

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4653751号
(P4653751)

(45) 発行日 平成23年3月16日(2011.3.16)

(24) 登録日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 Q 1/02	(2006.01)	C 12 Q 1/02	
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	Z
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2006-533239 (P2006-533239)
(86) (22) 出願日	平成16年5月18日 (2004.5.18)
(65) 公表番号	特表2007-515941 (P2007-515941A)
(43) 公表日	平成19年6月21日 (2007.6.21)
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/015810
(87) 國際公開番号	W02005/049789
(87) 國際公開日	平成17年6月2日 (2005.6.2)
審査請求日	平成19年5月17日 (2007.5.17)
(31) 優先権主張番号	60/473,658
(32) 優先日	平成15年5月28日 (2003.5.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	505045908 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 メリーランド州 21218 バルティモア ノース・チャールズ・ストリート 3400	
(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 肇生
(72) 発明者	ジェフ ディー ポーク アメリカ合衆国 メリーランド州 21210 バルティモア ウエスト・ユニバーシティ・パークウェイ 835

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】合成された哺乳動物のレトロトランスポゾン遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然の L 1 レトロトランスポゾン ORF 1 遺伝子又は ORF 2 遺伝子の DNA 配列において、当該 DNA 配列中の複数のコドンを、コードするアミノ酸を変えることなく、「ヒトに関連したコドン」から選択されるコドンのいずれかに置換することを特徴とする、L 1 レトロトランスポゾンの RNA 発現を増加させる方法；

ここで、「ヒトに関連したコドン」とは、アラニン G C C、アルギニン C G C 又は C G G、アスパラギン A A G、アスパラギン酸 G A C、システイン T G C、グルタミン C A G、グルタミン酸 G A G、グリシン G G C 又は G G G、ヒスチジン C A C、イソロイシン A T C、ロイシン C T G 又は C T C、リジン A A G、メチオニン A T G、プロリン C C C、フェニルアラニン T T C、セリン A G C 又は T C C、トレオニン A C C、トリプトファン T G G、チロシン T A C、及び、バリン G T G 又は G T C である。

【請求項 2】

置換後の DNA 配列がヘアピン構造を有する場合に、コドンの少なくとも 1 つを他の「保存的なアミノ酸」をコードする「ヒトに関連したコドン」のいずれかに置換することでヘアピン構造を崩壊させることを特徴とする請求項 1 に記載の方法；

ここで「保存的なアミノ酸」の置換とは、以下のグループ間：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン；での置換である。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の方法により合成された L 1 レトロトランスポゾン ORF 1 遺伝子又は ORF 2 遺伝子であって、天然の L 1 レトロトランスポゾン ORF 2 遺伝子と比較して RNA 発現が増加した合成された ORF 2 遺伝子。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の方法により合成された L 1 レトロトランスポゾン ORF 1 遺伝子又は ORF 2 遺伝子であって、天然の L 1 レトロトランスポゾン ORF 1 遺伝子と比較して RNA 発現が増加した合成された ORF 1 遺伝子。

【請求項 5】

L 1 レトロトランスポゾンの転位効率を増大させる方法であって、L 1 レトロトランスポゾンをコードする DNA 配列において、その ORF 2 をコードする DNA 配列を、請求項 3 に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン ORF 2 遺伝子の DNA 配列とすることを特徴とする、方法。 10

【請求項 6】

さらに、その ORF 1 をコードする DNA 配列を、請求項 4 に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン ORF 1 遺伝子の DNA 配列とすることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

天然の L 1 レトロトランスポゾンと比較して効率よくレトロトランスポーズする合成 L 1 レトロトランスポゾンであって、L 1 レトロトランスポゾンをコードする DNA 配列において、その ORF 2 をコードする DNA 配列中の複数のコドンが、コードするアミノ酸を変えることなく、「ヒトに関連したコドン」から選択されるコドンのいずれかに置換されていることを特徴とする、合成 L 1 レトロトランスポゾン； 20

ここで、「ヒトに関連したコドン」とは、アラニン G C C、アルギニン C G C 又は C G G、アスパラギン A A G、アスパラギン酸 G A C、システイン T G C、グルタミン C A G、グルタミン酸 G A G、グリシン G G C 又は G G G、ヒスチジン C A C、イソロイシン A T C、ロイシン C T G 又は C T C、リジン A A G、メチオニン A T G、プロリン C C C、フェニルアラニン T T C、セリン A G C 又は T C C、トレオニン A C C、トリプトファン T G G、チロシン T A C、及び、バリン G T G 又は G T C である。

【請求項 8】

ORF 2 をコードする DNA 配列中の複数のコドンが、コードするアミノ酸を変えることなく「ヒトに関連したコドン」から選択されるコドンのいずれかに置換される際に、置換後の DNA 配列がヘアピン構造を有する場合、コドンの少なくとも 1 つが他の「保存的なアミノ酸」をコードする「ヒトに関連したコドン」から選択されて置換されることでヘアピン構造が崩壊していることを特徴とする、請求項 7 に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン； 30

ここで「保存的なアミノ酸」の置換とは、以下のグループ間：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン；での置換である。 40

【請求項 9】

さらに、その ORF 1 をコードする DNA 配列中の複数のコドンが、コードするアミノ酸を変えることなく、「ヒトに関連したコドン」から選択されるコドンのいずれかに置換されていることを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン。

【請求項 10】

ORF 1 をコードする DNA 配列中の複数のコドンが、コードするアミノ酸を変えることなく「ヒトに関連したコドン」から選択されるコドンのいずれかに置換される際に、置換後の DNA 配列がヘアピン構造を有する場合、コドンの少なくとも 1 つが他の「保存的なアミノ酸」をコードする「ヒトに関連したコドン」から選択されて置換されることでヘアピン構造が崩壊していることを特徴とする、請求項 9 に記載の合成 L 1 レトロトランス 50

ポゾン；

ここで「保存的なアミノ酸」の置換とは、以下のグループ間：グリシン、アラニン；パリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン；での置換である。

【請求項 1 1】

請求項 7 から 1 0 のいずれかに記載の合成 L 1 レトロトранスポゾンをコードする D N A を包含する、リコンビナントベクター構築物。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載のリコンビナントベクター構築物で、形質導入され、形質転換され又は感染された真核細胞。 10

【請求項 1 3】

請求項 7 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン及び望ましい遺伝子を哺乳動物（ヒトを除く）に投与することを包含する、望ましい遺伝子又はその生物学的に活性なフラグメントを哺乳動物の細胞へ送達する方法。

【請求項 1 4】

請求項 7 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の合成 L 1 レトロトランスポゾン及び検出可能なタグを投与すること、タグ配列を発現する細胞を同定すること及びタグ配列に隣接する D N A を特徴付けることからなる、細胞中で未だに特徴付けられていない遺伝子又はその生物学的に活性なフラグメントを同定する方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2003年5月28日に出願された米国仮出願第 6 0 / 4 7 3 , 6 5 8 号の利益を主張するもので、その全ては参照により本明細書に取り込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

トランスポゾンは、プラスミド、ウイルス及び細菌の染色体に共通する構成因子である、個別の可動遺伝因子（D N A）である。これらの因子は、自身をコードする表現型特性を、レプリコンからレプリコンへと転位させる能力、又は、公知の遺伝子へと転位しそれを不活性化する能力によって検出される。トランスポゾンには 2 つのタイプがあり、大きさは約 7 5 0 から 5 0 , 0 0 0 ヌクレオチド塩基対以上にも及ぶ。小さな挿入配列又は I S 因子として知られる一つのタイプでは、如何なる公知の表現型特性もコードしてはいない。もう一方のタイプでは抗菌耐性等の表現型特性をコードする比較的大きなユニットを含んでいる（Plasmids and Transposons Environmental Effects and Maintenance Mechanisms；Edited by C. Stuttard and K. Rozee；Academic Press, New York；Pages 165 - 205）。トランスポゾン又は転位因子は、反復配列が結合した核酸の一部分を含むものである。活性なトランスポゾンは、D N A 配列に核酸を組込むのを助ける酵素をコードする。 30

【0 0 0 3】

脊椎動物において、D N A トランスポゾン、すなわちD N A の媒介によって移動する可動性因子の発見は、比較的最近のことである（Radice, A. D.ら, 1994. Mol. Gen. Genet. 244 606 - 612）。それ以来、真核生物トランスポゾンの h A T (h o b o / A c / T a m) スーパーファミリーと同様、不活性で、高度に変異した T c l / m a r i n e r のメンバーが、魚類の異なる種、アフリカツメガエル、ヒトのゲノムから単離された（Oosumiら, 1995. Nature 378, 873；Ivicsら, 1995. Mol. Gen. Genet. 247 312 - 322；Kogaら, 1996. Nature 383, 30；Lamら, 1996. J. Mol. Biol. 257, 359 - 366 及び Lam, W. L. ら, Proc. Natl. Ac 40

ad Sci. USA 93, 10870 - 10875)。

【0004】

レトロトランスポゾンは、現在までに試験されたほとんど全ての動物、植物、細菌種の細胞で見出される、天然のDNA因子である。それらは、細胞内で発現し、染色体外因子に逆転写され、同じゲノム内の他の部位に再度組込まれる。

【0005】

レトロトランスポゾンは、レトロウイルス様のLTRレトロトランスポゾンと、ヒトL1因子、アカバンカビTAD因子(Kinsey, 1990, Genetics 126: 317 - 326)、ショウジョウバエのI因子(Buchetonら, 1984, Cell 38: 153 - 163)、及びカイコのR2Bm(Luanら, 1993, Cell 72: 595 - 605)等の非LTR因子の2つのクラスに分けることができる。レトロトランスポゾンのこれら2つのタイプは、構造的に異なり、また根本的に異なるメカニズムでレトロトランスポーズする。

【0006】

LTRレトロトランスポゾンとは異なり、非LTR因子(ポリA因子とも呼ばれる)はLTRを欠き、代わりに末端はポリA又はAに富んだ配列となっている。LTRレトロトランスポゾンの転位メカニズムは比較的よく理解されている。対照的に、非LTRレトロトランスポゾンによる転位メカニズムは解明が始まったところである(Luan and Eickbush, 1995, Mol. Cell. Biol. 15: 3882 - 3891; Luanら, 1993, Cell 72: 595 - 605)。非LTRレトロトランスポゾンはさらに配列特異的な及び非-配列特異的なタイプに分けることができる。L1は、ヒト、マウス及び他の哺乳動物全ての染色体において散在的に組込まれていることが見出された、後者のタイプに属する。

【0007】

L1因子(LINEとしても知られる)はヒトゲノムへの定着に極めて成功している。初期の概算では、L1はヒトゲノム中に100,000コピー存在し、核DNAの5%を構成すると、見られていた(Fanning and Singer, 1987, Biochim Biophys Acta 910: 203 - 121)。しかしながら、最近の研究によれば、850,000もの多くのL1がヒトゲノム中に存在するようである(Smitら, 1996, Current Opinion in Genetics and Development)。これらコピーの大部分は5'末端が切り詰められていて、欠陥があると推定されている。完全な長さの因子と同様に、5'末端が切り詰められているコピーもしばしば短い標的部位との重複(TSDs)によって挟まれている。

【0008】

完全長6.1kbのL1コンセンサス配列は、以下の保全機構(conserved organization)：内部プロモーターを有する5'非翻訳リーダー領域(UTR)、2つの重複していないORF(ORF1及びORF2)、200bpの3'UTR及び3'ポリAテイル、を示している。ORF1は40kdタンパク質をコードし、RNAに対してパッケージング機能を提供しているようである(Martin, 1991, Mol. Cell. Biol. 11: 4804 - 4807; Hohjohら, 1996, EMBO J. 15: 630 - 639)。一方、ORF2は逆転写酵素をコードしている(Mathiasら, 1991, Science 254: 1808 - 1810)。ORF1タンパク質、そしておそらくORF2タンパク質もL1 RNAと結合し、リボ核タンパク質の粒子を形成する。ORF2タンパク質による逆転写が起こり、L1 cDNAが生じ、そして、そのL1 cDNAがゲノムに組込まれる(Martin, 1991, Curr. Opin. Genet. Dev. 1: 505 - 508)。さらに、L1因子は通常、7から20bpのTSDによって挟まれている。完全長のL1及び他の非LTRレトロトランスポゾンは、レトロウイルスインテグラーゼ、プロテアーゼ及びRNアーゼHと認識されるホモログを欠いている。この因子群においては、LTRレトロトランスポゾンとは根本的に異なる転位メカニズムが採用されている。

10

20

30

40

50

【0009】

ヒトL1因子の幾つかは、ヒトゲノムの新たな部位へ、レトロトランスポーズ（発現し、それらの標的部位を切断し、切断された標的部位をプライマーとして用いて自身のRNAを逆転写すること）可能であり、遺伝的な疾患を引き起こす。例えば、生殖細胞系列に於けるVII因子及びジストロフィン遺伝子へのL1挿入は、それぞれ血友病A及び筋ジストロフィーを引き起こす（Kazazianら, 1988, *Nature* 332 : 164 - 166 ; Naritaら, 1993, *J. Clinical Invest.* 91 : 1862 - 1867 ; Holmesら, 1994, *Nature Genetics* 7 : 143 - 148）。一方、体細胞でのc-myc及びAPC腫瘍抑制遺伝子へのL1挿入は、それぞれ乳癌及び結腸癌の珍しい例に関与する（Morseら, *Nature* 333 : 87 - 90 ; Mikiら, 1992, *Cancer Research* 52 : 643 - 645）。L1レトロトランスポゾンは、直接又は間接に、質量によって（Landersら, 2001, *Nature* 409 : 860 - 921）、Alu因子の自己動員及びトランス動員によって（Dewannieuxら, 2003, *Nature Genetics* 35 : 41 - 48）、哺乳動物のゲノムの30%以上を占めている。完全な長さ（約6kb）のL1は、レトロトランスポーズするためのタンパク質をコードする2つのオープンリーデングフレーム、ORF1及びORF2から成る（Fengら, 1996, *Cell* 87 : 917 - 927）。

