

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3940959号

(P3940959)

(45) 発行日 平成19年7月4日(2007.7.4)

(24) 登録日 平成19年4月13日(2007.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 39/275 (2006.01)	A 6 1 K 39/275	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C O 7 K 14/065 (2006.01)	C O 7 K 14/065	
請求項の数 21 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平9-501769	(73) 特許権者	ヴァイロジェネティクス コーポレイション
(86) (22) 出願日	平成8年6月6日(1996.6.6)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 121
(65) 公表番号	特表2001-520507(P2001-520507A)		80 トロイ レンスラー テクノロジー
(43) 公表日	平成13年10月30日(2001.10.30)		パーク ジョーダン ロード 465
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/009454	(74) 代理人	弁理士 柳田 征史
(87) 国際公開番号	W01996/039491	(74) 代理人	弁理士 佐久間 剛
(87) 国際公開日	平成8年12月12日(1996.12.12)	(72) 発明者	パオレッティ, エンゾ
審査請求日	平成15年4月1日(2003.4.1)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 120
(31) 優先権主張番号	08/471,014		54 デルマー マーレイ アヴェニュー
(32) 優先日	平成7年6月6日(1995.6.6)		297
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	08/658,665		
(32) 優先日	平成8年6月5日(1996.6.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 組換えボックスウイルスーサイトメガロウイルス組成物および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ボックスウイルスゲノムの非必須領域に外来DNAを含有する組換えボックスウイルスであって、前記DNAは、アミノ酸715-772が欠失されたgB、またはアミノ酸715-772が欠失され、切断部位がArgThrLysArgSerThrからArgThrIleArgSerThrに修飾されたgBであるHCMVタンパク質を、単独でまたはHCMV gH、gL、pp150、pp65、IE1、2-32位のアミノ酸が欠失されたIE1、292-319位のアミノ酸が欠失されたIE1、またはIE1エクソン4セグメントの少なくとも1つと共に、コードすることを特徴とする組換えボックスウイルス。

【請求項2】

修飾組換えウイルスであって、ウイルスにコードされている遺伝子機能が不活化されていることにより該ウイルスのビルレンスが弱毒化されていることを特徴とする請求項1の組換えボックスウイルス。

【請求項3】

トリボックスウイルスであることを特徴とする請求項1の組換えボックスウイルス。

【請求項4】

ボックスウイルスがワクシニアウイルスであることを特徴とする請求項1の組換えボックスウイルス。

【請求項5】

ワクシニアウイルスであり、少なくとも1つのオープンリーディングフレームを欠失させ

ることにより遺伝子機能が不活化されていることを特徴とする請求項2の組換えボックスウイルス。

【請求項6】

欠失された遺伝子機能が、C7L-K1Lオープンリーディングフレームまたは宿主領域領域を含むことを特徴とする請求項5の組換えボックスウイルス。

【請求項7】

少なくとも1つの追加のオープンリーディングフレームが欠失されており、該追加のオープンリーディングフレームが、J2R、B13R+B14R、A26L、A56R、およびI4Lから成る群より選ばれることを特徴とする請求項6の組換えボックスウイルス。

10

【請求項8】

少なくとも1つの追加のオープンリーディングフレームが欠失されており、該追加のオープンリーディングフレームが、チミジンキナーゼ遺伝子、出血性領域、A型封入体領域、血球凝集素遺伝子、およびリボヌクレオチドレダクターゼ大サブユニットから成る群より選ばれることを特徴とする請求項6の組換えボックスウイルス。

【請求項9】

J2R、B13R+B14R、A26R、A56R、C7L-K1LおよびI4Lがウイルスから欠失されていることを特徴とする請求項7の組換えボックスウイルス。

【請求項10】

チミジンキナーゼ遺伝子、出血性領域、A型封入体領域、血球凝集素遺伝子、宿主領域領域およびリボヌクレオチドレダクターゼ大サブユニットがウイルスから欠失されていることを特徴とする請求項8の組換えボックスウイルス。

20

【請求項11】

NYVAC組換えウイルスであることを特徴とする請求項9の組換えボックスウイルス。

【請求項12】

NYVAC組換えボックスであることを特徴とする請求項10の組換えボックスウイルス。

【請求項13】

修飾組換えトリボックスウイルスであって、修飾により宿主内におけるビルレンスが弱毒化されていることを特徴とする請求項2の組換えボックスウイルス。

【請求項14】

ウイルスがカナリアボックスウイルスであることを特徴とする請求項13の組換えボックスウイルス。

30

【請求項15】

カナリアボックスウイルスが、Rentschlerワクチン株の1つであって、ニワトリ胚繊維芽細胞による200回以上の継代培養により弱毒化され、そのマスター種株が寒天培地下の4回の連続的なプラーク精製に供された後、そのプラーククロンが5回の追加の継代培養により増殖されたものであることを特徴とする請求項14の組換えボックスウイルス。

【請求項16】

ALVAC組換えウイルスであることを特徴とする請求項15の組換えボックスウイルス。

【請求項17】

前記DNAが、アミノ酸715-772が欠失され、切断部位がArgThrLysSerThrからArgIleArgSerThrに修飾されたHCMV gBタンパク質を、HCMV pp65またはIE1の少なくとも1つと共にコードすることを特徴とする請求項3の組換えボックスウイルス。

40

【請求項18】

前記DNAが、アミノ酸715-772が欠失され、切断部位がArgThrLysArgSerThrからArgThrIleArgSerThrに修飾されたHCMV gBタンパク質を、HCMV pp65またはIE1の少なくとも1つと共にコードすることを特徴とする請求項4の組換えボックスウイルス。

【請求項19】

vP1128またはvP1145であることを特徴とする請求項4の組換えボックスウイルス。

【請求項20】

50

請求項 1、2、3、4、11、13、14、15または16のいずれかに記載の組換えボックスウイルスを適当な担体と混合して含むことを特徴とする免疫応答を誘起するための組成物。

【請求項 2 1】

インビトロ培養される細胞内で遺伝子産生物を発現させる方法であって、該細胞に請求項 1、2、3、4、11、13、14、15または16のいずれかに記載の組換えボックスウイルスを導入することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

この出願は、1995年6月6日出願された米国特許出願08/471,014号の一部係属出願であり、該08/471,014号出願は、1993年8月13日出願され今では米国特許第5,494,807号となっている米国特許出願第08/105,483号の一部係属出願であり、該08/105,483号出願は、1992年3月6日出願された米国特許出願第07/847,951号の一部係属出願であり、該07/847,951号出願は、1991年6月11日出願された米国特許出願第07/713,967号の一部係属出願であり、該07/713,967号出願は、1991年3月7日出願された米国特許出願第07/666,056号の一部係属出願であり；1993年3月24日出願された米国特許第08/036,217号は、米国特許出願第07/666,056号の一部係属出願であり、1994年11月15日に米国特許第5,364,773号として発行されている。この出願は、さらに、1993年9月21日出願され現在は米国特許第5,482,713号となっている米国特許出願第08/124,668号の一部係属出願であり、該08/124,668号出願は、1990年4月4日出願され現在は米国第5,338,683号となっている米国特許出願第07/502,834号の分割出願であり；第07/502,834号出願は、1989年8月16日出願された米国特許出願第07/349,488号出願の一部係属出願であり、該07/349,488号出願は、1989年8月17日出願された米国特許第07/339,004号の一部係属出願であり；さらに、1987年8月27日出願された米国特許出願第07/090,209号の一部係属出願であり、該07/090,209号出願は、1984年7月19日出願され現在では米国特許第4,722,848号となっている米国特許出願第06/622,135号の分割出願であり、該06/622,135号出願は、1982年12月8日出願され現在では米国特許第4,603,112号となっている米国特許出願第06/446,824号の一部係属出願であり、該06/446,824号出願は、1981年12月24日出願され現在では米国特許第06/334,456号の一部係属出願であった。これらの出願および特許を参考のために本出願に引用する。

発明の分野

本発明は、変性（修飾）ボックスウイルスならびにその製造および使用方法に関し；例えば、ワクシニアウイルスまたはトリ（鳥類）ボックス（例えば、カナリアボックスまたは家禽ボックス）、例えば変性組換えボックスウイルス—サイトメガロウイルス（CMV）、例えば、弱毒化組換え体のようなヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、特にNYVACまたはALVAC CMVまたはHCMV組換え体に関するものである。さらに詳細には、本発明は、外来遺伝子を挿入し発現させて、CMVまたはHCMVウイルスに対して免疫応答を誘起するための安全な免疫化媒体として用いられる改良ベクターに関する。すなわち、本発明はCMVまたはHCMVの遺伝子産生物を発現する組換えボックスウイルス、および、宿主またはインビトロ（例えば、半ビボモダリティ）投与されたCMVまたはHCMV感染に対して免疫応答を誘起する免疫原性組成物に関し、さらには、該ボックスウイルスの発現産生物であって、それ自身が免疫応答を誘起、例えば抗体を産生するのに有用な生成物に関し、ここで、該抗体は、血清反応陽性または血清反応陰性の個体におけるCMVまたはHCMV感染に対して有用であり、また、該発現産生物またはそれから誘起される抗体は、状況に応じて動物またはヒトまたは培養細胞から単離されることにより、ウイルスもしくは感染細胞またはその他の系における抗原または生成物の発現の検出用の診断キット、試験または分析法を構築するのに有用なものである。そのような単離された発現産生物は、各種の系、宿主、血清もしくはサンプルにおける抗体の検出、または抗体の産生に特に有用である。本発明のボックスウイルス組換え体は好ましくは、CMVまたはHCMVのgB、gH、gL、pp150、pp65およびIEIのいずれかまたは全てのコードするDNAを含有し、一部切除された（truncated）IEIを発現する組換え体も含む。そして、該組換えボックスウイルスDNAは、CMVもしくはHCMVまたはそ

10

20

30

40

50

これらの抗原の存否を検出するためのCMVもしくはHCMV用プローブまたはPCRプライマー調製に有用である。

本出願においては、幾つかの刊行物を参照している。これらの参考文献は、本明細書の末尾の特許請求の範囲の前にまとめて引用しているか、あるいは、刊行物について言及している個所においてそれぞれの刊行物を引用しており、それらの内容を本明細書中に包含させることとする。

発明の背景

外来遺伝子を挿入し発現させるためにはワクシニアウイルス、および最近は、その他のポックスウイルスが用いられている。生きた感染性ポックスウイルス内に外来遺伝子を挿入する基本的な手法は、ドナープラスミド内の外来遺伝子をはさむ（フランキングする）ポックスDNA配列と、レスキューウイルスであるポックスウイルス内に存在する相同配列との間で組換えを起こすことである（Piccini他、1987）。

詳述すれば、組換えポックスウイルスは、当該技術分野で既知であり、また、米国特許第4,769,330号、第4,772,848号、第4,603,112号、第5,100,587号および第5,179,993号に記載のワクシニアウイルスまたはトリポックスウイルスのようなポックスウイルスの合成組換え体を創製する方法（これらの特許の開示を参考のために本明細書に引用しておく。）に類似の2つの工程で構築される。

第1の工程として、当該ウイルスに挿入すべきDNA遺伝子配列、特に、非ポックス源からのオープンリーディングフレームが、ポックスウイルスDNAの一部に相同的なDNAが予め挿入されている大腸菌プラスミド構造体に導入される。これとは別に、挿入されるべきDNA遺伝子配列をプロモータに連結しておく。プラスミド構造体におけるプロモータと遺伝子の連結体の位置は、可欠（nonessential）遺伝子座を含有するポックスDNAの領域をはさむDNA配列に相同的なDNAにより、該プロモーター遺伝子連結体の両端がはさまれているようにしておく。このようにして得られたプラスミド構造体は、次いで、大腸菌内で培養、増幅され（Clewell、1972）、単離される（Clewell他、1969；Maniatis他、1982）。

第2の工程として、挿入されるべきDNA遺伝子配列を含有する単離後のプラスミドは、ポックスウイルスとともに、培養細胞、例えば、ニワトリ胚線維芽細胞に形質転換（トランスフェクション）される。プラスミド内の相同的ポックスDNAと、ウイルスゲノムとの間の組換えにより、ポックスウイルスのゲノムの可欠領域に外来DNA配列が存在する変性ポックスウイルスが得られる。「外来（foreign）」DNA配列という語は、外因性DNA、特に非ポックス源からのDNAであって、該外因性DNAが導入されているゲノムによって通常は産生されない遺伝子産物をコードするDNAを指称する。

遺伝子組換えは、一般に、2つのDNA鎖間の相同的DNA部分の交換である。ウイルスによっては、DNAの代わりにRNAとなることもある。核酸の相同的部分とは、同じ配列の核酸塩基を有する核酸（DNAまたはRNA）の一部分である。

遺伝子組換えは、本来、感染宿主細胞内で新しいウイルスゲノムが複製または産生される間に起こり得るものである。すなわち、2種もしくはそれ以上の異なるウイルスまたはその他の遺伝子構造体が共感染した（co-infected）宿主細胞内で起こるウイルス複製サイクル中に、ウイルス遺伝子間の遺伝子組換えが起こり得る。第1のゲノム由来のDNAの一部が交換させられて、この第1のウイルスゲノムに相同的なDNAを有する第2の共感染性ウイルスのゲノムの一部を構成する。

しかしながら、組換えは、完全に相同的でない異なるゲノムにおけるDNA部分間でも起こり得る。第1のゲノム由来のそのようなDNAの一部分が別のゲノムの一部分に相同的であるが、その第1のDNA部分に、例えば、遺伝子マーカーや抗原決定基をコードする遺伝子が挿入されて存在しているような場合には、組換えが起こり、その組換え産生物は組換えウイルスゲノム内のそのような遺伝子マーカーや遺伝子の存在により検出され得るようになる。最近は、組換えワクシニアウイルスを調製するためにその他の戦略も報告されている。

変性された感染性ウイルスにより、挿入されたDNA遺伝子配列の発現を成功させるため

10

20

30

40

50

には2つの条件が要求される。第1に、ウイルスの可欠領域に挿入を行い、変性ウイルスの生存性が維持されるようにしなければならない。挿入DNAの発現に関する第2の条件は、該挿入DNAに対して至適な関係でプロモータが存在しているということである。プロモータの位置は、発現されるべきDNA配列の上流にあるようにしなければならない。ワクシニアウイルスは天然痘に対する免疫処置に使用されて成功をおさめ、1980年には世界的に天然痘を撲滅させた。その歴史の過程でワクシニアの多くの菌株が出現した。これらの異なる菌株は、種々の免疫原性を示し、また、程度の差はあるが、いろいろな合併症に関連する可能性があるとして、その最も深刻なものはワクチン接種後の脳炎と全身性ワクシニアである (Behbehani, 1993)。

天然痘の撲滅に伴い、ワクシニアの新しい役割、すなわち、外来遺伝子を発現させるための遺伝子工学用ベクターとして役割が重要となった。きわめて多くの異種抗原をコードする遺伝子がワクシニア内で発現され、その結果、対応する病原体による攻撃 (チャレンジ) に対する防御免疫をもたらしたことも多い (Tartaglia他による総説、1990a)。

ワクシニアウイルスの遺伝学的経歴は、発現される外来免疫原の防御効能に影響を与えることが示されている。例えば、ワクシニアウイルスのWyethワクチン株内でエプスタインバーウイルス (EBV) gp340が発現されても、EBVウイルスで引き起こされるリンパ腫に対してタマリンを防御しなかったが、ワクシニアウイルスのWR研究室株内で同じ遺伝子を発現させると防御効果があった (Morgan他、1988)。

ワクシニアウイルスに基づき組換えワクチンを得ようとする場合には効力と安全性との間に精密なバランスをとることがきわめて重要である。組換えウイルスが与える免疫原は、ワクチン投与された動物内で防御能のある免疫応答を誘起するが、実質的に病原性が無いものでなければならない。したがって、ベクター株を弱毒化することが、現在の技術状況では最も望ましいであろう。

多くのワクシニア遺伝子が、組織培養におけるウイルスの成長に可欠であることが確認されており、それらを欠失させ不活化することにより、いろいろな動物系におけるビルレンス (毒性) が減少される。

ワクシニアウイルスのチミジンキナーゼ (TK) をコードする遺伝子についてはマッピングが行われ (Hruby他、1982)、また、配列決定も行われている (Hruby他、1993; Wier他、1993)。チミジンキナーゼ遺伝子が不活化または完全欠失しても、広範な組織培養中でワクシニアウイルスの増殖は妨げられない。また、TK⁻ワクシニアウイルスは各種の投与法により各種の宿主における接種部位においてインビボ複製する能力を有する。

単純ヘルペスウイルス2型については、TK⁻ウイルスをモルモットに腔内投与すると、TK⁺ウイルスの投与の場合よりも脊髄中のウイルス力価がかなり低くなることが示された (Stanberry他、1985)。ヘルペスウイルスではインビトロでのTK活性は、代謝の活発な細胞中ではウイルスの増殖に重要でないが、静止細胞中ではウイルス増殖に必須であることが示された (Jamieson他、1974)。

マウスに脳内投与および腹膜内投与することによりTK⁻ワクシニアが弱毒化されることが示された (Buller他、1985)。神経毒性のあるWR実験室株およびWyethワクチン株の双方について弱毒化が認められた。皮膚内投与されたマウスにおいては、TK⁻組換えワクシニアが、親株のTK⁺ワクシニアウイルスと同等の抗ワクシニア中和抗体を産生したが、これは、この試験系では、TK機能の喪失がワクシニアウイルスベクターの免疫原性を有意に減少させないことを示唆している。TK⁻およびTK⁺の組換えワクシニアウイルス (WR株) をマウスに鼻内接種すると、他の部位 (脳を含む) へのウイルスの伝播が有意に減少したことが見出された (Taylor他、1991a)。

ヌクレオチドの代謝に関連する別の酵素は、リボヌクレオチドレダクターゼである。単純ヘルペスウイルス (HSV) 内でコードされているリボヌクレオチドレダクターゼの活性が、その大サブユニットをコードしている遺伝子を欠失させることにより喪失しても、インビトロの分裂細胞中でのウイルス増殖やDNA合成は影響されないが、無血清細胞でのウイルスの増殖能力は極めて損なわれることが示された (Goldstein他、1988)。眼部の急性HSV感染および三叉神経ガングリオンにおける再活性性潜伏感染に関するマウスモ

10

20

30

40

50

デルを用いた場合、リボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニットを欠失したH S Vについては、野生型H S Vに比べてビルレンスが減少することが示された (Jacobson他、1989)。

ワクシニアウイルスにおいては、リボヌクレオチドレダクターゼの小サブユニット (Slabough他、1988) および大サブユニット (Schmidt他、1988) のいずれも同定されている。ワクシニアウイルスのWR株においてリボヌクレオチドレダクターゼを挿入不活化すると、マウスの頭蓋内接種により測定され得るようなウイルスの弱毒化がもたらされる (Ghild他、1990)。

ワクシニアウイルスの血球凝集素 (H A) 遺伝子についてはマッピングおよび配列決定が行われている (Shida、1986)。ワクシニアウイルスのH A 遺伝子は、組織培養中の増殖にとって不可欠なものである (Ichihashi他、1971)。ワクシニアウイルスのH A 遺伝子を不活化すると、頭蓋内投与されたウサギにおいては神経毒性化が減少し、また、皮膚内投与部位におけるウサギの損傷は小さくなっていた (Shida他、1988)。H A の遺伝子座を利用して、ワクシニアウイルスのWR株 (Shida他、1987)、Lister株の誘導体 (Shida他、1988) およびCopenhagen株 (Guo他、1989) に外来遺伝子を挿入している。外来遺伝子を発現する組換えH A ワクシニアウイルスは、免疫原性があり (Guo他、1989; Itamura他、1990; Shida他、1988; Shida他、1987)、また、関連する病原体によるチャレンジに対して防御効果を有する (Guo他、1989; Shida他、1987) ことが示された。

牛痘ウイルス (Brighton赤色株) は、鶏卵の漿尿膜上に赤色 (出血性) 痘瘡を生じさせる。牛痘ゲノム内で自然欠失すると白色痘瘡を生じる変異体となる (Pickup他、1984)。出血性機能 (u) は、初期遺伝子によってコードされた38k D aのタンパク質によることがマッピングされている (Pickup他、1986)。この遺伝子は、セリンプロテアーゼインヒビターと相同性を有し、牛痘ウイルスに対する宿主の炎症応答を阻害し (Palumbo他、1989)、また、血液凝固のインヒビターである。

このu遺伝子は、ワクシニアウイルスのWR株中に存在する (Kotwal他、1989b)。外来遺伝子を挿入することによりu領域が不活化されているWRワクシニアウイルス組換え体が接種されたマウスは、u遺伝子がインタクトのままである類似の組換えワクシニアウイルスが接種されたマウスよりも、該外来遺伝子に対して高い抗体レベルを産生する (Zhou他、1990)。このu領域は、ワクシニアウイルスのCopenhagen株内で欠陥性非機能形態として存在する (Goeberu他による報告 (1990a,b) においてB13およびB14と称されているオープンリーディングフレーム)。

感染細胞内において牛痘ウイルスは、細胞質A型封入体 (A T I) として局在化している (Kato他、1959)。A T I の機能は、動物から動物への伝播に際して牛痘ウイルスビリオンを防御することにあると考えられている (Bergoin他、1971)。牛痘ゲノムのA T I 領域は160k D aのタンパク質をコードしており、これがA T I 封入体のマトリックスを形成する (Funahashi他、1988; Patel他、1987)。ワクシニアウイルスは、そのゲノムに相同領域を含有するが、一般にA T I を産生しない。ワクシニアのWR株においては、ゲノムのA T I 領域は94k D aのタンパク質として翻訳される (Patel他、1988)。ワクシニアウイルスのCopenhagen株においてはA T I 領域に相応するD N A 配列の大部分は欠失されており、該領域の残存する3'末端はA T I 領域の上流にある配列と融合して、オープンリーディングフレーム (O R F) A26Lを形成する (Goeberu他、1990a,b)。ワクシニアウイルスの左末端近傍については、各種の自然欠失 (Altenburger他、1989; Drillien他、1981; Lai他、1989; Moss他、1981; Paez他、1985; Panicali他、1981) や人為的欠失が報告されている。10kbが自然欠失したワクシニアウイルスのWR株 (Moss他、1981; Panicali他、1981) は、マウスに頭蓋内接種することにより弱毒化されることが示された (Buller他、1985)。後に、この欠失部は17ヶのO R Fを含む可能性が示された (Kotwal他、1988b)。該欠失部内にある特別の遺伝子としては、ピロカインN1Lおよび35k D aタンパク質 (Goebel他による1990a,bの報告でC3Lと称されたもの) が挙げられる。N1Lを挿入不活化すると、通常のマウスおよびヌードマウスのいずれについても、頭蓋内接種によりビルレンスが減少する (Kotwa他、1989a)。上記の35k D aタンパク質は

10

20

30

40

50

、ワクシニアウイルス感染細胞の培地にN 1 Lと同様に分泌される。このタンパク質は、補体コントロールタンパク質群、特に補体4 B結合タンパク質 (C 4 bp) に相同性である (Kotwal他、1988a)。細胞性C 4 bpと同様に、ワクシニアの35k D aタンパク質は補体の第4成分と結合し、古典的補体カスケードを阻害する (Kotwal他、1990)。このように、ワクシニアの35k D aタンパク質は、該ウイルスが宿主の防御機構を回避するのを助けることに関与しているものと考えられる。

ワクシニアゲノムの左末端は、宿主域遺伝子として同定された2つの遺伝子、K 1 L (Gillard他、1986) およびC 7 L (Perkus他、1990) を含む。これらの遺伝子の双方が欠失すると、各種のヒト細胞系でワクシニアウイルスの増殖能が減少する (Perkus他、1990)。

この他に、本来的に宿主が制限されているポックスウイルスであるトリポックスウイルスを使用する2つのワクチンベクター系がある。すなわち、家禽ポックスウイルス (F P V : fowlpoxvirus) およびカナリアポックスウイルス (canarypoxvirus) の両者に工夫を施して外来遺伝子産物を発現させてきた。家禽ポックスウイルス (F P V) は、ポックスウイルス科のトリポックス (Avipox) 属の基本ウイルスである。このウイルスは、家禽類に経済的に重要な疾病を引き起こすが、1920年代から弱毒化生ワクチンを使用することにより良好な対策が講じられてきた。トリポックスウイルスの複製は鳥類に限られ (Matthews他、1982)、ヒトを含む非鳥類においてトリポックスウイルスの感染が起こったという文献の報告は存しない。このように宿主が制限されているので、他の種にウイルスが伝染することに対する本質的な安全性が確保され、トリポックスウイルス由来のワクチンベクターは魅力ある手段として動物やヒトへ応用される。

F P Vは、家禽類病原体由来の抗原を発現する優れたベクターとして使用されてきた。ビルレントトリインフルエンザウイルスの血球凝集素タンパク質がF P V組換え体で発現された (Taylor他、1988a)。この組換え体をニワトリおよび七面鳥に接種すると、同種または異種のビルレントインフルエンザウイルスのいずれのチャレンジに対しても防御能のある免疫応答が誘起された (Taylor他、1988a)。ニューカッスル病ウイルスの表面糖タンパクを発現するF P V組換え体も開発された (Taylor他、1990; Edbauer他、1990)。宿主制限によりF P VおよびC P Vの複製はトリ系に限られているにも拘わらず、これらのウイルスから誘導された組換え体は、非トリ源細胞において外来遺伝子を発現することが見出された。さらに、そのような組換え体ウイルスは、該外来遺伝子産物に対する免疫応答を引き起こし、場合によっては、相応する病原体によるチャレンジに対する防御能を有することが示された (Tartaglia他、1993a,b; Taylor他、1992; 1991b; 1988b)。

ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) は、ベータヘルペスウイルス亜科 (ヘルペスウイルス科) の一種である。H C M Vはヒトに偏在しており、通常は軽症または不顕性の急性感染の後、保続または潜在化する。しかしながら、H C M Vは、子宮内感染した幼児においては発病および死亡の主要な原因となっている (Stagno他、1983)。H C M Vは、臓器移植 (Glenn他、1981) および免疫無防備状態の宿主 (Weller他、1971) における最も一般的な感染合併症である。エイズ患者においては、C M V網膜炎が失明の主因となっている (Roarty他、1993; Gallant他、1992; Gross他1990)。冠状動脈休止症におけるH C M Vの役割の可能性の1つが最近検討された (Speir他、1994)。H C M VのTowne株を生きたままで弱毒化したものは、血清陰性の腎臓移植受領者を防御しH C M V感染による重い臨床症状を引き起こさないようにし (Plotkin他、1976、1984および1989)、また、当初血清陰性の健康な個体を防御して、H C M V野性株を皮下チャレンジされた後に感染および臨床症状を引き起こさない (Plotkin他、1989) ことが示された。ヒトにおけるヘルペスウイルス感染の特徴として潜伏中に再活性化現象があり、また、H C M Vの菌株の中にはインビトロで細胞を悪性に形質転換する能力を有するものがあるため、H C M Vの生ワクチンを使用することが従来より関心を持たれている。これらの理由から、ヒトの免疫には組換えによるサブユニットC M Vワクチンの方が好ましいであろう。

個々のH C M Vタンパク質の防御免疫における役割は不明である。H C M Vエンベロープに関連する3種類の免疫学的に異なる糖タンパク質、すなわち、g C I (gp55およびgp93

10

20

30

40

50

-130)、g C I I (gp47-52) および g C I I I (gp85-p145) について検討されている (Gretch他、1988b)。これらの糖タンパク群のそれぞれに特異的な抗体を用いるとインビトロでH C M Vが中和されることが示された (Pachl他、1989; Rasmussen他、1989; Kari他、1986)。

g C I をコードする遺伝子はH S V - I の g B と相同性である (Cranghe他、1986)。H C M V g B は、見かけの分子量130~140 k D a のグリコシル化された非切断前駆体として合成され、これは細胞のプロテイナーゼにより処理されてN末端側の90~110 k D a の生成物とC末端側の55~58 k D a の生成物になるが、これらの生成物はジスルフィド結合されたコンプレックスとして結合状態を保持する (BrittおよびAuger、1986; BrittおよびVugler、1989; Reis他、1993)。H C M V 感染細胞のライゼートまたはH C M V ビリオンで免疫化 (免疫感作) したマウスからH C M V を中和し得るモノクローナル抗体が得られたが、該モノクローナル抗体は、前記C末端側55~58 k D a フラグメントと専ら反応性を有していた (Britt、1984; Kari他、1986; Pereira他、1984; Rasmussen他、1988)。しかしながら、生化学的に生成したgp93で免疫化すると、gp93特異的な中和m A b s (モノクローナル抗体) が得られた (Kari他、1990)。

H C M V - g B はヒト中で防御免疫を誘発するように機能するものと考えられる: 精製したg B タンパク質で免疫化すると中和抗体が誘発され (Goenczoel他、1990)、また、ヒト抗g B モノクローナル抗体は当該ウイルスを中和する (Masuho他、1987)。自然感染の後、H C M B - g B に特異的な中和抗体が認められる。ヒト血清からg B 特異性抗体を吸収してしまうと、H C M V 中和性抗体の力価は有意に減少する (55~88%、Goenczoel他、1991; 0~98% (メジアン48%)、Marshall他、1992)。さらに、生来的に血清陽性のヒトにおいてはg B タンパク質によりヘルパーT細胞が活性化されるという証拠があり (Liu他、1991)、また、幾つかの研究においてはヒト中にg B 特異的なC T L が検出されている (Borysiewicz他、1988; Liu他、1991; Riddell他、1991)。

g C I I 糖タンパク質は、U S 6 遺伝子群にある単一または複数の遺伝子によってコードされている (U S 6 からU S 11、Gretch他、1988a)。これらの糖タンパク質は、回復期の大人由来の血清中にあるヒト抗H C M V 抗体により認識される。しかしながら、持続性感染を有する生来感染幼児由来の血清はg C I I 糖タンパク質と反応せず (KariおよびGehrz、1990)、このことは、g C I I はH C M V に対するヒトの防御免疫応答に重要であろうということを示唆している。

g C I I I コンプレックスのgp86成分は、H S V - 1 の g H に相同性の遺伝子によりコードされている (Cranghe他、1988、Pachl他、1989)。H C M V の g H タンパク質は、ヒトにおける中和性免疫応答を誘発する能力がある (H C M V 感染した個体の10%に検知可能なレベルの循環性g P 特異的抗体が認められ (Rasmussen他、1991)、同様のことが実験動物についても見られる (Babooniann他、1989; Cranghe他、1988; Ehrlich他、1988; Rasmussen他、1984))。マウスg H - 特異性モノクローナル抗体は、補体に依存してウイルス感染を中和し (Bfboonian他、1989; Cranghe他、1988; Rasmussen他、1984)、そしてウイルスの蔓延を抑制し (Pachl他、1989)、これらのことから、g H はウイルスの付着、浸透および/または拡散に関与したものと思われる。

g H はH C M V 感染細胞の表面に見出されるが (Cranghe他、1988)、各種の組換え系で発現させると内形質細網に限定される (Spaete他、1991)。H C M V のU L 115遺伝子産生物 (糖タンパク質g L) を共発現 (同時発現) させると、これら2種類のタンパク質の安定したコンプレックスが生成し、そして、g H が細胞表面に輸送される (Spaete他、1993; Kaye他、1992)。

H C M V は多くのマトリックス外皮リンタンパク質を合成する。リンタンパク質pp150は、きわめて免疫原性が高く、見かけ上、他のH C M V 構造タンパク質のいずれよりも高い (Jshn他、1987)。第2のマトリックスリンタンパク質pp65は、ヒトにおいて各種の体液性応答を誘発する (Jahn他、1987; Plachter他、1990)。このタンパク質は、リンパ球増殖、I L - 2 およびインターフェロンの産生、抗体のB細胞刺激およびナチュラルキラー細胞活性を刺激することができる (Forman他、1985)。該タンパク質は、さらに、H C M

10

20

30

40

50

V-特異的でHLA-限定性の細胞障害性T細胞(CTL_s)に対する標的抗原としても機能する(Pande他、1991; Gilbert他、1993)。

HCMVに対する防御免疫応答を誘発させるには追加の構造タンパク質を必要とするものと思われる。主キャプシドタンパク質(UL86)は自然感染中に特異抗体を誘発するものとして知られ、また、CMV群に共通の抗原と考えられている(Spaete他、1996)。外皮リンタンパク質pp28(UL99)もまた、自然感染中に持続性の抗体応答を誘発するものとして知られている。さらに、このタンパク質はCTL標的抗原の1種であると考えられている(Charpentier他、1986)。上部外皮リンタンパク質のように特徴が明らかにされていないが、既知の外皮タンパク質の1種として更に検討が必要である。

組換えサブユニットワクチンには、以上の構造タンパク質に加えて、幾つかの非構造タンパク質を含ませることも考えられる。マウスサイトメガロウイルス(MCMV)pp89(HCMV IE 1の機能的ホモログ)を発現する組換えワクシニアウイルスでマウスを免疫すると、MCMVのチャレンジによる防御免疫を媒介するCD8⁺T細胞応答が誘発される(Jonjic他、1988)。ヒトCMV主要即時初期タンパク質(IE 1)は、HCMV血清陽性個体から単離されたCTL_sに対する標的であることが示されている(Borysiewicz他、1988)。IE 1は、発現される初期のウイルスタンパク質の1種であり、他のCMV遺伝子の発現を誘発し潜伏感染細胞内でウイルス寿命を開始させるのに必要であるから(BlantonおよびTevethia、1981; CameronおよびPreston、1981; DeMarchi他、1980; McDonoughおよびSpector、1983; Wathen他、1981)、IE 1に対するCTL応答は、HCMV感染を制御しおよび/または除去するのに重要であると考えられる。最近、Gilberらが提示した(1993) HCMVによって展開される機序によれば、ウイルスにコードされている他のタンパク質がクラスI主要組織適合複合体(MHC)分子と共同して、IE誘導性ペプチドの出現を選択的に妨げるということである。

組換えサブユニットHCMVワクチンには、その他の非構造タンパク質を含ませることも考えられる。即時初期タンパク質IE 2(UL122)および調節タンパク質UL69は、ヒトT細胞エピトープを含有することが知られている(Beninga他、1995)。

HCMVサブユニットワクチンを開発する1つの手法は、生のウイルスベクターを使用して関連するHCMV遺伝子産生物を発現させることである。

かくして、CMVまたはHCMVの組換えボックスウイルス、ならびにそれから得られる組成物および生成物、特にNYVACまたはALVAC由来のCMVまたはHCMV組換え体ならびにそれから得られる組成物および生成物、特に、HCMVのgB、gH、gL、pp150、pp65およびIE 1のいずれかまたは全てをコードするDNAを含有するような組換え体(一部切除されまたは変性されたIE 1および/またはgBを発現する組換え体を含む)ならびに、それから得られる組成物および生成物が提供されれば、現在の技術を前進させるきわめて望ましいものとなるであろう。

発明の目的および概要

したがって、本発明の目的は、安全性が向上した変性(修飾)組換えウイルスを提供すること、およびそのような組換えウイルスを製造する方法を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、既知の組換えボックスウイルスワクチンと比較して安全性のレベルが増大した組換えボックスウイルス抗原ワクチンまたは免疫組成物を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、ベクターが宿主内で弱毒化された毒性(ビルレンス)を有するように変性(修飾)された、宿主中で遺伝子産生物を発現する変性(修飾)ベクターを提供することにある。

本発明の別の目的は、安全性の目的は、安全性のレベルが増大した変性(修飾)組換えウイルスまたは変性(修飾)ベクターを用いて、生体内(インビトロ)で培養された細胞中で遺伝子産生物を発現する方法を提供することにある。

本発明のこれらの目的およびその他の目的ならびに効果は、以下の記述から一層明らかになるであろう。

一つの態様として、本発明は、変性組換えウイルスであって、該ウイルスにコードされて

10

20

30

40

50

いる遺伝子機能が不活化されていることによりビルレンスが弱毒化され安全性が高められた組換えウイルスに関する。その遺伝子機能は、可欠的なものであるか、またはビルレンスに関連しているものである。ウイルスとしてはボックスウイルスが有利であり、特にワクシニアウイルスまたはトリボックスウイルス、例えば家禽ボックスウイルスまたはカナリアウイルスである。この変性組換えウイルスは、そのウイルスゲノムの可欠領域に、HCMV由来の抗原またはエピトープ、例えば、HCMBのgB、gH、gL、pp150、pp65、IE1（変性または一部切除されたIE1および／またはgBを含む）のいずれかまたは全てをコードする外来DNA配列を含むことができる。

他の態様として、本発明は、接種された宿主動物内に免疫応答を誘起する抗原性、免疫原性、ないしはワクチン組成物または治療用組成物に関し、該ワクチンは、担体と変性組換えウイルスとを含み、該組換えウイルスは、ウイルスにコードされている可欠遺伝子機能が2活性化されていることによりビルレンスが弱毒化され安全性が向上している。本発明に従うこの組成物に用いられるウイルスはボックスウイルスが有利であり、特にワクシニアウイルスまたはトリボックスウイルス、例えば、家禽ボックスウイルスまたはカナリアボックスウイルスである。この変性組換えウイルスは、そのウイルスゲノムの可欠領域に、HCMV由来の抗原またはエピトープ、例えば、HCMBのgB、gH、gL、pp150、pp65、IE1（変性または一部切除されたIE1および／またはgBを含む）のいずれかまたは全てをコードする外来DNA配列を含むことができる。

さらに別の態様として、本発明は、変性組換えウイルスを含有する免疫原性組成物に関し、該変性組換えウイルスは、ウイルスにコードされている可欠遺伝子機能が不活化されていることによりビルレンスが弱毒化され安全性が高められている。この変性組換えウイルスは、そのウイルスゲノムの可欠領域に、抗原性タンパク質〔例えば、HCMBのgB、gH、gL、pp150、IE1（変性または一部切除されたIE1および／またはgBを含む）のいずれかまたは全てのようなHCMV由来のもの〕をコードする外来DNA配列を含み、該組成物は、宿主に投与されると、該抗原に特異的な免疫応答を誘起する能力を有する。

別の態様として、本発明は、インビトロ培養される細胞に、ビルレンスが弱毒化され安全性が高められた変性組換えウイルスを導入することにより該細胞内で遺伝子産物を発現させる方法に関する。この変性組換えウイルスは、そのウイルスゲノムの可欠領域に、抗原性タンパク質、例えば、HCMVのgB、gH、gL、pp150、IE1（変性または一部切除されたIE1および／またはgBを含む）のいずれかまたは全てのようなHCMV由来のタンパク質をコードする外来DNA配列を含むことができる。その後、該細胞は、個体に直接再注入されるか、または、再注入のために特定の反応性を増幅するのに使用する（半ビボ治療）ことができる。

別の態様として、本発明は、インビトロ培養される細胞に、ビルレンスが弱毒化され安全性が高められた変性組換えウイルスを導入することにより該細胞内で遺伝子産物を発現させる方法に関する。この変性組換えウイルスは、そのウイルスゲノムの可欠領域に、抗原性タンパク質、例えば、HCMVのgB、gH、gL、pp150、IE1（変性または一部切除されたIE1および／またはgBを含む）のいずれかまたは全てのようなHCMV由来のタンパク質をコードする外来DNA配列を含むことができる。得られた遺伝子産物は、ヒトまた動物に投与されて免疫応答を刺激することができる。産生された抗体は、各個体内でHCMVの予防および治療に有用であり、また、ヒトもしくは動物由来の抗体または単離されたインビトロ発現産物は、診断キット、分析または試験に用いられて、血清のようなサンプル中のHCMVもしくはHCMV由来の抗原またはそれらに対する抗体の有無（したがって、該ウイルスもしくは該産物、または該ウイルスもしくは抗原に対する免疫応答の有無）を測定するのに用いることができる。

さらに別の態様として、本発明は変性組換えウイルスに関し、該組換えウイルスは、ウイルスにコードされている可欠遺伝子機能が不活化されていることによりビルレンスが弱毒化されており、さらに、ウイルスゲノムの可欠領域に外来源のDNAを含有している。このDNAは、HCMVのgB、gH、gL、pp150、pp65、IE1（変性または一部切除

10

20

30

40

50

された I E 1 および／または g B を含む) のような H C M V をコードすることができるものである。さらに詳述すれば、遺伝子機能は、ビルレンス因子をコードするオープンリーディングフレームを欠失させることにより、または、自然の宿主制限ウイルスを利用することによって不活化されている。本発明に用いるウイルスは、ボックスウイルスが有利であり、特にワクシニアウイルスまたはトリボックスウイルス、例えば家禽ボックスウイルスまたはカナリアボックスウイルスである。オープンリーディングフレームは、J 2 R、B 13 R + B 14 R、A 26 L、A 56 R、C 7 L - K 1 L、および 14 L (Goebel 他による 1990a, b の報告における名称による) から成る群、ならびにそれらの組合せにより選択されるのが好ましい。ここで、オープンリーディングフレームは、チミジンキナーゼ遺伝子、出血性領域、A 型封入体、血球凝集遺伝子、宿主域遺伝子領域もしくはリボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニット、またはそれらの組合せから成る。ワクシニアウイルスの好適な変性 Copenhagen 株は、N Y V A C として同定されたものであり (Tartaglia 他、1992)、または、J 2 R、B 13 R + B 14 R、A 26 R、C 7 L - K 11 および I 4 L またはチミジンキナーゼ遺伝子、出血性領域、A 型封入体領域、血球凝集遺伝子、宿主域領域、リボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニットが欠失されたワクシニアウイルスである (米国特許第 5,364,773 号も参照されたい)。他の好適なボックスウイルスは、A L V A C であり、カナリアボックスウイルス (Rentschler ワクチン株) が、例えば、ニワトリ胚繊維芽細胞による 200 回以上の継代培養により弱毒化され、そのマスター種株が寒天培地下の 4 回の連続的なプラーク精製に供された後、5 回の追加の継代培養によりプラーククローンが増幅されたものである。

本発明は、さらに別の態様として、本発明による組換えボックスウイルスの発現産生物およびその使用、例えば、治療、予防、診断または試験に用いられる抗原性組成物ないしはワクチン組成物を調製することに関する。

これらの態様およびその他の態様は、以下の詳細な説明から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

以下、添付図面に沿って本発明を詳細に説明するが、この説明は本発明を例示するためのものであり、本発明はそれらの特定の態様に限定されるものではない。

図 1 は、チミジンキナーゼ遺伝子を欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 410 を形成するためのプラスミド p S D 460 を構築する方法を図示する。

図 2 は、出血性領域を欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 553 を形成するためのプラスミド p S D 486 を構築する方法を図示する。

図 3 は、A T I 領域を欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 618 を形成するためのプラスミド p M P 494 Δ を構築する方法を図示する。

図 4 は、血球凝集遺伝子を欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 723 を形成するためのプラスミド p S D 467 を構築する方法を図示する。

図 5 は、遺伝子群 [C 7 L - K 1 L] を欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 804 を形成するためのプラスミド p M P C K 1 Δ を構築する方法を図示する。

図 6 は、リボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニットを欠失させ組換えワクシニアウイルス v P 866 (N Y V A C) を形成するためのプラスミド p S D 548 を構築する方法を図示する。

図 7 は、T K 欠失遺伝子座に狂犬病糖タンパク質 G 遺伝子を挿入し組換えワクシニアウイルス v P 879 を形成するためのプラスミド p R W 842 を構築する方法を図示する。

図 8 は、C 5 O R F [SEQ ID NO:27 (配列識別番号 27)] (この C 5 O R F は 1537 位で開始し 1857 位で終結する) を含有するカナリアボックス DNA の 3209 塩基対フラグメントの DNA 配列を示す。

図 9 A および図 9 B は、組換えカナリアボックスウイルス v C P 65 (A L V A C - R G) を構築する方法を図示する。

図 10 は、N Y V A C を形成するために欠失させる O R F s (オープンリーディングフレーム) を図示する。

図 11 A から図 11 D は、予め同一のワクチンを接種するかまたはワクチンを変えて免疫化し

10

20

30

40

50

たボランティアにおけるウサギ中和抗体力価（R F F I T、IU/ml）、H D Cおよびv C P 65（ $10^{5.5}$ T C I D₅₀）のブースター効果を示すグラフである。（なお、ワクチン接種は、0日、28日および180日目に行い、抗体力価の測定は0日、7日、28日、35日、56日、173日、187日および208日目に行った。）

図12は、H C M V g B（Towne株）のD N A配列（SEQ ID N0:37）を示す。

図13Aおよび図13Bは、H 6をプロモータとするH C M V g BおよびN Y V A C配列（T K遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:38）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Bの5'末端は3447位にあり；C M V g Bをコードする配列は3324位から606位までである。）

図14Aから図14Cは、C 3 O R Fを含有するカナリアボックスD N Aの7351塩基対フラグメントのD N A配列（SEQ ID N0:39）を示す。（C 3 O R Fは1458位から開始され、2897位で終結する。） 10

図15Aから図15Cは、H 6をプロモータとするH C M V g BおよびA L V A C配列（C 3遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:40）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Bの5'末端は4425位にあり；C M V g Bをコードする配列は4301位から1581位までである。）

図16Aおよび図16Cは、H 6をプロモータとするH C M V g BおよびN Y V A C配列（A T I遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:41）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Bの5'末端は3348位にあり；C M V g Bをコードする配列は3224位から504位までである。） 20

図17は、トランスメンブレン領域が欠失されたH C M V g B（Towne株）のD N A配列（SEQ ID N0:42）を示す。

図18Aおよび図18Bは、H 6をプロモータとするH C M V g B（そのトランスメンブレン領域を欠損している）およびN Y V A C配列（A T I遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:43）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Bの5'末端は3173位にあり；C M V g Bをコードする配列は3050位から504位までである。）

図19は、トランスメンブレン領域が欠失され且つ切断部位が変性（修正）されたH C M V g B（Towne株）のD N A配列（SEQ ID N0:44）を示す。

図20Aおよび図20Bは、H 6をプロモータとするH C M V g B（トランスメンブレン領域が欠失され且つ切断部位が変性されている）およびN Y V A C配列（A T I遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:45）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Bの5'末端は3173位にあり；C M V g Bをコードする配列は3050位から504位までである。） 30

図21は、H C M V g H（Towne株）のD N A配列（SEQ ID N0:46）を示す。

図22Aおよび図22Bは、42KをプロモータとするH C M V g HとN Y V A C配列（I 4 L遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:47）を示す。（42KをプロモータとするC M V g Hの5'末端は641位にあり；C M V g Hをコードする配列は708位から2933位までである。）

図23Aおよび図23Bは、42KをプロモータとするC M V g HとA L V A C配列（C 5遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:48）を示す。（42KをプロモータとするC M V g Hの5'末端は1664位にあり；C M V g Hをコードする配列は1730位から3955位までである。） 40

図24は、42KをプロモータとするC M V g HおよびW Rフランキング配列のD N A配列（SEQ ID N0:49）を示す。（42KをプロモータとするC M V g Hの5'末端は2457位にあり；C M V g Hをコードする配列は2391位から166位までである。）

図25は、H C M V I E 1（A D 169株）のD N A配列（SEQ ID N0:50）を示す。

図26は、H 6をプロモータとするC M V I E 1およびW Rフランキング配列のD N A配列（SEQ ID N0:51）を示す。（H 6をプロモータとするC M V I E 1の5'末端は1796位にあり；C M V I E 1をコードする配列は1673位から201位までである。）

図27Aおよび図27Bは、H 6をプロモータとするC M V I E 1およびN Y V A C配列（A T I遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:52）を示す。（H 6をプロモータとす 50

るCMV IE1の5'末端は2030位にあり；CMV IE1をコードする配列は1906位から434位までである。）

図28は、292～319位のアミノ酸を欠くHCMV IE1（AD169株）のDNA配列（SEQ ID NO:53）を示す。

図29Aおよび図29Bは、H6をプロモータとするCMV IE1（292～319位のアミノ酸を欠如している）およびNYVAC配列（ATI遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:54）を示す。（H6をプロモータとするCMV IE1の5'末端は1940位にあり；CMV IE1をコードする配列は1816位から434位までである。）

図30は、HCMV IE1（AD169株）のエクソン4セグメントのDNA配列（SEQ ID NO:55）を示す。

10

図31は、H6をプロモータとするCMV IE1 エクソン4セグメントおよびALVAC配列（I4L遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:56）を示す。（H6をプロモータとするIE1 エクソン4の5'末端は630位にあり；CMV IE1 エクソン4をコードする配列は754位から1971位までである。）

図32Aおよび図32Bは、H6をプロモータとするCMV IE1 エクソン4セグメントおよびALVAC配列（C5遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:57）を示す。（H6をプロモータとするIE1 エクソン4は1647位にあり；CMV IE1 エクソン4をコードする配列は1771位から2988位までである。）

図33は、2～32位のアミノ酸を欠如するHCMV IE1（AD169株）のDNA配列（SEQ ID NO:58）を示す。

20

図34は、H6をプロモータとするCMV IE1（2～32位のアミノ酸を欠く）およびNYVAC配列（I4L遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:59）を示す。（H6をプロモータとし2～32位のアミノ酸を欠くIE1の5'末端は630位にあり；2～32位のアミノ酸を欠くCMV IE1をコードする配列は754位から2133位までである。）

図35Aおよび図35Bは、H6をプロモータとするCMV IE1（2～32位のアミノ酸を欠く）およびALVAC配列（C5遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:60）を示す。（H6をプロモータとし2～32位のアミノ酸を欠くIE1の5'末端は1647位にあり；2～32位のアミノ酸を欠くCMV IE1をコードする配列は1771位から3150位までである。）

図36は、HCMV pp65（Towne株）のDNA配列（SEQ ID NO:61）を示す。

30

図37は、H6をプロモータとするCMV pp65およびNYVAC配列（HA遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:62）を示す。（H6をプロモータとするpp65の5'末端は476位にあり；CMV pp65をコードする配列は660位から2282位までである。）

図38Aおよび図38Bは、C6 ORFを含有するカナリアボックスDNAの3706塩基対フラグメントのDNA配列（SEQ ID NO:63）を示す。（C6 ORFは377位から開始され2254位で終結する。）

図39Aおよび図39Bは、H6をプロモータとするCMV pp65およびALVAC配列（C6遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:64）を示す。（H6をプロモータとするpp65の5'末端は496位にあり；CMV pp65をコードする配列は620位から2302位までである。）

40

図40は、H6をプロモータとするCMV pp65およびWRランキング配列のDNA配列（SEQ ID NO:65）を示す。（H6をプロモータとするpp65の5'末端は168位にあり；CMV pp65をコードする配列は292位から1974位までである。）

図41は、HCMV pp150（Towne株）のDNA配列（SEQ ID NO:66）を示す。

図42Aおよび図42Bは、42KをプロモータとするCMV pp150およびNYVAC配列（ATI遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:67）を示す。（42Kをプロモータとするpp150の5'末端は3645位にあり；CMV pp150をコードする配列は3580位から443位までである。）

図43Aおよび図43Bは、42KをプロモータとするCMV pp150およびALVAC配列（C6遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:68）を示す。（42Kをプロモータとする

50

pp150の5'末端は3714位にあり；CMV pp150をコードする配列は3649位から512位までである。）

図44Aおよび図44Bは、42KをプロモータとするCMV pp150およびWRフランキンゲン配列のDNA配列（SEQ ID NO:69）を示す。（H6をプロモータとするpp150の5'末端は3377位にあり；CMV pp150をコードする配列は3312位から175位までである。）

図45Aおよび図45Bは、42KをプロモータとするHCMV gHおよびH6をプロモータとするHCMV IE エクソン4およびNYVAC配列（I4L遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:70）を示す。（42KをプロモータとするCMV gHの5'末端は2935位にあり；CMV gHをコードする配列は2869位から644位までであり；H6をプロモータとするCMV IE エクソン4の5'末端は2946位にあり；CMV IE エクソン4をコードする配列は3070位から4287位までである。）

10

図46Aから図46Cは、H6をプロモータとするHCMV pp65および42KをプロモータとするHCMV pp150およびALVAC配列（C6遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:71）を示す。（H6をプロモータとするCMV pp65の5'末端は496位にあり；CMV pp65をコードする配列は620位から2302位までであり；42KをプロモータとするCMV pp150の5'末端は5554位にあり；CMV pp150をコードする配列は5489位から2352位までである。）

図47は、HCMV gL（Towne株）のDNA配列（SEQ ID NO:72）を示す。

図48Aおよび図48Bは、H6をプロモータとするHCMV gLおよびNYVAC配列（TK遺伝子座をはさむ）のDNA配列（SEQ ID NO:73）を示す。（H6をプロモータとするCMV gBの5'末端は3447位にあり；CMV gBをコードする配列は3324位から606位までであり；H6をプロモータとするCMV gLの5'末端は3500位にあり；CMV gLをコードする配列は3624位から4460位までである。）

20

図49は、ALVAC-IE1（vCP256）によるHCMV IE1 CTLの刺激の結果を示す。（パーセント細胞毒性；無地棒グラフ=WR、黒地（右下がり縞）棒グラフ=WR IE1、（右上がり縞）棒グラフ=非同原）。

図50は、ALVAC-pp65（vCP260）によるHCMV pp65-CTLの刺激の結果を示す。（インビトロでヒトCTLを刺激し、図49に用いたのと同様の方法によりHCMV pp65-CTLを分析したもの。パーセント細胞毒性；無地棒グラフ=WR、黒地（右下がり縞）棒グラフ=WR-pp65、（右上がり縞）棒グラフ=非同原）。

30

図51は、ALVAC-IE1（vCP256）によるHCMV IE1 CTLの刺激の結果を示す。（図49に用いたのと同様の方法による。但し、再刺激のために6日間インキュベートした後、抗ヒトCD3、CD4またはCD8モノクローナル抗体に結合された免疫磁性ビートを用いてキラー単核細胞をインキュベートした。パーセント細胞毒性；無地棒グラフ=WR、黒地（右下がり縞）棒グラフ=WR-IE1、（右上がり縞）棒グラフ=HLAミスマッチ）。

図52Aから図52Dは、COPAK組換え体によるVero細胞およびHeLa細胞におけるCMV gBの発現を示す。（³⁵Sメチオニンで放射標識した感染細胞由来の細胞および培地画分をモルモット抗CMV gB抗体で免疫沈降したもの；vP993（COPAK親株）（レーン1）、全gBを発現するvP1126（レーン2）、トランスメンブレン部位の無いgBを発現するvP1128（レーン3）、およびトランスメンブレン部位が無く且つ切断部位が変性されたgBを発現するvP1145（レーン4）のそれぞれによる感染由来のVero培地（A）、HeLa培地（B）、Vero細胞（C）、およびHeLa細胞（D）画分を示している。右端のレーンは分子量マーカーを示す。）

40

図53Aおよび図53Bは、Vero細胞およびHeLa細胞のワクシニア感染を、ワクシニア初期タンパク質E3Lの発現によって検出したものである。（³⁵Sメチオニンで放射標識した感染細胞由来の細胞画分をウサギ抗p25（E3L）抗体で免疫沈降させた；vP993（レーン1）、vP1126（レーン2）、vP1128（レーン3）、およびvP1145（レーン4）による感染由来のVero細胞（A）およびHeLa細胞（B）画分を示す；右端のレーンは分子量マーカーである。）

50

図54は、Vero細胞、HeLa細胞およびMRC-5細胞によるCMV gBの産生を比較して示すものである。vP1145（レーン1、2、3）またはvP993（レーン4、5、6）を感染させた後、MRC-5細胞（レーン1、4）、Vero細胞（レーン2、5）またはHeLa細胞（レーン3、6）由来の培地にSDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析を行った；CMV gBの検出にはモノクローナル抗体CH380を用いた；レーンMには分子量マーカーを示す。）

図55は、幾つかのモノクローナル抗体およびモルモット抗gB抗体によるCMVの免疫沈降を示す。（vP993（レーン1）、vP1126（レーン2）、vP1128（レーン3）、およびvP1145（レーン4）を感染させたVero細胞由来の放射標識した培地画分を、モルモット抗CMV gB抗体またはモノクローナル抗体13-127、13-128、CH380、HCMV34、もしくはHCMV37で免疫沈降させた；左端のレーンは分子量マーカーを示す。）

10

図56は、CMV gBイムノアフィニティクロマトグラフィカラムからの画分および層（ベッド）物質のウエスタンブロット分析を示す。（溶出したgB（レーン5）、フロースルー物質（レーン6）、カラムに適用した（かけた）粗製gB（レーン7）を表すカラム19画分をSDS-PAGEおよびモノクローナル抗体CH380を用いるウエスタンブロットにより分析した；カラム19からの層物質（レーン2）、カラム11からの層物質（レーン3）およびカラム7で精製したgB（レーン4）についても分析を行った；分子量マーカーはレーン1に示されている。）

図57は、イムノアフィニティクロマトグラフィカラムから溶出したCMV gBのSDS-PAGE分析を示す。（カラム8から溶出した画分8.16から8.22までを10%ゲル上で還元条件下に電気泳動によって分離し、銀染色した。）

20

図58は、イムノアフィニティにより精製したCMV gBの5つのバッチについてのSDS-PAGE分析を示すものである。（バッチ1から5までのサンプル（レーン1～5）を10%ゲル上で還元条件下に電気泳動により分離し、クーマーシーブルーで染色した；レーンMは分子量マーカーを含む。）

図59および図59Aは、イムノアフィニティで精製したCMV gBの特性を示す。（図58Aおよび図58Bに示すようにSDS-PAGE分析したバッチ5にデンスitomーターを走査して、各バンドを同定した（レーン7のラベル1～8）。図59Aは、レーン7のデンスitomーター記録を示す。）

図60Aおよび図60Bは、イムノアフィニティ精製したCMV gBのイムノブロット分析を示す。（精製したHIV env（レーン1）、アフィニティ精製したCMV gB（レーン2）、粗製CMV gB（レーンB3）、またはモノクローナル抗体CH380（レーンA3）を10%ゲル上で電気泳動により分離し、ニトロセルロースペーパーに転写し、そして、ヤギ抗マウスIgG（A）またはモノクローナル抗体CH380（B）を用いてマウスIgGのHおよびL鎖またはCMV gBの存在を探索した；レーン4には分子量マーカーを示す。）

30

図61Aおよび図61Bは、アフィニティ精製したgBの免疫沈降／イムノブロット分析を示す。（イムノアフィニティで精製したgB（A）または粗製gB（B）を、モノクローナル抗体CH380（レーン1）、13-127（レーン3）、HCMV37（レーン4）またはHCMV34（レーン5）で免疫沈降させた；それらの免疫沈降物を10%ゲル上で還元条件下に電気泳動により分離し、ニトロセルロースに転写し、モルモット抗CMV gB抗体を用いてgBの存在を探索した；右端のレーンは分子量マーカーである。）

40

図62Aおよび図62Bは、アフィニティ精製したCMV gBのイムノブロット分析を示す。（Vero細胞リゼイト（レーンA3、B2）、CEFリゼイト（レーンA2）、ワクシニア感染Vero細胞（レーンB3）、粗製CMV gB（レーン4）、アフィニティ精製したCMV gB（レーン5）または精製HIV env（レーン6）を10%ゲル上で還元条件下に電気泳動により分離し、ニトロセルロースに転写して、ウサギ抗Vero細胞抗体を用いてVero細胞タンパク質の存在（A）、またはウサギ抗ワクシニア抗体を用いてワクシニアタンパク質の存在（B）を探索した；分子量マーカーはレーン1に示す。）

図63Aから図63Cは、H6をプロモータとするHCMV pp65および42Kをプロモータとす

50

るH C M V pp150およびA L V A C配列（C 6 遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:188）を示す。（H 6をプロモータとするC M V pp65の5'末端は496位にある。C M V pp65をコードする配列は620位から2302位までである。42KをプロモータとするC M V pp150は2341位にある。C M V pp150をコードする配列は2406位から5543位までである。）
図64Aおよび図64Bは、C 7 O R F（tk）を含有するカナリアボックスD N Aの5798bpフラグメントのD N A配列（SEQ ID N0:189）を示す。（C 8 O R Fは4412位で開始され4951位で終結する。）

図65Aおよび図65Bは、H 6をプロモータとするH C M V g LおよびA L V A C配列（C 7 遺伝子座をはさむ）のD N A配列を示す。（H 6をプロモータとするC M V g Lの5'末端は2136位にある。C M V g Lをコードする配列は2260位から3093位までである。）

図66Aおよび図66Bは、H 6をプロモータとするH C M V g LおよびH 6をプロモータとするH C M V I E 1ーエクソン4遺伝子およびA L V A C配列（C 7 遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:190）を示す。H 6をプロモータとするC M V g Lの5'末端は3476位である。C M V g Lをコードする領域は3600位から4433位までである。H 6をプロモータとするI E 1ーエクソン4の5'末端は3469位にある。C M V I E 1ーエクソン4をコードする領域は3345位から2128位までである。）

図67は、トランスメンブレン領域および細胞質尾部を欠失したH C M V g HのD N A配列（SEQ ID N0:191）を示す。

図68Aおよび図68Bは、H 6をプロモータとするH C M V g L遺伝子および42Kをプロモータとする端部切断H C M V g H遺伝子およびN Y V A C配列（A T I 遺伝子座をはさむ）のD N A配列（SEQ ID N0:191）を示す。（H 6をプロモータとするC M V g L遺伝子の5'末端は2669位にある。C M V g Lをコードする領域は2793位から3626位までである。42KをプロモータとするC M V g H遺伝子の5'末端は2650位にある。一部切除されたC M V g Hをコードする配列は2584位から434位までである。）

発明の詳細な説明

新しいワクシニアワクチン株を開発するために、N Y V A C（v P 866）、すなわち、ワクシニアウイルスのコペンハーゲンワクチン（Copenhagen）株を、既知または予想される毒性（ビルレンス）因子をコード化するゲノムの6つの可欠領域を欠失させることにより変性した。配列の欠失については以下詳細に記載されている（米国特許第5,364,773号を参照）。ワクシニアの制限断片（フラグメント）、オープンリーディングフレームおよびヌクレオチド位置の呼称は全て、Goebel等、1990a,bに報告されている用語法に基づいている。

また、挿入する外来遺伝子を受容できるように欠失させる遺伝子座を工夫した。

N Y V A C中で欠失された領域を以下に列記する。欠失された領域の略称、およびオープンリーディングフレームの呼称（Goebel等、1990a,b）並びに特定の欠失を含有するワクシニア組換え体の呼称（v P）も併せて記している：

- (1)チミジンキナーゼ遺伝子（T K；J 2 R）v P 410；
- (2)出血性領域（u；B 13 R + B 14 R）v P 553；
- (3)A型封入体領域（A T I；A 26 L）v P 618；
- (4)血球凝集素遺伝子（H A；A 56 R）v P 723；
- (5)宿主域遺伝子領域（C 7 LーK 1 L）v P 804；および
- (6)リボヌクレオチドレダクターゼ大サブユニット（I 4 L）v P 866（N Y V A C）。

N Y V A Cは、ビルレンスおよび宿主域に関連する遺伝子産生物を含む遺伝子産生物をコードする18のオープンリーディングフレームを欠失させることにより遺伝子工学的手法で得られたワクシニアウイルス株である（Tartaglia他、1992；Goebel他、1990a,b）。宿主域遺伝子を欠失すると、特定の種（例えば、ブタやヒト）由来の組織培養細胞内における該ウイルスの複製能力が減少する（Tartaglia他、1992；Perkus他、1990）。複製能力が減少することの他に、N Y V A Cが高度に弱毒化されたことは以下のような多くの特徴によって示される；(a)ウサギの皮膚に硬結や潰瘍形成がなくなること、(b)投与部位からの迅速なクリアランス、(c)新生マウスに頭蓋内投与した場合、W Y E T Hのような他のワ

10

20

30

40

50

クシニア株に比べて無病毒性が大きくなること、(d)免疫無防備状態の動物に腹腔腔内投与した場合に、死亡、二次障害または播種性感染が起こらなくなること (Tartaglia他、1992)。NYVACが高度に弱毒化する特徴を示すにも拘わらず、NYVACに基づく組換え体は、狂犬病のチャレンジからマウス (Tartaglia他、1992)、日本脳炎ウイルスおよび擬似狂犬病ウイルスのチャレンジからブタ (Brockmeier他、1993; Konishi他、1992)、ならびにウマインフルエンザウイルスのチャレンジからウマ (Taylor他、1993) をそれぞれ防御するのに効果的である。

NYVACは高度に弱毒化されるが、このことは以下のような多くの特徴からも判る：i) 新生マウスに脳内接種するとビルレンスが減少すること、ii) 遺伝学的に (nu^+/nu^+) または化学的 (シクロホスホアミド) に免疫無防備状態マウスにおける無毒性、iii) 免疫無防備状態マウスにおいて、播種性感染が起こらなくなること、iv) ウサギ皮膚の硬結や潰瘍形成がなくなること、v) 接種部位からの迅速なクリアランス、vi) 多くの組織培養細胞系 (ヒト由来のものを含む) において複製能が激減すること。これにも拘わらず、NYVACに基づくベクターは、外来性免疫原に対して優れた応答を誘起し防御免疫を提供する。生のベクターとしてトリボックスウイルス由来の組換え体を用いることによっても組換えサブユニットワクチンが得られる。該ウイルスは本来的にその複製能が鳥類に限られている。TROVACとは、弱毒化家禽ボックスであって、1日齢のヒナへのワクチン接種がライセンスされている家禽ボックスウイルスFP-1ワクチン株からプラークを単離して得られたものである。

ALVACは、弱毒化カナリアボックスを基礎とするベクターであり、ライセンスされているカナリアボックスワクチンKanapox (Tartaglia他、1992) からプラークをクローニングして得られたものである。ALVACの一般的性質には、Kanapoxの一般的性質と同じものがある。外来性免疫原を発現するALVAC系組換えウイルスは、ワクチンベクターとしても有効であることが示されている (Tartaglia他、1993a,b)。例えば、狂犬病ウイルスの糖タンパク質を発現するALVAC組換え体で免疫化されたマウスは、狂犬病ウイルスの致死量チャレンジから防御され (Tartaglia他、1992)、このことはワクチンベクターとしてのALVACの可能性を示唆している。ALVAC由来の組換え体は、さらに、イヌジステンパーウイルスがチャレンジされたイヌ (Taylor他、1992)、狂犬病ウイルスがチャレンジされたイヌ (Perkus他、1994)、ネコ白血病ウイルスがチャレンジされたネコ (Tartaglia他、1993b)、ウマインフルエンザウイルスがチャレンジされたウマ (Taylor他、1993) においても有効であることが証明されている。

このトリボックスベクターは、その複製がトリ類に限定されている。ヒトの培養細胞においては、ウイルスのDNA合成に先行してウイルス複製サイクルの初期にカナリアボックスウイルスの複製は中断してしまう。しかしながら、外来性免疫原を発現するように工夫すれば、哺乳動物細胞中でインビトロで真正な発現とプロセッシングが認められ、多くの哺乳動物種に接種すると該外来性免疫原に対する抗体および細胞性免疫応答を誘発し、同種の病原体のチャレンジに対する防御を与える (Taylor他、1992; Taylor他、1993)。カナリアボックス/狂犬病糖タンパク質組換え体 (ALVAC-RG; vCP65) に関するヨーロッパおよび米国における最近の第一相臨床試験によれば、この試験ワクチンは、十分に受け入れられるものであり、防御レベルの狂犬病ウイルス中和抗体を誘起することが示された (Cadoz他、1992; Fries他、1992)。事実、ALVAC-RGを投与されたボランティアの反応原性は極めて少なく、そして $10^{5.5}$ TCID₅₀の用量でALVAC-RGが2回投与されたワクチン被接種者の全てにおいて狂犬病中和抗体の発現が認められた。さらに、ALVAC-RG被接種者由来の末梢血単核細胞 (PBMCs) は、精製狂犬病ウイルスで刺激すると有意レベルのリンパ球増殖を示した (Fries他、1992)。

HIVのエンベロープ糖タンパク質gp160を発現するALVAC組換え体 (ALVAC-HIV; vCP125) を用いて第一相ヒト臨床試験を行い、組換えgp160を用いてプライム (一次免疫) /ブースト (追加免疫) プロトコールが実施された。ALVAC-HIVを投与したボランティアの反応原性はきわめて少なく、このワクチンは初回投与でHIV-1のエンベロープに特異的な体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を誘発した。

10

20

30

40

50

最近の研究によれば、プライム／ブーストプロトコルを採用し、外来遺伝子産生物を発現するボックスウイルスによる免疫の後に、該遺伝子産生物を精製したサブユニット製剤を用いてブースト（追加免疫）を行うと、それらの単独を用いて誘発される応答に比べて免疫応答が増大することが示されている。H I V－1 のエンベロープ糖タンパク質を発現するワクシニア組換え体で免疫化され且つ精製されたH I V－1 エンベロープ糖タンパク質サブユニット製剤がブースト（追加免疫）されたヒトボランティアにおいては、該ワクシニア組換え体または精製されたエンベロープ糖タンパク質のみで免疫化した個体よりもH I V－1 中和抗体力価の発現が高い（Graham他、1993；Cooney他、1993）。A L V A C－H I V－1 env組換え体（v C P 125）を2回注射して免疫されたヒトにおいては、H I V特異的抗体が出現されなかった。ワクシニアウイルス組み換え体由来の精製rgp160でブーストすると検出可能なH I V－1 中和抗体が生じた。さらに、rgp160をブーストすることにより、rgp160に対して特異的なTリンパ球細胞増殖が明らかに大きくなった。このワクチン接種法によれば、エンベロープ特異的細胞障害性リンパ球活性も検出された（Pialoux他、1995）。サル免疫不全症ウイルス（S I V）のエンベロープ糖タンパク質を発現するワクシニアウイルスで免疫化し且つバキュロウイルス由来のS I Vエンベロープ糖タンパク質でブーストされたアカゲザルはS I Vチャレンジから防御された（Hu他、1991；1992）。同様にして、精製したH C M V g Bタンパク質を用いて、N Y V A CまたはA L V A C－g B組換え体によるプライム／ブーストプロトコルを実施することもできる。

また、N Y V A C、A L V A CおよびT R O V A Cは、以下の点において、あらゆるボックスウイルスの中でも独特であると考えられている。すなわち、米国公衆衛生局のN I H（Institute of Health）の組換えDNA勧告委員会（Recombinant DNA Advisory Committee）は、ウイルスやベクターのような遺伝子材料の物理的封じ込めに関するガイドライン、すなわち、特定のウイルスやベクターの病原性に基づくそれらのウイルスやベクターの利用における安全な取扱に関するガイドラインを出しているが、この物理的封じ込めのレベルをB S L 2 からB S L 1 に下げることが認められた。ここで、他のいずれのボックスウイルスもB S L 1 の物理的封じ込めレベルを満足していない。ワクシニアウイルスのCopenhagen株（最も一般的な天然痘ワクチンである）ですら、これよりも高い物理的封じ込めレベル、すなわち、B S L 2 を有する。このように、当該分野においては、N Y V A C、A L V A CおよびT R O V A Cは他のボックスウイルスよりも病原性が低いことが認められている。

C M Vは、エイズ患者、骨髄被移植者および新生物疾患（腫瘍性疾患）の免疫抑制治療を受けている患者の発病や死亡の原因となることが多い。C M V感染に対する有効で広く許容された薬剤の治療法はない。1つの方法は、ドナーC M V特異的C T Lの半ピボ刺激を行い、骨髄被移植者においてC M V感染により頻発する致命的な肺炎を治療し制御することであろう。事実、C M V C T Lクローンの養子移入によるヒトにおけるC M V感染の治療および制御は成功をおさめている（Riddell他、1992）。しかしながら、この例においては、該治療プロトコルに用いたC M V特異的C T Lクローンを刺激し維持するためにC M Vが用いられた。C T Lクローンを半ピボ刺激する目的でC M Vを使用することは幾つかの欠点があり、その最も明らかなものは、免疫抑制されている患者に別のC M Vを導入する可能性があるということである。抗原特異的な細胞性免疫エフェクター活性を刺激するのに安全で容認できる手段を与えるような免疫治療剤を利用しなければならないことが、養子免疫治療における大きな短所である。タンパク質サブユニットは、安全とは考えられるが、よく知られているようにC T Lの刺激能が低い。ペプチドは、一般に安全且つC T L応答を刺激するのも効果的であるが、C T L応答を刺激する能力がきわめて限定的である。すなわち、ペプチドは、一般に、単一のタンパク質に含有されている多くの可能なC T Lエピトープのうちの1つのC T Lエピトープに対するC T L応答を誘発することしかできない。さらに、ペプチドは、個体群の限定された一部のC T L応答しか刺激しないのが一般的であり、ヒト主要組織適合性複合体（M H C）の特定のアレルを発現するような個体に限られる。組換えウイルスベクターは、全抗原を発現することができ

10

20

30

40

50

、個体群の単一部分に対する単一のエピトープに限られないので、C T L 活性の優れた誘発剤と考えられる。しかしながら、これらのウイルスベクターの多く（例えば、アデノウイルス）は、複製能があり、この種のプロトコルに使用するのに安全とは限られない。本明細書に含まれるデータによって示されるように、A L V A C 組換え体は、哺乳動物細胞内では複製せず、しかも抗原特異的 C T L 応答を刺激する能力は有するので、ウイルス特異的 C T L クローンを半ビボ刺激して免疫治療に適用するための唯一の安全で効果的な方法を提供する。

本発明は、g B、g H、g L、pp150、pp65および I E 1（その一部が切除されたものを含む）をコードする H C M V 遺伝子を含む N Y V A C、A L V A C および ワクシニア（W R 株）組換え体に関し、その詳細は後の実施例で述べる。

10

N Y V A C、A L V A C および T R O V A C 核ベクターの弱毒化プロフィールおよびそれらが体液性免疫応答および細胞性免疫応答を誘発する能力を有することから明らかなように（Tartaglia他、1993a,b；Taylor他、1992；Konishi他、1992）、それらの組換えウイルスは、既述のワクシニア系組換えウイルスよりも顕著な利点を有している。

本発明の組換えウイルスまたはその発現産生物、組成物、例えば、免疫原性、抗原性もしくはワクチン組成物または治療組成物は、非経口経路（皮内、筋肉または皮下）で投与することができる。そのような投与により全身性免疫応答が可能となる。

さらに概説すれば、本発明に従う抗原性、免疫原性もしくはワクチン組成物または治療組成物（本発明のボックスウイルス組換え体を含む組成物）は、製薬技術分野における当業者に周知の標準的な方法に従って調製することができる。それらの組成物は、患者の年齢、性別、体重、および症状、ならびに投与経路を考慮しながら、適当な投与量で医学的分野の当業者に周知の方法に従って投与することができる。該組成物は、単独投与することもできるが、さらに、本発明の組成物、または他の免疫原性、抗原性もしくはワクチン組成物または治療組成物と同時に、または、それらとともに特定の順序で逐次的に、血清（反応）陽性の個体に投与することもできる。また、該組成物は、単独投与することもできるが、本発明の組成物、または他の免疫原性、抗原性もしくはワクチン組成物または治療組成物と同時に、またはそれらとともに特定の順序で逐次的に、血清（反応）陰性の個体に投与することもできる。他の組成物とは、H C M V 由来の精製抗原または組換えボックスウイルスもしくは他のベクター系によって発現されたそのような抗原由来のものが挙げられる。他の組成物としては、また、他の H C M V 抗原を発現する組換えボックスウイルスまたは生体応答調節剤が挙げられる。これらの場合においても、患者の年齢、性別、体重および症状ならびに投与経路などの因子を考慮する。

20

30

本発明の組成物は、例えば、腔部（例えば、口、鼻、肛門、膺など）投与用の液状製剤、例えば、サスペンション、シロップまたはエリキジュールなど；さらには、非経口、皮下、皮内、筋肉内または静脈内投与（例えば、静注）用製剤、例えば、無菌のサスペンションまたはエマルションの形態をとる。それらの組成物においては、組換えボックスウイルスに、適当なキャリア、稀釈剤、または賦形剤、例えば無菌水、生理食塩水、ブドウ糖などを混合させてもよい。

さらに、本発明の組換えボックスウイルスの発現産生物を直接使用して、血清陰性（血清反応陰性）もしくは血清陽性（血清反応陽性）のヒトまたは動物における免疫応答を刺激することもできる。すなわち、上述の組成物における本発明の組換えウイルスの代わりにまたはそれとともに、該発現産生物を使用して本発明に従う組成物とすることもできる。また、本発明の組換えボックスウイルスおよびそれに由来する発現産生物は、ヒトおよび動物における免疫または抗体応答を刺激し、したがって該産生物は抗原となる。これらの抗体または抗原から、当該技術分野で周知の手法により、モノクローナル抗体を調製することができ、そして、周知の抗体結合分析系、診断キットまたはテスト系においてこれらのモノクローナル抗体または抗原を使用して、特定の H C M V 抗原の有無、したがって、（H C M V またはその他の系において）該ウイルスまた抗原の発現の有無を測定したり、または、該ウイルスまたは抗原に対する免疫応答が刺激されたか否かを判定することができる。これらのモノクローナル抗体または抗原は、免疫吸着クロマトグラフィーに使用さ

40

50

れて、HCMVまたは本発明の組換えポックスウイルスの発現産生物を回収したり単離することもできる。

さらに、詳述すれば、本発明に従う組換え体および組成物は、以下のような多くの用途を有する：

(i)血清反応陰性の個体における免疫応答の誘発（ワクチン接種またはワクチン接種の一部として）；

(ii)血清反応陽性の個体の治療；および

(iii)ウイルス感染のリスクを伴わないインビトロでのHCMVタンパク質の調製。

本発明の組換えポックスウイルスの発現産生物は、直接使用されて、血清反応陰性もしくは血清反応陽性のヒトまたは動物における免疫応答を刺激することができる。すなわち、本発明の組換えポックスウイルスに代えてまたはそれとともに、該発現産生物を使用して本発明の組成物を調製することもできる。

さらに、本発明の組換えポックスウイルスおよびそれに由来する発現産生物は、ヒトおよび動物における免疫または抗体応答を刺激する。これらの抗体から、当該分野で周知の手法によりモノクローナル抗体を調製することができ、そして、これらのモノクローナル抗体または本発明に従うポックスウイルスの発現産生物もしくは組成物を周知の抗体結合分析系、診断キットまたはテスト系に使用して、特定のHCMV抗原または抗体の有無、したがって、該ウイルスの有無を測定したり、あるいは、該ウイルスまたは抗原に対する免疫応答が刺激されたか否かを判定することができる。これらのモノクローナル抗体を免疫吸着クロマトグラフィーに使用して、HCMVまたは本発明の組換えポックスウイルスの発現産生物を回収、単離または検出することもできる。モノクローナル抗体を製造する方法およびモノクローナル抗体の使用法、ならびにHCMV抗原（本発明のポックスウイルスの発現産生物および組成物）の使用法などは当該技術分野における当業者には周知である。それらは、診断法、キット、テスト系または分析系などに使用されるとともに、免疫吸着クロマトグラフィーまたは免疫沈降法による物質回収に使用され得る。

