

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5657251号

(P5657251)

(45) 発行日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)

(24) 登録日 平成26年12月5日 (2014. 12. 5)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/00 (2006. 01)

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/02 (2006. 01)

C 1 2 N 7/02

A 6 1 K 39/29 (2006. 01)

A 6 1 K 39/29

A 6 1 P 31/14 (2006. 01)

A 6 1 P 31/14

請求項の数 13 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-523678 (P2009-523678)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月11日 (2008. 7. 11)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/062977
 (87) 国際公開番号 W02009/011413
 (87) 国際公開日 平成21年1月22日 (2009. 1. 22)
 審査請求日 平成23年2月16日 (2011. 2. 16)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-184587 (P2007-184587)
 (32) 優先日 平成19年7月13日 (2007. 7. 13)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 591222245
 国立感染症研究所長
 東京都新宿区戸山一丁目2 3 番 1 号
 (73) 特許権者 591063394
 公益財団法人東京都医学総合研究所
 東京都世田谷区上北沢2 - 1 - 6
 (73) 特許権者 000003159
 東レ株式会社
 東京都中央区日本橋室町2 丁目1 番 1 号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エピトープタグ化C型肝炎ウイルス粒子の作製と利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の (a) または (b) を含む核酸であって、前記 (a) または前記 (b) の E 2 タンパク質コード配列の超可変領域 1 (HVR 1) にエピトープタグペプチドをコードする核酸配列を含む、ただし、前記エピトープタグペプチドが、前記 E 2 タンパク質の N 末端の 1 1 番目～1 7 番目のアミノ酸を除去した位置に挿入されること、かつ、前記超可変領域 1 (HVR 1) の配列の C 末端アミノ酸の次のアミノ酸を 1 番としたとき、前記キメラ HCV ゲノム (b) の場合に 1 2 2 番目または前記キメラ HCV ゲノム (a) の場合に 1 2 4 番目のアミノ酸であるアスパラギンをリジンに置換する変異を含むことを特徴とする、核酸。

(a) C型肝炎ウイルス (HCV) の J 6 C F 株の 5' 非翻訳領域、J 6 C F 株の C o r e タンパク質コード配列、J 6 C F 株の E 1 タンパク質コード配列、J 6 C F 株の E 2 タンパク質コード配列、J 6 C F 株の p 7 タンパク質コード配列、および J 6 C F 株の N S 2 タンパク質コード領域の N 末端の 1 番目から 1 6 番目 アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、J F H - 1 株の N S 2 タンパク質コード領域の N 末端の 1 7 番目 アミノ酸残基から C 末端までコードする配列、J F H - 1 株の N S 3 タンパク質コード配列、J F H - 1 株の N S 4 A タンパク質コード配列、J F H - 1 株の N S 4 B タンパク質コード配列、J F H - 1 株の N S 5 A タンパク質コード配列、J F H - 1 株の N S 5 B タンパク質コード配列および J F H - 1 株の 3' 非翻訳領域、を含むキメラ C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム

10

20

(b) C型肝炎ウイルス (HCV) の JFH-1 株の 5' 非翻訳領域、TH株の Core タンパク質コード配列、TH株の E1 タンパク質コード配列、TH株の E2 タンパク質コード配列、TH株の p7 タンパク質コード配列、および TH株の NS2 タンパク質コード領域の N 末端の 1 番目から 33 番目アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、JFH-1 株の NS2 タンパク質コード領域の N 末端の 34 番目アミノ酸残基から C 末端までコードする配列、JFH-1 株の NS3 タンパク質コード配列、JFH-1 株の NS4A タンパク質コード配列、JFH-1 株の NS4B タンパク質コード配列、JFH-1 株の NS5A タンパク質コード配列、JFH-1 株の NS5B タンパク質コード配列および JFH-1 株の 3' 非翻訳領域、を含むキメラ C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム

【請求項 2】

10

前記エピトープタグペプチドは、DYKDDDDK または DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK からなるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

前記エピトープタグペプチドは、リンカー配列をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

前記リンカー配列は、GGG 配列、GGGGS 配列もしくは (GGGGS)₃ 配列、または、前記 GGG 配列、前記 GGGGS 配列もしくは前記 (GGGGS)₃ 配列の一部において 1～10 個のアミノ酸の欠失、置換または付加を含むリンカー配列である、請求項 3 に記載の核酸。

20

【請求項 5】

配列番号 11、12、41 または 42 で示される核酸配列において前記変異 E2 タンパク質コード配列を含む、ただし核酸が RNA の場合は配列表の塩基記号「T」は「U」に読み替えるものとする、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 6】

配列番号 20 または 21 で示される、ただし核酸が RNA の場合は配列表の塩基記号「T」は「U」に読み替えるものとする、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 8】

30

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の核酸をゲノムとして含有するエピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のエピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を産生する細胞。

【請求項 10】

Hu h7 またはその派生株である、請求項 9 に記載の細胞。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の細胞からエピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を生成する生成ステップと、

前記エピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を含有する液体を抗エピトープタグ抗体固定化担体に接触させ、前記エピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を前記抗エピトープタグ抗体固定化担体に吸着させる吸着ステップと、

40

前記エピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を前記抗エピトープタグ抗体固定化担体から遊離させて前記エピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子を得る遊離ステップと、

を備える、エピトープタグ化 C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子の精製方法。

【請求項 12】

前記遊離ステップは、エピトープタグペプチド含有緩衝液、カルシウム不含緩衝液、pH 2.5～pH 4.0 の 0.1 M グリシン緩衝液、pH 4.0～pH 5.0 の 1 M アルギニン塩酸緩衝液または 0.1 mM～1 mM の塩酸のいずれかを用いて、前記抗エピト-

50

プタグ抗体固定化担体から前記エピトープタグ化C型肝炎ウイルス（HCV）粒子を遊離させる、請求項11に記載の精製方法。

【請求項13】

請求項8に記載のエピトープタグ化C型肝炎ウイルス（HCV）粒子を不活化して得られる不活化HCV粒子を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルス（HCV）ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エピトープタグ化C型肝炎ウイルス粒子、該ウイルスを生産するためのベクター、該ウイルス粒子を生産する細胞株に関する。また、本発明は、該ウイルス粒子を精製する方法、該ウイルス粒子を不活化して得られるワクチン、抗原としての該ウイルス粒子に対する抗C型肝炎ウイルス抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

C型肝炎ウイルス（HCV：Hepatitis C virus；以下、単に「HCV」と称することもある）は非A非B肝炎の主要な原因ウイルスとして発見同定され（非特許文献1）、高感度なHCVの検出方法が確立されたことにより、輸血による新たなHCV感染患者は激減した。しかしながら、日本におけるウイルス保有者は肝炎の症状を示していない、いわゆるウイルスキャリアを含めると200万人以上、世界で1億7000万人以上と推定されている。それはHCV感染による肝炎の慢性化率が70～80%と高いことや、現在のところインターフェロン以外の有効な抗ウイルス剤がないことが大きな原因となっている。さらに、C型肝炎は予後の悪い深刻な感染症であり、C型慢性肝炎患者の半数程度は肝硬変、肝癌へと病態が確実に悪化していく。こうしたことから、キャリアの発症予防やウイルスの排除を目的とした抗ウイルス薬やワクチンの開発が望まれている。

HCVに対する治療薬を開発するためには、感染性HCV粒子やHCVが増殖するメカニズムを研究するための細胞培養系が必要である。これまで、HCVを効率よく増殖させることのできる実験系としては、チンパンジーを用いた動物実験系のみしか存在しなかったことが、HCV治療薬の開発の遅れの主たる原因であった。しかし、2005年に脇田らによって、細胞培養系で感染性ウイルスを作製する技術が開発され（特許文献1および2、非特許文献2）、感染性HCV粒子を用いて、HCV治療薬を開発することが可能となった。

このような状況にあって、細胞培養系で産生された感染性HCV粒子を精製するための公知の技術（特許文献2および非特許文献3）よりも、簡便かつ高純度に感染性HCV粒子を精製する新たな技術開発の必要性がある。

細胞培養系で得られたタンパク質を簡便にかつ高純度に精製する方法としては、目的タンパク質を標識となるタンパク質との融合タンパク質として発現させ、標識となるタンパク質に対する抗体やこれに特異的に結合する分子で融合タンパク質を精製する技術が知られている。

標識となるタンパク質はエピトープタグあるいは単にタグ（Tag）と呼称される。エピトープタグとしては、FLAGペプチド、3XFLAGペプチド、HAペプチド、3XHAペプチド、mycペプチド、6XHISペプチド、GSTポリペプチド、MBPポリペプチド、PDZドメインポリペプチド、TAP（Tandem Affinity Purification）ペプチド、アルカリフォスファターゼ、アビジンなどが知られている。これらのペプチドまたはポリペプチドは、通常目的のタンパク質のN末端またはC末端に融合されるが、場合によっては目的のタンパク質内に挿入することもできる。

しかし、タンパク質にエピトープタグを付加する際に、タンパク質の種類、エピトープタグの種類、タンパク質上のエピトープタグの付加位置などによって、タンパク質本来の生物活性や立体構造が変化しないという保証はない。そのためタンパク質毎、エピトープタグの種類毎、さらにはエピトープタグの付加位置毎にエピトープタグ化タンパク質の生

10

20

30

40

50

物学的機能を調べる必要がある。

HCVのゲノムは、約9600ヌクレオチドからなる(+)鎖の一本鎖RNAである。このゲノムRNAは、5'非翻訳領域(5'NTRまたは5'UTRとも表記する)、構造領域と非構造領域とから構成される翻訳領域、および3'非翻訳領域(3'NTRまたは3'UTRとも表記する)からなる。その構造領域にはHCVの構造タンパク質がコードされており、非構造領域には複数の非構造タンパク質がコードされている。

このようなHCVの構造タンパク質(Core、E1、E2およびp7)と非構造タンパク質(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、およびNS5B)は、翻訳領域から一続きのポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼによる限定分解を受けて遊離、生成される。構造タンパク質のうち、Coreはコアタンパク質であり、E1およびE2はエンベロープタンパク質である。非構造タンパク質はウイルス自身の複製に関与するタンパク質であり、NS2はメタロプロテアーゼ活性、NS3はセリンプロテアーゼ活性(N末端側の3分の1)とヘリカーゼ活性(C末端側の3分の2)を有することが知られている。さらに、NS4AはNS3のプロテアーゼ活性に対するコファクターであり、NS5BはRNA依存RNAポリメラーゼ活性を有することも報告されている。

HCVはエンベロープと呼ばれる被膜で包まれている。エンベロープは宿主細胞の膜に由来する成分とウイルスに由来するタンパク質からなる。HCVのエンベロープを構成するタンパク質は、エンベロープタンパク質1(E1と呼称する)、エンベロープタンパク質2(E2と呼称する)およびp7からなる。特にE1およびE2はそのC末端に膜貫通領域を持っており、HCVの膜にこの膜貫通領域を介してアンカーされ、HCV粒子形成や感染に関与している(非特許文献4、非特許文献5)。

E2タンパク質のアミノ末端側にはウイルス株間で著しく配列の異なるところが2カ所存在し、超可変領域1(HVR1と呼称する)と超可変領域2(HVR2と呼称する)と命名されている(非特許文献6)。HVR1はE2タンパク質のアミノ末端部分の27アミノ酸からなり、E2タンパク質の表面に露出してB細胞エピトープになっている。HVR1のアミノ酸配列の多様性は最大80%を示すがアミノ酸が保存されている部分も数カ所認められることから、ウイルスの生存にはある一定の2次構造が必要であると考えられている。さらにHVR1にはシステイン残基やアスパラギン結合型糖鎖付加シグナルはほとんど存在しない。一方、HVR2は7アミノ酸よりなり、E2タンパク質のアミノ末端より91-97番目に位置している。HVR2はHCV1b型のゲノムに存在するが、他の遺伝型のHCVには存在しない。

HCVにおいてウイルス粒子にエピトープタグが挿入された例としては、JFH-1株(HCV2a型)のE2タンパク質のHVR1がHAペプチドに置換されたものが公知であり、感染性を有することが確かめられている(非特許文献2)。しかしながら、この感染性エピトープタグ化HCV粒子が高純度に精製できたとの報告はない。

【特許文献1】WO05080575A1

【特許文献2】WO06022422A1

【非特許文献1】Choo, Q.L. et al., Science, 244:359-362, 1989

【非特許文献2】Wakita, T. et al., Nat. Med., 11:791-796, 2005

【非特許文献3】Zahn, A. & Allain, J.P., J. Gen. Virol., 86:677-685, 2005

【非特許文献4】Voisset, C. & Dubuisson, Biology of the Cell, 96:413-420, 2004

【非特許文献5】Op De Beeck, A. et al., J. Gen. Virol., 82:2589-2595, 2001

【非特許文献6】Hijikata, M. et al., Biochem Biophys Res Commun., 175:220-228, 1991

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【0003】

本発明の目的は、H C V粒子を簡便かつ高純度に精製可能なエピトープタグ化H C V粒子とその精製方法、および高純度H C V粒子を用いたワクチン等を提供することにある。

本発明者らは、H C V粒子の細胞培養での生産性および感染性に影響しないエピトープタグの種類およびエピトープタグを付加するH C Vタンパク質と付加位置との組み合わせを検討し、本発明の第一の目的であるエピトープタグ化H C V粒子の作製に成功した。さらに、このH C V粒子を高生産するクローンを作製し、産生されたエピトープタグ化H C V粒子が抗エピトープタグ抗体カラムを用いて1ステップで高純度に精製できることを確認し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の(1)～(15)に関する。

(1) 下記の(a)、(b)または(c)を含む核酸であって、(a)、(b)または(c)のE2タンパク質コード配列の超可変領域1(HVR1)にエピトープタグペプチドをコードする核酸配列を含む、核酸。

(a) C型肝炎ウイルス(HCV)のJFH-1株のゲノム

(b) HCVのJ6CF株の5'非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列およびp7タンパク質コード配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列および3'非翻訳領域、を含むキメラHCVゲノム

(c) HCVのJFH-1株の5'非翻訳領域、TH1株のCoreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列およびp7タンパク質コード配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列および3'非翻訳領域、を含むキメラHCVゲノム

(2) 上記エピトープタグペプチドは、DYKDDDDKまたはDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKからなるアミノ酸配列を含む、上記(1)に記載の核酸。

(3) 上記エピトープタグペプチドは、リンカー配列をさらに含む、上記(1)または(2)に記載の核酸。

(4) 上記リンカー配列は、GGG配列、GGGGS配列もしくは(GGGGS)₃配列、または、GGG配列、GGGGS配列もしくは(GGGGS)₃配列の一部において1～10個のアミノ酸の欠失、置換または付加を含むリンカー配列である、上記(3)に記載の核酸。

(5) 配列番号11、12、30、31、41または42で示される、上記(1)～(4)のいずれかに記載の核酸(ただし核酸がRNAの場合は配列表の塩基記号「T」は「U」に読み替えるものとする)。

(6) 上記超可変領域1(HVR1)の最後の配列の次のアミノ酸を1番としたとき、122番目または124番目のアミノ酸であるアスパラギンをリジンに置換する変異を含む、上記(1)～(5)のいずれかに記載の核酸。

(7) 配列番号20または21で示される、上記(6)に記載の核酸(ただし核酸がRNAの場合は配列表の塩基記号「T」は「U」に読み替えるものとする)。

(8) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の核酸を含有するベクター。

(9) 上記(1)～(7)のいずれかに記載の核酸をゲノムとして含有するエピトープタグ化HCV粒子。

(10) 上記(9)に記載のエピトープタグ化HCV粒子を含有する細胞。

(11) Hu h7またはその派生株である、上記(10)に記載の細胞。

(12) 上記(10)または上記(11)に記載の細胞からエピトープタグ化HCV粒子を生成する生成ステップと、

上記エピトープタグ化HCV粒子を含有する液体を抗エピトープタグ抗体固定化担体に接触させ、そのエピトープタグ化HCV粒子を抗エピトープタグ抗体固定化担体に吸着さ

10

20

30

40

50

せる吸着ステップと、

上記エピトープタグ化HCV粒子を上記抗エピトープタグ抗体固定化担体から遊離させてエピトープタグ化HCV粒子を得る遊離ステップと、

を備える、エピトープタグ化HCV粒子の精製方法。

(13) 上記遊離ステップは、エピトープタグペプチド含有緩衝液、カルシウム不含緩衝液、pH2.5～pH4.0の0.1Mグリシン緩衝液、pH4.0～pH5.0の1Mアルギニン塩酸緩衝液または0.1mM～1mMの塩酸のいずれかを用いて、上記抗エピトープタグ抗体固定化担体から上記エピトープタグ化HCV粒子を遊離させる、上記(12)に記載の精製方法。

(14) 上記(9)に記載のエピトープタグ化HCV粒子を不活化して得られるHCVワクチン。 10

(15) 抗原としての上記(9)に記載のエピトープタグ化HCV粒子に対する抗HCV抗体。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2007-184587号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、HCV E2の構造図を示す。N1～N11は糖鎖付加部位、HVRはHyper Variable Region、TMDはTrans Membrane Domainを示す。J6/JFH-1のE2 HVR1のアミノ酸の一部(下線)の部分を除き、そこにFLAGタグ配列(下線)を挿入した。 20

図2A、図2Bおよび図2Cは、pJ6/JFH-1(1XFLAG)、pJ6/JFH-1(3XFLAG)プラスミドの構築図を示す。図2Bは、図2Aの続きであり、図2Cは、図2Bの続きである。

図3は、J6/JFH-1 RNAおよびJ6/JFH-1(3XFLAG) RNAをHuh-7細胞に導入後の培養上清中のHCV Coreタンパク質量の変化を示す。J6/JFH-1ではその産生量に変化はなかったが、J6/JFH-1(3XFLAG)ではCore産生量が22日目まで減少したが、その後、増加し35日目でJ6/JFH-1とほぼ同じ産生量となった。

図4は、J6/JFH-1 RNAおよびJ6/JFH-1(3XFLAG) RNAをHuh-7細胞に導入後、4、17、30、43日目のHCV CoreおよびE2タンパク質の発現を示す。J6/JFH-1(3XFLAG)において、30、43日目のE2タンパク質の分子量は4日目よりも低くなっていることが示された。 30

図5は、J6/JFH-1(3XFLAG) RNAをHuh-7細胞に導入後、4、17、30、43日目のHCV E2タンパク質をエンドグリコシダーゼ(PNGase F)で処理したときの挙動を示す。エンドグリコシダーゼ処理することにより、図4で見られたような分子量の違いは見られなくなった。

図6は、J6/JFH-1(3XFLAG) RNA導入後、8日目と39日目のHCV ゲノムの配列解析を示す。RNA導入後から39日目でE2領域の糖鎖付加部位であるアスパラギン(N6)がリジン(K)に置換されていた。 40

図7は、J6/JFH-1(3XFLAG) ウイルスの精製溶液中のHCV Coreタンパク質量を示す。1XFLAGペプチドまたは3XFLAGペプチド溶出によりHCV Coreタンパク質が検出されたことから、HCV粒子の精製が確認された。

図8は、精製したJ6/JFH-1(3XFLAG) ウイルス溶液中に含まれる夾雑タンパク質について示す。精製したウイルス溶液中には夾雑タンパク質はほとんど含まれていなかった。

図9は、精製したJ6/JFH-1(3XFLAG) ウイルスの感染性について示す。各ウイルスを感染後、4日目の細胞内のHCV RNAを定量した。精製したウイルスは未精製のウイルスと同等の感染性を有することが確認された。

図10A、図10Bおよび図10Cは、pJ6/JFH-1(1XFLAG) N→K、 50

pJ6/JFH-1 (3XFLAG) N→Kプラスミドの構築図を示す。図10Bは、図10Aの続きであり、図10Cは、図10Bの続きである。

図11は、HCV E2の構造図を示す。N1～N11は糖鎖付加部位、HVRはHyper Variable Region、TMDはTrans Membrane Domainを示す。JFH-1のE2 HVR1のアミノ酸の一部（下線）の部分を除き、そこにFLAGタグ配列（下線）を挿入した。

図12A、図12Bおよび図12Cは、pJFH-1 (1XFLAG)、pJFH-1 (3XFLAG) プラスミドの構築図を示す。図12Bは、図12Aの続きであり、図12Cは、図12Bの続きである。

図13は、HCV E2の構造図を示す。N1～N11は糖鎖付加部位、HVRはHyper Variable Region、TMDはTrans Membrane Domainを示す。pTH/JFH-1のE2 HVR1のアミノ酸の一部（下線）の部分を除き、そこにFLAGタグ配列（下線）を挿入した。

図14A、図14Bおよび図14Cは、pTH/JFH-1 (1XFLAG)、pTH/JFH-1 (3XFLAG) プラスミドの構築図を示す。図14Bは、図14Aの続きであり、図14Cは、図14Bの続きである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明の実施にあたっては、当該分野の技術の範囲内にある分子生物学および免疫学の従来技術を利用するものとする。このような技術は、当業者には自明であり、既報において十分に説明されている（たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版、2001）、Ed Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual（1988）を参照）。

また、本明細書中に引用されている全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体が本明細書に参考として、援用される。

1. エピトープタグ化HCV粒子

本発明にかかる「エピトープタグ化HCV粒子」とは、HCVの構造タンパク質内にエピトープタグペプチドが付加されたHCV粒子を意味する。このエピトープタグ化HCV粒子は、細胞培養系で生産でき、好ましくは感染性を保有している。

細胞培養系でHCV粒子を生産するためには、JFH-1株由来の全長遺伝子、またはJFH-1株と他のHCV株とのキメラ遺伝子を用いる必要があり、その基本技術は、WO04104198A1、WO06022422A1、Wakita, T. et al., Nat. Med. 11: 791-796, 2005、およびLindenbach, B. D. et al., Science 309: 623-626, 2005に記載されている。

すなわち、HCV粒子を生成できる遺伝子の1つの形態は、JFH-1株のウイルスゲノムRNAであって、5'側から3'側に順番に、5'非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列および3'非翻訳領域からなるRNAである。

HCV粒子を生成できる遺伝子の別な形態は、2種類以上のHCV株のウイルスゲノムRNAからなるキメラ遺伝子であって、たとえば、5'側から3'側に順番に、JFH-1株以外のHCV株の5'非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列およびNS2タンパク質コード配列、ならびに、JFH-1株のNS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列および3'非翻訳領域からなるRNAである。

具体的には、HCV粒子を生成できる遺伝子としては、下記の(a)、(b)および(c)

10

20

30

40

50

c) の核酸、すなわち、

(a) 5' 側から 3' 側に順番に、J F H 1 株のゲノム (すなわち J F H-1 株由来の 5' 非翻訳領域、C o r e タンパク質コード配列、E 1 タンパク質コード配列、E 2 タンパク質コード配列、p 7 タンパク質コード配列、N S 2 タンパク質コード配列、N S 3 タンパク質コード配列、N S 4 A タンパク質コード配列、N S 4 B タンパク質コード配列、N S 5 A タンパク質コード配列、N S 5 B タンパク質コード配列および 3' 非翻訳領域を含む核酸: (配列番号 30: p J F H-1 (1 X F L A G)、配列番号 31: p J F H-1 (3 X F L A G) 参照))

(b) 5' 側から 3' 側に順番に、J 6 C F 株の 5' 非翻訳領域、C o r e タンパク質コード配列、E 1 タンパク質コード配列、E 2 タンパク質コード配列および p 7 タンパク質コード配列、ならびに、J F H-1 株の N S 2 タンパク質コード配列、N S 3 タンパク質コード配列、N S 4 A タンパク質コード配列、N S 4 B タンパク質コード配列、N S 5 A タンパク質コード配列、N S 5 B タンパク質コード配列および 3' 非翻訳領域を含むキメラ H C V ゲノム (好ましくは、5' 側から 3' 側に順番に、J 6 C F 株由来の 5' 非翻訳領域、C o r e タンパク質コード配列、E 1 タンパク質コード配列、E 2 タンパク質コード配列、p 7 タンパク質コード配列、および N S 2 タンパク質コード領域の N 末端 16 アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、J F H-1 株の N S 2 タンパク質コード領域の N 末端 17 アミノ酸残基から C 末端までコードする配列、N S 3 タンパク質コード配列、N S 4 A タンパク質コード配列、N S 4 B タンパク質コード配列、N S 5 A タンパク質コード配列、N S 5 B タンパク質コード配列および 3' 非翻訳領域からなるキメラ H C V ゲノム: 配列番号 10: p J 6 / J F H-1、配列番号 11: p J 6 / J F H-1 (1 X F L A G)、配列番号 12: p J 6 / J F H-1 (3 X F L A G) 参照)

(c) 5' 側から 3' 側に順番に、J F H 1 株の 5' 非翻訳領域、T H 1 株の C o r e タンパク質コード配列、E 1 タンパク質コード配列、E 2 タンパク質コード配列および p 7 タンパク質コード配列、ならびに、J F H-1 株の N S 2 タンパク質コード配列、N S 3 タンパク質コード配列、N S 4 A タンパク質コード配列、N S 4 B タンパク質コード配列、N S 5 A タンパク質コード配列、N S 5 B タンパク質コード配列および 3' 非翻訳領域を含むキメラ H C V ゲノム (好ましくは、5' 側から 3' 側に順番に、J F H-1 株由来の 5' 非翻訳領域、T H 株の C o r e タンパク質コード配列、E 1 タンパク質コード配列、E 2 タンパク質コード配列、p 7 タンパク質コード配列、および N S 2 タンパク質コード領域の N 末端 33 アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、J F H-1 株の N S 2 タンパク質コード領域の N 末端 34 アミノ酸残基から C 末端までコードする配列、N S 3 タンパク質コード配列、N S 4 A タンパク質コード配列、N S 4 B タンパク質コード配列、N S 5 A タンパク質コード配列、N S 5 B タンパク質コード配列および 3' 非翻訳領域からなるキメラ H C V ゲノム: 配列番号 40: p T H / J F H 1、配列番号 41: p T H / J F H 1 (1 X F L A G)、配列番号 42: p T H / J F H 1 (3 X F L A G) 参照)、を挙げることができる。

本発明では、上記 H C V ゲノムに対し、その E 2 タンパク質コード配列の超可変領域 1 (H V R 1) 中にエピトープタグペプチドである D Y K D D D D K G G G (配列番号 49) または D Y K D H D G D Y K D H D I D Y K D D D D K G G G (配列番号 50) をコードする核酸配列をインフレームで挿入するか、または当該領域の一部を上記エピトープタグペプチドで置換し、エピトープタグ化 H C V ゲノム D N A を作製する。そして、この D N A を用いて「エピトープタグ化 H C V 粒子」を培養細胞系で産生させ、高純度で精製されたエピトープタグ化 H C V 粒子を取得する。

2. エピトープタグ化 H C V 粒子の作製

(1) H C V 構造タンパク質内にエピトープタグを持つ H C V ゲノム D N A の作製

本明細書で用いられる「エピトープタグ (あるいは単にタグ (T a g) と呼称する)」は、H C V の標識に使用可能のものであれば特に限定されるものではないが、たとえば、F L A G ペプチド (f l a g ペプチド、F l a g ペプチドとも呼称する)、3 X F L A G ペプチド (3 x F L A G ペプチド、3 x F l a g ペプチド、3 X f l a g ペプチドとも呼

10

20

30

40

50

称する)、HAペプチド、3XHAペプチド、mycペプチド、6XHisペプチド、GSTポリペプチド、MBPポリペプチド、PDZドメインポリペプチド、TAP (Tandem Affinity Purification) ペプチド、アルカリフォスファターゼ、アビジン等を挙げることができる。本発明においては、エピトープタグペプチドとしてFLAGペプチド(アミノ酸配列: DYKDDDDK (配列番号51))または3XFLAGペプチド(アミノ酸配列: DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK (配列番号52))を用いるが、なかでも3XFLAGペプチドがより好適である。

上記エピトープタグを付加する場所はHCV粒子のE2タンパク質のHVR1領域である。エピトープタグは、HVR1領域内において各HCV株間での相同性が低いE2タンパク質のN末端から数えて、8~19番目アミノ酸の間にインフレームで(読み枠がズレないように)挿入するか、あるいは上記N末端の11~17番目のアミノ酸を除去して、ここにエピトープタグペプチドを挿入するのがより好適である。

上記エピトープタグのC末端には、必要に応じて適当なリンカーを付加する。リンカーとして、アミノ酸配列GGG (配列番号53)、GGGGS (配列番号54)、または(GGGGS)×3 ((GGGGS)₃ともいう)、あるいは、これらのアミノ酸配列の一部に、1~10個程度、好ましくは1~5個、より好ましくは1~2個のアミノ酸の欠失、置換または付加を含むペプチドが使用され、好適な例としてGGG、GGGGS (配列番号54)、(GGGGS)×3が挙げられるが、GGGがより好適である。

上記エピトープタグをコードする核酸をHCVゲノムに導入する方法としては、エピトープタグをコードする核酸配列を含む合成プライマーでHCVゲノムのcDNAを鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、得られたPCR産物を適宜制限酵素処理、ライゲーション処理によりHCVゲノムのcDNAに組み換える方法が挙げられる。これらの手法の例は、後述の実施例に示されている。

使用するHCV株は限定されるものではなく、HCV株の塩基配列を用いた系統解析法によって分類される遺伝子型1a (例えばH77株 (GenBank アクセッション番号AF011751))、遺伝子型1b (例えばJ1株 (GenBank アクセッション番号D89815))、Con1株 (GenBank アクセッション番号AJ238799、Con-1株、con1株と称することもある)、TH株 (Wakita, T. et al., J. Biol. Chem., 269, 14205-14210, 1994、特開2004-179))、遺伝子型2a (例えばJFH-1株 (GenBank アクセッション番号AB047639、JFH1株と称することもある)、J6CF株 (GenBank アクセッション番号AF177036)、JCH-1 (GenBank アクセッション番号AB047640)、JCH-2 (GenBank アクセッション番号AB047641)、JCH-3 (GenBank アクセッション番号AB047642)、JCH-4 (GenBank アクセッション番号AB047643)、JCH-5 (GenBank アクセッション番号AB047644)、JCH-6 (GenBank アクセッション番号AB047645))、遺伝子型2b (例えばHC-J8株 (GenBank アクセッション番号D01221))、遺伝子型3a (例えばNZL1株 (GenBank アクセッション番号D17763))、遺伝子型3b (例えばTr-Kj (GenBank アクセッション番号D49374))の6タイプのいずれに属する株を使用することができる。本明細書の実施例においては、本発明の好ましい例として、非構造タンパク質コード配列および3'非翻訳領域はJFH-1株由来のもので、5'非翻訳領域および構造タンパク質コード配列がTH1株、JFH-1株またはJ6CF株由来の核酸配列を使用した。

HCVのHVRに所望のエピトープタグペプチドを挿入するには、HCVゲノムRNAのcDNAをクローン化したベクターを鋳型にして、エピトープタグペプチドをコードした合成DNAをプライマーとして、PCRを行う。これにより、エピトープタグが目的の場所に付加/挿入されたエンベロープタンパク質をコードするcDNAを得ることができる。

さらに、エピトープタグを持つエンベロープタンパク質をコードするcDNA断片を適

10

20

30

40

50

切な制限酵素で消化して単離し、T7プロモーターなどのプロモーターの下流に完全長のHCVゲノムRNAのcDNAをクローン化したベクターを上記と同じ制限酵素で消化し、同じ位置に単離したエピトープタグ配列を持ったエンベロープタンパク質をコードするcDNA断片を挿入することでエピトープタグを有する完全長HCV cDNAを得ることができる。

ここで使用する完全長のHCVゲノムRNAのcDNAをクローン化したベクターは、このベクターから転写されたRNAをHuh7細胞などのHCV許容性細胞に導入すると、HCV粒子を産生可能なものであり、その構造や作製の詳細はWO04104198A1、WO06022422A1、Wakita, T. et al., Nat. Med. 11:791-796, 2005、Lindenbach, B.D. et al., Science 309:623-626, 2005に記載されている。

10

(2) 細胞培養系によるエピトープタグ化HCV粒子の産生

プロモーターの制御下にエピトープタグコード配列を持つHCV cDNAからRNAを合成し、このRNAを細胞に導入することでエピトープタグ化HCV粒子を含有する細胞が得られ、上記細胞を培養することでエピトープタグ化HCV粒子を作製することができる。プロモーターとしては、限定するものではないが、T7プロモーター、SP6プロモーター、T3プロモーターが挙げられるが、T7プロモーターが特に好ましい。

T7プロモーターの制御下にHCV cDNAを導入し、クローン化した核酸を鋳型として、in vitroでRNAを作製するためには、MEGAscript T7 kit (Ambion社)などのキットを用いることができる。

20

RNAを導入する細胞は、HCV粒子形成を許容する細胞で有れば良く、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、293細胞、あるいはHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞または293細胞にCD81遺伝子および／またはClaudin1遺伝子を発現させた細胞が挙げられる。なかでもHuh7細胞またはHuh7細胞の派生株が好適に使用される。Huh7細胞の派生株としては、Huh7.5細胞、Huh7.5.1細胞を挙げるができる。

RNAを細胞に導入する方法としては、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法が挙げられるが、リポフェクション法およびエレクトロポレーション法が好ましく、エレクトロポレーション法がより好適である。

30

RNAの代わりにcDNAを細胞に導入してもよく、この場合、エピトープタグコード配列を付加したHCV cDNAをRNAポリメラーゼIプロモーターとターミネーターとからなるベクター(Neumann, G. et al., Virology, 202:477-479, 1994、WO2007/037428A1)に機能しうる態様で挿入して、RNAと同じ方法で細胞に導入し、発現させる。

細胞のウイルス粒子産生能は、培養液中に放出されたHCVウイルス粒子を構成する、例えば、Coreタンパク質、E1タンパク質、またはE2タンパク質に対する抗体を用いて評価することができる。また、培養液中のHCVウイルス粒子が含有するHCVゲノムRNAを、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により増幅して検出することによって、HCVウイルス粒子の産生能を間接的に評価することもできる。

40

作製されたウイルスが感染能を有しているか否かは、HCV RNAを導入した細胞を培養して得られた上清でHCV許容性細胞(たとえばHuh7)を処理して、たとえば48時間後に上記細胞を抗コア抗体で免疫染色して感染細胞数を数えるか、上記細胞の抽出物をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロットにて、コアタンパク質を検出することで評価できる。

(3) エピトープタグ化HCV粒子産生細胞株の取得

HCVゲノムの効率的な複製には、ゲノムの塩基配列に変異が起こることが必要であることが示されており(Lohmann, V. et al., J. Virol. 75:1437-1449, 2001)、複製を向上させる変異は適応変異(adaptive mutation)と呼ばれている。上記(2)により作製したHCVゲノムRNAが導入

50

された細胞を継代培養することで、HCV粒子を持続的に生産する細胞株を得ることができる。このように培養を続けることで、HCVゲノムに適合変異が起こり、HCV粒子生産が著しく向上することがある。

上記(a)から(c)の核酸において、HVR1配列(Puntoriero, G. et al., EMBO J. 17:3521-3533, 1998)の最後の配列の次のアミノ酸を1番としたとき、122番目または124番目のアミノ酸であるアスパラギンがリジンに置換するような変異は、エピトープタグ化HCV粒子の産生する際の変異として好適である。中でも(a)または(b)の核酸では124番目のアミノ酸がアスパラギンからリジンに置換するように変異することがより好適であり、(c)の核酸では122番目のアミノ酸がアスパラギンからリジンに置換するように変異することがより好適である。この位置のアスパラギンは糖鎖の修飾を受ける領域であると考えられ、糖鎖が付加されないことが、HCV粒子の高生産性と関係があることが示唆される。

10

本発明での適合変異は、前述の通り継代培養によって得ることもできるが、人為的に導入することもできる。適合変異を人為的に導入する場合、変異導入用プライマーを設計し、これを用いたPCRを行なうことにより変異が導入されたDNAを合成することができる。また、突然変異体作製キットとして市販されているQuick Charge XL Site-Directed Mutagenesis kit(Stratagene社)を用いて変異体を作製してもよい。

本発明での適合変異は、ハイブリダイゼーション技術では1アミノ酸が変異するのに必要な核酸の変異を検出することは困難であるが、HCVの遺伝子配列をシーケンスすることで確認することができる。