【0010】

20

このように、高度に活性なL1因子は、哺乳動物の遺伝学に於ける手段（tool）として有望な有用性がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

(発明の要約)

一態様に於いては、本発明は、合成されたトランスポゾン遺伝子に関する。別の態様に於いては、本発明は、合成された哺乳動物のトランスポゾン遺伝子に関する。

【0012】

30

本発明者らは、合成されたトランスポゾン及びレトロトランスポゾン遺伝子が遺伝子治療への応用及び本明細書に記載の他の遺伝学的な応用に有用であることを見出した。

【0013】

更なる態様では、本発明は、合成されたレトロトランspoゾン遺伝子に関するものである。本発明の更なる態様は、哺乳動物の合成されたレトロトランspoゾン遺伝子を提供することである。

【0014】

一態様では、本発明は、合成されたORF2遺伝子に関する。別の態様では、本発明は、合成された哺乳動物のORF2遺伝子に関する。合成遺伝子は、天然のL1レトロトランspoゾンORF2遺伝子に比較してより高レベルな発現を示す。

【0015】

40

一態様では、本発明は、合成されたORF1遺伝子に関する。別の態様では、本発明は、合成された哺乳動物のORF1遺伝子に関する。合成遺伝子は、天然のL1レトロトランspoゾンORF1遺伝子に比較してより高レベルな発現を示す。

【0016】

更なる態様では、本発明は、ヒトと関連のあるコドンを含む合成されたORF2又はORF1遺伝子に関する。本発明の更なる態様は、合成されたORF2又はORF1遺伝子は、ヒトと関連のあるコドンのみを含む。これらの態様では、ヒトと関連のあるコドンとは、高度に発現される哺乳動物の遺伝子で最も頻繁に使用されるコドンを指す。注目すべきは、それぞれのアミノ酸をコードする2又はそれ以上のこのようなコドンがしばしば存在し、それゆえ多くの可能な合成因子が存在しうるのである。

50

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、配列番号1を含む合成された哺乳動物のORF2遺伝子を提供する。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、本発明は、配列番号2を含む合成された哺乳動物のORF1遺伝子を提供する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、配列番号3を含む合成された哺乳動物のORF2遺伝子を提供する。

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、配列番号4を含む合成された哺乳動物のORF1遺伝子を提供する。

10

【 0 0 2 1 】

一態様では、本発明は、合成されたトランスポゾン遺伝子を含むトランスポゾンに関する。別の態様では、本発明は、合成されたレトロトランスポゾン遺伝子を含むレトロトランスポゾンに関する。更なる態様では、本発明は、合成されたORF2又はORF1遺伝子を含むL1レトロトランスポゾンに関する。別の態様では、本発明は、合成されたORF2及び合成されたORF1遺伝子を含むL1レトロトランスポゾンに関する。本発明の更なる態様は、合成された哺乳動物のORF2遺伝子、合成された哺乳動物のORF1遺伝子、又は合成された哺乳動物のORF2遺伝子及び合成された哺乳動物のORF1遺伝子の両者を含む哺乳動物のL1レトロトランスポゾンを提供する。レトロトランスポゾンは、天然のL1レトロトランスポゾンと少なくとも同程度の効率でレトロトランスポーズする。本発明の更なる態様では、レトロトランスポゾンは、天然のL1レトロトランスポゾンより効率よくレトロトランスポーズする。

20

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は合成されたORF2遺伝子を含むリコンビナントベクター構築物を提供する。別の実施例では、本発明は合成されたORF1遺伝子を含むリコンビナントベクター構築物を提供する。別の態様では、本発明は合成されたORF2遺伝子及び合成されたORF1遺伝子を含むリコンビナントベクター構築物を提供する。これらの構築物で形質導入され、形質転換され又は感染された真核細胞が同様に提供される。

30

【 0 0 2 3 】

更なる態様では、本発明は、合成のORF2又はORF1遺伝子を調製するための方法を提供する。

【 0 0 2 4 】

別の態様では、本発明は、望ましい遺伝子又はその生物学的に活性な断片を哺乳動物の細胞へ送達する方法に関する。本発明の方法は、該哺乳動物へ、合成されたORF2若しくはORF1遺伝子、又はそれらの組合せを望ましい遺伝子と共に投与することを包含する。

【 0 0 2 5 】

本発明の更なる態様は、合成されたORF2若しくはORF1遺伝子、又はそれらの組合せ、並びに望ましい遺伝子及び薬学的に許容される担体を含むカセットを更に含んで成る組成物を提供する。別の態様では、本発明は、哺乳動物の遺伝的な疾患を治療する方法に関する。本発明の方法は、問題の遺伝的な疾患を有する哺乳動物へ、合成されたORF2若しくはORF1遺伝子、又はそれらの組合せ、並びに望ましい遺伝子及び薬学的に許容される担体を含む組成物を投与することを包含する。

40

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本発明は、特徴付けされていない遺伝子又はそれらの生物学的に活性な断片を細胞中で同定する方法に関する。本発明の方法は、合成されたORF2若しくはORF1遺伝子又はそれらの組合せ及び検出可能なタグ配列を投与すること、並びにタグ配列を発現する細胞を同定すること及びタグ配列に隣接するDNAを特徴付けることを包含

50

する。

本発明の他の態様は、以下に開示される。

【課題を解決するための手段】

【0027】

(発明の詳細な説明)

本明細書は、合成されたトランスポゾン遺伝子を開示する。さらに、本明細書は、合成された哺乳動物のトランスポゾン遺伝子を開示する。加えて、本明細書は、合成されたレトロトランスポゾン遺伝子を開示する。さらに、本明細書は、合成された哺乳動物のレトロトランスポゾン遺伝子を開示する。

【0028】

合成されたレトロトランスポゾンは、一態様では、天然のレトロトランスポゾンと少なくとも同様の効率でレトロトランスポーズする。別の態様では、合成されたレトロトランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明の合成レトロトランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより約2倍以上効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明の合成レトロトランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより約25倍以上効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明の合成レトロトランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより約100から200倍以上効率よくレトロトランスポーズする。

10

【0029】

合成トランスポゾンは、一態様で、天然のトランスポゾンと少なくとも同様の効率で転位する。別の態様では、合成トランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより効率よく転位する。更に別の態様では、本発明の合成トランスポゾンは、天然のトランスポゾンより約2倍以上効率よく転位する。更に別の態様では、本発明の合成トランスポゾンは、天然のトランスポゾンより約25倍以上効率よく転位する。更に別の態様では、本発明の合成レトロトランスポゾンは、天然のレトロトランスポゾンより約100から200倍以上効率よく転位する。

20

【0030】

本明細書は、合成されたORF2遺伝子を開示する。一態様では、本発明の合成されたORF2遺伝子は、魚類、爬虫類、両生類、鳥類、昆虫等の脊椎動物のものである。一態様では、本発明の合成されたORF2遺伝子は、マウス(murine)、ウシ、ウマ等の哺乳動物のものである。合成遺伝子の一態様は、ヒトに対して最適なコドンを使用するのみならず、発現量が低い原因となるおそれがある核酸配列の偏りを無くしている。

30

【0031】

一態様では、合成されたORF2遺伝子は、天然のL1レトロトランスポゾンORF2遺伝子と比較して、より高レベルの発現を示す。

【0032】

本発明の別の態様では、合成されたORF2遺伝子は、天然の遺伝子と同じタンパク質をコードしており、更にヒトに関連したコドンをも含んでいる。

本発明の別の態様では、合成されたORF2遺伝子は、ヒトに関連したコドンのみを含んでいる。「ヒトに関連したコドン」とは、高度に発現される哺乳動物の遺伝子で最も頻繁に使用されるコドンを指す。当業者であれば、どのコドンが特定の遺伝子で最も頻繁に関連付けられているか決定することができる。注目すべきは、それぞれのアミノ酸をコードする2又はそれ以上のこのようなコドンがしばしば存在し、それゆえ多くの可能な合成因子が存在しうることである。例えば、それぞれのアミノ酸に対するヒトに関連したコドンは、以下を含んでいてもよい。アラニンG C C、アルギニンC G C又はC G G、アスパラギンA A C、アスパラギン酸G A C、システインT G C、グルタミンC A G、グルタミン酸G A G、グリシンG G C又はG G G、ヒスチジンC A C、イソロイシンA T C、ロイシンC T G又はC T C、リジンA A G、メチオニンA T G、プロリンC C C、フェニルアラニンT T C、セリンA G C又はT C C、トレオニンA C C、トリプトファンT G G、チロシンT A C、及び、バリンG T G又はG T C。

40

50

【0033】

一態様では、合成されたORF2遺伝子は、天然のL1レトロトранスポゾンORF2遺伝子の配列と100%の相同性を示すDNA配列は有していない。別の態様では、合成されたORF2遺伝子は、天然のL1レトロトранスポゾンORF2遺伝子の配列と約90%未満の相同性を示すDNA配列を有している。別の態様では、合成されたORF2遺伝子は、天然のL1レトロトранspoゾンORF2遺伝子の配列と約80%未満の相同性を示すDNA配列を有している。

【0034】

別の態様では、合成された哺乳動物のORF2遺伝子は、配列番号1と少なくとも約70%の相同性を示すDNA配列を有している。更に別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF2遺伝子は、配列番号1を包含する。10

【0035】

さらに本明細書は、合成されたORF1遺伝子を開示する。本発明の別の態様では、本発明の合成されたORF1遺伝子は、魚類、爬虫類、両生類、鳥類、昆虫等の脊椎動物のものである。本発明の別の態様では、本発明の合成されたORF1遺伝子は、マウス、ウシ、ウマ等の哺乳動物のものである。本発明の更なる態様では、合成されたORF1遺伝子は、天然のL1レトロトранspoゾンORF1遺伝子と比較して、より高レベルの発現を示す。

【0036】

本発明の別の態様では、合成されたORF1遺伝子は、天然の遺伝子と同じタンパク質をコードしているが、ヒトに関連したコドンをも含んでいる。本発明の別の態様では、合成されたORF1遺伝子は、ヒトに関連したコドンのみを含んでいる。20

【0037】

一態様では、本発明の合成されたORF1遺伝子は、天然のL1レトロトランspoゾンORF1遺伝子の配列と100%の相同性を示すDNA配列は有していない。別の態様では、本発明の合成されたORF1遺伝子は、天然のL1レトロトランspoゾンORF1遺伝子の配列と約90%未満の相同性を示すDNA配列を有している。別の態様では、本発明の合成されたORF1遺伝子は、天然のL1レトロトランspoゾンORF1遺伝子の配列と約80%未満の相同性を示すDNA配列を有している。

【0038】

別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF1遺伝子は、配列番号2と少なくとも約70%の相同性を示すDNA配列を有している。更に別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF1遺伝子は、配列番号2を包含する。30

【0039】

別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF2遺伝子は、配列番号3と少なくとも約70%の相同性を示すDNA配列を有している。更に別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF2遺伝子は、配列番号3を包含する。

【0040】

別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF1遺伝子は、配列番号4と少なくとも約70%の相同性を示すDNA配列を有している。更に別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF1遺伝子は、配列番号4を包含する。40

【0041】

一態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF2遺伝子はヒトのものである。本発明の別の態様では、本発明の合成された哺乳動物のORF1遺伝子はヒトのものである。

【0042】

一態様に於いて、本発明の合成トランスポゾン遺伝子を包含するトランスポゾンが提供される。別の態様に於いて、本発明の合成レトロトランスポゾン遺伝子を包含するレトロトランスポゾンが提供される。

【0043】

更なる態様に於いて、本発明の合成されたORF2遺伝子を包含するL1レトロトラン50

スポゾンが提供される。更なる態様に於いては、本発明の合成されたO R F 1遺伝子を包含するL 1レトロトランスポゾンが提供される。更に別の態様は、本発明の合成されたO R F 2遺伝子及び本発明の合成されたO R F 1遺伝子の両者を包含するL 1レトロトランスポゾンを提供する。トランスポゾン又はレトロトランスポゾンは、一態様では、天然のトランスポゾン又はレトロトランスポゾンと少なくとも同様の効率で、それぞれトランスポーズ又はレトロトランスポーズする。別の態様では、トランスポゾン又はレトロトランスポゾンは、天然のトランスポゾン又はレトロトランスポゾンより効率よく、それぞれトランスポーズ又はレトロトランスポーズする。

【0044】

更なる態様に於いて、本発明の合成された哺乳動物のO R F 2遺伝子を包む哺乳動物のL 1レトロトランスポゾンが提供される。更なる態様に於いては、本発明の合成された哺乳動物のO R F 1遺伝子を包む哺乳動物のL 1レトロトランスポゾンが提供される。更に別の態様は、本発明の合成された哺乳動物のO R F 2遺伝子及び本発明の合成された哺乳動物のO R F 1遺伝子の両者を含む哺乳動物のL 1レトロトランスポゾンを提供する。哺乳動物のレトロトランスポゾンは、一態様では、天然のL 1レトロトランスポゾンと少なくとも同様の効率でレトロトランスポーズする。別の態様では、哺乳動物のレトロトランスポゾンは、天然のL 1レトロトランスポゾンより効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明のレトロトランスポゾンは、天然のL 1レトロトランスポゾンより約2倍以上効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明のレトロトランスポゾンは、天然のL 1レトロトランスポゾンより約25倍以上効率よくレトロトランスポーズする。更に別の態様では、本発明のレトロトランスポゾンは、天然のL 1レトロトランスポゾンより約100から200倍以上効率よくレトロトランスポーズする。