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞により産生される免疫グロブリンである。モノクローナル抗体は、単一の抗原決定基に反応し、通常の血清由来の抗体よりも高い特異性を与える。さらに、多数のモノクローナル抗体にスクリーニングを行うことにより、所望の特異性、アビディティ（抗原結合力）およびイソタイプを有する個々の抗体を選択することができる。ハイブリドーマ細胞系は、化学的に同一の抗体の恒常的且つ安価な供給源となり、そして、そのような抗体の調製は容易に標準化できる。モノクローナル抗体を産生する方法は当該技術分野における当業者には周知であり、例えば、Koprowski他による米国特許第4,196,265号1983年3月8日発行）を参考に引用しておく。

モノクローナル抗体の用途も既知である。そのような用途の一つは診断法に利用するものであり、例えば1983年3月8日付でDavid,G.およびGreene,H.に付与された米国特許第4,376,110号を引用しておく。モノクローナル抗体は、免疫吸着クロマトグラフィーにより物質を回収するのにも利用されており、例えば、Milstein,C.による「Scientific American 243: 66, 70 (1980)」を引用しておく。

さらに、本発明に従う組換えポックスウイルスおよびその発現産生物は、インビトロまたは半ビボ（後に患者に再注入）で細胞の応答を刺激するのに使用することができる。患者の血清反応が陰性の場合、再注入により、免疫応答、例えば能動免疫のような免疫または抗原応答を刺激する。血清反応陽性の患者においては、再注入が、HCMVに対する免疫系を刺激または増強する。

従って、本発明の組換えポックスウイルスは以下のような幾つかの用途を有する：血清反応陰性の患者に投与されるような抗原性、免疫性またはワクシン組成物における使用。HCMVに対する免疫系を刺激または増強して治療が必要な血清反応陽性なヒト用組成物への使用。インビトロで抗原性を産生させ、これをさらに、抗原性、免疫性もしくはワクチン組成物または治療組成物に使用すること。以下の用途に使用され得るような抗体（直接投与するか、または本発明の組換えポックスウイルスの発現産生物を投与することによる）または該発現産物または抗原を産生させること：すなわち、診断系、テスト系またはキ

10

20

30

40

50

ットに使用して、血清のようなサンプル中における抗原の有無を確認、例えば、血清のようなサンプル中のH T L Vの有無を確認したり、あるいは、該ウイルスまたは特定の抗原に対する免疫応答が誘起されたか否かを判定したり、さらには、免疫吸着クロマトグラフィー、免疫沈降またはこれらに類似する手法に使用すること。

さらに、本発明の組換えボックスウイルスは、ハイブリダイゼーションし得るD N Aの存否を検出したり、D N Aを増幅して、例えば、サンプル中のH C M Vを検出し、またはH C M VのD N Aを増幅するのに使用することができるプローブまたはP C Rプライマー用のD N Aを調製するのにも有用である。

本発明の実施態様としてはその他の用途もある。

本発明およびその効果をさらに明らかにするため以下に実施例を示す。

10

実施例

D N Aクローニングおよび合成 標準的な方法 (Maniatis他、1982 ; Perkus他、1985 ; Piccini他、1987) によりプラスミドを構築し、スクリーニングし培養した。制限エンドヌクレアーゼは、米国メリーランド州Gaithersburgのベセスダーリサーチ・ラボラトリーズ (Bethesda Research Laboratories)、米国マサチューセッツ州Beverlyのニューイングランド・バイオラブズ (New England Biolabs)、および米国インディアナ州Indianapolisのベーリンガー・マンハイム・バイオケミカルズ (Boehringer Mannheim Biochemicals) から入手した。大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片は、Boehringer Mannheim Biochemicalsから入手した。B A L - 3 1 エクソヌクレアーゼおよびファージT 4 のD N AリガーゼはNew England Biolabsから入手した。各試薬は供給業者の指示に従って使用した。

20

合成オリゴデオキシリボヌクレオチドは、既述のように (Perkus他、1989) Biosearch 8750またはApplied Biosystems 380B D N A合成装置を用いて調製した。D N A配列決定は、既述の手法に従い (Guo他、1989) シークエナーゼ (Sequenase) を用いて (Tabor他、1987) ジデオキシシーチェーンターミネーション法により (Sanger他、1977) 行った。配列確認のためのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によるD N A増幅 (Engelke他、1988) は、自動式Perkin Elmer Cetus D N A熱サイクル装置 (D N A Thermal Cycler) によりカスタム合成オリゴヌクレオチドプライマーおよびGeneAmp D N A増幅試薬キット (米国コネチカット州Norwalkのパーキン・エルマー・シータス (Perkin Elmer Cetus) 社製) を用いて実施した。プラスミドからの過剰D N A配列の欠失は、制限エンドヌクレアーゼ分解、その後、B A L - 3 1 エクソヌクレアーゼによる制限分解および合成オリゴヌクレオチドによる突然変異法 (Mandecki, 1986) により行った。

30

細胞、ウイルスおよびトランスフェクション ワクシニアウイルスのコペンハーゲン (Copenhagen) 株の起源および培養条件は既に明らかにされている (Guo他、1989)。組換えによる組換えウイルスの調製、ニトロセルロースフィルターを用いるインサイトウハイブリダイゼーションおよびβ - ガラクトシダーゼ活性を利用するスクリーニングについては既に明らかにされている (Piccini他、1987)。

ワクシニアウイルスのCopenhagen株およびN Y V A Cの起源および培養条件は既に明らかにされている (Guo他、1989 ; Tartaglia他、1992)。組換えによる組換えウイルスの調製、ニトロセルロースフィルターを用いるインサイトウハイブリダイゼーション、およびβ - ガラクトシダーゼを利用するスクリーニングについては既に明らかにされている (Panicali他、1982 ; Perkus他、1989)。

40

カナリアボックスウイルスの親株 (Rentschler株) はカナリアのワクシニア菌株である。このワクチン株は、野生型の単離物から入手され、ニワトリ胚繊維芽細胞を用いる200回以上の継代培養により弱毒化されたものである。そのマスターウイルス種株は寒天培地下の4回の連続的なブランク精製に供され、そのブランククロンの1つが5回の追加の継代培養により増幅され、その後、このストックウイルスが親ウイルスとしてインビトロ組換え試験に使用されてきた。このブランク精製カナリアボックス単離物がA L V A Cと命名されている。

F P - 1 と命名された家禽ボックスウイルス (F P V) 株については既に明らかにされている (Taylor他、1988a)。これは、日齢のヒナのワクチン接種に有用な弱毒化ワクチン

50

株である。親ウイルス株Duvetteは、フランスにおいてニワトリヒナから家禽ボックス疥癬として入手された。このウイルスが胚鶏卵での約50回の連続的な継代培養の後、ニワトリ胚繊維芽細胞における25回の継代培養により弱毒化された。該ウイルスは4回の連続的なブランク精製に供された。ブランクの1つが単離され、初代C E F細胞中で増幅され、T R O V A Cと命名されたストックウイルスが樹立された。

NYVAC、ALVACおよびTROVAC各ウイルスベクターおよびそれらの誘導体の増殖については既に記述されている (Piccini他、1987; Taylor他、1988a,b)。増殖にベロ (Vero) 細胞やニワトリ胚繊維芽細胞 (C E F) を使用することも既に明らかにされている (Taylor他、1988a,b)。

NYVACおよび特に実施例1から6に関しては、米国特許第5,364,773号を参照しており、本明細書に引用しておく。

実施例1—チミジンキナーゼ遺伝子 (J 2 R) を欠失させたプラスミド p S D 4 6 0 の構築

図1に関連して、プラスミド p S D 4 0 6 は、p U C 8 にクローニングしたワクシニア H i n d III J (位置83359~88377) (83359~88377位) を含有する。p S D 4 0 6 を H i n d III と P v u II で切断し、H i n d III の左側の1.7kbのフラグメントを、H i n d III / S m a I で切断した p U C 8 にクローニングして p S D 4 4 7 を調製した。p S D 4 4 7 は、J 2 R の全遺伝子を含有する (位置83855~84385)。開始コドンは N l a III 部位内に含まれており、また、終止コドンは S s p I 部位内に含まれている。転写の方向は図1内の矢印で示す。

左側のフランキングアームを得るために、p S D 4 4 7 から0.8kbの H i n d III / E c o R I フラグメントを分離し、次いで N l a III で分解して0.5kbの H i n d III / N l a III フラグメントを分離した。以下の配列を有するアニーニングした合成オリゴヌクレオチド M P S Y N 4 3 / M P S Y N 4 4 (S E Q I D N0:1 / S E Q I D N0:2) を0.5kbの H i n d III / N l a III フラグメントと連結 (ライゲート) し、H i n d III / E c o R I で切断した p U C 1 8 ベクタープラスミドに導入して、プラスミド p S D 4 4 9 を得た。

```

MPSYN43  5'      TAATTAAGCTACCCGGG      3'
MPSYN44  3'  GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA  5'
           NlaIII                      EcoRI

```

ワクシニアの右側のフランキングアームおよび p U C ベクター配列を含有する制限酵素フラグメントを得るために、ワクシニア配列内で S s p I (部分的) を用い、また p U C / ワクシニア結合部において H i n d III を用いて p S D 4 4 7 を切断して、2.9kbのベクターフラグメントを分離した。このベクターフラグメントを、以下の配列を有するアニーリングした合成オリゴヌクレオチド M P S Y N 4 5 / M P S Y N 4 6 (S E Q I D N0:3 / S E Q I D N0:4) と連結して、p S D 4 5 9 を得た。

```

MPSYN45  5'      AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA
MPSYN46  3'      AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT
           HindIII SmaI

```

```

           NotI          SspI
ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCTAATTAATACTAAT  3' MPSYN45
TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA  5' MPSYN46

```

左側フランキングアームと右側フランキングアームを結合させて1つのプラスミドとするために、p S D 4 4 9 から0.5kbの H i n d III / S m a I フラグメントを分離し、これを、H i n d III / S m a I で切断された p S D 4 5 9 ベクタープラスミドに連結して p S D 4 6 0 を調製した。この p S D 4 6 0 をドナープラスミドとして用い、野性型親ワクシニアウイルス Copenhagen 株 V C - 2 との組換えを実施した。鋳型として M P S Y N 4 5 (S E Q I D N0:3) およびプライマーとして相補的な20マー (20mer) オリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドMPSYN47 (SEQ ID NO:5) (5' TTAGTTAATTAGGCGGCCGC 3') を用いるプライマー延長法により32Pがラベルされたプローブを合成した。組換えウイルスvP410の同定はプラークハイブリダイゼーションにより行った。

実施例2－出血性領域 (B13R+B14R) を欠失させたプラスミド pSD486 の構築

図2において、プラスミド pSD419 は、pUC8 にクローニングされたワクシニア Sal I G (位置160,774~173,351) を含有する。pSD422 は、右側に隣接するワクシニア Sal I フラグメント Sal I G (位置173,351~182,746) (pUC8 にクローニングされている) を含有している。出血性領域 u、B13R-B14R (位置172,549~173,552) が欠失されたプラスミドを構築するため、左側フランキングアーム源として pSD419 を用い、また、右側フランキングアーム源として pSD422 を用いた。u 領域の転写方向は図2の矢印で示す。

pSD419 から非所望配列を除去するために、NcoI / SmaI を用いて pSD419 を分解し、次いで大腸菌のクレノウ断片を用いる平滑末端化および連結 (ライゲーション) を行うことにより、NcoI 部位 (位置172,253) の左側の配列を除去してプラスミド pSD476 を得た。B14R の終結コドンにおける HpaI を用いる pSD422 の分解および NruI による分解によりワクシニアの右側フランキングアーム 0.3kb を得た。この 0.3kb のフラグメントを単離、pSD476 から単離された 3.4kb の HincII ベクターフラグメントに連結して、プラスミド pSD477 を得た。pSD477 におけるワクシニア u 領域の部分欠失位置は三角形で示している。pSD477 における残りの B13R コード配列を除去するため、ClaI / HpaI を用いる酵素分解を行い、得られたベクターフラグメントを、以下の配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド SD22mer / SD20mer (SEQ ID NO:6 / SEQ ID NO:7) に連結して、pSD479 を調製した。

		<u>Cla</u> I		<u>Bam</u> HI	<u>Hpa</u> I	
SD22mer	5'	CGATTACTATGAAGGATCCGTT				3'
SD20mer	3'	TAATGATACTTCCTAGGCAA				5'

pSD479 は、開始コドン (下線) を含有し、その後に BamHI 部位がある。u プロモーターの制御下に B13-B14 (u) 欠失位置に大腸菌ベクターガラクトシダーゼを入れるために、ベクターガラクトシダーゼ遺伝子 (Shapira 他、1983) を含有する 3.2kb の BamHI フラグメントを pSD479 の BamHI 部位に挿入して、pSD479 BG を調製した。この pSD479 BG をドナープラスミドとして、ワクシニアウイルス vP410 との組換えを実施した。組換えワクシニアウイルス vP533 を、発色性基質 X-gal の存在下に青色のプラークとして分離した。vP533 においては、B13R-B14R 領域が欠失され、ベクターガラクトシダーゼによって置換されている。

vP533 からベクターガラクトシダーゼを取り除くために、ポリリンカー領域を含有するが u 欠失結合部に開始コドンをもたない pSD477 の誘導体であるプラスミド pSD486 を用いた。まず、上述の pSD477 由来の ClaI / HpaI ベクターフラグメントを、以下の配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド SD42mer / SD40mer (SEQ ID NO:8 / SEQ ID NO:9) に連結して、プラスミド pSD478 を調製した。

		<u>Cla</u> I		<u>Sac</u> I		<u>Xho</u> I		<u>Hpa</u> I	
SD42mer	5'	CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT							3'
SD40mer	3'	TAATGATCTAGACTCGAGGGGGCCGAGCTCCCTAGGCAA							5'
		<u>Bgl</u> II		<u>Sma</u> I		<u>Bam</u> HI			

次に、pUC / ワクシニア結合部における EcoR I 部位を破壊するため、EcoR I を用いて pSD478 を酵素分解し、その後、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片を用いる平滑末端化および連結 (ライゲーション) を行うことにより、pSD478 E- を得た。この pSD478 E- を BamHI および HpaI を用いて分解し、以下に示す配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド HEM5 / HEM6 (SEQ ID NO

10

20

30

40

50

:10/SEQ ID NO:11)に連結して、プラスミド pSD486 を調製した。

```

      BamHI EcoRI HpaI
HEM5 5' GATCCGAATTCTAGCT 3'
HEM6 3' GCTTAAGATCGA 5'

```

pSD486 をドナープラスミドとして用い、組換えワクシニアウイルス vP533 との組換えを行って vP553 を得た。この vP553 は、X-gal の存在下に明瞭なプラークとして単離された。

実施例 3-ATI 領域 (A26L) を欠失させたプラスミド pMP494Δ の構築

図 3 において、pSD414 は、pUC8 にクローニングされた SaII B を含有する。A26L 領域の左側の非所望 DNA 配列を取り除くために、pSD414 を、ワクシニア

10

配列内で XbaI を用いて切断し、また pUC/ワクシニア結合部において HindIII を用いる切断を行い、次に、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片を用いる平滑末端化および連結を行うことにより、プラスミド pSD483 を得た。A26L 領域の右側の非所望ワクシニア DNA 配列を除去するために、EcoRI を用いて pSD483 を切断し (位置 140,665 および pUC/ワクシニア結合部)、連結処理 (ライゲーション) を行ってプラスミド pSD484 を形成した。A26L コード領域を取り除くため、NdeI (部分的) を用いて A26L の ORF の少し上流を切断し (位置 139,004) 且つ HpaI を用いて A26L の ORF の少し下流を切断 (位置 137,889) した。5.2kb のベクターフラグメントを単離し、これを以下の配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド AT13/AT14 (SEQ ID NO:12/SEQ ID NO:13) と連結して、A26L

20

```

      NdeI
AT13 5' TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTAAATTAAGTATATTCAAAAAATAAGT
AT14 3' ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA

```

```

      BglII EcoRI HpaI
TATATAAATAGATCTGAATTCGTT 3' AT13
ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA 5' AT14

```

得られたプラスミドを pSD485 と命名した。pSD485 のポリリンカー領域における BaII 部位および EcoRI 部位は唯一のものではないので、BgII を用いる分解

30

(位置 140,136) および pUC/ワクシニア結合部における EcoRI による分解を行い、その後、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片を用いる平滑末端化および連結 (ライゲーション) により、プラスミド 483 (上述) から非所望の BaII 部位および EcoRI 部位を除去した。得られたプラスミドを pSD489 と命名した。pSD489 由来で A26L の ORF を含有する 1.8kb の ClaI (位置 137,198) / EcoRI (位置 139,048) フラグメントを対応する 0.7kb でポリリンカーを含有する pSD485 由来の ClaI / EcoRI フラグメントと置換することにより pSD492 を得た。この pSD492 のポリリンカー領域における BgII 部位および EcoRI 部位は唯一のものである。

pSD492 の BgII 部位に、11kDa のワクシニアプロモーター (Bertholet 他、1985; Perkus 他、1990) の制御下に大腸菌ベクターガラクトシダーゼ遺伝子 (Shapira 他、1983) を含有する 3.3kb の BgII カセットを挿入して、pSD493 KBG を形成した。このプラスミド pSD493 KBG を用いて、レスキューウイルス vP553 との組換えを行った。A26L 欠失領域にベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルス vP581 が、X-gal の存在下に青色のプラークとして単離された。

40

ワクシニア組換えウイルス vP581 からベクターガラクトシダーゼを欠失させるプラスミドを調製するために、以下の配列を有する合成オリゴヌクレオチド MP5YN177 (SEQ ID NO:14) を用いる突然変異法 (Mandek, 1986) によりプラスミド pSD492 のポリリンカー領域を欠失させた。

```

(5' AAAATGGGCGTGGATTGTAACTTTATATACTTATTTTTTGAATATAC 3')

```

得られたプラスミド pMP494Δ においては、位置 [137,889~138,937] をカバーし、

50

A 2 6 L の O R F 全体を含むワクシニア DNA が欠失されている。この p M P 4 9 4 Δ と ベーターガラクトシダーゼ含有ワクシニア組換え体 v P 5 8 1 との間の組換えにより、ワクシニア欠失変異体 v P 6 1 8 が得られ、X - g a l の存在下に明瞭なプラークとして単離された。

実施例 4 - 血球凝集素遺伝子 (A 5 6 R) を欠失させたプラスミド p S D 4 6 7 の構築
図 4 において、ワクシニア S a l I G 制限酵素フラグメント (位置 160,744~173,351) は、H i n d III A / B 結合部 (位置 162,539) を包含している。p S D 4 1 9 は、p U C 8 にクローニングされたワクシニア S a l I G を含有する。血球凝集素 (H A) 遺伝子の転写方向は図 4 における矢印で示されている。H i n d III B 由来のワクシニア配列の除去には、ワクシニア配列内および p U C / ワクシニア結合部において H i n d III を用いる p S D 4 1 9 の酵素分解を行い、その後、連結処理 (ライゲーション) した。得られたプラスミド p S D 4 5 6 は、左側が 0.4kb のワクシニア配列および右側が 0.4kb のワクシニア配列で挟まれた H A 遺伝子 (A 5 6 R) を含有する。A 5 6 R をコードする配列を除去するために、A 5 6 R コード配列の上流を R s a I (部分的; 位置 161,090) により、また、該遺伝子の末端近傍を E a g I (位置 162,054) により p S D 4 5 6 を切断した。p S D 4 5 6 から 3.6kb の R s a I / E a g I ベクターフラグメントを単離し、以下の配列を有するアニーリングした合成オリゴヌクレオチド M P S Y N 5 9 (S E Q I D N O : 15)、M P S Y N 6 2 (S E Q I D N O : 16)、M P S Y N 6 0 (S E Q I D N O : 17) および M P S Y N 6 1 (S E Q I D N O : 18) に連結 (ライゲート) して、A 5 6 R の O R F の上流の DNA 配列を再構成し、A 5 6 R の O R F を下記に示すようなポリリンカー領域と置換した。

RsaI
MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTATAGGT-
MPSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTTCATAAACCTTTCAAAATATCCA-

MPSYN59 AGTTGATAGAACAAAATACATAATTT 3'
MPSYN62 TCAACTATCT 5'

MPSYN60 5' TGTAATAATAATCACTTTTTTATA-
MPSYN61 3' TGTTTTATGTATTAAACATTTTATTAGTGAAAAATAT-

BglII SmaI PstI EagI
MPSYN60 CTAAGATCTCCCGGGCTGCAGC 3'
MPSYN61 GATTCTAGAGGGCCCGACGTCGCCGG 5'

得られたプラスミドが p S D 4 6 6 である。この p S D 4 6 6 におけるワクシニア欠失は位置 [161,185~162,053] を包含する。p S D 4 6 6 における欠失部位は図 4 では三角形で示されている。

p S D 4 6 6 の B g l II 部位に、11 k D a のワクシニアプロモーター (Bertholet 他、1985; Guo 他、1989) の制御下に大腸菌ベーターガラクトシダーゼ遺伝子 (Shapira 他、1983) を含有する 3.2kb の B g l II / B a m H I (部分的) カセットを挿入して、p S D 4 6 6 K B G を形成した。このプラスミド p S D 4 6 6 K B G を用いて、レスキューウイルス v P 6 1 8 との組換えを行った。A 5 6 R 欠失部位にベーターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルス v P 7 0 8 が、X - g a l の存在下に青色プラークとして単離された。

ドナープラスミド p S D 4 6 7 を用い、v P 7 0 8 からベーターガラクトシダーゼ配列を除去した。p S D 4 6 7 は p S D 4 6 6 と同じであるが、但し、E c o R I / B a m H I を用いる p S D 4 6 6 の分解、それに続く大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片を用いる平滑末端化および連結処理 (ライゲーション) により p U C / ワクシニア結合部から E c o R I 部位、S m a I 部位および B a m H I 部位が取り除かれている。v P 7 0 8 と p S D 4 6 7 との間に組換えを行うことにより組み換えワクシニア欠失変異体 v P 7 2 3 が得られ、X - g a l の存在下に明瞭なプラークとして単離された。

実施例 5 - オープンリーディングフレーム [C 7 L - K 1 L] を欠失させたプラスミド p

10

20

30

40

50

M P C S K 1 Δ の構築

図5に関し、次のワクシニアクロンを利用してpMPCSK1Δを構築した。pSD420は、SalI HでpUC8にクローニングされたものである。pSD435は、KpnI FでpUC18にクローニングされたものである。SphIでpSD435を切断してpSD451を形成した。このpSD451においては、HindIII MにおけるSphI部位（位置27,416）の左側のDNA配列が除去されている（Perkus他、1990）。pSD409は、HindIII MでpUC8にクローニングされたものである。ワクシニアから[C7L-K1L]遺伝子群を除去する基質を得るために、先ず、以下のように、ワクシニアのM2L欠失座に大腸菌ベクターガラクトシダーゼを挿入した。pSD409においてBglII部位を取り除くために、BglIIを用いてワクシニア配列（位置28,212）およびBamHIを用いてpUC／ワクシニア結合部において該プラスミドを切断し、次いで連結処理（ライゲーション）を行い、プラスミドpMP409Bを形成した。唯一のSphI部位（位置27,416）においてpMP409Bを切断した。以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを用いる突然変異法（Guo他、1990；Mandecki, 1986）によりM2Lをコードする配列を除去した。

BglII

**MPSYN82 (SEQ ID NO:19) 5' TTTCTGTATATTTGCACCAATTTAGATCTT-
ACTCAAATATGTAACAATA 3'**

得られたプラスミドpMP409Dは、上記のようにM2L欠失座に挿入された唯一のBglII部位を含有する。BglIIで切断されたpMP409Dに、11kDaのプロモーター（Bertholet他、1985）の制御下に大腸菌ベクターガラクトシダーゼ遺伝子（Shapira他、1983）を含有する3.2kbのBamHI（部分的）／BglIIカセットを挿入した。得られたプラスミドpMP409DBG（Guo他、1990）をドナープラスミドとして用い、レスキューワクシニアウイルスvP723との組換えを行った。M2L欠失座に挿入されたベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルスvP784が、X-galの存在下に青色プラークとして単離された。

ワクシニア遺伝子[C7L-K1L]が欠失されたプラスミドを、SmaI、HindIIIで切断され、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片で平滑末端化されたpUC8に組み込んだ。ワクシニアHindIII C配列から成る左側のフランキングアームを得るために、pSD420をXbaI（位置18,628）で分解した後、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片を用いる平滑末端化およびBglII（位置19,706）を用いる分解を行った。ワクシニアHindIII K配列から成る右側のフランキングアームを選ぶには、pSD451をBglII（位置29,062）およびEcoRI（位置29,778）で分解した。得られたプラスミドpMP581CKは、HindIII CのBglII部位（位置19,706）とHindIII KのBglII部位との間のワクシニア配列が欠失されている。プラスミドpMP581CKにおけるワクシニア配列の欠失部位は図5に三角形で示している。

ワクシニア欠失部の過剰なDNAを除去するため、プラスミドpMP581CKをワクシニア配列内のNcoI部位（位置18,811；19,625）において切断し、Bal-31エクソヌクレアーゼを用いて処理し、さらに、以下の配列を有する合成オリゴヌクレオチドMPSYN233（SEQ ID NO:20）を用いる突然変異法（Mandecki, 1986）に供した。

5'-TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAATAATATTTATT-3'

得られたプラスミドpMPCSK1Δは、12のワクシニアリーデンフレーム[C7L-K1L]を包含する18,805～29,108位置のワクシニア配列が欠失されている。pMPCSK1Δとベクターガラクトシダーゼ含有ワクシニアウイルスvP784との間に組換えを行わせることにより、ワクシニア欠失変異体vP804が得られ、X-galの存在下に明瞭なプラークとして単離された。

実施例6ーリボヌクレオチドレダクターゼ大サブユニットを欠失させたプラスミドpSD548の構築

図6において、プラスミドpSD405は、pUC8にクローニングされたワクシニアH

10

20

30

40

50

i n d III I（位置63,875～70,367）を含有する。この p S D 4 0 5 をワクシニア配列内で E c o R I により、また、p U C / ワクシニア結合部においては S m a I により消化分解し、連結処理（ライゲーション）することによりプラスミド p S D 5 1 8 を形成した。p S D 5 4 8 の構築に用いたワクシニア制限フラグメントは、全て、この p S D 5 1 8 由来のものである。

ワクシニアの I 4 L 遺伝子は、67,371～65,059の位置に延在している。I 4 L の転写方向は、図 6 において矢印で示されている。I 4 L のコード配列の一部が欠失したベクタープラスミドを得るために、p S D 5 1 8 を B a m H I（位置65,381）および H p a I（位置67,001）を用いて分解し、且つ、大腸菌のクレノウ断片を用いて平滑末端化した。この4.8kbのベクターフラグメントを、ワクシニアの 1 1 k D a のプロモーター（Bertholet他、1985；Perkus他、1990）の制御下に大腸菌ベクターガラクトシダーゼ遺伝子（Shapira他、1983）を含有する3.2kbの S m a I カセットに連結して、プラスミド p S D 5 2 4 K B G を得た。この p S D 5 2 4 K B G をドナープラスミドとして、ワクシニアウイルス v P 8 0 4 との組換えを行った。I 4 L 遺伝子の部分欠失位置にベクターガラクトシダーゼを含有する組換えワクシニアウイルス v P 8 5 5 が、X - g a l の存在下に青色プラークとして単離された。

ベクターガラクトシダーゼおよび残存する I 4 L の O R F を v P 8 5 5 から欠失させるために、欠失プラスミド 5 4 8 を構築した。以下に詳述し且つ図 6 に示すように、左側および右側のワクシニアフランキングアームをそれぞれ別個に p U C 8 に組み込んだ。

左側のワクシニアフランキングアームを受け入れるベクタープラスミドを構築するため、p U C 8 を B a m H I / E c o R I で切断し、以下の配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド 5 1 8 A 1 / 5 1 8 A 2（S E Q I D N O : 21 / S E Q I D N O : 22）に連結して、プラスミド p S D 5 3 1 を形成した。

B a m H I R s a I

```

518A1  5'  GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT
518A2  3'      GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA
  
```

B g l I I E c o R I

```

TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG      3'   518A1
AACTCTTATTTTTTCTAGAATCCTTAA 5'   518A2
  
```

R s a I（部分的）および B a m H I で p S D 5 3 1 を切断し、2.7kbのベクターフラグメントを単離した。B g l I I（位置64,459）で p S D 5 1 8 を切断して0.5kbのフラグメントを単離した。これらの2つのフラグメントを互いに連結して、I 4 L のコード配列の左側の完全なワクシニアフランキングアームを含有する p S D 5 3 7 を形成した。

右側のワクシニアフランキングアームを受け入れるベクタープラスミドを構築するため、B a m H I / E c o R I で p U C 8 を切断し、以下に示す配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド 5 1 8 B 1 / 5 1 8 B 2（S E Q I D N O : 23 / S E Q I D N O : 24）に連結して、プラスミド p S D 5 3 2 を形成した。

B a m H I B g l I I S m a I

```

518B1  5'  GATCCAGATCTCCCGGGAAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAG-
518B2  3'      GTCTAGAGGGCCCTTTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATC-
  
```

R s a I E c o R I

```

GGATTTGACGTATGTAGCGTACTAGG      3'   518B1
CCTAAACTGCATACTACGCATGATCCTTAA 5'   518B2
  
```

この p S D 5 3 2 を R s a I（部分的） / E c o R I で切断して2.7kbのベクターフラグメントを単離した。p S D 5 1 8 を、ワクシニア配列内を R s a I（位置67,436）により、また、ワクシニア / p U C 結合部を E c o R I によって切断して0.6kbのフラグメントを単離した。I 4 L をコードする配列の右側の完全なフランキングアームを含有する p S D 5 3 8 を調製した。

右側のワクシニアフランキングアームは、p S D 5 3 8 から0.6kbの E c o R I / B g l I I フラグメントとして単離し、E c o R I / B g l I I で切断された p S D 5 3 7 内に連結

10

20

30

40

50

した。得られたプラスミド p S D 5 3 9 においては、I 4 L の O R F（位置 65,047～67,836）がポリリンカー領域によって置換されており、該領域は左側を 0.6kb の ワクシニア D N A により、また右側を 0.6kb の ワクシニア D N A により挟まれており（フランキングされており）、これらは全て p U C バックグランド内にある。ワクシニア配列内の欠失部は、図 6 において三角形で示している。p S D 5 3 9 の p U C 誘導部分のベクターガラクトシダーゼが、組換えワクシニアウイルス v P 8 5 5 内のベクターガラクトシダーゼと組換えを行う可能性を回避するため、p S D 5 3 9 からワクシニア I 4 L 欠失カセットを取り除いて p R C 1 1 とした。この p R C 1 1 は、すべてのベクターガラクトシダーゼが除去され、ポリリンカー領域で置換された p U C 誘導体である（Cokins 他、1990）。p S D を E c o R I / P s t I で切断して 1.2kb のフラグメントを単離した。このフラグメントを、E c o R I / P s t I で切断した p R C 1 1（2.35kb）に連結して、p S D 5 4 8 を形成した。p S D 5 4 8 とベクターガラクトシダーゼ含有ワクシニア組換え体 v P 8 5 5 との間に組換えを行わせることにより、ワクシニア欠失変異体 v P 8 6 6 が得られ、X - g a l の存在下に明瞭なプラークとして単離された。

組換えワクシニアウイルス v P 8 6 6 由来の D N A の分析は、制限酵素分解、次にアガロースゲル上の電気泳動法により行った。制限パターンは予測どおりであった。鋳型として v P 8 6 6 および上で詳述した 6 つの欠失遺伝子座を挟むプライマーを用いるポリメラーゼチェーン反応（P C R）（Engelke 他、1988）により予測された大きさの D N A フラグメントが得られた。P C R で得られたフラグメントの欠失接合領域近傍の配列分析により、接合が期待どおりであることが確認された。上述したような 6 つの欠失部を有するように工夫した組換えワクシニアウイルス v P 8 6 6 をワクシニアウイルス株「N Y V A C」と命名した。

実施例 7 - N Y V A C への狂犬病糖タンパク質 G 遺伝子の挿入

ワクシニア H 6 プロモーター（Taylor 他、1988a, b）の制御下に狂犬病（ウイルス）糖タンパク質 G をコードする遺伝子を T K 欠失プラスミド p S D 5 1 3 に挿入した。p S D 5 1 3 は、ポリリンカーが存在している点を除いては、p S D 4 6 0（図 1）と同一である。

図 7 に示すように、p S D 4 6 0 を S m a I で切断し、以下の配列を有するアニーリングされた合成オリゴヌクレオチド V Q 1 A / V Q 1 B（S E Q I D N O : 25 / S E Q I D N O : 26）に連結することにより該ポリリンカーを挿入することにより、ベクタープラスミド p S D 5 1 3 を形成した。

		<u>SmaI</u>	<u>BglII</u>	<u>XhoI</u>	<u>PstI</u>	<u>NarI</u>	<u>BamHI</u>	
VQ1A	5'	GGGAGATCTCTCGAGCTGCAGGGCGCCGGATCCTTTTCT	3'					
VQ1B	3'	CCCTCTAGAGAGCTCGACGTCCCGCGGCCTAGGAAAAAGA	5'					

この p S D 5 1 3 を S m a I で切断し、ワクシニア H 6 プロモーター（Taylor 他、1988a, b）の制御下に狂犬病糖タンパク質 G をコードする遺伝子を含有し、S m a I 末端から成る 1.8kb のカセットに連結した。得られたプラスミドを p R W 8 4 2 と命名した。この p R W 8 4 2 をドナープラスミドとして用い、N Y V A C レスキューウイルス（v P 8 6 6）と組換えを行った。狂犬病糖タンパク質 G をコードする配列に対する³²P ラベル化プローブを用いるプラークハイブリダイゼーションにより組換えワクシニアウイルス v P 8 7 9 を同定した。

本発明の変性組換えウイルスは、組換えワクチンベクターとして幾つかの利点を有する。すなわち、ベクターのビルレンスが弱毒化されているので、ワクチン接種による被接種者が無制御（ランナウェー）感染する可能性が減少し、さらに、感染者から非感染者への伝染や環境の汚染も少なくするという利点を有する。

さらに、本発明の変性組換えウイルスは、インビトロ培養される細胞内で遺伝子産生物を発現させるのに用いることもでき、このためには、該細胞内で遺伝子産生物をコードし発現する外来遺伝子を有する本発明の変性組換えウイルスを該細胞に導入すればよい。

実施例 8 - 狂犬病ウイルス糖タンパク質 G を発現する A L V A C 組換え体の構築

この実施例は、カナリアポックスウイルスベクター A L V A C およびカナリアポックス

10

20

30

40

50

狂犬病ウイルス組換え体ALVAC-R (vCP65)の調製ならびにその安全性と効力について記述するものである。

細胞およびウイルス 親カナリアポックスウイルス (Rentschler株) はカナリア用ワクチン株の1つである。このワクチン株は野性型の単離物から入手され、にわとり胚繊維芽細胞による200回以上の連続的な継代培養により弱毒化されたものである。マスターウイルス種株は、寒天培地下の4回の連続的なプラーク精製に供され、さらに、プラーククロンの1つが5回の追加の継代培養により増殖された後、該保存ウイルスが親ウイルスとしてインビトロ組換え試験に用いられた。プラーク精製されたカナリアポックス単離物は、ALVACと命名されている。

カナリアポックス挿入ベクターの構築 880bpのカナリアポックスPvuIIフラグメントを、PUC9のPvuII部位間にクローニングしてpRW764.5を調製した。このフラグメントの配列は、図8 (SEQ ID NO:27)において1372~2251位置に示されている。C5として指称されているオープンリーディングフレームの範囲を確認した。このオープンリーディングフレームは、該フラグメント内の位置166 (166位)で開始され且つ位置487 (487位)で終結されていることが明らかにされた。オープンリーディングフレームを阻害することなくC5の欠失を行った。位置167から位置455までの塩基を、配列 (SEQ ID NO:28) GCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTと置換した。この置換配列は、HindIII、SmaIおよびEcoRI挿入部位と、それに後続しワクシニアウイルスRNAポリメラーゼにより認識される翻訳停止シグナルおよび転写終結シグナルを含有している (Yuen他、1987)。C5オープンリーディングフレームの欠失は以下のよう

に行った。プラスミドpRW764.5をRsaIで部分的に切断して線状の生成物を単離した。このRsaI線状フラグメントをBglIIで再切断し、かくして、位置156から位置462までのRsaIからBglIIまでが欠失したpRW764.5フラグメントを単離し、以下の合成オリゴヌクレオチド用ベクターとして使用した。

RW145 (SEQ ID NO:29):
ACTCTCAAAAGCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTTATAAA

RW146 (SEQ ID NO:30):

GATCTTTATAAAACTAGCTAGCTAGAAATCCCGGGAAGCTTTTGAGAGT

オリゴヌクレオチドRW145およびRW146をアニーリングし、上述のpRW764.5 RsaIおよびBglIIベクターに挿入した。得られたプラスミドをpRW831と命名した。

狂犬病G遺伝子を含有する挿入ベクターの構築 以下にpRW838の構築について説明する。AからEのオリゴヌクレオチド (狂犬病ウイルスGのH6プロモーターの開始コードンと重なっている) をpUC9にクローニングしてpRW737とした。オリゴヌクレオチドA~EはH6プロモーターを含有し、NruIで始まり、狂犬病ウイルスGのHindIIIに到り、その後にBglIIがある。オリゴヌクレオチドA~E ((SEQ ID NO:31) ~ (SEQ ID NO:35))の配列は以下のとおりである。

A (SEQ ID NO:31): CTGAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTTAA

GTTTGTATCGTAATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGT

B (SEQ ID NO:32): CATTACGATACAACTTAACGGATATCGCGATAA

TGAAATAATTTTCAG

C (SEQ ID NO:33): ACCCCTTCTGGTTTTTCCGTTGTGTTTTGGGAAA

TTCCCTATTTACACGATCCCAGACAAGCTTAGATCTCAG

D (SEQ ID NO:34): CTGAGATCTAAGCTTGTCTGGGATCGTGTAATA

GGGAATTTCCCAAAACA

E (SEQ ID NO:35): CAACGGAAAAACCAGAAGGGGTACAAACAGGAGA

GCCTGAGGAAC

10

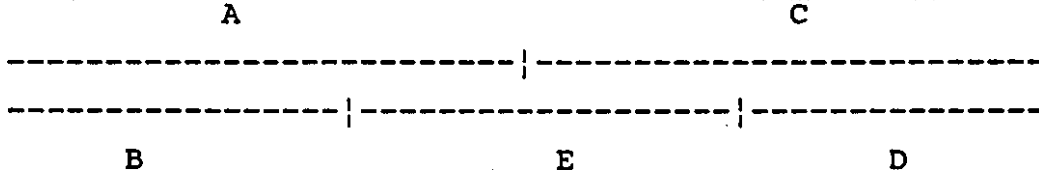
20

30

40

50

また、アニーリングされたオリゴヌクレオチドA～Eを図解すると次のようになる。



オリゴヌクレオチドA～Eをキナーゼ処理し、アニーリングし（95℃で5分間、その後、室温に冷却）、pUC9のP r uII部位間に挿入した。得られたプラスミドpRW737をH i ndIIIおよびB gIIで切断し、p t g 1 5 5 P R O（Kieny他、1984）のH i ndIII-B gIIの1.6kbpフラグメント用ベクターとして使用してpRW739を調製した。p t g 1 5 5 P R O H i ndIII部位は、狂犬病Gの翻訳開始コドンの86bp下流にある。また、p t g 1 5 5 P R Oにおいて、B gIIは狂犬病G翻訳停止コドンの下流にある。pRW739をN r uIを用いて部分切断し、さらにB gIIを用いて完全切断し、かくして、既知のH6プロモーター（Taylor他、1988a,b；Guo他、1989；Perkus他、1989）の3'末端から狂犬病Gの全遺伝子までを含有する1.7kbpのN r uI-B gIIフラグメントをpRW824のN r uI部位とB a mHI部位との間に挿入した。得られたプラスミドをpRW832と命名する。pRW824に挿入することにより、N r uIのH6プロモーターの5'が付加された。S m aIの前のB a mHIのpRW824の配列は、GGATCCCCGGG（S E Q I D N0:36）である。pRW824は、ワクシニアウイルスのH6プロモーターに非関連遺伝子が正確に結合されたプラスミドである。N r uIおよびB a 10
mHIを用いる分解によりこの非関連遺伝子を切除した。このpRW832のS m aIの1.8kbpフラグメント（H6をプロモーターとする狂犬病Gを含有している）をpRW831のS m aIに挿入して、プラスミドpRW838を調製した。

A L V A C-RGの調製 既知のリン酸カルシウム沈降法を用いて（Panicali他、1982；Piccini他、1987）、A L V A C感染初代C E F細胞にpRW838をトランスフェクトさせた。特定の狂犬病Gプローブに対するハイブリダイゼーションにより陽性クローンを選択し、純粋な集団が得られるまで6回の連続的なブランク精製に供した。次に、代表ブランクを増殖して、得られたA L V A C組換え体をA L V A C-RG（v C P 6 5）と命名した（図9Aおよび図9B参照）。配列分析により、狂犬病G遺伝子がA L V A Cゲノム内に正しく挿入され、その後の変異が生じていないことを確認した。 30

免疫蛍光 成熟狂犬病ウイルス粒子が形成される最終段階においては、糖タンパク質成分はゴルジ体から形質膜に移送され、そこで、細胞膜質および細胞膜の外表面にあるタンパク質本体にカルボキシ末端を延ばしながら蓄積する。A L V A C-RG内で発現された狂犬病糖タンパク質が正しく存在していることを確認するために、A L V A CまたはA L V A C-RGで感染された初代C E F細胞上で免疫蛍光測定法を実施した。この免疫蛍光法は、既知の手法（Taylor他、1990）に従い、狂犬病Gのモノクローナル抗体を用いて行った。A L V A C-RGを感染させたC E F細胞においては強い表面蛍光が検出されたが、親のA L V A Cには蛍光は認められなかった。

免疫沈降 初代C E F細胞、ベロ（Vero）細胞（アフリカミドリザルの腎臓細胞由来の細胞系、A T C C # C C L 81）、およびM R C-5細胞（正常なヒト胎児肺臓由来の繊維芽細胞類似の細胞系、A T C C # C C L 171）から予め形成した単層に、既知の手法（Taylor他、1990）に従い、放射ラベルした35S-メチオニンの存在下に、10 p f u /細胞で、親ウイルスA L V A Cおよび組換えウイルスA L V A C-RGを接種した。免疫沈降反応は、狂犬病G特異的モノクローナル抗体を用いて行った。組換えA L V A C-RGの場合は、分子量がおよそ67kDaの狂犬病特異的糖タンパク質が効率的に発現していることが検出された。非感染細胞または親ウイルスであるA L V A Cが感染された細胞においては、狂犬病特異的生成物の検出は認められなかった。

連続継代培養実験 A L V A Cを広範囲の非トリ種に適用した研究では、感染の増幅や明白な病気は認められていない（Taylou他、1991b）。しかしながら、親ウイルスおよび組換えウイルスのいずれも非トリ細胞では増殖できないことを確認するため、連続的な継代 50

培養実験を行った。

以下の細胞基質に2種類のウイルス、すなわち、ALVACおよびALVAC-RGを接種して10代の連続的な盲検（ブラインド）継代培養を行った。

(1)11日齢の白色レグホーン胚由来の初代ニワトリ繊維芽（CEF）細胞；

(2)ベロ（Vero）細胞－アフリカミドリザルの腎臓細胞由来の無限増殖性細胞（ATCC # CCL81）；および

(3)MRC-5細胞－ヒト胎児の胚組織由来の二倍体細胞系（ATCC # CCL171）。

各細胞につき3ヶの60mm培養皿を用い各皿に 2×10^6 ヶの細胞が含有されるようにして、0.1pfu/細胞のm.o.i.で最初の接種を行った。培養皿の1つは、DNA複製の阻害剤であるシトシンアラビノシド（Ara C）40 μ g/mlの存在下に接種を行った。37℃で1時間の吸着期間の後、接種物を除去し、単層を洗浄して非吸着ウイルスを取り除いた。この時点で、培地の置換を行い、2つの培養皿（サンプルt0およびサンプルt7）には5mlのEMEM+2%NBCSを入れ、また、第3番目の培養皿（サンプルt7A）には40 μ g/mlのAra Cを含有する5mlのEMEM+2%NBCSを入れた。サンプルt0は-70℃で凍結して残存する導入ウイルスの指標とした。サンプルt7およびサンプルt7Aは37℃で7日間培養し、その後、内容物をハーベストし、間接音波処理により細胞を破碎した。

各細胞基質のサンプルt7の1mlを同じ細胞基質の3つの培養皿に希釈せずに接種し（サンプルt0、t7およびt7Aとする）、さらに、初代CEF細胞の1つの培養皿に接種した。サンプルt0、サンプルt7およびサンプルt7Aは継代用に処理した。CEF細胞への追加接種は、非トリ細胞中に存在し得るようなウイルスに対する高感度検出用の増殖工程に供した。

この操作を繰り返して、10代の連続ブラインド継代培養（CEFおよびMRC-5）または8代の連続ブラインド継代培養を行った。サンプルを凍結し、3回解凍して初代CEF単層上で滴定を行うことにより分析した。

次に、寒天培地下にCEF単層上でプラーク滴定を行うことによりウイルス収量を測定した。実験結果をまとめて図1および図2に示す。

この結果から、親のALVACおよび組換え体のALVAC-RGの両方とも、CEF単層上で複製を持続する能力を有し力価の損失はないことが示されている。ベロ（Vero）細胞においては、ALVACについては第2代後、また、ALVAC-RGについては第1代後にウイルスのレベルは検出レベル以下に低下した。MRC-5においても同様の結果が示され、第1代後にはウイルスが検出されなかった。図1および図2には第4代までの結果しか示していないが継代培養を第9代（Vero）および第10代（MRC-5）まで行ったところ、これらの非トリ細胞においてはいずれのウイルスも検知可能となるように成長適応化していなかった。

第1代においては、MRC-5細胞およびVero細胞のt7サンプルには比較的高レベルのウイルスが存在した。しかしながら、このレベルは、t0サンプルおよびウイルスの複製が起こり得ないようにシトシンアラビノシドの存在下に接種を行ったt7Aサンプルにおいて見られるレベルに等しかった。このことは、非トリ細胞において7日目に認められたウイルスレベルは、残存ウイルスを表し新たに複製されたウイルスではないことを示している。

分析をさらに高感度にするため、各細胞基質から7日目にハーベストしたものの一部を、許容CEF単層に接種し、細胞変性効果（CPE）が認められた時にハーベストするか、またはCPEが示されない場合は7日目にハーベストした。この実験結果を図3に示す。許容細胞基質による増殖後においても、MRC-5細胞およびVero細胞においては、更に2代の継代でウイルスが検出されるだけであった。これらの結果から、採用した条件下では、Vero細胞またはMRC-5細胞においてはいずれのウイルスも増殖できるように適応化できないことが明らかである。

アカゲザルへの接種 HIVに関して血清反応陽性の4匹のアカゲザルに先ずALVAC-RGを接種した（表4）。100日後、該動物に再接種してブースター効果を調べ、さらに、追加の7匹のアカゲザルにいろいろな投与量で接種を行った。適当な間隔で血液を抜

10

20

30

40

50

き出し、56℃において30分間の加熱不活性化後、迅速蛍光フォーカス阻止（Rapid Fluorescent Focus Inhibition: R F F I）分析法（Smith他、1973）により狂犬病ウイルス抗体の存在を血清分析した。

チンパンジーへの接種 オトナのオスのチンパンジー2匹（体重範囲50～65kg）に、v C P 6 5 を 1×10^7 pfu で筋肉内また皮下接種した。該動物の反応を観察し、また、規則的な間隔で採血を行いR F F I テスト（Smith他、1973）により抗狂犬病ウイルス抗体の存在を分析した。最初の接種から13週間後、同じ投与量で該動物に再接種した。

マウスへの接種 グループ分けしたマウスに、異なるバッチ由来のv C P 6 5 をいろいろな希釈度で50～100 μ l 接種した。マウスへの接種は肉趾に接種した。14日目に、狂犬病ウイルスのビルレント性C V S 株を15～43マウスL D₅₀で頭蓋内接種することによりマウスのチャレンジを行った。マウスの生存率を監視し、接種から28日目における50%防御投与量（P D₅₀）を求めた。

イヌおよびネコへの接種 10匹のビーグル犬（5ヶ月齢）および10匹のネコ（4ヶ月齢）に、A L V A C - R G を6.7または7.7log₁₀ T C I D₅₀で皮下接種した。4匹のイヌおよび4匹のネコには接種を行わなかった。接種後14日および28日後にそれらの動物の採血を行い、R F F I テストにより抗狂犬病ウイルス抗体を分析した。6.7log₁₀ T C I D₅₀のA L V A C - R G が投与された動物については、接種後29日目に、N Y G S 狂犬病ウイルスチャレンジ株の3.7log₁₀（マウスL D₅₀）（ビーグル犬）または4.3log₁₀（マウスL D₅₀）（ネコ）を用いてチャレンジを行った。

リスザルへの接種 各グループに4匹のリスザル（*Saimiri Sciureus*）から成る3グループのリスザルに、3種類のウイルスの1つ、すなわち、(a) A L V A C（カナリアポックス親ウイルス）、(b) A L V A C - R G（狂犬病G糖タンパク質を発現する組換体、または(c) v C P 3 7（ネコ白血病ウイルスのエンベロップ糖タンパク質を発現するカナリアポックス組換え体）を接種した。接種はケタミン麻酔下を実施した。各動物は以下を同時に投与された：(1)乱刺を行わずに右目の表面に滴注された20 μ l、(2)口中に数滴として100 μ l、(3)右腕の外表面の毛をそった皮膚内の2つの注射部位にそれぞれ100 μ l；および(4)右大腿の前部筋肉に100 μ l。

4匹のサルに各ウイルスを接種し、2匹についてはlog₁₀ pfuとして全量5.0とし、また、他の2匹についてはlog₁₀ pfuとして7.0とした。規則的な間隔で該動物の採血を行い、血清を分析してR F F I テスト（Smith他、1973）により抗狂犬病ウイルス抗体を調べた。接種に対する該動物の反応を毎日観察した。最初の接種から6ヶ月後、A L V A C - R G を投与された4匹のリスザル、v C P 3 7 が当初投与された2匹のリスザルに加えて非投与のリスザル1匹に、A L V A C - R G を6.5log₁₀ pfuで皮下接種した。血清を分析して、R F F I テスト（Smith他、1973）により狂犬病ウイルス中和抗体の存在を調べた。

ヒト細胞系へのA L V A C - R G の接種 当該ウイルスが複製しない非トリ細胞内で外来遺伝子が効率的に発現されるか否かを判定するため、5種類の細胞系、すなわち、1種類のトリ系および4種類の非トリ系について分析を行い、ウイルス収量、外来狂犬病G遺伝子の発現およびウイルス特異的DNA蓄積を調べた。接種した細胞は次のとおりである。

(a) Vero細胞。アフリカミドリザル腎臓細胞。A T C C # C C L 81。

(b) M R C - 5細胞。ヒト胎児肺細胞。A T C C # C C L 171。

(c) W I S H細胞。ヒト羊膜由来。A T C C # C C L 25。

(d) Detroit-532細胞。ヒト包皮由来。ダウン症候群。A T C C # C C L 54。

(e) 初代C E F細胞。

11日齢白色レグホーン胚由来のニワトリ胚繊維芽細胞を陽性対象として用いた。接種は全て、下記のように予め調製した 2×10^6 細胞から成る単層に実施した。

A. DNA分析法。

各細胞系について3ヶの培養皿を用い、被試験ウイルスを5 pfu/細胞で接種し、さらに、各細胞系について1ヶの培養皿を追加し非接種用とした。培養皿の1つについては、40 μ g/mlのシトシスアラビノシド（A r a C）の存在下に培養を行った。37℃において60分間の吸着期間の後、接種物を除き、単層を2回洗浄して非吸着ウイルスを除去した。次

10

20

30

40

50

いで、培地（Ara Cを含有するもの、または含有しないもの）の交換を行った。培養皿の1つ（Ara Cを含有しないもの）からは、時間ゼロにおけるサンプルとして細胞をハーベストした。残りの皿は、37℃で72時間保持した後、細胞をハーベストしてDNA蓄積の分析に用いた。2×10⁶細胞から成る各サンプルを40mMのEDTAを含有する0.5mlのリン酸緩衝塩溶液（PBS）に再懸濁して37℃で5分間保温した。42℃で予め加温し120mMのEDTAを含有する等体積の1.5%アガロースを細胞懸濁液に添加してゆっくり混合した。該懸濁液をアガロースプラグモールドに移し、少なくとも15分間放置して硬化させた。次いで、アガロースプラグを取り除き、該プラグを覆うような体積の溶解緩衝液（1%のサルコシル、100μg/mlのプロティナーゼK 10mMのトリスHCl pH7.5、200mlのEDTA）内で50℃において12～16時間インキュベートした。次に、該溶解緩衝液を5.0mlの無菌0.5×TBE（44.5mlのトリスーボロン酸、44.5mMのボロン酸、0.5mMのEDTA）と置換して、TBE緩衝液を3回変えながら4℃において6時間平衡化した。パルス電場式電気泳動装置を用いて細胞RNAおよびDNAからプラグ内にあるウイルスDNAを分別した。電気泳動は、ランプ50～90秒とし0.5×TBE内で15℃において、180Vで20時間実施した。ラムダDNAを分子量標準としてDNAを走行させた。電気泳動後、エチジウムブロミドで染色することによりウイルスDNAのバンドを可視化した。次にDNAをニトロセルロース膜に移し、精製ALVACゲノムDNAから調製した放射ラベル化プローブを用いて分析した。

10

B. ウイルス収量の推定

培養皿への接種は上記と同じように行った。但し、感染多重度は0.1pfu/細胞とした。感染72時間後、凍結および解凍サイクルを3回連続的に実施することにより細胞を溶解した。CEF単層上でプラーク滴定を行うことによりウイルス収量を調べた。

20

C. 狂犬病G遺伝子の発現の分析

組換えウイルスまたは親ウイルスを10pfu/細胞の多重度で培養皿に接種するとともに、追加の皿を非感染ウイルス対照用とした。1時間の吸着期間の後、培地を除去し、無メチオニン培地と置換した。30分後、この培地を、25μCi/mlの³⁵S-メチオニンを含有する無メチオニン培地と置換した。感染細胞を一晩かけて（約16時間）ラベル化し、次に、A緩衝液を添加することにより溶解した。狂犬病G特異的モノクローナル抗体を用い既知の手法に従い（Taylor他、1990）、免疫沈降を実施した。

結果：ウイルス収量の推定

30

細胞当たり0.1pfuで接種した72時間後に行ったウイルス収量を求める滴定分析の結果を表5に示す。この結果が示すように、トリ細胞においては強い感染が生じ得るが、4種類の非トリ細胞系においてはこの方法ではウイルス収量の増加を検知することはできない。

ウイルスDNAの蓄積の分析 DNA複製の前または後に非トリ細胞におけるウイルス複製の障害が生じたか否かということを判定するために、細胞リゼイト（溶菌液）からのDNAを電気泳動法により分画し、ニトロセルロースに移し、ウイルス特異的DNAを探索した。非感染CEF細胞、時間ゼロにおけるALVAC-RG感染細胞、接種72時間後のALVAC-RG感染CEF細胞および接種72時間後のALVAC-RG感染CEF細胞（40μg/mlのシトシンアラビノシド存在下）由来のDNAはいずれもある程度のバックグラウンド活性を示したが、これは、おそらく、放射ラベル化ALVAC DNAプローブの調製に際して混入したCEF細胞DNAに因るものと思われる。しかしながら、接種72時間後のALVAC-RG感染CEF細胞は、約350kbpの領域にALVAC特異的ウイルスDNAの蓄積を表す強いバンドを示した。DNA合成阻害剤であるシトシンアラビノシドの存在下に培養物をインキュベートしてもそのようなバンドは検出されなかった。

40

Vero細胞で得られた相応するサンプルについては、時間ゼロにおけるALVAC-RG感染Vero細胞において約350kbpにおいて非常に弱いバンドが示された。このレベルは残存ウイルスを表すものであった。接種72時間後にはバンド強さが増加されており、このことは、Vero細胞においてはある程度のレベルのウイルス特異的DNA複製が起こったが、ウイルス子孫の増加を生じさせはしなかったということを示唆している。MRC-5細胞で得られた相応するサンプルにおいては、これらの条件下でウイルス特異的DNAの蓄積は検

50

出されなかった。この実験を広げ、追加のヒト細胞系、すなわちW I S H細胞およびDetroit-532細胞についても実施した。A L V A C感染C E F細胞を陽性対照とした。A L V A C-R Gが接種されたW I S H細胞およびDetroit細胞のいずれにおいてもウイルス特異的D N A蓄積は検出されなかった。なお、この方法の検出限界は完全には確認されておらず、ウイルスD N A蓄積は起こっているのかも知れないが、該方法の感度よりも低いレベルであろう。³H-チミジンを導入することによりウイルスD N A複製が測定されるようにした他の実験は、Vero細胞およびM R C-5細胞に関して得られた上記の結果を支持している。

狂犬病遺伝子の発現分析 ウイルス遺伝子、特に挿入された外来遺伝子の発現が、ウイルスD N A複製の非存在下においてもヒト細胞系で起こっているか否かを判定するために、A L V A CおよびA L V A C-R Gを感染させたトリ系細胞および非トリ系細胞由来の³⁵S-メチオニンラベル化リゼイトについて免疫沈降実験を実施した。狂犬病G特異的モノクローナル抗体を用いる免疫沈降実験の結果、A L V A C-R Gを感染させたC E F、Vero、M R C-5、W I S HおよびDetroitの各細胞において67k D aの糖タンパク質から成る特異的免疫沈降が認められた。非感染細胞および親ウイルスを感染させた細胞のリゼイトのいずれにおいても、そのような特異的狂犬病遺伝子産物は検出されなかった。この実験結果が示唆することは、分析したヒト細胞系においては、A L V A C-R G組換え体はH 6 初期／後期ワクシニアウイルスプロモータの転写制限下に感染を開始し外来遺伝子産物を発現させることはできるが、D N A複製を介する複製は進行せず、また、検知され得るようなウイルス子孫は産生しなかったということである。Vero細胞においては、ある程度のレベルのA L V A C-R G特異的D N A複製は認められたが、この方法ではウイルス子孫は検出されなかった。これらの結果から、分析したヒト細胞系においてはウイルス複製の阻止はD N A複製の開始前に起こるが、Vero細胞においてはウイルスD N A複製の開始後に該阻止が起こるのであろう。

A L V A C-R G内で発現された狂犬病糖タンパク質が免疫原性を有するか否かを判定するために、多くの動物種に該組換え体を接種してテストした。現行の狂犬病ワクチンの効力はマウスモデル系で評価されている。そこで、A L V A C-R Gを用いて同様のテストを行った。感染力価が6.7から8.4 ($\log_{10}$ (T C I D₅₀/ml)) の範囲にある9種類のウイルス調製物(種ウイルスを10回組織培養による継代培養して得られたワクチンバッチ(J)を含む)を連続的に希釈し、50~100 μ lの希釈液を4週齢から6週齢のマウスの肉趾に接種した。14日後に、マウスL D₅₀(対照用マウスグループにおける致死滴定量から求めた)が15から43の狂犬病ウイルスC V S株300 μ lを頭蓋内投与してマウスをチャレンジした。P D₅₀(50%防御投与量)として表す効力をチャレンジから14日目に計算した。実験結果を表6に示す。この結果から、A L V A C-R Gは狂犬病ウイルスのチャレンジに対して恒常的にマウスを防御することができ、P D₅₀値は、3.33から4.56の範囲にあり平均値3.73 (S T D 0.48)であることが示されている。追加実験として、6.0 $\log_{10}$ T C I DのA L V A C-R Gを含有するウイルス50 μ lまたは等体積の非感染細胞懸濁液をオスのマウスに頭蓋内接種した。接種から1日、3日および6日目にマウスを殺し、その脳を取り出し、固定化し薄片に切断した。組織病理学検査によれば、マウス内にA L V A C-R Gの神経毒性の証拠は認められなかった。

イヌおよびネコに対するA L V A C-R Gの安全性および効力を評価するため、14ヶ月齢および5ヶ月齢のビーグル犬、ならびに14ヶ月齢および4ヶ月齢のネコから成るグループの分析を行った。該イヌおよびネコのそれぞれについて4匹にはワクチン接種を行わなかった。該動物の5匹には6.7 $\log_{10}$ T C I D₅₀で皮下投与した。動物の採血を行い、抗狂犬病抗体の分析を行った。非投与または6.7 $\log_{10}$ T C I DのA L V A C-R Gを投与した動物に対しては、接種から29日目に、N Y G S狂犬病ウイルスチャレンジ株の3.7 $\log_{10}$ (マウスL D₅₀) (ビーグル犬、側部筋に)または4.3 $\log_{10}$ (マウスL D₅₀) (ネコ、頸部に)を用いてチャレンジを行った。実験結果を表7に示す。

ネコおよびイヌのいずれにおいても且ついずれの接種ウイルス投与量においても接種に対する副作用は認められなかった。6.7 $\log_{10}$ T C I D₅₀で免疫された5匹のイヌのうち4匹は

10

20

30

40

50

、ワクチン接種14日目に抗体力価を示し、29日目には全てのイヌが抗体力価を有した。全てのイヌが、4匹の対照用イヌの3匹を殺したようなチャレンジに対して防御された。ネコの場合、 $6.7\log_{10} \text{TCID}_{50}$ で投与された5匹のネコのうち、3匹が14日目に特異的抗体力価を有し、そして、29日目には全てが陽性となったが、平均抗体力価は低く2.9IUであった。対照用ネコの全てを殺したようなチャレンジに対して、5匹のネコのうち3匹が生存した。 $7.7\log_{10} \text{TCID}_{50}$ で免疫したネコは全て14日目に抗体力価を示し、29日目には幾何平均力価は8.1国際単位（IU）であった。

ALVAC、ALVAC-RGおよび非関連カナリアポックスウイルス組換え体の接種に対するリスザル (*Saimiri Sciureus*) の免疫応答を試験した。幾つかのグループに分けたリスザルに上述したように接種を行い、血清を分析して狂犬病特異的抗体の有無を調べた。皮内投与に対する軽い典型的な皮膚反応を除いては、いずれのサルにおいても副作用は認められなかった。投与から2日目および4日目だけは、皮内接種後の皮膚損傷部から少量の残留ウイルスを単離した。7日目以降は全て陰性であった。筋注に対する局所反応は認められなかった。ALVAC-RGが接種された4匹のサルは全て、RFFIテスト測定すると、抗狂犬病血清中和抗体を産生してた。最初の接種から約6ヶ月後、全てのサルおよび追加の非接種サル1匹に、左側大腿部の外表面に $6.5\log_{10} \text{TCID}_{50}$ のALVAC-RGを皮下経路で再接種した。血清を分析して抗狂犬病抗体の存在を調べた。結果を表8に示す。

狂犬病ウイルス未感染の5匹のサルのうち4匹は、ALVAC-RGの接種7日後に血清学的応答を示した。接種11日後には5匹のサル全てが検出可能な抗体を有した。予め狂犬病糖タンパク質に感染された4匹のサルについては、ワクチン接種から3日から7日の間に血清中和力価に有意の増加が認められた。この結果から、リスザルにALVAC-RGをワクチン接種すると副作用は生じず、一次中和抗体応答が誘起され得ることが示された。ALVACに、または非関連外来遺伝子を発現するカナリアポックス組換え体に予め感染していても、再ワクチン接種に際して、抗狂犬病免疫の誘発を妨げない。

HIV-2に関して血清反応陽性のアカゲザルにおいてALVAC-RG接種に対する免疫応答を調べた。該動物に上述のように接種を行い、RFFIテストにより抗狂犬病血清中和抗体の有無を分析した。表9に結果を示すように、皮下接種されたHIV-2陽性アカゲザルは、1回の接種から11日目までに抗狂犬病抗体を産生した。最初の接種から約3ヶ月後に与えたブースター接種後に既往応答が検出された。該組換え体が経口投与された動物には何らかの応答も検出されなかった。更に、一連の6匹のアカゲザルに投与量を減少させながらALVAC-RGを筋肉内または皮下投与した。接種された6匹のうち5匹がワクチン接種から14日目までに応答を示したが抗体力価に有意の差は無かった。

以前にHIV感染した2匹のチンパンジーに $7.0\log_{10} \text{pfu}$ のALVAC-RGを皮下または筋肉内接種した。該接種から3ヶ月後に両チンパンジーに同じ方法で再ワクチン接種した。結果を表10に示す。

筋肉内または皮下接種のいずれにおいても接種に対する副作用は見られなかった。いずれのチンパンジーも初回接種から14日目までに応答し、そして、再接種後に応答の強い増強が検出された。

10

20

30

表 1. トリおよび非トリ細胞における A L V A C の連続継代培養

	<u>C E F</u>	<u>Vero</u>	<u>M R C - 5</u>	
第 1 代				
サンプル t 0 ^a	2.4	3.0	2.6	10
t 7 ^b	7.0	1.4	0.4	
t 7 A ^c	1.2	1.2	0.4	
第 2 代				
サンプル t 0	5.0	0.4	N. D. ^d	20
t 7	7.3	0.4	N. D.	
t 7 A	3.9	N. D.	N. D.	
第 3 代				
サンプル t 0	5.4	0.4	N. D.	
t 7	7.4	N. D.	N. D.	
t 7 A	3.8	N. D.	N. D.	
第 4 代				
サンプル t 0	5.2	N. D.	N. D.	30
t 7	7.1	N. D.	N. D.	
t 7 A	3.9	N. D.	N. D.	

a : このサンプルは時間ゼロにおいてハーベストされたものであり、残存する導
入ウイルスを表す。力価は log pfu/ml として表す。

b : このサンプルは感染後 7 日目にハーベストされた。

c : このサンプルは、40 μ g/ml のシトシンアラビノシドの存在下に接種され、感
染後 7 日目にハーベストされた。

d : 検出されず (Not Detectable)

表 2. トリおよび非トリ細胞における A L V A C - R G の連続継代培養

	C E F	Vero	M R C - 5	
第 1 代				
サンプル t 0 ^a	3.0	2.9	2.9	10
t 7 ^b	7.1	1.0	1.4	
t 7 A ^c	1.8	1.4	1.2	
第 2 代				
サンプル t 0	5.1	0.4	0.4	
t 7	7.1	N. D. ^d	N. D.	
t 7 A	3.8	N. D.	N. D.	
第 3 代				
サンプル t 0	5.1	0.4	N. D.	20
t 7	7.2	N. D.	N. D.	
t 7 A	3.6	N. D.	N. D.	
第 4 代				
サンプル t 0	5.1	N. D.	N. D.	30
t 7	7.0	N. D.	N. D.	
t 7 A	4.0	N. D.	N. D.	

a : このサンプルは時間ゼロにおいてハーベストされたものであり、残存する導
入ウイルスを表す。力価はlog pfu/mlとして表す。

b : このサンプルは感染後 7 日目にハーベストされた。

c : このサンプルは、40 μ g/ml のシトシンアラビノシドの存在下に接種され、感
染後 7 日目にハーベストされた。

d : 検出されず (Not detectable)

表 3. C E F 細胞における継代培養による残存ウイルスの増殖

		C E F	Vero	M R C - 5	
a) A L V A C					
継代数	2 ^a	7.0 ^b	6.0	5.2	10
	3	7.5	4.1	4.9	
	4	7.5	N. D. ^c	N. D.	
	5	7.1	N. D.	N. D.	
b) A L V A C - R G					
継代数	2 ^a	7.2	5.5	5.5	20
	3	7.2	5.0	5.1	
	4	7.2	N. D.	N. D.	
	5	7.2	N. D.	N. D.	

a : 第 2 代は、第 1 代の 7 日目サンプルを C E F 細胞内で増殖させたもの

b : 力価は $\log_{10}\text{pfu/ml}$ として表す。

c : 検出されず (Not Detectable)

表 4. アカゲザル (rhesus macaques) への A L V A C - R G (v C P 6 5) の接種スケジュール

動物	接種法	
176L	一次： 1×10^8 pfu の vCP65 、 Tang で経口接種	10
	二次： 1×10^7 pfu の vCP65 1×10^7 pfu の vCP82 ^a 、皮下接種	
185L	一次： 1×10^8 pfu の vCP65 、 Tang で経口接種	
	二次： 1×10^7 pfu の vCP65 1×10^7 pfu の vCP82 、皮下接種	
177L	一次： 5×10^7 pfu の vCP65 、皮下接種	
	二次： 1×10^7 pfu の vCP65 1×10^7 pfu の vCP82 、皮下接種	
186L	一次： 5×10^7 pfu の vCP65 、皮下接種	20
	二次： 1×10^7 pfu の vCP65 1×10^7 pfu の vCP82 、皮下接種	
178L	一次： 1×10^7 pfu の vCP65 、皮下接種	
182L	二次： 1×10^7 pfu の vCP65 、筋肉内接種	
179L	一次： 1×10^6 pfu の vCP65 、皮下接種	
183L	一次： 1×10^6 pfu の vCP65 、筋肉内接種	
180L	一次： 1×10^6 pfu の vCP65 、皮下接種	30
184L	一次： 1×10^5 pfu の vCP65 、筋肉内接種	
187L	一次： 1×10^7 pfu の vCP65 、経口接種	

a : v C P 8 2 は、麻疹ウイルス融合物と血球凝集素遺伝子を発現するカナリアポックスウイルス組換え体である。

表5. ALVAC-RGを接種したトリ系および非トリ系細胞におけるウイルス収量の分析

サンプル時間				
細胞の種類	t0	t72	t72A ^b	
実験1				10
CEF	3.3 ^a	7.4	1.7	
Vero	3.0	1.4	1.7	
MRC-5	3.4	2.0	1.7	
実験2				
CEF	2.9	7.5	<1.7	
WISH	3.3	2.2	2.0	20
Detroit-532	2.8	1.7	<1.7	

a : log₁₀ pfu/mlで表した力価

b : 40 μg/mlのシトシンアラビノシドの存在下に培養

表 6. マウス内で試験された A L V A C - R G の効力

被試験対象	チャレンジ投与量 ^a	PD ₅₀ ^b	
種株	43	4.56	
第 1 代菌株	23	3.34	
ワクチンバッチ H	23	4.52	10
ワクチンバッチ I	23	3.33	
ワクチンバッチ K	15	3.64	
ワクチンバッチ L	15	4.03	
ワクチンバッチ M	15	3.32	
ワクチンバッチ N	15	3.39	
ワクチンバッチ J	23	3.42	20

a : マウス LD₅₀で表すb : log₁₀ TCID₅₀で表す

表 7. イヌおよびネコにおける A L V A C - R G の効力

イヌ			ネコ		
投与量	抗体 ^a	生存率 ^b	抗体	生存率	
6.7	11.9	5/5	2.9	3/5	
7.7	10.1	N.T.	8.1	N.T.	

a : 幾何平均力価 (国際単位 : I U) で表した接種から29日後の抗体力価

b : チャレンジを受けた動物に対する生存動物の比で表す

10

20

30

40

表 8. カナリアボックス組換え体が接種されたリスザルの抗狂犬病血清応答

カニクイザル		狂犬病血清 - 中和抗体 ^a							
#	事前感染	-196 ^b	0	3	7	11	21	28	
22	ALVAC ^c	NT ^g	<1.2	<1.2	<1.2	2.1	2.3	2.2	10
51	ALVAC ^c	NT	<1.2	<1.2	1.7	2.2	2.2	2.2	
39	vCP37 ^d	NT	<1.2	<1.2	1.7	2.1	2.2	N.T. ^g	
55	vCP37 ^d	NT	<1.2	<1.2	1.7	2.2	2.1	N.T.	
37	ALVAC-RG ^e	2.2	<1.2	<1.2	3.2	3.5	3.5	3.2	
53	ALVAC-RG ^e	2.2	<1.2	<1.2	3.6	3.6	3.6	3.4	20
38	ALVAC-RG ^f	2.7	<1.7	<1.7	3.2	3.8	3.6	N.T.	
54	ALVAC-RG ^f	3.2	<1.7	<1.5	3.6	4.2	4.0	3.6	
57	None	NT	<1.2	<1.2	1.7	2.7	2.7	2.3	

a : 掲記の日に R F F I テストで測定し国際単位で表したもの

30

b : 一次接種から28日後の血清を示す。

c : $5.0 \log_{10}$ TCID₅₀ の ALVAC が投与されたリスザル

d : $5.0 \log_{10}$ TCID₅₀ の vCP37 が投与されたリスザル

e : $5.0 \log_{10}$ TCID₅₀ の ALVAC-RG が投与されたリスザル

f : $7.0 \log_{10}$ TCID₅₀ の ALVAC-RG が投与されたリスザル

g : 試験せず (Not tested)

40

表 9. アカゲザルへの A L V A C - R G ^a の接種

接種からの日数 接種経路 (or/Tang:経口(Tang), SC:皮下, IM:筋肉内, OR:経口)

	<u>or/Tang</u> <u>176L^b185L</u>		<u>SC</u> <u>177L</u>	<u>SC</u> <u>186L</u>	<u>SC</u> <u>178L</u>	<u>IM</u> <u>182L</u>	<u>SC</u> <u>179L</u>	<u>IM</u> <u>183L</u>	<u>SC</u> <u>180L</u>	<u>IM</u> <u>184L</u>	<u>OR</u> <u>187L^b</u>
-84	-	-		-							
-9	-	-	-	-	-		-				
3	-	-	-	-							
6	-	-	±	±							
11	-	-	16 ^d	128							
19	-	-	32	128	-		-				
35	-	-	32	512							
59	-	-	64	256							
75	-	-	64	128	-		-				
99 ^c	-	-	64	256	-		-	-	-	-	-
2	-	-	32	256	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	512	512	-	-	-	-	-	-	-
15	16	16	512	512	64	32	64	128	32	-	-
29	16	32	256	256	64	64	32	128	32	-	-
55		32				32		32	16	-	
57	16		128	128	16		16				-

a : 接種スケジュールについては表 9 を参照のこと。

b : アカゲザル176Lおよび185Lは 5 mlのTangに入れ経口で8.0log₁₀pfu を投与、
アカゲザル187LはTangに入れずに経口で7.0log₁₀pfuを投与。c : アカゲザル176L、185L、177Lおよび186Lに対しては皮下投与で再ワクチン
接種し、また、アカゲザル178L、182L、179L、183L、180L、184Lおよび18
7Lに対しては一次ワクチン接種した日。d : R F F I テストにおいて蛍光の阻害を示した最終希釈倍数の逆数として表
した力価。

表10. チンパンジーへのALVAC-RGの接種

接種後の週	チンパンジー431 (筋肉内接種)	チンパンジー457 (皮下接種)	
0	<8 ^a	<8	10
1	<8	<8	
2	8	32	
4	16	32	
8	16	32	
12 ^b /0	16	8	
13/1	128	128	20
15/3	256	512	
20/8	64	128	
26/12	32	128	

30

a : R F F I テストにおいて蛍光の阻害を示した最終希釈倍数の逆数として表した力価

b : 再接種の日

実施例 9 - 狂犬病糖タンパク質を発現するカナリアボックス (ALVAC-RG ; v C P 6 5) を用いるヒトの免疫化

40

実施例 9 および図 9 A および図 9 B で記述したように ALBAC-RG (v C p 6 5) を調製した。スケールアップおよびワクチン生産のため、SPF 卵由来の初代 C E F において ALVAC-RG (v C P) を増殖させた。細胞を 0.1 の多重度で感染させ、37°C において 3 日間インキュベートした。

該感染細胞から成る無血清培地中で超音波破碎することによりワクチンウイルスの懸濁液を得た。次に、細胞破片を遠心分離とろ過により取り除いた。得られた清澄な懸濁液に凍結乾燥安定剤 (アミノ酸の混合物) を加え、単一投与用バイアル内に分散させ、凍結乾燥した。凍結乾燥の前に、無血清培地および凍結乾燥剤の混合物に入れたウイルス懸濁液を連続的に 10 倍希釈することにより力価が徐々に低下した 3 種類のバッチを調製した。

細胞基質、培地およびウイルス種株ならびに最終生成物には品質管理試験を行った。望ま

50

しくない特徴は見出されなかった。

前臨床データ インビトロ試験によれば、VERO細胞またはMRC-5細胞はALVAC-RG (vCP65) の増殖を支持せず、8回の連続継代培養 (VEROの場合) および10回の連続継代培養 (MRCの場合) によって、これらの非トリ細胞系において当該ウイルスが検出され得るように増殖適応化されないことが示された。ALVAC-RG (vCP65) が感染または接種されたヒト細胞系 (MRC-5、WISH、Detroit-532、HEL、HNKまたはEBV形質転換リンパ芽球細胞) の分析では、ウイルス特異的DNAの蓄積は認められず、これらの細胞においてはDNA合成の前に複製の障害が起こることが示唆された。しかしながら、重要なことには、試験された全ての細胞系において狂犬病ウイルス糖タンパク質の発現から、カナリアボックス複製サイクルにおける不稔過程はウイルスDNA複製に先行して起こることが示唆された。 10

一連の動物実験においてALVAC-RG (vCP65) の安全性と効力が明らかにされた。多数の動物種、例えばカナリア、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、実験用げっ歯類 (マウスの乳獣および成獣)、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、リスザル、アカゲザルおよびチンパンジーに、 10^5 から 10^8 pfu の投与量範囲で接種が行われた。各種の投与経路を検討し、最も一般的には皮下、筋肉内および皮下投与であったが、経口 (サル類およびマウス) や頭蓋内投与 (マウス) も採用した。

カナリアにおいては、ALVAC-RG (vCP65) は、乱刺部位に「癒着」損傷を引き起こしたが、疾病や死亡の徴候はなかった。ウサギへの皮内接種は典型的なボックスウイルス接種反応を示したが、この反応が拡がることはなく、7日から10日で治癒した。いずれの動物においてもカナリアボックスに因る副作用は無かった。げっ歯類、イヌ、ネコおよび霊長動物にALVAC-RG (vCP) を接種した後、迅速蛍光フォーカス阻害テスト (RFFIT) によって測定すると、抗狂犬病抗体が産生していることにより免疫原性があることが明らかにされた。また、ALVAC-RG (vCP65) で免疫したマウス、イヌ、およびネコに狂犬病ウイルスをチャレンジすることにより防御機能が発現することも明らかにされた。 20

ボランティア 狂犬病免疫化の前略のない年齢20~45才の25人の健康な成人を登録した。病歴調査、身体検査および血液の化学分析を行うことにより、これらのボランティアの健康状態を調べた。妊娠、アレルギー症、あらゆる種類の免疫低下症、慢性的な衰弱症、がん、過去3ヶ月以内の免疫グロブリンの投与、およびヒト免疫不全症ウイルス (HIV) またはB型肝炎表面抗原に対する血清反応陽性を有する者は排除した。 30

