復を示し、粘膜における炎症性リンパ球のごく僅かの残留物を明らかにした。MG1363 [pT1TR5AH] で処置したマウスは、中程度の病理を示した。

【0051】

図7は、記載したL.lactic菌株で処置した後に各マウスから得た組織学的スコアの統計学的評価を示す (群サイズ=10)。スコアは、記載したように遠位結腸のスライドのブラインド観察後に記録した (Kojouharoff et al., 1997)。各マウスを、結腸の外周上の等間隔の3個の縦方向のスライドによって判断した。リンパ様浸潤及び上皮損傷の両者を、0~4点に評価し、そして両パラメーターの値を全マウスについて合計した。正常ブランクマウスは、1ポイントの組織学的スコアを示した。大腸炎を誘導したマウスは、5ポイントを僅かに超えた。L. lactisに対する全コントロール群は、場合によりいくつかの群では僅かに高い傾向でもって、この数字周辺を変動した。しかし、mIL-10産生性L. lactisで14日間処置し、続いて14日間回復させたマウスは、平均で約3ポイントを示した。これは、無処理群とブランクコントロール群との間の差に対して測定したときの病理のほぼ50%の減少である。この減少は、有意である ($p=0.0151$)。

【0052】

実施例3

用いた培養条件のために、mIL-10の微量 (40ng) が、接種懸濁液の上清中に存在した。このIL-10が組織学的スコアの認められた減少を引き起こしたかどうかを研究するために、我々は、UVで殺したIL-10産生株を用いる処置を包含した。この培養を、接種の直前にUV照射した。図8は、照射が細菌の生存度を 10^6 cfu中1個未満に減少させ、更なるIL-10の蓄積は全く認められなかった。これはOD₆₀₀における低下が全くなく、そしてIL-10前駆物質が培養上清中に全く検出されなかったことから、細胞溶解とは関連がない。照射は、IL-10生理活性に影響しなかった。UVで殺した培養で2又は4週間処置した罹患したマウスは、全腸炎陽性である任意のコントロール群と比べたとき、結腸組織像の差は全く示さなかった。接種培地中の残留IL-10の運命は、胃及び十二指腸内での変性及び分解と思われる。前のpH1.5である胃の酸性度は、接種直後pH6に上昇した。5分間後pHが4に達し、更に接種後30及び60分間の間の間隔で3.5~2.5に低下した。接種後5分間の胃内で検出されたIL-10は、その濃度が急速に減少し、そして接種後30分間で十二指腸内で痕跡量しか見出されなかった。より遅い時点では、ここ又は空腸若しくは回腸においても全く検出されなかった。

【0053】

実施例4

1時間の間隔に関する、MG1363 (pT1MIL10) の $3.4 \cdot 10^9$ cfuの7系列の接種を129Sv/Ev IL-10-/-マウスに与えた。腸を最後の接種の3

10

20

30

40

50

0 分間後に調製し、次いで形態的区画に分けた。直ちに、祖々期をPBSとBSA及び0.05%Na₃N₃中でホモジナイズした。MG1363 (pT1MIL10) の測定したcfuは、胃内で $7 \cdot 10^6$ 、十二指腸内で $2.6 \cdot 10^8$ 、空腸内で $2.8 \cdot 10^7$ 、回腸内で $4 \cdot 10^8$ 、盲腸内で $8.4 \cdot 10^8$ 、及び結腸内で $7 \cdot 10^8$ であった。われわれは結腸ホモジネート中で可溶性IL-10の70ngを検出した。上流区画は、あらゆるIL-10含有物を全く示さなかった。したがって、リコンビナントL.latisは結腸内でIL-10を活性的に産生することができると結論される。

【0054】

実施例5

IL10-ノーマウス中の全腸炎の予防

10

上記方法の129Sv/Ev IL10-ノーマウスにおける大腸炎の発生を要望する能力をテストした。このマウスは、3～8週齢の枠内で全身性全腸炎を自然発生する (Kuhn et al., Cell, 1993;75:263-274)。炎症性の変化は、3週齢の突然変異体の盲腸、上行結腸及び横行結腸で最初に現れた。老化IL10-ノーマウスにおける進行性疾患は、中程度の上皮性過形成と杯細胞の僅かなムチン欠乏を伴う単核細胞及び好中球からなる多巢性の炎症性細胞浸潤の増加した数によって特徴づけられる。小上皮性侵食及び陰窩膿瘍が、時々存在し、炎症がまれに粘膜下組織に生じた。我々の研究に用いたIL10-ノーマウスは、我々の動物施設の「コンベンショナル」条件よりもむしろ「クリーン」条件のために、記載したようにより軽い重篤炎症が見られた。

このマウスを抗IFN γ 又は抗IL-12のいずれかで第3週から6～8週間処置したとき、大腸炎を予防することができた (Rennick et al., J-Leukoc-Biol., 1997 Apr; 61(4):389-396)。我々は、IL-10産生性L.lactisで毎日胃内接種によって3週齢マウスを処置した。マウスを対数期中期又は対数期末期のいずれかの培養で4週間処置し、無処置群は、同条件下の状態にしておいた。図7は、盲腸を検査しなかったことを除いて、記載したとおりに得られた組織学的スコアを示す (Berg et al., J-Clin-Invest; 1996, Aug 15;98(4):1010-1020)。無処理マウスは、平均約4.5ポイントの組織学的スコアを示した。これは、この値における盲腸スコアの分布及び僅かな年齢差を考慮すれば、報告されたデータとよく一致する。MG1363 (pT1MIL10) は、3週齢マウスについて報告されている値を僅かに超えるだけである、平均1.5ポイントの組織学的スコアを示した (Berg et al., J-Clin-Invest; 1996, Aug 15;98(4):1010-1020)。0～4ポイントに及ぶ3個の値の合計であることから、極めて低いスコアと考えられる。このデータから、大腸炎の発生は、この処置によって予防することができることは明らかである。

20

30

【0055】

【表1】

参考文献

Wells J.M., & Schofield, K.M. Cloning and expression vectors for lactococci From: Lactic Acid Bacteria (eds Bozoglu B., and Ray, B.) NATO ASI Series H 98: 37-63 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1996).

Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D.N., Andus, T., Scholmerich, J., Gross, V. & Falk, W. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. Clin. Exp. Immunol. 107, 353 - 358, 1997.

10

Van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M. and Simons, G. Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. Gene 95, 155-160 (1990).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis T. Molecular cloning-a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1990).

20

Wells, J.M., Wilson, P.W., and Le Page, R.W.F. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. J. Appl. Bacteriol. 74, 629-636 (1993).

Schlaak, J.F., Schmitt, E., Huls, C., Meyer zum Buschenfelde, K.H. & Fleischer, B. A sensitive and specific bioassay for the detection of human interleukin-10. J. Immunol. Methods 168, 49-54, 1994.

30

Thompson-Snipes, L., Dhar, V., Bond, M.W., Mosmann, T.R., Moore, K.W. & Rennick, DM Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. J. Exp. Med. 173, 507-10, 1991.

Ho, A., S., Y., Liu, Y., Khan, T., A., Hsu, D., H., Bazan, J., F. & Moore, K., W. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(23): 11267-11271 (1993)

40

【 0 0 5 6 】

【表 2】

Liu, Y., Wei, S., H., Y., Ho, A., S., Y., De Waal-Malefyt, R. & Moore, K., W.
Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *Journal of Immunology* 152(4): 1821-1829 (1994)

Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J-Exp-Med.* 170, 2081-95, 1989.

10

Waterfield, N.R. et al., The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Gene*, 165, 9-15 (1995).

Baer, R. et al., DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 130, 207-211 (1984).

【図面の簡単な説明】

20

【図1a】 図1は、用いたプラスミドの概要である。図1aは、用いたプラスミドの該略図である。P1は、Waterfield et al, (1995)のとおりのラクトコッカスのP1プロモーターであり、usp45Sは、ラクトコッカスのUsp45の分泌シグナルペプチドをコードするDNAフラグメントであり (van Asseldonck et al, 1990)、m1110は、マウスインターロイキン10の成熟部分をコードするDNAフラグメントであり、tr55は、1型TNFレセプターの成熟部分をコードするDNAであり、H6は、6ヒスチジン残基をコードするフラグメントであり、EM^rは、エリスロマイシン選択マーカである。

【図1b】 pTREX及びpT1NXのDNA配列である。

【図1c】 pT1MIL10及びpT1TR5AHのDNA配列である。

30

【図2】 イムノブロット後の表示菌株の培養上清SDS-PAGE後のタンパク質プロファイル、抗マウスインターロイキン10（パネルA）、又は抗マウス1型TNFレセプター及び抗6His（パネルB）抗血清を示す。

【図3】 a) 慢性大腸炎をDSSで誘導した、b) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pTREX1株を経口で投与した、c) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1TR5AH株を経口で投与した、及びd) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1MIL10株を経口で投与した、マウスの群の結腸長の平均。

【図4】 a) 慢性大腸炎をDSSで誘導した、b) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pTREX1株を経口で投与した、c) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1TR5AH株を経口で投与した、及びd) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1MIL10株を経口で投与した、マウスの群の末端結腸における上皮損傷スコアの平均。

40

【図5】 a) 慢性大腸炎をDSSで誘導した、b) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pTREX1株を経口で投与した、c) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1TR5AH株を経口で投与した、及びd) 慢性大腸炎をDSSで誘導し、次にL. lactisのMG1363 pT1MIL10株を経口で投与した、マウスの群の末端結腸における炎症性浸潤の平均。

【図6】 ヘマトキシリン及びエオシンで染色したマウス末端結腸の代表的切片。

正常組織：無処理動物

50

D S S大腸炎：慢性大腸炎をもたらすためD S Sで前処置した動物

D S S大腸炎、MG1 3 6 3 p T 1 M I L 1 0処置：慢性大腸炎をもたらすためD S Sで前処置し、続いてL. lactis菌株MG1 3 6 3 p T 1 M I L 1 0を経口投与した動物。D S S大腸炎、MG1 3 6 3 p T R E X 1処置：慢性大腸炎をもたらすためD S Sで前処置し、続いてL. lactis菌株MG1 3 6 3 p T R E X 1を経口投与した動物。

【図7】 組織像の統計学的評価。結腸切片を無作為に番号付けし、ブラインドで判断した。次に、個々のマウスのスコアをデコードし、そして再編した数を統計学的に解析した。D S S大腸炎パネルは、ブランクマウス、及び無処置又はL. lactis培養で処置したかのいずれかの慢性大腸炎をもたらすために誘導したマウスを示す。スコアは、共に0～4の範囲である、上皮損傷及びリンパ様浸潤のスコアの合計である。別のマウスの群（n = 10）は、2週間（= 2w）又は4週間（= 4w）、MG1 3 6 3、MG1 3 6 3（p T R E X 1）又はMG1 3 6 3（p T 1 M I L 1 0）（= I L - 1 0）で処置した。いくつかの培養を 10^6 倍生存度を減少させるために摂取の前に紫外線を照射した（+uv）。I L - 1 0 - / - 大腸炎パネルは、無処理、T R E X 処置及びI L - 1 0 処置の雌129 S v / E v I L - 1 0 - / - マウスの7週齢の群（n = 5）の組織学的合計値を示す。組織化学的スコアは、全て0～4の範囲である、近位、中間、遠位結腸の炎症度の合計。誤差バーは、標準誤差（s.e.m.）を表す。

10

【図8】 OD_{600} で測定した照射後の代表的細菌生存度。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOL

<120> USE OF CYTOKINE-PRODUCING LACTOCOCCUS STRAIN TO TREAT
COLITIS

<130> V1/002-V023

<140>

<141>

<150> 98203529.7

<151> 1998-10-20

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer used
for obtaining the plasmid pT1MIL10

<400> 1

cagtacagcc gggaagacaa t

21

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer used
for obtaining the plasmid pT1MIL10

<400> 2

gcactagtta gcttttcatt ttgat

25

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

10

20

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer used
for obtaining the plasmid pT1TR5AH

<400> 3

ctgggtccctt ctcttggtga c 21

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer used
for obtaining the plasmid pT1TR5AH

<400> 4

ccactagtct attaatgatg atgatgatga tgcgcagtac ctgagtcctg ggg 53

<210> 5

<211> 5230

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid pTREX1

<400> 5

gaattcgatt aagtcattctt acctctttta ttagttttttt cttataatct aatgataaca 60
tttttataat taatctataa accatatccc tctttggaat caaaatttat tatctactcc 120
tttgtagata tgttataata caagtatcag atctgggaga ccacaacggt ttcccactag 180
aaataattttt gtttaactttt agaaaggaga tatacgcatg caggatatct ctagaatgga 240
tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata 300
actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg 360
aactatatcc ggatgacctg caggcaagct ctagaatcga tacgattttg aagtggcacc 420
agataaaaaa aagcagttta aaattgttgc tgaactttta aaacaagcaa atacaatcat 480
tgtcgcaaca gatagcgaca gagaaggcga aaacattgcc tggtcgatca ttcataaagc 540
aaatgccctt tctaaagata aaacgtataa aagactatgg atcaatagtt tagaaaaaga 600
tgtgatccgt agcggttttc aaaatttgca accaggaatg aattactatc ccttttatca 660
agaagcgcaa aagaaaaacg aaatgatca ccaatcagtg caaaaaaaga tataatggga 720
gataagacgg ttcgtgttcg tgcctgacttg caccatatca taaaaatcga aacagcaaaag 780
aatggcgga aagtaaaaga agttatggaa ataagactta gaagcaaaact taagagtgtg 840
ttgatagtgc agtatcttaa aattttgtat aataggaatt gaagttaaatt tagatgctaa 900
aaatttgtaa ttaagaagga gtgattacat gaacaaaaat ataaaatatt ctcaaaaactt 960