10

20

【0045】

更なる態様に於いて、本発明の合成されたO R F 2遺伝子を包むリコンビナントベクター構築物が提供される。本発明の合成されたO R F 1遺伝子を包むリコンビナントベクター構築物が更なる態様で提供される。本発明の合成されたO R F 2遺伝子及び本発明の合成されたO R F 1遺伝子の両者を含むリコンビナントベクター構築物が更なる態様で提供される。リコンビナントベクターは、化学的に結合されたもの；エプスタイン-バーウィルス(E B V)、ポリオーマ性ウイルス、アデノ隨伴ウイルス、レンチウイルス、パルボウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス等の(D N A又はR N A)ウイルスベクター；融合タンパク質；プラスミド；ファージから選択されてもよいがそれらに限定はされない。ベクター配列は自然に生じた真核細胞のウイルス因子に限定される必要はない。哺乳類の人工染色体を含む人工染色体も本発明の範囲のものとする。

30

【0046】

一態様では、目的のプラスミドは、天然のm O R F 2配列を、本発明の合成された哺乳動物のO R F 2又はO R F 1遺伝子のD N A配列で置き換えたp C E P 4である。

【0047】

本発明のリコンビナントベクター構築物は、天然のベクターで観察されのよりも、より頻繁にレトロトランスポーズする。一態様では、本発明の構築物は、天然のベクターで観察されるより約2から約100倍の頻度でレトロトランスポーズする。

40

【0048】

別の態様に於いて、本発明のリコンビナントベクター構築物によって形質導入、形質転換又は感染された真核細胞が提供される。

【0049】

本発明の合成されたO R F 2又はO R F 1遺伝子の調製方法を提供する。一態様では、本発明の方法は、「ヒトに関連したコドン」を含む本発明の合成されたO R F 2又はO R F 1遺伝子の調製を包含する。別の態様では、本発明の方法は、「ヒトに関連したコドン」のみを含む本発明の合成されたO R F 2又はO R F 1遺伝子の調製を包含する。別の態様では、本発明の方法はさらに、約400から約600塩基対の間隔でユニークな制限酵

50

素部位を組み込む工程を包含する。更に別の態様では、本発明の方法はさらに、1つ以上のユニークな制限酵素部位を有する核酸配列からなる3'非翻訳領域を再合成するか、又は細胞の遺伝子の3'UTR(非翻訳領域)を使用する工程を包含する。更に別の態様では、本発明の方法はさらに、前記配列のセンス及び相補鎖の両者について約30塩基対から約90塩基対の長さのオリゴヌクレオチドを設計する工程を包含する。更に別の態様では、本発明の方法はさらに、それぞれの長さが約400から約600塩基対である約6から約12個のDNAフラグメントを合成するためにオリゴヌクレオチドを使用する工程を包含する。更に別の態様では、本発明の方法はさらに、前記フラグメントのそれぞれに対応するセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むほぼ等モル濃度の混合物を使用するPCRを実施する工程を包含する。更に別の態様では、本発明の方法はさらに、完全な遺伝子を作成するために、ユニークな制限酵素部位を使用してPCRにより得られたフラグメントをサブクローニングする工程を包含する。

【0050】

合成されたORF2又はORF1遺伝子は、「ヒトに関連したコドン」を含むように調製されてもよい。結果として得られる核酸配列は、およそ500塩基対間隔でユニークな制限酵素部位が組み込まれるように、さらに改変されていてもよい。さらに、3'非翻訳領域は、サブクローニングを容易にするために、複数のユニークな制限酵素部位で再合成されてもよい。オリゴヌクレオチドは、この新しい配列の両方の鎖を完全にカバーするように設計されてもよく、例えば、約30から約90塩基対のオリゴヌクレオチドが設計されてもよい。約65より高い融解温度を有するこれらのオリゴヌクレオチド内のヘアピン構造(例えば、コンピュータープログラムOligo5.0で予測されるような)は、アミノ酸配列を保存する突然変異で破壊されるであろう。これらの突然変異は、最適なコドンをそれより劣る改変されたコドンへと変更するであろう。

【0051】

結果として得られる最適化されたORF2又はORF1核酸配列は、その後修飾されたポリメラーゼ連鎖反応(Stemmerら, 1995, Gene 164: 49-53)に供されてもよい。例えば、約40塩基対から約80塩基対のセンス鎖全体をカバーするオリゴヌクレオチドが合成されてもよい。相補鎖もまた、センス鎖オリゴヌクレオチドに対して約30塩基対ずらして、約40塩基対から約80塩基対のオリゴヌクレオチドで、合成されてもよい。オリゴヌクレオチドは、相補鎖由来の2つのオリゴヌクレオチドからなる、約20から約50塩基対のハイブリッドであってもよい。これらのオリゴヌクレオチドを使用して、ORF2又はORF1核酸配列は、それぞれの長さが約400から約600塩基対である約6から約12個の間のフラグメントとして合成されてもよい。それぞれのフラグメントに対応するセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ほぼ等モル量で混合されてもよく、PCR反応が実施されてもよい。例えば、25サイクルの会合PCRを行ってもよい。他のPCRサイクルが実施されてもよく、本明細書で開示される利益を享受する当業者であれば、目的に応じて最適なサイクル数を決定することが可能である。この会合反応物は、例えば、增幅プライマーとしてのフラグメントである最も外側のオリゴヌクレオチドを含んでいるPCR反応物中に希釈されてもよい。

【0052】

結果として得られるフラグメントは、例えば、別々にプラスミド中にクローン化され、約20-30クローンはそれぞれ配列決定されてもよい。標準的なサブクローニングの手順に従って、オリゴ合成、会合又はPCRの際に導入された突然変異は取り除かれてもよい。結果として得られるフラグメントは、あらかじめ配列中に設計されているユニークな制限酵素部位を使用してサブクローニングされ、プラスミド中に、最適化された完全なORF2又はORF1核酸配列を作成する。

【0053】

哺乳動物の細胞中に、望ましい遺伝子又はそれらの生物学的に活性なフラグメントを送達する方法は、同様に、本発明の態様中で提供される。本発明の一態様では、望ましい遺伝子は、治療のための遺伝子である。本発明は、本発明の合成されたORF2及び/又は

10

20

30

40

50

O R F 1 遺伝子及び望ましい遺伝子を哺乳動物へ投与することを包含する。遺伝子治療の方法もまた、本発明の態様に従って意図されている。レトロトランスポジションで遺伝子治療を通して送達される遺伝子は、第V I I I 因子、第I X 因子、チロシン水酸化酵素、芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ、アポトーシス性プロテアーゼ活性化因子 - 1 - 優性抑制阻害剤 (A p a f - 1 - D N) 、アルファ - ガラクトシダーゼA (A G A) を含むがそれらに限定されるものではない。レトロトランスポジションを用いる遺伝子治療に於いて標的とする障害及び / 又は疾患は、血友病、パーキンソン病、ファブリー病、家族性高コレステロール血症、ゴーシエ病、囊胞性纖維症及び副腎白質ジストロフィー、アデノシンデアミナーゼ欠損症 (S C I D) 、アルファ - 抗トリプシン欠損症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フェニルケトン尿症、鎌状赤血球貧血、ティ - サックス病及びサラセミア、を含むがそれらに限定されない。

【 0 0 5 4 】

別の態様は、本発明の合成されたO R F 2 及び / 又はO R F 1 遺伝子及び望ましい遺伝子及び薬学的に許容される担体からなるカセットを含む組成物を提供する。一態様では、カセットは細胞のゲノムに挿入されてもよい異種又は同種のD N A (L 1 D N A ではない)を包含していてもよい。このD N A は、3' U T R 配列内、又は3' U T R とポリAシグナルの間に、D N A の発現がプロモーターに制御されるよう部位に配置されてもよい。挿入されるD N A の種類は、挿入部位を同定するためのマーカーとして機能するD N A 、例えば、ネオマイシン (n e o) 耐性遺伝子又は他の薬剤耐性遺伝子 (例えば、z e o 、h y g r o 、g p t) 、緑色蛍光タンパク質 (G F P) 遺伝子、I a c Z 、単純ヘルペスウイルス (H S V) チミジンキナーゼ遺伝子、及び、限定はされないがT 細胞受容体遺伝子等の細胞表面受容体遺伝子も含むが、それらに限定されるものではない。

【 0 0 5 5 】

本発明に従った組成物の投与経路も、治療される疾患によって異なってもよい。組成物は、従来の方法 (例えば、経口、非経口、経皮又は粘膜を通して) のうちの1つの形態、生分解性で生物学的適合性のあるポリマーを用いた持効性の製剤で、又は、ミセル、ゲル及びリポソームを用いた現場への送達によって患者に投与されてもよいし、又は、直腸へ (例えば、座薬又は浣腸によって) 投与されてもよい。一態様では、肺感染症の患者の治療には、例えばエアロゾルによる鼻腔内への送達であるか、血管を通して投与されてもよい。適した薬学的に許容される担体は、当業者に明らかであり、投与経路に大いに依存するであろう。

【 0 0 5 6 】

本発明の一態様では、プロモーターが以下から選択されるかもしれないが、それらに限定されない。アクチン、P G K 、D N A p o l I I 又はユビキチンプロモーター等のハウスキーピングプロモーターのようなR N A ポリメラーゼI I プロモーター、アルブミン、グロビン、オボアルブミンプロモーター配列等の組織特異的プロモーター、K 1 2 又はK 1 4 等の皮膚特異的プロモーター、ステロイド誘導プロモーター、テトラサイクリン誘導プロモーター等の誘導プロモーターなど、及び、S V 4 0 初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) プロモーター及びサイトメガロウイルス極初期プロモーター (C M V) 等と同様に、L 1 因子プロモーター、t R N A プロモーター及び5 S R N A プロモーター等の他のレトロウイルスL T R 及びR N A ポリメラーゼI I プロモーター等のウイルスプロモーター。望ましいD N A の最適な発現を提供するプロモーターの種類は、望まれる結果に依存するであろうし、当業者に明らかであろう。

【 0 0 5 7 】

細胞内のレトロトランスポジションと、その結果である望ましいD N A の細胞ゲノム中への挿入を達成するため、本発明の合成されたO R F 2 及び / 又はO R F 1 遺伝子及び望ましい遺伝子からなるカセットは、細胞によるD N A の取り込みが達成されるのに適した組成物で細胞集団へ添加されてもよい。例えば、リコンビナントベクターがプラスミドである場合、インビトロでの細胞へのトランスフェクションに際して、カルシウムリン酸トランスフェクション混合物、リポソームトランスフェクション製剤等を含むがそれらに

10

20

30

40

50

限定されない多数の製剤によって、カセットが細胞に添加されてもよい。この種のトランسفエクションの手順は、当業界で周知であり、例えば、Sambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.)に記載されている。前記カセットは、カセットに適応した組換えDNA技術を用いて製造され、望ましい細胞にカセットを送達するのに適したウイルスの形で細胞に添加されてもよい。

【0058】

宿主細胞DNAの不活性領域にDNAの挿入をするために、ORF2及び/又はORF1タンパク質が特に害のない配列、例えばリボソームRNA遺伝子配列中で、宿主細胞DNAを切断するようにそれらを改変することが可能である。あるいは、ORF2又はORF1のエンドヌクレアーゼドメインを、特に害のない配列で特異的にDNAを切断する別の酵素のドメインで置換することが可能である。このような酵素は、アデノ随伴ウイルスのrep遺伝子及びあるグループIイントロンにコードされる部位特異的なエンドヌクレアーゼ、例えば酵母ミトコンドリアSCCE1遺伝子の普遍的なコード等価物を含むがそれらに限定はされない。

【0059】

別の態様では、カセットに含まれるDNAは、挿入される細胞中の遺伝学的な欠陥を修正するのに有用である。このような遺伝学的な欠陥の修正に使用することができるDNAは、細胞内で突然変異し、その結果として遺伝学的な欠陥を引き起こした遺伝子の野生型又はその派生物を含む。このようなDNAは、欠陥を有する細胞で遺伝学的な欠陥を修正するのに使用できる公知の又は未知の如何なるDNAも限定されることなく包含するものである。このようなDNAの例は、囊胞性線維症膜貫通導性調節因子(CFTR)をコードするcDNA、ベータグロビンをコードするcDNA、血液凝固タンパク質をコードするcDNA、アデノシンデアミナーゼ、ヒポキサンチングアミニホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGprt)等(これらに限定はされないが)の酵素をコードするcDNA、腫瘍抑制遺伝子p53、p21、p16、網膜芽腫、ウィルムス腫瘍等(これらに限定されないが)このような癌で役割を果たすcDNA、そしてまた、サイトカイン、インターロイキン及び治療用のペプチドをコードする遺伝子等が含まれる。

【0060】

したがって、一態様では、本発明は哺乳動物における遺伝的な障害を治療するための方法を提供し、そこでは、本発明の方法は本発明の合成されたORF2及び/又はORF1遺伝子及び望ましい遺伝子及び薬学的に許容される担体からなるカセットを含む組成物を前記の遺伝的な障害を有する哺乳動物に投与することを包含する。