試験計画 標準的なヒトジプロイド細胞狂犬病ワクチン (HDC) (フランスLyonのPasteur Merieux Serum & Vaccine製) または対象ワクチンALVAC-RG (vCP65) のいずれかが投与されるようにボランティアを無作為に振り分けた。

この試験は投与量 (用量) 漸増試験とした。3つのバッチ由来の試験対象ワクチンALVAC-RG (vCP65) を3グループのボランティア (グループA、BおよびC) に2週間間隔で逐次的に使用した。それらの3つのバッチの濃度は、それぞれ、1回の投与当たり、 $10^{3.5}$ 、 $10^{4.5}$ および $10^{5.5}$ TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose: 50%組織培養感染量) とした。

各ボランティアには、2週間間隔で三角筋域に同一のワクチンを2回皮下投与 (注射) した。最初の投与時にはボランティアには投与ワクチンの種類を知らせないが、研究者には分かるようにした。 40

第2回目の投与時に即時過敏症を可及的に少なくするため、実験対象ワクチンの中間用量が投与されるように割り当てられたグループBのボランティアには、1時間前に低用量を投与し、また、高用量グループ (グループC) のボランティアには1時間間隔で低用量および中間用量を逐次投与した。

6ヶ月後、最も高用量のALVAC-RG (vCP65) の被投与者 (グループC) およびHDCワクチンの被投与者に第3回目のワクチン投与を行った。次に、該被投与者を無作為に分けて以前と同一のワクチンまたは別のもう一方のワクチンを投与した。このようにして、以下の免疫化スケジュールに対応する4つのグループを構成した: 1. HDC、 50

HDC-HDC；2. HDC、HDC-ALVAC-RG (vCP65)；3. ALVAC-RG (vCP65)、ALVAC-RG (vCP65)-HDC；4. ALVAC-RG (vCP65)、ALVAC-RG (vCP65)、ALVAC-RG (vCP65)。

副作用の観察 すべての被験者を投与1時間後に観察し、さらに次の5日間にわたり毎日検査した。次の3週間、局所反応および全身反応について尋ね、1週間に2度、電話により質問した。

実験室における分析 登録前、ならびに各投与後2日目、4日目および6日目に血液標本を採取した。実施した分析には、血球数、肝臓酵素およびクレアチンキナーゼの分析を含む。

10

抗体分析 最初の投与の7日前ならびに実験開始から7日、28日、35日、56日、173日、187日および208日目に抗体分析を行った。

中和抗体のレベルの測定には、迅速蛍光フォーカス阻害テスト (RFIIT) (Smith他、1973) を採用した。カナリアボックス抗体は、直接ELISAにより測定した。これには、抗原、すなわち、0.1% Triton×100で破碎した精製カナリアボックスウイルスの懸濁液をマイクロプレートに被覆した。血清の固定化稀釈液を室温下で2時間反応させ、ペルオキダーゼでラベルした抗ヒトIgGヤギ抗体を用いて反応性抗体を出現させた。結果を490nmにおける光学密度として表した。

分析 25名を被験者として登録し試験を行った。男性が10名、女性が15名であり、平均年齢は31.9才 (21才～48才) であった。3名を除く全てが、以前に種痘のワクチン接種を受けていた。残りの3名の被験者は瘢痕およびワクチン接種の前歴がなかった。3名の被験者に試験対象ワクチンの低用量のそれぞれ ($10^{3.5}$ および $10^{4.5}$ TCID₅₀) を投与し、9名の被験者には $10^{5.5}$ TCID₅₀ を投与し、さらに10名の被験者にHDCワクチンを投与した。

20

安全性 (表11) 初回免疫に際して、投与から24時間以内に37.7℃より高い熱を示したのは、HDCを投与された者の1名 (37.8℃) および $10^{5.5}$ TCID₅₀ のvCP65を投与された者の1名 (38℃) であった。ワクチン接種によるその他の全身性反応はいずれの被投与者にも見られなかった。

皮下接種によるHDCワクチンの被投与者の9/10に、また、 $10^{3.5}$ 、 $10^{4.5}$ および $10^{5.5}$ TCID₅₀ のvCP65被投与者には、それぞれ0/3、1/3および9/9に局所的反応が見られた。

30

痛覚が最も一般的な症状であったが、常に軽いものであった。他の局所的症状として発赤および硬結があったが、これらも軽く且つ一過性のものであった。すべての症状は一般に24時間以内におさまリ、72時間以上持続することはなかった。

血球数、肝臓酵素またはクレアチンキナーゼの値に有意の変化はなかった。

免疫応答：狂犬病に対する中和抗体 (表12) 最初の投与から28日後、HDC被投与者のすべてが (感染) 防御力価 (≥ 0.5 IU/ml)

を有していた。これに対して、ALVAC-RG (vCP65) の被投与者においては、この防御力価に達したのは、グループAおよびB ($10^{3.5}$ および $10^{4.5}$ TCID₅₀) の被投与者にはなく、またグループでは2/9のみであった。

40

56日目 (すなわち、2回目接種 (二次接種) から28日目) に、ALVAC-RG (vCP65) ワクチン被投与者においては、グループAでは0/3、グループBでは2/3およびグループCでは9/9が防御力価を取得し、また、HDC被投与者においては10名の全てにおいて、この防御力価が持続されていた。

56日目における幾何平均力価は、グループA、B、CおよびHDCにおいて、それぞれ、0.05、0.47、4.4および11.5 IU/mlであった。

180日目には、すべての被験者において狂犬病抗体力価はかなり低下したが、HDC被投与者のうち5/10、また、ALVAC-RG (vCP65) 被投与者のうち5/9においては、最低防御力価0.5 IU/ml以上に持続されていた。HDCグループおよびグループCにお

50

る幾何平均力価は、それぞれ、0.51および0.45IU/mlであった。

カナリアボックスウイルスに対する抗体（表13） 高力価被験者にカナリアとの接触の前歴が無いにも拘わらず、0.22から1.230.D.の広範囲にわたる前免疫（pre-immune）力価が認められた。前免疫力価とその後の第2回目の投与による力価との差の2倍以上増加した場合に血清変換（seroconversion）が起こったと定義すれば、グループBの被験者の1/3、グループCの被験者の9/9に血清変換が起こったが、グループAまたはHDCの被験者には血清変換はなかった。

ブースター投与 6ヶ月後のブースター投与（追加接種）時にはワクチンは十分に許容できるものとなった。HDCブースター被投与者の2/9、また、ALVAC-RG（vCP65）ブースター被投与者の1/10に発熱が見られた。局所反応は、HDCブースター被投与者の5/9、また、ALVAC-RG（vCP65）ブースター被投与者の6/10に認めれた。

観察結果 図11A～図11Dは、狂犬病中和抗体力価（RFFITによる。単位IU/ml）を示すグラフであり、ボランティアに対するHDCまたはvCP65（ $10^{5.5}$ TCID₅₀）のブースター効果を示している（該ボランティアには以前に同一のワクチンまたはもう一方のワクチンを接種）。ワクチン接種は0日、28日および180日目に実施した。抗体力価の測定は、0日、7日、28日、35日、56日、173日、187日および208日目に行った。

図11A～図11Bに示すように、ブースター投与するとどの免疫スケジュールでも全ての被験者に狂犬病抗体力価の上昇をもたらした。しかしながら、ALVAC-RG（vCP65）ブースターは、全体的に、HDCブースターよりも低い免疫応答を誘発しており、また、ALVAC-RG（vCP65）、ALVAC-RG（vCP65）-ALVAC-RG（vCP65）の順序から成るグループは、他の3つのグループよりも実質的に力価が低くなっていた。さらに、ALVAC-RG（vCP65）をブースター投与すると、以前にHDCワクチンが投与された被験者の3/5に、また、以前にALVAC-RG（vCP65）で免疫化された被験者の全てに、カナリアボックス抗体力価の上昇をもたらした。

一般的に、vCP65の投与による局所的副作用からウイルスの局所的複製が起こっていることは示されなかった。特に、ワクチン接種後に見られるような皮膚障害はなかった。このように見かけ上はウイルスの複製が無いにも拘わらず、該投与により、カナリアボックスベクターおよび発現された狂犬病糖タンパク質の双方に対する有意量の抗体がボランティアに産生された。

狂犬病中和抗体の分析は、迅速蛍光フォーカス阻害テスト（RFFIT）により実施したが、この方法は、マウスにおける血清中和テストと優れた相関性を有することで知られている。 $10^{5.5}$ TCID₅₀の被投与者9名のうち5名は、初回投与後の応答レベルが低かった。最も用量（投与量）の高い被投与者全員、また、中間用量の被投与者も3名のうち2名において、2回目の投与後に防御力価を有する狂犬病抗体が得られた。この試験においては、両ワクチンとも、生ワクチンについては、一般的に推奨されているが不活性HDCワクチンには勧められていない皮下投与により接種した。この投与経路を選択したのは、投入部位（注射部位）を入念に調べることができる点において最良であるからであるが、このために、HDC被投与者における抗体の出現が遅くなったことも考えられる：事実、HDC被投与者のいずれも7日目には抗体上昇を示さず、一方、HDCワクチン筋肉内投与する多くの試験においては、被験者の大部分に抗体上昇が認められている（Klietmann他、国際赤十字（ジュネーブ）、1981；Kuwert他、国際赤十字（ジュネーブ）、1981）。しかしながら、本発明は必ずしも皮下投与に限定されるものではない。

被験ワクチンにおける狂犬病中和抗体のGMT（幾何平均力価：geometric mean titers）は、HDC対照ワクチンよりも低かったが、防御に必要な最低力価を十分に上まわるものであった。3種類の投与量を採用した本試験において得られた明瞭な用量依存性応答が示すように、投与量が高い程、強い応答を誘発する。当業者であれば本明細書の開示から、所与の患者に至適な投与量を選択できることは明らかであろう。

本実施例の他の重要な結果は、抗体応答を増強（ブースト）する能力である。免疫スケジ

10

20

30

40

50

ュールの如何に拘わらず6ヶ月目の投与後には全ての被験者に狂犬病抗体力価の上昇が見られており、このことは、カナリアポックスウイルスまたは狂犬病糖タンパク質により誘発された既存の免疫は、当該組換えワクチンまたは従来からのHDC狂犬病ワクチンによるブースター（追加接種）に対する阻害作用を有しないということを示している。このことは、ワクシニア組換え体をヒトに用いた場合、既存の免疫によって免疫応答が阻害されるという従来知見（Cooney他；Ettinger他）とは対照的である。

かくして、本実施例が明示するように、非複製性ポックスウイルスはヒトにおいて免疫化ベクターとして機能することができ、その際、複製性の作用物質が免疫応答に与えるような全ての利点を有しながら、完全に許容性のウイルスが引き起こすような安全上の問題はない。そして、本実施例および他の実施例の教示から、狂犬病ウイルスまたはその他のコードもしくは発現産物を含有する組換え体を投与または免疫接種するに際して、至適な投与量（用量）または投与方式や投与経路を選択することは、インビトロ発現法とともに当業者には明らかであろう。

表11. ワクチン接種5日後の反応

vCP60投与量 (TCID ₅₀)	10 ^{3.5}		10 ^{4.5}		10 ^{5.5}		HDC 対照	
投入	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
被接種者の数	3	3	3	3	9	9	10	10
温度 > 37.7℃	0	0	0	0	0	1	1	0
痛覚	0	0	1	1	6	8	8	6
発赤	0	0	0	0	0	4	5	4
硬結	0	0	0	0	0	4	5	4

表12. 狂犬病中和抗体力価 (R F F I T ; I U / ml)

各人の力価と幾何平均力価 (G M T)

日						
No.	TCID50/ 投与量	0	7	28	35	56
1	$10^{3.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.2
3	$10^{3.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
4	$10^{3.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	G.M.T.	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
6	$10^{4.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
7	$10^{4.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	2.4	1.9
10	$10^{4.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.6	1.1
	G.M.T.	< 0.1	< 0.1	0.1	0.58	0.47
11	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	1.0	3.2	4.3
13	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	0.3	6.0	8.8
14	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	0.2	2.1	9.4
17	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.2	2.5
18	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	0.7	8.3	12.5
20	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.3	3.7
21	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	0.2	2.6	3.9
23	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	1.7	4.2
25	$10^{5.5}$	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.6	0.9
	G.M.T.	< 0.1	< 0.1	0.16	1.9	4.4*
2	HDC	< 0.1	< 0.1	0.8	7.1	7.2
5	HDC	< 0.1	< 0.1	9.9	12.8	18.7
8	HDC	< 0.1	< 0.1	12.7	21.1	16.5
9	HDC	< 0.1	< 0.1	6.0	9.9	14.3
12	HDC	< 0.1	< 0.1	5.0	9.2	25.3
15	HDC	< 0.1	< 0.1	2.2	5.2	8.6
16	HDC	< 0.1	< 0.1	2.7	7.7	20.7
19	HDC	< 0.1	< 0.1	2.6	9.9	9.1
22	HDC	< 0.1	< 0.1	1.4	8.6	6.6
24	HDC	< 0.1	< 0.1	0.8	5.8	4.7
	G.M.T.	< 0.1	< 0.1	2.96	9.0	11.5*

* $p = 0.007$ スチューデント式テスト

表13：カナリアボックス抗体：E L I S A幾何平均力価*

日					
vCP65 投与量 TCID50/投与	0	7	28	35	56
$10^{3.5}$	0.69	ND	0.76	ND	0.68
$10^{4.5}$	0.49	0.45	0.56	0.63	0.87
$10^{5.5}$	0.38	0.38	0.77	1.42	1.63
HDC control	0.45	0.39	0.40	0.35	0.39

* 25倍稀釈における光学密度

実施例10—ALVACおよびNYVACと各種のワクシニアウイルス株とのLD₅₀の比較
マウス 異系交配したオスのスイス・ウェブスター（Swiss Webster）マウスをTaconic Farms（米国ニューヨーク州Germantown）から購入し、3週齢（「標準」マウス）になって使用に供されるまで、マウス飼料と水を任意に（adlibitum）に与えて飼育した。異系交配したオスとメスのスイス・ウェブスター新生マウスはTaconic Faumsによって実施された計画妊娠に従って入手した。新生マウスは全て出産から2日以内に引き渡されたものである。

ウイルス ALVACは、カナリアボックスウイルスの集団をブランク精製し、初代ニワトリ胚繊維芽細胞（CEF）内で調製されたものである。ショ糖密度勾配遠心により精製した後、CEF細胞内のALVACのブランク形成単位を測定した。ワクシニアウイルスのWR（L）変異株はWRの大ブランク表現型を選択することによって得られたものである（Panicali他、1981）。ワクシニアウイルスのWyethワクチン株（New York State Board of Health）はPharmaceuticals Calf Lymph Type vaccine Dryvaxから管理番号302001Bとして入手したものである。ワクシニアウイルスのCopenhagen株VC-2はフランスのInstitute Merieuxから入手した。ワクシニアウイルスのNYVAC株はCopenhagen株VC-2から誘導されたものである。Wyeth株をのぞき、これらの株は全て、アフリカミドリザルの腎臓由来のVero細胞で培養し、ショ糖密度勾配遠心法により精製し、そしてVero細胞上のブランク形成単位を測定した。Wyeth株はCEF細胞内で増殖し、CEF細胞内のブランク形成単位を測定した。

接種 各グループ10匹から成る標準マウスにウイルス稀釈液の1つの0.05mlを頭蓋内（ic）接種した。ウイルス稀釈液は保存ウイルス液を連続的に10倍稀釈することによって調製した。場合によっては、保存ウイルス液を稀釈せずに接種した。

各グループ10匹から成る新生マウス（1日齢または2日齢）にも標準マウスと同様にic接種した。但し、接種量は0.03mlとして使用した。

すべてのマウスについて、毎日、接種から14日間（新生マウスの場合）または21日間（標準マウスの場合）にわたって死亡率を観察した。接種の翌朝に死亡したマウスは、外傷による死亡の可能性があるので排除した。

被験個体数の50%を死亡させるのに要する致死量（LD₅₀）は、ReedおよびMuenchの比例法（ReedおよびMuench, 1938）に従って求めた。

若い異系交配標準マウスにおけるic投与によるALVACおよびNYVACと各種のワクシニアウイルス株とのLD₅₀の比較 若い標準マウスにおいては、NYVACおよびALVACのビルレンス（毒力）は、試験した他のワクシニアウイルス株よりも数桁低かった（表14）。NYVACおよびALVACは、Wyeth株よりも3,000倍以上平常マウスにおけるビルレンスが低く；親株であるVC-2株よりも12,500倍以上ビルレンスが低く；そし

10

20

30

40

50

て、WR (L) 変異株よりも63,000,000倍以上ビルレンスが低いことが見出された。これらの結果から、NYVACは他のワクシニアウイルスよりも高度に弱毒化されており、また、ALVACは頭蓋内投与された場合、若いマウスには一般に非ビルレンス性であると考えられる。但し、両者ともきわめて高投与量の場合 (ALVACを 3.85×10^8 PFU、NYVACを 3×10^8 PFU)、未だ不明の機序により、この投与経路によりマウスの死亡をもたらすことがある。

異系交配新生マウスにおけるic投与によるALVACおよびNYVACと各種のワクシニア株とのLD₅₀の比較 新生マウスにおける5種類のボックスウイルス株の相対的ビルレンスを頭蓋内 (ic) チャレンジモデル系における滴定によって調べた (表15)。LD₅₀の値が示したところによれば、ALVACは、ワクシニアウイルスのWyeth株よりも100,000倍以上ビルレンスが低く；ワクシニアウイルスのCopenhagenVC-2株よりも200,000倍以上ビルレンスが低く；そして、ワクシニアウイルスのWR (L) 変異株よりも25,000,000倍以上ビルレンスが低い。但し、試験した最高投与量 (6.3×10^7 PFU) においては、100%死亡率となった。 6.3×10^6 PFUでは33.3%の死亡率が認められた。最高投与量グループ (約6.3LD₅₀) の平均生存時間 (MST) が 6.7 ± 1.5 日であることから、死因は (未だはっきりしないが) おそらく毒性または外傷性によるものではないであろう。チャレンジ投与量5LD₅₀におけるWR (L) と比較すると、ALVACがチャレンジされたマウスのMSTは有意に長いものであった ($P=0.001$)。

NYVACと比較すると、Wyethは15,000倍以上ビルレンスが強く；VC-2は35,000倍以上ビルレンスが強く；そして、WR (L) は3,000,000倍以上ビルレンが高いことが見出された。ALVACの場合と同様に、NYVACの投与量が高くなる (6×10^8 PFUおよび 6×10^7 PFU) と、100%死亡率となった。しかしながら、そのような最高用量 (380LD₅₀に相応) でチャレンジされたマウスのMSTは僅か2日 (2日目に9匹死亡、4日目に1匹死亡) であった。これに対して、最高用量 (500LD₅₀に等しい) のWR (L) でチャレンジされたマウスは全て4日目まで生存した。

表14. 各種のワクシニアウイルス株およびカナリアボックスウイルス

(ALVAC) をic投与したマウスの50%致死量計算値

ボックスウイルス株	LD ₅₀ 計算値(PFU)
WR (L)	2.5
VC-2	1.25×10^4
WYETH	5.00×10^4
NYVAC	1.58×10^8
ALVAC	1.58×10^8

表15. 各種のワクシニアウイルス株およびカナリアポックスウイルス（ALVAC）をic投与した新生マウスの50%致死量計算値

ポックスウイルス株	LD ₅₀ 計算値(PFU)
WR (L)	0.4
VC-2	0.1
WYETH	1.6
NYVAC	1.58×10^6
ALVAC	1.00×10^7

10

実施例11. NYVAC (vP866) およびNYVAC-RG (vP879) の評価

免疫沈降 トリ細胞または非トリ細胞から成り予め形成した単層に、親ウイルスである NYVAC (vP866) ウイルスまたはNYVAC-RG (vP879) ウイルスを10pfu/細胞接種した。この接種は2%の透析したウシ胎児血清を添加した無メチオニンEMEM内に実施した。1時間インキュベートした後、接種物を除き、培地を20μCi/mlの³⁵S-メチオニンを含有するEMEM（無メチオニン）と置換した。一晚、約16時間インキュベートした後、緩衝液A（1%のNonidet P-40、10mMトリス（pH7.4）、150mMのNaCl、1mMのEDTA、0.01%のアジ化ナトリウム、アプロチニン500単位/ml、および0.02%のフェニル・メチル・スルホニル・フルオリド）を添加して細胞を溶解した。免疫沈降には、狂犬病糖タンパク質特異的モノクローナル抗体24-3F10（入手先：米国ニューヨーク州AlbanyのGriffith Laboratories, New York State Department of HealthのC. Trinchari博士）およびラットの抗マウスコンジュゲート（入手先：Boehringer Mannheim Corporation, カタログ番号605-500）を使用した。支持マトリックスとしてプロテインAセファロースCL-48（入手先：米国ニュージャージー州PiscatawayのPharmacia LKB Biotechnology社）を用いた。10%ポリアクリルアミドゲル上で免疫沈降物を分画した（Dreyfuss他、1984）。ゲルを固定化し、蛍光写真に供するため1MのNa-サリシレートで1時間処理し、KodakのXAR-2フィルムに露光して免疫沈降したタンパク質種を現像した。

20

30

動物源 ニュージーランド（New Zealand）白色ウサギをHare-Marland（米国ニュージャージー州Hewitt）から入手した。3週齢のオスの異系交配スイス・ウェブスター（Swiss Webster）マウス、計画妊娠しているメスの異系交配スイス・ウェブスターマウス、および4週齢のスイス・ウェブスターヌードマウス（nu⁺nu⁺）をTaconic Farms社（米国ニューヨーク州Germantown）から入手した。これらの動物は全てNIHのガイドラインに従って飼育した。動物のプロトコルは全てIACUCによって承認されたものである。必要と考えられた場合には、明らかに致命的な疾病を有しているマウスは安楽死させた。ウサギにおける障害評価 2匹のウサギのそれぞれに、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷もしくは10⁸ pfuの各被験ウイルスを含有するPBSまたはPBS単独0.1mlを複数部位に皮内接種した。4日目から障害が消散するまでウサギを毎日観察した。硬結および潰瘍形成を測定し記録した。

40

接種部位からのウイルス回収 1匹のウサギに、10⁶、10⁷もしくは10⁸ pfuの各試験ウイルスを含有するPBSまたはPBSのみの0.1mlを複数の部位に皮内接種した。11日目に、ウサギを安楽死させ、各接種部位から採取した皮膚のバイオプシー標本を機械的破碎およ

50

び間接音波処理により無菌的に調製してウイルスを回収した。C E F 単層上のプラーク滴定により感染ウイルスを分析した。

マウス内のビルレンス 各グループ10匹から成るマウス、または5匹から成るヌードマウスに、0.5mlの無菌P B Sに溶かしたウイルスの数倍稀釈液の1つをip接種した。実施例1も参照。

シクロホスホアミド (C Y) 処理 - 2日目に4 mg (0.02ml) のC Y (S I G M A製) をマウスにip注入した後、0日目にウイルス注入を行った。ウイルス注入後、次のようにマウスにC Yをip注入した：1日目に4 mg；4日、7日および11日目に2 mg；14日、18日、21日、25日および28日目に3 mg。Coulter計数装置を用い11日目に白血球を計数することにより免疫抑制を間接観察した。平均白血球数は、非処理マウス (n = 4) については13,500白血球/μ l、また、C Y処理した対照マウスについては4,220白血球/μ lであった。

L D₅₀の計算 ReedおよびMuenchによる比例法 (ReedおよびMuench, 1938) により、50%死亡率をもたらすのに要する致死量 (L D₅₀) を求めた。

マウス内のN Y V A C - R Gの効力試験 4週齢から6週齢のマウスの肉趾に、V V - R G (Kieny他、1984)、A L V A C - R G (Taylor他、1991b)、またはN Y V A C - R Gのいずれかの一定範囲稀釈液 (50%組織培養感染料 (T C I D₅₀) として2.8~8.0) の50~100 μ lを接種した。各グループは8匹のマウスから構成した。ワクチン接種後14日目において、狂犬病ウイルスC V S株 (0.03ml) の15 L D₅₀を頭蓋内接種することによりマウスへのチャレンジを行った。28日目に生存マウスを数え、50%防御投与量 (P D₅₀) を求めた。

N Y V A C (v P 8 6 6) の誘導 ワクシニアウイルスのN Y V A C株は、Copenhagenワクチン株をプラーククロニングして得られたV C - 2から調製されたものである。V C - 2からN Y V A Cを調製するためには、本明細書において既述したような一連の操作を行って、18ヶのワクシニアのO R F (オープンリーディングフレーム) (ビルレンスに関連する多数のウイルスの機能を含む) を正確に欠失させた。これらの欠失を行うに当たっては、非所望の新規なオープンリーディングフレームが出現しないように設計した。図10は、N Y V A Cを調製するのに欠失させたO R Fを図示する。図10の上部には、ワクシニアウイルスゲノム (V C - 2 プラーク単離物、Copenhagen株) のH i n d III制限マップを示す。N Y V A Cを調製するのに逐次欠失させたV C - 2の6つの領域を拡げて示している。これらの欠失については本明細書において既述した (実施例1から実施例6)。そのような欠失位置の下に、該位置から欠失させたO R Fを、その遺伝子産物の機能ないしはホモロジーおよび分子量とともに掲記している。

ヒト組織細胞系におけるN Y V A CおよびA L V A Cの複製試験 ヒト由来の細胞におけるワクシニアウイルスのN Y V A C株 (v P 8 6 6) の複製レベルを調べるため、液体培養条件下、導入多重度0.1pfu/細胞で6種類の細胞系を接種し、72時間インキュベートした。親株のCopenhagenクローン (V C - 2) の接種も併せて行った。初代ニワトリ胚繊維芽細胞 (C E F) (10~11日齢のS P F源の胚卵。米国コネチカット州StorrsのSpafas社製) 使用して全てのウイルスに対する許容細胞基質とした。2つの基準、すなわち、産生的なウイルス複製が生じているかということ、および、外来抗原が発現しているかということに基づいて培養物の分析を行った。ヒト由来のいろいろな細胞におけるN Y V A Cの複製能を表16に示す。V C - 2およびN Y V A CのいずれもC E F細胞内で複製する能力を有するが、N Y V A Cの方が幾分収量 (産生量) が低い。V C - 2も、E B V形質転換リンパ球芽細胞系J T - 1 (エプステインバーウイルスで形質転換されたヒトリンパ球芽細胞系。Rickinso他 (1984) を参照) を除き、試験した6種類のヒト由来細胞系で産生的複製能力を有している。これに対して、N Y V A Cは、試験したヒト由来細胞系のいずれにおいてもその複製能力が高度に減弱されている。N Y V A Cを感染させたM R C - 5 (A T C C # C C L 171、ヒト胎児肺由来)、D E T R O I T 5 3 2 (A T C C # C C L 5 4、ヒト包皮、ダウン症候群)、H E L 2 9 9 (A T C C # C C L 137、ヒト胎児肺細胞)、およびH N K (ヒト新生児腎臓細胞。米国メリーランド州WakersvilleのWhittiker Bio

products社製、カタログ#70-151) から、残存ウイルスレベルを超える感染ウイルスの僅かな増加が見られている。これらの細胞系における複製は、NYVAC感染CEF細胞または親株のVC-2から得られたウイルス収量(産生量)に比較すると有意に減少していた(表16)。注目すべきことには、NYVACおよびVC-2のいずれについても、24時間におけるウイルス収量は72時間の収量に等しい。したがって、該ヒト由来細胞系培養物を更に48時間(ウイルス生成サイクルの2回分)培養させると、相対的なウイルス収量を上昇させたかも知れない。

上記のヒト由来細胞系においては、ウイルス収量が低かったことに一致して、MRC-5およびDETROIT532においてもNYVAC特異的DNAの複製は、検出可能ではあったが、そのレベルは低かった。NYVACを感染させたMRC-5およびDETROIT532細胞系におけるDNA複製レベルは、NYVAC感染CEF細胞で見出されたレベルと比較すると、ウイルス収量において近似していた。その他のヒト由来細胞のいずれにおいてもNYVAC特異的ウイルスDNA複製は見出されなかった。

トリボックスウイルスであるALVACを用いても同様の実験を行った。このウイルス複製の結果も表16に示す。いずれのヒト細胞系においても子孫ウイルス(子ウイルス)は検出されず、カナリアボックスウイルスの宿主域によりトリ種に制限されていることに相反しない。さらに、いずれのヒト由来細胞系においてもALVAC特異的なDNA蓄積は検出されなかったという事実も、それらのヒト由来細胞においてALVACの産生的複製が起こらないということに矛盾していない。

ヒト細胞におけるNYVAC-RG(vP879)による狂犬病糖タンパク質の発現 産生的ウイルス複製が実質的に起こらない場合においても外来遺伝子の効率的な発現が得られるかということを判定するために、上記と同じ細胞系に、³⁵S-メチオニンの存在下に、狂犬病ウイルス糖タンパク質発現性のNYVAC組換え体(vP879、実施例7)を接種した。該狂犬病糖タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を用い、放射ラベルした培養リゼイトから狂犬病糖タンパク質を免疫沈降させた。67kDaのタンパク質の免疫沈降物が得られたが、これは狂犬病糖タンパク質が完全にグリコシレートされた形態に一致する。非感染細胞リゼイトまたは親のNYVACが感染した細胞リゼイトにおいて血清学的に交差性の生成物は検出されなかった。分析した他の細胞においても同様の結果が得られた。

ウサギ皮膚への接種 ワクシニアウイルス株の病原性の尺度として、皮内(id)接種後のウサギの皮膚障害およびその特徴が利用されている(Buller他、1988; Child他、1990; Fenner他、1958; Flexner他、1987; GhendonおよびChernos1964)。そこで、ワクシニア株WR(CV-1細胞ATCC#CCL70をプラーク精製したATCC#VR119として、これらからL変異体として単離、選択されたプラークから成るATCC#VR2035。Panicali他(1981)参照)、WYETH(ATCC#VR325。米国ペンシルバニア州MariettaのWyeth Laboratories社からDRYVACとして市販)、COPENHAGEN(VC-2)およびNYVACを2匹のウサギ(A069およびA128)にid接種した場合の障害の特徴を調べた。これらの2匹のウサギはウイルスに対する全体的な感度が異なっており、ウサギA128の方がウサギA069よりも応答性が低かった。ウサギA128においては障害は比較的軽くて、接種後27日目までに消散した。ウサギA069においては、障害程度は強く(特にWR接種部位)、49日経過後ようやく消散した。また、障害の強さは、リンパ液排出網状組織に対する接種部位の相対的な位置に依存していた。特に脊椎上に位置する部位の障害が強く、脾腹にある障害が消散するのに長い時間を要した。4日目から最後の障害が消えるまで全ての障害を毎日調べ、障害の最大サイズの平均値および消散までの日を求めた(表17)。対照であるPBSの注入部位には局部反応は見られなかった。WR、VC-2およびWYETHワクシニアウイルス株の注入部位には潰瘍性障害が見られた。重要なことは、NYVACの接種部位には硬結または潰瘍性障害が観察されなかったということである。

接種部位における感染性ウイルスの残存 接種部位における各ウイルスの相対的な残存性を調べるため、10⁶、10⁷、または10⁸ pfuのVC-2、WR、WYETHまたはNYVAC

10

20

30

40

50

を含有する0.1mlのPBSをウサギの複数部位に皮内接種した。各ウイルスについて、 10^7 pfuを脊椎上に投与し、その両側に 10^6 および 10^8 を投与した。接種部位を11日間にわたって毎日観察した。WRが最も強い反応を示し、次いで、VC-2およびWYETHとなった(表18)。潰瘍が最初に見出されたのは、WRおよびWYETHについては9日目、VC-2については10日目であった。NYVACまたは対照用PBSが接種された部位は硬結または潰瘍形成を示さなかった。接種後11日前に、接種部位から皮膚サンプルを切除し、機械的に破碎し、CEF細胞上でウイルスを滴定した。結果を表18に示す。いずれの場合においても、この時点では投与量よりも多量のウイルスは回収されなかった。ワクシニア株WRの回収量は、ウイルス投与量とは無関係に約 10^6 pfuであった。ワクシニア株WYETHおよびVC-2の回収量は投与量と関係なく 10^3 から 10^4 であった。NYVACを接種した部位からは感染性ウイルスは回収されなかった。

10

遺伝的または化学的に免疫不全性のマウスへの接種 スードマウスに高投与量のNYVAC (5×10^8 pfu) またはALVAC (10^9 pfu) を腹腔内投与したが、10日間の観察期間を通じ、死亡、障害および明らかな疾病を引き起こすことはなかった。これに対して、WR (10^3 から 10^4 pfu)、WYETH (5×10^7 または 10^8 pfu) またはVC-2 (10^4 から 10^9 pfu) を接種されたマウスは、まず趾部に、次いで尾部にポックスウイルスに典型的な播種性障害を示し、その後、幾つかのマウスにおいては睾丸炎が見られた。WRまたはWYETHを感染させたマウスは播種性障害が出現すると、一般的に、最終的には死亡したが、VC-2を感染させたマウスは多くの場合、最終的には回復した。LD₅₀計算値を表19に示す。

20

さらに詳述すると、VC-2を接種されたマウスはまず趾部に、そして、それより1~2日後には尾部に障害(赤色丘疹)を示す。これらの障害は、高投与量(10^9 、 10^8 、 10^7 および 10^6 pfu)を投与されたマウスについては接種後から11~13日目、 10^5 pfuを投与されたマウスにおいては接種後16日目、また、 10^4 pfuを投与されたマウスにおいては接種後21日目に出現した。 10^3 および 10^4 を投与されたマウスにおいては100日間の観察期間中障害は見出されなかった。 10^9 および 10^8 pfuを投与されたマウスにおいては接種後23日目に、また、他のグループのマウス(10^7 から 10^4 pfu)においては、それより約7日後に睾丸炎が認められた。睾丸炎は 10^9 および 10^8 投与グループにおいて特に強く、次第に後退してはゆくが、100日間の観察期間の終わりまで認められた。数匹のマウスの皮膚には、接種後30~35日目に幾つかのポックス性の障害が認められた。これらのポックス障害の多くは、一般に接種後60~90日目に治癒した。 10^9 pfuを接種されたグループのマウスのうち1匹のみが死亡し(接種後34日)、また、 10^8 pfuを投与されたグループのマウスの1匹が死亡(接種後94日)した。VC-2が接種されたマウスにその他の死亡は見られなかった。

30

10^4 pfuのWRワクシニア株を接種されたマウスは、接種後17日目にポックス性障害を示し始めた。これらの障害は、VC-2接種マウスに見られた障害と同じであった(趾部、尾部の腫脹)。 10^3 pfuのWR株を接種されたマウスでは接種後34日目まで障害は出現しなかった。睾丸炎が認められたのは高用量のWR(10^4 pfu)が接種されたマウスのみであった。観察期間の後期に口の周りに障害が現れマウスは食餌を止めた。 10^4 pfuのWRを接種したマウスは全て、接種後21日から31日目に死亡するか、必要に応じて安楽死させた。 10^3 pfuのWRを投与した5匹のうち4匹は、接種後35日から57日目に死亡するか、必要と考えられた場合は安楽死させた。低投与量のWR(1から100 pfu)が接種されたマウスには死亡は認められなかった。

40

高投与量(5×10^7 および 5×10^8 pfu)のワクシニアWYETH株を投与したマウスは、趾部および尾部に障害を示し、睾丸炎が発生し、そして死亡した。 5×10^6 pfuまたはそれ以下のWYETHを投与したマウスは疾病や障害の症状を示さなかった。

表19に示すように、CY処理されたマウスは、ポックスウイルスのビルレンスを分析するのにスードマウスの場合よりも高感度のモデル系を与える。WR、WYETH、およびVC-2に関するLD₅₀値は、このモデル系においてはスードマウスモデルの場合よりも有意に低くなっていた。さらに、WYETH、WRおよびVC-Rワクシニアウイルスをマウスに投与した場合、以下に記すように、各ウイルスをさらに高い用量で投与することに

50

より障害が出現し、この結果、障害の形成がさらに迅速になっている。ヌードマウスにおいて見られたように、NYVACまたはALVACを注入されたCY処理マウスは障害を示さなかった。しかしながら、ヌードマウスの場合とは異なり、NYVACまたはALVACを用いてチャレンジされたCY処理マウスにおいては、投与量とは無関係に、死亡が見られたものもあった。このような不規則な発病が死因と関係しているかも知れない。WYETHが投与されたマウスはいずれの投与量においても (9.5×10^4 から 9.5×10^8 pfu)、接種後7日目から15日目の間に尾部および／または趾部にポックス性障害を示した。さらに、尾部および趾部は腫脹した。尾部での障害の出現は、ポックス性障害の典型的なものであり、丘疹の形成、潰瘍形成、そして最後には痂皮の形成を伴う。VC-2が投与されたマウスも、すべての投与量において (1.65×10^5 から 1.65×10^9 pfu)、WYETH 10
投与マウスの場合に類似した尾部および／または趾部にポックス性障害を示した。これより低用量のWRウイルスを投与したマウスには障害は見られなかったが、これらのグループで死亡は生じた。

NYVAC-RGの効力試験 ワクシニアウイルスのCOPENHAGEN株を弱毒化することにより、それから得られるNYVAC株のベクターとしての有用性を実質的に変化させていないことを明らかにするため、比較効力試験を行った。該ウイルスを弱毒化するのに行われた一連の遺伝子操作中の該ベクターの免疫原性能を調べるため、リポーター外来抗原として狂犬病ウイルスの糖タンパク質を利用した。該狂犬病糖タンパク質を発現するベクターの感染防御効力の評価は狂犬病に関する標準的なNIHマウス効力試験によった (Seligmann, 1973)。表20に示しているように、高度に弱毒化したNYVACベクターについ 20
て得られるPD₅₀値は、tk遺伝子座に狂犬病遺伝子を含有するCOPENHAGEN由来組換え体を用いて得られた値 (Kieny他、1984) と同じであり、また、ALVAC-RG (トリ種に複製が制限されているカナリアポックス由来ベクター) について得られたPD₅₀に近似している。

考察 よく知られたビルレンス遺伝子が欠失され且つ限定されたインビトロ増殖特性を有するNYVACを動物モデル系で分析して、その弱毒化特性を調べた。これらの試験に当たって、神経毒性のあるワクシニアウイルスの実験室株、WR、2種類のワクシニアウイルスワクチン株、WYETH (New York City Board of Health) およびCOPENHAGEN株、さらには、カナリアポックスウイルス株であるALVACとの比較を行った (実施例11も参照)。さらに、これらのウイルスについてマウスチャレンジモデルおよびウサギ皮膚モ 30
デルにおける相対的な病原性能が調べられた。すなわち、WRが最もビルレンスの高い株であり、WYETHおよびCOPENHAGEN (VC-2) は弱毒化ワクチン株として既に利用されているような特徴を有し、そして、ALVACは複製がトリ種に制限されるようなポックスウイルスの1例であることが理解された。これらのインビボ分析は、ワクシニアウイルス株WR、WYETHおよびCOPENHAGEN (VC-2) に比べるとNYVACが高度に弱毒化された特性を有するものであることを明示している (実施例14~20)。重要なことは、NYVACにおけるLD₅₀値は、トリ宿主制限トリポックスウイルスであるALVACにおいて見出された値に匹敵したということである。NYVACに因る死亡は、ALVACと同様に、きわめて高用量のウイルスが頭蓋投与された場合のみ見出された (実施例11、表14、15、19)。この死亡が多量のタンパク質を接種した非特異性に因るものであるか 40
否かは未だ明らかでない。免疫無防備状態マウスモデル (ヌードマウスおよびCY処理マウス) における分析からも、WR、WYETHおよびCOPENHAGEN株に比べてNYVACが高度に弱毒化された特徴を有することが明らかにされた。重要なことは、NYVAC接種動物またはALVAC接種モデルにおいては、観察期間を通して、ワクシニア感染の播種やワクシニア性疾病の形跡が見出されなかったということである。NYVACにおいて複数のビルレンス関連遺伝子を欠失させると、病原性に関する相乗効果が示された。NYVACの接種特性を知る別の手段としてウサギ皮膚への皮内投与を行った (表17および18)。非トリ種において複製能力を有しないウイルスであるALVACに関する結果を考察すると、接種部位における複製能力のみが反応性に相関しているのではない。ALVACの皮内接種は投与量に依存して硬結域をもたらしたからである。すなわち、ウイルスの複製 50

能力以外の因子が障害の形成に寄与しているものと推測される。NYVACにおいてビルレンスに関連する特定の遺伝子を欠失させると障害の発生が防止される。

さらに、本実施例および既述の実施例（実施例9を含む）の結果から、WR、ならびに既に利用されているワクシニアウイルスワクチン株であるWYETHおよびCOPENHAGENに比べてNYVACが高度に弱毒化された特性を有することが明らかである。事実、試験した動物モデル系におけるNYVACの病原性プロファイルは、トリ種においてのみ産生的複製を行うことで知られたボックスウイルスであるALVACのプロファイルに類似していた。NYVACの産生的複製能がヒト（表16）およびその他の動物（マウス、ブタ、イヌおよびウマを含む）由来の細胞において見かけ上制限されていることが重要な障壁となって、ワクチン接種されたヒトの中で播種する可能性の低いベクターを提供できることに加えて、ワクチン非接種者または一般的な環境への伝染を制限したり防止することになる。

重要なことは、NYVAC系ワクチンが効力を有することが示されたことである。各種の病原体由来の外来遺伝子産物を発現するNYVAC組換え体は、霊長類を含む幾つかの動物種において該外来遺伝子産物に対する免疫応答を引き起こした。特に、狂犬病糖タンパク質を発現するNYVACを基礎とする組換え体は致死的な狂犬病ウイルスのチャレンジに対してマウスを防御する能力を有した。該NYVAC由来狂犬病糖タンパク質組換え体の効力は、tk遺伝子座に狂犬病糖タンパク質を含有するCOPENHAGEN由来組み換え体のPD₅₀に匹敵するものであった（表20）。また、NYVACを基礎とする組換え体は、ウサギにおいて麻疹ウイルス中和抗体を誘起し、ブタにおける擬狂犬病ウイルスおよび日本脳炎ウイルスのチャレンジに対して防御機能を有した。高度に弱毒化されたNYVAC株は、ヒト、動物、医学および獣医学の分野での利用において安全であるという利点を有する（Tartaglia他、1992）。さらに、一般の実験的発現ベクター系としてNYVACを使用すれば、ワクシニアウイルスに関連する生物学的危険性（ハザード）が激減する。

本実施例およびその他の実施例（実施例10を含む）の結果が示すように、次のような基準によりNYVACが高度に弱毒化されたものであることを明らかにした：a）接種部位に硬結または潰瘍化が検出されないこと（ウサギ皮膚）；b）皮内接種部位から感染ウイルスが迅速に存在しなくなる（ウサギ皮膚）；c）睪丸炎症がないこと（ヌードマウス）；d）ビルレンスが激減していること（3週齢マウスおよび新生マウスの両方における頭蓋内チャレンジ）；e）免疫不全被験体において病原性が激減しており播種しないこと（ヌードおよびシクロホスホアミド処理マウス）；およびf）各種のヒト組織培養細胞において複製能が著しく減少していること。そして、高度に弱毒化されているのにも拘わらず、NYVACは、ベクターとして、外来抗原に対する強力な免疫応答を保有している。

10

20

30

表16. トリまたはヒト由来の細胞系におけるCOPENHAGEN (VC-2)、
NYVACおよびALVACの複製

細胞	感染後時間	収量 ^a			% 収量
		VC-2	NYVAC	ALVAC	
CEF	0	3.8 ^b	3.7	4.5	
	24	8.3	7.8	6.6	
	48	8.6	7.9	7.7	
	72	8.3	7.7	7.5	25
	72A ^c	<1.4	1.8	3.1	
MRC-5	0	3.8	3.8	4.7	
	72	7.2	4.6	3.8	0.25
	72A	2.2	2.2	3.7	
WISH*	0	3.4	3.4	4.3	
	72	7.6	2.2	3.1	0.000 4
	72A	- ^d	1.9	2.9	
DETROIT	0	3.8	3.7	4.4	
	72	7.2	5.4	3.4	1.6
	72A	1.7	1.7	2.9	
HEL	0	3.8	3.5	4.3	
	72	7.5	4.6	3.3	0.125
	72A	2.5	2.1	3.6	
JT-1	0	3.1	3.1	4.1	
	72	6.5	3.1	4.2	0.039
	72A	2.4	2.1	4.4	
HNK	0	3.8	3.7	4.7	
	72	7.6	4.5	3.6	0.079
	72A	3.1	2.7	3.7	

a : 同一の細胞系において、72時間後のVAC-2の収量（産生量）のパーセントとして表した72時間後のNYVACの収量（産生量）。

b : LOG₅₀pfu/mlとして表した力価。

c : 40 μl/mlのシトシンアラビノシドの存在下にサンプルをインキュベートした。

d : 測定せず

* : ATCD # CCL 25 ヒト羊膜細胞。

表17. ウサギ皮膚の皮内接種部位における硬結および潰瘍形成

ウイルス株	投与量 ^a	硬 結		潰瘍形成	
		サイズ ^b	日 ^c	サイズ	日
WR	10 ⁴	386	30	88	30
	10 ⁵	622	35	149	32
	10 ⁶	1057	34	271	34
	10 ⁷	877	35	204	35
	10 ⁸	581	25	88	26
WYETH	10 ⁴	32	5	-- ^d	--
	10 ⁵	116	15	--	--
	10 ⁶	267	17	3	15
	10 ⁷	202	17	3	24
	10 ⁸	240	29	12	31
VC-2	10 ⁴	64	7	--	--
	10 ⁵	86	8	--	--
	10 ⁶	136	17	--	--
	10 ⁷	167	21	6	10
	10 ⁸	155	32	6	8
NYVAC	10 ⁴	--	--	--	--
	10 ⁵	--	--	--	--
	10 ⁶	--	--	--	--
	10 ⁷	--	--	--	--
	10 ⁸	--	--	--	--

a 1つの部位に皮内接種された掲記ワクチンの0.1ml P B S中のpfu

b 障害の平均最大サイズ (mm²)

c 接種後、障害が完全に治癒するまでの平均時間

d 認識できる障害なし

表18. 皮内接種部位におけるポックスウイルスの残存

ウイルス	接種量	回収された全ウイルス
WR	8.0 ^a	6.14
	7.0	6.26
	6.0	6.21
WYETH	8.0	3.66
	7.0	4.10
	6.0	3.59
VC-2	8.0	4.47
	7.0	4.74
	6.0	3.97
NYVAC	8.0	0
	7.0	0
	6.0	0

a : log₁₀pfuとして表す。

10

20

表19. 免疫無防備状態マウスにおけるビルレンス試験

ボックスウイルス株	LD ₅₀ ^a	
	ヌードマウス	ホスホアミド処理マウス
WR	422	42
VC-2	>10 ⁹	<1.65 × 10 ⁵
WYETH	1.58 × 10 ⁷	1.83 × 10 ⁶
NYVAC	>5.50 × 10 ⁸	7.23 × 10 ⁸
ALVAC	>10 ⁹	≥5.00 × 10 ^{8b}

a : 掲記ワクシニアウイルスおよびALVACを腹腔内投与したヌードマウスおよびシクロホスホアミド処理マウスにおける50%致死量 (pfu)計算値。

b : 10匹のマウスのうち5匹が5 × 10⁸pfuの高投与量で死亡。

表20. マウスにおけるNYVAC-RGおよびALVAC-RGの相対効力

組換え体	PD ₅₀ ^a
VV-RG	3.74
ALVAC-RG	3.86
NYVAC-RG	3.70

a : 4週齢から6週齢のマウスの肉趾に、VV-RG (Kieny 他、1984)、ALVAC-RG (vCP65) またはNYVAC-RG (vP879) のいずれかの希釈液 (2.0 ~ 8.0 log TCID₅₀) の50~100 μlを接種した。14日目に、15LD₅₀/マウスに相応する生きたCVS株狂犬病ウイルスを頭蓋内接種することにより各グループのマウスをチャレンジした。28日目に、生存マウスを数え50%防御用量 (PD₅₀) を求めた。

実施例12-ボックスウイルスベクターへのHCMVのクローニング
ワクシニアドナープラスミドへのHCMV gB遺伝子のクローニングHCMV DNA (Towne株) のHindIIIフラグメントの4800bpHindIII-BamHIフラグメントを、プラスミドpIBI24 (米国コネチカット州HavenのInternational Biotechnologies社製) の2800bpHindIII-BamHIフラグメント内にクローニングした。オリゴヌクレオチド

CMVM5 (SEQ ID NO:74)

(5'-

GCCTCATCGCTGCTGGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAATCCAGGATCTG-3')

および CMVM3 (SEQ ID NO:75) (5'-

GACAGAGACTTGTGATTTTTATAAGCTTCGTAAGCTGTCA-3'),

を用いるインビトロ変異法 (Kunkel、1985) により、該 g B 遺伝子を変性してワクシニア H 6 プロモータの制御下に発現され得るようにした (Taylor 他、1988a,b; Perkus 他、1989)。この変性 g B を含有するプラスミドを 24 CMV g B (5 + 3) とした。CMV g B 遺伝子の DNA 配列は図 12 に示す (SEQ ID NO:37)。

プラスミド pMP2VCL (K1L 宿主域遺伝子上流にワクシニア配列に対するポリリンカー領域を含有する) を上記ポリリンカー内で Hind III および Xho I を用いて分解 (酵素分解) し、さらに、以下に示すアニーリングされたオリゴヌクレオチド SPHPRHA A から D に連結 (ライゲート) して、Hind III 部位、H 6 プロモータ (-124 ~ -1) (Perkusu 他、1988) およびポリリンカー領域を含有する SP131 を調製した。

SPHPRHA A (SEQ ID NO:76) (5'-

AGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGT-3')

SPHPRHA B (SEQ ID NO:77) (5'-

TGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAC-3')

SPHPRHA C (SEQ ID NO:78) (3'-

TTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATGAGCT-5')

SPHPRHA D (SEQ ID NO:79) (3'-

AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACACAATTTAACTTTTCGCTCT-5')。

24 CMV g B (5 + 3) の 2900bp EcoRV - BamHI フラグメントを、SP131 の 3100bp EcoRV - BglII フラグメント内にクローニングした。このクローニング工程により、当該 g B 遺伝子が H 6 プロモータの制御下に置かれるようになる。得られたプラスミドを SP131 CMV g B と命名した。

プラスミド pSD22-H は、pUC8 の BamHI 部位に連結されたワクシニアウイルス WR 株の HindIII F 領域由来の 2.9kb BglII フラグメントを含有する。pSD22-H における唯一の BamHI 部位は、外来遺伝子に対する挿入遺伝子座として使用する可欠部位である (Panicali および Paoletti、1982)。プラスミド pMP22BHP は、pSD22-H の誘導体であり、上記の唯一の BamHI 部位が、延長したポリリンカー領域を加えることにより外来 DNA を挿入できるようになっている。プラスミド pMP22BHP を HindIII で分解し、SP131 CMV g B (H 6 をプロモータとする g B 遺伝子を含有する) 由来の 2.9kb HindIII フラグメントに連結して、プラスミド SAg22 CMV g B を調製した。SAg22 CMV g B 内のポリリンカー領域を変性するために、該プラスミドを BamHI で分解した後、HindIII で部分分解し精製した。IBI24 由来の 50bp BamHI / HindIII ポリリンカーに連結することによってプラスミド 22 CMV g B を得た。

NYVAC ドナープラスミド pSD542 への HC MV g B 遺伝子のクローニング プラスミド pSD513 (Tartaglia 他、1992) からプラスミド pSD542 (NYVAC TK 遺伝子座ドナープラスミド) を誘導した。このため、pSD513 内のポリリンカー領域を PstI / BamHI を用いて切断し、次に、アニーリングされた合成オリゴヌクレオチド

MPSYN288 (SEQ ID NO:80)

(5'-GGTCGACGGATCCT- 3') および

MPSYN289 (SEQ ID NO:81) (5'-GATCAGGATCCGTCGACCTGCA- 3')

に連結することによりプラスミド pSD542 を得た。

22CMVgBを、BamHI および NsiI で分解してH6プロモータおよびgB遺伝子の一部を含有するフラグメントを調製し、また、NsiI および PstI で分解してgB遺伝子の残りを含有するフラグメントを調製した。これらの2種類のフラグメントをpSD542 (予め、そのポリリンカー内でBamHI および PstI で分解して、NYVACドナープラスミド542CMVgBを形成したもの) に連結した。542CMVgBに含有されているCMVgB遺伝子のDNA配列およびその端部をはさむ配列(フランキング配列)は図13Aおよび図13Bに示す(SEQ ID NO:38)。

ALVACドナープラスミドCP3LVQH6へのHCMVgB遺伝子のクローニング

8.5kbのカナリアボックスBglIIフラグメントをpBS-SKプラスミドベクター(米国カリフォルニア州La JollaのStratagene社製)のBamHI部位にクローニングしてpWW5を調製した。ヌクレオチド配列分析によれば、C3と指称されているリーディングフレームは、図14A~図14Cに示す配列(SEQ ID NO:39)において、1458位から開始され2897位で終結していた。C3遺伝子座に外来遺伝子を挿入するとともにC3のオープンリーディングフレームを完全に切除したドナープラスミドを構築するために、PCRプライマーを用いてC3に対する5'側配列および3'側配列を増幅した。5'側配列用のプライマーとして、

RG277 (SEQ ID NO:82) (5'-CAGTTGGTACCACTGGTATTTTATTTTCAG-3') および RG278 (SEQ ID NO:83) (5'-TATCTGAATTCCTGCAGCCCGGGTTTTATAGCTAATTAGTCAAATGTGAGTTAATATTAG-3')

を用いた。また、3'側配列用のプライマーとして、

RG279 (SEQ ID NO:84)

(5'-

TCGCTGAATTCGATATCAAGCTTATCGATTTTTATGACTAGTTAATCAAATAAAAAGCATACAAGC-3') および RG280 (SEQ ID NO:85) (5'-TTATCGAGCTCTGTAACATCAGTATCTAAC-3')

を用いた。これらのプライマーは、ワクシニアの転写および翻訳停止シグナルが隣接しているような多重クローニング部位を含むように設計した。さらに、左側アームおよび右側アームの5'末端および3'末端に適当な制限酵素部位がある(左側アームについてはAsp718およびEcoRI、右側アームについてはEcoRIおよびSacI)ようにし、これによりAsp718/SacI分解pBS-SKプラスミドベクターにそれらの2種のアームを連結させることができた。得られたプラスミドをpC31と命名した。プラスミドpWW5をNsiI および SspI で分解することにより、C3遺伝子座のすぐ上流に908bpのカナリアボックスDNAフラグメントを得た。PCR法により(Engelke他、1988)、鋳型としてプラスミドpWW5およびオリゴヌクレオチド

CP16 (SEQ ID NO:86)

(5'-TCCGGTACCGCGGCCGCGAGATATTTGTTAGCTTCTGC-3') および

CP17 (SEQ ID NO:87) (5'-TCGCTCGAGTAGGATACCTACCTACTACCTACG-3')

を用いて、カナリアボックスDNAの604bpフラグメントを得た。該604bpのフラグメントをAsp718およびXhoI (それらの制限部位は、それぞれ、オリゴヌクレオチドC

10

20

30

40

50

P 1 6 および C P 1 7 の 5 ' 末端に存在) で分解し、次に、A s p 7 1 8 / X h o I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された I B I 2 5 (米国コネチカット州 New Haven の International Biotechnologies 社製) にクローニングして、プラスミド S P C 3 L A を調製した。この S P C 3 L A を I B I 2 5 内で E c o R V により分解、また、カナリアボックス DNA 内で N s i I により分解し、これを 908bp の N s i I - S s p I フラグメントに連結することにより S P C P L A X を調製した。S P C P L A X は、C 3 遺伝子座の上流にカナリアボックス DNA の 1444bp を含有する。

プラスミド p X X 4 (これは、p B S - S K の P s t I 部位にクローニングされたカナリアボックス DNA の 6.5kb N s i I フラグメントを含有する) から、カナリアボックス DNA の 2178bp B g 1 I I - S t y I フラグメントを分離した。プラスミドの p X X 4 を鋳型とし、さらに、オリゴヌクレオチド
CP19 (SEQ ID NO:88) (5'-

10

TCGCTCGAGCTTTCTTGACAATAACATAG-3') および **CP20 (SEQ ID NO:89)**
(5'-TAGGAGCTCTTTATACT ACTGGGTTACAAC-3')

を用いて、P C R 法 (Engelke 他、1988) によりカナリアボックス DNA の 279bp フラグメントを分離した。この 279bp のフラグメントを X h o I および S a c I (これらの制限酵素部位は、それぞれ、オリゴヌクレオチド C P 1 9 および C P 2 0 の 5 ' 末端に存在する) で分解し、S a c I - X h o I 分解されアルカリホスファターゼ処理された I B I 2 5 中にクローニングして、プラスミド S P C 3 R A を得た。

20

該ポリリンカーに唯一の制限酵素を追加するために、p C 3 I をポリリンカー領域内で E c o R I によって分解し、アルカリホスファターゼで処理し、さらに、キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチド

CP12 (SEQ ID NO:90) (5'-AATTCCTCGAGGGATCC-3') および

CP13 (SEQ ID NO:91) (5'- CGGGATCCCTCGAGG-3')

E c o R I 粘着端、X h o I 部位、B a m H I 部位、および C l a I に結合し得る粘着端を含有する) に連結した。S P C P 3 S を、C 3 遺伝子座の下流のカナリアボックス配列内で S t y I および S a c I を用いて分解し (p B S - S K)、S P C 3 R A 由来の 261bp B g 1 I I - S a c I フラグメントおよび p X X 4 由来の 2178bp B g 1 I I - S t y I フラグメントに連結して (C 3 遺伝子座の下流に 2572bp のカナリアボックス DNA を含有する) プラスミド C P R A L を調製した。C 3 遺伝子座の上流のカナリアボックス配列内において A s p 7 1 8 (p B S - S K 中) および A c c I を用いて S P C P 3 S を分解し、S P C P L A X 由来の 1436bp A s p 7 1 8 - A c c I フラグメントに連結して、(C 3 遺伝子座の上流に 1457bp のカナリアボックス DNA を含有する) プラスミド C P L A L を調製した。C 3 遺伝子座の下流のカナリアボックス配列内で S t y I および S a c I (p B S - S K 中) を用いて C P L A L を分解し、次に、C P R A L 由来の 2438bp S t y I - S a c I フラグメントに連結してプラスミド C P 3 L を調製した。かくして、このプラスミド C P 3 L は、C 3 遺伝子座の上流に 1457bp のカナリアボックス DNA、6 ヶのリーディングフレーム内に停止コドン、初期転写終結シグナル、ポリリンカー領域、初期転写終結シグナル、6 ヶのリーディングフレーム内に停止コドン、および、C 3 遺伝子座の下流に 2572bp のカナリアボックス DNA を含有する。

30

40

P C R 法により (Engelke 他、1988)、鋳型として p R W 8 3 8 (H 6 プロモータに連結した狂犬病ウイルス糖タンパク質遺伝子 (Kieny 他、1984) を含有するプラスミド) を用い、さらにオリゴヌクレオチド

CP21 (SEQ ID NO:92)

(5'-TCGGGATCCGGGTTAATTAATTAGTTATTAGACAAGGTG-3') および

CP22 (SEQ ID NO:93) (5'-
TAGGAATTCCTCGAGTACGATACAACTTAAGCGGATATCG-3')

を用いて、初期／後期H6ワクシニアプロモータ (Taylor他、1988a,b; Perkus他、1989) を生成物を BamHI および EcoRI を用いて (それらの制限酵素部位は、それぞれ、CP21 および CP22 の 5' 末端にある) 分解し、CP3L に連結し、さらに、ポリリンカー内で BamHI および EcoRI で分解し、プラスミド VQH6CP3L を得た

10

。ALVACドナープラスミド VQH6CP3L をポリリンカー内で XhoI により、また、H6プロモータ内で NruI によって分解し、そして、22CMVgB (H6プロモータおよび gB 遺伝子の一部、ならびに XhoI および HindIII 分解により pIBI24 から誘導されたポリリンカーを含有する) 由来の NruI / HindIII フラグメントに連結して、ALVACドナープラスミド CP3LCMVgB を調製した。プラスミド CP3LCMVgB における CMVgB 遺伝子の DNA 配列および付加されているフランキンゲン配列は図15A～図15Cに示している (SEQ ID NO:40)。

トランスメンブレン領域が欠失されたHCMVgB遺伝子のNYVACドナープラスミド pSD553へのクローニング プラスミド pSD553は、COPAK系列に属するワクシニア欠失／挿入プラスミドの1つである。このプラスミドは、Copenhagenワクシニアのフランキンゲンアーム内に、ワクシニアK1L宿主域遺伝子 (Gillard他、1986; Perkus他、1990) を含有し、ATI領域 (オープンリーディングフレーム A25L、A26L; Goebel他、1990a,b) を置換している。pSD553は以下のように構築した。

20

左側および右側のワクシニアフランキンゲンアームは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により鋳型として pSD414 (ワクシニア SalI B を pUC8 にクローニングしたもの1種 (Goebel他、1990a,b)) を用いて調製した。左側アームの合成にはプライマーとして、合成デオキシオリゴヌクレオチド

MPSYN267 (SEQ ID NO:94) (5'-

GGGCTGAAGCTTGCTGGCCGCTCATTAGACAAGCGAATGAGGGAC-3') および

30

MPSYN268 (SEQ ID NO:95) (5'-

AGATCTCCCGGCTCGAGTAATTAATTAATTTTATTACACCAGAAAAGACGGCTTGAGAT C-3')

を用いた。右側アームは、プライマーとして合成デオキシオリゴヌクレオチド

MPSYN269 (SEQ ID NO:96) (5'-

TAATTACTCGAGCCCGGAGATCTAATTTAATTTAATTTATATAACTCATTTTTTTGAATAT ACT-3') および MPSYN270 (SEQ ID NO:97) (5'-

TATCTCGAATTCCTCGGCTTTAAATGGACGGAAGTCTTTTCCCCC-3')

40

を用いて合成した。左側アームおよび右側アームを含有するこれらの2種類のPCR由来DNAフラグメントを一緒にして更なるPCR反応を行った。得られた生成物を EcoRI / HindIII で切断して、0.9kbのフラグメントを分離した。この0.9kbフラグメントを pUC8 の EcoRI / HindIII 断片に連結して、プラスミド pSD541 を得た。ワクシニアATI欠失座にあるポリリンカー領域を以下のように伸長した。pSD541 を BglII / XhoI で切断し、アニーリングされた相補的合成オリゴヌクレオチド

MPSYN333 (SEQ ID NO:98)

(5'-

GATCTTTTGTTAACAAAACTAATCAGCTATCGCGAATCGATTCCCGGGGGATCCGGTAC
CC-3') および MPSYN334 (SEQ ID NO:99) (5'-
TCGAGGGGTACCGGATCCCCCGGAATCGATTGCGGATAGCTGATTAGTTTTTGTTAACAA
A A-3')

に連結してプラスミド p S D 5 5 2 を調製した。プラスミド p S D 5 4 2 から 1 kb の B g
l II (部分分解) / H p a I フラグメントとして K 1 L 宿主域遺伝子 (Perkus 他、1990)
を単離した。p S D 5 5 2 を B g l II / H p a I で切断し、上記 K 1 L 含有フラグメント
に連結して、p S D 5 5 3 を調製した。

10

S P 1 3 1 C M V g B (H 6 プロモータの制御下にある H C M V g B 遺伝子を含む)
由来の H i n d III フラグメントを DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片で切れ目充填 (フ
ィリング) し、プラスミド p S D 5 5 3 (S m a I で分解されアルカリホスファターゼ
処理されたもの) に連結した。得られた N Y V A C ドナープラスミド (H 6 をプロモータ
とする g B は K 1 L と同じ方向にある) を 5 5 3 H 6 C M V g B と命名した。このプラス
ミド 5 5 3 H 6 C M V g B における C M V g B 遺伝子の DNA 配列と付加されているフラ
ンキング DNA 配列は図 16 A および図 16 B に示す (SEQ ID NO:41)。

トランスメンブレン領域が欠失された C M V g B の配列は図 17 に示されている (SEQ ID N
O:42)。トランスメンブレン領域をコードするヌクレオチドは以下のように欠失させた。
オリゴヌクレオチド

20

SPgB3 (SEQ ID

NO:100) (5'-GATCCATGGACTCGACAGCGGCGTCTCTGCATGCAGCCGCTGCAGA-
3') および SPgB4 (SEQ ID NO:101) (5'-
AGCTTCTGCAGCGGCTGCATGCAGAGACGCCGCTGTCTGAGTCCATG-3')

をキナーゼ処理し、アニーリングし、B a m H I / H i n d III 分解され且つアルカリホ
スファターゼ処理された I B I 2 4 にクローニングしてプラスミド S P C M V g B 2 を調
製した。オリゴヌクレオチド

30

SPgB1 (SEQ ID NO:102) (5'-

TACGAATTCTGCAGTTCACCTATGACACGTTGC-3') および SPgB2 (SEQ ID
NO:103) (5'-ATAGGATCCATGGTCGTCCAGACCCTTGAGGTAGGGC-3')

を用いプラスミド S P 1 3 1 C M V g B を鋳型とする P C R を行い、0.7kb フラグメント
を調製した。このフラグメントを E c o R I / B a m H I で分解し、E c o R I / B a m
H I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された I B I 2 4 中にクローニングしてプ
ラスミド S P C M V g B 1 を調製した。この S P C M V g B 1 由来の 0.7kb E c o R I /
N c o I フラグメントを、E c o R I / N c o I 分解されホスファターゼ処理された S P
C M V g B 2 に連結してプラスミド S P C M V g B を調製した。オリゴヌクレオチド
SPgB5 (SEQ ID NO:104) (5'-

40

GCCCTACCTCAAGGGTCTGGACGACACTCGACAGCGGCGTCTCTGCAT-3')

を用いる突然変異法 (Mandecki、1986) により、S P C M V g B 3 内の唯一の N c o I 部
位を欠失させてプラスミド S P C M V g B 4 を調製した。S P C M V g B 4 由来の 0.7kb
P s t I フラグメントを 5 5 3 H 6 C M V g B 由来の 6.6kb P s t I フラグメントに連結
して、N Y V A C ドナープラスミド 5 5 3 H 6 C M V g B T M⁻ を調製した。このプラス
ミドは、H 6 プロモータの制御下にあり、そのトランスメンブレン領域が欠失された (ア
ミノ酸 715~772 位; Spaete 他、1988) g B 遺伝子を含む。プラスミド 5 5 3 H 6 C M

50

V g B T M⁻におけるトランスメンブレンが欠失されたCMV g B遺伝子のDNA配列と追加のフランキングDNA配列は図18Aおよび図18Bに示す (SEQ ID NO:43)。

トランスメンブレン領域が欠失され切断部位が変更されたHCMV g B遺伝子のNYVACドナープラスミドpSD553へのクローニング

トランスメンブレン領域が欠失され変更 (変性) された切断部位を含有するCMV g Bの配列は図19に示す (SEQ ID NO:44)。切断部位の変性は以下のように行った。オリゴヌクレオチド

SPgB8 (SEQ ID NO:105)(5'-AATTGGTGACCG-3')

および **SPgB9 (SEQ ID NO:106) (5'-GATCCGGTCACC-3')**

10

をキナーゼ処理し、アニーリングし、E c o R I / B a m H I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B I 2 4にクローニングして、プラスミドB s t I B Iを調製した。5 5 3 H 6 C M V g B T M⁻由来の1.4kbB s t E I I / S p H Iフラグメントを、B s t E I I / S p H I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたB s t I B Iにクローニングして、S P C M V g B 5を調製した。

オリゴヌクレオチド

SPgB10 (SEQ ID NO:107) (5'-

TGAAAGACCGAATTCTGCGT-3') + SPgB11 (SEQ ID NO:108) (5'-
TGCGATTTCATCGGTTTGTGTAGAT-3') および SPgB12 (SEQ ID NO:109)
(5'-GACCCTTGAGGTAGGGCGGC-3') + SPgB13 (SEQ ID NO:110)
(5'-ACTCATAATAGAACCATAAGATCTACAGATGGCAACAAT-3')

20

を用いてプラスミド5 5 3 H 6 C M V g B T M⁻のPCRを行い、0.7kbフラグメントおよび0.8kbフラグメントを得た。これら2種類のフラグメントを組み合わせて、オリゴヌクレオチドS P g B 1 0 + S P g B 1 2のPCRを実施して、1.2kbのフラグメントを得た。この1.2kbフラグメントをE c o R IおよびP s t Iで分解し、0.5kbのフラグメントを分離し、E c o R I / P s t I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B I 2 4にクローニングして、プラスミドS P C M V g B 6を調製した。このS P C M V g B 6由来の0.5kbE c o R I / P s t Iフラグメントを用いて、S P C M V g B 5中の対応するフラグメントと置換して、プラスミドS P C M V g B 7を調製した。このS P C M V g B 7由来の1.4kbB s t E I I / S p H Iフラグメントを用いて、5 5 3 H 6 C M V g B中の対応するフラグメントと置換して、NYVACドナープラスミド5 5 3 H 6 g B C⁻ T M⁻を調製した。このプラスミドは、H 6プロモータの制御下にあり、トランスメンブレン領域が欠失された (アミノ酸715~772位) g B遺伝子を含有し且つ切断部位が変性 (R T K R^{*} S TがR T I R S Tに変性。ここで星印は切断が通常起こる個所を示すが (Spaete他、1988)、Sコドンが変性されてB g l I I制限酵素部位を形成した。) されている。プラスミド5 5 3 H 6 g B C⁻ T M⁻における切断部位が変性され且つトランスメンブレンが欠失されたCMV g BのDNA配列および追加のフランキングDNA配列は図20Aおよび図20Bに示されている。 (SEQ ID NO:45)

30

40

実施例13-HCMV g Bを含有する組換えボックスウイルスの構築

レスキューウイルスを感染させた組織培養細胞に組換えドナープラスミドをトランスフェクションし、ニトロセルロースフィルタ上のインサイチュハイブリダイゼーションにより組換え体を同定することは既に明らかにされている (Guo他、1989; PanicaliおよびPaolotti、1982; Piccini他、1987; Perkus他、1993)。かくして、NYVAC (v P 8 6 6) 感染Vero細胞 (A T C C C C L # 8 1) に、プラスミド5 4 2 C M V g Bをトランスフェクションして、組換え体v P 1 0 0 1 (NYVAC-g B)を調製した。また、ALVAC感染初代ニワトリ胚繊維芽 (C E F) 細胞にプラスミドC P 3 L C M V g Bをトランスフェクションして組換え体v C P 1 3 9 (ALVAC-g B)を調製した。さらに、NYVAC感染Vero細胞に、プラスミド5 5 3 H 6 C M V g B、5 5 3 H 6 C M V g B T M⁻

50

および553H6 g B C T M をトランスフェクションして、それぞれ、組換え体 v P 1 1 2 6、v P 1 1 2 8 および v P 1 1 4 5 を調製した。WR L 変異体ワクシニアウイルス (Panicali他、1981) が感染したVero細胞に、プラスミド22CMV g Bをトランスフェクションして、組換え体 v P 9 9 2 を調製した。

実施例14ーボックスウイルス組換え体によって発現されたCHMV g Bの免疫沈降

g B特異的モルモットポリクローナル血清 (Goenczoel他、1990) を用い、既知の方法 (Taylor他、1990) により免疫沈降分析を行った。g B特異的なバンドの見かけの分子量は以前に報告された結果 (BrittおよびAuger、1986; BrittおよびVugler、1989; Reis他、1993) と一致した。v P 9 9 2、v P 1 0 0 1、v C P 1 3 9、v P 1 1 2 6、v P 1 1 2 8 および v P 1 1 4 5 由来の細胞内画分は、見かけの分子量130~140 k D a の主要バンドを含有したが、これはグリコシル化された未切断 g B 前駆体であろう。また、細胞画分には約110 k D a および55 k D a において弱いバンドも見られたが、これらはN-末端およびC末端のプロセシングされたフラグメントである。v P 1 1 2 8 および v P 1 1 4 5 が感染した細胞由来の細胞内画分は、未切断前駆体ならびにN-末端およびC末端のプロセシングされたフラグメントを含有していた。

実施例15ーALVAC-g BおよびNYVAC-g Bを接種した実験動物の体液性応答

CBAマウスにv P 1 0 0 1 (NYVAC-g B) を単一回接種して免疫化 (免疫感作) した後、被接種マウスの血清中の中和抗体力価を分析した (Goenczoel他、1986)。免疫化から14~21日後 (幾何平均力価は1:16) および28~60日後 (幾何平均力価は1:26) マウスの血清中のHCMV中和性抗体を検出した (表2)。CBAマウスにv C P 1 3 9 (ALVAC-g B) を単一回免疫化した場合に産生されたHCMV中和性抗体力価は、1:64gmt (幾何平均) (免疫後14~21日) および1:111gmt (免疫後28~60日) であった。このように、HCMV g Bを発現するNYVACおよびALVAC組換え体でマウスを免疫化すると、HCMVの感染を中和することのできる抗体が誘起される。ヒトのボランティアにおいてALVAC-g B (v C P 1 3 9) の安全性および免疫原性を評価した。該組換え体を $10^{6.3}$ T C I D₅₀で2回接種した後でも、顕著な作用は認められなかった。

表21 CBAマウスにおけるHCMV中和性抗体

免疫化	免疫後の日数		
NYVAC - g B	14-21 16 16	21-28	28-60
			32
			24
			32
ALVAC - g B	32 64 128 64	64 128	24
			128
			96

免疫化は、組換えウイルスを $2 \sim 4 \times 10^8$ P F Uでi.p.投与することにより行った。

次に、モルモットにALVAC-g Bを2回 (0日および28日) 接種、免疫化し、血清を分析してHCMV中和抗体の存在を調べた。34日目 (gmt=60)、42日目 (gmt=60) および56日目 (gmt=60) において血清中のHCMV中和抗体の検出を行った (表22)。このように、ALVAC-g Bでモルモットを免疫化すると、HCMVの感染を中和し得る抗体が

誘発された。

表22 A L V A C - g B を接種したモルモット中の H C M V 中和抗体

モルモットの番号 #	日数					
	0	14	28	34	42	56
19	< 4	< 4	< 4	64	64	64
20	< 4	< 4	< 4	32	64	64
21	< 4	< 4	< 4	12	32	64
22	< 4	< 4	< 4	48	48	32
23	< 4	< 4	4	96	46	46
24	< 4	< 4	< 4	46	46	32

0 日目および28日目に $10^{6.3}$ T C I D₅₀ でモルモットに筋肉内接種した。

実施例16ーボックスウイルスベクターへの H C M V g H のクローニング

N Y V A C ドナープラスミド p S D 5 5 0 への H C M V g H 遺伝子のクローニング P C
R 法によりオリゴヌクレオチド

SPgH1 (SEQ ID NO:111)

(5'-TATCTGCAGATGCGGCCAGGCCTCCCCTCCTAC-3') および **SPgH2**

(SEQ ID NO:112) (5'-CCGAAGCTTTCAGCATGTCTTGAGCATGC-3')

を用いてゲノム DNA (Towne株) から H C M V g H 遺伝子を単離した。得られた2.3kbフラグメントを P s t I (制限部位は S P g H 1 の 5' 末端にある) および H i n d III (制限部位は S P g H 2 の 5' 末端にある) を用いて分解し、P s t I / H i n d III 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された I B I 2 4 にクローニングしてプラスミド S p g H 1 を調製した。C M V g H の配列は図21に示す (SEQ ID NO:46)。

以下に示すように、該 g H 遺伝子の 3' 末端を変性させて、ワクシニアウイルス初期転写終結シグナル (YuenおよびMoss、1987) および唯一の X h o I 制限 (酵素) 部位を含有するようにした。すなわち、S P g H 1 を、g H の 3' 末端内で S p H I を用い、また、I B I 2 4 内で H i n d III を用いて分解し、得られる g H 含有フラグメントを精製し、そして、キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチド

SPgH16 (SEQ ID NO:113)

(5'-CTCAAGACATGCTGATTTTTATCTCGAGA-3') および **SPgH17**

(SEQ ID NO:114) (5'-AGCTTCTCGAGATAAAAATCAGCATGTCTTGAGCATG-3')

に連結してプラスミド S P g H 2 を調製した。

キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチド

SPgH12 (SEQ ID NO:115)
 (5'-AATTCTCGAGTTTATTGGGAAGAATATGATAATATTTTGGGATTTC- 3'),
 SPgH13 (SEQ ID NO:116) (5'-
 AAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGCGGCCCGGG-3'), SPgH14 (SEQ
 ID NO:117) (5'-GATCCCGGGCCGCATTTTATATTGTAATTATAT-3') および
 SPgH15 (SEQ ID NO:118) (5'-
 ATTTTCAATTTGAAATCCCAAATATTATCATATTCTTCCCAATAAACTCGAG-3')

を、EcoRI/BamHI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたIBI24 10
 に連結してプラスミドSPgH3を調製した。このプラスミドは、唯一のXhoI部位、
 エントモボックス42KプロモータおよびHCMVgHの最初の4個のアミノ酸配列をコ
 ードするヌクレオチド配列を含有する（オリゴヌクレオチドSPgH13 (SEQ ID NO:11
 6) およびSPgH14 (SEQ ID NO:117) において斜線を引いているコドンは一アミノ酸配
 列を変更することなくSmaI部位を形成するように変性されたものである）。プラスミ
 ドSPgH1を鋳型とするPCR法においてオリゴヌクレオチド

SPgH18 (SEQ ID NO:119)

(5'-TTAGAATTCCCCGGGCTCCCCTCCTACCTCATCGT-3') および

SPgH19 (SEQ ID NO:120) (5'-

20

TTACTGCAGTAAGTGTTAAGTCTCTGTTGGTATC-3')

を用いて0.4kbのフラグメントを得た。このフラグメントをSmaIおよびPstIで分
 解し、SmaI/PstI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたSPgH3に
 クローニングして、プラスミドSPgH5（唯一のXhoI部位、42Kプロモータおよ
 びHCMgH遺伝子の5'側15%を含有する）を調製した。このSPgH5由来の0.4kb
 EcoRI/BglIIフラグメントを、SPgH5由来の4.7kbEcoRI/BglIIフ
 ラグメントに連結して、プラスミドSPgH6（42Kをプロモータとし、XhoI部位
 には含まれているgH遺伝子を含有する）を調製した。

プラスミドpSD548 (Tartaglia他、1992) からプラスミドpSD550 (I4L遺 30
 伝視座ドナープラスミド) を誘導した。すなわち、pSD548内のポリリンカー領域を
 BglIIおよびSmaIで切断し、アニーリングされた合成オリゴヌクレオチド

539A (SEQ ID NO:121) (5'-

AGAAAAATCAGTTAGCTAAGATCTCCCGGGCTCGAGGGTACCGGATCCTGATTAGTTAAT

T TTTGT-3') および 539B (SEQ ID NO:122) (5'-

GATCACAAAATTAATAATCAGGATCCGGTACCCTCGAGCCCGGGAGATCTTAGCTAAC
 T GATTTTTTCT-3')