10

20

30

40

ttttaacgagt gaaaaagtac tcaaccaaatt aataaaacaa ttgaatttaa aagaaaccga 1020
 taccgttttac gaaattggaa caggtaaagg gcattttaacg acgaaactgg ctaaaaataag 1080
 taaacaggta acgtctattg aattagacag tcatctattc aacttatcgt cagaaaaatt 1140
 aaaactgaat actcgtgtca ctittaattca ccaagatatt ctacagtttc aattccctaa 1200
 caaacagagg tataaaattg ttgggagtat tccctaccat ttaagcacac aaattattaa 1260
 aaaagtgggt tttgaaagcc atgcgtctga catctatctg attgttgaag aaggattcta 1320
 caagcgtacc ttggatattc accgaacact agggttgctc ttgcacactc aagtctcgat 1380
 tcagcaattg cttaagctgc cagcggatg ctttcacctc aaaccaaaag taaacagtgt 1440
 cttaataaaa cttaaccgcc ataccacaga tgttcagat aaatatgga agctatatac 1500
 gtactttgtt tcaaaatggg tcaatcgaga atatcgtcaa ctgtttacta aaaatcagtt 1560
 tcatcaagca atgaaacacg ccaaagtaaa caatttaagt accgttactt atgagcaagt 1620
 attgtctatt tttaatagtt atctattatt taacgggagg aaataattct atgagtcgct 1680
 tttgtaaatt tggaaaagta cacgttacta aagggaatgt agataaatta ttaggatatac 1740
 tactgacagc ttccaaggag cttaaagggt ccttagcgtt cttatcatgg ggaagctcgg 1800
 atcatatgca agacaaaata aactcgcac acgacttgga gaaatgggac gaatcgagaa 1860
 aacctctctt acgctggatt acatatctaa taaagccgta aggagacggg ttcaaaaagg 1920
 tttaaataaa ggagaagcaa tcaatgcatt agctagaact atattttttg gacaacgtgg 1980
 agaatttaga gaacgtgctc tccaagacca gttacaaaga gctagtgcac taaacataat 2040
 tattaacgct ataagtgtgt ggaacactgt atatatgga aaagccgtag aagaattaaa 2100
 agcaagagga gaatttagag aagatttaat gccatatgag tggccgttag gatgggaaca 2160
 tatcaatttt cttggagaat acaaaattga aggattacat gacactgggc aaatgaattt 2220
 acgtccttta cgtataaaaag agccgtttta ttcttaatat aacggctctt tttatagaaa 2280
 aaatccttag cgtggttttt ttccgaaatg ctggcgggtac cccaagaatt agaaatgagt 2340
 agatcaaatt attcacgaat agaatcagga aaatcagatc caaccataaa aacactagaa 2400
 caaattgcaa agttaactaa ctcaacgcta gtagtggtt taatcccaaa tgagccaaca 2460
 gaaccagagc cagaacacaga atcagaacaa gtaacattgg atttagaaat ggaagaagaa 2520
 aaaagcaatg acttcgtgtg aataatgcac gaaatcgtt cttatttttt tttaaaagcg 2580
 gtatactaga tataacgaaa caacgaactg aatagaaaag aaaaaagagc catgacacat 2640
 ttataaaatg tttgacgaca ttttataaat gcatagcccg ataagattgc caaaccaacg 2700
 cttatcagtt agtcagatga actcttccct cgtaagaagt tatttaatta actttgtttg 2760
 aagacggtat ataaccgtac tatcattata tagggaaatc agagagtttt caagtatcta 2820
 agctactgaa tttaaagatt gttaagcaat caatcgaaa tcgtttgatt gctttttttg 2880
 tattcattta tagaagggtg agtttgtatg aatcatgatg aatgtaaaac ttatataaaa 2940
 aatagtttat tggagataag aaaattagca aatatctata cactagaaac gtttaagaaa 3000
 gagttagaaa agagaaatat ctacttagaa acaaaatcag ataagtattt ttcttcggag 3060
 ggggaagatt atatatataa gttaatagaa aataacaaaa taatttattc gattagtggg 3120
 aaaaaattga cttataaagg aaaaaaatct ttttcaaac atgcaatatt gaaacagttg 3180
 aatgaaaaag caaaccaagt taattaaaca acctatttta taggatttat aggaaaggag 3240
 aacagctgaa tgaatatccc ttttgttgta gaaactgtgc ttcatgacgg cttgttaaag 3300
 tacaatttta aaaaatagtaa aattcgtcca atcaactacca agccaggtaa aagcaaaggg 3360
 gctatttttg cgtatcgtc aaaatcaagc atgattggcg gtcgtgggtg tgttctgact 3420
 tccgagggaag cgattcaaga aaatcaagat acatttacac attggacacc caacgtttat 3480
 cgttatggaa cgtatgcaga cgaaaaccgt tcatacacga aaggacattc tgaaaacaat 3540
 ttaagacaaa tcaatacctt ctttattgat ttgatattc acacggcaaa agaaactatt 3600
 tcagcaagcg atattttaac aaccgtatt gatthaggtt ttatgectac tatgattatc 3660
 aaatctgata aagggttatca agcatatttt gtttagaaa cgcagttcta tgtgacttca 3720
 aaatcagaat ttaaatctgt caaagcagcc aaaataattt cgcaaatat ccgagaatat 3780
 tttggaaggt ctttgccagt tgatctaacg tgtaatcatt ttggtattgc tcgcatacca 3840

10

20

30

40

```

agaacggaca atgtagaatt ttttgatcct aattaccgtt attctttcaa agaattggcaa 3900
gatttggctct tcaaacaaac agataataag ggctttactc gttcaagtct aacggtttta 3960
agcggtagacag aaggcaaaaa acaagtagat gaaccctggt ttaatctctt attgcacgaa 4020
acgaaattttt caggagaaaa ggggtttaata gggcgtaata acgtcatgtt taccctctct 4080
ttagccctact ttagttcagg ctattcaatc gaaacgtgcg aatataatat gtttgagttt 4140
aataatcgat tagatcaacc cttagaagaa aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgcc 4200
tattcagaaa actatcaagg ggctaataag gaatacatta ccattctttg caaagcttgg 4260
gtatcaagtg atttaaccag taaagattta ttgtccgtc aagggtggtt taaattcaag 4320
aaaaaaagaa gcgaacgtca acgtgttcat ttgtcagaat ggaagaaga tttaatggct 4380
tatatttagcg aaaaaagcga tgtatacaag ccttatttag tgacgaccaa aaagagatt 4440
agagaagtgc taggcattcc tgaacggaca ttagataaat tgctgaagg actgaaggcg 4500
aatcaggaaa ttttcttta gattaaacca ggaagaaatg gtggcattca acttgctagt 4560
gttaaattcat tgttgctatc gatcattaaa gtaaaaaaag aagaaaaaga aagctatata 4620
aaggcgctga caaattcttt tgacttagag catacattca ttaagagac tttaaacaag 4680
ctagcagaac gccctaaaac ggacacacaa ctcgatttgt ttagctatga tacaggctga 4740
aaataaaacc cgcactatgc cattacattt atatctatga tacgtgtttg tttttcttt 4800
gctgttttagc gaattgattag cagaaatata cagagtaaga ttttaattaa ttattagggg 4860
gagaaggaga gagtagcccg aaaactttta gtggccttgg actgaacgaa gtgagggaaa 4920
ggctactaaa acgtcgaggg gcagtgagag cgaagcgaa acttgatttt ttaattttct 4980
atcttttata ggtcattaga gtatacttat ttgtcctata aactatttag cagcataata 5040
gattttattga ataggtcatt taagttgagc atattagagg aggaaaatct tggagaaata 5100
tttgaagaac ccgattacat ggattggatt agttcttctg gttacgtggt ttttaactaa 5160
aagtagtgaa tttttgattt ttggtgtgtg tgtcttcttg ttagtatttg ctagtcaaag 5220
tgattaaata                                     5230

```

10

20

<210> 6

<211> 5906

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid pTlNX

<400> 6

```

gaattcgatt aagtcattctt acctctttta ttagtttttt cttataatct aatgataaca 60
tttttataat taatctataa accatatccc tcttttgaat caaaatttat tatctactcc 120
ttttagataa ttttataata caagtatcag atctgggaga ccacaacggg tttccactag 180
aaataatttt gtttaacttt agaaaggaga tatacgcatg aaaaaaaga ttatctcagc 240
tatttttaatg tctacagtca tactttctgc tgcagcccg ttgtcaggtg tttacgccgg 300
cgacggatcc aaaaaggagaa gacaataaca agcctggcaa agaagacaat aacaagcctg 360
gcaaaagaaga caataacaa cctggcaaa aagacaacaa caagcctggc aaagaagaca 420
acaacaagcc tggtaaagaa gacaacaaca agcctggcaa agaagacggc aacaagcctg 480
gtaaaagaaga caacaaaaaa cctggtaaag aagatggcaa caagcctggc aaagaagaca 540
acaaaaaac tggtaaagaa gacggcaaca agcctggcaa agaagatggc aacaaacctg 600
gtaaaagaaga tggtaacgga gtacatgtcg ttaaacctgg tgatacagta aatgacattg 660
caaaagcaaa cggcactact gctgacaaaa ttgctgcaga taacaaatta gctgataaaa 720
acatgatcaa accttggtcaa gaacttgttg ttgataagaa gcaaccagca aaccatgcag 780

```

30

40

atgctaacaa agctcaagca ttaccagaaa ctggcgaaga aaatccattc atcgggtacaa 840
 ctgtattttg tggattatca ttagccttag gtgcagcgtt attagctgga cgtcgtcgcg 900
 aactataact agtagatccg gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggtgctg 960
 ccacgcgtga gcaataacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 1020
 ttttgctgaa aggaggaact atatccggat gacctgcagg caagctctag aatcgatacg 1080
 attttgaagt ggcaacagat aaaaaaagc agttttaaatt tgttgctgaa cttttaaaac 1140
 aagcaaatac aatcattgtc gcaacagata gcgacagaga aggcgaaaac attgcctggt 1200
 cgatcattca taaagcaaat gcccttttcta aagataaaac gtataaaaga ctatggatca 1260
 atagttttaga aaaagatgtg atccgtagcg gttttcaaaa ttgcaacca ggaatgaatt 1320
 actatccctt ttatcaagaa gcgcaaaaga aaaacgaaat gatacaccaa tcagtgcaaa 1380
 aaaagatata atgggagata agacggttcg tgttcgtgct gacttgcacc atatcataaa 1440
 aatcgaaaca gcaagaatg gcggaacgt aaaagaagt atggaaataa gacttagaag 1500
 caaacttaag agtgtgttga tagtgcagta tctttaaatt ttgtataata ggaattgaag 1560
 ttaaatlaga tgctaaaaat ttgtaattaa gaaggagtga ttacatgaac aaaaatataa 1620
 aatattctca aaacttttta acgagtgaat aagtaactca ccaaataata aaacaattga 1680
 atttaaaaga aaccgatacc gttttacgaa ttggaacagg taaagggcat ttaacgacga 1740
 aactggctaa aataagtaaa caggtaacgt ctattgaatt agacagtcac ctattcaact 1800
 tatcgtcaga aaaattaaaa ctgaatactc gtgtcacttt aattcaccaa gatattctac 1860
 agtttcaatt ccctaacaaa cagaggtata aaattgttgg gagtattcct taccatttaa 1920
 gcacacaaat tattaaaaaa gtggtttttg aaagccatgc gtctgacatc tatctgattg 1980
 ttgaagaagg attctacaag cgtaccttgg atattcaccg aacactaggg ttgctcttgc 2040
 acactcaagt ctgattcag caattgctta agctgccagc ggaatgcttt catcctaaac 2100
 caaaagtaaa cagtgtctta ataaaactta cccgccatac cacagatgtt ccagataaat 2160
 attggaagct atatacgtac tttgtttcaa aatgggtcaa tcgagaatat cgtcaactgt 2220
 ttactaaaaa tcagtttcat caagcaatga aacacgcaa agtaaacaa ttaagtaccg 2280
 ttacttatga gcaagtattg tctattttta atagttatct attatttaac gggaggaaat 2340
 aattctatga gtgcgttttg taaatttggg aagttacacg ttactaaagg gaatgtagat 2400
 aaattattag gtatactact gacagcttcc aaggagctaa agaggtccct agcgtcttta 2460
 tcatggggaa gctcggatca tatgcaagac aaaataaact cgcaacagca cttggagaaa 2520
 tgggacgaat cgagaaaacc ctctttacgc tggattacat atctaataaa gccgtaagga 2580
 gacgggttca aaaaggttta aataaaggag aagcaatcaa tgcattagct agaactatat 2640
 tttttggaca acgtggagaa tttagagaac gtgctctcca agaccagtta caaagagcta 2700
 gtgcactaaa cataattatt aacgctataa gtgtgtggaa cactgtatat atggaaaaag 2760
 ccgtagaaga attaaaagca agaggagaat ttagagaaga ttaaatgcca tatgcgtggc 2820
 cgttaggatg ggaacatatc aattttcttg gagaatacaa atttgaagga ttacatgaca 2880
 ctggggcaaat gaatttacgt cctttacgta taaaagagcc gttttattct taatataaac 2940
 gctcttttta tagaaaaaat ccttagcgtg gtttttttcc gaaatgctgg cggtaaccca 3000
 agaattagaa atgagtagat caaattattc acgaatagaa tcaggaaaat cagatccaac 3060
 cataaaaaa ctagaacaaa ttgcaaggtt aactaactca acgctagtag tggatttaatt 3120
 ccaaatgag ccaacagaa cagagccaga aacagaatca gaacaagtaa cattggattt 3180
 agaaatggaa gaagaaaaaa gcaatgactt cgtgtgaata atgcacgaaa tcgttgctta 3240
 ttttttttta aaagcgggtat actagatata acgaaacaac gaactgaata gaaacgaaaa 3300
 aagagccatg acacatttat aaaatgtttg acgacatttt ataaatgcat agcccgataa 3360
 gattgccaaa ccaacgctta tcagttagtc agatgaactc ttccctcgta agaagttatt 3420
 taattaactt tgtttgaaga cggatatata ccgtactatc attatatagg gaaatcagag 3480
 agttttcaag tatctaagct actgaattta agaattgtta agcaatcaat cggaatcgt 3540
 ttgattgctt tttttgtatt catttataga aggtggagtt tgtatgaatc atgatgaatg 3600
 taaaacttat ataaaaata gtttatttga gatagaaaa ttagcaataa tctatacact 3660