【0061】

別の態様では、本発明は、動物において遺伝学的な欠陥を修正することに関する。更に関連する態様に於いては、哺乳動物及び、より好ましくはヒトが意図されている。動物の遺伝学的な欠陥を修正するために、上述した遺伝子送達の方法は、望ましい遺伝子又はその生物学的に活性なフラゲメントをレトロトранスポジションによって遺伝学的な欠陥を有する動物の細胞に送達することに基づく本発明に包含される。治療する動物に於けるインビオでの細胞内のレトロトランスポジションを達成するために、本発明の合成されたORF2及び/又はORF1遺伝子及び望ましい遺伝子を含むカセットは、当業界で公知の技術、例えば、参照により本明細書に取り込まれている国際公開第94/28938号及び米国特許第5,240,846号に記載される技術を用いて動物に投与される。本明細書に記載の組成物を動物に投与することにより、標的とされた細胞にカセットが取り込まれ、次いでレトロトランスポジションを引き起こす。

【0062】

レトロトランスポジションを用いて修正される遺伝学的な欠陥は、囊胞性線維症、ジストロフィン遺伝子の突然変異、血液凝固に関連する遺伝学的な欠陥及び他の公知又は未知の遺伝学的な欠陥(例えば、リソソーム蓄積症及び他の代謝性疾患)を含むがそれらに限定はされない。

10

20

30

40

50

【0063】

更に別の態様では、未だ特徴付けられていない遺伝子又はそれらの生物学的に活性なフラグメントを細胞中で同定するための方法が提供されるが、当該方法は、本発明の合成O R F 2 及び / 又は O R F 1 遺伝子及び検出可能なタグ配列を投与し、そのタグ配列を発現している細胞を同定し、そのタグ配列に隣接するDNAを単離して特徴付ける方法である。別の態様では、本発明の方法は未だに知られていない又はクローニングできていない遺伝子をクローニングすることを包含してもよい。「タグ」DNAは、neoR、GFP遺伝子、lacZ等から選択されてもよいが、これらに限定はされない。

【0064】

細胞中へのタグDNAのレトロトランスポジションに次いで、ゲノムに挿入されたタグ配列を有する細胞を同定する際に、当業界で周知の多くの手法を用いてもよい。例えば、ハイブリダイゼーションが使用されてもよく、そこではタグDNAからなるプローブがタグDNA又はRNAを有する細胞を同定するために使用される。タグDNAがタンパク質として発現される場合、タグタンパク質を発現している細胞の同定にあたて多様な免疫学的手法を用いてもよい。このような手法は当業界で周知であり、例えばSambrookら(上記)に記載されている。タグDNAに隣接するDNAは、例えばSambrook(上記)に記載されている一般的な手法で単離されクローニングされてもよく、その結果未だに知られていないDNAの遺伝子及び領域の同定及び特徴付けが達成される。

【0065】

本明細書で使用される「レトロトランスポジション」は、ゲノム中へ配列を組込み、ゲノム中で前記配列を発現させ、当該配列の染色体外コピーを作成するために組込まれた配列を逆転写し、ゲノム中へ配列を再組込みする過程を包含する。

【0066】

本明細書で使用される「遺伝子」は、遺伝子のエクソン及びイントロンの両者を含む現実の遺伝子を包含する。

【0067】

本明細書で使用される「異種のDNA」は、それが挿入された細胞で天然には見出されないDNAを包含する。例えば、マウス又は細菌のDNAがヒト細胞のゲノムに挿入されたとき、本明細書では、これらのDNAは「異種のDNA」とされる。一方、本明細書で使用される「同種のDNA」なる用語は、それが挿入された細胞で天然に見出されるDNAを意味する。例えば、マウス細胞のゲノムにマウスDNAが挿入されることは、その細胞への「同種のDNA」の挿入を意味する。後者の場合、同種のDNAが天然に見出される細胞ゲノム中の部位に、それが挿入される必要はなく、むしろ、同種のDNAは、天然に見出されるのとは異なる部位に挿入され、それによって、挿入部位に遺伝的な改変(突然変異)を生じさせてもよい。

【0068】

本明細書で使用される「L1ではないDNA」は、L1因子には天然で生じていないDNAを包含する。

【0069】

本発明の態様が、本明細書中で開示されるDNA配列に限定して解釈されるべきではないものと認識されたい。開示されたDNA配列と同様の機能を実質的に有する同種のDNA配列も、本発明に包含されるとみなされる。さらに、(本質的に同じ機能を有するレトロトランスポゾンORF等の)密接に関連する構造間の遺伝子配列は非常に多様であるが、このような配列も本発明に同様に包含されるものと認識されている。

【0070】

本明細書で使用されるように、「相同性」なる用語は、2つの重合分子間の、例えば2つの核酸分子間の、例えば2つのDNA分子又は2つのポリペプチド分子間の、サブユニット配列の相同性又は類似性を指す。2つの分子の両者でサブユニットの位置が同じモノマーのサブユニットで占められているとき、例えば2つのポリペプチド分子のそれぞれにおいて一つの部位がフェニルアラニンで占められているならば、それらはその部位におい

10

20

30

40

50

て相同である。% 相同性で最も明確に定義される 2 つの配列間の相同性は、同一である位置の数に直接相關している。例えば、2 つのポリペプチド配列中で半分の位置（例えば、10 サブユニットの長さのポリマー中で 5 つの位置）が同一であるならば、2 つの配列は 50 % の相同性を示すものであり、70 % の部位、例えば 10 のうち 7、が一致又は相同ならば、2 つの配列は 70 % の相同性を有するものである。例として挙げると、ポリペプチド配列 A C D E F G と A C D H I K は 50 % の相同性を有し、ヌクレオチド配列 C A A T C G と C A A G A C は 50 % の相同性を有する。

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される「相補性」は、2 つの核酸、例えば 2 つの DNA 分子間のサブユニット配列の相補性を指す。例えば、両方の分子においてヌクレオチドの位置が、常態で互いに塩基対を形成できるヌクレオチドで占められているとき、核酸はその位置で互いに相補的であるとみなされる。このように、それぞれの分子において実質的な数（少なくとも 50 %）の対応する位置が、常態で互いに塩基対を形成するヌクレオチド（例えば、A : T 及び G : C）で占められているとき、2 つの核酸は互いに相補的である。

10

【 0 0 7 2 】

本明細書中で考察されるように、本発明のある態様は、細胞中で遺伝的な疾患を修正するために遺伝子治療で使用してもよいタンパク質産生物をコードする DNA を提供する。このようなタンパク質は、天然のポリペプチド配列を包含してもよく、又、一般に遺伝子治療剤としてより適し細胞中でより安定なタンパク質を提供する修飾体を包含してもよいと理解されるべきである。

20

【 0 0 7 3 】

本発明の更なる態様は、細胞のゲノム中に挿入される DNA 配列によってコードされるタンパク質又はペプチドのアナログを提供する。アナログは、保存的なアミノ酸配列の差異によって又は配列に影響を与えない修飾によって、又はその両者によって、天然に生じるタンパク質又はペプチドとは異なることができる。例えば、保存的なアミノ酸変化はタンパク質又はペプチドの一次配列を改変するが、その機能はそのまま改変しないものであるが、そのような保存的なアミノ酸変化が為されるかもしれない。保存的なアミノ酸置換は、一般的に以下のグループ間：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン；での置換を含むがこれらのグループに限定はされない。

30

【 0 0 7 4 】

（一次配列をそのまま改変しない）修飾は、例えば、アセチル化又はカルボキシル化のようなインビポ又はインピトロでのポリペプチドの化学的な誘導体を包含する。糖付加の修飾、例えばポリペプチド合成及びプロセッシングの間に又は更なるプロセッシング過程において、ポリペプチドのグリコシル化パターンを修飾することによって、例えば糖付加に影響を与える酵素、例えば哺乳動物のグリコシル化又は脱グリコシル化酵素にポリペプチドを曝すことによる糖付加の修飾も、包含される。リン酸化アミノ酸残基、例えばリン酸化チロシン、リン酸化セリン、リン酸化トレオニンを有する配列も包含される。後者の例において、再構成された核酸 / タンパク質粒子が送達に使用されるならば、これは最も適用できるであろう。それは、インビポ送達が後に続く、本質的なインピトロでの修飾である。

40

【 0 0 7 5 】

タンパク質分解に対する耐性を改良するために又は溶解特性を最適化するために又は治療剤としてそれらをより適合させるために、一般的な分子生物学的な技術を用いて修飾されたポリペプチドも包含される。このようなポリペプチドのアナログは、天然に生じる L - アミノ酸以外の残基、例えば D - アミノ酸又は天然には生じない合成アミノ酸を含むものを包含する。本発明のペプチドは、本明細書中に列挙された特定の例示的な工程のいずれの産生物にも限定されない。

【 0 0 7 6 】

50

本明細書で使用される「遺伝学的な欠陥の修正」なる用語は、遺伝学的な欠陥により機能が異常とみなされた細胞に対して、正常な機能を回復する量で細胞中に野生型遺伝子産物を発現することを包含する。この用語は、実際に欠陥タンパク質を発現している細胞以外の細胞タイプに欠陥遺伝子の野生型コピーを送達することによって、動物の遺伝学的な欠陥が修正されるという状況にも適用される。他の細胞に遺伝子の野生型コピーを発現させること、及び、そこで発現された野生型タンパク質を分泌することも、動物で遺伝学的な欠陥を修正するために役立つものである。

(実施例)

【0077】

本発明はここに記載される実施例に限定されて解釈されるべきではなく、むしろ、本発明は本明細書中で提供される全ての適用及び当業者の技術の範囲内にある全ての均等物のいざれをも含むと解釈されるべきであると認識されたい。10

【実施例1】

【0078】

s m O R F 2 及び O R F 1 配列は、マウス L 1 O R F s 内のそれぞれのコドンを、高発現しているヒト遺伝子内の好まれるコドンで置換することによって作成された (H a a s ら, 1996, Curr. Biol. 6 : 315 - 324)。配列は、ユニークな切断部位を導入し、遺伝子の会合を阻害したかもしれない潜在的なヘアピン構造を排除するサイレント突然変異でさらに改変された。s m O R F 2 の両方の鎖を集合的にコードする 6 0 - m e r のオリゴヌクレオチドはキアゲン社のものを用い、遺伝子合成 (Stemmer ら, 1995, Gene 164 : 49 - 53) が図 1 b に示されるようにそれぞれ 5 0 0 b p セグメントで実施された。20

【0079】

会合反応液は、全量 2 5 μ l 中にそれぞれのプライマー 3 0 n M と 1 × E x T a q m i x (Takara) を含んでいた。增幅反応液は、全量 2 5 μ l 中にそれぞれのアウタープライマー 0 . 5 μ M、2 . 5 μ l の会合反応液及び 1 × E x T a q m i x を含んでいた。P C R 条件は、94 4 分間、94 3 0 秒間 - 65 3 0 秒間 - 72 3 0 秒間が 2 5 サイクルで 72 7 分間がそれに続いた。P C R 産生物は、p C R I I 中に T O P O - T A クローニングキット (Invitrogen) でクローン化された。2 4 - 4 8 クローンの全てがそれぞれのフラグメントについて配列決定され、突然変異が標準的なクローニング技術によって取り除かれた。最後に、合成されたフラグメントは p B l u e s c r i p t K S + 中に共に連結された。使用されたオリゴヌクレオチド配列は図 1 0 に示される。30

【0080】

融合ベクターが (図 1 c に示されるように) 調製され、そこではテスト配列 (lacZ 、m O R F 2 又は s m O R F 2) が G F P O R F の下流にフレームに合わせて繋がれた。独立した neo 転写物も挿入された。

【0081】

s m O R F 2 の発現が、次いでイムノプロット解析によって解析された。細胞は、5 % の S D S / P B S 中に回収され、次いで超音波処理された。全溶解産物は、7 . 5 % の S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供され、ポリフッ化ビニリデン (Amersham) に転写された。抗体とのインキュベーションが 0 . 0 5 % の Tween - 2 0 及び 5 % のミルクを含む P B S 中で実施された。0 . 1 % の Tween - 2 0 を含む P B S で洗浄された。抗 G F P (F L) 抗体 (Santa Cruz) が 1 : 2 5 0 希釀で使用された。抗ウサギ Ig G (Amersham) が 1 : 5 0 0 0 希釀で使用された。プロットは E C L - plus (Amersham) で検出された。40

【0082】

ヒト及びマウス両者の細胞において、G F P s m O R F 2 の形質導入は野生型 G F P m O R F 2 と比較して R N A 量の大規模な増加を引き起こした (図 1 d 、上段、レーン 3 及び 4)。m O R F 2 のエンドヌクレアーゼ活性及び逆転写酵素活性を破壊する 2 つの突然50

変異の導入は、さらにsmORF2 RNAレベルのわずかな増加を提供した(図1d、上段、レーン5)。ベクターにコードされるneon転写物に対するプローブは、これらのRNAの増加が形質導入効率又は負荷の違いによらないことを示していた(図1d、中段)。抗GFPを用いたこれらの試料のイムノプロット(図1d、下段)は、タンパク質のレベルがRNAの増加と相關することを示し、哺乳動物のシステムでリコンビナントの全長ORF2タンパク質が検出可能な量で再現可能に発現できることを示した注目すべき最初の例であることを示した。