に連結することにより変性して、プラスミドpSD550を得た。SPgH6由来の2.3k 40
 bXhoIフラグメントを、XhoI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたp
 SD550にクローニングして、NYVACドナープラスミドI4L42KgHを調製し
 た。このプラスミド中でgHの方向は置換されたI4L遺伝子と同じ方向にある。プラス
 ミドI4L42KgHにおけるCMVgHのDNA配列および付加されているフランキン
 グDNA配列は図22Aおよび図22Bに示している (SEQ ID NO:47)。

ALVACドナープラスミドNVQC5LSPへのHCMVgH遺伝子のクローニング
 以下のようにして、C5上流に1535bp、KpnI/SmaI/XbaIおよびNotI部
 位を含有するポリリンカーおよび404bpのカナリアボックスDNA (31塩基対のC5をコ
 ードする配列および373bpの下流配列) を含有するC5挿入ベクターを誘導した。コスミ
 ドベクター (KnaufおよびNester、1982) にカナリアボックスDNAのゲノムライブラリ 50

ーを構築した。この際、プロービングに p R W 764.5 (P U C 9 系プラスミドであり、図 9 (SEQ ID NO:27) における C 5 の O R F スクレオチド 1372~2252 位を含む 880bp カナリアボックス P v u II フラグメントを含有する) および 29kb のインサート (p H C O S 1) を含有するクローンをを用いた。p H C O S 1 から C 5 領域を含有する 3.3kb の C l a I フラグメントを分離、同定した。C 5 のオープンリーディングフレームは、図 8 に示す配列 (SEQ ID NO:27) において 1537 位で開始し、1857 位で終結している。

C 5 挿入ベクターの構築には、2 つの工程を実施した。オリゴヌクレオチド

C5A (SEQ ID NO:123)

(5'-ATCATCGAATTCTGAATGTTAAATGTTATACTTTG-3') および **C5B (SEQ ID NO:124) (5'-GGGGGTACCTTTGAGAGTACCACTTCAG-3')**

10

ならびに精製されたゲノムカナリアボックス DNA を鋳型として用いる P C R 増幅法により 1535bp の上流配列を調製した。このフラグメントを E c o R I で分解 (オリゴ C 5 A 内で) し、E c o R I / S m a I 分解された p U C 8 にクローニングして C 5 L A B を調製した。オリゴヌクレオチド

C5C (SEQ ID NO:125) (5'-

GGGTCTAGAGCGGCCGCTTATAAAGATCTAAATGCATAATTTTC-3') および **C5DA**

(SEQ ID NO:126) (5'-ATCATCCTGCAGGTATTCTAAACTAGGAATAGATG-3')

を用いる P C R 増幅法により、404bp のアームを調製した。このフラグメントを P s t I で分解 (オリゴ C 5 D A 内で) し、S m a I / P s t I 分解された C 5 L A B にクローニングして、p C 5 L を調製した。

20

この p C 5 L を A s p 7 1 8 および N o t I で分解 (ポリリンカー内) し、アルカリホスファターゼで処理し、さらに、キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチド

CP26 (SEQ ID NO:127) (5'-

GTACGTGACTAATTAGCTATAAAAAGGATCCGGTACCCTCGAGTCTAGAATCGATCCCGG

GTTTTTATGA CTAGTTAATCAC-3') および **CP27 (SEQ ID NO:128) (5'-**

GGCCGTGATTAACTAGTCATAAAAACCCGGGATCGATTCTAGACTCGAGGGTACCGGATC

30

C TTTTTATAGCTAATTAGTCAC-3')

(不能化した A s p 7 1 8 部位、6 ヶのリーディングフレームの翻訳停止コドン、ワクシニア初期転写終結シグナル (Yuen および Moss, 1987)、B a m H I、K p n I、X h o I、X b a I、C l a I および S m a I 制限部位、ワクシニア初期転写終結シグナル、6 ヶのリーディングフレームの翻訳停止コドン、ならびに不能化した N o t I 部位を含有する) に連結して、プラスミド C 5 L S P を調製した。C 5 L S P のポリリンカー領域をさらに変性するため、B a m H I で分解し、アニーリングされたオリゴヌクレオチド

CP32

40

(SEQ ID NO:129) (5'-

GATCTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCGAGAACGAGACTATCTGCTCGTTAATTAAT

T AGGTCGACG-3') および **CP33 (SEQ ID NO:130) (5'-**

GATCCGTGACCTAATTAATTAACGAGCAGATAGTCTCGTTCTCGCCCTGCCTGATGACT

A ATTAATTAA-3')

に連結して、プラスミド V Q C 5 L S P を調製した。この V Q C 5 L S P を E c o R I で分解し、アルカリホスファターゼ処理し、キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチド

CP29 (SEQ ID NO:131)

(5'-AATTGCGGCCGC-3')

に連結し、さらにNot Iで分解した。この線状プラスミドを精製し、自己連結させてプラスミドNVQC5LSPを調製した。SPgH6由来の2.3kbのXho Iフラグメントを、Xho I分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたNVQC5LSPにクローニングしてALVACドナープラスミドNVQC5L42KgHを得たが、該プラスミド内ではgHの方向は欠失されたC5遺伝子と同じ方向にある。プラスミドNVQC5L42KgHにおけるCMVgHのDNA配列および追加のフランキングDNA配列は図23Aおよび図23Bに示す(SEQ ID NO:47)。

ワクシニアドナープラスミドpSD157K1LINSへのHCMVgH遺伝子のクローニング プラスミドpHK(これは、pBR322にクローニングされたWRワクシニアHindIIIフラグメントを含有する)をHindIII/BhlIIで分解し、1.2kbフラグメントを単離し、これをBamHI/HindIII分解されたpBS-SK⁺にクローニングして、プラスミドpBS-HKARMを得た。このpBS-HKARMをポリリンカー内でAsp718を用いて分解し、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウ断片で平滑末端化し、そして、pBS/ワクシニア接合部においてHindIIIで分解した。得られた4.1kbのベクターフラグメントをpHM-1(pHM-1は、pBR322にクローニングしたWRワクシニアウイルスHindIIIMフラグメントを含有する)由来の2.0kbNruI/HindIIIフラグメントに連結してプラスミドpMPWRMKを得た。このpMPWRMKをHpaIで切断し、アニーリングされた合成オリゴヌクレオチド

MPSYN527 (SEQ ID NO:132) (5'-

ATAAAAATTAGCTACTCAGGTACCCTGCAGTCGCGAGGATCCGAATCCCCGGGCTCGAGT GATTAATTAGTTTTTAT-3')および**MPSYN528 (SEQ ID NO:133) (5'-ATAAAACTAATTAATCACTCGAGCCCGGGGAATTCGGATCCTCGCGACTGCAGGGTACCT GAGTAGCTAATTTTTAT-3')**

に連結した。得られたプラスミドがpSD157K1LINSである。pSD157K1LINSをそのポリリンカー領域内でXho Iで分解し、アルカリホスファターゼで処理し、さらに、SPgH6由来の2.3kbのXho Iフラグメントに連結してプラスミドMP804-42KgH(同じ方向にあるHCMVgH遺伝子およびK1L遺伝子を含有)を形成した。プラスミドMP804-42KgHにおけるCMVgHのDNA配列および付加されているフランキングDNA配列は図24に示す(SEQ ID NO:49)。

実施例17-HCMVgHを含有する組換えボックスウイルス組換え体の構築

NYVAC感染CEF細胞にプラスミドI4L42KgHをトランスフェクションして組換え体vP1173(HCMVgHを含有)を調製した。同じプラスミドをvP1001感染Vero細胞にトランスフェクションして組換え体vP1183(HCMVgBおよびgHを含有)を調製した。

プラスミドNVQC5L42KgHをALVAC感染CEF細胞にトランスフェクションして、組換え体vCP236(HCMVgHを含有)を調製した。同じプラスミドをvCP139感染CEF細胞にトランスフェクションして組換え体vCP233(HCMVgBおよびgHを含有)を調製した。ワクシニアウイルスvP1170(これは、欠失されたK1L遺伝子の場所にエントモボックスウイルス42Kプロモータの転写制御下にEcogptを含有する)を用いて、プラスミドMP804-42KgHでトランスフェクションされたVero細胞を感作して組換え体vP1205Bを調製した。

実施例18-ボックスウイルス組換え体によって発現されるHCMVgHの免疫沈降

HCMVgHに対して特異的なモノクローナル抗体を用いて実施した免疫沈降により、組換え体vP1173、vP1183、vP1205B、vCP233およびvCP236によって86KDaのgHタンパク質(Pachl他、1989)が発現されていることが示され

10

20

30

40

50

た。また、g B特異的モルモットポリクローナル血清を用いる免疫沈降により、組換え体 v P 1 1 8 3 および v C P 2 3 3 が正確に発現されていることが示された。

H C M V の 7 2 K D a 即時初期 1 タンパク質 (I E 1) は、ヒトにおける C D ₈⁺ 細胞障害性 T 細胞の標的であり (Borysiewicz 他、1988)、C D ₄⁺ T 細胞によって認識される (Alp 他、1991)。1 人について I E 1 上の増殖性で M H C ー クラス I ー 制限性の細胞障害性決定基を調べたところ、エクソン 4 をコードする領域の空間的に離れたセグメントから成ることが見出された (Alp 他、1991)。I E 1 タンパク質は、それ自身のプロモータ由来の発現を高めるように調節し (Cherrington および Mocarski、1989)、さらには、H I V

L T R 由来の発現 (Biegelke および Geballe、1991; Ghazal 他、1991) および細胞性遺伝子 c - m y c、c - f o s および h s p 7 0 に対するプロモータの発現 (Hagemeiser 他、1992; Santomenna および Colberg-Poley、1990; Colberg-Paley 他、1992) に同様の機能を発揮することが示されている。Lafemina ら (1989) は、安定な細胞系内で発現された I E 1 タンパク質は分裂中期の染色体に優先的に結合すると報告し、潜伏期に H C M V の D N A をプラスミド状態で保持するのに該タンパク質が関与している可能性があることを提示した。

以下の実施例 19~30 においては、I F 1 全遺伝子、2~32 位のアミノ酸が欠失された I E 1、292~319 のアミノ酸が欠失された I E 1、または I E 1 のエクソン 4 セグメントを発現するボックスウイルス組換え体の構築について示している。これらの検討を行った目的は、核へ転移することができず、したがって、転移活性物質として機能する可能性を減少させながら、C D ₈⁺ 細胞障害性 T 細胞により認識され得る能力は維持しているような形態の I E 1 遺伝子産生物を開発することにある。実施例 45 により、全長遺伝子産生物とは異なり、変性された形態の I E 1 タンパク質 (2~32 位のアミノ酸が欠失したもの) を発現する A L V A C 組換え体は、感染細胞の核および細胞質の双方において見出され、H C M V 血清反応陽性個体由来の細胞障害性エフェクター細胞を再刺激できることが示されている。

実施例 19ーボックスウイルスベクターへの H C M V I E 1 全遺伝子のクローニング
ワクシニアドナープラスミド p S D 2 2 - H への H C M V I E 1 遺伝子のクローニング

プラスミド p J D 0 8 3 を鋳型とし (Akrigg 他、1985)、オリゴヌクレオチド

IE3 (SEQ ID NO:134) (5'-

ACGGATCCATAAAAATTACTGGTCAGCCTTGCTTC-3') および **IE5 (SEQ ID NO:135) (5'-ATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGTCCTCTGCCAAGAGA-3')**

を用いる P C R 法により、1.5kb フラグメントとして全 H C M V I E 1 遺伝子を得た。プラスミド p S D 4 8 6 H 6 3 4 0 (これは、H 6 プロモータに正確に結合した非関連遺伝子を含む) を (該 H 6 プロモータ内で) N r u I で分解し、さらに (該非関連遺伝子の 3' 末端において) B a m H I で分解し、B a m H I 分解された 1.5kb の P C R フラグメント (オリゴヌクレオチド I E 3 の 5' 末端に B a m H I がある) に連結してプラスミド p S D 4 8 6 H 6 H C M V I E 1 を調製した。

この p S D 4 8 6 H 6 H C M V I E 1 から、B a m H I による分解の後、部分的 B a l I I 分解を行うことにより 1.6kb のフラグメントとして H 6 をプロモータとする I E 1 遺伝子が得られ、B a m H I 分解 p S D 2 2 - H に連結してプラスミド p S D 2 2 - H C M V I E 1 を調製した。プラスミド p S D 2 2 - H C M V I E 1 における C M V I E 1 の D N A 配列と追加のフランキング D N A 配列は図 26 に示している (SEQ ID NO:51)

ワクシニアドナープラスミド p S D 5 5 4 への H C M V I E 1 遺伝子のクローニング
プラスミド p S D 4 8 6 H 6 H C M V I E 1 を鋳型とする P C R 法においてオリゴヌクレオチド

SPIE1 (SEQ ID NO:136) (5'-

CGCGAATTCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGT-3')および SPIE2
(SEQ ID NO:137) (5'-GCCTCTAGAGTTAACCTCCTTCCTCAACAT-3')

を用いて、181bpフラグメントを調製した。このフラグメントをEcoRIおよびXbaIで分解し、EcoRI/XbaI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたIBI24にクローニングして、プラスミドSPIE1 (H6プロモータの一部およびIE1遺伝子の最初の135bpを含有する)を調製した。プラスミドpSD486H6HCMVIE1を鋳型とするPCR法にオリゴヌクレオチド

SPIE3 (SEQ ID NO:138) (5'-

CGGTCTAGAGGTTATCAGTGTAATGAAGC-3')および SPIE4 (SEQ ID NO:139)
(5'-CCGAAGCTTCTCGAGATAAAAATTACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT-3')

を用いて506bpのフラグメントを調製した。このフラグメントをXbaIおよびHindIIで分解し、XbaI/HindIII分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたIBI24にクローニングしてプラスミドSPIE2 (IE1遺伝子の3'末端、ワクシニア初期転写終結シグナルおよびXhoI部位を含有する)を調製した。SPIE1を、IE1遺伝子の挿入フラグメントの3'末端においてHindIIで分解し、IBI24ポリリンカー内でHindIIIで分解し、アルカリホスファターゼ処理し、さらに、pSD486H6HCMVIE1由来の903bpHindII-BglIIフラグメントおよびSPIE2由来の464bpBglII-HindIIIフラグメントに連結してプラスミドSPIE3 (H6プロモータの一部に結合した全IE1遺伝子を含有する)を調製した。

プラスミドpSD553をNruIで切断し、(翻訳開始コドンに対して-26に位置するNruI部位の上流に合成H6プロモータ(Perkus他、1989)を含有する)SmaI/NruIフラグメントに連結した。得られたプラスミドpMP553H5をNruIおよびBamHIで分解し、アニーリングされたオリゴヌクレオチド

MPSYN347 (SEQ ID NO:140)

(5'-CGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATCTGCAGCCCGGGGGGG- 3') および

MPSYN348 (SEQ ID NO:141) (5'-

GATCCCCCGGGCTGCAGATTACGATACAACTTAACGGATATCG-3')

に連結した。得られたプラスミドは、開始コドンに対して-1位のヌクレオチドを通る全H6プロモータ領域、それに後続するポリリンカー領域を含有する。このpSD554をNruIおよびXhoIで分解し、SPIE3由来の1.5kbのNruI/XhoIフラグメントに連結してプラスミドCOPAKH6IEを調製した。プラスミドCOPAKH6IEにおけるCMV IE1のDNA配列およびフランキングDNA配列は図27Aおよび図27Bに示す(SEQ ID NO:52)。

実施例20ー全HCMVIE1遺伝子を含有する組換えボックスウイルスの構築

WR L変異体を感染させたVero細胞にプラスミドpSD22-HCMVIE1をトランスフェクションして組換え体vP893を調製した。また、NYVAC感染Vero細胞にプラスミドCOPAKH6IEをトランスフェクションして組換え体vP1161を調製した。

実施例21ーボックスウイルス組換え体による全IE1遺伝子の発現

HCMVIE1に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫沈降試験により、vP893およびvP1161による72kDaのIE1タンパク質(BlantonおよびTevethia、1981; CameronおよびPreston、1981)の発現が確認された。免疫蛍光試験(Taylor他、1990)の記載に従って実施)によれば、該IE1遺伝子産生物が核に局在化していることが示された。

10

20

30

40

50

実施例22－ワクシニアドナープラスミド pSD554 への HCMV IE1 遺伝子 (292～319位 アミノ酸を欠失) のクローニング

292～319位 アミノ酸を欠失した CMV IE1 の DNA 配列は図28に示す (SEQ ID NO:53)。この欠失は以下のように行った。SpeI でプラスミド SPIE3 を分解し、4239bp のフラグメントを単離した (これは、292～319位の アミノ酸をコードする 868～958位のヌクレオチドを欠失する)。該フラグメントを自己連結させてプラスミド SPIE4 とした。この SPIE4 由来の 1.4kb の NruI / XhoI フラグメントを NruI / XhoI 分解された pSD554 に連結してプラスミド COPAKH6 IEN⁺ を調製した。プラスミド COPAKH6 IEN⁺ において 292～319位 アミノ酸を欠失する CMV IE1 の DNA 配列とフランキング DNA 配列は図29A および図29B に示している (SEQ ID NO:54)。
実施例23－292～319位の アミノ酸が欠失した HCMV IE1 遺伝子を含有する組換えボックスウイルスの構築

NYVAC 感染 Vero 細胞にプラスミド COPAKH6 IEN⁺ をトランスフェクションして組換え体 vP1160 を調製した。

実施例24－292～319位の アミノ酸が欠失した HCMV IE1 遺伝子の発現

免疫沈降分析により、vP1160 が感染した細胞での 69kDa タンパク質の発現は 292～319位の アミノ酸を欠失したものであることが確認された。免疫蛍光試験により、この遺伝子の産生物は核に局在化していることが示された。

実施例25－ボックスウイルスへの HCMV IE1 のエクソン4セグメントのクローニング
 NYVAC ドナープラスミド SPI4LH6 への HCMV IE1 のエクソン4セグメントのクローニング HCMV IE1 のエクソン4セグメントの DNA 配列を図30に示す (SEQ ID NO:55)。該遺伝子セグメントは以下のようにして得た。すなわち、プラスミド pSD486H6HCMV IE1 に対する PCR 法においてオリゴヌクレオチド

SPIE5 (SEQ ID NO:142) (5'-

CGCGAATTCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAAACAGATTAAGGTTTCGAGT-3') および **SPIE6 (SEQ ID NO:143) (5'-GCCTCTAGATGCCGCCATGGCCTGACT-3')**

を用いて 0.5kb のフラグメントで分解し、EcoRI / XbaI 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された IBI24 にクローニングして、プラスミド SPIE5 を調製した。プラスミド SPIE3 を EcoRI および NcoI で分解して 3.6kb のフラグメントを精製し、SPIE5 由来の 0.47kb EcoRI - NcoI フラグメントに連結してプラスミド SPIE6 (これは、H6 プロモータの一部に結合した IE1 のエクソン4セグメントを含有する) を調製した。

鋳型として PRW823 (非関連遺伝子に結合した H6 プロモータを含有するプラスミド) を用い、さらに、オリゴヌクレオチド

CP30 (SEQ ID

NO:144) (5'-TCGGGATCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCG-3') および

CP31 (SEQ ID NO:145) (5'-

TAGCTCGAGGGTACCTACGATACAAACCTTAACGGATATCG-3')

を用いて初期／後期 H6 ワクシニアウイルスプロモータ (Guo 他、1989; Perkusu 他、1989) を得た。PCR 生成物を BamHI および XhoI で分解 (制限部位は、それぞれ、CP30 および CP31 の 5' 末端にある) し、BamHI / XhoI 分解された C5LSP に連結してプラスミド VQH6C5LSP を調製した。このプラスミドを鋳型として用い、オリゴヌクレオチド CP31 および

RUB1 (SEQ ID NO:146) (5'-

TCGGGATCCTTCTTTATTCTATACTTA-3')

10

20

30

40

50

を用いるPCR法を実施した。得られたPCR生成物をBamHIおよびXhoIで分解（制限部位は、それぞれ、RUB1およびCP31の5'末端にある）し、BamHI/XhoI分解されたpSD550に連結してプラスミドSPI4LH6を調製した。SPIE6から単離した1.3kbのNruI/XhoIフラグメントを、NruI/XhoI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたSPI4LH6にクローニングして、プラスミドI4LH6IE-Ex4（この中では、H6をプロモータとするIE1のエクソン4遺伝子は、置換されたI4L遺伝子と同じ方向にある）を調製した。プラスミドI4LH6IE-Ex4におけるHCMVIE1のエクソン4セグメントのDNA配列とフランキングDNA配列は図21に示している（SEQ ID NO:54）。

ALVACドナープラスミドNVQH6C5LSPへのHCMVIE1のエクソン4フラグメントのクローニング プラスミドVQH6C5LSPをEcoRIで分解し、アルカリホスファターゼ処理し、キナーゼ処理され且つアニーリングされたオリゴヌクレオチドCP29に連結し、さらに、NotIで分解した。直鎖状にした該プラスミドを精製し、自己連結させてプラスミドNVQH6C5LSPを調製した。SPIE6由来の1.3kbNruI/XhoIフラグメントをNruI/XhoI分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたNVQH6C5LSPにクローニングしてプラスミドNVQH6IE-Ex4（このプラスミド中では、H6をプロモータとするIE1のエクソン4遺伝子は、置換されたC5遺伝子と同じ方向にある）を調製した。プラスミドNVQH6IE-Ex4におけるHCMVIE1のエクソン4セグメントのDNA配列とフランキングDNA配列は図32Aおよび図32Bに示している（SEQ ID NO:57）。

実施例26—IE1エクソン4セグメントを含有する組換えボックスウイルスの構築

NYVAC感染CEF細胞に、プラスミドI4LH6IE-Ex4をトランスフェクションして組換え体vP1186を調製した。また、ALVAC感染CEF細胞に、プラスミドNVQH6IE-Ex4をトランスフェクションして組換え体vCP244を調製した。

実施例27—ボックスウイルス組換え体によるHCMVIE1のエクソン4セグメントの発現

免疫蛍光分析によれば、組換え体vP1186およびvCP244によって発現されたIE-エクソン4タンパク質は細胞質に局在化していることが示された。IE-エクソン4に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降実験により、vCP244が感染した細胞内でエクソン4セグメントの大きさに正確に一致する60kDaのタンパク質の発現が確認された。バクテリアのエクソン4融合タンパク質に対するポリクローナルウサギ血清を用いる免疫沈降反応により、vP1186およびvCP244が感染した細胞内で60kDaのタンパク質が発現されていることが示された。

実施例28—ボックスウイルスベクターへの（2～32位のアミノ酸を欠失する）HCMVIE1遺伝子のクローニング

NYVACドナープラスミドSPI4LH6への（2～32位アミノ酸を欠失する）HCMVIE1遺伝子のクローニング 2～32位のアミノ酸を欠失するHCMVIE1のDNA配列は図33に示す（SEQ ID NO:58）。このセグメントは以下のように調製した。オリゴヌクレオチド

SPIE9 (SEQ ID NO:147) (5'-

AATTCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGACGACGTTCTGCAGACTATGTTG

A GGAAGGAGGTT-3')および SPIE10 (SEQ ID NO:148) (5'-

AACCTCCTTCCTCAACATAGTCTGCAGGAACGTCGTCATTACGATACAACTTAACGGAT

ATCGC GAG-3')

をキナーゼ処理し、アニーリングし、さらに、SPIE3由来のアルカリホスファターゼ処理された4.2kbフラグメントに連結してプラスミドSPIE8を調製した。このSPIE0（H6プロモータの一部および2～32位アミノ酸を欠失するIE1を含有する）由来

10

20

30

40

50

の1.4kbの N r u I / X h o I フラグメントを、N r u I / X h o I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された S P I 4 L H 6 に連結して、プラスミド I 4 L H 6 I E d 3 2 を調製した。プラスミド I 4 L H 6 I E d 3 2 における 2 ～ 32 位アミノ酸欠失 H C M V I E 1 の DNA 配列とフランキング DNA 配列は図 34 に示している (SEQ ID NO:59)。
A L V A C ドナープラスミド N V Q H 6 C 5 L S P への (2 ～ 32 位のアミノ酸が欠失した) H C M V I E 1 遺伝子のクローニング S P I E 8 由来の 1.4kb の N r u I / X h o I フラグメントを、N r u I / X h o I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理された N V Q H 6 C 5 L S P にクローニングして、プラスミド N V Q H 6 I E d 3 2 を調製した。プラスミド N V Q H 6 I E d 3 2 における 2 ～ 32 位アミノ酸欠失 H C M V I E 1 の DNA 配列とフランキング DNA 配列は図 35 A および図 35 B に示している (SEQ ID NO:60)。
 実施例 29— 2 ～ 32 位のアミノ酸が欠失された I E 1 遺伝子を含有するボックスウイルス組換え体の構築

10

N Y V A C 感染 C E F 細胞に、プラスミド I 4 L H 6 I E d 3 2 をトランスフェクションして組換え体 v P 1 2 0 1 を調製した。また、A L V A C 感染 C E F 細胞に N V Q H 6 I E d 3 2 をトランスフェクションして組換え体 v C P 2 5 6 を調製した。

実施例 30— ボックスウイルス組換え体による 2 ～ 32 位アミノ酸欠失 I E 1 の発現

免疫蛍光実験によれば、組換え体 v P 1 2 0 1 および v C P 2 5 6 による 2 ～ 32 位アミノ酸欠失 I E 1 タンパク質は核および細胞質の両方に存在していることが示された。バクテリアのエクソン 4 に対するポリクローナルウサギ血清を用いる免疫沈降法は、v P 1 2 0 1 が感染した細胞に、予測サイズに一致する 6 8 k D a のタンパク質が発現していることを示した。

20

実施例 31— ボックスウイルスベクターへの H C M V p p 6 5 遺伝子のクローニング

N Y V A C ドナープラスミドへの H C M V p p 6 5 遺伝子のクローニング

p S D 4 5 6 は、H A 遺伝子 (A 5 6 R、Goebel 他、1990a,b) およびその周りの領域を含有するコペンハーゲン (Copenhagen) ワクシニア DNA のサブクローンである。この p S D 4 5 6 を鋳型とし P C R 法により、A 5 6 R O R F をはさむ (フランキングする) 左側および右側のワクシニアアームを合成した。左側アームの合成にはオリゴヌクレオチド

MPSYN279 (SEQ ID NO:149) (5'-

CCCCCGAATTCGTCGACGATTGTTTCATGATGGCAAGAT-3') および MPSYN280

30

(SEQ ID NO:150) (5'-

CCCGGGGGATCCCTCGAGGGTACCAAGCTTAATTAATTAATATTAGTATAAAAAGTGATTTATTTTT-3')

を用いた。右側アームは、オリゴヌクレオチド

MPSYN281 (SEQ ID NO:151) (5'-

AAGCTTGGTACCCTCGAGGGATCCCCGGGTAGCTAGCTAATTTTTCTTTTACGTATTAT

A TATGTAATAAACGTTTC-3') および MSYN312 (SEQ ID NO:152) (5'-

40

TTTTTTCTGCAGGTAAGTATTTTAAACTTCTAACACC-3')

を用いて合成した。これらの左側アームおよび右側アームの精製 P C R フラグメントを更なる P C R 反応によって結合した。得られた生成物を E c o R I / H i n d III で分解した。得られた 0.9kb のフラグメントを E c o R I / H i n d III 分解された p U C 8 にクローニングしてプラスミド p S D 5 4 4 を得た。

この p S D 5 4 4 を、ポリリンカー内で X h o I 分解し、クレノウ断片を用いてフィリングを行い、さらにアルカリホスファターゼ処理した。プラスミド S P 1 2 6 (S P 1 3 1 と等価) を H i n d III で分解し、クレノウ処理し、さらに S m a I で分解して H 6 プロモータを単離した。この H 6 プロモータフラグメントを p S D 5 4 4 に連結して S P H A

50

ーH6を調製した。

鋳型としてHCMVゲノムDNA (Towne株)を用い、さらにオリゴヌクレオチド
pp651 (SEQ ID NO:153) (5'-

GATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGCATCCGTACTGGGTCCCATTTCG
GG-3')および pp651R (SEQ ID NO:154) (5'-
GCATAGGTACCGGATCCATAAAAATCAACCTCGGTGCTTTTTGGGCG-3')

を用いて、HCMV pp65遺伝子をPCR増幅した。CMV pp65のDNA配列は
図36に示す (SEQ ID NO:61)。1.6kbの生成物を NruI および BamHI で分解 (制限
部位は、それぞれ、オリゴヌクレオチド pp651 および pp651R の5'末端に存在
する) し、NruI / BamHI 分解された SPHA-H6 にクローニングしてプラスミ
ドCMV65.1を調製した。このプラスミドはH6プロモータに結合したpp65遺伝子を
含有していたが、該pp65遺伝子の最初の30bpを欠失していた。

pp65の最初の30bpを含有するプラスミドを得るために、オリゴヌクレオチド
RNApp65I (SEQ ID NO:155) (5'-

TAGTTCGGATCCCCGCTCAGTCGCCTACA-3')および pp65R4 (SEQ ID NO:156)
(5'-ATCAAGGGATCCATCGAAAAAGAAGAGCG-3')

を用いてゲノムDNAのPCR反応を行った。得られた1kbフラグメントを BamHI
で分解 (BamHI 部位は、両オリゴヌクレオチドの5'末端に存在する) し、BamHI
I 分解された IBI24 にクローニングしてプラスミドpp65.7を調製した。このプラスミ
ドpp65.7を用いてオリゴヌクレオチド
pp651B (SEQ ID NO:157) (5'-

GATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGAGTCGCGCGGTGCGCGTTGTCCC
G-3')および pp65BstXI (SEQ ID NO:158) (5'-ACCTGCATCTTGGTTGC-
3')

によるPCR法を実施して0.5kbのフラグメントを得た。このフラグメントを NruI お
よび BstXI で分解 (制限部位は、それぞれ、オリゴヌクレオチド pp651B および pp65
BstXI の5'末端にある) し、CMV65.1の4.8kbの NruI / BstXI フラグメ
ントに連結してプラスミドpCMV65.2を調製した。このプラスミドは、H6プロモータ
に正確に連結され置換されたHA遺伝子と同じ方向に配向されている全pp65遺伝子を含有
する。プラスミドpCMV65.2におけるCMVpp65のDNA配列とフランキングDNA配
列は図37に示す (SEQ ID NO:62)。

ALVAC ドナープラスミド pMPC616E6VQ へのHCMV pp65遺伝子のクロー
ニング 図38Aおよび図38B (SEQ ID NO:63) は、カナリアボックスDNAの3.7kbフラ
グメントの配列である。該配列を分析することにより、C6Lと指称されるリーディング
フレームが377位で開始し2254位で終結していることが示された。C6の上流の370bp、S
maI、PstI、XhoI および EcoRI 部位を含有するポリリンカー、ならびに下
流配列の1156bpを含有するC6挿入ベクターを以下のようにして誘導した。0.4bpの上流
配列の調製は、精製したゲノムカナリアボックスDNA由来のコスミドクロンのPCR
増幅法によりオリゴヌクレオチド

C6A1SG (SEQ ID NO:159)

(5'-ATCATCGAGCTCGCGGCCGCCTATCAAAAGTCTTAATGAGTT-3')

および C6B1SG (SEQ ID NO:160) (5'-

GAATTCCTCGAGCTGCAGCCCGGGTTTTATAGCTAATTAGTCATTTTTTCGTAAGTAAG
TATTTTATTAA-3')

10

20

30

40

50

を用いて行った。1.2kbの下流アームは上記と同じ鋳型を用いるPCR増幅法によりオリゴヌクレオチド

C6C1SG (SEQ ID NO:161) (5'-

CCCCGGGCTGCAGCTCGAGGAATTCTTTTATTGATTAAGTCAAATGAGTATATATAA

T TGAAAAAGTAA-3')および**C6D1SG (SEQ ID NO:162) (5'-**

GATGATGGTACCTTCATAAATACAAGTTTGATTAACTTAAGTTG-3')

を使用して調製した。これらのフラグメントを融合するため、ゲル精製した0.4kbフラグメントおよび1.2kbフラグメントを鋳型としてプライマーC6A1SG (SEQ ID NO:159) およびC6D1SG (SEQ ID NO:162) を用いる第3のPCR法を実施した。得られる1.6 kbのフラグメントをアガロースゲルから分離し、SacIおよびKpnIで分解し、同じ酵素で分解されたpBSに連結して、C6挿入プラスミドpC6Lを調製した。

非関連遺伝子に結合したH6プロモータを含有するHpaI - XhoIフラグメントを、SmaI - XhoI分解されたpC6LにクローニングすることによりプラスミドpMPC616E6VQを誘導した。このpMPC616E6VQをNruIおよびBamHIで分解し、4kbのベクターフラグメント (NruI - BamHI) と0.6kbのC6フランキングアームフラグメント (BamHI - BamHI) を単離した。これらの2種類のフラグメントを、pCMV65.2 (p65遺伝子に結合したH6プロモータの一部分を含有する) 由来の1.7kbNruI - BamHIフラグメントに連結して、プラスミドCMV65C6.1、すなわち、C6フランキングアーム、H6プロモータおよびpp65遺伝子を含有するが0.6kbのC6フランキングアームを欠失したプラスミドを調製した。CMV65C6.1をBamHIで分解し、アルカリホスファターゼ処理し、さらに、0.6kbのC6フランキングアームに連結して、プラスミドCMV65C6.2、すなわち、H6 - pp65インサートの両側にC6フランキングアームが存在しているプラスミドを調製した。プラスミドCMV65C6.2におけるCMVpp65のDNA配列とフランキングDNA配列は、図39Aおよび39Bに示す (SEQ ID NO:64)。

ワクシニアドナープラスミドpSD157K1LINSへのHCMVpp65遺伝子のクローニング プラスミドpCMV65.2をKpnI分解し、ヤエナリヌクレアーゼ処理し、さらにBamHIで分解して、H6 - pp65を含有する1.7kbフラグメントを調製した。PSD157K1LINSをBamHIおよびSmaIで分解し、上記1.7kbフラグメントに連結して、プラスミドCMV65.WRを調製した。プラスミドCMV65.WRにおけるCMVpp65のDNA配列とフランキングDNA配列は図40に示す (SEQ ID NO:65)。

実施例32 - HCMVpp65を含有する組換えボックスウイルスの構築

プラスミドpCM65.2を、NYVAC感染Vero細胞にトランスフェクションして組換え体vP1184 (HCMVpp65を含有する) を調製し、vP1001感染Vero細胞にトランスフェクションして組換え体vP1196 (HCMVgBおよびpp65を含有する) を調製し、また、vP1183感染Vero細胞にトランスフェクションして組換え体vP1210 (HCMVgB、gHおよびpp65を含有する) を調製した。

ALVAC感染CEF細胞にプラスミドCMV65C6.2をトランスフェクションして組換え体vCP260 (HCMVpp65を含有する) を調製した。

vP1170感染Vero細胞にプラスミドCMV65.WRをトランスフェクションして組換え体vP1214 (WR - pp65) を調製した。

実施例33 - ボックスウイルス組換え体によるHCMVpp65の発現

HCMVpp65に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降実験の結果、組換え体vP1184、vP1214、vCP260、vP1196およびvP1210による65kDaのタンパク質 (Pande他、1991) の発現が確認された。さらに、gB特異的なモルモットポリクローナル血清を用いる免疫沈降実験の結果、組換え体vP1196およびvP1210によりgBが正しく発現されていることが明らかにされ、また、gH特異的モノクローナル抗体を用いる免疫沈降実験によれば組換え体vP1210によりgHが正しく発現されていることが明らかにされた。

10

20

30

40

50

実施例34—ボックスウイルスベクターへのH C M V pp150遺伝子のクローニング N Y
V A Cドナープラスミド p S D 5 4 1 へのpp150遺伝子のクローニング
 C M V pp150のD N A 配列を図41に示す (SEQ ID NO:66)。オリゴヌクレオチド
pp150.1B (SEQ ID NO:163)

(5'-TTCGGATCCGGTCTCTGGAGAAAAGCC-3') および **pp150R6 (SEQ ID NO:164) (5'-GCTTCCAAGCTTTCCTGAAGGGATTGTAAGCC-3')**

を用いてTowneゲノムD N AのP C Rを行って、pp150の5'末端から2kbフラグメントを調製した。このフラグメントをB a m H IおよびH i n d IIIで分解し、B a m H I / H i n d III分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B I 2 4にクローニングしてプラスミドpp150.5を調製した。オリゴヌクレオチド
pp150.9 (SEQ ID NO:165) (5'-

TTCGGATCCGGCTTTCAGTCTCGTCTCC-3') および **pp150END2 (SEQ ID NO:166) (5'-TTCGGATCCATGCAATTGCCCGCGGACAAC-3')**

を用いてTowne D N AのP C Rを実施して、該遺伝子の3'末端を含む1.8kbフラグメントを調製した。このフラグメントをB a m H Iで分解して、B a m H I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたP U C 8にクローニングしてpp150.3を得た。
 オリゴヌクレオチド

SP150-3 (SEQ ID NO:167) (5'-

**TTCGAATTCGCTAGCTTTATTTGGGAAGAAATATGATAATATTTTGGGATTTCAAAATTGAA
 A ATATATAATTACAATATAAAATGAGTTTGCAGTTTATC-3')** および **SP150-4
 (SEQ ID NO:168) (5'-TTCTCTAGATGAGCTCGTTGAACAGCAC-3')**

を用いてプラスミドpp150.5を鋳型とするP C Rを行い、259bpのフラグメントを調製した。このフラグメントをE c o R IおよびX b a Iで分解して、E c o R I / X b a I 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B I 2 4にクローニングしてプラスミド150.5MPを調製した。このプラスミドはN h e I 部位、65bpのエントモボックスウイルス4 2 Kプロモータ、およびpp150遺伝子の5'末端から1~170位の塩基を含有する。オリゴヌクレオチドS P 1 5 0 - 3の配列において下線を施した塩基（該プロモータの-53位）はこのクローンにおいては欠失している。
 オリゴヌクレオチド

SP150-1 (SEQ ID NO:169) (5'-

CCGAAGCTTGCTAGCAATAAAAACTATTCCTCCGTGTTCTTAAT-3') および **SP150-2
 (SEQ ID NO:170) (5'-GCCTCTAGATACGTAAAGCTAAGTTATC-3')**

を用いてプラスミドpp150.3を鋳型とするP C Rを行い、907bpのフラグメントを調製した。このフラグメントをX b a I およびH i n d IIIで分解し、X b a I / H i n d III 分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B I 2 4にクローニングしてプラスミド150.3MPを得た。このプラスミドは、pp150の2273~3141位のヌクレオチド、それに後続するワクシニア初期転写終結シグナル (T₅ A T T) (YuenおよびMoss、1987) およびN h e I 部位を含有する。このクローンにおけるpp150のヌクレオチド2748位 (図41; SEQ ID NO:48) は、Aでありpp150.3におけるようにCでないが、この変化はサイレントである。プラスミドpp150.3をS n a B I およびH i n d IIIで分解し、3451bpのフラグメントを単離した。プラスミド150.3MPをS n a B I およびH i n d IIIで分解し、873bpのフラグメントを単離した。これらの2種類のフラグメントを連結することによりプラスミド150.3MC、すなわち、pp150の1473~3141位ヌクレオチド、それに後続するT₅ A T TおよびN h e I 部位を含有するプラスミドを得た。

10

20

30

40

50

プラスミド150.5MPを S a c I および H i n d III で分解し、3056bpのフラグメントを単離した。プラスミド pp150.5 を S a c I および H i n d III で分解し、1816bpのフラグメントを単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド150.5MC (N h e I 部位、65bpの42Kプロモータおよびpp150の1~1981位ヌクレオチドを含有する)を得た。プラスミド150.5MCを H p a I および H i n d III で分解して4634bpのフラグメントを単離した。プラスミド150.3MCを H p a I および H i n d III で分解し、1412pbのフラグメントを単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド150.1を得たが、このプラスミドは N h e I 部位、65bpの42Kプロモータ、pp150の1~3141位ヌクレオチドおよび N h e I 部位を含有する。

プラスミド p S D 5411 は、A 2 5 L および A 2 6 L の O R F (Goebel他、1990a,b) を包
含するワクシニアウイルス配列が欠失した挿入プラスミドである。欠失接合部は、X h o
I、S m a I および B g l II 制限部位を含有するポリリンカー領域から成り、その両側が
停止コドンおよび初期ワクシニア転写終結シグナル (Yuen および Moss、1987) ではさま
れている。p S D 5 4 1 の構造は、クローニングしたワクシニア S a l I E プラスミドを
鋳型とするポリメラーゼ連鎖反応により行った。プライマーとして合成オリゴヌクレオチ
ド

MPSYN267 (SEQ ID

NO:94) (5'-GGGCTCAAGCTTGCGGCCGCTCATTAGACAAGCGAATGAGGGAC-3')

および MPSYN268 (SEQ ID NO:95) (5'-

**AGATCTCCCGGGCTCGAGTAATTAATTTTATTACACCAGAAAAGACGGCTTGAGA
T C-3')**

を用いて左側のワクシニアアームを調製し、また、合成オリゴヌクレオチド

MPSYN269 (SEQ ID NO:96) (5'-

TAATTACTCGAGCCCGGGAGATCTAATTTAATTTAATTTATATAACTCATTTTTTGAATA

T ACT-3') および MPSYN270 (SEQ ID NO:97) (5'-

TATCTCGAATTCCTCGGGCTTTAAATGGACGGAACCTTTTTCCCC-3')

を用いて右側のワクシニアアームを調製した。該左側アームおよび右側アームから成る P
C R 生成物を結合させて、P C R 増幅に供した。その P C R 生成物を E c o R I および H
i n d III で分解して、アガロースゲル上で電気泳動させた。0.8kbのフラグメントを単離
し、E c o R I / H i n d III で切断された p U C 8 に連結して、プラスミド p S D 5 4
1 を得た。

p S D 5 4 1 をそのポリリンカー内で S m a I で分解し、アルカリホスファターゼ処理し
た。プラスミド150.1を N h e I で分解し、クレノウ断片で処理して3224bpのフラグメン
ト (42K-pp150を含有) を単離した。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミ
ド150.7を得た。プラスミド150.7における C M V pp150の D N A 配列とフランキング D N
A 配列は図42A および図42B に示している (SEQ ID NO:68)。

A L V A C ドナープラスミドへの pp150 遺伝子のクローニング プラスミド PMM117 は、
ポリリンカー領域が変性された p C 6 L の誘導体である。PMM117 をそのポリリンカー
内で E c o R I で分解し、クレノウでフィリングを行い、さらに、アルカリホスファター
ゼで処理した。プラスミド150.1を N h e I で分解し、クレノウ処理して、3224bpのフラ
グメント (42K-pp150を含有) を単離した。このようにして得られた2種類のフラグメン
トを連結してプラスミド150.69を調製した。プラスミド150.6における C M V pp150の D N
A 配列とフランキング D N A 配列を図43A および図43B に示す (SEQ ID NO:68)。

ワクシニアドナープラスミド p S D 1 5 7 K 1 L I N S への pp150 遺伝子のクローニング

プラスミド p S D 1 5 7 K 1 L I N S をそのポリリンカー内で S m a I で分解し、アル
カリホスファターゼ処理した。プラスミド150.1を N h e I で分解し、クレノウで処理し

10

20

30

40

50

て、3224bpのフラグメント（42K-pp150を含有する）を単離した。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミド150.4を調製した。プラスミド150.4におけるCMVpp150のDNA配列とフランキングDNA配列を図44Aおよび図44Bに示す（SEQ ID NO:69）。

実施例35—HCMVpp150を含有する組換えボックスウイルスの構築

vP1170感染CEF細胞にプラスミド150.4をトランスフェクションして組換え体vP1238（WR-pp150）を調製した。

NYVAC感染CEF細胞にプラスミド150.7をトランスフェクションして組換え体vP1247（NYVAC-pp150）を調製した。

ALVAC感染CEF細胞にプラスミド150.6をトランスフェクションして組換え体vCP284（ALVAC-pp150）を調製した。

10

実施例36—ボックスウイルス組換え体によるHCMVpp150の発現

HCMVpp150に特異的なモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロットにより（HallowおよびLane、1988）、vP1238感染細胞内に150kDaのタンパク質が発現され、HCMV感染細胞内に存在するタンパク質と共に移動したことが示された。pp150に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降により、vP1247およびvCP284感染細胞内に150kDaのタンパク質の発現が認められた。

実施例37—HCMVgHおよびIE1エクソン4遺伝子を含有するNYVACドナープラスミドの構築

プラスミドI4LH6IE-Ex4をBamHIで直鎖状にし、クレノウでフィリングし、さらにアルカリホスファターゼで処理して4.9kbのフラグメントを得た。プラスミドgH6-3をXhoIで分解し、クレノウでフィリングして、2.3kbのフラグメント（42K-gHを含有）を単離した。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミドI4L42KgHH6IE-Ex4を調製した。プラスミドI4L42KgHH6IE-Ex4におけるCMVgHのDNA配列と負荷されているフランキング配列は図45Aおよび図45Bに示す（SEQ ID NO:70）。

20

実施例38—HCMVgB+gH+pp65+IE-エクソン4、HCMVgB+gH+pp65+pp150、またはHCMVgB+gH+pp65+IE-エクソン4およびpp150を含有するNYVAC組換え体の構築

vP1196感染Vero細胞にプラスミドI4L42KgHH6IE-Ex4をトランスフェクションして、組換え体vP1216（HCMVgB、gH、pp65、IE-エクソン4を含有）を調製した。vP1216感染CEF細胞にプラスミド150.7をトランスフェクションして組換え体vP1251（HCMVgB、gH、IE-エクソン4、pp65、pp150を含有）を調製した。vP1210感染Vero細胞にプラスミド150.7をトランスフェクションして組換え体vP1262（HCMVgB、gH、pp65、pp150を含有）を調製した。

30

実施例39—vP1216、vP1251、vP1262におけるHCMV遺伝子の発現

gB、gH、pp65およびIE-エクソン4に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降により、組換え体vP1216によるそれら4種類の遺伝子の正確な発現が確認された。gB、gH、pp65およびIE-エクソン4に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降により、組換え体vP1251によってそれら4種類の遺伝子が正確に発現されていることが確認された。gB、gHおよびpp65に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降により、組換え体vP1262によるそれら3種類の遺伝子の正確な発現が確認された。pp150に特異的なモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロットにより、組換え体vP1251およびvP1262による該遺伝子の正確な発現が確認された。

40

実施例40—HCMVのpp65およびpp150遺伝子を含有するドナープラスミドの構築 プラスミドCMV65C6.2をEcoRIで直鎖状化し、クレノウでフィリングを行い、さらにアルカリホスファターゼで処理して6.3kbのフラグメントを調製した。プラスミド150.1をNheIで分解し、クレノウでフィリングを行って、3.2kbのフラグメント（42K-pp150を含有）を調製した。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミド150.8を得た。プラスミド150.8におけるCMVpp65とpp150のDNA配列と付加されているフランキング配列は図46A～46Cに示す（SEQ ID NO:71）。

50

実施例41－H C M V g B、g H、pp65およびpp150を含有するA L V A C組換え体の構築
v P C 233感染C E F細胞にプラスミド150.8をトランスフェクションして、A L V A C－
g B、g H、pp150組換え体（v C P 280）を調製した。

実施例42－v C P 280におけるH C M V遺伝子の発現

g B、g Hおよびpp65に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降により、組換え体
v C P 280によるそれら3種類の遺伝子の正確な発現が確認された。

実施例43－g Bおよびg Lを含有するN Y V A Cドナープラスミドを得るためのボックス
ウイルスへのH C M V gのクローニング

Towne DNAを鋳型とするP C Rにおいてオリゴヌクレオチド

UL115A (SEQ ID NO:171) (5'-

10

**GCCTCTAGAATGTGCCGCCGCCCGGATTGC-3')および UL115B (SEQ ID
NO:172) (5'-CGCAAGCTTAGCGAGCATCCACTGCTTGAGGGC-3')**

を用いて853bpのフラグメントを調製した。このフラグメントをX b a IおよびH i n d I
IIで分解し、X b a I / H i n d III分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B
I 24にクローニングしてプラスミドU L 115.1を調製した。C M V g Lの配列は図47に
示す (SEQ ID NO:72)。

プラスミドU L 115.1を鋳型とするP C Rにおいてオリゴヌクレオチド

UL115M (SEQ ID NO:173) (5'-

TCCAAGCTTAGATCTATAAAAATTAGCGAGCATCCACTGCTTGAGGGCCATAGC-3')

20

および **UL115N (SEQ ID NO:174) (5'-GCCTCTAGATGCTGACGCTGTTGAGCTCGGAC-3')**

を用いて498bpのフラグメントを調製した。このフラグメントH i n d IIIおよびX b a I
で分解し、H i n d III / X b a I分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B
I 24にクローニングしてプラスミド115.2を調製した。

プラスミドU L 115.1を鋳型とするP C Rにおいてオリゴヌクレオチド

UL115G2 (SEQ ID NO:175) (5'-

**CGCGAATTCTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGTGCCGCCGCCCGGATTGC-
3')および UL115H2 (SEQ ID NO:176) (5'-**

30

GCCTCTAGATTCCAGCGCGCGCTGTGTCCGAGC-3')

を用いて450bpのフラグメントを調製した。このフラグメントをE c o R IおよびX b a I
で分解し、E c o R I / X b a I分解され且つアルカリホスファターゼ処理されたI B
I 24にクローニングしてプラスミドU L 115.3を調製した。

プラスミド115.3をH i n d IIIおよびS a c Iで分解し、3226bpのフラグメントを単離し
た。プラスミドU L 115.2をH i n d IIIおよびS a c Iで分解し、469bpのフラグメント
を単離した。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミドU L 115.4を得た。

プラスミド115.4をN r u IおよびB g l IIで分解し、865bpのフラグメントを得た。プ
ラスミドI 4 L H 6をN r u IおよびB g l IIで分解し、3683bpのフラグメントを単離した
。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミドI 4 L H 6 g Lを得た。

40

I 4 L H 6 g L内のH 6プロモータの1塩基欠失を矯正するために、該プラスミドをE c
o R Vで分解し、アルカリホスファターゼで処理して、3805bpのフラグメントを単離した
。また、プラスミドI 4 L H 6をE c o R Iで分解して736bpのフラグメントを単離した
。これらの2種類のフラグメントを連結してプラスミドI 4 L H 6 C g Lを得た。

プラスミド5 4 2 C M V g BをB a m H Iを用いて直鎖状化し、アルカリホスファターゼ
で処理した。プラスミドI 4 L H 6 C g LをB a m H IおよびB g l IIで分解し、968bp
のフラグメント（H 6をプロモータとするg L遺伝子を含有する）を単離した。これら2
種類のフラグメントを連結してプラスミド5 4 2 C M V g B g Lを調製した。プラスミド
5 4 2 C M V g B g LにおけるC M V g LおよびC M V g BのDNA配列と付加されてい

50

るフランキンゲンDNA配列は図48Aおよび図48Bに示している (SEQ ID NO:73)。

実施例44—g B、g H、g L、pp65、pp150、I E 1—エクソン4、またはg B、g H、g L、pp65、pp150を含有するNYVAC組換え体の構築

v P 1 2 5 1 感染C E F細胞にプラスミド5 4 2 C M V g B g Lをトランスフェクションして、NYVAC g B、g H、g L、pp65、pp150、I E 1—エクソン4組換え体 (NYVAC—CMV 6 : v P 1302およびv P 1302B) を調製した。

v P 1262感染細胞にプラスミド5 4 2 C M V g B g LをトランスフェクションしてNYVAC組換え体v P 1312 (NYVAC—CMV 5) を調製した。

実施例45—HCMVタンパク質に対するヒト細胞傷害性Tリンパ球応答

免疫系の抗原特異性セグメントから成るリンパ球は、抗体 (Bリンパ球) を産生することにより、あるいは細胞傷害性Tリンパ球 (C D 8 + Tリンパ球) になることにより抗原と機能的に反応し得る。ヒト細胞傷害性Tリンパ球により認識されることが知られているHCMVタンパク質を発現するALVAC組換え体は、ヒトの細胞性免疫応答を再刺激することができ、その際、古典的なCTLsの特徴が発揮される。

CTL標的用に既にEBV—形質転換B細胞系 (L B C L) が樹立された13名について、スクリーニングを行いHCMVのg B、I E 1およびpp65に対するCTL応答を調べた。これらの血液提供ボランティアのうちHCMVの明確な臨床経歴を有するのは1名のみであったが、HCMV中和性抗体を含有する血清によれば7名がHCMV血清陽性であることが判明した。

ALVAC—I E 1 (v C P 2 5 6) によるHCMV I E 1 CTLsの刺激：各ボランティアドナーから静脈穿刺により全血液を採取してヘパリン添加したVacutainer管に入れた。残りの血液構成成分から単核細胞画分をLeucoprep勾配遠心により分離し、Stim培地 (5%のウシ胎児血清 (F B S)、2 mMのL—グルタミン、 10^{-4} Mの2—メルトカプトエタノール、100IU/mlのペニシリン、および100 μ g/mlのストレプトマイシンを含有するMEM) 中で遠心することにより数回洗い、トリパンブルーを用いて生存細胞を計数し、Stim培地内に 5×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した (キラー細胞)。該単核細胞の一部を、2% F B Sを含有するMEM中に 10^7 細胞/mlの濃度で再懸濁し、HCMVのI E 1を発現する組換えALVACを37°Cにおいて1時間にわたり感染多重度25で感染させた。インキュベーション後、充分量のStim培地を添加して該感染細胞を希釈して 5×10^5 細胞/mlとした (刺激細胞)。等体積のキラー細胞と刺激細胞とを、直立で25cm²の組織培養フラスコまたは24個のウェルから成る組織培養プレートのウェルに添加して、37°Cにおいて6日間、5% CO₂/95%空気下にインキュベートした。標的細胞の調製は、刺激細胞の感染の場合と同様に、HCMVのI E 1を発現する組換えWRワクシニアウイルス (v P 893) でL B C Lsを感染させることにより行った。但し、標的細胞は、20% F B Sを含有するR P M I 1640培地中 4×10^5 細胞/mlにおいて一晩インキュベートした。インキュベーション後、単核細胞および標的細胞をAssay培地 (10% F B S、2 mMのL—グルタミン、 5×10^{-5} Mの2—メルトカプトエタノールを含有するR P M I 1640培地) 中の遠心により洗浄した。標的細胞をNa₂⁵¹ C r O₄中で1時間インキュベートし、Assay培地中の遠心により洗浄し、Assay培地中で 10^5 細胞/mlの濃度に再懸濁して、使用に供するまで氷上に保持した。遠心後、単核細胞をAssay培地中で 2×10^6 細胞/mlに希釈した。10分の1 mlの単核細胞および0.1mlの⁵¹ C rをラベルした感染標的細胞を、96—ウェル丸底組織培養プレートのウェルに添加した。この体積と細胞密度により、エフェクター対標的比 (E : T) は20 : 1となった。該組織培養プレートを250gで2分間遠心し、次に、5% CO₂/95%空気中で37°Cにおいて4~5時間インキュベートした。インキュベーション後、各ウェルからSkatronフィルターガーゼを用いて0.1mlの上澄み液を集め、放出された放射能を計数した。細胞毒性 (パーセント) は以下のように計算した：

(実験による⁵¹ C r 放出—自発的⁵¹ C r 放出) / (最大⁵¹ C r 放出—自発的⁵¹ C r 放出) $\times 100$ 。

最大放出は標的細胞に5%のドデシル硫酸ナトリウムを添加することにより測定し、また、自発的放出はエフェクター細胞の不存在下に標的細胞をインキュベーションすることに

10

20

30

40

50

より測定した。いずれの実験においても、標的細胞からの⁵¹Crの自発的放出が最大の⁵¹Cr放出の20%を超えることはなかった。

単一のHCMVタンパク質を発現するALVAC組換え体によるインビトロ刺激後、7名の血清陽性ボランティアドナーのうちの4名由来の単核細胞はHCMVのIE1を発現する同源性（自己由来）標的を溶解し（図49）、また、7名の血清陽性ドナーのうちの6名由来の単核細胞はHCMVのpp65を発現する同源性標的を溶解した（図50）。HCMV血清陽性ドナー由来の再刺激単核細胞が、HCMVのgBを発現する同源性標的を溶解することはなかった。

HCMV血清陰性のボランティアドナー由来の単核細胞をHCMV血清陽性ドナーの単核細胞と同様に再刺激したが、HCMVのIE1またはHCMVのpp65を発現する同源性標的細胞を溶解しなかった（それぞれ、図49および図50参照）。 10

1例を除くすべての場合において、細胞障害性エフェクター細胞は、適当なHCMVを発現する同源性標的細胞のみを溶解し、非同源性標的細胞は溶解しなかった。唯一の例外であるドナー7C由来の単核細胞は、ALVACpp65（vCP650）による再刺激後、HCMVpp65を発現する非同源性標的細胞を溶解することができた。しかしながら、後に、ドナー7Cおよび非同源性標的細胞系のドナーは、ヒト主要組織適合複合体（MHC）のHLA-B7を共有していることが明らかにされた。

ALVAC-IE1（vCP256）によるHCMV IE1 CTLsの刺激：インビトロでヒトCTLsを刺激し、図49と同様の方法を用いてHCMV IE1 CTLsを分析した。但し、再刺激のための6日間のインキュベーションの後、抗ヒトCD3、CD4またはCD8モノクローナル抗体に結合した免疫磁性ビードを用いてキラー単核細胞をインキュベートした。インキュベーション後、マグネットによりビード、すなわちCD3+、CD4+またはCD8+細胞を除去した。磁性ビードに付着している細胞を解離し、洗浄して、細胞障害性分析に使用した。 20

このHCMV血清陽性コホートの細胞障害性応答の表現型の典型として、ALVAC-IE1（vCP256）で再刺激されたドナー2A由来の単核細胞は、CD3およびCD8を発現するがCD4を発現しないリンパ球を欠失させたIE1発現性標的を溶解しなかった（図51）。さらに、CD8を増加させたがCD4は増加させていない再刺激単核細胞は、細胞障害活性を保持していた。

このように、HCMV IE1を発現するALVAC組換え体（vCP256）またはHCMV pp65を発現するALVAC組換え体（vCP260）によるインビトロ再刺激によってHCMV血清陽性のボランティアドナーから誘導された細胞障害性エフェクター細胞は、抗原特異性でMHC制限性であり、そしてCD3およびCD8発現性である。これらの特徴は、古典的な細胞障害性Tリンパ球（CTLs）の特徴と一致している。 30

これらの結果は、HCMVが感染したヒトの細胞の破壊を媒介することのできるヒト細胞障害性Tリンパ球を誘発する目的のワクチンとして、HCMVタンパク質を発現するALVAC組換え体が機能し得ることを示すものである。さらに、これらのデータは、これらの組換えウイルスが、免疫治療の目的で半ビボ刺激したり細胞障害性Tリンパ球クローンを増幅する（Riddell他、1992）ための試薬として機能し得ることも示している。

前に論じたように、HCMV-gBはヒトにおいて防御免疫を誘発するように機能することができ、その理由は、1)ヒト血清からgB特異的抗体が吸収されてしまうとHCMV中和性抗体の力価が有意に減少すること（Goenczoel他、1991；Marshall他、1992）、および2)血清陽性の個体においてgBタンパク質によりヘルパーT細胞が活性化されている証拠がある（Liu他、1991）からである。Goenczoelら（1990）は、イムノアフィニティ法で精製したgBがヒトのボランティア内で免疫原性を有していたことを報告している。この研究では、該精製gBの単一回投与（注射）により、本来血清陽性の個体に高力価のHCMV中和性抗体およびリンパ球増幅を誘起することができた。血清陰性の個体においてはgB製剤を3回投与すると一過性のHCMV中和性抗体が誘起され、第4回目の投与により迅速な再誘起が認められ、HCMV中和性抗体力価が上昇した。 40

これらの研究は、精製gBがサブユニットとして使用できることを示している。さらに、 50

精製 g B は N Y V A C または A L V A C - g B 組換え体と組み合わせることにより、プライム／ブーストプロトコールに使用することもできる。最近の研究が示すところによれば、外来遺伝子の産生物を発現するポックスウイルス組換え体で免疫化した後、該遺伝子産生物を精製したものでブースト（追加免疫）を行うプライム／ブーストプロトコールは、それらの生成物のいずれか一方のみによって誘起される応答に比べて高い免疫応答を誘起している。例えば、H I V - 1 のエンベロップ等タンパク質を発現するワクシニア組換え体で免疫化され、さらに、バキュロウイルス組換え体由来の精製された H I V - 1 エンベロップ糖タンパク質でブーストされたヒトは、該ワクシニア組換え体または精製エンベロップ糖タンパク質単独で免疫化された個体よりも高い H I V - 1 中和性抗体力価を示している（Graham 他、1993；Cooney 他、1993）。A L V A C - H I V (v C P 125) の 2 回投与（注射）で免疫化されたヒトは、H I V 特異性抗体を産生しなかった。ワクシニアウイルス組換え体由来の精製 rgp160 でブーストすると、検知可能な H I V - 1 中和抗体を生じた。さらに、rgp160 を用いるブーストにより、rgp160 に対して特異的なリンパ T 細胞の増殖の上昇が明らかに認められた。このワクチン化法によれば、エンベロップ特異的細胞障害性リンパ球活性も検出された（Pialoux 他、1995）。サル免疫不全症ウイルス（S I V）エンベロップ糖タンパク質を発現するワクシニア組換え体で免疫化され且つバキュロウイルス組換え体由来の S I V エンベロップ糖タンパク質でブーストされたマーカーザルは、S I V のチャレンジから防御されている（Hu 他、1991；1992）。

10

実施例 46 - H C M V 糖タンパク質 B の精製

この実施例は、ワクシニア組換え体によって産生された C M V 糖タンパク質 B の精製、および A L V A C - C M V g B (v C P 139) と組み合わせた場合の実験動物中の免疫原性の試験に関するものである。

20

C O P A K 組換え体 v P 1126、v P 1128、および v P 1145（それぞれ、異なる形態の g B を発現する）は、マウス中に C M V 中和性抗体を誘発し（表 23）、したがって、免疫原性のある形態で g B を発現する。ウイルスと細胞系、そして C M V の g B を精製するための免疫試薬を選定するために、5 種類の異なる g B 特異的モノクローナル抗体を用いる免疫沈降分析により上記 3 種類の C O P A K 組換え体の比較を行った。その分析結果に基づき、v P 1145 感染 Vero 細胞の培地から g B を精製する方法を開発した。C M V g B 特異的モノクローナル抗体（m A b）C H 380 をプロテイン A - アガロースに架橋させることにより、イムノアフィニティカラムの層材料（充填材）を調製した。この材料を用いて 1 段階法による g B の精製を行った。g B のバッチを幾つか製造し、セクション III に記述するように純度を調べた。

30

免疫沈降分析 それぞれ 60mm の皿に入れた Vero 細胞および HeLa 細胞の単層に v P 1126、v P 1128、v P 1145、または v P 993（後述）を無血清培地内で 5 pfu／細胞の moi で感染させた。感染から 24 時間後、培地と細胞を別々にハーベストした。下記の試薬を用い、モノクローナル抗体用プロテイン A に対するブリッジとしてラットの抗マウス I g G を用いる免疫沈降（I P）分析を行った（Taylor 他、1990）。

ウイルス：

v P 1126：COPAK-CMV gB(全域)。全長の野性型 gB。

v P 1128：COPAK-CMV gB (T M⁻)。トランスメンブレン領域を欠失。

40

v P 1145：COPAK-CMV gB (T M⁻, C I⁻)。トランスメンブレン領域を欠失し、切断部位が変性されている。

v P 993：COPAK（対照）。

試薬：

モルモット抗 CMV gB：Eva Goenczoel（Wistar 研究所）から入手。

モノクローナル CH380：P M s & V（Pereria および Hoffman、1986）から入手。

モノクローナル 13-127：Advanced Biotechnologies 社製。

モノクローナル 13-128：Advanced Biotechnologies 社製。中和性でコンホメーション依存性。

モノクローナル HCMV-34：Cogent Diagnostics 製、中和性。

50

モノクローナルHCMV-37: Cogent Diagnostics製、中和性。

ウサギ抗-p25 (ワクシニアE 3 L): 米国アリゾナ州Bert Jacobsから入手。

イムノアフィニティクロマトグラフィ層材料の調製 架橋剤ジメチルピメリミデートを用いてプロテインA-アガロースに結合させたモノクローナル抗体 (mAb) CH380の約2.4 mgから成るイムノアフィニティカラム層材料1 mlがConnaught Laboratories社 (カナダのオンタリオ州Willowdale) のStephem Cockleによって提供された。mAb CH380 (PereriaおよびHoffman, 1986) は、CMVウイルスエンベロープ調製物 (Goenzoel他, 1990) からCMV g Bを精製するのに以前に使用された。S. Cockleからの材料を予備的な実験に用いて、g B精製に有用であることを確認した。g Bの生産をスケールアップするため、S. Cockleによるのと同じ方法により、後述するように、追加の層材料を調製した。

モノクローナル抗体CH380の調製 凍結乾燥したモノクローナル抗体CH380 (ロットS1705、PMsvから入手) の4バイアルをPBS (137mMのNaCl、2.7mMのKCl、1.5mMのKH₂PO₄、8.1mMのNa₂HPO₄、pH7.4) 中で再構成 (各1 ml) し、PBS (最終体積3.5ml) に対して一晚透析した。ビシンコニン酸分析 (BCA分析。試薬は米国イリノイ州RockfordのPierceから入手) によるとタンパク質濃度は4.9mg/mlと測定された。次に、この製剤を等体積のMAPS結合緩衝液 (Bio-Radのカatalog番号153-6161; milli-Q水中31.4% w/v、pH9に調整、22mmの膜でろ過したもの) 中に希釈した。粒状物質を取り除くため、MAPS緩衝液に溶かした抗体製剤を16,000×gで30分間遠心し、上澄液中のタンパク質濃度を280nmにおける吸光度 (IgGに対する吸光度係数を1.44とする) から計算した。

プロテインA-アガロースビードの調製 プロテインA-アガロースビード (Bio-Rad社カatalog番号153-613) 3 mlを、2倍体積のMAPS結合緩衝液を用い密閉管中で軽く混合し、1000×gで5分間遠心 (Beckman社製GPKR遠心機で1400rpm、GH3.7ローター) することにより4回洗浄した。最後の洗浄後、上清を廃棄した。

ビードへのモノクローナル抗体の結合 上記の工程1で得たmAb抗体の全てを工程2からの洗浄済みビードに添加し、得られた混合物を密閉管中4℃で回転させた。ビードをペレット化し (1000g/5分)、280nmにおけるODを読みとり (上述) 上清中のIgGを測定することにより、ビードに結合されたmAbの量を6~12時間毎に求めた。上清から90%のIgGが欠失するには、4℃において約48時間のインキュベーションが必要であった。

ビードへのモノクローナル抗体の共有架橋 90%の結合が得られた後、ビードを6 ml (2倍体積) の50mMのホウ酸塩、3 MのNaCl (pH9) で4回洗浄した。次に、該ビードを30ml (10倍体積) の50mMのホウ酸塩、3 MのNaCl (pH9) に再懸濁し、pHを9±0.1に調整した。ビードの1サンプル (100μl) を抜き出し、後の架橋度の評価に供した。架橋剤ジメチルピメリミデート (DMP) は使用直前に調製し、200mMのホウ酸、3 MのNaCl、pH9に溶かして500mMの濃度とした。ビードにDMPを添加して最終濃度20mMとし、それらのビードを密閉管内で室温下に30分間上下を逆にするにより混合した。別のビードサンプル (100μl) を取り出し架橋度の評価に供した。残存する架橋剤をクエンチするため、200mMのエタノールアミン (pH8) 6 ml (2倍体積) を用いてビードを2回洗浄し、次に、200mMのエタノールアミン (pH8) 30ml (10倍体積) 中で、2時間室温下に混合 (上下を逆にする) することによりインキュベートした。最終ビードを6 ml (2倍体積) のPBSで4回洗い、0.01% NaN₃を含むPBS 6 ml中に保存した。

架橋度を測定するため、DMPインキュベーションの前後に取り出したゲル状ビードサンプルをペレット化し、上清を棄て、そしてビードを2倍量のSDS-PAGEサンプル緩衝液 (還元剤を含有) と混合した。これらのサンプルを煮沸し、10%ポリアクリルアミドゲル状で電気泳動法により分離した。クーマーシーブルーで染色した後、IgGのH鎖およびL鎖は、「事前」サンプルには検出されたが「事後」サンプルには検出されず、効率的に架橋が生じていることが示された。

ビードによる抗体のインキュベーションの前後のタンパク質濃度に基づき、得られた層材

10

20

30

40

50

料は、プロテインA-アガロースビード1ml当たり約5mgのモノクローナル抗体を含有するものと推定された。

イムノアフィニティカラムクロマトグラフィによるCMV g Bの精製 カラム緩衝液 P B S (173mMのNaCl、2.7mMのKCl、1.5mMのKH₂PO₄、8.1mMのNa₂HPO₄)、pH1 (バッチ1)、pH7.4 (バッチ2~5)、またはpH6.8 (バッチ2~5) ; 0.1Mグリシン、pH2.5 ; 1Mトリス、pH8.5。

カラム カラムの大きさは、体積として0.3~4mlの範囲で変化させた。新しいカラムを注入したときは、10層体積 (bed volume : bv) の0.1Mグリシン (pH2.5)、次いで10~20bvのP B S (pH7または7.4) を用いてストリッピングを行った。各カラム運転の最後に、少なくとも10bvのP B S (pH7) を用いてカラムを洗浄した。各カラム運転の最初にも、少なくとも10bvのP B S (pH7) を用いて洗浄を行った。カラムの運転は室温下に行い、使用していないときは、P B S + 0.01% NaN₃ 中4℃で貯蔵した。

粗g Bサンプルの調製 MEM + 10% F B S に入れたVero細胞をローラボトル (850cm²) に接種した。感染の2~12時間前に培地を無血清MEMに変えた。v P 1145を細胞に感染させ、このときのMOIは5pfu/細胞 (体積10ml/無血清MEMのRB) とした。37℃で60分間ウイルスを吸収させ、その後、各RBに無血清MEMを添加し、37℃においてインキュベーションを続行した。感染から16~24時間後、培地をハーベストした。3000rpmで15分間遠心することにより (Beckman製GPKR遠心機、GH3.7ロータ) 培地を清澄化した。上清を回収し、Beckman製SW28ロータ中で60分間、20,000rpmで遠心することにより更に清澄化した。次に、清澄化した培地を、30,000MWC0を有する以下の限外濾過装置を用い、P B S (pH7.4) に緩衝液を交換する限外濾過により濃縮 (10~40倍) した : Centricell-60 (Polysciences製、カタログ番号19182-6)、Centriprep-30 (Amicon製、カタログ番号4306)、またはポリスルホン浸水性フィルターユニット (Polysciences製、カタログ番号2250)。以上のようにして得られた材料を後述するようにカラムに適用した。

カラム操作 ストップコックまたはペリスタル型ポンプにより流量を0.03~0.09ml/分に制御して、上記の粗g Bサンプルをカラムに適用 (注入) した。サンプルの注入後、10bvのP B S、pH7 (バッチ1)、または20bvのP B S、pH7.4の次に20bvのP B S、pH6.8 (バッチ2~5) を用いて、0.2~0.6ml/分の流量でカラムを洗浄した。10bvの0.1Mグリシン (pH2.5) を用いて被結合材料を溶出させて、1.0Mトリス (pH8.5) 50μlを含有する管 (バッチ1, 3) または100μlを含有する管 (バッチ2, 4, 5) に、500μlのフラクション (バッチ1, 3) または1mlのフラクション (バッチ2, 4, 5) を集めた。1つのカラム (#28) は0.1Nのグリシン + 0.1Mのトリス (pH7) を用いて溶出を行った。CMV g Bフラクション (画分) の同定は、還元条件下10%ゲル上のSDS-PAGE、次いで銀染色 (Bio-Rad社製キット、カタログ番号161-0443) によって行った。

溶出g Bの処理 SDS-PAGEおよび銀染色による同定後、CMV g B画分をプールし、以下の2つの方法のいずれかによって濃縮した : 1) 0.1×P B Sに対する透析および真空による10倍濃縮 (バッチ1の大部分)、または2) 70%硫酸アンモニウムを用いる沈降処理およびP B Sへの再懸濁。g Bサンプルのタンパク質濃度は、ピシンコニン酸マイクロプレート分析 (BCA、試薬は米国イリノイ州RockfordのPeirce製) により測定した。g Bの5バッチを調製し、幾つかのアリコートにして-70℃に凍結した。

精製g Bの評価 スロットプロット スロットプロット分析を用いて、粗調製物、アフィニティカラム精製のフロースルー画分および溶出画分中のCMV g Bの相対量を測定した。各テストサンプルについてP B S中の連続的な2倍希釈を行い、SchleicherおよびSchell Manifold IIスロットプロット装置を用いてニトロセルロースペーパーにかけた。各テストには、標準として既知のタンパク質濃度 (BCAマイクロプレート分析によって測定) を有する精製g Bの連続希釈サンプルを含ませた。CMV g Bの検出には、モノクローナル抗体CH380 (1000倍希釈) を用い¹²⁵Iヤギ抗マウス抗体 (NEN製、カタログ番号NEX159、0.1Ci/ml) により行った。オートラジオグラフ上のスロットプロット信号をスキャンニングして、デンシオメトリー (米国ニューヨーク州Huntington StationのPD

10

20

30

40

50

I 社製、Quantity-Oneデンスイオメータプログラム付) によって分析した。各テストサンプルのCMV g Bの量は、g Bの標準曲線と比較した線形回帰分析により求めた。
ウエスタンブロット テストサンプルは、還元条件下に10%ゲル上に電気泳動法に分離し、そしてニトロセルロースペーパーにブロッティングした (HarlowおよびLane、1988)。以下の試薬を用いてブロットを探索し、CMV g B、マウス I g G、ワクシニア、およびVero細胞タンパク質の存在を調べた。

抗原	一次抗体	検出手段
CMV g B	モノクローナル抗体CH380	^{125}I ヤギ抗マウス抗体 (NEN # NEX 159) 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$
マウス I g G	^{125}I ヤギ抗マウス抗体 (NEN # NEX 159) 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$	(一次抗体参照)
ワクシニア タンパク質	ウサギ抗vP410 抗体 (ウサ ギ # W29, 39週, 9/13/91) Vero細胞に予め吸収され 1000倍希釈されたもの	^{125}I タンパク質 A (NEN # NEX-146) 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$
Vero細胞 タンパク質	ウサギ抗Vero細胞抗体 (B. Meigner から入手) PVsv, ALVAC感染CEF に予め 吸収され1000倍希釈された もの	^{125}I タンパク質 A (NEN # NEX-146) 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$

免疫沈降/ウエスタンブロット分析 モノクローナル抗体を用いバッチ1のg BについてI P (免疫沈降) /ウエスタンブロットを実施した。ラベル化していない粗製g Bおよび精製g Bおよび精製g Bを免疫沈降に供した後、SDS-PAGEにかけ、ゲルをニトロセルロースにブロッティングし、モルモット抗CMV g B抗体 (Eva Goenczoelから入手) (1000倍希釈) を用い、 ^{125}I プロテイン A (NEN製、#NEX-146) (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$) により、g B特異的タンパク質を検出した。

g B生成物の純度分析 各g Bバッチのサンプルについて、還元条件下10%ゲル上での電気泳動分離による分析を行った後、クーマーシーブルーによる染色を行った。乾燥後のゲルをスキャンニングしてデンスイトメトリー (米国ニューヨーク州Huntington StationのPDI社製、Quantity-Oneデンスイトメータプログラム付) によって分析した。

3種類のワクシニアCOPAK組換え体によるCMV g Bの発現を比較するための免疫沈降分析 CMV g Bを産生させイムノアフィニティ精製するのに好適な組換え体、細胞基質および抗体を選択するために、モルモット抗g B抗体および一連のモノクローナル抗体を用いる免疫沈降分析により、3種類の異なる形態のg Bを発現するCOPAK組換え体の比較を行った。組換え体v P 1126、v p 1128、およびv P 1145は、マウス内にCMV中和性抗体を誘発し、したがって、免疫原性のある形態のg Bを発現する (表23)。テストしたCMV g B抗体はすべて同様のI P結果を示した。HeLa細胞およびVero細胞感染由来の培地および細胞画分の両方を用いてモルモット血清について行った代表的な分析を図52A～図52Dに示す。予想されたように、v P 1128およびv P 1145感染細胞の細胞および培地画分の両方からCMV g B特異的物質が沈降したが、v P 1126感染細胞に関しては細胞画分のみであった。g B特異的バンドの見かけの分子量は以前に報告された結果と一致している (BrittおよびAuger、1986; BrittおよびVugler、1989; Reis他、1993)。これらの3種類のCMV g B組換え体の全ての細胞画分は、見かけの分子量130～140の主要バンドを含有していたが、これはグリコシル化された未切断g B前駆体の見かけの分子量に一致する。細胞画分にはみかけのMWが110kDaおよび55kDaの弱いタンパク種が観察されたが、これは加水分解処理を受けた成熟タンパク種に一致する。N末端生成物は以前に90～110k

Daであると報告され、また、C末端生成物は55～58kDaと報告された（BrittおよびAuger 1986）。HeLa細胞においては見かけの分子量がさらに高いタンパク種（約150kDa）も存在していた（例えば、図52Dのレーン4）。このタンパク種も、おそらく、未切断前駆体を示すし、グリコシル化の更に進んだものであろう。培地画分においては、v P 1128およびv P 1145感染細胞から3種類g Bバンドの沈降が認められ、未切断前駆体ならびに、N-末端プロセシングされたポリペプチドおよびC末端がプロセシングされたポリペプチドを示している。デンストメトリー分析によれば、HeLa細胞に比べてVero細胞の培地画分の方がより多くのg B特異性の物質の沈降が認められ、組換え体v P 1145はv P 1128よりも多くのg B特異性物質を産生させていた。この相違は、v P 1128の細胞画分よりもv P 1145の細胞画分の方がより多くのワクシニアE 3 Lが沈降し、このサンプルにおいては全体のワクシニアの発現量が高くなっていることを示しているという事実から（図53Aおよび図53B）説明できる。v P 1145については、細胞画分（HeLa細胞およびVero細胞の両方）からよりも培地画分の方が多くのg B特異性の物質の沈降が見られた（図52AおよびBと図52CおよびDを比較されたい）。