10

20

30

40

```

agaaacgttt aaagaaagagt tagaaaagag aaatatctac ttagaaacaa aatcagataa 3720
gtatttttct tcggagggggg aagattatat atataagtta atagaaaata acaaaataat 3780
ttattcgatt agtggaaaaa aattgactta taaaggaaaa aaatcttttt caaaacatgc 3840
aatattgaaa cagttgaatg aaaaagcaaa ccaagttaat taaaccaacct attttatagg 3900
attttatagga aaggagaaca gctgaatgaa tatccctttt gttgtagaaa ctgtgcttca 3960
tgacggcttg ttaaagtaca aatttaaaaa tagtaaaatt cgctcaatca ctaccaagcc 4020
aggtaaaagc aaaggggcta tttttgcgta tcgctcaaaa tcaagcatga ttggcggtcg 4080
tggtgttgtt ctgacttccg aggaagcgat tcaagaaaat caagatacat ttacacattg 4140
gacacccaac gtttatcggt atggaacgta tgcagacgaa aaccgttcat acacgaaagg 4200
acattctgaa aacaatttaa gacaaatcaa taacctcttt attgattttg atattcacac 4260
ggcaaaagaa actatttcag caagcgatat ttaacaacc gctattgatt taggttttat 4320
gcctactatg attatcaaat ctgataaagg ttaacaagca tattttgttt tagaaacgcc 4380
agtctatgtg acttcaaaat cagaatttaa atctgtcaaa gcagccaaaa taatttcgca 4440
aaatatccga gaatatlttt gaaagtcttt gccagttgat ctaacgtgta atcatttttg 4500
tatgtctcgc ataccaagaa cggacaatgt agaatttttt gatcctaatt accgttattc 4560
tttcaaagaa tggcaagatt ggtctttcaa acaaacagat aataagggct ttactcggtc 4620
aagtctaacy gttttaagcg gtacagaagg caaaaaacaa gtagatgaac cctgggttaa 4680
tctcttattg cacgaaacga aattttcagg agaaaagggt ttaatagggc gtaataacgt 4740
catgtttacc ctctctttag cctactttag ttcaggctat tcaatcgaaa cgtgcgaata 4800
taatattgtt gagtttaata atcgattaga tcaaccctta gaagaaaaag aagtaatcaa 4860
aattgttaga agtgcttatt cagaactact tcaaggggct aataggggat acattaccat 4920
tctttgcaaa gcttgggtat caagtgattt aaccagtaaa gattttattg tccgtcaagg 4980
gtgggttttaa ttcaagaaaa aaagaagcga acgtcaacgt gttcattttg cagaatggaa 5040
agaagattta atggccttata ttagcgaaaa aagcgatgta tacaagcctt atttagtgac 5100
gacaaaaaaa gagattagag aagtgcctag cattcctgaa cggacattag ataaattgct 5160
gaaggctactg aaggcgaatc aggaattttt ctttaagatt aaaccaggaa gaaatgggtg 5220
cattcaactt gctagtgtta aatcattgtt gctatcgatc attaaagtaa aaaaagaaga 5280
aaaagaaagc tatataaagg cgctgacaaa ttcttttgac ttagagcata cattcattca 5340
agagacttta aacaagctag cagaacgccc taaaacggac acacaactcg atttgtttag 5400
ctatgatata ggctgaaaat aaaaccgca ctatgccatt acattttatat ctatgatagc 5460
tgtttgtttt ttctttgctg ttttagcgaat gattagcaga aatatacaga gtaagatttt 5520
aattaattat tagggggaga aggagagagt agcccgaaaa cltttagttg gcttggactg 5580
aacgaagtga gggaaaggct actaaaacgt cgaggggcag tgagagcgaa gcgaacactt 5640
gattttttta tttctatctt tttataggtc attagagtat acttattttg cctataaaact 5700
atttagcagc ataatagatt tattgaatag gtcatttaag ttgagcata tagaggagga 5760
aaatcttgga gaaatatatt aagaaccoga ttacatggat tggattagtt cttgtgggtta 5820
cgtgggtttt aactaaaagt agtgaatttt tgatttttgg tgtgtgtgtc ttgttggttag 5880
tatttgctag tcaaagtgat taaata 5906

```

10

20

30

<210> 7

<211> 5770

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid

pT1MIL10

40

<400> 7

```

gaattcgatt aagtcattctt acctctttta ttagttttttt cttataatct aatgataaca 60
tttttataat taatctataa accatatccc tctttggaat caaaatttat tatctactcc 120
tttgtagata tgttataata caagtatcag atctgggaga ccacaacggt ttcccactag 180
aaataatttt gttaactttt agaaaggaga tatacgcatg aaaaaaaga ttatctcagc 240
tatttttaatg tctacagtca tactttctgc tgcagcccg ttgtcaggtg ttacgccc 300
gtacagcccg gaagacaata actgcacca cttcccagtc gccagagcc acatgctcct 360
agagctgcgg actgccttca gccaggtgaa gaetttcttt caaacaagg accagctgga 420
caacatactg ctaaccgact ccttaatgca ggactttaag ggttacttgg gttgccaagc 480
cttatcgaa atgalecagt ttacctggt agaagtgatg cccagggcag agaagcatgg 540
cccagaaatc aaggagcatt tgaattccct ggttgagaag ctgaagacc tcaggatgcg 600
gctgaggcgc tgtatcgat ttctccctg tgaaaaaag agcaaggcag tggagcaggt 660
gaagagtgat tttaataagc tccaagacca aggtgtctac aaggccatga atgaatttga 720
catcttctc aactgcatag aagcatatcat gatgatcaaa atgaaaagct aactagtaga 780
tccggtcgtc acaaaagccc gaaagggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata 840
actagcataa ccccttgagg cctctaaccg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg 900
aactatatcc ggatgacctg caggcaagct ctagaatcga tacgattttg aagtggcaac 960
agataaaaaa aagcagttta aaattgttgc tgaacttlla aaacaagcaa atacaatcat 1020
tgtcgcaaca gatacgacga gagaaggcga aaacattgcc tggtcgatca ttcataaagc 1080
aaatgccttt tctaagata aaacgtataa aagactatgg atcaatagtt tagaaaaaga 1140
tgtgatccgt agcggttttc aaaatttgca accaggaatg aattactatc ctttttatca 1200
agaagcgcaa aagaaaaacg aatgatata ccaatcagtg caaaaaaaga tataatggga 1260
gataagacgg ttctgtttcg tgcgtacttg caccatatca taaaaatcga aacagcaaa 1320
aatggcgga acgtaaaaaga agttatggaa ataagactta gaagcaaaat taagagtgtg 1380
ttgatagtgc agtatcttaa aattttgtat aataggaatt gaagttaa atagatgctaa 1440
aaattttgaa ttaagaagga gtgattacat gaacaaaaat ataaaatatt ctcaaaactt 1500
tttaacaggt gaaaaagtac tcaacaaat aataaaaaca ttgaatttaa aagaaccga 1560
tacogtttac gaaattggaa caggtaaaag gcatttaacg acgaaactgg ctaaaaata 1620
taaacaggta acgtctattg aattagacag tcatctattc aacttatcgt cagaaaaatt 1680
aaaactgaat actcgtgtca ctttaattca ccaagatatt ctacagtttc aattccctaa 1740
caaacagagg tataaaattg ttgggagtat tccctaccat ttaagcacac aaattattaa 1800
aaaagtgggt tttgaaagcc atgcgtctga catctatctg attgttgaag aaggattcta 1860
caagcgtacc ttgatattc accgaacact aggggttgc ttcacactc aagtctcgat 1920
tcagcaattg cttaaagctgc cagcggaatg ctttcatcct aaacaaaaag taaacagtgt 1980
cttaataaaa cttaccgcc ataccacaga tgttccagat aaatattgga agctatatac 2040
gtactttgtt tcaaaatggg tcaatcgaga atatcgtaa ctgtttacta aaaaatcagtt 2100
tcatcaagca atgaaacacg ccaaagtaaa caatttaagt accgttactt atgagcaagt 2160
attgtctatt tctaatagtt atctattatt taacgggagg aaataattct atgagtcgct 2220
tttgtaaaat tggaaagtta cacgttacta aagggaatgt agataaatta ttagggtatac 2280
tactgacagc ttccaaggag cttaaagggt ccctagcgt cttatcatgg ggaagctcgg 2340
atcatatgca agacaaaata aactcgcaac agcacttgga gaaatgggac gaatcgagaa 2400
aaccctcttt acgttggtt acatatctaa taaagccgta aggagacggg ttcaaaaagg 2460
tttaataaaa ggagaagcaa tcaatgcatt agctagaact atattttttg gacaacgtgg 2520
agaattttaga gaacgtgctc tccaagacca gtacaaaaga gctagtgcac taaacataat 2580
tattaacgct ataagtgtgt ggaacactgt atatatgaa aaagccgtag aagaattaaa 2640
agcaagagga gaatttagag aagatttaat gccatatgcg tggccgttag gatgggaaca 2700
tatcaatttt cttggagaat acaaatttga aggattacat gacactgggc aaatgaattt 2760

```

10

20

30

acgtccttta cgtataaaaag agccggtttta ttcttaatat aacggctctt tttatagaaa 2820
 aaatccttag cgtgggttttt ttccgaaatg ctggcggtac cccaagaatt agaaatgagt 2880
 agatcaaatt attcacgaat agaatcagga aaatcagatc caaccataaa aacactagaa 2940
 caaattgcaa agttaactaa ctcaacgcta gtagtggtt taatcccaaa tgagccaaca 3000
 gaaccagagc cagaaacaga atcagaacaa gtaacattgg atttagaaat ggaagaagaa 3060
 aaaagcaatg acttcgtgtg aataatgcac gaaatcgttg cttatttttt tttaaaagcg 3120
 gtatactaga tataacgaaa caacgaactg aatagaaacg aaaaaagagc catgacacat 3180
 ttataaaatg tttgacgaca ttttataaat gcatagcccg ataagattgc caaaccaacg 3240
 cttatcagtt agtcagatga actcttcctt cgtaagaagt tatttaatta actttgtttg 3300
 aagacggtat ataacogtac tatcattata tagggaaatc agagagtttt caagtatcta 3360
 agctactgaa ttttaagaatt gttaagcaat caatcggaaa tcgttttgatt gctttttttg 3420
 tattcattta tagaagggtg agtttgatg aatcatgatg aatgtaaaac ttatataaaa 3480
 aatagtttat tggagataag aaaattagca aatatctata cactagaaac gtttaagaaa 3540
 gagttagaaa agagaaatat ctacttagaa acaaaatcag ataagtattt ttcttcggag 3600
 ggggaagatt atatatataa gttaatagaa aataacaaaa taattttattc gattagtggg 3660
 aaaaaattga cttataaagg aaaaaaatct ttttcaaaac atgcaatatt gaaacagttg 3720
 aatgaaaaag caaaccaagt taattaacaa acctatttta taggatttat aggaaaggag 3780
 aacagctgaa tgaatatccc ttttgttgta gaaactgtgc ttcattgacgg cttgttaaag 3840
 taaaaattta aaaaatagtaa aattcgtctc atcactacca agccaggtaa aagcaaaggg 3900
 gctatttttg cgtatcgctc aaaatcaagc atgattggcg gtcgtgggtg tgtctgact 3960
 tccgaggaag cgattcaaga aaatcaagat acatttacac attggacacc caacgtttat 4020
 cgttatggaa cgtatgcaga cgaaaaccgt tcatacacga aaggacattc tgaaaacaat 4080
 ttaagacaaa tcaatacctt ctttattgat ttgtatattc acacggcaaa agaaactatt 4140
 tcagcaagcg atattttaac aaccgctatt gatttaggtt ttatgcctac tatgattatc 4200
 aaatctgata aaggttatca agcatatttt gttttagaaa cgccagtcta tgtgacttca 4260
 aaatcagaat ttaaatctgt caaagcagcc aaaataattt cgcaaaatat ccgagaatat 4320
 tttggaaagt ctttgccagt tgatctaacg tgtaatcatt ttggtattgc tcgcatacca 4380
 agaacggaca atgtagaatt ttttgatcct aattaccgtt attctttcaa agaatggcaa 4440
 gatttgtctt tcaaacaaac agataaataag ggctttactc gttcaagtct aacggtttta 4500
 agcggtagac aaggcaaaaa acaagtagat gaaccctggg ttaatctctt attgcacgaa 4560
 acgaaatttt caggagaaaa ggggttaata gggcgtaata acgtcatgtt taccctctct 4620
 ttagcctact ttagttcagg ctattcaatc gaaacgtgcg aatataatat gtttgagttt 4680
 aataatcgat tagatcaacc cttagaagaa aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgcc 4740
 tattcagaaa actatcaagg ggctaataag gaatacatta ccattctttg caaagccttg 4800
 gtatcaagtg atttaaccag taaagattta ttgtccgctc aagggtggtt taaattcaag 4860
 aaaaaagaa gcgaacgtca acgtgttcat ttgtcagaat ggaaagaaga tttaatggct 4920
 tatattagcg aaaaaagcga tgtatacaag ctttatttag tgacgaccaaa aaaagagatt 4980
 agagaagtgc taggcattcc tgaacggaca ttagataaat tgcctgaagg actgaaggcg 5040
 aatcaggaaa ttttctttta gattaaacca ggaagaatg gtggcattca acttgctagt 5100
 gttaaatcat tgttgctatc gatcatlaaa gtaaaaaaag aagaaaaaga aagctatata 5160
 aaggcgctga caaattcttt tgacttagag catacattca ttcaagagac tttaaacaag 5220
 ctagcagaa cgcctaaaaac ggacacacaa ctcgatttgt ttagctatga tacaggctga 5280
 aaataaaaacc cgcactatgc cattacattt atatctatga tacgtgtttg tttttctttt 5340
 gctgttttag gaatgattag cagaaatata cagagtaaga ttttaattaa ttattagggg 5400
 gagaaggaga gagtagcccg aaaactttta gttggcttgg actgaacgaa gtgagggaaa 5460
 ggctactaaa acgtcgaggg gcagtgaag cgaagcgaac acttgatttt ttaattttct 5520
 atcttttata ggtcattaga gtatacttat ttgtcctata aactatttag cagcataata 5580
 gatttattga ataggtcatt taagttgagc atattagagg aggaaaatct tggagaaata 5640