【実施例2】

【0083】

増加したRNAレベルがレトロトランスポゾンによる転位効率の改変を引き起こしたか否かを決定するために、確立された組織培養アッセイ、レトロトランスポジションアッセイ(図2a)が、HeLa細胞で相対的なレトロトランスポゾンによる転位頻度を測定するのに使用された。HeLa細胞での標準的なレトロトランスポジションアッセイは、基本的にはMoranら、1996, Cell 87: 917-927に記載されるように実施した。形質導入された細胞は、10-12日間200μg/mlのヒグロマイシンで選択され、それから計数され、600μg/mlのG418で10日間培養された。コロニーは0.4%ギムザを含むPBSで染色された。

10

【0084】

mORF2は、全長のマウスL1中でsmORF2と置換され、部分的に合成されたマウスL1(psmL1)が作成された。再コードされたmORF2はレトロトランスポジションに必要とされる潜在的に重要なシス作用配列(例えば、内部リボゾーム挿入部位)を欠いているかもしれないと考えられたので、mORF2の最初の約500bpが野生型のL1配列からなり残りが合成である、部分的に合成されたORF2の変形物(psmL1-2)も構築した。HeLa細胞で、psmL1及びpsmL1-2の両者が野生型のmL1より約20-25倍以上活性であった(図2b)。合成されたmORF1(smORF1)及び部分的に合成されたmORF1の変形物の合成と取り込みは、更なるレトロトランスポジションの増加を引き起こし、2つの完全に合成されたORFを有する因子で、野生型に対して最大で200倍以上の増加に達した(図2b)。

20

【0085】

HeLa、3T3及びL細胞における一過性のレトロトランスポジションアッセイが、基本的にはWeiら、2000, Anal. Biochem. 284: 435-438に記載されるように実施された。それぞれの転位構築物は、GFP発現プラスミドpTracerEF(Invitrogen)を用いて共に形質導入され、形質導入効率が標準化された。形質導入後24時間で、細胞は100mm皿に1:2、1:20及び1:200に分割された。形質導入後36時間で、希釈された細胞はG418で選択され、残った細胞はフローサイトメトリーでGFPの発現について解析され、形質導入効率が標準化された。3T3細胞は1mg/mlのG418中で選択され、L細胞は400μg/mlのG418中で選択された。コロニーは0.4%のギムザ又は0.5%のクマシープリリアントブルーで染色された。

30

【0086】

一過性アッセイの使用により、合成のマウスL1(pCEPsmL1)レトロトランスポジション頻度が、野生型の天然のヒトL1及び野生型の天然のマウスL1のそれと比較された(N=3)。HeLa、3T3及びL細胞に対するpJM101L1rpコロニーの平均的な絶対値(形質導入された10⁶細胞当たりのコロニー数)は、それぞれ2904、108及び1568であった。

40

【表1】

表1：マウス細胞における高頻度レトロトランスポジション

プラスミド	相対的なトランスポジション頻度		
	HeLa	3T3	L
pCEP4 (空のベクター)	0	0	0
pTN201 (天然のマウス野生型)	<0.005	<0.002	<0.002
pTN203 (天然のマウス突然変異)	0	0	0
pJMJ101L1 (天然のヒト野生型)	0.13	0.017	0.07
pCEPsmL1 (合成されたマウス野生型)	1	1	1
pCEPsmL1mut ² (合成されたマウス突然変異)	0	0	<0.002

【実施例3】

【0087】

s mL 1 の G 4 1 8 耐性コロニーが真正な L 1 レトロトランスポーズによるものであることを確認するために、6つのs mL 1 挿入を特徴付けた。完全な挿入と隣接している配列のそれぞれを増幅することができるインバースポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、突然変異部位が同定された。それぞれのプライマー対に対して、親の HeLa 細胞は空の部位を示す産物のみを產生した (図3a、奇数レーン) が、一方対応する G 4 1 8 耐性コロニーは空の部位 (empty site) 及び予想されるサイズの完全長 s mL 1 挿入産物の両者を产生した (図3a、偶数レーン)。

【0088】

一般的な構造とゲノム隣接部を決定するために、アンブリコンがクローニングされ配列決定された。組込み部位は、基本的に Morriseyら, 2002, Nature Genetics 31: 159-165 に記載されるようにインバース PCR によって決定された。それぞれのクローニングから得られたゲノムDNA (5 μg) が EcoRI で消化され、熱で不活化され、1ml に希釈され、一晩連結され、エタノールで沈殿され、30 μl の水に再懸濁され、オリゴヌクレオチド JB 6466 / 6467 (1回目) 及び JB 6468 / 6469 (2回目) を用いる2回のインバース PCR に供された。JB 3529、JB 3530 及び JB 3531での配列決定は 30 の隣接配列を同定した。隣接配列に基づくプライマーが、無傷の s mL 1 挿入を増幅するのに使用され、増幅された s mL 1 挿入物は続けて配列決定された。

【0089】

図3b に要約するように、全てのアンブリコンが適切にスプライシングされた neo 遺伝子、ポリAテイルを示し、ほとんど (6のうち5) が 5' ~ 108 bp の長さの標的部位複製物を有していた。挿入番号 10 は 10 bp の標的欠失を有し、挿入番号 18 は 5' L 1 逆位を有し、特徴は L 1 挿入に共通して見出された。

【0090】

さらに、様々な染色体が標的として使用され、標的部位複製物から推測されるエンドヌクレアーゼ切断部位は以前に報告された変性コンセンサス (下の鎖において 5' - TTTT T / A A - 3') (図3c) に一致した。

【実施例4】

【0091】

合成のマウス L 1 レトロトランスポゾンの活性が、野生型のヒト及びマウス L 1 とマウス細胞において比較された。標識されたレトロトランスポゾンを導入するために使用されたエピソーム性のプラスミドはマウス細胞中で効率よく複製されないので、3T3 及び L

10

20

30

40

50

細胞中での一過性レトロトランスポジションアッセイが使用された。（図2 b 及び表1の p T N 2 0 1 及び p C E P s m L 1 を比較し）標準的なアッセイで得られる相対的なレトロトランスポジション頻度を確認するために、HeLa細胞での一過性レトロトランスポジションアッセイも実施された。合成のマウスL1（p C E P s m L 1 ）は、マウス細胞で野生型の対応物より非常に高い頻度で（200倍以上）レトロトランスポジションを行った。

【0092】

さらに、s m L 1 をヒトL1（p J M 1 0 1 L 1 r p ）と比較した。L 1 r p は以前にトランスジェニックマウス系統を作成するのに使用され、マウスでレトロトランスポジション頻度の基準として使用されるからである。L 1 r p が従来知られていた最も活性なL 1 因子であった全ての細胞タイプの試験において、s m L 1 はL 1 r p より非常に活性が高かった。s m L 1 m u t ² を産生するためにs m L 1 に導入された触媒作用の突然変異は、実質的にレトロトランスポジションを消滅させた。

【実施例5】

【0093】

野生型の全長m L 1 及びその合成の対応物のノーザンプロット解析が実施された。全RNAが製造者の指示に従ってTRIZol試薬（Invitrogen）を用いて単離された。それぞれのサンプルから得られた全RNA（6 μg）は、10単位のDNase Iで37℃で15分間処理され、0.8%アガロース／ホルムアルデヒドゲル上で泳動され、Genescreen plus nylon membrane（NEN）へ10×

SSC 中で一晩プロットされ、紫外線照射により架橋された。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションが共に42℃でULTRAhyb（Ambion）中で実施された。続いて[‘y-³²P]ATP末端ラベルされたオリゴヌクレオチドがプローブとして使用された。GFPプローブとしてJB4057、GFPプラスミドneoプローブとしてJB4059、トランスポジションプラスミドneoプローブとしてJB4541、hygプローブとしてJB6341が使用された。洗浄が2×SSC、0.1%のSDS及び0.2×SSC、0.1%のSDSで実施された。放射性シグナルは、Fujiiイメージングプレート（Fuji imaging plates）及びFujiiスキャナー（Fuji scanner）（BAS-1500）で測定した。次いで再度プローブするために、沸騰した0.1×SSC、1%のSDS中で10分間3回洗浄することにより、膜からプローブが除去された。

【0094】

野生型の全長m L 1 及びその合成の対応物のノーザンプロット解析によれば、合成のL 1 配列の長さの増加は全長L 1 RNAレベルの増加を導くことが明かとなった（図4）。hyg r o 形質導入／負荷コントロールによって決定されるように（データ示さず）、p C E P s m L 1 はエピソームで維持することが困難なので、p C E P s m L 1 m u t ² がp C E P s m L 1 の代わりに使用された。無傷のp C E P s m L 1 プラスミドは形質導入された細胞で長期間、維持されない。

【実施例6】

【0095】

c reリコンビナーゼタンパク質に曝されたときのみレトロトランスポーズする、合成マウスレトロトランスポゾンの条件的に活性化する変形物が構築された（図5 a ）。未成熟なRNAの切断を導く配列に操作可能に結合された、介在性のレポーター遺伝子（-GEO等）によって、合成のレトロトランスポゾンが不活性化されている構築物が作成された。このカセットには、10×P組換え部位が隣接している。このDNAセグメントはc reタンパク質（インビトロで提供されるか、同時トランスフェクションにより又はc re発現トランスジェニックマウスの交配により提供される）の存在下で、c reが10×P部位で組換えを行うことにより、-geoを欠失し、合成レトロトランスポゾンを活性化するだろう。

【0096】

10

20

30

40

50

レトロトランスポジションに対するレポーターは、UVで励起される緑色蛍光タンパク質(gfp)であり、このタンパク質は単に紫外線を照射することにより新たな突然変異を視覚的に追跡することを可能にする。これは図5bに示される。不活性化された及び活性化されたDNA構築物(図5aに表される)はHEL A細胞に形質導入され、表現型は-gene発現に対してX-gal染色、トランスポジション(gfp活性)に対して蛍光顕微鏡を用いて評価された。

【実施例7】

【0097】

ヒト(human version)の合成L1因子が上記と同じ方法を用いて合成された。この因子はヒトL1因子コンセンサス(Brouhard, 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 5280 - 5285)のアミノ酸配列に基づいている。ORF1及びORF2が、内部ORF領域及び3'UTRと同様に再度コードされ、完全な合成ヒトL1を作製した。

【0098】

レトロトランスポジション活性が測定され、天然のヒトL1と比較して活性が数倍増加することが明らかとなった。

【0099】

本明細書で引用されるそれぞれの特許、特許出願及び刊行物の開示は、その全てが参照により本明細書中に取り込まれる。

【0100】

本発明は特定の態様に言及することで開示されているが、本発明の他の態様及び改変が本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく当業者によって工夫されることは明かなことである。添付の特許請求の範囲は、このような態様及び均等な改変の全てを包含するものである。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1a】図1aは、L1構造の模式図を示すものである。TSDは標的部位の重複を、UTRは非翻訳領域を表す。

【図1b】図1bは哺乳動物のORF2遺伝子の合成について概略図を示す。それぞれの断片をコードするオリゴヌクレオチドはPCR会合反応(PCR assembly reaction)で混合され、次いで增幅の錫型として用いる。增幅産物はクローン化され唯一の制限部位(AからJとラベルされた)で繋がれた。

【図1c】図1cはプラスミドの構造を示す。テスト配列(1acZ, mORF2又はsmORF2)がGFP-ORFの下流にインフレームで挿入される。それぞれのneo転写物は、形質転換の効率と負荷をモニターするのに使用された。プラスミドに沿って延びる短い線は、図1dで示された、プローブを表す。

【図1d】図1dはsmORF2発現解析を示す。上段は、GFP1acZ、GFPmORF2及びGFPsmORF2のRNA発現。中段は、負荷コントロールのRNA発現。下段は、GFP1acZ、GFPmORF2及びGFPsmORF2のタンパク質発現を示す。

【図2a】図2aはレトロトランスポゾンアッセイの概略図を示す。L1因子は、それ自身のプロモーターとポリアデニル化シグナルを有する3'非翻訳領域に、イントロンで中断されたneoレポーターを含む。neoがL1プロモーターから転写され、スプライシングされ、逆転写され、ゲノムに組込まれると、細胞はG418耐性となる。プラスミドの部分に沿って延びる短い線は、RNA解析のためのプローブを表す。SDはスライスドナーを、SAはスライスアクセプターを示す。

【図2b】図2bは、レトロトランスポゾンがHeLa細胞でアッセイされた際に得られた結果を示している(N=3)。pTN201は野生型の天然のマウスL1配列のみを含み、pTN203は野生型の天然のマウスL1配列と共にD709Y逆転写酵素の点突然変異を含む。pTN201のコロニーの平均絶対数は、形質導入された10⁶個の細胞当

10

20

30

40

50

たり 440 である。

【図 3 a】図 3 a は、それぞれ完全な挿入配列とフランкиング配列を増幅したインバースポリメラーゼ連鎖反応の結果を示す。それぞれの挿入配列に隣接するプライマーは、G 418 耐性クローニングから増幅するために使用された。奇数のレーンは、それぞれのプライマーについて、親の HeLa 細胞が空の部位の産物のみを產生したことを示している。偶数のレーンは、それぞれの G 418 耐性クローニングが、空の部位の産物及び予想されるサイズの完全長 s mL 1 挿入産物の両方を产生したことを示している。

【図 3 b】図 3 b は、クローニングされた挿入物の特徴を提供する。TSD は標的部位の重複を示す。

【図 3 c】図 3 c は、クローニングされた挿入物の構造と隣接する配列の概略図を示す。挿入物 no. 8 はヒトゲノム配列には見られない 7 bp (青で強調された) の付加配列を含む。挿入物 no. 10 は、ヒトゲノム配列データベースと比較して、1 組の鋳型と異なる塩基対を含み、それに L 1 挿入物の直ぐ上流の 10 bp の欠失 (青で示された) が続いている。TSDs は赤で強調され、推定されるエンドヌクレアーゼ切断部位は下線で示されている。