HeLa感染細胞の培地から沈降したサイズの異なる3種類のg Bは、Vero細胞で産生した3種類と分子量が異なっているようである（図52Aと図52Bを比較）。この相違は、Vero細胞に比べてHeLa細胞におけるグリコシル化の程度が異なることに因るものかも知れないが、この推定は更に検討はしていない。分子量の大きいg B特異的タンパク質が他のヒト細胞系（MRC-5）においても産生されるか否かということ进行を明らかにするため、モノクローナル抗体CH380を用い、v P 1145を感染させたHeLa細胞、MRC-5細胞およびVero細胞の培地におけるg Bタンパク質を比較するウエスタンブロット分析を行った（図54）。その結果、この分析で検出できる2つのg Bバンド、すなわち、g B前駆体（約140kDa）およびC末端プロセシングフラグメント（55～58kDa）は、Vero細胞におけるよりもHeLa細胞およびMRC-5細胞における方がみかけの分子量が大きくなっていた。N-末端プロセシングフラグメントは、モノクローナル抗体CH380またはモルモット抗CMV g B血清のいずれを用いてもウエスタンブロットでは検出できない。

イムノアフィニティ精製用にモノクローナル抗体CH380を選択した。その理由は、大量を容易に入手でき、また、上記IP分析において5種類の異なるモノクローナル抗体により検出されたg B特異的タンパク質に違いが認められなかったからである（図55）。IP分析に基づき、更に、感染細胞の培地から分泌g Bを精製するには細胞膜からg Bを可溶化し、細胞タンパク質からそれを精製する必要がないということを考慮して、CMV g Bの精製はv P 1145感染Vero細胞の培地画分を用いて開始した。無血清培地において感染を行い、粗製材料中に混入するタンパク質を更に減少させた。

CMV g Bの精製 別々に実施した15回のイムノアフィニティクロマトグラフィカラム運転（全量として3.1mgのg Bを得た）の結果を表24にまとめている。該物質の幾分かを更なる分析に使用し、残りは、精製済み生成物として5つのバッチに分けて（全量2.6mg）プールした（図25）。カラムラン7、8、10および11は同一のカラムにおける連続的な運転である。カラム19A、19B、19C、21A、21Bおよび21C由来の層材料をプールしてラン28、29および32用のカラムを調製した（ラン28、29および32から最大量のg Bが得られた）。表24は各カラムに適用した粗製g Bを掲記したものであり、該粗製物が誘導されたv P 1145感染Veroローラーボトルの数（RB当たり 1×10^8 細胞）、該粗製物中の全タンパク質およびg B特異的タンパク質の量を示している。8サンプルの分析に基づき、該粗製物中の全タンパク質含有量は1.2～3.7mg/RBの範囲にあり平均値は2.4mg/RB（ 10^6 細胞当たり24μg）であった。精製g Bを標準とするスロットブロット分析により、それらの調製物のうちの7つについて粗製物中に存在するg Bの量を測定したところ、50～350μg/RBの範囲にあり、平均値は153μg/RB（1.5μg/ 10^6 細胞）であった。これらの数値をまとめると、粗製物中のタンパク質は、約6%のg Bから構成されていたことが示された。CMV g Bの収量は、8～29μg/RBの範囲にあり、平均値は20μg/RB（0.2μg/ 10^6 細胞）であった（表24）。1mgのCMV g Bを得るのに、大略50のローラーボトル（ 1×10^9 細胞）が必要であった。g B用免疫吸着ゲルの性能は十分に調べていなかった。そこで、

10

20

30

40

50

カラムラン28, 29および32に用いた4 mlの層材料を当初, 0.6mlのミニカラムに分割し (カラムラン19A、19B、19C、21A、21Bおよび21C)、g Bを量を変えながら各カラムにかけて (適用して) 結合の飽和が生じるかを判定した。不幸なことには、カラムに適用した粗製物中のg Bの量を過大評価していたため、飽和は見られなかった。結合が最大のもの (カラム19Cから) をカラム性能の推定量として用いた ($300 \mu\text{g/ml}$ 層材料)。ミニカラムから溶出したg Bの量は、カラムに適用したg Pタンパク質の8~25%であった (表24)。したがって、4 mlカラムの性能が少なくとも1.2mgであり、適用されたg Bの25%が回収されるとすれば、1.2mgの精製g Bを得るには、4.9mgの粗製g B (約33のR Bから) をカラムに適用しなければならないものと推定された。カラム28による結果はこの推定に近い: 36のローラーボトルから得られた材料をカラムに適用して、1 mgのg Bが溶出された。

10

カラムに適用されたが精製物として溶出されなかったg Bの定量的な説明はできていない。カラムに適用された (かけられた) g Bのうちの8~25%のみが精製g Bとして回収されたものであるから、残りは、フロースルー画分、洗浄画分、生成物とともにプールされなかった溶出画分に存在するか、またはカラムに結合しているはずである。フロースルー画分においてはウエスタンブロットによりCMV g Bを検出することはできた (例えば、図56のレーン6)。しかしながら、スロットブロット分析によりフロースルー画分中のg B量を推定すると、適用したg Bの20%以上を説明できなかった。洗浄画分は調べていない。最終的なg B生成物として選ばれたプール画分はピーク画分のみであるから、隣接する画分中の痕跡量のg Bが消失g Bとなっているのかも知れない。例えば、図57は、カラム8から溶出された連続的な画分であり、画分8.17~8.21はg B生成物としてプールされたが、痕跡量が画分8.16および8.22に残存していた。さらに、免疫吸着ゲル中にg Bが保有されている証拠もある。溶出および洗浄後のカラム11および19Cからのゲル材料は、ウエスタンブロットで検出され得るg B特異的物質を含有している (図56のレーン2および3)。カラム上に残存するg Bの量の定量的分析は行わなかった。

20

カラムラン7のフロースルー物質をカラム10に適用することにより、フロースルー物質をカラムに再度適用してみた (表24)。カラム10から溶出したg Bの量 ($4.5 \mu\text{g}$) は、カラム7から得られたg B量 ($110 \mu\text{g}$) のわずか4%であった。この結果を評価することはできない。g B用層材料の性能、ならびにカラムに適用されフロースルー画分に存在するg Bの量が不明であったからである。収量が悪いので、この方法を再度用いることはなかった。

30

精製g Bの評価 g Bを含有する溶出画分をプールした後、精製g Bについて以下の評価を行った: 1)全タンパク質濃度の測定、2)g B特異的および非特異的バンドを同定するSDS-PAGE分析、および3)免疫試薬を用いる上記バンドの確認。さらに、精製g Bを分析して、デンストメータの走査による純度、および一連のCMVモノクローナル抗体に対する結合能による自然コンホメーションを調べた。

各カラムから溶出したCMV g B含有画分を先ずSDS-PAGEと銀染色により分析し、g B画分の同定を行い各ラン毎にプールした。典型的な溶出プロファイルは図57に示す。溶出g Bの一部を分析に使用し、該物質の残りを一緒にして5つのバッチに分けた (表25)。各バッチについて、還元条件下10%ゲル上のSDS-PAGEによる分析を行い、クーマーシーブルーを用いて染色を行った (図58)。染色ゲルをデンストメータでスキャンニング (走査) し、各バンドの分子量および相対量を求めた: 典型的なスキャンを図59および図59Aに示し、また、5つのバッチの分析結果を表26にまとめている。SDS-PAGE分析によれば、バッチ1~5は非常に似ているようである (図58)。みかけの分子量が120~130および51~59 kDaの2つの主要バンドは、前駆体g Bタンパク質およびC末端がプロセシングされたフラグメントを表す。これらのバンドが幅広状になっているのは、一般にグリコシル化の強いこの種のタンパク質においていろいろなレベルのグリコシル化が生じているためであろう。これらのバンドがg B特異的であることの確認は、モノクローナル抗体CH380を用いるウエスタンブロットの結果によって裏付けられた (図60B)。バッチ2~5においてダブレットとして現れている (図58) みかけの分子量77~10

40

50

0kDaのバンドは、gBのN-末端プロセッシングフラグメントのサイズに一致し、IP分析によりvP1145感染細胞の培地で同定されたものである（図52Aおよび52B）。これらのバンドは、ウエスタンブロット分析（図60B）または免疫沈降-ウエスタンブロット分析の組合せ（図61Aおよび図61B）のいずれによってもgB特異的であると確認できなかったが、モルモット抗gB血清またはモノクローナル抗体のいずれもウエスタンブロットによりN-末端プロセッシングフラグメントを検出することができないことから、その可能性は除外されるべきであろう。各バッチには、全タンパク質の6～15%の程度で、約39～45kDaの混入（汚染）タンパク質が存在する（図58および表26）。全てのバッチにおいてgBタンパク質である可能性のより高い2つのバンド、すなわち、一方は200kDaより大きいバンドおよびもう一方は30～35kDaのバンドが存在する（図58、59、および59A；表26）。大きいタンパク質（～200kDa）がgBであるという証拠は、モノクローナル抗体を用いるウエスタンブロットによって導かれ、これによれば、200kDaよりも大きい分子量を有する2つのタンパク質が検出されている（図60Bのレーン2および3）。約30～35kDaのタンパク質もgB特異的である可能性がある（図58）。vP1145感染細胞の培地のIP分析においては、約35kDaのタンパク質が、3種類のモノクローナル抗体（13-128、HCMV34、およびHCMV37）により検出され（図55）、およびモルモット血清により検出されている（図52Aおよび図52B）。このサイズのタンパク質はReis他により（1993）gBの分解産物として記述されていた。

gB調製物の汚染（混入）タンパク質が、細胞基質、ウイルスベクターまたは免疫吸着層材料に由来するものと仮定して、該調製物を調べてマウスIgG、Vero細胞タンパク質、およびワクシニアタンパク質の存在を確認した。Vero細胞またはマウスIgG由来のタンパク質はウエスタンブロット分析によっては検出することができなかった（図60Aおよび図62A）。しかしながら、約35および20kDaの分子量を有するワクシニア特異的タンパク質が痕跡量で検出された（図62B、レーン5）。

溶出されたgBがその自然のコンホメーションを保持していたかということを明らかにするため、3種類の中和性抗体および1種類のコンホメーション依存性抗体を含む一連のモノクローナル抗体を用いて、免疫沈降/ウエスタンブロットを組み合わせた分析を行った。各モノクローナル抗体は、精製されたgB由来の前駆体およびC-末端フラグメントを沈降させ、イムノアフィニティカラムから溶出されたgBがその自然のコンホメーションを保持していることが示された。

総括すると、バッチ1～5の溶出gBの分析により、生成物は少なくとも2種類の既知のgB特異的タンパク質、すなわち前駆体gBおよびC末端フラグメントを含有し、これらを合せてタンパク質の約50%を占めていることが示されている（図58および表26）。その他の3種類のタンパク種（全タンパク質の約20～25%をしめる）もgB特異的と考えられ得るが、直接的な証拠は得られていない。

精製されたgBの免疫原性 HCMVgBの5つのバッチをプールし、最終濃度を測定した。精製gBの幾つかにはアジュバントとしてミョウバンまたはQS21を加え、マウスへの接種に用いた。マウスの血清についてHCMV中和性抗体の有無を調べた。表27は、テストした精製gBはいずれの量においても両アジュバントによりHCMV中和性抗体を誘発できたことを示している。

精製gBをALVAC-gBと組み合わせてマウスプライム（初回免疫）/ブースト（追加免疫）プロトコールに用いた。表28が示すように、0日目にALVAC-gB（vCP139）が投与され且つ29日目に精製gB（QS21またはミョウバンをアジュバントとする）でブーストとされたマウスは、2回目にALVAC-gB（vCP139）が投与されたマウスよりも高レベルのHCMV中和性抗体を発現した。

表23. マウスにおけるH C M V 中和性抗体の誘発

免疫原 ¹	免疫後の日数		
	30	48	135
v P 1126	16 ²	8	256
v P 1128	16	8	106
v P 1145	16	8	106

1 : マウスの免疫化には、0 日および49日目に 1×10^8 P F U の組換えウイルス
 (ip投与) を用いて行った。

2 : H C M V 中和力価

10

20

表24. イムノアフィニティ精製カラムのまとめ

カラムラン	Veror-ラ ボトル の数 ^a	カラムサイズ	カラム に適用した粗製物質		gB収量 (適用中%)
			全タンパク質 ^b	gB特異的 タンパク質 ^c	
7	4	1 ml	13.3 mg	nd ^d	110 ug ^b
8	6	1 ml	14.4 mg	2.2 mg	84 μg ^b
10	カラム7の フロースルー	1 ml	nd	nd	4.8 ug ^b
11	4	1 ml	nd	nd	100 ug ^b
13	1	0.3ml	nd	nd	12 ug ^d
19A	1	0.6ml	2.9 mg	240 μg	41 μg ^c (17%)
19B	2	0.6ml	5.8 mg	480 μg	93 μg ^c (19%)
19C	3	0.6ml	8.7 mg	720 μg	185 μg ^c (25%)
21A	3	0.6ml	5.7 mg	300 μg	29 μg ^c (8%)
21B	5	0.6ml	9.5 mg	500 μg	120 μg ^c (13%)
21C	7	0.6ml	13.3 mg	700 μg	150 μg ^c (19%)
23	3	6 ml	5.7 mg	300 μg	25 μg ^c (8%)
28	36	4 ml	64.8 mg	nd	1000 μg ^b
29	24	4 ml	30 mg	nd	480 μg ^b
32	24	4 ml	nd	nd	700 μg ^b

a 細胞密度：1×10⁸ /ローラボトル

b Pierce BCA分析により測定されたタンパク質濃度

c 精製 g Bを標準とするスロットブロット分析により推定

d 測定せず

10

20

30

40

表25. C M V g B バッチ

バッチNo.	全 g B	体積	濃度	カラムラン
1	0.6mg	0.55ml	0.29mg/ml	7 8 10 11 13
2	1.0mg	1.0ml	1.0mg/ml	28
3	0.26mg	0.5ml	0.52mg/ml	21A 21B 21C 23
4	0.48mg	0.5ml	0.96mg/ml	29
5	0.7mg	0.5ml	1.4mg/ml	32

表26. C M V g B の 5 バッチのデンシメトリー分析

タンパク質 バンド	みかけの分子量 (kDa) ^a					相対量 (%) ^b				
	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5
>200kDa (gB?)	222 192	208	221	225	217	10.6 8	6.7	7.5	8.3	7.4
前駆体gB	128	120	124	128	134	39	30	36.1	30	27.4
N フラグメント (?)	83	94 77	99 84	101 88	100 89	9.6	3.6 9.7	3.2 6.3	4.5 6.6	3.5 6.3
C フラグメント	55	51	55.4	56.4	59	21	15.6	13.7	22.6	21
未知の 混入物	42	39	42	44	45	6.1	12	15.4	14.3	15.8
gB分解 生成物(?)	32	30	35	35	37	4.3	9.7	11.3	8.6	10

- a 分子量マーカーを標準とするデンシトメータのスキanningから求めた (図59、図59A 参照)。
- b 各バンドの密度を、該バンドを通る2次元走査ラインから求める：カーブの下方からベースラインまでについてサンプルを横切る平均ピクセルODを、積分して密度を求める (OD × cm)。当該レーンにあるすべてのバンドの全密度に占めるパーセントを相対量とする。

表27- C B A マウスにおいて精製 g B によって誘発された H C M V 中和抗体¹

マウス	投与量 ³	アジバンド ³	NT ² 4w	NT ² 6w	NT ² 8w	NT ² 9w	
201	2.5	Alum	32	256	256	256	
203			8	64	128	128	
204			8	12	16	16	
206	5.0	Alum	48	512	192	192	10
207			12	192	512	512	
208			16	192	192	192	
209			16	128	256	256	
210			8	128	256	256	
211	10.0	Alum	32	256			
213			32	96	256	256	
214			32	256	256		
216	20.0	Alum	64	128	128	128	
217			64	256	256	256	
218			32	128	512	256	
219			16	128	256	256	
220			32	192	512	256	
222	2.5	QS21	8	192	512		
223			32	>4096	>4096	2048	
224			16	1536			
225			64	1024	1024	1024	
226	5.0	QS21	64	>4096	1024	1024	
227			96	>4096			
228			64	>4096	>4096	>4096	
229			64	> 256	>4096		
230			32	>4096	1536	2048	
231	10.0	QS21	64	2048	2048	>4096	
232			96	1536	2048		
233			96	>4096			
234			64	2048	2048	1024	
236	20.0	QS21	128	3072			
239			96	>4096	>4096	>4096	

1 マウスは 0 週および 4 週目に S. C. 投与した。

2 初回投与から 4、6、8、または 9 週目に血清を採取した。

3 各接種に用いた 15 μ g の Q S 21 または 25 μ l の ミ ョ ウ バ ン 中 の g B の μ g。

表28. プライム／ブースト実験のまとめ

マウス	N T 0 日	抗原アジュバント	N T 29日	抗原アジュバント	N T 42日	N T 56日	
381	4	ALV	32	gB+Alu	384	768	
382	<4	ALV	8	gB+Alu	192	192	
383	4	ALV	4	gB+Alu	192	256	
384	<4	ALV	48	gB+Alu	512	512	
385	4	ALV	16	gB+Alu	256	ND	10
397	4	ALV	8	gB+Alu	128	192	
G. m. 4			13.5		248	326	
392	<4	ALV	<4	gB+QS	128	128	
393	<4	ALV	4	gB+QS	>1024	>1024	
394	<4	ALV	8	gB+QS	>1024	>1024	
395	<4	ALV	16	gB+QS	512	384	
396	<4	ALV	4	gB+QS	256	384	
398	4	ALV	8	gB+QS	>1024	>1024	
G. m. 4			6.3		>512	>522	20
373	4	ALV	16	ALV	128	96	
376	4	ALV	4	ALV	8	12	
378	8	ALV	4	ALV	8	4	
379	4	ALV	8	ALV	128	128	
380	4	ALV	16	ALV	64	64	
399	4	ALV	4	ALV	96	192	
400	<4	ALV	4	ALV	64	128	
G. m. 4			6.5		45.6	51.2	

30

5×10^5 TCD₅₀のALVAC-gB (vCP139)、5 ugの gB+Alu、1 ugの gB+QS21をS.C.投与した。

G. m. = 幾何平均

本明細書に記す結果が示すように、NYVACおよびALVAC-HCMV組え体およびそれらから得られる生成物の性能は、記述したような組成物や用途に利用することができ、例えば、免疫原性、抗原性もしくはワクチン組成物、または、分析、キットもしくは試験用の抗原もしくは抗体の調製に用いられ、また、例えば、HCMVの感染を防止することのできるワクチンまたは免疫化（免疫感作）戦略に用いられるのに適しており、さらに、該組換え体のDNAはプローブとして、またはPCRプライマーを調製するのに有用である。

40

実施例47-NYVAC-CMV6およびNYVAC-CMV5におけるCMV遺伝子の発現
gB、gH、pp65、pp150およびIE1-エクソン4に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降によれば、NYVAC-CMV6によりこれら5種類の遺伝子が正しく発現されていることが示された。FACSScan分析（Becton-Dickinson社製）によれば、vP1302B感染細胞内ではgHの表面発現があるが、その親株（vP1251）が感染した細胞内ではこれがなく、機能性gL遺伝子産生物はvP1302B内で発現されることが示された。

50

g B、g H、pp65およびpp150に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降によれば、N Y V A C - C M Vによりこれら4種類の遺伝子が正しく発現されていることが示された。F A C S c a n分析によれば、v P 1312感染細胞内でg Hの発現があるが、その親株(v P 1262)が感染した細胞内ではこれがみられず、機能性g L遺伝子産生物はv P 1312内で発現されることが示された。

実施例48—H C M Vのpp65およびpp150遺伝子を含むA L V A Cドナープラスミドの構築

プラスミドC M V 65 C 6.2をE c o R Iで直鎖状化し、クレノウでフィリングを行い、さらに、アルカリホスファターゼ処理して6.3kbのフラグメントを調製した。プラスミド150.1をN h e Iで分解し、クレノウでフィリングして3.2kbのフラグメント(42K-pp150)を単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド150.8R1(このプラスミド内では、pp65およびpp150の転写が同じ方向にあり、また、pp150は実施例40のプラスミド150.8と逆になっている)を得た。プラスミド150.8R1におけるC M V pp65およびC M V pp150のD N A配列と付加されているフランキンゲン配列は図63A～図63Cに示している(SEQ ID NO:177)。

10

実施例49—A L V A C - C M V 4 (g B、g H、pp65、pp150)の構築

v C P 233感染C E F細胞にプラスミド150.8R1をトランスフェクションしてA L V A C - C M V 4 (v P 1360)を調製した。

実施例50—A L V A C - C M V 4内でのC M V遺伝子発現

g B、g H、pp65およびpp150に対して特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降によって、A L V A C - C M V 4 (v P 1360)により4種類の遺伝子は全て正しく発現されていることが示された。

20

実施例51—H C M Vのg Lまたはg L + I E 1 - エクソン4を含むA L V A Cドナープラスミドの構築

図64Aおよび64B(SEQ ID NO:178)は、プラスミドp C P t kに含まれるカナリアボックスD N Aの3.8kdセグメントの配列である。カナリアボックスチミジンキナーゼ遺伝子(t k)は、このセグメント内にコードされ、4412位のヌクレオチドから開始され4951位のヌクレオチドで終結している。C 7の上流2085bp、S m a I、N r u I、E c o R I、X h o IおよびS t u I部位を含むポリリンカー、ならびにC 7の上流812bpを含むt k(C 7)挿入ベクターを以下のように調製した。p C P t k由来の3450bpのP s t I / N s i Iフラグメントを、p B S - S K +の平滑末端化A s p 718 / X b a I部位にクローニングしてプラスミドp E U 1を得た。t kのO R Fを欠失させポリリンカーと置換させるため、オリゴヌクレオチド

30

RG578 (SEQ ID NO:179)

(5'-GTACATAAGCTTTTTGCGATG-3') + RG581 (SEQ ID NO:180) (5'-TATGAATTCCTCGAGGGATCCAGGCCTTTTTTATTGACTAGTTAATCAGTCTAATATACGTACTAAATAC-3')および RG579 (SEQ ID NO:181) (5'-CTAATTTCTGAATGTCCGACG-3') + RG580 (SEQ ID NO:182) (5'-TTAGAATTCTCGCGACCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTACTTATTACAAATACTATAATATTTAG-3')

40

を用いてp C T t k由来の2種類P C Rフラグメントを増幅した。これらのフラグメントを精製し、H i n d III / E c o R IまたはB s t B I / E c o R Iで分解し、H i n d III / B s t B Iで切断されたp F U 1に連結して、プラスミドp C 7を得た。

p C 7内のポリリンカー領域を次のように変性した。p C 7をE c o R IおよびS t u Iで分解し、精製し、次に、アニーリングされたオリゴヌクレオチド

SDSYN154 (SEQ ID NO:183) (5'-AATTCGTCGACGGAT

CCCTCGAGGGTACCGCATGC-3')および SDSYN155 (SEQ ID NO:184)

(5'-GCATGCGGTACCCCTCGAGGGATCCGTCGACG-3')

50

に連結して、プラスミド pC7⁺を調製した。プラスミド pC7⁺を BamHI で分解し、アルカリホスファターゼで処理した。プラスミド I4LH6Cg L を BamHI および BglII で分解して968bpのフラグメント (H6をプロモータとする g L 遺伝子を含む) を単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド C7g L (このプラスミド内では、g L の転写は欠失された t k 遺伝子と同じ方向になる) を調製した。プラスミド C7g L における HCMV の g L の DNA 配列と付加されているフランキング配列は図65Aおよび図65Bに示している。

プラスミド C7g L を BamHI および PspAI で分解し、アルカリホスファターゼで処理した。プラスミド I4LH6IEEX4 を BamHI および PspAI で分解し、1363bpのフラグメント (H6をプロモータとする IE1-エクソン遺伝子を含む) を単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド C7g LIES2を得た。プラスミド C7g LIES2 における HCMV の g L および IE1-エクソン4の DNA 配列と付加されているフランキング配列は図66Aおよび図66Bに示している。

実施例52-A LVAC-CMV6 (g B、g H、g L、pp65、pp150、IE1-エクソン4) および A LVAC-CMV6 (g B、g H、g L、pp65、pp150) の構築

v P1360感染細胞にプラスミド C7g LIES2 をトランスフェクションして A LVAC-CMV6 (g B、g H、g L、pp65、pp150、IE1-エクソン4) を調製した。

v P1360感染細胞にプラスミド C7g L をトランスフェクションして A LVAC-CMV5 (g B、g H、g L、pp65、pp150) を調製した。

実施例53-トランスメンブレン領域および細胞質テイルを欠失する HCMV g L および g H の NYVAC ドナープラスミド pSD553 へのクローニング

トランスメンブレン領域および細胞質テイル (尾部) を欠失する HCMV g H の配列を図67に示す。プラスミド SPgH1 に PCR を実施しオリゴヌクレオチド

SPgHS1 (SEQ ID NO:185) (5'-CCGAAGCTTCTCGAGAT

AAAAATCAACGACTGTCTCGGTAGCGTCCACGACGAC-3') および

SPgH8 (SEQ ID NO:186) (5'-TCCACTCCATGCTAGT-3')

を用いて756bpのフラグメントを調製した。このフラグメントを NsiI および HindIII で分解して275bpのフラグメントを単離した。プラスミド SPgH6 を NsiI および HindIII で分解し、4779bpのフラグメントを単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド SPgH7 (トランスメンブレン領域および細胞質テイルを欠失し、42Kをプロモータとする g H 遺伝子を含む) を得た。

NYVAC 挿入プラスミド pSD553 VC を BamHI で分解しアルカリホスファターゼで処理した。プラスミド I4LH6Cg L を BamHI および BglII で分解し、970bpのフラグメント (H6プロモータと g L 遺伝子を含む) を単離した。これら2種類のフラグメントを連結してプラスミド COPAKg L-24を調製した。

プラスミド g H7 を XhoI および ScaI で分解し、2239bpのフラグメント (42Kプロモータと端部切除された g H 遺伝子を含む) を単離した。プラスミド COPAKg L-24を XhoI で分解し、アルカリホスファターゼで処理し、さらに、前記2239bpフラグメントに連結してプラスミド COPAKHL-15を調製した。プラスミド COPAKHL-15における g L および端部切除 g H の DNA 配列と付加されているフランキング配列は図68Aおよび図68Bに示している (SEQ ID NO:187)。

実施例54-トランスメンブレン領域および細胞質テイルを欠失する g L および g H を含むボックスウイルス組換え体の構築

NYVAC 感染 CEF 細胞にプラスミド COPAKHL-15 をトランスフェクションして組換え体 v P1399を調製した。

実施例55-組換え体 v P1399 による g H の発現

g H に特異的なモノクローナル抗体を用いる免疫沈降によって、約97kDaの分泌 g H タンパク質が組換え体 v P1399により発現されていることが示された。

10

20

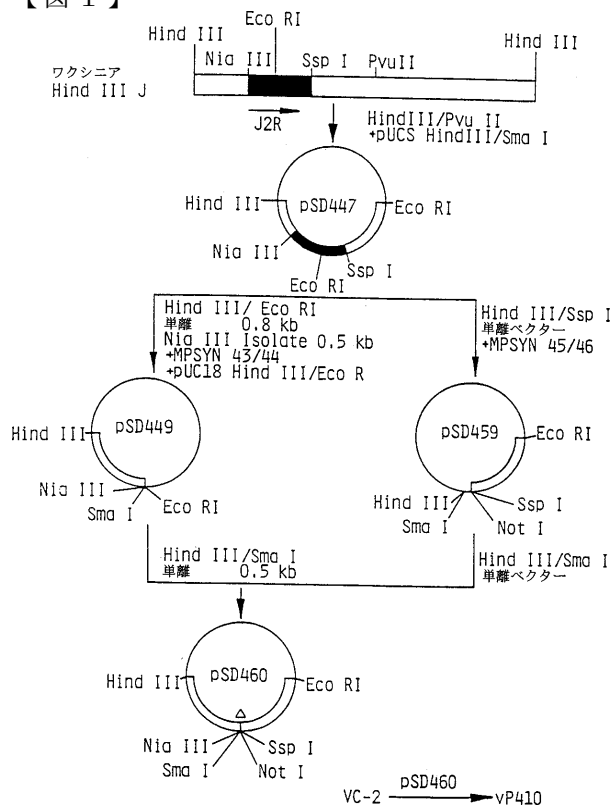
30

40

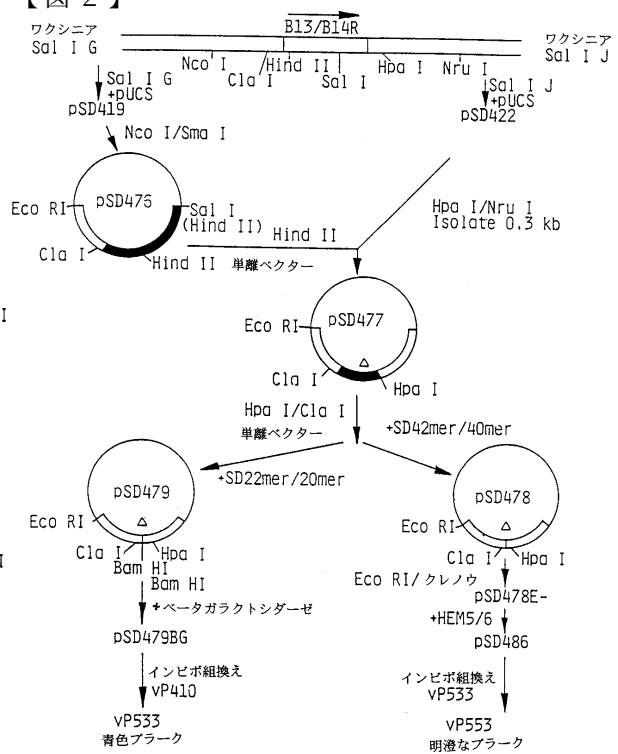
50

以上のように本発明を好ましい実施態様に沿って詳述したが、請求の範囲に記載の本発明はそのような特定のものに限定されるものではなく、本発明の技術思想または請求の範囲から逸脱しない多くの変更が可能である。

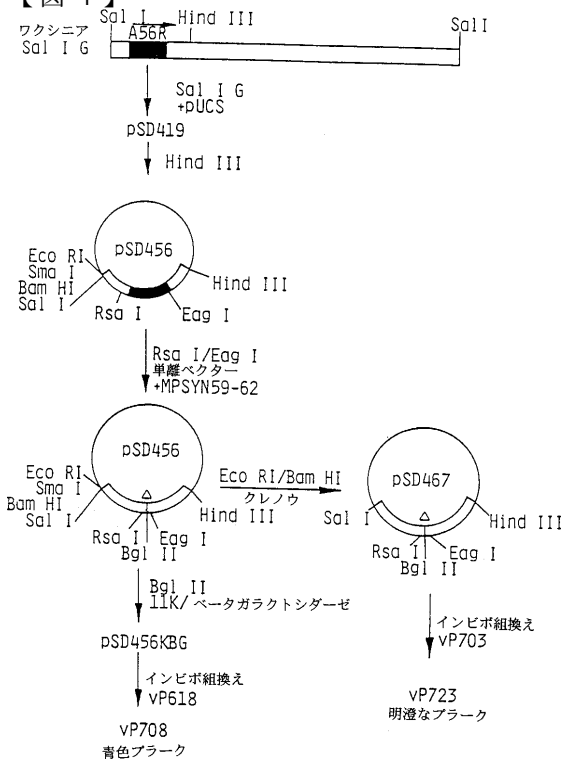
【図 1】



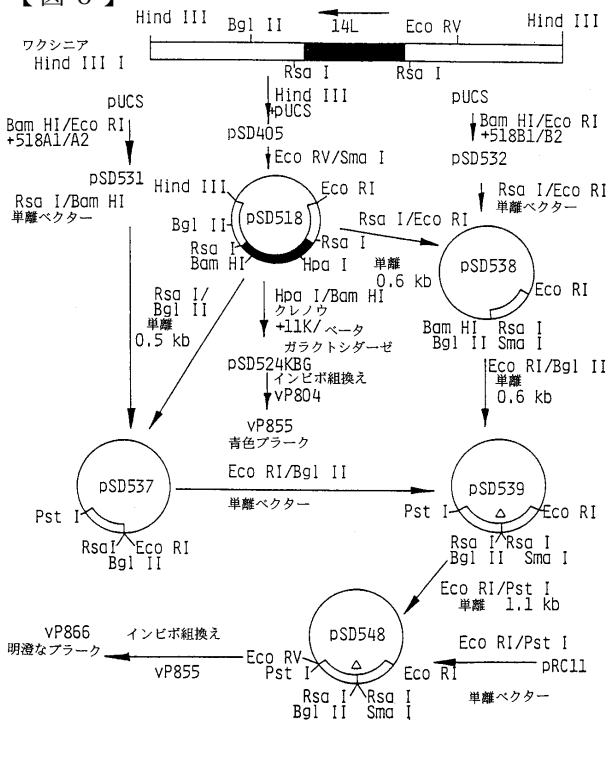
【図 2】



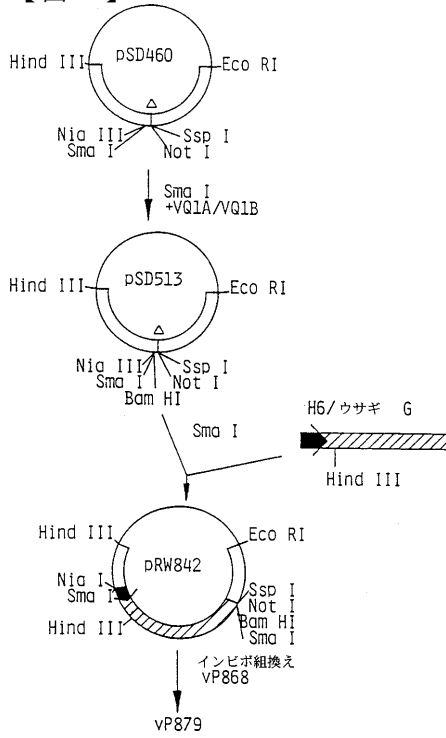
【图 4】



【 义 6 】



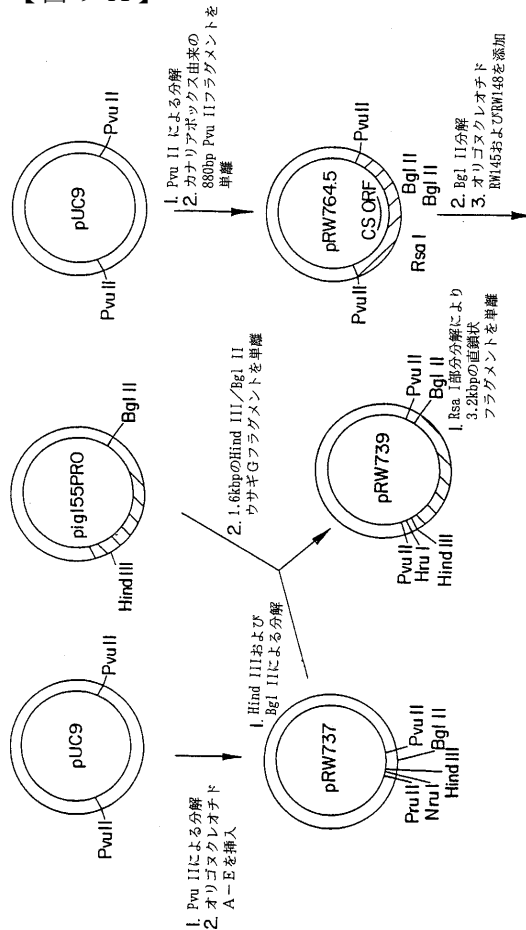
【 図 7 】



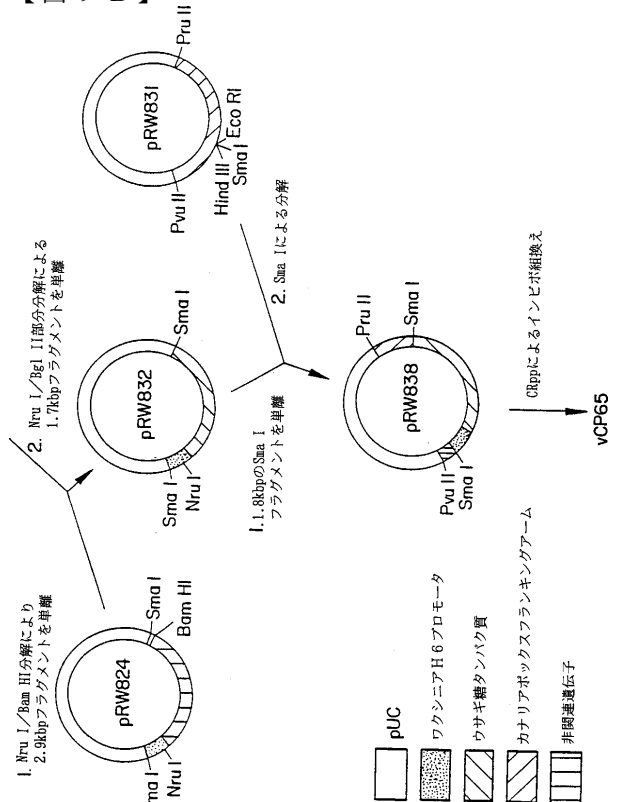
【図 8】

1	TGAATGTTAA	ATGTTATCAT	TGTGATGAAG	CTATAAATAT	GCATTGGAAA	AATAATTCAT
61	TATAAGAAAG	TGCTCAAAAT	CTACAAAACG	TAAAGCGATA	GATGTAACTA	AGACCTTATC
121	TTAACGACGC	TTTAAATATA	CACAAATAAA	CTATAACTA	GATTAACCTA	ACCAATTAAC
181	AAAACTAAAA	TATTAATATA	GGAATATGAA	TCTGTGAAT	ATCTCTGATA	AGGATGGGGT
241	TATAATTTTA	TATCAGCTGT	ATATCTATCA	TGTTATCGTA	TACTCTGATA	AGGATGGGGT
301	ACGAATATGC	AGAGATATAT	AGAGATTACG	ATTTAAGAGA	ATCTTGTCAT	GATAAATGGG
361	TTGACGATCG	TGTAATTAAT	TATTTCCGCA	CGTTACATAA	AGCTAGTTCG	AAAGATGAAT
421	GGATACCAAG	TATATATATC	GGTGCAAAAT	TGTTAAATAA	CAGCATCTCT	TCCGGAAGTA
481	TAAAGAGATG	AGATTATCTC	GAATTTGTAT	TGTTGGATAA	ACACAGATCT	CGAAATATCT
541	CGACATCGTG	TAAITCTTCT	ATGTTTATAT	TGTTGTACAA	TAAAAGGCCA	TATTCTCCAA
601	AAACTTTTGT	TTCCTGTAAT	TTCCTGTAAT	TATATATATC	AGATATTATG	AGGATTAATC
661	TGAAGCTGT	TCCAGCAGGG	TIGTGTAAAA	CACAAAAAAT	ATACATCAAT	TGAAAAAGTA
721	TATATAGCTT	TGAGGCTAT	CTATGGATAT	GACAAATCAT	CTCTAAATAG	ATGCTGGGTC
781	AGTGTACGAT	CTGACTAAC	GGAAATATGG	ACTTCAACAT	CCTCTCTGTA	AATGGCTGTA
841	AGTGTACGAT	CACTCTGAGG	TATATAAAAT	TGTTGAGATG	TGTGGAGACT	CACTCTGAGT
901	AAAGATATCA	TGAAGAAATG	CTTCTCATAT	CGCGTGTGTA	GAGACGACTA	ACAAATATGT
961	TGTTGTTGGT	CAGCTTATAT	TATCAACAG	AAATGTTCTT	ACCTCGGGAG	TCTTATCCCT
1021	CGGATGTATG	ATTATTTCAA	CACGAGTCGG	TAACTCTCTT	ACCTCTCTAT	GGCTCATTCG
1081	TGTTGTTGGT	CAATGTTGTA	ACTCTTATGT	ACAAAGGTCG	CTGATATAGT	CTCTCTGGAT
1141	AAAAATTTAA	TGCTCTCTTT	AATGATCGCT	GTACAAATCT	GAAATAATGA	CCAGCTGTAA
1201	AACTATGGGAC	AAAAAAAATA	AATGTGCAGA	ACTGCGGAAA	ATTGATCTCT	GAATTAAGTA
1261	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1321	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1381	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1441	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1501	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1561	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1621	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1681	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1741	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1801	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1861	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1921	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
1981	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2041	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2101	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2161	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2221	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2281	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2341	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2401	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2461	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2521	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2581	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2641	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2701	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2761	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2821	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2881	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
2941	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
3001	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
3061	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
3121	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA
3181	AACTATGGGAC	AAAAAGAGTG	CTCAGGCTAT	TGTTCAACAA	AGGAGCAGAT	GTAATTAAGTA

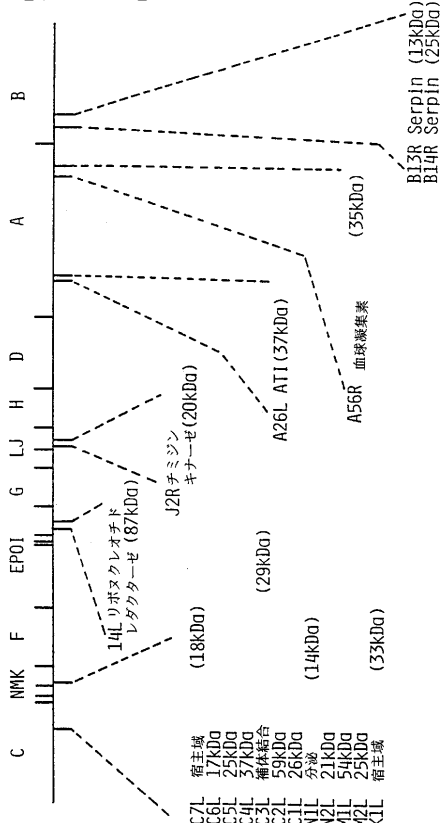
【図 9 A】



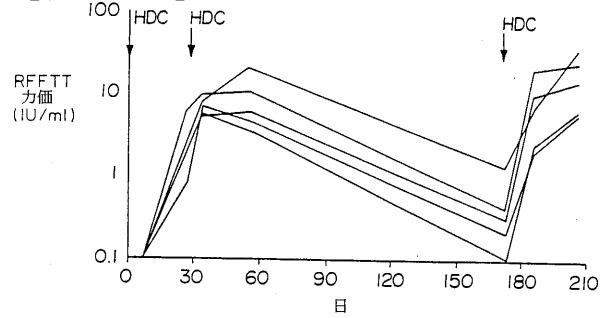
【図 9 B】



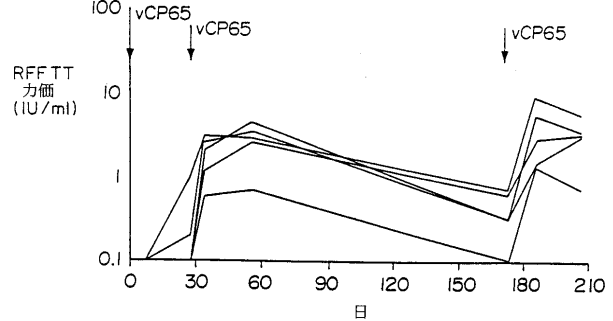
【図 10】



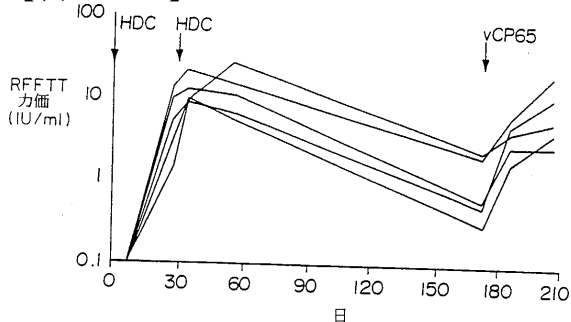
【図 11 A】



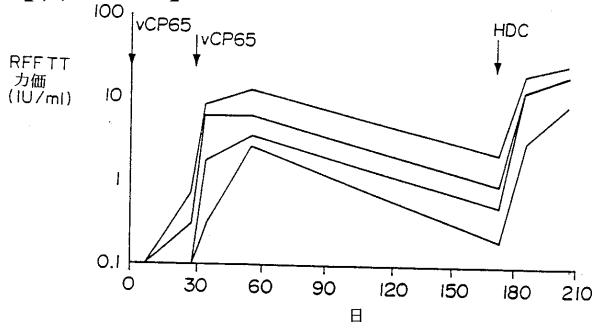
【図 11 C】



【図 11 B】



【図 11 D】



【図 12】

1 ATGGAATCCA GGATCTGGTG CCGGTAGTC TGGGTTAACT TGTGTATCGT CTGTCGGGT
 61 GTGCGGGTTT CCTCATCTTC TTCTCGATCC GGTTCATCTC CTCACAGTCA CCATTCCTCT
 121 CATACGACGT CTGCTGCTCA TAACGAGACC ATCTACAGCA CTACCCCTCA GTACGGGATG
 181 CAAACGGTCA GCGATGGTGT TAACGAGACC ATCTACAGCA CTACCCCTCA GTACGGGATG
 241 GTGGTGGGGG TCAACACCCG CAAGTACCCC TATCCGGTGT GTTCTATGCG ACAGGGTACG
 301 GATCTTATTC GCTTTGAACG TAATATCGTC TGCACCTCGA TGAAGCCCAT CATGTAAAGC
 361 CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTCTACAAA CGCAACATCG TCGCGCACAC CTTTAAAGTA
 421 CSAGTCTACC AGAAGGTTTT GACGTTTCGT CGTAGCTACG CTTACATCCA CACCACTTAT
 481 CTGCTGGGCA AGTCTACAG TTCTACACGC CGGCTTATAG GGGAGATTCA TCATATCAAC
 541 AGTACAGCTC AGTCTACAG TTCTACACGC CGGCTTATAG GGGAGATTCA TCATATCAAC
 601 TATCATAGGG ACAGCTATGA AACAACACGC ATGCAATTAG CAGGCACGGT TTTCTGGTCT
 661 ACCCAGCTA CCCGTTACGT GACCGTCAAG GATCAATTAG TGGCCGACGA TTTTCCAAAC
 721 CTCTATCGTG AGACCTGTA TCTGAATTGT ATGCTGACCA TCACTACTCG CAGCAGCTGG
 781 TATCCCTATC ATTTTTCGCG AACTTCCAGG GGTGATGTGG TTGACATTTC TCCCTTCTAC
 841 AACGGAACCT ATCGCAATGC CAGCTATTTT GGAGAAAAGG CCGACAAGTT TTTCAATTTT
 901 CCGAATCTCA CTATCGTCTC GACTTTTGA AGACCGAATT CTGCGTTAGA GACCCACAGG
 961 TTGGTGGCTT TTCTTGAACG TGGGACTCTA GTGATCTCCT GGGATATACA GGACGAGAGG
 1021 AATGTTACTT GTCAACTCAC TTTCGCGGAA GCCTCGGAAC GCACCATTCG TTCCGAGGCC
 1081 GAGGACTCTG ATCACTTTTC TGGGACTCTA GTGATCTCCT GGGATATACA GGACGAGAGG
 1141 GAGGTGAACA TGTCCGACTC TGGGACTCTA GTGATCTCCT GGGATATACA GGACGAGAGG
 1201 CAGCAGATT TCAATCTCTC ATCAATCTCA TGGCAAGGTA TCAAGCAAAA CTTCTGGTGT
 1261 TTTGAAACCA CTGGTGGTTT GGTGGTCTTC TGGCAAGGTA TCAAGCAAAA CTTCTGGTGT
 1321 GAATCGAAC GTTGGGCGAA CCGCTCCAGT CTGAATCTTA CTCTAATATG AACTCTGTC
 1381 AGTACAGATG GCAACAATGC AACTCATTTA TCCAAATAGG AGTCCGTTGA CAATCTGTC
 1441 TAGCGCCAGC TGCAGTTTAC CTATGACAGC TTGCGCGGTT AGATCAACCG GCGCTGGGCC
 1501 GAAATCGCAG AAGCCTGGTG TGTGGATCAA CGGCGCACCC TAGAGTCTCT CAAGGAAGTT
 1561 AGCAGATACA ACCCTCAGC TATCTCTCTG GCGCTGACCA TTAACCAAGC TGGCGCGGCT
 1621 TTAGTGGGTG ATGCTCTGGG TCTGCGCAGC TGGCTGACCA TTAACCAAGC TGGCGCGGCT
 1681 GTCTGGGTG ATATGAATGT CAGTACGCTG TGTGAGGAA TGTCTCTGAG GCGCTGGGCC
 1741 ATCTTTAATT TGGCCACAGC CACTGAGGAA TGTGAGGAA TGTCTCTGAG GCGCTGGGCC
 1801 ATCTTTAATT TGGCCACAGC CACTGAGGAA TGTGAGGAA TGTCTCTGAG GCGCTGGGCC
 1861 GCGCGCAACT CGGCTCAGCA GTACGTTGAG TACCTCTTCA AACGCATGAT TGACCTCAGC
 1921 AGCATCTCCA CCGTCGACAG CATGATCGCC CTAGACATCG ACCCGTGGGA AACACCCAGC
 1981 TTAGGAGTAC TGGAACTTTA CTGCGAGAAA GAATTGCGTT CCAGCAACGT TTTTGAATCT
 2041 GAGGAGATCA TGGCGAGATT CAATTCTGAT AAGCAGCGGG TAAAGTACGT GGAGGACAG
 2101 CTAGTGCAGC CGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG GCGCTGGGCC
 2161 GCGCGGGGAA AGCGCTTGGG CCGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG
 2221 GCGCGGGGAA AGCGCTTGGG CCGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG
 2281 GCGCGGGGAA AGCGCTTGGG CCGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG
 2341 GCGCGGGGAA AGCGCTTGGG CCGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG
 2401 GCGCGGGGAA AGCGCTTGGG CCGCTCGGCC CTACCTCAAG GGTCTGGAGC ACCTCATGAG
 2461 TCTGTTGCGA AAGACACGCT GTTACAGGCT CCGCTCTCCT ACGAGGAAAG TGTTTATAT
 2521 ACCAACGAGC AGGCTTACCA GATGCTTCTG GCGCTGGTCC GTCTGGAGCA AGAGCAGCA
 2581 GCGCGGAGCA ACGGTACAGA TTCTTTGGAC ACTCGGACAC CGCAAAAACG GGTACCGACA
 2641 AAGCGGAGCA AAGGAGAGCT CTGA
 2701 TCCGACGAG AAGGAGAGCT CTGA

【図 13 A】

1 AAGCTTTTTC GATCAATAAA TGGATCCAGAA CCAGTATCTC TTAACGATGT TCTTCGCAGA
61 TGAATGATCA TTTTAAAGT ATTTGGCTGAT TCAAGATGAT GAATCTTCAT TATTCGATAT
121 ATTGCAAAAT ACTCAATATC TAGACTTTCT GTTATTATTA TTGATCCAAT CAAAATAA
181 ATTAGAAGGC TTCTCAGATC GTTATGAATC GTTATCAGAG GAATACAGAC AATTGACAAA
241 ATTACAGACG TCTCAGATC GTTATGAATC GTTATCAGAG GAATACAGAC AATTGACAAA
301 AAGGCTCAAA CTAAATAAAG GTTATGAATC GTTATCAGAG GAATACAGAC AATTGACAAA
361 AAAAGATATC TCTCTAGCTA CCACGCCAAT AGATCTCTAT AATAAGATGA ACATTAATTA
421 CGATATCGCA TTTTCTAAGC TGATGGATAT ATTAAGATGA AATAAGATGA ACATTAATTA
481 ATTCTTTAT TGTCACTATG CTACCCGGGA GTTCTCTGCT TCTCTCTGCT TCTCTCTGCT
541 CTATAAATA TCACAACTGT CTCTGCTGCT TTTTGTCTAG TTTTGTCTAG TTTTGTCTAG
601 TCAGACGCTC AGCAGGTTCG TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
661 CAGTGGCTCT AGCAGGTTCG TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
721 AGAATCTCTA GCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
781 CATCTGCTAA GCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
841 TGGTCCCGGT CTTTGGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
901 TAACGACGTG TCTTGGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
961 GGGAAAGAGG TCTTGGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT TCTCTGCTGCT
1021 AATGATAAAT ACAGAGCGCTA TGGCCACAGG GCGCCGCCAG TCTCCACGTAC TTTACCGGCT
1081 GAGGAAGGTG GCAAGCGCTT GCGCCGCCAG TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1141 TAGCCCAAGC GCGTCTCCG GCGCCGCCAG TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1201 TAGGCGCGCG AGCGGCTGCA TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1261 ATTGAACCTG CGCATGATCT TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1321 CGAGTAAAGT TCCAGTACCC TGAATCGGCT TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1381 CATGCTGCTG ACAGGTGAGA TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1441 GTACTCTGAG CGCAGATTCG TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1501 AGTGGCGTGG TTGCCAACA GATATTCTGT TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1561 CGAGCTTTTG GCAAAATTA AGATGACCA CACCTCTGAC TCTCCACGTAC TTTACCGGCT
1621 CTCTCATTCT ATATCAGCA CACCTCTGAC TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1681 CAGACCCAGC ACATACCCA TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1741 AATAGCTGAC GGGTTGATCT TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1801 CACACACAGC GCTTCTGCA TCTCCACGTAC TTTACCGGCT TTTACCGGCT TTTACCGGCT
1861 ATAGGTGAAC TGCAGCTGGG GTGACACAG GCGCCGCCAG TCTCCACGTAC TTTACCGGCT
1921 AGTGGCTATT TTGCCATCTG TACTTCTTTT GGTCTCTATA TGAATAGAT TGAATAGAT
1981 CGGTGCTGGC AAAAGTTCGA GTTCCACAG AGATTTTTCG TGAATAGAT TGAATAGAT
2041 CACCAACACA CAGGTGCTTT CAAAGACGGA CAGCTTTTCA TATTTTTCAT ATGTTTTCAT
2101 CTATGAGTGA GCTGAAATCT GCTGTAACTT ATTTATGGCC TCATCAGTA CACAGTCCAG
2161 CGCAGAGCTG GACATACCTG CTTCTGCTCT CTTAGATAAG AAAGTGGCGG TCAATTTTGGC
2221 AGAAGAAAGT TGATAAGGAT GGAACGAATG GTGCGTCCG AGGCTTCCCA AGGCTTCCCA
2281 GAAAGTGAAT TGATAAGGAT GGAACGAATG GTGCGTCCG AGGCTTCCCA AGGCTTCCCA
2341 CGCAGCTTCA AGAAGAGCCA CCAACCTGCT GTGCGTCCG AGGCTTCCCA AGGCTTCCCA
2401 TCTGGGAGAG ATAGTGTAGT TCGGAAATAT GGAACGAATG GTGCGTCCG AGGCTTCCCA
2461 GCTGGCAATG CAGTGTAGTCT CGTGTAGTAA AGGAAGAAATG TCAACACCAT CACCCGTGGA
2521 AGTTCGCAAA AATGATAGAG GATACTTTGA GCGCGCAGTA CCAATCAAT CCAATCAAT
2581 CAGATGAGAT CAGTGTAGTCT CGTGTAGTAA AGGAAGAAATG TCAACACCAT CACCCGTGGA
2641 CCGTCACTGA CCGTGTAGTCT CGTGTAGTAA AGGAAGAAATG TCAACACCAT CACCCGTGGA
2701 GTTTCTATAG CTGTCCTATG GATTTCTGCT GCGCTGCTG TCAATTAAT CAGTGTGCT
2761 GGAAGCTGAG CAGTGTAGTCT CGTGTAGTAA AGGAAGAAATG TCAACACCAT CACCCGTGGA
2821 GTATTCCGCT GTCTGCGCCA CAGATTAAGT GGTGTGAGAT TGAAGTGAAT TGAAGTGAAT
2881 CGTCAAAACG TCTGTGTAGA CTGTGACTCT AAAGGTGTG GGTGTGAGAT TGAAGTGAAT
2941 GACACACGAT ATGCGCTCTG CAGGCTCTCT ATGATGTGCG TCGACAGAT TCGACAGAT
3001 ATTACGTTCA AAGCGAATCA GATCCCTATC CTGAGCCTAA GAACACAGC GATGAGGGA
3061 CTGGTGGTGG TTGACCCCA CACATCTCTC GTACTTGAG GTAGTGTGT AGATGTGCTC

【図 13 B】

3121 GTTAAACACA TGGCTGACCG TTTGGGAAGA AGTTACGCGT TGAGAGACTG AACCGGATCG
3181 AGAATGAGCA GCAGACGCTG TATGAGAGGA ATGGTGTAGT TGAGAGACTG AACCGGATCG
3241 AGTAGAGATG GAGGAACCGG CAGCACCAGC ACAGACGATA CCAAGATTA CCAAGATTA
3301 CAGCAGCAG ATCTCTGATC CCATTACGAT ACATCACTTA CCGATATTCG GATAATGAA
3361 TAATTTATGA TTATTTCTCG TTCTCAATTT AACCAACACC TCAAGAACCT TGTATTATTA
3421 TTCTACTTTT AAGTATAGAA GTTATGAGAA GTTATGAGAA GTTATGAGAA GTTATGAGAA
3481 GGTCGACTCT AGAGGATCCG TATGTTAGCG CCGCTCAAT AACTAATAT AACTAATAT
3541 AAACGATCTG TAGTTAGCGG CCGCTCAAT AACTAATAT AACTAATAT AACTAATAT
3601 TAAAAATAA CATTGATTAA ATTTAATAT AACTAATAT AACTAATAT AACTAATAT
3661 ATAAACGCTT TATGTTATTT GAGGAATATG ATATAGAGT ATATAGAGT ATATAGAGT
3721 CAAATAGAGT TATGTTATTT TATGTTATTT TATGTTATTT TATGTTATTT TATGTTATTT
3781 TATTTTCTCT TAGTAAAGAT TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG
3841 TAGGATCGCG TCTCTGTTAG TCTCTGTTAG TCTCTGTTAG TCTCTGTTAG TCTCTGTTAG
3901 GTGATGTGAC TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG
4021 AACTGCTATC TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG
4081 AACTGCTATC TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG TCTAGTAAAG
4141 TAAACCCGCT GCGCTCTAGT CTAAATATGA GATCCCTCTA TCCAGATCAA TGGATCAGG
4201 ACTTTTATAT CCCCACGGT AATAAATATG TACAACCTTT TCGCTCTTCA TATTCACTG

【図 14 A】

1 AGATATTTGT TAGCTTCTGC CGGAGATACC GTGAAATCT ATTTCTGGA AGGAAAGGGA
61 GGTCTTATG ATGTTCTGAG CAGAGTAGGT TCTCTCTAATG ACAGAGACAA TAGTAAATCT
121 TGTCTAGGAG GTCTCAATCT AGAGTTTCAA ACTGATCATC AGGTGTTGAT AACTCTGAT
181 TGTACGAGTC TCTTCAAGT CTTTCAAGT CTTTCAAGT CTTTCAAGT CTTTCAAGT
241 ACTGATTTAT TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG
301 CGATCTAGAA GTCTAATAGC TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG
361 CCAAAACCTA CAAATATAGG AGAAGCTCTT TTTCTATCTG TTTCTATCTG TTTCTATCTG
421 CTATTACTAC TCAAAAGATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
481 AAGACTAAGG CTGTAAGATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
541 TATGTTCTGT AGATCAGTAA GTTATAGTAA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
601 CTTAAATATA ATCTGATACA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
661 TCAATAGTAA GTTATAGTAA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
721 TAAAGAGCAG GATCTCTATG TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
781 ATATTCTTAA GTTATAGTAA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
841 TATAGCTGAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
901 GAACTAATTT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
961 ATGATTAAGT GATGATATAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1021 ATATAGTATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1081 CTTACTAAGA AACTAGTAA ATACATATAT ACTAAGCCCA TTTTACTATC TTTTACTATC
1141 GTATTAATCT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1201 ATGATATATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1261 AATTAATATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1321 GTATCTCTTA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1381 AAGCTAAGT CTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1441 TAATATTAAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1501 CAAACATGTT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1561 TACTTAAAGG AGATATTAAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1621 AACATTTAGA CATTAATATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1681 TAGATAAGAA CAATCTGATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1741 TTTAACTCTT ATTTAAAGT GCGCGAATG TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1801 TTTTCTCATC CCGAGGATTA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1861 ACAAACCTAA CTTTAAAGT GTGAAATAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1921 TAGATATATA TTTTAAAGT GTGAAATAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
1981 AAGCAATGTT TTTTAAAGT GTGAAATAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2041 CAGGATGTTT TTTTAAAGT GTGAAATAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2101 TATTAAGCAT TGTCTGATA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2161 GAGCAGAGT TAAATAGTGT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2221 TTAACAATA TGTATATGTT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2281 CGGAAGATGG TAGACGCTGT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2341 ATGATGTGCT TAGCTATGGA AGTCACTATA CAGCGGTAGA TACTTATGCT TTTTACTATC
2401 TATCTGATTA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2461 TAGAGATGTT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2521 CTATGATGAT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2581 TACTTAAAGG TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2641 CTGATATAGT TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2701 AACTCTAGG TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2761 ATCAATATAA AAAAGTATTA CTGTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2821 TTTGATGTTT AGTATATATA ACTGATATTA TTTTACTATC TTTTACTATC TTTTACTATC
2881 GAGCGTTATC ATTTAAATGA AATAAAGGTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA
2941 ATGCGAGGTA ATTTAAAGTA AATAAAGGTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA
3001 ATGCGAGGTA ATTTAAAGTA AATAAAGGTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA ATACAAGCTA

【図 14 B】

3061 TTTTAACTTT TACGACGTTA GGTTAGATAC TGATGTTACA GATTATAATA ATGTTACAAT
3121 AAAATACATG ACAGGATGCT XATTTTTTTC TCAATATACT TCTGGAATAG CAATATATGA
3181 TCAATGTGAT AGATTTGAAA ATTTCAAAA GCAAAATACG TATCAAGATG TATCAAGATG
3241 TCTTATAGTC TCTTAAAGAT AGATGTGTTT TCTTAAAGAT TATCAAGATG TATCAAGATG
3301 AGCGAAAGGA TGGCGTGTAG TTTAGAAATC GGAGGTATCT GGAGGTATCT GGAGGTATCT
3361 AAATGCTCTG CTGAATGCGG TACCCTGTTC GAAGGACGCT GGAGGACGCT GGAGGACGCT
3421 TAATCCGTGG AATCCTCACA TAACAGTAGG ATATGTTAAG GAGGACGATG GAGGACGATG
3481 GTATTATATA GTATCTAAGT ATTTGGTATA ATTTTATAA TATGATAAT TATGATAAT
3541 ATAAATACGA TGATAACGGT TTTTATAGA ATAAATAGA GATAATATCA TATGATAAT
3601 TAATACTTCA TTACCAGAAA TGAGTAAAGG AAGACTTATA AATGAATCTG ATAAAGCTAT
3661 TAGTAAAGTA GATTAATAAT TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA
3721 AATATATA TCAAGCTGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA
3781 ATATATATA GAAACGCTG TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA
3841 ATATATATA GAAACGCTG TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA TATGAAAGTA
3901 TGCTAGTTTA GATAATACAG AAGGTGTTAA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
3961 ACAGATACAT TCTGGAATA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4021 TGTACTGTAT GATAAGTAT TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4081 TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4141 TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4201 TATGATATTA ATTAGGATAT TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4261 CCAATTAACAG TATCTCATAA AGGACTTAA AATATATAG ATTAGGATAT TTTTATAGA
4321 ACTTATATAA CAGGAGGTGC ATTAATAGAA AATATATAG ATTAGGATAT TTTTATAGA
4381 TCTTCTGCTA ATTAATAGAA AATATATAG ATTAGGATAT TTTTATAGA TTTTATAGA
4441 TATCAGGATG ATAGATGACT GTATGGGAGG TCCCTTACAT TACGCTGTTT CAGGATAGCA
4501 TATCAGGATG ATAGATGACT GTATGGGAGG TCCCTTACAT TACGCTGTTT CAGGATAGCA
4561 TATGATACCC GTTCTTAAAT TATGATACAG AAGGTGTTAA TTTTATAGA TTTTATAGA
4621 ACTGAAAGTAC GTTACTGATA CAACTGATTA ATTTTGAAC TCCCTTACAT TACGCTGTTT
4681 TATGAAAGT AGAATATATA ATATAGTATA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4741 CGTCTATAAT CATTAAGGTT TCACTCTCTC ATACATGGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4801 ATTTGTATA CTCTTACTTG ACCAGGCTGC TTACGATATG TTTTATAGA TTTTATAGA
4861 AATATCTCT TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA TTTTATAGA
4921 ATCTTATAAC CCGGACTATA ATTTCTTAAA TAATCAGGCT AATACGCTC TTTTATAGA
4981 TAGCTTTTAT GATGACAAGA TATCTATAT GATAATATG ATTAGGATAT TTTTATAGA
5041 TAAATATCTT GAAATAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5101 TATTAAGGA CTACTATCTA TAAAGAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5161 TATTAAGGA CTACTATCTA TAAAGAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5221 GATAAAGTCT GTACTATCTA TAAAGAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5281 GAAATATATA CGGAAAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5341 GATAAAGTCT GTACTATCTA TAAAGAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5401 AGTATAGTAA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5461 AGTATAGTAA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5521 GAAATATATA CGGAAAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5581 AGAATATGAT TATTTAAGTA AAGTATAGT ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5641 ATAAATAGT TATTTAAGTA AAGTATAGT ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5701 AATTTATCT CTATAGATG ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5761 ATAAATAGT TATTTAAGTA AAGTATAGT ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5821 TCAAAATATC AAGATATGTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5881 ATATGATAT ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA ATTTAGCTA
5941 TACGAGAGG ATAGATATTA TAGATCTTTT GATAATATAA GGAATAGTA TAAATATTA
6001 TACGAGAGG ATAGATATTA TAGATCTTTT GATAATATAA GGAATAGTA TAAATATTA

【図 14 C】

```

6121 ACCACTAGCG TGTGCCGTTA ATACTTGCAA CGAGTACTA GTAGATATTC TGTAAATAA
6181 TGATGCGAAT CCTGATTCAAT CCTCCTCAT TTTTITAGGT ACTAATGTGT TACATACAGC
6241 CGTAGGTACC GGTAAATATAG ATATTGTAG ATCTTTTACTT ACCTGCTGGT CCAATCCCTAA
6301 TGATAGGAGT AAATCTGGAG TTACTCCTTT GCACGTTGCT GCAGCTGAAT AAGACAGTTA
6361 TCTGTAAATG GAGATGCTAC TAGATAGCGG GGCAGATCCA AATATAAAAT GGGCAAGCGG
6421 TTTTACTCCT TGTTTTAAAT CAGTATATGA TCATAACCGT ATAAAGTTAT TATCTTTCTA
6481 CGGGCTGATG AATATATTTA ATTCATAAT ATCTTACTAT TATCTTACAA ATATACTCTA
6541 TTTTGTAAAT AATATATTTA ATTCATAAT ATCTTACTAT TATCTTACAA ATATACTCTA
6601 ATATACAGAT GAAGATTTGT TTCCACCTGG TATGATAAAA AATTTAAACT TTATGAATC
6661 AAACGATAGT CTTAAAGTTA TACCTTAAAT GGAGCTTTTA GAGGAAGAGG AAGAAGATGA
6721 TAAAGACATA GATGCAGATA ACCTATTATT ATCTTAAATA GTAATTTAAAT CATTGAAATA
6781 AATAGACAGA TGGCATACTA CATGTAAAT ATCTTAAATA GTAATTTAAAT CATTGAAATA
6841 TTAAGTTACA AGATGAATCGA GGTCACTTAT TACCTTTCTT TGAATTTAAAT CATTGAAATA
6901 TTTATACGTT AGTAAATCTT AACGATGTAA TACGTGTCTG TGAATTTAAAT CATTGAAATA
6961 GATGTTTGTG AATATAAAGA AATGAAGAAA ATCAGTCACC TGTATATATA GCTATATACA
7021 AAGGACTTTA TGAATGACTT GAAATGTTAT TGTATAATAA TCCAAGTTA GCTATATACA
7081 TACCTTTCTT AATATAGCTT GCTAATAATA ATGACTTACC TATGATAAAA TATTGATATC
7141 AATAGCGGCG AAAATTTAAAT GATATTATTAT TAAGGGACAC AGCAATTAATG ATAGCTTTCT
7201 CAAGATGTTA CTTGATATA GCTGAATATT TACTTTTCAAT AGGAGCAGAA TTTGTTAAAT
7261 AGACACATTA GGTATATATT AAATATCTAT CAAAAGATGC GTATGAATTA CTTTITTAGAT
7321 TTAATTTATG CGTTAATATA ATAGATTGAG A

```

【図 15 A】

```

1 AGATATTGTT TAGCTTCTGC CGGAGATACC GTGAAAATCT ATTTTCTGGA AGGAAAGGGA
61 GGTCTTATCT ATTCTGTCAG CAGAGTAGGT TCCTCTAATG ACGAAGACAA TAGTGAATAC
121 TTGCATGAAG GTCACTGTGT AGAGTTCAAA ACTGATCATC AGTGTITGAT AACTCTAGCG
181 TGTAGAGTCT CTCTATACAC TGTGCTTTAT AAAAGGATAA AGACACCTAT
241 ACTGATTCTAT TTCTATCTGT CAACCTTTCT CTAAGAGATT CATAGGTATT ATTAATACAT
301 CGATCTAGAA GTCTAATPAC GTCTAATPAC AGAAGCTTCT CTTATGAATC ATTAACGGCT
361 CCATAAAGCTA CAAATATAGG AGAAGCTTCT CTTATGAATC ATTAACGGCT
421 CTATTACTAC TCAAAAGAGA TATTACATTA ATATGCTGAT GAGGCATCTA TTAACCTCTA
481 AAAGCTAAGC CTGTAGAAGC TGTATTGAAG ATATCTTTAT GAGCATATAT CAGATATATT
541 TTAGTITCTGT AGATCAGTAA CGTATAGCAT ACAGATATAA TTATCTGAGG TAGTAGTAT
601 CCTAAAATHA ATCTGATACA GATAATAACT TTGTAATCA ATTCCAGCAAT TTCTCTATTA
661 TCATGATAAT GATTAAATACA CAGCGTGTCT TTATTTTITG TTACGATAGT ATTTCTAAAG
721 TAAAGAGCAG GAATCCCTAG TAATAATAGAA ATAATCCATA TGAAAAATAT AGTAATGTAC
781 ATATTCTTAA TGTATACATA TTTATAGGTA AATCCAGGAA GGGTAATTTT TACATATCTA
841 TATAGCGTTA TTACAGTTAT TAATAAAGAA CTGCAAAAGA AATTAATCTA TATGTATATA
901 GAACTAATTT TACAAAGTGC TTATCCAAA TGCCAAAGGA AATTAATCTA TATGTATATA
961 ATGTATAAAG GTATGAATAT CACAAACAGC AAATCGGCTA TTCCCAAGTT TTCTCTATTA
1021 ATAATAGATA TATTTCTAGA TACCATTAA ATCCCTATAA GCTTGCAGT TCCCTATATG
1081 CCTACTAAGA AAACTAGAAG ATACATACAT ACTAACGCCA TCAGAGAGTA ACTACTCTA
1141 GTATAAGTCT TGTTGCTAAC AGTGACACTG ACTGATATT TATTTTCAIT ATATACATTA TAGTATATAA
1201 ACTATATAAT ACTATATTAC ATGTGATATT TATTTTCAIT ATATACATTA TAGTATATAA
1261 ATATATATT GTATAATTAT ATTAATTAT ATATATTAT TCAGTGTAGA AAGTAAATAT AGTAAATAT
1321 GTATCTCTTA TTTTAACTTT ATTAGTAAAG TATGTACTAT TCAATTTATG TGTGTTATTA
1381 AAGCTAAATG CTACTAGATT GATATAAATG GATATAAATG AATTAATCTA TATGTATATA
1441 TAATATTAACT TCAATTTTGA CTAAATAGCT TCAATTTTGA TCAATTTTGA TCAATTTTGA
1501 GACCGGTGCG ATGCAAGCTT ATAAATAATC CAACTCTCTG TCCTCTCTG AGTCTTTTCA
1561 TTTTITTTCT CTCTGCTTCA GACGTTCTCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1621 CCCTTTTTCG GGTGCTGCG GTGCTGCTG AGGTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1681 CAGTCTGCTG CGTCCAAAGA ATCTGTACC TTCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1741 CGAGCCAGAG CAGAAGCAT CTGCTGAGCG TTCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1801 GATGCTCAG ACACCGTGG TCCGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1861 TAGGAAGCGC GACCTCTGTA CGAGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1921 TCGGCGGACA CAGATAGGAG AAGAGGCTTC TCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
1981 CGAGTATAGA TCAATAAAT GATAATGAGT AAGAGGCTTC TCTGCTGCT TCCTGCTGCT
2041 GCTCCGAGAG GTTTTTTGA GAGGTGCTG CCAAGGCTTC TCTGCTGCT TCCTGCTGCT
2101 CCCACGCGCC CAATGGCTAC GCCAACGCGC TTCCGCGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
2161 TCGTCCAGAC CTTGAGGTA GGGCGGCGC GGGTGCATCA CTTGCTGCT TCCTGCTGCT
2221 ACCCGCTGCT TATACGAATT GAACTCGGCT GAACTCGGCT GAACTCGGCT GAACTCGGCT
2281 GAACGCAATT CTTTCTGCGA GTAAAGTTCC AGTACCTGTA AGTACCTGTA AGTACCTGTA
2341 TCGAAGAGTA GGGCGATCAT GCTGTGCGAG GCTGTGCGAG GCTGTGCGAG GCTGTGCGAG
2401 TTTGAAGAGT AGTCCAGTA CTCTAGGCTC GAGTGTGCGG GAGTGTGCGG GAGTGTGCGG
2461 GGAAGCTGAC ATCTCTCAGT GCGGTGCTG CCGAAGAGTA CCGAAGAGTA CCGAAGAGTA
2521 TACCGCTACT GACGCTACGA GCTGTGCGC GCTGTGCGC GCTGTGCGC GCTGTGCGC
2581 CAGGCTCTGT GCGATTCTTT CACATTCTTA TCACGAGCA CCGTCAAGCT GCGTGTGCT
2641 ATGGTCAAGC AGCTGGCCAG ACCCAGGACA ACCCAGGACA ACCCAGGACA ACCCAGGACA
2701 TTTAGATAGG CCGAGAGAA AGCTGACGGG TTGATCTTGC TAGTCTTGC TAGTCTTGC
2761 AGGTTGCGCC GTTATCCAC ACACAGGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT TCCTGCTGCT
2821 CCGCCGSCA AGCTGTCTTA GGTGAAGTGC AGCTGGGCTG AGCCAGAGT AGCCAGAGT
2881 TTAAGATAGT TCAAAATAGT TGCATTGTG TGCATTGTG TGCATTGTG TGCATTGTG
2941 GTAAAGTATG CAGTGGAGTA CAGGCTGCTA GCTGTGCTA GCTGTGCTA GCTGTGCTA
3001 ATACTGTGCC AGAACCCAC TAAAGTATG TAAAGTATG TAAAGTATG TAAAGTATG
3061 TTTTCAATG TTTGATTGTA TGAAGTATG TGAAGTATG TGAAGTATG TGAAGTATG

```

【図 15 B】

```

3121 TCACGTACAC AGTCCAGCGC AGAGTCCGAC ATGTTCCACCT CTGCTTCTCT AGATAAGAAA
3181 GTGGCGGTGA TTTTGGGAGA AGTAAAGTGA TACGAGTCTC CTGCTTCTCT AGATAAGAAA
3241 CGTTCCGAGG CTCCCGAGGA AGTAAAGTGA TACGAGTCTC CTGCTTCTCT AGATAAGAAA
3301 CAGGAGATCA CTGAGTCCGC ACCTTCAAGA AAAGCCACCA CTGCTTCTCT AGATAAGAAA
3361 GAATTCGGTC TTTTCAAGTC GGAGACGATA GTGTAGTCTC CTGCTTCTCT AGATAAGAAA
3421 GCTTTTCTCT CAAATATAGT GCGATTGGGA TTAGTCTCCG TGTAGAAAGG CCGAGTGTGC
3481 ACCACATCAC CCGTGGAAAT TCGGAAAAAT TGATAGGAA CTGTTGAGGCT CCGAGTGTGC
3541 ATGGTTCACG TACAATTCAG ATTACAGGTC TCAGATAGAT AAGCCACGAA AACCGTGCTC
3601 TCCGATTCAT CCGTGAAGCT CACGTTAAGG GTACTGTGGG TGTGGAATA ATCGTGGGCT
3661 ATTAATTCGA CCGTGTAGGA ACTGTAAGC TGTGAGTCTC TGTGAGTCTC TGTGAGTCTC
3721 GCTATACGCG GCGCTGTAGG TCCGTTATGAT AAGCCACGAA AACCGTGCTC TGTGAGTCTC
3781 CACATAGGAG GCGCCACGTA TCCGTTATGAT AAGCCACGAA AACCGTGCTC TGTGAGTCTC
3841 CGGTAGTCTC GCGCCACGTA TCCGTTATGAT AAGCCACGAA AACCGTGCTC TGTGAGTCTC
3901 ACGATGTTGC GTTGTAGAC CACCATGATG CCGTCTGCTA CCGTCTGCTA CCGTCTGCTA
3961 ATCGAGGTGC AGACGATAT ACCTTCAAGC CGAATAAGT CCGTCTGCTA CCGTCTGCTA
4021 CACAGCGCAT AGGGGTACTT GGTGTTGTTG ACCCCACCA CATCTCCGTA CTGAGGCTGA
4081 CTGCTGTAGA TGGTCTGTTT AACACCAATG CTGACCGTTT GGGAAAGAT GTAGCGTTGA
4141 GAGCTGAC CGAGTCGAGA ATGAGCAGCA GACCTCGTAT GAGAGGAATG GTAGCGTTGA
4201 GTAGCAGAG TTCCACAGAT GAGCAGATG GAAACCGCAG CACCCAGACA GACGATACAC
4261 AAGTTAAGCG AGACTACCA GACGAGATG GAAACCGCAG CACCCAGACA GACGATACAC
4321 ATATCGCGAT AATGAATAA TTTATGATTA TTTCTGCTT TACGATACA AACTTAAACG
4381 AGAACCTTTG TATTTATTTT CACTTTTAA GTATAGAATA AAGAGCTCT TCAATTTAAT
4441 GCTACAAATA GTTTCGTTT CACTTTTAA GTATAGAATA AAGAGCTCT TCAATTTAAT
4501 TTTATGACT AGTTAATCAA ATAAAAAGCA TACAAGCTAT TGCTTCTGCTA TCGTTACAAA
4561 ATGGCAGGAA TTTTGTGTA ACTAAGCCAC ATACTTGCCA ATGAAAAAAA TAGTAGAAAG
4621 GATATATATT TAATGGGATT AGATGTTAAG TTCTCTTGGG ATTATAGTAA CTGGGCTATC
4681 GTTAACTTTT ACAGCTTAGG GTTAGATCT CATATACTC ATGATACTA TGTTAACATA
4741 AATACATAGA CAGGATGTGA TATTTTCTCT CATATACTC ATGATACTA TGTTAACATA
4801 CAATGTGATA GATTGAAAA TTTCAAAAG GATGTGTTTT CCGTCAAGTA AGCCTTAAGA
4861 TCTATAGTCT GTAAAGAGA GATGTGTTTT CCGTCAAGTA AGCCTTAAGA
4921 GCGAAAGGAT GCGCTGTAGT TATGAAACTG GAGGTATCTG ATGAACTTGA CACATGAT
4981 AATGTTCTGC TGAATGCGGT ACCCTGTTGC AAGGACGTGT TGTGTGATAT CGAATAACAG
5041 AATCCGTGGA ATCCTCACAT AACAGTAGGA TATGTTAAG AGGACGATGT TCTAGGATAG
5101 AAACGCTTAA TGGAGTGCAT GTCCAGATTT AGGGGGCAAG AATACCAAGT TCTAGGATAG
5161 TATTAATAG ATCTAAGTA TTTGGTATA TTTGTTAAAT AGTATAATTA TAACAAATAA
5221 TAAATAACAT GATAACGGT TTTATTAGAA TAAAATAGAG ATAATATCAT AATGATATAT
5281 AATACTTCTA TACCAAGAA AGATATGGA AGACTTATAA ATGAAGTCTA TAAAGCTATA
5341 AGGTATAGAG ATATAAATTT AGTAAGTAT AGTATATAA AATGCAATAA CAATAACGTA
5401 AATATACAT CAACGTCTTT GTATTAGGCC GTAAAGTATT ATGATATAA AATGCAATAA
5461 TATTACTAG AACACGGTGC CGATATTTTA AATGTAAAA ATCCTCTCT TCAATAGCT
5521 GCTAGTTTAT AATAACAGA AATTGCTAAA CTACTAATAG ATTTCTGCTA TAAGTCTATA
5581 CAGATACATT CTGGAATATG TCCGTTATAT ATTTCTGCTA TAAGTCTATA TAAGTCTATA
5641 ACTAGATATT TATTAATAAA AGGTGTTAAT TGTATAGAT TCTTTCTAAA TTATTACGAT
5701 GTACGTATAT AATAGATATC TGTATATG TATATAAAT TTATAGATT TAATATTGAT
5761 CTTAATATAC TTAGGATATT TTTGAACT CCGTTACATT ACCTATATAA GTATAAGAT
5821 ATAGATTATA TTAGGATATT TTTGAACT CCGTTACATT ACCTATATAA GTATAAGAT
5881 CATAAACAGT ATCTCTATAA GGCATTTAAT AGTATATAA AATGCAATAA CAATAACGTA
5941 CTTATTAATC ACGGAGTGCC TATAAACGAA CAAGATGAT TGTAAATCT AGGACGCTA
6001 CATTCGGTAA TTAATAGAG AAAAGATGTA ACAGACTCTC ACCTGCTTTC ACCTGCTTTC
6061 ATAAACGATA TAGATGACTG TATGGGAGT CCCTTACAT ACCTGCTTTC ACCTGCTTTC
6121 ATCGAAACAA CAAGACATCT TTTAAGAAA GGATCTAAT TTAATGTTG TAATATCAT

```

【図 15 C】

```

6181 ATAGATACCG TTTTAAATAT AGCTGTTGCA TCTAAAAACA AAATATAGT AAATCTTATTA
6241 CTGAAGTACG GTACTGATAC AGATGTTGTA GATATGTTAT TATATGTTAT CTATGTAAAC
6301 ATAGAATAAG AAGATATTA CACTCTCTTA TACGTATATG TATGTTCTAT GAAAACAGAA
6361 GCTTAAATG ATAAAGGTTT CACTCTCTTA TACGTATATG TATGTTCTAT GAAAACAGAA
6421 TTTGTTAAAC TCTTACTTGA CCACGCTGCT TACGTATATG TATGTTCTAT GAAAACAGAA
6481 TTTGTTAAAC TCTTACTTGA CCACGCTGCT TACGTATATG TATGTTCTAT GAAAACAGAA
6541 TCTTATAAGC CCGACTATAA AGCTATATG ATATATATG AATGATGTTA GTTATCTGGA
6601 AGCTTTTITG ATGACAAGAT TACGTATATG ATATATATG AATGATGTTA GTTATCTGGA
6661 AATAGCTTAA TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT
6721 AATAAAGAC TACTATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT
6781 AATAAAGTAA ATCTATATA TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT
6841 GTAAAGTTTC TAATTAATCC TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT TACGATCTAT
6901 GAATAAATTA GAAATAATTA ATCATTAGCT TTTCTAGC TTTCTAGC TTTCTAGC
6961 GTAAAGTAA TATTAAGTAA TAATGATTTA CATTCTGTTA TCACAGCTG TGTAAACCTA
7021 GTAGTATAAA G

```

【図 16 A】

1 AAGCTTGGGG CCGCTCATT GACACGGGAA TGAGGGACGA AAACGTGGAG GAGGTATTAA
 61 GTTTGGAGAA ATGGAGAGAG AGCTTTTAAT AGCGCATGGC GCAGCCAAATA CTATTACAGA
 121 AGTTTGTGAAA GATTTCGGAGG AGATTATATC AGATGTGTAT GTTTGTGAAA ATATTGGAGA
 181 CATAGACGCA CAAATCAAGG GTATTAAATC ATGTCTTAGA TGTTCAAAAC TTAATCTCTC
 241 TCCTCTCTTTA CAAAATATG ATACCAACGA CGTATCTAAA GTATTCTCTA CTCAATATGA
 301 CGCCAGAGGG GTAAAAGTCA AATTAGATTT CGAACGAAGG CCTCCTTCGT TTTATAAAC
 361 ATTAGATAAA GTTGATCTCA AGCCGTCTTT TCTCGGTGTA TAAAATATTA TTAATTAATC
 421 GAGGGTACCG GATCCCCCAG CTATATAAAA TCACAAGTCT CGAGCATCTT TTTTGTCTAG
 481 TTTTTTTTTC TCCTCTTGCT TCAGACGTCT TCTTCTTCGT CGAGCATCTT CTAAGTGTGG
 541 TAGCCGCTTT TCGCGTTCGA CAGTGGCTGT AGCAGGTGGG GCTTCTGTCT CTAAGTGTGG
 601 GTCCGAGTCT GCGCGTTCGA AGAATCTGTA CGTTCCTGCT GCGCTCGCTG CTAAGTGTGG
 661 AGACGACCA GCGCGTTCGA CATCTCGGTA CCGTGTCTGT TGGTGTAAAG CGAGACCGCC
 721 GTGGATGCAAT GCGCGTTCGA TACCGTGGGT CTTTGGGTGT TGGCCGACGT CACGCTGTGC
 781 TCGTAGAAGG CGGAGACCTG TAACGACGCT TCTTGGGTGT TGGCCGACGT CACGCTGTGC
 841 CCGTGGCGCG ACACCAAGTA GGGAAAGGAG AATGATAAAT ACACGCGCTA CGACCGACGT
 901 TGTGAGTAT AGATCAAAAT AATGATAAAT ACACGCGCTA CGACCGACGT CACGCTGTGC
 961 TGTGAGTAT AGATCAAAAT AATGATAAAT ACACGCGCTA CGACCGACGT CACGCTGTGC
 1021 CCACCCACCG CCGCAATGGC TAGCCCAAGG GCGTTCGCT GCGCGCGCTA CGACCGACGT
 1081 AGGTGCTCCA GACCTCTGAG GTAGGGCGCG AGCGGGTCCA CTACCTGTGC TGGTGTAAAG
 1141 TTTACCGCTG GTTATACGA ATTGAATCTG CGCATGATCT CCGTCAAGAT TGAAGTGGT
 1201 CCGGAAACGA ATTCTCTCTG CAGTAAAGT TCCAGTACCC TGAAGTGGT GTTTCGAGT
 1261 GGGTGGATGT TTAGGGCGAT CATGCGGCTA GTACTCTGTG TTTGCCAACA GCGCATGAA
 1321 CCGTGTGAAG GTTATGCAAT AGTGGGCTG AGCGGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA
 1381 CCGGAAACGA GATCATTCTC AGTGGGCTG AGCGGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA
 1441 AGTTGACCTG ACTGCAATCT GAGTGGCTG AGCGGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA
 1501 TAGACGCTG CCGCGGATTC CTTCACATCT ATATCAACGA GCACCTTGAC GCGCATGAA
 1561 TTAATGTGTA CGACGCTGGC CAGACCCGAG ACATCAACCA GCGCATGAA GCGCATGAA
 1621 TTTGTGTAGA GCGCGTGGT AATAGCTGAC AATAGCTGAC GCGCATGAA GCGCATGAA
 1681 TCTAGGCTG GCGCGTGGT AATAGCTGAC AATAGCTGAC GCGCATGAA GCGCATGAA
 1741 ATGTAAACCG CCAACGCTG TAGCGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA GCGCATGAA
 1801 GACTCCATGT TGGATAAATG AGTGTCAAT TGGCAAAATA AGATGACCA GCGCATGAA
 1861 TGAGTAAGAT TCAGACTGGA GCGGTGGTCC CAGTGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA
 1921 TTAGTACCTT GCGCAACAC CACCAAAACA CAGTGTGGT TGGCAAAATA AGATGACCA
 1981 TATTTTTCAT ATGTTTGAAT GTATGAAGTA TGAATAACT GTGTGAAGT TGAATAACT
 2041 TCAATCAGTA CAGAGTCCAG CCGAGAGTCC GACATGTTCA CCGTGTGGT TGAATAACT
 2101 AAATGAGTCA TCAATTTGGC AGAAGAAAGG TGATACGAGT CCGTGTGGT TGAATAACT
 2161 GCGGTGGTCC TTAGGGCGAT TTAGGGCGAT TTAGGGCGAT CCGTGTGGT TGAATAACT
 2221 TCCAGGAGTA TCACTGAGTC CCGAGAGTCC GACATGTTCA CCGTGTGGT TGAATAACT
 2281 GCGAATTCG GTCTTTCAA GTCTGGGAGT AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA
 2341 TCGGGCTTTT CTTCAAAATA GCTGGGAGT AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA
 2401 TCAACACAT CCGGTGGTGA AATGATGAGT AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA AGAAGAGTCA
 2461 GTGATGCTCA CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2521 CTTGGCTGAT GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2581 GCGATGATCT CAGTGTGTTT GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2641 CCGCTATATA GAGGCGCCAC GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2701 TCCCATATAG GAGGCGCCAC GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2761 TAGAGCTAGC TACGACGAA GTCTGTGAGT GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT
 2821 GCGAGATGT TCGGTTTGTG GATCTGTGAC CAGTACATCT CAGTACATCT CAGTACATCT
 2881 TTTATGAGG TCGACGACAT ATTACGTTCA AAGCGAATA GATCTGTGAC CAGTACATCT
 2941 GACACACGCA GATAGGGGTA CTTGGTGGT TGGACCCCA CACCATCTCC GATCTGTGAC
 3001 GTAGTGTGT AGATGTGCTC GTTAAACACA TGGTGGAGG TTTGGGAGA AGTGTGCTG
 3061 TGAGAGATCG AACCGGATCG AGAATGAGCA TATGAGAGA ATGTGACTG

【図 16 B】

3121 TGAGTAGCAG AAGTTCACAG AGTAGAAGAT GAGGAAACCG CAGCACCCAG ACAGACGATA
 3181 CACAGAGTAA ATGGAGAGAG AGCTTTTAAT AGCGCATGGC GCAGCCAAATA CTATTACAGA
 3241 CGGATATCGC GATAATGAAA TAATTTATGA TTAATTTATG CTTTCAATTT ACACACACGA
 3301 TCAGAGAACCT TTGTATTATZ TTGTATTATZ ATGTCTTAGA TGTTCAAAAC TTAATCTCTC
 3361 TCGCGATGAG CTGATTAGT TTGTATTATZ ATGTCTTAGA TGTTCAAAAC TTAATCTCTC
 3421 TACACACCTT GACGTACATG AGATCTTTTG CTTTGTCTAG TTAATAAAC TTAATTAATC
 3481 TATTATTCTT GACGTATATG AGATCTTTTG CTTTGTCTAG TTAATAAAC TTAATTAATC
 3541 TTTCTATAT CATCTTAGT ATTTCGGCAT CATCCAATCT CATTCAATCT CATTCAATCT
 3601 ATGTAGATAT AATGTCGGA ATGAAGAGAA GGGAAATATT GGTGTTTGT TGAATACAC
 3661 TAGCCACATA GAGAATCAT ATATCCACGT GTCCATTTTT TATAGTGGT TGAATACAC
 3721 ATGTAGAGAT AGCCAGATCA AAGATAGAT GTATTCTGA AAGAAAGAT GATCAATAC
 3781 TAAGTAGAAT AAGCATATCT TTAACAGAT CATATGATAA AGAAGATTTT CATTCAATCT
 3841 TACATCAT CTCAATTTTT TTAACAGAT CATATGATAA AGAAGATTTT CATTCAATCT
 3901 ACATCATCT TACTATTTTG GTATCTCTA ATGTGGCTGC CATCAATCT CATTCAATCT
 3961 CATATAACA TCGCGTGTCT CTTTGTCTAT CATATGATAA AGAAGATTTT CATTCAATCT
 4021 GCAAAATCT TACTATTTTG GTATCTCTA ATGTGGCTGC CATCAATCT CATTCAATCT
 4081 TCTCTAGA ATTTTTCAAT GTCCACGCT GTCCATGGAC ATCCGCTTA TTAATTTCT
 4141 TATCAGCTAT TGCATAATAC AAGGACACT GTCCATGGAC ATCCGCTTA TTAATTTCT
 4201 TACTAGAGAG AAGCTTTTT AGCTGCTTAT ACTTCCAGT ATTAATTTCT TGAATACAC
 4261 TTTCTGTAAG GAGACGCTAA TTAGTGTATA TTTTGTGATA TTTTGTGATA TTTTGTGATA
 4321 GACACAGAT TAAATATAT TCTAATAGAT TAAATATAT TAAATATAT TAAATATAT
 4381 TTTGAATATA CTTTATAT TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA
 4441 GAACATCAAT CTTTATAGG AAGATAGAT TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA
 4501 CCAAGCTAAA TAGAATCTTA TCTGTGGCT TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA
 4561 TTTGTGATTT AGTAATCTTT TTTTCCAAAT TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA
 4621 TGTCTGCTTC ATCGGCTTTA ACAATGCTT CCGGTGTAGC CCGGTGTAGC CCGGTGTAGC
 4681 CTTTGTGAGA AAAAATTTCA GTTCTGCTGA TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA
 4741 TTTCTGCTAT TAAAGCCCG GGGAAATC TTAGTGTATA TTAGTGTATA TTAGTGTATA

【図 17】

1 ATGGAATCCA GGATCTGCT CCGGTAGTC TGCCTTAAT TGTGTATCT GTCTCTGGGT
 61 GCTCGGGTCT CTCTGATCT CTCACAGCT CTCACAGCT CACTTCTCTC
 121 CATACGAGCT CCGGTGCTCA TTTCTGATCT GTTCAACGCT CACTTCTCTC
 181 CAAACGGTCA CCGGTGCTCT ATCTACAGCT ATCTACAGCT CACTTCTCTC
 241 GTGGTGGGGG TCAACACCA CTAATACCTC TATCGGCTGT GTTCTATGCT GTTCTATGCT
 301 GATCTTATCT GTTTTGAAGT TAAGACCTCG TGAAGCCCAT GTTCTATGCT GTTCTATGCT
 361 CTTGACAGCT GATCATGCT GTTCTTGAAG TGCAGCATCT TGCAGCATCT TGCAGCATCT
 421 CCGTCTGCTC CAAACGCTG ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT TGCAGCATCT
 481 CCGTCTGCTC CAAACGCTG ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT TGCAGCATCT
 541 ATCTACAGCT AGTCTGATG TGCAGCATCT ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT
 601 TATCATAGG ACAGCTGATG TGCAGCATCT ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT
 661 ACCCAGATG ACCGCTGATG TGCAGCATCT ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT
 721 CTTATCTGCT AGACCTGATG TGCAGCATCT ATACGCTGGG CCGTCTATAT TGCAGCATCT
 781 TATCGCTATC ATTTTTCGCT AACTTCCAGT GGTGATGCTG TGCAGCATCT TGCAGCATCT
 841 AAGTGAACCT ATCGAATCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG TGCAGCATCT
 901 CCGAATCTCA CTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG TGCAGCATCT
 961 TTTGCTGCTT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG TGCAGCATCT
 1021 GAGGATCTCT ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1081 GAGGATCTCT ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1141 GAGGATCTCT ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1201 CAGCATGAT TCAATCTCTC ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT
 1261 TTTGAACCA CTTGCTGCTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1321 GATCTGATG TCAATCTCTC ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT
 1381 GATCTGATG TCAATCTCTC ATCACTTTTC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT
 1441 TAGCCGACG TCGACTTTAC TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1501 GAAATCGCAG AACCGTGGT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1561 AGAAGATCA AACCCTGGT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1621 TTTCTGCTCT ATGCTGCTG TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1681 GTCTGCTGCT ATATGATG TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1741 ATCTTTTAT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1801 ATCTTTTAT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 1861 CCGCGCAAT CCGCTTCA GATCTGATG TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT
 1921 AGCATCTTCA CCGTGCAGC CATGATGCT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT
 1981 TTTCAAGGAT TGGAACTTTA TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2041 GAGGATGAT TCGCGGATCT CAACTGCTA AAGCAGCGG GGTCTGGAG GGTCTGGAG
 2101 GTTCTGACG CCGTGGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2161 TCGATGACG CCGTGGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2221 ACCTGCTGCA ACACCAAGG CCGTGGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2281 TATATATCT GATCAAGCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2341 CTTTACACA ACAGACGCT TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2401 CAGCAGCGCC ACAGAAAGG TTTCTGCTCT CAGCTTTTGA AGACCGAAT CCGCATGATG
 2461 GAGACGACG CCAACCTGCT AGACCGGCTA CAGCAGCGCC ACAGAAAGG
 2521 AAGACCTCG CCAACGCTG AAGCCTCTGA

【図 18 A】

1 AAGCTTGGGG CCGCTCATT GACACGGGAA TGAGGGACGA AAACGTGGAG GAGGTATTAA
 61 GTTTGGAGAA ATGGAGAGAG AGCTTTTAAT AGCGCATGGC GCAGCCAAATA CTATTACAGA
 121 AGTTTGTGAAA GATTTCGGAG AGATTATATC AGATGTGTAT GTTTGTGAAA ATATTGGAGA
 181 CATAGACGCA CAAATCAAGG GTATTAAATC ATGTCTTAGA TGTTCAAAAC TTAATCTCTC
 241 TCCTCTCTTTA CAAAATATG ATACCAACGA CGTATCTAAA GTATTCTCTA CTCAATATGA
 301 CGCCAGAGGG GTAAAAGTCA AATTAGATT TCGAACGAGT CCGTCTTCGT TTTATAAAC
 361 ATTAGATAAA GTTGATCTCA AGCCGTCTTT TCTGGGTGTA TAAAATATTA TTAATTAATC
 421 GAGGGTACCG GATCCCCCAG CTATATAAAA TCACAAGTCT CGAGCATCTT TTTTGTCTAG
 481 TTTGTGTAGA GCGCGTGGT AATAGCTGAC AATAGCTGAC GCGCATGAA GCGCATGAA
 541 TAGCCGCTTT TCGCGTTCGA CAGTGGCTGT AGCAGGTGGG GCTTCTGTCT CTAAGTGTGG
 601 GTCCGAGTCT GCGCGTTCGA AGAATCTGTA CGTTCCTGCT CTAAGTGTGG
 661 AGACGGACCA GGGCGAGA GCGGTGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 721 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 781 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 841 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 901 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 961 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1021 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1081 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1141 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1201 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1261 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1321 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1381 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1441 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1501 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1561 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1621 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1681 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1741 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1801 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1861 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1921 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 1981 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2041 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2101 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2161 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2221 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2281 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2341 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2401 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2461 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG
 2521 TCGTAGAGAT CAGACGACCG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG TGGTGGCTG

【図 18 B】

```

3121 CAACCCCTCAA GAACCTTTGT ATTTATTTT ACTTTTAAAG TATAGAATAA AGAAGCTGGG
3181 AATCGATTTCG CGATAGCTGC TTAGTTTTTG TTAACAAAAA TTGGGGAGAA TCTAATTAGT
3241 TTTTCTTTTACA ACAATTGACG TACATGAGTC TGAGTTCCTT GTTTTTGCTA TTTTTCCTTC
3301 CCAATTATTTT ATCTTTGAGC ATTTCTGAGT CTTTGTGATA GGAGTCAGAC TTGTATTCAA
3361 CATGCTTTTTC TATAATCATC TTAGTTATTT CGGCATCATC CAATAGTACA TTTTCAGAT
3421 TAACAGAGTA GAATTTAATG TCCGGAATGA AGAGAGCCGT ATTTATTTTAT ATGTCTTTAT
3481 TATCATATAGC GAGCAAGAGA ATCATCAATG CCACGCTGCC ATTTTATAA TTTGTGCGAG
3541 TACAATTAAG GAGAATAGCC AGATCAAAAG TAGATGGATG TCTGAAATGA AAGTATGATA
3601 CAATACTTAC ATCATTAAAGC ATGACGGGAT GATAAAATGA AGTTTTCATG CCAATTTTCC
3661 CATAGACAT CATGCTCCAA TTTTCTTAA ACAGTTTACG CGTTTGCATG TTACCACTAT
3721 CAACGGGATA ATACAATGCG GTTTCAGCT TGTCTATCAA TTGTGAATCA TCCATTCCAC
3781 TGAATAGCAA AATCTTATCT ATTTTGTAT AGCGCATGCG TCTTAATGCT TCAATAGGAA
3841 ATTCATTCTC TAGAAGATTT TCCAATGCT CAGCGTTTCA CAACGTACAT ACTAAGACGA
3901 CGTTATTATC AGGATATTGA TAATACAGCG CACTATGTCC CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4021 TATCTTTACT AGAGAGAAAG CTTTTCAGCT GCTTAGACTT CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4081 GATCCATGTC TGAATTAAT CTATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4141 CAATATGAC CAAGATTATC AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4201 TATATTTTTC AATATCTCTA AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4261 CATGCTTCAAC CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4321 GATTTTCCAA CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4381 ATCTTTTGTG TACATATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4441 CCTCATGTGC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4501 TATCAGCTTC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4561 AAAGAGTTCC GTCCATTTAA AGCGCGGGA ATTC

```

【図 19】

```

1 ATGGAATCCA GGATCTGTG CCGTGTAGTC TGGGTAACT TGTGTATCGT CTGTCTGGGT
61 GCTGCGGTTT CTTCACTTTC TACTCGTGA ACTTCTGCTA CTCAAGTGA CCAATCTCTC
121 CATACGAGCT CTGCTGTGCA TTCTCGATCC GGTTCAGTCT CTCAAGCGGT AACTTCTTCC
181 CAACGAGCTA GCTCATGGGT TAACGAGAGC ATCTACAAAC CTACCTCTAA GTACGGAGAT
241 GTGGTGGGGG TCAAGAGAGC CAAGTACCCC TATCCGCGGT GTTCTATGCG TCAGGGTAGC
301 GATCTTATTC GCTTTGAAGC GGTCTACAAA CGCAACATTC TGAAGCCCAT CAATGAAGAC
361 CTGGAGGAGG GCATCATGCT GGCTTACAAA CGCAACATTC TGAAGCCCAT CAATGAAGAC
421 CGAGTCTACC AGAAGGTTTT GACGTTTCTG CCGTCTATGT GAGGATTTCA CACTCTATC
481 CTGCTGGGCA GCAACACGGA ATACGTGGCG CCGTCTATGT GAGGATTTCA CACTCTATC
541 AGTCACAGTC AGTGTCTACG TTCTCATGCG CCGCTTATAT GAGGATTTCA CACTCTATC
601 TATCATAGGG ACAGCTATGA AAACAAAACC ATGCAATTAA TGCCCGACGA TTATTCCAA
661 ACCCACGATA CCGCTTACGT GACGCTCAAG GATCAATTGG ACAGCGCGGG CAGCAGCTGG
721 CTCTATCTCG AGACCTGTAA TCTGATGTCG GTGTATGTCG TTGACATTTC CGGCTCCAG
781 TATCCCTATC ATTTTTCGCG AACTTCCAGG AACTTCCAGG GTGTATGTCG TTGACATTTC
841 AACGGAATCA ATCGCAATGC CAGCTATTTT GAGAAAGAGC CCGCACAGCT TTCTATTITT
901 CCGAATACGA CTATCGTCTC GACCTTTGAA AGACCGAAT CTGCTTTAGA CACTCTATC
961 TTGCTGGCTT TTCTTGAAGC TCGCGAGCTA GTGATCTCTC GGGATATACA CACTCTATC
1021 AATGTTACTT GTCACTTACG TTCTTGGGAA GCCTCGGAA GCACCATCTG TTCCGAGGCC
1081 GAGGACTGCT ATCACTTTCG TCTGCGAACT TCTGCGAACT ATGACCGCAA CTTTCTTATC
1141 GAGGTTAACT TCGCGAACT TCGCGAACT TCGCGAACT ATGACCGCAA CTTTCTTATC
1201 CAGCAGATTT TCAATATCTC ATCACTTTCG TCGCGAACT TCGCGAACT ATGACCGCAA
1261 TTTGAAACCA CTGCTGGTTC GTGGGTGTC TCGCGAACT TCGCGAACT ATGACCGCAA
1321 TCTACAGATG GCAACATGCG AACTCATTTA TCCAATGTCG AGTCCGTGCA CACTCTATC
1381 TCGCCCGAGC AAGCCTGGTG TGTGATCAA CGGCGCACCC TAGAGGCTCT CAGGAACTCT
1441 TCCAGGATAC ATGCTCCGCG TATCTCTGCG GCGCTCAGC TATCTCTGCG GCGCTCAGC
1501 TCCAGGATAC ATGCTCCGCG TATCTCTGCG GCGCTCAGC TATCTCTGCG GCGCTCAGC
1561 GTGCTGGGTG ATATGAATGT GAAGGAATCG CAGTACGCTC CAGTACGCTC
1621 GTGCTGGGTG ATATGAATGT GAAGGAATCG CAGTACGCTC CAGTACGCTC
1681 GTGCTGGGTG ATATGAATGT GAAGGAATCG CAGTACGCTC CAGTACGCTC
1741 ATCTTTAATT TCGCCAAACG CACTGAGGAA TGTCACTTTC AACTCATTTA
1801 ATCTTTAATT TCGCCAAACG CACTGAGGAA TGTCACTTTC AACTCATTTA
1861 CCGCGCAACT CGGCTTACGA GTACGTGGA TACTCTTCA AACTCATTTA
1921 AGCATCTTCA CCGTGCAGAC CATGATCGCC CTAGACATCG ACCCGCTGGA AATCACTGCT
2041 GAGGATATCA TCGAACTTTA TTTTGGGTT GAATTGGGTT CACGACACGT TTCTTATCTC
2101 TGTGTCGACC CGCTCCGCGC AATTCGTTAT AAGCAGCGGG TAAATGATCG GAGGAGCAAG
2161 TGTGTCGACC CGCTCCGCGC AATTCGTTAT AAGCAGCGGG TAAATGATCG GAGGAGCAAG
2221 ACCTCGGGCA ACACCAAGAA CAGCTCGTTA CAGGCTCCGC GTGCTGGTCT ATGCTTCCAC
2281 TATAAATCTG GTCCGAAAGG ACCGCGGACA CAGCTCGTTA CAGGCTCCGC GTGCTGGTCT
2341 CCTTACACCA ACAGAGCAGG TTACAGATG CTCTGGGCGG TGGTCTGGTCT GAGCAGAGAG
2401 GAGCAGAGCG ACAGAGAACG TACAGATTCT TTGACGCGAG AGACTCTGCT CAGGAGCAAG
2461 GAGCAGAGCG ACAGAGAACG TACAGATTCT TTGACGCGAG AGACTCTGCT CAGGAGCAAG
2521 AAAGACTCCG ACAGAGAGAG AGACCTCTGA AGACCTCTGA CAGGAGCAAG

```

【図 20 A】

```

1 AAGCTTGGCG CGGCTCATTA GACAAGCGAA TGAGGGACGA AAACGCTGGG GAGGTATTAA
61 GTTTGGGAGAA ATGGAGAGAG ACTGTTATAT AGATCTGTAT GTTTGGGAGAA TCTAATTAGT
121 AGTTTGGGAA GATTGCGAAG AAGATTATCA AGATCTGTAT GTTTGGGAGAA TCTAATTAGT
181 CATAGCAGCA AAGATCAAGG GTATTATATC ATGCTCTTGA TGTCTAAAC TTTTTCCTTC
241 TCCCTCTCTA ACAAATATG ATACACGCGA CGTATCTAAA GTATTCTCTA TTTTTCCTTC
301 GCGTCTCTTA ACAAATATG ATACACGCGA CGTATCTAAA GTATTCTCTA TTTTTCCTTC
361 CATGCTTTTC TATAATCATC TTAGTTATTT CGGCATCATC CAATAGTACA TTTTCAGAT
3781 TGAATAGCAA AATCTTATCT ATTTTGTAT AGCGCATGCG TCTTAATGCT TCAATAGGAA
3841 ATTCATTCTC TAGAAGATTT TCCAATGCT CAGCGTTTCA CAACGTACAT ACTAAGACGA
3901 CGTTATTATC AGGATATTGA TAATACAGCG CACTATGTCC CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4021 TATCTTTACT AGAGAGAAAG CTTTTCAGCT GCTTAGACTT CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4081 GATCCATGTC TGAATTAAT CTATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4141 CAATATGAC CAAGATTATC AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4201 TATATTTTTC AATATCTCTA AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4261 CATGCTTCAAC CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4321 GATTTTCCAA CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4381 ATCTTTTGTG TACATATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4441 CCTCATGTGC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4501 TATCAGCTTC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4561 AAAGAGTTCC GTCCATTTAA AGCGCGGGA ATTC

```

【図 20 B】

```

3121 CAACCCCTCAA GAACCTTTGT ATTTATTTT ACTTTTAAAG TATAGAATAA AGAAGCTGGG
3181 AATCGATTTCG CGATAGCTGC TTAGTTTTTG TTAACAAAAA TTGGGGAGAA TCTAATTAGT
3241 TTTTCTTTTACA ACAATTGACG TACATGAGTC TGAGTTCCTT GTTTTTGCTA TTTTTCCTTC
3301 CCAATTATTTT ATCTTTGAGC ATTTCTGAGT CTTTGTGATA GGAGTCAGAC TTGTATTCAA
3361 CATGCTTTTTC TATAATCATC TTAGTTATTT CGGCATCATC CAATAGTACA TTTTCAGAT
3421 TAACAGAGTA GAATTTAATG TCCGGAATGA AGAGAGCCGT ATTTATTTTAT ATGTCTTTAT
3481 TATCATATAGC GAGCAAGAGA ATCATCAATG CCACGCTGCC ATTTTATAA TTTGTGCGAG
3541 TACAATTAAG GAGAATAGCC AGATCAAAAG TAGATGGATG TCTGAAATGA AAGTATGATA
3601 CAATACTTAC ATCATTAAAGC ATGACGGGAT GATAAAATGA AGTTTTCATG TCAATTTTCC
3661 CATAGACAT CATGCTCCAA TTTTCTTAA ACAGTTTACG CGTTTGCATG TTACCACTAT
3721 CAACGGGATA ATACAATGCG GTTTCAGCT TGTCTATCAA TTGTGAATCA TCCATTCCAC
3781 TGAATAGCAA AATCTTATCT ATTTTGTAT AGCGCATGCG TCTTAATGCT TCAATAGGAA
3841 ATTCATTCTC TAGAAGATTT TCCAATGCT CAGCGTTTCA CAACGTACAT ACTAAGACGA
3901 CGTTATTATC AGGATATTGA TAATACAGCG CACTATGTCC CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4021 TATCTTTACT AGAGAGAAAG CTTTTCAGCT GCTTAGACTT CCAAGTATTA ATCTGAGTCA
4081 GATCCATGTC TGAATTAAT CTATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4141 CAATATGAC CAAGATTATC AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4201 TATATTTTTC AATATCTCTA AATATCTCTA ATAGATCTTA TTTAATTTT TTTAATTTT
4261 CATGCTTCAAC CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4321 GATTTTCCAA CTAATAATGA ACTCTCATCT TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4381 ATCTTTTGTG TACATATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4441 CCTCATGTGC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4501 TATCAGCTTC GTCTTATGTA ATCTTTTTC TGCCTTTTAC ACATCTTTT TTTTGTCTT
4561 AAAGAGTTCC GTCCATTTAA AGCGCGGGA ATTC

```

【図 2 1】

1 ATGCGGCGGAC GCCTCCCGCTC CTACCTCATC GTCCCTCGCGG TCTGTCTCCT CAGCCACCTA
61 CTCTTCTGTCAC CATTTAGGGG AGAAGCCATA TCCGAACCGG TGGACAAAGC GTTTCACCTA
121 CTGCTCAACA CCTACGGGAG ACCCATCCGC TTCTGCGGTG AAAACACACG CCAGTGTACC
181 TCAATATAGCA CTGCTCGGTA AATCACTATA CAGCATCGGTG GTTCAACTTT
241 TTCCAAAGCT ATATCTGTA CTATGTATTC CATATGCTCT CTGACCGAAA CCCTGGAAAG ATACCCACAG
301 CTGGCGGAGC AGTTTCTGTA CAGTGTGTA GACCTTGCCA GTTACCGGAT CTGTTGGCAG
361 AGACTTAAACA CTTAGCGCCT GTATGCCGAA CAGCCCAACA CTGTCGACCC ACCCATTTAGC
421 CAGCTAAAGG CACAGGACAG CCTAGGTGAA CAACCACTCT CACACGGCTG GACGAAATCA
481 CTGTCAATAC CATACGTTTG CATACGTTTG TGTTTGACCC AAGGCTTTTA CTCTATCGCA
541 CATACCACTC CAGGACTACA CCGACACACG TTAAACACGA CCTGTATCCT CTCTATCGCA
601 CAGCATCTAC TATTTCAGCA CGTCACACCT TGTTTGACCC AAGGCTTTTA CTCTATCGCA
661 GAACATCGTT ACCTTAAAT AAACACTGACC GAGGACTTCT TCGTAGTTAC GGTGTCCATA
721 GAGCAGGACA CACCCATGCT GCTTATCTTC GGCATCTTTC CACGCGTACT CTCTTAAAGC
781 CCTATCAAC GCGCAACTTT TATATACGTA CAAACTGAAA AAACAGAGCT CCTGGTGCTA
841 GTTAAAGAA GTCACATGTA CCGTCACTCT TATCTCAAAG ACCCGGACTT TCTTTAGCGC
901 CACTCTGAT TCACTACTCT GACCTCAGC GCATCTACTAC GTAACAGCTT TCACCGTTAC
961 CGCTGGATG TACTCAAAG CGCTCGATCT CAGTCTGCTG CAGCAGCGAC AGGAGAGGCG
1021 GCCTTCGCTC ACCTATPAG CTGTTGCTG AGACGCCGAG CCGCGACTCT TCGTAGTTAC
1081 GTCTCCGCTC CACGCGGCTC AGACGCCGAG CCGCGACTCT TCGTAGTTAC
1141 ATCTCCGCTC TCTCAACAA CACACCAACG ACACGCTTTC TCGTAGTTAC
1201 GCTCGGCA CACGAGGCTC TTGGAACACG AATCAGATCA CCGACATCAC CTGCTCTGTA
1261 CAGCATCTC ACATCTGCT TAAACAGAA CAGCAACATC TCATCCGCCA CTGCTCTGTA
1321 CGACGATCG CCGACTTTGC CTCTAAATCA CACAAACGAC ACCTGGCCTC TTTTCTTTCA
1381 GCGCTTCGCG CTCAAGAACT CTTCACTATG GGCAGCTCTG TCCACTCCAT CTGCTCTGTA
1441 CAGCAGGAGA GAGCGGAAAT AGCTCATCTG CACACGAAAT AGCTCATCTG CACACGAAAT
1501 TCACTCACTC CAGGATTTGC GTGAGGCTCT AGGCTATCAC TCGCTCGAAC CCGCTCTGCA
1561 CCTCTTCCA CTGACGGGCT CGTTCGCGCT GCGCTCTGCA TCGCTCGAAC CCGCTCTGCA
1621 GAGCGCAGC TCCCTCATAC TCCCTCATAC TCGCTCGAAC CCGCTCTGCA TCGCTCGAAC
1681 GAGCGCAGC TCCCTCATAC TCCCTCATAC TCGCTCGAAC CCGCTCTGCA TCGCTCGAAC
1741 CTGACCGCTC CCGAACACCT CAGTATGCTG GTAAACAAAC CTGCTCGAAC CCGCTCTGCA
1801 TCTCAGCTCT TCTCCACCACT CAGTATGCTG GTAAACAAAC CTGCTCGAAC CCGCTCTGCA
1861 CAACTAAAT CCGAACATGAG CCGCAACCTC CATACACACG CACAGCATCAC AGCGCGCTC
1921 CAACTAAAT CCGAACATGAG CCGCAACCTC CATACACACG CACAGCATCAC AGCGCGCTC
2041 CCACTAAAT CCGAACATGAG CCGCAACCTC CATACACACG CACAGCATCAC AGCGCGCTC
2101 GATGCGGCTC TAGAAGTAACT TAGCTCTGCT GTGGACGCTA CCGACAGCTC TCTCTCATG
2161 ATGCTGCTC TAGAAGTAACT TAGCTCTGCT GTGGACGCTA CCGACAGCTC TCTCTCATG
2221 ACATGCTGA

【図 2 2 A】

1 CTGCGGCTCG ACCGATCTGA GAATGGATGA TTCTCCAGCC GAAACATATT CTACCATGGC
61 TCGGTTTAAAT TTGTTGATGA AGATGGATTC ATCCTTAAAT GTTTTCTCTG TAATAGTTTC
121 CAGCGGAAAGA CTATGCAAGG AATTTTGAAT GCCTTCTCTG TGCTTAAATG TTCCATAGAC
181 GGCTTCTAGA AGTTGATAGA ACATAGGACT AGCGCGGCTA ACTTTTAAAT TTAGAAAGTA
241 TCCATCGCTT CTATCTGTTT TAGATTATTT TTTTAAAGT TTAGTCTCTC CTTCACCAT
301 AATAAAGTCT GATCTGTTT GACTAGATTA ACTATCAGTA AGCTTTATG AGATAGACGA
361 AATATAGCG TATTGAGAG CATTATGTTT GACTAGTCTG TGTAGAGTAT AGATATAGA
421 ACTATCGAT TTTGATPACT CTATAACACC CGCAACAGTC CTGAGAGTAT CGCTAGATTG
481 AGTAGGCTCT GGTGAAGTTT CAACTCTCTT ATGCTCTGAT GTCTTTTTCG GAGATATAGA
541 ATAATTGTAT TTTGTAATAT AATGATATAT ATTTTCACT TATCTCATTT TTAAGCTTAA
601 AGATACAAAA AATTAACATA TCAGAGTCCG GACTTCTGTA GTTTATTTGG GTAGATATGA
661 TAATATTTTG GGTATTCAAA ATTGAAATA TATAATTACA ATATAAAATG CGGCCCGGCG
721 TCCCTCTCTA CTCTCATCTC CTGCGCTCTC GTCTCTCTAG CCACCTACTT TCGTACGAT
781 ATGGCGGAGA AGCCATATCC GAACCGCTCG ACAAGCGCTT TCACCTACTG CTCACACCTG
841 AGCGGAGACG CATCGGCTTC CACCGCTCTC CTGCGTGAAG ACACCAACCA AATAGCAGCC
901 TCGGTAAACG CACGCTCTCT AGGGGAAAGC CCATCAGTTT CAACTTTTTC CAAAGCTATA
961 AGTAGAATG CTGTTTTCAT ATGCTCTGAT GTCTTTTTCG GGTCTCTCTG CGCGAGCAGT
1021 TCTGAAACCA GGTAGTCTG ACCGAAACCC TGGAAAGATA CCAACAGAGA CTTAAACACT
1081 TCTGAAACCA GGTAGTCTG ACCGAAACCC TGGAAAGATA CCAACAGAGA CTTAAACACT
1141 AGGACAGCT AGGTGAACAG CCGACACTG TSCACACCTG TCGTCTCTAG CCACTACTT
1201 AGTTTGGAT CCGACCCGCA ACCACTCCAC AGGCTCTGAT GTATCTCTCT TGAATAGAG
1261 GACTACACCT ACCACACTTT GACTCTCTG TGTCTCTCTG GTCTCTCTG GTCTCTCTG
1321 TCAGGACCGT CACACCTTGT TTGCAACAG GCTTTTACTG CTCTCTCTG GTCTCTCTG
1381 CAAACACAC ACTGACCGAG GACTTCTG GACTTCTG GTCTCTCTG GTCTCTCTG
1441 CCACTGCTCT TATCTTCGCG CATCTCTCAC CGCTACTCTT TAAAGCGCCC TATCAACGCG
1501 ACTGCTTTAT ACTACGACAA AGTGAAGAAC AGCTGAAACG AGCTGAAACG TAAAGAGATG
1561 AACTGAACCG TCACTTTAT CTCAAAGACC CCGACTTTCT TCGAGCGGCA GTTGACTTCA
1621 ACTGCTTTAT ACTACGACAA AGTGAAGAAC AGCTGAAACG AGCTGAAACG TAAAGAGATG
1681 TCAAAAGGCG TCGATGTGAG ATGCTGGACC CGCGCAGCT AGAAATGGCC TTGCGCTACG
1741 TCAAAAGGCG TCGATGTGAG ATGCTGGACC CGCGCAGCT AGAAATGGCC TTGCGCTACG
1801 TCAAAAGGCG TCGATGTGAG ATGCTGGACC CGCGCAGCT AGAAATGGCC TTGCGCTACG
1861 GGGCGCTTGA CCGCGAGGCT GCACTTTTAC AATAACAGA ATTTATGATG ACCTGGCTCT
1921 GGGCGCTTGA CCGCGAGGCT GCACTTTTAC AATAACAGA ATTTATGATG ACCTGGCTCT
1981 GGGCGCTTGA CCGCGAGGCT GCACTTTTAC AATAACAGA ATTTATGATG ACCTGGCTCT
2041 ACTTTTCTCT AAAAACTG CAAACGCTCT GGGCTCTCT TCTTTTCTCT TCTTTTCTCT
2101 AAGAAGCTCTA CTTCTAGGCG AGCTCTGCTC ACTCTCTCT AGTACATACG CAGGAGAGC
2161 GGGAAATCTT CATGCTAGAA AGCGGCTCTG GTTCTATGAG GACGATATCA CACTTTAGCG
2221 AGTTTCTAGC TCATCCGAGC CACGAATACC TCAGGACACT GTACACACCC TGTTCAGTA
2281 CGCGGCGAGC GATCAGCTCG CTCGAAACCG TCACAGCTCT GTCCTCCGAT GCGCCGCTC
2341 CCACTACCTG TCCCGCGGCG CTCTCCATCT TATCTACCAT GCAACAGAGC ACCTGATGAG
2401 CTTTCCCGGA CCGTGTTTGT CTGCGGCTCG GCGAATCTCT GCTCTCTCTG ACCTGCTC
2461 AAGCAGCTAG TTAGTCTGTA ACAAACCACT ACCTGATCAA AGGTATCTCT TACCTGTCT
2521 CAGCAGCTCT CAGTACGCTA CAGCTCATCA CACCCAGAG AGCTGATCAA AGGTATCTCT
2581 AACTGAGGCT CAGTACGCTA CAGCTCATCA CACCCAGAG AGCTGATCAA AGGTATCTCT
2641 AAAAACTGCT CTTTTCGCA CAACTCATCA CAACTCATCA CAACTCATCA CAACTCATCA
2701 ACTATCTGCA CATGACGACG TCGGAGGAGC TCGGAGGAGC TCGGAGGAGC TCGGAGGAGC
2761 TGTGCTCTC ATCTCCGCGA ACTCACTACC TCACTCTCTT GAAAGACGCT AGCTGCTCTC
2821 AAGTAACTGA CGTCTGCTG CAGCTGCTG CAGCTGCTG CAGCTGCTG CAGCTGCTG
2881 CGCTATCGG CATCATCGG ATCTATCTG CTCTACCGAT CTCTACCGAT CTCTACCGAT
2941 TCTCTGAGC CGCGGAGATC TTAGCTAACT GTATTTCTG GAAAGAAAT TATTACTT
3001 TCTATTAATA GGGATTGAG GTATGTAGG TCAAAATTA TCGTTCTCTG TATATAGATA
3061 AAGAGTCTTA TATATTGAA AATCGTTAG TCGTAAATG ACTTTTCTG TGTCAATG

【図 2 2 B】

3121 AATATATCAT TAGGATTAA CTCTTGACT ATCATGGCG CGCCAGAAAT TACATCAA
3181 AGCATTAAAT CAGTTATGCC GATCGAGT AGACCGGTTA TAGCATCCAC CATTATAT
3241 TAAATATAG ATCAAGAAAT ATGTGACAAAT CTCTAGTTG TATCATGAGA ATTGACGAAA
3301 CAATGTTTCT TACATTTTCT GTTCTATTA GTACTGACT TAAATAGTAG AACTGGAAG
3361 CTAGACTTGA TTTTCTATA AGTATAGATA CCTCTTCA GATTTTCTG TTTGATAAA
3421 GTTCCAGAAA ATGTAGAAAT TTTTAAAG TTTTAAAG TTTTAAAG TTTTAAAG
3481 AGACGCTTAT TATTAAATG AGTAATGAA TCCACACCG CTCTAGATG GGGGAATG

【図 2 3 A】

1 GAATGCGCG CGCTGAATGT TAAATGTTAT ACTTTGGATG AAGCTATAAA TATGCAATGG
61 AAAATAAAT CATTTAAAGA AAGGATTCOA ACTTACCAAA ACCTAAGCGA TAAATGTTA
121 ACTAAGCTTA TTCTTACGCA CGCTTTAAAT TTTGTATAC TTTGTATAC TTTGTATAC
181 CTAAACAATA CTATAACAT AAAATCAAT AAGGAAATG TAAATGTTA TAAATGTTA
241 TCAGGAATGG GGTAAATAT TTAATACAG TGTATATCTA TGTATCTTAT GTATCTCTG
301 TACAATTAAT TTTTACGATA TAGTATGATA TGTATTTTTC GTATCTCTG GTATCTCTG
361 CATGATAAT GGTATGACGA TAGTATGATA TGTATTTTTC GTATCTCTG GTATCTCTG
421 TCGGAAGAG ATAGGATACC AGTTATATTA TACAAAACTG ACTGTTTGA TAAACAGAT
481 CTCTGCAAT TCGTAAATGA TCGAAATTTG TAAACTATGA CAAATAAAG TAAACTATGA
541 CCAATTTATCT CACAGGATCT GTGTAATCT TCGAATTTT ATGATGTTG TCGAATTTG
601 ATGAGGTTAT TATTAAGTTT TGTATATCT TGTATATCT TGTATATCT TGTATATCT
661 AATGAAAGA GTTGAAGC TGTTCAGGAG CGGTTGTTGA AAAAACTG ACTGTTTGA TAAACAGAT
721 CAGATTTTCT TACATATGAG TCGTCTGAGC TCGTCTGAGC TCGTCTGAGC TCGTCTGAGC
781 TAAGTTTGGT CACAATGGAT TCGACCTTAA CAGCAATGAT TCGAATTTT TCGAATTTT
841 TAAGTTTGGT CACAATGGAT TCGACCTTAA CAGCAATGAT TCGAATTTT TCGAATTTT
901 TGAATTTGGT GTTATGTTGA AGAATACCGA GCGTATATAA AAAAACTG ACTGTTTGA
961 TAACTCTGTA GTTATGTTGA CAGCAATGAT TCGAATTTT TCGAATTTT TCGAATTTT
1021 CTACAAAAAT GTTGAAGATCT TGTGAAGATA TAACTATGTA AAAAACTG ACTGTTTGA
1081 AGGCTTTTACT CTGTTGTTG TGGCAGCTTA CTTTAACTGA GTTAAATTTG TAAACTATGA
1141 ATGTTGCTAT TCGGCGGATG TAGATATTTT AAAAACTG ACTGTTTGA TAAACTATGA
1201 AGGCTTTTACT CTGTTGTTG TGGCAGCTTA CTTTAACTGA GTTAAATTTG TAAACTATGA
1261 TGAATTTGCT GATAACATG GAGCTACTCT TAAAAAAA GTGCTCAGG TACTTTTCAA
1321 TGAATTTGCT GATAACATG GAGCTACTCT TAAAAAAA GTGCTCAGG TACTTTTCAA
1381 TGGCAGCTG TATATCTGAG TATATCTGAG TATATCTGAG TATATCTGAG TATATCTGAG
1441 GATGTAATCT ACTCTTTGA AGAAGATGGA AATCATATA ACTCTCAAAG CTGCTGAGT
1501 GATGTAATCT ACTCTTTGA AGAAGATGGA AATCATATA ACTCTCAAAG CTGCTGAGT
1561 AATTTAGCTA TAAATAGAT TTAATTAAT AGTCACTGAG AGTCACTGAG TTAATAGAT
1621 CTGCTGTTA ATTAATAGG TCGACGGATC CGTACCTCTC GAGTTTATG GGAAGATAT
1681 GATAATGTT TGGGATTTCA AATTTGAAA TATATAATTA CAATATAAAA TCGCGCGCG
1741 CTCTCCCTCC TACCTCATCG TCTCGCGGCT GTGCTCTCTC AGCCACTTAC TTTCTCACG
1801 ATATGGCGCA GAAGCAATAT CCGAACCGCT GGACAAAGCG TTTCACTTAC TGCTCAACG
1861 CTACGGGAGA CCACTTCCGCT TCTGCTGTA AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
1921 CTTCTGTAAG AGCAGCGTCT TCGAGGAAA CCGCATCAGT TTTCACTTTC TCCAAAGCTA
1981 TATATCACT CAGTATGAT TATGTTTCT TATGTTTCT TATGTTTCT TATGTTTCT
2041 CTCTCTGAG CAGTATGAT TATGTTTCT TATGTTTCT TATGTTTCT TATGTTTCT
2101 TACGCGCTG GTATCCAAAG TACCGGAACT TTTTGGAGC TTTTGGAGC TTTTGGAGC
2161 ACAGGAGCAG CTGAGTGAAC AGCCGACAGC TTTTGGAGC TTTTGGAGC TTTTGGAGC
2221 TCACTTTGG ATGCGACCGC AAAAACTG CCGTACCTCT TTTGATGAG TTTGATGAG
2281 AGGACTACAC CAGCACTACT TTAACAGAGC AGGCTTTTAC CAGTATGAG TTTGATGAG
2341 ATTCAGCAGC GTACACCTCT GTTTCAGCA AGGCTTTTAC CAGTATGAG TTTGATGAG
2401 CTTTAAATA ACAGTACCG AGGACTTTCT CGTAGTTAG GTGTCATAG TTTGATGAG
2461 ACCCATGCTT CTATCTTTC GCGATCTTCT CAGGCTTCTC TTTTGGAGC TTTTGGAGC
2521 CAGCACTTCT ATACTGAGC AACTGAAAA CAGCAGGCTC TTTTGGAGC TTTTGGAGC
2581 TCACTGAGC GTGCTACTTT ATCTCAAAG CCGGACTTTT CTGACGCGC TTTTGGAGC
2641 CAGTACTGAG GTGCTACTTT ATCTCAAAG CCGGACTTTT CTGACGCGC TTTTGGAGC
2701 ACTCAAAGC GTGCTACTTT ATCTCAAAG CCGGACTTTT CTGACGCGC TTTTGGAGC
2761 CAGATTTAGA CTGTTTGGAG AGATGCTGGA AGGCTTTTAC CAGTATGAG TTTGATGAG
2821 CAGGCGCTT TGGAGCTGAG CAGGCTGAGC AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
2881 CTCAAAAAA CAGCAGGCA CAGGCTGAGC AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
2941 AGGCGCTTCT TGGAGCTGAG CAGGCTGAGC AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
3001 CACTCTTCT AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
3061 GAGTCTTGG CTTAAACTAC AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG

【図 2 3 B】

3121 TCAAGATCT TACCTCATG CGAGCTCTG CCACTCCATG CTAGTACATA CGACGGAGAG
3181 AGCGGAGTCT TTTCTCATG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
3241 CAGTGTGCTA GCTCATCCG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG
3301 TAGCGGCTGA CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG
3361 CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG CCGGAGGAG
3421 AAGCTTTTCT GAGCTGTTT GAGCTGTTT GAGCTGTTT GAGCTGTTT GAGCTGTTT
3481 CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3541 CCGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3601 CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3661 AAAAACTG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3721 CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3781 AAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3841 CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3901 CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
3961 TTTTCTCTG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
4021 AAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
4081 TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT
4141 ATGTTTGA AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG AAAAACTG
4201 ATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT
4261 TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT
4321 AATGTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT TATGATTTT
4381 CTCTTTTGA CATAATTTA TCTATTTCTA GTTTAGATA CTGCGAG

【図 2 4】

1 AAGACTAATT TGTAACCACT CTACTCAGAA ATAGTAGACAT GCAATGAGTA
61 AGACATATAGG AATCTATCTT TATATACACA TAATATTCTC ATCAATTTTA CCAATATGTT
121 AGTTGATATGT TATAAAATCT AATTAATACAC TCGAGATATAA AATCAGCATGT TCTGTAGCAT
181 CGGGTAGAGAG AGATAGATGCG CGATGATGGCG CGATAGCGCGG TAGACGGGACA TCATGAGGAGG
241 ACCAGCTCTGCG TAGAGCTGCA CGACAGCGCTG GCGGAGATAGA GACCAACCACT CGTTTTTCAA
301 AAGCATAGAGG TCCTCCGAGT GCGGAGATAGA CGAGTATCTC ATGACCGCTT CGGTGTCTCG
361 GAAAGAGGAGC TGCTCCGAGT GCGGAGATAGA CGAGTATCTC ATGACCGCTT CGGTGTCTCG
421 GTATCTAGT AGGGCTGTAT GCGGAGATAGA CGAGTATCTC ATGACCGCTT CGGTGTCTCG
481 TGTGATGCTG AGGGCTGTAT GCGGAGATAGA CGAGTATCTC ATGACCGCTT CGGTGTCTCG
541 CTGGGTGATG ATAGGGCTGTG GCGGAGATAGA CGAGTATCTC ATGACCGCTT CGGTGTCTCG
601 GATCAGGTATG TGGTGTGTTA CGACATAACT GACGTGTCTG GCGGAGATAGA CGAGTATCTC
661 GGAATCCGCG AGCGGAGAGC AAGACAGGTC GGGGAGAGGT TCTAGTGGCA GCGGAGATAGA
721 GGTAGATAGG ATGGAGAGAG GCGGAGAGC GGTAGTGGG ACAGGTGGCA GCGGAGATAGA
781 ACCTGTGAGG CATTCCGAGC AGTATCGCG TCGCCGCTCA TCGGAACAGG GTGTGTACAG
841 CTGCTGAGAC TAATCGGCTG CGGATAGTGC TAGCAACTGC GTTACGCTCG CTCTCCGCTG
901 CATGAGGTG ACAGAGGCTG CATGATGTTA GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
961 CATGAGGTG ACAGAGGCTG CATGATGTTA GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
1021 AGAGGCGAGG TCGCTTTTGT GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
1081 CTGGGGGATG AGTATGTTA GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
1141 GGTGATGTCG GTGATCTGAT TCGCTTTTGT GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
1201 GGGATACAGC AGCAACGCTG TCGCTTTTGT GATTTCTTGA GCGGAGAGG GTGTGTACAG
1261 TTTGATTTGT AAGAGCTGCG GATTTCTTGT TCGCTTTTGT GATTTCTTGA GCGGAGAGG
1321 GCGCTCTTCT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT
1381 GCGCTCTTCT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT
1441 AAGAGCTGTTA CTTGATAGT GCGTGTAGT CAGGTAGTTG AAGTCAAGTG CTAGCACAG
1501 AAGAGCTGTTA CTTGATAGT GCGTGTAGT CAGGTAGTTG AAGTCAAGTG CTAGCACAG
1561 GAGCTCTGTT TTTTCTGTTT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT TCGCTTTTGT
1621 GAGTACGCTG AAGAGTCTCT CCGTGTAGT CAGCATGGGT GTGTCTGCTG CTATGGACAC
1681 CTAATCTAGT AAGAGTCTCT CCGTGTAGT CAGCATGGGT GTGTCTGCTG CTATGGACAC
1741 GTAAAGGCTT TGGTGTAAAC AAGTGTGAC GTGTCTGCTG CTATGGACAC
1801 GAGGATACAG TGGTGTAAAC AAGTGTGAC GTGTCTGCTG CTATGGACAC
1861 CAGCGGCTGT GAGTGTGTTT GCGGTGCTG CCAAAAGTCT GCGTGTAGT CCGTGTAGT
1921 TGGTGGGATG AGGCTGTGCT GTTCACTGCT GCGTGTAGT CCGTGTAGT CCGTGTAGT
1981 AGATCGTCTG TCGGCGAGT CTTTGTAGT GCGTGTAGT CCGTGTAGT CCGTGTAGT
2041 CTTTCTGAGG GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG
2101 AAAAAAGCAT CAGGATATAT GGAATACATA GTATTGATTA TACGTTTGA GCGGAGAGG
2161 ACTGATGGCG TTTTCTGCTG GACGCTGCTG GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG
2221 GGTGCTGCTG TCGGCGAGG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG
2281 CCGTCTGCTG TCGGCGAGG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG
2341 GAGGAGACAG ACAGCGAGG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG
2401 TAATATATAT TTTTCAATTT TCGGCGAGG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT
2461 GAGGAGAGG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG GATTCACGCT
2521 AAGTGTGAC AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG GATTCACGCT
2581 CCGTCTGCTG AAGTGTGAC GTTTCGCTG GATTCACGCT GTTTCGCTG GATTCACGCT
2641 TATAGGAGTC A

【図 2 5】

1 ATGGAGTCTT CTGCCAAGAG AAAGATGGAC CCTGATATC CTGACGAGGG CCCTTCCTCC
61 AGATGGCCAC GGCCCGAGAC ACCCGTGACC AAGGCGACGA CGTCTCTGCA GACTATGTTG
121 AGGAGAGGAG TTAACAGTCA GCTGAGTCTG GGAGACCCCG TGTTCGCGA GTTGGCGGAA
181 GAATCCCTCA AACTTTTGA ACAAGTGACC GAGGATTGCA ACAGGAACCG GATGAGATC
241 GTCCCTGGCG AACTCGTCAA ACAGATTAAG GTTCCGAGTG ACATGGTGGC GCGCTTTAAT
301 AAGAGGACGA TGCTGTAAGA ATATACCCAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
361 ATGATGGGAG GTGTTTATG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
421 GAGGAGATGA AGTGTATGTT GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
481 GAGGAGATGA AGTGTATGTT GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
541 GCGGCTAACA AGTGTGGGGG TGCACTGACG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
601 AGGAGAAAGA TGATGTATAT GTGCTACAGG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
661 TCCCTTAAGA CCACCAATAG GTGCTACAGG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
721 TGCTTCCTCG ATGAGATTAT GCGTATGACC GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
781 AGAGCAAGG TGCTACAGCA CATGATGAC ATATTATG GATGATCTAG GATGATCTAG
841 GAGCAATGT GTATAGTGA GTTCTGTGCG GTGCTGTGCT GATGATCTAG GATGATCTAG
901 GCGCTCTCTG TGCGCAAGCG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
961 AGTGTATGTC TGCGCAAGCG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1021 GCGGCTATG AGGAGATCTG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1081 CTGAGAGTCT GCTCTCTCTG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1141 GAGGAGGCTA GTATAGCTTA CACTTTGACC GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1201 GTGCTACCCC CAGAGTCCCC GTGACCCCGG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1261 GAGGAGAGT ATCAGGAAGA AGTGTAGGAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1321 GAGGAGAGG AGGACACTGT GTCTGTCAAG TCTGAGGAGG GATGATCTAG GATGATCTAG
1381 GCGGCAAGG AAGAGAGGGA TGGTGTGAGT GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1441 CACCTATG TGACTAGAGG CAAGGCTGAC CAGTAA

【図 2 6】

1 ATATAATCTT CCACCAAAAT AGAGAAATATA TATATCATCA TTTTATGATG TATACTACTG
61 AATGTGAAC TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
121 AATGTGAAC TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
181 AATGTGAAC TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
241 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
301 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
361 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
421 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
481 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
541 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
601 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
661 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
721 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
781 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
841 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
901 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
961 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1021 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1081 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1141 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1201 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1261 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1321 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1381 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1441 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1501 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1561 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1621 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1681 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1741 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1801 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1861 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT
1921 TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT TTTTATGAT

【図 2 7 A】

1 AAGCTTCCGG CCGCTCATTA GACAAGCGAA TGAGGGACGA AAGCTGGAG GAGGTATTA
61 GTTTGGAGAA ATGGAGAGG ACTGTTTAAAT AGCGCATGGC GCGAGCAATA CTATTACAGA
121 AGTTTGTAAA GATTGCGAAG AGATATATCA AGATGTGTAT GTTTGTGAAA ATTGTGGAGA
181 CATAGCAGCA CAATCAAGG GTATTATATC ATGTTCTTAA GTTTTCTTAA TTAATCTCTC
241 TCTCTCTCTA ACAAAATGTA ATACACAGCA GTATTCTTAA GTTTTCTTAA TTAATCTCTC
301 CGCCAGAGCG TGAAGAAGTA ATATAGATTTT CGAACGAGG CTCTCTTCTG TTAATCTCTC
361 ATTAGATATA GTTGTATCTA AGCGCTGCTT TCTGTTGCTT TTAATCTCTC TTAATCTCTC
421 GAGATATAAA TTAGCTGTCA TCGACATCTC AGTGTGTGTT TTAATCTCTC TTAATCTCTC
481 CAGAGCGGCT GGGTCTCTCA CACCATCTCT CTCTCTCTCG TCGGCGAGC GCGAGCTCTC
541 CAGACACGCT CACAGACTGT ACAGACAGCT GTCTCTCTCG CTCTCTCTCG TCGGCGAGC
601 CCGTCTCTCT ATCACTCTCT TCACTTTCTT CCGTATCTCT GTCTCTCTCG TCGGCGAGC
661 AGGAGACAGG GATGATCTCG GTTACAGGGG ACTCTGCGGG TCGACACAGA CTCTCTCTCG
721 AGTGTACAGC AGCGGTGGCC AAGGTGTAGG TCGACATAGC CTCTCTCTCG TCGGCGAGC
781 CGCGAGTGC CCGTAGGCTA TCGACATCTC TCGTCTCTCG TCGGCGAGC TCGGCGAGC
841 GATGTACTCT GCGAAGAGG TCGATCTGCA TCGTCTCTCG TCGGCGAGC TCGGCGAGC
901 TAACTCTCAG CTGTGTATCT CAGAACCGA CAGAACCTCT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
961 CATAGCAGCA CAGAACCGA CAGAACCTCT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC TCGGCGAGC
1021 TCTATACAGC GCTCATAGTG ACCTGTATCT CATATACAT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1081 GGAATATCCG AATATGTTG TCAATGTGCG TGAGCAGCTT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1141 TCTTAAATAT TTTCTGGGCA TAAAGCATTA TCTCATCAGG TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1201 CAGTGTCCCG TATGCGGCA CTGACAGGAA AGGAGAGCTT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1261 TAAAGAACTC TATATCTCTG TAGCACATAT ACATCATCTT TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1321 TAGACCGGGG CTTAGGCTCTG AGTGCACCCC CCAACTTGTG TCGTCTCTCG TCGGCGAGC
1381 CTAGCGCTCT CTATACAAA GCGATCCACA TCTCCGCTT ATCTCTCAGT ACAATATGAT
1441 TCTATCTCTA GATATCTAAG GCGATCTGCA AACATCTCTC CATCATATTA AAGGCGCCAG
1501 CTTTATCTCT TCGTCTCTCG GATATTTT TCGAGCATGTG TCGTCTCTCG CATCATATTA
1561 TCAATTTCTC TCGAACCTTA GATATTTT TCGAGCATGTG TCGTCTCTCG CATCATATTA
1621 CCGTCTCTCG TCGAACCTTA GATATTTT TCGAGCATGTG TCGTCTCTCG CATCATATTA
1681 TCTGTGTGCA ATCTCTCGCT GATATTTT TCGAGCATGTG TCGTCTCTCG CATCATATTA
1741 GAAACAGCGG GTCTCTCGAG TCGTCTCTG AAGTCTTGG GATTTCTCTG GCGAATCTCT
1801 GGAACGCTGT GCGCTTGGT ACAGGCTGCT TCGTCTCTG AAGTCTTGG GATTTCTCTG
1861 CCGTCTCTG ATCAGGCTGT ATCTTTCTCT TCGGAGAGG TCGTCTCTG AAGTCTTGG
1921 AACGAGTATC CCGTAAATGA AATAATTTAT GATTATTTCT GCGTCTCAAT TTAACACAG
1981 CCGTCTCTG CTTTGTATTT ATTTTCACTT TTAAGTATA GAATAAAGAA GCTCTAATTA
2041 ATTAAGCTAC AATATGTTTCT GTTTTCACTT TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2101 CCGTCTCTG AATATGTTTCT GTTTTCACTT TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2161 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2221 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2281 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2341 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2401 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2461 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2521 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2581 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG
2641 TCGATCTCAT GAGTATCTTT TCGTCTCTG TGTCTAATAA CTAATTAAT AAGGCGCCAG

【図 2 8】

1 ATGGAGTCTT CTGCCAAGAG AAAGATGGAC CCTGATATC CTGACGAGGG CCCTTCCTCC
61 AGATGGCCAC GGCCCGAGAC ACCCGTGACC AAGGCGACGA CGTCTCTGCA GACTATGTTG
121 AGGAGAGGAG TTAACAGTCA GCTGAGTCTG GGAGACCCCG TGTTCGCGA GTTGGCGGAA
181 GAATCCCTCA AACTTTTGA ACAAGTGACC GAGGATTGCA ACAGGAACCG GATGAGATC
241 GTCCCTGGCG AACTCGTCAA ACAGATTAAG GTTCCGAGTG ACATGGTGGC GCGCTTTAAT
301 AAGAGGACGA TGCTGTAAGA ATATACCCAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
361 ATGATGGGAG GTGTTTATG GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
421 GAGGAGATGA AGTGTATGTT GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
481 GAGGAGATGA AGTGTATGTT GATGATCTAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
541 GCGGCTAACA AGTGTGGGGG TGCACTGACG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
601 AGGAGAAAGA TGATGTATAT GTGCTACAGG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
661 TCCCTTAAGA CCACCAATAG GTGCTACAGG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
721 TGCTTCCTCG ATGAGATTAT GCGTATGACC GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
781 AGAGCAAGG TGCTACAGCA CATGATGAC ATATTATG GATGATCTAG GATGATCTAG
841 GAGCAATGT GTATAGTGA GTTCTGTGCG GTGCTGTGCT GATGATCTAG GATGATCTAG
901 ACCAAGCGCT AGGTTATCAG TGTAAATGAG GCGGCGAGT GATGATCTAG GATGATCTAG
961 TTTGCGGAGT ACATTTCTGG GCGGAGTCTT GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1021 TCGGCGGCA TCGGCGAGG GTGAGATGAG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1081 ACCGCTGGTG TCGCTCTCTG GTGCTCTCTG GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1141 ACTATGCTCT TGCTCTCTG AATTTCTGCT GATGATCTAG GATGATCTAG GCGCTTTAAT
1201 AGTATGAGG GGGTGTGCG GAGGAGAGG GAGGAGAGG GAGGAGAGG GAGGAGAGG
1261 TCGTGTGAGT AGGAGAGG GCGGCGAGT GCGGCGAGG GAGGAGAGG GAGGAGAGG
1321 GAACCCAGC CTCTGTGAGT TAAGATATCC ACCCTATG TGACTAGAG CAAAGCTGAC
1381 CAGTAA

【図 2 7 B】

3121 ACTTTTAAAT AACAAGAGG TTAAGTACT CATATGAGC CCGTCCAGTC TGAACATCAA
3181 TCTTTTATAG CAGAGATATC ATAGCCGCTC TTAGAGTTTC AGCGTATATT TCAACCTTAA
3241 ATAGACTCTC ATCGTTGGGT TACAACTTAT TTTCTATTTG TTAACACTTT GTTGTAGAT
3301 TAGTAACTCT TTTTTCGAAA TTAGTTAGCC GTTGTGTAGG AGTTTCTCTA GTTGTAGAT
3361 CATCGGCTTT ACAAATTTCT TCGGCTTTAG CCGCTGGGCT GTTCTATCA GCTTTGTAGT
3421 AAAAAAATC AGTTGCTGGA ATTCGAGAT GTGATCTCT GGGGAAAGA GTTCCGTGCA
3481 TTTAAAGCG CCGGAATTC

【図 29 A】

1 AAGCTTCCGG CCCTCTCTTA GACAAGCGAA TGAGGGACGA AAACGTGGAG GAGGTATTAA
61 GTTTGGAGAA ATGGAGAGAG ACTGTTTAAT AGCGCATGCG GCAGCCAATA CTATCTAGGA
121 AGTTTGTGAA GATTTCGAGAG AAAGTTTATCA AGATGTGTAT GTTTGTGAAA ATTTGTGGGA
181 CATAGCAGCA CAATCAAGAG GTATTAAATAC ATGTCTTAGA TGTTCAAAAC TTAATCTCTC
241 TCCTCTCTCTA ACAAAAATTTG ATACCACGCA CGTATCTTAA GTATTCTCTA TCAAAATGAA
301 CGCGAGAGCG GTAAAAGTGA ACCTTGTCTT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
361 ATTAGATAAA GTTGATCTGA ACCTTGTCTT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
421 GAGATATAAA TTAGTCTGTA ACCTTGTCTT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
481 AGAGGCGCGT GGGTCTCTCA GCACATCTCT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
541 CAGACACATCG CTCAGATCTG ACACAGACAT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
601 CCTCTCTCTC ATCACTCTCTG TCACCTTCTT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
661 AGGACAGAGCG GATAGTCTCG GTTACAGGGG ACTCTGTGGG TGACACACAG TCTGTGTGTA
721 AGCTAGACAC AGCGGTGGCC AAAGTGTAGG CTACAATAGC TCTGTGTGTA TAAAAATTA
781 CGGCGATGCG CGGTAGGTCA TCCACATCTAG GAGAGCAGAG TCTGTGTGTA TAAAAATTA
841 GAATGTACTG CCGAAAAGCC TTCTATGAGA TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
901 TAACTCTCAG TCTGTGTGTA AGAGGCGCGT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
961 CTCTTCACTAT TGTTTCCACA CATGTATGTA GGTATCTCAT TCTGTGTGTA TAAAAATTA
1021 TCACTCATCGT GATCTCTCTC TCATCCAAAA TCTTAAATAT TTTCTGGGCA TAAAGCCATA
1141 TGTGTGTCTT AGGGAAGGCT GAGTCTTCTG TAAAGAACTC TATATCTCTG TAGCACATCT
1201 ACATCACTCT TCCCTCAAGT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT
1261 CACACTTGTT AGCGGCGGCC TGTCTCTCAT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT
1321 TCTCCCGGCT ATCTCTAGGT ACAATGTAGT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT TCTGTCTCAT
1381 TACACTCTAT CTCTCTGAAA GGCTCATGAA CCTTATCTAA GATATCTAAG CTGTCTCTAT
1441 AACACTCTCC CATCATATTA AAGGCGCCAG TGAATTTCTC TTTCTGGGCA TAAAGCCATA
1501 TCAGATGTGT CTCTCTGATT TATGCGCGCA CCATGTCCAC TCGAACCTTA ATCTGTCTC
1561 CGAGTTCTCG CAGGACATCT TTTCTGGGCT TCTGTGTGTA TAAAAATTA TTAATTAACCT
1621 AAGTTTGTAG GAGTCTCTCG GCCAACTCTG GAAACAGCGG GTCTCCAGA CTCACTGTAC
1681 TGTAACTCTC CTCTCTCAAC ATAGTCTGCA GGAACGTCGT GCGCTTGTCT ACGGCTGTCT
1741 CGGCGCGTGG CACCTTGGAG GAAGGCGGCT COTCAGGATT ATCAGGGTCT ACTCTTCTCT
1801 TCGCAGAGAG CTCATCTAGG ATACAAACTT AACGGATATC GCGATAATGA AATAATTTAT
1861 GATTATTTCT CGCTTCTCAT GCTCTCAATC ATTAAGCTAC AAATAGTTTC GTTTTCACTT
1921 TTTAGATATA GAATTAAGAA GCTCTCAATC ATTAAGCTAC AAATAGTTTC GTTTTCACTT
1981 TGTCTAATTA CTATTAATTT AACCCGATG TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT
2041 GAGATCTTAA TTAGTTTCTT TTTTCACTAT TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT
2101 TGTCTAATTA TTTTCACTAT TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT
2161 CAGACTGTGA TTTTCACTAT TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT TTTTGTAACT
2221 GTACTTTTCT GATTAATACA GAGTAGATAT TAATGTCTGA TTTGAACAGA GCGTGTAACT
2281 TCTCAATGTC TTATTTTCTA TAATGTCTGA TTTGAACAGA GCGTGTAACT TTTGAACAGA
2341 TGTGTGTGTT CGAGCTGATA TAGTCCAGCA AGAGAATCAT CATATCCAGC TGTGCTTTCT
2401 TTTAGTGTGT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2461 AAGAAAGTGA TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2521 TCCATCTCAG TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2581 GCATGTACCT ACTATCAACC GCAATCACTC TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2641 AATCATCTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2701 CCGATGTCTA TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2761 TACATCTAGT AGCAGCTGTA TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2821 CATCCGCTCT AATGTCTCT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2881 TATTAATCTG TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
2941 TTTTATATCT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
3001 TTTTATATCT AATCACTTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
3061 CATATGAGAT CGCTCAGCTC TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT TTTTCACTAT

【図 29 B】

3121 TTAGAGTTTC AGCGTGATT TCCAACCTAA ATAGAACTTC ATCGTGTGCT TTACAACACT
3181 TTTCTATTTC TTCAAACCTT GTTGTATCAT TAGTAATCTT TTTTCCCAA TTAGTAGGCC
3241 GTTGTATTAG AGTTTCTCTA TGTCTGTCTT CATCGGCTTT AACAAATGCT TCGCGTTTAT
3301 CTCTCTGCT GTTCTTATCA GCCTTTGTAG AAAAAATTC AGTTGTCTGA ATTCGAAGAT
3361 CGTCATGCTT GGGGAAAGGA GTTCCGTTCA TTTAAAGCCG CGGGAATTC

【図 31】

1 CTCAGGCTCG ACGGATCTGA GAATGGATGA TTCTCCAGCC GAAACATATT CTACCATGGC
61 TCGGCTTTAT TTGTTGATGA AATTTGATTC ATCTTAAAT GTTTTCTCTG TAAATGTCTT
121 CACGAAAGAA CATAGCAAGG AATTTGATTC ATCTTAAAT GTTTTCTCTG TAAATGTCTT
181 GGCTCTAGAG GTTGTATACA ACATAGGATG TCGTTAAATG TAACTATAGC
241 TCCATCGGCT CTATCTTGTG TAGATTATAT TTTTAAAGAT ACTTTTATTT TAAAGAAAGA
301 AATAAAGTGA GAAGTCAATT GAGTAGATGA ACTATCAAGT AGTTTATATG TTTTCACTAT
361 ACATATAGCG TATTGAGAGG CATTTAGTGT AACGTATATG ATACATTTTC CTTTCACTAT
421 ACATATAGCG TATTGAGAGG CATTTAGTGT AACGTATATG ATACATTTTC CTTTCACTAT
481 AGTAGGCTCT GGTGAAGTGT CAACCTCTCT CTGTGATGAC TTTTCACTAT TTTTCACTAT
541 AATAATGTAT TTTGTAATAT AATGATATAT ATTTTCACTT TTTTCACTAT TTTTCACTAT
601 AGATCAAAAG AATTAACATA TCAAGATCTT CTCTTATCTT ATACTTAAAG AGTGAAGATA
661 AATCAAAAGG TCTCTGAGGG TTGTTTAAAG TGAAGAGCGA GAAATATATT TAAATTTATT
721 CATTTATGCG ATATCTATGA AGTTTGTATC GTAAATGAAG AGATTAAAGT TCGAGTGGAG
781 ATGCTGCGCG ATAGATCTAA GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
841 TTTCACTGCG CTCTTATATG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
901 AAGGTTCTAG AGGCTTTCTG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
961 GAGGAGGAG TTGTACTCTG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
1021 CATGATAGGA AGCAAGGCGC GCTTAAAGAG TTTGGGGGCTG CACTGAGGCT TATAGAGTAA
1081 CCGTAAAGAG TCGAAGCTAG GAGAAAGATG GTCTACAGAA TATAGAGTAA TATAGAGTAA
1141 TTTACCAAGA ACTCAGGCTT CCGTAAAGAG ACCAATGGCT CAGATCAGG CATTGAGGCT
1201 CTGCAAGACT TGCTCTCAGT CTCTCTCTAT TTTTCACTT TTTTCACTT TTTTCACTT
1261 AAGATTTTGG ATGAGGAGAG AGCAAGGCTG CTACAGCACA TTTATGATAT TTTTCACTT
1321 ATCTCTATCA ATCTGTGAGG ACAAATGGT ATAGAGTACA AGGTCACTAG TTTTCACTT
1381 ATGATACACA CTGACGCGCG CATCTCTCTC TTAAGTGTAG TCTGTGCTG TTTTCACTT
1441 TATGCTTTAG AGGAGACTAG TTTGATGCTG GCGCAAGGCG CCGATCTGCA TTTTCACTT
1501 TATGCTTTAG AGGAGACTAG TTTGATGCTG GCGCAAGGCG CCGATCTGCA TTTTCACTT
1561 ATCTGAGGCG CCGATCTCTG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
1621 CCGAGAGAGT CAGATCTCTG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
1681 AGCTCTCTCT ATCTCTCTG GTACACGCGA GAGTCCGCT TACCCGCGC TTTTCACTT
1741 TCTCAGTAA TTGTGCTCTG GAGAGTCTAG TGTATGAGG TGGTGTGATG TAAAGCTTAA
1801 GAGGAGGAG GTGCTCAGG GAGAGGCGG GACACTGTGT CTGTCAAGT TTTTCACTT
1861 TCTGAGATAG AGGAATCTGA CCCAGAGGAA GAGGAGGATG GTGCTGAGG ATCCACGCGC
1921 TCTGAGGATG AGAGTACCTA AGCTTACCTG ACTAGAAGCA AGGCTGAGCA GTAAATTTTAA
1981 TCTGAGGAG GATTTAGCT ATGTAAGCTA CAAAATTAAT TTTTCACTT
2041 CATTAATAGG TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2101 GAGTCTCTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2161 TATTAATGAT TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2221 CATTAATGAT TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2281 AATAATGAT TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2341 ATGTTTCTTA CATATTTTCT TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2401 AGACTTCTAT ATCTTCTATG ATATAGATAC TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2461 TCGTAAAGAT GTAGAATTTT TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA
2521 ACGCTTATTA TTAATATGAG TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA TTTTCACTA