10

20

30

40

```

tttgaagaac ccgattacat ggattggatt agttcttgtg gttacgtggt ttttaactaa 5700
aagtagtgaa tttttgattt ttggtgtgtg tgtcttgttg ttagtatttg ctagtcaaaag 5760
tgattaaata                                     5770

```

<210> 8

<211> 5870

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: plasmid
pT1TR5AH

10

<400> 8

```

gaattcgaatt aagtcattctt acctctttta ttagtttttt cttataatct aatgataaca 60
ttttttataat taatctataa accatatccc tctttggaat caaaatttat tatctactcc 120
tttgtagata tgttataata caagtatcag atctgggaga ccacaacggt ttcccactag 180
aaataatttt gtttaacttt agaaaggaga tatacgcattg aaaaaaaga ttatctcagc 240
tatttttaatg tctacagtca tactttctgc tgcagccccg ttgtcagggtg tttacgccct 300
ggccccctct ctgggtgacc gggagaagag ggatagcttg tgtccccaag gaaagtatgt 360
ccattcctaag aacaattcca tctgctgcac caagtgccac aaaggaaacct acttgggtgag 420
tgactgtccg agcccagggc gggatacagt ctgcaggagg tgtgaaaagg gcacctttac 480
ggcttcccag aattacctca ggcagtgtct cagttgcaag acatgtcggg aagaaatgtc 540
ccagggtggag atctctcctt gccaaagtga caaggacaag gtgtgtggct gtaaggagaa 600
ccagttccaa cgctaactga gtgagacaca ctccagtgct gtggactgca gccctgtctt 660
caacggcacc gtgacaatcc cctgtaagga gactcagaac accgtgtgta actgccatgc 720
aggggttcttt ctgagagaaa gtgagtgcgt cccttgccag cactgcaaga aaaatgagga 780
gtgtatgaag ttgtgcctac ctccctccgct tgcaaatgtc acaaaccccc aggactcagg 840
tactgcgcct catcatcatc atcattaata gactagtaga tccggctgct aacaaagccc 900
gaaaggaaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg 960
cctctaaaagc ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggatgacctg 1020
caggcaagct ctagaatcga tacgattttg aagtggcaac agataaaaaa aagcagttta 1080
aaattgttgc tgaactttta aaacaagcaa atacaatcat tgtcgcaaca gatagcgaca 1140
gagaaggcga aaacattgcc tggtcgatca ttcataaagc aaatgccttt tctaaagata 1200
aaacgtataa aagactatgg atcaatagtt tagaaaaaga tgtgatccgt agcggttttc 1260
aaaatttgca accaggaatg aattactatc ccttttatca agaagcgcaa aagaaaaaac 1320
aaatgataca ccaatcagtg caaaaaaaga tataatggga gataagacgg ttctgtgttcg 1380
tgctgacttg caccatatca taaaaatcga aacagcaaag aatggcgga acgtaaaaga 1440
agttatggaa ataagactta gaagcaaact taagagtgtg ttgatagtgc agtatcttaa 1500
aattttgtat aataggaatt gaagttaaat tagatgctaa aaatttgtta ttaagaagga 1560
gtgattacat gaacaaaaat ataaaatatt ctcaaaactt tttaacgagt gaaaaagtac 1620
tcaaccaaat aataaaacaa ttgaatttaa aagaaaccga taccgtttac gaaattggaa 1680
caggtaaaag gcatttaacg acgaaactgg ctaaaaataag taaacaggta acgtctattg 1740
aattagacag tcatctattc aacttatcgt cagaaaaatt aaaactgaat actcgtgtca 1800
ctttaattca ccaagatatt ctacagtttc aattccctaa caaacagagg tataaaattg 1860
ttgggagtat tccttaccat ttaagcacac aaattattaa aaaagtgggt ttgaaagcc 1920
atgcgtctga catctatctg attgttgaag aaggattcta caagcgtacc ttgatatatt 1980

```

20

30

40

accgaacact aggggttgctc ttgcacactc aagtctcgat tcagcaattg cttaaagctgc 2040
 cagcggaatg ctttcatcct aaaccaaag taaacagtgt ctttaataaaa cttacccgcc 2100
 ataccacaga tggtccagat aaatattgga agctatatac gtactttgtt tcaaaatggg 2160
 tcaatcgaga atatcgtaa ctgtttacta aaaatcagtt tcatcaagca atgaaacacg 2220
 ccaaagtaaa caatttaagt accgttactt atgagcaagt attgtctatt tttaatagtt 2280
 atctattatt taacgggagg aaataattct atgagtcgct ttgtgaaatt tggaaagtta 2340
 cacgttacta aagggaatgt agataaatta ttaggtatac tactgacagc ttccaaggag 2400
 ctaaagaggt ccctagcgct cttatcatgg ggaagctcgg atcatatgca agacaaaata 2460
 aactcgcaac agcacttgga gaaatgggac gaatcgagaa aaccctcttt acgctggatt 2520
 acatatctaa taaagccgta aggagacggg ttcaaaaagg tttaataaaa ggagaagcaa 2580
 tcaatgcatt agctagaact atattttttg gacaacgtgg agaatttaga gaacgtgctc 2640
 tccaagacca gttacaaaga gctagtgcac taacataaat tattaacgct ataagtgtgt 2700
 ggaacactgt atatatggaa aaagccgtag aagaattaaa agcaagagga gaatttagag 2760
 aagatttaat gccatatgag tggccgttag gatgggaaca tatcaatttt cttggagaat 2820
 acaaatitga aggattacat gacactgggc aaatgaattt acgtccttta cgtataaaaag 2880
 agccgtttta ttcttaatat aacggtcttt tttatagaaa aaatccttag cgtgggtttt 2940
 ttccgaaatg ctggcggtag cccaagaatt agaaatgagt agatcaaatt attcacgaat 3000
 agaatcagga aaatcagatc caaccataaa aacactagaa caaattgcaa agttaactaa 3060
 ctcaacgcta gtagtggtt taatcccaaa tgagccaaca gaaccagagc cagaaacaga 3120
 atcagaacaa gtaacattgg atttagaaat ggaagaagaa aaaagcaatg acttcgtgtg 3180
 aataatgcac gaaatcgttg cttatttttt tttaaaaagc gtataactaga tataacgaaa 3240
 caacgaactg aatagaaacg aaaaaagagc catgacacat ttataaaatg tttagcgaca 3300
 ttttataaat gcatagcccg ataagattgc caaaccaacg cttatcagtt agtcagatga 3360
 actcttcocct cgtaagaagt tatttaatta actttgtttg aagacgggat ataaccgtac 3420
 tatcattata tagggaaatc agagagtttt caagtatcta agctactgaa ttaagaatt 3480
 gttaagcaat caatcgaaa tcgtttgatt gctttttttg tattcattta tagaaggttg 3540
 agtttgatg aatcatgatg aatgtaaaac ttatataaaa aatagtttat tggagataag 3600
 aaaattagca aatatctata cactagaaac gtttaagaaa gagttagaaa agagaaatat 3660
 ctacttagaa acaaaatcag ataagtattt ttcttcggag gggaagatt atatataata 3720
 gttaatagaa aataacaaaa taatttatto gattagtggg aaaaaattga cttataaagg 3780
 aaaaaaatct ttttcaaaac atgcaatatt gaaacagttg aatgaaaaag caaaccaagt 3840
 taattaaaca acctatttta taggatttat aggaaaggag aacagctgaa tgaatatccc 3900
 ttttggtgta gaaactgtgc ttcatgacgg cttgttaaag tacaatttta aaaatagtaa 3960
 aattcgctca atcactacca agccaggtaa aagcaaaggg gctatttttg cgtatcgctc 4020
 aaaatcaagc atgattggcg gtcgtggtgt tgttctgact tccgagggaag cgattcaaga 4080
 aaatcaagat acatttacac attggacacc caacgtttat cgttatggaa cgtatgcaga 4140
 cgaaaaccgt tcatacacga aaggacattc tgaaaacaat ttaagacaaa tcaatacctt 4200
 ctttattgat ttgatattc acacggcaaa agaaactatt tcagcaagcg atattttaac 4260
 aaccgctatt gatttaggtt ttatgcctac tatgattatc aaatctgata aaggttatca 4320
 agcatatttt gttttagaaa cgccagctca tgtgacttca aaatcagaat ttaaatctgt 4380
 caaagcagcc aaaataattt cgcaaaatat ccgagaatat tttggaaagt ctttgccagt 4440
 tgatctaacg tgaatcatt ttggtattgc tcgcatacca agaacggaca atgtagaatt 4500
 ttttgatcct aattaccgtt attctttcaa agaattggca gattggcttt tcaaacaaac 4560
 agataataag ggctttactc gttcaagtct aacggtttta agcggtagag aaggcaaaaa 4620
 acaagtagat gaaccctggg ttaatctctt attgcacgaa acgaaatttt caggagaaaa 4680
 gggtttaata gggcgtaata acgtcatgtt taccctctct ttagcctact ttagttcagg 4740
 ctattcaatc gaaacgtgag aatataatat gtttgagttt aataatcgat tagatcaacc 4800
 cttagaagaa aaagaagtaa tcaaaattgt tagaagtgc ctttcagaaa actatcaagg 4860

10

20

30

40

```

ggctaataag gaatacatta ccattctttg caaagcttgg gtatcaagtg atttaaccag 4920
taaagattta tttgtccgtc aagggtggtt taaattcaag aaaaaaagaa gcgaacgtca 4980
acgtgttcat ttgtcagaat ggaaagaaga tttaattggt tatattagcg aaaaaagcga 5040
tgtatacaag ccttattttg tgacgaccaa aaaagagatt agagaagtgc taggcattcc 5100
tgaaacggaca ttagataaat tgctgaaggt actgaaggcg aatcaggaaa ttttctttaa 5160
gatlaaacca ggaagaaatg gtggcattca acttgctagt gttaaatcat tgttgotatc 5220
gatcattaaa gtaaaaaaag aagaaaaaga aagctatata aaggcgctga caaatctttt 5280
tgacttagag catacattca ttcaagagac ttttaacaag ctacgagaac gccctaaaac 5340
ggacacacaa ctcgatttgt ttagctatga tacaggctga aaataaaacc cgcactatgc 5400
cattacattt atatctatga tacgtgtttg tttttctttt gctgttttagc gaatgattag 5460
cagaaatata cagagtaaga ttttaattaa ttattagggg gagaaggaga gtagagcccg 5520
aaaactttta gttggcttgg actgaacgaa gtgagggaaa ggctactaaa acgtcgaggg 5580
gcagtggagag cgaagcgaac acttgatttt ttaattttct atcttttata ggtcattaga 5640
gtatacttat ttgtcctata aactatttag cagcataata gatattattga ataggtcatt 5700
taagttgagc atattagagg aggaaaatct tggagaaata ttgaagaac ccgattacat 5760
ggattggatt agttcttctg gttacgtggg ttttaactaa aagtagtgaa tttttgattt 5820
ttggtgtgtg tgtcttgttg ttagtatttg ctagtcaaag tgattaaata 5870