【図 4】図 4 は、マウス細胞での s mL 1 発現の全 RNA 解析による、高頻度なレトロトランスポジションを表している。天然、部分的に合成された及び完全に合成された mL 1 の発現が HeLa 細胞で比較された。

【図 5 a】図 5 a は、c re リコンビナーゼタンパク質に曝された時のみレトロトランスポーズする、条件的に活性化するマウスレトロトランスポゾンの概略図を表す。

【図 5 b】図 5 b は、組織培養細胞での結果を示す。

【図 6 a】図 6 a は、配列番号 1 (合成されたマウス ORF 2) の前半部分を記載する。

【図 6 b】図 6 b は、配列番号 1 (合成されたマウス ORF 2) の残りの部分を記載する。

【図 7】図 7 は、配列番号 2 (合成されたマウス ORF 1) を記載する。

【図 8 a】図 8 a は、配列番号 3 (合成されたヒト ORF 2) の前半部分を記載する。

【図 8 b】図 8 b は、配列番号 3 (合成されたヒト ORF 2) の残りの部分を記載する。

【図 9】図 9 は、配列番号 4 (合成されたヒト ORF 1) を記載する。

【図 10 a】図 10 a は、マウスでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 5 - 72) を記載する。

【図 10 b】図 10 b は、マウスでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 73 - 143) を記載する。

【図 10 c】図 10 c は、マウスでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 144 - 209) を記載する。

【図 11 a】図 11 a は、ヒトでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 210 - 262) を記載する。

【図 11 b】図 11 b は、ヒトでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 263 - 319) を記載する。

【図 11 c】図 11 c は、ヒトでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 320 - 376) を記載する。

【図 11 d】図 11 d は、ヒトでの実験で使用されたオリゴヌクレオチドの配列 (配列番号 377 - 411) を記載する。

【図 12 a】図 12 は、合成のマウス L 1 と天然のマウス L 1 の配列アラインメントを提供する。MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular) を使用して、ORF 1 の ATG で開始し、ORF 2 の終始コドンで終了する、天然のマウス L 1 と合成のマウス L 1 の核酸 C 1 us t a 1 W アラインメントを作成した。これらの配列について、L 1 spa の塩基構成は、41% A、20% T、21% C、18% G である。s mL 1 の塩基構成は、27% A、14% T、33% C、26% G である。L 1 spa (Genbank アクセッション番号 # AF016099) が天然のマウス L 1 の配列として使用された。一致部分は灰色の陰影を付けて示されている。

10

20

30

40

50

- 【図12b】図12bは、図12aの続きである。
 【図12c】図12cは、図12bの続きである。
 【図12d】図12dは、図12cの続きである。
 【図12e】図12eは、図12dの続きである。
 【図12f】図12fは、図12eの続きである。
 【図12g】図12gは、図12fの続きである。
 【図12h】図12hは、図12gの続きである。

【図1a】



図1a

【図1b】

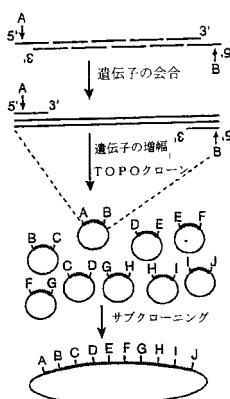


図1b

【図1c】

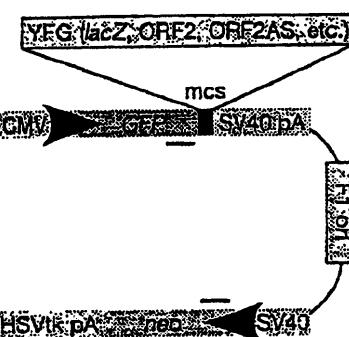


図1c

【図1d】

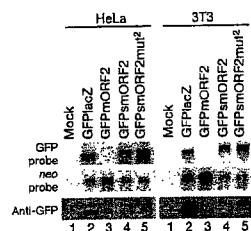


図1d

【図2b】

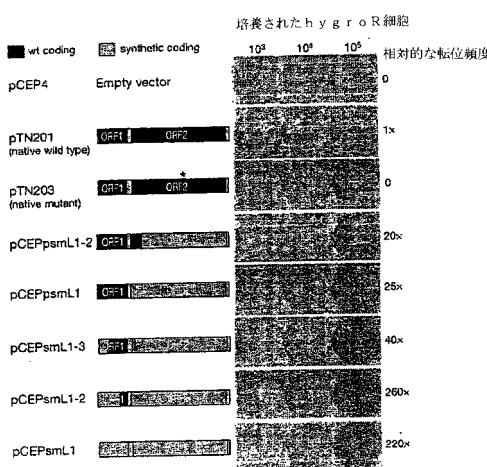


図2b

【図2a】

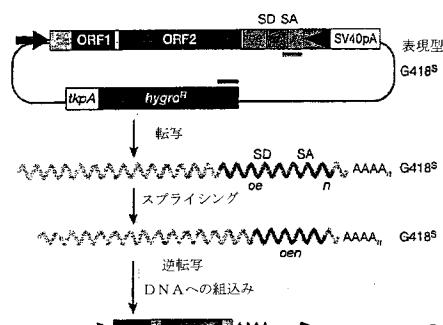


図2a

【図3a】

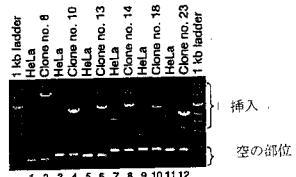


図3a

【図3c】

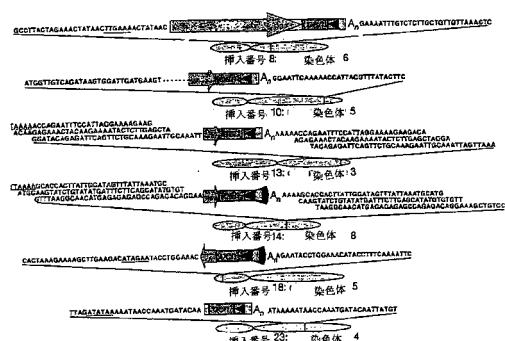


図3c

【図3b】

挿入番号	Poly(A)?	TSD?	5'逆位	欠失	録型と異なるヌクレオチド
8	Y	Y, 5 bp	N	N	Y, 7 bp
10	Y	N	N	Y, 10 bp	Y, 1 bp
13	Y	Y, 101 bp	N	N	N
14	Y	Y, 108 bp	N	N	N
18	Y	Y, 15 bp	Y	N	N
23	Y	Y, 23 bp	N	N	N

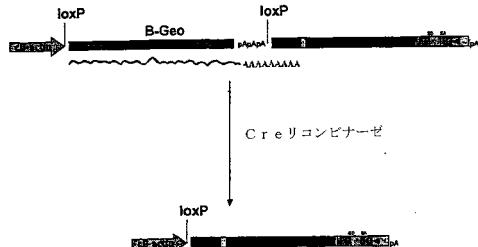
図3b

【図4】



図4

【図 5 a】



☒ 5 a

【図 5 b】



1

図 5 b

【図 6 a】

配列番号 1

ATGCCCTTGTACCCAGAACAGTCACCGGCAAGAACAACTACTTCAGCTGA
TCAGCTTGAACTACATCACGGCTTAAGCAGCCCCATCAAGCGCAGCGCTGAC
CAACTGGCTGCAACAGCAGGCCCCAACCTTCTGTCCTCCAGGAGAACCCAC
CTGGCGAGAAGGAGCCGCACTACCTGCGGATGAAGGGCTGGAAGAACCATC
TTCAAGGCCCAGCGCTATGAAGAACAGCAGCTGGCTGGCATCTGTACAGG
AAGAACATGACTCTTCCAGGCGAACAGGTATCAAGAACAGGAGGGGCCACT
TCATCTGTAGTCAAGGGCAAGATTCAGGAGCTGGCTGAGGACTCTGAAACAT
CTACGGGCCCCAACACCCGGCGGCCACTTCACAGGAGAACCTCTGGTJAAG
CTGAAGGGCCACATCGCTCCCCACATCATGTCGGCACTTCACACCC
CCCTGAGCCCCATGGCAGACATTGAGAAGCTGAGAACGGCCACACTTCA
GAAGCTGAGGGCGGTATGAAGAGTGGCTGAGCTGGCAAGGAGAACCT
TTCTACCCAAAGACCAAGGGCAACTCTTCAGGCTCTCCCAAGGCAGGACCT
CAGAACAGATGACCCACATCTGGCAAGAGGGGGTGAAGGGCTGA
GAACATCAGGAGATCTGGCTCTGGTACATCTGGCAGGACCAAGCATGGCTGGA
ATCTTCAACAAACAGATTAAACAACCCGGCAAGGCCAACCTTCTGGTGAAGGCTGA
ACAAACACCTCTGTAGACGACACCTCTGGTGAAGGAGGCTAACAGAGGAGA
TCAAGGGACTCTTCTGGATTCACAGAGAACGGCCACACTACCTAACCT
GTGGGGACACCATGAGAACGGCTTCTGGGGCAAGCTGATGGCTGAGGGCC
TTCAAGAAGAGGGGGAGGGCGGCCACATAGTAGCTGCTGACCACCCACTGA
AGGCCCTGGAGAAGAAGGGGCTAACCTCCCAAGCGCTCCGGGGCAGG
AGATCATCAAGCTGGCGGGAGATCACACCGGATGGAGACCCGGGCCACCA
TCCAAGGATCACACAGGACCCGGCTTGTGTTCTGGAGAAGATCACAAAGAT
CGACAAAGGCCCTGGCTCGCTGACCAAGGGGCCACCCGGAAGAATCTGTAC
AACAAAGATGCCAACAGAGGGCGACATTCACCCAGGCCAGGAGGATC
CAGAACACCATGGCAGCTTCAAGGGCTGTAGCAGCACCAAGGGTGGAGA
ACCTTGGACGGAATGGCACAGTCTGGCAGGCCATACCTGGTGGCAAGCTGA
CAGGACCGAGTGGACCTGCTGAAGCAGGCCATCTGGCTTCAAGGAAGATCG
GCCGTGATCAACAGCGCTGGCCCAAGAAGAGGCCGGCCGGCAGGCTTCA
GCTTTCTACACAGATCGAGGCTGAGGGCTACCTTCCCAAAGGACTCTTCA
GCCACCATCACCTGTATCCCCAACGGCCAGAACATGGCTGAGGAGGAGA
ATCTTGGCCCCCATCGCTGTAGAACATCGAGGCCAGAACATCTGAA
CCTGGCAACCCGATCCAGGACACATCAAGGCCATCATCACCCTGGACCCAG
GTGGCTGCTTACCTCCCCGGATCGAGGGCTGGTACATCCCAAAGGACTCT
ACGTGATTCACATCAACAGGCTGAAGGACACAGAACACCATGATCATCA
CTCTGGACCCGAGAAGGCCCTGGACAAGAGATCAGCAGCACCCTCTCATGATCA
GGCTGGTGGGGAGGGGCTTACAGGGGGCTAGTCAACATGATCAAGGGCA
TCTACAGCAAGGGGGCTGGCCACACATCAAGGCTGAAGGGAGAACCTGGAG
CCATCCCTGTAAGAGCGCAGCGCTCAGGGCTGTCTCTGTCCCCCTACCTG
TCAAGCATCTGGTGGAGGTCTGGGGCTGATCTGGGGCAGCAAGGGAGA
TCAAGGGCTTCAAGATCGCAAGGAGAAGTGAAGATCAGCTGGCTGGCA
CGACATGATCAACAGCTGGGGAGGGTGGCTGCTAACAGTAAACAGCA
AGAGCATGATGGCTTCTGTACACAGAACAGAACAGGGAGAACCTGGAG
CCATCCCTGTAAGAGCGCAGCGCTCAGGGCTGTCTCTGTCCCCCTACCTG
TCAAGCATCTGGTGGAGGTCTGGGGCTGATCTGGGGCAGCAAGGGAGA
TCAAGGGCTTCAAGATCGCAAGGAGAAGTGAAGATCAGCTGGCTGGCA
CGACATGATCAACAGCTGGGGAGGGTGGCTGCTAACAGTAAACAGCA
AGAGCATGATGGCTTCTGTACACAGAACAGAACAGGGAGAACCTGGAG