【図 30】

1 ATGAAACAGA TTAAGGTTTC AGTGACATG GTGCGGCATA GAATCAAGGA CCACATGCTG
61 AAAAAATATA CCCAGACGGA AGAGAATTC ACTGCGGCTT TTAATATGAT GGGAGGATGT
121 TTGCAGATAT CCTTAGATAT CTATGATAGG ATCTATGAGC TTTCTGAGGA GTTAAAGTGT
181 ATTTGGGCTAA CTATGATAGG CATGTATGAG GTTCTAGAGG TACGCGGAG
241 ATTTGGGCTAA CTATGATAGG CATGTATGAG GTTCTAGAGG TACGCGGAG
301 GGGGTGTCAC TGCAGGCTTA AGAGTCTCTT ACCAAGAACT CAGCTTCTCC TACGCTGCT
361 TATATGTGCT ACAGGAATAT GGGCGGCTCT CAGAACTTTC TTTTCACTT CCGTGTATG
421 AATGCGTCTA GTACGGCCAT GGGCGGCTCT CAGAACTTTC TTTTCACTT CCGTGTATG
481 ATTTGTTGAT ATGCCCAGAA AATATTTAG ATGACCATGT GTGTGGAATC AATGTGTAT
541 ACGCACATG ATCACAATAT TATGATATCT CTACATCTAT AGGAGAGAGA CAAGGTGTCT
601 GAGTACAAG TCACTAGTGA CGCTGTATG ATGACCATGT GTGTGGAATC AATGTGTAT
661 AGTGAATCT GTGCGGTGCT GTGCTGTATG GTCTGTAGAG AGACTAGTAT CTCTCTCTA
721 AAGCGGCTCT TGATAACCAA GCGTGAAGTT ATCAGTGTAA TGAAGCGCGC CATGTAGGAG
781 ATTTGATGAT AGGCTTTTTC CCAATGATAT CTGCGGCGCG ATCTCTGAG AGTCTGTCT
841 CCTAGTGTG ATGACCTACG GCGCACTGCG GAGGAGTCTAG ATGAGGAGAG GGTCTATGTA
901 CCTACACTT TGCGCCACCG TGGTGTGCTG TCTCTGATT CTCTGTGCTG ACCGCCAGAG
961 TCGGCTGAT CCGGCACTAT TCGGCACTAT TCGGCACTAT TCGGCACTAT TCGGCACTAT
1021 GAGAAAGTGT ACAGGATGTA GAGGAGAGAG GAGGAGAGAG CTTAGGAGAG CGGGAGGAG
1081 ACTGTGTCTG TCAAGTCTGA GCGCTGTCTG CACCGCTCTT GGAGGTAAAG GTACCCACCC
1141 GAGGATGGTG CTAGGAAACC CACCGCTCTT GGAGGTAAAG GTACCCACCC
1201 AGAAGCAAG CTAGCAGTA A

【図 32 A】

1 GATTTGCGC CGCTGAATGT TAAATGTTAT ACTTTGGATG AAGCTATAAA TATGATTTGG
61 AAAAAATATA CATTAAAGA AAGGATTTAA ATACTATCAA ACTTAAAGGA TAAATGTTTA
121 ACTAAGCTTA TTTTAAAGCA CGCTTAAAT ATACACAAT AACATATAT TTTTATTAAC
181 TAAACAATA ACTAAGACAT AAAAAATTA AAAAAATTA TAAATATCTA TTTTATTAAC
241 TCAGGAGATG GGTAAATAT TTAATACAGG TGTATATCTA TACTGTATCT TTTTATTAAC
301 TACAATTAAT ATTAGAATA TCGAAGAGAT AATAAGATG CGTATTTAAG AAGATTTCTG
361 CATGATAAT GGGTACGACA TAGTGATAAA TGTATTTCTG CATCGTTACA TAAAGTCTAG
421 TGGAAAGATG GATTGTACAG ATGTAACTTA ATAGGTGCAA AAATGTAAA TAAAGTCTAG
481 CATCGGAAG ATAGGATACC AGTTATATTA TACAATAACT ACTGTTTGA TAAAGTCTAG
541 TCTGCAATAT TCGTAAAGA TGAAGATTAC TCGCAATTTG TAAAGTCTAG TAAAGTCTAG
601 CCAATTTATC CACGACATC GTGTAATCT TCAATTTTCT ATGTATGTT TTTTCACTT
661 ATGAGATAC TATAATCTT TGTATATCT TGTATATCT TGTATATCT TGTATATCT
721 AATGAAGA TGTTCAGAG TGTTCAGAG TGTTCAGAG TGTTCAGAG TGTTCAGAG
781 CAGATGGCT TACATATGAG TCTGTGAGG TCTGTGAGG TCTGTGAGG TCTGTGAGG
841 TAGGTTTCTG GACAATGGAT TCGACCTTAA CACGGAATG GTATCTCTAC GTATCTCTAC
901 TGAATGGCT GTAATGTTC AAGATACCGA GCGTATAA ATCTGTATG GTATCTCTAC
961 TATGCGGAT TGTACTGAAT GCACACTCT TGTCTCTGAT GATGCGGCTG TGAAGAGCA
1021 TACAAATAA GTGAAGATC TGTGGAAGA TAACTATGTA AACAATGTT TTTTCACTT
1081 AGGCTTTTACT CTTTGTGTT TGGCAGCTTA TGAACATGTT TGAACATGTT TGAACATGTT
1141 ATTTGCTCAT TCGCGGATG TAGATATTTT AACAAGGAT CCGTTAACTC CTCTACATAT
1201 AGGCTTTTACT AATAAATAA TGAACATGTT TGAACATGTT TGAACATGTT TGAACATGTT
1261 TGAATTTCTG GATAACATG GACGTACTCT TTTAATGATG GCTGTACAT CTGGAATAT
1321 TGAATTTCTG GATAACATG GACGTACTCT TTTAATGATG GCTGTACAT CTGGAATAT
1381 TGAATTTCTG TAAATTTCTG TAAATTTCTG TAAATTTCTG TAAATTTCTG TAAATTTCTG
1441 GATTAATCT ATCTCTTGA TGAACATG TGAACATG TGAACATG TGAACATG
1501 GATTAATCT ATCTCTTGA TGAACATG TGAACATG TGAACATG TGAACATG
1561 AATTAGTCTA AAAAAAGAT CCGGTATAT TTTTCACTT TTTTCACTT TTTTCACTT
1621 CATTCTGCTT GTTAATTAAT TAGAGCTCTT TTTTCACTT TTTTCACTT TTTTCACTT
1681 ACAAAGGTT TTTGAGGTTG TGTAAATG TGAAGAGGAA TTAATGTTG ATGAGTATG
1741 TATGCGGAT TCGGTTAAGT TTTTCACTT TTTTCACTT TTTTCACTT TTTTCACTT
1801 GTGCGGATG GAATCAAGG GCACATGCTG AAAAAATAA CCGAGAGGA AGAGAAATTC
1861 GTGCGGCT TTTAATGAT GGGAGGATG TTTGAGATG TTTGAGATG TTTGAGATG
1921 GTTCTGAGG CTCTCGAGG GATGAAGTGT ATTTGAGGAT TTTTCACTT TTTTCACTT
1981 ATCTACATG TACCTGAGG TAAAGCGGCT TAAAGCGGCT TAAAGCGGCT TAAAGCGGCT
2041 GATGTAGCA AACTTAGAG AAGAGTATG TATATGTCT ATGAGTATG ATGAGTATG
2101 AAAAAAGT CAGCTTCTC TGAACATG TGAACATG TGAACATG TGAACATG
2161 ACAAAGAT CAGCTTCTC CAGTATGAT ATTTAGCTT ATTTAGCTT ATTTAGCTT
2221 CAGAGATCT CTGAGTCTC CAGTATGAT ATTTAGCTT ATTTAGCTT ATTTAGCTT
2281 ATTTTGTATG AAGAGAGAGA CAGTCTCTC AGGCACATG ATACATAT TTTTCACTT
2341 CTACATCAT GTGCGGAAC AATGTGATG AGTACAAG TCACTATGAT CCGTGTATG
2401 AGGACCATG ATCGGCGGCT CTCTCTCTA GTGTAGTCT GTGCGGCTG GTGCGGCTG
2461 GTTCTAGAG AGACTATGT GTGCTGCGC AAGCGGCTC TGAATACCA CCGTGAAGT
2521 ATCAGTGTAA TGAAGCGGCT CATTGAGG CATTGAGG CATTGAGG CATTGAGG
2581 CTTGCGGCT ATCTCTCTG AGTCTGCTC CTTAGTCTG ATGACATCTG GCGGCTGCGC
2641 GAGGAGTCA ATGAGGAGAA GCGTATGTA GCGTATGTA GCGTATGTA GCGTATGTA
2701 TCTGCTATG CTTGCTGCTG ACCCCAGAG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG
2761 TCAATGAT TCGTCTGCTG ACCCCAGAG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG
2821 GAGGAGGTTG TCGGAGAG TCGGAGAG TCGGAGAG TCGGAGAG TCGGAGAG
2881 GAGATAGAG AAGTGTGCTG AAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG
2941 GAGGATAG GATCCACCT TATGCTGAT GAGGAGAG GAGGAGAG GAGGAGAG
3001 CGAGTCTAGA ATCATGCTG GTTTTATG AATGATTAAT CACGCGCTC TATAAGATG
3061 TAAATTCAT AATTTCTAA TAAATTCAT AATTTCTAA TAAATTCAT AATTTCTAA

【図 32 B】

3121 TTTTCAATG GAGATTAAG CTCTATACG TTTCTATGTT ATGATTTAG ATGATGTTT
3181 AGAAAGATA GTTATTGAAT ATGAAACTT TAAATGATG AAGATGAGT AAGATGAGT
3241 TTTGTTGAAA TCTGTTTTAG ATGAGAGAG TGAAGCGCTA TATGATCTA TCGTTACAA
3301 GTATAAGTCT ATACTACTAA TGGCGACTG TGAAGAGAG TATGATATG TGAATATGTT
3361 GTATGATTAT GATTATGAAA AACCAATAA ATCAGATCA TATCTAAGG TATCTCTTT
3421 GCACATTAAT TCATCTATC CTAGTTTAGA ATACCTCGAG

【図 3 3】

1 ATGAGGACGCT TCCTGCGACG TATGTTGAGG AAGGAGGTTA ACAGTCAGCT GAGTCTGGGA
 61 GAGCCCGCTGT TTCCAGAGTT GGGCGAAGAA TCCCTCAAAA CTCTTGAACA AGTGACCGAG
 121 GATTGCAACG AGAACCCTGAG GAAAGATGTC CTGGCGAAGC TCGTCAAAAC GATTAAAGGT
 181 CGAGTGGACA TGCTGCGGCA TAGAATCAAG GAGCAGATGC TGAAAAAATA TACCCAGACG
 241 GAAGAGAAAT TGCTGCGGCG CTCTTAAATATG ATGGGAGGAT GTTGTGAGAA TGCTCTAGAT
 301 ATCTTGATGA AGGTTCTAGA GCTCTCTGAG GATTAAGGAGT GATTAAGGAGT AACCTATGAG
 361 AGCATGTATG AGAATCTACT TGTAAGCTGAG TGTAAGCTGAG TGTAAGCTGAG TGTAAGCTGAG
 421 AAGGAGCTGC ATGATGTGAG CTAAGGCGGCG CTAAACAATG TGTAAGCTGAG TGTAAGCTGAG
 481 AAGGCGGCTG CTAAAGAGGA TGAATCTAGG AGAAGATGTA AGAATGATGTA AGAATGATGTA
 541 ATAGAGTTCT TTACCAAGAA CTACAGCTTC CTAAGAGACA CCAATGCTG GATTAAGGAT
 601 ATGGCGGACG TGCAAGAACT GCCTCAGTGC TCCCTGATG AGAATGATG GATTAAGGAT
 661 AAAATATTTA AGATTTTGA TGAGGAGAGA GACAAGGTGC TCACGACATC TGATCAACATA
 721 TTTATGATGA TCCTCACTAC ATGTGTGGAA ACAATGTGTA ATGAGTACAA GGTCACATGT
 781 GACGCTTGTA TGATGACCAT GTACGCGGCG ATCTCTCTCT TAAGTGAAGT CTGTCGGGTG
 841 CTGTGCTGCT ATGTCTTAGA GGAAGACTAG GTGATGCTGG CCAAGCGGCG TCTGATAGT
 901 AAGCCTGAGG TTATCAAGTGT AATGAAGGCG CGCATGTAGG AGATCTGCAT GAAGGTCTTT
 961 GCGGCTGAGG TTTCTGGGCG AGAGTCTGCT CCCTGATGCT TCTGATAGT GGATGACCTA
 1021 CGGCGCTGCG CCGAGGAGTG AGATGAGGAA GAGGCTATTG TAGCTTACAC TTTGGGCGAC
 1081 GCTGCTGTGA GCTGCTGTGA TCTCTCTGTT TCACGCGGAG AGTCCCTCTG ACCCGGCGAC
 1141 ATCCCTCTGT GCGCTGTAAT TTGGGCTGAG TACAGTGTGTC AGAAGAGGAG TGACCAAGCT
 1201 GATGAGGAG AGGAGGAGGG TGCTCAGGAG GAGCGGAGG ACATCTGTG TCCTGAGGAG
 1261 GAGCAGTGT GTGATGCTGA GGAAGTGTGC CAGAGGAGG AGGAGGAGG TGCTGAGGAG
 1321 CCCACGCGCT CTGAGGTGTA GAGTACCCAC CCTATGTTGA CTAGAAGCAA GGCTGACCA
 1381 TAA

【図 3 4】

1 CTGAGGCTCG ACGGATCTGA GAATGGATGA TTCTCCAGCC GAACATATTT CTACCATGSC
 61 TCCGTTTAAAT TTGTTGATGA AGATGAGTAT ATCCCTTAAAT GTTCTCTCTG TAAATGTTTC
 121 CACCGAAGA CTATGCAAGC AATTTGGAAT GCGTCTCTCTG TGCTTAATGT TTCCATAGAC
 181 GCGTCTAGAA AGTTGATAGA ACATAGGACT AGCCCGGGTA ACTTTTATTT TTGAAAGTA
 241 TCCATCGCTT CTATCTGTTT TAGATTTATT TTTTAAAGT TAGTCTCTCT CTTCACCAAT
 301 ATAAAGAGG GAGTCAATTT GACTAGATAA AGTTATGATG ACTTTTATAG AGTAGAGACA
 361 ACATTTAGCG TATTTGAGAA CATTTAGTGT CATAAGACC CTGTATGATC GACTATGATC
 421 ACTATCGAT TTGCAATACT CTAAAGTGT CACTCTCTCT TACTAGAGAT TTAACCTTAA
 481 AGTAGGCTCT GTTGAAGTTT ACAAGTGACC GTTATGATAT ATTTCTACT TACTCATTA
 541 ATAATTTGAT TTTGTAATAT AATGATATAT ATTTCTACT TACTCATTA TACTCATTA
 601 AATACACAAA AATTAACATA TCAGGATCTCT TCTTTATCT TACTCATTA TACTCATTA
 661 AATACAAAAG TTCTTGAGGG TTGTTGTAAT TTGAAAGGCA GAAATATCTA GACTATGATC
 721 CATTTAGCGG ATATCCGTTA AGTTTGTATC GTAAATGACC CGTTCCTGCA GACTATGATC
 781 AGGAAGGAGG TTAACGATCA GCTGAGTCTG GAGAGCCGCG GTTTTCCAGA GTTGGCGGAA
 841 GAATCCCTCA AAATTTTGA ACAAGTGACC AGCGAAGAGA AATTCAGTGT CGAGAAAGAT
 901 GTCTGCGGAG AACTGCTCAA ACAGATTGAG GTTTCAGTGT ACATGTTGCG GCATGAAGATC
 961 AAGGAGCACA TGCTGAAAAA ATATACCCAG ACAGGAGAGA AATTCAGTGT GCCTTTTAA
 1021 ATATGCGGAG GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA
 1081 GAGGAGATGA AGTGTATTTG GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA
 1141 GAGGATAAGC GGGAGATGTT GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA
 1201 GCGGTAAACA AGTGGGGGG TGCACTGCGG GATGTTTGA GATGTTTGA GATGTTTGA
 1261 AGGAGAAAGA TGATGTATAT GTGCTACAGC GCGATGCGCG TTAAGATTTT TACATCTGTC
 1321 TCCCTTAAAG CCACCAATGG GTGCACTGAG GCGATGCGCG TTAAGATTTT TACATCTGTC
 1381 TGCTCCCTCG ATGAGATTAT GGCTTATGCG CAGAAAAAT TTAAGATTTT TACATCTGTC
 1441 AGAGACAAGG TGCTCAGGCA CATTGATCAC ATATTTATGG ATATCTCTAC CATGTCAGG
 1501 GAAACAATGT GTATAGATA CAAGGCTCAT AGTGACGCTG ATATGATCAT GACTGACGG
 1561 GGCATCTCTC TCTTAAAGTA GTTCTGTGCG GTGCTGTGCT GCTATGCTCT AGAGAGAGAT
 1621 AGTGTGATGC TGCGCAAGCG GCGTCTGATA ACCAAGCCTG AGGTTATCAG TGTAATGAG
 1681 GCGGCAATTT AGGAGATCTG CATGAAGGTC TTTGCCAGT ACATCTCGGG GCGGATCTCT
 1741 CTGAGGCTCT TTTGAGCTTA TGTTGATGAT GATGTTGATG GATGTTGATG GATGTTGATG
 1801 GAAGAGGCTA TTTGAGCTTA TGTTGATGAT GATGTTGATG GATGTTGATG GATGTTGATG
 1861 GTGTCACCCC CAGAGCTCCC GTGTTGCGG ACCTTTGCGG ACCTTTGCGG ACCTTTGCGG
 1921 GAGACAGATG ATCAGGAAAG AAGTGACGAG ACTATCTGCT AGTATGCTG AGAGAGAGG
 1981 GAGGAGCGGG AGGACACTGT GTCTGTCAAG TCTGAGCCAG TCTGAGCCAG TCTGAGCCAG
 2041 GCGCCACAGG AAGAGAGAGA TGTTGCTGAG GAACCCACCG CCGTCTGAGG GATGATGATC
 2101 CACCTATGAG TGACTAGAAG CAAGGCTGAC CAGTAATTTT TATCTCGAGC CCGGAGATG
 2161 TGAGTAACTT GATTTTCTG GAAAAAAT TATTTAACTT TATTTAACTT TATTTAACTT
 2221 GTATGTAGCG TACAAAATTA TCGTTCTGCG TATATAGATA AAGATCTCTA TATATTTGAA
 2281 AATCTGTAGC GCTCGATTAA ACTTTAATGA TTGATAGATA AAGATCTCTA TATATTTGAA
 2341 ATCTGTAGC ATCTGTAGC GCGGCAAGAT TACCATCAAA TACCATCAAA TACCATCAAA
 2401 GATCGAGTGT AGAAGTGTGT TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG
 2461 ATGACACAAA GCTCTAGTTG TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG
 2521 TTTCTTATTA GTAATGATC TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG
 2581 AGATAGATA CCGTCCAGA TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG TATGATGATG
 2641 TTTTAAAGG TATCTTTTGT CTATACCAA GATTTGTTT AGCTGATTT TATTAATATG
 2701 AGTAATGAAA TCCACACCGC TCTGATATC TCTGATATC GGGGAATTC

【図 3 5 A】

1 GAATGCGCGC GCGTGAATGT TAAATGTTAT ACTTTGGATG AAGCTATAAA TATGCAATGG
 61 AAAAATAATC CATTTAAAGA AAGGATTTCA ATACTTCAAA ACCTAAGCGA TAAATGTTAT
 121 ACTAAGCTTA TTCTTAACGA CCGCTTAAAT ATACACAAT AAAGGAAATG TAATGTTATC
 181 CTAAACAATA ACTTAAACAT AAAAATAAAT AAGGAAATG TAATGTTATC TAATGTTATC
 241 TCAGGAGATG GGTAAATAT TTAATATCAG TGTATATCTA TACTATCTGA ATTTATTTAC
 301 TACAATTAAT ATTAACAATA TGCAAGAGAT AATAAGATTA CGTATTTAAG AATATCTTGT
 361 CATGATAAAT GGGTACGACA TAGTGATAAA TGCTATTTTG CATGCTTACA TAAATCTTGT
 421 TGAAGAGATG GGTATGACAG ATGTTGATTA ATAGGTGCAA AAATGTTAAA TAACATCTGT
 481 CTATCGGAG ATAGGATACC AGTTATATTA TACAAAACTC ACTGGTTGGA TAAACAAGAT
 541 TCTGCAATAT TCGTGAATTC TGAAGATTAT TCGCAATTTG TAAACTATGA CAAATAAAG
 601 CCAATTAATC CAACGACATC TGTAATTTCT TCCATGTTTT ATGATGTGTT TACAGATATT
 661 ATGAGATTAT TTTTAACTTT TGTTATACCT ATATTCCGTA AACTATATTA ATCATGAAGA
 721 AATGAAAA CTATGAAGC TGTTCCGAGG CCGTTGTTGA AAACAACAAA ATTTATACAT
 781 CAAGATGCTT TACAATAAGC TCTGTGAGG CACAACCTGA CAGCAATATG GGTACCTTAAA
 841 TAGGTTTTTG GACAATGGAT TCGACCTGAG TATCATGGAT AATGACATAT AATCTCTTAA
 901 TGAATGGCT GTAAATGTTCA AGAATACCGA GGTATATAAA ATCTTTGAGG GGTATGAGG
 961 TAAACCTGTA GTTACTGAAT GCACAACCTC TGTCTGCAAT GATCGGTTGT TTTAGAGG
 1021 CTACAAAAAT TGTTGAAGAA TAACTATGTA AACTATGTTT TAAATGTTT TAAATGTTT
 1081 AGGCTTTTACT CTTTGTGTTT TGGCAGCTTA CCTTAAACAA GTTAATTTTG TAAATGTTT
 1141 ATTTGCTCAT TCGGCGGATG TAGATATTTT AAACACGGAT CCGTTTAACT CTCTACATAT
 1201 AGCGGTATCA AATAAAAAAT TAAACAATGT TTAACCTTAT TTAACAACAA GGTGATATC
 1261 TGACTTGTG GATAACATGG GACGTATCTC TTTAATGTCC GCTGTACAAT CTGGAATATC
 1321 TGGCAGCTG AATGACATGG TGAAGAAAGA GTGCTCAGG TACTTTTCAA CAAAGAGGCA
 1381 TGGCAGCTG AATGACATGG TGAAGAAAGA GTGCTCAGG TACTTTTCAA CAAAGAGGCA
 1441 GATGTAAAT ACTTCTTGA AAGAAATGTA CTGAAGTGTG AAGTCTCAAG GGTATGAGG
 1501 GAAAGTTACT CTGAGACACA AAGAAATGTA CTGAAGTGTG AAGTCTCAAG GGTATGAGG
 1561 AATTAGTACT AAAAAGGATC CCGGTTAAT TTAATCTTCT TTAATCTTCT TTAATCTTCT
 1621 CTATCTGCTG GTTAAATTAAT TAGAGCTTCT TTAATCTTCT TTAATCTTCT TTAATCTTCT
 1681 ACAAGGTTG TTAGGGTTG TGTTAATATG ATGACGAGAT TCTTGCAGC TATGTTGAG
 1741 TATCGCGATA TCCGTAAAGT TGTTAATATG ATGACGAGAT TCTTGCAGC TATGTTGAG
 1801 AAGGAGGTTA ACAGTCACTG GAGTCTGGGA GACCCGCTGT TCCAGAGATG GCGGCAAGAA
 1861 TCCCTCAAAA CTTTGAACA AGTGACCGAG GATTGCAACG AGAACCCTGA GAAAGATGTC
 1921 CTGGCAGAAC TCGTCAAAAC GATTAAAGGT CGAGTGGACA TGGTGGCGCA TAGAATCAAG
 1981 GAGCAGATGC TGAAGAAATA TACCCAGAGC GATTTGAGAT AGGTTTATG GCTTTTATG
 2041 ATGGAGGAT GATTTGAGAT TGCTTAGAT TGGCTTATG ATCTTAGATG AGAAGTATG
 2101 GAGATGAAGT GATTTGAGAT TGCTTAGAT TGGCTTATG ATCTTAGATG AGAAGTATG
 2161 GATAAGCGGG AGATTTGAGT GATTTGAGT AGGAGCTGCT ATGATTTGAG CAGGCGGCG
 2221 GCTAACAGT TGAGGAGTGC ACTCAGGCTT TTAATCTTCT TTAATCTTCT TTAATCTTCT
 2281 AGAAGATGA TGTATATGTC CACAGAGAT ATAGAGTTCT TTACCAAGAA CAGGCTTCT
 2341 CCTAAGACCA CCAATGCTGT CAGTCAAGGCT ATGCGGCGAC TGCAAGACTT GCTCTAGTCT
 2401 TCCCTCTGTA AGATTTATGCT TTATGCTGAG AAAATATTTA AGATTTTGA TGAAGAGAGA
 2461 GCAAGGTTG TCACGACAT TATGACATTA TTTATGGAAT TCTTCACTAC ATGTTGGA
 2521 ACAATTTGTA ATGATACAA GGTCACTAGT GACGTTTGTG TATGATGATC GTACGCGGCG
 2581 ATCTCTCTCT TAAGTGAAGT CTGTCGGGTC TCTGATTAAC GCGGCTGAGG CAGTCTCTCT
 2641 GATGCTGCG CAGGCGGCG TCTGATTAAC GCGGCTGAGG CAGTCTCTCT CAGTCTCTCT
 2701 GCAATTTGAG GATCTGCTA GATGATGATC GCGGCTGAGG CAGTCTCTCT CAGTCTCTCT
 2761 AGAGTCTGCT CTCTCTGCT TTAGGCTTCT GCGGCTGAGG CAGTCTCTCT CAGTCTCTCT
 2821 GAGGCTTATG TAGGCTACAC TTTGGGCAAC TTTGGGCAAC TTTGGGCAAC TTTGGGCAAC
 2881 TACCCGCGAG AGTCCCTGCT ACCGCGGACT ATCTCTCTCT CAGTCTCTCT CAGTCTCTCT
 2941 ACAAGTATC AGGAAGAAAG TAGGAGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG
 3001 GAGCGGAGG ACATCTGTCT GTCAAGTGT GAGGAGGAGG GATGAGGAGG GATGAGGAGG
 3061 CCAGAGGAGG AGGAGGATG TCGTGAAGAA CCGGAGGCT CTGAGGTTAA GAGTACCCAC

【図 3 5 B】

3121 CCGTGTGCTG TTAAGAGCAA GGCTGACGAC TAATTTTTAT CTCGAGTCTA GAATCGATCC
 3181 GCGTTTTTTA TGATGATTA TCACTAGATC ATCAGCGCGC CTTTAAAGA TCTAAATGCG ATATTTCTTA
 3241 AATATGAAA AAAAGATGA TCACTAGATC ATCAGCGCGC CTTTAAAGA TCTAAATGCG ATATTTCTTA
 3301 CCGTCTATAC CGTCTATGTT TATTTGATTC TATTTGATTC TATTTGATTC TATTTGATTC
 3361 ATATGAAAGT TTTAATGAG ATGAAGATGA CAGCGGATGA TATGCTTACA TATGCTTACA
 3421 AGATGAGAAA GATGACGCGC TAAAGTATAC TATGCTTACA TATGCTTACA TATGCTTACA
 3481 AATGCGGACT TGTCAGAGAA GGTATGATAT AGTGAAGATG TGTGATGAT TGTGATGAT
 3541 AAAACCAAAAT AAATCAGATC CATATCTAAA GGTATCTCCT TTGCAGATAA TTTCACTTAT
 3601 TCGTAGTTTA GAATACCTCG AG

【図 3 6】

1 ATGAGGCTCG CCGGCTCGGCG TTTGTCGCGA ATGATATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG
 61 CAGCTGCTGA AAGCTGTTT TAGTGGCGG GACACGCGCG TGCTGCGGCA CGAGACGCGA
 121 CTCTCTGAGA CCGGTATCCG CTGTCGCGT AGCCGACGCT GCGTATGCTT GGTGTGCGAG
 181 TACACGCGCG ACTCAGCGCG ATGCCACGCG ATGCCACGCG ATGCCACGCG ATGCCACGCG
 241 TACTTTACGG CAGCGAGGTT GAGAGAGGTT GCGTCCAGC TGCCAGAACCC CACGCGGCGG
 301 AGCATCTGCC CCAGCCAAAG GCGCATGTG ATCATGTGTT ACCTGCTGCG CCGGCTGCGG
 361 CTGACATCCG CCAGCATCAA CCGTCAAGCC TGATGATCAC GCGTCAAGCC CCGGCTGCGG
 421 CACGCTGCT CCGGACTGCG CTGACGCGCT CAGCAGAGATC AGTGAAGAGA GCGGCGGCTG
 481 CTATACAGCT CAGCGCTGCT TTTTCCAGC AAGAGACGCG CACTGAGGCA CCGTGGTGTG
 541 GCGGACGAGC TGTTTGTGCT CATGAGAGAC ACGCCGCGAA CCAAGATGCA GGTGATAGGT
 601 GAGCATGATC TGAAGGTGTA CTGAGGTGCT CCGTGGAGTC CCGTGGAGTC CCGTGGAGTC
 661 TTTTGTGAGC TCAAGCTGCG CTCTGAGGTT CCGTGGAGTC CCGTGGAGTC CCGTGGAGTC
 721 CAACCTCTCA TCGGCGGCG CCGGCAAGT CTGCGCATCT CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 781 ATATCAAAAG CCGGCAAGT TCGTGTGCT CAAGAGCATC CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 841 CATTTTGGGCT TGCTGTGCTC CCGGAGGTTG CCGGAGGTTG CCGGAGGTTG CCGGAGGTTG
 901 ATGACGCGCG AGCAGATCTT CCGTGGAGTT CCGGAGGTTG CCGGAGGTTG CCGGAGGTTG
 961 CAGTACGATC CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG
 1021 CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG
 1081 CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG
 1141 TACCGAGACA CCGTGGAGCG CAGCAGAGAG GGTGCGGCGG AGGGCGAGCA CGAGCTGTG
 1201 ACCGCGGCGG CCGGCTATG GCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1261 CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1321 TCGTGGAGG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1381 CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1441 GGTTCACCT CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1501 GCTGAGGTTG AGGGTCAAG TCTGAAGTAC CAGGAGGTTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1561 TCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1621 CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG CCGGCGGCTG
 1681 GGTTCGA

【図 3 7】

1 GTCGACGATT GTTCATGATG GCAAGATTTA TATATCTGGA GGTACACA CA ATAGTAGTGT
61 AGTTAAATGTA ATATCGAATC TAGTCCCTTAG CATATAATCG ATATATGATG AATGGACCAA
121 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
181 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
241 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
301 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
361 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
421 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
481 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
541 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
601 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
661 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
721 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
781 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
841 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
901 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
961 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1021 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1081 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1141 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1201 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1261 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1321 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1381 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1441 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1501 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1561 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1621 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1681 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1741 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1801 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1861 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1921 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
1981 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2041 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2101 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2161 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2221 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2281 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2341 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2401 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2461 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2521 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2581 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2641 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA
2701 ATATCATATCA TTAACATATC CTAGAAATTA TCCCGCTCTA TGGTCGACGGC ATATAAATTA

【図 3 8 A】

1 AAGCTTCTAT CAAAGTCTCT AATGAGTTAG GTGTAGATAG TATGATGATT ACTACAAAGG
61 TATTCATATT TCCTATCAAT TCTAAAGTAG ATGATATTA TAACTCAAG ATGATGATAG
121 TATGATATAG ATACGCTCAT ATATAGTAGT CAAATTTGGA CGGTTCACAT TTTAATCATC
181 ATGCGGTTCAT AAGTTTCAAC TGGATAGATC AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
241 TGGAGAGAGA TGGACATCTT ATATGATAGA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
301 GATTTTCTCT ATATGATAGA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
361 ATCTTACTTAC GAAAGAAATGT ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
421 AGAGTCTCTT AAGAGTTTAA ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
481 TGTGTACTAT GTTGTAGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
541 ATTTGATATA ATTTCTGTTT TTAATCTCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
601 TATGATATCA ATATTAGATA TAGATATCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
661 GTTATGATAT CTAAAGAAAG GAGCGGTGTA TTTAGAAATTA GAAGATCTAA ATTTAGCTAT
721 ATATGAGAGC AATAGTAACT TATATTATTA AGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
781 TACTAAAGGA TTTATGATT ACAAGTTTGT ATTTATCTCT TACATGAATA ATTTAGCTAT
841 ACAGTATAAT AAAAGAAATA CTATAATAGA AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
901 CATATGGGTT AAAAATGTTA TAGAATATCT TTTCTCTGTC CATATGAATA ATTTAGCTAT
961 TATAAAGGC GTGTCTGAAG ATGATTGGTT AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1021 TCGGATATA TTTATACACT TATATACACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1081 ACGAGTAGGT ACAATATATG TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1141 TATACCTTACT GATTTTCTAT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1201 ATATTTGGCC GGATATTTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1261 TTTATCTTCT GAATGGGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1321 AGCTATATCT TTTGATGCTA GTTATTTTTT CCAATCTCTT ACTAAAGCTA ATTTATCTAT
1381 TATATTGGCA AAGAAATCTT TCGCATATTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1441 AATATATATA ATTAAGAAAG ATAGTACAGT GATAGATAGA GTATGTTTAT TAAAGCTATG
1501 TATATATAAT CACGTAACTT ACTTAATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1561 ATCTCTCGGA ATGATAGATA TACTACTGTT TGAATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1621 ATTTATCTCT ATGATGTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1681 TTTACTTTTA TCAATGTTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1741 TATATCTGCA GAAATCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1801 AGATCTTCTG TCTATCTGTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1861 ATATATATCT AAAAGAGATA TATCAGCAAA AAGATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1921 TATAATATCT GCGTGTGAGT TAAAGAGATA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1981 CCGTGAAAG ATAAATATCT TTAATTTCTA TCCATCATAC ATTTAGATAT TAAATGAAGA
2041 AAGAGCTTTA GATATTCTAT ATTTCTATCT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2101 TACCAAGAT GAGATGACAA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2161 ATCTGATACT TATAATCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2221 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2281 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2341 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2401 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2461 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2521 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2581 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2641 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2701 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA

【図 3 8 B】

3121 GTTAAATGCC AATATCGATT CTATATTTCA TCATAACAGT AGTACATTTA TCACTGATAT
3181 ACTTAAACCA TCTACAGACT CAATCTATGA AGGAATAGC AATATGCCAA TTAATGCTAA
3241 TATTTTAACT TTAGATATTA AGCATATCTA CCAATACATA AATATGCTAA CTGTAGATAG
3301 TTTTAAATTA TGCATATTA TGAAGAGTAT TAGAAGAAAT ACTTTGTTCT ATACCTTTGG
3361 AGGAAGAGAT TTTAGACAAA CTTAAGATTTA ATCAAACCTG TATTTATGTA CACTATAAAA
3421 AATATATGGA AGATACAGAT AAAAGATGTT ATGTTGAATG TCGTAGTTTA GAACATATTA
3481 ATACCGGTAA CTATATATTA GTGTACGGAC AAAACGAATTA TATGATTTCT TATATACATG
3541 CTCTCATATG TAGGATTAAT AATATTATAG AAACTTTAAA ATATAATCTG TGGGGCTAG
3601 ACGAATCTAC AATACGTATTA AATAATTTAT TAATTTTCAA AAGAACAAAA AAAAATCAGT
3661 TTTATATACC TTAATGATAA ACTATATTTT TTACCATATG CAACAC

【図 3 9 B】

3121 TATGATAGCTA CTAATATGGA AAGAAATGTA TACAAAAAGC TGGAGCTTT TATATTAAT
3181 AGCATATTA TGAAGATTT TAAATGATA TAAAGATATA CAAACACAGT AAAATGCTAA
3241 ATGATATCTA TATTTTATCA TAAAGATATA ACATATATA CACTATATCT GAACAGCAT
3301 ACAGATCTAA CTATGCAAGG ATATAAGCAAT ATGCCAATTA TGTCTATTA TTTAATCTTA
3361 GAATCAAAAC GTTCTACCAA TACTAAAAAT AGGATACGTT ATAGCTCTTA AAAAGCTTTA
3421 AATAATAGTA AGGATGTAAG AAGAAATCTT GTTCTATATC CTTCGGAGGA AAGAACTTTA
3481 GAACAACTTA AGTTTATACA AACTTGTATT TATGAGGTA C

【図 3 9 A】

1 AAGCTTCTAT CAAAGTCTCT AATGAGTTAG GTGTAGATAG TATGATGATT ACTACAAAGG
61 TATTCATATT TCCTATCAAT TCTAAAGTAG ATGATATTA TAACTCAAG ATGATGATAG
121 TATGATATAG ATACGCTCAT ATATAGTAGT CAAATTTGGA CGGTTCACAT TTTAATCATC
181 ATGCGGTTCAT AAGTTTCAAC TGGATAGATC AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
241 ATATGATAGA ATGATATCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
301 GATTTTCTCT ATATGATAGA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
361 ATCTTACTTAC GAAAGAAATGT ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
421 AGAGTCTCTT AAGAGTTTAA ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
481 TGTGTACTAT GTTGTAGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
541 ATTTGATATA ATTTCTGTTT TTAATCTCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
601 TATGATATCA ATATTAGATA TAGATATCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
661 GTTATGATAT CTAAAGAAAG GAGCGGTGTA TTTAGAAATTA GAAGATCTAA ATTTAGCTAT
721 ATATGAGAGC AATAGTAACT TATATTATTA AGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
781 TACTAAAGGA TTTATGATT ACAAGTTTGT ATTTATCTCT TACATGAATA ATTTAGCTAT
841 ACAGTATAAT AAAAGAAATA CTATAATAGA AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
901 CATATGGGTT AAAAATGTTA TAGAATATCT TTTCTCTGTC CATATGAATA ATTTAGCTAT
961 TATAAAGGC GTGTCTGAAG ATGATTGGTT AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1021 TCGGATATA TTTATACACT TATATACACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1081 ACGAGTAGGT ACAATATATG TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1141 TATACCTTACT GATTTTCTAT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1201 ATATTTGGCC GGATATTTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1261 TTTATCTTCT GAATGGGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1321 AGCTATATCT TTTGATGCTA GTTATTTTTT CCAATCTCTT ACTAAAGCTA ATTTATCTAT
1381 TATATTGGCA AAGAAATCTT TCGCATATTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1441 AATATATATA ATTAAGAAAG ATAGTACAGT GATAGATAGA GTATGTTTAT TAAAGCTATG
1501 TATATATAAT CACGTAACTT ACTTAATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1561 ATCTCTCGGA ATGATAGATA TACTACTGTT TGAATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1621 ATTTATCTCT ATGATGTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1681 TTTACTTTTA TCAATGTTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1741 TATATCTGCA GAAATCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1801 AGATCTTCTG TCTATCTGTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1861 ATATATATCT AAAAGAGATA TATCAGCAAA AAGATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1921 TATAATATCT GCGTGTGAGT TAAAGAGATA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1981 CCGTGAAAG ATAAATATCT TTAATTTCTA TCCATCATAC ATTTAGATAT TAAATGAAGA
2041 AAGAGCTTTA GATATTCTAT ATTTCTATCT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2101 TACCAAGAT GAGATGACAA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2161 ATCTGATACT TATAATCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2221 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2281 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2341 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2401 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2461 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2521 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2581 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2641 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2701 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA

【図 4 0】

1 AAGCTTCTAT CAAAGTCTCT AATGAGTTAG GTGTAGATAG TATGATGATT ACTACAAAGG
61 TATTCATATT TCCTATCAAT TCTAAAGTAG ATGATATTA TAACTCAAG ATGATGATAG
121 TATGATATAG ATACGCTCAT ATATAGTAGT CAAATTTGGA CGGTTCACAT TTTAATCATC
181 ATGCGGTTCAT AAGTTTCAAC TGGATAGATC AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
241 ATATGATAGA ATGATATCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
301 GATTTTCTCT ATATGATAGA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
361 ATCTTACTTAC GAAAGAAATGT ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
421 AGAGTCTCTT AAGAGTTTAA ATTTAAAGTA AAGATTTTCA TAAAAGAGTA TGAATGATAG
481 TGTGTACTAT GTTGTAGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
541 ATTTGATATA ATTTCTGTTT TTAATCTCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
601 TATGATATCA ATATTAGATA TAGATATCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
661 GTTATGATAT CTAAAGAAAG GAGCGGTGTA TTTAGAAATTA GAAGATCTAA ATTTAGCTAT
721 ATATGAGAGC AATAGTAACT TATATTATTA AGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
781 TACTAAAGGA TTTATGATT ACAAGTTTGT ATTTATCTCT TACATGAATA ATTTAGCTAT
841 ACAGTATAAT AAAAGAAATA CTATAATAGA AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
901 CATATGGGTT AAAAATGTTA TAGAATATCT TTTCTCTGTC CATATGAATA ATTTAGCTAT
961 TATAAAGGC GTGTCTGAAG ATGATTGGTT AAGATATGACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1021 TCGGATATA TTTATACACT TATATACACT TACATGAATA ATTTAGCTAT
1081 ACGAGTAGGT ACAATATATG TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1141 TATACCTTACT GATTTTCTAT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1201 ATATTTGGCC GGATATTTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1261 TTTATCTTCT GAATGGGTAA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1321 AGCTATATCT TTTGATGCTA GTTATTTTTT CCAATCTCTT ACTAAAGCTA ATTTATCTAT
1381 TATATTGGCA AAGAAATCTT TCGCATATTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1441 AATATATATA ATTAAGAAAG ATAGTACAGT GATAGATAGA GTATGTTTAT TAAAGCTATG
1501 TATATATAAT CACGTAACTT ACTTAATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1561 ATCTCTCGGA ATGATAGATA TACTACTGTT TGAATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1621 ATTTATCTCT ATGATGTTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1681 TTTACTTTTA TCAATGTTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1741 TATATCTGCA GAAATCTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1801 AGATCTTCTG TCTATCTGTT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1861 ATATATATCT AAAAGAGATA TATCAGCAAA AAGATATGTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1921 TATAATATCT GCGTGTGAGT TAAAGAGATA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
1981 CCGTGAAAG ATAAATATCT TTAATTTCTA TCCATCATAC ATTTAGATAT TAAATGAAGA
2041 AAGAGCTTTA GATATTCTAT ATTTCTATCT TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2101 TACCAAGAT GAGATGACAA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2161 ATCTGATACT TATAATCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2221 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2281 ATATATATCT CAGGTAACTT TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2341 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2401 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2461 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2521 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2581 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2641 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA
2701 TCTATGAGT TAAATTTCTA TAAATTTCTA TAAATGAAGA TAAATGAAGA TAAATGAAGA

【図 4 1】

1 ATGAGTTTCG AGTTTATCGG TCTACAGCGG CGCGATGTGG TGGCCCTGGT CAACCTTCTG
 61 CGCCATCTCA CGAAATAAGC CGACGTGGAT CTCGAGGACG ACCCCAAAGT CCGTGAATAA
 121 TGTGGCGGAA AACCGCTTGA CGCGCGTAGC GTGCTGTTCG ACAGAGTCAT GCTTTGGTGT
 181 GGATCTATCC CGAGGCTGGG TTTCACCAAC CCGGACCTCT CCTCGGTTCT CGAGGAGTTC
 241 GAGGTGCGTT GCGCGGCGGT GCGCGCTGCG GGCTACACTT ACCCGTTTCG TGATCTGGT
 301 AAGCGCGGTG ACCAGCTGCG TGCTGTAGAC CGTACCGAAT TCGATACGGA CGTACGCCAC
 361 GATGCTGAGA TTGTGGAGCG CGCGCTGTGA AGCGAGCTCA TTCTGGCCAA GATGTCGGTG
 421 CGCGAGACCG TGGTCACAGC CATCGGCCAT AGCGAACCA CTGAGGCTG TGCCCTTTGT
 481 GATACGGAGG TGACAGCGAT TGAAGAAAC CTGAGGCTG TGCGCTTTGA CATGTTCTGC
 541 GTGAAACCGG TCGACCTTAA CCGTGGACCGG CAGGCCAACA CGCGCTGTGA CAGTGTCTGC
 601 AACAGCTCTG TGTACACGGG CCGTCTCATC ATGAACGTGC CGAGGTCTTG CGAGGTCTGC
 661 GAGCGCAATG GTCTGGCGCG CATTGAGGAG CGCTGCAAGC TGCTGGTCAA GGAGCTCGCG
 721 ATGTGCTTTT CCTTTGATTC CAACTACTGT CGCAATATCC TCAACACGCG CCGTGAATAA
 781 GGTGACTCGG CGGACACGCT GCTGGAGCTG CTCACTGAGG ACTTTGACAT CTACGTGGAC
 841 AGCTTCCCGG AGTGGCGGCA CACCTTTTTG GCGCGCGCGC GCCTGCTGT GGAGTTTGA
 901 GATGACGCCA ATCTCTCTCT GCTCGCGCGG AGTGGATTCG CCACTCCCTG GAGGGACAC
 961 CATGTCCGCA CCGCGCGCTG GGAGCGGCTG GCTGGATTCG CCGCGCGCGC CCACGCCCGC
 1021 AAGCGCTTCC GCTTCCAGCG CATGTGGTCT CTGGCAACCG CCGCGCGCGC CGAGAAACCG
 1081 CGTTCGCGCG CCGCTCGGTA TTAGCAAGAA CAGCACTGTA AGGCTTGGGA GAGGAGGAC
 1141 GTGGACAGCG AGGTGGTGCA CGGTGAGAAA CAGCACTGTA AGGCTTGGGA GAGGAGGAC
 1201 CAGAGCTCTG AGCAACCTCG CAGCAACCGG CGCGCGCGCG CAGCACTGTA AGGCTTGGGA
 1261 CAGAGGCTCT TTGGCTCCAG TGCGCTCCAG AGCAACCTCG CAGCACTGTA AGGCTTGGGA
 1321 ATCTTTACCG CCATCAAGAA ACCGGGAAGT AGCGGCAAGG GCGCGCGTAG TGCGCAACCG
 1381 GTTTTCAGCA TTTTCCAGCG CATGTTATCT TCGGGCAGTG AGAAACCTCG CAGCGCTCCC
 1441 TTTGAACATG CCGGAGCAAA ACAGCGTCAAC CGCGCTTTCA GTCTGCTCTC CCGCGAGTGA
 1501 ACCAAGGCCA CGCCGGGAAG GGTCCGTCTG GACAGCGCGT GGAAGCTGAG GCGCTTACG
 1561 GAGACAGAGG GGAATCTCTT CTCCGGCGAG GAGGATTTCCG ACAGCTCGGA TGGCTATCCC
 1621 CGCAACCGTG AAGATCTTTG TTTCACGCGC AGCTGGTGGT ACATCAACGGA TACCGAGACG
 1681 AGCGCCAAAC CGCGCGTCAAC CAGCGCGTAC AAGTTCGAGG AACCGACGTT GAGTGTGCGC
 1741 GCGCGAGTTA AGCTCTCTG CGCGCGCGCG TGCGCATCTC TCACGCGGAC GCGTGTCAAT
 1801 CTTCCACGCG CCGCGCGCTG GCGCGCGGCA CCTACCTTCG CGGATATCCA AACCCCGGCT
 1861 AAGCGTAAGT GCGCGTGGG TCCGAGCTCG CCGTCTCAAG AATCTTCAAC TGCTTTCAAG
 1921 TGGCGCGCGG AACGCGGCTG TGCGCTCAAG GCGCTTCAAG AATCTTCAAC TGCTTTCAAG
 1981 ATGCTCAGCA CTTCCAGGAC TTCTCAAAAC AACGTGTCCA CCGCTCTGCG GAGGCTTGGC
 2041 ACTCCAGCGG CGGCGGTGAC ACAGAACAGG TCTCAGAACG CCGCTCTGCG GAGGCTTGGC
 2101 TTAAGGAGCC AAATCTGAGA GTACACGGTG GAGACAGCGG AGGAGGAAGA CGACGACTCC
 2161 CTGGACAGCG GCTCCGTCTG CAGCTTGGGA CACACAACAG CGTCTGCGGA TTACAGTACG
 2221 GTCACTTCGCT CTCCGATGCA GACGCGGAGC CAGTGCAGCG CGTCCAGAAAT ACGTAAAGCT
 2281 AAGTATTTCG TCCCAATGAC GACGACATCC CCGCGAGGCG CAGACGGTGA CGTGCACAGC
 2341 GTCCGAGCGG CGCAGCGGTC GCGCGGAGCG GGTAGATATC TTCTGCGCGC GAGAACCTCT
 2401 AGGTAAGAGA AACAGCTATC AACCTCATCA AGGAACGCTG GGTAGATATC TTCTGCGCGC
 2461 CAACCGCGCT CGTCTAAAC GTACAGCTCG CCGTCTGCGG CAGCTCTCTC GAGGCTGGG
 2521 TCGCTGCTCG CTGACAGCGG GCGCGTCTCC GCGCTGCTG ATGCTTTGGT GCGTCTGCTG
 2581 GCGGTGTCGG GCGCTGCTCC GCGTCTGCT GCGTCTGCT GCGTCTGCTG TCGTCTGCTG
 2641 AAGAGTGGCC CTGCGTCTCC GGTGAAAGGT GCGGCGAGCG GCGTCTGCTG TCGTCTGCTG
 2701 AAACCTCTTT TGGCGGTGTA GGTGAGCTGT GGTGAGCTGT GCGTCTGCTG TCGTCTGCTG
 2761 AGCGCGCGCG CGTCCGCTGT CCGGACAGCG GCGGCGCGCT GCGTCTGCTG TCGTCTGCTG
 2821 CCGGTAAACCA CGTCTTATCC ACAGCGCAAA CGAGCGTATC GAATGCGTCC
 2881 CCTGTGGCTT CCGCTCTCAT CTGTGAAACCG GCGGCGAGCG CCGCTTTGCA ATCAACCGCG
 2941 TCGAGCGGGA CGCGCGCGGT AGGTTCGCCC GTCAAGAGCA GTACAGGCGT GATGAGGCG
 3001 GCTTTGAGCC TATGCTGCG CCAAAACGCG TCTCGACGCG GTGCGAGGCG TCTCGAGGCG
 3061 ATGGGCGCG CCAAAACGCG TCTCGACGCG GTGCGAGGCG TCTCGAGGCG
 3121 ATTAAGAAAC CGAGGGAATA G

【図 4 2 A】

1 AAGCTTCCGG CCGCTCATT GACAAGCGAA TGAGGGACGA AAACGTGGAG GAGGTATTAA
 61 GTTGTGGAGAA ATGGAGAGAG ACTGTTTAA AGCGCTGAGT GGTTCGGAAT ATTTGTTGAGA
 121 AGTTTGTGAAA GATTTCGGAGG AAGATTATCA AGATGTGTAT GTTTCGGAAT ATTTGTTGAGA
 181 CATAGCAGCA CAATCAAGG GTATTAAATC ATGTCTTAGA TGTTCGGAAT ATTTGTTGAGA
 241 TCTCTCTGTT ACAAAAGTCA AATAGATTAT ATAGCTTCTA GTATTCTCTC TTAATCTCTC
 301 CGCAGAGCG GTTGAAGTCA AGCGCTCTTT TCTGTGTAA TAAATAATTA TTAATTAATC
 361 ATTAGATAAA CAATAAAGC GCGCTCTGTT TCTGTGTAA TAAATAATTA TTAATTAATC
 421 GAGCGCTGAG CAATAAAGC GCGCTCTGTT TCTGTGTAA TAAATAATTA TTAATTAATC
 481 GTTCTGTGAC GCGCTCTGAG GCGCTCTGTT TCTGTGTAA TAAATAATTA TTAATTAATC
 541 GCGCGCTTACC GCTCTCTGAG GCGCGCTGTT TCTGTGTAA TAAATAATTA TTAATTAATC
 601 TGCTCTTTCAG GCGGGAACCT ACAGCGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 661 CCGCTCGCCC CGGTTTACAG ATGAGGAGGG AGGCCACAGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 721 TTTTGGCGGT AGACGAGCGT GGGTAAACGG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 781 AGCGCGCGCG GCTGCTGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 841 GCGGCTGCGG TACACGCGCG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 901 GCGTCTGCGG GAGACGCGCG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 961 ACGAAGAGAT CATTCTTACC GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1021 AAGCGGAGCG GCGGCTGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1081 TCACGCTTCT TGAATGAGCT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1141 GTTGTGTGAG GCGGCTGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1201 TCACGCTCTG GCGTCTGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1261 TCTGCTCTGT GGAATGCTGT GAGTCTGCTG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1321 GCGTCTGCTG CTGCGGCTGT TGAATGAGCT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT
 1381 GTTGTGTGAG TCCGAGGCTG ACAGCGGAGC GCGGCTGCTG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT
 1441 GCGTCTGCTG GAGCGGCTGT TCTGAGGAGT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT
 1501 GCGTCTGCTG GAGCGGCTGT TCTGAGGAGT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT
 1561 TGAGCAAGCT CTTTGTGAGG TCTGAGGAGT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT
 1621 GGTGAGGAT TCTGAGGAGT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1681 GCGGCAACG GCGGCTGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1741 GGTGAGGAT TCTGAGGAGT GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1801 GGAATGAGC GCGGCGGCGG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1861 GGTGAGCT GTAGCGGCTG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1921 CCGAGCGGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 1981 CCGAGCGGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2041 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2101 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2161 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2221 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2281 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2341 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2401 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2461 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2521 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2581 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2641 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2701 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2761 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2821 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2881 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 2941 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 3001 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 3061 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT
 3121 GAGCGGCTGT GTGCGTGAAG GAGACGCGCG TGGTTACCGG GCGGCTCTTT ATTCGCTGAT

【図 4 2 B】

1 TGGGTTCGCT CTGGCGGATG GCTGTGACCA CGCTCTCGCG CACCGACATC TTGGCCAGAA
 61 TACAGCGGCT TACGAGCGCG CCGCTCTGCGG CACCGACATC TTGGCCAGAA
 121 ATTCGCTGAG GTCTAGCACA CCGCGGCTGT ACCAGCATCA CCGAAGCGGT
 181 AAGTGTAGCG CGCAGCGCGC CCGCGGCTGT ACCAGCATCA CCGAAGCGGT
 241 AGAGGTGCGG GTTGTGGAAG CCGCGGCTGT ACCAGCATCA CCGAAGCGGT
 301 TGAACAGCAG CGTACGCGCG TTGCGGCGGT TTTGCGGCTG CCGAAGCGGT
 361 GTGCTCGAG ATCCAGCGCG GCGTCTGCGG TTTGCGGCTG CCGAAGCGGT
 421 CCACATCGCG CCGCTGTAGA GCGGCTGTGA CCGAAGCGGT TTTGCGGCTG
 481 TTTCAATTTT GAAATCCCAA AATATTATCA TATCTTCCCA ATTAAGCTAT
 541 ATTTAATTTT AATATTATCA ATTTATTTT GAATATATCT TTAAGCTAT
 601 TGTACTCATA TGGAGCGCGG CAGTCTGCTA CATCAATCTT TTAAGCTAT
 661 CCGCTCTTAG AGTTTTCAGG TGAATTTTCA ACCTAAATAG AACTTATATC
 721 AACCTCTTTC TATTTGTTGA AACTTTGTTG TTACATTAGT AATCTTTTTC
 781 TTAGCGCTTG TTGAGGCTTG TCTCATTTGT GGTCTTAACT ATTGCTTCTG
 841 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 901 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 961 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1021 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1081 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1141 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1201 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1261 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1321 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1381 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1441 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1501 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1561 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1621 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1681 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1741 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1801 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1861 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1921 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 1981 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2041 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2101 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2161 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2221 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2281 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2341 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2401 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2461 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2521 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2581 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2641 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2701 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2761 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2821 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2881 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 2941 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 3001 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 3061 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG
 3121 TTTAGCGCTG TTTGAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG TTTAGGCTG

【図 4 3 A】

1 GAGCTCCGCG CCGCTATCA AAACTCTTAA TGAGTTAGGT GTAGATAGTA TAGATATTAC
 61 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 121 GATGATAGTA GATATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 181 TATCATATCA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 241 GATGATAGTA GATATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 301 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 361 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 421 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 481 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 541 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 601 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 661 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 721 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 781 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 841 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 901 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 961 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1021 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1081 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1141 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1201 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1261 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1321 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1381 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1441 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1501 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1561 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1621 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1681 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1741 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1801 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1861 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1921 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 1981 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2041 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2101 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2161 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2221 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2281 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2341 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2401 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2461 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2521 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2581 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2641 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2701 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2761 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2821 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2881 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 2941 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 3001 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 3061 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT
 3121 TACAAAGTA TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT TTTATATTTT

【図 4 3 B】

3121 TACGGCGCAC ACCCTCCAGG TTTTCTTCAA TGGGCTGCAC CTCCTGATCC TTGAGGTGCA
 3181 CAAAAGCGAT GGGTTCGGTC TGGCCGATGG CTGTGACGAG CTCTGCTGCC ACCGACATCT
 3241 TGGCCGAGAT GACCGCGCTT ACAGAGCGGC GTCCACCAAT CTGACGATCG TTGGCGTAGCT
 3301 CGGATCGGTA TTGGGTACGG CTAGGACGAG CCAGGTGGTC ACAGGCTGTA CCACGATCAC
 3361 CGAACGGGTA AGTGTAGCCG GAGCTCGGGG TTGTGGAAAC CGAGCTCGCA ACAGCCTCGA AACTCTCTGA
 3421 GAACCGAGGA GACGACGACC GTACCGCGGT GTACGCTCGG GAGCTCGGTC ATGTCAGGTA AACCAAGCA
 3481 TGAGCTCGGT TGCTCGAGG TCCCTGAGC GCTTTTGGCT GAGATGGCGC AGAAAGTTGA
 3541 TCTTGGGGCT CACATCGCGC CGCTGTAGC CGATAAAGT CAAACTCATT TTATATTGTA
 3601 CCAGGGCCAC CACATCGCGC CGCTGTAGC ATATATCAT ATCTTCCCAA TAAAGCTAGA
 3661 ATTATATATT TTCAATTTTG AAATCCCAA ATATATCAT ATCTTCCCAA TAAAGCTAGA
 3721 TCTTTTTTAT GTATTAACTA GTCAAATGAG TATATATCAT ATCTTCCCAA TAAAGCTAGA
 3781 CATATAATTA TGAACGAAA TATCAGTAAT AGACAGGAA ATGAAAAGTA AAATATAAAT
 3841 GAAGTAGATA CTGCTAAATC TCCAAAATTA GATAAAAGT ATACAGCAAA TACAGCTTCA
 3901 TTCAACGAAT TACCTTTTAA TTTTTCGAGA CACACCTTAT TACAATAA TACAGCTTCA
 3961 CTATGAGATA CTAAACGATG ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4021 TAATAATTTA ATACAGTATA ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4081 ATATATAAAT CTAAACGATG ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4141 TTTGAGGATA AAGGATATA ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4201 TAATAATTTA ATACAGTATA ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4261 CAGATCTATG GTTAGGATAA AACACTGTAA CCGGAGCGAG CATCTCTATG ATATGTATCA
 4321 TAGATATTTA ATATTATATC TAACAACAAAC AAACATTTTA CCAACAATAA TACAGCTTCA
 4381 TAGATATTTA ATATTATATC TAACAACAAAC AAACATTTTA CCAACAATAA TACAGCTTCA
 4441 TTTGAGGATA AAGGATATA ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4501 TCAATATATC ATATTATATC TAACAACAAAC AAACATTTTA CCAACAATAA TACAGCTTCA
 4561 ATTAATATAG ATATTATATC TAACAACAAAC AAACATTTTA CCAACAATAA TACAGCTTCA
 4621 TGCCATATAC GACTCACTA GTTCACTAAT TACAGCTTCA TACAGCTTCA TACAGCTTCA
 4681 ACCGATATAC GACTCACTA GTTCACTAAT TACAGCTTCA TACAGCTTCA TACAGCTTCA
 4741 AACTTTAGAA CTAAACGATG ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4801 AGCTGCAATA AATAGTAGAT ATTAAGCTTA TGGGTATAAT ATAATAAGA TTCAATATAT
 4861 AACTTTAGAA CAACTTAAGT TTAATCAAC TTGATTTTAT GAAGGTACC

【図 4 4 A】

1 AAGACTAATT TGTAAACCAT CTTACTCAAA ATATGTAACA ATAGTAGCAT GCAATAGATA
 61 AGACAATAGG AAATCTATCT TATATACACA TAATATTATC ATCAATTTTA CAATTAGTAT
 121 AGGTGATAGT TATAAAACAT AATTAATCAC TCGAGCCCTC AGCAATAAAA AATTTCTCT
 181 CGTGTCTCTA ATCTTCTCGA TCTTTTGGAG GATGTTCTCG ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 241 GCGGCGCGCC ATGCGCGGAG AACCCGGTGT CGGCGCCGTA CGGCTCTCTC GGGCGACGTA
 301 TAGGTGGAAG GCGCGCGGTT TCTATGAAAG CGGCTCTCTC ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 361 GGTCCCGGTC GAGCGCGGTT TCTATGAAAG CGGCTCTCTC ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 421 GGAGGCGCAC GCGCGCGCAT TCGGCGCTGT GCGGCTCTCG ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 481 GGTGGTTACC GCGGCGCATC GAGACACGAC CGGCTCTCTC ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 541 ACCCGCGCGC CTACCGCTCA CGGCTCTCTC ACGGCGCTCG ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 601 CAAAGTAGGT TTCAAAGAAG GAACACGACG CGGCTCTCTC ACGGCGCTCG ACGGCGCTCT
 661 AGGGGACCTC TTGGCGCGGG ACAGGAGGCG TGACGAAAGC ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 721 GGGGACACG ACATCATCTC CGGCTCTCTC ACAGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 781 AGCGGAGGCG GAAGAGGTTG TCGGCGCGGG ACAGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 841 CGGAGCGGCT TGAGGTTGCA ACAGGCGTGG CAGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 901 TCTCTCTACC CTTCCTGAA CGGCTCTCTC ACAGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 961 CGGCTCTCGG ACTCGCTTGC CCGGAGGCG ATGACAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1021 AGACGATAAC TTAGCTTTAC GTATTTCTGA CGGCTCTCTC ACAGGAGGCG ATGACAGGCG
 1081 AGCGGAGGCG ACCTCGTTGT AATCGGAGCG CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1141 CGGAGGTTGC GAGGAGTCTG CTCTCTCTCT CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1201 TTGGTCCCTT AAAGCGCAAA CCTCATCAGC CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1261 GCGCGCTGGA GTGCGCGGCG TCGGAGGCG GGTGGACGCG CCGGAGGCG ATGACAGGCG
 1321 AGTCTGAGCG ATCTGTAAGG GATTGTAAGC CAGGTGAGGA TTCTTCTGAG AAGTCTGTTGA
 1381 TTGCGCGCGC CAGTTGCGCG GTTCTATATC CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1441 CGAGTTACCG GCGCGGAGCG GATTTGACAG CAGGTGAGGA TTCTTCTGAG AAGTCTGTTGA
 1501 GCGGCTGTTG GCGCGGAGCG GATTTGACAG CAGGTGAGGA TTCTTCTGAG AAGTCTGTTGA
 1561 TTATACCTCG CCGCGGAGCG GATTTGACAG CAGGTGAGGA TTCTTCTGAG AAGTCTGTTGA
 1621 CGGTGTTGCG CTGCTGTTGC GCGGAGGCG GGTGGACGCG CCGGAGGCG ATGACAGGCG
 1681 TTGAGCGGTT GCGGAGGCG GGTGGACGCG CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1741 CCCTCTGTTG TCGGAGGCG GGTGGACGCG CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1801 GGTGCGCTTG GTTACTCTGC GGGAGGCGAG CCGGAGGCG ATGACAGGCG CCGGAGACGCG
 1861 CGGATGTTG AAAGGAGCGCG TGGTGGGTTT CTGACTGCTC GAGGATATCA TSCCGCTGAA
 1921 AATGCTGGAA ACACCTTTGC CACTAGCGCG GCGCTTGGCG CTAGTTCTCG CTAGTTCTCG
 1981 GGGCGTAAAG ATGTTTTTCT CGTCACTATC ATGCTCGTGC TCCTCATCG CACTGAGCG
 2041 AAAGAGGCTC CCGGAGGCGCG CCGGTTTACG TGCTCGGGG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2101 CTGAGGCTTC TGCTGCTCTC CCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2161 CTGCTGCTTC ACCTGTTTCT CCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2221 GCGGCGCGAA CCGGCGCGCT TCGGAGGCG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2281 CGGGAACGCT TTGTGCTCTC TCGGAGGCG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2341 GCTGGGAGCA TGTGTTCTGG TCGGAGGCG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2401 ATTGGGCTCA TCGTCAACTC CCAACGAGCG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2461 CTGCGGGAAG GTTCTCACGT CCAACGAGCG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2521 GCGGAGTACA CCGTCTTTCA CCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG CTGACTGTTG
 2581 GGAAGGCGAC ATGCGGAGCT CCGTCTGAGC CCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2641 ACATTTGCGC TCGAGCTCTC CCAACGAGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2701 CAGCGGCTTG TCGAGGCGCT CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2761 GAGCGGCTTG TCGAGGCGCT CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2821 CAGCTCGCTA TCGTCTGAGT CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2881 CAGCTCGCTA TCGTCTGAGT CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 2941 AATCTCAGCA TCGTGGCGTA CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 3001 CTACGCGGCC TTACCGCATC CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG
 3061 GCAACGCGCC TCGAATCTCT CCGGAGGCG GCGGCTGCTG GCGGCTGCTG CTGACTGTTG

【図 4 4 B】

3121 GCGGTAGTAT CCCAACCAAA GCATGAGGTC GTTGAACAGC ACCGTACGCC GGTGCGAGCG
 3181 TTTTTCGCCA CATTTTTTTCA GATCTTGGG GTGTGCTCTG AGATGCAAGT CCGGCTTTTG
 3241 CGTGAGATGG CCGAGAAAGT TGACCGAGGC CACCAATCGT CCGCGCTGTA CCGGCTGTA
 3301 CTGCAAACTC TTATATATAT GTAAATATAT ATTTTCAATT TTGAAATCCC AAGGCTGTA
 3361 CATATCTTCC CAATAAGCTT AGGGGGAATT CGGATCTCGG CGACTCGAGG GTACCTGAGT
 3421 AGCTAAATTT TAACAATAAA TTGGGGGAAAT TCTAATTAGT TTTTCTTTAC ACAATTTAG
 3481 TACATGAGTC TGAGTTCCTT GTTTTGTCTA ATTATTTTAT CCAATTTTAT ATTTCTGAGC
 3541 ATATCGAGAT CTTTGTGTAT GAGGTCA

【図 4 5 A】

1 CTGCGGCTG ACAGATCTGA GAATGGATGA TTCTCCAGCC GAAACATATT CTACCATGCG
 61 TCCGCTAAT CTGAGATGA AGATGGATTC ATGCTTAAAT GTTTTCTCTG TAAATAGTTT
 121 CACCGAAAGA CTATGTAAGA AGATGGATTC ATGCTTAAAT GTTTTCTCTG TAAATAGTTT
 181 GCGTCTCTGA AGTGTATACA ACATGAGACT AGCCCGGTA ACTTTTATTT TAAAGATGA
 241 TCCATCGCTT CTATCTTTGT TAGATTATTT GATAGATATA AGTTTATATG AGTTTATATG
 301 AATAAAGGTG GAAGCTAATT GACTAGATGA AGTTTATATG AGTTTATATG AGTTTATATG
 361 ACAATTAGCG TATTGAGAGG CATTTAGTGT AACGTATTTG CAGATATTTG CAGTATAGTA
 421 ACTAATCGAT TTGCACTACT ATATAACACC CGCAACAAGT CAGTCTGAGT CAGTCTGAGT
 481 AGTAGGCTCT GTTGAAGTTT CAACTCTCTT CTGTAGTATC TATCTCATGA TTAACCTTAA
 541 ATAATATAT TTGTAATAT ATTTTCAATT TATCTTAACT TATCTCATGA TTAACCTTAA
 601 AGATCAACAA AATTAACATA TCAGGATCTC GAGATAAAAA TCAGCATGTC TTGAGATGTC
 661 GGTAGGCGCG ATAGTGCGCG ACAGGCTCAG ATAGCGGCTA ACAGGCTCAG ATAGGAGGAG
 721 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 781 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 841 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 901 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 961 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1021 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1081 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1141 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1201 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1261 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1321 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1381 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1441 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1501 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1561 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1621 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1681 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1741 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1801 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1861 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1921 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 1981 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2041 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2101 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2161 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2221 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2281 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2341 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2401 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2461 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2521 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2581 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2641 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2701 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2761 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2821 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2881 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 2941 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 3001 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG
 3061 GATGTCGCTG GTGAGTCTCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG CAAAGGCGCG

【図 4 5 B】

3121 CACATGCTGA AAAAATATAC CCAGACGGAA GAGAAATTC A CTGGGCGCTT TAATATGATG
 3181 GAGGAGATGTT TGCAGAAATGC CTTAGATATC TTAGATAAGG TTCATGAGCC TTCGAGGAG
 3241 ATGAGATGATA TTGGGCTAAC TATGACAGAG ATGTATGAGA ACTACATGTT ACCTGAGGAT
 3301 AAGCGGGAGA TGTGATGAGC TTGTATTAA GAGCTGCATG ATGTGAGCAA GGGCGGCGT
 3361 AACAGGTTGG GGGGTGCAC TCGAGGTAAG GCCCGTGCTA AAAAGAGTGA ACTTAGGAGA
 3421 AAGATATGAT ATATGCTGAG TCAGGCAATATA GAGTCTTTTA CCAAGAACTC AGCCTTCCCT
 3481 AAGACCACCA ATGGCTGCTA TCAGGCAATATA GAGTCTTTTA CCAAGAACTC AGCCTTCCCT
 3541 CCGTATGAGA TTATGGCTTA TCACATATTT ATATTTAAGA TTTTGGATGA GGAGAGAGAC
 3601 AAGGTGCTCA CGCACATTTA TCACATATTT ATATTTAAGA TTTTGGATGA GGAGAGAGAC
 3661 ATGTGTAATG AGTACAAGGT CACTAGTAGC CTTGTATGTA TGACCATGTA TGTGAAACA
 3721 TCTCTCTTAA GTGAGTCTTG TCGGGTCTGT TCGTCTATG TCTTAGAGGA GACTATGCTG
 3781 ATGCTGGCCA AGCGGCTCTT GATAACCAAG CCTGAGGTTA TCAGTGTAT TGGGGGCGCA
 3841 ATTGAGGAGA TCTGCATGAA GGTCTTTTGC CAGTACATTC TGGGGGCGCA TCGTCTGCTG
 3901 GCTGCTCTC CTAGTGTTGA TGACCTACGG GCCATCGCGC AGGAGTCAGA TGAGGAGAG
 3961 GCTATTGTAG CTTACACTTTT GGGCACCGCT GGTGTGAGT CCTCTGATTC TCTGTTGCTA
 4021 CCCCAGAGT CCCCCTGATC CGCAGCTATC CCTCTGCTCT CAGTAATGTT GGTCTAGAGAG
 4081 AGTGTACAG CTGTCTCTGT TGAGGAAAGG GAGGAGGAGT AGGAGGAGG AGGAGGAGG
 4141 CCGGAGGAGA CTGTCTCTGT TGAGGAAAGG GAGGAGGAGT AGGAGGAGG AGGAGGAGG
 4201 GAGGAGGAG AGGATGCTGT CAGGCTGTAG CAGGCTGTGT AGATAGAGGA AGTGTCCCCA
 4261 ATGGTGACTA GAAGCAAGG CGCAGAGGAT GAGGTAAGAG GAGGTAAGAG TACCACCTCT
 4321 AACTGATTTT TCTGGGAAAA AAATATTATTA ACTTTTCAAT AATAGGAGTT TGAATCTGTT
 4381 TAGCGTACAAA ATTATGCTTC CTGTATATTA GATTAAGAGT CTTATAGAGT TGCAGTATG
 4441 TACGGCTCGA TTAATCTTTA ATGATTCGAT AGTGAATATA AGTGAATATA TGAATCTGTT
 4501 GACTATCATG CGCGCGCCAG AAATATTATTA ACTTTTCAAT AATAGGAGTT TGCAGTATG
 4561 AAGTAGAACG GTTATAGCAT CCACCATTTA TATCTAAAAA TTAGATCAAA
 4621 CAAGTATCTA GTTATAGCAT CCACCATTTA TATCTAAAAA TTAGATCAAA
 4681 ATTAGTAACT GACTTAATAG TACGATATG AAAGCTAGAC TTGATATATC TATAAGTATA
 4741 GATACCTCTC CAGATAATGT TCTCTTTGAT GAAATGTTAG AAATTTTAAA
 4801 AAAGTATATC TTGTCTATTA CCAAGATGTT TTTAGAGCGC TTATATTATA
 4861 GAAATCCACA CGCGCTCTAG ATATGGGGAA TTC

【図 4 6 A】

1 GAGCTCGGG CCGCCTATCA AAAGTCTTAA TGAGTTAGGT GTAGATAGTA TAGATATTAC
 61 TACAAGGTA TTCATATTTC CTATCAATTC TAAAGTAGAT GATATTAACT ACTCAAAAGT
 121 GATGATAGTA GATAATATAT ACCTCATAT ATAGACTGCA AATTTGGAGC GTTCAATATG
 181 TATCATATC GCGTTCATTA GGTTCATATA CAGTACTGCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 241 CAGTATATTT ATTTGTTATTT AGACAGGTTT TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 301 TATGATATTT ATTTGTTATTT TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 361 TATAAAATAT TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 421 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 481 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 541 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 601 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 661 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 721 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 781 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 841 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 901 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 961 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1021 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1081 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1141 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1201 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1261 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1321 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1381 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1441 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1501 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1561 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1621 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1681 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1741 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1801 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1861 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1921 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 1981 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2041 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2101 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2161 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2221 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2281 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2341 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2401 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2461 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2521 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2581 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2641 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2701 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2761 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2821 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2881 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 2941 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 3001 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT
 3061 TTAGCTATCA AATCTCACTA AAAAGATAGT

【図 4 6 B】

3121 GCTCGGGGG AGCGGTGCGG CGTGGCGACT CGTGTGCCA GCACCGGTTT CTGGCTCGTG
 3181 GATGCTGCTG TCAATGAGGA CCAATTAATC TCGTGTAAAT CGGACGACGG TGTGTGTGTG
 3241 CCGAGGCTCT GACTGGGAGG CGAATAGGAG GAGTGTGCTG CTTCTCTCTC GCTGTCTCTG
 3301 CCGAGGCTCT GACTGGGAGG CGAATAGGAG GAGTGTGCTG CTTCTCTCTC GCTGTCTCTG
 3361 ACCGCTGACT CTCGACTGCG GTCCTTAAAG GCGCAGCGGC CTTCTCTCTC GCTGTCTCTG
 3421 GCTGTTTGTG TCAACGTTTG GTCGCTTAA GCGCAGCGGC CTTCTCTCTC GCTGTCTCTG
 3481 TTTTGAAGAG TCGTGGAAAT CGTAGGATAT CTGAAGGATG GTGAGGAGGAT GGTGAGGATG
 3541 TTTGAGGCGCC CCGCGGCGCC GTGAGGAGGAT GTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3601 GCGCTGCGAG CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3661 GCGTGGCGCC GCGCGGCGCC GTGAGGAGGAT GTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3721 CCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3781 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3841 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3901 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 3961 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4021 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4081 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4141 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4201 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4261 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4321 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4381 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4441 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4501 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4561 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4621 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4681 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4741 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4801 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT
 4861 TCGGCGCGCC CCGAGGCGCA GTTACCGTTG ACCGCGGTTT GGTGAGGAGGAT GGTGAGGAGGAT

【図 4 6 C】

6241 CTAACACAA CAAAAAATT TAACGATGTA TGCGCAAGAG TATTTTCTAC TAATAAAGAT
 6301 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6361 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6421 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6481 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6541 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6601 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6661 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA
 6721 TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA TAACGATGTA

【図 4 7】

1 ATGCTGCGCC GCGCGGATTG CGGCTTCTCT TTCTCACTG GACCGGTGCG ACTGCTGTGG
 61 TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 121 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 181 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 241 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 301 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 361 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 421 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 481 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 541 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 601 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 661 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 721 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG
 781 GAGAGATGTA CCGGCGGATG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG TGTGCTGCTG