20

(4) エピトープタグ化HCV粒子の精製

エピトープタグ化HCV粒子の精製には、そのエピトープタグに結合することの出来るタンパク質を結合させた担体が用いられる。タンパク質としてはエピトープタグペプチドに対する抗体がもっとも一般的である。本発明においては、好適なエピトープタグがFLAGペプチドまたは3XFLAGペプチドであり、これらのペプチドに結合することの出来る抗FLAG抗体であるM2抗体やM5抗体を結合(固定化)させた担体(いずれもシグマ社より入手できる)等が使用できる。

FLAGエピトープタグ化HCV粒子産生細胞または3XFLAGエピトープタグ化HCV粒子産生細胞の培養上清、あるいは該HCV粒子含有液体、を抗FLAG抗体結合担体カラムにかけ、カラムをリン酸緩衝液で洗浄し、FLAGペプチドまたは3XFLAGペプチドを含む緩衝液で、抗FLAG抗体結合担体に結合したHCV粒子を溶出することができる。カルシウム依存的にFLAGペプチドに結合する抗体であるM5抗体を結合させた担体を使用する場合は、カルシウムを含有する緩衝液でHCV粒子を結合させ、カルシウム不含の緩衝液でHCV粒子を担体から溶出させることができる。

30

その他の溶出方法としては、抗体結合担体からのタンパク質を溶出する一般的な方法を使用することができる(Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。たとえば溶出溶液として、0.1Mグリシン緩衝液(pH2.5~pH4.0)または1Mのアルギニン塩酸緩衝液(pH4.0~pH5.0)が使用できる(Ejima, D. et al., Anal. Biochem. 345:250-257, 2005)。さらに0.1mM~1mMの塩酸を使用することができる。また、溶出されたHCV粒子が変性しないように、溶出後の緩衝液のpHを中性付近(pH6.0~pH8.0)にするのが望ましい。

40

このようにして精製されたHCV粒子をSDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ウェスタンブロットにて、HCV由来タンパク質を検出することでHCV粒子が精製できたか否かを判断できる。

3. エピトープタグ化HCV粒子の利用

(1) ワクチン

純度の高いエピトープタグ化HCV粒子はワクチンとしての用途、抗HCV抗体作製の

50

ための抗原としての用途に好適である。

具体的には、作製されたエピトープタグ化HCV粒子を当該分野で既知の方法により不活化して用いることができる。ウイルスの不活化は、ホルマリン、 β -プロピオラクトン、グルタルジアルデヒド等の不活化剤を、例えば、ウイルス浮遊液に添加混合し、ウイルスと反応させることにより達成することができる (Appaiahgari et al., Vaccine, 22:3669-3675, 2004)。

さらに、紫外線で照射することによりウイルスの感染性を失わせ、迅速に不活化することもできる。紫外線照射は、ウイルスを構成するタンパク質などへの影響が少なく、ウイルスの不活化を行うことができる。不活化するための紫外線の線源としては一般に市販されている殺菌灯、特に15W殺菌灯を用いて行うことができるが、それに限るものではない。また、本発明においては、HCV粒子は上記に記載した方法により精製したものをを用いているが、不活化方法は精製・未精製などの状態により限られるものではない。好ましくはエピトープタグ化HCV粒子を含む溶液を20mW/cm²の紫外線で室温にて5分以上照射することにより、エピトープタグ化HCV粒子を不活化することができる。

本発明のワクチンは、溶液または懸濁液のいずれかの形態で、10%~95%、好ましくは25%~70%の活性成分（ウイルス粒子またはその一部分）を含有し、投与可能に調製される。液体中の溶解または懸濁に適した固形物の形態で調製することができる。調製物は乳濁され、またはリポソームにカプセル化してもよい。

HCV粒子などの活性免疫原性成分は、薬学的に受容可能であって、活性成分に適合した賦形剤がしばしば混合される。適切な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの混合物が挙げられる。さらに、所望に応じて、ワクチンは、少量の補助剤（例えば加湿剤または乳化剤）、pH緩衝剤、および/またはワクチンの効能を高めるアジュバントを含有し得る。有効であり得るアジュバントの例は、限定されないが、たとえば、水酸化アルミニウム、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (th r-MDP)、N-アセチル-L-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (CGP11637、nor-MDPと称せられる)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (CGP19835A、MTP-PEと称せられる)、およびRIBIを包含する。RIBIは、バクテリアから抽出した3成分、すなわちモノホスホリリピドA、トレハロースジミコレート、および細胞壁骨格 (HPL+TDM+CWS) を2%スクアレン/Tween (登録商標) 80エマルジョン中に含有している。アジュバントの効能は、HCV粒子から構成されるワクチンを投与することにより生じる、抗体の量を測定することにより決定され得る。

本発明のワクチンは、通常非経口的に、例えば皮下注射または筋肉注射のような、注射により投与される。他の投与態様に適切な別の処方としては、坐薬、およびある場合には経口処方薬が挙げられる。

所望により、アジュバント活性を有する1以上の化合物をHCVワクチンに加えることができる。アジュバントは、該免疫系の非特異的刺激因子である。それらは、HCVワクチンに対する宿主の免疫応答を増強する。当技術分野で公知のアジュバントの具体例としては、フロイント完全および不完全アジュバント、ビタミンE、非イオンブロック重合体、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油およびCarbopolが挙げられる。粘膜適用に特に適したアジュバントとしては、例えば、大腸菌 (E. coli) 易熱性毒素 (LT) またはコレラ (Cholera) 毒素 (CT) が挙げられる。他の適当なアジュバントとしては、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムまたは酸化アルミニウム、油性乳剤（例えば、Bayol (登録商標) またはMarcol 52 (登録商標) のもの）、サポニンまたはビタミンEソリュビリゼートが挙げられる。したがって、好ましい形態においては、本発明のワクチンはアジュバントを含む。

例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内に投与する注射剤において、本発明のワクチンと医薬上許容される担体または希釈剤の他の具体例には、安定化剤、炭水化物（例えば、ソ

10

20

30

40

50

ルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、グルコース、デキストラン)、アルブミンまたはカゼインなどのタンパク質、ウシ血清または脱脂乳などのタンパク質含有物質、およびバッファー(例えば、リン酸バッファー)などともに投与することができる。

本発明のワクチンは、投与剤形に適した方法で、そして予防および/または治療効果があるような量で投与される。投与されるべき量は、通常投与当たり抗原を0.01 μ gから100,000 μ gまでの範囲であり、これは、処置される患者、その患者の免疫系での抗体合成能、および所望の防御の程度に依存し、経口、皮下、皮内、筋肉内、静脈内投与経路などの投与経路にも依存する。

本発明のワクチンは、単独投与スケジュールで、または好ましくは複合投与スケジュールで与えられ得る。複合投与スケジュールでは、接種の開始時期に1~10の個別の投与を行い、続いて免疫応答を維持するおよびまたは強化するのに必要とされる時間間隔で、例えば2回目の投与として1~4ヵ月後に、別の投与を行い得る。必要であれば、数ヶ月後に引続き投与を行い得る。投与のレジメもまた、少なくとも部分的には、個体の必要性により決定され、医師の判断に依存する。

また本発明のワクチンは、他の免疫制御剤(例えば、免疫グロブリン)と共に投与してもよい。

さらに本発明のワクチンは、健常人に投与し、健常人にHCVに対する免疫応答を誘導し、新たなHCV感染に対し、予防的に使用してもよい。さらにまた、HCVに感染した患者に投与し、生体内にHCVに対する強い免疫反応を誘導することにより、HCVを排除する治療的ワクチンとして使用してもよい。

(2) エピトープタグ化HCV粒子を抗原として誘発される抗HCV抗体

本発明のエピトープタグ化HCV粒子は簡便に精製でき、高純度であるため、抗体作製のための抗原として有用である。

すなわち、動物の血清には不純物に対する抗体が含まれているため、動物の免疫に用いるHCV粒子サンプルに不純物が存在する場合、この不純物に対する抗体を除くために血清をHCV抗原カラムなどで精製する必要がある。しかしながら、本発明のエピトープタグ化HCV粒子は高純度なHCVとして得られるため、このような精製工程は不要である。

抗HCV抗体は、本発明のエピトープタグ化HCV粒子を哺乳類または鳥類に投与することで作製することができる。哺乳類動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、モルモット、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ、ラマなどを挙げることができる。ヒトコブラクダ、フタコブラクダおよびラマはH鎖のみからなる抗体を作製するには好適である。鳥類動物としては、ニワトリ、ガチョウ、ダチョウなどを挙げることができる。本発明の粒子を投与された動物の血清を採取して、既知の方法に従って抗体を取得することができる。

本発明のエピトープタグ化HCV粒子で免疫した動物の細胞を用いてモノクローナル抗体産生細胞を産生するハイブリドーマを作製することができる。ハイブリドーマを製造する方法は周知であり、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)に記載された方法を用いることができる。

モノクローナル抗体産生細胞は、細胞融合により作製してもよく、また癌遺伝子DNAの導入やEpstein-Barrウイルスの感染によりBリンパ球を不死化させるような他の方法で作製してもよい。

これらの方法によって得られたモノクローナル抗体やポリクローナル抗体はHCVの診断や治療、予防に有用である。

本発明のエピトープタグ化HCV粒子を用いて作製された抗体は、C型肝炎の治療、予防を目的として使用される。さらに臓器移植によるドナー臓器からのHCVの感染予防にも使用される。さらに上記抗体は、既存の抗ウイルス剤たとえば、インターフェロン、リバビリンなどとの併用でも使用できる。

抗HCV抗体の有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mgから100

10

20

30

40

50

0 mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 0.01 ~ 100000 mg/body の投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明のエピトープタグ化 HCV 粒子を用いて作製された抗 HCV 抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

上記治療剤の投与経路は特に限定されないが、好ましくは、皮下、皮内、筋肉内投与であり、より好ましくは、静脈内投与である。なお、治療剤の投与時期は、疾患の臨床症状が生ずる前後を問わない。

本発明のエピトープタグ化 HCV 粒子を用いて作製された抗 HCV 抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, Latest Edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例としては、水、医薬的に許容される有機溶剤、コーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて、たとえば上記の中から単独でまたは適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定されるものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたエピトープタグ化 HCV 粒子を用いて作製された抗 HCV 抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えば Tween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0006】

実施例 1 : HCV E2 HVR1 領域に FLAG タグ配列を挿入した J6/JFH-1 プラスミドの構築

HCV ゲノム RNA の cDNA として、5' UTR から NS2 の N 末端 16 アミノ酸残基までが遺伝子型 2a の J6CF 株 (GenBank アクセッション番号 AF177036, Yanagi, M. et al., Virology, 262(1999) p250-263)、NS2 の N 末端 17 アミノ酸残基から 3' UTR までが同じく遺伝子型 2a 株の JFH-1 株 (GenBank アクセッション番号 AB047639, Kato, T. et al., Gastroenterology, 125(2003) p1808-1817) である J6/JFH-1 キメラの cDNA を使用した。挿入する FLAG タグとしては FLAG 配列を 1 回または 3 回繰り返した cDNA を挿入した。作製されたこれらのプラスミドをそれぞれ pJ6/JFH-1 (1XFLAG)、pJ6/JFH-1 (3XFLAG) と呼ぶ。

これらの遺伝子から翻訳される FLAG タグの挿入部位近傍のアミノ酸配列を E2 タンパク質の N 末端のアミノ酸から図 1 に示した。J6/JFH1 のコードする E2 タンパク質の N 末端のアミノ酸配列を配列番号 1、pJ6/JFH-1 (1XFLAG) のコードする E2 タンパク質の N 末端のアミノ酸配列を配列番号 2、pJ6/JFH-1 (3XFLAG) のコードする E2 タンパク質の N 末端のアミノ酸配列を配列番号 3 に記載した。また、これらのプラスミドの作製方法を図 2 (A) - (C) に示す。

具体的には、JFH1 株由来ゲノム RNA 全領域に対応する cDNA を pUC19 プラスミド中にクローニングすることにより構築されたプラスミド DNA である pJFH1 (Wakita, T. et al. Nat. Med., 11 (2005) p791-796、国際公開 W02004/104198) を EcoRI で消化後、さらに BclI で部

10

20

30

40

50

分消化し、EcoRI部位から最初のBclI部位までの断片（約2840 bp）が除去されたプラスミドDNA断片を精製した。一方、pUC19プラスミド中にクローニングされたJ6CF株由来ゲノムcDNA、pJ6CF（GenBank アクセッション番号AF177036、Yanagi,M., et al., Virology 262: 250-263,1999）をEcoRIとBclIで部分消化して得られる約2840 bpの断片を上記の断片に連結し、J6/JFH1を得た。

次に、J6/JFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-F（配列番号4）および1F-R（配列番号5）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.1とした。

10

次に、J6/JFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-R（配列番号6）および1F-F（配列番号7）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.2とした。

次にJ6/JFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-F（配列番号4）および3F-R（配列番号8）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.3とした。

20

次に、J6/JFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-R（配列番号6）および3F-F（配列番号9）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.4とした。

30

それぞれのPCR産物を精製し、15 µlのH₂Oに溶かした。PCR産物no.1とPCR産物no.2のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-F（配列番号4）およびE2-R（配列番号6）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.5とした。

40

次にPCR産物no.3とPCR産物no.4のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット（FINNzymes社）に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー E2-F（配列番号4）およびE2-R（配列番号6）をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase（FINNzymes社）を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.6とした。それぞれのPCR産物を精製し、30 µlのH₂Oに溶かした。

J6/JFH1 cDNA および精製したPCR産物no.5を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片を

50

アガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJ6/JFH-1 (1XFLAG)と名付けた。このpJ6/JFH-1 (1XFLAG)は、5'側から3'側に順番に、J6CF株由来の5'非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列、およびNS2タンパク質領域のN末端16アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質領域のN末端17アミノ酸残基からC末端間でコードする配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質領域および3'非翻訳領域からなるキメラ遺伝子をコードする塩基配列であり、上記E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列をコードする塩基配列を含む。

10

次いで、J6/JFH1 cDNAおよび精製したPCR産物no.6を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJ6/JFH-1 (3XFLAG)と名付けた。このpJ6/JFH-1 (3XFLAG)は、5'側から3'側に順番に、J6CF株由来の5'非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列およびNS2タンパク質領域のN末端16アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質領域のN末端17アミノ酸残基からC末端までコードする配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質領域および3'非翻訳領域からなるキメラ遺伝子をコードする塩基配列であり、上記E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列を3回繰り返した塩基配列を含む。

20

pJ6/JFH-1を配列番号10、pJ6/JFH-1 (1XFLAG)を配列番号11、pJ6/JFH-1 (3XFLAG)を配列番号12としてこれらの塩基配列を配列表に示した。

実施例2: In vitro RNA合成と細胞内への導入

pJ6/JFH-1, pJ6/JFH-1 (1XFLAG)、pJ6/JFH-1 (3XFLAG)をXba Iで切断し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。この切断したプラスミドを鋳型として、MEGAscript T7 kit(Ambion社)を用いて各HCV RNAの合成を行った。

3×10^6 個のHuh-7細胞と5 μ gのHCV RNAをCytomix溶液(120mM KCl, 0.15 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 25 mM Hepes, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , 20 mM ATP, 50 mM Glutathione) 400 μ lで懸濁し、4 mmキューベットに移した後、Gene Pulser(BioRad社)を用いて260 V、950 μ Fでエレクトロポレーションを行った。その後、HCV RNA導入細胞を10 cm^2 ディッシュに播種し、継代培養を行った。

30

実施例3: J6/JFH-1 (3XFLAG) RNA導入細胞によるHCV粒子の産生

J6/JFH-1, J6/JFH-1 (3XFLAG) RNAを導入した各細胞の継代時に、HCV抗原ELISAテストキット(オゾン社)を用いて培養上清中に含まれるHCV Coreタンパク質を定量し、HCV粒子産生の確認を行った。その結果、J6/JFH-1 RNA導入ではその産生量に変化は見られずほぼ一定だった。しかしながら、J6/JFH-1 (3XFLAG) RNA導入では培養上清中のHCV Core量は導入21日目までは経時的に減少していったが、導入から22日を経過した時点でCore量が上昇し始め、35日経過時点でJ6/JFH-1と同程度のCore産生量を示した(図3)。このことから、J6/JFH-1 (3XFLAG) RNAは、Huh-7細胞導入当所は高いウイルス産生能を有していないが、後にウイルスゲノム内にウイルス産生に必要な適合変異が導入され、J6/JFH-1 RNAと同様のウイルス産生能を有するようになると考えられた。

40

実施例4: J6/JFH-1 (3XFLAG) RNA導入細胞によるHCVタンパク質の発現

J6/JFH-1, J6/JFH-1 (3XFLAG) RNA導入から4, 17, 30, 43日目の細胞内のHCVタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより確認した。解析にあたって、RNAを導入していないHuh-7細胞から得られた細胞抽出試料を陰性対象とした。それぞれの細胞からの抽出試料のSDS-PAGEを行い、PVDF膜(Immobilon-P, Millipore社)にブロッティングした。その

50

後、抗Coreモノクローナル抗体、抗FLAGモノクローナル抗体(M2抗体、シグマ社)および抗E2モノクローナル抗体と、これらの抗体を認識するHRP標識2次抗体を用いて、ECL Plus(GE Healthcare社)にて細胞内で翻訳されたCoreタンパク質およびE2タンパク質を検出した。

その結果、J6/JFH-1 (3XFLAG)導入において、30, 43日目でのE2タンパク質はRNA導入時のE2タンパク質より分子量が軽くなっていることが示された(図4)。Coreタンパク質においてはそのような変化は見られなかった。そこで、これらのE2タンパク質を脱糖鎖酵素であるPNGase Fで処理したところ、そのような分子量の違いはみられなくなっていた(図5)。このことから、J6/JFH-1 (3XFLAG) RNAゲノムのE2領域は細胞の継代を重ねることによって、そのゲノム内に変異を生じ、その部位は糖鎖結合部位である可能性が示唆された。

10

実施例5：継代を重ねたJ6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルス感染細胞内のHCVゲノム配列解析

J6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルスが高い感染性を有するために必要な適合変異を調べるために、RNA導入から8日目と39日目の感染細胞内のtotal RNAを抽出し、この中に含まれるHCVゲノムの配列解析を行った。

その結果、E2領域の糖鎖付加部位の一つであるアスパラギンAAU (N) がリジンAAA (K) に置換されており、この部位の糖鎖修飾が無くなることにより、RNA導入時のE2タンパク質よりも分子量が軽くなることが示された(図6)。なお、本アスパラギンはJ6CF株 (GenBankアクセッション番号AF177036、Yanagi, M. et al., Virology, 262(1999) p250-263) のCoreタンパク質のN末端配列であるメチオニンを1として数えて534番目のアミノ酸に対応する。

20

実施例6：J6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルス粒子の精製

J6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルス粒子を精製するために、J6/JFH-1 (3XFLAG) RNA導入から56日目の培養上清を用いた。この培養上清600 μ lに、0.1 M glycine-HCl(pH3.5)で前処理したM2 抗体agarose(シグマ社) 500 μ lを加え、4°Cで2時間転倒混和を行った。フロースルーを回収し、M2 抗体 agaroseをTBS bufferで3回洗浄後、200 μ l の1XFLAGペプチド(シグマ社)溶液または3XFLAGペプチド(シグマ社) 溶液を用いて3回溶出操作を行った。これらの溶出サンプルのHCV Coreタンパク質量をHCV抗原ELISAテストキット(オーソ社)により定量したところ、どちらのFLAGペプチドでも溶出でき、その精製効率は約5%であった(図7)。

30

これらの溶出サンプルの純度を調べるために、HCV Core 0.1 fmol相当の溶出サンプルおよび未精製の培養上清のSDS-PAGEを行った。その後、銀染色を行い各溶液中に含まれる夾雑タンパク質を確認したところ、溶出サンプルではほとんど夾雑タンパク質は確認されなかった(図8)。以上から、溶出サンプルはHCV粒子が高純度に精製されていることが確かめられた。

実施例7：精製したJ6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルスの感染性の評価

実施例6で精製したJ6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルスの感染性を評価するために、培養細胞を用いての感染実験を行った。Huh-7細胞を8 wellガラスチャンバーに 1×10^4 cell/wellで播種し、24時間培養後、HCV Core 1 fmol相当のウイルス液を3時間感染させた。感染後、DMEM(シグマ社)で2回洗浄し、そこから4日間培養を行った。4日後の細胞内のtotal RNAをTrizol Reagent(invitrogen社)の添付マニュアルに従って抽出した。このtotal RNA中のHCV RNA量を定量的RT-PCR法により測定した。使用するプライマーおよびプローブはHCV RNAの5' -UTR領域を標的としたセンスプライマー S-17 (配列番号13)、アンチセンスプライマー R-19 (配列番号14)およびタックマンプローブ (配列番号15)を用いた。このプライマーおよびプローブと抽出したtotal RNAを混合し、TaqMan EZ RT-PCR CORE REAGENTS(Applied Biosystems)の添付マニュアルに従いRT-PCR反応溶液を調製し、7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)による検出を行った。その結果、精製したJ6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルス溶液はHuh-7細胞に対して感染性を有することが示された(

40

50

図9)。このことから、HCV E2のHVR1領域にFLAGタグ配列を挿入したウイルスは高純度に精製することが可能であり、その精製ウイルスは感染性を有することが示された。

実施例8：J6/JFH-1 (1XFLAG) E2 N→KおよびJ6/JFH-1 (3XFLAG) E2 N→K変異プラスミドの構築

実施例5で示した、J6/JFH-1 (3XFLAG) ウイルスが高い感染性を有するために必要な適合変異 (E2領域の糖鎖付加部位のアスパラギンAAT (N6) からリジンAAA (K) への置換) を持つプラスミドpJ6/JFH-1 (1XFLAG) N→KおよびpJ6/JFH-1 (3XFLAG) N→Kの構築を行った。プラスミドの作製方法を図10 (A) - (C) に示す。

具体的には、pJ6/JFH-1 (1XFLAG)を鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマー 1141S-2a (配列番号 1 6) およびJ6E2-K-R (配列番号 1 7) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 μl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.7とした。

次に、pJ6/JFH-1 (3XFLAG)を鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマー1141S-2a (配列番号 1 6) およびJ6E2-K-R (配列番号 1 7) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 μl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.8とした。

次に、pJ6/JFH-1を鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマーJ6E2-K-F (配列番号 1 8) および3189R-IH (配列番号 1 9) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 μl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.9とした。

それぞれのPCR産物を精製し、50 μlのH₂Oに溶かした。PCR産物no.7とPCR産物no.9のDNAを各1 μlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマー1141S-2a (配列番号 1 6) および3189R-IH (配列番号 1 9) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 μl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.10とした。

次に、PCR産物no.8とPCR産物no.9のDNAを各1 μlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマー1141S-2a (配列番号 1 6) および3189R-IH (配列番号 1 9) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 μl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.11とした。それぞれのPCR産物を精製し、30 μlのH₂Oに溶かした。

pJ6/JFH1および精製したPCR産物no.10を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本) を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJ6/JFH-1 (1XFLAG) N→Kと名付けた。このpJ6/JFH-1 (1XFLAG) N→Kは、5' 側から3' 側に順番に、J6CF株

10

20

30

40

50

由来の5' 非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列およびNS2タンパク質領域のN末端16アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質領域のN末端17アミノ酸残基からC末端間でコードする配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質領域および3' 非翻訳領域からなるキメラ遺伝子をコードする塩基配列であり、上記NS2のHVR1領域にFLAGペプチド配列をコードする塩基配列を含み、かつCoreタンパク質のN末端配列であるメチオニンを1として数えて538番目のアミノ酸がリジンとなるような塩基配列を含む。

次いで、pJ6/JFH1および精製したPCR産物no.11を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJ6/JFH-1 (3XFLAG) N→Kと名付けた。このpJ6/JFH-1 (3XFLAG) N→Kは、5' 側から3' 側に順番に、J6CF株由来の5' 非翻訳領域、Coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、p7タンパク質コード配列およびNS2タンパク質領域のN末端16アミノ酸残基までコードする配列、ならびに、JFH-1株のNS2タンパク質領域のN末端17アミノ酸残基からC末端までコードする配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質領域および3' 非翻訳領域からなるキメラ遺伝子をコードする塩基配列であり、上記NS2のHVR1領域にFLAGペプチド配列を3回繰り返した塩基配列を含み、かつCoreタンパク質のN末端配列であるメチオニンを1として数えて552番目のアミノ酸がリジンとなるような塩基配列を含む。

pJ6/JFH-1 (1XFLAG) N→Kを配列番号 20、pJ6/JFH-1 (3XFLAG) N→Kを配列番号 21としてこれらの塩基配列を配列表に示した。

実施例9：J6/JFH-1 (1XFLAG) E2 N→KおよびJ6/JFH-1 (3XFLAG) E2 N→Kウイルスの作製

実施例8で作製したプラスミドをそれぞれXbaIで切断し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。この切断したプラスミドを鋳型にMEGAscript T7 kit(Ambion社)を用いて各HCV RNAの合成を行った。

3×10^6 個のHuh-7細胞と5 μ gのHCV RNAをCytomix溶液(120mM KCl, 0.15 mM CaCl_2 , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 25 mM Hepes, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , 20 mM ATP, 50 mM Glutathione) 400 μ lで懸濁し、4 mmキューベットに移した後、Gene Pulser(BioRad社)を用いて260 V、950 μ Fでエレクトロポレーションを行った。その後、HCV RNA導入細胞を10 cm^2 ディッシュに播種し、継代培養を行った。

J6/JFH-1 (1XFLAG) E2 N→KおよびJ6/JFH-1 (3XFLAG) E2 N→K RNAを導入した各細胞の継代時に、HCV抗原ELISAテストキット(オーソ社)を用いて培養上清中に含まれるHCV Coreタンパク質を定量し、HCV粒子産生の確認を行った。培養初期から後期にわたって、変異を導入しないRNAを導入した細胞の培養上清中に含まれるHCV Core量と変異を導入したRNAを導入した細胞の培養上清に含まれるHCV Core量とを比較すると後者の方が高いことが示された。

実施例10：HCV E2 HVR1領域にFLAGタグ配列を挿入したJFH-1プラスミドの構築

実施例1と同様な方法で、遺伝子型2a株のJFH-1株(GenBankアクセッション番号AB047639、Kato, T. et al., Gastroenterology, 125(2003) p1808-1817)のHVR1内にエピトープタグ配列を導入した。エピトープタグとしてはFLAG配列を1回または3回繰り返したcDNAを挿入した。これらのプラスミドをそれぞれJFH-1 (1XFLAG)、JFH-1 (3XFLAG)と呼ぶ。

これらの遺伝子から翻訳されるFLAGタグの挿入部位近傍のアミノ酸配列をE2タンパク質のN末端のアミノ酸から図11に示した。

pJFH-1 (pJFH1と呼称されることもある)のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 22、pJFH-1 (1XFLAG)のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 23、pJFH-1 (3XFLAG)のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 24に記載した

。また、これらのプラスミドの作製方法を図12 (A) ~ (C) に示す。

具体的には、pJFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーJFH1-F (配列番号25) およびJFH1-1F-R (配列番号26) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.12とした。

次に、pJFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー3189R-IH (配列番号19) およびJFH1-1F-F (配列番号27) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.13とした。

次にJFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーJFH1-F (配列番号25) およびJFH1-3F-R (配列番号28) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.14とした。

次に、pJFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー3189R-IH (配列番号19) およびJFH1-3F-F (配列番号29) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.15とした。

それぞれのPCR産物を精製し、15 µlのH₂Oに溶かした。PCR産物no.12とPCR産物no.13のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーJFH1-F (配列番号25) および3189R-IH (配列番号19) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.16とした。

次にPCR産物no.14とPCR産物no.15のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーJFH1-F (配列番号25) および3189R-IH (配列番号19) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.17とした。それぞれのPCR産物を精製し、30 µlのH₂Oに溶かした。

pJFH-1 cDNA および精製したPCR産物no.16を制限酵素EcoRIおよびKpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本) を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJFH-1 (1XFLAG)と名付けた。このpJFH-1 (1XFLAG)は、JFH1株の遺伝子をコードする塩基配列で、E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列をコードする塩基配列を含む。次いで、pJFH1

10

20

30

40

50

cDNA および精製したPCR産物no.17を制限酵素EcoRIおよびKpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpJFH-1 (3XFLAG)と名付けた。このpJFH-1 (3XFLAG)は、JFH1株の遺伝子をコードする塩基配列で、E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列を3回繰り返した塩基配列を含む。

pJFH-1 (1XFLAG)を配列番号 3 0、pJFH-1 (3XFLAG)を配列番号 3 1としてこれらの塩基配列を配列表に示した。

実施例11：HCV E2 HVR1領域にFLAGタグ配列を挿入したTH/JFH1プラスミドの構築

HCVゲノムRNAのcDNAとして、5' UTRからNS2のN末端16アミノ酸残基までが遺伝子型 1 b のTH1株 (Wakita, T. et al., J. Biol. Chem., 269, 14205-14210, 1994、特開2004-179)、NS2のN末端17アミノ酸残基から3' UTRまでが同じく遺伝子型2a株のJFH-1株 (GenBank アクセッション番号AB047639、Kato, T. et al., Gastroenterology, 125(2003) p1808-1817) であるTH/JFH-1キメラのcDNAを使用し、TH/JFH1のHVR1内にエピトープタグ配列を導入した。挿入するエピトープタグとしてはFLAG配列を1回または3回繰り返したcDNAを挿入した。これらのプラスミドをそれぞれpTH/JFH-1 (1XFLAG)、pTH/JFH-1 (3XFLAG)と呼ぶ。

これらの遺伝子から翻訳されるFLAGタグの挿入部位近傍のアミノ酸配列を、E2タンパク質のN末端のアミノ酸配列由来ものとして図13に示した。

pTH/JFH-1のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 3 2、pTH/JFH-1 (1XFLAG) のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 3 3、pTH/JFH-1 (3XFLAG) のコードするE2タンパク質のN末端の配列を配列番号 3 4に記載した。また、これらのプラスミドの作製方法を図14に示す。

まず、TH/JFH-1を作製した。pJFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社)に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマーJFH1-A (配列番号 4 3) およびJFH1-B (配列番号 4 4) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社)を0.5 μl加えてから、PCR反応を行い、JFH-1の5' 非翻訳領域とプライマーJFH1-Bに含まれるTHのCoreの一部の増幅を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.18とした。

次に、pTH (Wakita et al., J.Biol.Chem., 269: 14205-14210, 1994 およびMoradpour et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 246: 920-924, 1998) を鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社)に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマー TH-C (配列番号 4 5) およびTH-D (配列番号 4 6) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社)を0.5 μl加えてから、PCR反応を行い、THのCoreからNS2の一部分とプライマーTH-Cに含まれるJFH-1の5' 非翻訳領域の一部分およびプライマーYH-Dに含まれるJFH-1のNS2の一部分の増幅を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.19とした。

pJFH-1を鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社)に添付されていた、10×緩衝液を10 μl、2mM dNTP混合液を4 μl、10 μMのプライマーJFH1-E (配列番号 4 7) およびJFH1-F (配列番号 4 8) をそれぞれ1 μl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 μlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社)を0.5 μl加えてから、PCR反応を行い、JFH-1のNS2、NS3の一部とプライマーJFH1-Eに含まれるTHのNS2の一部の増幅を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.20とした。

上記PCR産物no.18, no.19, no.20とプライマーJFH-AおよびJFH-Eを用いてPCRを行い、JFH-1の 5' 翻訳領域からTH株のCoreからNS2の一部、JFH-1のNS2からNS3の一部のフラグメ

10

20

30

40

50

ントを得た (PCR産物no.21)。

次に、pJFH-1およびPCR産物no.21をそれぞれEcoR I、SpeIで制限酵素処理を行い、ライゲーションし、pTH/JFH-1を得た。このプラスミドを用いて、pTH/JFH-1 (1XFLAG)、pTH/JFH-1 (3XFLAG)を作製する方法を図14(A)－(C)に示す。

具体的には、pTH/JFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーTH-F (配列番号 3 5) およびTH-1F-R (配列番号 3 6) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.22とした。

10

次に、pTH/JFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー3189R-IH (配列番号 1 9) およびTH-1F-F (配列番号 3 7) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.23とした。

次にpTH/JFH1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーTH-F (配列番号 3 5) およびTH-3F-R (配列番号 3 8) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.24とした。

20

次に、pTH/JFH-1 cDNAを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマー3189R-IH (配列番号 1 9) およびTH-3F-F (配列番号 3 9) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 1分30秒からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.25とした。

30

それぞれのPCR産物を精製し、15 µlのH₂Oに溶かした。PCR産物no.22とPCR産物no.23のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーTH-F (配列番号 3 5) および3189R-IH (配列番号 1 9) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.26とした。

40

次にPCR産物no.24とPCR産物no.25のDNAを各1 µlずつ混合した。これを鋳型として、Phusion High-Fidelity DNA Polymeraseキット (FINNZYMES社) に添付されていた、10×緩衝液を10 µl、2mM dNTP混合液を4 µl、10 µMのプライマーTH-F (配列番号 3 5) および3189R-IH (配列番号 1 9) をそれぞれ1 µl加え、最終的に脱イオン水を加え全量を49.5 µlとした。その後Phusion DNA Polymerase (FINNZYMES社) を0.5 µl加えてから、PCR反応を行った。PCR反応は、98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 2分からなる工程を1サイクルとして30サイクルの条件で行った。得られたPCR産物をPCR産物no.27とした。それぞれのPCR産物を精製し、30 µlのH₂Oに溶かした。

pTH/JFH-1 cDNA および精製したPCR産物no.26を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix

50

(タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpTH/JFH-1 (1XFLAG)と名付けた。このpTH/JFH-1 (1XFLAG)は、TH1株の遺伝子をコードする塩基配列で、E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列をコードする塩基配列を含む。

次いで、pTH/JFH1 cDNA および精製したPCR産物no.27を制限酵素KpnIで消化し、各HCV cDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分画し、精製した。これら2つのDNA断片とLigation Mix (タカラバイオ社、日本)を混合し、2つのDNA断片を連結した。このベクターをpTH/JFH-1 (3XFLAG)と名付けた。このpTH/JFH-1 (3XFLAG)は、TH1株の遺伝子をコードする塩基配列で、E2のHVR1領域にFLAGペプチド配列を3回繰り返した塩基配列を含む。

pTH/JFH1を配列番号40、pTH/JFH-1 (1XFLAG)を配列番号41、pTH/JFH-1 (3XFLAG)を配列番号42としてこれらの塩基配列を配列表に示した。

10

上記実施例で作製されたベクター類から合成されたRNAはいずれも、培養HCV許容性細胞(Huh7等)に導入すると、エピトープタグ化HCV粒子を生成した。そして、エピトープタグ化HCV粒子含有培養上清を、抗エピトープタグ抗体を固定した担体を充填したカラムに通すことによって、エピトープタグ化HCV粒子を特異的に吸着し、その後の溶離処理により、該HCV粒子を精製することができた。

【産業上の利用可能性】

【0007】

本発明によれば、HCV粒子を培養細胞系で生産し、精製するための方法において、従来の方法よりも、簡便かつ高純度にHCV粒子を精製できる。本発明の方法によって提供されるHCV粒子は高純度であるため、HCVの予防または治療用ワクチンとして好適である。さらに、本発明のエピトープタグ化HCV粒子はHCVに対する抗体を誘導するツールとしても利用できる。

20

本発明の方法によって提供されるHCV粒子は高純度であるため、HCVの予防または治療用ワクチンとして好適に利用できる。さらに、本発明にかかるエピトープタグ化HCV粒子はHCVに対する抗体を誘導するツールとしても利用できる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

【0008】

30

配列番号1：J6/JFH1のコードするE2タンパク質のN末端の配列

配列番号2：pJ6/JFH-1 (1XFLAG)のコードするE2タンパク質のN末端の配列

配列番号3：pJ6/JFH-1 (3XFLAG)のコードするE2タンパク質のN末端の配列

配列番号4：プライマー (E2-F)

配列番号5：プライマー (1F-R)

配列番号6：プライマー (E2-R)

配列番号7：プライマー (1F-F)

配列番号8：プライマー (E2-F)

40

配列番号9：プライマー (3F-R)

配列番号10：pJ6/JFH-1

配列番号11：pJ6/JFH-1 (1XFLAG)

配列番号12：pJ6/JFH-1 (3XFLAG)

配列番号13：プライマー (S-17)

配列番号14：プライマー (R-19)

配列番号15：プローブ

配列番号16：プライマー (1141S-2a)

配列番号17：プライマー (J6E2-K-R)

配列番号18：プライマー (J6E2-K-F)

50

配列番号 19 : プライマー (3189R-1H)	
配列番号 20 : pJ6/JFH-1 (1×FLAG) N→K	
配列番号 21 : pJ6/JFH-1 (3×FLAG) N→K	
配列番号 22 : pJFH-1 のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	
配列番号 23 : pJFH-1 (1×FLAG) のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	
配列番号 24 : pJFH-1 (3×FLAG) のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	
配列番号 25 : プライマー (JFH1-F)	
配列番号 26 : プライマー (JFH1-1F-R)	10
配列番号 27 : プライマー (JFH1-1F-F)	
配列番号 28 : プライマー (JFH1-3F-R)	
配列番号 29 : プライマー (JFH1-3F-F)	
配列番号 30 : pJFH-1 (1×FLAG)	
配列番号 31 : pJFH-1 (3×FLAG)	
配列番号 32 : pTH/JFH1 のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	
配列番号 33 : pTH/JFH-1 (1×FLAG) のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	
配列番号 34 : pTH/JFH-1 (3×FLAG) のコードする E2タンパク質の N 末端の配列	20
配列番号 35 : プライマー (TH-F)	
配列番号 36 : プライマー (TH-1F-R)	
配列番号 37 : プライマー (TH-1F-F)	
配列番号 38 : プライマー (TH-3F-R)	
配列番号 39 : プライマー (TH-3F-F)	
配列番号 40 : pTH/JFH1	
配列番号 41 : pTH/JFH1 (1×FLAG)	
配列番号 42 : pTH/JFH1 (3×FLAG)	
配列番号 43 : プライマー (JFH1-A)	
配列番号 44 : プライマー (JFH1-B)	30
配列番号 45 : プライマー (TH-C)	
配列番号 46 : プライマー (TH-D)	
配列番号 47 : プライマー (JFH1-E)	
配列番号 48 : プライマー (JFH1-F)	
配列番号 49 : エピトープタグペプチド (1×FLAG+Linker)	
配列番号 50 : エピトープタグペプチド (3×FLAG+Linker)	
配列番号 51 : エピトープタグペプチド (1×FLAG)	
配列番号 52 : エピトープタグペプチド (3×FLAG)	
配列番号 53 : リンカー	
配列番号 54 : リンカー	40
[配列表]	

SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by Director General of National
Institute of Infectious Diseases
Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research
Toray Industries, Inc.