【 図 6 b 】

GGGAGGACCA CCCCCTTGACATGCCGACCAAAACCATCTAACGATCTGGGT
GACCTGTCAGAACAGGAGTGGAGGCTTGACAGGCTTGACAGAACGCTTGAG
GAAGAAGGAGATCAAGGGAGGCTCCGCCCCCTGAGGACTCTGGCTTGAG
CTGGATGGCCGCCACCAACATCTGGAGATGGCTTCCTGCCAACGGATCTCAG
TACCGCTTCIAAGGCCATCCCATGAGATCCCCACCAGTTCTTCAAGGAAGCT
CGAGGGGCCATGAGGAGTCAAGGAGGCTTGAACTGGAGAACAAAGGAGGGCCATGCC
AAAGGAGCTTGTAAGGAGAACAGGGCACCATGGGGGGATCACATGGCCAG
CTGAGGCTGTACAGGCGGCCATGCTGATGAGCAGGCTTGATGAGCT
GGGACCCGGAGTGGACATGGAGACATGGAGGAGGCTTGAGGAGGAGTGGAC
CCCCACACTGGCCGGCTACTGTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GAAGAAGGAGCACATCTTCAAACTGAGCTGGGCAACTGCTGCTTGAGC
TGGCCGGCTATGGCGATGGACCTTCAAGGCCATGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GCAAGTGTGATCAAGGAGTGGCAATCACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GGAGAAGGTTGGCAAGAGCTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GCAAGTGTGATCAAGGAGTGGCAAGAGCTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GGAGAAGGTTGGCAAGAGCTGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
CTGGATGAGGCTGACTCTCTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GGAGAACAAACCCCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
CCCCGGAGGACTGGCATGGCGAGAACGACTGAGAAGTGGAGCAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
CTCTGATCATCCGGAGATGAGCATGAGAACGACCCCTGCTGGCTACCTGACC
GGCTGGCGGAGTGGCGAGAACGCGGAGACTGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
GGCTGGCGGAGGGCGGACCTGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
TGACGGCTCTGGAGAACGGCTGGGGCTTGCGGAGATCTGGGAGAGGAGGAGGAGTGGAC
CCCCGGCGAGAACGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
TATCGGGCGGCACTGGAGAACGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
TACAGGAGATGGTGGACATCTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
AACGAGTGTGATCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
TGAGGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC
TGAGGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGAC

四六

【 図 7 】

配列番号 2

ATGCGCAAGGCCAAGGCCGCACCTGACCACCGAACCCGGACACAGC
CCCCGGCCCGAGCCCGACCCCAACGGCCGAGCCGGGAAACCCAAAC
CCCCGGAACCTGGACCTGGACCTGAAGGCTTACCTGTATGATGTTGGA
GGACATCAAGAAGGACTTCACAAAGGCTGGAAGGAGATCCAGGAGAAC
CGCCAGGAGCTGCGAGCTGTCAGGAGAACAGGAGAACCATCAAGCA
GTGGAGGGATGCTGAGCAGGAGAGGGAGAACGAGCTACAAGCAGGTGATGGA
GATGAAACAGAACCTCTGGACCTGAAGGGCGAGGTGACACCTAACGAA
GACCCAGAGCGAGGCCACCTTGAGATGACAGGACCTGGAGAAGAGGGG
CACCATCGACCTGACCATCAGAACCGCATCAGGAGATGGAGGAGGCCATC
AGCGCCGCGGAGGAGCACATCGAGAACATCGGCCACCCATCAAGGAAAC
GGCAAGTCAAGAAGCTGAGCAGGAGAACATCCGGAGAGTCCAGGACACC
ATCCGGCCGCCCAACGTTGGCATCATCGCGTGGACAGGAAAGGACTTCC
AGCTGAAGGGCCCCCAGAACATCTTCAAGATCATCGAGGAAAGATTCCC
AACCTTGAAAGAACGAGATGCACATGAAACATCAGGAGGCTTACCGCACCCC
AACCCTGGAGCCAGAACGGCAACAGCTTACGACATCATCTGGCCACCA
GCAAGCCCTGAAACAGGAGCCGATCCTGAGGGCTGGCAGAGGGGG
AGTGACCTTACAAGGGCAAGCCCATCGGCATCACCCCCGACTTCAGCCCCG
CACAACTGCAAGGGCCGGCGCCGGTGGCTGATCCCAGCAAGCTGACATCATCG
AGGGCGAGACCAAGGTGTTCAAGCAGAACAGGAACTTCACCCACTACCTGAG
CACCAACCCGGCCCTGGCAGCGCATCATCAGGAGAACAGCTGACATCATCG
GGCAACAAAGCCCTGGAGAGAACCGCCGCTAA

四

【図 8 a】

配列番号 3

図8 (続く)

【図 8 b】

TACCATCGCTAGCAAGCGCATAAGTACCTGGGATCCAGCTGACCCGGC
CTGTAGAGGGACTCTTGAAAGGAACATAACAGGGCTCTGAGGGAGTCAG
GAGGAGAACCAAACTGGAGAACATCCCTCGACGTGGTGGGGCCGCATC
AACATCGTGAAGATGCCATCTGCCAAGGTGATCCCGCTTCACGCCA
TCCCCATGGAGCTGCCATGGACTCTTCACCCAGGTGAGAACGACCCCT
GAAGTCTATCTGGAAACGAGGGCAGCCGATCGCCAAGGACATCTGAGC
CAGAAGAACAGAACGGGGGGCATACCCCTGGGACTCTAACAGCTTACTA
AGGGCCACCTGTAACAGGGCTCTGGTAGCTTGACCCAGAACGGGATATCGA
CCAGTGGAAACGGCACCAGGGCCAGGGACTGATCCTGGCCACTCTAACACT
CTGATCTTCAGCAAGCCGGAGAACAGAACAGCATGGGCAAGCAGGCTC
TCAACAAAGTGGCTGCTGGGAAAGACTGGCTGCCATCTGGGCCAAGTGG
GGGGACCTCTTCACCCCTTACACAAAGTCAACAGGGCTGATCAAGGA
CTCTGAACCTGAGGCCCAGGACCATCAAGGCTTGGAGGAACCTTGGGAT
CACCATCCAGAACATCGCGTGGCAAGACTCTGAGAACGCCCCAAAG
GCCATGGCCACCAAGGACAAAGTGGCAGACTGGACCTGATCAAGCTGAAG
GCCATGGCCACCCGAAAGGAGGACCCATTGGGCTGAAAGCCAGGGCCACCA
CTCTGGAGAAAGATCTTCGGACCTACAGCGGCCAAGGGCTGATCGCCG
CATCTAACACAGCTGAAGCAGTACAAAGGAAGAACGAGGACCCACCATCA
CAAGAACAGTGGCAAGGACATGAGACCGCCATCTGCAAGGAGGACATCTA
GGGGCCAGAACCATATGAAGAAGTGGCAGCAGCAGCTGGCCATCTGGG
GATGCGAGATGGGACACCATCTGGCTACCATCTGCGGCTACCTGGGCTG
ATCATCAAGAACAGGGCAACACCGCTGCTGGGGCTGCGGCGAGATC
GGCCACCTCTGGCTGATCTGGCTGGGACTGCAAGCTGGTGCAGCCCCCTGG
AGAGGCTGTGGCTGGCTTCTGGCGACCTGGAGCTTGGAGATCCCCCTTGAC
CCCCATCCCCCTTGCTGGCATCTACCCCAAAGCTAACAGGACTCTGGTCTAC
AAGGACACTCTGGCCACCCGGATCTTGCTGGCCCTGTTACCATCCCAAGA
CTCTGGAAACGGCCAAAGTGGCCACCATCTGATCGATGGTAAAGAACAGTGT
GACATCTACACATGGAGACTCTGGCCACCATCTGACAGAACGAGCTTCTAC
AGCTTCTGGGCCACCTGGTGAAGCTGGAGAACCATCTGAGCTGAGCAAGCTGA
GCCAGGAGCAGAACGACCAAGCAGCCGATCTGAGCTGGGCTGACCCGGCAACTG

18

【 四 9 】

配列番号 4

ATGGGCAAGAACGAGAACCGCAAGACCGGCACACGCAAGACCCAGAGGCC
AGCCCCCCCCCCCCAAAGGGCAGCAGCAGCCCCGCCAGCAGAGCTGG
ATGGGAACGACTTCGAGCACGGCTGGCGAGGAGGGCTTCGGCCCACTCA
ACAGGGAGCTGGCGGAGACATTCCAGAACCAAGGGCAAGGAGTGGAGAAC
TGAGAAGAACCTGGAGGAGTGGCATCACCAGAACCCAGGAAGT
GCCTGAAGGACCTGTAGTGGAGCTGAAGACCAAGGCCGAGCTGGCGAGG
AGTGGCGCAGCTGGCGAGCAGCTGGGACCAATTTGGAGGAGGCCGCTGAGCG
ATCTGGAGGACAGATAGAACAGGATGAAGCCGAGGGCAAGTCTGGAGAGA
GGCGCATCAAGGCCAACAGGCAAGACCTGAGGAGATCTGGGACTACCTGTAA
GCCGCCAACCTGGCGCTATGGCGCTGGCGAGGAGCAGCTGGAGAACAGCC
ACCAAGCTGGAGAACACCTTGAGGACATCATCAGGAGAACCTTCCCCAAC
TGGGCCGCCAGGCCAACCTGAGCATTGGAGGAGTCCAGGCCAGCCCAGCG
CTACAGCACGGCCCCGGCACCCCCGGACATCATCTGGCTTCCTAACAG
GTGGAGATGAAGGAGAAGATCTGGCGCCGGCGCGAGAACGGCGCTG
ACCTTGAGGGCAAGGCCAACCTGGCTTCAGCTAACGGCCGAGCTGGCGGAGACCC
TGCAGGCCCCGGCGAGTGGGGGCCCATCTTCACATCTCTGAAGGAGAAGAA
CTTCCAGCCCCCATCTACGCTACCCGGGAAAGCTGGCTTCATCAGGAGGGC
GAGATCACTAGTCTACGCAAGCAGATCTGGCGGCCAGCTGTGACCA
GCCGCCGCCATGAAGGGAGCTGTGGAGAAGGCCCTGAAGATGGAGGCCAAC
ACCGCTTACAGGCCCTGAGAACAGGCCAACAGATGTA

1

【 図 1 0 a 】

【 义 1 0 b 】

【 10c 】

【図 1 1 a】

【図 1-1-b】

TCTTGGTCGCTTGTAGTCGCTTGTGCGTCAGACAGGAGGCC
163 ATGCAAGCCACCAAGGCGCAGGAGGAGGGGACTACA
164 CTCGCTGGTCGTCGCTTGTAGCATGAGGAGGAGGGGACTACA
165 AGGCAGCATCAGCAAGGAGGAGGGGACTACA
166 GCGAATTCAGCGTTGTCGGCCCGCTCATGACAGCATCGTGAGC
167 GCGGACCTGGTCGCTGTCGGCCCGCTCATGACAGCATCGTGAGC
168 TGGCTGGTCGCTGTCGGCCCGCTCATGACAGCATCGTGAGC
169 GCGGACCTGGTCGCTGTCGGCCCGCTCATGACAGCATCGTGAGC
170 GGGTCTGGCCTGGCGGGTGTAGGGTGTAGGGTGTAGGGTGTAGG
171 CCTTCGGGACCGCAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
172 CGCCGCTGGTCGAGGCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
173 CGCCGCTGGTCGAGGCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
174 AGAAAGGAGTACTGCGTGTCTGGGGTGTAGGGGCTGGGTAGTGT
175 GCGACCGATCACCCATTCTGGCGCCCCAACACACCATGACAG
176 CCTTGTGTCGCCCCAGGTGGTGTAGCTGGTGTAGTGTGGTGG
177 ACATCGTGGAGGAGGCGCTGGTGTAGCGACAGGAGGACCCAG
178 GGTGCTCGGAGGAGGCGCTGGTGTAGCGACAGGAGGACCCAG
179 CCAAACATTGAGGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
180 TGCTGTGTCGCTTGTGGTGTAGCTGGTGTAGCGACAGGAGG
181 TGACCCAGGACCGCCGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
182 TCTGTGTCGCCCCAGGTGGTGTAGCTGGTGTAGCGACAGGAGG
183 ACTGGTCAACCAAGGAGTGGGAGGCGGAGGATCAAGATGGTCTCG
184 CGGAATTCAGGAAACATCGTGG
185 CGGAATTCAGGAAACCAAGGAGAAGGAGGACACCCATTAGGA
186 ACACGGCTTGGAGGCGCTGGAGGAGGAAAGGACCCAGG
187 ACACGGCTTGAAGGCGCTGGAGGAGGAAAGGACCCATTGCTCT
188 TGCTGCTGCTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
189 CGAAAGGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
190 GGGTCTGGCTCTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
191 AGAACGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
192 CCTTGTGTCGCCCCAGGTGGTGTAGCTGGTGTAGCGACAGGAGG
193 TCGGGCTGGCGGGGAGTCTGGTGTAGCTGGTGTAGCGACAGGAGG
194 CGGATTCAGGAGTACTGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
195 CGGAATTCAGGAAACATCGTGG
196 TGATGTTAGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
197 TGGCCGGCCGTCTGGAGGAAAGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
198 TATGTCGCTCTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
199 AGACAGGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
200 AGACAGGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
201 AGACAGGAGGACCGCCGAGGAGGAAAGGACCCAGG
202 AGACTAAGACAGCTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGG
203 TGAGGGTGTAGCTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGG
204 CCTTGTGTCGCCCCAGGTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGGTGTAG
205 CGGGTGTAGGGGGGTGTAGCTGGTGTAGCTGGTGTAGCTGG
206 TGAAAGGCGCCATACCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
207 GGG
208 CCAAGAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
209 AGGGCGACGGCTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
210 AGGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
211 AGGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
212 GCGATCTGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
213 TCTGGTGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
214 CGGGCCGGACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
215 TGTGGCAAGATCTGGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
216 AGGGCGACGGCTGGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
217 GGGTGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
218 AGCTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
219 CGGAATTCAGGAAACATCGTGG

図1-1(続く)