```

10

【図 1 a】

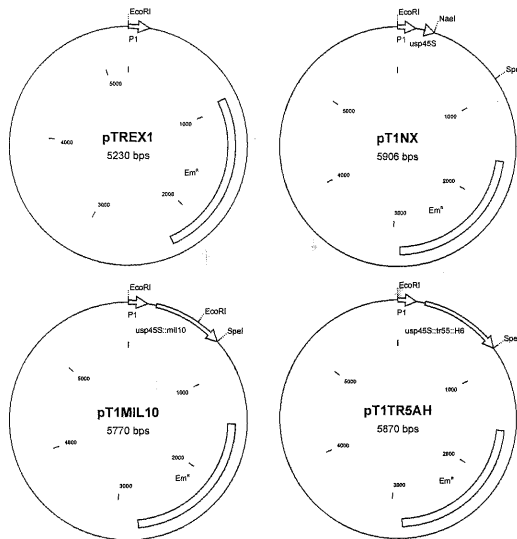


Figure 1a

【図 1 B】

pTREX1 Figure 1B

```

GAATTCGATTAAAGTCACTTACCTCTTTTATTAGTTTCTTATAATCTAATGATAACATTT
TTATAATTAATCTATAAACCATATCCCTCTTTGGGAATCAAAATTTATTATCTACTCCTTTGTA
GATATGTTATAATACAGATCATGATCTGGGAGACACCAACGGTTTCCCACTAGAAATAA
TTTTGTTAACTTATAGAAAGGAGATATACGCATGCAGGATATCTCTAGATGGATCCGGC
TGCTAACAAAGCCGAAAGGAAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAATAG
CATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAAGGGTTTTTGTCTGAAGGAGGAACT
ATATCCGGATGACCTGCAGGCAAGCTCTAGAAATCGATACGATTTTGAAGTGGCAACAGA
TAAAAAAGCAGTTTAAATTTGCTGAACTTTTAAACAAAGCAAAATCAATCATTGTC
GCAACAGATAGCGACAGAGAAGCGGAAACATTGCTCGTGCATCATTCATAAAGCAAA
TGCCCTTTCTAAAGATATAAAGCTATAAAGACTATGGATCAATAGTTTAGAAAAAGATGTG
ATCCGTAGCGGTTTCTAAATTTGCAACAGGAAATGAATTTACTATCCCTTTATCAAGAA
CGCAAAAGAAATAGCAATATACACATCAATGCTGCAAAAGCAATATATAGGAGATAA
GACCGTTCTGTTCTGCTGACTTGCACCATATCATAAAATCGAAACAGCAAGAAATGG
CGAAACGTAAGAAAGTATGGAAATAAGACTTGAAGCAAACTTAAGAGTGTGTGAT
AGTGCAGTATCTTAAATTTTGTATAATAGGAATGAAGTTAAATAGATGCTAAAAATTTG
TAATTAAGAGGAGTATTACATGAACAAAAATATAAATATTCTCAAACTTTTAAACGA
GTGAAAAAGTACTCAACCAATAATAAACAATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTA
CGAAATTGGAACAGGTAAAGGGCATTTAACGACGAACTGGCTAAATAGTAAACAGG
TAACGTCTATTGAATTAGACAGTCTATTTCAACTTATCGTCAGAAAAATTAACACTGAA
TACTCGTGCTCATTAAATTCACCAAGATATTCACAGTTTCAATCCCTTACCAACAGAGG
TATAAATTTGTTGGGAGTATTCCTTACCATTTAAGCACAACAAATTTAAAAAGTGGTTT
TGAAAGCCATCGCTGACATCTATCTGATTTGTTGAAGAGGATTCTACAGCTACCTT
GGATATTCACCAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGAATTCAGGAATGCT
TAAGCTGCCAGCGAATGCTTTCATCTCAACCAAGTAAACAGTGTCTTAAATAACT
TACCGCCATACCAAGATGTTCCAGATATAATTTGAAGCTATATAGCTACTTGTGTTCA
AAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCAAGCAAGTA
AACAGCCCAAGTAAACAAATTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGCTATTTTAA
TAGTTATCTATTATTAACGGGAGGAAATTAATCTATGAGTCTGCTTTGTAATTTGAA
GTTACAGCTTACTAAAGGGAATGATAGATAAATTTAGGTACTACTGACAGCTTCCAA
GGAGCTAAAGAGGTCCCTAGCGCTCTTATCATGGGGAGGCTCGGATCATATGCAAGACA
AAATAAAGCTCGCAACGACTTGGGAAATGGGAGCAATCGAGAAACCTCTTACGCT
TGGATTACATATCTATAAAGCCGTAAGGAGACGGGTTCAAAAGGTTTAAATAAGGAG
AAGCAATCAATGATAGCTAGACTATATTTTGGACAACGTGGGAAATTTAGAGAAC
GTGCTCTCAAGACAGCTTACAAAGAGCTAGTGCATCAACATAATTTAAACGCTATA
GTGTGTGGAACACTGTATATGAAAAAGCCGTAGAGAAATTAAGCAAGAGGAGAA
TTTAGAGAAGATTATGCCATATGCGTGGCCGTAGGATGGGAACATATCAATTTTCT
GGAGAATACAAATTTGAAGGATTACATGACACTGGGCAAAATGAATTTACGCTCTTACGT
ATAAAGAGCCGTTTATCTTATAATAACGGCTCTTTTATAGAAAAATCCTTAGCGTG
GTTTTTCCGAAATGCTGGCGGTACCCCAAGAAATGAATGAGTATGATCAAAATTTAT
ACGAATAGAATCAGGAAATCAGATCCCAACATAAACAACATGAGCAAAATTTGCAAGTT
AAGCAATTTTATTAATGATAGCTGATAGCTTAAATCCCAATGAGCAACAGCAAGGAG
AAACAGAAATCAGAAAGTAACTGGATTTTGAATTTGAAGAAAGAAAAAGCAATGACT
TCGTGTGAATTAATGCAAGCAATGCTGCTTATTTTTTAAAAAGCGGTACTAGATATA
ACGAAACAAAGCAATGAAATGAAAGCAAAAAAGGCAATGACACATTTATAAATTTGTTG
ACGACATTTTATTAATGATAGCTGATAGCTTAAAGATTGCCAAACCAAGCTATGATGATG
AGATGAAGCTTCTGCTGTAAGAGTTTATTAATTAATTTTAAAGCAAGCTATATAC
CGATATCTATTATAGGAAATCAGAGAGTTTCAAGTATCTAAGCTACTGAATTTAAG
AATTGTTAAGCAATCAATCGAAATCGTTGATGCTTTTTTTGTTATCTTTATAGAAAGT
GGAGTTTGTATGAATCATGATGAATGTAACCTTATATAAAAAATAGTTTATGAGATAA

```

pTREX1 (cont.) Figure 1B (cont.)

GAAAAATTAGCAAATCTCTACACTAGAAACGTTTAAAGAAAGAGTTAGAAAAAGAGAAATAT
CTACTTAGAAACCAAAATCAGATTAAGTATTTTCTTCGGAGGGGGAAGATTATATATATAAG
TTAATAGAAATACAAATAAATTTATTCGATTTAGTGGGAAAAAAATTTGACTTATAAAGAGAAA
AAATCTTTTTCAAACATGCAATATTGAACACAGTGTAAATGAAAAAGCAAAACAGATTAA
TAAACACCTATTTTATAGGATTTTATAGGAAAGGAAGAACAGCTGAATGAATACCCCTTTTG
TTGTAGAAACCTGTGCTTCATGACGGCTGTGTTAAAGTACAAATTTAAAAATAGTAAATTCG
CTCAATCACTACCAAGCCAGGTAAAGCAAAAGGGGCTATTTTTGGGTATCGCTCAAAATC
AAGCATGATTACGGCGTCTGGTGTGTGTTCTGACTCCGAGGAAGCGATTCAAGAAATC
AAGATACATTTACACATTTGGACACCCAACGCTTTATCGTTATGGAACGTATGCAAGACGAAA
ACCGTTTACACACGAAAGGACATCTGAAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTCTTTAT
TGATTTTGATATTCACACGGCAAAAGAAATCTTTTCAGCAAGCGATATTTTAAACACCCGT
ATTGATTTAGGTTTTATGCTACTATGATTATCAAAATCTGATAAAGGTTATCAAGCATATTT
TGTTTTAGAAACGCCAGTCTATGTGACTTCAAAATCAGAAATTTAAATCTGTCAAAAGCAGCC
AAAAATATTTCCGCAAAATATCCGAGAATATTTTGGAAAGTCTTTGCCAGTTGATCTTAAGCT
GTAACTATTTTGGTATTGCTCGCATACCAAGCAACGGCAATGTAGAAATTTTTTGATCTCAA
TTACCGTTATCTTTCAAAGAAATGCGAGATTGGCTTTTCAAAACAAACAGATTATAAGGGC
TTTACTCGTTCAAGCTCAACGGTTTAAAGCGGTACAGAAGGCCAAAAACAAGTAGATGAA
CCCTGGTTAATCTTATTTGCGAGCAAGCAATTTTACAGGAGAAAGGGTTTAAATAGGG
CGTAATAACGTCATGTTTACGCTCTCTTTAGCTCACTTTAGTTTCAAGGCTATTTCAATCGAAA
CGTGGCAATATAATGTTTGAAGTTTAAATAGTATGATCAACCCCTTAGAAGAAAAAGA
AGTAATCAAAATGTTTGAAGAGTGCCTATTACAGAAACATCAAGGGGCTAATAGGGAATA
CATTACCATTTCTTGCAAAAGTTGGGTATTGAACGATTTAACCGATAAAGATTATTTTGTG
CGTCAAGGGTGGTTTAAATCAAGAAATAGAACGCAACGCTCAACGTGTTCATTGTGCA
GAATGGAAAGAAAGATTAAATGGCTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAAAGCCTAT
TTAGTGACGACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGCTAGGCATTCCTCAAGCGACATTAGA
TAAATTTGCTGAAGTACTGAAGGGCAATCAGGAAATTTTCTTAAAGATTAAACCCAGGAAG
AAATGTGGGCTTCACTTCTAGTGTTAATCATTTGTTGCTATGCATCATTTAAAGTAAAA
AAAGAGAAAAAGAGCTATTATAAGGGCTGTCAGAAATTTCTTGGCTTAGAGCATACA
TTCAATTCAGAGACTTTAAACAGAGCTAGCAGAAAGCCCTAAACCGCACACACACTCGAT
TTGTTTAGCTATGATACAGCGTGAAATATAAACCCGCACTATGCCATTACATTTATATCTA
TGATACGTGTTTGTCTTCTGCTGAGTAAAGCAATGATTAGCAGAAATATACAGAGTAA
GATTTTAAATTAATTAGGGGAGAGAGGAGAGGATAGCCCGAAAACTTTTAGTTGGCTT
GGACTGAACGAAGTGAGGGGAAAGGCTACTAAAGCTCGAGGGGCGAGTGAGAGCGAAG
CGAACACTGATTTTTAAATTTCTATCTTTTATAGTCAATTAGAGTATACATTATTGTGCT
ATAAATCTATTAGCAGCATAAAGATTATTGAATAGGTCAATTAAGTTGAGCATTTTGA
GGAGGAAATCTTGGAGAAATTTAGAGAAACCCGATTTACATGGGATTGGATTAGTCTTGG
TGGTACGTGGTTTTAACTTAAAGATGTAAGGATTTGATTTTGGTTTGGTGTGTGCTGTT
GTGATGTTTGTGATGCAAAAGTAAATA

pT1NX (cont.) Figure 1B (cont.)