<120> Method of producing epitope-tagged hepatitis C virus
particle and use of the same

10

<130> PH-3617-PCT

<150> JP 2007-184587

<151> 2007-07-13

<160> 54

<170> PatentIn version 3.4

20

<210> 1

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in J6/JFH-1

<400> 1

30

Arg Thr His Thr Val Gly Gly Ser Ala Ala Gln Thr Thr Gly Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ser Leu Phe Asp Met Gly Pro Arg Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Asn Cys Asn Asp Ser
35 40 45

40

Leu His Thr
50

<210> 2

<211> 55
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pJ6/JFH-1 (1XFLAG)

<400> 2

10

Arg Thr His Thr Val Gly Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Asp Lys Gly Gly Gly Ser Leu Phe Asp Met Gly Pro Arg Gln Lys Ile
 20 25 30

Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Asn
 35 40 45

20

Cys Asn Asp Ser Leu His Thr
 50 55

<210> 3

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pJ6/JFH-1 (3XFLAG)

<400> 3

Arg Thr His Thr Val Gly Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp
 1 5 10 15

40

Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Leu Phe Asp Met Gly Pro Arg Gln Lys Ile Gln Leu
 35 40 45

Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Asn Cys Asn
 50 55 60

Asp Ser Leu His Thr
 65

<210> 4 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (E2-F)

<400> 4

cctggtacca tcaactggaca

20

20

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (1F-R)

<400> 5

cccttgatcat cgtcaccctt gtaatccgcg gcagaacccc caac

44

30

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (E2-R)

<400> 6

tgggtggtac ccactcctga

20

40

<210> 7

<211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (1F-F)

<400> 7
 aggatgacga tgacaaggga ggcggtagct tatttgacat gggc 44 10

<210> 8
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (3F-R) 20

<400> 8
 taatcgatgt catgatcttt ataatacccg tcatggtctt ttagtccgc ggcagaaccc 60
 ccaac 65

<210> 9
 <211> 65
 <212> DNA 30
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (3F-F)

<400> 9
 aagatcatga catcgattac aaggatgacg atgacaaggg aggcggtagc ttatttgaca 60
 tgggc 65

40

<210> 10
 <211> 9683
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> pJ6/JFH-1

<400> 10

accgccect aatagggcg acactccgc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
 ctacacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctcgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tetatgccc gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttggtactg cctgataggg 300
 tgcttgcgag tgccecgga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420
 cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccagg tgggtgtgcg 480
 cgcgacaagg aagacttcgg agcggtecca gccacgtgga aggcgccagc ccatccctaa 540
 agatcggcgc tccactggca aatccctggg aaaaccagga taccctggc ccctatacgg 600
 gaatgaggga ctcggtggg caggatggct cctgtccccc cgaggttccc gtcctcttg 660
 gggcccaat gacccccggc ataggtcgc caacgtgggt aaggtcagc ataccctaac 720
 gtgcggcttt gccgacctea tgggtacat cctgtcgtg ggcgccccgc tcggcggcgt 780
 gccagagct ctgcgcagtg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt ttgcaacagg 840
 gaacttacc ggttgtcct tttctatctt ctgtctggcc ctgtgtcct gcaccacc 900
 cccgtctcc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatggtga ctaacgactg 960
 caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggtgtctgc ctccacgtc ccgggtgcgt 1020
 cccgtgcgag aaagtgggga atgcattca gtgttgata ccggtctac cgaatgtggc 1080
 cgtgcagcgg ccggcgccc tcacgcagg cttgcggac cacatcgaca tggtttgtat 1140
 gtccgccag ctctgtctg cctctacgt gggggacctc tgcggtggg tgatgtcgc 1200
 agcccaaatg ttattgtct cgcgcagca ccactggtt gtccaagact gcaattgtc 1260
 catctacct ggtaccatca ctggacacc catggcatgg gacatgatga tgaactggtc 1320

10

20

30

40

gcccacggct accatgatct tggcgtacgc gatgcgtgtc cccgaggtca ttatagacat 1380
 cattagcggg gctcattggg gcgtcatgtt cggttggcc tacttctcta tgcagggagc 1440
 gtgggcgaaa gtctgtgtca tccttctgtt ggccgcccgg gtggacgcgc gcaccatac 1500
 tgttgggggt tctgccgcgc agaccaccgg gcgcctcacc agcttatitg acatgggccc 1560
 caggcagaaa atccagctcg ttaacaccaa tggcagctgg cacatcaacc gcaccgccct 1620
 gaactgcaat gactccttgc acaccggctt tategcgtct ctgttctaca cccacagctt 1680
 caactcgtca ggatgtcccg aacgcatgtc cgcttgcgc agtatcgagg ccttccgggt 1740
 gggatggggc gccttgcaat atgaggataa tgtaccaat ccagaggata tgagacccta 1800
 ttcttggtcac taccaccaa ggcatgttg cgtggtctcc gcgaagactg tgtgtggccc 1860
 agtgtactgt ttcaccccca gccagtggt agtgggcacg accgacaggc ttggagcgcc 1920
 cacttacacg tggggggaga atgagacaga tgtcttcta ttgaacagca ctcgaccacc 1980
 gctggggtea tggttcggt gcacgtgat gaactcttct ggctacacca agacttgcgg 2040
 cgcaccacc tgccgtacta gagctgactt caacgccagc acggacctgt tgtccccac 2100
 ggactgtttt aggaagcatc ctgataccac ttacctcaa tgcggctctg ggccctggct 2160
 cagccaagg tgcctgatcg actacccta caggctctgg cattaccct gcacagttaa 2220
 ctataccatc ttcaaaataa ggatgtatgt gggaggggt gagcacaggc tcacggctgc 2280
 atgcaatttc actcgtgggg atcgttgcaa citggaggac agagacagaa gtcaactgtc 2340
 tcctttgttg cactccacca cggaatgggc cattttacct tgctcttact cggacctgcc 2400
 cgcttgtcg actggtcttc tccacctca caaaacatc gtggacgtac aattcatgta 2460
 tggcctatca cctgccctca caaaatacat cgtccgatgg gagtgggtaa tactcttatt 2520
 cctgtcttta gcggacgcca gggtttgcgc ctgcttatgg atgtcatct tgttgggcca 2580
 ggccgaagca gcactagaga agctggatc cttgcacgt gcgagcgcag ctagctgcaa 2640
 tggtctcta tattttgtca tcttttctgt ggtgtcttgg tacatcaagg gtcgggtagt 2700

10

20

30

40

ccccttagct acctattccc tcaactggcct gtggtccttt agcctactgc tccatgcatt 2760
 gcccacacag gcttatgctt atgacgcac tgtgcatggc cagataggag cggctctgct 2820
 ggtaatgac accctcttca cactcacccc ggggtataag accctctctg gccagtgtct 2880
 gtgggtgttg tgctatctcc tgacctggg ggaagccatg attcaggagt gggtaccacc 2940
 catgcagggtg cgcggcggcc gcgatggcat cgcgtgggcc gtcactatat tctgcccggg 3000
 tgttgtgttt gacattacca aatggctttt ggctgtgtt ggccctgctt acctcttaag 3060
 ggccgctttg acacatgtgc cgtacttctg cagagctcac gctctgataa gggtatgcgc 3120
 ttttgtgaag cagctcgcgg ggggtaggta tgttcagggt gcgctattgg cccttggcag 3180
 gtggactggc acctacatct atgaccacct cacacctatg tcggactggg ccgctagcgg 3240
 cctgcgcgac ttagcggctg ccgtggaacc catcatcttc agtccgatgg agaagaaggt 3300
 catcgtctgg ggagcggaga cggctgcatg tggggacatt ctacatggac ttcccggtgc 3360
 cgcccgactc ggccaggaga tcctcctcgg ccagctgat ggctacacct ccaaggggtg 3420
 gaagctcctt gctcccatca ctgcttatgc ccagcaaca cgaggcctcc tgggcgcat 3480
 agtggtgagt atgacggggc gtgacaggac agaacaggcc ggggaagtcc aaatcctgtc 3540
 cacagtctct cagtccttcc tcggaacaac catctcgggg gttttgtgga ctgtttacca 3600
 cggagctggc aacaagactc tagccggtt acgggggtccg gtcacgcaga tgtactcgag 3660
 tgctgagggg gacttggtag gctggcccag ccccttggg accaagtctt tggagccgtg 3720
 caagtgtgga gccgtcgacc tatacttggt cagcggaac gctgatgtca tcccggctcg 3780
 gagacgcggg gacaagcggg gagcattgct ctccccgaga cccatttga ccttgaaggg 3840
 gtctcgggg gggccgggtc tctgccctag gggccacgtc gttgggtctt tccgagcagc 3900
 tgtgtgtctt cggggcgtgg ccaaatecat cgatttcac cccgttgaga cactcgacgt 3960
 tgttacaagg tctccactt tcagtacaa cagcacgcca ccggtgtgc ccagacctt 4020
 tcaggtcggg tacttgcacg ctccaactgg cagtggaaag agcaccaagg tccctgtcgc 4080

10

20

30

40

gtatgccgcc caggggtaca aagtactagt gcttaacccc tcggtagctg ccaccctggg 4140
 gtttggggcg tacctatcca aggcacatgg catcaatccc aacattagga ctggagtcag 4200
 gaccgtgatg accggggagg ccatcacgta ctccacatat ggcaaatttc tcgccgatgg 4260
 gggctgcgct agcgggcgct atgacatcat catatgcgat gaatgccacg ctgtggatgc 4320
 tacctccatt ctccgcatcg gaacggctct tgatcaagca gagacagccg gggtcagact 4380
 aactgtgctg gctacggcca cccccccgg gtcagtgaca acccccatac ccgatataga 4440
 agaggtaggc ctccggcggg agggtagat ccccttctat gggagggcga ttccctatac 4500
 ctgcatcaag ggaggagac acctgatttt ctgccactca aagaaaaagt gtgacgagct 4560
 cgcgccggcc ctccggggca tgggcttgaa tgccgtggca tactatagag ggttggacgt 4620
 ctccataata ccagctcagg gagatgtggt ggtcgtcgcc accgacgcc tcatgacggg 4680
 gtacactgga gactttgact ccgtgatcga ctgcaatgta gcggtcacc aagctgtcga 4740
 ctccagcctg gacccacct tcactataac cacacagact gtcccacaag acgtgtctc 4800
 acgcagtcag cgcccggggc gcacaggtag aggaagacag ggcacttata ggtatgttc 4860
 cactggtgaa cgagcctcag gaatgtttga cagtgtagt ctttgtgagt gctacgacgc 4920
 aggggctgcg tggtagatc tcacaccagc ggagaccacc gtcaggetta gagegtattt 4980
 caacacgccc ggcctacccg tgtgtcaaga ccatcttgaa ttttgggagg cagttttcac 5040
 cggcctcaca cacatagacg cccacttct ctcccaaca aagcaagcgg gggagaactt 5100
 cgctaccta gtagcctacc aagctacggt gtgcgccaga gccaaagccc ctccccgctc 5160
 ctgggacgcc atgtggaagt gcctggcccc actcaagcct acgttgagg gccccacacc 5220
 tctctgtac cgtttgggccc ctattaccaa tgaggtcacc ctccacacacc ctgggacgaa 5280
 gtacatcgcc acatgcatgc aagctgacct tgaggtcatg accagcacgt gggtcctagc 5340
 tggaggagtc ctggcagccg tcgccgata ttgcctggcg actggatgcg ttccatcat 5400
 cgcccgcttg cagctcaacc agcgagtcgt cgttgcccg gataaggagg tctgtatga 5460

10

20

30

40

ggcttttgat gagatggagg aatgcgcctc tagggcggct ctcatcgaag aggggcagcg 5520
 gatagccgag atgttgaagt ccaagatcca aggcttgctg cagcaggcct ctaagcaggc 5580
 ccaggacata caaccgccta tgcaggcttc atggcccaaa gtggaacaat tttgggccag 5640
 acacatgttg aacttcatta gcggcatcca atacctcgca ggattgtcaa cactgccagg 5700
 gaaccccgcg gtggttcca tgatggcatt cagtgcgcgc ctaccagtc cgttgtcgac 5760
 cagtaaccacc atccttctca acatcatggg aggctgggta gcgtcccaga tcgcaccacc 5820
 cgcgggggcc accggtttg tegtcaagg cctgggtggg gctgccgtgg gcagcatagg 5880
 cctgggtaag gtgtgttg acatcctggc aggatatggt gcgggcattt cgggggcct 5940
 cgtcgattc aagatcatgt ctggcgagaa gccctctatg gaagatgtca tcaatctact 6000
 gcctgggac ctgtctccg gagccctggt ggtgggggtc atctgcgcgg ccattctgcg 6060
 ccgccacgtg ggaccggggg agggcgcggt ccaatggatg aacaggctta ttgcctttgc 6120
 ttccagagga aaccacgtc cccctactca ctacgtgacg gagtcggatg cgtcgacgcg 6180
 tgtgaccaa ctacttgct ctcttactat aaccagccta ctcagaagac tccacaattg 6240
 gataactgag gactgcccc tccatgctc cggatcctgg ctccgcgacg tgtgggactg 6300
 ggtttgacc atcttgacag acttcaaaaa ttggtgacc tctaaattgt tcccaagct 6360
 gcccgccctc cccttcact ctgttcaaaa ggggtacaag ggtgtgtggg ccggcactgg 6420
 catcatgacc acgcgtgcc ctgcggcgc caacatctct ggcaatgtcc gcctgggctc 6480
 tatgaggatc acagggccta aaacctgcat gaacacctgg caggggacct ttctatcaa 6540
 ttgttacacg gagggccagt gcgcgcgaa acccccacg aactacaaga ccgccatctg 6600
 gaggttgcg gcctcggagt acgcggaggt gacgcagcat ggtcgtact cctatgtaac 6660
 aggactgacc actgacaatc tgaaaattcc ttgccaacta cttctccag agttttctc 6720
 ctgggtggac ggtgtgcaga tccatagggt tgcaccaca ccaaagccgt tttccggga 6780
 tgaggctctg ttctgcgtt ggttaattc ctatgtgtc ggtcccagc ttccctgtga 6840

10

20

30

40

acctgagccc gacgcagacg tattgaggtc catgctaaca gatecgcccc acatcacggc 6900
 ggagactgcg gcgcggcgct tggcacgggg atcacctcca tetgaggcga gtcctcagt 6960
 gagccagcta tcagcacctg cgctgcgggc cacctgcacc acccacagca acacctatga 7020
 cgtggacatg gtcgatgcca acctgtcat ggagggcggt gtggctcaga cagagcctga 7080
 gtccagggtg cccgtttctg actttctcga gccaatggcc gaggaagaga gcgaccttga 7140
 gccctcaata ccacggaggt gcatgtccc caggagcggg ttccacggg ccttaccggc 7200
 ttgggcacgg cctgactaca acccgccgct cgtggaatcg tggaggaggc cagattacca 7260
 accgcccacc gttgttggtt gtgtctccc ccccccaag aaggccccga cgcctcccc 7320
 aaggagacgc cggacagtgg gtctgagcga gacaccata tcagaagccc tccagcaact 7380
 ggccatcaag accttggcc agccccctc gacgggtgat gcaggctcgt ccacgggggc 7440
 gggcgccgcc gaatccggcg gtccgacgtc ccttggtgag cgggccccct cagagacagg 7500
 ttccgcctcc tctatgcccc cctcagagg ggagcctgga gatecggacc tggagtctga 7560
 tcaggtagag ctcaacctc cccccaggg ggggggggta gctcccggtt cgggctcggg 7620
 gtettggtct acttgtccg aggaggacga taccaccgtg tgtgtctcca tgtcatactc 7680
 ctggaccggg gctctaataa ctccctgtag cccgaagag gaaaagttgc caatcaacc 7740
 tttagtaac tcgtgttgc gataccataa caaggtgtac tgtacaacat caaagagcgc 7800
 ctacagagg gctaaaaagg taacttttga caggacgcaa gtgtcgcacg cccattatga 7860
 ctacgtctta aaggacatca agctagcggc ttccaaggtc agcgcaaggc tctcacctt 7920
 ggaggaggcg tgccagttga ctccaccca ttctgcaaga tccaagtatg gattcggggc 7980
 caaggaggtc cgcagcttgt cgggagggc cgttaaccac atcaagtccg tgtggaagga 8040
 cctcttgga gaccacaaa caccaattcc cacaaccatc atggccaaaa atgaggtgtt 8100
 ctgctggac cccgccaagg ggggtaagaa accagctcgc ctcatgttt acctgacct 8160
 cggcgtccgg gtcigcgaga aaatggccct ctatgacatt acacaaaagc ttctcaggc 8220

10

20

30

40

ggtaatggga gcttctatg gcttccagta ctccccctgcc caacgggtgg agtatctctt 8280
 gaaagcatgg gcggaaaaga aggaccccat gggtttttcg tatgataccc gatgcttcga 8340
 ctcaaccgtc actgagagag acatcaggac cgaggagtcc atataccagg cctgctccct 8400
 gcccaggag gcccgcactg ccatacactc gctgactgag agactttacg taggagggcc 8460
 catgttcaac agcaagggtc aaacctgcgg ttacagacgt tgccgcgcca gcggggtgct 8520
 aaccactagc atgggtaaca ccatcacatg ctatgtgaaa gccctagcgg cctgcaaggc 8580
 tgcggggata gttgcgcccc caatgctggt atgcggcgat gacctagtag tcatctcaga 8640
 aagccagggg actgaggagg acgagcggaa cctgagagcc ttacaggagg ccatgaccag 8700
 gtactctgcc cctcctggtg atccccccag accggaatat gacctggagc taataacatc 8760
 ctgttctca aatgtgtctg tggcggttggg cccgcggggc cgccgcagat actacctgac 8820
 cagagaccca accactccac tcgcccgggc tgcctgggaa acagttagac actcccctat 8880
 caattcatgg ctgggaaaca tcattccagta tgetccaacc atatgggttc gcatggtcct 8940
 aatgacacac ttcttctcca ttctcatggt ccaagacacc ctggaccaga acctcaactt 9000
 tgagatgtat ggatcagtat actccgtgaa tcctttggac ctccagcca taattgagag 9060
 gttacacggg cttgacgcct ttctatgca cacatactct caccacgaac tgacgcgggt 9120
 ggcttcagcc ctcaaaaaac ttggggcgcc accctcagg gtgtggaaga gtcgggctcg 9180
 cgcagtcagg gcgtccctca tctcccgtag agggaaagcg gccgtttgcg gccgatatct 9240
 cttcaattgg gcggtgaaga ccaagctcaa actcactcca ttgccggagg cgcgcctact 9300
 ggacttatec agttgggtca ccgtcggcgc cggcgggggc gacattttc acagcgtgtc 9360
 gcgcgccga cccgcctcat tactcttcgg cctactccta ctttctgtag gggtaggcct 9420
 cttctactc cccgctcggg agagcggcac aactaggta cactccatag ctaactgttc 9480
 ctttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 9540
 ccttttttt cctttctcat cttattctac ttttttttt ggtggctcca tcttagccct 9600

10

20

30

40

agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg ccgtaactgg 9660
 tctctctgca gatcatgtct aga 9683

<210> 11
 <211> 9695
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> pJ6/JFH-1 (1XFLAG)

<400> 11
 acccgccct aatagggcg acactccgc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
 cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccggg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt ctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
 tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420
 cgccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccagg tgggtgtgcg 480
 cgcgacaagg aagacttcgg agcgggccca gccacgtgga aggcgccagc ccacccctaa 540
 agatcggcgc tccactggca aatcctgggg aaaaccagga taccctggc ccctatacgg 600
 gaatgaggga ctcggtggg caggatggct cctgtcccc cgaggttccc gtccctcttg 660
 gggccccaat gacccccggc ataggtcgc caacgtgggt aaggtcatcg atacccctaac 720
 gtgcggcttt gcgacctca tgggtacat cctgtcgtg ggcgccccgc tcggcgcgct 780
 cgccagagct ctgcgcagtg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt ttgcaacagg 840
 gaacttacc ggttgctcct ttctatctt cttgctggc ctgctgtcct gcatcaccac 900
 cccggtctcc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatggtga ctaacgactg 960

20

30

40

caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggtgctgtc ctccacgtcc ccgggtgcgt 1020
 cccgtgcgag aaagtgggga atgcattctca gtgctggata ccggtctcac cgaatgtggc 1080
 cgtgcagcgg ccgggcgcc tcacgcaggg ctgctggacg cacatcgaca tggttgtgat 1140
 gtccgccacg ctctgtcttg cctctacgt gggggacctc tgcggtgggg tgatgctcgc 1200
 agcccaaatg ttcatgtct cgcgcagca ccactggttt gtccaagact gcaattgctc 1260
 catctacct ggtaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggtc 1320
 gccacggct accatgatct tggcgtacgc gatgcgtgtc cccgaggtca ttatagacat 1380
 cattagcggg gctcattggg gctcatgtt cggttggcc tacttctcta tgcagggagc 1440
 gtgggcgaaa gtctgttca tcctctgtt ggccgccggg gtggacgcgc gacccatac 1500
 tgttgggggt tctgccggg attacaagga tgacgatgac aaggaggcg gtagcttatt 1560
 tgacatgggc ccaggcaga aatccagct cgttaacacc aatggcagct ggcacatcaa 1620
 ccgcaccgcc ctgaactgca atgactcctt gcacaccggc tttatcgct ctctgttcta 1680
 caccacagc ttcaactcgt caggatgtcc cgaacgcag tccgctgcc gcagtatcga 1740
 ggccctccgg gtgggatggg gcgcttgca atatgaggat aatgtacca atccagagga 1800
 tatgagacce tattgttgc actaccacc aaggcagtgt ggcgtggtct ccgcgaagac 1860
 tgtgtgtggt ccagtgtact gttcacccc cagccagtg gtagtgggca cgaccgacag 1920
 gcttggagcg ccacttaca cgtgggggga gaatgagaca gatgtcttc tattgaacag 1980
 cactcgacca ccgtgggggt catggttcgg ctgcacgtgg atgaactctt ctggtacac 2040
 caagacttgc ggccaccac cctgccgtac tagagctgac ttcaacgcca gcaaggacct 2100
 gttgtgcccc aeggactgtt ttaggaagca tctgatacc acttacctca aatgcggctc 2160
 tgggccctgg ctacgccaa ggtgccgat cgactacccc tacaggctct ggcattaccc 2220
 ctgcacagtt aactatacca tcttcaaaat aaggatgtat gtgggagggg ttgagcacag 2280
 gctcacggct gcatgcaatt tcactcgtgg ggategttgc aacttggagg acagagacag 2340

10

20

30

40

aagtcactg tctcctttgt tgcactccac cacggaatgg gccattttac ctgtctctta 2400
ctcggacctg cccgccttgt cgactggctt tctccacctc caccaaaaca tcgtggacct 2460
acaattcatg tatggcctat cacctgccct cacaaaatac atcgccgat gggagtgggt 2520
aatactctta ttctgtctt tagcggacgc cagggtttgc gctgtcttat ggatgtcat 2580
ctgtttgggc caggccgaag cagcactaga gaagctggc atcttgacg ctgcgagcgc 2640
agctagctgc aatggtctcc tataatttgt catcttttc gtggctgctt ggtacatcaa 2700
gggtcgggta gtccccttag ctacctatc cctcactggc ctgtgtctt ttagcctact 2760
gtccttagca ttgcccacac aggttatgc ttatgacga tctgtgatg gccagatagg 2820
agcggctctg ctggtaatga tcacctctt cacactcacc ccggggata agacctctt 2880
cggccagtgt ctgtggtggt tgtgtctat cctgacctg ggggaagcca tgattcagga 2940
gtgggtacca cccatgcagg tgcgcggcgg ccgcatggc atcgctggg ccgtcactat 3000
attctgccg ggtgtggtgt ttgacattac caaatggctt ttggcgttgc ttgggcctgc 3060
ttacctctta agggccgctt tgacacatgt gccgtactc gtcagagctc acgtctgat 3120
aagggtatgc gctttggtga agcagctgc ggggggtagg tatgttcagg tggcgtatt 3180
ggcccttggc aggtggactg gcacctacat ctatgaccac ctcacacta tgcggactg 3240
ggccgctagc ggctgcgcg acttagcggc cgcgtggaa cccatcatct tcagtcgat 3300
ggagaagaag gtcactgtt ggggagcga gacggctga tgtggggaca ttctacatgg 3360
acttccctg tccgccgac tcggccagga gatcctctc ggcccagctg atggtacac 3420
ctccaagggg tggaagctcc ttgtcccat cactgcttat gccagcaaa cacgagcct 3480
cctgggcgcc atagtgtga gtatgacgg gcgtgacagg acagaacagg ccggggaagt 3540
ccaaatcctg tccacagtct ctacgtctt cctcggaaca accatctcgg gggttttgtg 3600
gactgtttac cacggagctg gcaacaagac tctagccggc ttacggggtc cgtcacgca 3660
gatgtactcg agtctgagg gggacttggg aggttgccc agccccctg ggaccaagtc 3720

10

20

30

40

ttitggagccg tgcaagtgtg gagccgtcga cctatatctg gtcacgcgga acgctgatgt 3780
 catccccggt cggagacgcg gggacaagcg gggagcattg ctctccccga gaccatttc 3840
 gaccttgaag gggtcctcgg gggggccggt gctctgccct agggggccacg tcgttgggct 3900
 cticcagaca gctgtgtgtc ctccggggcg ggccaaatcc atcgatttca tccccgttga 3960
 gacactcgac gttgttataa ggtctccac tttcagtac aacagcacgc caccgctgt 4020
 gccccagacc tatcaggteg ggtacttga tgctccaact ggcagtggaa agagcaccaa 4080
 ggctcctgtc gcgtatgccg cccaggggta caaagtacta gtgcttaacc cctcggtagc 4140
 tgccaccttg gggtttgggg cgtacctatc caaggcacat ggcataatc ccaacattag 4200
 gactggagtc aggaccgtga tgaccgggga ggccatcacg taciccacat atggcaaatt 4260
 tctcgccgat gggggctgcg ctageggcgc ctatgacatc atcatatgcg atgaatgcca 4320
 cgtgtggat gctacctcca ttctcgccat cggaacggtc ctgatcaag cagagacagc 4380
 cggggtcaga ctaactgtgc tggctacggc cacaccccc gggtcagtga caacccccca 4440
 tcccgatata gaagaggtag gcctcgggcg ggagggtgag atccccctt atgggagggc 4500
 gattccccia tcttgcatac agggagggag acacctgatt ttctgccact caaagaaaaa 4560
 gttgtacgag ctccggcgcg ccttcgggg catgggcttg aatgccgttg catactatag 4620
 agggttggac gctccataa taccagctca gggagatgtg gtggtcgtcg ccaccgacgc 4680
 cctcatgacg ggggtacactg gagactttga ctccgtgac gactgcaatg tagcggtcac 4740
 ccaagctgtc gaattcagcc tggacccac cttaactata accacacaga ctgtcccaca 4800
 agacgtgtc tcacgcagtc agcgccgcgg gcgcacaggt agaggaagac agggcactta 4860
 taggtatgtt tccactggcg aacgagctc aggaatgtt gacagtgtag tgctttgtga 4920
 gtgctacgac gcaggggctg cgtggtacga tctcacacca gcggagacca ccgtcaggct 4980
 tagagcgtat ttcaacacgc ccggcctacc cgtgtgtcaa gaccatcttg aattttggga 5040
 ggcagttttc accggcctca cacacataga cggccacttc ctctccaaa caaagcaage 5100

10

20

30

40

ggggggagaac ttcgcgtacc tagtagecta ccaagctacg gtgtgcgcca gagccaaggc 5160
 ccctcccccg tcttgggacg ccatgtggaa gtgcctggcc cgactcaagc ctacgcttgc 5220
 gggccccaca cctctcctgt accgtttggg ccctattacc aatgaggtca ccctcacaca 5280
 ccctgggacg aagtacatcg ccacatgcat gcaagctgac cttagaggtca tgaccagcac 5340
 gtgggtccta gctggaggag tcttggcagc cgtcgcgca tattgcctgg cgactggatg 5400
 cgtttccatc atcggccgct tgcacgtcaa ccagcgagtc gtcgttgccg cggataagga 5460
 ggtcctgtat gaggcctttg atgagatgga ggaatgcgcc tctagggcgg ctctcatcga 5520
 agaggggcag cggatagccg agatgttgaa gtccaagatc caaggcttgc tgcagcaggc 5580
 ctctaagcag gcccaggaca tacaaccgc tatgcaggt tcatggcca aagtgaaca 5640
 attttgggcc agacacatgt ggaacttcat tagcggcatc caatacctcg caggattgtc 5700
 aacactgcca gggaaccccg cggtggttc catgatggca ttcagtgcg ccctcaccag 5760
 tccgttgctg accagtacca ccctcttct caacatcatg ggaggctggt tagcgtcca 5820
 gatgcacca cccgcggggg ccaccggtt tgtcgtcagt ggcttgggtg gggctgcct 5880
 gggcagcata ggcttgggt aggtgctggt ggacatcctg gcaggatatg gtgcgggcat 5940
 ttcgggggcc ctctgcgat tcaagatcat gtctggcgag aagccctcta tggaagatgt 6000
 catcaatcta ctgcctggga tctgtctcc gggagccctg gtggtggggg tcatctgcgc 6060
 ggccattctg cgcgccacg tgggaccggg ggagggcgcg gtccaatgga tgaacaggct 6120
 tattgccttt gcttcagag gaaaccacgt cgccttact cactacgtga cggagtgcga 6180
 tgcgtgcag cgttgaccc aactacttg ctctcttact ataaccagcc tactcagaag 6240
 actccacaat tggataactg aggactgcc catccatgc tccggtact ggctccgca 6300
 cgtgtgggac tgggtttgca ccatcttgac agacttcaaa aattggctga cctctaaatt 6360
 gtccccaaag ctgcccggc tcccttcat ctcttgtaa aagggtaca aggtgtgtg 6420
 ggccggcact ggcatcatga ccacgcgtg cccttgcggc gccaacatct ctggcaatgt 6480

10

20

30

40

ccgcctgggc tctatgagga tcacagggcc taaaacctgc atgaacacct ggcaggggac 6540
 ctttcctatc aattgctaca cggagggccca gtgcgcgccg aaacccccca cgaactacaa 6600
 gaccgccatc tggagggtgg cggcctcgga gtacgcggag gtgacgcagc atgggtcgta 6660
 ctctatgta acaggactga ccactgacaa tctgaaaatt ccttgccaac taccttctcc 6720
 agagtitttc tcttgggtgg acggtgtgca gatccatagg ttgcaccca caccaaagcc 6780
 gttttccgg gatgaggtct cgttctcgct tgggcttaat tctatgctg tcgggtccca 6840
 gcttccctgt gaacctgagc ccgacgcaga cgtattgagg tccatgctaa cagatccgcc 6900
 ccacatcacg gcggagactg cggcgcggcg cttggcacgg ggatcacctc catctgaggc 6960
 gagtcctca gtgagccagc tatcagcacc gtcgtgcgg gccacctgca ccaccacag 7020
 caacacctat gacgtggaca tggtcgatgc caacctgctc atggaggcg gtgtggtca 7080
 gacagagcct gagtcagggt tgcctgtct ggactttctc gagccaatgg ccgaggaaga 7140
 gagcgacctt gagccctcaa taccatcgga gtgcatgctc cccaggagcg ggtttccacg 7200
 ggcttaccg gcttgggcac ggctgacta caaccgcgcg ctcttggaat cgtggaggag 7260
 gccagattac caaccgcccc ccgttgcctg ttgtgctctc cccccccca agaaggcccc 7320
 gagcctccc ccaaggagac gccggacagt gggctgagc gagagcacca taccagaagc 7380
 cctccagcaa ctggccatca agaccttgg ccagccccc tcgagcggtg atgcagctc 7440
 gtccacgggg gcgggcgcgc ccgaatccgg cggctcgacg tcccctggtg agccggcccc 7500
 ctccagagaa ggttcgcct cctctatgcc cccctcgag ggggagcctg gagatccgga 7560
 cctggagtct gatcaggtag agcttcaacc tccccccag gggggggggg tagctcccg 7620
 ttcgggctcg gggcttgggt ctacttctc cgaggaggac gataccaccg tgtgtgctc 7680
 catgtcatac tcttgaccg gggctctaat aactccctgt agccccgaag aggaaaagtt 7740
 gccaatcaac cctttgagta actcgtgtt gcgataccat aacaagggtg actgtacaac 7800
 atcaaagagc gcctcacaga gggctaaaaa ggtaactttt gacaggagc aagtgtcga 7860

10

20

30

40

cgcccaattat gactcagtct taaaggacat caagctagcg gcttccaagg tcagcgcaag 7920
 gctcctcacc ttggaggagg cgtgccagtt gactccacce cattctgcaa gatccaagta 7980
 tggattcggg gccaaaggagg tccgcagctt gtccgggagg gccgttaacc acatcaagtc 8040
 cgtgtggaag gacctcctgg aagaccacaa aacaccaatt cccacaacca tcatggccaa 8100
 aaatgagggtg ttctgcgtgg accccgccaa ggggggtaag aaaccagctc gcctcatcgt 8160
 ttacctgac ctccggctcc gggctctgca gaaaatggcc ctctatgaca ttacacaaaa 8220
 gcttctcag gcgtaatgg gagcttcta tggtctccag tactccctg cccaacgggt 8280
 ggagtatctc ttgaaagcat gggcggaaaa gaaggacccc atgggttttt cgtatgatac 8340
 ccgatgcttc gactcaaccg tcactgagag agacatcagg accgaggagt ccatatacca 8400
 ggctgtctcc ctgcccgagg aggcccgcac tgccatacac tcgtgactg agagacttta 8460
 cgtaggaggg cccatgttca acagcaaggg tcaaacctgc ggttacagac gttgccgcgc 8520
 cagcgggggtg ctaaccacta gcatgggtaa caccatcaca tgctatgtga aagccctagc 8580
 ggctgcaag gctgcgggga tagttgcgcc cacaatgtct gtatgcggcg atgacctagt 8640
 agtcatctca gaaagccagg ggactgagga ggacgagcgg aacctgagag ccttcacgga 8700
 ggccatgacc aggtactctg cccctcctgg tgatccccc agaccggaat atgacctgga 8760
 gctaataaca tctgttctt caaatgtgtc tgtggcggtg ggcccgcggg gccgcccag 8820
 atactacctg accagagacc caaccactcc actcggccgg gctgcctggg aaacagttag 8880
 acactccct atcaattcat ggctgggaaa catcatccag tatgctcaa ccatatgggt 8940
 tcgcatggtc ctaatgacac actttcttc cattctcatg gtccaagaca ccctggacca 9000
 gaacctcaac tttgagatgt atggatcagt atactccgtg aatcctttgg accttcagc 9060
 cataattgag aggttacacg ggettgacgc cttttctatg cacacatact ctcaccacga 9120
 actgacggg gtggttcag cctcagaaa acttggggcg ccacctca gggtgtggaa 9180
 gagtcgggct cgcgcagtc gggcgctcct catctccgt ggagggaag cgccgcttg 9240

10

20

30

40

cgcccgatat ctcttcaatt gggcggtgaa gaccaagctc aaactcactc cattgccgga 9300
 ggcgcgcccta ctggacttat ccagttgggt caccgtcggc gccggcgggg gcgacatttt 9360
 tcacagcgtg tcgcgcgccc gaccccgctc attactcttc ggccactcc tacttttctg 9420
 aggggtaggc ctcttcttac tccccgctcg gtagagcggc acacactagg tacactccat 9480
 agctaactgt tccttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttctttt 9540
 tttttttttt tccctctttc tccctctctc atcttattct actttcttct ttggtgctc 9600
 catcttagcc ctatgcacgg ctagctgtga aaggctcgtg agccgcatga ctgcagagag 9660
 tgccgtaact ggtctctctg cagatcatgt ctaga 9695

10

<210> 12
 <211> 9737
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> pJ6/JFH-1 (3XFLAG)

<400> 12
 acccgccct aatagggcg aactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
 cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctctc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
 tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420
 cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgacaagg aagacttcgg agcgttcca gccacgtgga aggcgccagc ccatccctaa 540
 agatcggcgc tccactggca aatcctgggg aaaaccagga taccctggc ccctatacgg 600

30

40

gaatgagga ctcggctggg caggatggct cctgtcccc cgaggtccc gtccctcttg 660
 gggccccaat gacccccggc ataggctcgc caacgtgggt aaggtcatcg atacccaaac 720
 gtgcggcttt gccgacctca tggggtacat cctgtctgtg ggcgccccgc tcggcggcgt 780
 cgccagagct ctcgcgcacg gcgtgagagt cctggaggac ggggtaatt ttgcaacagg 840
 gaacttaccg ggttgctcct ttctatctt cttgttgccc ctgtgtcct gcatcaccac 900
 cccggtctcc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatgggtga ctaacgactg 960
 caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggctgtgtc ctccacgtcc ccgggtgcgt 1020
 cccgtgcgag aaagtgggga atgcatctca gtgttgata ccgtctcac cgaatgtggc 1080
 cgtgcagcgg ccggcgccc tcacgcaggg ctgctggacg cacatcgaca tggttgtgat 1140
 gtccgccacg ctctgtctg cctctacgt gggggacctc tgcggtgggg tgatgtctgc 1200
 agcccaaatg ttcatgtct cgcgcagca ccaactggtt gtccaagact gcaattgtc 1260
 catctacct ggtaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactgtc 1320
 gccacggct accatgatct tggcgtacgc gatgcgtgtc ccgagggtca ttatagacat 1380
 cattagcggg gctcattggg gcgtcatgtt cggcttgccc tacttctcta tgcagggagc 1440
 gtgggcgaaa gtctgtgtca tcttctgtt ggccgccggg gtggacgcgc gacccatac 1500
 tgttgggggt tctgcccgcg actacaaaga ccatgacggt gattataaag atcatgacat 1560
 cgattacaag gatgacgatg acaaggagg cggtagctta ttgacatgg gcccaggca 1620
 gaaaatccag ctcgttaaca ccaatggcag ctggcacatc aaccgcaccg ccctgaactg 1680
 caatgactcc ttgcacaccg gctttatcgc gtctctgtc tacaccaca gcttcaactc 1740
 gtcaggatgt ccgaaacga tgcgcctg ccgcagtatc gaggccttc ggggtgggatg 1800
 gggcgcttg caatatgagg ataattgtac caatccagag gatatgagac cctattgtc 1860
 gcactacca ccaaggcagt gtggcgtggc ctccggaag actgtgtgtg gccagtgta 1920
 ctgtttcacc ccagcccgagg tggtagtggg cagaccgac aggttgagg cgcacctta 1980

10

20

30

40

cacgtggggg gagaatgaga cagatgtctt cctattgaac agcactcgac caccgctggg 2040
 gtcattggtc ggctgcacgt ggatgaactc ttctggctac accaagactt gcggcgcacc 2100
 accctgccgt actagagctg acttcaacgc cagcacggac ctgttgtgcc ccacggactg 2160
 ttttaggaag catctgata ccacttacct caaatgcggc tctgggcctt ggctcacgcc 2220
 aaggcgctg atcgactacc cctacaggct ctggcattac ccctgcacag ttaactatac 2280
 catcttcaaa ataaggatgt atgtgggagg ggttgagcac aggtcacgg ctgcatgcaa 2340
 tttcactcgt ggggatcgtt gcaacttga ggacagagac agaagtcaac tgtctccttt 2400
 gttgcactcc accacggaat gggccatttt acctgtctct tactcggacc tgcccgctt 2460
 gtcgactggc etttccacc tccacaaaa catcgtggac gtacaattca tgtatggcct 2520
 atcacctgcc ctcacaaaat acatcgctcg atgggagtgg gtaatactct tatctctgct 2580
 cttagcggac gccagggttt gcgcctgctt atggatgctc atcttgttgg gccaggccga 2640
 agcagcacta gagaagctgg tcattcttga cgtcgcgagc gcagctagct gcaatggctt 2700
 cctatatattt gtcattttt tcgtggtgc ttggtacac aagggtcggg tagtccctt 2760
 agctacctat tccctcactg gctgtgggc ctttagccta ctgtccctag cattgcccc 2820
 acaggettat gcttatgacg catctgtgca tggccagata ggagcgctc tgctggtaat 2880
 gatcacctc ttcacactca ccccggggta taagacctc ctggccagt gtctgtgtgtg 2940
 gttgtgctat ctctgacct tgggggaagc catgattcag gattgggtac caccatgca 3000
 ggtgcgcggc ggccgcgatg gcatcgctg gcccgctact atattctgcc cgggtgtgtg 3060
 gtttgacatt accaaatggc ttttggcgtt gcttggcct gcttacctct taaggccgc 3120
 tttgacacat gtgcgtact tcgtcagagc tcacgtctg ataagggtat gcgttttgt 3180
 gaagcagctc ggggggggta ggtatgttca ggtggcgcta ttggcccttg gcaggtggac 3240
 tggcacctac atctatgacc acctcacacc tatgtcggac tggccgcta gcggcctgcg 3300
 cgacttagcg gtgcctgtg aacctatcat ctccagtcg atggagaaga aggtcatcgt 3360

10

20

30

40

ctggggagcg gagacggctg catgtgggga cattctacat ggacttcccg tgtccgcccg 3420
 actcggccag gagatcctcc tcggcccage tgatggctac acctccaagg ggtggaagct 3480
 ccttgctccc atcaactgctt atgcccagca aacacgaggc ctcttgggcg ccatagtgg 3540
 gagtatgacg gggcgtgaca ggacagaaca ggccggggaa gtccaaatcc tgtccacagt 3600
 ctctcagtc ttcctcggaa caaccatctc gggggttttg tggactgttt accacggagc 3660
 tggcaacaag actctagccg gcttacgggg tcgggtcagc cagatgtact cgagtgtga 3720
 gggggacttg gtaggttggc ccagcccccc tgggaccaag tctttggagc cgtgcaagtg 3780
 tggagccgtc gacctatc tggtcacgga gaacgtgat gtcaccccg ctcggagacg 3840
 cggggacaag cggggagcat tgctctcccc gagaccatt tcgacctga aggggtcctc 3900
 gggggggccg gtgctctgcc ctaggggcca cgtcgttggg ctcttccgag cagctgtgtg 3960
 ctctcggggc gtggccaaat ccatcgattt catccccgtt gagacactcg acgttgttac 4020
 aaggctccc actttcagtg acaacagcac gccaccggt gtgcccaga cctatcaggt 4080
 cgggtacttg catgctcaa ctggcagtg aaagagcacc aaggctcctg tcgcgtatgc 4140
 cggccagggg tacaaagtac tagtgcttaa cccctcggta gctgccacc tggggtttgg 4200
 ggcgtacctt tccaaggcac atggcatcaa tcccaacatt aggactggag tcaggaccgt 4260
 gatgaccggg gaggccatca cgtactccac atatggcaaa tttctcgccg atgggggctg 4320
 cgctagcggc gcctatgaca tcacatcatg cgatgaatgc cacgtgttg atgtacctc 4380
 cattctcggc atcggaacgg tccttgatca agcagagaca gccggggta gactaactgt 4440
 gtggtctacg gccacacccc ccgggtcagt gacaacccc catccgata tagaagaggt 4500
 aggcctcggg cgggaggggt agatccccct ctatgggagg gcgattcccc tatectgcat 4560
 caaggagggg agacacctga tttctgcca ctcaaagaaa aagtgtgacg agctcgcggc 4620
 ggcccttcgg ggcattgggt tgaatccgt gccatactat agagggttgg acgtctccat 4680
 aataccagct caggagatg tgggtgctgt cgccaccgac gccctcatga cggggtacac 4740

10

20

30

40

tggagacttt gactccgtga tcgactgcaa tgtagcggtc acccaagctg tcgacttcag 4800
 cctggacccc accttcacta taaccacaca gactgtccca caagacgtg tctcacgcag 4860
 tcagcgccgc gggcgcacag gtagaggaag acagggcact tataggtatg tttccactgg 4920
 tgaacgagcc tcaggaatgt ttgacagtgt agtgctttgt gagtgtacg acgcaggggc 4980
 tgcgtggtac gatctcacac cagcggagac caccgtcagg cttagagcgt atttcaacac 5040
 gcccggccta cccgtgtgtc aagaccatct tgaattttgg gaggcagttt tcaccggcct 5100
 cacacacata gacgcccact tcctctccca aacaaagcaa gcgggggaga acttcgcgta 5160
 cctagtagcc taccaagcta cgggtgtgcg cagagccaag gccctcctcc cgctctggga 5220
 cgccatgttg aagtgcctgg cccgactcaa gcctacgctt gcgggcecca cactctcct 5280
 gtaccgtttg ggccctatta ccaatgaggt caccctcaca caccctggga cgaagtacat 5340
 cgccacatgc atgcaagctg accttgaggt catgaccagc acgtgggtcc tagctggagg 5400
 agtcttgga gccgtgcgc catattgcct ggcgactgga tgcgtttcca tcctcgccg 5460
 ctgtcacgtc aaccagcgag tcgtcgttgc gccggataag gaggtcctgt atgaggcttt 5520
 tgatgagatg gaggaatgcg cctctagggc ggctctcatc gaagaggggc agcggatagc 5580
 cgagatgttg aagtccaaga tccaaggctt gctgcagcag gcctctaagc aggcccagga 5640
 catacaacc gctatgcagg ctctcatggc caaagtggaa caattttggg ccagacacat 5700
 gtggaacttc attagcgga tccaatacct cgcaggattg tcaacactgc cagggaacc 5760
 cgcggtggt tccatgatgg cattcagtgc cgccctcacc agtccgttgt cgaccagtac 5820
 caccatcct ctcaacatca tgggaggctg gttagcgtcc cagatgcac caccgcggg 5880
 ggccaccggc tttgtcgtca gtggcctggt gggggctgcc gtgggcagca taggcctggg 5940
 taaggtgctg gtggacatcc tggcaggata tgggtcgggc atttcggggg ccctcgtcgc 6000
 attcaagatc atgtctggcg agaagccctc tatggaagat gtcataatc tactgcctgg 6060
 gatcctgtct ccgggagccc tggtggtggg ggtcatctgc gcggccattc tgcgcgccca 6120

10

20

30

40

cgtgggaccg ggggagggcg cggccaatg gatgaacagg cttattgcct ttgcttccag 6180
 aggaaaccac gtgccccta ctactacgt gacggagtcg gatgcgtcgc agcgtgtgac 6240
 ccaactaatt ggctctctta ctataaccag cctactcaga agactccaca attggataac 6300
 tgaggactgc cccatcccat gctccggatc ctggctccgc gacgtgtggg actgggtttg 6360
 caccatcttg acagacttca aaaattggct gacctctaaa ttgttcccca agctgcccgg 6420
 cctccccttc atctcttgtc aaaaggggta caaggtgtg tgggcccggc ctggcatcat 6480
 gaccacgcgc tgcccttgcg gcgccaacat cctggcaat gtcgccttg gctctatgag 6540
 gatcacaggc cctaaaacct gcatgaacac ctggcagggg acctttccta tcaattgcta 6600
 cacggagggc cagtgcgcgc cgaaccccc cacgaactac aagaccgcca tctggagggt 6660
 ggcggcctcg gactacgcgg aggtgacgca gcatgggtcg tactctatg taacaggact 6720
 gaccactgac aatctgaaaa ttcttgcca actaccttct ccagagtttt tctcctgggt 6780
 ggacggtgtg cagatccata ggtttgcacc cacaccaaag ccgtttttcc gggatgaggt 6840
 ctcgttctgc gttgggctta attcctatgc tgtcgggtcc cagcttccct gtgaacctga 6900
 gcccgacgca gacgtattga ggtccatgct aacagatccg ccccatca cggcggagac 6960
 tgcggcgcgg cgcttggcac ggggatcacc tccatctgag gcgagctcct cagtgaacca 7020
 gctatcagca ccgtcgtcgc gggccacctg caccaccac agcaaacct atgacgtgga 7080
 catggtcgat gccaacctgc tcatggaggc cgggtgtggc cagacagagc ctgagtccag 7140
 ggtgcccgtt ctggactttc tcgagccaat ggccgaggaa gagagcgacc ttgagccctc 7200
 aataccatcg gactgcatgc tcccaggag cgggtttcca cgggccttac cgcttgggc 7260
 acggcctgac tacaaccgc cgtcgtgga atcgtggagg aggcagatt accaaccgcc 7320
 caccgttgct ggttgtgctc tcccccccc caagaaggcc ccgacgcctc cccaaggag 7380
 acgccggaca gtgggtctga gcgagagcac catacagaa gccctccagc aactggccat 7440
 caagaccttt ggccagcccc cctcgagcgg tgatgcaggc tcgtccacgg gggcgggcgc 7500

10

20

30

40

cgccgaatcc ggagggtccga cgtccccctgg tgagccggcc cctcagaga caggttccgc 7560
 ctctctatg cccccctcg agggggagcc tggagatccg gacctggagt ctgacaggt 7620
 agagcttcaa cctccccccc aggggggggg ggtagctccc ggttcgggct cggggtcttg 7680
 gtctacttgc tccgaggagg acgataccac cgtgtgtgc tccatgtcat actcctggac 7740
 cggggtctta ataactcct gtagcccca agaggaaaag ttgccaatca accctttgag 7800
 taactcgctg ttgcgatacc ataacaagg gtactgtaca acatcaaaga ggcctcaca 7860
 gagggctaaa aaggtaactt ttgacaggac gcaagtgtc gacgccatt atgactcagt 7920
 cttaaaggac atcaagctag cggttccaa ggtcagcgca aggtccctca ccttggagga 7980
 ggctgtccag ttgactccac cccattctgc aagatccaag tatggattcg gggccaagga 8040
 ggtccgcagc ttgtccggga gggccgttaa ccacatcaag tccgtgtgga aggacctcct 8100
 ggaagacca caaacaccaa tccccacaac catcatggcc aaaaatgagg tgttctgct 8160
 ggaccccgcc aaggggggta agaaaccagc tcgcctcctc gtttacctg acctcggcgt 8220
 ccgggtctgc gagaaaatgg cctctatga cattacaaa aagcttctc aggcggtaat 8280
 gggagcttcc tatggcttcc agtactccc tgcacaacgg gtggagtatc tottgaaagc 8340
 atgggcggaa aagaaggacc ccatgggttt ttctatgat acccgatgtc tgcactaac 8400
 cgtcactgag agagacatca ggaccgagga gtccatatac caggcctgct cctgccccga 8460
 ggaggccccgc actgccatac actcgtgac tgagagactt tacgtaggag ggcccatgtt 8520
 caacagcaag ggtcaaacct gcggttacag acgttgccgc gccagcgggg tgctaaccac 8580
 tagcatgggt aacaccatca catgtatgt gaaagcccta gcggcctgca aggtgcggg 8640
 gatagttgcg cccacaatgc tggatgcgg cgatgacct gtagtcatct cagaaagcca 8700
 ggggactgag gaggacgagc ggaacctgag agccttcaag gaggccatga ccaggtactc 8760
 tgccccctct ggtgateccc ccagaccgga atatgacct gagetaataa catctgttc 8820
 ctcaaagtgt tctgtggcgt tgggccccgc ggccgcgcgc agatactacc tgaccagaga 8880

10

20

30

40

cccaaccact ccactegccc gggctgacctg ggaacacagti agacactccc ctatcaattc	8940	
atggctggga aacatcatcc agtatgctcc aaccatatgg gttegcattg tectaattgac	9000	
acaattcttc tccattctca tggccaaga caccctggac cagaacctca actttgagat	9060	
gtatggatca gtatactccg tgaatccttt ggaccitcca gccataattg agaggttaca	9120	
cgggcttgac gccttttcta tgcacacata ctctcaccac gaactgaecg gggctggcttc	9180	10
agccctcaga aaacttgggg cgccaccct cagggtgtgg aagagtcggg ctgcgcagti	9240	
cagggcgtcc ctcatctccc gtggaggga agcgccgctt tgcggccgat atctcttcaa	9300	
ttgggcggtg aagaccaagc tcaaactcac tccattgccg gaggcgcgcc tactggactt	9360	
atccagttgg ttaccgctcg gcgcggcgg gggcgacatt ttacacagcg tgtcgcgcgc	9420	
cggacccgcg tcattactct teggcctact cctacttttc gtaggggtag gcctcttct	9480	20
actccccgct cggtagagcg gcacacacta ggtacactcc atagctaaact gttccttttt	9540	
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttct tttttttttt ttccctctt	9600	
tcttcccttc tcattctatt ctactttctt tcttgggtgc tccatcttag cctagtcac	9660	
ggctagctgt gaaaggctcg tgagccgcat gactgcagag agtgccgtaa ctggtctctc	9720	
tgcagatcat gtctaga	9737	30
<210> 13		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer (S-17)		40
<400> 13		
cgggagagcc atagtgg	17	

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (R-19)

<400> 14

agtaccacaa ggcctttcg

19

10

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<400> 15

ctgcggaacc gtgagtacac

20

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (1141S-2a)

30

<400> 16

tgtecgccac gctetgct

18

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer (J6E2-K-R)

<400> 17

atctgtctct ttctcccccc a

21

<210> 18

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (J6E2-K-F)

<400> 18
 tggggggaga aagagacaga t 21 10

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (3189R-1H) 20

<400> 19
 ccagtcacc tgccaagg 18

<210> 20
 <211> 9695
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> pJ6/JFH-1 (1XFLAG) N->K 30

<400> 20
 acccgccct aatagggcg acactccgc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60

cttcacgcag aaagcgteta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccagggcc 120

ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccgggtg agtacaccgg aattgccggg 180

aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240

caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg 300

tgtttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360

tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tgccccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420

40

cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgacaagg aagacttcgg agcgggccca gccacgtgga aggcgccagc ccattccctaa 540
 agatcggcgc tccactggca aatcctgggg aaaaccagga tacccttgge ccctatacgg 600
 gaatgaggga ctcggtggg caggatggct cctgtcccc cgaggttccc gtccctcttg 660
 gggccccaat gacccccggc ataggtcgc caacgtgggt aaggtcatcg atacccctaac 720
 gtgcggcttt gccgacctca tggggtacat cctgtcgtg ggccccccgc tcggcggcgt 780
 gccagagct ctgcgcgatg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt ttgcaacagg 840
 gaacttaccg ggttgcctct tttctatctt cttgttgccc ctgtgtcct gcattaccac 900
 cccggtctcc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatggtga ctaacgactg 960
 caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggctgtgtc ctccacgtcc cgggtgtcgt 1020
 cccgtgcgag aaagtgggga atgcattca gtgttgata ccggtctcac cgaatgtggc 1080
 cgtgcagcgg cccggcgccc tcacgcaggg cttgcggacg cacatcgaca tggtttgtat 1140
 gtccgccacg ctctgtctg cctctacgt gggggacctc tgcggtgggg tgatgtcgc 1200
 agcccaaatg ttcatgtct cgcgcagca ccaatggtt gtccaagact gcaattgtc 1260
 catctacct ggtaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactgtc 1320
 gccacggct accatgatct tggcgtacg gatgcgtgtc cccgaggtca ttatagacat 1380
 cattagcggg gctcattggg gcgtcatgtt cggcttgccc tacttctcta tgcagggagc 1440
 gtgggcgaaa gtcttgtca tccttctgtt ggccgcggg gtggacgcgc gcaccatac 1500
 tgttgggggt tctgccggg attacaagga tgacgatgac aaggaggcg gtagcttatt 1560
 tgacatggc cccaggcaga aaatccagct cgttaacacc aatggcagct ggcacatcaa 1620
 ccgcaccgcc ctgaactgca atgactcctt gcacaccggc ttatgcgt ctctgttcta 1680
 caccacagc ttcaactgt caggatgtc cgaacgatg tccgctgcc gcagtatga 1740
 ggcttccgg gtgggatgg gcgccttgca atatgaggat aatgtacca atccagagga 1800

10

20

30

40

tatgagaccc tattgttggc actaccaccc aaggcagtgt ggcgtggctt ccgcgaagac 1860
 tgtgtgtggc ccagtgtact gtttcacccc cagcccagtg gtagtgggca cgaccgacag 1920
 gcttggagcg cccacttaca cgtgggggga gaaagagaca gatgtcttcc tattgaacag 1980
 cactegacca ccgctggggg catggttcgg ctgcacgtgg atgaactctt ctggctacac 2040
 caagacttgc ggcgaccac cctgccgtac tagagctgac ttcaacgcca gcacggacct 2100
 gtgtgcccc acggactgtt ttaggaagca tcttgatacc acttacctca aatgcggctc 2160
 tgggccttgg ctacgccaa ggtgcctgat cgactacccc tacaggtctt ggcattaccc 2220
 ctgcacagtt aactatacca tcttcaaaat aaggatgtat gtgggagggg ttgagcacag 2280
 gctcacggtt gcatgcaatt tcactcgtgg ggatcgttgc aacttggagg acagagacag 2340
 aagtcactg tctcctttgt tgcactccac caggaatgg gccatcttac ctigtcttta 2400
 ctcgacctg ccgccttgt cgactggctt tctccacctc caccaaaaca tctgggacgt 2460
 acaattcatg tatggcctat cacctgccct caaaaatac atcgtccgat gggagtgggt 2520
 aatactctta ttctgtctt tagcggacgc cagggtttgc gctgtcttat ggatgctcat 2580
 ctgtttgggc caggccgaag cagcactaga gaagctggtc atcttgcacg ctgcgagcgc 2640
 agctagctgc aatggcttcc tatattttgt catcttttcc gtggcigtct ggtacatcaa 2700
 gggtcgggta gtcccttag ctacctatc cctcactggc ctgtggctct ttagcctact 2760
 gctcctagca ttgcccaac aggcttatgc ttatgacgca tctgtgcatg gccagatagg 2820
 agcggctctg ctggtaatga tcacctctt cactcacc ccgggtata agacctcct 2880
 cgccagtgt ctgtgggtgt tgtgtatct cctgacctg ggggaagcca tgattcagga 2940
 gtgggtacca cccatgcagg tgcggggcgg ccgcgatggc atcgcgtggg ccgtcactat 3000
 attctgcccg ggtgtggtgt ttgacattac caaatggctt ttggcgttgc ttgggcctgc 3060
 ttacctctta agggccgctt tgacacatgt gccgtacttc gtcagagctc acgtctgat 3120
 aagggtatgc gcttttgtga agcagctcgc ggggggtagg tatgttcagg tggcgtatt 3180

10

20

30

40

ggcccttggc aggtggactg gcacctacat ctatgaccac ctcacaccta tgteggactg 3240
 ggccgctagc ggctgcgcg acttagcggt cgccgtggaa cccatcatct tcagtccgat 3300
 ggagaagaag gtcacgtct ggggagcgga gacggctgca tgtggggaca ttctacatgg 3360
 acttcccgtg tccgcccga cggccagga gacctcctc ggcccagctg atggetacac 3420
 ctccaagggg tggaagctcc ttgctccat cactgcttat gccagcaaa cagaggcct 3480
 cctgggcgcc atagtgggta gtagacggg gcgtgacagg acagaacagg ccggggaagt 3540
 ccaaactctg tccacagtct ctcagtcctt cctcggaaca accatctcgg gggttttgtg 3600
 gactgtttac cagggagctg gcaacaagac tctagccggc ttacggggtc cggtcacgca 3660
 gatgtactcg agtgctgagg gggacttggg aggttggccc agccccctg ggaccaagtc 3720
 ttggagccg tgcaagtgtag gacgctgca cctatatctg gtcacgagga acgctgatgt 3780
 catcccggct cggagacgag gggacaagcg gggagcattg cttccccga gaccatttc 3840
 gaccttgaag gggctcctcg gggggccggt gctctgccct aggggccacg tcgttgggct 3900
 ctccgagca gctgtgtgct ctcggggcgt ggccaaatcc atcgatttca tccccgttga 3960
 gacactcgac gttgttaca ggtctccac ttctagtgac aacagcacgc caccggctgt 4020
 gcccagacc taccaggtcg ggtacttgca tctccaact ggcagtggaa agagcaccaa 4080
 ggtccctgtc gcgtatgcc cccaggggta caaagtacta gtgcttaacc cctcggtagc 4140
 tgccaccctg gggtttggg cgtacctatc caaggcacat ggcatcaatc ccaacattag 4200
 gactggagtc aggaccgtga tgaccggga ggccatcacg tactccacat atggcaaatt 4260
 tctcgccgat gggggctgag ctagcggcgc ctatgacatc atcatatgag atgaatgcca 4320
 cgtgtggat gctacctcca ttctcgcat cggaacggtc cttgatcaag cagagacagc 4380
 cggggtcaga ctaactgtgc tggtacggc cacaccccc gggtcagtga caacccccca 4440
 tccgatata gaagaggtag gcctcgggcg ggagggtgag atccccctt atgggagggc 4500
 gattccccta tctgcatca agggaggag acacctgatt ttctgccact caaagaaaaa 4560

10

20

30

40

gtgtgacgag ctgcggcg cccttcgggg catgggcttg aatgccgtgg catactatag 4620
 agggttggac gtctccataa taccagctca gggagatgtg gtggtcgtcg ccaccgacgc 4680
 cctcatgacg gggtacactg gagacttga ctcctgtatc gactgcaatg tagcggtcac 4740
 ccaagctgtc gacttcagcc tggacccac ctctactata accacacaga ctgtccaca 4800
 agacgtgtc tcacgcagtc agcgcgcgg gcgcacaggt agaggaagac agggcactta 4860
 taggtatgtt tccactgggtg aacgagcctc aggaatgttt gacagtgtag tgctttgtga 4920
 gtgctacgac gcaggggctg cgtgggtacga tctcacacca gcggagacca ccgtcaggct 4980
 tagagcgtat ttcaacacgc ccggcctacc cgtgtgtcaa gaccatcttg aattttggga 5040
 ggcagttttc accggcctca cacacataga cgcctacttc ctctccaaa caaagcaagc 5100
 gggggagaac ttgcgtacc tagtagccta ccaagctacg gtgtgcgcca gagccaaggc 5160
 ccctcccccg tcttgggaag ccatgtggaa gtgcctggcc cgactcaagc ctacgtttgc 5220
 gggccccaca cctctcctgt accgtttggg ccctattacc aatgaggtea ccctcacaca 5280
 ccctgggacg aagtacatcg ccacatgcat gcaagctgac cttgaggtea tgaccagcac 5340
 gtgggtccta gctggaggag tcttggcagc cgtcgccga tattgcctgg cgactggatg 5400
 cgtttccatc atcgccgct tgcaagctca ccagcgagtc gtcgttgcgc cggataagga 5460
 ggtcctgtat gaggttttg atgagatgga ggaatgcgc tctagggcgg ctctcatcga 5520
 agaggggcag cggatagccg agatgttgaa gtccaagatc caaggtttgc tgcagcaggc 5580
 ctctaagcag gccagagaca tacaaccgc tatgcaggt tcatggcca aagtgaaca 5640
 attttgggcc agacacatgt ggaacttcat tagcggcatc caatacctcg caggattgtc 5700
 aacactgcca gggaaccccg cgttggttc catgatggca ttcagtgcg ccctcaccag 5760
 tccgttgctg accagtacca ccctccttct caacatcatg ggaggttgt tagcgtccca 5820
 gatgcacca cccgcggggg ccaccgctt tgtcgtcagt ggcctgggtg gggctgccg 5880
 gggcagcata ggcctgggtg aggtgctgtt ggacatcctg gcaggatatg gtgcgggcat 5940

10

20

30

40

ttcgggggcc ctctgcgat tcaagatcat gtctggcgag aagccctcta tggaagatgt 6000
 catcaatcta ctgectggga tectgtctcc gggagccctg gtggtggggg tcatctgcgc 6060
 ggccattctg cgccgccacg tgggaccggg ggagggcgcg gtccaatgga tgaacaggct 6120
 tattgccttt gcttccagag gaaaccacgt cgccctact cactacgtga cggagtcgga 6180
 tgcgtcgcag cgtgtgaccc aactacttgg ctctcttact ataaccagcc tactcagaag 6240
 actccacaat tggataactg aggactgccc catcccatgc tccggatcct ggctccgcga 6300
 cgtgtgggac tgggtttgca ccactttgac agacttcaaa aattggtga cctctaaatt 6360
 gtccccaaag ctgcccggcc tccccctcat ctcttgtaa aaggggtaca aggggtgtgtg 6420
 ggccggcact ggcatcatga ccaecgcgtg cccttgccgc gccaacatct ctggcaatgt 6480
 ccgctgggce tctatgagga tcacagggcc taaaacctgc atgaacacct ggcaggggac 6540
 ctttctatc aattgctaca cggagggcca gtgcgcgcgc aaacccccca cgaactacaa 6600
 gaccgccatc tggaggggtg cgccctcgga gtacgcggag gtgacgcagc atgggtcgta 6660
 ctctatgta acaggactga ccactgacaa tctgaaaatt ccttgccaac taccttctcc 6720
 agagtttttc tectgggtgg acggtgtgca gatccatagg ttgaccca caccaaagcc 6780
 gtttttccgg gatgaggctc cgttctgcgt tgggettaat tctatgctg tcgggtccca 6840
 gcttccctgt gaacctgagc ccgacgcaga cgtattgagg tccatgctaa cagatccgcc 6900
 ccacatcacg gcggagactg cggcgcggcg ctgggcacgg ggatcacctc catctgaggc 6960
 gagtccctca gtgagccagc tatcagcacc gtcgtgcgg gccacctgca ccaccacag 7020
 caacacctat gacgtggaca tggtcgatgc caacctgctc atggagggcg gtgtggctca 7080
 gacagagcct gagtccaggg tgcccgttct ggactttctc gagccaatgg ccgaggaaga 7140
 gagcgacctt gagccctcaa taccatcgga gtgcatgctc cccaggagcg ggtttccacg 7200
 ggcttaccg gcttgggcac ggctgacta caaccgcgcg ctctggaat cgtggaggag 7260
 gccagattac caaccgcca ccgttgcctg ttgtgctctc cccccccca agaaggeccc 7320

10

20

30

40

gacgcctccc ccaaggagac gccggacagt gggctctgagc gagagcacca tatcagaagc 7380
 cctccagcaa ctggccatca agacctttgg ccagccccc tcgagcgggtg atgcaggctc 7440
 gtccacgggg gggggcgccg ccgaatccgg cggctcgacg tcccctgggtg agccggcccc 7500
 ctccagagaca ggttccgcct cctctatgcc ccccctcgag ggggagcctg gagatccgga 7560
 cctggagtct gatcaggtag agcttcaacc tccccccag gggggggggg tagctcccgg 7620
 ttccggctcg gggctttggg ctacttgctc cgaggaggac gataccaccg tgtgctgctc 7680
 catgtcatac tcctggaccg gggctctaatt aactccctgt agccccgaag aggaaaagtt 7740
 gccaatcaac cctttgagta actcgtgtt gcgataccat aacaagggtg actgtacaac 7800
 atcaaagagc gcctcacaga gggctaaaaa ggtaactttt gacaggacgc aagtgtcga 7860
 cgcccattat gactcagtct taaaggacat caagctagcg gttccaagg tcagcgcaag 7920
 gctcctcacc ttggaggagg cgtgccagtt gactccacc cattctgcaa gateccaagta 7980
 tggattcggg gccaaaggagg tccgcagctt gtccgggagg gccgttaacc acatcaagtc 8040
 cgtgtggaag gacctcctgg aagaccaca aacaccaatt ccacaacca tcatggccaa 8100
 aaatgagggtg ttctgcgtgg accccgcaa ggggggtaag aaaccagctc gcctcatcgt 8160
 ttaccctgac ctcggcgtcc gggctctgca gaaaatggcc ctctatgaca ttacacaaaa 8220
 gttcctcag gcggtaatgg gagcttccta tggttccag tactccctg cccaacgggt 8280
 ggagtatctc ttgaaagcat gggcggaaaa gaaggacccc atgggttttt cgtatgatac 8340
 ccgatgcttc gactcaaccg tcactgagag agacatcagg accgaggagt ccatatacca 8400
 ggctgctcc ctgcccagg agggccgcac tgccatacac tcgtgactg agagacttta 8460
 cgtaggaggg cccatgttca acagcaaggg tcaaacctgc ggttacagac gttgccgcgc 8520
 cagcggggtg ctaaccacta gcatgggtaa caccatcaca tgctatgtga aagccctagc 8580
 ggctgcaag gctgcgggga tagttgcgc cacaatgctg gtatgcggcg atgacctagt 8640
 agtcatctca gaaagccagg ggactgagga ggacgagcgg aacctgagag ctttcacgga 8700