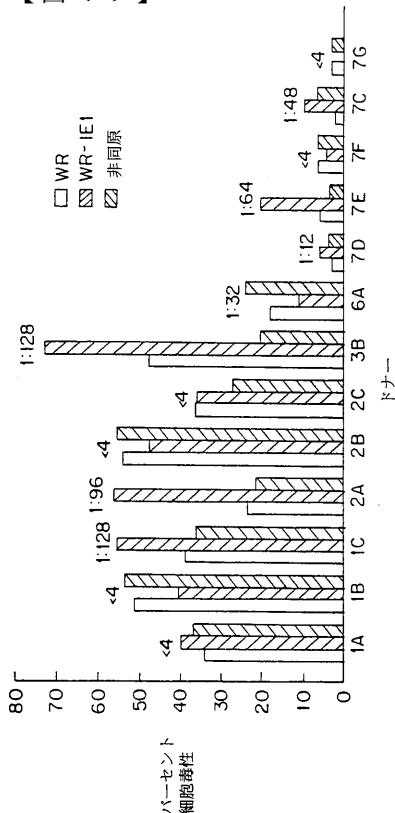
【図 48 A】

1 AAGCTTTTTC GATCAATAAA TGGATCACAA CCAGTATCTC TTAACGATGT TCTTCGAGA
 61 TGAATGATCA TTTTAAAGT ATTGGGCTAG TCAAGATGAT GAATCTTCAT TATCTGATAT
 121 ATTGCAATCT ACTCAATATC TAGACTTTCT GTTATTATTA TTGATCCAAAT CAAAAAATPAA
 181 ATTAGAAGCG GTGGGTCATT GTTATGAATC TCTTTACAGAG GAATAACAGAC AATTGACAAA
 241 ATTCACAGAC TCCCAAGATC TTTTAAACCT GTTTAAACAG GTCCCTATTG TTACAGATGG
 301 AAGGGTCAAA CTATATAAAG GATATATGCT GCACCTTTGG ATTAGTTTGA TGGGATTCAA
 361 AAAAGAAATCC TCTCTAGTAC TGAATAGATAT ATTAACATCG GAATCTCTCGA TCCCTTTGGT
 421 CGAATATCGCA TTTTCTAAGC TGAATAGATAT ATTAACATCG GAATCTCTCGA TCCCTTTGGT
 481 ATTCTTTTAT TCAACAAATC CTGTCACTTT TTTTGTCTAG TTTTCTTTTC TCCCTTTGGT
 541 TCTATATAAA TCACAAATCT CTGTCACTTT TTTTGTCTAG TTTTCTTTTC TCCCTTTGGT
 601 TCGAGAGTTC TCTCTCTCTG CGGAGTCTTT CAAGTGTCCG TAGCCGTTTT TCCGCTTTGG
 661 CAGTCTGCTC AGCAGGTTGG GTTCTCTGCC CTGTCTCTGC GTGCCAGTCT GTCCGTCCTA
 721 AGAATCTGTA CCGTCTCTCT TGAATATATA AACACTTTCC TCGTAGGAAG GCGGAGCCTG
 781 CATCTGTAAA CCGTCTCTCT TGAATATATA AACACTTTCC TCGTAGGAAG GCGGAGCCTG
 841 TGGTCCCGGT CTTTTCGAGC GGTGCTAAGG CGGAGCCTGCG GTGGATGCAAT CAGACGAGCG
 901 TAACGAGCTGT TCTTTTGTGT TGGCCAGCAG GATGATGCTG AAGGCTCCGA CCCCCTTTAG
 961 GGGAAAGAGG TTTCTGAGCG GTGCTGATGCA GAGACGCGCG GTGCTGAGTA AGGGGTTTTT
 1021 AATGATAATG ACGACGCGTA TGGCCACGAG GATGATGCTG AAGGCTCCGA CCCCCTTTAG
 1081 GAGGAAGGTG GCAACGCGCT CGACCCAGCA GCGGACGCGG CCGGCTCTCA AGGCTCTGCA
 1141 TAGCCCAACG GCCTTTCCCG CGGCGCCGAG GCGGCTCTCA AGGCTCTGCA AGGCTCTGCA
 1201 GTAGGGGCGG AGCGGGTCTGA CTACCTTTCTG TCCACGATAC TTTACCGGCT GCTTATACGA
 1261 ATTGAATCTG CCGATGATCT CCTCGAGATC AAAAACGTTG CTGGAACGCA ATTCTTTCTG
 1321 CGAGTAAAGT TCCATATACC TCAATGATCT GTTTTCCAGC GGTGCGATGT CTAGGGCGAT
 1381 CATGCTGTGAC ACGGTGAGAG TGGTCTGAGG GTCAATCAIG CGTTTGAAGA GGTAGTCCAC
 1441 GTACTCTGTG TGGTCTGAGG GTGCTGAGG GATCTTGAAG AGTTGACCGT ACTGCACTGA
 1501 AGTGGCGGTG TGGCCCAACA GGAATTTCTG ATCTCTGCGC TAGCAGCGTC GCGACCTGGC
 1561 CGAGCTTTTG GCGAAATTTA AGATGACCA CCGTCTGAGG TGAATGCTGA TGAATGCTGA
 1621 CTTCACATCT ATATCAGCGA GCACCTTTGAC GGTGCTGAGG TGAATGCTGA TGAATGCTGA
 1681 CAGACCCAGG ACATCACCAC TGAACGCGC GCGCAATCGG TTGTTGTAGA TGGCGGAGAG
 1741 AATAGCTGAC GGGTTGATCT TGCTAAGTTC CTGTAAGACC TCTAGGTTGG CCGCTTGATC
 1801 CACACACGAG GCTCTCAGCA TTTTCGCGAG CTCTAGACAG ATTGTGCACC GACTCCATGT
 1861 CATCTGTAAC TCGACGCTGG GTTCTGAGG GATCTTGAAG AGTTGACCGT ACTGCACTGA
 1921 AGTGTGATTT TGGCCTCTG TACTCTTTT GTTCTGAGG GATCTTGAAG AGTTGACCGT
 1981 GCGGTTGGCC AAACGTTCTG GTTCCACAG AGATTCTTTC TTGATACCTT GCCAGAACAC
 2041 CACCAAAACA CAGTGTGTTT CAAAGACGGA CAGCTTTCCA TATTTTTCAT ATGTTTGAAT
 2101 GTATGAAGTA TTGAATAATG CTGTGTAAGT ATTTATGGCC TCATCAGCTA CAGATGCCAG
 2161 CGCAGAGTCG GACATGTTCA CCGTCTGCTT CTATAGATAAG AAAGTGGCGG TCATTTTGGC
 2221 AGAAGAAAAG TGATACGAGT CCGTGGCTTC GGAACGAATG GTGCGTTCCG AGGCTTCCCA
 2281 GAAAGTGAAG TGACAGTAA CATCTTTCTC GTCTCTGATA TCCGAGGAGA TCATCTGAGT
 2341 CCGCAGCTTCA AGAAGACCA CCAACCTGTG GGTCTCTAAC GCAGAAATTC GTCTTTCAAA
 2401 CTGCGGAGAG ATAGTGTAGT CCGTGAATAA GAAAACTTGG TCGGCGTTTT CTCCAAAATA
 2461 CTGGGCTATT CGATTAGTTC CCGTGTAGAA AGGAGAAATG TCAACCAATC CCAATGATTT
 2521 AGTTGGGAAA AAATGATAGG GATATCTTGA GATATCTTGA GATATCTTGA GATATCTTGA
 2581 CAGATTACAG GTCTCAGCAT AGAGCCAGGT GCTGCGCGCG GGCATTAAT GCATCTTGA
 2641 CGTCACTGTA CGGCTCTGT GGTGTTGGA ATAACTGCTG GGCATTAAT GCATCTTGA
 2701 GTTTTCATAG CTGCTCCATAT GATAAGCCAC GAAACCGTG CCGTGTATAA CGCGGCTGTA
 2761 GGAAGCTGAG CACTGACTGT GACTGTTGAT ATGATGAATC TCCACATAG GAGGCGCCAC
 2821 GTATTCTGCT TTGCTGCCCA CGCATATAAG GGTGTGATG TAAGCGTAGC TAGCAGGAAA
 2881 CTTCAAAACG TCTGCTGAGC TCGTACCTTT AAAGGTTGTC GCGACGATGT TGGCTTTGTA
 2941 GACCAACCAT ATGCCCTCTG CAGGCTCTTC ATTGATGGGC TTCATCGAGG TGCACAGCAT
 3001 ATTACGTTCA AAGCGAATAA GATCCGTATC CTGCTCCATA GAACACAGC GATAGGGGTA
 3061 CTTGGTGGTG TTAGCCCCCA CCAATCTTCC GTACTTGAGG GTAGTGTGT AGATGGTCTC

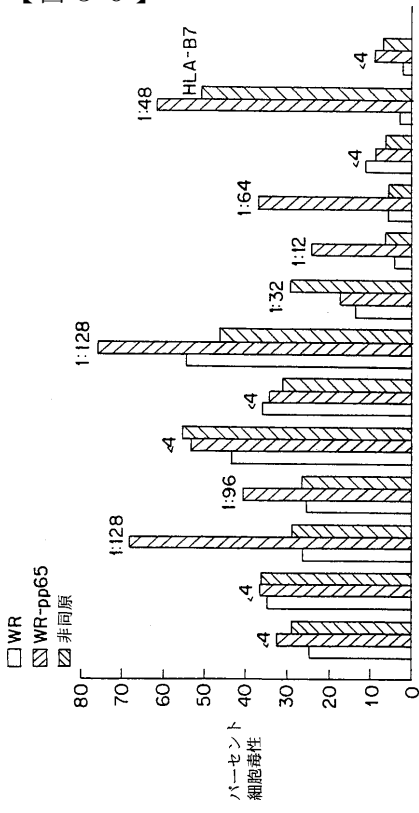
【図 48 B】

3121 GTTAACACCA TGGCTGACCG TTGGAAGA AGTTACGGT TGAGAGACTG AACCCGATCG
 3181 AGAATGAGCA GCAGACGTCG TATGAGAGGA ATGGTGAAGT TGAGTAGCAG AAGTTCCAGC
 3241 AGTAGAAGAT GAGGAAACCG CAGCACCAGC ACAGACGATA CACAAGTTAA CGCAGACTAC
 3301 CAGCACACCG ATCTGGAATT CCAATTACGAT ACACACTTAA CCGGATATCGG GATATGAAA
 3361 TAATTTATGA TTATTTCTCG CTCTCAATTT AACACAACCC TCAAGAACCT TTGATTATTA
 3421 TTTCACTTTT AAGTATAGAA TGCATGCCCAT TCTTTATCTT TGCTATTAATA AATACAAAGG
 3481 GGTGCACTCT AGAGGATCTT TCTTTATCTT TGCTATTAATA AATACAAAGG
 3541 TTTCTGAGGG TTGTGTATAA TTGAAAGCGA GAAATAATCA TAAATATATT TCTTTCTCAC
 3601 ATATCCGTTA AGTTTGTATC TGAAATGTGCG GCGGCGCGGA TTGCGGCTTC TCAGCAGCCG
 3661 CTGGACCGGT GGCATCTGTC TGTGTGTGCG TCTCTGCTGC CATCGTTTCC TCAGCAGCCG
 3721 TCAAGCTCTT TCTTACCGTC TCTTACCGTC TCTTACCGTC TCTTACCGTC TCTTACCGTC
 3781 TGAATGTATC GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 3841 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 3901 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 3961 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4021 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4081 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4141 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4201 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4261 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4321 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4381 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4441 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4501 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4561 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4621 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4681 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4741 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4801 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4861 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4921 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 4981 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 5041 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 5101 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 5161 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG
 5221 GGTGAGGCTG GGTGAGGCTG TTTTACGGGT ACAAGTATGA AAGTTGGCTG CCGCCGTTGG

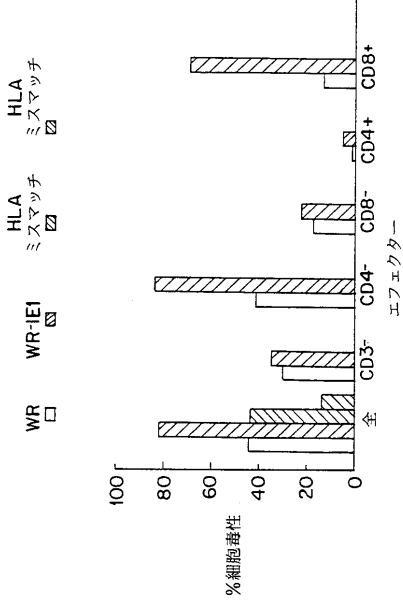
【図 49】



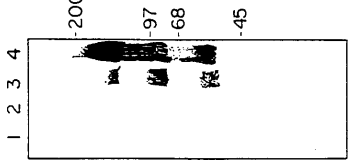
【図 50】



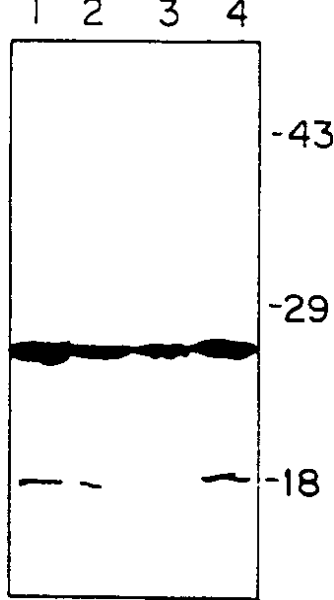
【図 5 1】



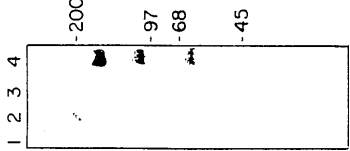
【図 5 2 A】



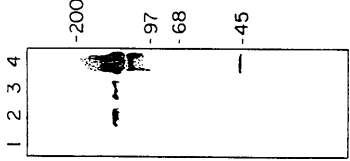
【図 5 3 A】



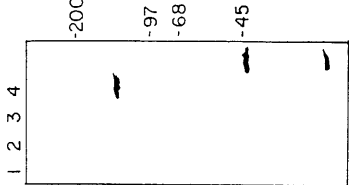
【図 5 2 B】



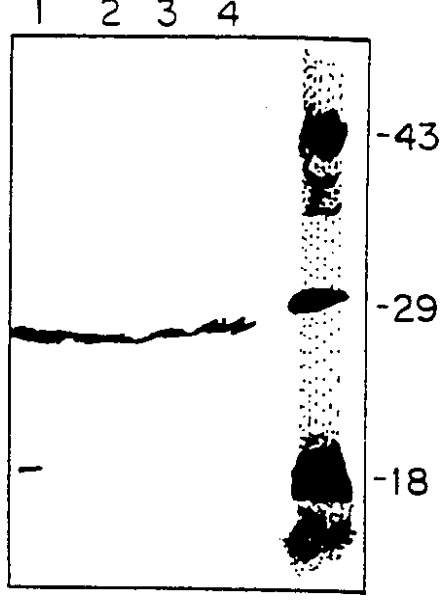
【図 5 2 C】

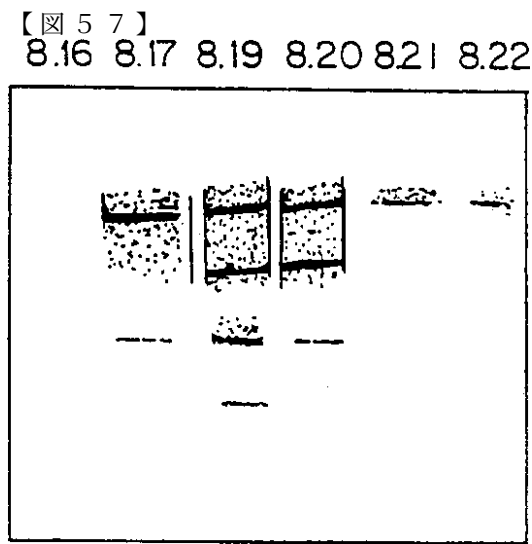
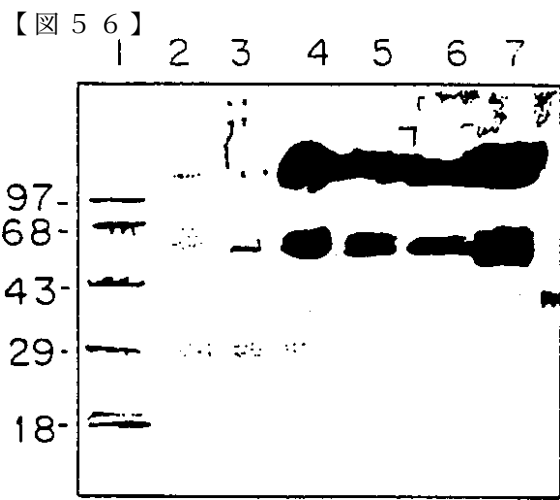
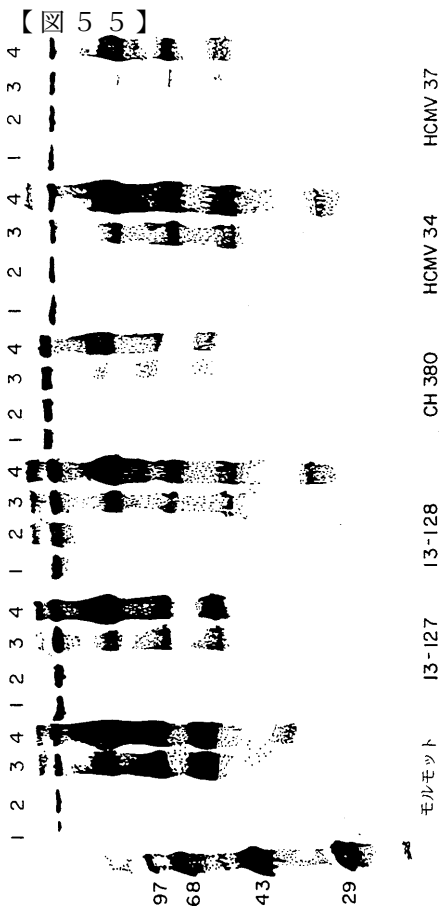
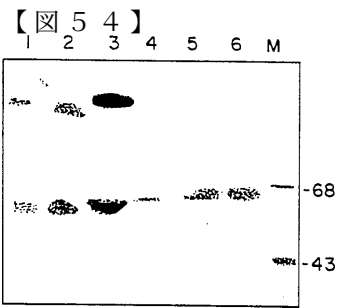


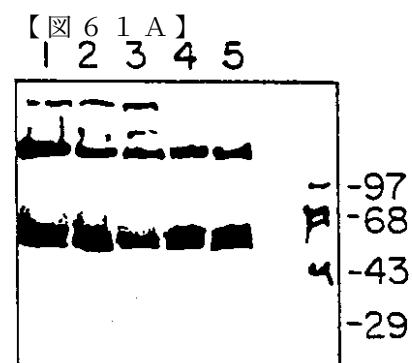
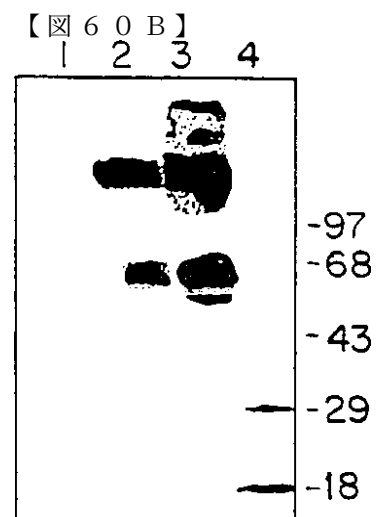
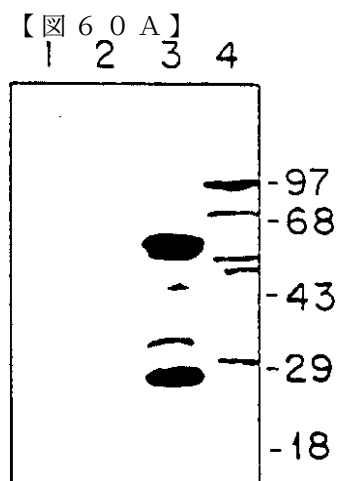
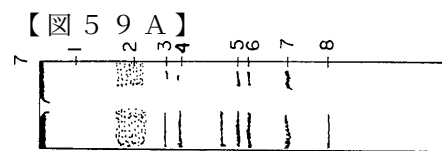
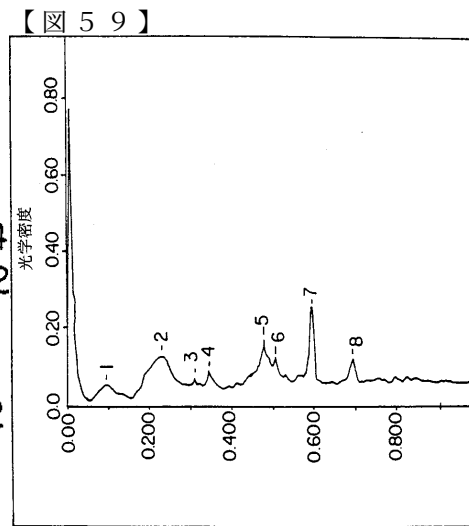
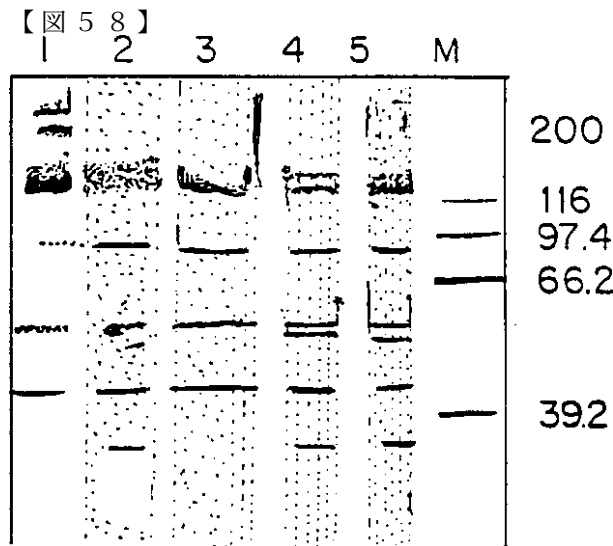
【図 5 2 D】

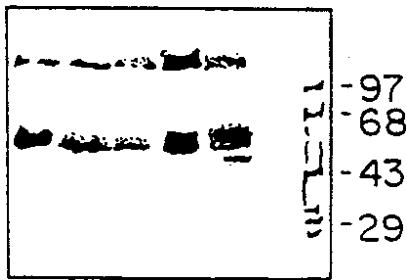
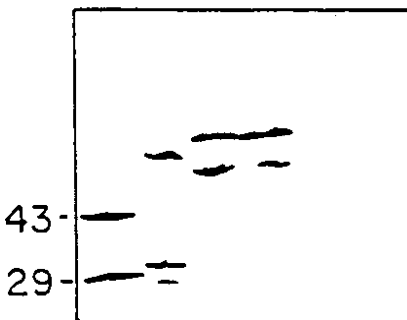
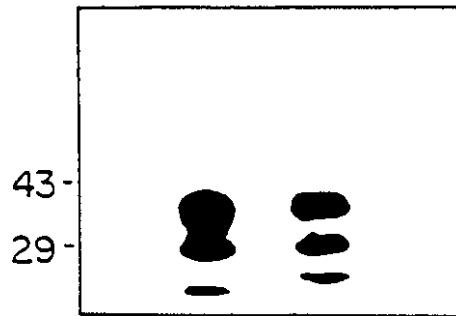


【図 5 3 B】







【図 6 1 B】
1 2 3 4 5【図 6 2 A】
1 2 3 4 5 6【図 6 2 B】
1 2 3 4 5 6

【図 6 3 A】

1 GAGCTCCGGG CCGGCTATCA AAGTCTTAA TGAGTTAGGT GTAGATAGTA TAGATATTAC
61 TACAAAGGTA TTGATATTTC CTATCAATTC AATGACTGSA AATTGGGAGC GTTCAATTTT
121 GATGATAGTA GATATATAGAT ACGCTCATAT CATAGATCAA AATCTCACTA AAAAGATAGC
181 TAATCATCAC GCGTTCATAA GTTTCACATG CATAGATCAA AATCTCACTA AAAAGATAGC
241 CGATGATATT GAGAGAGATT GGACATCTAA CTACGCTTAA GAAATTAACAG AAGATATTAA
301 TACATAATGG ATTTTGTGTT CATCAGTTAT ATTAACATA AGTACATAA AAAACCCCAA
361 ATAAAAATAC TTACTTACGA AAAATAGACT AATTAGCTAT AAAACCCCAA AAAAATACTA
421 TCAGCTATCG GGGTTAATTA ATTAGTTTAT AGACAAGGTG AAAACCCCAA TATTTTGATC
481 TTAATTAAAT AGAGCTTCTT AAGCGAGAAA TAATCAATAA TATTTTCAAT TATTTTCAAT
541 TGAGGGTGTG CTGAAATTTGA TGAGGTGGCG CGGTGCGCGT GTGCGCGTGA GTGCGCGTGA
601 CCGTTAAGTT TGTATCTGTA TGAGGTGGCG CGGTGCGCGT GTGCGCGTGA GTGCGCGTGA
661 ACTGGGTCCC ATTTGCGGGC ACGTCTGTA AGCGGTGTTT GTGCGCGTGA GTGCGCGTGA
721 GCTGCCCGAC GAGACGCGAC TCCTGCGAGC GGTATATCCAC GTGCGCGTGA GTGCGCGTGA
781 GCTGATCCTG GTGCGCGAGT ACACGCGCGA CTGCGCGTGA GTGCGCGTGA GTGCGCGTGA
841 GCTGCAAGGT GAGCAACAGT ACTTTACGGG CAGCGAGGTG GAGAAGCTGT CGGTCAACGT
901 GCACACCCCG ACGGGCGCGA GCATCTGCCC CAGCGAGGTG CCGATGTCGA TCTATGTGTA
961 CCGGCGCGCG CTCAAGATGCG TGAACATCCC CAGCATCAAC GTGCAACACT ACCCGTCCCG
1021 GCGCGAGCGC AAGCAACCGC ACCTGCGCGT GTGAGCGCTC GCGGACTGCG GTGAGCGCTC
1081 CGAGATGCTG CAGGCGCGCT CTACAGTCTC AGCTTCTGTC GTGAGCGCTC GTGAGCGCTC
1141 GTGGAAAGAG CCGACGCTCT ACTACACGTC AGCTTCTGTC GTGAGCGCTC GTGAGCGCTC
1201 ACTGCGGACG GTGAGTGTGCG CGCAGAGCTG GGTTGTCTCC CTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1261 CAAGATGCGG GTGAGTGTGCG ACCAGTACGT CAAGGTGTGTC CTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1321 GCGTCCCTCC GCGCAAGCTCT TTATGCACTG CAGCGTGGGC TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1381 GAGGATGACC CGCAACCCCG AACCTTCACT AAGAGTCTCC TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1441 GTTGTGTCCC AAAAATATGA TAATCAAAAC GGTGTGTCCC TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1501 GCGTCTTACC TCACACGCGC ATTTTGGGCT CAGATCTCTC CTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1561 CATCTCAGGT ACCCTATGGA TGAACGCGCA CTGAGTCTCT TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1621 CGAGACGCTG GAACTGCGCT CTGAGTCTCT CAGATCTCTC CTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1681 CTGTGCTGCT GAGCGCGGGC AGTATACAG CAGTATCTCT TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1741 CATCCAGGCG AAGCTTGTAGT ACCGACACAC CTGAGTCTCT TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1801 GCGCGAGCGC GAGCTCTGGA CCGAGCGGAT GAGTCTCTCT TCTGAGTCTCT TCTGCGAGG
1861 GCGCAAGAGC CCGCGCGGTA CCGCGCGGCG GCGCATGCGC GCGCGCGGTA TGAACGCGG
1921 CCGCAAAAGC AAATCAGCAT CCGTGGCGCC CGAGGAGGAG ACCGACGAGG ATTCCGACAA
1981 CCGCTTAAAG CCGAGTCTCA CCGTGGCGCC GCGCGCGGCG TCGTGGCGCC TCGTGGCGCC
2041 CCAATCTCAC AATCCGCGCG CTAGCGTTCA CCGTGGCGCC TCGTGGCGCC TCGTGGCGCC
2101 GAGTCTGGTG CCGATGCTGCG CCGTGGCGCC TCGTGGCGCC TCGTGGCGCC TCGTGGCGCC
2161 CTGGGAGCGC AAGCAATCTT ACCGATCTCT CCGCGAATTT GAAAGGCGAT GCGACCGCG
2221 TGCGCGAGCC AAGCTGCGCG CCGCAGCGCG AGACGCGCTT CCGCGCGCTT GCGCGCGCTT
2281 GAGCGCCAAA AAGCAGCGAG GTTGATTTTT ATGGATCCCG TACCTTCGAG GAATTTCTAG
2341 TTTATTGGGA AGATATGATA ATATTTTGGG ATTTCAAAAT TGAATAATATA TAATTTCAAT
2401 ATAAAAATAG TTTCAGTATT ATCGGTCTAC AGCGCGCGCA TGTGTGTGCG CTGGTCAAT
2461 TTCTCGGCGA TCTCACGCGA AAGCCGCGAG CCGCGCGCGC TGTGTGTGCG CTGGTCAAT
2521 AAAATATGCG CGAATAACCG CTGCAACCGC GTACGCTGCT GTTCTGAGG GTTCTGAGG
2581 GTTGGGATGA CTACCGCGCG CTGCGCGCTA CACTTACCG GTTCTGAGG GTTCTGAGG
2641 AGTTGCGAGT GTCGTCGCGC CCGTGGCGCG GTGCGCGCTA CACTTACCG GTTCTGAGG
2701 GTGGTAAGCG CCGTGACGAC CTGCGTGTGCG TAGACGCTAC GGTCAATCTG GCGCAAGGTG
2761 GCGCAGATGC TGAGATTGTC GAGCGCGCGC TCGTAAGCGCG GGTCAATCTG GCGCAAGGTG
2821 CCGTGGCGCG GAGCGTGTGCT ACACGCGATC GCGCAAGCGA ACCCATGCT GTTGTGCGC
2881 TCAAGGATAC CAGGCTGCGC CCGATTGAAG AAAACCTGGA GGTGTGCGCG GGTAACTATG
2941 TCGCGGTGAA ACGCGTCTGAC CTTAACTGCT ACCGCGACCG CTGTTCAAGC
3001 CCGTCAACAA GTCGCTGTGCT CTTAGCGGCTC CCGTGGCGAG CCGTGGCGAG GTCAAGGAGC
3061 AGCTGGAGCG CAAATGTCGT GCGGCGATTC AGGAGCGGCTG CAAAGTGTGCT GTCAAGGAGC

【図 6 3 B】

1221 TCGGCAATGT CTTTTCCTTT GATTCCAACT ACTGTGCGAA TATCTCTAAA CAGCGCGTGG
1281 AAAACGCTGA CTGCGCGGAG AGCTGCTCT AGCTGCTCT CGAGGAGCTTT GACATCTACG
1341 TGGCAGCTTT CCGCGAGTCT GCGCACACCT TTTTGGGCGC GCGCGCGGCG TCGTGGAGT
1401 TGGCAGCTGA CCGCAATCTC CTCTGCTGCG GCGGCGGCTT AGCTCTTCTCG TCGGTACCCA
1461 AGAAACATGT CCGCACGCGC CCGCTGGAGC GCTGGAGTCT GATCGCCAGT CCGTGGAGG
1521 GACACAAACC GTTCCGCTTC GAGGCCCATG GTTCTCTGCG ACCGCGCGCG GACGCGCGCG
1581 CCGCGCGCTC GCGCGCGCTC GGTATTACG ACGAAGAGGA AAAGCGTCCG GAGCGCGCAG
1641 AACCGGTTGA GACGAGGTG GTGCGAGCTG AGAAACAGCA GCTGAAGGCT TGGGAGGAGA
1701 GCGGAGCGAA CCGTGAGCAA AACCGCGCGC CCGCACACCT AAACCGGCGG CCGGAGGAGA
1761 CCGTCTTGGC TCCGCTGCGC ATGACGAGGA GATGAGGAGA CCGGCGCGCG GATGAGGAGA
1821 AAAACATCTT TAGCCCATCT AAGAAACCGG GAATAGCGG CAAGGCGCGC GCTAGTGAGA
1881 ACGGTGTTTC CAGCATTTTC AGCGGCGTGT TATCTCTGCG CAGTCAAGAA CCGACACGCG
1941 GTCGCGCGAG CATCCGCGCG GTCACGCGCG GTTCAAGTCT GTCTCTCCCC GTCTCTCCCC
1991 AGGTAAACAA GCGCGAGCGG GGAAGGGTCC GTGCGGACAG CCGCTGGGAG GTGAGGCGCG
2051 TCCGCGGAGC AAGAGGGGAT CTTTCTCGCG GCGACAGAGA TTCCGACAGC TCGGATGCGT
2111 ATCCCGCCAA CCGTCAAGAT CCGCGTTTCA CCGACACGCT GGTGAGCATC ACGGATACCG
2171 AGAGCGGCGC CAAACCGCCC GTGCGGCGCG CTACCAAGTT CAGGCAACCG ACGTGTGAGT
2231 AGTTAAAGTC CCGTGTGCGC CCGGCGCTCG CATCTCTCAG CCGACGCTCG CCGACGCTCG
2291 TCAATCTCTC CAGCGCGCCC GTTCCGCGCG CAGACACCTG TCTCCGCGGT ACCCAACCC
2351 CGGTCAACGG TAACCTCGCC TGGGCTCCGA CCGCGCGCTT GCGCGCGGAT ATGAACCGCG
2411 CCAAGTGGCC GCGCGAGCGC CCGTGGGCGC TCAAGATACC TCACTGCTGT TCAATCTCTC
2471 TACGAGTCTC TACGACTTCC AGCACTTCTC AAAACAACTG GTCCACACCC CCGTGGAGCG
2531 CCGTCACTCC ACGCGCGCGC GTGACACAAA CAGCGCTCTA GAGCGCGCTG GATGAGGTT
2591 GCGCTTTAAG GGACCAAACT CCGCGCGGCG GTGAGTCTC AAGCGAGGAG GAAGAGCGAG
2651 ACTCTCTCGA CAGCGCGCTC GTGCTGAGCG TGGGACACAC AACACCGTGG TCGGATCTGA
2711 AGAGCGTCTC TCGCGCTCTC AGTCAAGCTC CCGGCGCTCG CCGGCGCTCG AGAATACGTA
2771 AAGCTAAGTT ATGCTCTTCA ATGACGCGA CATCCACGAG CAGAAACCGG GTGCTGGCG
2831 AGCGAGTCTG GAGCGCGCGC CCGTCTGCGC GAGCGCGAGC GGTGAGTCTC ACGCGCTCG
2891 AAGGAAAGGT AGAGAAACAG GTTCTGCGCA CAGCGCTCGC GTGAGTCTCT AGCGCTCTCT
2951 AACCTCAACG GGTCTGCTCT AAAACAACTG CATCAAGGAA CGTGATCTCT CCGCGAGAGA
3011 CCGTCTGCGC TCGCGCTCGA CAGCGCTCGC CCGTCTGCGC CCGTCTGCGC CCGCGAGAGA
3071 ATGATGTCTG GTCCCGCGTC ACGTGGCGCG TGTCTATGCT TCTGTCAGCG TCTCGTCTCT
3131 CCGCGAGAGG TCGCGCTCGC TCTCGGCTCG AAGGTCTGCG CAGCGCGCTC GGTGTCTCT
3191 CTTTGAACCC TACTTTGGCG GCGCAAGGCG TGGTASGTG CCGCGCGCTG GTACCGGTGA
3251 CCGCTGAGCG CCGCGCTGCG CCGCGCGCGC CCGCTGAGC AGCGCGAGC AGCGCGAGC
3311 ATCCCGCGGT AAGCACTCTT TACCAACGCT CCGTCTGAGC CAAAGAGGAG GTATCAAGT
3371 CCGCGCGCTG GCGCTCTCCC TCCATCTGTA AACCGCGCGC GAGCGCGGCT TGTCAATCAC
3431 CCGCTCTGAG GGGGACCGCG CCGCTAGGTT CCGCGCTCAA GAGCACGAGC GGCATGAAA
3491 CCGTGGCTTT CCGCGCTGCG TCGCGCGCAG AGAGCGGTGAC GGGCGCGCAA CCGGGTCTCT
3551 AGAAGATTAA GAACACGAGG GAATAGTTTT TATCTGTAGA ATCTTTTTTA TGTATTAAT
3611 AGTCAATAGA GTATATATA GTTAAAAAGT AAAATATAAA TCATATAATA ATGAACAGAA
3671 ATATCAGTAA TAGACAGGAA CTGGCAGATT CTCTCTTCAA TGAAGTAACT ACTGCTAAAT
3731 ATCTAGCTCT ATCTAGCTCT ATCTAGCTCT ATCTAGCTCT ATCTAGCTCT ATCTAGCTCT
3791 ATTTTTCGAG ACTACGCTTA TACAAACTA CTAAGCTGAG ATGATAGGAA ACTAATATA
3851 AATTTAACTT ATGGGTATAA TATAATAAG ATTCATGATA TTAATTAATT ACTTAACGAT
3911 TTAATAGAGC TATTTCCATC AACCCCTTCA GATATTATAA TATATAATAA AATACAGGAT
3971 AATGATATTA AATAGATTG TTAAGAGAT GTAAATAATT ATTTGAGGAT AAAGGATATA
4031 AATATTAGTT ATCTTTTACA TGGAAATGAA TTAACCTATA TTAATAATAA TGATAGGAAT
4091 TTTTATAGAT TTACAGCTGT TATATGTATC AACAATACAG CAGATCTATG GGTATAGTA
4151 AAACATCTGA ACGGGAAGCA GATTTCTATG GATTTCTGCT ATGTTAGGCT AGGAGATGTA
4211 TTTATCTCTA TAAACATTTT ACCCAAAATA ATAGGATCTCT CTAGATATTT AATATTATAT

【図 6 3 C】

6241 CTAACACAAA CAAAAAATTT TAACGATGTA TGGCCAGAAG TATTTTCTAC TAATAAGAT
6301 AAAGATAGTC TATCTTATCT ACAAGATATG AAAGAGGATA ATCAATTATG ATGATAGAT
6361 AATTTGGAAA GAAATGTATA GAAAGCTTTA TATTAATATG CATATTACTA CATATTACTA
6421 TAAGATTTAA ATCTAGATCT TAGTAAAGAA AAGACATGAA ATGCCAATAT CGATTCTATA
6481 TTTATCATATA ACAGTAGTAC ATTAATCATG GATATCTGGA GATATCTGGA AGACTCTAC
6541 ATGCAAGGAA TAAGCAATAT GCGCAATATG TCTAATATAT TAATCTTAACT AGACTCAACT
6601 TCTACCAATA CTAATAATAG GATACGTGAT AGGCTGTAAA AAGCTGCAAT AATAGTAGT
6661 GATGTAGAAG AAATACCTTT TCTATACCT TCGGAGGAAA GAACCTTTAGA ACACTTTAG
6721 TTTAATCAAA CTGTATTTA TGAAGGTAC

【図 6 4 A】

1 TCTAGAACTA GTGGATCTTC TGGTAATGAC AAATTTAAACT GTTTCAGCGTA TATTATATATC
61 TCGTATATATA AATCATGATC TATATTCTTA ATAGCTTTTA ATCGTATGAAA ATCGTATGAAA
121 TAAACATPAG TTCCCTTTCT CACTCTACCT ACACGACCTT TACGTTTGGT CATCATAGAT
181 TTTGATATATA ACCTGTAAC ACACGTAAGA GTCTAGGTA GTATACCTCT CACGCTATGCG
241 TATAGCTGAG TCGCGTGA G TATAGTATA TATAGTATCA AATAGTATGCG ATAGTATGCG
301 ATACAAGGTC TTCTCTAT ATAGCTGTTGA ACATCTCTGA GGATTTCTCG GTATCTCTTA
361 AATTTTCCAT GTATTACTAT AAATCAATTA TTCTTATCTC TAGATTCTTA GTATCTCTTA
421 TCTTATATAT ATTTCTGATC AGAAGGTAAG AATAAAATAT TTCTCTCTAT TATCAAAATTA
481 TTAACACACA ATAAAGTAGA GATATATATC TTCTCTCTAT TATCAAAATTA AATCTCTCTA
541 TCGCGGAGAT ACCTATTTTT TACGTATATC TTCTTATGCG AGTAAAGAAC TGGTCTCTCT
601 ATATGCTAAA ATTTAACTAT AGGAAGAAAT TCCATTAGTC TATCTTTATC ATCTTTCTAG
661 GTGGCGAGCA TAAATCTAGC GATATGATG TATCTATATC TTTTCTCTAG AACGGCTATC
721 ATAAATTCGG CTATCTATC ATGTTCTATG ATTTCTATCA TATGACTAT TATGACTAT
781 GATAGAGAGT AACTAGTAGC TTTTATAGTA GAAGTATCTA TACCTTGAAG TCCCTTTTTC
841 GTTCTTTCTG TATGCTCTCC GTATTATAGT TCTACAGGAG AACCTCTGCA CTGTAAGAAAT
901 CCCAACGATG TTTTGGGTAT AATTTCCGTTG CTCTTTACCA AAGTCACCTCT CATCTCTGCT
961 AAAACATATG GTTTGGGTAT AATTTCTAGC CTCTATCTCT CTATATCTAT ATGTTTATCC
1021 AATTAATATG TATCAACATC TATTAATCTT GGTAACCTGAG ATGTTTATCC TATGCTCTCT
1081 CTACCGGTAA CTACTATCTG TTCTCTCTTC TTTAAACATAT CAAAGATATC AACCTGTGTT
1141 GTTAACTGAA GGGTAAATGA CGATATGATA TCGATATGTA TGAAGAGAAA TAGACAGATG
1201 ATAGATATCT TATGCGGTAC CTCTCTATG GTCTCTATG TATGACTAT TATGACTAT
1261 ACTAGTATCT CTCTCTTATC TCGAAGGTTA ATATCTATG TACTCTATG TACTCTATG
1321 TTTAGTATCT TATAGCATTC AAACGTTATA AATCTATCTG TACTCTATG TACTCTATG
1381 TTTAGTATCT TATAGCATTC AAACGTTATA AATCTATCTG TACTCTATG TACTCTATG
1441 GGTATGTAAT TATAGTATCT AAACGTTATA AATCTATCTG TACTCTATG TACTCTATG
1501 ACTTATTTAT ACCTATGTTT TATATATGTA AATACAGAAAT GAGAAAAAAA TAACTGATCT
1561 TTTATTTATG ATCTCTCTAA TTCTTTATGG GTATATCTAT TTTGGAATAT TTTGGAATAT
1621 TTAGGGAAGG CGTATATGCA AATATAGCTC TTAGTGGCCA TAGTCTCTAC AGTATGATA
1681 TTTAGTATCT TTTAGTATCT AATATAGCTC TTAGTGGCCA TAGTCTCTAC AGTATGATA
1741 GGTATGTAAT TATGCGGTAC CTCTCTATG GTCTCTATG TATGACTAT TATGACTAT
1801 GTATCAAAAT TCAAAAGGTA TCTCAATGTT TACGCTCTAG AGAATATGTA AGACAGAAA
1861 ACATGTTGGA TAAAGCTCTG CTGCGCTTAT TCTATCTCTG TAAAGTATGTA AGACAGAAA
1921 ATATTATCTA AACAGCATAG GTCTAAACGA GAATATAGTA TAAAGTATGTA AGACAGAAA
1981 GAATTAATGT AATATACCAA GTATTTGCGA GATATATGTA CTATACCTAG TAAAGTATGTA
2041 ATAGATGAT TTTTAAACCG GTATCAAGTA GAAAAAGTAT CTAAAGCTGT AGATTTTCTC
2101 AGATGTTGTA TAAAGTATGCA TAAATATGAG AATATATGAG TAAAGTATGTA AGACAGAAA
2161 AATATATGTA CTATGTTGTA GATTTGATCA GAAAAAGTAT CTGCGGTATG TAAATATGAG
2221 ATGCGATCT TATATAGGAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC
2281 ACTTATATG TATATATGTA TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC
2341 CGAGAACTTT TAAAGTATGTA TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC
2401 TTTTCTCTAT ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2461 TTTTCTCTAT ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2521 TCTATATGTA ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2581 GAAATATGTA ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2641 GGTATGTAAT ACCTGATATG TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC TATGCTCTAC
2701 TTTTCTCTAT ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2761 TTTTCTCTAT ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2821 ACCTGATGTA ATTTGAGGAG ATCTATATCA AATGACTTTG ATCTATATG TATGCTCTAC
2881 AAAAAATGAG AAGATGTTGT TGGTAAACCT ATAAACATTT TATGCTATATA AATAACACA
2941 CGTGTAAATA GTATATATGA TATGTAATAT TATGTAAGCA TATGTAAGCA TATGTAAGCA
3001 GATGATATGA CCTATAGCAG AATTAAGAAC TCCAGATTTT AAGTATCAAT ATTTATATAT
3061 GACTATATCT TTTAATTTTC CTGACTTATA TATTTGTAAT AAAAAATTA TTTGGAAGCC

【図 6 4 B】

1121 CGATAAATCT TTGCTAGATG TTTCTAAGTC TTTGCTTACT TTAACATCAT TTCGGTATGA
1181 AAACCTTTGT ATAAATGATT TACTAAGAAC TACTGTCAGG TACTGTCAGG TACTGTCAGG
1241 CTATTTTTTTT CCGCTAGGCT GTTTTGTAGG AAAAGAGAGT GTATTACCCA ATTACCAAGT
1301 ATGCTATATA ATAAATGAAA GTATATATCA AGAGATATAA GAAACATATA TATGAAATTA
1361 TTTATCTACA CACGCTATTT ATGAGATATA CCTATCTATA GAAACAGACC GATTAACAGG
1421 AGATCTTATA AACAGACAT CTATCTTAGG AGCTAGACAG TTAGAGCTTA TATGCTATG
1481 TTTCTTTTTT CCGCTAGGCT GTTTTGTAGG AAAAGAGAGT GTATTACCCA ATTACCAAGT
1541 CAAAGACAGA CATTGCGGCT TATCTTATGT AGTTGATAGA GAGGATATGT ATAAAGTAT
1601 TAAAGATAAT TATCTCTAGC TATGTTTGTAT TATGTTTGTAT TATGTTTGTAT TATGTTTGTAT
1661 TCACTACTAT CTCTAGCTA ATCAAGATAA AAAATTAATA CCGTTACCCA TAAATCATTT
1721 CAATACCTTA TGGGAGATAG TTCAGACCTT TGAGTTTTTA AGATTTGAGC TAAATCATAT
1781 TTTTCTACTC GTTTTCTACT CTTTATTTTC TAAACAGCTA GTTATATATA TCAACTTACC
1841 CCAATATACC GTTTTCTACT CTCTATCTAT GTCATCAAT AAACAGATTA GAATTTCTTA CACATATAGA
1901 TGATAAATA CTATCTACT TTTAAAGAG TACTGATTTT CGTAAAGGAT AAATTTCTTA CTTTCTAT
1961 TCTTCTACTG ACATTTAAA AAAGGAATAT AGTCAAGAAC AGGAATATTA CTTTCTAT
2021 TCTGAGCTT GTCCGAGCTT AGGAGAGCTT AGGAGAGCTT AGGAGAGCTT AGGAGAGCTT
2081 CATATGCTAT AATTTTGAAT ATTTTCTGAT ATACGTTTGA AAAACCTTTA ATGATACAT
2141 ATAAATGAAA CTAACTAGAG AAACGCTGAT ATTTTGTAGC ATTAATCTAT TAGTATAGT
2201 AATGATGATA TCTGTTTCTC CACTAATAT GCGATTGATA CTTGCTGAT ATTCATCACT
2261 TCTGTTTCTC TCTGTTTCTC TCTGTTTCTC TCTGTTTCTC TCTGTTTCTC TCTGTTTCTC
2321 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2381 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2441 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2501 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2561 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2621 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2681 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2741 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2801 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2861 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2921 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
2981 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
3041 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
3101 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA
3161 TATGCTATG CCAATCATAG TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA TAAATATGTA

【図 6 5 A】

1 GCGCTTAAAG GAGTCCAGAA ACTTTTTAAG ATTAAGAGTA GAATTAAGG ATTACGTACA
61 AGATTTTGTG TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT
121 GAAACAGGAT TTTGATATCT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT TGTTCGTTTT
181 TATGATATAT TTTTCTACTA TATGCTATCT TATGCTATCT AGAGGATCTA ATAGAAATCT
241 TCTAGCTTAT CTAAATGAAA TCGAGATGTA GATATCTCTG TCAACTTTTT AGAGGATCTA
301 TACGAAATGA TTTTCAAGTA TATTAAGCTA GAAGTCAATC AGCTGATGTT ATCAGATGTT
361 GTATGTTTTA CTGTGTTTTT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
421 GGGATATAGA AGACATATGA TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
481 AATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
541 GCGCATACAG ATATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
601 GATTAATATA CAACAGCTGT AATGATATCT AATGATATCT AATGATATCT AATGATATCT
661 GAGATATCTG TCAAGATGTA TAAACCTATC AGCGATATCT AATGATATCT AATGATATCT
721 ACAATATAT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
781 TTTTCTTGGC AAACCGGATA ATACTTTGCT AGATGTTTTT AGCTCTTTTC TATGCTATCT
841 CTCTTTTGGC TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT TATGCTATCT
901 TCACTATATC AGTATCTAT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT
961 CCGATATATC AATATCTAT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT
1021 AATATATGTA ATATCTAT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT
1081 GAGGATATTA ACGAGATCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT TTTTACCGCT
1141 CCTATATGCG TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT TTTTCTCTT
1201 TATGATGATA GATACAAAGA CAGACATCTC GGTGTATCTT TACGTATCTT GTATTATCTT
1261 ATGATATAAG TAAATTAACG AATATATCTT TACGTATCTT GTATTATCTT GTATTATCTT
1321 GATATGCTCA CGTTTCAATC TACTCTCTTA GCTAATCACA GTAAATAAAT AATACCGTAT
1381 CCGATATAAT ATTGCAATC CTTATGCGAG ATAGTTTCACT ACTTTGAGTT TTTGAGATT
1441 GAGCATATCA CTATGCAAT ACCTGTTTTT ACTTTGAGTT TTTGAGATT TTTGAGATT
1501 ATATCTACT TACTCTATG AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA
1561 TATGATATTA TAGATATGTA AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA
1621 CTATGATATTA CTATCTCTCA CGGTATATTT AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA
1681 TATGATATTA CTATCTCTCA CGGTATATTT AATATTAATA AATATTAATA AATATTAATA
1741 TCTTCACTTA ATACCTGTAA TAGAGTATTT TTAGACGTTA GTAGATATCT TACAAAACCC
1801 TTTTATGATA CAATATAAAT GGAATATCT TTTTATGTT TTTTATGTT TTTTATGTT
1861 GTACTATGTA TAGTATATAT TTTTATGTT TTTTATGTT TTTTATGTT TTTTATGTT
1921 GTATATCTAT CAGTATATAT ATCTGCTTCT TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
1981 GTATATCTAT CAGTATATAT ATCTGCTTCT TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2041 AATATCTATA TGAATAAATA CTATCTCTCT TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2101 AAAACCGGCT TCGCGAGAA TTTTCTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2161 AAAATATATA CAAGGTTTCT TCGAGGTTCT TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2221 TTTTATCTAT TCGCGAGAA TTTTCTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2281 GGTCTCTCTT TCTACCTCTG ACCGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2341 GTTCTCTCTG CCACTGCTAG CCGTCTCTCT ACCGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT
2401 CCGGATATTA CCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT
2461 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2521 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2581 ACTCTGCTCT TCTCTCTA CAGGCTCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2641 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2701 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2761 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2821 CTCTTAACTG TGGTGTGCTG CAGGCTCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2881 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
2941 GAGGATATTA AATCTGCTCT CAGGCTCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
3001 AATATCTAG CCGGCTCTG CAGGCTCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT
3061 TCGGTTGCTG TTTTACCGA CCGGTTGCTG TATGATATCT TATGATATCT TATGATATCT

【図 6 5 B】

1121 CCGATGCGCT TTTTATGAG TAGTATATCA GTCTAATATA CGTCTAAT ACTTGTACGT
1181 AGAATATGAT TGAATATAT TGTCTAGTAT AGTATATATA CAGTATATGA AAAATATAAA
1241 TTTGATATAA AGTATGCTCT TATTTCCGAG AATATATGTA CAAATGGAT TATGATATTA
1301 AATCTTTGCG AAGTATTTCA AAAATATGCG AATATATGTA CAAATGGAT TATGATATTA
1361 TAAAGATAT TAAACAGAGA TTTTAAATTA CAATTTACTG TAAATGTTAT TGTCTATCA
1421 AAGATATAT TTTATAGATT GTTACTGAGA AACTGCTTTT AATGATATAT TTTATAGT
1481 TTAGAGGAAA GTATCTAATC TATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA
1541 ATCAATATCA TGTGATTTT TATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA
1601 GAATAGAGA AAAATATACC ATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA TATGATATTA
1661 GAACGATATA GATATATGTA TTTTATGTA TTAGAACCCG AATATATGTA CAAATATGTA
1721 TTAATATATA TTTCTGATTA TTAGAACCCG AATATATGTA CAAATATGTA CAAATATGTA
1781 CTATTTGATA AGGTGAAGG AAAATATACC AATATATGTA CAAATATGTA CAAATATGTA
1841 AAACCGTATT TCTTAAATA CGACCTACGT TAATGATATC TATATATATA CAGATTATG
3961 AA

【図 6 6 A】

1 GCCTTTAACA GAAGTCCGGA ACTTTTTAAG ATTAAGAAGA GAATTAAGG ATTACGTACA
61 AGATTGGTGA TGTTGGGTTT CTGTTATATG TCCCATTTGA AATGTTTATG ATATGATAGA
121 GAAACGATT TTGTATGTTT CTATGATTCA GGAGGATCTA ATCCAAATGA CTTTGTATCAC
181 TAGATATGA TTTTCTACPA TAGACATATG GATATTTCTG TCACATTTT COTGGATTAAT
241 TCTAGCTTAT CTATGAAAAA TCCAGATATG GATATTTCTG TCACATTTT COTGGATTAAT
301 TAGCAGATTA CTTGAGGATG TATAACGATA GAAGTCAATC AGCTGTATGA ATCCAAATGA
361 GGTATGTTTA CTGTTTGGTT TAGACATATG TCGTGTCTCC ATCCCTCTAA GACTATGTGA
421 GGGATAGAAA AGACATATAT CATTATTTAAG TTTTGTAGCCG ATAAAAAAAT GAACTATGTGA
481 AGATCTATAT TTTTCAACGG TGACAAGATG GAATTTAAGG TGAAGAATTC AAGCAATGTA
541 GGATATCAAG AATATAAAAA AATGGAAGAG TGGTGTGGTA AAATATATAA CATTTTAGCT
601 GATTAATAAT CAACAGCTGT AAATAGTATA ATAGATAGT AAATGGATA ATTTTATATA
661 CGAGATATCG TCAAGATATG TAAACCTAT AGCAGATATA GAACCTCCAG ATTCTAAAGT
721 ACAATATAT TAGATATATA TATCTTTTAA TTTTCTGACG TTATATATAT GTAATAAAAA
781 TTTATTTGCG AAACCCGATA ATCTTTTGGT AGATGTTTCT AATCTTTTGC TGTCTTTAAA
841 CTCAATTTCCG TATGAAATCT TGTGTATATA TGATTTATCA AGAATATATA GCGCTTAA
901 TCCGATATAT GATGTTTAT TTTTACCCGT AGGTGGTTTG TAGGAAGAAG AGATGTATTA
961 CCCATTTACC AATATATCAT AAAAATAATA AGAAGTATCA ATCAAGAAGT AATAGAAAAC
1021 ATATTATAGA ATATTATAT CTATACCCGT ATTTATGGAG ATAACTATC ATATGAAAAC
1081 GACCGATTAA ACAGAGTATC TATAAACAGA CATTCTATTG TAGGAGCTAG CATTGTAGTA
1141 CCTATATGCG TTGTTTCTTT TTTATCTTTT GACCTGAAA ATAAATATC ATCTGTATTA
1201 TATGCTGGTA GATACAGA GAGACATTCG GGTGTATCTT ATGTAGTTGA TAGAGAGGAT
1261 ATGATATAAG TAATTAACAG AATATATCTT TACTGTATCT TATTTATCTT AATACCTTAA
1321 GATATGTGTA CGTTTCAATC TACTCTCTCA GCTAATCACA GTAAAAATTT TTTGAGATTT
1381 CCCATTAATC ATTGCAATAC CTATATGGAG ATAGTTCACG ACTTTGAGTT TTTGAGATTT
1441 GATTAATATCA TATGCAATCT ATCTCTTTT TCTCTAACA TCTCTAATC TTTGAGATTT
1501 ATAACTAATC TACTGTATGA TATACCTATT ACTTGTGCAT CAATAAAGC ATATAGAAAT
1561 GTTACACATA TAGATGATA AAAATATATA TTATCGTAAA GGATATAATTT
1621 CTATGAAATA CTATTCTTCA CGGTACATTT AAAAAGGA ATATAGTCAG AAACAGGAAA
1681 TATATCTTCA CTATACATG GTCTAATTTT GAATGTCCGA CGTTAGGAGA CGTTAGTCTT
1741 TCTTCACTA ATACCTCTCA TCTCTCTCT CTTCACTACA GTGCTCACTT TCTTCTCTCT
1801 TTTATGATAG CATATATAAT GAACATACT AGAGTATCTT TTAGACGTTA GTAGATACGT
1861 GTTATAGTAT TAGTATATG CATATCTGGT TTTCTACTAA TATGTGATAT GATACCTCTT
1921 GTATATTTAT CAGTTATTTAG ATCTGCTCTC GTAGGAGGGA AAATATTAAG ATTTATGGAG
1981 GTATTCTCTA GTATTCTCTT ATCTGCTCTC TTTATACAGC TTTATATAGG ATTTATAGG
2041 AATATCTAAG TGAATAATAA TAAATATATA TAGTATTTGT AATAAGTACT AATAGTACTT
2101 AAAAACCCGG TCCGAGATA AAAATATCTG GTCAGCTCTT CTCTAGTCTT CACTGAGGTT
2161 GGTATCTTCA CTCTCCAGAG CGGTGGGTTCT CTCAGCACA CACTCTCTCT COTCTGGGGT
2221 AATCTCTCT CTCTCCAGAG CAGGTGCTCA GCTTGCAGAG CAGGTGCTCT COTCTGGGGT
2281 CTGAGCAGC TCTCTCTCT CTTCACTACA GTGCTCACTT TCTTCTCTCT CACTGTTCTC
2341 AGCCAAATC ATCTAGGACA GAGGATATCT CGGAGTCTG GGGGATCTG GGGGATCTG
2401 GAGCAATCA GAGGAGCTGA CAGCAAGCTG TCTGCTAAAG TAGCTTACAA TAGCTCTCTC
2461 CTATCTGAC TCTCCGCGCA TGGCCGCTAG GTCATCCACA CTAGGAGAGC AGACTCTCAG
2521 AGGATCGGCC CCCATCTGCT ACTGGGCAAA GACCTTCTAT CAGATCTCTT CAGTCTGGCG
2581 CTCTATATCA CTGATAAATC AGGCTTGTGT TATCAGAGGC CGCTTGGCCA GCATCAATC
2641 AGTCTCTCTA AAGCATATG AGCAGCAGC CCGACAGAA TCATTAAGA GAGAGATGCC
2701 CCGTATCATG CTGATCATAC AAGGCTCACT AGTGACCTTG TACTCTATCA CATTTGTTTC
2761 CACATCTGTA GTAGGATATC CATATAATAT GTGATCAATG TGCTGTCTCT TCTGTCTCT
2821 CTCTCTGTA CATATATATA TATATATCTT GTTAAAGC CTGATGAGC TCTGAGGAG
2881 CTGAGGCAAG TCTGCAAGT CGCCCATGCG CTGATGAGC TCTGAGGAG TCTGAGGAG
2941 GGTCTGAGTT TGTGTAAGA ACTCTATAT CTCTGAGC TATATACATA TCTTTCTCT
3001 AAGTCTATCT TTTTATGACG GGGCTTTAGC CTGCACTGCA CCCCCAATC GTTTAGCGG
3061 GCGCTTCTCT ACATCATGCA GCGCTTTAAT ACAGCTGCTC CACTCTCTCT GCTTATCTCT

【図 6 6 B】

3121 AGGTACAATG TAGTCTCAT ACATGCTCTG CATATGTAGC CCAATACACT TCACTCTCTC
3181 GAAAGGCTCA TGAAGCTTAT CTAAGATATC TCAAGATATC TCCCATCATC CTCCATCATC
3241 ATTAAGGCTG CCAAGTAAAT TCTCTTCCGT CTGGGTATAT TTTTCTAGCA TGTGCTCTT
3301 GATTCTATG CCAACATATG CCACTGGAAC CTTAATCTCT TTTATATAGA TACACACACC
3361 ACAGATATCG CGATAATGAA ATAAATTTATG ATTATTTCTG CTTTCAATG TATACATATC
3421 CCAAGAAACC TTTGTATTTA TTTTCACTTT TTAGTATATG AATTAAGAAG GTATCTCTT
3481 TTTCTTATAC TAAAAAAGTG AAAATAAATA CAAAGGTTCT TGAAGGTTCT TGTATCTTAA
3541 AAGCGAGAAA TAATCATATA TTTATTTTAT ATCCGATATG CCGTAAAGTT TGTATCTTAA
3601 TGTGCGCGCC CCGCGATTGC GCGCTTCTCT TCTCACTCTG ACCGTTGGGA CCGTCTGGGT
3661 GTTGCTCTCT GCTGCGCATC GTTCTCTCAG CCACCGCTAG CCGTCTCTCT ACCGTCGGCG
3721 AGAAAGTTCC CGCGGAGTGC CCGGAGCTAA CGGCTCGATG CCGTCTGGGT GAGGTGTTTC
3781 ASGGTGACA GTATGAAAT TGGCTGCGCC CCGTGGTGA TGTATACAGA CGGATGCTTC
3841 CGCTATCGCA ACTTATCTCT TACCGTCCCG TACCGTCCCG TACCGTCCCG TACCGTCCCG
3901 TGGAGGATGC TTTCTCTGAG ACTCTGCGCC TCGCTACAAA CAATCCGGAT CAATGCGGG
3961 CTTTGTGAGC GCTGTTGAGC TCGGACACAG CCGCGCGCTG GATGACGGTG ATGCGCGCTG
4021 ACAGGAGTGC CCGCGATGCG TCGCGCGCGC TGTACACGTC TGTACACGTC GTGCTGGGT
4081 GCTACGAGCT CAGCGAGCTG TCAATCGGCG CGACGATCTT CACGGAACAC GTGTTAGCTG
4141 TCGAGTGGGT GCGACCGTCT CTTCTTAAAG TGGTGGTGGC CATACGCAAC GAGGCAACGC
4201 GTACACACCC CGCGTGGCT CTGCGCGGTA GCACCGCTGC CGCGCGCGAG GGCATCACGC
4261 TCTTTTACG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG
4321 CGCTGCTGAG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG CCGCTGCTG
4381 GGTGCACTCT CCGCGCTGAG TCGCGCTGAG TCGCGCTGAG TCGCGCTGAG TCGCGCTGAG
4441 TATGATCTCT CCGAGTACAG CCACTGATAG CCACTGATAG CCACTGATAG CCACTGATAG
4501 CGTATCAAT ACTTGTACGT ACAATATATG TAGAATAAT TGTCTAGTAT TGTCTAGTAT
4561 CAGTATGTA AAAAATAAAA TTTGATATA TTTGATATA TTTGATATA TTTGATATA
4621 CAAATGGAT TTAGATATA AATCTTGAAG AAGTATTTAC AATATATGGA AATATATGGA
4681 TTTATGACA GGTATATAAT AAGATATATC TTTATGATTT GTTACTGAGA AACTGCTTTT
4741 TTTTCTATC TTTTCTATC TTTTCTATC TTTTCTATC TTTTCTATC TTTTCTATC
4801 AATGATAT TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
4861 AATGATAT TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
4921 AATGATAT TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
4981 GAGGCTGAG CAGTACGCTG CAGTACGCTG CAGTACGCTG CAGTACGCTG CAGTACGCTG
5041 AGAATGACA AAAAGGTTAT GTACTAAAAA TTTTAAATAT TTTTAAATAT TTTTAAATAT
5101 AATGATAT TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
5161 TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
5221 TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC TTTTATATC
5281 TATATATAT CAGATTTATG AA

【図 6 7】

1 ATGCGGCGAG GCGTCCGCTC CTACCTCATC GTCTCTCGCG TCTGTCTCTT CAGCCACCTA
61 GTTTCGCTCA CAGTACGCGC CTGAGAGGCT TCTCTGCGTG TCCGAGGAAA TTTTCACTT
121 CTGCTCAACA CCTACGGGAG ACCCATCCGC GTACAGGAAA CCGCTGCTCT TTTTCACTT
181 TAGCAATAGA CTTCAATAGA CAGCAGGCTG GTACAGGAAA CCGCTGCTCT TTTTCACTT
241 CTGCAAGGCT AGTATCAATA CTATGATATC CATATGCTCT GATGCTCTCT TTTTCACTT
301 TCGCGGAGCG AATTTCTGAA CAGGTATAGT CTGACGGAAG CCGCTGCTCT TTTTCACTT
361 AGACTTAAAG CTTAGCGGCT GGTATGCAAA GACCTGGCCA CCGTACGCTG TTTTTCGCA
421 CAGCTAAAGG CACAGGACAG CATTAGGTTA CAGTGGGAAA CCGTGGCAAC CCGTATGAG
481 CTGCTCAATG CTCAGCTTTG GATGCGACCG CAACCAACTC CACAGCGGCT CTTTATGCTT
541 CAGTACACT CAGGATACA CCGACCAAC TTTTACGAC AAGCTCTTTA CCGTCTGCTT
601 CAGATCTAT TATTGACAG CTCTCAACTC GTTTCGACC GAGGACTCTT TCTGATGCTT
661 GAATCTGCTT ACCTTAAAT ACATCTGACC GAGGACTCTT TCTGATGCTT CTTTAAAGT
721 CAGCAGACA CACCTATGCT GCTTATCTTC GGCATCTCT CAGCGCTATC CTTTAAAGT
781 CCGTATCAAC CGCACTACT TATATCTAGA CAACCTGAAA AACACAGGCT CCGTGGTCTT
841 GTTAAAGAG AACCTATGCT CCGTCACTCT TATCTCAAG ACCCGGACTT TCTTACGCTC
901 GCACTTGACT TCAACTACTT GGCCTGCTG CAGTACTATC GTAACAGCTT TCAAGGTTAT
961 CCGTGGAGT TACTCACTG CAGTCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
1021 GCGTCTGCTT ACCTATGCTG ACTGTTCTGA CCGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
1081 CTCTCGCTCT CAGGCTGCTG AGCAGCTGAG ACCACGCTG TCGTGTATCA CAGGCTGCTG
1141 ATGCTCTGCT TCTCAATAC CACACCAAG CAGCACTGCT TCTGATGCTT CAGGCTGCTG
1201 GAGCTGGCCA AACGAGGCTT TTTGACAGC AATCAGATCA CCGATCTATC CAGGCTGCTG
1261 CCGCTGTGCT ACATCTCTCT TAAACAGAA TCTATCCCTA TCTATCCCTA CAGGCTGCTG
1321 CAGCAGCTCG CCGATCTTGC CTTAAACTA CACAAAAGC ACCTGGCTCT TTTTCTTTA
1381 GCGCTTGGCG TCTCAAGATC CTTACTCATG GCGAGCTGCT TCTGATGCTT CTTTAAAGT
1441 ACAGCGGAGA GAGCGGAAAT CTTCATCTG TAAACAGAA TCTACTCATG GAGGCTGCTT
1501 TCACTCTTA CCGAGTGTCT AGCTCACTG CAGCAGGCT CAGCAGGCT CAGCAGGCT
1561 CCGTGTGCT CAGGCTGCTG AGCAGCTGAG CCGCTGCTG TCTGATGCTT CAGGCTGCTG
1621 AGTGGCAGC CCGCCTATC CCGTCTGCTG TGTCTGCTG TGTCTGCTG TGTCTGCTG
1681 AGCAGCTGAG AATCTTTCCC GAGCTCTGCT GGTCTGCTG TGTCTGCTG TGTCTGCTG
1741 CTGACGCTCT CCGACAGCT CAGTATGCTG TTAACAAAC AGTACCTGAT CAAAGGATC
1801 TCTACGCTCT TCTACAGCT CAGAGCTGAG TCTATCCACA TCTATCCACA CAGGCTGCTG
1861 CAACTTAAT CCGAACTGAG CCGCACTGAG CATACACAC CAGCAGCTG CAGGCTGCTG
1921 AATCTTAACT GAGAACTGAG CGGCTTTGCG TACTAGAATA CAGCAGCTG CAGGCTGCTG
1981 CAGGCTGCT TCAACATCAT GTACATCTG GACTCTGAG AGCTCTGCT CCGCTGCTG
2041 CCGTCAAGC AAGTGGTGT CTAATCTGCG CCACTCACT ACCTCTGCT TTTTAAAGT
2101 GGTACGCTCT TAGAATTAAC TGAAGCTGCT GTGAGCTG CCGCAGCTG T

【図 6 8 A】

1 AAGTCTGCGC CCGCTCATTA GACAAGCGAA TGAGGAGACA AAACGTGGAG GAGGTATTAA
61 GTTGGGAGAA ATGGAGAGAG ACTGTTTAAAT TGAAGCTTAA TCAATCTTAA CTATTACAGA
121 AGTTTGTAAA GATTCCGAGG AAGATTATCA AGATGCTTAT GTTCTGCTG TTTTGGAGA
181 CATTAGCAGA CAAATCAAGG GTATTATATC ATGTCTCTGA GTTCTCAAA TTTATCTCTT
241 TCTCTCTTAA ACAAAATTTG ATACCAGCA CGTATCTTAA GTATTCTTA CTCTAAATGA
301 CCGCAGAGCG GTAAAAGTCA AATTAGATT TCGAACGATG CCGCTCTCTG TTTTAAACAG
361 AATTAGTAAA GTTGTATCTA AGCCGCTCTT TCTGGTGTAA TAAAATTTAA TTTATATCTA
421 GAGATATAAA TCAACAGACT CCGATAGGCT TCGAGGAGAG TGAGGAGGAG ACTTCTGTTT
481 CAAATGAGAA AGCAGTATGAG TCGCGGAGAG TGAGGAGGAG ACTTCTGTTT TTTATGAGC
541 AGGATCCAG GCGGAGAAAG ACCTGATCTG TTTGGCAAAA GCGCGAGTCT TTTATGAGC
601 TCTGGTGTCT GTGCTATCTT AGTAGGCGCG TTTGGCAAAA GCGCGAGTCT TTTATGAGC
661 TGTGAGGCG CCGCTGTGAT GTGCTGTGAG TATGCTATG TCGGCTGAGT GCGCTGAGT
721 TTTGATGCT CCGCTGTGAG ATGATGAGG CCGTGGCTG TCTGGCTGAG TCGGCTGAGT
781 AGGAGTATC TTTGATCAG TACTGTTTGT TTAGCAGATA ACTGAGGTT TCGGAGAGG
841 TAGAGCGGGA GAGGATTTCG CCGGAGGAGA TCGGAGGAGA ACTGAGGTT TCGGAGAGG
901 CATGATGCT CAGTGTAGAT AGGATGAGAG GCGCGGCGAG AACGAGTATG GCGAGGAGG
961 CATGCTGCT CAGGCTGCTG AGCAGTCTG CCGAGTCTG CCGAGTCTG CCGAGTCTG
1021 AGGTTGTGTA CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
1081 GTGATGCTG GCGTAAATGA CAGGAGCGCG TTTCTACAT TATGAGTCT TCGGAGGAG
1141 TGTATGATG TACATGAGG TCGAGGAGG TCGGAGGAG TCGGAGGAG TCGGAGGAG
1201 AGGCTGAGAG AAAAGAGGCG AGGTCGCTT TGTGATGTT TTAGGCAAG TCGGAGGAG
1261 CTGCTGATG CCACTGGGCG ATGATAGTGT GCTGATCTG TCGGAGGAG TCGGAGGAG
1321 GCGCTGAGAG CCGTGTGATG TCGGATCTG TCGGATCTG TCGGATCTG TCGGATCTG
1381 TCTGAGGAT CAGGAGGATG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
1441 TACTATAAA TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT
1501 AGACTTGGG CCGGCTGCT TCTGCTGCT TCTGCTGCT TCTGCTGCT TCTGCTGCT
1561 AGGCTATTC TACCGTGGCG CCGTGGGCTG TCGGCTGCT TCGGCTGCT TCGGCTGCT
1621 CCGGCTAAG GTGAAAGCTG TTAGTATGTA GTGCGCTGAG GTCCAGGATG TTTGATCTA
1681 TCGGCGCTG AAGAAAGTCT GCGCTTTTGA GATAAGAGT AGCGTCTAG TGTCTCTCT
1741 TAACTAGAC CAGGAGCTG TGTGTTTGA TTTGCTGTA TATTAAGTGT TCGGCTGCT
1801 AGGCTGCTT AAGAGTATG CAGGAGGAT CCGTGGCTG CCGTGGCTG CCGTGGCTG
1861 CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT
1921 GTCTGCTGAT GAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT CAGGTAAGT
1981 GTCTGCTGAT TGTCTGAGG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
2041 CAGGCTCAAT GGGTGGTGG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG CAGGCTGCTG
2101 GCTGCTGCA AAAAGATGCG TAGCTGGCA GGTCTTGA TACGAGGCT TAACTGCTG
2161 GTCTCTGCT GATCTTTTCC AGGTTTCCG TCGATCTAC TCGATCTAC TCGATCTAC
2221 GTCTCTGCT CCGAAAGGA CATCGAGCA TATGGAATAT TATGGAATAT TATGGAATAT
2281 CAGAGGAGC CCGAAAGGA CATCGAGCA TATGGAATAT TATGGAATAT TATGGAATAT
2341 GAAAGAGT GATCTGCTG TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT
2401 TGTAGTACA TCTGAGTAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT
2461 GAGTATGAGT AAACGCTTGT TCGAGGCTG TCGAGGCTG TCGAGGCTG TCGAGGCTG
2521 AAAGTATGAGT GTGAGGAGA CAGAGGCTG CAGAGGCTG CAGAGGCTG CAGAGGCTG
2581 GCAATTTATA TTTGATTTAT ATATTTTCAA TTTTGAATCT CAAATATAT ATCATATCT
2641 ATATCTGCA TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT
2701 ATATCTGCA TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT TATCTGCTT
2761 GAAAGAGT GATCTGCTG TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT TTTTCTGAT
2821 CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT
2881 CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT CAGGAGGCT
2941 TAAAGGCTG AGCTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3001 GCGGCTGCT GATGTTTAC AGAGGCTG CCGGCTGCT CCACTTAT TGTGCTGCT
3061 CCGTATGCTG GAGGCGGCG AACTCTGCTG TGTGCTGCT TGTGCTGCT TGTGCTGCT

【図 68 B】

```

3121 CCCTGCTGTA CAACAATCCG GATCAATTGC GGGCCTTGCT GACGCTGTTG AGCTCGGACA
3181 CAGCGCCGCG CTGGATGACG GTGATGCGCG GTTACAGCGA GTGCGGGGAT GGCTCGCCGG
3241 CCGGTACACG GTGCGTGGAC GACCTGTGCG GCGGCTACGA CCTCAGCGCA CTGTCATACG
3301 GCGCGAGCAT CTTCACGGAA CAGCTGTAG GCTTCGAGCT GGTGCCACCG TCTCTCTTTA
3361 ACCTGGTGGT GGCCATACGC AACGAAGCCA CGCGTACCAA CGCGCGCGTG CGTCTGCCCC
3421 TGAGCACCGC TGCCGCGCCC GAGGGCATCA CGCTCTTTTA CGGCTGTGAC AACGCAATGA
3481 AGGAATTCTG CCTGCGTCAC CAGCTGGACC CGCGGCTGCT ACGCCACCTA GATAAATACT
3541 ACGCGGACT GCGCGCCGAG CTGAAGCAGA CGCGGCTCAA CCTGCCGGCT CACTCGCGCT
3601 ATGGCCCTCA AGCAGTGGAT GCTCGCTAAT TTTTATAGAT CCCCAGGAA TOGATTGCGG
3661 ATAGCTGATT AGTTTTTGTT AACAAAAATG TGGGAGAATC TAATTAGTTT TTCTTTACAC
3721 AATTGACGTA CATGAGTCTG AGTTCCTTGT TTTTGCTAAT TATTTTCATC AATTATTAT
3781 TCTTGACGAT ATCAGATCT TTTGTATAGG AGTCAGACTT GTATTCAACA TGCTTTCTTA
3841 TAATCATCTT AGTTATTTCG GCATCATCCA ATAGTACATT TTCCAGATTA ACAGATAGA
3901 TAATTAATGTC GTATTGAAAC AGAGCCTGTA ACATCTCAAT GTCTTTATTA TCTATAGCCA
3961 ATTTAATGTC CGGAATGAAG AGAAGGGAAT TATTGGTGTG TGTGACGTC ATATAGTCGA
4021 GCAAGAGAAT CATCATATCC ACGTGTCCAT TTTTATAGT GGTGTGAATA CAACTAAGGA
4081 GAATAGCCAG ATCAAAAGTA GATGGTATTT CTGAAAGAAA GTATGATACA ATACTTACAT
4141 CATTAGCAT GACGGCATGA TAAATGAAG TTTTCCATCC AGTTTTCCCA TAGAACATCA
4201 GTCTCCAAAT TTTCTTAAAC AGTTTCACCG TTTGCTGTT ACCACTATCA ACCGCTAAT
4261 ACAATGCGGT GTTTCCTTTG TCATCAAAAT GTGAATCATC CATTCACATG AATAGCAAAA
4321 TCTTTACTAT TTTGCTATCT TCTAATGTGG CTGCTGATG TAATGAAAT TCATTTCTTA
4381 GAAGATTTTT CAATGCTCCA CGGTCTCAAC ACGTACATAC TAGACCGACG TTATTATCAG
4441 CTATTGCATA ATACAAGGCA CTATGTCCAT GGCATCCGC CTTAAATGTA TCTTTACTAG
4501 AGAGAAAGCT TTTAGCTGCG TTAGACTTCC AAGTATTAAT TCGTGACAGA TCCATGTCTG
4561 AAACGAGACG CTAATTAGTG TATATTTTTT CATTTTTTAT AATTTTGTCA TATTGCACCA
4621 GAATTAATAA TATCTCTAAT AGATCTAATT TAATTTAATT TATATAACTT ATTTTTTGAA
4681 TATACTTTTA ATTAACAAAA GAGTTAAGTT ACTCATATGG ACGCGGTCCA GTCTGAACAT
4741 CAATCTTTTT AGCCAGAGAT ATCATAGCCG CTCTTAGAGT TTCAGCGTGA TTTTCCAAAC
4801 TAATAGAAC TTCAATCGTTG CGTTTACAAC ACTTTTCTAT TTGTTCAAAC TTTGTGTTA
4861 CATTAGTAAT CTTTTTTTCC AATTAAGTTA GCGGTGTTT GAGAGTTTCC TCATTGTGCT
4921 CTTATCGGCG TTTAACAATT GCTTCGCTT TAGCCTCCTG GCTGTTCTTA TCAGCCTTTG
4981 TAGAAAAAAA TTAGTTGCTT GGAATTGCAA GATCCTCATC TCCGGGGAAA AGAGTTCCGT
5041 CCATTTAAAG CCGCGGAAT TC

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 7/04 (2006.01) C 1 2 N 7/04
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C

(72)発明者 ピンカス, スティーヴン イー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 2 0 6 1 イースト グレンブッシュ トロイ ロード 7
8

(72)発明者 コックス, ウィリアム アイ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 2 1 8 0 トロイ パインウッズ アヴェニュー 5 1 9

(72)発明者 カウフマン, エリザベス ケー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 2 0 1 8 アヴェリル パーク カヒューガ コート 3 3

審査官 坦ケ 隆幸

(56)参考文献 特表平06-505874 (JP, A)
特表平03-503478 (JP, A)
特表昭63-502722 (JP, A)
国際公開第94/023744 (WO, A1)
Vaccine, 1991, vol.9, p.631-637
Journal of Virology, 1991, vol.65, p.3641-3646
Journal of General Virology, 1992, vol.73, p.437-442

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
Science Direct