GAGTAGATCAAAATATTACGAAATAGAAATCAGGAAAAATCAGATCCAAACCTAAAAACACTA
GAACAAATTGCAAAATTAACATAAGCTCAACGCTAGTAGTGGATTTAATCCCAATGAGCGA
ACAGAACCCAGAGCCAGAAACAGATACAGAACAGTAACATTGGATTTAGAAATGGAAAG
AGAAAAAGCAATAGCTTCGTGTAATTAACGAAATCGTTGCTTATTTTTTAAAA
GGGATATACGATATACGAAGAACACAGCACTGAATAGAACGAAAAAGAGCCATGACA
CATTTATAAAATGTTTGAAGCATTTTATAAATGACTAGCCGATAAAGATTGCGCAACCA
CGCTATACGCTAGTCAAGTACTGCTCCCTGTGAGAAAGTATTTAATTAATCTTTGTT
GAGCAGCGTATATACCGTACTACTATATATAGGAAATCAGAGAGTTTCAAAATGATTA
AGCTACTGATTTAAGAAATTTAGAACCAATCAATCGGAAATCGTTTATTGCTTTTGT
ATTCAATTTAGAGAGTGGAGTTTGTATGAATCATGATGAATGTAAACCTTATATAAAAAA
TAGTTTTATTGGAGATACGAAGTATGCAAAATATCTATACACTAGAAACGTTTAGAAGAGAG
TTAGAAAGAGAAATATCTACTTAGAAACAAAATCAGATAAGTATTTTCTCGAGGGG
GAAGATTATATATTAAGTTAATAGAAAAAACAAATAATTTATTGCGATTAGTGAAGAAAA
ATTGACTTATAAGGAAAAAAATCTTTTCAAAACATGCAATTTTGAACAGTGTGAATGAA
AAGCGAAACCAAGTTTAAATAACAACTTTTATAGGATTTATAGGAAAGGAGAACAGCT
GAATGAATTCCTCTTTTGTGTAGAAAGCTGTGCTTCATGACGGCTTGTAAAGTACAAAT
TAAAAATAGTAAAAATTCGCTCAATCACTACCAAGCCAGGTAAAAAGCAAGGGGCTATTT
TGGCTATCGCTCAAAATCAGAGTATTGGCGGTGCTGGTGTGTTGTTCTGACTTCGAGG
AAGCGATTACAGAAATCAGATGATTTACACATTGCGACACCCAAACGTTTATCGTTATG
GAACGTATGCGAGCAAGAAACGTTTATAGAGTATTTAGGCAAGAGACATTCGAAACAAATTAAGAC
CAATCAATACCTCTTTTATGATTTGATATTCACACGGCAAGAAAGAACTATTTCAGCAAG
CGATTTTTAACACCGCTATTGAATTTAGGTTTTATGGCTACTATGATTTCAAAATCGATA
AAGGTTATCAAGCATATTTGTTTTAGAAACGCCAGTCTATGTGACTTCAAAATCAGAAAT
TAAATCTGTCAGAGCAGCCAAATTAATTCGCAAAATTCGAGAAATTTTGGAAAGATCT
TGCCAGTGTGATCTAAGCTGTAATCATTTTGTGATTGCTGCGATACCAAGAACGGACAT
GTAGAAATTTTGTATCCTAATTACCGTTATTCTTCAAGAAATGGCAAGATTGGCTTTTCA
AACAAACAGATAAAGGGCTTACTGCTTCAAGTCTAAGCGTTTAAAGCGGTACAGAGA
GCAAAAAACAGTAGATAGAACCCGTGGTTTAATCTCTATTGACGAAACGAAATTTTCAG
GAGAAAGGGTTTTAATAGGGCGTAATACGCTCATGTTTACCCCTGCTTTTAGCGTACTTTA
GTTCAAGCTATTCAATCGAAAGCTGCCAATAATATGTTTGAAGTTATAATTCAGATTAGA
TCAACCGTTAGAGAAAGAAAGATTAATCAATTTTGAAGTGGCTATTTCAGAAACATCTA
CAAGGGGCTAATAGGGAATCAATACCATCTTTTGCAAAGCTTGGGTATCAAGTGATTTA
ACCAATGAAGATTATTTTTCGCTCAAGGTGGTTTAAATCTTCAAGAAAAAGAGCGGAA
CGTCAACGTGTTCAATTTGTCAGATGGAAAGAGATTTAATGGCTTATTATAGCGAAAA
AGCGATGTATACAGGCTTATTATTAGTACACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGTCTAGG
CATTCCTGAACGGACATTAGATAAATTTGCTGAAGTACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTT
CTTTAAGATTAAACCGAGAAAGAAATGGTGGCATTCACCTTGTAGTGTTTAAATCATTTGGT
CTATCGATCATTAAGTAAAAAGAGGAAAAAGAAAGCATATAAAGGGCGTGCACAAAT
TCTTTTGACTTAGAGCATACATTGATTCGAAGACTTTAAACCAAGCTAGCAGAACCGCT
AAACCGGACACCAACTCGATTGTTTATGCTATGATACAGGCTGAAAAATAAACCCGCGAC
TTGCCATTACATTTATCTATGATACCTGTTTCTTTGCTGCTGTTTAGCGAATGAT
TAGCAAAATATACAGAGTAGATTATTAATTAATAGTAGGGGAGAGAGAGAGAGTACG
CGGAAACCTTTAGTTGGCTTGGACTGAACGAAGTGAGGGAGAGGCTACTAAAGCGTCC
AGGGCGAGTGAAGGCAAGCGAACCTTGATTTTTAATTTCTATCTTATAGTGCAT
AGAGTATACCTATTGTCCTTAAACATTTAGCGAGCATATAGATTTATTGAATAGGTCAT
TTAAGTTGAGCATTTTAACTGAGGAGAAAAATCTTGGAGAAATATTGAAGAACCCGATACA
TGAATTTGAGTATGTTCTGTGGTACGTGGTTTTAACTAAAAAGTAGTGAATTTTGATTT
TTGGTGTGTGTGCTGTTTGTAGTATTGCTAGTCAAAAGTATTAAATA

pT1NX Figure 1B (cont.)

GAATTCGATTAAAGTCATCTTACCTCTTTTATAGTTTTTCTTATAATCTAATGATAACATTT
TTATAATTAATCTATAAACCAATTCCTCTTTTGGAAATCAAAATTTATTTACTCTCTTTGTA
GATATGTTTATTAATACAGATATCAGATCTGGGAGACCACCAACGGTTTCCCACTAGAAATA
TTTTGTTTAACTTTAGAAAGGAGATATACGATGAAAGAAAGATTTACTCAGCTATTTTAA
TGCTACAGTCATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACCGCGCGACAGGA
TCCAAAGAGGGAAGACAATAACAAAGCCTGGCAAAAGAGACATAACAAAGCCTGGCAAA
AGACATAATAACAAAGCCTGGCAAAAGAGACAAACAAAGCCTGGCAAAAGAGACAAAC
AAGCCTGGTAAAGAGACAAACAAAGCCTGGCAAAAGAGCGGGCAACAAAGCCTGGTAA
AAGAGACAAACAAAAACCTGGTAAAGAAAGTGGCAAAAGCCTGGTAAAGAGACAAACA
AAAAACCTGGTAAAGAGAGCGGCAACAAAGCCTGGCAAAAGAGATGGCAACAAACCTGGT
AAAGAAAGTGGTAACGAGATACATGCTGTTAAACCTGGTGATACAGTAATGACATTTGCA
AAAGCAAAACGGCACTACTGCTGACAAAAATTTGCTGCAGATAACAAATTTAGCTGATAAAAA
ATGATCAAAACCTGGTCAAGAACTTTGTTGTTGATTAAGAAAGCAACCAAGCAACCTGACAGAT
GCTAACAAAGCTCAAGCATTACAGAAACCTGGCGAAAGAAATTCATTCTCGGTACAACT
GTATTTGGTGATTTATTCAATGACCTTAGTGTCAGGCTTTATAGCTGCGAGCTGCTCGCGA
ACTATAACTATGATGATCGGCTGCTAAAGAGCCGGAAGGCGTGAATTTGAGGCTGCTG
CAACGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGGGGGT
TTTTTGGTGAAGGAGGAACATATCCGGATGACCTCGAGGCAAGCTTGAATCGATACA
CGATTTTGAAGTGGCAACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTTGTTGCTGAACTTTTAAAA
CAAGCAAAATACAATCAATTGTCGCAACAGATAGCGACAGAGAGAAAGCAAACTTGGCTG
GTCGATCATCTAAGAGCAATGCTTTTCTAAGATTAAGCAATGATAAAGAGCTATGAGTAC
AATAGTTTAAAGAAAGATGTGATCGGTAGCGGTTTTTCAAAATTTGCAACCGAGATGAAT
TACTATCCCTTTTATCAAGAAAGCGCAAAAGAAAAAGCAATGATACACCAATTTAGCTGCA
AAAAAGATATAATGGGAGATAAGACGGTTCTGCTGTTGCTGATGCTGACCATATCTATAA
AAATCGAAACAGCAAGAAATGGCGAAACGTAAAAAGAGTTATGAAATTAAGACTTAGAG
GCAACCTTAAGAGTGTGTTGATAGTGCAGTATCTTAAATTTTGTATAATAGGAATGGAAG
TTAATTAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAGAGGATTACATGACAAAAATATAA
ATATTCTCAAAACTTTTAAAGAGTGAAGAACTCAACCAATTAATAACCAATTTGAAT
TAAAGAAACCGGATACCGTTTACGAAATTTGAACAGGTAAAGGGCATTTAAGCAGCAAA
TGGCTAAAAATTAAGTAAACAGGTAACTGTTGATTAAGTACAGCATCATGATTCAACTTATC
TCGAAAAAATTAACACTGATCTGCTGCTGCTTAACTTCAACCAAGATTTTCAAGTTT
CAATTCCTCAACCAACAGAGGATATAAATTTGTTGGGATTTTCTTACCATTTTAAAGCAG
AAATTTAAAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGCTGACATCTATCTGATTTTGAAGA
AGGATTTCAAGAGCGTACCTTTGGATTTTCAACGAACTAGGTTGCTCTGCACACTCA
AGTCTCGATTCAGCAATTTGCTTAAGCTGCCAGCGGAATTTGCTTATCTGCAACCAAGAT
AAACAGTGTCTTATAAAACCTTACCCGCCATACACAGATGTTCCAGATAAATATTGGA
GCTATACGTAACCTTTGTTTCAAAATTTGGGTCAATGAGCAATTAAGCAATTTGATATAATGGA
ATACGTTTTGATCAGCAATGAAACACCGCAAGTAAAGCAATTTAAGTACCGTACTATTG
AGCAAGTATGCTATTTTAAAGATGATATTATTAAAGAGGAAATTAATCTATTGAT
TGCCTTTTGTAAATTTGGAAGTTACAGCTTACTAAGGGAATGTAGATAAATATTAGGT
ATACTACTGACAGCTTCCAGGAGCTAAAGAGTCCCTAGCGCTCTTATCATGGGGAAG
CTCGGATCATATGCAAGACAAAAATAACTCGCAACAGCACTTGGAGAAATGGGACGAT
CGAGAAAAACCTCTTTACGCTGGATTACATATCTAATTAAGCCGTGAAGGAGACGGGTTCA
AAAAGGTTTAAATAAGGAGGAAGCAATCAATGCTTAGCTAGTAACTATTATTTTGGACAA
CGTGAGGAATTTAGAGAACGTGCTCCAGAGCCAGTACAAAGAGCAGTATGTCACATAA
CATAATTTAACGCTATAAGTGTGGGAACACTGATATATGGAAGAAAGCCGTAGAAGA
ATTAAGAGCAAGGAGGAATTTAGAGAAAGTATTAATGCCATATGCGTGGCGCTTAGGATG
GGAACATATCAATTTTCTGGAGAAATCAAAATTTGAAGGATACATGACACTGGGGCAAT
GAATTTACGTCTTTACGATATAAAGAGCGGTTTTATCTTATAATACAGGCTTTTTATA
GAAAAATCTCTAGCGTGTGTTTTTTCGAAATGCTGGCGTACCCCAAGATTAATGATA

【図 1c】

pT1M10 Figure 1c

GAATTCGATTAAAGTCATCTTACCTCTTTTATAGTTTTTCTTATAATCTAATGATAACATTT
TTATAATTAATCTATAAACCAATTCCTCTTTTGGAAATCAAAATTTATTTACTCTCTTTGTA
GATATGTTTATAATACAGATATCAGATCTGGGAGACCACCAACGGTTTCCCACTAGAAATA
TTTTGTTTAACTTTAGAAAGGAGATATACCGATGAAAAAAGAAATTTACTCAGTATTTTAA
TGCTACAGTCATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACCGCGCGACAGC
CGGGAAGACAATAACTGCACCCACTTCCAGTGGCGGAGCCAGCTGCTTACAGAGCT
CGCGACTCGCTTCAGCCAGGTGAAGACTTTCTTCAAAACAAAGACCGAGCTGGGAACA
TACTGCTAACCGGACTCCTTAATGACAGGACTTTAAGGTTTACTTGGGCTGCAAGCTTAT
CGGAAATGATCCAGTTTACTGCTGTTGAAGTGTATGCCCGAGGCGAGAGAGCTGGGCCA
GAAATCAAGGAGCATTTGAATTCCTGGGTGAGAGAAATGAAGCAATTTGATGATGGCGGT
GAGCGGCTGTCTGATTTCTCCCTGTGAAAAAAGAGCAAGGCGAGTGGAGCAGGTG
AAGAGTGTATTTAATAGCTCCAGACCAAGTGTCTCAGACCGGCTAGTAATTTGAC
ATCTTCACTCACTGCATAGAAAGCATCATGATGATCAACATGAAGAGTCAATAGTACT
CGGCTGCTACAAAGCCGGAAGAGAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAAACCCCTGGGGGCTCTAAACGGGCTCTTGAAGGGTTTTTGTGTAAGAGAG
GAATCATATCCGGATGACCTGCAGAGCAAGCTCATAGATGATACGATTTTGAAGTGGCA
ACAGATAAAAAAAGCAGTTTAAATTTGTTGCTGAACCTTTAAACAAAGCAATACATCA
TTGTGCGAACAGATAGCGACAGAGAGGCGAAAAACATTTGCCGTGCTGATCATCATATAA
GCAAAATGCTTTTCTAAAGATAAAACGATATAAAGCATATGGATCAATTTAGAAAAAG
ATGTGATCCGTAGCGGTTTTTCAAAATTTGCAACCGAGGAATGAATTAATCTCCCTTTTATCA
AAGAGCGCAAAAGAAAAACGAAATGATACACCAATCAAGTGGCAAAAAAGATATAATGGGA
GATAAGACGGTTCGTGTTGCTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAATGAAACAGCAAGAG
AATGCGCGAAGCTTAAAGAAATTTATGAAATTAAGACTTAGAAGCAAACTTAAGAGTGTG
TTGATAGTGCAGTACTTAAATTTTGTATAAGGAATTTGAAGAGTGAAGTAAATAGATGCTAA
ATTTGTAATTAAGAGGAGTGAATACATGAACAAAAATATAAATTTTCTCAAAACTTTTTA
ACGAGTGAAGAAAGTACTCAACCAATAATAAACAATTTGAATTTAAAGAAACCGATACCG
TTTAGCAAAATTGGAACAGGTAAAGGGCATTTAAGCAGCAACCTGGCTAAATTAAGTAAAC
AGGTAACTGTTAATTTAGACAGTCACTATTCAACTTATCGTCAAAAAATTAACAT
GAATACCTGCTGCTCACTTTAATTCACCAAGATTTTACAGACTTTCAATTCCTCAACCAAG
AGGTATAAATTTTGGGGAGTATTCCTTACCAATTTAAGACACAAATTTAATAAAGGTGG
TTTTGAAGGCCATGCGCTGACATCTATCTGATTTGTGAAGAGAGGTATTCACAGAGTCA
CCTTGGATTTTACCGGAACACTAGGTTTGTCTTTCGACACTCAAGATTTGATGATCAGCAAT
TGCTTAAGCTTGCAGCGGAATGCTTTCATCTTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAAATA
AACTTACCCCTATACACAGATGTTCCAGATAAATTTAGAGAGCTTATATGCTGATTTGT
TTCAAAATGGGTTCAATCGAAGATTCGTCAAGCTTTTACTAAAAATCAGTTTATCGCAAGA
ATGAACACCGCCAAAGTAACAAATTAAGTACCGTTACTTAGGCAAGATTGTGCTATT
TTAATAGTTATCTATTATTAAACGGGAGGAATAATTTCTATGAGTTCGTTTTGTAATTTG
GAAAGTTACAGCTTACTAAGGGAATGATAGATAAATTTATAGGTACTACTGACAGCTGCT
CAAGGAGCTAAAGAGGTTCCTAGCGCTTATCATGAGGAAAGCTCGGATCAATTCAGCAAG
ACAAAATAAATCGCAACAGCACTTGGAGAAATGGGAGCAATGAGAAAAACCCCTTTTAC
GCTGGAATTACATATCTAATAAAGCCGTAAAGGAGCGGTTTCAAAAGCTTAAAGTAAAG
AGAGCAATCAATGCAATAGCTAGAACATATTTTGGACAACTGGAGAAATTAGAGA
ACGTGCTCTCCAGGACCGATTACAAAGAGCTATGCTCACTCAACATTAATTTAACTGAT
AAGTGTGTGGAACAGCTGATATATGGAAGAAAGCCGTAGAGAAATTAAGAGCAAGAGGAG
AATTTAGAGAAAGTTTAAATCCATAGCTGGCGCTTAGGATGGGAAATCATTAATTTTCT
TTGGAATAATCTTTTGAAGGATTCAGTACAGTGGGCAAGTGAATTAAGTAACTAATCTTAC
GTATAAAGAGCCGTTTTTCTTAAATAACGGCTCTTTTATAGAAAAATTCCTTAGCG
TGTTTTTTTTCCGAAATGCTGGCGGTACCCCAAGATTAGAAATAGAAATGCAAAAT
TCACGAATGAAGATCAGGAAATCAGTACCAACATAAAACACTAGAACAAATTCGAAAG

pT1MIL10 (cont.) Figure 1c (cont.)

TAACTAAGTCAACGCTAGTAGTGGATTTAATCCCAATGAGCCAAACAGAACACGAGAGCCA
GAAACAGAAATCAGAACCAAGTAACTTGGATTTAGAAATGGAAGAGAAAGAAAGCAATGAC
TTGGTGGAAATAGGACGAAATCGTTGCTTTATTTTAAAGCGGATACATAGATAT
AACGAAACCAACGAACTGAAATAGAACCAAAAGAGCCATGACACATTTATAAATGTTT
GACGACATTTTATAAATGCTATAGCCGATTAAGATTTGCCAAACCAACGCTTATCAGTTAGT
CAGATGAACCTCTCCCGTGAAGAAATGTTAATTAATCACTTTGTTGAAGACGGTATATATA
CCGTACTATCATTTATATAGGGAATCAGAGATTTTCAAGTATCTAAGCTACTGAATTTAA
GAATTTGTTAAGCAATCAATCGGAAATCGTTTGAATGCTTTTGTGATTCATTTATAGAAAG
GTGGAGTTTGTATGAATCATGATGAATGTAAACCTTATATATAAAATAGTTTATTTGGAGAT
AAGAAATTTAGCAAAATATCTATACACTAGAAACGTTTAAAGAAAGAGTTAGAAAGAGAAAT
ATCTACTAGAAACCAAAATCAGATAAGTATTTTCTCGGAGGGGGAAGATTATATATATA
AGTTAATAGAAATTAACAAATTAATTTATTCGATTAGTGGAAAGAAATTTGACTTATAAAGG
AAAAAATCTTTTCAAAACATGCAATATTGAAACAGTTGAATGAAAGCAACCAAGTT
AATTAACAACTTATTTATAGGATTTATAGGAAAGGAGAACAGCTGAATGAATATCCCTT
TTGTTGTAGAAATCTGCTTCAATGACGCTTTGTTAAATACAAATTTAAATAGTAAAT
TCGCTCAATCACTACCAAGCGAGTAAAGCAAGGGGCTATTTTTCGCTATCGCTCAAA
ATCAAGCATGATTGGCGGTGCTGGTGTGTTGCTGACCTCCGAGGGAAGCGATTCAAGAAA
ATCAAGATACATTTACACATTTGGACACCAACGTTTATCGTTATGGAACGATGACAGACG
AAACCGCTTATCAACGAAAGGACATCTGAAAACAATTAAGACAAATCAATACCTCTCT
TATTGATTTGATATTTACACGCGCAAGAGAACTATTTCAGCAAGCGATTTTAAACAAAC
GCTATTGATTTAGGTTTATGCTACTATGATTAATCAATCTGATAAGGTTATCAAGCAT
ATTTTGTTTAGAAACGCGAGCTATGTGACTTCAAAATCAGAAATTTAAATCTGTCAAGAGC
AGCCAAAATTAATTCGCAAAATTCGCGAATATTTGGAAAGCTTTGCCAGTTGATCTA
ACGTGTAATCATTTTGGTATTTGCTCGCATACCAAGAACGGACCAATGATGAATTTTGTATC
CTAATACCGTTATCTTCAAGAAATGGCAGATTTGGTCTTTTCAACAAACAGATAATATA
GGGCTTTACTGCTTCAAGTCTAACCGTTTAAAGCGGTACAGAAAGCAAAACCAAGTAT
ATGAACCTGGTTAATCTCTTATGCTGACGAAACGAAATTTTCAGGAGAAAGGTTTAT
AGGCGTAAATACGCTCATGTTTACCTCTTCTTAGCGTACTTTAGTTCAGGCTATTCAATC
GAAACGTCGGAATATAATGTTTGAATTTGCTGATACCAAGAACGGACCAATGATGAATTTTGTATC
AAGAGTAAATCAAAATGTTGAAGAGTGCCTATTACGAAACATCAAGGGGCTAATAGGG
AATACATACCATTTCTTTCGAAAGCTTTGGGTATCAAGTATTAAACAGTAAGATTTTAT
TGTCCGTCAGGGTGGTTTAAATCAAGAAAAAAGAGCGAAGCTCAACGCTGTTCAAT
GTGAGATTTGAAAGAGAGATTAAATGGCTTATATTAGCGAAAAAGCGATGTATCAAGCC
TTATTATGTCAGCAGCAAAAGAGATGATAGAGAGTCTAGGCAATCTCGAACGGCATT
AGATAAATGCTGAAGGCTAGTGAAGGCAATCAGGAAATTTTCTTAAGATTAAACGAGG
AAGAAATGGTGGCATTCACATGCTAGTGTAAATCAATTTGCTATCGATCATTAAAGTA
AAAAAAGCAAAAGAAAGCTATAAAGCGGCTGACAAATCTTTTGAATCAGAGCAT
ACATCTTATCAGAAAGCTTTAAACAGCTTAGCAGAAAGCTATAAAGCGACACCACT
GATTTGTAGCATGATACAGCGCTGAATTAAGAAACCCGACATATGCCATACATTTATAT
CTATGATACGCTTGTGTTTGTCTTCTGCTGTTTAGCGAATGATTAGCAGAAATACAGAG
TAAGATTTTAATTAATTTAGGGGGAGAGGAGAGAGTAGCCGCAAAACCTTTTAGTTGG
CTTGGACTGAACGAGTAGGGGAAGGCTACTAAACGTCGAGGGGCACTGAGAGCGGA
AGCGAACACTTGATTTTAAATTTCTATCTTTTATAGGTCATTAGAGTATCTATTATTGTC
CTATAAATCTTTAGCAGCATTTTAAATGATTTGAATAGGTCATTAAAGTTGAGCATTTA
GAGGAGGAAAACTTGGGAGAAATTTTAAAGAACCCGATACATGATTTGGATTAGTCT
TGTGGTTACGTGGTTTAACTAAAGTAGTAAATTTTGAATTTTGTGTGTGTGCTCTG
TGTGTAGTATTGCTAGTCAAGATGATTAATA

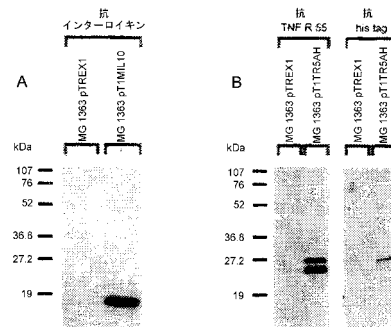
pT1TR5AH Figure 1c (cont.)

GAATTCGATTAAGTCATCTTACCTCTTTATTAGTTTCTTATAATCTAATGATAACATTT
TTATAATTAATCTATAAACCATATCCCTCTTTGGAATCAAAATTTATTATCTACTCGTTGTGA
GATATGTTTATATACAGTATCAGATCTGGGAGACCAAAAGCGTTTCCACTAGAAATTA
TTTTGTTAACTTTAGAAAGGAGATATACGATGAAAAAAAGGATTTATCGCATTTTAA
TGCTACAGTCTACTTTCTGCTGCAGCCCGTGTGTCAGGTGTTACCGCTGTCCTCT
CTCTTGGTGACCGGGAAGAGGGATAGCTTGTGTCGCCAAGGAAGATGTGTCATCTCT
AAGAACAATTCATCTGCTGCACCAAGTCCCAAGGAAGCACTCTTGGTAGTGACTG
TCCGAGCCCAAGGGCGGGATACAGTCTGCAAGGAGTGTGAAAGGGGCACTTACGGCT
TCCAGAAATACCTCAGGCACTGTCTCAGTTGCAAGACATGTGCGAAAGAAATGTCCCA
GGTGGAGATCTCTCTTGCACAGCTGACAGGACACGCTGTGTGGCTGTAGAGGAGAAC
CAGTTCCCAACGCTACCTGAGTGAGACACACTTCCAGTGCCTGGACTGCAGCCCTGCTT
CAACGGCACCGTGACCAATCCCTGTAAAGGAGACTCAGAAACCCGCTGTGTACTGCCATG
CAGGGTCTCTTCTGAGAGAAAGTGAAGTGCCTGCTTGCAGCCACTGCAAGAAAAATGAG
GAGTGTATGAAGTTGTGCTACCTCTCTGCTGTCGCAAAAGTGTGCAAAAGCCCAAGCACTC
AGTACTCCGATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT
CCGAAAGGAAGCTGAGTTGCTGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATACCTAGCATACCCCTT
GGGCGCTCTAAACGGGCTTTGAGGGGTTTTCGTGAAAGGAGGAATATATCCGGATG
ACCTGCAGGCAAGCTCTAGAATCGATACGATTTTGAAGTGGCAACAGATAAAAAAGCA
GTTTAAAAATTTGCTGTAACCTTTTAAACCAAGCAATACATCTTGTCCCAACAGATGCA
GACAGAGAAGGGCGAAACACTTGCCTGCTGATCATTTAAGCAAAATGCCCTTTCTAAA
GATAAACGCTATAAAGACTATGATCAATAGTTTGAAGAAAGATGTGATCGGTACGGCT
TTTCAAAATTTGCAACCAAGGAATGAATTAATCTCCCTTTTATCAAGAGCGCAAAAGAAAA
ACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGGAGATAGACGGTTCGTGT
TCGTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAATCGAAACAGCAAGAAATGGCGGAAAGCTAAA
AGAAGTATGGAATTAAGACTTAGAAGCAAACTTAAGAGTGTGTGATGATGCAATATCT
TAAATTTTGTATAATAGGAATGGAATTAATTAATAGATGCTAAAAATTTGTATTAAGAGG
AGTGATTAATGAAACAAAAATATAAATTTCTCAAACTTTTAAGCAATACCTAGCATACCT
CAACCAAAATATAAACAATTTGAATTTAAAGAAACCGCATACGTTTACGAAATTTGGAACA
GGTAAAGGGCAATTTAAGCAAGAACTGGCTAAAAATAGTAAGAGATACGCTTATTTGAA
TTAGACAGTCTATTCTCACTTATCGTCAGAAAAATTAACACTGAATCTGCTCACTT
TAATTCACCAAGATTTCTACAGTTTCAATTCCTCAACCAAGAGGATATAAATTTTGTGG
GAGTATTCTCTACCATTTAAGCACACAATTTAAAAAGTGGTTTGTGAAGGCCATCGG
CTGACATCTATCTGATTGTGAAGAGGATCTACAGCGCTAGCTTGGATTTACCGCA
ACACTAGGGTGTCTCTGCACACTCAAGTCTCGATTGAGCAATTTGCTTAAGCTGCCAG
GGAATGCTTTCATCTTAAACCAAGTAAACAGTGTCTTATAAAGACTTACCGGCAATGAC
ACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTGTGTTCAAAATGGGTCAATC
GAGAAATCTGCACTGTTTACTAAAAATCAGTTTCTATCAAGCAATGAAACACGCCAAAG
TAAACAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAATTTGCTTATGCTGATTTATCTATTA
TTAACGGGAGAAATAATCTATAGTGCCTTTTGTAAATTTGAAAGTTACAGCTTACT
AAGGGGAATGTAGATAAATTTAGGTATCTACTGACAGCAAGTGTCTTCCAGGAGCTAAGAG
TCCTTAGCGCTCTTATCATGGGGAAGCTCGATCATGTCAGCAACAAATTAACCTGCCAA
CAGCACTTGAGAAATGGGAGCAATCGAGAAACCCCTCTTACGCTGATTCATGATCTATA
ATAAGCCGTAAGGAGACGGGTTCAAAAGGTTTAAATAGGAGGAAGCAATCAATGCA
TTAGCTAGAACTATTTTTTGAACAAGCTGGAGAAATTTAGAGCAAGTGTCTCCCAAGC
CAGTTACAAAGAGCTAGTGCACTAAACATAATTTAAGCGCTATAAGTGTGTGGAACACT
GTATATTTGAAAAAGCCGTAGAGAAATTTAAAGCAAGAGGAGAAATTTAGAGAAATTTTA
ATGCCATATGCGTGGCCGTATAGGTGGGAACATATAATTTTCTTGGAGAAATCAAAAT
GAAGGATTACATGACACTGGGCAATGAATTTACGCTTCTACGATAAAGAGGCGCTTT
TATCTTAATATACGGCTCTTTTATAGAAAAATCCCTAGCGTGGTTTTTTTCGGAATG

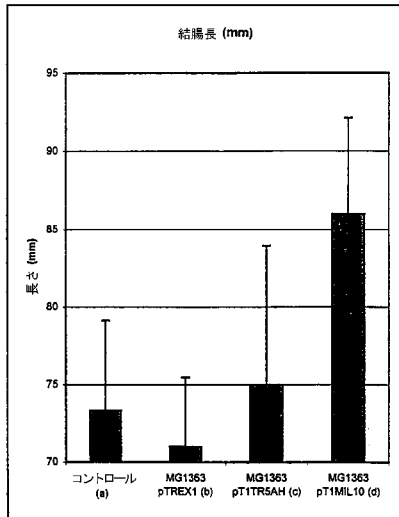
pT1TR5AH (cont.) Figure 1c (cont.)

CTGGCGGTACCCCAAGAAATAGAAATGAGTAGATCAAAATATTCAAGATAGAAATCAGGA
AAATCAGATCCAAACCAATAAAAAACATAGAACAAATTTGCAAGTTAACTAAGTCAACGCTAG
TAGTGGATTTAATCCCAATGAGCCCAACAGAACGAGCCAGAAACAGAAATCAGAAACA
GTAACTTGGATTTAGAAATGGAAGAGAAAGAAAGCAATGACCTTGTGTAATATGCGAC
GAAATCGTGTCTTATTTTTTAAAGCGGTATACATAGATATAACGAAACCAACGAACTGA
ATAGAAACGAAAAAGAGCCATGACACATTTTAAATATGTTTGAAGCATTTTATAAATGCA
ATAGCCCGATAGAAATTTGCAACCAAGCTTATAGTTTGTGAGTGAAGCTCTTCCCTCG
TAAGAAATTTATTAATGACTTGTGTTGAAGAGCTATATAACGCTACTATCAATATATAG
GAAATCAGAGAGTTTCAAGTATCTAAGCTATGAAATTTAAGAAATTTGTAAGCAATCAATC
GAAATCGTGTGATTTGCTTTTTTGTATTCATTTATAGAAAGTGGAGTTTGTATGAATCAT
GTGAATGTAAACCTTATATAAAAAATAGTTTATGGAGATAAGAAATTTAGCAAAATATCTA
TACACTAGAAACGTTTAAAGAAAGAGTTAGAAAGAGAGAAATATCTACTTAGAAACAAATCA
ATAAGATTTTCTTGGAGGGGGAAGATTTATATATAAGTTTAAATAGAAATATAACAAATA
TAATTTATCGATTTAGTGGAAAAATTTGACTTATAAGGAAAAATATCTTTTCAAAACAT
GCAATATTGAACACCTTGAATGAAAGCAACCAAGTTAATTAACCAACCTATTTTATAG
GATTTATAGAAAGGAGAACAGCTGAATGAATATCCCTTTTGTGTGAGAACTGTGCTTC
ATGACGGCTTTTAAAGTACAAATTTAAATATAGTAAAAATTCGCTCAATCACTACCAAGCC
AGGTAAAGGCAAGGGGCTATTTTGGGTATCGCTCAAAATCAAGCATGATTTGGCGGCTC
GTGGTGTGTTGCTGACTTCCGAGAAAGCATTAAGCAAGTAAAGTAAATCAATATCAATTA
GGAACCCCAAGCTTTTGTATGAGTATGAGCAAGTATGAGCAAGCAAAACCGCTTATGAG
GGACATCTGAAACAAATTTAAGCAAAATCAATACCTTCTTATGATTTTGTATATCAAC
GGCAAAAGAAACATTTTCAAGCAAGCGATTTTAAACACCGCTTATGATTTAGGTTTATG
CCTACTATGATTTCAAACTGATAAGGTTTATCAAGCATATTTTGTGTAAGAACGCCAG
TCTATGTGACTTCAAAATCAGAAATTTAATCTGTCAGAAAGCAAGCAAAATTTTCCGCAAA
TATCCGAGAAATTTTGGAAAGTCTTGGCAAGTGTATCAAGCTGAATCAATTTTGGTATT
GCTCGCATACCAAGAGGCAAGTATGAAATTTTATGCTTAATTTACCGTATTATCTTCA
AAGAAATGGCAAGTGTGCTTTCACCAACCAAGATAAAGGGCTTTTACTCGTTCAGCTC
TAACGGTTTTAAGCGGTACAGAAAGGCAAAACCAAGTATGATGAACCTGCTGTTTAACTCT
TATTGACGCAAAACGAAATTTTTCAGGAGAAAGGGTTTAAAGGGGCTAATAACGTCATGT
TTACCTCTCTTTAGGCTTACTTATGTTGAGGCTTCAATCGAAACGTCGCAATATAATAT
GTTTGAGTTTAAATCGATTAGATCAACCTTGAAGAAAGAAAGTAAATCAATTAATGTT
AGAAATGCTTATTCAGAAACATCAAGGGGCTAATAGGGAATACATACCATCTTTCG
AAAGCTTGGGTATCAAGTGAATTTAACAGTAAAGATTTTGTGCTGCAAGGGTGTGTT
AAATTCAGAAAAAGAGGCAAGCTCAAGCTGTTTCAATTTGTCAGAAATGGAAGAAAGAT
TTAATGGCTTATTTAGCGAAAAAGGATGATACAGCCCTTATTTAGTGACGACCAAAAA
AAGAGATTAGAGAGTGTGAGGCTTCTGCAAGCGACATAGATAAATTTGCTGAAGGTA
CTGAAGGCGAATCAGGAAATTTTCTTAAAGTAAACAGGAGAAATTTGGTGGCAATCAA
CTTGCTAGTGTAAATCAATTTGCTATCGATCAATTAAGTAAAAAGGAGAAAGAAAGAA
GCTATATAAGGCGCTGACAAATCTTTTGAATTAGAGCATACATTTTCAAGAGACTTT
AAACAGCTAGCAGAACCGCTTAAACGAGCACACCACTCGATTTGTTAGCTATGATAC
AGGCTGAAAAATAAACCGCACTATGCGATTACATTTATATCTATGATACGTTGTTGTTT
TCTTGTGCTTTTAGCGATGATAGCGAAATATACAGAGTAAGATTTTAAATTAATATTA
GGGCGGAAAGGAGAGATGACCCGAGTGTGACGCAAGCAATTTTGAAGTAAAGTAAAG
GGAAAGGCTACTAAACGTCAGGGGCTGAGAGCGAAGCGAAGCACTGATTTTATTA
ATTTCTATCTTTATAGGTCATTAGAGTATCTATTGTCCTATAAACATTTAGCAGCA
TAATAGATTTATAGAGTGTCTTAAAGTTGAGCATATAGAGGAGGAAATCTTGGAGA
AATATTGAAGAACCCGATACATGGAATTTGATTTGCTTGTGGTACGTTGTTTAAAC
TAAAGTAGTGAATTTTGAATTTTGGTGTGTGTGCTTGTGATGATTTGCTAGTCA
AGTGAATTAATA

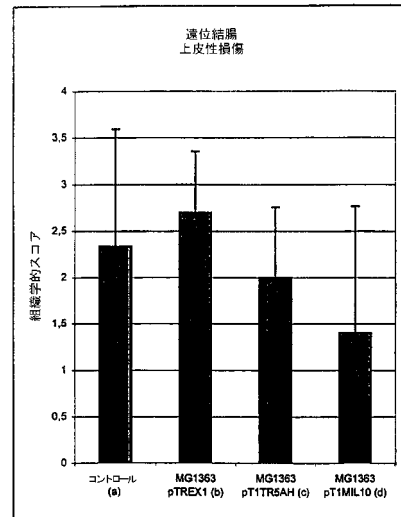
【図 2】



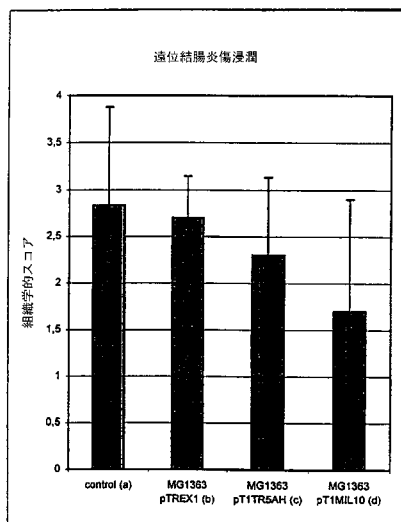
【図 3】



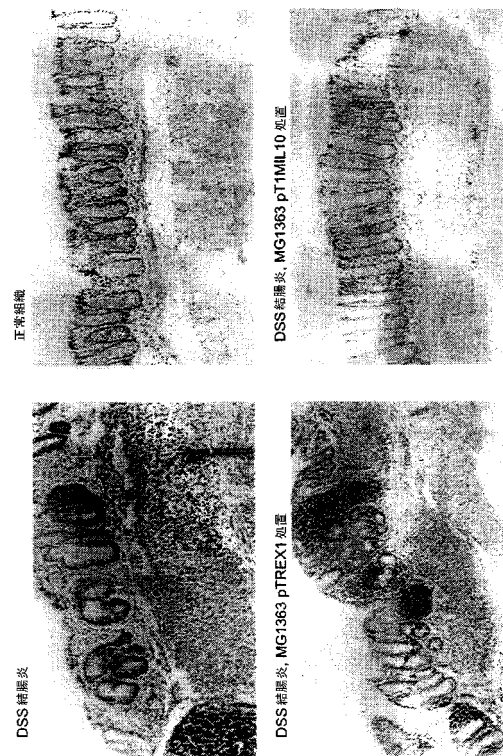
【図 4】



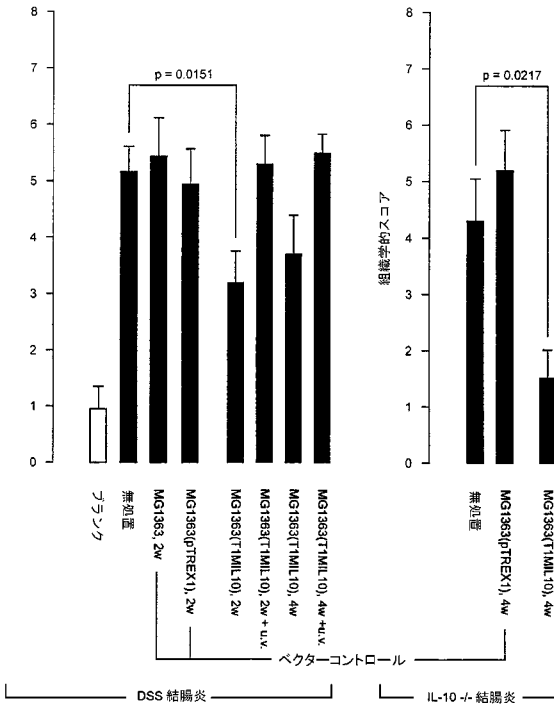
【図 5】



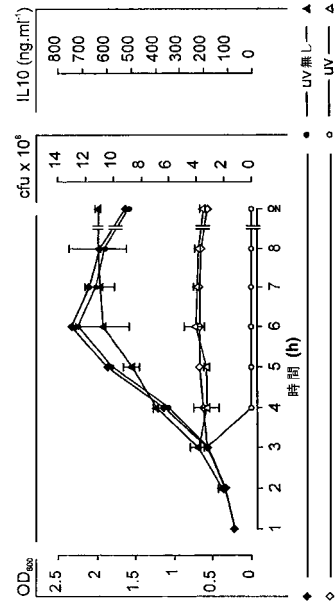
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02

- (72)発明者 ステイドラー, ロタール
ベルギー国、ペー9160 ロケレン、ボックスラールストラート 41
- (72)発明者 レマウト, エリック・レーネ
ベルギー国、ペー9921 フィンデルハウテ、ベルフストラート 7
- (72)発明者 フィアス, ウォルター
ベルギー国、ペー9070 デステルベルヘン、ペーケンドレーフ 3

審査官 遠藤 広介

- (56)参考文献 特表平10-506791 (JP, A)
特表平08-500362 (JP, A)
特表平09-505812 (JP, A)
特表平06-506446 (JP, A)
HERFARTH, H.H. et al, Interleukin 10 suppresses experimental chronic, granulomatous inflammation induced by bacterial cell wall polymers, Gut, 1996年, Vol.39, No.6, p.836-845

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 35/00-35/74
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)