10

20

30

40

ggccatgacc aggtactctg cccctcctgg tgatccccc agaccggaat atgacctgga 8760
 gctaataaca tctgttctct caaatgtgtc tgtggcggtg ggcccgcggg gccgcccag 8820
 atactacctg accagagacc caaccactcc actgccccgg gctgcctggg aaacagttag 8880
 acactcccct atcaattcat ggctgggaaa catcatccag tatgtccaa ccatatgggt 8940
 tcgcatggtc ctaatgacac acttcttctc cattctcatg gtccaagaca ccttgacca 9000
 gaacctcaac tttgagatgt atggatcagt atactccgtg aatcctttgg accttccagc 9060
 cataattgag aggttacacg ggcttgacgc cttttctatg cacacatact ctcaccacga 9120
 actgacgcgg gtggcttcag cctcagaaa acttggggcg ccacctca gggtgtggaa 9180
 gagtcgggct cgcgcagtca gggcgctcct catctccgt ggagggaag cggccgttg 9240
 cgccgatat ctctcaatt gggcggtgaa gaccaagctc aaactactc cattgccga 9300
 ggcgcccta ctggacttat ccagtiggtt caccgtcggc gccggcgggg gcgacatttt 9360
 tcacagcgtg tcgcgcgcc gacccgctc attactcttc ggctactcc tacttttctg 9420
 aggggtaggc ctcttctac tccccgctc gtagagcggc acacactagg tacactccat 9480
 agctaactgt tcttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt tttttcttt 9540
 ttttttttt tccctcttct tccctctctc atctattctt actttcttct ttggtgctc 9600
 catcttagcc ctagtacgg ctagctgtga aaggctcgtg agccgcatga ctgcagagag 9660
 tgccgtaact ggtctctctg cagatcatgt ctaga 9695

10

20

30

<210> 21
 <211> 9737
 <212> DNA
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> pJ6/JFH-1 (3XFLAG) N->K

<400> 21
 acccgccct aatagggcg acactccgc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60

ctacacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacage ctccaggccc 120
 cccctcccc ggagagccat agtggctctg ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactget agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttggtactg cctgataggg 300
 tgcttgcgag tgcctcgga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccacaa gacgttaagt ttccgggcgg 420
 cgccagatc gttggcggag tatacttgtt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgacaagg aagacttcgg agcggctcca gccacgtgga aggcgccage ccatecctaa 540
 agatcggcgc tccactggca aatcctgggg aaaaccagga tacccttggc cctatacgg 600
 gaatgaggga ctcggtggg caggatgget cctgtcccc cgaggttccc gtccctcttg 660
 ggccccaat gacccccggc ataggtcgc caacgtgggt aaggtcatcg ataccctaac 720
 gtgcggcttt gccgacctca tgggtacat cctgtcgtg ggcccccg tcggcggcgt 780
 cgccagagct ctgcgcctg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt ttgcaacagg 840
 gaacttacc gggtgtcct tttctatctt ctgtgtggc ctgtgtcct gcatcaccac 900
 cccgtctcc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatggtga ctaacgactg 960
 caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggtgtctgtc ctccacgtcc ccgggtgcgt 1020
 cccgtgcgag aaagtgggga atgcattctca gtgttgata ccgtctcac cgaatgtggc 1080
 cgtgcagcgg cccggcgccc tcacgcaggg cttgcggacg cacatcgaca tggttgtgat 1140
 gtccgccacg ctctgtctg cctctacgt gggggacctc tgcggtgggg tgatgtctgc 1200
 agcccaaatg ttcatgtct cgcgcagca ccaactgttt gtccaagact gcaattgtc 1260
 catctacct ggtaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggc 1320
 gccacggct accatgatct tggcgtacg gatgcgtgtc cccgaggtca ttatagacat 1380
 cattagcggg gctcattggg gcgtcatgtt cggcttgcc tacttctcta tgcagggagc 1440

10

20

30

40

gtggcgaaa gtcgttgtca tccttctgtt ggccgcccgg gtggacgcgc gcacccatac 1500
 tgttgggggt tctgccgcgg actacaaaga ccatgacggg gattataaag atcatgacat 1560
 cgattacaag gatgacgatg acaagggagg cggtagctta ttgacatgg gcccaggca 1620
 gaaaatccag ctctttaaca ccaatggcag ctggcacatc aaccgcaccg ccctgaactg 1680
 caatgactcc ttgcacaccg gctttatcgc gtctctgttc tacaccaca gcttcaactc 1740
 gtcaggatgt cccgaacgca tgccgcctg ccgcagtatc gaggccttc gggtaggatg 1800
 gggcgccctg caatatgagg ataattgcac caatccagag gatatgagac cctattgctg 1860
 gcactacca ccaaggcagt gtggcgtggt ctccgcgaag actgtgtgtg gccagtgta 1920
 ctgtttcacc cccagcccag tggtagtggg cagcacggac aggcttgag cgccactta 1980
 cacgtggggg gagaaagaga cagatgtctt cctattgaac agcactcgac caccgtggg 2040
 gtcattgttc ggctgcacgt ggatgaactc ttcttgctac accaagactt gcggcgacc 2100
 accctgccgt actagagctg acttcaacgc cagcacggac ctgttgtgcc ccacggactg 2160
 ttttaggaag catctgata ccacttacct caaatgcggc tctgggcctt ggctcacgcc 2220
 aaggtgcctg atcgactacc cctacaggct ctggcattac cctgcacag ttaactatac 2280
 catcttcaa ataaggatgt atgtgggagg ggttgagcac aggctcacgg ctgcatgcaa 2340
 ttctactcgt ggggatcgtt gcaacttgga ggacagagac agaagtcaac tgtctcctt 2400
 gttgcactcc accacggaat gggccatttt acctgtctct tactcggacc tgccgcctt 2460
 gtcgactgg ctctccacc tccacaaaa catcgtggac gtacaattca tgtatggcct 2520
 atcacctgcc ctacaaaaat acatcgtccg atgggagtg gtaatactct tattctgct 2580
 cttagcggac gccagggttt gcgcctgctt atggatgctc atcttggttg gccagccga 2640
 agcagcacta gagaagctgg tcattcttga cgctgcgagc gcagctagct gcaatggett 2700
 cctatatatt gtcattttt tcgtggtgc ttggtacatc aagggtcggg tagtcccctt 2760
 agctacctat tccctcactg gcctgtggtc ctttagccta ctgtcctag cattgcccc 2820

10

20

30

40

acaggettat gcttatgacg catctgtgca tggccagata ggagcggctc tgctggtaat 2880
 gatcacctc ttcacactca ccccggggta taagaccctc ctcgccaggt gtctgtggtg 2940
 gttgtgctat ctctgaccc tgggggaage catgattcag gagggggtac caccatgca 3000
 ggtgcgcggc ggccgcgatg gcatcgctg ggccgtcact atattctgcc cgggtgtggt 3060
 gtttgacatt accaaatggc ttttggcggt gcttgggcct gcttacctct taagggccgc 3120
 ttgacacat gtgccgtact tcgtcagage tcacgtctg ataagggtat gcgctttggt 3180
 gaagcagctc gcggggggta ggtatgttca ggtggcgcta ttggcccttg gcaggtggac 3240
 tggcacctac atctatgacc acctcacacc tatgtcggac tgggcgccta gcggcctgcg 3300
 cgacttagcg gtgcgcgtgg aacccatcat ctccagtcg atggagaaga aggtcatcgt 3360
 ctggggagcg gagacggctg catgtgggga cattctacat ggacttccg tgtccgcccg 3420
 actcgccag gagatcctcc tcggcccage tgatggctac acctccaagg ggtggaagct 3480
 ccttgctccc atcactgctt atgcccagca aacacgagc ctctgggcg ccatagtgtg 3540
 gagtatgacg gggcgtgaca ggacagaaca ggccggggaa gtccaaatcc tgtccacagt 3600
 ctctcagtc ttcctcgga caaccatctc gggggttttg tggactgttt accacggagc 3660
 tggcaacaag actctagccg gcttacgggg tcgggtcacg cagatgtact cgagtgtga 3720
 gggggacttg gtaggttggc ccagccccc tgggaccaag tctttggagc cgtgcaagtg 3780
 tggagccgtc gacctatata tggtcacgga gaacgtgat gtcacccgg ctcgagacg 3840
 cggggacaag cggggagcat tgctctccc gagaccatt tcgacctga aggggtcctc 3900
 gggggggccg gtgtcttgc ctaggggcca cgctgttgg ctcttccag cagctgtgtg 3960
 ctctcggggt gtggccaaat ccatcgattt catccccgt gagacactc acgttgttac 4020
 aaggtctccc actttcagt acaacagcac gccaccggt gtgcccaga cctatcaggt 4080
 cgggtacttg catgtccaa ctggcagtg aaagagcacc aaggtccctg tcgctatgc 4140
 cgcccagggg tacaaagtac tagtgcttaa cccctcgga gtgccacc tggggtttgg 4200

10

20

30

40

ggcgtagccta tccaaggcac atggcatcaa tccaacatt aggactggag tcaggaccgt 4260
 gatgaccggg gaggecatca cgtactccac atatggcaaa tttctcgccg atgggggctg 4320
 cgctagcggc gcctatgaca tcatacatg cgatgaatgc cacgctgtgg atgtacctc 4380
 cattctcggc atcggaacgg tccttgatca agcagagaca gccggggtca gactaactgt 4440
 gctggctacg gccacacccc ccgggtcagt gacaacccc catcccgata tagaagaggt 4500
 aggctcggg cgggagggtg agatccctt ctatgggagg gcgattcccc tatcctgcat 4560
 caaggagggg agacacctga tttctgcc acaaagaaa aagtgtgacg agctcgggc 4620
 ggcccttcgg ggcatgggct tgaatgccgt ggcatactat agagggttgg acgtctccat 4680
 aataccagct caggagatg tgggtgctgt gccaccgac gccctcatga cggggtacac 4740
 tggagacttt gactccgtga tcgactcaa tgtagcggc acccaagctg tcgacttcag 4800
 cctggacccc accttacta taaccacaca gactgtccca caagacgtg tctcacgcag 4860
 tcagcgccgc gggcgcacag gtagaggaag acagggcact tataggtatg tttccactgg 4920
 tgaacgagcc tcaggaatgt ttgacagtgt agtgctttgt gagtgtacg acgcaggggc 4980
 tgcgtggtac gatctcacac cagcggagac caccgtcagg cttagagcgt attcaacac 5040
 gcccgcccta ccggtgtgc aagaccatct tgaattttgg gaggcagttt tcaccggcct 5100
 cacacacata gacgcccact tctctccca aacaaagcaa gcgggggaga acttcgcgta 5160
 cctagtagcc taccaagcta cgggtgtgc cagagccaag gccctcccc cgtcctggga 5220
 cgccatgtgg aagtgcctgg ccgactcaa gcctacgctt gcgggcccc caacctctct 5280
 gtaccgtttg ggccctatta ccaatgaggt caccctcaca caccctggga cgaagtacat 5340
 cgccacatgc atgcaagctg acctgaggt catgaccagc acgtgggtcc tagctggagg 5400
 agtctggca gccgtcgcc catattgcct ggcgactgga tgcgtttcca tcatcgccg 5460
 cttgcacgtc aaccagcgag tcgtcgttgc gccggataag gaggtcctgt atgaggcttt 5520
 tgatgagatg gaggaatgcg cctctagggc ggctctcatc gaagaggggc agcggatagc 5580

10

20

30

40

cgagatgttg aagtccaaga tccaaggctt gctgcagcag gcctctaagc aggcccagga 5640
 catacaaccc gctatgcagg ctcatggcc caaagtggaa caattttggg ccagacacat 5700
 gtggaacttc attagcggca tccaatacct cgcaggatig tcaacactgc cagggaaccc 5760
 cgeggtggct tccatgatgg cattcagtgc cgcctcacc agtccgttgt cgaccagtac 5820
 caccatcctt ctcaacatca tgggaggctg gttagcgtcc cagatcgcac caccgcggg 5880
 ggccaccggc tttgtcgtca gtggcctggt gggggctgcc gtgggcagca taggcctggg 5940
 taaggtgtg gtggacatcc tggcaggata tgggtcgggc atttcggggg ccctcgtcgc 6000
 attcaagatc atgtctggcg agaagccctc tatggaagat gtcatcaatc tactgcctgg 6060
 gatcctgtct ccgggagccc tgggtgtggg ggtcatctgc gggccattc tgcgcgccca 6120
 cgtgggaccg ggggaggcg cggccaatg gatgaacagg ctattgcct ttgettccag 6180
 aggaaaccac gtgccccta ctactacgt gacggagtcg gatgcgtcgc agcgtgtgac 6240
 ccaactactt ggctctctta ctataaccag cctactcaga agactccaca attggataac 6300
 tgaggactgc cccatcccat gtcccgatc ctggctccgc gacgtgtggg actgggtttg 6360
 caccatcttg acagacttca aaaattgget gacctctaaa ttgttccca agctgcccg 6420
 cctcccttc atctcttgc aaaagggta caagggtgtg tgggccggca ctggcatcat 6480
 gaccacgcgc tgcccttgcg gcgccaacat ctctggcaat gtccgcctgg gctctatgag 6540
 gatcacaggg cctaaaacct gcatgaacac ctggcagggg accttcccta tcaattgcta 6600
 cacggagggc cagtgcgcgc cgaaacccc cacgaactac aagaccgcca tctggagggt 6660
 ggcgccctcg gactacgcgg aggtgacgca gcatgggtcg tactcctatg taacaggact 6720
 gaccactgac aatctgaaaa ttcccttgcca actaccttct ccagagtttt tctcctgggt 6780
 ggacggtgtg cagatccata gtttgcacc cacaccaaag ccgtttttcc gggatgaggt 6840
 ctcttctgc gttgggctta attcctatgc tgtcgggtcc cagcttcct gtgaacctga 6900
 gcccgacgca gacgtattga ggtccatgct aacagatccg ccccatca cggcggagac 6960

10

20

30

40

tgcggcgcgg cgcttggcac ggggatcacc tccatctgag gcgagctcct cagttagcca 7020
 gctatcagca ccgtcgtgc gggccacctg caccaccac agcaaacct atgacgtgga 7080
 catggtcgat gccaacctgc tcatggaggc cgggtgtggt cagacagagc ctgagtcag 7140
 ggtgcccgtt ctggacttgc tcgagccaat ggccgaggaa gagagcgacc ttgagccctc 7200
 aataccatcg gagtgcacgc tccccaggag cgggtttcca cgggccttac cggttgggc 7260
 acggcctgac tacaaccgc cgtcgtgga atcgtggagg aggcagatt accaaccgc 7320
 caccgttgcg ggttgtgctc tcccccccc caagaaggcc ccgacgctc cccaaggag 7380
 acgccggaca gtgggtctga gcgagagcac catatcagaa gccctccagc aactggccat 7440
 caagaccttt ggccagcccc cctcgagcgg tgatgcaggc tegtccacgg gggcgggcgc 7500
 cgccgaatcc ggccgtccga cgtccctggt tgagccggcc cctcagaga caggttccgc 7560
 ctctctatg cccccctcg agggggagcc tggagatccg gacctggagt ctgatcaggt 7620
 agagcttcaa cctccccccc aggggggggg gtagctccc ggttcgggt cggggtcttg 7680
 gtctacttgc tccgaggagg acgataccac cgtgtgctgc tccatgcat actcctggac 7740
 cggggtctta ataactccct gtagcccca agaggaaaag ttgccaatca accctttgag 7800
 taactcgtg ttgcgatacc ataacaaggc gtactgtaca acatcaaaga gcgcctcaca 7860
 gagggctaaa aaggttaact ttgacaggac gcaagtgtc gacgccatt atgactcagt 7920
 cttaaaggac atcaagctag cggttccaa ggtcagcga aggtcctca ccttggagga 7980
 ggcgtgccg ttgactccac ccattctgc aagatccaag tatggattcg gggccaagga 8040
 ggtccgcagc ttgtccggga gggccgttaa ccacatcaag tccgtgtgga aggacctcct 8100
 ggaagacca caaacacca tccccacaac catcatggcc aaaaatgagg tgttctcgt 8160
 ggaccccgcc aaggggggta agaaaccagc tcgctcctc gtttacctg acctcgcggt 8220
 ccgggtctgc gagaaaatgg cctctatga cattacaaa aagcttctc aggcggtaat 8280
 gggagcttc tatgcttcc agtaactccc tgccaacgg gtggagtac tcttgaaagc 8340

10

20

30

40

atgggcggaa aagaaggacc ccatgggttt ttcgtatgat acccgatgct tcgactcaac 8400
 cgtcactgag agagacatca ggaccgagga gtccatatac caggcctgct ccctgcccga 8460
 ggaggccccgc actgccatac actcgtgac tgagagactt tacgtaggag ggcccatgtt 8520
 caacagcaag ggtcaaacct gcggttacag acgttgccgc gccagcgggg tgctaaccac 8580
 tagcatgggt aacaccatca catgtatgt gaaagcccta gcggcctgca aggetgcggg 8640
 gatagttgcg cccacaatgc tggatatgcg cgatgaccta gtagtcact cagaaagcca 8700
 ggggactgag gaggacgagc ggaacctgag agccttcacg gaggccatga ccaggtactc 8760
 tgccccctct ggtgatcccc ccagaccgga atatgacctg gagctaataa catcctgttc 8820
 ctcaaatgtg tctgtggcgt tgggccccgc gggccgccgc agatactacc tgaccagaga 8880
 cccaaccact ccactcgcgc gggctgcctg ggaacagtt agacactccc ctatcaattc 8940
 atggetggga aacatcatcc agtatgtcc aaccatatgg gttcgcatgg tcctaatac 9000
 acacttcttc tcattctca tggccaaga caccctggac cagaacctca actttgagat 9060
 gtatggatca gtatactccg tgaatccttt ggaccttcca gccataattg agaggttaca 9120
 cgggcttgac gccctttcta tgcaacata ctctaccac gaactgacgc ggggtggcttc 9180
 agccctcaga aaacttgggg cgccaccct cagggtgtgg aagagtcggg ctgcgcagt 9240
 cagggcgtcc ctcatctccc gtggaggga agcgccggtt tgcggccgat atctcttcaa 9300
 ttgggcggtg aagaccaagc tcaaactcac tcattgccg gaggcgcgc tactggactt 9360
 atccagttgg ttcaccgtcg gcgcggcg gggcgacatt tttcacagcg tgcgcgcgc 9420
 ccgacccgc tcattactct tcggcctact cctacttttc gtaggggtag gcctcttct 9480
 actccccgt cggtagagcg gcacacacta ggtacactcc atagetaact gtctctttt 9540
 ttttttttt ttttttttt ttttttttt tttttttct ttttttttt ttccctctt 9600
 tcttcccttc tcatttatt ctactttct tcttggtggt tccatcttag ccctagtcac 9660
 ggctagctgt gaaaggtccg tgagccgcat gactgcagag agtgccgtaa ctggtctctc 9720

10

20

30

40

tgcagatcat gtctaga

9737

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pJFH-1

<400> 22

Gly Thr Thr Thr Val Gly Gly Ala Val Ala Arg Ser Thr Asn Val Ile
1 5 10 15

Ala Gly Val Phe Ser His Gly Pro Gln Gln Asn Ile Gln Leu
20 25 30

20

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pJFH-1(1XFLAG)

30

<400> 23

Gly Thr Thr Thr Val Gly Gly Ala Val Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
1 5 10 15

Asp Lys Gly Gly Gly Gly Val Phe Ser His Gly Pro Gln Gln Asn Ile
20 25 30

40

Gln Leu

<210> 24

<211> 48

<212> PRT

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer(JFH1-1F-F)

<400> 27

aggatgacga tgacaaggga ggcggtggcg tgttcagcca tggc 44

10

<210> 28

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer(JFH1-3F-R)

<400> 28

taatcgatgt catgatcttt ataatacccg tcatggtctt tgtagtctgc aacagegcct 60

20

ccaac 65

<210> 29

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer(JFH1-3F-F)

<400> 29

aagatcatga catcgattac aaggatgacg atgacaaggg aggcggtggc gtgttcagcc 60

atggc 65

30

<210> 30

<211> 9690

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pJFH-1(1XFLAG)

<400> 30

40

acctgcccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
 ctacacgcag aaagcgcccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctccccg ggagagccat agtgggtcgc ggaaccgggtg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg 300
 cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tgcgccagaa gacgttaagt tcccgggcgg 420
 cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggcgccagg tgggtgtgcg 480
 cagacaagg aaaacttcgg agcggtccea gccacgtggg agacgccagc ccatcccaaa 540
 agatcggegc tccactggca aggcctgggg aaaaccagg cgcacctgga cctatatgg 600
 gaatgaggga ctgggtggg caggatggct cctgtcccc cgaggtctc gccctctg 660
 gggccccact gacccccgc ataggtcgc caacgtgggt aaagtcacg acacctaac 720
 gtgtggettt gccacctca tggggtacat cccgtctga ggcgccccg ttagtggcgc 780
 cgccagagct gtgcgcacg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt atgcaacagg 840
 gaacctaccc ggtttccct tttctatctt cttgttgcc ctgttgcct gcatcacgt 900
 tccgtctct gtgcccagg tgaagaatac cagtagcagc tacatggtga ccaatgactg 960
 ctccaatgac agcatcactt ggcagctcga ggtgcgggt ctccacgtc ccgggtgcgt 1020
 cccgtgcgag agagtgggga atacgtcag gtgttgggtg ccagtctgc caaacatggc 1080
 tgtgcggcag cccggtgccc tcacgcaggg tctgcggacg cacatcgata tggttgtgat 1140
 gtccgccacc ttctgtctg ctctctacgt gggggacctc tgtggcgggg tgatgctgc 1200
 ggcccagggt ttcacgtct cgcgcagta ccaactggtt gtgcaagaat gcaattgctc 1260
 catctacctt ggcacatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggtc 1320
 gccacggcc accatgatcc tggcgtacgt gatgcgcgt cccgaggtca tcatagacat 1380

10

20

30

40

cgttagcggg gctcactggg gcgtcatgtt cggtttggcc tactttctta tgcaggagc 1440
 gtgggcgaag gtcattgtca tctttctgtt ggccgtggg gtggacggg gcaccaccac 1500
 cgttggaggc gctgttgacg attacaagga tgacgatgac aaggaggcg gtggcgtgtt 1560
 cagccatggc cctcagcaga acattcagct cattaacacc aacggcagtt ggcacatcaa 1620
 ccgtactgcc ttgaattgca atgaactcct gaacaccggc tttctcggg ccttgttcta 1680
 caccaaccgc ttttaactcgt cagggtgtcc agggcgctg tccgcctgcc gcaacatcga 1740
 ggctttccgg atagggtggg gcaccctaca gtacgaggat aatgtcacca atccagagga 1800
 tatgaggcgg tactgttggc actaccccc aaagccgtgt ggcgtagtcc ccgcgaggtc 1860
 tgttgttggc ccagtgtact gtttcacccc cagcccggtg gtagtgggca cgaccgacag 1920
 acgtggagtg cccacctaca catggggaga gaatgagaca gatgtcttcc tactgaacag 1980
 cacccgaccg ccgcagggt catgttcgg ctgcacgtgg atgaactcca ctggtttcac 2040
 caagacttgt ggcgcgccac ctgcccgcac cagagctgac ttcaacgcca gcacggactt 2100
 gttgtgccct acggttgtt ttaggaagca tctgatgcc acttatatta agtgtgttc 2160
 tgggccctgg ctacaccaa agtgccctgt cactaccct tacagactct ggcattaccc 2220
 ctgcacagtc aattttacca tcttcaagat aagaatgtat gtagggggg ttgagcacag 2280
 gctcacggcc gcatgcaact tcaactgtgg ggatcgtgc gacttgagg acagggacag 2340
 gagtcagctg tctctctgt tgcactctac caggaatgg gccatcctgc cctgcaccta 2400
 ctcagactta ccgctttgt caactggtct tctccacct caccagaaca tctggacgt 2460
 acaatacatg tatggcctct cactgtctat caaaaatac gtcgttcgat gggagtgggt 2520
 ggtactctta ttctgtctt tagcgacgc cagagtctgc gctgtttgt ggatgtcat 2580
 cttgttgggc caggccgaag cagcattgga gaagtggc gtcttgacg ctgcgagtgc 2640
 ggctaactgc catggcctcc tatattttgc catctcttc gtggcagctt ggcacatcag 2700
 gggtcgggtg gtcccttga ccacctatt cctcactggc ctatggcct tctgcctact 2760

10

20

30

40

gtcacatggca ctgccccggc aggccttatgc ctatgacgca cctgtgcacg gacagatagg 2820
 cgtgggtttg ttgatattga tcacctctt cactcacc ccgggtata agacctcct 2880
 cggccagtgt ctgtggtgt tgtctatct cctgacctg gggaagcca tgattcagga 2940
 gtgggtacca cccatgcagg tgcgcggcg ccgcgatggc atcgcgtggg ccgtcactat 3000
 attctgcccg ggtgtggtgt ttgacattac caaatggctt ttggcgttc ttgggcctgc 3060
 ttaccttta agggccgctt tgacacatgt gccgtacttc gtcagagctc acgctctgat 3120
 aagggtatgc gctttggtga agcagctgc ggggggtagg tatgttcagg tggcctatt 3180
 ggcccttggc aggtggactg gcacctacat ctatgaccac ctacaccta tgcggactg 3240
 ggccgctagc ggctgcgcg acttagcggc ccgcgtggaa cccatcatct tcagtcgat 3300
 ggagaagaag gtcacgtctt ggggagcgga gacggctgca tgggggaca ttctacatgg 3360
 acttcccgctg tccgccgac tcggccagga gatctcttc ggccagctg atggctacac 3420
 ctccaagggg tggaagctcc ttgctccat cactgcttat gccagcaaa cagaggcct 3480
 cctgggcgcc atagtgtga gtagcagg gcgtgacagg acagaacagg ccggggaagt 3540
 ccaaactctg tccacagtct ctcagtcctt cctcggaaca accatctcgg gggtttgtg 3600
 gactgtttac cacggagctg gcaacaagac tctagccggc ttacggggtc cggtcacgca 3660
 gatgtactcg agtctgagg gggacttggc aggttgccc agccccctg ggaccaagtc 3720
 ttggagccg tgcaagtgtg gagccgtcga cctatatctg gtcacggga acgctgatgt 3780
 catcccgct cggagacgc gggacaagcg gggagcattg ctctccccga gaccatttc 3840
 gacctgaag ggtcctcgg gggggccggt gctctgccct aggggccacg tcgttgggt 3900
 ctccgagca gctgtgtgt ctcgggcgt ggccaaatcc atcgattca tccccgtga 3960
 gacactcgac gttgttaca ggtctccac ttctagtac aacagcacgc caccgctgt 4020
 gcccagacc tatcaggtcg ggtacttga tgctccaact ggcagtggaa agagaccaa 4080
 ggtccctgtc gcgtatgccg ccaggggta caaagtacta gtgcttaacc cctcggtagc 4140

10

20

30

40

tgccacctg gggtttggg cgtacctatc caaggcacat ggcataatc ccaacattag 4200
 gactggagtc aggacctga tgaccgggga ggccatcacg tactccacat atggcaaatt 4260
 tctcgccgat gggggctgcg ctagegggcg ctatgacatc atcatatgcg atgaatgcca 4320
 cgctgtggat gctacctcca ttctcggcac cggaacggtc cttgatcaag cagagacagc 4380
 cggggtcaga ctaactgtgc tggtacggc cacaccccc gggtcagtga caacccccca 4440
 tcccgatata gaagaggtag gctcgggcg ggagggtgag atccccctt atgggagggc 4500
 gattccccca tctgcatca agggaggag acacctgatt ttctgccact caaagaaaaa 4560
 gtgtgacgag ctgcggcgg ccttcgggg catgggcttg aatgccgtgg catactatag 4620
 agggttggac gtctccataa taccagctca gggagatgtg gtggtcgtcg ccaccgacgc 4680
 cctcatgacg gggtaactg gagactttga ctccgtgatc gactgcaatg tagcggtcac 4740
 ccaagctgtc gacttcagcc tggacccac ctteactata accacacaga ctgtcccaca 4800
 agacgtgtc tcacgcagtc agcgccggg gcgcacaggt agaggaagac agggcactta 4860
 taggtatgtt tccactggtg aacgagctc aggaatgtt gacagtgtag tgctttgtga 4920
 gtgtacgac gcaggggctg cgtggtaga tctcacacca gggagacca ccgtcaggct 4980
 tagagegtat ttcaacacgc ccggcctacc cgtgtgtcaa gaccatcttg aattttggga 5040
 ggcagtttcc accggcctca cacacataga cgcctctc ctctccaaa caaagcaagc 5100
 gggggagAAC ttcgctacc tagtagccta ccaagctacg gtgtgcgcca gagccaaggc 5160
 cctcccccg tctgggacg ccatgtggaa gtgcctggcc cgactcaagc ctacgcttgc 5220
 ggccccaca cctctcctgt accgtttggg ccttattacc aatgaggtca cctcacaca 5280
 cctgggacg aagtacatg ccacatgcat gcaagctgac cttgaggtca tgaccagcac 5340
 gtgggtccta gctggaggag tcttggcagc cgtcgcgca tattgcctgg cgactggatg 5400
 cgtttccatc atcgccgct tgcacgtcaa ccagcgagtc gtcgttgcgc cggataagga 5460
 ggtcctgtat gaggttttg atgagatgga ggaatgcgc tctaggcggt ctctcatcga 5520

10

20

30

40

agaggggcag cggatagccg agatgttgaa gtccaagatc caaggttgc tgcagcaggc 5580
 ctctaagcag gcccaggaca tacaaccgcg tatgcaggct tcatggccca aagtggaaca 5640
 attttgggcc agacacatgt ggaacttcat tagcggcatc caatacctcg caggattgtc 5700
 aacactgcca gggaaacccg cgggtggttc catgatggca ttcagtgcg ccctcaccag 5760
 tcegttgctg accagtacca ccatacttct caacatcatg ggaggctggt tagcgtccca 5820
 gatgcacca cccgcggggg ccaccggctt tgtcgtcagt ggcttggtgg gggctgccgt 5880
 gggcagcata ggcttggtta aggtgctggt ggacatcctg gcaggatatg gtgcgggcat 5940
 ttcgggggcc ctctgcat tcaagatcat gtctggcgag aagccctcta tggaagatgt 6000
 catcaatcta ctgcctggga tcctgtctcc gggagccctg gtggtggggg tcacttgcgc 6060
 ggccattctg cgcgcacg tgggaccggg ggaggcgcg gtccaatgga tgaacaggct 6120
 tattgccttt gtctccagag gaaaccacgt cgccttact cactacgtga cggagtcgga 6180
 tgcgtcgcag cgtgtgacc aactacttg ctctcttact ataaccagcc tactcagaag 6240
 actccacaat tggataactg aggactgccc catcccatgc tccggtcct ggctccgga 6300
 cgtgtgggac tgggtttgca ccatcttgac agacttcaa aattggctga cctctaaatt 6360
 gtccccaaag ctccccggc tcccttcat ctcttgtaa aaggggtaca aggtgtgtg 6420
 ggccggcaact ggcatcatga ccacgcgtg ccttgcggc gccaacatct ctggcaatgt 6480
 ccgctgggc tctatgagga tcacagggcc taaaacctgc atgaacacct ggcaggggac 6540
 ctttctatc aattgctaca cggagggcc gtgcgcgcg aaacccccca cgaactaaa 6600
 gaccgccatc tggagggtg cggcctcgga gtacgcggag gtgacgcagc atgggtcgta 6660
 ctctatgta acaggactga ccactgacaa tctgaaaatt ccttgccaac taccttctcc 6720
 agagtttttc tctgggtg acggtgtgca gatccatagg ttgcacca caccaaagcc 6780
 gttttccgg gatgaggtct cgttctgcgt tgggttaat tctatgctg tcgggtccca 6840
 gcttccctgt gaacctgagc ccgacgcaga cgtatgagg tccatgctaa cagatccgc 6900

10

20

30

40

ccacatcacg gcggagactg cggcgcggcg ctiggcacgg ggatcacctc catctgaggc 6960
 gagctectca gtgagccagc tatcagcacc gtcgctgcgg gccacctgca ccacccacag 7020
 caacacctat gacgtggaca tggtcgatgc caacctgctc atggagggcg gtgtggctca 7080
 gacagagcct gagtccaggg tgcccgttct ggactttctc gagccaatgg ccgaggaaga 7140
 gagcgacctt gagecctcaa taccatcgga gtgcattgctc cccaggagcg ggtttccacg 7200
 ggccctaccg gcttgggcac ggccctgacta caaccgcgcg ctctgtggaat cgtggaggag 7260
 gccagattac caaccgcca ccgttgctgg ttgtgctctc cccccccca agaaggcccc 7320
 gacgcctccc ccaaggagac gccggacagt gggctctgagc gagagcacca tatcagaagc 7380
 cctccagcaa ctggccatca agacctttgg ccagcccccc tcgagcgggtg atgcaggctc 7440
 gtccacgggg gcgggcgcgc ccgaatccgg cggctcgacg tcccttggtg agccggcccc 7500
 ctccagagaca ggttccgcct cctctatgcc cccctcgag ggggagcctg gagatccgga 7560
 cctggagtct gatcaggtag agcttcaacc tccccccag gggggggggg tagctcccg 7620
 ttccggctcg gggctcttgg ctacttgctc cgaggaggac gataccaccg tgtgctgctc 7680
 catgtcatac tcctggaccg gggctctaata aactccctgt agccccgaag aggaaaagtt 7740
 gccaatcaac cctttgagta actcgtgtt gcgataccat aacaagggtg actgtacaac 7800
 atcaaagagc gcctcacaga gggctaaaaa ggtaactttt gacaggacgc aagtgtctga 7860
 cgcccattat gactcagtct taaaggacat caagctagcg gttccaagg tcagcgcaag 7920
 gctcctcacc ttggaggagg cgtgccagtt gactccacce cattctgcaa gatccaagta 7980
 tggattcggg gccaaaggagg tccgcagctt gtccgggagg gccgttaacc acatcaagtc 8040
 cgtgtggaag gacctcctgg aagaccaca aacaccaatt ccacaacca tcatggccaa 8100
 aaatgaggtg ttctgcgtgg accccgcca ggggggtaag aaaccagctc gcctcatcgt 8160
 ttacctgac ctggcgctcc gggctctgca gaaatggcc ctctatgaca ttacacaaaa 8220
 gcttctcag gcggtaatgg gagcttcta tggcttcag tactccctg cccaacgggt 8280

10

20

30

40

ggagtatctc ttgaaagcat gggcggaaaa gaaggacccc atgggttttt cgtatgatac 8340
 ccgatgcttc gactcaaccg tcactgagag agacatcagg accgaggagt ccatatacca 8400
 ggcttgetcc ctgcccagg aggcccgcac tgccatacac tcgtgactg agagacttta 8460
 cgtaggaggg cccatgttca acagcaaggg tcaaacctgc ggttacagac gttgccgcgc 8520
 cagcggggtg ctaaccacta gcatgggtaa caccatcaca tgctatgtga aagccctagc 8580
 ggcttgaag gctgcgggga tagttgcgcc cacaatgctg gtatgcggcg atgacctagt 8640
 agtcatttca gaaagccagg ggactgagga ggacgagcgg aacctgagag ctttcacgga 8700
 ggccatgacc aggtactctg cccctcctgg tgatccccc agaccggaat atgacctgga 8760
 gctaataaca tcctgttctt caaatgtgtc tgtggcgttg ggcccgcggg gccgccgcag 8820
 atactacctg accagagacc caaccactcc actcgcccg gtgcctggg aaacagttag 8880
 aactccctt atcaattcat ggctgggaaa catcatccag tatgtccaa ccatatgggt 8940
 tcgatggtc ctaatgacac acttcttctc cattctcatg gtccaagaca ccctggacca 9000
 gaacctcaac tttgagatgt atggatcagt atactccgtg aatcctttgg acctccagc 9060
 cataattgag aggttacacg ggcttgacgc cttttctatg cacacatact ctcaccacga 9120
 actgacgcgg gtggcttcag cctcagaaa acttggggcg cccccctca ggggtgtggaa 9180
 gagtggggt cgcgcagtca gggegtccct catctccgt ggagggaaag cgcccgtttg 9240
 cgccgatat ctcttcaatt gggegggtgaa gaccaagctc aaactcactc cattgccgga 9300
 ggcgcccta ctggacttat ccagttgggt caccgtcggc gccggcgggg gcgacatttt 9360
 tcacagcgtg tcgcgcgcc gacccgctc attactctt gcctactcc tacttttctg 9420
 aggggtaggc ctcttctac tcccgcctg gtagagcggc acacactagg tacactccat 9480
 agctaactgt tcttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 9540
 ttttttttt tccctcttct tccctctctc atcttattct actttcttc ttggtggctc 9600
 catcttagcc ctagtcacgg ctagctgtga aaggtccgtg agccgcatga ctgcagagag 9660

10

20

30

40

tgccgtaact ggtctctctg cagatcatgt

9690

<210> 31

<211> 9732

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pJFH-1(3XFLAG)

10

<400> 31

acctgccccct aatagggggcg aactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60

cttcacgcag aaagcgcccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120

ccccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccgggtg agtacaccgg aattgccggg 180

aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240

20

caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttggtactg cctgataggg 300

cgttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360

tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccagaa gacgttaagt tccccggcgg 420

cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccagggt tgggtgtgcg 480

cacgacaagg aaaacttcgg agcggtecca gccacgtggg agacgccagc ccatccccaa 540

30

agatcggcgc tccactggca aggcctgggg aaaaccagggt cggccctggc ccctatatgg 600

gaatgaggga ctcggtggg caggatggt cctgtcccc cgaggctctc gcccctcttg 660

gggccccact gacccccggc ataggtcgcg caacgtgggt aaagtcacg acaccctaac 720

gtgtggcttt gccgacctca tgggtacat ccccgctgta ggcccccg ttagtggcgc 780

cgccagagct gtcgcgacg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt atgcaacagg 840

40

gaacctacc ggtttcccc ttctatctt ctgtctggc ctgttgctt gcatcaccgt 900

tccggtctct gctgcccagg tgaagaatac cagtagcagc tacatggtga ccaatgactg 960

ctccaatgac agcatcactt ggcagctcga ggctgcggtt ctccacgtcc ccgggtgcgt 1020

cccgtgcgag agagtgggga atacgtcacg gtgttgggtg ccagtctcgc caaacatggc 1080
 tgtgcggcag cccggtgccc tcaecgaggg tctgcggacg cacatcgata tggttgtgat 1140
 gtccgccacc ttctgctctg ctctctacgt gggggacctc tgtggcgggg tgatgctcgc 1200
 ggcccagggtg ttcatcgtct cgccgcagta ccactggttt gtgcaagaat gcaattgctc 1260
 catctaccct ggcaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggtc 1320
 gccacggcc accatgatcc tggcgtagct gatgcgcgtc cccgaggcca tcatagacat 1380
 cgttagcggg gctcactggg gcgtcatgtt cggcttggcc tacttctcta tgcagggagc 1440
 gtgggcgaag gtcattgtca tcttctgct gcccgctggg gtggacgcgg gcaccaccac 1500
 cgttggaggc gctgttcag actacaaaga ccatgacggt gattataaag atcatgacat 1560
 cgattacaag gatgacgatg acaagggagg cgggtggcgtg ttcagccatg gccctcagca 1620
 gaacattcag ctcatataa ccaacggcag ttggcacatc aaccgtactg ccttgaattg 1680
 caatgactcc ttgaacaccg gctttctcgc ggcttgttc tacaccaacc gctttaactc 1740
 gtcagggtgt ccagggcgcc tgcgcctg ccgcaacatc gaggtttcc ggatagggtg 1800
 gggcaccta cagtacgagg ataatgtcac caatccagag gatatgaggc cgtactgctg 1860
 gcactacccc ccaaagccgt gtggcgtagt ccccgcgagg tctgtgtgtg gcccagtga 1920
 ctgtttcacc ccagcccg tagtagtggg cagcaccgac agacgtggag tgcccaccta 1980
 cacatgggga gagaatgaga cagatgtctt cctactgaac agcaccgac cgccgcaggg 2040
 ctcatggttc ggtgcacgt ggatgaactc cactggtttc accaagactt gtggcgcgcc 2100
 acctgcccgc accagagctg acttcaacgc cagcacggac ttgttgtgcc ctacggattg 2160
 ttttaggaag catctgatg ccacttatat taagtgtggt tctgggcctt ggctcacacc 2220
 aaagtgcctg gtccactacc cttacagact ctggcattac cctgcacag tcaattttac 2280
 catcttcaag ataagaatgt atgtaggggg ggttgagcac aggctcacgg ccgcatgcaa 2340
 cttcactcgt ggggatcgt gcgacttga ggacaggac aggagtcagc tgtctcctct 2400

10

20

30

40

gttgcactct accacggaat gggccatcct gccctgcacc tactcagact taccgccttt 2460
 gtcaactggt ctctccacc ttcaccagaa catcgtggac gtacaataca tgtatggcct 2520
 ctacactgct atcacaaaat acgtcgttcg atgggagtggt gtggtactct tattcctgct 2580
 cttagcggac gccagagtct gcgcctgctt gtggatgctc atcttggttg gccaggccga 2640
 agcagcattg gagaagttgg tcgtcttgca cgtcgcgagt gcggctaact gccatggcct 2700
 cctatatattt gccatcttct tcgtggcagc ttggcacatc aggggtcggg tggccccctt 2760
 gaccacctat tgcctcactg gcctatggcc ctctgccta ctgctcatgg cactgccccg 2820
 gcaggettat gcctatgacg cacctgtgca cggacagata ggcgtgggtt tgttgatatt 2880
 gatcaccctc ttcacactca ccccggggta taagaccctc ctcgccaggt gtctgtggtg 2940
 gtgtgtctat ctctgaccc tgggggaagc catgattcag gagtgggtac caccatgca 3000
 ggtgcgcggc ggcccgatg gcctcgcgtg ggccgtcact atattctgcc cgggtgtggt 3060
 gtttgacatt accaaatggc ttttggcgtt gcttgggcct gcttacctct taagggccgc 3120
 tttgacacat gtccgtact tcgtcagagc tcacgtctg ataagggtat gcgctttggt 3180
 gaagcagctc ggggggggta ggtatgttca ggtggcgcta ttggcccttg gcaggtggac 3240
 tggcacctac atctatgacc acctcacacc tatgtcggac tggcccgcta gcggcctgcg 3300
 cgacttagcg gtcgccgttg aaccatcat ctccagtcg atggagaaga aggtcatcgt 3360
 ctggggagcg gagacggctg catgtgggga cattctacat ggacttccg tgccgccccg 3420
 actggccag gagatcctc tcggcccagc tgatggctac acctccaagg ggtggaagct 3480
 ccttgctccc atcactgctt atgccagca aacacaggc ctctgggcg ccatagtgtt 3540
 gagtatgacg gggcgtgaca ggacagaaca ggccggggaa gtccaaatcc tgtccacagt 3600
 ctctcagtc ttcctcggaa caaccatctc gggggttttg tggactgttt accacggagc 3660
 tggcaacaag actctagccg gcttacgggg tccggtcacg cagatgtact cgagtgtga 3720
 gggggacttg gtaggctggc ccagccccc tgggaccaag tctttggagc cgtgcaagtg 3780

10

20

30

40

tggagccgtc gacctatata tggtcacgcg gaacgctgat gtcateccgg ctcggagacg 3840
 cggggacaag cggggagcat tgctctcccc gagaccatt tcgacctga aggggtccctc 3900
 gggggggccg gtgctctgcc ctaggggcca cgtcgttggg ctcttcgag cagctgtgtg 3960
 ctctcggggc gtggccaaat ccatcgattt catccccgtt gagacactcg acgttggtac 4020
 aaggtctccc actttcagtg acaacagcac gccaccggt gtgccccaga cctatcaggt 4080
 cgggtacttg catgtccaa ctggcagtgg aaagagcacc aaggtccctg tcgcgtatgc 4140
 cgcccagggg tacaaagtac tagtgcttaa cccctcggta gctgccacc tggggtttgg 4200
 ggcgtaacct tccaaggcac atggcatcaa tcccaacatt aggactggag tcaggaccgt 4260
 gatgaccggg gaggccatca cgtactccac atatggcaaa tttctcgccg atgggggctg 4320
 cgctagcggc gcctatgaca tcatcatatg cgatgaatgc cacgctgtgg atgtacctc 4380
 cattctcggc atcggaacgg tccttgatca agcagagaca gccggggtca gactaactgt 4440
 gctggctacg gccacacccc ccgggtcagt gacaaccccc catcccgata tagaagaggt 4500
 aggcctcggg cgggagggtg agatccccct ctatgggagg gcgattcccc tatectgcat 4560
 caaggagggg agacacctga tttctgcca ctcaaagaaa aagtgtgacg agctcgcggc 4620
 ggcccttcgg ggcatgggct tgaatgccgt ggcatactat agagggttgg acgtctccat 4680
 aataccagct caggagatg tgggtgctgt cggcaccgac gccctcatga cggggtacac 4740
 tggagacttt gactccgtga tcgactgcaa tgtagcggtc acccaagctg tcgacttcag 4800
 cctggacccc accttacta taaccacaca gactgtccca caagacgtg tctcacgcag 4860
 tcagcgcgcg gggcgcacag gtagaggaag acagggcact tataggtatg tttccactgg 4920
 tgaacgagcc tcaggaatgt ttgacagtgt agtgctttgt gagtgtctac acgcaggggc 4980
 tgcgtggtac gatctcacac cagcggagac caccgtcagg cttagagcgt atttcaacac 5040
 gcccggccta cccgtgtgtc aagaccatct tgaattttgg gaggcagttt tcaccgcct 5100
 cacacacata gacgccact tcctctccca aacaaagcaa gcgggggaga acttcgcgta 5160

10

20

30

40

cctagtagcc taccaagcta cgggtgtgcgc cagagccaag gcccctcccc cgtcctggga 5220
 cgccatgtgg aagtgcctgg cccgactcaa gcctacgctt gggggcccca cacctctcct 5280
 gtaccgtttg ggcctatta ccaatgaggt caccctcaca caccctggga cgaagtacat 5340
 cgccacatgc atgcaagctg accttgaggt catgaccagc acgtgggtcc tagctggagg 5400
 agtcctggca gccgtgcgc catattgcct ggcgactgga tgcgtttcca tcacggccg 5460
 cttgcacgtc aaccagcgag tcgtcgttgc gccggataag gaggtcctgt atgaggettt 5520
 tgatgagatg gaggaatgcg cctctagggc ggctctcatc gaagaggggc agcgatagc 5580
 cgagatgttg aagccaaga tccaagctt gctgcagcag gcctctaagc agggccagga 5640
 catacaaccc gctatgcagg cticattggcc caaagtggaa caattttggg ccagacacat 5700
 gtggaacttc attageggca tccaatacct cgcaggattg tcaacactgc cagggaaccc 5760
 cgcggtgget tccatgatgg cattcagtgc cgcctcacc agtcgttgt cgaccagtac 5820
 caccatcctt ctcaacatca tgggaggtg gttagcgtcc cagatgcac caccgcggg 5880
 ggccaccggc tttgtctca gtggcctggt gggggctgcc gtgggcagca taggcctggg 5940
 taagggtctg gtggacatcc tggcaggata tgggtcgggc atttcggggg cctcgtcgc 6000
 attcaagatc atgtctggcg agaagccctc tatggaagat gtcataate tactgcctgg 6060
 gatcctgtct cgggagccc tgggtgtggg ggtcatctgc gggccattc tgcgcgcca 6120
 cgtgggaccg ggggagggcg cggccaatg gatgaacagg cttattgcct ttgettccag 6180
 aggaaaccac gtcgccccta ctactacgt gacggagtcg gatgcgtcgc agcgtgtgac 6240
 ccaactactt ggctctctta ctataaccag cctactcaga agactccaca attggataac 6300
 tgaggactgc cccatcccat gctccggatc ctggctccgc gacgtgtggg actgggtttg 6360
 caccatcttg acagacttca aaaattggtt gacctctaaa ttgttccca agctgcccgg 6420
 cctccccctc atctcttgic aaaaggggta caagggtgtg tgggcccggca ctggcatcat 6480
 gaccacgcgc tgcccttgcg gcgccaacat ctctggcaat gtccgcctgg gctctatgag 6540

10

20

30

40

gatcacaggg cctaaaacct gcatgaacac ctggcagggg acctttccta tcaattgcta 6600
cacggagggc cagtgcgcg cgaaaccccc cacgaactac aagaccgcca tctggagggt 6660
ggcggcctcg gagtacgagg aggtgacgca gcatgggtcg tactcctatg taacaggact 6720
gaccactgac aatctgaaaa ttcttgcca actaccttct ccagagtttt tctcctgggt 6780
ggacgggtgtg cagatecata ggtttgcacc cacaccaaag ccgtttttcc gggatgaggt 6840
ctcgttctgc gttgggetta attcctatgc tgcgggtcc cagcttcct gtgaacctga 6900
gcccgaacga gacgtattga ggtccatgct aacagatccg cccacatca cggcggagac 6960
tgcggcgagg cgcttgccac ggggatcacc tccatctgag gcgagctcct cagtggacca 7020
gctatcagca ccgtcgctgc gggccacctg caccaccac agcaaacct atgacgtgga 7080
catggctgat gccaacctgc tcatggagg cggtgtggct cagacagagc ctgagtcag 7140
ggtgcccgtt ctggacttct tcgagccaat ggccgaggaa gagagcgacc ttgagccctc 7200
aataccatcg gagtgcctgc tcccaggag cgggtttcca cgggccttac cggttgggc 7260
acggcctgac tacaaccgc cgctcgctga atcggtgagg aggccagatt accaaccgcc 7320
cacggttct ggttctgctc tcccccccc caagaaggcc ccgacgctc cccaaggag 7380
acgcgggaca gtgggtctga gcgagagcac catatcagaa gccctccagc aactggccat 7440
caagaccttt ggccagcccc cctcgagcgg tgatgcaggc tcgtccacgg gggcgggcgc 7500
cgccgaatcc ggcggtccga cgtcccttgg tgagccggcc ccctcagaga caggttccgc 7560
ctcctctatg cccccctcg agggggagcc tggagatccg gacctggagt ctgatcaggt 7620
agagcttcaa cctccccccc aggggggggg gtagctccc ggttcgggt cggggtcttg 7680
gtctacttgc tccgaggagg acgataccac cgtgtgctgc tccatgcat actcctggac 7740
cggggctcta ataactccct gtagccccga agaggaaaag ttgccaatca accctttgag 7800
taactcgctg ttgcgatacc ataacaaggt gtactgtaca acatcaaaga gcgcctcaca 7860
gagggtctaa aaggtactt ttgacaggac gcaagtgtc gacgccatt atgactcagt 7920

10

20

30

40

cttaaaggac atcaagctag cggttccaa ggtcagcgca aggtcctca ccttgaggga 7980
 ggcggtccag ttgactccac ccattctgc aagatccaag tatggattcg gggccaagga 8040
 ggtccgcagc ttgtccggga gggccgttaa ccacatcaag tccgtgtgga aggacctcct 8100
 ggaagaccca caaacaccaa ttcccacaac catcatggcc aaaaatgagg tgttctcggt 8160
 ggaccccgcc aaggggggta agaaaccagc tcgctcctc gtttaccctg acctcgcggt 8220
 ccgggtctgc gagaaaatgg ccctctatga cattacaca aagcttcctc aggcggtaat 8280
 gggagcttcc tatggcttcc agtactcccc tgcccaacgg gtggagtatc tcttgaaagc 8340
 atgggcggaa aagaaggacc ccatgggttt ttcgtatgat accgatgct tcgactcaac 8400
 cgtcactgag agagacatca ggaccgagga gtccatatac caggcctgct cctgcccga 8460
 ggaggccgc actgccatac actcgctgac tgagagactt tacgtaggag ggcccatgtt 8520
 caacagcaag ggtcaaacct gcggttacag acgttgccgc gccagcgggg tgctaaccac 8580
 tagcatgggt aacacatca catgctatgt gaaagcccta gcggcctgca aggtgcggg 8640
 gatagtgcg ccacaaatgc tggatgogg cgatgacct gtagtcatct cagaaagcca 8700
 ggggactgag gaggacgagc ggaacctgag agccttcacg gaggccatga ccaggtactc 8760
 tgccccctct ggtgatcccc ccagaccgga atatgacctg gagctaataa catcctgttc 8820
 ctcaaattgt tctgtggcgt tgggcccgcg ggcccgccgc agatactacc tgaccagaga 8880
 cccaaccact ccactgccc gggtgcctg ggaacagtt agacactccc ctatcaatte 8940
 atggctggga aacatcatcc agtatgctcc aaccatatgg gttegcattg tctaattgac 9000
 acattcttc tccattctca tggccaaga caccctggac cagaacctca actttgagat 9060
 gtatggatca gtatactccg tgaatccitt ggaccttcca gccataattg agaggttaca 9120
 cgggcttgac gccttttcta tgcacacata ctctaccac gaactgacgc ggggtgcttc 9180
 agccctcaga aaacttgggg cgccaccct cagggtgtgg aagagtcggg ctgcgcagat 9240
 caggcgctcc ctcatctccc gtggaggga agcgccgtt tgcggccgat atctcttcaa 9300

10

20

30

40

ttgggcggtg aagaccaagc tcaaactcac tccattgccg gaggcgcgcc tactggactt 9360
 atccagttgg ttcaccgtcg gcgccggcgg gggcgacatt tttcacagcg tgtcgcgcgc 9420
 ccgaccccgcc tcattactct tcggcctact cctacttttc gtaggggtag gcctcttcct 9480
 actccccgct cggtagagcg gcacacacta ggtacactcc atagctaact gttccttttt 9540
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttttct tttttttttt tttccctctt 9600
 tcttcccttc tcactcttatt ctactttctt tcttggtggc tccatcttag cccatgtcac 9660
 ggctagctgt gaaaggtccg tgagccgcat gactgcagag agtgccgtaa ctggtctctc 9720
 tgcagatcat gt 9732

10

<210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pTH/JFH1

<400> 32

Ala Thr Tyr Val Thr Gly Gly Ser Glu Ala Arg Gly Ala Ser Gly Leu
 1 5 10 15

30

Ala Asn Leu Phe Ser Phe Gly Ala Ser Gln Lys Ile Gln Leu
 20 25 30

<210> 33
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pTH/JFH-1(1XFLAG)

<400> 33

Ala Thr Tyr Val Thr Gly Gly Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

1 5 10 15

Asp Lys Gly Gly Gly Asn Leu Phe Ser Phe Gly Ala Ser Gln Lys Ile
20 25 30

Gln Leu

10

<210> 34

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> N terminal sequence of E2 protein encoded in pTH/JFH-1(3XFLAG)

20

<400> 34

Ala Thr Tyr Val Thr Gly Gly Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp
1 5 10 15

Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
20 25 30

30

Gly Gly Gly Asn Leu Phe Ser Phe Gly Ala Ser Gln Lys Ile Gln Leu
35 40 45

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer(TH-F)

<400> 35

aggcgacaac ctatccccaa

20

<210> 36

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer(TH-1F-R)

<400> 36

cccttgatcat cgtcatcctt gtaatcggtt tccgaccccc ccgt

44

10

<210> 37

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer(TH-1F-F)

20

<400> 37

aggatgacga tgacaaggga ggcggtaacc tcitttcatt tggg

44

<210> 38

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> primer(TH-3F-R)

<400> 38

taatgatgt catgatcttt ataataccg tcatggtctt tgtagtcggc ttccgacccc

60

cccggt

65

<210> 39

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer(TH-3F-F)

<400> 39

aagatcatga catcgattac aaggatgacg atgacaaggg aggcggtaac ctcttttcat 60
 ttggg 65

<210> 40
 <211> 9669
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> pTH/JFH1

<400> 40
 acctgcccct aatagggggc acactccgcc atgaatcaact cccctgtgag gaactactgt 60
 cticacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccgggt agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cttttcttgg ataaacccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttggtactg cctgataggg 300
 cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcacga atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaacgta acaccaaccg ccgccacag gacgtcaagt tcccgggcgg 420
 tggccagatc gttggtggag ttacctgtt gccgcgcagg ggcccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgactagg aagaattccg agcggtcgca acctcgtgga aggcgacaac ctatccccaa 540
 ggatcgccga cccgagggca gggcctgggc tcagcctggg tacccttggc ccctctatgg 600
 caacgagggc atgggggtggg caggatggct cctgtcacc cgtggctccc ggccatgttg 660
 ggcccccaat gacccccggc gcaggtcgcg taatttgggt aaagtcacg atacccttac 720
 atgcggttc gccgacctca tggggtacat tccgtcgtc ggcgtccct tggggggcgc 780
 tgccagggcc ttggcgcag gcgtccgggt tctggaggac ggctgaact atgcaacagg 840
 gaatctgccc ggttgccttt tctctatctt cctcttggct ctgtgtcct gtetaacat 900
 ccagcttcc gcttatgaag tgcgcaacgt gtccgggtg taccatgtca cgaacgactg 960

20

30

40

ctccaactcg agcatttgt acgagacagg ggacatgatt atgcacaccc ctgggtgcgt 1020
 gccctgtgtt cgggagaaca actcctcccg ctgttgggca gcgtcactc ccacgtcgc 1080
 ggccaggaac gccagcgcc ccaccacgac aatacggcgc cactcgatt tgctcgttgg 1140
 ggcggtgtct ttctgtccg ctatgtacgt gggggatctc tgcggatctg ttttcctcgt 1200
 ctcccagttg ttcaccttct cgcctcgccg gcatgagaca gtgcaggact gcaattgttc 1260
 aatctatccc ggccacgtat caggtcaccg catggcttgg gatatgatga tgaactggtc 1320
 acctacaaca gccctactgg tatcgcagtt actccggatc ccacaagccg tcgtggacat 1380
 ggtggcgggg gcccaactgg gagtcctggc gggccttggc tactattcca tggcggggaa 1440
 ctgggctaag gttttgattg tgctgtact ctttgcggc gttgatgggg cgacctacgt 1500
 gacggggggg tcggaagcca gaggggcctc tggttagca aacctctttt catttggggc 1560
 gtctcagaag atccagctca taaataccaa cggcagttgg cacatcaata gaactgccct 1620
 gaactgcaat gactccctcc acaactgggtt tcttgcggc ctattctaca cacacaaatt 1680
 caacgcgtcc ggatgtccag agcgcattgg cagctgcgc cccattgaag agttcgtca 1740
 ggggtatggt cccatcactt atgtgagcc ctccccctc gaccagagc cctattgctg 1800
 gcactacgcg cctcgacctg gtggtatcat accgcgctc caggtgtgtg gtccagtgt 1860
 ctgcttcacc ccaagccctg ttgtgttggg gacgaccgat cgctccggtg cccccacgta 1920
 taattggggg gcgaatgaga cggacgtgct gtatctcaac aacacgcggc cgccgcaagg 1980
 caactggttc ggctgcacat ggatgaatgg caccgggttc accaagacgt gcgggggccc 2040
 cccgtgcaac atcggggggg gcggcaacaa caacaccttg acctgcccc cggactgttt 2100
 ccggaaacac cccgaggcca cctacaccaa atgtgttctg ggaccttggg tgacacctag 2160
 gtgcatggtc gactacccat acaggctctg gcaactccc tgcaccgtta actttacat 2220
 cttaaggtt aggatgtacg tgggaggtgt ggagcacagg ctcaacgcc catgcaattg 2280
 gaccgagga gagcgttgta acttagagga cagggataga tcagagctta gcccgctgct 2340

10

20

30

40

gctgtcaaca acagagtggc aggtgctacc ttgttccttc accaccctac cggtctgtc 2400
 cactggtttg atccatctcc accagaacat cgtggacgtg caatacctgt acggtatagg 2460
 gtcggcggtt gtctctatg caatcaaatg ggaatatgtc ttgttgctct tctctctct 2520
 ggcagacgcg cgcgtctgcg cctgcttggt gatgatgtc ctgatatgtc aagctgaggc 2580
 cgccttagag aacctgggtg tctcaatgc ggcgtccctg gctggagcgc atggccttct 2640
 ctctttctt gtgtttctt gtgccgttg gtacatcaag ggcaggttga tccccggggc 2700
 ggcgtatgt ttttacggcg tatggcgtc gtctctactc ctgctggcgt taccaccacg 2760
 agcatacgcc atggaccggg agatggctgc atcgtgcgga ggcgcggtt ttgtaggtct 2820
 ggcattctc accctgtcac cacactataa ggcattctc gccaaagctc tgtggtggtt 2880
 gtgtatctc ctgacctgg gggaagccat gattcaggag tgggtaccac ccatgcaggt 2940
 gcgcggcggc cgcgatggca tcgctgggc cgtcactata ttctgcccg gtgtggtgtt 3000
 tgacattacc aaatggctt tggcgttgt tggcctgtc tacctcttaa ggcccgctt 3060
 gacacatgt cgtacttcg tcagagctca cgtctgata aggttatgcg ctttggtgaa 3120
 gcagctcgc gggggtaggt atgttcaggt ggcgtattg gcccttgga ggtggactgg 3180
 cactacatc tatgaccacc tcacacctat gtccgactgg gccgttagcg gcctgcgcga 3240
 cttagcgtc gccgtggaac ccatcatctt cagtcgatg gagaagaagg tcatcgtctg 3300
 gggagcggag acggtgcat gtggggacat tctacatgga ctcccggtg ccgccgact 3360
 cggccaggag atctctctc gccagctga tggctacacc tccaaggggt ggaagctcct 3420
 tgcctccatc actgcttatg ccagcaaac acgaggctc ctgggcgcca tagtggtgag 3480
 tatgacgggg cgtgacagga cagaacagc cggggaagtc caaatcctgt ccacagtctc 3540
 tcagtcctc ctggaacaa ccatctcggg ggttttggg actgtttacc acggagctgg 3600
 caacaagact ctagecggct tacgggtcc ggtcacgcag atgtactcga gtgtgaggg 3660
 ggacttggtg ggttggecca gccccctgg gaccaagtct ttggagccgt gcaagtgtg 3720

10

20

30

40

agccgtcgac ctatatctgg tcacgcggaa cgcigatgtc atcccggctc ggagacgcgg 3780
 ggacaagcgg ggagcattgc tctccccgag acccatttcg accttgaagg ggtcctcggg 3840
 ggggccggtg ctctgcccta ggggccacgt cgttgggctc ticcagacag ctgtgtgctc 3900
 tcggggcgtg gccaaatcca tcgatticat ccccgttgag acaactcgacg ttgttacaag 3960
 gtctcccact ttcagtgaca acagcacgcc accggctgtg cccagacct atcaggtcgg 4020
 gtacttgcat gctccaactg gcagtggaaa gaggaccaag gtccctgtcg cgtatgccgc 4080
 ccaggggtac aaagtactag tgcttaaccc ctcggtagct gccaccctgg ggtttggggc 4140
 gtacctatcc aaggcacatg gcatcaatcc caacattagg actggagtca ggaccgtgat 4200
 gaccggggag gccatcacgt actccacata tggcaaattt ctgccgatg ggggctgcgc 4260
 tagcggcgcc tatgacatca tcatatgca tgaatgccac gctgtggatg ctacctcat 4320
 tctcggcac ggaacggtec ttgatcaagc agagacagcc ggggtcagac taactgtgct 4380
 ggctacggcc acaccccccg ggtcagtgc aacccccat cccgatatag aagaggtagg 4440
 cctcgggcgg gagggtgaga tccccctta tgggaggcg attcccctat cctgcatcaa 4500
 gggagggaga cacctgattt tctgccactc aaagaaaaag tgtgacgagc tcgcggcggc 4560
 ccttcggggc atgggcttga atgccgtggc atactataga gggttggacg tctccataat 4620
 accagctcag ggagatgtgg tggctgctgc caccgacgcc ctcatgacgg ggtacactgg 4680
 agactttgac tccgtgateg actgcaatgt agcggtcacc caagctgtcg acttcagcct 4740
 ggacccacc ttactataa ccacacagac tgteccaca gacgtgtct cacgcagtca 4800
 gcgcgcggg cgcacaggta gaggaagaca gggcacttat aggtatgttt ccaactggtga 4860
 acgagcctca ggaatgtttg acagtgtagt gctttgtgag tgctacgacg caggggctgc 4920
 gtggtacgat ctacaccag cggagaccac cgtcaggctt agagcgtatt tcaacacgcc 4980
 cggcctaccc gtgtgtcaag accatcttga attttgggag gcagttttca ccggcctcac 5040
 acacatagac gcccacttcc tctcccaaac aaagcaagcg ggggagaact tcgcgtacct 5100

10

20

30

40

agtagcctac caagctacgg tgtgcgccag agccaaggcc cctccccctg cctgggacgc 5160
 catgtggaag tgcctggccc gactcaagcc tacgcttgcg ggccccacac ctctcctgta 5220
 ccgtttgggc cctattacca atgaggtcac cctcacacac cctgggacga agtacatcgc 5280
 cacatgcatg caagctgacc ttgaggtcat gaccagcacg tgggtcctag ctggaggagt 5340
 cctggcagcc gtcgccgat attgcctggc gactggatgc gtttccatca tcggccgctt 5400
 gcacgtcaac cagcgagtcg tcgttgccg ggataaggag gtcctgtatg aggcttttga 5460
 tgagatggag gaatgcgct ctagggcggc tctcatcga gaggggcagc ggatagccga 5520
 gatgttgaag tccaagatcc aaggttgct gcagcaggcc tctaagcagg cccaggacat 5580
 acaaccgct atgcaggctt catggcccaa agtggacaa ttttgggcca gacacatgtg 5640
 gaacttcatt agcggcatcc aatacctcgc aggattgtca aactgcccag ggaacccgc 5700
 ggtggcttcc atgatggcat tcagtccgc cctcaccagt ccgttgctga ccagtaccac 5760
 catccttctc aacatcatgg gaggttggt agcgtcccag atcgcaccac ccgcgggggc 5820
 caccgcttt gtcgtcagt gcctgggtgg ggctgccgtg ggcagcatag gcctgggtaa 5880
 ggtgctggtg gacatcctgg caggatatgg tgcgggcatt tcgggggccc tcgtcgcat 5940
 caagatcatg tctggcgaga agccctctat ggaagatgtc atcaatctac tgcctgggat 6000
 cctgtctccg ggagccctgg tggtaggggt catctgcgc gccattctgc gcgccacgt 6060
 gggaccgggg gagggcgcg tccaatggat gaacaggctt attgcctttg ctccagagg 6120
 aaaccacgtc gccctactc actacgtgac ggagtcggat gcgtcgagc gtgtgacca 6180
 actacttgcc tctcttacta taaccagcct actcagaaga ctccacaatt ggataactga 6240
 ggactgcccc atcccatgt ccggatcctg gctccgcgac gtgtgggact gggtttgac 6300
 catcttgaca gacttcaaaa attggctgac ctctaaattg ttccccaage tgcccgccct 6360
 ccccttcate tcttgtaaa aggggtacaa ggggtgtgtg gccggcactg gcatcatgac 6420
 cacgcgtgc ccttgggcg ccaacatctc tggcaatgtc cgctgggct ctataggat 6480

10

20

30

40

cacagggcct aaaacctgca tgaacacctg gcaggggacc tttcctatca attgctacac 6540
 ggagggccag tgcgcgccga aacccccac gaactacaag accgccatct ggaggggtggc 6600
 ggccctcggag tacgcggagg tgacgcagca tgggtcgtac tectatgtaa caggactgac 6660
 cactgacaat ctgaaaattc cttgccaaact accttctcca gagtttttct cctgggtgga 6720
 cgggtgtcag atccataggt ttgcacccac accaaagccg ttttccggg atgaggcttc 6780
 gttctgcgtt gggttaatt cctatgctgt cgggtccag ctccctgtg aacctgagcc 6840
 cgacgcagac gtattgaggt ccatgctaac agatccgcc cacatcacgg cggagactgc 6900
 ggcgcgccgc ttggcacggg gatcacctcc atctgaggcg agtcctcag tgagccagct 6960
 atcagcaccg tcgtgcggg ccacctgcac caccacagc aacacctatg acgtggacat 7020
 ggtcgatgcc aacctgctca tggagggcgg tgtggctcag acagagcctg agtccagggt 7080
 gcccgttctg gactttctcg agccaatggc cgaggaagag agcgaccttg agccctcaat 7140
 accatcggag tgcattctcc ccaggagcgg gtttccacgg gccttaccgg ctggggcacg 7200
 gcctgactac aaccgcgcgc tcgtggaatc gtggaggagg ccagattacc aaccgcccac 7260
 cgttgctggt tgtgctctcc cccccccaa gaaggcccg acgcctcccc caaggagacg 7320
 ccggacagtg ggtctgagcg agagcaccat atcagaagcc ctccagcaac tggccatcaa 7380
 gacctttggc cagccccct cgagcgggtga tgcaggctcg tccacggggg cggcgccgc 7440
 cgaatccggc ggtccgacgt ccctggtga gccggcccc tcagagacag gtccgcctc 7500
 ctctatgcc cccctcagg gggagcctgg agatccggac ctggagtctg atcaggtaga 7560
 gcttcaacct cccccccagg ggggggggt agtcccggt tcgggtcgg ggtcttggtc 7620
 tacttgctcc gaggaggacg ataccacgt gtgctgctcc atgtcatact cctggaccgg 7680
 ggctctaata actccctgta gcccgaaga ggaaaagttg ccaatcaacc ctttgagtaa 7740
 ctcgtgttg cgataccata acaagggtga ctgtacaaca tcaaagagcg cctcacagag 7800
 ggctaaaaag gtaacttttg acaggacga agtgctcgac gccattatg actcagtctt 7860

10

20

30

40

aaaggacatc aagctagcgg ctccaaggt cagcgcaagg ctctcacct tggaggaggc 7920
 gtgccagttg actccacccc attctgcaag atccaagtat ggattcgggg ccaaggaggt 7980
 ccgcagcttg tccgggaggg ccgttaacca catcaagtc gtgtggaagg acctcctgga 8040
 agaccacaaa acaccaattc ccacaacct catggccaaa aatgaggtgt tctgcgtgga 8100
 ccccgccaag gggggtaaga aaccagctcg cctcatcgtt taccctgacc tggcgctccg 8160
 ggtctgcgag aaaatggccc tctatgacat tacacaaaag ctctcagcgg cggtaatggg 8220
 agcttcctat ggcttcaggt actccctgc ccaacgggtg gattatctct tgaaagcatg 8280
 ggccgaaaag aaggacccca tgggtttttc gtatgatacc cgatgcttcg actcaaccgt 8340
 cactgagaga gacatcagga ccgaggagtc catataccag gcctgctccc tgcccagga 8400
 ggcccgact gccatacact cgtgactga gagactttac gtaggagggc ccatgttcaa 8460
 cagcaagggt caaacctgcg gttacagacg ttgccgcgc agcgggggtgc taaccactag 8520
 catgggtaac accatcacat gctatgtgaa agccctagcg gcctgcaagg ctgcggggat 8580
 agttgcgccc acaatgctgg tatgcggcga tgacctagta gtcactcag aaagccaggg 8640
 gactgaggag gacgagcgga acctgagagc cttcacggag gccatgacca ggtactctgc 8700
 cctccttgtt gatccccca gaccggaata tgacctggag ctaataacat cctgttcctc 8760
 aaatgtgtct gtggcgttgg gcccgcgggg ccgcgcaga tactacctga ccagagacc 8820
 aaccactcca ctgccccggg ctgcctggga aacagttaga cactcccta tcaattcatg 8880
 gctgggaaac atcatccagt atgctccaac catatgggtt cgcattgtcc taatgacaca 8940
 cttctctccc attctcatgg tccaagacac cctggaccag aacctcaact ttgagatgta 9000
 tggatcagta tactccgtga atcctttgga cctccagcc ataattgaga ggttacacgg 9060
 gcttgacgcc tttctatgc acacatactc tcaccacgaa ctgacgcggg tggttcagc 9120
 cctcagaaaa cttggggcgc caccctcag ggtgtggaag agtcgggctc gcgcagtcag 9180
 ggcgctccctc atctccctg gagggaaagc ggccgtttgc ggccgatac tcttcaattg 9240

10

20

30

40

ggcggtgaag accaagctca aactcactcc attgccggag gcgcgcctac tggacttate 9300
 cagttgggtc accgtcggcg ccggcggggg cgacattttt cacagcgtgt cgcgcgccc 9360
 accccgctca ttactcttcg gcctactect acttttcgta ggggtaggcc tcttctact 9420
 ccccgcctcg tagagcggca cacactaggt aactccata gtaactgtt ctttttttt 9480
 ttttttttt ttttttttt ttttttttt tttttcttt ttttttttt cctctttct 9540
 tcccttctca tcttattcta ctttctttct tgggtgctcc atcttagccc tagtcacggc 9600
 tagctgtgaa aggtccgtga gccgcctgac tgcagagagt gccgtaactg gtctctctgc 9660
 agatcatgt 9669

10

<210> 41
 <211> 9681
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> pTH/JFH1(1XFLAG)

<400> 41
 acctgcccct aataggggag acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
 cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcttacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccgggt agtacaccgg aattccggg 180
 aagactgggt ctttctttgg ataaacccac tetatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
 caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgatagg 300
 cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcacga atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaacgta acaccaaccg ccgccacag gacgtcaagt tcccgggcgg 420
 tggccagatc gttgggtggag ttacctgtt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgactagg aagacttccg agcggtcgca acctcgtgga aggcgacaac ctatcccaaa 540
 ggatcgccga cccgagggca gggcctgggc tcagcctggg tacccttggc cctctatgg 600

30

40

caacgagggc atggggtggg caggatggct cctgtcacc cgtggctccc ggcctagttg 660
 gggccccaat gacccccggc gcaggtcgcg taatttgggt aaagtcacg atacccttac 720
 atgcggcttc gccgacctca tggggtacat tccgctcgtc ggcgctccct tggggggcgc 780
 tgccagggcc ttggcgcatg gcgtccgggt tctggaggac ggcgtgaact atgcaacagg 840
 gaatctgccc ggttgcctct tctctatctt cctcttggct ctgctgtcct gtctaaccat 900
 ccagcttcc gcttatgaag tgcgcaacgt gtccgggggtg taccatgtca cgaacgactg 960
 ctccaactcg agcattgtgt acgagacagg ggacatgatt atgcacaccc ctgggtgcgt 1020
 gccctgtgtt cgggagaaca actcctcccg ctgctgggca gcgtcactc ccacgctcgc 1080
 ggccaggaac gccagcgtcc ccaccacgac aatacggcgc cagctcgatt tgcctgttgg 1140
 ggcggctgct ttctgctccg ctatgtacgt gggggatctc tgcggatctg ttttctcgt 1200
 ctcccagttg ttcaccttct cgcctcgccg gcattgagaca gtgcaggact gcaattgttc 1260
 aatctatccc ggccacgtat caggtcaccg catggcttgg gatatgatga tgaactggtc 1320
 acctacaaca gccctactgg tatcgagtt actccggatc ccacaagccg togtggacat 1380
 ggtggcgggg gccactggg gagtccctggc gggccttgcc tactattcca tggcggggaa 1440
 ctgggctaag gttttgattg tgcgtctact ctttgcgggc gttgatgggg cgacctacgt 1500
 gacggggggg tcggaagccg attacaagga tgacgatgac aaggaggcg gtaacctctt 1560
 ttcatttggg gcgtctcaga agatccagct cataaatacc aacggcagtt ggcacatcaa 1620
 tagaactgcc ctgaactgca atgactcctt ccacactggg tttcttgccg cgtatttcta 1680
 cacacacaaa ttcaacgct ccggatgtcc agagcgcacg gccagctgcc gccccattga 1740
 agagtctcgt caggggtatg gtcccatcac ttatgtgag cctccccct cggaccagag 1800
 gccctattgc tggcaactac cgcctcgacc gtgtggtatc ataccgcgt cgcaggtgtg 1860
 tggctcagtg tactgcttca cccaagccc tgttgtggtg gggacgaccg atcgtccgg 1920
 tgccccacg tataattggg gggcgaatga gacggacgtg ctgtatctca acaacacgcg 1980

10

20

30

40

gccgccgcaa ggcaactggt tcggctgcac atggatgaat ggcaccgggt tcaccaagac 2040
 gtgcgggggc cccccgtgca acatcggggg gggcggaac aacaacacct tgacctgccc 2100
 cacggactgt ttccggaaac accccgaggc cacctacacc aaatgtgggt cgggaccttg 2160
 gttgacacct aggtgcatgg tcgactaccc atacaggctc tggcactacc cctgcaccgt 2220
 taactttacc atctttaagg ttaggatgta cgtgggaggt gtggagcaca ggtcaacgc 2280
 cgcattgcaat tggaccgag gagagcgttg taacttagag gacaggata gatcagagct 2340
 tagcccgctg ctgctgtcaa caacagagt gcaggtgcta ccttgcttct tcaccacct 2400
 accggctctg tccactggtt tgatccatct ccaccagaac atcgtggacg tgcaatacct 2460
 gtacggtata gggtcggcgg ttgtctctca tgcaatcaaa tgggaatatg tcttggtgct 2520
 ctctctctc ctggcagacg cgcgcgtctg cgcctgcttg tggatgatgc tgctgatagc 2580
 tcaagctgag gccgccttag agaacctggt ggtctcaat gcggcgctcc tggctggagc 2640
 geatggcctt ctctcttcc ttgtgttctt ctgtgccgt tggatcatca agggcaggtt 2700
 gatccccggg gcggcgatg ctttttacgg cgtatggcgg ctgctctac tctgtctgga 2760
 gttaccacca cgagcatacg ccatggaccg ggagatggt gcacgtgcg gaggcgcgtt 2820
 tttgtaggt ctggcattcc tgacctgta accacactat aaggcattcc tcgccaagct 2880
 cctgtggtgg ttgtgctatc tctgacctt gggggaagcc atgattcagg agtgggtacc 2940
 acccatgcag gtgcgcggcg gccgcgatgg catcgctgg gccgtacta tattctgccc 3000
 ggggtggtg ttgacatta ccaaatggt ttggcggtt cttgggcctg ctacctctt 3060
 aagggcgct ttgacacatg tgccgtactt cgtcagagct cacgtctga taagggtatg 3120
 cgttttggtg aagcagctcg cgggggtag gtatgttcag gtggcgtat tggcccttgg 3180
 cagggtgact ggcacctaca tctatgacca cctcacacct atgtcggact gggccgctag 3240
 cgccctgcgc gacttagcgg tcgccgtgga accatcatc ttcagtcca tggagaagaa 3300
 ggtcatcgtc tggggagcgg agacggctgc atgtggggac attctacatg gacttccgt 3360

10

20

30

40

gtccgccga ctgccagg agatcctcct cgccccagct gatggctaca cctccaaggg 3420
 gtggaagctc cttgtccca tcactgctta tgcccagcaa acacagggcc tctgggcgc 3480
 catagtgggtg agtatgacgg ggcgtgacag gacagaacag gccggggaag tccaaatcct 3540
 gtccacagtc tctcagtcct tctcgggaac aaccatctcg ggggttttgt ggactgttta 3600
 ccacggagct ggcaacaaga ctctagccgg cttacggggt ccggtcacgc agatgtactc 3660
 gagtgcctgag ggggacttgg taggtggcc cagccccct gggaccaagt ctttgagcc 3720
 gtgcaagtgt ggagccgtcg acctatact ggtcacggg aacgtgatg tcatccggc 3780
 tcggagacgc ggggacaagc ggggagcatt gctctccc agaccattt cgacctgaa 3840
 ggggtcctcg gggggccgg tgctctgcc tagggccac gtcgttggc tctccgagc 3900
 agctgtgtgc tctcggggcg tggccaaac catcgattc atccccgtg agacactega 3960
 cgttgttaca aggtccca ctttcagtga caacagcag ccaccggctg tgcccagac 4020
 ctatcaggtc gggtaacttc atgtccaac tggcagtga aagagacca aggtccctgt 4080
 cgcgtatgcc gcccaggggt acaaagtact agtgcttaac cctcggtag ctgccacct 4140
 ggggtttggg gcgtacctat ccaaggcaca tggcatcaat cccaacatta ggactggagt 4200
 caggaccgtg atgaccgggg aggccatcac gtactccaca tatggcaaat ttctcgcca 4260
 tggggctgc gctagcggcg cctatgacat catcatatgc gatgaatgcc acgtgtgga 4320
 tgctacctcc attctcgga tcggaacggt cttgatcaa gcagagacag ccggggtcag 4380
 actaactgtg ctggctacgg ccacacccc cgggtcagtg acaaccccc atccgatat 4440
 agaagaggta ggcctcgggc gggagggtga gatccccctc tatgggaggg cgattccct 4500
 atctgcac aaggaggga gacacctgat ttctgccac tcaaagaaa agtgtgacga 4560
 gctcggcg gccctcggg gcattggcctt gaatgccgtg gcatactata gaggttgga 4620
 cgtctccata ataccagtc agggagatgt ggtggctgc gccaccgac cctcatgac 4680
 ggggtacact ggagacttg actccgtgat cgaactgcaat gtagcggtca ccaagctgt 4740

10

20

30

40

cgacttcagc ctggacccca ccttcactat aaccacacag actgtcccac aagacgttgt 4800
 ctacgcagt cagcgccgcg ggcgcacagg tagaggaaga cagggcactt ataggtatgt 4860
 ttccacttgt gaacgagcct caggaaigtg tgacagtgtg gtgctttgtg agtgetacga 4920
 cgcaggggct gcggtgtaag atctcacacc agcggagacc accgtcaggc ttagagcgta 4980
 ttccaacacg cccggcciac cegtgtgtca agaccatctt gaattttggg aggcagtttt 5040
 caccggcctc acacacatag acgcccactt cctctcccaa acaaagcaag cgggggagaa 5100
 cttecggtac ctagtagcct accaagctac ggtgtgcgcc agagccaagg cccctccccc 5160
 gtcttgggac gccatgtgga agtgcctggc ccgactcaag cctacgcttg cgggccccac 5220
 acctctcctg taccgtttgg gccctattac caatgaggtc accctcacac accctgggac 5280
 gaagtacatc gccacatgca tgcaagctga ccttgaggtc atgaccagca cgtgggtcct 5340
 agctggagga gtcttggcag ccgtcgccgc atattgcctg gcgactggat gcgtttccat 5400
 catcgccgc ttgcacgtca accagcgagt cgtcgttgcg ccggataagg aggtcctgta 5460
 tgaggctttt gatgagatgg aggaatgcgc ctctagggcg gctctcatcg aagaggggca 5520
 gcggatagcc gagatgttga agtccaagat ccaaggcttg ctgcagcagg cctctaagca 5580
 ggcccaggac atacaacccg ctatgcaggc ttcatggccc aaagtggaaac aattttgggc 5640
 cagacacatg tggaaactta ttagcggcat ccaatacctc gcaggattgt caaacctgcc 5700
 agggaaacccc gcggttggett ccatgatggc attcagtgc gccctacca gtccgttgc 5760
 gaccagtacc accatccttc tcaacatcat gggaggctgg ttagcgccc agatcgacc 5820
 acccgccggg gccaccggt ttgtcgtcag tggcctggg ggggctgcc tgggcagcat 5880
 aggctgggt aaggtgctgg tggacatcct ggcaggatat ggtgcgggca ttccgggggc 5940
 cctcgtcgca ttcaagatca tgtctggcga gaagccctct atggaagatg tcatcaatct 6000
 actgcctggg atcctgtctc cgggagccct ggtggtggg gtcattctgc cgccattct 6060
 gcgccgccac gtgggaccgg gggagggcgc ggtccaatgg atgaacaggc ttattgcctt 6120

10

20

30

40

tgcctccaga ggaaaccaag tcgcccctac tcactacgtg acggagtcgg atgcgtcgca 6180
 gcgtgtgacc caactacttg gctctcttac tataaccagc ctactcagaa gactccacaa 6240
 ttggataact gaggactgcc ccatcccatg ctccggatcc tggctccgcg acgtgtggga 6300
 ctgggtttgc accatcttga cagacttcaa aaattggctg acctctaaat tgttccccaa 6360
 gctgcccggc cccccctca tetcttgtca aaaggggtac aagggtgtgt gggccggcac 6420
 tggcatcatg accacgcgtt gcccttggcg cgccaacatc tctggcaatg tccgcctggg 6480
 ctctatgagg atcacagggc ctaaaacctg catgaacacc tggcagggga cctttctat 6540
 caattgctac acggaggggc agtgcgcgcc gaaaccccc acgaactaca agaccgcat 6600
 ctggagggtg gggcctcgg agtacgcgga ggtgacgcag catgggtcgt actcctatgt 6660
 aacaggactg accactgaca atctgaaaat tccttgccaa ctacctctc cagagttttt 6720
 ctctgggtg gacggtgtgc agatccatag gtttgacccc acaccaaagc cgtttttccg 6780
 ggatgaggtc tcgttctgcg ttgggcttaa ttctatgct gtcgggtccc agcttccctg 6840
 tgaacctgag cccgacgcag acgtattgag gtccatgcta acagatccgc cccacatcac 6900
 ggccgagact gggcgcggc gcttggcacg gggatcacct ccatctgagg cgagctctc 6960
 agtgagccag ctatcagcac cgtcgtcgcg ggccacctgc accaccacaca gcaacaccta 7020
 tgacgtggac atggtcgatg ccaacctgct catggagggc ggtgtggctc agacagagcc 7080
 tgagtccagg gtgccgttc tggactttct cgagccaatg gccgaggaag agagcgacct 7140
 tgagccctca ataccatcgg agtgcctgct cccaggagc gggtttccac gggccttacc 7200
 ggcttgggca cggcctgact acaaccgcc gctcgtggaa tcgtggagga ggccagatta 7260
 ccaaccgcc accgttgctg gttgtgctct ccccccccc aagaaggccc cgacgcctcc 7320
 cccaaggaga cgccggacag tgggtctgag cgagagcacc atatcagaag ccctccagca 7380
 actggccatc aagacctttg gccagcccc ctcgagcggg gatgcaggct cgtccacggg 7440
 ggccggcgcc gccgaatccg gcggtccgac gtccctggg gagccggccc cctcagagac 7500

10

20

30

40

aggttcgcgc tctctatgc cccccctga gggggagcct ggagatccgg acctggagtc 7560
 tgatcaggta gagttcaac cccccccca gggggggggg gtagctcccg gttcgggctc 7620
 ggggtcttgg tctacttgct ccgaggagga cgataccacc gtgtgctgct ccatgtcata 7680
 ctctgggacc ggggtcttaa taactccctg tagccccgaa gaggaagagt tgccaatcaa 7740
 ccctttgagt aactcgtgtg tgcgatacca taacaagggt tactgtacaa catcaaagag 7800
 cgctcacag agggctaaaa aggtaacttt tgacaggacg caagtgtctg acgcccatta 7860
 tgactcagtc ttaaaggaca tcaagctagc ggcttccaag gtcagcgcaa ggctcctcac 7920
 ctggaggag gcgtgccagt tgactccacc ccattctgca agatccaagt atggattcgg 7980
 ggccaaggag gtccgcagct tgtccgggag ggccgttaac cacatcaagt ccgtgtggaa 8040
 ggacctcctg gaagaccac aaacaccaat tcccacaacc atcatggcca aaaatgaggt 8100
 gtctgcgtg gaccccgcca aggggggtaa gaaaccagct cgctcatcg ttaccctga 8160
 cctcggcgtc cgggtctgag agaaaatggc cctctatgac attacacaaa agcttcctca 8220
 ggcggtaatg ggagcttcct atggcttcca gtactccct gcccaacggg tggagtatct 8280
 ctgaaagca tgggcggaaa agaaggacc catgggtttt tcgtatgata ccgatgctt 8340
 cgactcaacc gtcactgaga gagacatcag gaccgaggag tccatatacc aggcctgctc 8400
 cctgcccgag gaggcccgca ctgccataca ctgctgact gagagacttt acgtaggagg 8460
 gcccatgttc aacagcaagg gtcaaacctg cggttacaga cgttgccgag ccagcgggg 8520
 gctaaccact agcatgggta acaccatcac atgctatgtg aaagccctag cggcctgcaa 8580
 ggctgcgggg atagttgcgc ccacaatgct ggtatgcggc gatgacctag tagtcatctc 8640
 agaaagccag gggactgagg aggacgagcg gaacctgaga gccttcacgg aggccatgac 8700
 caggtactct gccctcctg gtgatcccc cagaccggaa tatgacctgg agctaataac 8760
 atcctgttcc tcaaagtgtg ctgtggcggt gggcccgagg ggcccgca gatactacct 8820
 gaccagagac ccaaccactc cactcgcccg ggctgcctgg gaaacagtta gacactcccc 8880

10

20

30

40

tatcaattca tggctgggaa acatcateca gtatgtcca accatatggg ttcgcatggt 8940
 cctaatagaca cactttctct ccattctcat ggtccaagac accctggacc agaacctcaa 9000
 ctttgagatg tatggatcag tatactccgt gaatcctttg gaccttcag ccataattga 9060
 gaggttacac gggcttgacg cctttctat gcacacatac tctcaccacg aactgacgag 9120
 ggtggettca gccctcagaa aacttggggc gccacccctc aggggtgtga agagtggggc 9180
 tcgcgcagtc agggcgctcc tcctctcccg tggagggaaa gcggccggtt gcggccgata 9240
 tctcttcaat tgggcgggtga agaccaagct caaactcaat ccattgccgg aggcgcgcct 9300
 actggactta tccagttggt tcaccgtcgg cgccggcggg ggcgacattt ttcacagcgt 9360
 gtcgcgcgcc cgaccccgct cattactctt cgccctactc ctacttttcg taggggtagg 9420
 cctcttcta ctcgccgctc ggtagagcgg cacacactag gtacactcca tagctaactg 9480
 ttctttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 9540
 ttccctcttt ctccctctct catcttattc tactttcttt cttggtggct ccattcttagc 9600
 cctagtcacg gctagctgtg aaaggctcgt gagccgcatg actgcagaga gtgccgtaac 9660
 tggctctctt gcagatcatg t 9681

10

20

30

<210> 42
 <211> 9723
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> pTH/JFH1 (3XFLAG)

<400> 42
 acctgccct aataggggag acactccgc atgaatcaat cccctgtgag gaactactgt 60
 ctccacgcag aaagcgccia gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
 cccctcccg ggagagccat agtggctctg ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
 aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240

40

caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
 cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcacga atcctaaacc 360
 tcaaagaaaa accaaaacgt acaccaaccg cggccacag gacgtcaagt tccccggcgg 420
 tggccagatc gtttgtggag ttacctgtt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
 cgcgactagg aagacttccg agcggtcgca acctcgtagg aggcgacaac ctatcccaa 540
 ggatcgccga cccgagggca gggcctgggc tcagcctggg tacccttggc ccctctatgg 600
 caacgagggc atgggggtggg caggatggct cctgtcacc cgtggctccc ggcctagtig 660
 ggcccccaat gacccccggc gcaggtcgcg taatttgggt aaagtcacg atacccttac 720
 atgcggcttc gccgacctca tggggtacat tccgctcgtc ggcgtcccct tggggggcgc 780
 tgccagggcc ttggcgcatg gcgtccgggt tetggaggac ggcgtgaact atgcaacagg 840
 gaatctgccc ggttgccttt ttctatctt cctcttggct ctgtgtcct gtctaaccat 900
 cccagcttcc gcttatgaag tgcgcaacgt gtccgggggtg taccatgtca cgaacgactg 960
 ctccaaactcg agcatttgtt acgagacagg ggacatgatt atgcacacc ctgggtgcgt 1020
 gccctgtgtt cgggagaaca actcctcccg ctgtgggca gcgtcactc ccacgtcgc 1080
 ggccaggaa cccagcgtcc ccaccagac aatacggcgc cagctcgatt tgctcgttgg 1140
 ggcggtgct ttctgtccg ctatgtacgt gggggatctc tgggatctg ttttcctcgt 1200
 ctcccagttg ttcaccttct cgcctcgcg gcctgagaca gtgcaggact gcaattgttc 1260
 aatctatecc ggccacgtat caggtcaccg catggcttgg gatatgatga tgaactggtc 1320
 acctacaaca gccctacttg tatcgagtt actccggatc ccacaagccg tcgtggacat 1380
 ggtggcgggg gcccaactgg gagtcctggc gggecttgc tactattcca tggcggggaa 1440
 ctgggctaag gttttgattg tctgtctact ctttgcggc gttgatgggg cgacctacgt 1500
 gacggggggg tcggaagccg actacaaaga ccatgacggg gattataaag atcatgacat 1560
 cgattacaag gatgacgatg acaaggagg cggtaacctc ttttcatttg gggcgtctca 1620

10

20

30

40

gaagatccag ctcataaata ccaacggcag ttggcacatc aatagaactg cctgaactg 1680
 caatgactcc ctccacactg ggittcttgc cgcctattc tacacacaca aattcaacgc 1740
 gtccggatgt ccagagcgca tggccagctg ccgccccatt gaagagtteg ctcaggggta 1800
 tggtoceatc acttatgetg ageccctccc ctgggaccag aggeccctatt gctggcacta 1860
 cgcgcctcga ccgtgtggta tcataccgcg gtgcgaggtg tgtggtccag tgtactgctt 1920
 caccccaagc cctgttgtgg tggggacgac cgatcgctcc ggtgccccca cgtataattg 1980
 gggggcgaat gagacggacg tgctgtatct caacaacacg cggccgcgcg aaggcaactg 2040
 gtteggtgc acatggatga atggcaccgg gttaccaag acgtgcgggg gcccccgctg 2100
 caacatcggg gggggcggca acaacaacac ctgacctgc cccacggact gttccggaa 2160
 acaccccgag gccacctaca ccaaatgtgg ttccggacct tggttgacac ctaggtgcat 2220
 ggtcgactac ccatacagc tctggcacta cccctgcacc gttacttta ccatcttta 2280
 ggtaggatg tacgtgggag gtgtggagca caggctcaac gccgatgca attggaccg 2340
 aggagagcgt tgtaacttag aggacaggga tagatcagag cttagccgcg tctgtctgtc 2400
 aacaacagag tggcaggtgc tacctgttc ctaccacc ctaccggctc tgtccactgg 2460
 ttgatecat ctccaccaga acatcgtgga cgtgcaatac ctgtacggtg tagggctggc 2520
 ggttgtctcc tatgcaatca aatgggaata tgtctgttg ctcttctcc tctggcaga 2580
 cgcgcgcgtc tgcgcctget tgtggatgat gctgtgata gctcaagctg aggcgcctt 2640
 agagaacctg gtggtctca atgcggcgtc cctggctgga gcgatggcc ttctctctt 2700
 ccttgtgttc ttctgtgccg cttggtacat caagggcagg ttgatccccg gggcgcgta 2760
 tgetttttac ggcttatggc cgtgtctct actctgtct gcgttaccac cagagcata 2820
 cgccatggac cgggagatgg ctgcacgtg cggaggcgcg gttttttag gtctggcatt 2880
 cctgaccttg tcaccacact ataaggcatt cctcgccaag ctctgtggt ggttgtgcta 2940
 tctctgacc cgggggaag ccatgattca ggagtgggta ccacccatgc aggtgcgcg 3000

10

20

30

40

cggccgcgat ggcacgcgt gggccgtcac tatattctgc ccgggtgtgg tgtttgacat 3060
 taccaaatgg cttttggcgt tgcttgggcc tgcctacctc ttaaggcccg ctttgacaca 3120
 tgtgccgtac ttcgtcagag ctacacgtct gataagggtg tgcgctttgg tgaagcagct 3180
 cgcgggggggt aggtatgttc aggtggcgt attggccctt ggcaggtgga ctggcaccta 3240
 catctatgac cacctcacac ctatgtcgga ctgggccgt agcggcctgc gcgacttagc 3300
 ggtcgccgtg gaacccatca tcttcagtc gatggagaag aaggtcatcg tctggggagc 3360
 ggagacggct gcatgtgggg acattctaca tggacttccc gtgtccgcc gactcggcca 3420
 ggagatcctc ctggcccag ctgatggcta cacctccaag ggggtggaag tccttgcctc 3480
 catcactgct tatgccagc aaacacgagg cctcctgggc gccatagtgg tgagtatgac 3540
 ggggcgtgac aggacagaac aggccgggga agtccaaatc ctgtccacag tctctcagtc 3600
 ctctctcgga acaaccatct cgggggtttt gtggactgtt taccacggag ctggcaacaa 3660
 gactctagcc ggcttacggg gtccggtcac gcagatgtac tcgagtgtg agggggactt 3720
 ggtaggctgg ccagccccc ctgggaccaa gtctttggag ccgtgcaagt gtggagccgt 3780
 cgacctatat ctggtcacgc ggaacgtga tgcacccg gctcggagac gcggggacaa 3840
 gcggggagca ttgtctctcc cgagacccat ttcgacctg aagggtcct cgggggggcc 3900
 ggtgtctctgc cctaggggcc acgtcgttgg gtcttccga gcagctgtgt gtctcgggg 3960
 cgtggccaaa tccatcgatt tcatcccggt tgagacactc gacgttgta caaggtctcc 4020
 cactttcagt gacaacagca cgccaccggc tgtccccag acctatcagg tcgggtactt 4080
 gcatgctcca actggcagt gaaagagcac caaggtccct gtgcgtatg ccgccaggg 4140
 gtacaaagta ctagtctta accctcgggt agctgccacc ctggggtttg ggcgtacct 4200
 atccaaggca catggcatca atccaacat taggactgga gtcaggaccg tgatgaccgg 4260
 ggaggccatc acgtactcca catatggcaa atttctgcc gatgggggt gcgctagcgg 4320
 cgcctatgac atcatcatat gcgatgaatg ccacgtgtg gatgctacct ccattctcg 4380

10

20

30

40

catcggaacg gtccttgatc aagcagagac agccggggtc agactaactg tgctggetac 4440
ggccacaccc cccgggtcag tgacaacccc ccacccgat atagaagagg taggcctcgg 4500
gctgggagggt gagatccctt tctatgggag ggcgattccc ctatcctgca tcaaggagg 4560
gagacacctg attttctgcc actcaaagaa aaagtgtgac gagctcgagg cgcccttcg 4620
gggcatgggc ttgaatgccg tggcatacta tagagggttg gacgtctcca taataccagc 4680
tcaggagat gtggtggtcg tgcaccga cgccctcatg acgggttaca ctggagactt 4740
tgactccgtg atcgactgca atgtagcggc cacccaagct gtcgacttca gctggaccc 4800
caccttact ataaccacac agactgtccc acaagacgt gtctcacgca gtcagcgccg 4860
cgggcgcaca ggtagaggaa gacagggcac ttataggtat gtttccactg gtgaacgagc 4920
ctcaggaatg tttgacagt tagtgcttg tgagtgtac gacgcagggg ctgcgtggt 4980
cgatctcaca ccagcggaga ccaccgtcag gcttagagcg tatttcaaca cgcccgcc 5040
acccgtgtgt caagaccatc ttgaatttg ggaggcagtt ttcaccggcc tcacacacat 5100
agacggccac ttctctccc aaacaaagca agcgggggag aacttcgct acctagtagc 5160
ctaccaagct acggtgtgcg ccagagccaa ggcctctccc cgtctctggg acgcatgtg 5220
gaagtgcctg gcccagctca agcctacgt tgcgggcccc acacctctcc tgtaccgtt 5280
gggcctatt accaatgagg tcacctcac acacctggg acgaagtaca tgcacatg 5340
catgcaagct gaccttgagg tcatgaccag cagtggtgct ctagctggag gagtctggc 5400
agcgtcgcc gcatattgcc tggcgactgg atgcgttcc atcatcgcc gcttgacgt 5460
caaccagcga gtcgtcgttg cgccggataa ggaggtctg tatgaggctt ttgatgagat 5520
ggaggaatgc gcctctagg cggtctcat cgaagagggg cagcgatag ccgagatgt 5580
gaagtccaag atccaaggt tgcgtcagca ggctctaa caggcccagg acatacaacc 5640
cgctatgcag gcttcatggc ccaaagtga acaattttg gccagacaca tgtggaactt 5700
cattagcggc atccaatacc tgcaggatt gtcaacactg ccagggaacc ccgcggtg 5760

10

20

30

40

ttccatgatg gcattcagtg ccgccctcac cagtcggtg tcgaccagta ccaccatcct 5820
 tctcaacatc atgggaggct ggtagcgtc ccagatcgca ccacccggg ggccaccgg 5880
 ctttgtcgtc agtggcctgg tggggcgtc cgtgggcagc ataggcctgg gtaaggtgct 5940
 ggtggacatc ctggcaggat atggtgcggg catttcgggg gccctcgtcg cattcaagat 6000
 catgtctggc gagaagccct ctatggaaga tgtcatcaat ctactgcctg ggatcctgtc 6060
 tccgggagcc ctggtgggtg gggcatctg cgcggccatt ctgcgccgc acgtgggacc 6120
 gggggagggc gcggtccaat ggatgaacag gcttattgcc ttgtctcca gaggaaacca 6180
 cgtgcacct actactacg tgacggagtc ggatgcgtcg cagcgtgtga cccaactact 6240
 tggtctctt actataacca gcctactcag aagactccac aattggataa ctgaggactg 6300
 ccccatccca tgctcggat cctggctccg cgacgtgtg gactggggtt gcaccatctt 6360
 gacagacttc aaaaattggc tgacctctaa attgttccc aagctgcccg gcctccctt 6420
 catctcttgt caaaaggggt acaagggtgt gtgggcggc actggcatca tgaccacgcg 6480
 ctgcccttgc ggcgccaaca tctctggcaa tgtccgctg ggetctatga ggatcacagg 6540
 gcctaaaacc tgcatgaaca cctggcaggg gacctttcct atcaattgct acacggaggg 6600
 ccagtgcgcg ccgaaacccc ccacgaacta caagaccgc atctggaggg tggcgccctc 6660
 ggagtacgcg gaggtgacgc agcatgggtc gtactctat gtaacaggac tgaccactga 6720
 caatctgaaa attccttgc aactacctc tccagagttt ttctcctggg tggacggtgt 6780
 gcagatccat aggtttgcac ccacacaaa gccgttttc cgggatgagg tctcgttctg 6840
 cgttgggctt aattcctatg ctgtcgggtc ccagcttccc tgtgaacctg agcccgacgc 6900
 agacgtattg aggtccatgc taacagatcc gcccacatc acggcggaga ctgcggcgcg 6960
 gcgcttggca cggggatcac ctccatctga ggcgagctcc tcagtgagec agctatcagc 7020
 accgtcgtg cgggccacct gcaccacca cagcaacacc tatgacgtgg acatggtcga 7080
 tgccaacctg ctcatggagg gcggtgtggt tcagacagag cctgagtcca ggtgcccgt 7140

10

20

30

40

tctggacttt ctcgagccaa tggccgagga agagagcgac cttagaccct caataccate 7200
 ggagtgcattg ctccccagga gcgggtttcc acgggcctta cgggcttggg cacggcctga 7260
 ctacaacccg ccgctcgtgg aatcgtggag gaggccagat taccaaccgc ccaccgttgc 7320
 tggttgtgct cteccccccc ccaagaaggc cccgacgcct cccccaagga gacgcgggac 7380
 agtgggtctg agcgagagca ccatacaga agccctccag caactggcca tcaagacctt 7440
 tggccagccc ccctcgagcg gtgatgcagg ctctccacg ggggcgggcg ccgccgaatc 7500
 cggcggctcg acgtccctg gtgagccggc cccctcagag acaggttcg cctcctctat 7560
 gccccccctc gaggggggag ctggagatcc ggacctggag tctgacagg tagagcttca 7620
 acctcccccc cagggggggg gggtagctcc cggttcgggc tcggggtctt ggtctacttg 7680
 ctccgaggag gacgatacca ccgtgtgctg ctccatgtca tactcttgga ccggggtctt 7740
 aataactccc ttagccccg aagaggaaaa gttgccaatc aacctttga gtaactcgct 7800
 gttgcgatac cataacaagg tgtactgtac aacatcaaag agcgctcac agagggctaa 7860
 aaaggtaact ttgacagga cgcaagtgtc cgacgcccac tatgactcag tcttaaagga 7920
 catcaagcta gcggttcca aggtcagcgc aaggctctc accttgagg aggcgtgcca 7980
 gttgactcca cccattctg caagatccaa gtatggattc ggggccaagg aggtccgcag 8040
 cttgtccggg agggccgtta accacatcaa gtccgtgtgg aaggacctcc tggaagacce 8100
 acaaacacca attcccacaa ccatcatggc caaaaatgag gtgttctgcg tggacccgc 8160
 caaggggggt aagaaaccag ctgcctcat cgtttacct gacctggcg tccgggtctg 8220
 cgagaaaatg gccctctatg acattacaca aaagcttct caggcggtta tgggagcttc 8280
 ctatggcttc cagtactccc ctgcccacg ggtggagtat ctcttgaaag catgggcgga 8340
 aaagaaggac cccatgggtt ttctgtatga taccgatgc ttgactcaa ccgtcactga 8400
 gagagacatc aggaccgagg agtccatata ccaggcctgc tccctgcccg aggaggcccg 8460
 cactgccata cactcgtga ctgagagact ttacgttaga gggcccatgt tcaacagcaa 8520

10

20

30

40

ggggtcaaacc tgcggttaca gacgttgccg cgccagcggg gtgctaacca ctagcatggg 8580
 taacaccatc acatgctatg tgaaagccct agcggcctgc aaggtgcgg ggatagtgtc 8640
 gcccaaatg ctggtatgcg gcgatgacct agtagtcac tcagaaagcc aggggactga 8700
 ggaggacgag cggaacctga gagccttcac ggaggccatg accaggtact ctgccccctc 8760
 tggatgaccc ccagaccgg aatatgacct ggagctaata acatcctgtt cctcaaatgt 8820
 gtctgtggcg ttgggcccgc ggggcccgcg cagatactac ctgaccagag acccaaccac 8880
 tccactcgcc egggtgcct gggaaacagt tagacactcc cctatcaatt catggctggg 8940
 aaacatcatc cagtatgctc caaccatag gggtgcctg gtctaatga cacacttctt 9000
 ctccattctc atggtccaag acacctgga ccagaacctc aactttgaga tgtatggatc 9060
 agtatactcc gtgaatcctt tggaccttc agccataatt gagaggttac acgggcttga 9120
 cgctttttct atgcacacat actctcacca cgaactgacg cgggtggctt cagccctcag 9180
 aaaacttggg gcgccacccc tcagggtgtg gaagagtcgg gctcgcgag tcagggcgtc 9240
 cctcatctcc cgtggaggga aagcggccgt ttgcggcga tatctcttca attgggcgg 9300
 gaagaccaag ctcaaaactc ctccattgcc ggaggcgcgc ctactggact tatccagttg 9360
 gttcacgctc ggcgcggcg ggggcgacat tttcacagc gtgtcgcgcg cccgaccccg 9420
 ctcatctac ttcggcctac tctactttt cgtaggggta ggcctcttc tactccccgc 9480
 tcggtagagc ggcacacact aggtacactc catagctaac tgttcccttt tttttttt 9540
 ttttttttt ttttttttt ttttttttc ttttttttt ttttccctct ttcttccctt 9600
 ctcatcttat tctactttct ttcttgggtg ctccatctta gccctagtca cggctagctg 9660
 tgaaaggctc gtgagccgca tgactgcaga gagtgcgta actggctctct ctgcagatca 9720
 tgt 9723

10

20

30

40

<210> 43
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (JFH1-A)

<400> 43

tgtaaaacga cggccagt

18

10

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (JFH1-B)

<400> 44

ggttttaggat tcgtgctcat ggtgcacggt ctacgagacc

40

20

<210> 45

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer (TH-C)

30

<400> 45

ggtctcgtag accgtgcacc atgagcacga atcctaaacc

40

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer (TH-D)

<400> 46

agatagcaca accaccacag gagcttggeg aggaatgcct

40

<210> 47

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (JFH1-E)

<400> 47
 aggcattcct cgccaagctc ctgtggtggt tgtgctatct 40 10

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer (JFH1-F) 20

<400> 48
 cagctaccga ggggttaagc 20

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220> 30
 <223> Epitopetag peptide (1XFLAG+Linker)

<400> 49
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 50
 <211> 25
 <212> PRT 40
 <213> Artificial

<220>
 <223> Epitopetag peptide (3XFLAG+Linker)

<400> 50
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15

Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly
 20 25

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Epitopetag peptide (1XFLAG)

<400> 51
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 52
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Epitopetag peptide (3XFLAG)

<400> 52
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 1 5 10 15

30

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 20

<210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Linker

<400> 53
 Gly Gly Gly

1

<210> 54
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Linker

<400> 54
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

10

【図 1】

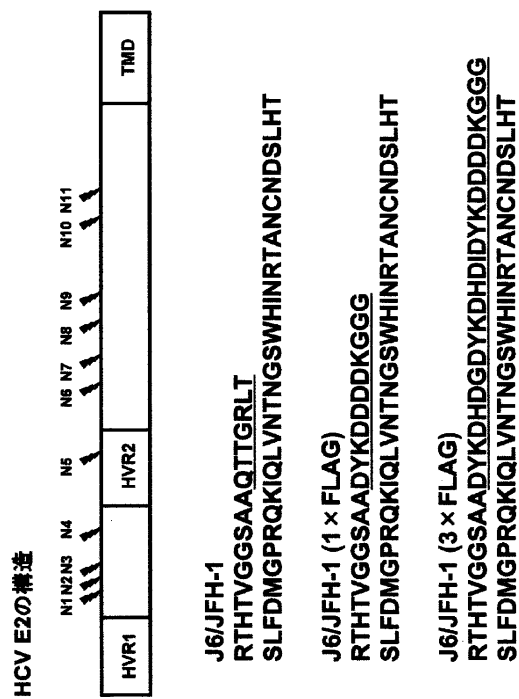


図 1

【図 2 A】

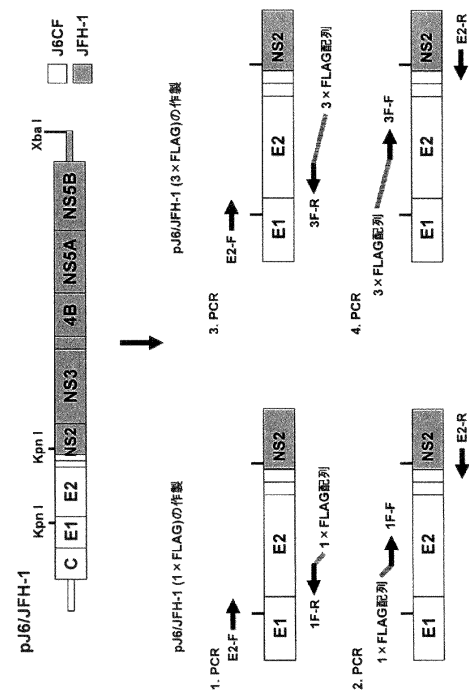
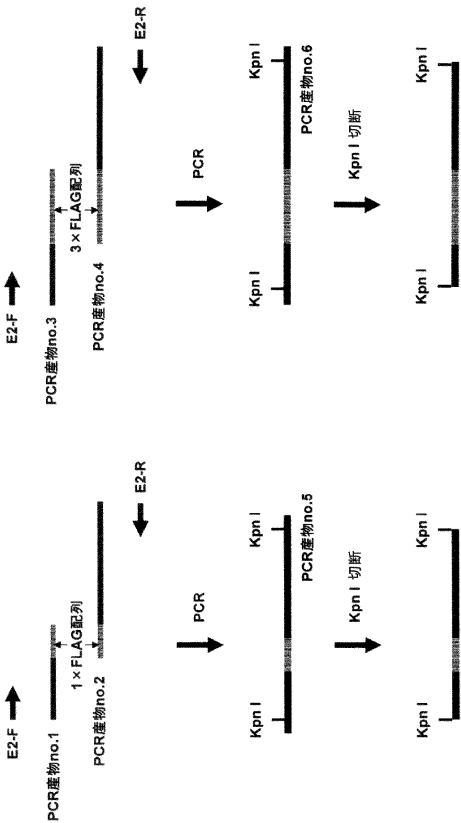


図 2 A

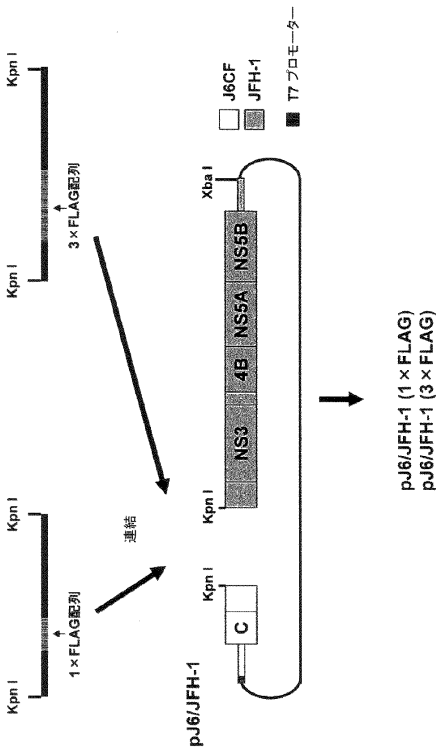
【図 2 B】

図 2 B



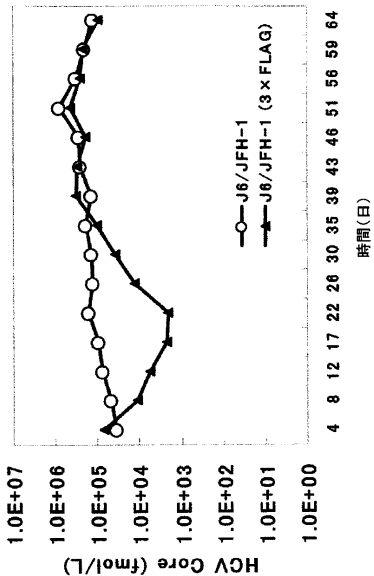
【図 2 C】

図 2 C



【図 3】

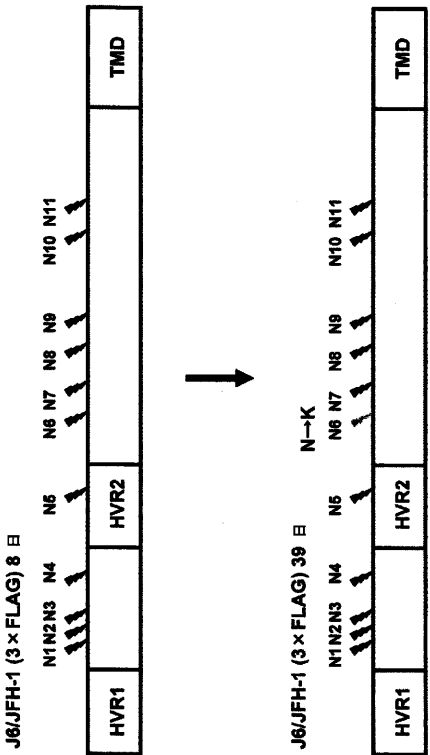
図 3



(HCV Core ELISA)

【図 6】

図 6



【図 9】

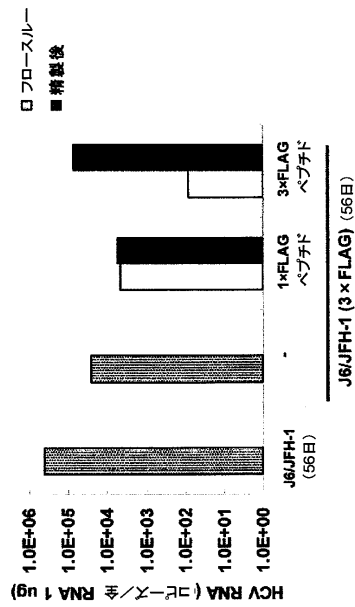


図 9

【図 10 B】

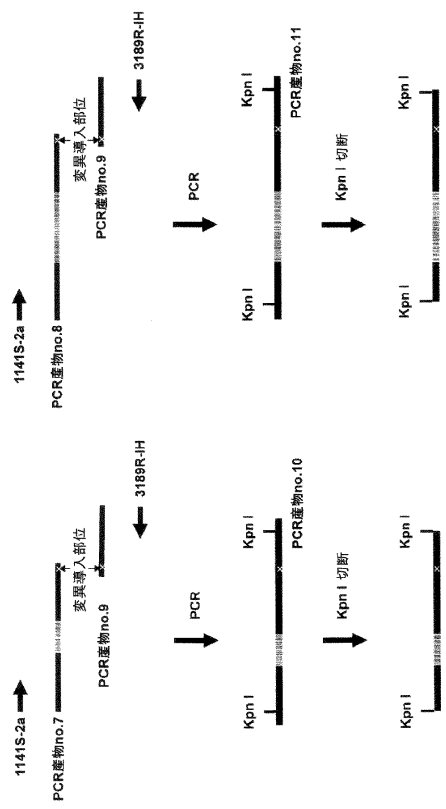


図 10 B

【図 10 A】

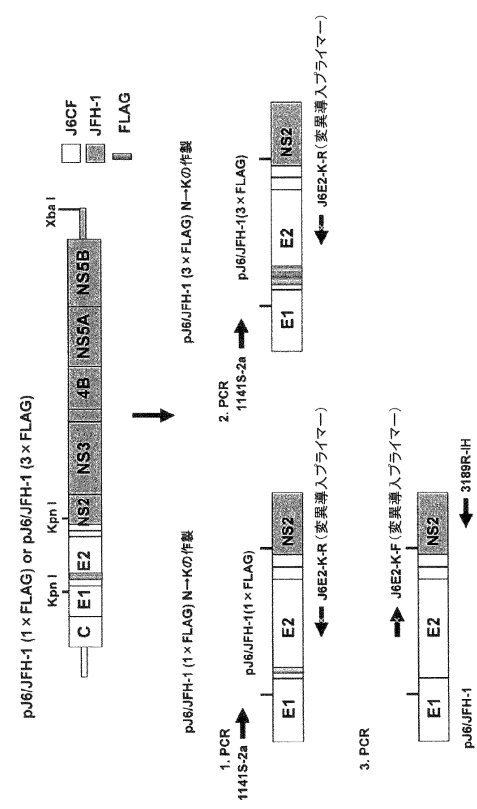


図 10 A

【図 10 C】

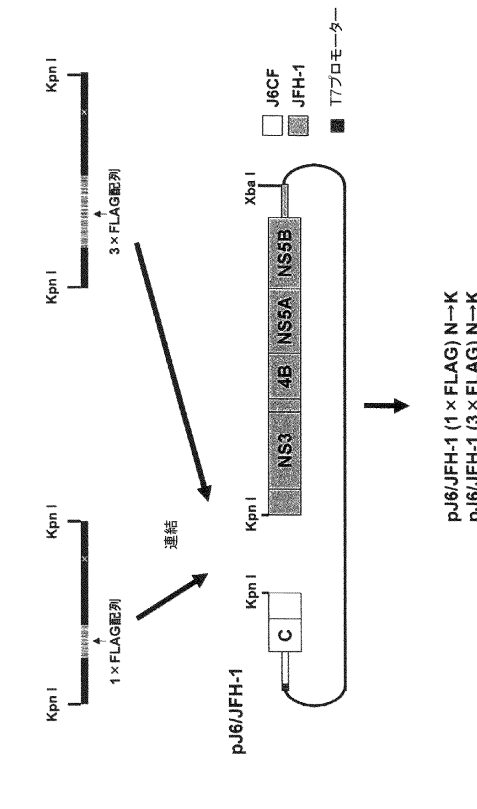
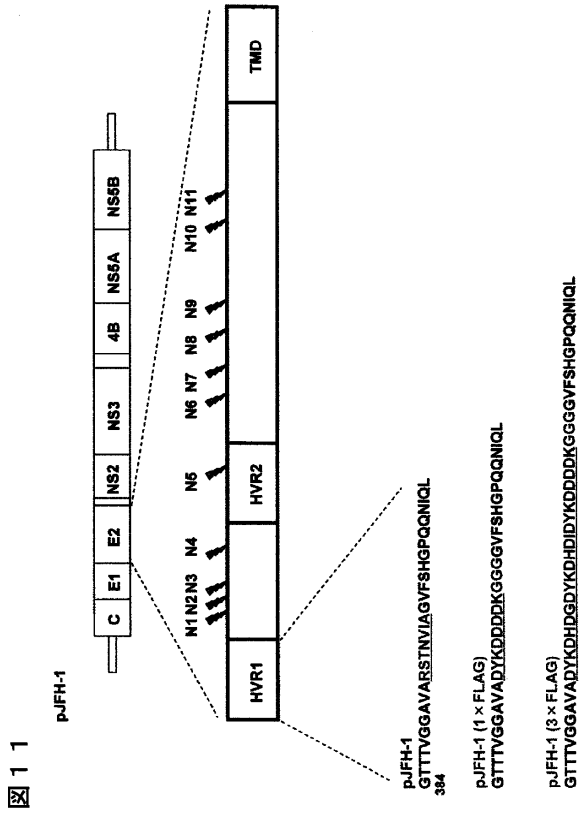


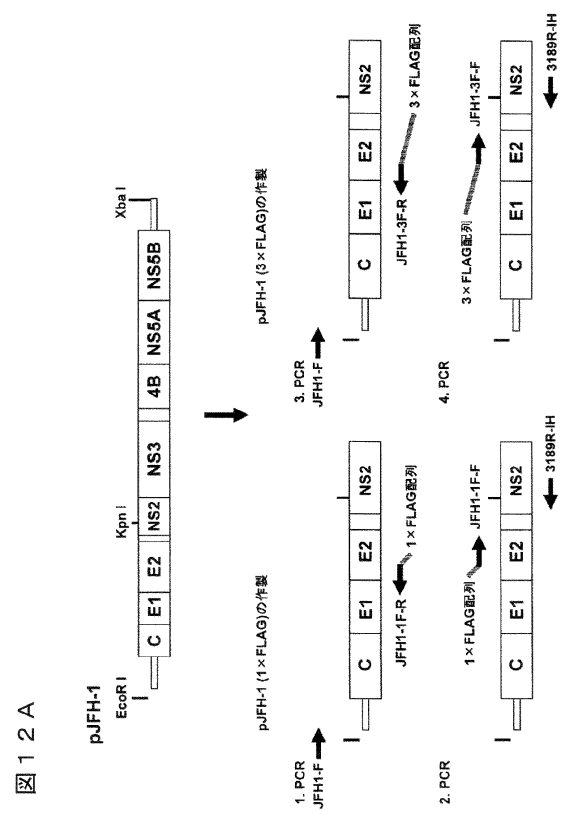
図 10 C

(リアルタイム RT-PCR)

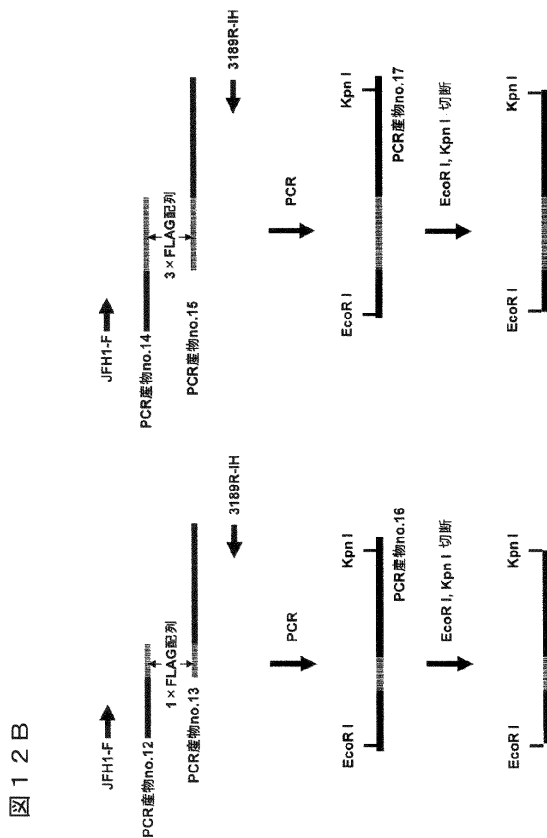
【図 1 1】



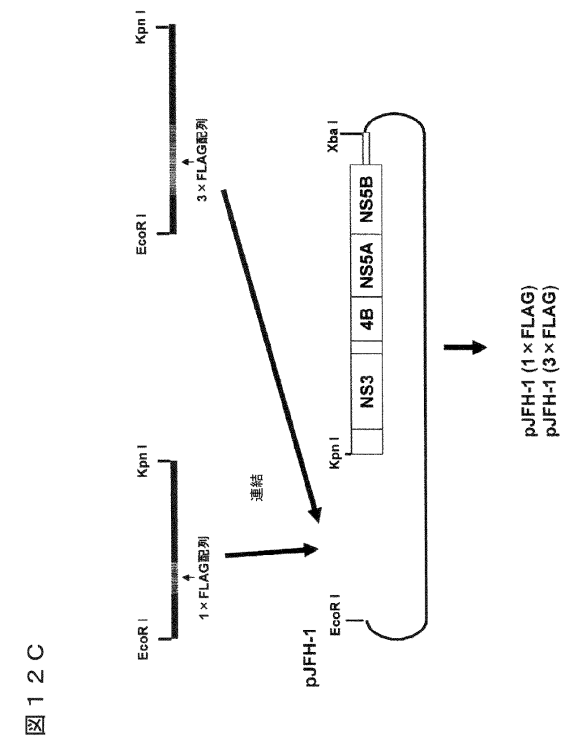
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 13】

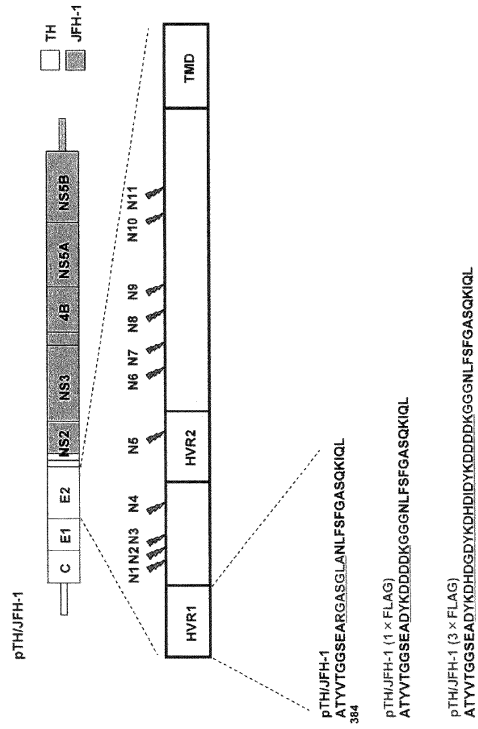


図 13

【図 14 A】

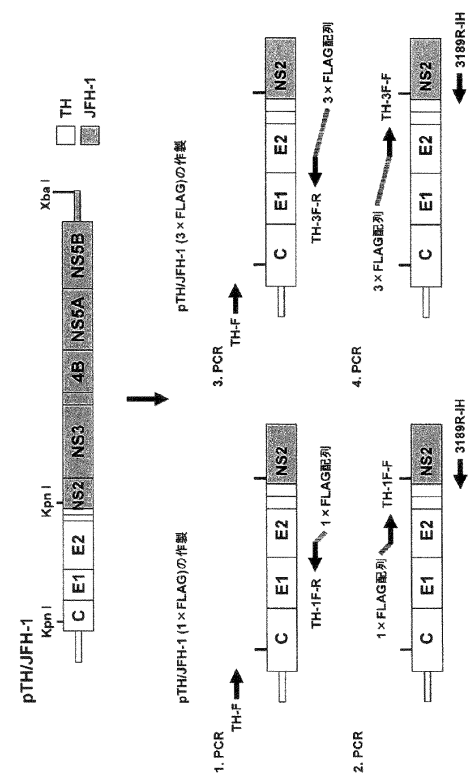


図 14 A

【図 14 B】

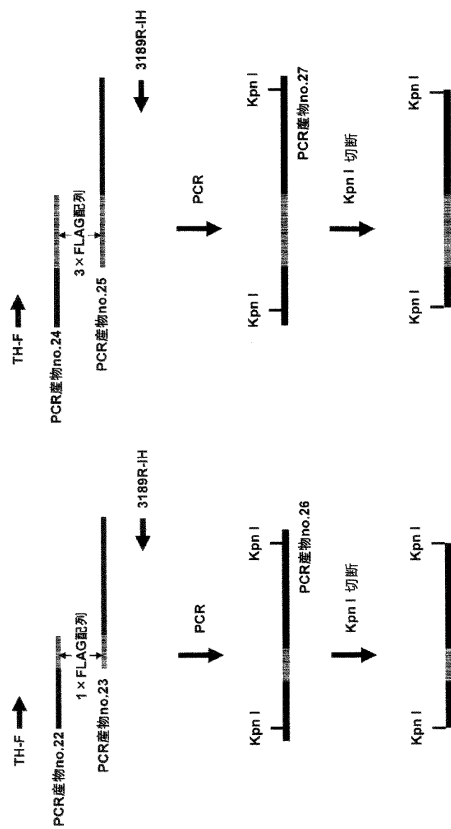


図 14 B

【図 14 C】

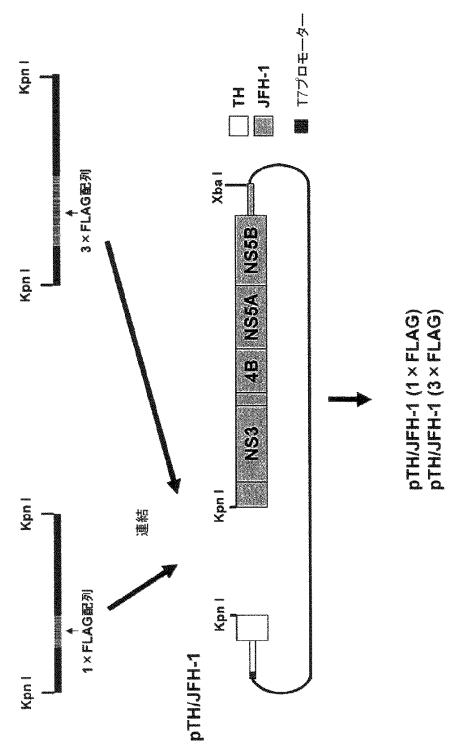


図 14 C

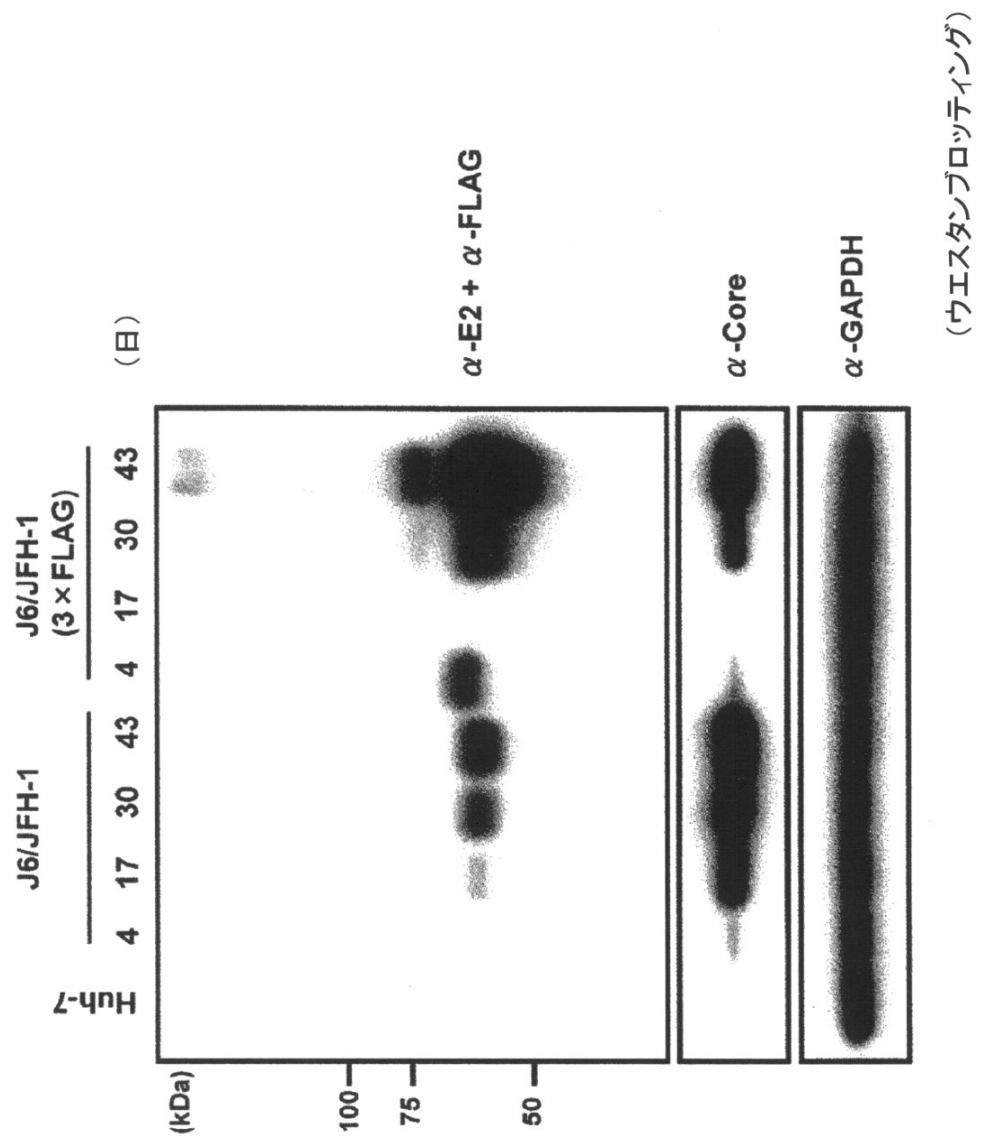


図 5

【図 5】

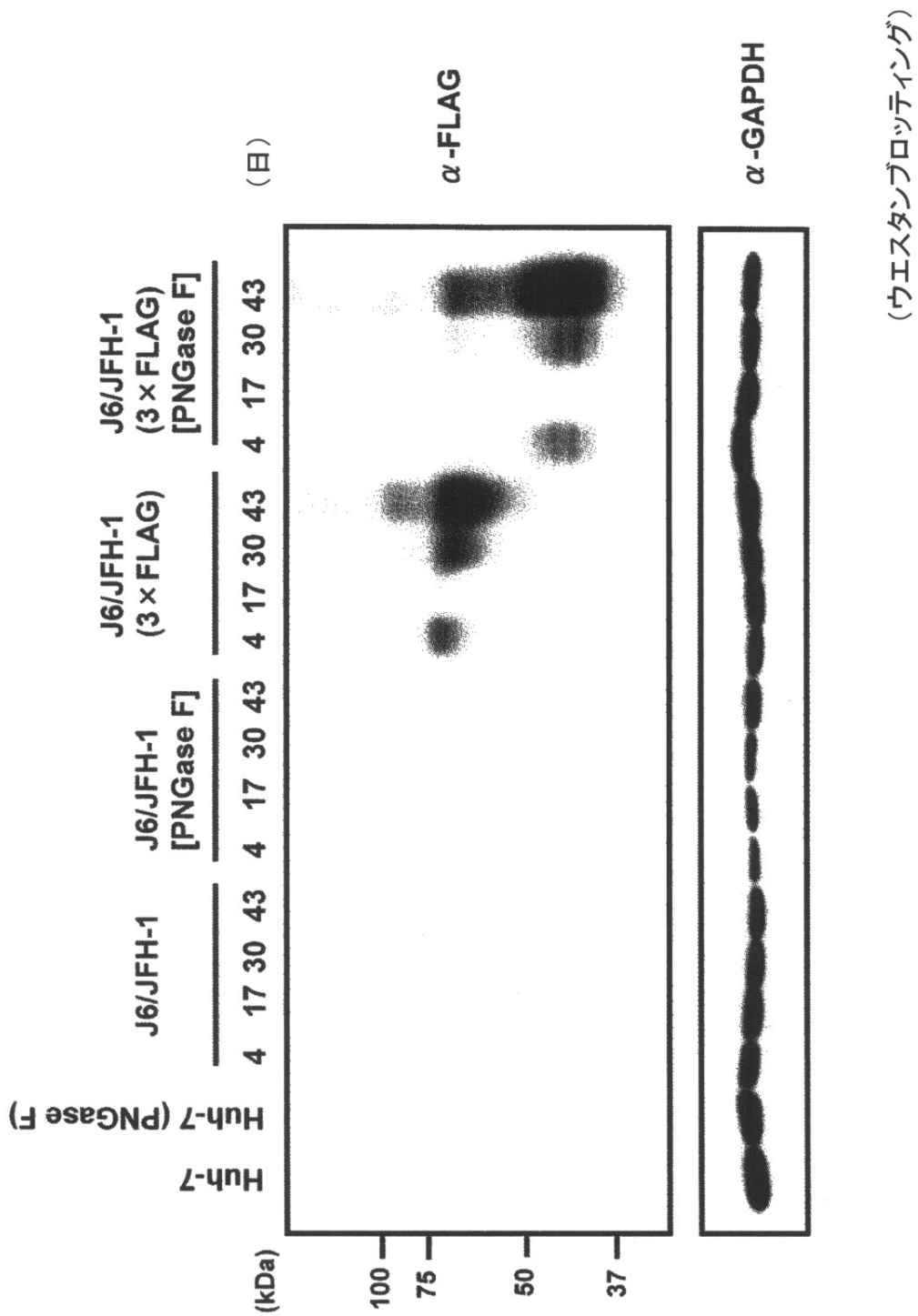
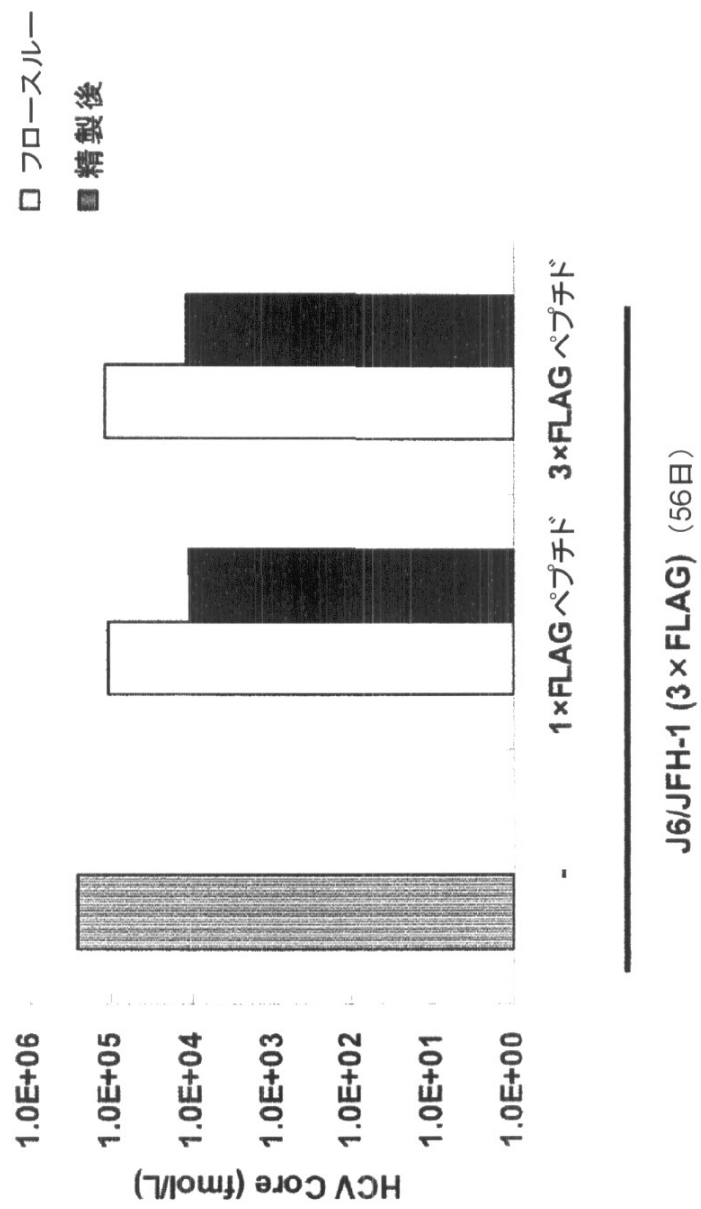
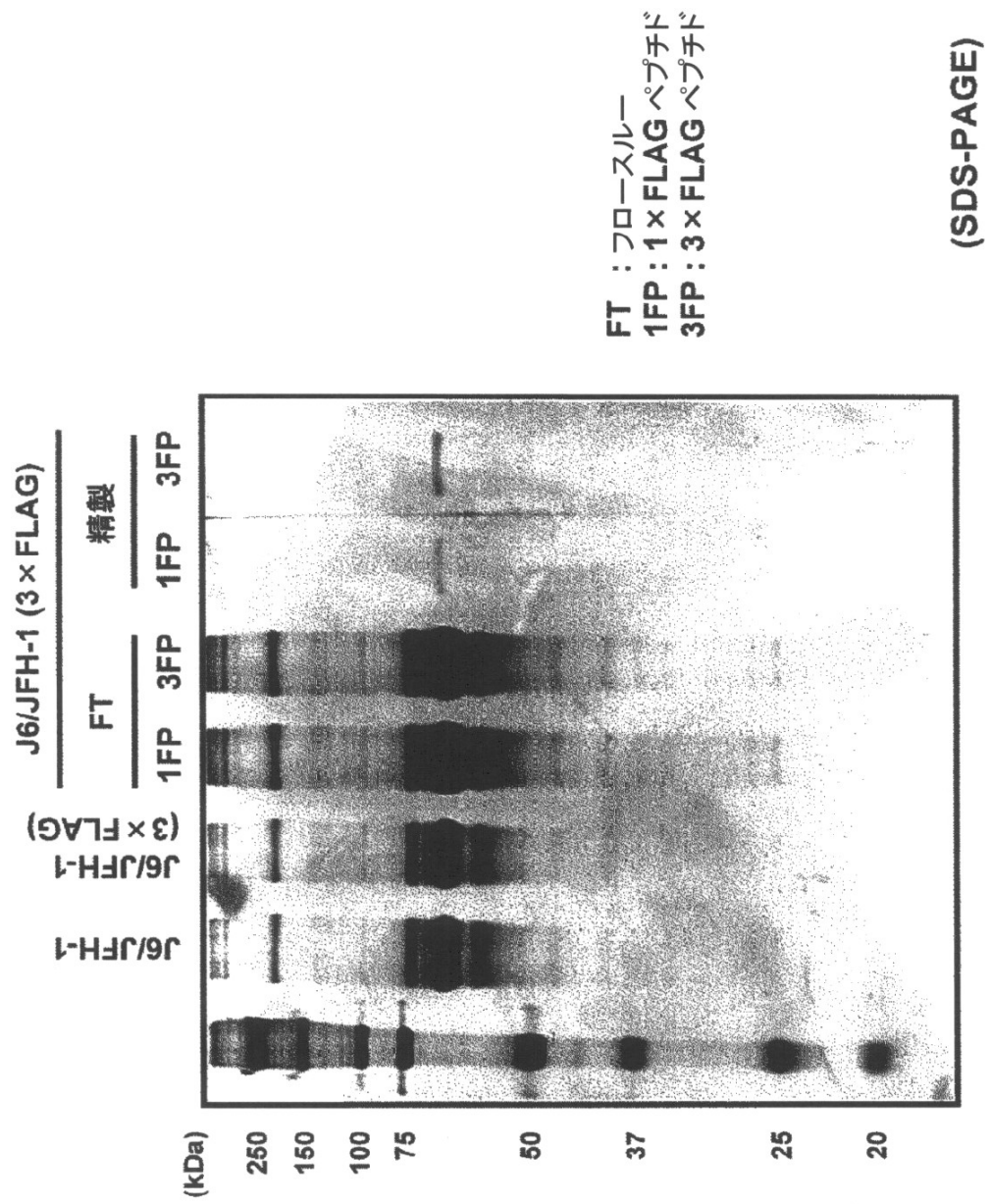


図 7



(HCV Core ELISA)



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 2

(72)発明者 脇田 隆字
東京都港区南青山5-4-10 B303
(72)発明者 鈴木 哲朗
東京都西東京市柳沢2丁目14番15号516号室
(72)発明者 高橋 仁
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究所内

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第2006/022422 (WO, A1)
特開2004-000179 (JP, A)
国際公開第2004/000220 (WO, A1)
Wakita T. et al, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a c
loned viral genome, Nat. Med., 2005年, vol.11, p.791-796
Virology, 1999年, vol.262, pp.250-263
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010年, vol.395, pp.565-571

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed
Cinii