【図 1 1 c】

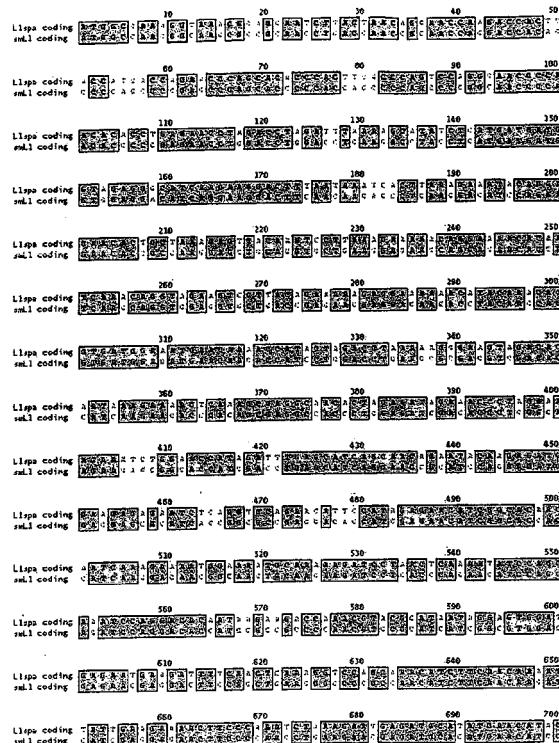
図11(続く)

【 図 1 1 d 】

377 GGTTCTATGTCCTGGCCCACTCTTGTGGGTTGTGTCCTCT
 378 GGGCAAGGACGAAAGCAGAAGGGACATCTAGCAAGGAAGGACATCTAG
 379 CGGAATTATAGTGTCTTGCGCGCATGAGTGTCTCTTC
 380 CGGAATTATAGTGAAGAACGAGTGGCGCATGAGTGTCTCTTC
 381 TGGCGATGGTGGCTGAGTGTGCTGATGGCGCATGAGTGTCTCTTC
 382 CAAGACGGGATCGCGTACACCGTACCGCCCGTGCAGCATGCCAT
 383 CAGCGGTGTTGGCCGCTCTTGTATGATGGCCATGCCGACGGG
 384 GAGCGGCCAACACUGCGTACCGCCGCGGCTGGCCGATGCCGAC
 385 TTTCGAGCTTACAGCAGTCAGTCAGCAGTCGGCGATCTCCGGCCCG
 386 CTGCTGGTGGACTGAACTGGTGACGGCGCTCTGGAAAGACGG
 387 AGCTCCAGTCGGCGGAGGAAAGGCGGCGGCTCTGGAAAGACGG
 388 CTGCGGCTGGCTGAGTGTGCTGAGATCCCGTACGCCCGCCATGCC
 389 TACTCTGGTGGATGAGTCAGCAGGGATGGGGATGGGGGGTGGAG
 390 CATCTACCCAGGAGGAGTACAGGAGGCTGTGCTAACGACACCTG
 391 AACAGGGGGGGGATGAGTACGGGGTGCAGGGTCTCTTGTAGCG
 392 GTTCATCCGGCCGGCTGTCAACATGCCAACAGCTGGAAACGCC
 393 ATTCATCATGATCATGGGGGACTCTGGGGTGTGGCTGGCTGCTG
 394 CACCATGATGGTGGATGATGGGGTGCAGGGTCTCTTGTAGCG
 395 CGGAATTATGGTGGATGATGGGG
 396 CGCGCTGGAGATGATTGTGAGTAAGAGATGTGGGGACATGCC
 397 CTGCTTGGATGGCGGGTGTAGTCTACCTGATGATGTGCCCCAT
 398 TAGCGGCCCATACAAAGACGACGAGGTTCTACGCTCTGGTGC
 399 CAGGATGATGGTCCTGCGTCTACGAGGCTGGCCACAGGCTGAT
 400 CTGGAGCTGCTGAGTCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 401 CGGCCATAGCTGCTGAGTCGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 402 ATCTCGACTGCTGAGTCGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 403 AGCGCTGAGTGGTGTGATGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 404 CCATTATCATCTTGGCTGTTCTGGGGGGCTGGTAGCGGTG
 405 CGCGAACATTAATGGTATTATCTTAATCTAACGCTGAAATTAT
 406 GAAGGGCGGCTGACTTAATAAAAGAAATAATTAGCAGCTGATTAG
 407 TTGACTGGCGCCTCTATATGACCGGCCGACGACACGGCACCAT
 408 CGGATGATGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 409 CGGATGATGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 410 GTGGCGCGGCGGATGATGCGTCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
 411 GGCGCTCGGGGGATGATGCGTCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
 sensenumber sL1 linkersense
 sensenumber sL1 linkersense

1

【 1 2 a 】



例 1.2. $\Omega = \{x_1 < 0\}$

【図12b】

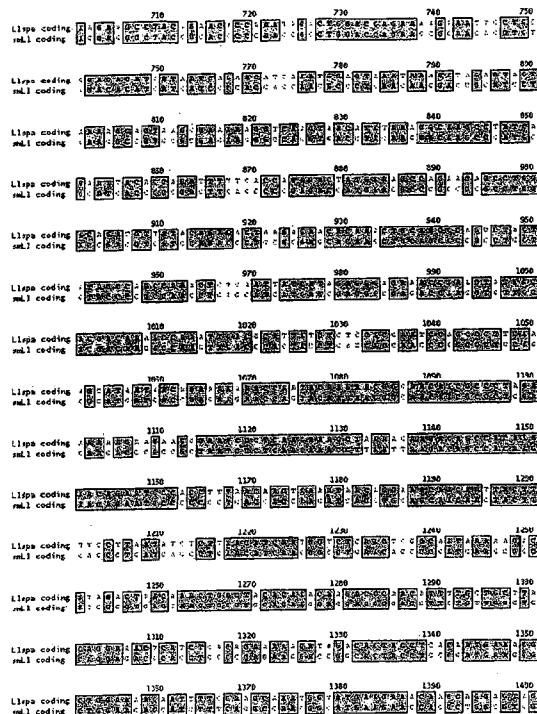


図12(続く)

【図12c】

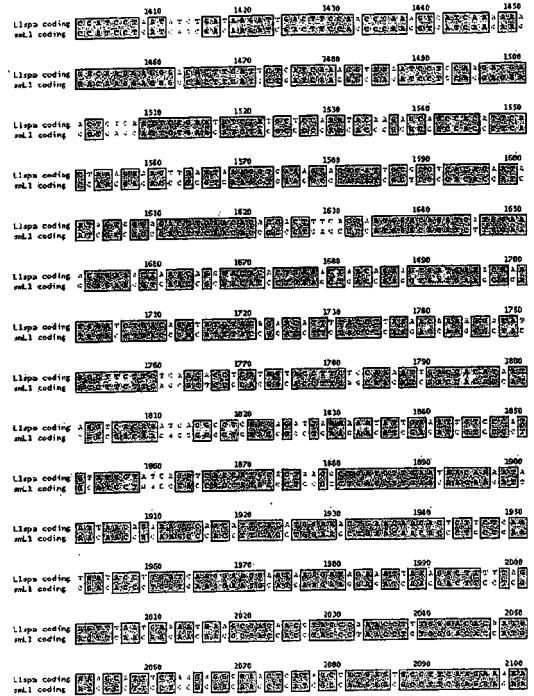


図12(続く)

【図12d】

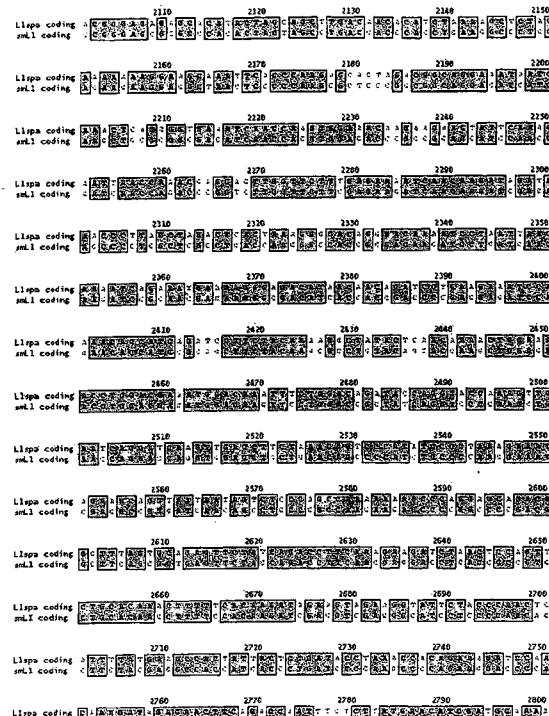


図12(続く)

【図12e】

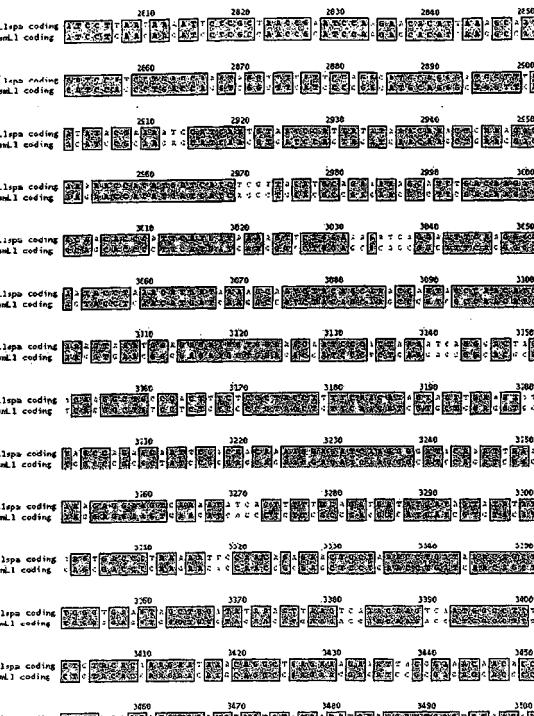


図12(続く)

【図12f】

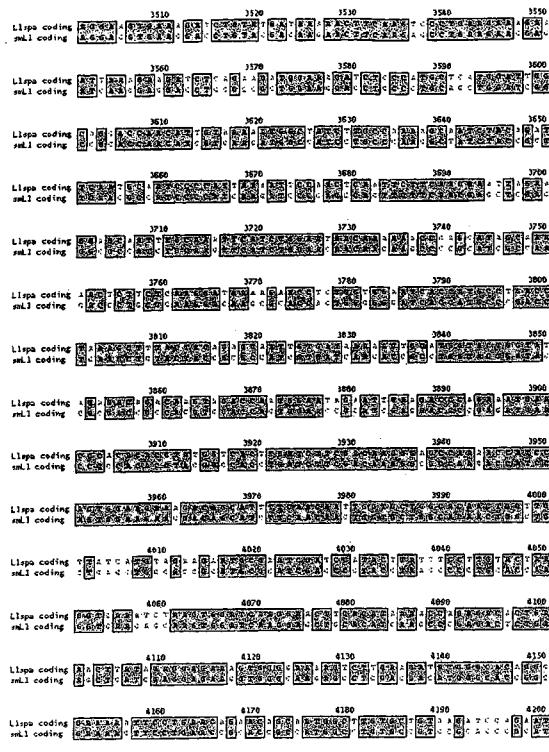


図12(続k)

【図12g】

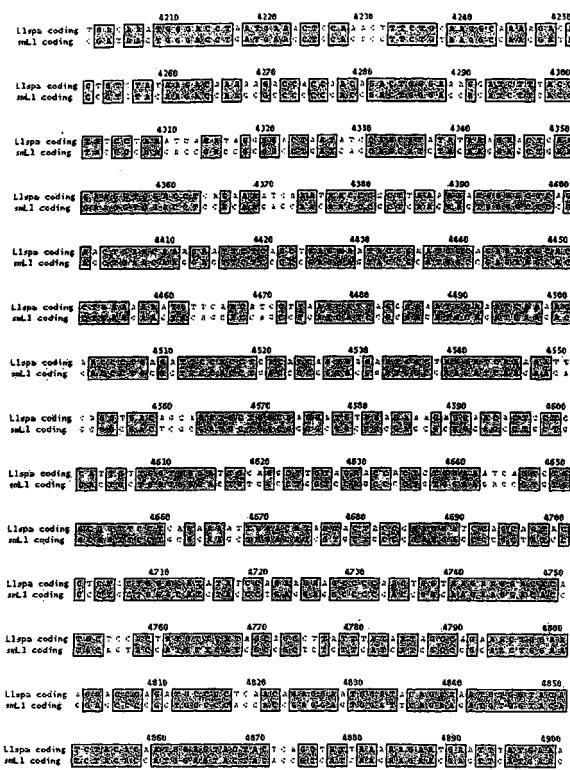


図12(続k)

【図12h】

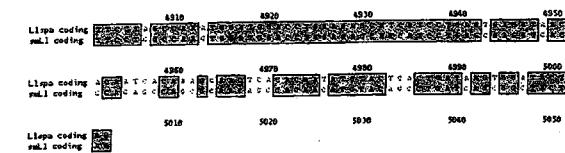


図12

【配列表】

0004653751000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジェフリー エス ハン

アメリカ合衆国 メリーランド州 21201 バルティモア カシードラル・ストリート 9
00, 506

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 米国特許第06150160(US,A)

Mol. Cell. Biol., 1986年, Vol.6, No.1, p.168-182

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003年 4月29日, Vol.100, No.9, p.5280-5285

Supporting information for Brouha et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10.1073/pnas.0831042100, 2003年 4月 7日, Supporting Figure 6, URL, <http://www.pnas.org/content/suppl/2003/03/31/0831042100.DC1/1042Fig6legend.html>

SCIENCE, 1995年, Vol.269, p.400-403

CHAKRABORTY, FASEB J., FASEB, 1993年, Vol.7, P971-977

NATURE, 2004年 5月20日, Vol.429, p.314-318

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/12、15/63

A61K 48/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq