

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3754457号
(P3754457)

(45) 発行日 平成18年3月15日(2006.3.15)

(24) 登録日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 135 (全 130 頁)

(21) 出願番号	特願平9-538116	(73) 特許権者	591173486
(86) (22) 出願日	平成9年4月10日(1997.4.10)		ザ・バイオロジカル・リサーチ・センター
(65) 公表番号	特表2000-508177 (P2000-508177A)		・オブ・ザ・ハンガリアン・アカデミー・
(43) 公表日	平成12年7月4日(2000.7.4)		オブ・サイエンス
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/005911		THE BIOLOGICAL RESE
(87) 国際公開番号	W01997/040183		ARCH CENTER OF THE
(87) 国際公開日	平成9年10月30日(1997.10.30)		HUNGARIAN ACADEMY O
審査請求日	平成13年6月7日(2001.6.7)		F SCIENCES
(31) 優先権主張番号	629, 822		ハンガリー人民共和国ホー-6701, セ
(32) 優先日	平成8年4月10日(1996.4.10)		ゲド, ペー・オー・ボックス 521
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	682, 080		
(32) 優先日	平成8年7月15日(1996.7.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工染色体、該染色体の使用および人工染色体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

選択可能マーカーを含む1つまたは複数のDNAフラグメントを哺乳動物または鳥類細胞に導入する段階と、

前記1つまたは複数のDNAフラグメントをゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

サテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階と

を含んで成る、ここでサテライト人工染色体は真正染色質よりも異質染色質を多く含むものである、サテライト人工染色体の製造方法。

【請求項2】

1つまたは複数のDNAフラグメントを細胞の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍に導入することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

増幅可能領域がrDNAからなることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

増幅可能領域が異質染色質からなることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項5】

細胞の染色体の挟動原体異質染色質にDNAを導入することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】

10

20

細胞が哺乳動物の細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

更に、サテライト人工染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

1 つまたは複数の DNA フラグメントが、当該フラグメントを染色体の異質染色質領域にターゲットするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ターゲッティングヌクレオチド配列がサテライト DNA からなることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。 10

【請求項 10】

細胞がヒトの細胞であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

細胞が、齧歯類の細胞であることを特徴とする請求項 1 から 5 及び 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

1 つまたは複数の DNA フラグメントが導入される細胞が EC 3 / 7 細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

1 つまたは複数の DNA フラグメントが導入される細胞がマウス染色体またはヒト染色体を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 14】

更に、遺伝子産物をコードする DNA を導入する段階を含んでおり、この遺伝子産物をコードする DNA は選択可能マーカを含むフラグメントに存在するかまたは第二の DNA フラグメントに存在し、得られるサテライト人工染色体が遺伝子産物をコードする異種 DNA を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

サテライト人工染色体がメガ染色体であり、ここでメガ染色体が、2 個の反転メガレプリコンを有するアンプリコンを含む、50 Mb ~ 400 Mb からなるサテライト人工染色体 30 であり、メガレプリコンが反復異質染色質 DNA 単位を含むものであり、方法が更に、断片化用ベクターを導入し、これによって細胞内のメガ染色体のサイズを小さくする段階と、

15 ~ 60 Mb のサイズのサテライト人工染色体を含む細胞を同定する段階とを含むことを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

サテライト人工染色体がメガ染色体であり、ここでメガ染色体が、2 個の反転メガレプリコンを有するアンプリコンを含む、50 Mb ~ 400 Mb からなるサテライト人工染色体 40 であり、メガレプリコンが反復異質染色質 DNA 単位を含むものであり、方法が、末端切断されたメガ染色体を含む細胞が産生される条件を細胞に作用させる段階を更に含むことを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記条件が、X 線照射と、染色体内部の塩基対合を不安定化する物質の存在下の増殖とから選択されることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記物質がプロモデオキシウリジンであることを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

更に、15 ~ 60 Mb からなるサテライト人工染色体を含んでいる細胞を選択する段階を含むことを特徴とする請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

細胞からサテライト人工染色体を単離する段階を更に含むことを特徴とする請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

単離が、

中期染色体を単離し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を識別し、

内因性染色体からサテライト人工染色体を分離することによって行われることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

DNA 配列特異的染料で染色体を染色することによってサテライト人工染色体を内因性染色体から識別し、フローセルソーターによって分離することを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

請求項 13 に記載の方法によって得られ、マウス動原体またはヒト動原体を含むサテライト人工染色体。

【請求項 24】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法によって製造されるサテライト人工染色体。

【請求項 25】

実質的に純粋な単離された、15 Mb またはそれより大きくかつ真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物または鳥類サテライト人工染色体。

20

【請求項 26】

マウスまたはヒトのサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 27】

500 Mb ～ 1000 Mb からなることを特徴とする請求項 24 または 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 28】

50 ～ 450 Mb からなるメガ染色体であることを特徴とする請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

30

【請求項 29】

250 ～ 400 Mb からなることを特徴とする請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 30】

150 ～ 200 Mb からなることを特徴とする請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 31】

15 ～ 60 Mb からなることを特徴とする請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 32】

10 ～ 60 Mb からなることを特徴とする請求項 25 に記載の実質的に純粋な単離されたサテライト人工染色体。

40

【請求項 33】

配列番号 18 から 24 のいずれかで示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項 24 または 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 34】

G3D5 細胞系または H1D3 細胞系の細胞から単離されたものであることを特徴とする、請求項 25 に記載のサテライト人工染色体。

【請求項 35】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法によって製造されるサテライト人工染色体を含む細胞。

50

【請求項 3 6】

請求項 2 4 から 3 4 のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を含む細胞。

【請求項 3 7】

哺乳動物の細胞であることを特徴とする請求項 3 5 または 3 6 に記載の細胞。

【請求項 3 8】

人工染色体が 1 0 ～ 6 0 M b からなるサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項 3 5 から 3 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 9】

染色体を不安定化する物質の存在下で T F 1 0 0 4 G 1 9 C 5 または 1 9 C 5 x H a 4 細胞系（それぞれ、受託番号 9 6 0 4 0 9 2 6 または 9 6 0 4 0 9 2 7 で E C A C C に寄託されている）の細胞を増殖させる段階と、

サテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階と

を含んで成る、ここでサテライト人工染色体は真正染色質よりも異質染色質を多く含むものである、サテライト人工染色体の製造方法。

10

【請求項 4 0】

選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の D N A フラグメントを哺乳動物または鳥類細胞に導入する段階と、

前記 1 つまたは複数の D N A フラグメントをそのゲノム D N A に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から新規な動原体を含む二動原体型染色体を有する細胞を選択する段階と、
真正染色質よりも異質染色質を多く含むサテライト人工染色体が産生される条件下で細胞を増殖させる段階と

20

を含んで成るサテライト人工染色体の製造方法。

【請求項 4 1】

選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の D N A フラグメントを哺乳動物または鳥類細胞に導入する段階と、

前記 1 つまたは複数の D N A フラグメントをそのゲノム D N A に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、

増殖した細胞から新規な動原体を含む二動原体型染色体を有する細胞を選択する段階と、
二動原体型染色体が分裂して元二動原体型染色体を産生する細胞を産生するために細胞を増殖させる段階と、

30

元二動原体型染色体を有する細胞を選択する段階と、

ソーセージ型染色体が産生される条件下で細胞を増殖させる段階と

を含んで成る、ここでソーセージ型染色体が増幅された異質染色質および真正染色質腕を含む、人工染色体の製造方法。

【請求項 4 2】

1 つまたは複数の D N A フラグメントを細胞内の染色体の増殖可能領域の内部またはその近傍に導入することを特徴とする請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

増幅可能領域が r D N A からなることを特徴とする請求項 4 2 に記載の方法。

40

【請求項 4 4】

増幅可能領域が異質染色質からなることを特徴とする請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

D N A を細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項 4 0 または 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

更に、

サテライト人工染色体にターゲットされる断片化用ベクターを導入する段階と、細胞を増殖させる段階と、断片化用ベクターが導入された細胞のサテライト人工染色体よりも小さいサテライト人工染色体を含む細胞を選択する段階とを含むことを特徴とする請求項 4 0

50

に記載の方法。

【請求項 47】

選択可能マーカーを含むDNAフラグメントを哺乳動物または鳥類細胞に導入する段階と、
前記DNAフラグメントをそのゲノムDNAに取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、
増殖した細胞から二動原体型染色体を産生した細胞を選択する段階と、
異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞が産生されるような、選択可能マーカーを使用する選択条件下で細胞を増殖させる段階と
を含んで成る人工染色体の製造方法。

10

【請求項 48】

更に、異質染色質アームをもつ染色体を含んでいる細胞を選択する段階と、染色体を不安定化する物質の存在下で前記細胞を増殖させる段階とを含むことを特徴とする請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

更に、50～400Mbの異質染色質染色体を有している細胞を同定する段階を含むことを特徴とする請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

細胞内の染色体の増幅可能領域の内部またはその近傍にDNAフラグメントを導入することを特徴とする請求項 47 から 49 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 51】

増幅可能領域がrDNAからなることを特徴とする請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

増幅可能領域が異質染色質からなることを特徴とする請求項 50 に記載の方法。

【請求項 53】

DNAを細胞の染色体の挟動原体異質染色質に導入することを特徴とする請求項 50 に記載の方法。

【請求項 54】

真正染色質よりも異質染色質を多く含むサテライト人工染色体をヒト以外の哺乳動物または鳥類動物細胞に導入する段階を含んで成る、トランスジェニック非ヒト哺乳動物または鳥類動物の産生方法。

30

【請求項 55】

更に、得られた動物細胞を代理母となる雌動物に導入して発育させ、トランスジェニック動物を得る段階を含むことを特徴とする請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

動物細胞が胚細胞であることを特徴とする請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 57】

胚細胞が幹細胞であることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

胚細胞が胚に存在するものであることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

40

【請求項 59】

動物細胞が受精卵であることを特徴とする請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 60】

幹細胞がマウス幹細胞であることを特徴とする請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】

動物細胞が卵母細胞、接合体または生殖系列細胞であることを特徴とする請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 62】

サテライト人工染色体が、高次の複製単位の2つの反転反復を含む反復DNA増幅単位の配列を含むメガ染色体であり、受託番号96040928及び96040929でECA

50

CCに寄託されている細胞系の同定特性の全部を有する細胞系に由来することを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項63】

細胞が前核にサテライト人工染色体を含むことを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項64】

サテライト人工染色体が請求項1に記載の方法によって得られることを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項65】

サテライト人工染色体が遺伝子産物をコードする異種DNAを含むことを特徴とする請求項54から64のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項66】

サテライト人工染色体が治療用物質をコードする異種DNAを含むことを特徴とする請求項54から64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

遺伝子産物が嚢胞性繊維症膜貫通調節蛋白質、抗HIVリボザイムまたは腫瘍抑制遺伝子であることを特徴とする請求項65に記載の方法。

【請求項68】

抗HIVリボザイムが抗gagリボザイムであり、腫瘍抑制遺伝子がp53であることを特徴とする請求項67に記載の方法。 20

【請求項69】

遺伝子産物が、発現によってトランスジェニック非ヒト動物中の病原体に対する免疫防御応答を誘発する抗原を含むことを特徴とする請求項65に記載の方法。

【請求項70】

遺伝子産物が、発現によって複数の病原体に対する免疫防御応答を誘発する複数の抗原を含むことを特徴とする請求項65に記載の方法。

【請求項71】

トランスジェニック非ヒト動物が哺乳動物であることを特徴とする請求項54から70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項72】

サテライト人工染色体が、細胞融合、キャリア系による脂質仲介転移、微量注入、ミクロセル（微小核体）融合、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクタイル、核転移、衝撃または直接DNA転移によって導入されることを特徴とする請求項54から71のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項73】

サテライト人工染色体が蛋白質と、動物の母乳または動物の卵の内部で遺伝子を発現させる調節要素とを含むことを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項74】

動物が、雌ウシ、ヤギ、雄ウシ、ブタ及びヒツジから選択されることを特徴とする請求項73に記載の方法。 40

【請求項75】

動物が家禽から選択されることを特徴とする請求項73に記載の方法。

【請求項76】

サテライト人工染色体がヒト細胞表面蛋白質発現用遺伝子をコードするDNAを含み、それにより動物の器官がヒト蛋白質を発現し、ヒトに移植されたときに拒絶が生じないことを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項77】

動物が鳥類であることを特徴とする請求項54または55に記載の方法。

【請求項78】

動物が鶏であることを特徴とする請求項77に記載の方法。 50

【請求項 79】

遺伝子産物がホルモン、抗体、サイトカイン、成長因子、調節蛋白質、分泌蛋白質であることを特徴とする請求項 65 に記載の方法。

【請求項 80】

請求項 54 から 70 のいずれか一項に記載の方法によって產生されるトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 81】

哺乳動物であることを特徴とする請求項 80 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 82】

それぞれ受託番号 96040926、96040927、96040929 及び 96040928 で E C A C C に寄託されている T F 1004 G 19 C 5、19 C 5 x H a 4、H 1 D 3 及び G 3 D 5 のいずれかの同定特性を有する細胞系。 10

【請求項 83】

50～400 Mb からなるメガ染色体を含む細胞系であって、メガ染色体が、2 個の反転メガレプリコンを有するアンプリコンを含む、50 Mb～400 Mb からなるサテライト人工染色体であり、メガレプリコンが反復異質染色質 DNA 単位を含むものであり、ここでサテライト人工染色体は真正染色質よりも異質染色質を多く含むものである、ことを特徴とする哺乳動物または鳥類細胞系。

【請求項 84】

メガ染色体が 250～400 Mb からなることを特徴とする請求項 83 に記載の細胞系。 20

【請求項 85】

メガ染色体が 150～200 Mb からなることを特徴とする請求項 83 に記載の細胞系。

【請求項 86】

メガ染色体が 90～120 Mb からなることを特徴とする請求項 83 に記載の細胞系。

【請求項 87】

メガ染色体が 60～100 Mb からなることを特徴とする請求項 83 に記載の細胞系。

【請求項 88】

治療用物質をコードする DNA を含みかつ真正染色質よりも異質染色質を多く含むサテライト人工染色体をターゲット哺乳動物細胞に導入する段階と、

得られたターゲット細胞をヒト以外の哺乳動物宿主動物に導入する段階と

を含んで成る遺伝子治療方法。 30

【請求項 89】

ターゲット細胞が、リンパ球、幹細胞、神経細胞、鶏細胞または筋肉細胞であることを特徴とする請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

異種遺伝子の多数コピーまたは複数の異種遺伝子を含みかつ真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物または鳥類サテライト人工染色体を有する細胞を含んで成る細胞性産生系。

【請求項 91】

異種遺伝子が代謝経路を構成する蛋白質をコードすることを特徴とする請求項 90 に記載の系。 40

【請求項 92】

代謝経路の発現によって產生される物質の発現方法であって、代謝経路を構成する蛋白質が発現されて前記物質を產生する条件下で請求項 91 に記載の系を培養する段階を含んで成る方法。

【請求項 93】

物質がビタミン、ホルモン、ヌクレオチド、アミノ酸、蛋白質またはペプチドであることを特徴とする請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

物質が成長因子、抗体、転写因子、腫瘍抑制蛋白質、酵素、熱ショック蛋白質、受容体、 50

サイトカイン、プロテアーゼ及びホルモンから成る群より選択されることを特徴とする請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 5】

異種遺伝子が選択的条件なしに細胞で発現されることを特徴とする請求項 9 0 に記載の系。

【請求項 9 6】

請求項 2 4 から 3 4 のいずれか一項に記載のサテライト人工染色体を細胞に導入する段階と、1 つまたは複数の遺伝子産物が発現される条件下で細胞を培養する段階とを含んで成る、1 つまたは複数の遺伝子産物の産生方法。

【請求項 9 7】

代謝経路を構成する蛋白質をコードする一連の遺伝子の発現によって遺伝子産物が産生されること、及び、サテライト人工染色体がこれらの遺伝子の各々を含むことを特徴とする請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

選択可能マーカーを含む 1 つまたは複数の DNA フラグメントを哺乳動物または鳥類細胞の染色体の増幅可能領域の内部または近傍に導入する段階と、前記 1 つまたは複数の DNA フラグメントをそのゲノム DNA に取込んだ細胞が産生されるような選択条件下で細胞を増殖させる段階と、真正染色質よりも異質染色質を多く含む人工染色体を有している細胞を選択する段階とを含んで成る人工染色体の製造方法。

【請求項 9 9】

増幅可能領域が r DNA であることを特徴とする請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

更に、人工染色体を単離する段階を含むことを特徴とする請求項 9 8 または 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

請求項 9 8 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法によって産生される人工染色体。

【請求項 1 0 2】

真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物または鳥類サテライト人工染色体を細胞に導入する段階を含むことを特徴とする異種核酸を含む細胞を産生する方法。

【請求項 1 0 3】

細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

サテライト人工染色体が哺乳動物のサテライト人工染色体であることを特徴とする請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

サテライト人工染色体が、直接 DNA 移入または取り込み、エレクトロポレーション、リポフェクション、核微量注入、リポソーム仲介転移、微粒子衝撃、多価カチオン介在転移、ポリエチレングリコール転移及びマイクロセル（微小核体）融合から選択される方法により導入されることを特徴とする請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

細胞が胚細胞であることを特徴とする請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物または鳥類サテライト人工染色体をヒト以外の核ドナー哺乳動物または鳥類細胞に導入する段階と、核ドナー細胞の核をヒト以外の哺乳動物または鳥類の除核受容体細胞に転移する段階とを含んで成る方法。

【請求項 1 0 8】

更に、受容体細胞を母系宿主動物に転移することを含むことを特徴とする請求項 1 0 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 0 9】

更に、転移した細胞を宿主中で動物へ発育させる段階を含むことを特徴とする請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

除核受容体細胞が卵母細胞であることを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

除核受容体細胞が胚幹細胞であることを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

胚幹細胞がマウス胚幹細胞であることを特徴とする請求項 1 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 3】

サテライト人工染色体をドナー細胞の前核に導入することを特徴とする請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

サテライト人工染色体が請求項 1 に記載の方法によって得られることを特徴とする請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

人工染色体が遺伝子産物をコードする異種 DNA を含むことを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 1 6】

人工染色体が遺伝子産物をコードする異種 DNA を含んでおり、発育した動物がその動物の母乳中に遺伝子産物を発現することを特徴とする請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

異種 DNA が動物内でアンチセンス RNA をコードすることを特徴とする請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

宿主が雌牛、ヤギ、マウス、雄牛、ラタダ、ブタ及びヒツジから成る群より選択されることを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

得られる動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 0 9 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 0】

人工染色体が直接取り込み、微量注入、細胞融合、ミクロセル（微小核体）融合、エレクトロポレーション、電気融合、粒子衝撃、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール転移及び脂質介在転移から成る群より選択される方法により核ドナー細胞に導入されることを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

ドナー細胞と受容体細胞とを融合することにより核ドナー細胞の核が受容体細胞に転移することを特徴とする請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

微量注入により核ドナー細胞の核が受容体細胞に転移することを特徴とする請求項 1 0 7 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 3】

遺伝子産物が嚢胞性繊維症膜貫通調節蛋白質、抗 HIV リボザイムまたは腫瘍抑制遺伝子であることを特徴とする請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

抗 HIV リボザイムが抗 gag リボザイムであり、腫瘍抑制遺伝子が p 5 3 であることを特徴とする請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

遺伝子産物が、発現によって（ヒト以外の）トランスジェニック動物中で病原体に対する

50

免疫防御応答を誘発する抗原を含むことを特徴とする請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

遺伝子産物が、発現によって複数の病原体に対する免疫防御応答を誘発する複数の抗原を含むことを特徴とする請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

遺伝子産物がホルモン、抗体、サイトカイン、成長因子、調節蛋白質、または分泌蛋白質であることを特徴とする請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

動物が鳥類であることを特徴とする請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

動物が鶏であることを特徴とする請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

サテライト人工染色体がヒト細胞表面蛋白質発現用遺伝子をコードする DNA を含み、それにより動物の器官がヒト蛋白質を発現し、ヒトに移植されたときに拒絶が生じないことを特徴とする請求項 1 0 7 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

遺伝子治療に有用な組成物の製造のための、真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物サテライト人工染色体の使用。

【請求項 1 3 2】

サテライト人工染色体が請求項 1 に記載の方法によって得られたものであることを特徴とする請求項 1 3 1 に記載の使用。

【請求項 1 3 3】

人工染色体が治療用物質をコードする DNA を含むことを特徴とする請求項 1 3 1 に記載の使用。

【請求項 1 3 4】

治療用物質をコードする DNA が、リンパ球、幹細胞、神経細胞及び筋肉細胞から成る群より選択されるターゲット細胞に導入されることを特徴とする請求項 1 3 3 に記載の使用。

【請求項 1 3 5】

遺伝子治療に使用するための、真正染色質よりも異質染色質を多く含む哺乳動物サテライト人工染色体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

関連出願

米国の国内段階に関して本出願は、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で 1996 年 8 月 7 日に出願された同時係属中の米国特許出願 08/695191 号 (GYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAY) の一部継続出願である。本出願はさらに、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で 1996 年 7 月 15 日に出願された同時係属中の米国特許出願 08/682080 号 (GYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAY) の一部継続出願でもあり、発明の名称「ARTIFICIAL CHROMOSOMES, USES THEREOF AND METHODS FOR PREPARING ARTIFICIAL CHROMOSOMES」で 1996 年 4 月 10 日に
出願された同時係属中の米国特許出願 08/629822 号 (GYULA HADLACZKY および ALADAR SZALAY) の一部継続出願でもある。

国際段階に関しては、これら各出願に対する優先権の恩恵が請求されており、その出願の主題はその全体が、本明細書に組み込まれるものとする。

米国特許出願 08/695191 号は、米国特許出願 08/682080 号の一部継続出願であり、米国特許出願 08/629822 号の一部継続出願でもある、米国特許出願 08/682080 号は、米国特許出願 08/629822 号の一部継続出願である。

本出願は、現在米国特許 5288625 号である米国特許出願 07/759558 号に関係し、1996 年 10 月 21 日出願の米国特許出願 08/734344 号に関係し、19

10

20

30

40

50

95年1月19日出願の認可された米国特許出願08/375271号に関係するものであり、該米国特許出願08/375271号は1993年6月23日出願の米国特許出願08/080097号の継続出願であり、該出願は1992年6月3日出願の米国特許出願07/892487号の継続出願であり、該出願は1990年5月9日出願の米国特許出願07/521073号の継続出願である。

許容される範囲まで、米国特許出願08/734344号、08/695191号、08/682080号、08/629822号、08/375271号、08/080097号、07/892487号および07/521073号ならびに米国特許5288625号のそれぞれの主題は、それに対する引用によって、全体が本明細書に組み込まれるものとする。

10

発明の属する技術分野

本発明は、人工染色体を含む細胞系の製造方法、人工染色体の単離方法、異種DNAの該染色体への標的挿入、特定の細胞および組織への該染色体の導入、ならびに該染色体の単離および大量生産方法に関するものである。さらには、上記方法で使用される細胞系、該方法によって製造される細胞系および染色体も提供される。さらには、人工染色体を使用した、異種蛋白の細胞に基づく製造方法、遺伝子治療および遺伝子導入動物、特には人間以外の遺伝子導入動物の形成方法も提供される。

発明の背景

遺伝子治療および異種核酸の組換え体発現のためのいくつかのウィルスベクター、非ウィルス性導入系および物理的導入系が開発されている（例えば、Mitani et al.(1993)Trends Biotech.11:162-166参照）。しかしながら現在使用できる系には、特に持続的、安定または制御された遺伝子発現が必要な場合に多くの制限がある。その制限には、（1）ウィルスベクターが許容できるDNA挿入物〔遺伝子〕の大きさに、多くて約10キロ塩基〔k B〕程度の制限があるための大きさ上の制限（それに対して、治療上重要と考えられる多くの哺乳動物遺伝子は、特に全ての制御要素が含まれる場合、その限界よりかなり高い）、（2）組み込みの標的を特異的に定めることができないため、ランダムな組み込みが起こって、重要な遺伝子または癌抑制遺伝子を破壊する危険性があること、（3）ランダムに組み込まれた治療遺伝子の発現が、核における機能的区画化によって影響を受けると考えられ、しかも染色質に基づく位置効果によって影響を受けること、（4）コピー数と従ってゲノムに組み込まれる所定の遺伝子の発現を制御できないことなどがある。従って、遺伝子導入における改善と安定な発現系が望まれている（例えば、Mulligan(1993)Science 260:926-932参照）。

20

30

さらに、安全かつ有効なベクターおよび遺伝子治療には、現在使用可能な系では保証されない多くの特徴がなければならない。例えば、安全なベクターは、宿主の遺伝物質において組換えもしくは突然変異によって望ましくない変化を促進し得るDNA要素を含んでいてはならず；ベクターを有する細胞、組織もしくは生物において有害効果を起こす可能性のあるものであってはならず；しかもゲノムの機能を妨害するものであってはならない。さらに、ベクターが非組み込み型であるか、あるいは部位特異的組み込み用であることが有利であると考えられる。さらに、ベクターが有する治療遺伝子のコピー数を制御して安定なものとする必要があり；ベクターは導入される遺伝子の独立かつ制御された機能を確保すべきであり；ベクターは大きい（Mbまで）挿入物を受け入れ、その挿入物の機能的安定性を確保するものでなければならない。

40

しかしながら、既存の遺伝子導入技術の限界があるために、大きい（Mb以上の大きさ）遺伝子および遺伝子複合体を、治療遺伝物質の安全で、制御された、持続的な発現を提供する調節要素とともに転移させるのに好適な別のベクター系の開発が望まれる。

現在、利用可能なベクターでこれらの要件を全て満たすものはない。しかしながら、これらの特徴のほとんどを染色体が有している。そこで人工染色体は、遺伝子治療だけでなく、多くの遺伝子発現の調整を必要とするかまたは大きい遺伝子によってコードされる遺伝子産物の安定で高レベルな制御された生産および他の用途に理想的なベクターであると考えられる。酵母での異種遺伝子の発現のための人工染色体が利用可能であるが、所定の

50

哺乳動物の人工染色体の構築は達成されていない。単離された機能的哺乳動物動原体がなく、その産生および安定複製のための必須条件の解明が不十分であることが、そのような構築の障害となっている。酵母の場合とは異なり、哺乳動物の動原体に非常に近い選択可能な遺伝子はなく、非常に反復性の高い挟動原体異質染色質DNAが長く続くことで、染色体歩行などの現在利用できる方法を用いた哺乳動物動原体の単離が実質的に不可能となる。哺乳動物の人工染色体生産には他の戦略が必要であり、いくつか開発されている。例えば、米国特許5288625号には、人工染色体、すなわち約20～30メガ塩基であるミニ染色体を含む細胞系が提供されている。しかしながら、その染色体の単離に用いられている方法では、わずかに約10～20%の純度のものしか得られない。そこで、別の人工染色体の開発および単離・精製方法の完成、ならびにより多用途な染色体の開発およびミニ染色体のさらなる特性決定が、この技術の可能性を実現する上で必要である。

従って本発明の目的は、哺乳動物の人工染色体ならびに外来DNAをそのような染色体に導入する方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、当該染色体の単離・精製方法を提供することにある。本発明の目的はさらに、特定の細胞に哺乳動物の人工染色体を導入する方法を提供すること、ならびにそうして得られる細胞と、人工染色体を含む遺伝子導入の人間以外の動物、鳥、魚および植物を提供することにある。本発明の目的はさらに、人工染色体を用いる遺伝子療法および遺伝子産物の発現方法を提供することにある。本発明の目的はさらに、生物特異的な人工染色体を新規に（デノボ）構築する方法を提供することにある。本発明のさらに別の目的は、デノボ哺乳動物人工染色体を形成する方法を提供することにある。

発明の概要

哺乳動物人工染色体[MAC]が提供される。MACおよび本発明の方法を用いて製造される昆虫、鳥、ニワトリおよび魚などの他の高等真核生物についての人工染色体も提供される。そのような染色体の形成方法および単離方法も提供される。昆虫、鳥、ニワトリおよび魚類などの他の動物から、MACを用いて人工染色体を構築する方法も提供される。人工染色体は、十分機能的に安定な染色体である。2種類の人工染色体が提供される。1種類は、本明細書においてSATACと称するもので（付随人工染色体または付随DNAに基づく人工染色体（これら用語は本明細書では互換的に使用する））、安定な異質染色質染色体であり、他方の種類は真正染色質の増幅に基づくミニ染色体である。

人工染色体は、1個のプロモーターに機能的に連結された1個の遺伝子の複数コピーあるいは各個別のプロモーターに連結された各コピーまたはいくつかのコピーなどの1個もしくは複数の遺伝子を含むメガ塩基[Mb]対の大きさのDNA断片の標的組み込みのためのゲノム外座を提供するものである。そこで、MACを用いて、細胞、組織および動物ならびに鳥、ニワトリ、魚および植物などの生物に遺伝子を導入する方法も提供される。組み込み異種DNAを有する人工染色体は、遺伝子治療；遺伝子産生物、特に複遺伝子性生合成経路の発言を必要とし、遺伝子導入（人間以外の）動物、鳥、鶏および魚を生産するための、胚幹細胞[ES細胞]などの生殖細胞系細胞の核への導入のための産生物の製造方法で使用するすることができる。単子葉植物および双子葉植物などの遺伝子導入植物も、本発明では想到される。

哺乳動物人工染色体は、対象とする蛋白をコードする遺伝子の導入のためのゲノム外特異的組み込み部位を提供し、メガ塩基の大きさのDNA組み込みが可能であることから、例えば、代謝経路全体をコードする遺伝子あるいは嚢胞性繊維症[CF；約250kb]ゲノムDNA遺伝子、多価ワクチン製造のための一連の抗原をコードする多重遺伝子などのいくつかの遺伝子などの非常に大きい遺伝子を安定に細胞に導入することができる。p53などの腫瘍抑制遺伝子、嚢胞性繊維症膜貫通調節蛋白質[CFTR]のcDNA、および抗HIV gagリボザイム(ribozyme)遺伝子などの抗HIVリボザイムの遺伝子等のそのような遺伝子を人工染色体に標的導入するためのベクターも提供される。

本発明で提供される染色体は、細胞、好ましくは安定な細胞系に、1個または複数の選択可能なマーカーをコードするDNAを含む異種DNAを導入し；細胞を選択条件で成長させ；得られたクローンの中から、1以上の動原体および／またはその断片を有する染色

体を含むクローンを確認することで形成される。追加の動原体を製造する増幅が、染色体の挟動原体領域の動原体付近で異種DNAが組み込まれた染色体を含む細胞で起こる。次に、特定のクローン細胞を用いて、人工染色体を形成する。

DNAの非標的導入によって適切な座への組み込みをいくらかの頻度で生じるが、標的導入が好ましい。そこで好ましい実施態様では、細胞に導入されて人工染色体の形成を行う選択可能マーカを有するDNAが、挟動原体領域、異質染色質および特には染色体のrDNAなどの増幅可能領域を標的としてそれを導入する配列を有する。例えば、それぞれマウス付随DNAおよびヒト付随DNAに特異的なそのようなDNAを含むpTEMPUDおよびpHASPU D（本発明で提供）のようなベクターが提供される。プラスミドpHASPU Dは、ヒト染色体を特異的に標的とするヒト付随DNA配列を含むpTEMPUDの誘導体である。好ましい標的配列には、異種DNAを標的として、rDNAを含む染色体のrDNA領域に組み込む哺乳動物リボソームRNA（rRNA）遺伝子配列（本明細書においてはrDNAと称する）などがある。例えば、マウスrDNAを含むpTERPU Dなどのベクターが提供される。細胞に存在する染色体に組み込む際、これらのベクターは増幅を誘発することができ、それによって追加の動原体が形成される。

人工染色体は、細胞を多動原体染色体、代表的には二動原体染色体とともに、染色体が切断されてミニ染色体と元二動原体（formerly dicentric）染色体とを形成する条件下に培養することで形成される。本発明で提供されるMACの中には、主として短い付随DNAの反復単位からなり、ほぼ完全に異質染色性であることから、異種もしくは異質のDNAの挿入がなければ、染色体が好ましくは遺伝情報を持たないか、あるいはrDNA配列などの非蛋白コード遺伝子配列のみを有するSATACがある。そこで、それは有害である可能性のある遺伝子を持たないことから、哺乳動物宿主へのDNA組み込みのための「安全な」ベクターとして使用することができる。SATACは、例えば米国特許5288625号におけるようなミニ染色体断片からではなく、元二動原体染色体の断片から形成される。

さらに、真正染色質ミニ染色体の形成方法およびその使用方法も本発明で提供される。ある種のMAC、すなわち米国特許5288625号ですでに記載されているミニ染色体の形成方法ならびに異種DNAの発現のためのその使用方法が提供される。ミニ染色体などのMACを形成するための本発明で提供される特定の方法では、哺乳動物rDNAを含む異種DNAおよび1以上の選択可能マーカ遺伝子を細胞に導入し、それを次に、選択条件下に成長させる。複数の動原体を有する染色体を含む得られた細胞を選別し、染色体が分裂してミニ染色体およびミニ染色体が放出される元多動原体（代表的には二動原体）染色体を形成する条件下で培養する。

ミニ染色体を含む細胞系およびその細胞融合への使用も提供される。1実施態様において、哺乳動物ミニ染色体を含む細胞系を、特定の遺伝子または複数遺伝子をコードするドナーDNAに対する受容細胞として使用する。ドナーDNAのミニ染色体への組み込みを容易にするため、受容細胞系には好ましくはミニ染色体を含ませるが、やはり元二動原体染色体は含ませない。これは、細胞融合ならびにミニ染色体を含むが元二動原体染色体を含まない細胞の選別などの本明細書に開示の方法によって行うことができる。ドナーDNAを、第2の選択可能マーカに連結し、ミニ染色体を標的とし、それに組み込む。得られた染色体を、細胞融合によって、チャイニーズ、ハムスター細胞系[CHO]などの適切な受容細胞系に転移させる。遺伝子操作染色体を有する細胞の大量生産後、その染色体を単離する。詳細には、コルヒチン添加などによって中期染色体を得て、それを細胞溶解物から精製する。その染色体を、異種DNAのクローニング、配列決定および細胞への組み込みに使用する。

選択条件下での反復培養ならびに元二動原体染色体から生産される染色体を含む細胞のサブクローニングによって形成される各種大きさのSATACも提供される。SATACの例としては、約15Mb〔2個の約7.5Mbブロック〕である反復DNA単位に基づいたものである。他の生物および他の染色体から形成されるSATACの反復DNA単位は変動し得るが、代表的には、約7～約20Mb程度であると考えられる。反復DNA単位

10

20

30

40

50

は本明細書ではメガレプリコンと称するが、それは例示のS A T A Cでは、異種DNAおよび非付随DNAなどの非DNAが隣接する付随DNAの縦列ブロックを含む。増幅によって、異種〔「外来」〕DNAと接する2個の反転メガレプリコンを含む1列の染色体部分（それぞれアンプリコンと称される）が生産される。細胞融合、選択培地での成長および／またはB r d U〔5-ブロモデオキシウリジン〕処理または他のゲノム不安定化試薬または不安定化剤による他の処理（X線などによるイオン化放射線照射等）ならびにサブクローニングを繰り返すことで、150～200Mbの「ソーセージ」染色体、500～1000Mbのギガ染色体、安定な250～400Mbのメガ染色体ならびにそれらから誘導される各種の相対的に小さい安定な染色体などの安定な異質染色性または部分的に異質染色性の染色体を有する細胞系が得られる。これらの染色体は、これらの反復単位に基づいたものであり、発現される異種DNAを含み得るものである。

10

そこで、両方の種類のMAC（すなわち、S A T A C Sおよびミニ染色体）の製造方法が提供される。その方法は、哺乳動物、鳥、鶏、魚、昆虫および植物などの高等真核生物細胞由来の動原体を有する人工染色体の製造に利用される。

得られる染色体を本発明で提供される方法によって精製して、異種DNAを特定細胞に導入して異種DNAによってコードされた遺伝子産生物の生産、遺伝子導入（人間以外）の動物、鳥、鶏、魚および植物の生産あるいは遺伝子治療を行うためのベクターを提供することができる。

さらに、ミニ染色体およびS A T A Cの断片化のための方法およびベクターが提供される。そのような方法およびベクターは、比較的小さく安定な人工染色体のin vivoでの形成に使用することができる。染色体断片化のためのベクターを用いて、メガレプリコン、動原体および2個の末端小粒を有し、約7.5Mb～約60Mb、好ましくは約10Mb～15Mbおよび30～50Mbのものである人工染色体を製造する。例を挙げると、好ましい範囲は約7.5Mb～50Mbである。そのような人工染色体は、他の方法によって製造することもできる。

20

15Mb（または2個の反転繰り返し単位を有する30Mbアンプリコン）または30Mb以上のそのマルチマー（例：60Mb）の単離は、in vitroで操作できる安定な染色体ベクターを提供するものでなければならない。MACを小さくしてより安定な自己再生人工染色体を形成する方法も提供される。

さらに本発明では、本明細書で提供のもののような哺乳動物人工染色体をin vitroで製造する方法ならびに得られる染色体も提供される。その方法では、構造要素および機能要素をin vitroで組み立てて、安定な人工染色体を提供する。そのような要素には、動原体、2個の末端小粒、1個以上の複製源ならびに付随DNAなどの充填物異質染色質などがある。その後の選択のための選択可能マーカーなどもあり得る。これらの特異的DNA要素は、異種DNAの細胞への導入ならびに人工染色体、特にS A T A Cを生じるその後の増幅によって形成されたものなどの本発明で提供される人工染色体から得ることができる。人工染色体のin vitroでの構築に使用する動原体配列も、本発明で提供される動原体クローニング法を用いることで得ることができる。好ましい実施態様においては、複製源、特にメガレプリケータを提供する配列はrDNA由来のものである。これらの配列には好ましくは、rDNA複製源および増幅促進配列などがある。

30

40

異種DNAを人工染色体に狙って組み込む方法およびベクターも、相対的に小さいが安定で自己再生性の人工染色体を製造するための染色体の断片化方法およびそのためのベクターと同様に提供される。

前記染色体を細胞に導入して、細胞源に応じて、安定な形質転換細胞系または細胞を得る。導入は、エレクトロポレーション；リン酸カルシウム沈殿などによる直接取り込み；リポフェクション（lipofection）、微小核体融合、脂質介在キャリア系その他の好適な方法による単離染色体の取り込みなど（ただし、これらの方法に限定されるものではない）の好適な方法によって行われる。得られる細胞は、細胞中での蛋白生産に使用することができる。その染色体は単離して、遺伝子取り込みに使用することができる。基準染色体と比較してMACにおいて異なる染色体のDNA含有量に基づく染色体の単離方法が提供さ

50

れる。さらに、M A C の含有量、特に密度および大きさによって決まる方法も提供される。

これらの人工染色体は、遺伝子治療；遺伝子産生物生産系；人化した遺伝子形質転換動物臓器の生産；遺伝子導入した植物および哺乳動物、鳥、鶏、魚、無脊椎動物、脊椎動物、は虫類および昆虫などの動物（人間以外）、臓器または情報保存媒体として染色体要素を使用すると考えられる機器の生産；ならびに、動原体機能の分析および研究；in vitroで構築できる人工染色体ベクターの生産；および生物特異的人工染色体の製造で 사용할ことができる。人工染色体は、微量注入法、細胞融合、微小核体融合、エレクトロポレーション、核転移、電気融合、粒子衝撃法（projectile bombardment）、核転移、リン酸カルシウム沈殿、脂質介在転移系および他のそのような方法を用いて、細胞に導入することができる。人工染色体とともに使用するのに特に好適な細胞には、特にトマト、シロイヌナズナ（arabidopsis）およびその他のような植物細胞；カイコ細胞などの昆虫細胞；昆虫の幼虫；魚；は虫類；両生類；蜘蛛；哺乳動物細胞；鳥の細胞；胚幹細胞；造血幹細胞；胚ならびに養子免疫療法で使用されるリンパ球および神経もしくは神経細胞などの遺伝子療法で使用される細胞などがあるが、これらに限定されるものではない。そこで、遺伝子産生物および遺伝子導入（人間以外）動物および植物を生産する方法も提供される。得られる遺伝子導入動物・植物も提供される。

10

これらの染色体を含む細胞系の例も提供される。

特定生物についての人工染色体を提供する方法および動原体のクローニング方法も提供される。例えば、異なる生物で使われる人工染色体を形成するために提供される2つの方法の例を以下に示す。第1に、本発明の方法を異なる生物に適用することができる。第2に、生物特異的人工染色体の形成手段および動原体をクローニングする手段が提供される。詳細には、動物または植物からの動原体をクローニングする方法は、その植物もしくは動物のゲノムを含むDNA断片のライブラリを得て、各断片を、選択した植物もしくは動物（通常は非哺乳動物）と異なる生物（通常は哺乳動物）からの動原体および選択可能なマーカーを含む哺乳動物付随人工染色体〔S A T A C〕に導入することで得られる。選択される植物または動物は、哺乳動物動原体が機能しないものである。各S A T A Cを、選択条件下で成長する細胞に導入し、それを選択条件下に成長させ、S A T A Cを有する細胞を確認する。そのようなS A T A CはライブラリからのDNAによってコードされた動原体を有するはずであるか、あるいは選択された生物における安定な複製に必要な要素を有するはずである。

20

30

比較的大きいDNA断片が人工染色体に含まれているライブラリも提供される。

遺伝子導入（人間以外）動物、無脊椎動物および脊椎動物、植物および昆虫、魚、は虫類、両生類、蜘蛛、鳥、鶏および哺乳動物も提供される。特に興味深いものは、耐性を与えるか疾患に対する感受性を低下させる遺伝子を発現する遺伝子導入（人間以外）動物および植物である。例えば転移遺伝子（transgene）は、ウィルス、細菌または害虫などの病原体に対して毒性があるが、遺伝子導入宿主には毒性を持たない蛋白をコードすることができる。さらに、複数の遺伝子をM A Cに導入できることから、抗原をコードする一連の遺伝子を導入し、それが発現時に、抗原への曝露によって免疫または何らかの保護を与える疾患に対して宿主動物を免疫感作する〔多価ワクチンと同様にして〕上で役立つ。

40

さらには、疾患の研究ならびにその治療および治療法を開発する上で使用される種の疾患および障害のモデルとして役立つ遺伝子導入（人間以外）動物も興味深い。そのような疾患の動物モデルは、M A Cで動物に導入され、その動物において疾患もしくは障害を誘発する遺伝子〔代表的には、疾患関連の突然変異を有する遺伝子〕を発現する。同様に、アンチセンスRNAをコードする遺伝子を有するM A Cを動物細胞に導入して、条件的「ノックアウト」遺伝子導入（人間以外）動物を得ることができる。そのような動物では、アンチセンスRNAの発現によって、アンチセンスRNAに相当する遺伝子の産生物が減少するか完全になくなる。さらに興味深いものとしては、動物の母乳で発現される治療蛋白をコードする含M A C遺伝子を有している遺伝子導入哺乳動物がある。動物の臓器を人化するのに役立つ含M A C遺伝子を発現する、異物移植術用の遺伝子導入（人間以外

50

哺乳動物動原体などの動原体のクローニング方法も提供される。詳細には、1実施態様において、S A T A Cの断片から構成されるライブラリを、チロシナーゼをコードするDNAなどの検出可能なマーカーを有するY A C〔酵母人工染色体〕にクローニングし、次にアルビノマウス胎仔などの哺乳動物細胞に導入する。哺乳動物で機能する動原体を含むようなY A Cを有する胎仔から得られるマウスは、前記の検出可能なマーカーを発現する。そこで、機能性の哺乳動物動原体が導入されたアルビノマウス胎仔からマウスを得た場合、そのマウスは有色であるか、または有色領域を有する。

DNAの反復縦列配置を製造する方法も提供される。本明細書ではテロメアDNAを用いた例を示しているこの方法は、いかなる反復配列にも適用可能であり、特に複雑さの小さい反復に適用可能である。縦列DNAの配置の合成のために本発明で提供される方法は、一連の延長段階に基づくものであり、その延長段階では、反復配列を連続的に倍化することで、縦列反復の配置が級数的に延長する。縦列反復を有するDNA断片を合成する方法の1実施態様について、以下に説明する。出発原料としては、2個のオリゴヌクレオチドを用いる。オリゴヌクレオチド1は、長さkの反復配列（その横は無関係である）のものであり、反復配列の比較的短い長さのもの（60～90ヌクレオチド）を有し、それに隣接して適切に選択された制限部位がある。

10

ここで S 1 は E 1 によって開裂する制限部位 1 であり、S 2 は E 2 によって開裂する第 2 の制限部位であり、> は簡単な反復単位を表し、「 」は下記のオリゴヌクレオチド 2 と相補的な配列が隣にある短い（8 ～ 10）ヌクレオチドを示す。

20

ここで、S 3は酵素E 3についての第3の制限部位であり、構築の際に使用されるベクターに存在する。その方法では次の段階を行う。(1)オリゴヌクレオチド1および2をアニーリングする；(2)アニーリングされたオリゴヌクレオチドを埋めて、二本鎖(ds)配列を得る；(3)二本鎖DNAを制限酵素E 1およびE 3で開裂させ、次に、同じ酵素E 1およびE 3で開裂させてあったベクター(例：pUC19または酵母ベクター)に連結する；(4)制限酵素E 1およびE 3で消化させることで、プラスミドの第1の部分から挿入物を単離し、プラスミドの第2の部分を酵素E 2(3'の突出を除くための処理)およびE 3で切断し、大きい断片(プラスミドDNAと挿入物)を単離する；(5)2個のDNA断片(S1～S3挿入物断片とベクター+挿入物)を連結する；(6)段階4および5を必要な回数繰り返して、所望の反復配列の大きさとする。各延長サイクルで、反復配列の大きさは倍化する。すなわち、mを延長サイクルの回数とすると、反復配列の大きさは $k \times 2^m$ ヌクレオチドとなる。

30

図1は、MMCneo [ミニ染色体] 染色体の生成を描いた模式図である。A～Gは、当該ミニ染色体の形成および安定化に至ると考えられる観察データと一致する連続事象を表す。

40

DNA領域への外来DNAの組み込みによってH型増幅が開始し、異質染色質腕が生成する。真正染色質末端部分を捕捉することで、その新たな染色体腕が「ソーセージ」染色体の形で安定化する。(E) BrdU [5-ブロモデオキシウリジン] 処理および／または薬剤選別によって、さらにH型増幅が誘発され、それによって不安定なギガ染色体が生成する。(F) BrdU処理および／または薬剤選別を繰り返すことで、動原体複製を含むさらなるH型増幅が誘発され、それによってさらに別の染色体腕が生成する。それは染色体切断によって7番染色体から切り離され、末端部分を獲得することで、安定なメガ染色体が生成する。

図3は、レプリコン構造の模式図であって、メガ染色体が生成すると考えられる図式である。

10

図4は、本明細書に記載の細胞系例の一部のものの間の関係を説明する図である。

図5は、プラスミドpTEMPUDの図である。

好ましい実施態様の詳細な説明

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有するものとする。本明細書で引用の全ての特許および刊行物は引用によって本明細書に含まれるものとする。

本明細書で使用する場合、哺乳動物人工染色体[MAC]とは、内因性染色体とともに、安定に複製および分離できるDNA片である。それは、染色体に挿入された異種遺伝子を収容および発現できるものである。それは活性な哺乳動物動原体を有することから、哺乳動物人工動原体と称する。植物人工染色体、昆虫人工染色体および鳥人工染色体は、それぞれ植物および昆虫の動原体を含む染色体と称する。ヒト人工染色体[HAC]とは、ヒト動原体を含む染色体を指し、BUGACとは昆虫人工染色体を指し、AVACとはトリ人工染色体を指す。本発明で提供されるMAC中、SATAC、ミニ染色体およびin vitro合成人工染色体がある。各種の構築方法が本発明で提供される。

20

本明細書で使用する場合、in vitro合成人工染色体とは、必須構成要素（少なくとも動原体、複製源）をin vitroで結合することで得られる人工染色体である。

本明細書で使用する場合、内因性染色体とは、MACの形成または導入以前に細胞で認められるゲノム染色体を指す。

本明細書で使用する場合、安定な染色体維持とは、約85%以上、好ましくは90%、より好ましくは95%の細胞が染色体を保持する場合のものである。安定性は、選択剤の存在下に測定する。好ましくは、それらの染色体は、選択剤不在下でも維持される。安定な染色体はさらに、細胞培養時にその構造を保持し、染色体内や染色体間の再配列を起こすことがない。

30

本明細書で使用する場合、選択条件下での成長とは、生残についての選択可能マーカーの発現を必要とする条件下での細胞の成長を意味する。

本明細書で使用する場合、染色体を不安定化させる薬剤は、増幅事象、突然変異を促進することが、当業者には公知のいずれかの薬剤である。BrdUを含むそのような薬剤は、当業者には公知である。

本明細書で使用する場合、動原体に関して「デノボ（新規の）」という用語は、本発明の方法を用いて異種DNA断片を組み込んだことで生じる過剰の動原体形成を指す。

40

本明細書で使用する場合、真正染色質および異質染色質は、それらの一般に認められた意味を有する。すなわち真正染色質は、広範に染色し、代表的には遺伝子を含む染色質を指し、異質染色質とは、以上に凝縮したままで、転写的には不活性であると考えられている染色質を指す。少なくとも哺乳動物細胞に関して、非常に反復性の高いDNA配列[付随DNA]は通常、動原体周囲の異質染色質[挟動原体異質染色質]の領域にある。構成異質染色質とは、構成上凝縮しており、遺伝的に不活性である非常に反復性の高いDNAを含む異質染色質を指す。

本明細書で使用する場合、BrdUとは、複製時にチミジンに代わって挿入される5-ブロモデオキシウリジンを指す。BrdUは、突然変異原として使用される。それはさらに

50

、細胞分裂時の中期染色体の凝縮を阻害する。

本明細書で使用する場合、二動原体染色体とは、2個の動原体を有する染色体である。多動原体染色体は、2個より多い動原体を有する。

本明細書で使用する場合、元二動原体染色体とは、二動原体染色体が断片化し、新たな末端小粒を獲得することで、それぞれが一方の動原体を有する2個の染色体を生成する時に生成する染色体である。各断片は複製可能な染色体である。染色体の一方について真正染色質DNAの増幅を行って、新たに導入された異質DNAおよび主として「少なくとも50%超」真正染色質を含む完全に機能性の染色体が得られる場合、それはミニ染色体である。残りの染色体は、元二動原体染色体である。一方の染色体について増幅を行うことで、異質染色質「付随DNA」が増幅され、真正染色質部分「または腕」が残っている場合、それはソーセージ染色体と称される。異種DNAの部分を除く実質的に全ての異質染色質である染色体はSATACと称される。そのような染色体「SATAC」は、BrdU処理および／または選択条件下での増殖のように、染色体を不安定化させることで、付随人工染色体「SATAC」を生成する条件下でソーセージ染色体を含む細胞を培養することで、ソーセージ染色体から生成することができる。本明細書に関しては、SATACは必ずしも複数段階で生成するとは限らないが、最初に異種DNAを導入し、選択条件下に成長させた後に生じるか、あるいは選択条件下でのいくつかの成長サイクルおよびBrdU処理後に生じ得るものであることは明らかである。

本明細書で使用する場合、SATACとは異種DNAの部分を除く実質的に全て異質染色質である染色体を指す。代表的には、SATACは付随DNAに基づく人工染色体であるが、その用語は、真正染色質より異質染色質を多く含む本発明の方法によって得られる染色体を含むものである。

本明細書で使用する場合、染色体に関して使用する際、特には本発明によって提供されるSATAC形成方法について使用する際の「増幅可能」という用語は、増幅を起こしやすい染色体領域を指す。増幅は代表的には、複製および他の組換えが関与する細胞事象の際に生じる。そのような領域は代表的には、付随DNA、rDNAおよび他のそのような配列などの縦列反復を含む染色体領域である。

本明細書で使用する場合、DNAに関しての「増幅」とは、DNAの部分複製して、実質的に縦列もしくは連続反復単位または反転反復単位としてつながっているのが普通の同一もしくはほぼ同一のDNA部分の2個以上のコピーを生じるプロセスである。

本明細書で使用する場合アンプリコンとは、メガレプリコンの1組の反転反復単位を有する反復DNA増幅単位である。メガレプリコンは、比較的高次の複製単位を代表するものである。例えば、SATACに関して、メガレプリコンは、それぞれが非付随DNAの隣接する付随DNAを有する1組の縦列DNAブロックを有する。挟動原体異質染色質および恐らくは動原体の複製の調整および促進に関与すると考えられるメガレプリケータと称される一次複製部位が、メガレプリコン内にある。メガレプリコン内には、相対的に小さい「例：一部の哺乳動物細胞で50～300kb」二次レプリコンがある場合がある。例示のSATACでは、メガレプリコンは、2個の約7.5Mbの縦列DNAブロックによって決定されている「例えば図3参照」。各人工染色体「AC」内で、あるいはその群において、各アンプリコンはほぼ同じ構造を有するが、配列が異なっている場合がある。そのような配列の差異は、特に培養時に生じる移動性遺伝要素の運動、欠失もしくは挿入または突然変異の結果生じるものである。そのような差異は、本明細書に記載のACの使用やその全体的構造に影響を与えるものではない。

本明細書で使用する場合、リボソームRNA「rRNA」とは、リボソーム構造の一部を形成し、蛋白合成に関与する特殊化したRNAである。リボソームRNAは、真核生物細胞において複数コピーに存在する遺伝子の転写によって産生される。ヒト細胞においては、一倍体ゲノム当たり約250コピーのrRNA遺伝子が、5以上の異なる染色体（13、14、15、21および22番染色体）上のクラスターで広がっている。マウス細胞では、リボソームDNA「rDNA」の存在は、20個のマウス染色体中の11以上の対「5、6、9、11、12、15、16、17、18、19番染色体およびX染色体」で確

10

20

30

40

50

認されている (Rowe et al(1996)Mamm.Genome 7:886-889およびJohnson et al(1993)Mamm .Genome 4:49-52参照)。真核生物細胞では、高度に保存された r R N A の複数コピーが、縦列に配置された一連の r D N A 単位にあり、該 r D N A 単位は長さが約 4 0 ~ 4 5 k b であり、転写領域ならびに長さおよび配列において多様であり得るスペーサ (すなわち、遺伝子間スペーサ) D N A として知られる非転写領域を有する。ヒトおよびマウスにおいて、これらの縦列配置の r D N A 単位は、挟動原体付随 D N A 配列 (異質染色質) に隣接している。r D N A があるこれら染色体領域は、核小体形成部位 (N O R) と称され、細胞核中のリボソーム産生部位である核仁に輪状に存在する。

本明細書で使用する場合、ミニ染色体とは、異質染色質 D N A より多くの真正染色質 D N A を含む多動原体染色体、代表的には二動原体染色体 (例えば図 1 参照) 由来の染色体を指す。

10

本明細書で使用する場合、メガ染色体とは、導入された異種 D N A を除き、実質的に異種染色質から構成される染色体を指す。メガ染色体は、導入された異種 D N A に隣接する 2 個の反転メガレプリコンを有する反復アンプリコン配置からなる (例えば、メガ染色体の模式図については図 3 参照)。本発明に関しては、メガ染色体は、約 5 0 ~ 4 0 0 M b 、一般には約 2 5 0 ~ 4 0 0 M b である。相対的に短いものは切断メガ染色体 [約 9 0 ~ 1 2 0 もしくは 1 5 0 M b] 、矮小メガ染色体 [約 1 5 0 ~ 2 0 0 M b] および細胞系、ならびにミクロメガ染色体 [約 5 0 ~ 9 0 M b 、代表的には 5 0 ~ 6 0 M b] とともに称される。本発明に関しては、メガ染色体という用語は、いずれかの挿入異種 D N A に隣接する 2 個の反転メガレプリコンを有する反復染色体部分 [アンプリコン] の配に基づいた全体的に反復性の構造を指す。その大きさを指定する。

20

本明細書で使用する場合、遺伝子治療には、ある種の細胞すなわち標的細胞への異種 D N A の転移もしくは挿入による、疾患の改善もしくは調節に関与する具体的な遺伝子産物の取得が関与する。異種 D N A が発現され、それによってコードされた産物を産生するような形で、特定の標的細胞に、その D N A を導入する。別法として、異種 D N A は何らかの形で、治療性生成物をコードする D N A の発現に介在する。それは、何らかの形で、直接もしくは間接に治療性生成物の発現に介在する、ペプチドもしくは R N A などの生成物をコードすることができる。さらに、遺伝子治療を用いて、宿主では通常は産生されないか、あるいは治療上有効な量または治療上有効な時期に産生されない T N F などの治療性化合物を導入することも可能である。標的細胞によって疾患を患っている生体内でのその標的細胞による異種 D N A の発現によって疾患の調節を行うことができる。治療性生成物をコードする異種 D N A に修飾を行ってから、疾患を患っている宿主の細胞に導入して、その産生物もしくは発現を促進その他の形で変えることができる。

30

本明細書で使用する場合、異種または外来の D N A および R N A は互換的に使用され、天然に生じるものとは異なるゲノムの位置に存在もしくは認められるゲノムの一部として天然には生じない D N A または R N A を指す。それは、細胞に対しては内因性ではなく、細胞に外部から導入された D N A もしくは R N A である。異種 D N A の例としては、遺伝子治療またはコードされた蛋白の産生を目的として導入された、対象とする遺伝子産物または複数の遺伝子産物をコードする D N A などがあるが、それに限定されるものではない。異種 D N A の他の例としては、薬剤耐性を与える蛋白などの追跡可能なマーカー蛋白をコードする D N A 、抗癌剤、酵素およびホルモンなどの治療上有効な物質をコードする D N A 、抗体などの他の種類の蛋白をコードする D N A などがあるが、それらに限定されるものではない。異種 D N A によってコードされる抗体は、その異種 D N A を導入した細胞の表面で分泌または発現され得る。

40

本明細書で使用する場合、治療上有効な生成物とは、D N A を宿主に導入した際に、先天性疾患もしくは後天性疾患の症状、発現を効果的に緩和もしくは解消する生成物またはその疾患を治癒させる生成物が発現される異種 D N A によってコードされた生成物である。本明細書で使用する場合、遺伝子導入植物とは、異種もしくは外来 D N A が発現される植物、あるいは植物に天然に存在する遺伝子の発現に変化が生じた植物を指す。

本明細書で使用する場合、プロモーター、エンハンサー、転写・翻訳終止部位、他の信号

50

配列などのヌクレオチドの調節配列およびエフェクタ配列に対する異種DNAの機能的（operative）連結とは、そのようなDNAとそのようなヌクレオチド配列との関係を指す。例えば、プロモーターに対する異種DNAの機能性連結とは、そのようなDNAの転写が、読み取り枠でそのDNAの認識、結合および転写を行うRNAポリメラーゼによって、プロモーターから開始するような、異種DNAとプロモーターの間の物理的関係を指す。好ましいプロモーターには、哺乳動物腺特異的プロモーターなどの組織特異的プロモーター；TK、CMW、アデノウイルスプロモーターなどのウィルスプロモーター；ならびに当業者に公知の他のプロモーターなどがある。

本明細書で使用する場合、単離された実質的に純粋なDNAとは、当業者が用いる標準的方法に従って精製されるDNA断片を指す（例えば、Maniatis et al.(1982)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにあるもの）。

10

本明細書で使用する場合、発現とは、核酸がmRNAに転写され、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白に翻訳されるプロセスを指す。核酸がゲノムDNA由来のものである場合、適切な真核生物宿主細胞または生体を選択すると、発現にはmRNAのスプライシングが含まれる場合がある。

本明細書で使用する場合、ベクターもしくはプラスミドは、異種DNAの発現またはクローニングされた異種DNAの複製のいずれかを目的として細胞中に異種DNAを導入するのに使用される別個の要素を指す。そのようなベクターおよびプラスミドの選択および使用は、当業界の技術レベルの範囲内である。

20

本明細書で使用する場合、形質転換／トランスフェクションとは、DNAまたはRNAを細胞に導入するプロセスを指す。トランスフェクションとは、実際にいずれのコード配列が発現されるかとは無関係に、宿主細胞による発現ベクターなどの外来核酸の取り込みを指す。多くのトランスフェクション法が当業者には知られており、例えば、リン酸カルシウムを用いた直接取り込み [CaPO₄；例えば、Wigler et al.(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.76:1373-1376]、ポリエチレングリコール [PEG] 介在DNA取り込み、エレクトロポレーション、リポフェクション [例えば、Strauss(1996)Meth.Mol.Biol.54:307-327]、微小核体融合 [実施例参照、さらにはLambert(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:5907-5911；米国特許5396767号；Sawford et al.(1987)Somatic Cell Mol.Genet.13:279-284；Dhar et al.(1984)Somatic Cell Mol.Genet.10:547-559；およびMcNeil-Killary et al.(1995)Meth.Enzymol.254:133-152参照]、脂質介在キャリア系 [例えば、Teifel et al.(1995)Biotechniques 19:79-80；Albrecht et al.(1996)Ann.Hematol.72:73-79；Holmen et al.(1995)In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.31:347-351；Remy et al.(1994)Bioconj.Chem.5:647-654；Le Bolch et al.(1995)Tetrahedron Lett.36:6681-6684；Loeffler et al.(1993)Meth.Enzymol.217:599-618参照] その他の好適な方法によって行うことができる。トランスフェクションが奏功したか否かは、宿主細胞内でのベクターの機能指示などの、トランスフェクションした細胞内での異種核酸の存在検出によって確認されるのが普通である。形質転換とは、DNAを生体に導入して、そのDNAを、染色体外要素としてあるいは染色体組み込みによって複製可能とすることを意味する。

30

本明細書で使用する場合、「注入（された）」とは、細胞へのDNAの微量注入 [小型注射器を使用] を指す。

40

本明細書で使用する場合、実質的に均一なDNAとは、別のそのような配列と十分類似していて、特定条件下に安定なハイブリッドを形成するヌクレオチド配列を含むDNAを指す。

同じ条件下に、異なる配列を有する核酸断片が検出可能な形で同一の「標的」核酸にハイブリダイゼーションし得ることは当業者には公知である。1個の断片が、他の核酸断片における1以上の部分の配列に対して相補的（またはほぼ相補的）である配列に少なくとも約14のヌクレオチドを有する部分を持つことから、十分長いハイブリダイゼーション期間にわたって緊縮条件下では、2個の核酸断片は検出可能な形でハイブリダイゼーションする。ハイブリダイゼーションが起こり得る時間が、所定の緊縮条件下に、正確に相補的

50

な塩基対合部分を有する2個の核酸断片が検出可能な形で互いに対してハイブリダイゼーションするだけの時間で一定に保たれた場合、正確な相補性からの逸脱が塩基対合部分にあっても良く、そのような場合であっても、塩基対合はハイブリダイゼーションを検出可能とするのに十分な程度に起こる。2個の核酸の塩基対合部分間の相補性からの逸脱が大きくなり、ハイブリダイゼーション条件がさらに激しくなるに連れて、2個の部分が検出可能な形で互いに対してハイブリダイゼーションする確率が低下する。

2個の一本鎖核酸部分は、(a) その両方が同一部分と塩基対合二体鎖を形成し、(b) 前記2つの二本鎖の0.5×SSPE溶液での融点差が10℃未満である場合、それらの部分は本明細書の意味の範囲内で、「実質的に同一の配列」を有する。比較する部分が同数の塩基を有していて、「実質的に同じ配列」を有するという場合、それは代表的には10個中1個未満の配列が異なるというものである。核酸二体鎖の融点測定方法は公知である〔例えば、Meinkoth and Wahl(1984)Anal.Biochem.138:267-284およびその文献中で引用の参考文献を参照〕。

本明細書で使用する場合、核酸プローブとは、同一もしくは非常に関係の深いヌクレオチド配列を有するDNAもしくはRNAに対して特異的にハイブリダイゼーションするだけの数のヌクレオチドを有するDNA断片もしくはRNA断片である。プローブは、約10という少数から数十万という多数のヌクレオチドまで、いかなる数のヌクレオチドを有していても良い。そのようなハイブリダイゼーション反応の条件およびプロトコールは、プローブの大きさ、温度、不適正対合の程度、塩濃度およびハイブリダイゼーション反応についての他のパラメータの効果のように、当業者には公知である。例えば、ハイブリダイゼーションを行う場合の温度が低く、塩濃度が高いほど、ハイブリッド分子中に存在する不適合対合の程度は大きくなる。

ハイブリダイゼーションプローブとして使用するには、核酸を例えば³²P、³Hおよび¹⁴Cなどの検出可能な部分もしくは標識で標識することで、またはウラシル部分の5'位でビオチン化されたデオキシウリジレートの存在下でのニック翻訳などの化学的標識のような他の手段によって検出できるようにするのが普通である。得られたプローブには、チミジレート残基に代わってビオチン化ウリジレートがあり、ストレプトアビジンのビオチンへの結合に基づく多くの市販検出システムのいずれかによって検出することができる(ビオチン部分を介して)。そのような市販の検出システムは、エンゾ・バイオケミカルズから入手可能である(Enzo Biochemicals, Inc., New York, NY)。非放射能標識などの当業者に公知の他の標識は、それがプローブを十分検出可能とする限りにおいて使用可能であり、それはアッセイの感度、使える時間〔細胞培養、DNA抽出およびハイブリダイゼーションアッセイに対して〕、プローブ源として利用可能なDNAもしくはRNAの量、特定の標識およびその標識を検出するのに使用される手段によって決まる。

プローブに対して十分高い程度で相同性を有する配列が確認されたら、それは標準法(例えばManiatis et al.(1982)Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYに記載のもの)によって容易に単離することができる。

本明細書で使用する場合、DNA分子が安定なハイブリッドを形成し、実質的に相同性であると考えられる条件とは、少なくとも約60%の相補性を有するDNA分子が安定なハイブリッドを形成するような条件を言う。そのようなDNA断片はこの場合、「実質的に相同」であると考えられる。例えば、特定の蛋白をコードするDNAは、そのDNAが安定なハイブリッドを形成して、断片の配列が少なくとも約60%相補的である場合、ならびにDNAによってコードされる蛋白がその活性を保持する場合に、別のDNA断片に対して実質的に相同である。

本明細書に関して、緊縮条件は以下のように規定される。

- 1) 高緊縮性: 0.1×SSPE、0.1%SDS、65℃
- 2) 中緊縮性: 0.2×SSPE、0.1%SDS、50℃
- 3) 低緊縮性: 1.0×SSPE、0.1%SDS、50℃

あるいは、塩および温度ならびに他の試薬の組み合わせによって、同程度の不適合または

10

20

30

40

50

適合を選択することができる。

本明細書で使用する場合、「免疫保護（性）」とは、ワクチンまたは抗原もしくは免疫誘発剤への曝露が、ワクチンもしくは抗原を投与もしくは導入した宿主に対して、疾患の原因となる病原体による感染に抵抗する能力または症状を軽減させる能力を与えることができる能力を指す。選択される抗原は、病原体によって提供される抗原であるのが普通である。

本明細書で使用する場合、ハイブリダイゼーション反応および抗体－抗原反応などの全てのアッセイおよび手順は、別段の断りがない限り、当業者が標準的条件と考える条件下に実施する。

A. MACを含む細胞系の製造

10

1. メガレプリコン

本発明で提供される方法、細胞およびMACは、動原体領域に比較的高次の複製単位〔メガレプリコン〕が存在することを発見したことによって得られたものである。このメガレプリコンは、一次複製開始部位〔メガレプリケータ〕を境界とし、動原体異質染色質および最も可能性の高いものとして動原体の複製を促進するように思われる。異種DNAのメガレプリケータ領域またはそのごく近くへの組み込みによって、メガ塩基サイズの染色体部分の大量増幅が開始し、それによって生存細胞においてデノボ染色体形成が起こるようになる。

好ましいメガレプリケータを提供するDNA配列は、リボソームRNA（rRNA）を生じるrDNA単位である。哺乳動物、特にマウスおよびヒトでは、そのrDNA単位には複製源（またはマウスにおける二方向複製源、すなわちOBR）ならびに増幅促進配列（APS）および増幅制御要素（ACE）などの特殊化要素がある（例えば、Gogel et al. (1996) *Chromosoma* 104:511-518; Coffman et al. (1993) *Exp. Cell. Res.* 209:123-132; Little et al. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13:6600-6613; Yoon et al. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:2482-2489; Gonzalez and Sylvester (1995) *Genomics* 27:320-328; Miesfeld and Arnheim (1982) *Nuc. Acids Res.* 10:3933-3949; Maden et al. (1987) *Biochem. J.* 246:519-527参照）。

20

上記のように、理論は別として、これらの特殊化要素は、細胞における本明細書に記載のような染色体のデノボ形成で、メガ塩基の大きさの染色体部分の複製および／または増幅を促進することができる。これらの特殊化要素は代表的には、rDNAの転写領域の上流にある非転写遺伝子間スペース領域にある。遺伝子間スペース領域はそれ自体、縦列に反復したブロックおよび非縦列ブロックとして分類することができる反復配列を内部に有し得るものである（Gonzalez and Sylvester (1995) *Genomics* 27:320-328参照）。マウスrDNAでは、二方向複製源は、転写開始部位の約1.6 kb上流を中心とする3 kbの開始ゾーン内に認めることができる（例えば、Gogel et al. (1996) *Chromosoma* 104:511-518参照）。これらの特殊化要素の配列は、例えばヌクレアーゼ過敏または曲がったDNA構造を生じ得るAT豊富領域の存在によって検出可能な、変化した染色質構造を有する傾向がある。複製源を含む配列の例が、ほぼ位置2430～5435で配列番号16およびGENBANK受託番号X82564に示してある。増幅促進配列を含む配列の例としては、配列番号16のヌクレオチド690～1060および1105～1530などがある。ヒトrDNAでは、一次複製開始部位は、転写領域上流の数キロ塩基対に認められ、二次開始部位は、非転写遺伝子間スペース領域全体に認められる（例えば、Yoon et al. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:2482-2489参照）。完全なヒトrDNA反復単位は、GENBANKに受託番号U13369で示されており、本明細書では配列番号17に示してある。複製開始部位を含む別の配列例は、配列番号17のヌクレオチド35355～42486の配列内、特にはヌクレオチド37912～42486の配列内、さらに詳細には配列番号17のヌクレオチド37912～39288の配列内にある（Coffman et al. (1993) *Exp. Cell Res.* 209:123-132参照）。

30

40

MACを含む細胞系は、細胞、好ましくは安定な細胞系を、選択可能なマーカーをコードする異種DNA断片で形質転換し；選択条件下に培養し；多動原体染色体、好ましくは二動原体染色体を有する細胞を確認することで得ることができる。その細胞を次に、本明細

50

書に記載の方法に従って操作して、本明細書に記載のようなミニ染色体および他のM A C、特には異質染色質S A T A Cを生成することができる。

多動原体染色体、特には二動原体染色体の形成は、挟動原体異質染色質、好ましくはr D N A配列を有する染色体の動原体領域における異質D N Aの組み込みによって行われるのが普通である。そこで、取り込みの頻度は、選択可能なマーカーをコードする異種断片におけるr D N Aまたは付随D N Aなどの（これらに限定されるものではないが）D N A等によって、それらの領域を標的とすることで上昇させることができる。異種D N Aを挟動原体異質染色質に向かわせるための好ましい標的配列には、r R N A遺伝子を有する染色体の動原体領域を標的とするr D N A配列がある。そのような配列には、配列番号1 6およびG E N B A N K受託番号X 8 2 5 6 4のD N Aおよびその一部、配列番号1 7およびG E N B A N K受託番号U 1 3 3 6 9のD N Aおよびその部分、配列番号1 8～2 4のD N Aなどがあるが、これらに限定されるものではない。異種D N Aを染色体r D N Aに組み込む上で使用される配列番号1 6内からのD N Aを組み込む特定ベクターは、p T E R P U Dである（実施例1 2参照）。付随D N A配列を用いて、異種D N Aを挟動原体異質染色質に組み込むこともできる。例えば、マウスおよびヒトの付随D N Aをそれぞれ有するベクターp T E M P U Dおよびp H A S P U Dが、デノボ人工染色体形成のために異種D N Aを細胞に導入するためのベクター例として本明細書にある（実施例1 2参照）。

次に、得られた細胞系を本発明で例示の細胞同様に処理して、二動原体染色体が断片化した細胞を得ることができる。次に、その細胞を用いて、別の選択的マーカーを断片化二動原体染色体（すなわち、元二動原体染色体）に導入して、挟動原体異質染色質を増幅して、異種染色質染色体を得ることができる。

以下の考察では、E C 3 / 7細胞系と得られる細胞を参照して、このプロセスについて説明する。他の細胞、特に細胞系に対して同じ手順を適用して、S A T A Cおよび真正動原体ミニ染色体を得ることができる。

2. デノボ染色体の形成

ヒトおよび細菌のD N Aを有するλ構築物[λ C M 8およびλ g t W E S n e o]の同時組み込み後の形質転換マウスL M T K⁻線維芽細胞系[E C 3 / 7]でのデノボ動原体形成[Hadlaczky et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:8106-8110および米国特許出願0 8 / 3 7 5 2 7 1号参照]が報告されている。「異種」操作ヒト、細菌およびファージD N Aの組み込みと、その後のマウスおよび異種D N Aの増幅による二動原体染色体形成が、マウス染色体の短腕の動原体領域で起こった。G分染によって、この染色体はマウス7番染色体であることが確認された。同じ染色体上に2個の機能的に活性な動原体が存在することから、動原体間では一定の切断が起こる。そのような特異的染色体切断によって、n e o-動原体を有する染色体断片が認められるようになった（細胞の約1 0 %で）。

E C 3 / 7細胞系[受託番号9 0 0 5 1 0 0 1でEuropean Collection of Animal Cell Culture（以下E C A C Cと称する）に寄託された米国特許5 2 8 8 6 2 5号参照；Hadlaczky et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:8106-8110および米国特許出願0 8 / 3 7 5 2 7 1号ならびに相当する公開欧州出願E P 0 4 7 3 2 5 3号も参照]から、2つの亜細胞系[E C 3 / 7 C 5およびE C 3 / 7 C 6]を反復単一細胞クローニングによって選別した。これらの細胞系では、n e o-動原体は専らミニ染色体[n e o-ミニ染色体]で認められたが、元二動原体染色体には「異種」D N Aの痕跡を有していた。

現在、動原体の異質染色質領域への選択可能マーカーをコードするD N Aの組み込みによって二動原体染色体が形成されたことがわかっている。

3. n e o-ミニ染色体

n e o-動原体をマウス染色体から分離するE C 3 / 7細胞での染色体切断がGバンド陽性「異種」D N A領域で起こった。これは、元二動原体染色体の切断末端に入およびヒトD N A配列の痕跡が認められたことで裏付けられる。n e o-動原体を有する染色体断片のGバンドパターンを安定なn e o-ミニ染色体のものと比較することで、n e o-ミニ染色体が、n e o-動原体を有する染色体断片の反転複製物であることが明らかである。

これは、neoミニ染色体が機能性動原体1個のみを有するが、ミニ染色体のいずれの末端も異質染色性であり、in situハイブリダイゼーションによって、これらの異質染色性領域においてマウス付随DNA配列が認められたことで裏付けられる。

例示の実施例ではλDNAおよびネオマイシン耐性遺伝子である異種DNAの複数反復単位を有するミニ染色体を含むマウス細胞を、細胞形質転換における受容細胞として用いることができる。ハイグロマイシン (hygromycin) 耐性を与えるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ [hyg] をコードする遺伝子などの第2の選択可能マーカーに連結されたλDNAを有する特定の異種DNAなどのドナーDNAをマウス細胞に導入し、ドナーDNA中のλDNAをミニ染色体におけるものと相同的に組み換えることで、ミニ染色体に組み込むことができる。組み込みは、in situハイブリダイゼーションおよびサザン
10
ブロッティング分析によって確認される。異種DNAの転写および翻訳は、プライマー延長および免疫ブロッティング分析によって確認される。

例えば、やはりハイグロマイシン耐性をコードするDNAおよびサイトメガロウイルス [CMV] 初期プロモーターなどのプロモーターに連結したRenillaルシフェラーゼ遺伝子ならびに細菌性ネオマイシン耐性コードDNAを含有するλDNA構築物 [pNem1ruc] を用いて、EC3/7C5細胞で、DNAがneoミニ染色体に導入されている。特定の細胞 [PHN4と称される] における染色体へのドナーDNAの組み込みが、核酸増幅 [PCR] およびin situハイブリダイゼーションによって確認されている。neoミニ染色体を生じると考えられる事象を図1に描いてある。

異種DNAを含む得られた遺伝子操作ミニ染色体は次に、チャイニーズハムスター卵巣細胞 [CHO] などの受容細胞系への細胞融合によって転移させることができ、異種DNAの正しい発現を確認することができる。細胞生産に続いて、例えばコルヒチンを加えることで中期染色体を得て、二重レーザー光に基づくセルソーターでAT特異染料およびGC特異染料を加えることで染色体を精製する（人工染色体の単離方法の説明については、実施例10B参照）。純度95%以上の分取量の染色体 [染色体 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ 個/mL] が得られる。得られた染色体を用いて、微量注入およびリポソーム介在転移などの方法によって、細胞に導入する。

そうして、neoミニ染色体は細胞中で安定に維持され、自己複製し、非選択的培養条件下でneo遺伝子の持続的な長期発現を可能とする。それはさらに、対象DNAの相同的組み換えおよび組み込みのための標的部として役立つメガ塩基の公知の異種DNA [例示の実施態様におけるλDNA] も有する。そこでneoミニ染色体は、細胞の遺伝子操作のためのベクターとなる。それをSCIDマウスに導入したところ、内因性染色体と同様に複製することが明らかになっている。

本発明の方法は、選択的マーカー [好ましくは、優性の選択可能マーカー] を有する異種DNAを細胞に導入し、選択条件下にその細胞を培養することで、neoミニ染色体を形成する事象を誘発する手段を提供するものである。結果的に、増幅によって生じる多動原体染色体（例えば二動原体染色体）およびその断片を有する細胞が得られる。次に、二動原体染色体を有する細胞を、BrdUなどの薬剤で処理するおよび/あるいは選択条件下で培養することで染色体を不安定化させて、二動原体染色体が2個の染色体を生成する細胞を得ることができる。その2個の染色体は、いわゆるミニ染色体と元二動原体染色体であり、後者は通常、異種DNAが組み込まれた異種染色質中で増幅されて、SATACまたはソーセージ染色体を与える [これについては後述する]。その細胞を他の細胞と融合させて、ミニ染色体を元二動原体染色体から分離して別の細胞に導入して、各種類のMACを別個に操作することができる。

4. SATACの製造

SATAC製造のためのプロトコル例を図2 [特にD、EおよびF] および図3 [実施例、特に実施例4～7も参照] に図示してある。

SATACを得るには、出発原料は細胞、好ましくは線維芽細胞系などの安定な細胞系および選択的マーカーをコードするDNAを含むDNA断片である。リン酸カルシウムを用いる直接取り込み、エレクトロポレーションおよび脂質介在転移などの（これらに限定さ
40
50

れるものではないが) DNA転移方法によって、DNA断片を細胞に導入する。異質染色質におけるDNA断片の組み込みを確実に行うには、λCM8ならびに付随DNAを含むpTEMPUD [図5] およびpHASPUD [実施例12参照] のような本発明で提供されるベクターなどの染色体の挟動原体異質染色質領域に、あるいは具体的にはrDNA配列を有する染色体の動原体領域におけるrDNAに導入されるDNAを原料とするのが好ましい。DNAを導入した後、細胞を選択条件下で成長させる。得られた細胞について調べて、多動原体染色体、特に二動原体染色体 [または異質染色質染色体またはソーセージ染色体その他のそのような構造; 図2D、2Eおよび2F参照] を選別する。

詳細には、二動原体染色体を有する細胞を選別した場合、それを選択条件下で成長させることができるか、あるいは好ましくは、第2の選択可能マーカーをコードする別のDNAを導入し、その第2のマーカーに対して選択的な条件下に細胞を成長させる。得られた細胞には、図2D、2Eおよび2Fに図示したものと同様の構造を有する染色体が含まれているはずである。図2Dのソーセージ染色体のような構造を有する細胞を選別し、第2の細胞系と融合させて、対象外の他の染色体を除去することができる。所望に応じて、他の染色体を有する細胞を選別し、本明細書に記載の方法に従って処理することができる。ソーセージ染色体を有する細胞を選別した場合、それをBrdUなどの薬剤で処理して、染色体を不安定化させて、異質染色質腕が実質的に異質染色性である染色体 [すなわち、メガ染色体。図2F参照] を形成するようにすることができる。異質染色質腕を増殖したがneo染色質腕から切り離していないギガ染色体などの構造も認められる。メガ染色体は安定な染色体である。融合および選択条件下での増殖および/またはBrdU処理その他のそのような処理等のさらなる操作を行って、メガ染色体の断片化を行って、基本的反復単位としてアンプリコンを有する相対的に小さい染色体を形成することができる。

pTEMPUD [図5および実施例12参照]、pHASPUDまたはpTERPUD (実施例12参照) などの染色体断片化ベクターを用いてメガ染色体をin vivoでさらに断片化して、最終的に、1~4個のメガレプリコンを含む約15Mb~60Mbの相対的に小さい安定な複製可能単位を有する染色体を得ることができる。

そうして、マウス7番染色体の短腕由来のデノボ生成した安定な染色体を分析した。この染色体領域は、大きい染色体部分の増幅能力を示し、デノボ染色体生成を促進する。同じ染色体領域での大量増幅によって、二動原体および多動原体染色体、ミニ染色体、150~200Mbの大きさのλneo染色体、「ソーセージ」染色体、500~1000Mbギガ染色体および安定な250~400Mbメガ染色体が生成する。

メガ染色体の腕に沿って明らかな分断が認められ、分析によって、この染色体の構成単位は、両末端に組み込まれた「外来」DNA配列を有するマウスの主要付随DNAから構成される約30Mbのアンプリコンであることが明らかになっている。その約30Mbアンプリコンは、約7.5Mbのマウス主要付随DNAブロックからなる2個の約15Mbの反転二重線からなり、それらは非付随配列の狭い帯によって互いに分離されている [例えば図3参照]。アンプリコンの境界にある比較的広い非付随領域には組み込まれた外来 [異質] DNAがあるが、アンプリコン内の非付随DNA配列の狭い帯は、マウス染色体の挟動原体異質染色質の重要な部分である。これらの結果は、非付随DNAに隣接する約7.5Mbのブロックがマウス染色体の挟動原体異質染色質の構成単位であり、マウス染色体の約15Mbの大きさの挟動原体領域には2個の約7.5Mb単位があることを示している。

真正染色質末端部分は別として、メガ染色体全体は異質染色性であり、構造的に均一である。従って、この大きい染色体は、増幅プロセスについてのデータを得る上で、さらには異種DNAにおけるベクターとしておよびさらなる断片化における標的として挟動原体構成異質染色質のいくつかの基本的特徴を分析する上で、ユニークな可能性を提供するものである。

本明細書に示すように、この現象は普遍的に起こるもので、他の染色体でも認めることができる。さらに、これらのデノボ生成染色体部分および染色体は外観は異なっているが、同様の増幅機序がその生成においてある役割を果たしている。すなわち、(i) 各場合に

10

20

30

40

50

において、増幅はマウス染色体の動原体領域で開始し、大きい (Mb の大きさ) アンプリコンが生成する。(i i) マウスの主要付随 DNA 配列は、異質染色質アンプリコンの大部分を提供するか [H 型増幅]、あるいは真正染色質アンプリコンに境界を設ける [E 型増幅] ことで、アンプリコンの一定の構成要素となる。(i i i) 反転部分の生成を、 λ neo-染色体およびメガ染色体で示すことができる。(i v) 増幅によって形成される染色体腕および染色体は、安定かつ機能性である。

反転染色体断片が存在することは、マウス 7 番染色体の動原体領域でデノボで形成される染色体において一般に見られると考えられる。neo-ミニ染色体生成の際、neo-動原体を有するマウス 7 番染色体の遠位部分の安定化を生じる事象が、その反転複製物の形成であった。メガ染色体のアンプリコンは、約 7.5 Mb のマウス主要付随 DNA ブロッ

10

5. 細胞系

ミニ染色体、 λ neo-染色体および SATAC などの MAC を有する細胞系が本発明で提供されるか、あるいはそれを本発明の方法によって得ることができる。このような細胞系は、これら染色体の簡便な入手源を提供するものであり、細胞融合または特定細胞系との融合における微小核体の生産などによって操作して、対象とする染色体をハイブリッド細胞系に導入することができる。本明細書では細胞系の例を記載しており、一部は E C A C C に寄託されている。

a. E C 3 / 7 C 5 および E C 3 / 7 C 6

細胞系 E C 3 / 7 C 5 および E C 3 / 7 C 6 を、E C 3 / 7 の単一細胞クローニングによって得た。例を挙げると E C 3 / 7 C 5 は E C A C C に寄託されている。これらの細胞系には、E C 3 / 7 からのミニ染色体および元二動原体染色体が含まれている。細胞系 E C 3 / 7 C 5 および E C 3 / 7 C 6 における安定なミニ染色体は同一であるように思われ、それらは二動原体染色体の約 10 ~ 15 Mb の「分裂」断片の複製誘導体であるように思われる。これらの独立に得られた細胞系でそれらの大きさが同様であることは、約 20 ~ 30 Mb が、安定なミニ染色体の最小または最小に近い物理的大きさであることを示していると考えられる。

20

b. T F 1 0 0 4 G 1 9

第 2 の選択可能マーカー、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (すなわち、ハイグロマイシン耐性遺伝子) および検出可能なマーカー β -ガラクトシダーゼ (すなわち、lacZ 遺伝子) をコードする DNA などの別の異種 DNA を E C 3 / 7 C 5 細胞系に導入し、選択条件下に増殖させて、T F 1 0 0 4 G 1 9 と称する細胞を得た。詳細にはこの細胞系は、抗 H I V リボザイム (ribozyme) およびハイグロマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド p H 1 3 2、p C H 1 1 0 [β -ガラクトシダーゼをコード] および λ ファージ [λ c l 8 7 5 S a m 7] DNA との共トランスフェクションおよびハイグロマイシン B による選別によって、E C 3 / 7 C 5 細胞系から得られた。

30

λ ファージおよびプラスミド DNA 配列を用いた in situ ハイブリダイゼーションによる T F 1 0 0 4 G 1 9 細胞系の詳細な分析により、ソーセージ染色体の形成が明らかになった。E C 3 / 7 C 5 細胞系の元二動原体染色体を別の末端動原体染色体の末端に転座させた。異種 DNA を元二動原体染色体の狭異質染色質に組み込み、メガ塩基のマウス挟動原体異質染色質付随 DNA 配列 [図 2 D] を用いて数回増幅して、「ソーセージ」染色体を得る。その後、末端動原体マウス染色体を真正染色質末端小粒によって置換した。

40

ハイグロマイシン耐性遺伝子および β -ガラクトシダーゼ遺伝子のビチオン標識した小断片を用いた in situ ハイブリダイゼーションによって、ソーセージ染色体の異質染色質腕のみにハイブリッド信号が生じ、T F 1 0 0 4 G 1 9 形質転換細胞では、これらの遺伝子が挟動原体異質染色質に局在していることが示された。

しかしながら、高レベルの遺伝子発現が検出された。異質染色質はショウジョウバエ、酵母で、さらにはマウス動原体で付随 DNA に導入された H S V - t k 遺伝子に対して沈黙効果を有する。そこで、T F 1 0 0 4 G 1 9 形質転換細胞系を調べて、異質細胞質に局在する遺伝子が一般に認められている定説とは対照的に実際に発現したことが確認されたこ

50

とは興味深いものであった。

それに関して、異なるソーセージ染色体 [図 2 D 参照] を有する T F 1 0 0 4 G 1 9 のサブクローンを単一細胞クローニングによって得た。ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子と l a c Z 遺伝子の小断片を有するサブクローンから単離された D N A のサザンハイブリダイゼーションから、ハイブリダイゼーションの強さとソーセージ染色体の長さとの間に密接な相関関係があることが明らかになった。この所見は、これらの遺伝子がソーセージ染色体の異質染色質腕に局在するという結論を裏付けるものである。

(1) T F 1 0 0 4 G - 1 9 C 5

T F 1 0 0 4 F - 1 9 C 5 は、n e o - ミニ染色体および安定な「ソーセージ」染色体を含むマウス L M T K 線維芽細胞系である。それは、T F 1 0 0 4 G 1 9 のサブクローンであり、T F 1 0 0 4 G 1 9 細胞系の単一細胞クローニングによって形成されたものである。それは、細胞系の例およびソーセージ染色体源の例として E C A C C に寄託してある。その後、この細胞系と C H O K 2 0 細胞との融合を行い、ハイグロマイシンおよび G 4 1 8 および H A T (ヒポキサンチン、アミノプテリア (aminopteria) およびチミジン培地; Szybalski et al. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. 48:2026 参照) による選別を行って、ソーセージ染色体と n e o - ミニ染色体を有するハイブリッド細胞 (1 9 C 5 × H a 4 と称する) を得た。ハイブリッド細胞の B r d U 処理とそれに続く単一細胞クローニングおよび G 4 1 8 および / またはハイグロマイシンによる選別によって、G B 4 3 および G 3 D 5 などの対象とする染色体を有する各種細胞を得た。

(2) 他のサブクローン

1 9 C 5 × H a 4 細胞を B r d U 処理し、次に G 4 1 8 を含有する選択培地で成長させ、B r d U で再度処理することで、細胞系 G B 4 3 および G 3 D 5 を得た。その 2 つの細胞系を、所定細胞の単一細胞クローニングによって単離した。G B 4 3 細胞には n e o - ミニ染色体のみが含まれている。E C A C C に寄託した G 3 D 5 には、n e o - ミニ染色体およびメガ染色体がある。この細胞系を単一細胞クローニングし、次にサブクローンを G 4 1 8 およびハイグロマイシンを含む培地で成長させて、n e o - ミニ染色体およびメガ染色体を有する G H B 4 2 細胞系などのサブクローンを得た。H 1 D 3 は、メガ染色体を有するが、n e o - ミニ染色体を持たないマウス - ハムスターハイブリッド細胞系であり、1 9 C 5 × H a 4 細胞を B r d U で処理し、次にハイグロマイシンを含む選択培地で増殖させ、特定細胞の単一細胞サブクローニングを行って得た。この細胞系を、やはり別の選択 (selection) 遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子をコードする D N A を有する C D 4⁺ H e L a 細胞系と融合させて、メガ染色体と C D 4 n e o を有するヒト染色体を持った細胞 [H 1 × H E 4 1 細胞] を生成した。さらに B r d U 処理を行い、単一細胞クローニングを行うことで、切断メガ染色体を有する細胞を含む 1 B 3 などの細胞系を得た。

5. 細胞の転換に使用する D N A 構築物

染色体製造時のいずれかの段階で、トランスフェクションその他の適切な方法によって、異種 D N A を細胞に導入することができる [例えば図 4 参照]。一般に、そのような D N A の M A C への導入は、異種 D N A での λ - D N A の封入 (例示の染色体について)、および別の選択的マーカー遺伝子によって行うことができるように、部位指向性組み込みによって確保される。例えば、ミニ染色体または S A T A C などの M A C を含む細胞は、H I V リボザイムをコードする D N A、嚢胞性線維症遺伝子およびハイグロマイシン耐性などの第 2 の選択可能マーカーをコードする D N A 等の所望の異種 D N A を有するプラスミドと共トランスフェクションすることができる。次に、新たな選択可能マーカーを発現しない細胞には有害である薬剤に細胞を曝露することで、細胞に選択圧をかける。そのようにして、異種 D N A を M A C に封入した細胞が確認される。第 2 の細胞系との融合によって、一つの特定の種類の染色体構造または M A C を有する細胞系を形成する手段を提供することができる。

本発明ではそのための各種ベクターが提供され [実施例参照]、他のものは容易に構築することができる。そのベクターは好ましくは、M A C 内に含まれる D N A に対して相同性の D N A を有することで、D N A を M A C に向かわせて、そこに組み込むようにする。そ

10

20

30

40

50

のベクターにはさらに、選択可能マーカー遺伝子および対象となる特定の異種遺伝子もある。本明細書の開示および当業者の知識に基づいて、当業者はそのようなベクターを構築することができる。

DNAを特定染色体の異質染色質領域に組み込むことができるベクター pTEMPUDとその誘導体が、ここでは特に興味深い。これらのベクターはまた、断片化ベクターとしても役立ち得る〔例えば、実施例12参照〕。

対象とする異種遺伝子には、治療効果のある物質をコードする遺伝子ならびに対象とする遺伝子生成物をコードするDNAなどがある。これらの遺伝子およびDNAには、嚢胞性線維症遺伝子〔CF〕、嚢胞性線維症膜貫通調節蛋白質（CFTR）遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない（米国特許5240846号；Rosenfeld et al.(1992)Cell 68:143-155；Hyde et al.(1993)Nature 362:250-255；Kerem et al.(1989)Science 245:1073-1080；Riordan et al.(1988)Science 245:1066-1072；Rommens et al.(1989)Science 245:1059-1065；Osborne et al.(1991)Am.J.Hum.Genetics 48:6989-6122；White et al.(1990)Nature 344:665-667；Dean et al.(1990)Cell 61:863-870；Erlich et al.(1991)Science 252:1643；ならびに米国特許5453357号、5449604号、5434086号および5240846号（正常なCFTR遺伝子をコードするレトロウィルスベクターを提供）など参照）。

B. 人工染色体の単離

本発明で提供されるMACは、当業者に公知の好適な方法によって単離することができる。さらに、本発明では、特にSATACのかんりの精製を行う方法が提供される。SATACは、蛍光活性化細胞選択〔FACS〕によって単離されている。この方法は、高い異質染色質DNA含量により、細胞中の他の染色体とは異なるSATACのヌクレオチド塩基含有量を利用するものである。特定の実施態様では、中期染色体を単離し、ヘキスト（Hoechst）33258およびクロモマイシンA3などの塩基特異的染料で染色する。蛍光活性化細胞選択は、SATACを内因性染色体と分けるものである。2つのレーザーが染料を別個に励起するよう設定されている二重レーザー細胞選択機〔FACS Vantage Becton Dickinson Immunocytometry Systems〕によって、塩基対の組成および大きさごとに染色体の二変量分析を行うことができた。そのようなSATACを含む細胞を同様に選別することができる。

内因性染色体から人工染色体を単離する本発明で提供される別の方法には、SATACなどの人工染色体の大量単離に特に好適な方法などがある。その方法では、SATACと内因性染色体との間の大きさおよび密度の差を利用して、それらの2種類の染色体を分離する。そのような方法には、スウィングバケット（swinging bucket）遠心、ゾーン遠心および速度沈降などの方法が関与する。内因性染色体から人工染色体を分離するための親和性、特に免疫親和性に基づく方法も、本発明で提供される。例えば、主として異質染色質であるSATACは、ハムスター細胞におけるように、内因性染色体が比較的少ない異質染色質を含む場合に、特異的に異質染色質および／またはそれに関連する蛋白を認識する抗体が関与する免疫親和性法によって、内因性染色体から分離することができる。

C. 人工染色体のin vitro構築

人工染色体は、細胞における安定な複製および分離を内因性染色体とともに行うことができる完全染色体に寄与する構造的および機能的要素を組み立てることで、in vitroで構築することができる。共同で機能性染色体を生じる別個の要素を確認することで、人工染色体のin vitro形成が可能となった。嚴重に制御可能な人工染色体のin vitro構築のプロセスは、例えば大量に必要な染色体または遺伝子導入動物系での特定用途に向けた染色体の形成において望まれる利点を提供するものである。

例えば、in vitro構築は、時間および規模の効率が人工染色体製造において重要な考慮事項である場合に有利であると考えられる。in vitro構築法には広範囲の細胞培養法が関与しないことから、in vivoの細胞に基づく生産系で使用される細胞を形質転換、供給、培養および回収するのに必要な時間および労力が使えない場合に、それらを利用することができる。

10

20

30

40

50

in vitro構築は、所望の人工染色体のいくつかの要素を組み合わせる正確な方法、ならびにそれらを組み立てて正確な規格の染色体を生成するのにどの配列および割合とするかに関して、厳しく制御することができる。これらの側面は、特定量の非常に純粹かつ特異的なDNA配列のみが宿主動物に導入されるようにすることが望ましい生存動物で使用される人工染色体の製造において重要であると考えられる。

以下に、出発原料の例としてメガ染色体を利用して、in vitroで人工染色体の構築に関する方法について説明する。

1. 人工染色体の成分の確認および単離

本発明で提供されるMAC、特にSATACは、人工染色体のin vitro構築で使用される成分の確認および単離で使用するのに好都合な簡単な染色体である。本明細書に記載のよう
10
に、非常に高レベルの純度までMACを精製する能力により、これらの用途での使用が促進される。例えば、メガ染色体、特にはその切断型〔すなわち、H1D3（受託番号96040929下にEuropean Collection of Animal Cell Culture(ECACC)に寄託したもの；以下の実施例参照）由来の1B3およびmM2C1等の細胞系〕は原料として役立つ。

例えば、mM2C1細胞系には、有利には1個のみの動原体、隣接するrDNA配列を有する組み込み異種DNAの2つの領域があり、染色体DNAの残りはマウスの主要付随DNAであるミクロメガ染色体（約50～60k B）を有する。他の切断メガ染色体は、末端小粒源として役立ち得るか、あるいは末端小粒が提供できる（縦列の反復末端小粒配列を有するプラスミドの構築に関しては、下記の実施例参照）。mM2C1細胞系の動原体
20
は、マウスの少量付随DNAを含み、それが動原体DNAの単離において有用な標識を提供する。

mM2C1細胞系のミクロメガ染色体などの本発明で提供される特定SATACの別の特徴で、それらSATACを染色体成分の単離および確認における出発原料として役立つよう特に適合させるものとしては、単一の特異的細胞系内の各メガ染色体の動原体が同一であるという事実である。均一な動原体源を用いて開始できることで（異なる動原体配列を有する異なった染色体の混合物とは対照的に）、動原体DNAのクローニングは非常に促進される。適切な制限エンドヌクレアーゼを用いての精製メガ染色体、特にミクロメガ染色体などの切断メガ染色体を消化し、市販で公知のYACベクター（例えば、Burke et al.(1987)Science 236:806-812参照）、BACベクター（例えば、Shizuya et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:8794-8797（0.9～1MbのDNAを組み込む能力を有する細菌人工染色体）参照）またはPACベクター（300kbのDNAを組み込む能力を有し、バクテリオファージパッケージング（packaging）ではなくエレクトロポレーションによって大腸菌宿主細胞に導入されるP1人工染色体ベクター；例えば、Ioannou et al.(1994)Nature Genetics 6:84-89；Pierce et al.(1992)Meth.Enzymol.216:549-574；Pierce et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:2056-2060；米国特許5300431号および国際PCT出願WO92/14819号参照）に断片をクローニングすることで、
30
わずか50個のクローンがミクロメガ染色体全体を代表することができる。

a. 動原体

哺乳動物人工染色体の構築に使用される動原体の例には、例えばH1D3などの本発明で
40
提供される含メガ染色体細胞系およびmM2C1細胞などのその誘導体のメガ染色体内に含まれるものがある。メガ染色体は、例えば本明細書に記載の手順を利用してそのような細胞系から単離され、動原体配列はその単離メガ染色体から抽出される。例えばメガ染色体は、例えば主として複製部位および／または異種DNA組み込み部位および／または付随DNAにある部位で認識および切断する特定の制限エンドヌクレアーゼを利用して、断片に分離することができる。得られた断片の大きさに基づいて、含動原体配列から、ある種の望ましくない要素を分離することができる。含動原体DNAは、1Mb程度の大きさであると考えられる。

マウスの付随DNAに基づくプローブ〔例えば、Wong et al.(1988)Nucl.Acids Res.16:11645-11661参照〕などの動原体配列を特異的に認識するプローブを用いて、メガ染色体由
50

来の含動原体YAC、BACまたはPACクローンを単離することができる。別法にて、あるいは含動原体メガ染色体DNAの直接確認を併用して、マウスの主要付随DNA、異種DNAおよび／またはrDNAに特異的なプローブなどの非動原体要素を特異的に認識するプローブを用いて、含非動原体DNAクローンを確認・除去することができる。

さらに、本明細書に記載の動原体クローニング法を利用して、メガ染色体の含動原体配列を単離することができる。例えば実施例12には、動原体配列の確認のために、マウスチロシナーゼ遺伝子およびNMR1/Hanマウスとの併用でYACベクターを使用することが記載されている。

動原体断片を単離したら、その配列決定を行い、次にその配列データを、メガ染色体その他の動原体源からの動原体配列のPCR増幅に使用することができる。単離された動原体について、DNAを宿主哺乳動物細胞に転移させることで、in vivoでの機能を調べることもできる。機能分析には例えば、動原体配列が動原体結合蛋白に結合する能力の検査などがあり得る。クローニングされた動原体は、選択可能マーカー遺伝子を有する哺乳動物細胞に転移され、抗動原体抗体などの動原体特異蛋白（例えばLU851; Hadlaczký et al. (1986) *Exp. Cell Res.* 167:1-15参照）の結合を用いて、動原体の機能を評価することができる。

10

b. 末端小粒

好ましい末端小粒は、本発明で提供される1kB合成末端小粒である（実施例参照）。変わりに反転配向のままである優性な選択可能マーカー遺伝子に連結した1kB合成末端小粒を含む二重合成末端小粒構成物を用いて、操作しやすくすることができる。そのような二重構造物には、マーカー遺伝子の一連のTTAGGG反復3'と反転配列の一連の反復、すなわちGGGATTであるマーカー遺伝子の5'を、(GGGATT)_n---優性マーカー遺伝子---(TTAGGG)_nのように有する。適切に配向した断片のみを選択することから、反転マーカーの使用により、例えば平滑末端連結による等の簡単な挿入方法が提供される。

20

c. メガレプリケータ

本発明で提供されるrDNAなどのメガレプリケータ配列は、in vitro構築物での使用で好ましい。rDNAは複製源を提供し、in vivoでの人工染色体の増幅を促進して染色体を大きくし、例えば、対象とする異種遺伝子のコピーを多く有し、その異種遺伝子を連続的に高レベルで発現する配列も提供する。

d. 充填異質染色質

充填異質染色質、特に付随DNAを含有させて、人工染色体の構造的完全性および安定性を維持し、染色体内に遺伝子を有するための構造的基礎を提供する。付随DNAは、マウス主要付随DNAなどのA/T豊富DNA配列またはハムスター天然付随DNAなどのG/C豊富DNA配列であるのが普通である。そのようなDNA源には、十分なA/TもしくはG/C組成を有する非コード付随DNAを有して、FACSまたは密度勾配などによって、配列ごとの容易な分離を促進する真核生物などがある。付随DNAはさらに、非常にA/TもしくはG/C豊富なDNA単位の単調な縦列反復を含む配列を形成することで合成することもできる。

30

人工染色体の構築に使用される充填異質染色質の最も好適な量は、例えば大きさを増しながら構築プロセスに各種長さの部分を含めることで、経験的に求めることができる。小さすぎて使用には適さない断片は、細胞に基づく発現試験で評価できる機能性染色体を提供しないか、あるいは機能の寿命または有糸分裂および構造の安定性が限られた染色体を生じる。

40

e. 選択可能マーカー

簡便な選択可能マーカーを、MACの簡便な座で用いることができる。

2. 単離染色体要素の組み合わせ

単離要素を得たら、それらを組み合わせて、完全で機能的な人工染色体を形成する。この組立は、例えば溶接、LMPアガロースまたはマイクロビーズでin vitro連結を行うことができる。連結を行って、動原体の一端が末端小粒に直接結合するようにする。遺伝子保有染色体腕として機能する動原体の他端は、付随DNAとrDNA配列の組み合わせから

50

形成され、やはり選択可能マーカー遺伝子を有することができる。別の末端小粒は、遺伝子保有染色体腕の末端に結合される。遺伝子保有腕とは、例えばそれによってコードされた所望の蛋白の発現で、対象の異種遺伝子が染色体の *in vitro* 構築時またはその後のいずれかの時点で組み込まれる部位である。

3. 人工染色体の分析および試験

in vitro で構築された人工染色体は、S A T A C、ミニ染色体について本明細書に記載の方法、または当業者に公知の方法のいずれかを用いて、*in vivo* の哺乳動物細胞系で機能性を調べることができる。

4. *in vitro* 合成染色体への所望の異種 DNA の導入

異種 DNA は、分子生物学の常法を用いて *in vitro* 合成染色体に導入することができ、S A T A C について本明細書に記載の方法を用いて導入することができ、あるいは異質染色質などの合成要素の一つの一部として、*in vitro* 合成染色体に組み込むことができる。異種 DNA は、特定の反復断片に連結することができ、次に得られた構築物は、本発明で提供されるような *in vitro* 増幅法を用いて *in vitro* で増幅することができる（実施例参照）。

D. 細胞、組織、動物および植物への人工染色体の導入

本発明で提供される M A C の導入に好適な宿主には、動物もしくは植物、それらの細胞もしくは組織などであるが、これらに限定されるものではなく、例としては、哺乳動物、鳥、は虫類、両生類、昆虫、魚、蜘蛛、タバコ、トマト、小麦、植物およびソウ類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。細胞に含まれる場合、M A C は細胞融合もしくは微小核体融合によって導入することができる。あるいは M A C が細胞から単離されている場合、直接 DNA 転移、エレクトロポレーション、脂質介在転移（例：リポフェクションおよびリポソーム）、微小粒子衝撃法（microprojectile bombardment）、細胞および胚での微量注入、原形質体の植物への再生および他の好適な方法など（これらに限定されるものではない）を含む当業者には公知の方法によって、これらは宿主細胞に導入することができる [例えば、Weissbach *et al.* (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, N.Y., Section VIII, pp. 421-463; Grierson *et al.* (1988) *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9 参照; さらに米国特許 5 4 9 1 0 7 5 号、5 4 8 2 9 2 8 号および 5 4 2 4 4 0 9 号も参照; 哺乳動物の分離細胞の粒子介在形質転換について記載した米国特許 5 4 7 0 7 0 8 号も参照]。

細胞に DNA を導入する他の方法には、核微量注入および無傷の細胞との細菌原形質体融合などがある。ポリブレンおよびポリオルニチンなどの多価カチオンも用いることができる。哺乳動物細胞の形質転換のための各種技術については、例えばケオウンらの報告 (Keown *et al.* *Methods in Enzymology* (1990) vol. 185, pp. 527-537) およびマンソールらの報告 (Mansour *et al.* (1988) *Nature* 336:348-352) を参照する。

例えば、単離・精製された人工染色体を、ヒト腎臓初期胚細胞系 [A T C C 受託番号 C R L 1 5 7 3] または胚幹細胞 [例えば、Hogan *et al.* (1994) *Manipulating the Mouse Embryo*, A: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 参照、特には 255-264 ページおよび添付資料 3 を参照] などの胎仔細胞系に注入することができる。

好ましくは、エッペンドルフ (Eppendorf) 自動微量注入システムなどのシステムを用いる微量注入によって染色体を導入し、ハイグロマイシン B またはネオマイシンの存在下等の選択条件下に成長させる。

1. 宿主への染色体の導入方法

使用する宿主細胞に応じて、そのような細胞に適した標準的方法を用いて形質転換を行う。その方法には、当業者には公知である以下に記載のものなどがある。

a. DNA 取り込み

細胞壁を持たない哺乳動物細胞の場合、異種 DNA 導入のためのリン酸カルシウム沈殿法が好ましい場合が多い [例えば、Graham *et al.* (1978) *Virology* 52:456-457; Wigler *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 1373-1376; および *Current Protocols in Molec*

10

20

30

40

50

ular Biology Vol.1, Wiley Inter-Science, Supplement 14, Unit 9.1.1-9.1.9(1990)参照)。DNA取り込みは、DNA単独でまたは融合剤であるポリエチレングリコール存在下に「PEG介在遺伝子転移」、あるいは当業者に公知のそのような方法の変法[例えば、米国特許4684611号参照]によって行うことができる。

細胞へのDNA導入の好ましい方法には脂質介在キャリア系もある[例えば、Teifel et al.(1995)Biotechniques 19:79-80; Albrecht et al.(1996)Ann.Hematol.72:73-79; Holm et al.(1995)In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.31:347-351; Remy et al.(1994)Bioconjug.Chem.5:647-654; Le Bolc'h et al.(1995)Tetrahedron Lett.36:6681-6684; Loeffler et al.(1993)Meth.Enzymol.217:599-618参照]。リポフェクション[例えば、Strauss(1996)Meth.Mol.Biol.54:307-327参照]を用いて、DNAを細胞に導入することもできる。

10

この方法は特に、ニワトリ細胞への外来DNAの転移に好適である(例えば、ニワトリ胚葉細胞および主要なニワトリ線維芽細胞; Brazolot et al.(1991)Mol.Repro.Dev.30:304-312参照)。詳細には、対象とするDNAを、リソチームおよび卵白アルブミンなどの遺伝子からのプロモータと機能的連結でニワトリに導入し、それを卵で発現させることによって、卵で異種DNAを発現させることができる。

細胞へのDNAの直接転移に有用な別の方法には、粒子銃電気融合[例えば、米国特許4955378号、4923814号、4476004号、4906576号および4441972号参照]およびビリオン介在遺伝子転移などがある。

陸上植物における遺伝子転移に対して一般に用いられるアプローチには、精製DNAの原形質体への直接導入が関与する。植物細胞への直接遺伝子転移の3つの基本的な方法には、1)ポリエチレングリコール「PEG」介在DNA取り込み、2)エレクトロポレーション介在DNA取り込みおよび3)微量注入などがある。さらに、超音波処理を行って、植物を形質転換させることができる[例えば、国際PCT出願公開WO91/00358号参照]。

20

b. エレクトロポレーション

エレクトロポレーションでは、原形質体と外来DNAとの混合物を含む溶液に高電圧の電気パルス印加して、植物原形質体および他の細胞の膜に可逆的な穴を設ける段階が関与する。エレクトロポレーションは、強固な細胞壁障壁を有する植物などの原核生物その他の細胞に用いられる[例えば、米国特許4784737号、5501967号、5501662号、5019034号、5503999号参照; さらには、Fromm et al.(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82:5824-5828も参照]。

30

例えば、エレクトロポレーションは多くの場合、植物の形質転換に使用される[例えば、Ag Biotechnology News 7:3および17(1990年9月/10月)参照]。この方法では、植物原形質体に対して、やはり表現型マーカーを含む対象DNAの存在下にエレクトロポレーションを行う。高電界強度の電気衝撃波が生体膜を可逆的に浸透性とすることで、プラスミドの導入を行うことができるようになる。エレクトロポレーションされた植物原形質体は細胞壁を修復し、分裂し、植物カルスを形成する。形質転換植物細胞は、発現される表現型マーカーによって確認される。外来DNAは、例えば露出した直線、環状もしくは超らせんDNA、リポソームに包み込まれたDNA、スフェロプラスト中のDNA、他の植物原形質体内のDNA、塩と複合体形成したDNAおよび他の方法などのいずれかの形で、原形質体に加えることができる。

40

c. 微小核体

人工染色体を含む微小核体を製造し、次に特定の標的細胞と融合させることで、染色体を転移させることができる。そのような微小核体の製造および融合の方法は公知である[実施例参照。さらには、米国特許5240840号、4806476号、5298429号、5396767号、Fournier(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:6349-6353; および Lambert et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:5907-59参照]。人工染色体を含む微小核体を用いた微小核体融合は、DT40ニワトリB前駆細胞などのトリ細胞へのMAC導入の特に有用な方法である[例えば、Dieken et al.(1996)Nature Genet.12:174-182参照]。

50

2. 宿主

好適な宿主には、異種DNAの導入および発現に有用であることが知られている宿主などがある。ここで特に興味深いものとしては、動物および植物の細胞および組織があり、それには昆虫の細胞および幼虫、植物および動物などがあり（これらに限定されるものではない）、特に遺伝子導入（人間以外）動物ならびに動物細胞がある。他の宿主には、哺乳動物、鳥（特にニワトリなどの家禽）、は虫類、両生類、昆虫、魚、蜘蛛、タバコ、トマト、小麦、単子葉植物、双子葉植物および藻類、ならびに異種DNAの導入が望ましいあらゆる宿主などがあるが、これらに限定されるものではない。そのような導入は、本発明で提供されるMACを用いて行うことができるか、あるいは必要に応じて、本発明で提供されるMACを用いて、生物固有の動原体および／または機能性染色体単位を確認し、次に得られた動原体もしくは染色体単位を人工染色体として用いるか、あるいは別法として、MACの製造に関して本明細書に例示の方法を行って生物固有の人工染色体を製造することで行うことができる。

10

a. 遺伝子導入（人間以外）動物生産のための胚へのDNAの導入および動物細胞へのDNAの導入

遺伝子導入（人間以外）動物は、微量注入によって、哺乳動物接合体の卵核に外来遺伝子材料を導入することで得ることができる〔例えば、米国特許4873191号および5354674号参照；さらに、米国特許出願08／159084号に基づく国際PCT出願公開WO95／14769も参照〕。接合体は、哺乳動物へ発達することができる。胚または接合体を宿主の雌子宮中に移植し、発達させる。詳細なプロトコールおよび例を以下に説明する。

20

核転移〔Wilmut et al.(1997)Nature 385:810-813、国際PCT出願WO97／07669およびWO97／07668参照〕。すなわちこの方法では、対象の遺伝子を含むSATACを、好適な方法によって、哺乳動物腺細胞のように、分化全能核を有する適切なドナー細胞に導入することができる。次に、細胞融合または微量注入などによって、第2減数分裂の中期で停止している不活性な卵母細胞、好ましくは、除核細胞に、G0期またはG1期である細胞の二倍体核を導入する。実際の除去などの好適な方法によるか、あるいは機能的に核を除去する紫外線などの手段による処理を行うことによって、除核を行うことができる。次に、正しい倍数性を維持しながら、好ましくは新たな核と細胞質とのある一定の接触期間後に（畜牛の場合、約6～20時間）、卵母細胞を活性化し、胚を再構築し、宿主に導入する。例えば、ノコダゾール、コルヒチン、コセミド（cocemid）およびタキソールなどの微小管阻害剤の存在下に、再生細胞をインキュベーションすることで、倍数性を維持し、それによってDNAを1回複製する。

30

遺伝子導入ニワトリは、発達段階Xの受容胚に同様の段階のニワトリ胚からの分散胚葉細胞を注射することで得ることができる〔例えば、Etches et al.(1993)Poultry Sci.72:882-889；Petitte et al.(1990)Development 108:185-189参照〕。最初に、例えばリポフェクション〔例えば、Brazolot et al.(1991)Mol.Repro.Dev.30:304-312参照〕または微小核体融合〔例えば、Dieken et al.(1996)Nature Genet.12:174-182参照〕などの方法を用いて、ドナー胚葉細胞に、異種DNAを導入する。次に、トランスフェクションしたドナー細胞を、受容体であるニワトリ胚に注入する〔例えば、Carsience et al.(1993)Development 117:669-675参照〕。殻体内の受容体ニワトリ胚を明かりに透かして観察し、孵化して、生殖細胞キメラニワトリを得るようにする。

40

直接取り込み、ポリエチレングリコール〔PEG〕とのインキュベーション、微量注入、エレクトロポレーション、リポフェクション、細胞融合、微小核体融合、微小粒子衝撃法などの粒子衝撃法〔例えば、粒子衝撃を介して、分離した哺乳動物細胞の形質転換を行う方法を提供する米国特許5470708号参照〕、他のそのような方法などの（これらに限定されないが）公知の方法を用いて、DNAを動物細胞に導入することができる。例えば、リボソーム中のプラスミドDNAのin situでのヒト細胞への直接転移が、ヒトでの使用についてFDAによって承認されている〔例えば、Nabel et al.(1990)Science 249:1285-1288および米国特許5461032号参照〕。

50

b. 異種DNAの植物への導入

遺伝子導入植物の製造または開発については、多くの方法が当業者には利用可能である。使用される方法は主として、植物の種類によって決まる。これらの方法には、PEG誘発DNA取り込み、原形質体融合、微量注入、エレクトロポレーションおよび微小粒子衝撃法などのDNAの直接転移などがあるが、これらに限定されるものではない〔例えば、そのような方法についての総説に関してはUchimiya et al.(1989)J.of.Biotech.12:1-20参照；さらに、米国特許5436392号および5489520号ならびに多くの他の特許も参照〕。この場合、MACの導入に際しては、微量注入、原形質体融合および粒子銃衝撃が好ましい。

タバコ、米、トウモロコシ、ライ麦、大豆、*Brassica napus*、綿、レタス、ジャガイモおよびトマトなどの植物を用いて、遺伝子導入植物が得られている。タバコおよびツクバネアサガオなどの他の植物は、それらの方法を開発し、遺伝子を最初に導入および発現させる実験モデルとして役立つことが多かった。

DNA取り込みは、植物原形質体を用いて、DNA単独または融合剤であるPEGの存在下に行うことができるか、あるいは当業者に公知のそのような方法の変法によって行うことができる〔例えば、Schilperootらに対する米国特許4684611号参照〕。原形質体と外来DNAの混合物を含む溶液に対する高電圧電気衝撃波印加を行って、可逆穴を形成するエレクトロポレーションを用いて、例えば外来遺伝子を米および*Brassica napus*に導入して奏功している。培養細胞および無傷の植物器官の細胞ならびに組織培養および微小粒子衝撃法〔粒子銃装置を用いて、DNAを含む高密度微小粒子を高速まで加速して、その粒子を植物の細胞壁および細胞膜を貫通させる〕における胚葉体などの植物細胞へのDNAの微量注入も用いられている。DNAを導入することができ、形質転換細胞から再形成することができる全ての植物細胞を用いて、転移人工染色体を有する形質転換した植物全体を作ることができる。植物宿主にDNAを導入する特定のプロトコールおよび手段を、特定の植物または栽培品種に適合するよう適応または改善する必要がある場合がある。

c. 昆虫細胞

(a) 有用な蛋白をコードする遺伝子の増幅を人工染色体で行って、昆虫細胞での蛋白収量を高めることができる；(b) 蛋白の生理的機能に必要である可能性のある糖付加およびリン酸化などの必要な翻訳後修飾を、昆虫細胞が支持し；(c) 昆虫細胞が、哺乳動物ウィルスを支持せず、従ってそのような感染源による生成物の交差汚染の問題がなくなり；(d) その方法は、昆虫細胞系における栄養蛋白、工業用蛋白または医療用蛋白の製造のための従来の組換えバキュロウィルス系より優れており；(e) 昆虫細胞の成長に最適な温度が低いことから(28℃)、生産のエネルギーコストが低く；(f) 昆虫細胞に対する血清を含まない成長培地によって生産コストが低くなり；(g) 人工染色体を含む細胞は、低温でいくらかでも保存でき、(h) 昆虫の幼虫は、受精昆虫卵の微量注入により栄養蛋白、医療用蛋白または工業用蛋白の生物工場となる等（これらに限定されるものではないが）の多くの理由により、昆虫は人工染色体の導入に有用な宿主である〔*Bombyx mori*の卵に各種DNAを微量注入する方法を提供するJoy et al.(1991)Current Science 66:145-150参照〕。

MACまたは昆虫固有の人工染色体〔BUGAC〕を用いて、遺伝子を昆虫に導入する。実施例に記載したように、MACは昆虫において機能して、それに含まれる異種DNAを発現させるように思われる。例えば、実施例に記載のように、lacZ遺伝子に融合した*B.mori*アクチン遺伝子プロモータを有するMACが、融合遺伝子を含むプラスミドによるEC3/7C5細胞のトランスフェクションによって得られている。その後、選別を生き残ったトランスフェクションEC3/7C5細胞と*B.mori*細胞を融合させることで、β-ガラクトシダーゼ発現が検出される含MAC昆虫-マウスハイブリッド細胞系を得ている。

昆虫宿主細胞には、*Spodoptera frugiperda*〔青虫〕、*Aedes aegypti*〔蚊〕、*Aedes albopictus*〔蚊〕、*Drosophila melanogaster*〔ミバエ〕、*Bombyx mori*〔蚕〕、*Manduca sexta*

10

20

30

40

50

a [スズメガ幼虫] および *Trichoplusia ni* [イラクサキンウワバ] などの宿主があるが、これらに限定されるものではない。培養での昆虫細胞の繁殖に向けた努力が行われている。そのような努力は行列毛虫ヨトウガ *Spodoptera frugiperda* に集中している。イラクサキンウワバ *Trichoplusia ni* および蚕 *Bombyx mori* などの他の昆虫からも細胞系が開発されている。スズメガ幼虫 *Manduca sexta* を用いて、類似の細胞系を得ることができることも提案されている。昆虫に DNA を導入するには、それを幼虫に導入し、増殖させ、次に血リンパ液を幼虫から回収して、それから蛋白を単離できるようにする。

昆虫細胞への人工染色体導入のための本発明における好ましい方法は微量注入である [例えば、*Tamura et al.* (1991) *Bio Ind.* 8:26-31; *Nikolaev et al.* (1989) *Mol. Biol.* (Moscow) 23:1177-87; および本明細書で例示・考察してある方法参照]。

10

E. 人工染色体の応用および使用

人工染色体は簡便かつ有用なベクターを提供し、場合によっては（例えば、非常に大きい異種遺伝子の場合）、宿主への異種遺伝子の導入のための唯一のベクターである。実質的にあらゆる対象遺伝子が、人工染色体を介しての宿主への導入を行いやすい。そのような遺伝子には、受容体、サイトカイン、酵素、プロテアーゼ、ホルモン、成長因子、抗体、腫瘍抑制遺伝子、治療物質および多重遺伝子経路をコードする遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない。

本発明で提供される人工遺伝子は、蛋白および遺伝子産生物の生産方法で、特にそのような産生物の生成における宿主細胞として昆虫を用いて、さらには人工染色体（特には MAC）が医療用および工業用の重要な化合物の生物製造を至適化するための高信頼性で安定な有効な手段を提供する細胞（例えば、哺乳動物細胞）生産系で用いられる。それらはさらに、遺伝子治療での使用、ならびに遺伝子導入植物および動物の生産を目的としたものでもある [上記、以下および実施例で述べてある]。

20

1. 遺伝子治療

治療遺伝子産生物または多重遺伝子経路の産生物をコードする核酸は、治療を目的として、ヒトなどの宿主動物に、あるいは動物への導入のために標的細胞系に導入することができる。そのような治療目的には、治療することまたは欠如もしくは欠陥のある遺伝子産生物を提供して抗腫瘍剤などの薬剤を標的細胞もしくは動物に提供すること、ならびに病原体に対する抵抗性を提供するかもしれない感受性を低下させるか、または疾患もしくは障害の症状を緩和する遺伝子産生物を提供することなどがある。以下に、遺伝子および遺伝子産生物の例をいくつか示す。そのような例示は本発明を限定するものではない。

30

a. 抗 HIV リボザイム

以下に例示のように、抗 HIV リボザイムをコードする DNA を、真正染色質に基づくミニ染色体および SATAC などの MAC を用いて、細胞に導入し、そこで発現させることができる。これらの MAC を用いて、リボザイムを発現する遺伝子導入マウスを作ることができる。従ってそれら MAC は、そのようなリボザイムの活性を調べるためのモデルとして、あるいはリボザイム産生細胞系を作ることができるモデルとして役立つ。さらに、抗 HIV リボザイムをヒト細胞中にコードする MAC の導入は、HIV 感染の治療として役立つ。そのような系はさらに、疾患特異的リボザイムの使用が特定の疾患を治療もしくは緩和する上で有効であることを示すものである。

40

b. 腫瘍抑制遺伝子

腫瘍抑制遺伝子は、その野性型対立遺伝子において、異常な細胞増殖を抑制する蛋白を発現する遺伝子である。腫瘍抑制蛋白をコードする遺伝子に突然変異もしくは欠失が生じると、生じた突然変異蛋白または腫瘍抑制蛋白発現の完全な喪失のために、細胞増殖が正しく調節されなくなる場合がある。その結果、特に細胞調節機序に対してすでに損傷がある場合には、異常な細胞増殖が起こる場合がある。多くのかなり研究されているヒト腫瘍および腫瘍細胞系が、腫瘍抑制細胞の欠如または機能喪失を有することが明らかになっている。

腫瘍抑制遺伝子の例としては、網膜芽細胞腫遺伝子すなわち RB 遺伝子、p53 遺伝子、結腸癌において欠失している遺伝子 [すなわち、DCC 遺伝子] および神経線維腫症 1 型

50

〔NF-1〕腫瘍抑制遺伝子などがあるが、これらに限定されるものではない〔例えば、米国特許5496731号、Weinberg *et al.* (1991) *Science* 254:1138-1146参照〕。腫瘍抑制遺伝子の機能喪失または失活は、かなりの数のヒト癌の発生および／または進行において中心的な役割を果たすと考えられる。

p53 遺伝子

p53 遺伝子の体細胞突然変異は、ヒト癌に関連する遺伝子突然変異で最も高頻度のものであると言われている〔例えば、Weinberg *et al.* (1991) *Science* 254:1138-1146参照〕。正常もしくは野生型 p53 遺伝子は、損傷を受けた場合に細胞形質転換を指向する細胞増殖の陰性調節因子である。p53 発現産生物は核で認められ、そこでは他の遺伝子産生物と同時にあるいは共動的に作用し得る。p53 が欠失した腫瘍細胞系を野生型 p53 ベクターで治療することで、腫瘍形成性を低下させることに成功している〔Baker *et al.* (1990) *Science* 249:912-915参照〕。

p53 遺伝子をコードする DNA およびその DNA を含むプラスミドは公知である〔例えば、米国特許5260191号参照；さらに、Chen *et al.* (1990) *Science* 250:1576；Farrel *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2879-2887も参照；その遺伝子を有するプラスミドは ATCC から入手可能であり、その配列は GenBank Database にあり、受託番号 X54156、X60020、M14695、M16494、K03199 である〕。

c. CFTR 遺伝子

嚢胞性繊維症〔CF〕は、気道、汗腺、膵臓その他の臓器の上皮組織に発症する常染色体劣性疾患である。それは、塩素イオン輸送における欠陥と関連する致死性遺伝病であり、各種真核細胞における塩素伝導性の発現と関連していた 1480 アミノ酸の蛋白である嚢胞性繊維症膜貫通伝導性調節蛋白質〔CFTR〕をコードする遺伝子における突然変異が原因で生じる。CFTR における欠陥によって、気道、汗腺、膵臓その他の組織における上皮細胞が、cAMP 介在作用に反応して塩素イオンを輸送する能力を破壊もしくは低下させ、cAMP 依存性蛋白キナーゼ A〔PKA〕による頂端膜チャンネルの活性化を阻害する。この疾患の発生率が高いことおよび破壊的性質を考慮すると、有効な CF 治療の開発が急務である。

CFTR 遺伝子〔約 250 kb〕を MAC 中のトランスフェクションし、それを例えば以下のように遺伝子治療に用いることができる。CF-YAC〔Green *et al.* *Science* 250:94-98参照〕を変性させて、プロマイシンもしくはハイグロマイシンに対する耐性を提供する蛋白をコードする遺伝子などの選択可能マーカー、および neo-Mini 染色体もしくは SATAC への部位特異的組み込みで使用される λ-DNA を持たせるようにすることができる。そのような変性 CF-YAC は、変性 CF-YAC を有する酵母原形質体との融合あるいは変性 CF-YAC を有する酵母核の細胞への微量注入によって、EC3/7C5 細胞もしくは 19C5×Ha4 細胞などの含 MAC 細胞に導入することができる。次に、抗生物質耐性に基づいて、安定な形質転換体を選択する。その形質転換体は、細胞に含まれる MAC 中に変性 CF-YAC を有する。

2. 遺伝子的に変化を受けて、疾患に対する抵抗性などの望ましい形質を有する動物、鳥、魚および植物

人工染色体は、例えば、疾患抵抗性、苛酷な環境条件に対する抵抗性、異なった成長パターンおよび物理的特徴向上などのある種の所望の形質を有する鳥および魚ならびに哺乳動物のような脊椎動物および無脊椎動物を含む動物を得るのに、理想的に適している。

疾患抵抗性生物を得る上での人工染色体のある使用例には、多価ワクチンの製造が関与する。そのようなワクチンには、MAC もしくは生物固有の人工染色体に含ませ、宿主に組み込んで免疫性を誘発するか、あるいは胚に組み込んで、ある種の疾患に対して免疫性であるかもしくは感受性が低い遺伝子導入（人間以外）動物および植物を形成することができる複数抗原をコードする遺伝子などがある。

病原体を破壊もしくは弱毒化するあるいは病原体が宿主に接触するのを抑制する遺伝子産物（ある種の病原体に対して有毒であるリボザイムおよび蛋白など）をコードする DNA を有する人工染色体の宿主生物または胚に導入することで、疾患に対する抵抗性を与え、

10

20

30

40

50

またはそれに対する感受性が低下した疾患抵抗性の動物および植物も得ることができる。例えば、農業用および装飾用植物の産業などの分野における生物の有用性、加工可能性および商業的価値を高めると考えられる所望の形質を有する動物および植物も、疾患抵抗性の動物および植物の生産について上記の同様の方法で人工染色体を用いて得ることができる。そのような場合、生物または胚に導入される人工染色体は、生物において所望の形質を与える上で役立つ遺伝子産生物をコードするDNAを有する。

特にニワトリなどの家禽のような鳥、魚および甲殻類は、人工染色体を用いた遺伝的に変化した生物の製造用のモデル宿主として役立つ。

3. ライブラリーの取得およびスクリーニングへのMACおよび他の人工染色体の使用

大きいDNA断片を各人工染色体に組み込むことができることから、その染色体は、ゲノムDNAライブラリーの取得において全ゲノムを有することができるクローニング媒体として用いるのに適しており、スクリーニングを容易に行うことができる。例えばMACを用いて、各種生物から機能性動原体DNAを確認および単離するのに有用なゲノムDNAライブラリーを得ることができる。そのような利用分野では、特定生物からゲノムDNAライブラリーを得るのに使用されるMACは、その生物の細胞中では機能性ではないものである。すなわちそのMACは、その生物の細胞におけるMAC内にある遺伝子を安全に複製せず、分離せず、その発現を行わない。好ましくはMACには、生物の細胞中の指標遺伝子の転写を促進することができるプロモーターに連結した指標遺伝子（例えば、 β -ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子またはネオマイシン、プロマイシン、ハイグロマイシンなどの抗生物質に対する耐性を与える産生物をコードする遺伝子など）を持たせる。生物からのゲノムDNAの断片をMACに組み込み、MACを生物からの細胞に転移させる。ゲノムDNA断片内に含まれる機能性動原体を組み込んだMACを有する細胞は、マーカー遺伝子発現を検出することで確認される。

4. 安定で高レベルの蛋白生産のためのMACおよび他の人工染色体の使用

本発明で提供されるMACおよび／または他の人工染色体は、蛋白の製造、特に生化学的経路もしくは多価ワクチンに関与する複数蛋白などの1つの細胞系からのいくつかの蛋白の製造に使用され、有効である。蛋白をコードする遺伝子を人工染色体に導入し、次にそれを細胞に導入する。別法として、対象の異種遺伝子を、その遺伝子が人工染色体に向かうような形で、すでに人工染色体を有する生産細胞系に転移させる。異種蛋白が発現される条件下で細胞を培養する。蛋白は安定で永久的なゲノム外染色体系において高レベルで発現されることから、選択的条件は必要ない。

細胞培養系での連続増殖に適応できる組換え宿主として役立つ得るトランスフェクション可能な細胞 [例えば、McLean(1993) *Trends In Biotech.* 11:232-238] は、人工染色体に基づく蛋白生産系での使用に好適である。宿主細胞系の例としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 [例えば、Zang et al.(1995) *Biotechnology* 13:389-392参照]、HEK293、Ltk⁻、COS-7、DG44およびBHK細胞などがあるが、これらに限定されるものではない。CHO細胞は特に好ましい宿主細胞である。人工染色体に基づく蛋白生産系で使用する宿主細胞系の選択は当業界の技術範囲に含まれるものであるが、多くの場合、生産される異種蛋白の性質、宿主細胞における蛋白の毒性の可能性、蛋白の翻訳後修飾（例えば、糖化、アミノ化、リン酸化）の必要条件、細胞で利用できる転写因子、異種遺伝子の発現を推進するのに使用されるプロモーター要素の種類、産生が完全に細胞内であるかまたは異種蛋白が好ましくは細胞から分泌されるか、ならびに細胞における酵素処理の種類などの各種因子によって決まる。

異種蛋白生産のための人工染色体に基づく系は多くの有利な特徴を有する。例えば上述のように、異種DNAは独立のゲノム外人工染色体（宿主細胞ゲノムの未知領域にランダムに挿入されたものや、一時的発現のみを与える染色体外要素として局在するものとは異なって）に局在することから、それは活性転写単位で安定に維持され、細胞分裂時の組み換えや脱離を介して放出されることはない。従って、宿主細胞に選択遺伝子を含める必要はなく、従って選択条件下での増殖も必要ない。さらに、人工染色体はDNAの大きい部分を組み込むことができることから、染色体に複数の異種遺伝子および連結プロモータ要素

10

20

30

40

50

のコピーを保持することができ、それによって外来蛋白を高レベルで発現させることができる。別法として、遺伝子の複数のコピーを1個のプロモータ要素に連結することができ、いくつかの異なる遺伝子を融合した多遺伝子複合体で単一のプロモータに連結して、例えば完全な代謝経路を構成する全ての重要な蛋白を発現させることができる〔例えば、Beck von Bodman et al.(1995)Biotechnology 13:587-591参照〕。別法として、単一遺伝子の複数のコピーを単一のプロモーターに機能的に連結させることができるか、あるいは個々のまたは1個もしくは数個のコピーを異なるプロモータまたは同じプロモータの複数のコピーに連結させることができる。さらに、人工染色体は外来遺伝子の組み込みおよび発現に関してほとんど無限の能力を有することから、対象とする最終生成物をコードする遺伝子の発現だけでなく、宿主細胞の最適な維持および代謝管理に関連する遺伝子（例：成長因子をコードする遺伝子）ならびに所望の異種蛋白生成物の本来の構造における迅速な合成を容易にすることができる遺伝子（例：プロセッシング酵素および転写因子をコードする遺伝子）の発現にも使用可能である。MACSは、生理活性にin vivoでの翻訳後修飾を必要とする蛋白およびペプチドなどのあらゆる蛋白もしくはペプチドの発現に好適である。そのような蛋白には、抗体断片、全長抗体および多重結合抗体、腫瘍抑制蛋白、天然もしくは人工の抗体および酵素、熱ショック蛋白その他などがあるが、これらに限定されるものではない。

そこで、そのような細胞に基づくMACを用いる「蛋白工場」を、適切なプロモーターを有する蛋白コード遺伝子、あるいは単一のプロモータによって作用する複数の遺伝子、すなわち融合遺伝子複合体〔植物発現系における完全代謝経路など；Beck von Bodman(1995)Biotechnology 13:587-591参照〕の複数コピー〔理論的には、無限数または得られるMACが、ほぼゲノム染色体（すなわち内因性）の大きさ以下である数字以上〕で構成されるMACを用いて形成することができる。そのようなMACが構築されると、蛋白を含まない培地〔例えば、(1995)Biotechnology 13:389-39参照〕でのCHO細胞系、または連続生産を確定することができる他の不死化細胞系〔例えば、(1993)TIBTECH 11:232-238参照〕などの好適な細胞培養系に転移させることができる。

MACが宿主細胞において高レベルの異種蛋白発現を行う能力は、例えば、本明細書に記載されE C A C Cに寄託されたH 1 D 3およびG 3 D 5細胞系の分析によって示される。これらの細胞から得られるmRNAのノーザンブロッティング分析によって、細胞におけるハイグロマイシン抵抗性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が、それに含まれるメガ染色体のアンプリコン数と相関していることが明らかである。

F. 反復DNA単位を含むDNA配列の合成方法

一般に、縦列反復DNAの組立により、相補的オリゴの明瞭なアニーリングなどの問題が生じる。例えば、別個にアニーリングされた生成物を、逆の配向で連結することができる。さらに、縦列もしくは反転した反復単位は、その配列を乱し得る組み換えおよび欠失事象を特に受けやすい。縦列反復DNA単位の配列合成のクローニング段階で使用する適切な宿主生物（例：rec株）の選択は、そのような事象の減少および排除に役立ち得るのである。

本発明においては、反復DNA単位を有する延長DNA配列の合成方法が提供される。その方法は特に、縦列に反復したDNA単位の配置の合成に適用できるが、通常そのような配列は、他の公知の遺伝子組立戦略を用いて構築することは困難であるか、不可能である。これらの方法の具体的な用途は、単純な（例えば、2～6個のヌクレオチド）縦列反復（臨床的意義を持つ可能性のある末端小粒および付随DNA反復単位およびトリヌクレオチド反復単位など）ならびに複雑な反復DNA配列の合成におけるものである。これらの方法を用いた150を超える連続反復ヘキサマーを有する末端小粒配列の合成の特定の例を、本明細書に示してある。

縦列DNA反復配置の合成について本発明で提供される方法は、反復の配列を連続的に倍化することで、縦列反復の配置を級数的に延長する一連の延長段階に基づくものである。これらの方法は、遺伝子組立の既知の方法より勝る利点をいくつか提供するものである。例えば、原料のオリゴヌクレオチドは1回だけ使用する。本明細書に記載のDNA配置の

10

20

30

40

50

10

原料として２個のオリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチド１は、長さ k の反復配列のものであり（隣接部分とは無関係）、適切に選択された制限部位に隣接している比較的短い長さ（ $60 \sim 90$ ヌクレオチド）の反復単位を有する。

ここで、S1はE1〔好ましくは3'‐突出（例：PacI,PstI,SphI,NsiIなど）または平滑末端を形成する酵素〕によって開裂する制限部位1であり；S2はE2（好ましくは、3'‐突出を形成する酵素またはTspRIなどの認識部位外で開裂するもの）によって開裂する第2の制限部位であり；>は簡単な反復単位を表し、「 」は下記のオリゴヌクレオチド2に相補的な配列に隣接する短い（8～10）ヌクレオチドを示す。

20

ここで、S 3は酵素E 3についての第3の制限部位であり、構築時に使用されるベクターに存在する部位である。

多くの異なる DNA 配列を開裂部位として認識する非常に多様な制限酵素があることから、いずれかの特定の反復配置の合成に関連して、これらの方法に好適な部位および酵素（好ましくは 3' - 突出末端を形成するもの）を常に選択できなければならない。ほとんどの場合、反復配列には、制限部位の 1 個のみの（または恐らくは 2 個の）ヌクレオチドは存在することが必要であり、制限部位の残りのヌクレオチドは、以下の例のように除去することができる。

30

KpnI:GGTAC/C-- (クレノウ/dNTP) C--

1 個の A を残す公知の制限酵素はないが、この問題は、以下のように全く残さない酵素によって解決できる。

40

さらに、クレノウに代えてヤエナリヌクレアーゼを用いた場合、次のようになる。

さらに、認識配列外で切断する多くの制限酵素があり、その場合には全く制限はない。

CTTAC/GN-- (クレノウ/dNTP) --

オリゴヌクレオチド 1 および 2 を、重複の長さに応じて選択した温度でアニーリングする（代表的には、30～65℃の範囲）。

50

アニーリングしたオリゴヌクレオチドを、 $dNTP$ の存在下にクレノウポリメラーゼで充填して、二本鎖 (ds) 配列を得る。

[illegible]

二本鎖DNAを、制限酵素E1およびE3で開裂し、次に同じ酵素E1およびE3で開裂させてあったベクター（例pUC19または酵母ベクター）に連結させた。連結生成物を用いて、使用するベクターに適合する適正な宿主細胞を形質転換し（例：pUC19を用いる場合、大腸菌DH5αなどの細菌細胞が好適な宿主である）、次にそれを選択平板で平板培養する。組換え体は、色（例えば、β-ガラクトシダーゼ発現の場合はXgal染色によって）または³²P標識オリゴヌクレオチド2を用いるコロニーハイブリダイゼーション（オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによる検出が好ましい。その理由としては、その配列はその後の各延長段階で除去され、反復配列の延長が奏功したDNAを含む組み換え体のみが存在するからである）によって確認することができる。

k 個のヌクレオチドの反復配列を有する組換えプラスミドの少量サンプルを、制限酵素 E 1 および E 3 で消化させ、挿入物をゲルで単離する（挿入物が短い時はポリアクリルアミドであるが、その後の段階での比較的長い挿入物の単離ではアガロースを用いることができる）。組換えプラスミドの第 2 の少量サンプルを酵素 E 2（クレノウおよび d N T P で処理して、3' - 突出を除去）および E 3 で切断し、大きい断片（プラスミド DNA と挿入物）を単離する。

2 個の DNA (S1 ~ S3 挿入物断片とベクター+挿入物) を連結し、選択的平板で平板培養し、段階 3 のように延長組み換え体についてスクリーニングを行う。ここで、制限部位間の反復配列の長さは、前の段階における反復配列の 2 倍、すなわち $2 \times k$ である。

段階 4 および段階 5 を必要な回数繰り返して、所望の反復配列サイズを得る。各延長サイクルにおいて、反復配列の大きさは倍化する。すなわち、 m を延長サイクル数とすると、反復配列の大きさは $k \times 2^m$ ヌクレオチドとなる。

以下に、実施例を示すが、これらは例示のみを目的としたものであり、本発明を限定するものではない。

全般的な材料および方法

以下の材料および方法は、下記の実施例で使用され、人工染色体を含む細胞系を得るのに使用することができる方法の例である。当業者に公知である他の好適な材料および方法を使用することも可能である。当業者に公知のこれら材料および方法に対する変更も行うことができる。

1. チャイニーズハムスターK-20細胞およびマウスA9線維芽細胞をF-12培地で培養した。EC3/7 [米国特許5288625号参照、受託番号90051001下にEuropean Collection of Animal Cell Culture(ECACC)に寄託;さらに、Hadlaczky *et al.* (1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:8106-8110および米国特許出願08/375271号も参照] およびEC3/7C5 [米国特許5288625号およびPraznovszky *et al.* (1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:11042-11046参照] マウス細胞系ならびにKE1-2/4ハイブリッド細胞系を、400 μ g/mLのG418を含むF-12培地 [SIGMA, St. Louis, MO] で維持した。

2. 以下に記載のTF1004G19およびTF1004G-19C5マウス細胞と以下に記載の19C5×Ha4ハイブリッドおよびその垂細胞系を、400 μg/mL以下

のハイグロマイシン B [Calbiochem] を含む F-12 培地で培養した。LP11 細胞を、 $3 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロマイシン [SIGMA, St. Louis, MO] を含む F-12 培地で維持した。

3. EC3/7C5 細胞とプラスミド [ファルマシアから入手の pH132、pCH110; Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101-109 も参照] と λ DNA との共トランスフェクションを、受容体細胞 5×10^6 個当たりプラスミド DNA 2~5 μg および λ ファージ DNA 20 μg を用いて、リン酸カルシウム DNA 沈殿法 [例えば、Chen et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752 参照] によって行った。

4. 細胞融合

マウスおよびハムスターの細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合した [Davidson et al. (1976) *Som. Cell. Genet.* 2:165-176]。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシン B を含む HAT 培地中で、ハイブリッド細胞を選別した。

約 2×10^7 個の受容体細胞および 2×10^6 個のドナー細胞を、ポリエチレングリコールを用いて融合した [Davidson et al. (1976) *Som. Cell. Genet.* 2:165-176 参照]。ハイブリッドを選別し、10% FCS および 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 を含む F-12/HAT 培地で維持した [Szybalsky et al. (1962) *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7:75-89]。ハイブリッド細胞系における「親」染色体の存在が、ビオチン標識したヒトおよびハムスターのゲノム DNA ならびにマウスの長い分散反復 DNA [pMCPE1.51] を用いた、生物特異的プローブによる in situ ハイブリダイゼーションによって確認された。

5. 微小核体融合

EC3/7C5 細胞から受容体細胞への人工染色体の微小核体介在転移を、グッドフェローら [Goodfellow et al. (1989) *Techniques for mammalian genome transfer, Genome Analysis a Practical Approach*, K.E. Davies, ed., IRL Press, Oxford, Washington DC, pp.1-17] およびヤマダら [Yamada et al. (1990) *Oncogene* 5:1141-1147] の変法を用い、サキソンの方法に従って [Saxon et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 1:140-146] 行った。すなわち、T25 フラスコ中の 5×10^6 個の EC3/7C5 細胞を、最初に 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコルセミドで 48 時間、次に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のサイトカラシン B で 30 分間処理した。T25 フラスコを端で遠心し、ペレット化した微小核体を血清を含まない DME 培地中に懸濁させた。最初に 5 ミクロン、次に 3 ミクロンのポリカーボネートフィルターによって微小核体を篩い、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のフィトヘマグルチニンで処理し、受容体細胞とのポリエチレングリコール介在融合に用いた。MMCneo を含む細胞の選別を、400~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 を含む培地中で、融合から 48 時間後に開始した。

微小核体を、以下のようにして 1B3 および GHB42 ドナー細胞からも得て、E2D6K 細胞と融合させた [プロマイシン N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を有する CHO-K-20 細胞系、すなわち、SV40 初期プロモーターの制御下でのプロマイシン耐性遺伝子]。ドナー細胞を接種して、24~36 時間以内に 60~75% の集密度を得た。その後、12 時間もしくは 24 時間にわたってコルヒチン (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に曝露することで、細胞を有糸分裂で停止させ、微小核化を誘発した。GHB42 細胞の小核化を促進するため、細胞を低張処理した (37°C で 10 分間)。コルヒチン処理後、またはコルヒチンと低張処理後に、細胞をコルヒチンを含まない培地で成長させた。

ドナー細胞をトリプシン処理および遠心し、ペレットを 1:1 パーコール培地に懸濁させ、37°C で 30~40 分間インキュベーションした。インキュベーション後、 $1 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞 (60~70% 微小核化指数) を各パーコール勾配に負荷した (各融合を 1~2 勾配に分配した)。これらの勾配を Sorvall SS-34 ローター中 34~37°C で 80 分間 19000 rpm にて遠心した。遠心後、2 つの細胞可視帯域を除去し、4°C で 10 分間 2000 rpm にて遠心し、再懸濁させ、8 μm 孔径ヌクレオポアフィルターで濾過した。

1B3 および GHB42 細胞から得た微小核体を、E2D6K と融合させた。E2D6K 細胞は、pCHTV2 による CHO-K-20 細胞の CaPO_4 トランスフェクションによって得られた。プラスミド pCHTV2 は、SV40 プロモーターおよびポリアデニル化

10

20

30

40

50

信号、*Saccharomyces cerevisiae* U R A 3 遺伝子、チャイニーズハムスター 2 番染色体特異的付随 DNA の 2 . 4 および 3 . 2 k b 断片 (H C - 2 付随体; Fatyol *et al.* (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:3728-3736 参照)、ジフテリア毒 A 鎖遺伝子の 2 個のコピー (1 個は単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ (H S V - T K) 遺伝子プロモータおよび S V 4 0 ポリアデニル化信号に連結したものであり、他方はポリアデニル化信号を持たずに H S V - T K プロモータに連結したものである)、アンピシリン耐性遺伝子および C o l E 1 複製開始点を有する。トランスフェクション後、プロマイシン耐性コロニーを単離した。E 2 D 6 K 細胞系における p C H T V 2 プラスミドの存在が、細胞から単離された DNA の核酸増幅によって確認された。

精製微小核体を前述と同様にして遠心し、フィトヘマグルチニン-P (P H A - P、1 0 0 μ g/mL) 2 mL に再懸濁した。次にその微小核体懸濁液を E 2 D 6 K 細胞の 6 0 ~ 7 0 % 集密度受容体培養物に加えた。それを室温で 3 0 ~ 4 0 分間インキュベーションして、微小核体を凝集させた。P H A - P を除去した後、細胞を 5 0 % ポリエチレングリコール (P E G) 1 mL とともに 1 分間インキュベーションした。P E G を除去し、培養物を血清を含まない F - 1 2 培地で 3 回洗浄した。細胞を非選択的培地中で 4 8 ~ 6 0 時間インキュベーションした。その後、細胞培養物をトリプシン処理し、4 0 0 μ g/mL のハイグロマイシン B および 1 0 g/mL のプロマイシンを含む F - 1 2 培地で平板培養して、親細胞系に対して選別を行った。

ハイブリッド細胞を、選択培地で培養しておいた細胞から単離した。これらのクローンを次に、X - g a l 染色法によって β - ガラクトシダーゼの発現によって分析した。G H B 4 2 微小核体と E 2 D 6 K 細胞との融合によって得られていた 5 つのハイブリッドクローン中の 4 個が、染色結果が陽性で、G H B 4 2 細胞が与えたメガ染色体に含まれる l a c Z 遺伝子が β - ガラクトシダーゼを発現していることを示している。同様に、1 B 3 微小核体と E 2 D 6 K 細胞との融合によって形成していたハイブリッドクローンからは陽性の染色結果が得られ、1 B 3 細胞が与えたメガ染色体に含まれる l a c Z 遺伝子が β - ガラクトシダーゼを発現していることを示唆していた。ハイブリッドクローンの *in situ* ハイブリダイゼーションも行っており、マウス-ハムスターハイブリッド細胞のマウス染色体含有量も分析した。

B. 染色体分染

染色体のトリプシン G 分染を、ワンらの方法 (Wang & Fedoroff (1972) *Nature* 235:52-54) を用いて行い、B S G による構成異質染色質の検出を行った。C 分染法をサムナーの方法 (Sumner (1972) *Exp. Cell. Res.* 75:304-306) に従って実施した。プロモデオキシウリジン [B r d U] 組み込みによる染色体複製の検出には、ペリーらの (Perry & Wolff (1974) *Nature* 251:156-158) フルオレセイン-ギムザ [F P G] 染色法を用いた。

C. 染色体の免疫標識および *in situ* ハイブリダイゼーション

ヒト抗動原体血清 L U 8 5 1 [Hadlaczky *et al.* (1986) *Exp. Cell. Res.* 167:1-15] による間接免疫蛍光標識および同じ試料に対する間接免疫蛍光および *in situ* ハイブリダイゼーションを、既報の方法に従って行った [Hadlaczky *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:8106-8110 参照; さらに、米国特許出願 0 8 / 3 7 5 2 7 1 号も参照]。マウス A 9 染色体の処理に関して 2 M 塩酸を 3 7 °C で 2 5 分間行い、ハイブリッド細胞の染色体に関して、1 M 塩酸を 3 7 °C で 3 0 分間用いた以外は、メーカー推奨の手順に従って、フルオレセイン標識抗 B r d U モノクローナル抗体 [Boehringer] による免疫標識を行った。

D. 走査型電子顕微鏡検査

オスミウム含浸を用いた走査型電子顕微鏡検査のための有糸分裂染色体細胞を、既報の方法に従って行った [Sumner (1991) *Chromosoma* 100:410-418]。その染色体を、加速電圧 2 5 k V で動作する日立 S - 8 0 0 電界放出走査型電子顕微鏡で観察した。

E. DNA 操作、プラスミドおよびプローブ

1. 一般的方法

DNA 操作はいずれも、標準的方法によって行った [例えば、Sambrook *et al.* (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

10

20

30

40

50

ng Harbor, NY参照]。マウスの主要付随体プローブを、ラトナー博士の方法によって得た [Dr. J. B. Rattner, University of Calgary, Alberta, Canada]。カルガリー大学のラトナー博士から、マウスの主要付随体プローブなどのクローニングしたマウス付随 DNA プローブ [Wong et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:11645-11661参照] の提供を受けた。完全ハムスターゲノム DNA を用いてハムスター染色体の着色を行い、2 番染色体の動原体領域に固有のクローニング反復配列

[Fátyol et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22: 3728-3736]

も用いた。マウス染色体の着色を、マウス真正染色質に固有のクローニングした長い分散反復配列 [pMCP1. 51] を用いて行った。

共トランスフェクションおよび in situ ハイブリダイゼーションには、pCH110β-ガラクトシダーゼ構築物 [Pharmacia または Invitrogen] および λ c l 8 7 5 S a m 7 フォージ DNA [New England Biolabs] を用いた。

2. プラスミド pPuroTel の構築

プロマイシン耐性遺伝子およびクローン化 2. 5 kb ヒト末端小粒配列 [配列番号 3] を、pBabe-puro レトロウイルスベクターから構築した

[Morgenstern et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 3587-3596 ;

Dr. L. Székely (Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institutet, Stockholm)

によって提供；さらに、Tonghua et al. (1995) Chin. Med. J. (Beijing, Engl. Ed.) 108:653-659 ; Couto et al. (1994) Infect. Immun. 62:2375-2378 ; Dunckley et al. (1992) FEBS Lett. 296:128-34 ; French et al. (1995) Anal. Biochem. 228:354-355 ; Liu et al. (1995) Blood 85:1095-1103 ; 国際 PCT 出願 WO 9 5 2 0 0 4 4 号、WO 9 5 0 0 1 7 8 号および WO 9 4 1 9 4 5 6 号も参照]。

F. 寄託細胞系

細胞系 KE1-2/4、EC3/7C5、TF1004G19C5、19C5×Ha4、G3D5 および H1D3 を、ブダペスト条約に従って、ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) に、それぞれ受託番号 9604924、9604925、9604926、9604927、9604928 および 9604929 下に寄託した。これらの細胞系の寄託は 1996 年 4 月 9 日に行った (European Collection of Animal Cell Culture (ECACC) Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom)。寄託は、本願において寄託細胞系に対する正式の証明書を得、欧州特許協定の規則 28 (1) (d) に従って、寄託細胞系を一般に利用可能とすることに対して無条件かつ最終的同意を与えたハドラツキー (Gyula Hadlaczky, H. 6723, SZEGED, SMAMOS U. I. A. IX. 36. HUNGARY) の名で行った。

実施例 2

EC3/7、EC3/7C5 および関連細胞系の取得

EC3/7 細胞系は、neo-動原体を有する LMTK⁻ マウス細胞系である。EC3/7C5 細胞系は、neo-ミニ染色体を有する EC3/7 の単一細胞サブクローンである。

A. EC3/7 細胞系

米国特許 5 2 8 8 6 2 5 号 [さらに、Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046 および Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110 も参照] に記載の方法に従って、ヒトおよび細菌の DNA を有する λ 構築物 [λ CM8 および λ gtWESneo] の共組み込み後に、デノボ動原体形成を、形質転換マウス LMTK⁻ 線維芽細胞系 [EC3/7] で行う。

λ中でクローニングした14 kbのヒトDNA断片[λCM8]および優性マーカー遺伝子[λgtWESneo]の共トランスフェクションにより、優性マーカー遺伝子[neo-動原体]に連結した選択可能動原体を、マウスLMTK⁻細胞系EC3/7で形成した[Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110; 図1参照]。異種DNA[λDNAおよびマーカー遺伝子をコードするDNA]の組み込みを、末端動原体染色体[7番染色体(図1B参照)]の短腕に行い、そこで増幅プロセスを行うことで、新たな動原体が形成された[neo-動原体(図1C参照)]。二動原体染色体(図1C)については、新たに形成された動原体領域に、細胞および活性動原体に導入される全ての異種DNA[ヒト、λおよび細菌]が含まれる。

同じ染色体に2つの機能的に活性な動原体があることで、動原体間で規則的切断が生じる[図1E参照]。二動原体染色体上の2個の動原体間の距離は約10~15 Mbと推定され、ミニ染色体を分離する切断が2つの動原体間で起こった。そのような固有染色体切断により、neo-動原体を有する染色体断片が生じる(細胞の約10%で)(図1F)。この染色体断片は主として、ヒト、λ、プラスミドおよびネオマイシン耐性遺伝子DNAから構成されるが、若干のマウス染色体DNAも有する。細胞学的証拠から、MMCneoの安定化時にneo-動原体を有する染色体断片の反転複製があったことが示唆される。MMCneoを含む細胞系におけるミニ染色体の大きさは約20~30 Mbである。その所見は、大きさが倍化したことを示している。

二動原体染色体[図1E]を有するEC3/7細胞系から、反復単一細胞クローニングによって、2個の亜細胞系[EC3/7C5およびEC3/7C6]を選別した。これらの細胞系では、neo-動原体は専ら小さい染色体[neo-ミニ染色体]上に認められたが、元二動原体染色体は、検出可能な量の外来DNA配列を有しており、活性なneo-動原体は持たなかった[図1Fおよび1G]。

細胞系EC3/7C5およびEC3/7C6のミニ染色体は類似している。細胞レベルおよび分子レベルのいずれにおいても、それらの構成に相違は認められない。これらのミニ染色体は、従来の制限エンドヌクレアーゼマッピングやパルスフィールド電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを用いる広範囲マッピングによっては区別できなかった。EC3/7C6系の細胞の細胞骨格はコルヒチンに対する感受性が高いことを示していたことから、EC3/7C5系を用いてさらに詳細な分析を行った。

B. EC3/7C5およびEC3/7C6細胞系の取得

neo-ミニ染色体を有するEC3/7C5細胞を、高濃度のG418[致死用量の40倍]でのEC3/7細胞系の350世代にわたるサブクローニングによって得た。2つの単一細胞由来の安定な細胞系[EC3/7C5およびEC3/7C6]を得た。これらの細胞系は、ミニ染色体上にneo-動原体を有し、二動原体染色体の残りの断片も有する。抗動原体抗体による間接免疫蛍光およびその後のin situハイブリダイゼーション実験から、ミニ染色体が二動原体染色体由来であることが示された。EC3/7C5およびEC3/7C6細胞系(それぞれ、140個および128個の中期)において、無傷の二動原体染色体は認められず、それぞれ細胞の97.2%および98.1%でミニ染色体が検出された。これらのミニ染色体は、150細胞世代にわたって維持したものである。これらは、元二動原体染色体の残りの部分を有する。

末端小粒DNA配列の複数コピーを、in situハイブリダイゼーションによって、元二動原体染色体の残りの部分のマーカー動原体領域で検出した。これは、マウス末端小粒配列が外来DNA配列によって共増幅されたことを示している。これらの安定なミニ染色体を有する細胞系は、別の動原体が機能して、ミニ染色体を維持することができることを示す直接の証拠を提供するものである[米国特許5288625号]。

neo-動原体をマウス染色体から分離するEC3/7細胞での染色体切断が、Gバンド陽性「外来」DNA領域で起こった。これは、元二動原体染色体の切断末端でλおよびヒトDNA配列の痕跡が認められたことで裏付けられる。neo-動原体を有する染色体断片のGバンドパターンを安定なneo-ミニ染色体のものと比較することで、neo-ミニ染色体が、neo-動原体を有する染色体断片の反転複製であることが明らかになって

10

20

30

40

50

いる。それはさらに、neo-ミニ染色体が1個の機能性動原体のみを有するが、ミニ染色体のいずれの末端も異質染色性であり、マウス付随DNA配列が、in situハイブリダイゼーションによってこれらの異質染色質領域で認められた。

そこで、これらの2つの細胞系EC3/7C5およびEC3/7C6は、優性マーカー遺伝子に連結した動原体を有する選択可能な哺乳動物ミニ染色体[MMCneo]を有する[Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110]。MMCneoは、ミニ染色体介在遺伝子転移のベクターとして使用するためのものであり、ミニ染色体に基づくベクター系のモデルとして使用されてきた。

MMCneoの広範囲マッピング研究から、ヒトDNAおよびネオマイシン耐性遺伝子構築物が、マウス染色体に別個に組込まれ、次に外来DNAを含む染色体領域が増幅されることが明らかになっている。MMCneoは、約160 kbの反復ブロックの形でλCM8およびλgtWESneoDNAの約30~50個のコピーを有し、それらが一緒になって、3.5 Mb以上の領域を網羅している。これに加えて、マウス末端小粒配列[Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046]ならびに染色分体の正確で高次の構造構成に必要なマウス由来DNAがある。

専ら真正染色質マウスDNAを認識する染色体着色プローブmCPE1.51[マウスの長い分散反復DNA]を用いたら、検出可能な量の分散反復配列が、in situハイブリダイゼーションによってMMCneoで認められた。neo-動原体は、少量であるが検出可能な量の付随DNAと関連している。neo-動原体をマウス染色体と分ける染色体切断が、「外来」DNA領域で起こる。これは、元二動原体染色体の切断末端にλおよびヒトDNAが存在することで明らかである。しかしながら、MMCneoの両末端には、in situハイブリダイゼーションによって明らかなマウスの主要付随DNAの痕跡がある。

この所見は、MMCneoの安定化の際にneo-動原体を有する染色体断片の大きさが倍化するの、反転複製の結果であることを示唆するものである。neo-動原体形成時に外来DNA配列で共増幅したマウス末端小粒配列は十分なMMCneo用末端小粒を提供できるが、複製によって、ミニ染色体用の機能性末端小粒が得られたものと考えられる。

neo-ミニ染色体の部分のヌクレオチド配列を次のようにして決定した。標準的方法に従って、EC3/7C5細胞から全長DNAを単離した。DNAについて、メーカーの手順に従って、PCRシステム(Expand Long Template PCR)[Boehringer Mannheim]を用いて核酸増幅を行った。その増幅方法では、neo-ミニ染色体に含まれるファージλ右腕の領域にある配列に相当する単一の33量体オリゴヌクレオチドプライマーのみが必要であった。このオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号13の最初の33個のヌクレオチドとして示してある。neo-ミニ染色体には、この配列の一連の反転反復があることから、その単一のオリゴヌクレオチドを正および逆のプライマーとして用いて、ファージλDNAの反転反復集合間にあるDNAが増幅された。一つの増幅反応から3つの生成物が得られ、反転反復の異なる群の間にあるDNAの配列が異なっている可能性のあることが示唆された。人工染色体中の反復核酸単位において、わずかな相違がある可能性があり、人工染色体を有する細胞の培養時にそれが起こるものと考えられる。例えば、移動性遺伝要素の組み込みと反復配列の欠失とともに、塩基対変化が起こる可能性がある。

これら3つの生成物のそれぞれについて、DNA配列分析を行った。3つの生成物の配列はそれぞれ、配列番号13、14および15に示してある。配列決定した生成物がneo-ミニ染色体から増幅されたことを確認するため、ミニ染色体および元二動原体染色体を持たない陰性対照細胞系(マウスLtk⁻細胞)ならびにneo-ミニ染色体のみを有する陽性対照細胞系[19C5×Ha4細胞(図4参照)]をBrdUで処理し、次にG418を含む選択培地で成長させ、BrdUで再処理する事で得られたマウス-ハムスターハイブリッド細胞系GB43から単離したDNAについて、同じプライマーを用いて対照増幅を行った。陽性対照細胞系のみが3つの増幅生成物を与え、陰性対照反応では、増幅生成物は検出されなかった。陽性対照増幅で得られた結果も、neo-ミニ染色体DNAが増幅され、元二動原体マウス染色体の断片は増幅されなかったことを示している。

3つの増幅生成物の配列を、Genbank/EMBLデータベースにある配列と比較した。配列番号13および14は、マウスからの槽内A粒子からのDNAの部分に対して高い(約96%)相同性を示していた。配列番号15は、データベースに入手できる配列とほとんど相同性を示さなかった。これら3つの配列を全て用いて、neoミニ染色体に対する相同性DNAとして遺伝子標的ベクターを得ることができる。

C. ミニ染色体の単離および部分精製

EC3/7C5細胞の有糸分裂染色体を、グリシン-ヘキシレングリコール緩衝液系 [Hadlaczky et al., (1982) *Chromosoma* 86:643-659] を用いて、ハドラツキーら (Hadlaczky et al., (1981) *Chromosoma* 81:537-555] 記載の方法に従って単離した。染色体懸濁液を1200×gで30分間遠心した。ミニ染色体を含む上清を5000×gで30分間遠心し、ペレットを適切な緩衝液に再懸濁させた。部分的に精製したミニ染色体を-20で50%グリセリン中にて保存した。

10

D. MMCneo維持およびneo発現の安定性

284日にわたって非選択培地中で成長させ、次に400μg/mLのG418を含む選択培地に転移させたEC3/7C5細胞は、G418の存在下に永久的に培養された対照細胞と比較して、96%平板培養効率[コロニー形成]を示した。細胞形成分析では、選択および非選択培養条件下では、MMCneoが細胞当たり1個のコピーで安定に維持されることが示された。分析した2270個の分裂中期で、2個のMMCneoを有する分裂中期は2個のみ認められた。

サザンハイブリダイゼーション分析では、DNA制限パターンに検出可能な変化は示されず、選択または非選択培養条件下で成長させた細胞からのDNAを比較した場合、同様のハイブリダイゼーション強度がneoプローブで認められた。

20

選択および非選択条件下に成長させた細胞から単離したneo遺伝子からのRNA転写物のノーザン分析では、ごくわずかで重要性の低い相違のみが示された。neo遺伝子の発現は、非選択培養条件下で290日間G418を含まないF-12倍地で維持されたEC3/7C5細胞で持続した。ミニ染色体からのneo遺伝子の長期発現は、MMCneoの核位置によって影響を受ける可能性がある。in situハイブリダイゼーション実験では、中間期核において、MMCneoの周辺位置が優先することが明らかになった。2500の核分析中60%を超えるもので、核外膜付近の核の周囲で、ミニ染色体が認められた。

30

実施例 3

ミニ染色体転移とλneo染色体の製造

A. ミニ染色体転移

neoミニ染色体 [MMCneoと称する、図2C] は、ハムスターおよびヒトなどの異なる哺乳動物細胞とミニ染色体を有する細胞 [EC3/7C5またはEC3/7C6] との融合による遺伝子転移に使用されている。37個の安定なハイブリッド細胞系が得られている。得られたハイブリッド細胞系はいずれも、「染色体着色」用のビオチン化ヒトおよびハムスターのゲノムまたはpMCPE1.51マウス長分散反復DNAプローブを用いるin situハイブリダイゼーションによって明らかなように、真正のハイブリッドであることがわかっている。MMCneoはさらに、EC3/7C5細胞由来の微小核体の融合によってマウスA9、L929および多分化能F9テラトカルシノーマに転移させて奏功している。転移は、PCR、サザンブロッティングおよびミニ染色体特異的プローブを用いたin situハイブリダイゼーションによって確認した。細胞形成分析から、微小核体融合について予想されるように、わずかな細胞 [1~5%] がMMCneoを受けた(または保持した)ことが確認された。

40

これらの結果は、MMCneoが広範囲の細胞によって耐容されることを示している。原核生物遺伝子およびミニ染色体上にあるヒトおよびλの配列についての過量投与は、組織培養細胞には不利ではないと考えられる。

MMCneoは、EC3/7C5ゲノムの最も小さい染色体であり、約20~30Mbと推定され、それは大半の宿主細胞(マウス)染色体よりかなり小さい。大きさが小さくな

50

ることで、簡単な分別遠心によって、単離染色体の懸濁液からミニ染色体を部分的に精製することができる。このようにして、純度15～20%のミニ染色体懸濁液が得られている。これらのミニ染色体豊富物を用いて、微量注入もしくはリポフェクションなどによって、ミニ染色体を特定の標的細胞に導入することができる。標的細胞には、遺伝子療法で
使用できる治療細胞、さらには遺伝子導入（人間以外）動物を得るための胚細胞などがある。

MMCneoは、自己複製することができ、細胞中で安定に維持され、非選択条件下に長期培養した後であっても、neo遺伝子の持続的発現を可能とするものである。核外膜付近の領域を占有しているように思われるのは非組み込みベクターである。核においてそれが周辺部に局在していることは、MMCneoの機能的完全性および安定性を維持する上で重要な役割を有する。宿主核の機能的区画化は、外来配列の機能に効果を有すると考えられる。さらに、MMCneoはメガ塩基のλDNA配列を有し、それは相同的組換えと従って所望の遺伝子のMMCneoへの組み込みのための標的部位として役立つはずである。それは、細胞および微小核体の融合、微量注入、エレクトロポレーション、脂質介在キャリア系または染色体取り込みによって転移させることができる。MMCneoのneo-動原体は、比較的大きい150～200Mbのλneo染色体の正常な分離を維持および支持することができる。この結果は、MMCneo染色体が異種DNAの大きい断片を持つのに有用であるに違いないことを示している。

B. λneo染色体の製造

EC3/7およびチャイニーズハムスター卵巣細胞 [図2] によって得られたハイブリッド細胞系KE1-2/4では、二動原体染色体からのneo-動原体の分離は、さらなる増幅プロセスと関連していた。この増幅によって、平均的な大きさの安定な染色体が形成された [すなわち、λneo染色体; Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046 参照]。λneo染色体は、末端に位置する機能性動原体を有し、λ、ヒト、細菌およびマウスのDNA配列の複数コピーを有する7個の大きいアンプリコンから構成されている [図2 参照]。これらのアンプリコンは、アンプリコン間の構成異質染色質の狭いバンドを形成するマウスの主要な付随DNA [Praznovszky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:11042-11046] によって分離される。

実施例 4

「ソーセージ染色体」(SC)の形成

上記の実施例に記載の所見は、マウス7番染色体の動原体領域が大量増幅能力を有することを示している [他の結果は、この能力が7番染色体に固有のものではないことを示している]。この結論は、元二動原体7番染色体とneo-ミニ染色体を有するEC3/7C5に第2の優性選択可能マーカー遺伝子および非選択マーカー遺伝子を導入した共トランスフェクション実験からの結果によってさらに裏付けられる。EC3/7C5細胞系を、λファージDNA、ハイグロマイシン耐性遺伝子構築物 [pH132] およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子構築物 [pCH110] で形質転換した。安定な形質転換体を、高濃度 [400 μg/mL] ハイグロマイシンBの存在下に選別し、サザンハイブリダイゼーションによって分析した。取り込まれた外来DNAの複数コピーを示す得られた形質転換細胞系について、in situハイブリダイゼーションによって調べて、取り込み部位の位置を決定し、LacZ染色によってβ-ガラクトシダーゼ発現を検出した。

A. 材料および方法

1. pH132の構築

pH132プラスミドは、β-アクチンプロモーターの制御下に、ハイグロマイシンB耐性遺伝子および抗HIV-1 gag リボザイム [リボザイムの配列に相当するDNA配列については配列番号6 参照] を有する。このプラスミドは、pHygプラスミド [Sugden et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:410-413; リッグ博士 (Dr. A.D. Riggs, Beckman Research Institute, Duarte) から提供; 例えば米国特許4997764号 参照] および pPC-RAG12 プラスミド [Chang et al. (1990) Clin Biotech 2:23-31; ロッシ博士 (Dr. J.J. Rossi, Beckman Research Institute, Duarte) から提供; 抗HIV gag リボザイムならば

10

20

30

40

50

にβ-アクチンプロモーターとSV40後期遺伝子転写終止およびポリAの信号に連結したリボザイム挿入物を有する哺乳動物発現ベクターの構築について記載している米国特許5272262号、5149796号および5144019号も参照]から構築した。BamHIリンカーが隣接しているリボザイム挿入物の挿入が関与するpPC-RAG12の構築を、BamHI消化pHβ-Apr-1gptに行った[Gunning et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84:4831-4835参照、米国特許5144019号も参照]。

プラスミドpH132を以下のようにして構築した。最初に、pPC-RAG12 [Chang et al.(1990)Clin.Biotech.2:23-31に記載]をBamHIで消化させて、遺伝子の5'末端にヒトβ-アクチンプロモーターが隣接し、遺伝子の3'末端にSV40後期転写終止信号およびポリAデニル化信号が隣接している抗HIVリボザイム遺伝子[リボザイムDと称する(Chang et al.(1990)Clin.Biotech.2:23-31による)]; ロッシ(Rossi)らに対する米国特許5144019号、特にその特許の図4も参照]を有する断片を切り取った。チャンら(Chang et al.(1990)Clin.Biotech.2:23-31)の報告に記載のように、リボザイムDを標的として、HIV gag遺伝子の翻訳開始領域の開裂を行う。このpPC-RAG12の断片をpBlue-script-KS(+) [Stratagene, La Jolla, CA]にサブクロニングして、プラスミド132を得た。次に、プラスミド132をXhoIおよびEcoRIで消化させて、遺伝子の5'末端にβ-アクチンプロモーターが隣接し、遺伝子の3'末端にSV40終止信号およびポリAデニル化信号が隣接しているリボザイムD遺伝子を有する断片を得た。この断片を、pHyg [Sugden et al.(1985)Mol.Cell.Biol.5:410-413]のEcoRIおよびSalIによる消化によって得られた最大断片に連結して、pH132を得た。そこで、pH132は、抗HIVリボザイム遺伝子と次にSV40終止信号およびポリAデニル化信号に連結したβ-アクチンプロモーター、ハイグロマイシン耐性遺伝子と次にチミジンキナーゼ遺伝子ポリAデニル化信号に連結したチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、ならびに大腸菌ColE1複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子という要素を有する約9.3kbのプラスミドである。

HSV-1 tk遺伝子からの転写対照を用いてハイグロマイシンBに対する耐性を与えるプラスミドpHyg [例えば、米国特許4997764号、4686186号および5162215号参照]は最初は、pKan2 [Yates et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81:3806-3810] およびpLG89 [Gritz et al.(1983)Gene 24:179-188参照]から構築されたものである。すなわち、pKan2をSmaIおよびBglIIで消化させて、トランスポゾンTn5由来の配列を取り出した。SnaI部位での平滑末端連結およびBglII部位での「突出末端」連結[容量20ml中、T4DNAリガーゼ(BRL)1ワイス単位を使用]を用いて、ハイグロマイシン耐性hph遺伝子を消化したpKan2に挿入した。pKan2のSmaI部位およびBglII部位は連結時に失われた。

pHygへのプロモーターおよびポリA部位を有する抗HIVリボザイム構築物の導入から得られるプラスミドpH132には、β-アクチンプロモーターの制御下での抗HIVリボザイムならびにTKプロモーターの制御下でのハイグロマイシン耐性遺伝子がある。

2. 染色体分染法

染色体のトリプシンG分染を、実施例1に記載の方法に従って実施した。

3. 細胞培養

以下に記載のTF1004G19およびTF1004G-19C5マウス細胞と19C5×Ha4ハイブリッドならびにその垂細胞系を、400μg/mLのハイグロマイシンB [Calbiochem]を含むF-12培地で培養した。

B. EC3/7C5の共トランスフェクションによるTF1004G19の生成

プラスミド [ファルマシアから入手可能なpH132、pCH110; Hall et al.(1983)J.Mol.Appl.Gen.2:101-109も参照] およびλDNA [λc1875Sam7 (New England Biolabs)とEC3/7C5との共トランスフェクションを、5×10⁶個の受容体細胞当たりプラスミドDNA2~5μgおよびλファージDNA20μgを用いて、リン酸カルシウムDNA沈殿法 [例えば、Chen et al.(1987)Mol.Cell.Biol.7:2745-2752参照]によって行われた。

10

20

30

40

50

C. ソーセージ染色体を有する細胞系

TF1004G19と称される形質転換体の一つの分析から、それがかなりのコピー数の組み込みpH132配列およびpCH110配列を有し、高レベルのβ-ガラクトシダーゼ発現を有していることが明らかになった。G分染およびヒトプローブ[CM8; 例えば、米国特許出願08/375271号参照]を用いたin situハイブリダイゼーションによって予想外に、EC3/7C5細胞系の元二動原体7番染色体で組み込みが起こったことが明らかになった。さらにこの染色体は、新たに形成された異質染色質染色体腕を有していた。この異質染色質腕の大きさは、個々の分裂中期で約150～約800Mbの範囲であった。

TF1004G19細胞系からの単一細胞クローニングによって、約100～150Mbの異質染色質腕を有する安定な7番染色体[ソーセージ染色体]を持つサブクローンTF1004G-19C5[図2D]を得た。この細胞系は、受託番号96040926下にECCに寄託してある。この染色体腕は、付随DNA豊富な4～5個の付随部分と、等間隔に組み込まれた異種「外来」DNA配列から構成されている。ソーセージ染色体のコンパクトな異質染色質腕の末端には、凝縮度の比較的小さい真核末端部分が規則的に認められる。このサブクローンを用いて、さらに分析を行った。

D. ソーセージ染色体が元二動原体染色体由来であることの明示

TF1004G-19C5細胞系におけるλファージおよびpH132DNAによるin situハイブリダイゼーションにより、ミニ染色体上ならびに「ソーセージ」染色体の異質染色質腕上のみでの陽性のハイブリダイゼーションが明らかになった[図2D]。「ソーセージ」染色体[以下、SCとも称する]がEC3/7C5細胞系の元二動原体染色体(FD)から形成されたように思われる。

これを確認するため、pCH110およびpH132プラスミドの組み込み部位を決定した。これは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のビオチン標識小断片によるこれら細胞でのin situハイブリダイゼーションによって行った。両方の実験により、ソーセージ染色体の異質染色質腕での狭いハイブリダイゼーションバンドが生じた。同じハイブリダイゼーションパターンが、ビオチン標識λプローブおよびpH132プラスミドの混合物を用いて、ソーセージ染色体で検出されて、λファージ、pH132プラスミドおよびpCH110プラスミドの共組み込みが明らかになった。

これをさらに調べるため、DNA結合染料ヘキスト33258の存在下に細胞を培養した。この染料存在下でのマウス細胞の培養により、中期染色体の挟動原体異質染色質の低凝縮が生じ、ハイブリダイゼーションパターンを比較的良好に観察することができる。この方法を用いると、TF1004G-19C5細胞のソーセージ染色体の異質染色質腕は規則的な低凝縮を示し、in situでのハイブリダイゼーションによる「ソーセージ」染色体の構造が詳細にわかる。ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のビオチン標識小断片を有するヘキスト処理TF1004G-19C5細胞でのin situでのハイブリダイゼーションの結果は、これらの遺伝子がソーセージ染色体の異質染色質腕のみに局在することを示している。さらに、等しい分染ハイブリダイゼーションパターンが認められた。この反復単位[アンプリコン]パターンは明瞭に、増幅プロセスによってソーセージ染色体が形成されたこと、ならびにλファージ、pH132およびpCH110プラスミドDNA配列がアンプリコンに隣接していることを示している。

マウス挟動原体異質染色質の主要構成成分であるマウスの主要付随DNAを用いて実施された蛍光in situハイブリダイゼーション[FISH]を用いた別の系統の実験では、結果から、ソーセージ染色体のアンプリコンが主として付随DNAから構成されることが確認された。

E. ソーセージ染色体の1個の動原体

マウス動原体配列が「ソーセージ」染色体を形成する増幅プロセスに関与していたか否かならびにアンプリコンが不活性動原体を有するか否かを決定するため、マウスの少量付随DNAを用いてin situハイブリダイゼーションを行った。マウスの少量付随DNAは特に、全てのマウス染色体の動原体付近に局在している。ソーセージ染色体を含む全ての動

10

20

30

40

50

原体で陽性のハイブリダイゼーションが検出されたが、それは異質染色質腕の開始時に陽性の信号を示すのみであった。

機能性動原体 [例えば、Hadlaczky *et al.* (1989) *Chromosoma* 97:282-288参照] のみを認識するヒト抗動原体抗体 [L U 8 5 1] を用いた間接免疫蛍光では、ソーセージ染色体が活性動原体を1個のみ有することが明らかになった。動原体は、染色体の元二動原体部分から来るもので、マウスの少量DNAプローブのin situハイブリダイゼーション信号とともに局在している。

F. ソーセージ染色体の異質染色質における選択および非選択異種DNAの発現

1. 高レベル異種遺伝子の発現

そうしてTF1004G-19C5細胞系は、ソーセージ染色体の異質染色質腕にのみ局在するハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の複数コピーを有する。TF1004G-19C5細胞は、200 μg/mLのハイグロマイシンBの存在下で、あるいは400 μg/mLの場合でさえ、非常に良好に成長することができる [発現レベルは、ハイグロマイシン耐性遺伝子および単一コピー遺伝子の小断片によるノーザンハイブリダイゼーションによって求めた。]。

TF1004G-19C5形質転換体における非選択β-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を、細胞のLacZ染色によって検出した。この方法により、100%の細胞が暗青色に染色され、全てのTF1004G-19C5細胞において高レベルのβ-ガラクトシダーゼ発現があることを示している。

2. 発現される異種遺伝子のソーセージ染色体の異質染色質での存在

ソーセージ染色体の構成異質染色質に局在する遺伝子が、TF1004G-19C5形質転換体 [すなわち、β-gal発現] のハイグロマイシン耐性およびLacZ染色能力を提供することを示すため、TF1004G-19C5マウス細胞とチャイニーズハムスター卵巣細胞との間のPEG誘発細胞融合を行った。ハイブリッドを選別し、G418 [400 μg/mL] およびハイグロマイシン [200 μg/mL] を含むHAT培地で維持した。19C5×Ha3および19C5×Ha4と称される2個のハイブリッドクローン (これらは受託番号96040927下にECCCに寄託してある) を選別した。そのいずれも、ソーセージ染色体とミニ染色体を有している。

19C5×Ha4ハイブリッドの単一細胞由来コロニー27個を維持し、個々のサブクローンについて分析した。ハムスターおよびマウスの染色体着色プローブおよびハムスター2番染色体特異的プローブを用いたin situハイブリダイゼーションにより、19C5×Ha4クローンが完全チャイニーズハムスターゲノムおよび部分的マウスゲノムを有することが確認された。19C5×Ha4サブクローンはいずれも、ハムスターゲノムを保持したが、異なるサブクローンは、異なる数のマウス染色体を示し、マウス染色体の優先的脱離を示している。

マウス染色体のさらなる脱離を促進するため、ハイブリッド細胞をBrdUで繰り返し処理した。ゲノムを不安定化させるBrdU処理によって、マウス染色体が大幅に失われる。BrdU処理19C5×Ha4ハイブリッド細胞を3つの群に分けた。一つのハイブリッド細胞群 (GH) を、ハイグロマイシン (200 μg/mL) およびG418 (400 μg/mL) の存在下に維持し、他の2つの細胞群は、G418 (G) もしくはハイグロマイシン (H) 選択条件下で培養して、ソーセージ染色体もしくはミニ染色体の脱離を促進させた。

1ヶ月後、単一細胞由来サブクローンを、19C5×Ha4ハイブリッド系のこれら3個の継代培養物から得た。ビオチン標識λファージおよびハムスター染色体着色プローブによるin situハイブリダイゼーションによってサブクローンをモニタリングした。ソーセージ染色体を失っていたがミニ染色体を保持したG418の存在下に選別された4つの個々のクローン [G2B5、G3C5、G4D6、G2B4] が認められた。ハイグロマイシン選別下では、1個のサブクローン [H1D3] のみがミニ染色体を失った。このクローンには、メガ染色体 [実施例5参照] が存在していた。

ハイグロマイシン耐性遺伝子およびβ-ガラクトシダーゼ遺伝子はソーセージ染色体から

10

20

30

40

50

発現されると考えられたことから、これら遺伝子の発現を、ソーセージ染色体を失っている4つのサブクローンで分析した。200 μ g/mL ハイグロマイシンの存在下に、4つの個々のサブクロンの細胞の100%が死んだ。 β -ガラクトシダーゼ発現ハイブリッドを検出するため、LacZ染色によってサブクローンを分析した。ソーセージ染色体を失った4つのサブクロンの細胞の100%が、LacZ染色能力も失った。非選択培養条件下でソーセージ染色体を失わなかった他のいずれのハイブリッドサブクローンも、LacZ染色は陽性であった。

これらの所見は、ハイグロマイシン耐性遺伝子および β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現がソーセージ染色体の存在に関連していることを示すものである。in situハイブリダイゼーションの結果は、異種DNAがソーセージ染色体の構成異質染色質から発現されることを示している。

10

他の3つのハイブリッドサブクローン [G2C6、G2D1およびG4D5] のin situハイブリダイゼーション研究では、ソーセージ染色体の存在は検出されなかった。LacZ染色法によって、これらハイブリッド系で染色した細胞が一部検出され、これらのサブクローンについてハイグロマイシン選別を行ったところ、一部のクローンが生残した。これらハイグロマイシン耐性コロニーの細胞学的分析およびin situハイブリダイゼーションからソーセージ染色体の存在が明らかになり、ソーセージ染色体を失っていないG2C6、G2D1およびG4D5ハイブリッドの細胞のみがハイグロマイシン耐性および β -ガラクトシダーゼ発現を保持できたことが示唆された。この結果は、これら遺伝子がソーセージ染色体の存在に関連していることを確認するものであった。 β -ガラクトシダーゼ発現のレベルを、モノクローナル抗体を用いる免疫プロットング法によって測定した。ソーセージ染色体を有する細胞のハイグロマイシン耐性および β -ガラクトシダーゼが、マウス挟動原体異質染色質に局在する遺伝子によって発現された。これは、ハイグロマイシン耐性遺伝子および β -ガラクトシダーゼ遺伝子のPCR増幅小断片をプローブとして用いて、ソーセージ染色体を持たないハイブリッド細胞でサザンDNAハイブリダイゼーションを行うことで示された。いずれのサブクローンも、これらプローブとのハイブリダイゼーションを示さなかった。しかしながら、分析したクローンのいずれにもミニ染色体があった。ソーセージ染色体を有する他のハイブリッドクローンは、これらDNAプローブとの強力なハイブリダイゼーションを示した。これらの結果から、ソーセージ染色体を有する細胞のハイグロマイシン耐性および β -ガラクトシダーゼ発現がマウス挟動原体異質染色質に局在する遺伝子によって行われたとすることができる。

20

30

実施例 5

ギガ染色体

実施例4で説明した通りに、ソーセージ染色体を細胞融合によってチャイニーズハムスター細胞に転移させた。ハイグロマイシンB/HATおよびG418選別を用いて、ソーセージ染色体を有する2つのハイブリッドクローン19C5×Ha3および19C5×Ha4を得た。ハムスターおよびマウス染色体着色プローブおよびハムスター2番染色体特異的プローブを用いたin situハイブリダイゼーションにより、19C5×Ha4が完全なチャイニーズハムスターゲノムと一部のマウスゲノムを有することが確認された。27個の19C5×Ha4コロニーを維持し、個々のサブクローンとして分析した。27個のサブクローン中26個が形態的に未変化のソーセージ染色体を有していた。

40

19C5×Ha3細胞系の1個のサブクローン、19C5×Ha47 [図2E参照] では、ソーセージ染色体の異質染色質腕が不安定となり、継続的な染色体内成長を示した。極端な場合、増幅染色体腕の大きさは1000 Mbを超えていた（ギガ染色体）。

実施例 6

安定なメガ染色体

A. メガ染色体を有する細胞系の形成

すべての19C5×Ha4サブクローンは完全なハムスターゲノムを保持したが、異なるサブクローンは異なった数のマウス染色体を示したことから、マウス染色体の優先的脱離が示された。実施例4に記載のように、マウス染色体のさらなる脱離を促進するためには

50

、ハイブリッド細胞をBrdUで処理し、G418（G）もしくはハイグロマイシン（H）選択条件下に培養し、次に 10^{-4} MのBrdUで16時間の再処理を行い、単一細胞サブクローンを得た。BrdU処理がゲノムを不安定化させて、同様にソーセージ染色体における変化を引き起こしたように思われた。さらに増幅を行った細胞群で、徐々に増加するのが認められた。ソーセージ染色体の約150～250Mb異質染色質染色体腕が形成され、それはマウス7番染色体のものとは異なっていた。別の真正染色質終端部分を獲得することで、新たな次中部動原体染色体（メガ染色体）が形成された。79個の個々のサブクローンを、単一細胞クローニングによって、これらのBrdU処理培地から得た。42個のサブクローンが無傷のメガ染色体を有し、5個のサブクローンがソーセージ染色体を有し、32個のサブクローンで、メガ染色体の断片もしくは転位部分が認められた。メガ染色体を有する26個のサブクローンを、2ヶ月間にわたって、非選択条件下で培養した。26個のサブクローン中19個で、メガ染色体が保持された。メガ染色体を失ったサブクローンはいずれも、ハイグロマイシンBに感受性となり、 β -ガラクトシダーゼ発現がなく、両方のマーカーがメガ染色体に連結していることを示していた。

10

さらなる実験用に選択した2つの垂細胞系（G3D5およびH1D3）は、選択条件下で100を超える世代でメガ染色体の形態に変化はなかった。G3D5細胞は、G418含有培地での19C5×Ha4細胞の成長と、それに続く再度のBrdU処理によって得られたものであったが、H1D3細胞は、ハイグロマイシン含有培地での19C5×Ha4細胞の培養とそれに続く再度のBrdU処理によって得られたものであった。

B. メガ染色体の構造

20

以下の結果は、真正染色質終端部分、組み込み外来DNA（および例示の実施態様の場合にはrDNA配列）は別として、メガ染色体全体が構成異質染色質であり、40ブロック〔約7.5Mb〕以上のマウス主要付随DNA〔図2および3参照〕の縦列配置を有する。4つの付随DNAブロックは、各末端に組み込み外来DNA配列を有する巨大な回文構造〔アンプリコン〕に構成されている。次中部動原体染色メガ染色体の長腕および短腕はそれぞれ、6個のアンプリコンおよび4個のアンプリコンを有する。当然のことながら、各成分の固有の構成および大きさは生物および増幅事象が開始する染色体によって異なり得るものである。

1. 主として異質染色質で構成されたメガ染色体

終端領域および組み込み外来DNAを除き、メガ染色体は主として、異質染色質から構成される。これはメガ染色体のC分染法によって明らかになっており、構成異質染色質の染色特性が陽性となっている。終端領域および組み込み外来DNAは別として、メガ染色体全体は異質染色性であるように思われる。マウス主要付随DNAはマウス染色体の挟動原体構成異質染色質の主要成分であり、総DNAの約10%である〔Waring et al.(1966)Science 154:791-794〕。in situハイブリダイゼーションにマウス主要付随DNAプローブを用いると、終端領域を除いて、メガ染色体全体に強力なハイブリダイゼーションが認められた。そのハイブリダイゼーションは、分割パターンを示した。4つの大きいブロックが短腕に現れ、通常は4～7ブロックが長腕に認められた。これらの部分を、約15Mbの主要付随DNAを有する正常マウス染色体の挟動原体領域と比較することで、メガ染色体上の主要付随DNAのブロックの大きさが、約30Mbであると推定された。

30

40

真正染色質に特異的なマウスプローブ〔pMCPE1.51；マウス長分散反復DNAプローブ〕を用いたら、H1D3ハイブリッド垂細胞系のメガ染色体の終端部分のみで、ハイブリダイゼーション陽性が検出された。G3D5ハイブリッドでは、ハムスター特異的プローブによるハイブリダイゼーションによって、いくつかのメガ染色体が長腕にハムスター起源の終端部分を有することが明らかになった。この所見は、これら染色体での終端部分の獲得がハイブリッド細胞で起こっていること、ならびにメガ染色体の長腕が形成されて間もない腕であることを示していた。マウス染色体の動原体に特異的なマウスの少量付随プローブを用いると〔Wong et al.(1988)Nucl.Acids Res.16:11645-11661〕、強力なハイブリダイゼーション信号がメガ染色体の一次くびれのみで検出され、それはヒト抗動原体血清〔LU851〕によって生じる陽性の免疫蛍光信号と同じ位置であった。

50

pH 13.2、pCH 110およびλ DNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション実験からは、全ての異種DNAがマウス主要付随DNA部分間のギャップにあることが明らかになった。マウス主要付随DNAの各部分の境界には、二重バンドの異種DNAが存在する長腕の第2の部分を除き、狭バンドの組み込み異種DNAがあり、そこには主要付随DNA部分がないか、あるいはかなり少ないことを示していた。この染色体領域は、メガ染色体の長腕を確認する上での有用な細胞学的マーカーとして役立った。1個の染色分体で部分全体の形成が起こった場合は、これら欠落付随DNAブロックの「復旧」が 10^{-4} の頻度で認められた。

ヘキスト33258処理(50 μg/mLで16時間)後、メガ染色体は、末端部分を除き、その全長にわたって低凝縮を示した。これによって、比較的高い分解能で、メガ染色体の構造を調べることが可能となった。低凝縮メガ染色体でのマウス主要付随プローブによるin situハイブリダイゼーションでは、約30 Mbの主要付随部分が、狭バンドの非ハイブリダイゼーション配列によって互いに分離された約7.5 Mbの4個のブロックから構成されていることが示された[図3]。LMTK⁻細胞系およびA9細胞系からの中部動原体マウス染色体における挟動原体異質染色質の大きいブロックで、同様の分割化を認めることができる。

2. 2個の縦列約7.5 Mbブロックとそれに続く反転ブロックを有する部分から構成されたメガ染色体

マウス細胞を単一S期の間、BrdUの存在下に成長させた場合、マウス主要付随体のDNAの2個の鎖の間でチミジン含有量に非対称性があることから、構成異質染色質はFPG染色後に側面非対称を示す。さらに、19C5×Ha4ハイブリッドでは、マウス線維芽細胞のチミジンキナーゼ[Tk]⁻欠乏が、ハムスターTK遺伝子によって補完されて、BrdU組み込み実験が可能であった。

メガ染色体の驚くべき構造上の規則性が、FPG法を用いて検出された。いずれの染色分体においても、メガ染色体の外観を格子模様とする暗および明の交互の染色が認められた。同様の見かけが、フルオレセイン接合抗BrdU抗体による標識によって得られた。これらの外観をメガ染色体の分割された外観と比較することで、1個の暗および1個の明FPGバンドが、約30 Mbのメガ染色体部分1個に相当することが明らかになった。これらの結果は、約30 Mb部分の両半分が反転した配向を有することを示唆している。これは、in situでのハイブリダイゼーションと同じ染色体でのフルオレセイン接合抗BrdU抗体による取り込みBrdUの免疫標識とを併用することで確認された。このメガ染色体の約30 Mbの部分[またはアンプリコン]はマウス主要付随DNAの4個のブロックから構成されていることから、一つの部分内に、縦列の約7.5 Mbブロック2個に続いて、2個の反転ブロックがあると言えることができる。

パルスフィールド電気泳動および「外来」DNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによるメガ染色体DNAの大量マッピングにより、簡単なパターンの制限断片が明らかになった。組み込み外来DNA配列において開裂部位がないか一つだけであるエンドヌクレアーゼを用い、次にhygプローブによるハイブリダイゼーションを行ったところ、1~4個の主要断片が検出された。メガ染色体には10~12個のアンプリコンがあり、そのアンプリコン当たり推定で3~8個のhyg配列のコピーがあることから(メガ染色体当たり30~90個のコピー)、ハイブリダイゼーション断片数が小さいということは、増幅部分においてDNAが均一であることを示している。

3. メガ染色体の走査型電子顕微鏡測定による上記所見の確認

メガ染色体の異質染色質腕の均一な構成が、高分解能走査型電子顕微鏡観察によって確認された。ヘキスト33258で処理したメガ染色体の延長腕およびマウス染色体の挟動原体異質染色質領域は同様の構造を示した。構成異質染色質領域は、真正染色質部分よりコンパクトであるように見えた。末端領域は別として、メガ染色体の両方の腕は完全に延長され、かすかな窪みを示しており、それは非増幅染色体とメガ染色体における付随DNAブロックの境界に相当するはずである。ヘキスト処理を行わない場合、その溝はメガ染色体腕におけるアンプリコン境界に相当するように思われた。さらに動原体は、周囲の異質

10

20

30

40

50

染色質よりコンパクトで細かい繊維状外観を示していた。

4. rRNA遺伝子配列を有する1B3細胞のメガ染色体

異種DNAの組み込み部位の領域におけるメガ染色体の配列を、クローニング法を用いたその領域の単離および得られたクローンの配列分析によって調べた。この分析の結果は、異種DNAが、メガ染色体に含まれるマウスリボソームRNA遺伝子（すなわち、rDNA）付近に異種DNAが局在することを示していた。

a. 異種DNAを組み込んだメガ染色体の領域のクローニング

本明細書に記載の方法（実施例10参照）に従った蛍光活性化細胞選別法を用いて、メガ染色体を1B3細胞（反復BrdU処理とH1×HE41細胞（図4参照）の単一細胞クローニングによって得られ、切断メガ染色体を有するもの）から単離した。内因性染色体からのSATAC（メガ染色体）の分離後、単離したメガ染色体をGH緩衝液（100mMグリシン、1%ヘキシレングリコール、飽和水酸化カルシウム溶液でpH8.4～8.6に調節したもの；実施例10参照）に保存し、0.5M EDTA中のアガロース床に遠心して入れた。

異種DNAの組み込み部位の領域周囲のメガ染色体の大量マッピングから、それがNotI用の認識部位のようなレアカッティング（rare-cutting）酵素部位を有する配列で豊富であることが明らかになった。さらに、マウス主要付随DNA（メガ染色体の大部分を構成する）は、NotI認識部位を持たない。従って、異種DNA組み込み部位と関連するメガ染色体領域の単離を容易にするため、単離したメガ染色体を8bpのGC認識部位を有するレアカッティング制限エンドヌクレアーゼであるNotIで開裂させた。メガ染色体の断片を次のように、プラスミドpWE15（Stratagene, La Jolla, California）に挿入した。単離SATACを有する100μLの低融点アガロースブロック（メガプラグ）の半量を、NotIで37℃にて終夜消化させた。次に、メガプラグを溶融させ、消化プラスミド、連結緩衝液およびT4リガーゼと混合した。連結は16℃で終夜実施した。細菌DH5α細胞を連結生成物によって形質転換させ、形質転換した細胞をLB/Amp平板で平板培養した。15～20個のコロニーを各平板で増殖させて、計189個のコロニーを得た。プラスミドDNAを、LB/Amp培地での増殖を生き残ったコロニーから単離し、サザンブロッティングハイブリダイゼーションにより、pUC19プローブに対してハイブリダイゼーションしたDNAの存在について分析した。このスクリーニング方法によって、全てのクローン、挿入物を持たないがpWE15プラスミドを有するクローンさえも検出されるようになった。挿入DNAを有するクローンは、異種DNAの組み込み部位にある非付随GC豊富メガ染色体DNA配列を有すると予想されよう。いずれのコロニーも、ハイブリダイゼーションDNAについては陽性であった。

189の全ての形質転換体の液体培養物を用いてコスミドの微小サンプルを得て、挿入DNA内の制限部位分析に供した。最初の189のコスミドコロニー中6コロニーが挿入物を有していた。これらのクローンは28（約9kbの挿入物）、30（約9kbの挿入物）、60（約4kbの挿入物）、113（約9kbの挿入物）、157（約9kbの挿入物）および161（約9kbの挿入物）と称した。制限酵素分析から、これらクローン中で3個（113、157および161）が同じ挿入物を有していることがわかった。

b. プローブとしてメガ染色体の単離部分を用いるin situハイブリダイゼーション実験

クローン30、113、157および161からの挿入DNAを精製し、標識し、いくつかの細胞系のin situハイブリダイゼーション試験におけるプローブとして使用した。ヨウ化プロピジウムを用いた細胞の対比染色によって、ハイブリダイゼーションの細胞部位を確認しやすくした。細胞中で検出された信号の位置を、以下の表にまとめている。

細胞の種類	プローブ	信号の位置
ヒトリンパ球 (男性)	No.161	動原体領域の4~5個の末端動原体染色体対
マウス脾臓	No.161	4対の染色体の末端動原体末端
EC3/7C5細胞	No.161	ミニ染色体と元二動原体染色体の末端。中部動原体マウス染色体の一つの挟動原体異質染色質。他のマウス染色体の一部の動原体領域。
K20チャイニーズハムスター細胞	No.30	6対以上の染色体の末端。短い染色体上の中間 (interstitial) 信号
HB31細胞 (繰り返しBrdU処理と単一細胞クローニングによるH1D3細胞由来のマウス-ハムスターハイブリッド細胞で、メガ染色体を有するもの)	No.30	12対以上の染色体の末端動原体末端。ある種の染色体の動原体およびメガ染色体。メガ染色体のアンプリコンの境界。
マウス脾臓細胞	No.30	プローブNo.161で認められる信号と同様。5対の染色体の動原体。挟動原体異質染色質に対する弱い交差ハイブリダイゼーション。
HB31細胞	No.113	プローブNo.30で認められる信号と同様。
マウス脾臓細胞	No.113	5対の染色体の動原体領域
K20細胞	No.113	6対以上の染色体。一部の末端小粒での弱い信号といくつかの中間信号。
ヒトリンパ球 (男性)	No.157	プローブNo.161で認められる信号と同様

c. プローブとしてメガ染色体の単離部分を用いるサザンブロッティングハイブリダイゼーション

マウス脾臓組織、マウスLMTK⁻細胞、K20チャイニーズハムスター卵巣細胞、EJ30ヒト線維芽細胞およびH1D3細胞からDNAを単離した。単離したDNAとラムダファージDNAについて、メガ染色体クローンNo. 30、113、157および161から単離した挿入物をプローブとして用いるサザンブロッティングハイブリダイゼーションを行った。プラスミドpWE15を陰性対照プローブとして用いた。4つのメガ染色体クローン挿入物のそれぞれを、ラムダファージDNAを除くDNAサンプル全てに、多コピー法でハイブリダイゼーションした (ハイブリダイゼーションの強度およびハイブリダイゼーションバンド数によって示される)。プラスミドpWE15はラムダDNAのみにハイブリダイゼーションした。

d. メガ染色体クローンNo. 161の配列分析

メガ染色体クローンNo. 161は、in situ実験およびサザンハイブリダイゼーション実験で最強のハイブリダイゼーションを示すように思われ、挿入配列の分析に選択した。

10

20

30

40

50

配列分析は、最初にコスミドクローンNo. 161のサブクローニングを行って、次のような5個のサブクローンを得ることで行った。

クローンNo. 161の挿入物の末端断片を得るため、クローンをNotIおよびBamHIで消化させ、NotI/BamHI消化pBlue-script KS (Stratagene, La Jolla, California)と連結させた。クローンNo. 161の挿入物の2個の断片、0.2 kbおよび0.7 kb挿入物断片を得た。クローンNo. 161の挿入物の内部断片のサブクローニングを行うため、同じ消化物をBamHI消化pUC19と連結させた。クローンNo. 161の挿入物の3個の断片、0.6 kb、1.8 kbおよび4.8 kb挿入物断片を得た。

サブクローニングした挿入物断片全ての末端について、最初に手技にて配列決定した。しかしながら、極めて高いGC含有量のため、オートラジオグラフは解釈が困難で、ABIシーケンサおよび染料終止暗号サイクルプロトコルを用いて配列決定を繰り返した。その配列データとGENBANKデータベースにある配列とを比較したところ、クローンNo. 161の挿入物がGENBANK受託番号X82564（本明細書では配列番号16として示してある）で示された位置7551～15670の間のマウスリボソームRNA遺伝子（rDNA）反復単位の内部部分に相当することがわかった。クローンNo. 161の挿入物について得られた配列データを配列番号18～24に示してある。具体的には、個々のサブクローンが、GENBANK受託番号X82564（すなわち、配列番号16）および配列番号18～24における以下の位置に相当していた。

サブクローン	開始	終了	部位	配列番号
	X82564 で			
161k1	7579	7755	<u>NotI</u> , <u>BamHI</u>	18
161m5	7756	8494	<u>BamHI</u>	19
161m7	8495	10231	<u>BamHI</u>	20(ヌクレオチド 8495～8950 に 相当する配列のみ示す) 21(ヌクレオチド 9851～10231 に 相当する配列のみ示す)
161m12	10232	15000	<u>BamHI</u>	22(ヌクレオチド 10232～10600 に相当する配列のみ示す) 23(ヌクレオチド 14267～15000 に相当する配列のみ示す)
161k2	15001	15676	<u>NotI</u> , <u>BamHI</u>	24

配列番号18～24に示した配列は、GENBANK受託番号X82564の位置7551～15670で示された配列とは一部の位置が異なっている。そのような相違は、rDNAの反復単位間のランダム突然変異が原因であると考えられる。クローン161の配列分析の結果はそれがrDNAに相当することを示したが、それはそのクローンがヒトリンパ球およびマウス脾臓細胞で形成したin situハイブリダイゼーション信号の外観と相関性がある。ハイブリダイゼーション信号は、これら細胞における末端動原体染色体で明瞭に認められ、そのような種類の染色体は、その染色体の短腕にある挟動原体付随DNAに隣接するrDNAを含むことが知られている。さらに、rRNA遺伝子は哺乳動物において非常に保存度が高く、それはヒト染色体DNAに対するクローンNo. 161の生物間交差ハイブリダイゼーションによって裏付けられる。

rDNAで認められるもののような増幅－複製制御領域を単離するため、H1D3細胞などのメガ染色体を有する細胞から単離したDNAに対して、例えば以下のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、核酸増幅を行うことが可能である。

増幅制御要素順プライマー（1～30）

5'-GAGGAATTCCCCATCCCTAATCCAGATTGGTG-3'（配列番号25）

増幅制御要素逆プライマー（2142～2111）

5'-AAACTGCAGGCCGAGCCACCTCTCTTCTGTGTTTG-3'（配列番号26）

複製領域順プライマーの起源（2116～2141）

5'-AGGAATTACAGAAGAGAGGTGGCTCGGCCTGC-3'（配列番号27）

複製領域逆プライマーの起源（5546～5521）

5'-AGCCTGCAGGAAGTCATACCTGGGGAGGTGGCCC-3'（配列番号28）

C. メガ染色体形成の概要

図2に、マウスLMTK⁻細胞系における二動原体染色体の形成から始まる安定なメガ染色体の形成に至る事象を示してある。（A）λCM8およびλgtWESneoによるLMTK⁻細胞のトランスフェクション後のマウス7番染色体の動原体領域での1回のE型増幅により組み込み外来DNAに連結したneo－動原体を得て、二動原体染色体を形成する。複数回のE型増幅によってλneo染色体を形成する。それは7番染色体由来のものであり、マウス－ハムスターハイブリッド細胞系で安定化したものである。（B）二動原体7番染色体の動原体間の特異的切断により、neo－動原体を有する染色体断片と、末端に外来DNAの痕跡を有する7番染色体とを形成する。（C）neo－動原体を有する断片の反転複製により、安定なneo－ミニ染色体を形成する。（D）元二動原体7番染色体の外来DNA領域への外因性DNAの組み込みによってH型増幅を行い、異質染色質腕を形成する。真正染色質終端部分を捕捉することで、この新たな染色質腕を「ソーセージ」染色体の形で安定化させる。（E）BrdU処理および／または薬剤選別によってさらにH型増幅が誘発され、それによって不安定なギガ染色体が形成されるように見える。（F）繰り返しBrdU処理および／または薬剤選別により、動原体複製を含むさらなるH型増幅を誘発し、それによって別の異質染色質染色体腕を形成する。染色体切断によって、それを7番染色体から切り離し、終端部分を獲得させて、安定なメガ染色体を形成する。

D. メガ染色体またはその誘導体を有する細胞系でのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシントランスフェラーゼ遺伝子の発現

メガ染色体またはその誘導体を有する細胞系での異種遺伝子（すなわち、β－ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシントランスフェラーゼ遺伝子）発現のレベルを量的に測定した。異種遺伝子のコピー数間の関係およびそれから発現される蛋白のレベルも測定した。

1. 材料および方法

a. 細胞系

上記のような250～400Mbのメガ染色体を有するH1D3細胞と50～60Mbのミクロメガ染色体を有するmM2C1細胞の異種遺伝子発現レベルを量的に評価した。H1×He41細胞系（メガ染色体ならびにCD4およびneo遺伝子を有する単一のヒト染色体を有するマウス－ハムスター－ヒトハイブリッド細胞系；図4参照）の再度のBrdU処理および単一細胞クローニングによって、mM2C1細胞を形成した。F12培地中で、選択条件（120μg/mLハイグロマイシン）もしくは非選択条件下に、その細胞系を成長させた。

b. β－ガラクトシダーゼアッセイのための細胞抽出物の取得

mM2C1もしくはH1D3細胞培養物の単層を、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3

10

20

30

40

50

回洗浄した。細胞をゴム製ポリスマンで掻き取り、懸濁させて、再度PBSで洗浄した。洗浄した細胞を0.25Mトリス-HCl (pH7.8)に再懸濁させ、液体窒素中での冷凍および37℃での解凍を3サイクル行って破壊した。抽出液を4℃にて12000rpmで5分間遠心することで透明とした。

c. β-ガラクトシダーゼアッセイ

β-ガラクトシダーゼアッセイ混合物は、1mMのMgCl₂、45mMのβ-メルカプトエタノール、0.8mg/mLのo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドおよび66mMのリン酸ナトリウム (pH7.5)を含んでいた。反応混合物を細胞抽出物とともに時間を長くして37℃でインキュベーションした後、3倍容量の1M Na₂CO₃を加えることで反応を停止し、420nmで光学密度を測定した。細胞抽出物を加えずにインキュベーションしたアッセイ混合物を対照として用いた。反応の直線範囲を測定したところ、0.1~0.8OD₄₂₀であった。β-ガラクトシダーゼ活性1単位を、37℃で1分間に3nmolのo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素量と定義する。

10

d. ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼアッセイのための細胞抽出物の取得

細胞を上記のように洗浄し、20mMのヘ pes (Hepes) 緩衝液 (pH7.3)、100mMの酢酸カリウム、5mMの酢酸マグネシウムおよび2mMのジチオトレイトールに再懸濁させた。微小先端プローブを用い、MSE超音波破碎機中0℃で10秒間印加を6回行うことで、細胞を破壊した。各超音波印加後1分後、細胞を放冷した。抽出物を微量遠心管中、2000rpmで1分間遠心することで透明とした。

20

e. ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼアッセイ

ホスホセルロース紙結合アッセイ (Haas and Dowding(1975), *Meth. Enzymol.* 43:611-628に記載のもの)によって、酵素活性を測定した。細胞抽出物に、0.1Mの塩化アンモニウムおよび1mMのアデノシン-γ-³²P-トリホスフェート (比放射能: 300Ci/mmol)を補給した。0.1mg/mLのハイグロマイシンを加えて反応開始し、長い時間にわたって37℃でインキュベーションした。水浴で75℃にて5分間サンプルを加熱することで反応停止し、沈殿した蛋白を微量遠心管中で5分間遠心することで除去した後、上清の少量サンプルをワットマン (Whatman) P-81ホスホセルロース紙 (2cm²)にスポットとしてしみ込ませた。室温で30秒後、紙を高温 (75℃) 蒸留水500mLに3分間入れた。この条件下で放射性ATPが溶液中に残っている間、ハイグロマイシンホスフェートはホスホセルロースに強力かつ定量的に結合している。紙を蒸留水500mL中で3回すすぎ、ベックマン (Beckman) 液体シンチレーションカウンタで、トルエンシンチレーションカクテル中にて、結合している放射能を測定した。ハイグロマイシンを加えずにインキュベーションした反応混合物を対照とした。

30

f. 異種遺伝子のコピー数の測定

細胞のSDS溶解とそれに続くプロテイナーゼK処理およびフェノール/クロロホルム抽出が関与する標準的な精製プロトコルを用いて、DNAをH1D3およびmM2C1細胞から得た。単離DNAを適切な制限エンドヌクレアーゼで消化させ、アガロースゲルで分別し、ナイロンフィルターに吸い取らせ、β-ガラクトシダーゼ遺伝子もしくはハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子由来の放射性プローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションのレベルを定量した (Molecular Dynamics PhosphorImage Analyzerにて)。異なった細胞系から負荷したDNAの総量を補正するため、フィルターを単一コピー遺伝子で再プロービングし、β-ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を単一コピー遺伝子ハイブリダイゼーションに対して正規化した。

40

g. 蛋白濃度の測定

細胞抽出物の総蛋白量を、標準としてウシ血清アルブミンを用いるブラッドフォード比色分析によって測定した。

2. H1D3細胞およびmM2C1細胞で発現されるβ-ガラクトシダーゼおよびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性の特性決定

50

量的条件を確立するため、 β -ガラクトシダーゼおよびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性の最も重要な動力的パラメータについて調べた。この比色分析で測定した β -ガラクトシダーゼ活性は、 $\text{nM}2\text{C}1$ および $\text{H}1\text{D}3$ 細胞系の両方について、 $0.1 \sim 0.8 \text{ OD}_{420}$ の範囲で線形であった。 β -ガラクトシダーゼ活性は、いずれの細胞系においても、総蛋白濃度範囲 $5 \sim 100 \mu\text{g}$ 以内で反応混合物に加えた蛋白量にも比例していた。 $\text{nM}2\text{C}1$ および $\text{H}1\text{D}3$ 細胞系のハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性は、 β -ガラクトシダーゼについて記載の条件下での反応時間または加えた細胞抽出物の総量にも比例していた。

a. $\text{mM}2\text{C}1$ および $\text{H}1\text{D}3$ 細胞系の β -ガラクトシダーゼ活性の比較

対数増殖期 $\text{mM}2\text{C}1$ および $\text{H}1\text{D}3$ 細胞系から得られた細胞抽出物について β -ガラクトシダーゼ活性を調べ、10回の独立の実験で比活性を比較した。 $\text{H}1\text{D}3$ 細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性は、 $440 \pm 25 \text{ U/mg}$ 総蛋白であった。同じ条件下で、 $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性は $1/4.8$ であり、 $92 \pm 13 \text{ U/mg}$ 総蛋白であった。

10

$\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系の高分散、分散およびほぼ集密の培養液の β -ガラクトシダーゼ活性も比較した。これらの実験では、対数的に細胞数が異なった $\text{H}1\text{D}3$ 細胞および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞を、一定容量の培地に接種し、標準的条件下に3日間成長させた。異なる細胞密度で成長させた細胞培養物の β -ガラクトシダーゼ比活性に有意差は認められず、 $\text{H}1\text{D}3/\text{mM}2\text{C}1$ β -ガラクトシダーゼ比活性も、3つの細胞密度のいずれにおいても同様であった。しかしながら、 $\text{H}1\text{D}3$ もしくは $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞の集密で静止した細胞培養物では、恐らくは接触障害の結果としての細胞分裂停止のために β -ガラクトシダーゼの発現は有意に低かった。

20

b. $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系のハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性の比較

細菌ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼは、 $\text{H}1\text{D}3$ または $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系に膜結合型で存在する。これは、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性を、これら細胞抽出物の高速遠心によって完全に除去することができ、その酵素活性は高速ペレットを再懸濁することで回復できるという所見によるものである。

$\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系における酵素の比活性の比は、 β -ガラクトシダーゼ活性と同様であった。すなわち、 $\text{H}1\text{D}3$ 細胞は、 $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞と比較して4.1倍の比活性を有している。

30

c. 非選択条件下で成長させた $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞におけるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ活性

ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の発現レベルを、30世代にわたって非選択条件下で成長させた $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系における比酵素活性定量に基づいて測定した。培地にハイグロマイシンがないことは、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の発現に影響しなかった。

3. $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系における β -ガラクトシダーゼおよびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子コピー数の定量

前述のように、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子は、メガ染色体、すなわち $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞におけるミクロメガ染色体内のみにある。 $\text{H}1\text{D}3$ および $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞系から単離したDNAのゲノムサザンプロットの定量分析(PhosphorImage Analyzerによる)から、メガ染色体に組込んだ β -ガラクトシダーゼ遺伝子のコピー数は、 $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞の場合と比較して $\text{H}1\text{D}3$ 細胞の方が約10倍であることがわかった。ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子のコピー数は、 $\text{mM}2\text{C}1$ 細胞の場合と比較して $\text{H}1\text{D}3$ 細胞の方が約7倍である。

40

4. メガ染色体またはその誘導体を有する細胞での異種遺伝子発現の定量結果の概要と結論

異質染色質メガ染色体における細菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を有する高等真核生物(

50

例：H 1 D 3 細胞）の β -ガラクトシダーゼ活性の定量測定により、細胞染色法によって検出される組込み細菌遺伝子が高レベルで発現するのが認められることが確認された。遺伝子導入動物における外来遺伝子の発現についての研究の報告では、導入遺伝子発現は正確な組織および発達の特異性を示すが、発現レベルは低いのが普通であり、広範囲の位置依存性の変動性を示す（すなわち、導入遺伝子発現のレベルは、染色体組込みの部位によって決まる）ことが明らかになっている。導入遺伝子の発現が低レベルであるのは、導入遺伝子を周囲の染色質の阻害効果から絶縁し、有効な遺伝子発現に必要な活性染色質構造の形成を促進する特殊な DNA 配列がないためであると仮定されている。この位置依存性の変動性を無効にし得て、高等真核生物における導入遺伝子座作用性領域（LAR）配列および下等真核生物における固有の染色質構造（scs）要素の高レベル発現を保証できるいくつかのシス作用性 DNA 配列要素が確認されている（例えば、Eissenberg and Elgin (1991) *Trends in Genet.* 7:335-340 参照）。これらのシス作用性 DNA 配列がない場合、導入遺伝子発現のレベルは低く、コピー数依存性である。

H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞の異質染色質メガ染色体に含まれる細菌 β -ガラクトシダーゼ受容体遺伝子は強力な真核生物プロモーター-エンハンサー要素によって作用するが、特異的シス作用性 DNA 配列要素を設計したり、それを境界要素として機能すると考えられる細菌 DNA 構築物に組み込んではいない。そこで、特にメガ染色体における β -ガラクトシダーゼ遺伝子が、遺伝子発現を遮断できることが知られている長くコンパクトな異質染色質環境にあることから、これらの細胞で測定される高レベル β -ガラクトシダーゼ発現は重要である。メガ染色体は、遺伝子発現に対する異質染色質の阻害効果を克服するよう機能する細菌 DNA 配列に関連して、DNA 配列要素を有するようと思われる。メガ染色体における異種遺伝子発現の特異性は、 β -ガラクトシダーゼ発現レベルがコピー数依存性であるという所見によっても裏付けられる。全長メガ染色体を有する H 1 D 3 細胞系では、 β -ガラクトシダーゼの比活性は、比較的小さく切断された形のメガ染色体のみを有する mM 2 C 1 細胞の約 5 倍である。定量的ハイブリダイゼーション法による H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞系における β -ガラクトシダーゼ遺伝子コピーの数の比較から、 β -ガラクトシダーゼの発現がコピー数依存性であることが確認された。組込み β -ガラクトシダーゼ遺伝子コピー数は、H 1 D 3 細胞の方が mM 2 C 1 細胞の約 10 倍である。そこで、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のコピー数を多く有する細胞系では、 β -ガラクトシダーゼ活性レベルは高くなり、それは発現のコピー数依存性を裏付けるものである。メガ染色体の異なる誘導体を有する細胞系における β -ガラクトシダーゼレベルおよびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ酵素レベルのコピー数依存性は、細菌遺伝子の組込み部位を囲む染色質配置およびメガ染色体の異質染色質環境のいずれも遺伝子発現を抑制しないことを示している。

H 1 D 3 細胞で発現される β -ガラクトシダーゼ蛋白の相対量を、この酵素の V_{max} [均一な結晶化細菌 β -ガラクトシダーゼ (Naider et al. (1972) *Biochemistry* 11:3202-3210) の場合 500] および H 1 D 3 細胞蛋白の比活性に基づいて推定することができる。500 という V_{max} は、均一な β -ガラクトシダーゼ蛋白が 37°C で酵素蛋白 1 mg 当たり 1 分間に基質 500 μmol を加水分解することを意味している。総 H 1 D 3 細胞蛋白抽出物 1 mg が、37°C で毎分 1.4 μmol の基質を加水分解することができる。すなわち H 1 D 3 細胞抽出物中に存在する蛋白の 0.28% が β -ガラクトシダーゼである。ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼは、H 1 D 3 および mM 2 C 1 細胞中に膜結合した形で存在する。その酵素が高等真核生物細胞で膜中に組込まれる傾向は、それが原核生物細胞において細胞周辺に局在することと関係があると考えられる。細菌ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼは、均一になるまで精製されたことはない。従って、その V_{max} は測定されていない。従って、その細胞系で発現されるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ蛋白の総量について推定を行うことはできない。しかしながら、mM 2 C 1 細胞と比較して H 1 D 3 細胞におけるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼの比活性が 4 倍であることは、その発現もコピー数依存性であることを示している。特に β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現に対する選択圧がない場合における H 1 D 3 およ

10

20

30

40

50

びmM2C1細胞でのその遺伝子の発現が一定で高レベルであることは、異質染色質メガ染色体で生じる遺伝子発現が安定であることを明瞭に示している。この結論はさらに、H1D3およびmM2C1細胞を非選択条件下に増殖させた場合、ハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ発現レベルが変化しなかったという所見によっても裏付けられる。細菌マーカー遺伝子の常に高レベルな、安定した、コピー数依存的発現は、メガ染色体が外来遺伝子の発現に対する理想的ベクター系であることを明瞭に示している。

実施例7

構築されたSATACおよびミニ染色体を有する細胞系の一部についての概要

1. EC3/7由来細胞系

マウス線維芽細胞系であるLMTK⁺由来細胞系を、λCM8およびλgtWESneo DNAでトランスフェクションして〔実施例2参照〕、形質転換細胞系を得た。これらの細胞系には、受託番号90051001下にECACC (European Collection of Animal Cell Culture) に寄託されたEC3/7があった〔米国特許5288625号参照; Hadlaczky et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8106-8110および米国特許出願08/375271号も参照〕。この細胞系は、neo-動原体を有する二動原体染色体を有する。再クロニングおよび選別によって、安定なneo-ミニ染色体および元二動原体染色体を有する細胞系であるEC3/7C5などの細胞系を得た〔図2C参照〕。

10

2. KE1-2/4細胞

EC3/7のCHO-K20細胞との融合およびG418/HATによる選別によってハイブリッド細胞系が得られ、その中にKE1-2/4があって、それは受託番号96040924下にECACCに寄託してある。KE1-2/4は、λneo染色体を有する安定な細胞系であり〔図2D参照; 米国特許5288625号も参照〕、E型増幅によって得られたものである。KE1-2/4は、λDNA、プロマイシン耐性遺伝子などの選択可能マーカー、p52および抗HIVリボザイム遺伝子などの対象遺伝子を有するベクターでトランスフェクションされている。これらのベクターは、染色体中の異種DNAによる相同組換えによってλneo染色体中に対象遺伝子を導入する。

20

3. C5pMCT53細胞

EC3/7C5細胞系をpH132、pH110およびλDNAならびに他の構築物と共にトランスフェクションしている (実施例2参照)。各種クローンおよびサブクローンが選別されている。例えば、p53をコードするDNAを有する構築物による形質転換によ

30

4. TF1004G24細胞

前述のように、プラスミド〔ファルマシアから入手のpH132、pCH110; Hall et al. (1983) J. Mol. Appl. Gen. 2:101-109も参照〕およびλDNA〔λc1875Sam7 (New England Biolabs)〕とのEC3/7C5細胞の共トランスフェクションによって、形質転換細胞を得た。これらの中には、neo-ミニ染色体中で抗HIVリボザイムをコードするDNAを有するTF1004G24がある。TF1004G24の再クロニングによって、多くの細胞系が得られた。その中にはNHHL24細胞系がある。この細胞系も、neo-ミニ染色体に抗HIVリボザイムを有し、高レベルのβ-galを発現する。それをCHO-K20細胞と融合させて、各種ハイブリッドを得た。

40

5. TF1004G19由来細胞

TF1004G形質転換体の再クロニングおよび選別によって、不安定なソーセージ染色体およびneo-ミニ染色体を有する、実施例4で前述した細胞系TF1004G19を得た。単一細胞クロニングによって、安定なソーセージ染色体およびneo-ミニ染色体を有するTF1004G-19C5〔図4参照〕細胞系を得た。TF1004G-19C5をCHO細胞と融合させて、ハイブリッドを選択条件下に成長させて、19C5×Ha4および19C5×Ha3細胞系〔実施例4参照〕およびその他の細胞系を得た。19C5×Ha3細胞系の再クロニングによって、ギガ染色体を有する細胞系、すなわち細胞系19C5×Ha47 (図2E参照) を得た。19C5×Ha4細胞のBrdU処理および選択条件下〔ネオマイシン (G) および/またはハイグロマイシン (H)〕での成

50

長によって、G 3 D 5 および G 4 D 6 細胞系ならびに他の細胞系などのハイブリッド細胞系が得られている。G 3 D 5 は n e o - ミニ染色体およびメガ染色体を有している。G 4 D 6 は、n e o - ミニ染色体のみを有する。

H 培地での 1 9 C 5 × H a 4 細胞の再クローニングによって多くのクローンが得られた。その中には、安定なメガ染色体を有する H 1 D 3 [図 4 参照] がある。再度の B r d U 処理および H 1 D 3 細胞の再クローニングによって H B 3 1 細胞系が得られており、それを p T E M P U D、p T E M P U、p T E M P U 3 および p C E P U R - 1 3 2 ベクターによる形質転換に用いた [以下の実施例 1 2 および 1 4 参照]。

H 1 D 3 を、プラスミドに C D 4 およびネオマイシン耐性をコードする D N A を有する C D 4⁺ H e l a 細胞系と融合させている [例えば、その H e l a 細胞について記載している米国特許 5 4 1 3 9 1 4 号、5 4 0 9 8 1 0 号、5 2 6 6 6 0 0 号、5 2 2 3 2 6 3 号、5 2 1 5 9 1 4 号、5 1 4 4 0 1 9 号参照]。G H による選別によって、メガ染色体と C D 4 n e o 構築物を含む単一のヒト染色体を有する H 1 × H E 4 1 [図 4 参照] などのハイブリッドを得ている。再度の B r d U 処理および単一細胞クローニングによって、メガ染色体を有する細胞系を得ている [細胞系 1 B 3 ; 図 4 参照]。1 B 3 細胞の約 2 5 % が切断メガ染色体 [約 9 0 ~ 1 2 0 M b] を有する。これらサブクローンの別のものである 2 C 5 と称されるものを、含ハイグロマイシン培地で培養し、メガ染色体を含まない細胞系を得て、G 4 1 8 を含む培地で成長させた。これら細胞の再クローニングによって、矮小メガ染色体 [約 1 5 0 ~ 2 0 0 M b] を有する I B 4 その他の細胞系、ならびにミクロメガ染色体 [約 5 0 ~ 9 0 M b] を有する I 1 C 3 および m M 2 C 1 などの細胞系を得た。細胞系 m M 2 C 1 のミクロメガ染色体は末端小粒を持たない。しかしながら、所望に応じて、本明細書で記載および生成したものなどの合成末端小粒を m M 2 C 1 細胞ミクロメガ染色体に付加することができる。ミクロメガ染色体を有する m M 2 C 1 細胞系などの比較的小さい切断メガ染色体を有する細胞系を用いて、さらに小さいメガ染色体 (例えば、大きさが約 1 0 ~ 3 0 M b) を形成することができる。これは例えば、これら細胞を X 線照射、B r d U もしくは末端小粒指向 in vivo 染色体断片化に曝露することで、その細胞におけるミクロメガ染色体を切断および断片化することで行うことができる。

実施例 8

メガ染色体の複製

メガ染色体の均一構造により、構成異質染色質の複製についての詳細な分析を行う特有の機会が得られる。

A. 材料および方法

1. 細胞系の培養

メガ染色体を有する H 1 D 3 マウス-ハムスターハイブリッド細胞 [実施例 4 参照] を、1 0 % ウシ胎仔血清 [F C S] および 4 0 0 μ g / m L ハイグロマイシン B [Calbiochem] を含む F - 1 2 培地で培養した。G 3 D 5 ハイブリッド細胞 [実施例 4 参照] を、1 0 % の F C S、4 0 0 μ g / m L のハイグロマイシン B (Calbiochem) および 4 0 0 μ g / m L の G 4 1 8 [SIGMA] を含む F - 1 2 培地で維持した。マウス A 9 線維芽細胞を、1 0 % F C S を補給した F - 1 2 培地で培養した。

2. B r d U 標識

代表的な実験では、並行して 2 0 ~ 2 4 個の半集密細胞培養物を 1 0 c m シャーレに準備した。プロモデオキシウリジン (B r d U) (Fluka) を、N a O H 1 滴でアルカリ性とした蒸留水に溶かして、1 0⁻² M 原液を得た。この B r d U 原液 1 0 ~ 5 0 μ L ずつを各 1 0 m L 培地に加えて、B r d U の最終濃度を 1 0 ~ 5 0 μ M とした。細胞を B r d U 存在下に 3 0 分間培養し、温完全培地で洗浄し、用時まで B r d U 不在下にインキュベーションした。この時点で、5 μ g / m L のコルヒチンをサンプル培養物に 1 時間ごとまたは 2 時間ごとに加えた。1 ~ 2 時間のコルヒチン処理後、有糸分裂細胞を「振り落とし (shake-off)」によって回収し、通常の染色体調製物を得て、免疫標識に供した。

3. 染色体の免疫標識および in situ ハイブリダイゼーション

マウス A 9 染色体の場合には 2 M 塩酸を 3 7 °C で 2 5 分間使用し、ハイブリッド細胞の染

10

20

30

40

50

色体については1 M塩酸を37℃で30分間使用した以外は、メーカーの説明に従って、フルオレセイン接合抗BrdUモノクローナル抗体(Boehringer)による免疫標識を行った。ビオチン標識プローブによるin situハイブリダイゼーション、ならびに同一調製物についての間接免疫蛍光およびin situハイブリダイゼーションを、既報の方法に従って行った[Hadlaczky et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:8106-8110; 米国特許5 288 625号も参照]。

4. 顕微鏡検査

観察および顕微鏡写真撮影はいずれも、顕微鏡(Vanox AHBS;Olympus)を用いて行った。写真には、フジカラー400 Super Gまたはフジカラー1600 Super HG高速カラーネガを用いた。

10

B. 結果

BrdUパルス標識とそれに続く免疫標識によって、メガ染色体の複製を分析した。最初にin vivoでのDNA標識についての基本的パラメータを決定した。並行培地で50 μM BrdUの30分間パルスを用いて、パルス開始から5分間隔で、さらにはBrdU除去から15分～1時間ごとにサンプリングおよび固定を行った。組み込まれたBrdUを、フルオレセイン接合抗BrdUモノクローナル抗体を用いる免疫標識によって検出した。最初の時点で(5分間)、38%の核が標識され、BrdU存在下でのインキュベーション中は標識核の数が徐々に増加するのが認められ、BrdU除去の時点で30分サンプルにおいて46%という最高値を得た。それ以上の時点(60分、75分および90分)において、変化はほとんど認められず、標識核の割合は一定のままであった[44. 5～4 20 6%]。

この結果は、(i) BrdUの取り込みが急速なプロセスであること、(ii) 30分間のパルス時間がS期核の高信頼性標識には十分であること、(iii) BrdUは洗浄によって、培地から効果的に除去できることを示している。

最終複製染色体部分での最も早いBrdU信号の出現と1回の完了した細胞周期後に染色体の染色分体の一つのみでの同一パターンの出現との間の時間を測定することで、H1D3およびG3D5細胞の細胞周期の長さを推定した。前期染色体での最初の検出可能BrdU信号の時間と標識有糸分裂法によって、G2期の長さを求めた[Qastler et al.(1959)Exp.Cell Res.17:420-438]。(i) 細胞周期長さと30～120分間のパルス中に標識された核の割合に基づき、(ii) 最終複製染色体の複製の丁度終了した時点とS期開始時の染色体での最初の信号検出との間の時間を測定することで、(iii) 標識有糸分裂法によってという3つの方法で、S期の長さを求めた。実験を繰り返して、細胞周期の期間が22～26時間であり、S期が10～14時間であり、G2期が3.5～4.5時間であることが認められた。

30

メガ染色体の複製分析を、コルヒチン処理の2時間後に2時間間隔で有糸分裂細胞を回収することで、並行培養にて行った。再実験で、1時間のサンプリング間隔と1時間のコルヒチン処理を行って同じ分析を行った。それら2回の方法とも同等の結果を与えたが、約30%の細胞が平均よりかなり短いもしくは長い細胞周期を有することが認められたことから、2時間サンプリング間隔の方が適切であるように見えた。個々の染色体、特に後期複製ハムスター染色体の一部の特徴的な複製パターンが、S期の異なる段階についての有用な内部マーカーとして役立った。異なった実験で細胞周期の長さが異なることで生じるエラーを低減するため、第2のS期開始時に1個の染色分体に最初の信号が認められるまで、全細胞周期にわたってサンプリングおよび分析を行った。

40

メガ染色体の複製順序は次の通りである。S期の最も初期では、メガ染色体の複製が染色体末端で開始する。中間位置での最初の複製開始は通常、動原体領域で検出することができる。間もなく、なおもS期の最初の1/4期において、短腕の終端領域がほとんどその複製を完了した時に、染色体腕に沿って明瞭な開始信号が現れる。S期の第2の1/4期では、複製が進行するに連れて、BrdU標識領域が徐々に広がり、メガ染色体の格子パターンが明瞭になる[例えば、図2F参照]。同時に、マウス染色体の挟動原体領域もBrdUの強力な取り込みを示す。メガ染色体の複製はS期の第2の1/4期と第3の1 50

／4期で最高となる。S期の第3の1／4期終了後および最終1／4期の丁度開始時に、メガ染色体およびマウス染色体の挟動原体異質染色質が複製を完了する。S期終了までに、マウスおよびハムスターの最後の複製部分のみがなお、BrdU取り込みを行っている。

ゲノム全体の複製は、明瞭な段階で起こる。S期の前半終了まで取り込みBrdUの信号が連続的に増加したが、S期の第3の1／4期が開始すると、異質染色質領域以外の染色体部分はほとんどBrdUを取り込まなかった。S期の最終1／4期では、BrdU信号が再度増加し、その際に最終複製部分が非常に強い取り込みを示した。

対照として、マウスA9細胞における複製について同様の分析を行った。免疫標識パターンの分解能を上げるため、ヘキスト33258処理によってA9染色体の挟動原体領域を分散させた。周囲の真正染色質配列の強力な複製があるために、低凝集のマウス染色体であっても、異質染色質における最初のBrdU信号の正確な位置決定は通常は困難であった。最初の信号の位置が明瞭に決定された染色体では、A9染色体の挟動原体異質染色質の複製は、メガ染色体の場合と同様であった。A9細胞の染色体も、ハイブリッド細胞におけるマウス染色体の物と同様の複製パターンおよび配列を示した。これらの結果は、メガ染色体およびマウス染色体が、ハイブリッド細胞においてその元のタイミングと特異性を保持していたことを示している。

BrdU取り込み後に得られた開始部位のパターンと、S期の第1の1／4期の詳細な分析における「外来」DNAの組込み部位の位置とを比較することで、メガ染色体のアンプリコン構造に関係する複製起源（開始部位）の確認を試みた。メガ染色体の長腕での組込みDNAの二重バンドが細胞マーカーとして役立った。得られた結果は、細胞レベルで認められたBrdUとin situハイブリダイゼーション信号とが同じ位置にあることを示しており、「外来」DNA配列が複製起源のごく近傍にあって、レプリケータと付随配列との間の非付随配列に組込まれていると推定されることを示していた〔図3参照〕。実施例6. B. 4に記載のように、メガ染色体で検出されるrDNA配列も、「外来」DNA配列の組込み部位のアンプリコン境界に位置し、メガ染色体の複製開始を起こす複製起源にrDNA配列が関与していることが示唆される。いくつかの他の染色体の挟動原体領域では、メガ染色体における開始信号と同様の点のようなBrdU信号を認めることができる。その信号は、通常の染色体の異質染色質領域における同様の開始部位を表している可能性がある。

頻度 10^{-4} で、組込みDNA配列の「未制御」増幅が、メガ染色体で認められた。「外来」配列がレプリケータに近接しているという仮定（上述）と一致して、この空間的に制限された増幅は、複製起源の未制御の反復点火（firing）の結果として部分全体の複製が完了しないためであると考えられる。

C. 考察

染色体の挟動原体領域の構成異質染色質は後期複製性であると考えられている〔例えば、Miller(1976)Chromosoma 55:165-170参照〕。それとは対照的に、それらの実験から、異質染色質ブロックの複製がS期の前半で明瞭な開始部位にて開始し、S期のほぼ3／4期にわたって続くことが明らかになっている。この差は、次のようにして説明することができる。（i）通常の染色体では、付随DNA周囲にある活発に複製する真正染色質配列によって開始信号が不明瞭となることから、開始部位の正確な位置がわかりにくい。（ii）異質染色質の複製は、異質染色質複製物の大部分と他のほとんどの染色体領域がすでにその複製を完了しているかまたはそれをまだ開始していないS期の後半期にのみ明瞭に検出することができる。そこで、オートラジオグラフィによる放射能標識前駆体の取り込みの分析などの低分解能の細胞学的方法では、隣接する真正染色質部分がもはや複製を行っていないS期の後半で、異質染色質における顕著な複製信号を検出するのみである。

メガ染色体では、複製の最初の開始部位は、「外来」DNA配列およびrDNA配列がアンプリコン境界で組み込まれる部位で同じ位置を占めている。同様の開始信号が、「外来」DNAを持たないマウス染色体の一部の挟動原体異質染色質において、同時に認められ、アンプリコンの境界での複製開始部位が付随DNAブロックの非付随隣接配列にある可

能性のあることを示している。各付随DNA二本鎖に第1の開始部位が存在することは、この大きい染色体部分が、第1の開始部位とその単位の各末端における終止点によって区切られた単一の巨大な複製単位「メガサイクロン」であることを示唆している。いくつかの系統の証拠から、この高次複製単位内で、「二次」起源およびレプリコンがメガレプリコンの完全な複製に寄与することが示されている。

1. メガ染色体の異質染色質領域の総複製時間は約9～11時間であった。真核生物染色体では代表的である複製フォークの運動速度毎分0.5～5kbでは[Kornberg et al. (1992) DNA Replication. 2nd. Ed., New York: W.H. Freeman and Co., p.474]、約15Mbのレプリコンの複製には50～500時間を要すると考えられる。別法として、1個のみの複製開始点を使用した場合、平均複製速度は毎分25kbとなって、10時間以内に複製が完了するはずであると考えられる。真正染色質および異質染色質の染色体部分におけるBrdU信号の強度を比較することで、それらの複製速度が5～50倍異なることを示す証拠は認められなかった。

2. 短いBrdUパルス標識を用いると、単一の複製開始点によって、複製フォークの動きを反映して、レプリコンに沿って移動する複製バンドが生じる。それとは対照的に、最終的にメガ染色体の格子パターンを生じた複製ゾーンの拡大が認められ、複製期間中では、ほとんどの強力なBrdU取り込みがS期の後半で起こった。これは、メガレプリケータが活性化されたら、それによって「二次」開始点の活性化および点火ができ、付随DNAの大部分の複製が、S期の後半でそれらの「二次」開始点から起こることを示唆するものである。これは、メガ染色体の複製のある種の段階で、アンプリコン全体が短いBrdUパルスによって見かけ上標識され得るという所見によって裏付けられる。

メガレプリケータおよび二次複製開始点は、厳格な時間的および空間的制御下にあると思われる。メガ染色体内での最初の開始は動原体で起こるのが普通であり、その後間もなくして、メガレプリケータ全てが活性となる。複製を完了するメガ染色体の最後の部分は、長腕の第2の部分であるのが普通であった。マウスA9染色体を用いた対照実験の結果からは、マウス染色体の異質染色質の複製が、メガ染色体アンプリコンの複製に相当することが示される。従って、異質染色質ブロックにすでに存在する複製の時間的制御が、メガ染色体で保存されている。転写活動と複製開始との間の正の相関[Hassan et al. (1994) J. Cell. Sci. 107:425-434] および負の相関[Haase et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14:2516-2524] が提案されている。メガ染色体では、組み込み遺伝子の転写は、複製開始点の元のタイミングに対して影響しないと思われる。異なるアンプリコンでのメガレプリケータ開始の統一的で正確なタイミングは、特異的でシス作用性の配列、複製起源の存在を示唆するものである。

マウス染色体の挟動原体異質染色質が、7～15Mbの範囲の数千の短く簡単な反復単位を有し、動原体自体も数百のキロ塩基を有し得ることを考慮すると、高次の複製単位が存在する可能性が高いと思われる。メガ染色体の複製開始領域に制限された未制御染色体内部複製が認められたことは、ローリングサークル型増幅を強く示唆するものであり、この領域における複製開始点の存在に対する証拠を追加するものである。

特異的複製開始部位がアンプリコンの境界で生じるという所見は、複製が増幅プロセスで何らかの役割を果たす可能性のあることを示唆するものである。その結果は、メガ染色体の各アンプリコンを、複製の「二次」開始点を有する一次開始部位「メガレプリケータ」によって規定される巨大なメガレプリコンと見なすことができることを示唆するものである。メガレプリコン内における二方向性複製の異なる起源からの複製バブル(bubble)の融合[DePamphilis (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:29-63]によって、メガレプリコン全体に相当する巨大な複製バブルが形成されることが考えられる。これを考慮すると、複製指向的な増幅機序によって、メガベースの大きさのアンプリコンを形成することができる。H型およびE型増幅では、アンプリコンの染色体内部増加が認められ[上記の実施例参照]、それは不均一姉妹染色体分体交換モデルと一致する。構成異質染色質におけるメガレプリコンの誘発もしくは自然の不定期複製によっても新たなアンプリコンが形成されて、それが増幅の拡大または「正常」染色体の異質染色質多形を生じる可能性がある。メガ染色体の長

10

20

30

40

50

腕の失われた部分の「復旧」は、1本鎖に限定された1個のアンプリコンの再複製の結果であると考えられる。

これらを併せて考えると、理論は別として、複製指向機序によって、マウス染色体の動原体領域における大量複製開始とデノボ染色体形成に対して妥当な説明が得られる。特異的〔増幅配列、すなわち増幅を制御する配列〕配列が増幅プロセスを促進する上で何らかの役割を果たす場合、メガレプリコンの一次複製開始部位〔メガレプリケータ〕での配列が候補として考えられる。

メガ染色体における外来DNA付近のアンプリコン境界におけるrRNA遺伝子配列の存在は、この配列が一次複製開始部位に寄与し、SATACのデノボ形成における挟動原体異質染色質の大量増幅に関与することを示唆するものである。リボソームRNA遺伝子は、縦列遺伝子の複数コピーを提供する固有の増幅機序を有する。そこで、本発明に関しては、細胞でのSATACの構築で、rDNAは標的組込みのための領域として、さらにはin vitroで構築されるSATACの成分として役立つ。

実施例 9

マウス1番染色体由来の増幅領域を有する染色体の形成

実施例2～7に記載の事象がマウス7番染色体に固有のものではないこと、ならびに人工染色体形成にEC7/3細胞系が必要条件というわけではないことを示すため、異なる初期細胞系およびDNA断片を用いて実験を繰り返した。いかなる細胞または細胞系も使用が可能であるか、あるいは使用できないことを容易に決定することができる。

A. 材料

5×10^6 個の受容体細胞についてプラスミドDNA $25 \mu\text{g}$ を用いて、「掻き取り負荷」トランスフェクション法〔Fechheimer et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:8463-8467〕によって、LP11細胞系を得た。LP11細胞を、 $3 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ のプロマイシン〔SIGMA〕を含むF-12培地で維持した。

B. LP11細胞での増幅

上記の実施例に記載の大量増幅は、形質転換EC3/7細胞系やマウスの7番染色体に限定されるものではない。独立の形質転換実験で、選択可能なプロマイシン耐性遺伝子を含む構築物でpPuroTelと称されるもの〔このプラスミドの記載については、実施例1. E. 2参照〕を用いたリン酸カルシウム沈殿法によって、LMTK⁻細胞をトランスフェクションして、細胞系LP11を得た。細胞系LP11は、異なった長さ〔約150～600 Mb〕の増幅染色体部分のある染色体を有する。LP11細胞の細胞学的分析から、増幅は、ロバートソン（Robertsonian）転座によって生成する次中部動原体染色体の長腕の挟動原体領域で起こることが示された。この染色体腕は、G分染によって1番染色体であると確認された。C分染およびマウス主要付随DNAプローブとのin situハイブリダイゼーションは、E型増幅が起こっていることを示しており、新たに形成された領域は、異なる量の異質染色質を含む真正染色質染色体部分の配置から構成されていた。増幅部分の大きさおよびCバンドパターンは不均一であった。いくつかの細胞で、これら増幅単位の数はいくつかを超えていた。しかしながら、LP11細胞系の単一細胞サブクローンは、10～15個の部分と一定のCバンドパターンを有する安定なマーカー染色体を有する。

LP11細胞の単一細胞クローニングによって得られたチミジンキナーゼ欠乏LP11細胞の亜細胞系（例：LP11-15P 1C5/7細胞系）を、チミジンキナーゼ遺伝子構築物でトランスフェクションした。安定なTK⁺トランスフェクション体を得た。

実施例 10

異型塩基含有量および／または大きさによるSATACおよび他の染色体の単離

1. 内因性染色体からの人工染色体の単離

SATACなどの人工染色体は、好適な方法を用いて内因性染色体から分けることができ、代表的には中期染色体の単離、人工染色体と内因性染色体との識別および人工染色体と内因性染色体との分離が関与する。そのような方法には通常、(1)好ましくは 1×10^6 個程度で人工染色体を得ることができるだけの数の細胞（代表的には、約 2×10^7 個の

有糸分裂細胞)を培養する段階、(2) コルヒチンなどの有糸分裂停止剤を用いて、有糸分裂の段階、好ましくは中期で、細胞の細胞周期を停止する段階、(3) 特には、細胞を低張緩衝液中で膨張させることで処理して、破壊に対する細胞の感受性を高める段階、(4) 放出された染色体を安定化させるための単離緩衝液の存在下に、物理的力を加えて細胞を破壊する段階、(5) 遊離染色体を安定化させるための単離緩衝液の存在下で染色体を分散させる段階、(6) 人工染色体と内因性染色体とを分離する段階、(7) 単離した染色体を適切な緩衝液中で保存する段階(および所望に応じて輸送する段階)という基本的段階がある。例えば、成長の特性および要件が異なる各種細胞型を扱い、停止剤による有糸分裂遮断の期間を至適化して染色体収量と残屑レベルの望ましい均衡を得るための人工染色体の一般的単離方法の改良法および変法を経験的に決定することができる。

10

段階1~5は、中期染色体の単離に関係するものである。人工染色体と内因性染色体との分離(段階6)は、各種方法で行うことができる。例えば、染色体は、ヘキスト33258およびクロモマイシンA₃などのDNA特異的染料で染色し、蛍光活性化細胞選別法(FACS)を行うことで、染料含有量に基づいて人工染色体と内因性染色体に選別した。人工染色体の大量単離を容易にするため、スイングバケット遠心(染色体の大きさおよび密度に基づいた分離を行うため)[Mendelsohn et al.(1968)J.Mol.Biol.32:101-108参照]、ゾーナルローター遠心(染色体の大きさおよび密度に基づいた分離を行うため)[例えば、Burki et al.(1973)Prep.Biochem.3:157-182; Stubblefield et al.(1978)Biochem.Biophys.Res.Comm.83:1404-1414参照]、速度沈降(染色体の大きさおよび形状に基づいた分離を行うため)[例えば、Collard et al.(1984)Cytometry 5:9-19参照]などの各種分離方法を用いることができる。免疫親和性精製法も、大量人工染色体単離法で用いることができる。その方法では、人工染色体を含む細胞(非同期または有糸分裂豊富)の大きい群をまとめて回収し、固体状態基体(例:カラム樹脂または磁気ビーズなど)に結合した抗体に結合させることで、有糸分裂染色体(低張緩衝液中での細胞のインキュベーションおよび/または処理した細胞の物理的破壊と併用した細胞の洗剤処理などの標準的方法を用いて、細胞から放出させることができる)が豊富となる。この方法での使用に好適な抗体を、凝集動原体蛋白または凝集およびDNA結合ヒストン蛋白に結合させる。例えば、哺乳動物動原体を認識する自己抗体LU851(Hadlaczky et al.(1989)Chromosoma 97:282-288参照)を用いて染色体の大量単離を行ってから、FACSなどの方法を用いて内因性染色体から人工染色体を分離することができる。結合した染色体を洗浄し、最終的に溶離して選別することになる。免疫親和性精製法を用いて、人工染色体を内因性染色体と直接分離することもできる。例えば、ハムスター細胞(例:V79細胞もしくはCHO-K1細胞)などの比較的少量の異質染色質を含む染色体を有する細胞系でSATACを形成することができるか、あるいはその細胞系にSATACをトランスフェクションすることができる(例:本明細書に記載のような微量注入または微小核体融合によって)。次に、固体基体に接合した抗異質染色質結合蛋白(ショウジョウバエHP-1)抗体を利用することで、主として異質染色質であるSATACを内因性染色体から分離する。そのような基体は、ハムスター染色体と比較してSATACと優先的に結合する。未結合のハムスター染色体を基体から洗い出し、SATACを標準法によって溶離する。

20

30

A. 細胞系および細胞培養手順

40

ある単離方法では、メガ染色体または切断メガ染色体を有する1B3マウス-ハムスター-ヒトハイブリッド細胞[図4参照]を、10%ウシ胎仔血清、150μg/mLハイグロマイシンBおよび400μg/mL G418を補給したF-12培地で増殖させた。メガ染色体およびミニ染色体を有するGHB42[G3D5細胞から再クローニングした細胞系]マウス-ハムスターハイブリッド細胞も、10%ウシ胎仔血清、150μg/mLハイグロマイシンBおよび400μg/mL G418を含むF-12培地で培養した。両方の細胞系の倍化時間は約24~40時間、代表的には約32時間であった。

代表的には、細胞単層が約60~80%の集密度に達した時に継代培養し、48~72時間ごとに分けた。80%を超える集密度に達した細胞は培養で老化しており、染色体回収には好ましくない。細胞を、約50~70%集密度で12~30時間にわたって100~

50

200個の100mLシャーレ中で平板培養してから、有糸分裂停止を行うことができる（下記参照）。

人工染色体のための宿主として使用することができ、人工染色体を単離することができる他の細胞系には、PtK1（NB L-3）有袋動物腎臓細胞（ATCC受託番号CCL35）、CHO-K1チャイニーズハムスター卵巣細胞（ATCC受託番号CCL61）、V79-4チャイニーズハムスター肺細胞（ATCC受託番号CCL93）、インドムンチャク（Indian muntjac）皮膚細胞（ATCC受託番号CCL157）、LMTK(-)チミジンキナーゼ欠乏マウスL細胞（ATCC受託番号CCL1.3）、Sf9行列毛虫ヨトウガ（fall armyworm）（*Spodoptera frugiperda*）卵巣細胞（ATCC受託番号CRL1711）ならびにMAC、特にSATACを構築するのに使用することができる、例えば本明細書に記載のハムスターマウスハイブリッド細胞などの形成ヘテロカリオン（ハイブリッド）細胞系などがあるが、これらに限定されるものではない。

細胞系を選択して、例えば大量生産プロセスで望まれるような人工染色体の生産および単離の効率を高めることができる。例えば、宿主細胞選択における考慮事項の一つとしては、細胞の人工染色体／総染色体比があり得る。人工染色体と内因性染色体との分離を容易にするため、人工染色体／総染色体比は高い方が望ましいと考えられる。例えばH1D3細胞（マウス／ハムスターヘテロカリオン；図4参照）の場合、この比は1：50、すなわち総染色体50個に対して人工染色体（メガ染色体）1個である。それとは対照的に、インドムンチャク皮膚細胞（ATCC受託番号CCL157）は、染色体総数（7本の染色体の二倍数）が相対的に少なく、同様にカンガルーネズミ細胞（12本の染色体の二倍数）でも、細胞での人工染色体の導入または形成時における人工染色体／総染色体比が相対的に高いと考えられる。

人工染色体の生産および単離について宿主細胞を選択する上での別の考慮事項としては、人工染色体の大きさと比較した内因性染色体の大きさがあると考えられる。染色体の大きさの差を利用して、人工染色体と内因性染色体との分離を容易にすることができる。例えば、インドムンチャク皮膚細胞染色体は、ミニ染色体や切断メガ染色体よりかなり大きいことから、人工染色体とムンチャク染色体との分離は、一変量（1個の染料、ヘキスト33258またはクロモマイシンA3）FACS分離法を用いて行うことができると考えられる。

人工染色体の生産および単離のための宿主細胞を選択する上での別の考慮事項としては、細胞の倍化時間があり得る。例えば、人工染色体を単離する手順で使用するのに十分な数の人工染色体含有細胞を形成するのに必要な時間は、大量生産にとっては重要であると考えられる。そこで、倍化時間が相対的に短い宿主細胞が望ましいと考えられる。例えば、V79ハムスター肺細胞の倍化時間は約9～10時間であるのに対してH1D3細胞の倍化時間は約32時間である。

従って、いくつかの点について考慮して、人工染色体の生産および単離のための宿主細胞選択を行うことができる。人工染色体のデノボ形成に最も望ましいとして選択される宿主細胞は、細胞系で形成される人工染色体の大量生産向けに最適化されていない場合がある。そのような場合、最初の宿主細胞系で人工染色体を形成したら、人工染色体の有効で高レベルな生産および単離に比較的好適な産生細胞系にそれを転移させることが可能であると考えられる。そのような転移は、例えば本明細書に記載のような微小核体融合または本明細書に記載のような手順を用いる形成細胞系から精製した人工染色体の生産細胞系への微量注入などのいくつかの方法によって行うことができる。生産細胞系は好ましくは、細胞当たり2個以上の人工染色体コピーを有するものとする。

B. 染色体単離

一般に、細胞は級数的成長で2世代にわたって培養してから、有糸分裂停止を行うのが普通である。ある特定の単離法で有糸分裂1B3及びGHB42細胞を蓄積するため、5μg/mLコルヒチンを培地に12時間加えた。得られた有糸分裂指数は60～80%であった。有糸分裂細胞を、単層細胞での培地の慎重なピペット採取による選択的分離によって回収した。集めた（有糸分裂）細胞を平板から放出させる手段として、機械的振り落と

10

20

30

40

50

しを利用することも可能である。200×gで10分間の遠心によって、細胞を沈降させた。

細胞（プラスチック上または懸濁液で成長）は、ヒドロキシ尿素、ビンブラスチン、コルセミドまたはアフィジコリンなどのコルヒチン以外の化学薬剤によって、細胞周期の各種段階で停止させることができる。ヒドロキシ尿素およびアフィジコリンなどの有糸分裂以外の段階に細胞を停止させる化学薬剤を用いて、その群における全ての細胞の周期を同期させてから、細胞培地から取り出して、細胞をほぼ同時に有糸分裂まで進めて、その時点で細胞を回収して、染色体を分散させることができる。有糸分裂細胞を豊富として、機械的振り落とし（付着細胞）に供することができると考えられる。MAC含有細胞の群内での細胞の細胞周期を、養分、成長因子またはホルモン遮断によって同期させて、G₁またはG₀段階の細胞を蓄積することもできる。次に、養分または成長因子を再度加えることで、静止細胞を約1世代において同期された細胞周期に再度入らせることができる。このようにしてホルモン遮断に対して反応することが知られていて、人工染色体のための宿主として好適である細胞系には、増殖刺激をプロラクチンに全能的に依存しているNb2ラットリンパ腫細胞系などがある（Gout et al.(1980)Cancer Res.40:2433-2436参照）。細胞をプロラクチン欠乏培地で18～24時間培養することで増殖を停止し、細胞を細胞周期のG₁期初期で蓄積する。プロラクチンを加えると、90%を超える細胞が有糸分裂状態にあると考えられるM期まで、全ての細胞がその細胞周期を進む（コルヒチンを加えることで、有糸分裂細胞の量を95%超とすることができると考えられる）。プロラクチン添加による増殖の再開と染色体分離のための有糸分裂細胞回収の間の時間は経験的に決定することができる。

別法として、V79細胞などの付着細胞を、ローラーボトルで増殖させ、ローラーボトルを200rpm超で回転させることで、有糸分裂細胞をプラスチック表面から放出させる（Shwarchuk et al.(1993)Int.J.Radiat.Biol.64:601-612）。ある所定の時点で、級数的に成長する同期群中の細胞の約1%がM期となる。コルヒチンを加えない場合であっても、200rpmでの5分間の遠心によって、4個の1750cm²ローラーボトルから2×10⁷個の有糸分裂細胞が回収されている。コルヒチンを2時間加えることで、収量を6×10⁸個の細胞まで上昇させることができる。

いくつかの方法を用いて、これらの細胞から中期染色体を単離することができ、その方法には、ポリアミン緩衝液系に基づくもの[Cram et al.(1990)Methods in Cell Biology 33:377-382]、修正ヘキシレングリコール緩衝液系に基づくもの[Hadlaczky et al.(1982)Chromosoma 86:643-65]、硫酸マグネシウム緩衝液系に基づくもの[Van den Engh et al.(1988)Cytometry 9:266-270およびVan den Engh et al.(1984)Cytometry 5:108]、酢酸固定緩衝液系に基づくもの[Stoehr et al.(1982)Histochemistry 74:57-61]ならびに低張KClおよびヨウ化プロピジウムを利用する方法に基づくもの[Cram et al.(1994)XVI I meeting of the International Society for Analytical Cytology, October 16-21, Tutorial IV Chromosome Analysis and Sorting with Commercial Flow Cytometers; Cram et al.(1990)Methods in Cell Biology 33:376]などがあるが、これらに限定されるものではない。

1. ポリアミン法

1B3またはGH B42細胞から人工染色体を単離するのに使用したポリアミン法では、約10⁷個の有糸分裂細胞を低張緩衝液（75mM KCl、0.2mMスペルミン、0.5mMスペルミジン）10mL中で室温にて10分間インキュベーションすることで、細胞を膨張させた。細胞は低張緩衝液中で膨張して、中期染色体を放出するが、細胞溶解には至らない。次に細胞を、代表的には室温で、100×gで8分間遠心した。細胞ペレットを注意深く取り出し、約10⁷個の細胞をポリアミン緩衝液[15mMトリス-HCl、20mM NaCl、80mM KCl、2mM EDTA、0.5mM EGTA、14mM β-メルカプトエタノール、0.1%ジギトニン、0.2mMスペルミン、0.5mMスペルミジン]1mLに再懸濁させて、中期染色体を物理的に分散させた。次に、細胞懸濁液を慎重に抜き取り、それを3mLプラスチック注射器に取り付けた22G

10

20

30

40

50

針から排出することで、染色体を放出させた。染色体濃度は、染色体約 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個 / mL であった。

ポリアミン緩衝液単離プロトコールは、高分子量染色体 DNA を得るのに好適である [Sillar and Young(1981) *J.Histochem.Cytochem.* 29:74-78; VanDilla et al.(1986) *Biotechnology* 4:537-552; Bartholdi et al.(1988) In "Molecular Genetics of Mammalian Cells" (M.Goettsman, ed.), *Methods in Enzymology* 151:252-267. Academic Press, Orlando]。染色体安定化緩衝液は、ポリアミンであるスペルミンおよびスペルミジンを用いて、染色体構造を安定させ [Blumenthal et al.(1979) *J.Cell Biol.* 81:255-259; Lalande et al.(1985) *Cancer Genet.Cytogenet.* 23:151-157]、重金属キレート化剤を用いてヌクレアーゼ活性を低下させるものである。

しかしながらポリアミン緩衝液プロトコールは、他のプロトコールの場合同様に広い適用範囲を持ち、遮断時間、細胞濃度、低張膨張緩衝液の種類、膨張時間、低張緩衝液の容量、および渦攪拌時間という変量を各細胞種について至適化しなければならない。このプロトコールを用いて製造される染色体は非常に凝縮しているのが普通である。

細胞を膨張させるのに使用できるいくつかの低張緩衝液があり、その例としては、75 mM KCl; 75 mM KCl、0.2 mM スペルミン、0.5 mM スペルミジン; 16.2 mM 亜硝酸ナトリウム、6.5 mM 酢酸ナトリウム、32.4 mM KCl のオーヌキ (Ohnuki) の緩衝液 [Ohnuki(1965) *Nature* 208:916-917 および Ohnuki(1968) *Chromosoma* 25:402-428] ならびにさらに 0.2 mM スペルミンおよび 0.5 mM スペルミジンを含むオーヌキの緩衝液の変種などがある。加える緩衝液の量および低張性は、細胞の種類および細胞濃度によって変動する。量は細胞 10^7 個当たり 2.5 ~ 5.5 mL の範囲またはそれ以上とすることができる。膨張時間は 10 ~ 90 分で変動させることができ、細胞の種類およびどの膨張緩衝液を使用するかで決まる。

ポリアミン単離緩衝液の組成も変動し得る。例えば、ある修正緩衝液では、15 mM トリス HCl (pH 7.2)、70 mM NaCl、80 mM KCl、2 mM EDTA、0.5 mM EGTA、14 mM β -メルカプトエタノール、0.25% トリトン-X、0.2 mM スペルミンおよび 0.5 mM スペルミジンを含む。

染色体分散は、各種物理的手段によって行うこともできる。例えば、細胞懸濁液を慎重に抜き取り、22 ゲージ針を取り付けた 3 mL 注射器に排出することができ [Cram et al.(1990) *Methods in Cell Biology* 33:377-382]；細胞懸濁液は卓上渦攪拌機で攪拌することができ [Cram et al.(1990) *Methods in Cell Biology* 33:377-382]；細胞懸濁液は、ホモジナイザーによって破壊することができ [Sillar and Young(1981) *J.Histochem.Cytochem.* 29:74-78; Carrano et al.(1979) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:1382-1384]；細胞懸濁液は卓上超音波浴で破壊することができる [Stoehr et al.(1982) *Histochemistry* 74:57-61]。

2. ヘキシレングリコール緩衝液系

1B3 または GHB42 細胞から人工染色体を単離するのに用いたヘキシレングリコール緩衝液法では、約 8×10^6 個の有糸分裂細胞を、グリシン-ヘキシレングリコール緩衝液 [100 mM グリシン、1% ヘキシレングリコール、飽和水酸化カリウム溶液で pH 8.4 ~ 8.6 に調節] 10 mL に再懸濁させ、37°C で 10 分間インキュベーションし、次に 10 分間遠心することで、核をペレット化した。上清を再度、200 × g で 20 分間遠心して、染色体をペレットとした。染色体を単離緩衝液中に再懸濁させた (染色体 $1 \sim 3 \times 10^8$ 個 / mL)。

ヘキシレングリコール緩衝液組成も変更可能である。例えば、ある修正緩衝液では、25 mM トリス-HCl (pH 7.2)、750 mM ヘキシレングリコール、0.5 mM CaCl_2 、1.0 mM MgCl_2 を含有させる [Carrano et al.(1979) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:1382-1384]。

3. 硫酸マグネシウム緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法

10

20

30

40

50

では、有糸分裂細胞を、4.8 mM HEPES (pH 8.0)、9.8 mM MgSO₄、4.8 mM KCl、2.9 mM ジチオトレイトールからなる緩衝液に再懸濁させる [Van den Engh et al. (1985) *Cytometry* 6:92 および Van den Engh et al. (1984) *Cytometry* 5:108]。

4. 酢酸固定緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法では、有糸分裂細胞を、2.5 mM トリス-HCl (pH 3.2)、750 mM (1,6)-ヘキサジオール、0.5 mM CaCl₂、1.0% 酢酸からなる緩衝液に再懸濁させる [Stoeher et al. (1982) *Histochemistry* 74:57-61]。

10

5. KCl-ヨウ化プロピジウム緩衝液系

この緩衝液系は、ポリアミンおよびヘキシレングリコール緩衝液系との関連で上述したような細胞膨張法および染色体分散法のいずれにおいても使用することができる。この方法では、有糸分裂細胞を、2.5 mM KCl、50 μg/mL ヨウ化プロピジウム、0.33% トリトン X-100、333 μg/mL RNase からなる緩衝液に再懸濁させる [Cram et al. (1990) *Methods in Cell Biology* 33:376]。

蛍光染料ヨウ化プロピジウムを用いるが、これは染色体安定化剤としても役立つ。顕微鏡のスライドガラス上に懸濁液の小滴を乗せ、位相差顕微鏡／蛍光顕微鏡によって細胞を観察することで、低張媒体（これもヨウ化プロピジウムを含むことができる）中での細胞の膨張をモニタリングすることができる。細胞は膨張しながらヨウ化プロピジウムを排除するはずであるが、一部は早期に溶解して、染色体蛍光を示す。細胞を遠心し、KCl-ヨウ化プロピジウム緩衝液系に再懸濁させた後、その細胞は、緩衝液中に洗剤が存在するために溶解する。次に、染色体を分散させてから、37℃にて30分以下でインキュベーションして、RNase を活性化させることができる。次に、染色体取得物をフローサイトメーターによって分析する。ヨウ化プロピジウムの蛍光を、アルゴンレーザの488 nm 波長で励起させ、1個の光電子増倍管によってOG570 光ファイバーを介して検出することができる。一変量ヒストグラムで、単一パルスと、統合・獲得することができる。小さい（直径1.5 μm）マイクロスフェアを用いて、流動細胞計測法を2%以下のCVに配置することができる。染色体取得物を60 μm ナイロンメッシュで濾過して、分析に供する。

20

30

C. DNA 特異的染料による染色体の染色

単離後、染色体取得物を6 μg/mL のヘキスト33258 および200 μg/mL のクロマイシンA3で染色した。分析の15分前に、2.5 mM の亜硫酸ナトリウムおよび10 mM のクエン酸ナトリウムを染色体懸濁液に加えた。

D. 染色体の流動選別

1B3 および GHB42 細胞から得られ維持された染色体を、ポリアミンに基づくシース (sheath) 緩衝液 (0.5 mM EGTA、2.0 mM EDTA、80 mM KCl、70 mM NaCl、15 mM トリス-HCl (pH 7.2)、0.2 mM スペルミン および 0.5 mM スペルミジン) に懸濁させた [Sillar and Young (1981) *J. Histochem. Cytochem.* 29:74-78]。次に染色体を、2個のレーザが染色体を別個に励起して、大きさと塩基対組成によって染色体の二変量解析ができるようになっている二重レーザセルソーター [FACStar Plus または FAXStar Vantage Becton Dickinson Immunocytometry System; Coulter Electronics 製造のもの (Elite ESP) および Cytomation 製造のもの (MoFlo) などの他の二重レーザ選別機も使用可能である] に通した。SATAC と他の染色体の塩基組成の差と結果的に生じる染料との相互作用における差、ならびに大きさの差があることから、SATAC は他の染色体と分離された。

40

E. 選別した人工染色体の保存

選別した染色体を遠心によってペレットとし、各種緩衝液中に懸濁させ、4℃で保存した。例えば、単離した人工染色体をGH緩衝液 (100 mM グリシン、1% ヘキシレングリコール (飽和水酸化カルシウム溶液で pH 8.4~8.6 に調節したもの) [例えば、Ha

50

dlaczky et al.(1982)Chromosoma 86:643-659参照] 中で1日間保存して、遠心によってアガロースに包埋することができる。選別された染色体を遠心してアガロース床に入れ、固形物を500mM EDTA中4℃で保存する。別の保存緩衝液には、CMB-I/ポリアミン緩衝液(17.5mMトリス-HCl(pH7.4)、1.1mM EDTA、50mM ε-アミノカプロン酸、5mMベンズアミドHCl、0.40mMスペルミン、1.0mMスペルミジン、0.25mM EGTA、40mM KCl、35mM NaCl)ならびにCMB-II/ポリアミン緩衝液(100mMグリシン(pH7.5)、78mMヘキシレングリコール、0.1mM EDTA、50mM ε-アミノカプロン酸、5mMベンズアミド-HCl、0.40mMスペルミン、1.0mMスペルミジン、0.25mM EGTA、40mM KCl、35mM NaCl)などがある。

微量注入が所期の用途である場合、選別した染色体を30%グリセリンで-20℃にて保存する。選別した染色体は、短い期間であれば(3~6日間)、グリセリンを用いずに保存緩衝液中4℃で保存することもできる。微量注入用の緩衝液の例としては、CBM-I(10mMトリス-HCl(pH7.5)、0.1mM EDTA、50mM ε-アミノカプロン酸、5mMベンズアミドHCl、0.30mMスペルミン、0.75mMスペルミジン)、CBM-II(100mMグリシン(pH7.5)、78mMヘキシレングリコール、0.1mM EDTA、50mM ε-アミノカプロン酸、5mMベンズアミド-HCl、0.30mMスペルミン、0.75mMスペルミジン)などがある。

分離染色体の長期保存には、上記の緩衝液に50%グリセロールを加え、-20℃で保存するのが好ましい。

F. 品質管理

1. 純度分析

選別された染色体の純度を、ビオチン標識マウス付随DNAプローブによる蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)によって調べた[Hadlaczky et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:8106-8110参照]。単離染色体の純度は約97~99%であった。

2. 選別染色体の特性

パルスフィールドゲル電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを行って、選別された人工染色体のDNA含有量の大きさ分布を求めた。

G. 純粋人工染色体の機能性

これら染色体の活性が保存されているか否かを調べるため、純粋な人工染色体を、初代培養細胞、体細胞および幹細胞に微量注入し(実施例13に記載のような方法によって)、次にそれについて、選択培地での増殖に関する分析およびβ-ガラクトシダーゼ活性のアッセイなどの人工染色体が有する異種遺伝子の発現を分析する。

II. 哺乳動物人工染色体を含む微小核体の分離

A. 小核化

細胞を、4T150フラスコ中で、80~90%集密度となるまで増殖させた。コルセミドを、最終濃度0.06μg/mLとなるまで加え、次に37℃で細胞と24時間インキュベーションした。

B. 核摘出

10μg/mLのサイトカラシンBを加え、得られた微小核体を28~33℃で15000rpmにて70分間遠心した。

C. 濾過による微小核体の精製

スイネックス(Swinnex)フィルターユニットおよびヌクレオポア(Nucleopore)フィルター[5μmおよび3μm]を用いて、微小核体を精製した。

D. 微小核体の染色および選別

上述のように、細胞をヘキストおよびクロモマイシンA3染料を用いて染色した。微小核体は、セルソーターによって選別し、哺乳動物人工染色体を含む微小核体を単離した。

E. 融合

人工染色体を含む微小核体を、例えば実施例1.A.5に記載の方法に従って、所定の初代培養細胞、体細胞、胚幹細胞に融合させて、遺伝子導入(人間以外)動物を形成して遺

10

20

30

40

50

伝子療法に用いたり、他の細胞に融合させてその染色体を細胞に導入する。

実施例 1 1

哺乳動物人工染色体の昆虫細胞への導入

昆虫細胞は、M A C 用、特に遺伝子産生物の生産で使用するのに有用な宿主であるが、それには以下のような多くの理由がある。

1. 哺乳動物人工染色体は、対象の蛋白をコードする遺伝子導入のためのゲノム外特異的組み込み部位を提供する〔生産系での突然変異の確率低下〕。
2. 人工染色体が大きいと、メガ塩基の大きさのDNA組み込みが可能となり、蛋白またはアルカロイド〔ジギタリス、モルヒネ、タキソール〕などの治療的価値のある非蛋白を生じる経路全体をコードする遺伝子を人工染色体に持たせることができる。
3. 有用な蛋白をコードする遺伝子の増幅を、人工哺乳動物染色体で行って、昆虫細胞での蛋白収量を上昇させることができる。
4. 昆虫細胞は、蛋白の生理機能に必須の必要な翻訳後修飾（糖付加、リン酸化）を支持する。
5. 昆虫細胞は、哺乳動物ウィルスを支持せず、ヒト感染因子による生成物の交差汚染が起こらない。
6. 染色体を導入する能力は、昆虫細胞系における栄養用、工業用または医療用蛋白の生産に向けた従来の組換えバキュロウィルス系より優れている。
7. 昆虫細胞成長に最適な低い温度（28℃）により、生産のエネルギーコストを下げる
8. 昆虫細胞用の血清を含まない成長培地により、生産コストが低くなる。
9. 人工染色体を含む細胞は、低温で無期限に保存することができる。
10. 昆虫の幼虫は、受精昆虫卵の微量注入によって、栄養用蛋白、医療用蛋白または工業用蛋白の生産のための生物工場として役立つ。

A. 昆虫細胞による哺乳動物プロモーターの認識

検出可能なマーカー遺伝子〔Renillaルシフェラーゼ遺伝子（RenillaルシフェラーゼをコードするDNAならびにそのようなベクターの構築のための原料を提供し得るプラスミド pTZrluc-1の説明については、例えば米国特許5292658号参照。さらに、配列番号10も参照）〕に連結されたCMVプロモーターや、さらにはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に機能的に連結されたサルウィルス40（SV40）プロモーターなどの哺乳動物プロモータを有する遺伝子構築物を、2種類の動物Trichoplusia ni〔イラクサキンウワバ〕およびBombyx mori〔カイコ〕の細胞に導入した。

エレクトロポレーションまたは微量注入によって昆虫細胞を構築物に転移させた後、24時間のインキュベーション後に、マーカー遺伝子の発現をルシフェラーゼアッセイ（例えば、実施例12. C. 3）およびβ-ガラクトシダーゼアッセイ（lacZ染色アッセイなど）によって検出した。これら遺伝子を含まないサンプルに対し、遺伝子を有するサンプルでのみ、陽性の結果が得られた。さらに、B.moriβ-アクトチンプロモーターRenillaルシフェラーゼ遺伝子融合体を、T.niおよびB.mori細胞に導入したところ、トランスフェクション後にこれらは発光した。すなわち、ある種の哺乳動物プロモーターは、昆虫細胞でのこれらマーカー遺伝子を直接発現させるように機能する。従って、M A C は昆虫細胞における異種遺伝子の発現の候補である。

B. 昆虫細胞で使用するためのベクターの構築および哺乳動物細胞との融合

1. 発現ベクターを有するLMTK⁺細胞を下記のもので形質転換する。
 - a. B.moriβ-アクトチンプロモーター昆虫細胞におけるHyg^r選択可能マーカー遺伝子
 - b. 哺乳動物細胞におけるプロマイシン^r選択可能マーカー遺伝子を制御するSV40またはCMVプロモーター。
2. LMTK細胞（プロマイシン^rLMTK細胞）で哺乳動物プロモータの発現を検出する。
3. Bombyx細胞およびTrichoplusia細胞との融合実験でプロマイシン^r細胞を用い、Hyg^r細胞を選別する。

10

20

30

40

50

C. 昆虫細胞へのMACの挿入

これらの実験は、昆虫細胞に導入されたMACにある検出可能マーカー遺伝子〔pSV40などの哺乳動物プロモータの制御下に発現されるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子など〕を検出するためのものである。データは、β-galが発現されたことを示している。

例えばミニ染色体〔EC3/7C5〕もしくはミニおよびメガ染色体〔G3D5から再クロニングされる細胞系であるGHB42など〕の哺乳動物人工染色体を有する哺乳動物細胞あるいはメガ染色体〔H1D3またはその再クロニング体など〕のみを有する細胞系と、昆虫細胞を融合させる。融合は次のように行う。

1. 対数増殖期にある哺乳動物と昆虫細胞を混合する（50%／50%）。
2. カルシウム／PEG細胞融合：（10分間～0.5時間）
3. ヘテロカリオン（+72時間）を選別する。

10

MACを含む昆虫細胞について選別を行う以下の選別条件を用いることができる〔+=陽性選別、-=陰性選別〕。

1. 28℃での成長（+昆虫細胞、-哺乳動物細胞）；
2. グレーズ（Graces）昆虫細胞培地〔SIGMA〕（-哺乳動物細胞）
3. 外因性CO₂がないこと（-哺乳動物細胞）および／または
4. 抗生物質選択（HygまたはG418）（+形質転換昆虫細胞）

融合プロトコルの直後に、哺乳動物と各昆虫細胞の間に多くのヘテロカリオン〔融合事象〕が認められる〔90%以下のヘテロカリオン〕。形質転換哺乳動物細胞の選別に使用される選別レベルでG418および／またはハイグロマイシンを含む昆虫培地での増殖〔2週間以上〕後、個々のコロニーについて、融合平板での増殖を検出する。MACによって与えられる抗生物質耐性の選択および昆虫細胞の選択によって、これらのコロニーはMACを有するはずである。

20

B.mori β-アクチン遺伝子プロモータは、B.mori細胞および哺乳動物細胞（例：EC3/7C5細胞）中でβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の発現を指向することが明らかになっている。そこで、プロモータに連結されたマーカー遺伝子の存在を哺乳動物細胞系および得られる昆虫細胞系で測定できることから、B.mori β-アクチン遺伝子プロモータは、後に昆虫細胞に転移される哺乳動物細胞で形成されるMACに入れるのに特に有用である。

実施例 12

染色体断片化用ベクター及びMACにDNAをターゲット化組込みするために用いられる
その他のベクターの調製

30

メガ染色体の断片化によって最終的には、ベクターとして使用するために操作し易いサイズである約15Mb～50Mbに短縮された安定な染色体が得られる。このような断片化用ベクターはまた、in vitro産生される人工染色体の調製に必要な要素を容易に決定及び同定するために使用できる。

異なる多くの方法によってメガ染色体のサイズを短縮し得る。このような短縮方法としては例えば、貧栄養化または低温処理もしくは熱処理などのストレス処理、BrdU、クマリン、EMSなどのゲノムを不安定化するもしくはDNAに切れ目を入れる物質による処理、イオン化放射線による処理（例えば、Brown（1992）Curr. Opin. Genes Dev. 2：479-486参照）、テロメア特異的 in vivo染色体断片化〔例えば、Farrら（1995）EMBO J. 14：5444-5454参照〕などがある。

40

A. 人工染色体断片化のため及び選択された遺伝子産物のターゲット化組込みのために用いるベクターの調製

1. pTEMPUDの構築

プラスミドpTEMPUD（図5参照）は、in vivo染色体断片化を行うため及び部位特異的組込みによって大規模増幅を誘発するために用いられるマウス相同組換え“キラー”ベクターである。図5を参照すると、～3,625bpのSalI-PstIフラグメントはpBabe-puroレトロウィルスベクターから得られた（Morgens ternら（1990）Nucleic Acids Res. 18：3587-359

50

マウスの主要サテライトをコードする1293bpのフラグメント（配列1参照）を、マウスLMTK-線維芽細胞から調製したDNAライブラリーからEcoRIフラグメントとして単離し、pPUのEcoRI部位に挿入してpMPUを作製した。

10

20

30

40

5' - AAAC TGC AGG TTA ATT AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAC
CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCT AAC CCGG

A T - 3 ' (配列 2 9) を有している。

また、配列：3 ' - T T G G G C C C T A G G C T T A A G G - 5 ' (配列 3 0) の部分的に相補的な短いオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドをゲル精製し、アニーリングし、クレノウポリメラーゼで修復し、E c o R I 及び P s t I で消化した。得られた E c o R I / P s t I フラグメントを、E c o R I / P s t I 消化した p U C 1 9 に結合させた。得られたプラスミドを使用して大腸菌 D H 5 α コンピテント細胞を形質転換させ、L B / アンピシリン選択に生き残った形質転換体の 1 つに由来のプラスミド D N A (p T e l 1 0 2) を P a c I で消化し、クレノウ及び d N T P で平滑末端を形成し、H i n d I I I で消化した。得られた 2 . 7 k b のフラグメントをゲル精製した。

同時に、伸長したより遠位の 2 6 量体の M 1 3 配列決定プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって同じプラスミドを増幅させた。増幅産物を S m a I 及び H i n d I I I で消化し、6 0 b p のテロメア反復配列 (と 2 4 b p のリンカー配列と) を含む 8 4 b p の二重鎖フラグメントを 6 % の生ポリアクリルアミドゲルで単離し、二重消化した p T e l 1 0 2 に結合させて 1 2 0 b p のテロメア配列を作製した。このプラスミドを用いて D H 5 α 細胞を形質転換させた。得られた組換え体のうち、アンピシリン (1 0 0 μ g / m l) 選択に生き残った 2 つの組換え体に由来のプラスミド D N A を A B I DNA シークエンサーで色素ターミネーション法によって配列決定した。p T e l 2 9 と命名された一方のプラスミドは、配列 T T A G G G の 2 0 個の反復を含む (即ち、配列 T T A G G G の連続する 1 9 個の反復と反復全鎖の各末端に結合した 1 / 2 配列とから成る)。p T e l 2 8 と命名された他方のプラスミドは、本質的には配列 T T A G G G の 1 0 個の反復を各々が含む 2 つの配列が結合し、この結合部で 2 b p (T A) が欠失したプラスミドである。この結果として、p T e l 2 8 は接合部にモチーフ G G G T G G G を有している。この突然変異はテロメア特異的染色体断片化の実験のタグとして役立つ。従って、普通よりも幾分長くポリリンカーから遠い配列、例えば配列：

5 ' - G C C A G G G T T T T C C C A G T C A C G A C G T - 3 ' (配列 3 1) の使用、または、いくつかの実験では、

m 1 3 順方向プライマーとして配列：

5 ' - G C T G C A A G G C G A T T A A G T T G G G T A A C - 3 ' (配列 3 2)、逆方向プライマーとして配列：

5 ' - T A T G T T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T - 3 ' (配列 3 3) の使用に基づく p U C / M 1 3 配列決定プライマーを用いた P C R によって p T e l 2 9 インサートを増幅させた。

増幅産物を S m a I 及び H i n d I I I で消化した。得られた 1 4 4 b p のフラグメントを 6 % の生ポリアクリルアミドゲルでゲル精製し、P a c I で消化し、クレノウ及び d N T P で平滑末端を形成し、H i n d I I I 消化によってリンカーを除去しておいた p T e l 2 8 に結合させた。この結合によって得られたプラスミドを p T e l 2 8 0 1 と命名した。プラスミド p T e l 2 8 0 1 は、配列 T T A G G G の 4 0 個の反復から成り、1 つの配列 (即ち 3 0 番目の配列) の 2 個のヌクレオチド (T A) が欠失して配列 T G G G となっているテロメア配列を含む。

次の伸長段階では、p T e l 2 8 0 1 を S m a I 及び H i n d I I I で消化し、2 6 4 b p のインサートフラグメントをゲル精製し、P a c I で消化し、平滑末端を形成し、H i n d I I I で消化しておいた p T e l 2 8 0 1 に結合させた。得られたプラスミドで D H 5 α 細胞を形質転換させ、得られた形質転換体のうちアンピシリン選択に生き残った 1 2 の形質転換体に由来のプラスミド D N A を制限酵素分析によって試験して、0 . 5 k b の E c o R I / P s t I インサートフラグメントの有無を判定した。1 1 個の組換え体が、予想された 0 . 5 k b のインサートを含んでいた。2 つの組換え体のインサートを配列決定すると予想通りであることが判明した。これらのプラスミドを p T e l 2 8 0 1 1 0 及び p T e l 2 8 0 1 1 1 と命名した。これらのプラスミドは同一であり、双方ともが配列 T T A G G G の 8 0 個の反復を含み、p T e l 2 8 で生じていた欠失を原因として 2 つの配列 (即ち、3 0 番及び 7 0 番目の配列) の 2 個のヌクレオチド (T A) が欠失して配列

T G G Gが生じていた。従って、(最初の段階を除く)各クローニング段階で合成テロメアの長さは倍加した。即ち、テロメアのサイズは指数関数的に増大した。テロメアは 60×2^n bpの長さを有しており、nは実施した伸長クローニング段階の表を示す。従って、原則的には(大腸菌、または、例えば酵母のような任意の他の微生物宿主が長いタンデム型反復DNAを許容すると想定すると)、所望の任意のサイズの安全なテロメアを形成するために配列を反復させることが可能である。

更に別の伸長段階では、p T e l 2 8 0 1 1 0をP a c Iで消化し、d N T Pの存在下のクレノウポリメラーゼで平滑末端を形成し、次いでH i n d I I Iで消化した。得られた0.5 kbのフラグメントをゲル精製した。プラスミドp T e l 2 8 0 1 1 1をS m a I及びH i n d I I Iで開裂し、3.2 kbのフラグメントをゲル精製し、p T e l 2 8 0 1 1 0に由来の0.5 kbのフラグメントに結合させた。得られたプラスミドを用いてD H 5 α 細胞を形質転換させた。アンピシリン選択に生き残った形質転換体からプラスミドDNAを精製した。選択した組換え体の9個を制限酵素分析によって試験して、1.0 kbのE c o R I / P s t Iフラグメントの有無を判定した。この結果、4つの組換え体(p T l k 2、p T l k 6、p T l k 7及びp T l k 8と命名)が配列T T A G G Gの160個の反復を含む所望の960 bpのテロメアDNAインサート配列を含み、p T e l 2 8で生じた欠失を原因として2つのヌクレオチド(T A)が欠失した配列T G G Gを有している4つの反復が存在することが判明した。フラグメントの両端から約300 bpが解明されたこれらのプラスミドのうちの2つのプラスミド(即ちp T l k 2及びp T l k 6)のE c o R I / P s t Iフラグメントの部分的DNA配列解析によって、この配列が配列T T A G G Gの連続反復から構成されていることを確認した。

合成テロメア配列にP m e I部位及びB g l I I I部位を付加するために、p T l k 2をP a c I及びP s t Iによって消化し、3.7 kbのフラグメント(即ち2.7 kbのp U C 1 9と1.0 kbの反復配列)をゲル精製し、配列: 5' - G G G T T T A A A C A G A T C T C T G C A - 3' (配列34)のオリゴヌクレオチドによってP s t I付着末端に結合させた。次いで、結合産物をクレノウポリメラーゼ及びd N T Pによって修復し、それ自体で結合させ、大腸菌D H 5 α 株を形質転換させた。アンピシリン選択に生き残った合計14個の組換え体を得られた。各組換え体に由来のプラスミドDNAはB g l I I Iで開裂可能であり、これは、この付加された非反復制限部位が各組換え体によって保存されていたことを示す。14個の組換え体のうちの4個の組換え体が1 kbの完全合成テロメアインサートを含んでいたが、残りの10個の組換え体は種々の長さの欠失を有していた。1 kbの合成テロメア配列が完全に(i n t a c t)保存されていた4個のプラスミドをp T l k V 2、p T l k V 5、p T l k V 8及びp T l k V 1 2と命名した。これらのプラスミドの各々はまたP m e Iで消化することが可能であった。更に、B g l I I I部位とP m e I部位との双方が存在することが配列解析によって確認された。これらの4個のプラスミドはいずれもB a m H I及びB g l I I Iによって消化されて、1 kbの合成テロメア配列を含むフラグメントを遊離でき、このテロメア配列を次にB g l I I I消化したp T E M P U Dに結合し得る。

2. i n v i v o染色体断片化のためのp T E M P U Dの使用

B g l I I Iによってp T E M P U Dを直鎖化すると、一端にヒトテロメアをもつ直鎖状分子が得られる。この直鎖状フラグメントを染色体、例えばハイブリッド細胞のメガ染色体またはマウス主要サテライト配列の反復を含む任意のマウス染色体に組込むと、選択可能マーカーであるピューロマイシン耐性遺伝子が組込まれ、テロメア末端によってプラスミドが開裂される。D T遺伝子は組込み及び発現のときに毒性であるため、完全直鎖状フラグメントがランダムイベントによって組込まれることを阻止する。従ってランダム組込みは毒性であり、このため、ターゲットされたDNAに対する部位特異的組込みが選択されるであろう。このような組込みが、断片化された染色体を産生させる。

新規なテロメアをもつ断片化された欠失染色体は生き残り、動原体をもたない他のフラグメントは消滅するであろう。i n v i v o断片化を繰返すことによって最終的には、可能な最小の機能性人工染色体が選択される。従ってこのベクターは、マウス染色体からミ

10

20

30

40

50

ニクロモソームを作製するため、または、メガ染色体を断片化するために使用できる。原則として、このベクターは、断片化を行うために任意の染色体中の選択された任意のDNA配列をターゲットするために使用できる。

3. pTERPUDの構築

染色体を *in vivo* 断片化するため、及び、部位特異的組込みによる大規模増幅を誘発するために好適であるがマウス主要サテライトDNAでなくマウスrDNA配列に基づく、pTEMPUDに類似の断片化／ターゲッティングベクターはpTERPUDと命名されている。このベクターにおいては、pTEMPUDのマウス主要サテライトDNA配列が、配列16のヌクレオチド10, 232-15, 000に対応する配列を含むメガ染色体クロン161の4770bpのBamHIフラグメントによって置換されている。

10

4. pHASPU D及びpTEMPHu3

ヒト染色体を特異的にターゲットするベクターをpTEMPUDから構築できる。これらのベクターは、選択されたサテライト配列に従って特異的ヒト染色体を断片化し、ヒトミニクロモソームを作製し、またヒト動原体を単離するために使用できる。

a. pHASPU D

pTEMPUDがヒト染色体の断片化に好適なプラスミドとなるように、マウス主要サテライト配列をヒトサテライト配列によって置換する。マウス染色体と違って、ヒト染色体の各々は、非反復サテライト配列を有している。例えば、マウス主要サテライトをヒト6量体αサテライト（またはアルホイド（*alphoid*）サテライト）DNA配列によって置換した。この配列はヒト結腸癌細胞系Colo320（受託番号ATCCCL 220.1で寄託）から単離されEMBLデータベースに受託番号X60716で寄託されたクロンpS12に由来の813bpのフラグメント（配列2のヌクレオチド232-1044）である。813bpのアルホイドフラグメントは、各々がEcoRI部位を含む合成プライマーを用いた核酸増幅によってpS12クロンから得られる。合成プライマーは、配列：

20

GGGGAATTCA T TGGGATGTTT CAGTTGA（配列4）の順方向プライマーと、配列：

CGAAAGTCCCC CCTAGGAGAT CTTAAGGA（配列5）の逆方向プライマーとから成る。

増幅産物のEcoRI消化によってヒトαサテライト配列を含むEcoRI末端をもつフラグメントが得られる。この配列をマウス主要サテライトを含むEcoRIフラグメントに置換してpTEMPUDに挿入しpHASPU Dを作製する。

30

ベクターpHASPU DをBgIIIによって直鎖化し、画線添加（*scrape loading*）によってEJ30（ヒト線維芽）細胞の形質転換に使用する。27個のピューロマイシン耐性形質転換株が得られた。

b. pTEMPHu3

pTEMPHu3中では、マウス主要サテライト配列がD3Z1（ATCC受託番号85434で寄託；Yrokov（1989）Cytogenet. Cell Genet. 51:1114も参照）に由来の3kbのヒト染色体3特異的αサテライトによって置換されている。

40

5. ヒト3番染色体における増幅を誘発するためのpTEMPHU3の使用

ヒト染色体の各々は非反復染色体特異的アルホイド配列を含む。従って、3番染色体特異的αサテライトにターゲットされたpTEMPHU3は、3番染色体の動原体領域の大規模増幅と新規な染色体の産生とが確保される選択条件下でヒト細胞に導入できる。このような誘発された大規模増幅は、新規な（*denovo*）染色体形成を誘発する手段を提供し、また、規定されたヒト染色体フラグメントをメガ塩基のサイズまで*in vivo* クローニングする手段を提供する。

例えば、3番ヒト染色体の破断点は動原体の近傍の短いアーム上に存在する。この領域は腎細胞癌の形成に関与する。pTEMPHu3をこの領域にターゲッティングすることによってこの領域に大規模増幅が誘発され、pTEMPHu3ベクター中の細菌マーカー及

50

び酵母マーカーを用いてこの領域をクローニングできる。

pTEMPHu3クローニングベクターは、相同組換え体の選択を可能にするだけでなく、YAC中で取込み部位の直接クローニングを可能にする。このベクターはまた、マウスヒトモノ染色体マイクロセルハイブレッド系中で、好ましくは欠失した短いアームをもつヒト3番染色体をターゲットするために使用できる。相同組換え体を核酸増幅（PCR）によってスクリーニングし、増幅をDNAハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、及び*in situ*ハイブリダイゼーションによってスクリーニングし得る。増幅領域をYACにクローニングできる。このベクター及びこれらの方法はまた、クローニングされた染色体領域の機能性分析を行うために、クローニングされた増幅領域を哺乳類細胞に再導入することによって使用できる。

10

B. 動原体のクローニング及び機能性染色体ユニットの同定に使用できるYACベクター中のライブラリーの調製

縮小されたサイズの機能性哺乳類人工染色体ユニットを作製し、このユニットを動原体DNAのクローニングに使用する別の方法では、YACベクターに基づく哺乳類DNAのライブラリーをスクリーニングし、トランスジェニックマウスモデル系で潜在的陽性クローンの機能性を分析する。マウスのチロシナーゼ遺伝子を含む哺乳類DNAライブラリーを、YRT2（Scheldら（1993）*Nuc. Acids Res.* 21:4783-4787参照）のようなYACベクター中で調製する。哺乳類のテロメア及び動原体の配列プローブに対するハイブリダイゼーションによってライブラリーをスクリーニングする。標準方法に従って陽性クローンを単離し、NMR1/Hanマウスの受精卵母細胞の前核に微量注入する。次に、胚をNMR1/Hanの養母に移入する。トランスジェニック子孫中でのチロシナーゼ遺伝子の発現は同定可能な表現型（色素沈着）を与える。従って、チロシナーゼを発現するトランスジェニックマウスを生じるクローンは機能性哺乳類人工染色体ユニットを含むことが確認される。

20

あるいは、上記の標準方法に従って、SATACのフラグメントをYACベクターに導入し、次いでNMR1/Hanマウスの受精卵母細胞の前核に導入してもよい。これによって、チロシナーゼを発現するトランスジェニックマウスを生じるクローンは、機能性哺乳類人工染色体ユニット、特に動原体を含むことが確認される。

C. 相同ターゲッティングベクターを用いた哺乳類人工染色体によるヘテロログス遺伝子の取込み

30

上述のように、ヘテロログス遺伝子を発現させるために哺乳類人工染色体を使用すると、レシピエント細胞ゲノム内へのヘテロログスプラスミドDNAのランダム組込みに起因するいくつかの不利な効果が回避される。ランダム組込みに伴う不利な効果を回避するための有効なツールとなり得る哺乳類人工染色体の本質的な特徴は、この染色体がレシピエント細胞中にゲノム外遺伝子ソースとして存在することにある。従って、哺乳類人工染色体からヘテロログス遺伝子を発現させるためには、レシピエント細胞ゲノム内への不要なランダム組込みを生じることなく、哺乳類人工染色体に限定されたヘテロログス遺伝子の特異的なターゲット化取込みが望ましい。

ヘテロログス遺伝子を人工染色体に部位特異的に組込む1つの手段では、相同ターゲッティングベクターを使用する。人工染色体に存在するヌクレオチドに相同な核酸配列を含むターゲッティングベクターに、有益なヘテロログス遺伝子をサブクローニングする。次に、ベクターと染色体との相同部位の組換えイベントによって人工染色体で部位特異的組込みが生じるような方法でベクターを人工染色体含有細胞に導入する。相同ターゲッティングベクターはまた、人工染色体にベクターを取込んだ細胞を容易に同定するための選択可能マーカーと、レシピエント細胞ゲノム内への不要なベクター組込みが生じたときにのみ発現される致死選択遺伝子とを含み得る。代表的な2つの相同ターゲッティングベクター、λCF-7及びpλCF-7-DTAを以下に記載する。

40

1. ベクターλCF-7の構築

ベクターλCF-7は、遺伝子治療に使用される哺乳類人工染色体に取込まれ得る治療用分子をコードする代表的な核酸として嚢胞性線維症トランスメンブランコンダクタンス調

50

節因子 (CFTR) 遺伝子を含む。選択可能マーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子を含み、またパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の *ura3* 遺伝子 (オロチジン-5-ホスフェートデカルボキシラーゼ) を更に含むこのベクターを以下の一連段階で構築した。

a. pURAの構築

S. cerevisiae ura3 遺伝子を含む酵母人工染色体ベクター pYAC5 (Sigma; YACベクターの記述に関してはBurkeら (1987) *Science* 236:806-812参照; pYAC5の完全配列に関してはGenBank受託番号U01086参照) に由来の2.6 kbのSalI/XhoIフラグメントを、pHygの3.3 kbのSalI/SmaIフラグメント (例えば、米国特許第4,997,764号、第4,686,186号及び第5,162,215号、並びに前記参照) に結合させることによってプラスミドpURAを調製した。結合に先立って、pHygの3.3 kbフラグメントのSmaI未満に平滑末端結合できるようにXhoI末端をクレノウポリメラーゼによって処理した。従って、pURAは*S. cerevisiae ura3* 遺伝子と大腸菌ColE1の複製起点とアンピシリン耐性遺伝子とを含む。組込まれた構築物をYACクローンとして哺乳類細胞から回収する手段を提供するためにuraE遺伝子が含まれている。

b. pUP2の構築

プラスミドpURAをSalIで消化し、pCEPURの1.5 kbのSalIフラグメントに結合させた。プラスミドpCEPURは、pCEP4 (Invitrogen) のNheI-NruIフラグメントに、pBabe-puroの1.1 kbのSnaBI-NhaIフラグメントを結合させることによって調製した (Morgensternら (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3587-3596; Dr. L. Szekely (Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institutet, Stockholm) によって提供された; また、Tonghuaら (1995) *Chin. Med. J. (Beijing, Engl. Ed.)* 108:653-659; Coutoら (1994) *Infect. Immun.* 62:2375-2378; Dunkleyら (1992) *FEBS Lett.* 296:128-34; Frenchら (1995) *Anal. Biochem.* 228:354-355; Liuら (1995) *Blood* 85:1095-1103; 国際PCT出願WO9520044; WO9500178及びWO9419456参照)。

得られたプラスミドpUP2は、pURAの全部の要素に加えて、pCEPURに由来のSV40プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を含む。

c. pUP-CFTRの構築

1つのプラスミド中でpUP2の要素をCFTR遺伝子と組み合わせるために中間プラスミドpUP-CFTRを作製した。まず、エプスタイン・バールウイルス (EBV) に基づくベクターpCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA; Yatesら (1985) *Nature* 313:812-815参照; また、米国特許第5,468,615号参照) の多数クロニング部位のCMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとの間にCFTR遺伝子を挿入するために、CFTRをコードするDNA (Riordanら (1989) *Science* 245:1066-1073参照; CFTR遺伝子の配列に関しては米国特許第5,240,846号及びGenbank受託番号M28668参照) を含むpCMV-CFTRのCFTR遺伝子だけを含んでいる4.5 kbのSalIフラグメントを、XhoI消化したpCEP4 (Invitrogen及び本文中にも記載) に結合させた。得られたプラスミドをpCEP-CFTRと命名した。プラスミドpCEP-CFTRを次にSalIで消化し、CMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとが隣接したCFTR遺伝子を含む5.8 kbのフラグメントを、SalI消化したpUP2に結合させてpUP-CFTRを作製した。従って、p

10

20

30

40

50

UP-CFTRは、pUP2の全部の要素に加えて、CMVプロモーター及びSV40ポリアダニル化シグナルに連結されたCFTR遺伝子を含む。

d. λCF-7の構築

次に、プラスミドpUP-CFTRをEcoRIで部分消化することによって直鎖化し、CFTR遺伝子を含む13kbのフラグメントを、EcoRI消化したCharon 4Aλに結合させた(Charon 4Aλの記述に関しては、Blattnerら(1977) Science 196:161; Williams and Blattner (1979) J. Virol. 29:555;及びSambrookら(1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Volume 1, Section 2.18参照)。得られたベクターλCF8は、Charon 4Aλバクテリオファージの左アームと、CMVプロモーター及びSV40ポリアダニル化シグナルに連結されたCFTR遺伝子と、ura3遺伝子と、SV40プロモーター及びポリアダニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、チミジンキナーゼプロモーター(TK)と、ColE1複製起点と、アンピシリン耐性遺伝子と、Charon 4Aλバクテリオファージの右アームとを含む。λCF8構築物を次にXhoIで消化し、得られた27.1kbを、SV40ポリAシグナルとEcoRI消化したCharon 4Aλの右アームとを含むpJB P86(後述)の0.4kbのXhoI/EcoRIフラグメントに結合させた。得られたベクターλCF-7は、Charon 4Aλの左アームと、CMVプロモーター及びSV40ポリAシグナルに連結されたCFTRのコーディングDNAと、ura3遺伝子と、SV40プロモーター及びポリアダニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、Charon 4Aλの右アームとを含む。λDNAフラグメントは、代表的な人工染色体に存在するヌクレオチドに相同なコード配列を提供する。

次に、本文中に例示した人工染色体を含む細胞にベクターを導入する。例えば、本文中に記載のようなメガ染色体を担持する融合細胞系に直鎖状λCF-7ベクターを導入するとき、このベクターは、ベクターと人工染色体との相同バクテリオファージλ配列間の組換えによってメガ染色体に特異的に組込まれるであろう。

2. ベクターλCF-7-DTAの構築

ベクターλCF-7-DTAもまた、λCF-7に含まれている全部の要素を含み、加えて、致死選択マーカーとジフテリア毒素A(DT-A)遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子と複製起点とを含む。このベクターを以下の一連段階で構築した。

a. pJB P86の構築

上記λCF-7の構築にプラスミドpJB P86を使用した。SV40プロモーター及びポリアダニル化シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を含むpCEPURの1.5kbのSalIフラグメントを、HindIII消化したpJB8に結合させた(例えばIsh-Horowitzら(1981) Nucleic acids Res. 9:2989-2998参照; ATCC受託番号37074から入手可能; Amer sham, Arlington Heights, ILの市販製品)。結合に先立って、pCEPURの1.5kbフラグメントのSalI末端とHindIII直鎖化したpJB8末端とをクレノウポリメラーゼによって処理した。得られたベクターpJB P86は、SV40プロモーター及びポリAシグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、Charon 4Aλの1.8kbのCOS領域と、ColE1複製起点と、アンピシリン耐性遺伝子とを含む。

b. pMEP-DTAの構築

ジフテリア毒素-A遺伝子を含むpMC1-DT-A(例えばMaxwellら(1986) Cancer Res. 46:4660-4666参照)の1.1kbのXhoI/SalIフラグメントを、XhoI消化したpMEP4(Invitrogen, San Ciego, CA)に結合させてpMEP-DTAを作製した。pMC1-DT-Aを作製するためには、DTA遺伝子のコーディング領域をp2249-1から800bpの

10

20

30

40

50

Pst I / Hind III フラグメントとして単離し、pMC1neopolyA (Stratagene から入手可能な pMC1) の neo 遺伝子に置換して TK プロモーターのコントロール下に導入した。得られた構築物 pMC1DT-A を Hind III で消化し、クレノウで末端を埋め戻し、Sal I リンカーを結合させて、Xho I 末端 (5') と、270bp の TK プロモーターと、~790bp の DT-A フラグメントとを含む Sal I 末端とをもつ 1061bp の TK-DTA 遺伝子カセットを作製した。このフラグメントを Xho I 消化した pMEP4 に結合させた。

従って、プラスミド pMEP-DTA は、TK プロモーター及び SV40 に連結された DT-A 遺伝子と、ColE1 複製起点とアンピシリン耐性遺伝子とを含む。

c. pJB83-DTA9 の構築

10

プラスミド pJB8 を Hind III 及び Cla I で消化し、オリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチドのセンス鎖としては配列 7 参照、アンチセンス鎖としては配列 8 参照) に結合させて pJB83 を作製した。Cla I / Hind III 消化した pJB8 に結合したオリゴヌクレオチドは、制限エンドヌクレアーゼ Sma I、Pac I 及び Srf I の認識部位を含んでいた。これらの部位は pλCF-7-DTA 構築物の直鎖化を容易にする。

次に、DT-A 遺伝子を含む pMEP-DTA の 1.4kb の Xho I / Sal I フラグメントを、Sal I 消化した pJB83 に結合させて pJB83-DTA9 を作製した。

d. λCF-7-DTA の構築

λCF-7 の 12bp のオーバーハングを、Mung bean ヌクレアーゼ及び T4 ポリメラーゼを順次用いた処理によって除去した。得られた 41.1kb の直鎖状 λCF-7 ベクターを、Cla I で消化し T4 ポリメラーゼで処理しておいた pFB83-DTA9 に結合させた。得られたベクター λCF-7-DTA は、λCF-7 の全部の要素と、TK プロモーター及び SV40 ポリアデニル化シグナルに連結された DT-A 遺伝子と、1.8kb の Charon 4A λ COS 領域と、アンピシリン耐性遺伝子 (pJB83-DTA9 に由来) と、ColE1 複製起点 (pJB83-DTA9 に由来) とを含む。

20

D. ルシフェラーゼマーカーを用いるターゲッティングベクター：プラスミド pMCT-RUC

哺乳類人工染色体に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を部位特異的にターゲットするプラスミド pMCT-RUC (14kb) を構築した (Renilla ルシフェラーゼをコードする DNA 及びこのようなベクターを構築するための出発物質を提供し得るプラスミド pTZrLuc-1 の記述に関しては米国特許第 5,292,658 号及び第 5,418,155 号参照)。このプラスミドの有利な特徴は、Renilla ルシフェラーゼ遺伝子がヒトサイトメガロウイルスの前初期遺伝子エンハンサー/プロモーターの転写調節下に維持されていること、及び、正の選択可能マーカーであるヒグロマイシン耐性遺伝子がチミジンキナーゼプロモーターの転写調節下に維持されていることである。特にこのプラスミドは、ミニクロモソームに相同の DNA (即ちネオマイシン耐性遺伝子) を含むプラスミド pAG60 (米国特許第 5,118,620 号、第 5,021,344 号、第 5,063,162 号及び第 4,946,952 号参照; また、Colbert-Gapapin ら (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14 参照) と、Renilla 遺伝子及びヒグロマイシン耐性遺伝子と、相同組換えの負の選択可能マーカーである tk プロモーターのコントロール下の HSG-tk 遺伝子と、プラスミドを直鎖化するための非反復 Hpa I 部位とを含む。

30

この構築物を、リン酸カルシウムトランスフェクションによって EC3/7C5 細胞に導入した (Lorenz ら (1996) J. Biol. Chem. 271:31-37 参照)。EC3/7C5 細胞を単層として維持した (Gluzman (1981) Cell 23:175-183 参照)。プレートあたり 10µg の直鎖化した pMCT-RUC を用いるリン酸カルシウムトランスフェクション (Harper ら (1981) Chromosoma 83:431-439 参照) を行うために、100mm のシャー

40

50

レ中で50%集密度の細胞を使用した。単一のトランスフェクト細胞に由来するコロニーを単離し、ヒグロマイシン(300 μ g/ml)と10%ウシ胎仔血清とを含むF-12培地に維持した。Renillaルシフェラーゼアッセイに先立って細胞を100mmのシャーレで増殖させた。

Renillaルシフェラーゼアッセイを実施した(例えば、Matthewsら(1977) Biochemistry 16:85-91参照)。in vivo及びin vitroの発光を測定するために、直鎖化したプラスミドpMCT-RUCをEC3/7C5細胞(“B”細胞系)にトランスフェクトした後に得られたヒグロマイシン耐性細胞系を、100%集密度まで増殖させた。約30世代後のin vivoの発光を以下の手順で測定した。増殖培地を除去し、コエレンテラジン(coelenterazine) (最終濃度1ミリモル/リットル)を含む1mlのRPMI 1640で置換した。次に、シャーレを弱光の映像解析装置(Hamamatsu Argus-100)に配置することによって細胞から放出された発光を可視化した。100%感度の光子計数管を用いて5分間の光子蓄積後に画像を形成した。in vitroの発光を測定するために、細胞をトリプシン処理し、1つのシャーレから採取し、ペレット化し、1mlのアッセイバッファ(0.5モル/リットルのNaCl、1ミリモル/リットルのEDTA、0.1モル/リットルのリン酸カルシウム、pH7.4)に再懸濁させ、氷上で10秒間音波処理した。次に、1ミリモル/リットルの濃度のコエレンテラジン0.5mlを速やかに注入後、溶解液をTurner TD-20eルミノメーターで10秒間検定し、発光の平均値をLUとして記録した(この器具で1LU=1.6 $\times 10^6$ hu/秒)。

直鎖化したプラスミドpMCT-RUCによってトランスフェクトされたEC3/7C5細胞の独立細胞系は異なるレベルのRenillaルシフェラーゼ活性を示した。同じ細胞系の溶解液を用いて測定試験を行ったときにも発光は同様の違いを示した。発光のこの違いは、マウスゲノム内へのプラスミドpMCT-RUCのランダム組込みによって生じた位置効果に起因すると考えられる。何故なら、この実験ではルシフェラーゼ遺伝子の部位ターゲッティングを目的とした濃縮を行わなかったからである。

ミニクロモソームに組込まれたルシフェラーゼ遺伝子を含む細胞が濃縮されたトランスフェクタント集団を得るために、トランスフェクト細胞をガンシクロビルの存在下で増殖させた。この負の選択培地は、添加されたpMCT-RUCプラスミドがゲノムに組込まれた宿主細胞EC3/7C5の増殖を抑制する。従ってこの選択に生き残ったトランスフェクト集団中では、pMCT-RUCが組込まれたミニクロモソームを含む細胞が濃縮されている。この選択に生き残った細胞をルシフェラーゼアッセイによって試験すると、より均一なレベルのルシフェラーゼ発現を示した。更に、in situハイブリダイゼーションアッセイの結果は、Renillaルシフェラーゼ遺伝子がこれらの細胞のミニクロモソームに含まれていることを示し、これは更に、ミニクロモソームに対するpMCT-RUCのターゲッティングが成功したことを示す。

また、ミニクロモソームに相同な伸長領域を与えるために更に λ DNAを含むpMCT-RUCの変種(後述の“他のターゲッティングベクター”の項参照)をEC3/7C5細胞にトランスフェクトした。レシピエントEC3/7C5細胞中のミニクロモソームに対してpNEM-1中のRenillaルシフェラーゼ遺伝子及びヒグロマイシン耐性遺伝子の部位特異的ターゲッティングを行った。これを、DNA増幅分析及びin situハイブリダイゼーションによって確認した。更に、トランスフェクタントのルシフェラーゼアッセイによってルシフェラーゼ遺伝子発現を確認した。

E. タンパク質分泌用ターゲッティングベクター

哺乳類細胞発現系において細胞内産生されたヘテロログスタンパク質を単離するためには、苛酷にもなり得る条件下で細胞破壊を行うこと、及び、細胞夾雑物から組換えタンパク質を精製することが必要である。組換え産生されたタンパク質を、精製による除去を要する夾雑物の少ない細胞外媒質に分泌させることによって、タンパク質単離のプロセスを簡単にすることができる。従って、哺乳類の人工染色体系と共に使用するための分泌用ターゲッティングベクターを構築した。

10

20

30

40

50

哺乳類細胞中のヘテロログスタンパク質の産生及び分泌を示す有用なモデルベクターは、タンパク質を細胞膜に輸送すること及び細胞からタンパク質を分泌することを指令する有効な分泌シグナルに融合した検出容易なリポータータンパク質をコードするDNAを含む。後述するベクターpLNCX-ILRUC及びpLNCX-ILRUCλはこのようなベクターの例である。これらのベクターは、インターロイキン-2 (IL2) のシグナルペプチドとRenilla reniformisルシフェラーゼとの融合タンパク質をコードするDNAを含む。IL-2のシグナルペプチド（配列9に示す配列によってコードされている）は、該ペプチドに連結されたルシフェラーゼタンパク質を哺乳類細胞から分泌するように指令する。宿主哺乳類細胞から分泌されると、IL-2のシグナルペプチドが融合タンパク質から切断され、活性ルシフェラーゼタンパク質が細胞外媒質に放出される。このヘテロログスタンパク質の産生及び分泌の成否は、媒質にルシフェラーゼ酵素の生物発光ルシフェリン基質を接触させたときに生じる発光を測定するルシフェラーゼアッセイによって容易に検出できる。この特徴は、人工染色体を遺伝子治療に使用するときには有用であろう。治療用遺伝子に融合したIL-RUCを担持する機能性人工染色体の存在を容易にモニターできる。体液または体組織のサンプルを採取し、ルシフェリンと適正な補因子とを添加し、生物発光を観察することによってルシフェラーゼ発現を試験し得る。

10

1. タンパク質分泌用ベクターpLNCX-ILRUCの構築

ベクターpLNCX-ILRUCは、哺乳類細胞中で遺伝子を構成的に発現させるためにヒトサイトメガロウイルス (CMV) の前初期プロモーターに連結されたヒトIL-2シグナルペプチド-R. reniformis融合遺伝子を含む。構築物を以下の手順で調製した。

20

a. IL-2シグナル配列をコードするDNAの調製

適当なIL-2プライマーを用いたHEK 293細胞系の核酸増幅によって、ヒトIL-2シグナルペプチドをコードするDNAを含む69bpのDNAフラグメントが得られた（例えば、IL-2をコードするDNAに関しては米国特許第4,518,584号及び配列9参照；IL-2遺伝子及び対応するアミノ酸配列はGenbank Sequence Databaseで受託番号K02056及びJ00264として提供される）。シグナルペプチドは、双方のGenbankに収録された翻訳産物及び配列9の最初の20個のアミノ酸を含む。最初の20個のアミノ酸をコードする対応するヌクレオチド配列は、上記の収録された翻訳産物の配列（例えば、受託番号K02056のヌクレオチド293-52及び受託番号J00264のヌクレオチド478-537）中に示されており、また、配列9に示されている。増幅プライマーは、pGEMT (Promega) に結合後のDNAフラグメントをサブクローニングするためのEcoRI部位 (GAATTC) を含んでいた。順方向プライマーを配列11に示し、逆方向プライマーを配列12に示す。

30

TTTGAATTTCATGTACAGGATGCAACTCCTG（順方向、配列11）

、

TTTGAATTTCAGTAGGTGCACTGTTTGTGAC（逆方向、配列12）

40

b. R. reniformisルシフェラーゼをコードするDNAの調製

R. reniformisルシフェラーゼ遺伝子の出発ソースはプラスミドpLXSN-RUCであった。ベクターpLXSN（例えば、米国特許第5,324,655号、第5,470,730号、第5,468,634号及び第5,358,866号並びにMillerら（1989）Biotechniques 7:980参照）は、ヘテロログスDNAをレトロウイルスLTRの転写調節下に発現させ得るレトロウイルスベクターである。このベクターは更に、SV40初期領域プロモーターに発現動作可能に連結されたネオマイシン耐性遺伝子を含む。R. reniformisルシフェラーゼ遺伝子をプラスミドpTZrLuc-1（例えば、米国特許第5,292,658号参照；また、Genbank Sequence Database受託番号M63501参照；また、Lo

50

renzら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 4438-4442参照)から入手し、配列10に示す。pTZrLuc-1の0.97 kbのEcoRI/SmaIフラグメントは、RenillaルシフェラーゼをコードするDNAのコーディング領域を含む。ベクターpLXSNを消化し、pLXSN-RUCに含まれたルシフェラーゼ遺伝子に結合させた。pLXSN-RUCは、ネオマイシン耐性遺伝子の発現を指令するSV40プロモーターの上流でウイルスLTRに作動可能に連結されたルシフェラーゼ遺伝子を含んでいた。

c. pLXSN-ILRUCを作製するためのIL-2シグナルペプチドをコードするDNAとR. reniformisルシフェラーゼ遺伝子との融合

項1. aで前述したIL-2シグナルペプチドをコードするDNAを含むベクターpGEMTをEcoRIで消化し、得られたシグナルペプチドをコードするフラグメントを、EcoRI消化したpLXSN-RUCに結合させた。得られたプラスミドをpLXSN-ILRUCと命名したが、このプラスミドは、pLXSN-RUC中のR. reniformis遺伝子の直ぐ上流にIL-2シグナルペプチドをコードするDNAを含む。次に、融合遺伝子の3'端にSmaI部位を付加するために融合遺伝子の核酸増幅鋳型としてプラスミドpLXSN-ILRUCを使用した。直鎖化した(EcoRI/SmaI消化した)pGEMT(Promega)に増幅産物をサブクロニングしてILRUC-pGEMTを作製した。

d. 哺乳類細胞中で発現させる調節要素を含むベクターへの融合遺伝子の導入

プラスミドILRUC-pGEMTをKspI及びSmaIで消化し、IL-2シグナルペプチドールシフェラーゼ融合遺伝子を含むフラグメントを遊離させ、これをHpaI消化したpLNCXに結合させた。ベクターpLNCX(例えば、米国特許第5,324,655号及び第5,457,182号参照;また、Miller and Rosman(1989) Biotechniques 7:980-990参照)は、ヘテロログスDNAをCMVプロモーターのコントロール下に発現させるレトロウイルスベクターである。このベクターはまた、ウイルスプロモーターの転写調節下のネオマイシン耐性遺伝子を含む。結合反応によって得られたベクターをpLNCX-ILRUCと命名した。ベクターpLNCX-ILRUCは、pLNCX中のCMVプロモーターの直ぐ下流でウイルス3'LTR及びポリアデニル化シグナルの上流にIL-2シグナルペプチドールシフェラーゼ融合遺伝子を含む。この配置によって融合遺伝子がCMVプロモーターのコントロール下で発現し得る。ヘテロログスタンパク質をコードするDNA(即ち、ルシフェラーゼ遺伝子)がIL-2シグナルペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された配置によって、ベクターがトランスフェクトされた哺乳類細胞中で融合タンパク質が発現され、ヘテロログスタンパク質が宿主細胞から細胞外媒質に分泌される。

2. タンパク質分泌用ターゲティングベクターpLNCX-ILRUCλの構築

IL-2シグナルペプチドールシフェラーゼ融合遺伝子を宿主細胞の哺乳類人工染色体に導入するために、ベクターpLNCX-ILRUCを修飾して使用するとよい。pLNCX-ILRUC発現ベクターによる哺乳類人工染色体の特異的取込みを促進するために、人工染色体に存在するヌクレオチドに相同な核酸配列を部位特異的組換え可能な状態でベクターに付加する。

本文中に記載の代表的な人工染色体はλファージDNAを含む。従って、分泌ベクターpLNCX-ILRUCを作製するために、λファージDNA(Charon 4Aアームに由来)を添加することによってタンパク質分泌用ターゲティングベクターpLNCX-ILRUCを調製した。

3. 哺乳類細胞からのR. reniformisルシフェラーゼの発現及び分泌

a. pLNCX-ILRUCを用いるR. reniformisルシフェラーゼの発現
エレクトロポレーション(BIORAD、製造業者の指示通りに実施)によって、哺乳類細胞(LMTK-、ACTTから入手)にベクターpLNCX-ILRUC(~10 µg)を一過性にトランスフェクトした。また、neo選択用G418中の増殖によって産生された安定なトランスフェクタントも調製した。

トランスフェクタントを増殖させ、次いでルシフェラーゼの発現を分析した。トランスフェクト細胞から活性ルシフェラーゼが分泌されたか否かを判定するために、コエレントラジンの添加によって培養培地のルシフェラーゼを検定した（例えば、Matthewsら（1977）*Biochemistry* 16:85-91参照）。

これらのアッセイの結果は、ベクターpLNCX-ILRUCが哺乳類宿主細胞中でヘテロガスDNAを構成的に発現し得ることを確認する。これらの結果は更に、ヒトIL-2シグナルペプチドはペプチドのC末端に融合したタンパク質の分泌を指令し得ることを証明する。加えて、これらのデータは、R. reniformisルシフェラーゼタンパク質が極めて有効なリポーター分子であり、哺乳類細胞環境で安定であり、高感度の容易な遺伝子発現アッセイの基礎となることを示す。

10

b. LMTK-細胞から分泌されると考えられるRenilla reniformisルシフェラーゼ

(i) 細胞ペレットのRenillaルシフェラーゼアッセイ

以下の細胞を試験した：

ベクター非含有細胞：陰性対照としてベクター非含有のLMTK-細胞；

pLNCX単独をトランスフェクトした細胞；

RUC-pLNCX（pLNCXベクター中にRenillaルシフェラーゼ遺伝子を含むベクター）をトランスフェクトした細胞；

pLNCX-ILRUC（pLNCXベクター中にIL-2リーダー配列+Renillaルシフェラーゼ融合遺伝子を含むベクター）をトランスフェクトした細胞。

20

エレクトロポレーションの48時間後、細胞及び培養培地を収集した。4つのプレートの細胞から得られた細胞ペレットを1mlのアッセイバッファに再懸濁させ、音波処理によって溶解した。200μlの再懸濁細胞ペレットを各ルシフェラーゼ活性アッセイに使用した（例えば、Matthewsら（1977）*Biochemistry* 16:85-91参照）。アッセイを3回繰返し、生物発光の平均測定値を算出した。

結果は、pLNCXをトランスフェクトした細胞または陰性対照細胞中に比較的低いバックグラウンド生物発光が存在することを示した。IL-2リーダー配列-ルシフェラーゼ遺伝子融合ベクターを含む細胞に由来の細胞ペレット中では低レベルが観察され、RUC-pLNCXを含む細胞サンプル中では5,000RLUを上回る値が観察された。

(ii) 細胞培地のRenillaルシフェラーゼアッセイ

30

4つの細胞プレートに由来の40ミリリットルの培地を採取して遠心沈殿させた。各ルシフェラーゼ活性アッセイに200マイクロリットルの培地を使用した。アッセイを数回繰返し、生物発光の平均測定値を算出した。これらの結果は、pLNCX-ILRUCで形質転換させた細胞の細胞培地中で比較的高いレベルの生物発光が検出されることを示した。RUC-pLNCXをトランスフェクトした細胞中の検出レベルは約1/10という低い値（ベクター非含有またはpLNCX単独をトランスフェクトした細胞の培地中のバックグラウンドレベルをやや上回る値）であった。

(iii) 結論

これらの実験の結果は、RenillaルシフェラーゼがIL-2シグナルペプチドの指令下でLMTK-細胞から分泌されることが示された。IL-2分泌シグナルをコードするDNAに連結されたRenillaルシフェラーゼをコードするDNAをトランスフェクトした細胞の培地は、対照またはルシフェラーゼをコードするDNAを含むシグナルペプチドをコードするDNAを含まない細胞よりも実質的に高いレベルのRenillaルシフェラーゼ活性を有していた。また、対照とルシフェラーゼをコードするDNAを含む細胞との差は、ルシフェラーゼ活性がルシフェラーゼ特異的であり、非特異的反応に由来しないことを示す。更に、RUC-pLNCXをトランスフェクトした細胞の培地から得られた結果がバックグラウンドと同様であることは、培地中のルシフェラーゼ活性が細胞溶解に由来するのではなく分泌ルシフェラーゼに由来することを示す。

40

c. pLNCX-ILRUCを用いたR. reniformisルシフェラーゼの発現哺乳類人工染色体からIL-2シグナルペプチド-R. reniformis融合遺伝子

50

を発現させるために、ベクター p L N C X - I L R U C λ は、哺乳類人工染色体に含まれている λ D N A 配列との相同組換えによって哺乳類人工染色体に部位特異的に組込まれるようにターゲットされる。これは、哺乳類人工染色体を担持している融合細胞系または哺乳類人工染色体を含む哺乳類宿主細胞に p L N C X - I L R U C λ を導入することによって行われる。例えばベクターのマイクロインジェクションまたはベクターによる融合細胞系のトランスフェクションを介して人工染色体を担持している融合細胞系にベクターが導入される場合、細胞を選択的条件下で増殖させる。ベクター p L N C X - I L R U C λ を取込んだ人工染色体を、前述のような精製手順を用いて生存細胞から単離し、次いで哺乳類宿主細胞に注入する。

あるいは、融合細胞系から単離しておいた哺乳類人工染色体を最初に哺乳類宿主細胞に注入してもよい。次に、宿主細胞にベクター p L N C X - I L R U C λ をトランスフェクトして増殖させる。

次に、組換え宿主細胞のルシフェラーゼ発現を上述の手順で検定する。

F. 他のターゲティングベクター

ベクター p M C T - R U C に基づくこれらのベクターは二重組換え体の挿入及び選択を確保するために正の選択及び負の選択に依存する。1回の交差によって細胞を殺傷する D T - A が取込まれ、2回の交差組換えによって D T - 1 遺伝子が欠失する。

1. プラスミド p N E M 1 は以下の要素を含む。

D T - A : ジフテリア毒素遺伝子 (負の選択可能マーカー) と、

H y g : ヒグロマイシン遺伝子 (正の選択可能マーカー) と、

r u c : R e n i l l a ルシフェラーゼ遺伝子 (非選択可能マーカー) と、

1 : L T R - M M T V プロモーターと、

2 : T K プロモーターと、

3 : C M V プロモーターと、

M M R : 相同領域 (プラスミド p A G 6 0)。

2. プラスミド p N E M - 2 及び - 3 は異なる負の選択可能マーカーを有する以外は p N E M 1 に等しい。

p N E M - 1 : “ - ” 選択可能マーカーとしてジフテリア毒素遺伝子、

p N E M - 2 : “ - ” 選択可能マーカーとしてヒグロマイシンアンチセンス遺伝子、

p N E M - 3 : “ - ” 選択可能マーカーとしてチミジンキナーゼ H S V - 1 遺伝子。

3. プラスミド λ D N A に基づく相同

p N E M λ - 1 : ベースベクター、

p N E M λ - 2 : p 5' 遺伝子を含むベースベクター、

1 : L T R M M T V プロモーター、

2 : S V 4 0 プロモーター、

3 : C M V プロモーター、

4 : μ T I I A プロモーター (メタロチオネイン遺伝子プロモーター)。

- 相同領域 (プラスミド p A G 6 0)

λ の左右のアームの λ L . A . 及び λ R . A . 相同領域 (λ g t - W E S)。

実施例 13

哺乳類細胞に対するプラスミド D N A のマイクロインジェクション

これらの手順は、哺乳類細胞、昆虫類細胞などの真核細胞に M A C を微量注入するために使用される。

マイクロインジェクション技術は、細胞内デリバリーシステムとして小さいガラス毛細管を使用する技術であり、D N A フラグメントを核に導入するために使用されている (例えば、C h a l f i e ら (1994) S c i e n c e 263:802-804 参照)。この技術によって、ホルモン、タンパク質、D N A 及び R N A などのほぼすべての種類の分子をレシピエント細胞の細胞質または核に導入することが可能である。この技術では、扱う細胞の種類の制限もなく、C a²⁺ 仲介型遺伝子導入及びリポソーム仲介型遺伝子導入のような他の方法よりも効率が高い。注入された細胞の約 20 ~ 30 % が形質転換に成功す

10

20

30

40

50

る。

マイクロインジェクションは位相差顕微鏡の観察下で行う。マイクロマニピュレータを用い、予めDNAサンプルを充填したガラス微量毛細管を注入対象細胞に向ける。毛細管に接続されたトランスジェクターから適度な空気圧を作用させることによって適量のサンプル（1～10 μ l）を細胞に移入する。注入された細胞の位置を特定し易いように、番号を付けた方眼をプリントしたガラススライド上でレシピエント細胞を増殖させる。

a. 材料及び装置

35×10mmのNunc lon組織培養皿、マウス細胞系EC3/7C5プラスミドDNA pCH110（Pharmacia）、精製した緑色蛍光タンパク質（Purified Green Fluorescent Protein, GFP）（Aequorea及びRenillaに由来のGFPは精製されており、GFPをコードするDNAもクローニングされている。例えば、Prasherら（1992）Gene 111: 229-233；米国特許出願08/119, 678及び08/192, 264に基づく国際PCT出願WO95/07463参照）、ZEISS Axiovert 100顕微鏡、エッペンドルフトランスジェクター5426、エッペンドルフマイクロマニピュレータ5171、エッペンドルフのセロケート・カバースライド、エッペンドルフ微量充填器、エッペンドルフのフェムトチップス及びその他の標準装置。

b. 注入プロトコル

（1）35mmの組織培養皿（37℃、5%CO₂）で細胞密度が80%集密度に達するまで線維芽細胞を増殖させる。インキュベータから皿を取出し、培地を深さ約5mmまで加える。

（2）皿ホルダーに皿を載せ、倍率10×の対物レンズで細胞を観察する。細胞表面上方に焦点を合わせるのが望ましい。

（3）微粒状落屑を完全に除去するために十分な遠心力でDNAサンプルを遠心（典型的には微量遠心管で約10,000rpmで10分間）することによって、プラスミドまたは染色体DNA溶液（1ng/ μ l）及びGFPタンパク質溶液を更に精製する。

（4）2つの2 μ lのDNA溶液（1ng/ μ l）をエッペンドルフ微量充填器で微量毛細管に充填する。充填中、微量毛細管の先端に充填器を挿入する。GFP（1mg/ml）を同じ手順で充填する。

（5）微量毛細管から保護シースを外し、微量毛細管をマイクロマニピュレータに接続した毛細管ホルダーに固定する。

（6）毛細管の先端を培地の表面まで下降させ、徐々に細胞に焦点を合わせていきながら毛細管の先端を細胞の表面に到達させる。更に下降させて毛細管を細胞に挿入する。毛細管のレベル、時間及び圧力のような種々のパラメーターは特定装置毎に決定される。例えば、線維芽細胞系C5と上記装置とを使用したときの最良条件は、注入時間0.4秒、圧力80psiである。DNAは次に細胞の核に自動的に注入される。

（7）注入後、細胞をインキュベータに戻し、約18～24時間インキュベートする。

（8）インキューベーション後、選択マーカーに依存する適当な方法で形質転換体の数を測定し得る。例えば、緑色蛍光タンパク質を使用する場合、UV光源及び注入後0～24時間に設定した蛍光フィルターを使用してアッセイを実施し得る。pHC110に由来のDNAのような β -gal含有DNAを注入した場合、形質転換体の β -galを検定し得る。

（c）プラスミドDNAが注入された細胞中の β -ガラクトシダーゼの検出

培養プレートから培地を除去し、5mlの定着溶液（1%のグルタルアルデヒド；0.1Mのリン酸ナトリウムバッファ溶液；1mMのMgCl₂）を加えて細胞を定着させ、37℃で15分間インキュベートする。定着溶液1を、5mlのX-gal溶液II（0.2%のX-gal；10mMのリン酸ナトリウムバッファ（pH7.0）；150mMのNaCl；1mMのMgCl₂；3.3mMのK₄Fe（CN）₆H₂O；3.3mMのK₃Fe（CN）₆）で置換し、プレートを37℃で30～60分間インキュベートする。X-gal溶液を除去し、2mlの70%グリセロールを各プレートに添加する。青色に染

10

20

30

40

50

色された細胞を光学顕微鏡で確認する。

この方法は、MAC、特に抗HIVメガ染色体をもつMACを導入して、抗HIV活性マウスモデルを作製するために使用されるであろう。

実施例 14

(ヒト以外の)トランスジェニック動物

動物体に所望の形質、例えば疾病耐性を与えるヘテロログス遺伝子を発現する（ヒト以外の）トランスジェニック動物を作製し得る。疾病耐性動物のモデルとして役立つトランスジェニックマウスを作製する。ワクチンをコードしているかまたは治療用分子をコードしている遺伝子を胚または胚幹細胞（ES細胞）に導入して遺伝子産物を発現させ、特定の疾病に耐性または低感受性の動物を作製し得る。

10

哺乳類の人工メガ染色体及びその他の人工染色体、特にSATACを使用して、病原性ウイルス耐性のような所望の形質を与える遺伝子を安定に発現させる哺乳類及び鳥類のような（ヒト以外の）トランスジェニック動物を作製し得る。人工染色体はまた、免疫的にヒト化された異種移植用器官を作製するために、ブタのような（ヒト以外の）トランスジェニック動物を作製するために使用され得る。

例えば、抗HIVリボザイムをコードするトランスジーンを含むトランスジェニックマウスは、これらの方法を用いて作製された安定な（ヒト以外の）トランスジェニック動物の有用な発育モデルである。（ヒト以外の）トランスジェニック動物、特に、乳汁中に有益なタンパク質を産生する雌牛、ヤギ、マウス、雄牛、ラクダ、ブタ及びヒツジ、卵中に治療用タンパク質または他の有益なタンパク質を産生するトランスジェニックニワトリ及び他の産卵性家禽、などが人工染色体を用いて作製され得る。例えば、乳汁中にヘテロログスDNAを発現させるために乳腺特異的プロモーターを使用することが公知である（例えば、米国特許第4,873,316号参照）。特に、乳汁特異的プロモーター、または好ましくは乳房組織中で特異的に活性化される乳汁特異的シグナルペプチドに連結されたプロモーターは有益なDNAに作動可能に連結され、これによって乳汁中でこのDNA配列を発現させる。

20

1. 抗HIVリボザイムを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

ベクターに担持されたトランスジーンDNAを用いて発育させたマウス（対照マウス）中のトランスジーン発現と、人工メガ染色体に担持されたトランスジーンを用いて発育させたマウス中の発現との安定性及び量を比較するために対照トランスジェニックマウスを作製する。

30

a. β -ガラクトシダーゼを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

β -ガラクトシダーゼ遺伝子を単独でマウス胚にマイクロインジェクションすることによって1組の対照トランスジェニックマウスを作製した。プラスミドDNAをマウス胚に導入するために使用したマイクロインジェクション手順は実施例13に記載の手順を胚を使用するように修正したものである（例えば、Hogan *et al.* (1994) *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 特にpp255-264及び付録3参照）。受胎マウス胚（Charles River Co. から得られたCB6株）に、BamHI消化によって直鎖化しておいた1ngのプラスミドpCH110（Pharmacia）を注入した。このプラスミドは、SV40後期プロモーターに連結された β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含んでいる。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子産物は、トランスジーン発現の成否を知るための検出容易なマーカーを提供する。更に、これらの対照マウスは、プラスミドを胚に導入するために使用したマイクロインジェクション手順を追認する。更に、モデル系（下記参照）のマウス胚に導入されるメガ染色体が β -ガラクトシダーゼ遺伝子も含むので、pCH110の胚注入によって作製された対照トランスジェニックマウスは、プラスミドに由来のヘテロログス遺伝子の発現と人工染色体に担持された遺伝子に由来のヘテロログス遺伝子の発現とを比較するための相似的な系として役立つ。

40

注入後、胚が分裂して2細胞を形成するまで胚を改質HTF培地中で、5%CO₂下、3

50

7℃で1日間培養する。2細胞の胚を代理母となる雌マウスに移植する（手順に関しては、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 127以降参照）。

b. 抗HIVリボザイムを発現する対照トランスジェニックマウスの発育

異なる3つの遺伝子、即ち、(1) 抗HIVリボザイムをコードするDNAと、(2) ピューロマイシン耐性遺伝子と、(3) ヒグロマイシン耐性遺伝子とを含むプラスミドpCEPUR-132をマイクロインジェクションによってマウス胚に導入し1組の抗HIVリボザイム遺伝子含有対照トランスジェニックマウスを作製した。プラスミドpCEPUR-132は、抗HIVリボザイム遺伝子（以後、Changら(1990) Clin. Biotech. 2:23-31に準じてリボザイムDと呼ぶ；他の参考文献としてはRossiらの米国特許第5,144,019号、特に図4）とヒグロマイシン耐性遺伝子とを含むプラスミドpCEP-132の部分とを結合させることによって構築された。

プラスミドpCEP-132を以下の手順で構築した。ベクターpCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA；また、Yatesら(1985) Nature 313:812-815参照)を、ベクターの多数クローニング部位領域を開裂するXhoIで消化した。この～10.4kbのベクターは、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたヒグロマイシン耐性遺伝子を含み、更にアンピシリン耐性遺伝子とColE1複製起点とEBNA-1（エプスタイン・バーウイルス核抗原）遺伝子とOriPとを含む。サイトメガロウイルスプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルとが多数クローニング部位に隣接している。

XhoI消化したpCEP4を、プラスミド132（このプラスミドの記述に関しては実施例4参照）のXhoI及びSalIによる消化によって得られたフラグメントに結合させた。このXhoI/SalIフラグメントは、3'端にSV40ポリアデニル化シグナルが連結された抗HIVリボザイム遺伝子を含んでいる。この結合によって得られたプラスミドをpCEP-132と命名した。従って詳細にはpCEP-132は、抗HIVリボザイム遺伝子のCMVプロモーター駆動発現のために多数クローニング部位に挿入された抗HIVリボザイム遺伝子とSV40ポリアデニル化シグナルとを含むpCEP4から成る。

pCEPUR-132を作製するために、pCEP-132をpCEPURのフラグメントに結合させた。pCEPURは、pCEP4のNheI/NruI消化によって生じた7.7kbのフラグメントを、5'端にSV40プロモーターが連結されたピューロマイシン耐性遺伝子を含むpBabeの1.1kbのNheI/SnaBIフラグメントに結合させることによって調製した（pBabeの記述に関しては、Morgenstern and Land (1990) Nucleic Acids Res. 18:3587～3596参照）。従って、pCEPURは、pCEP4に由来のアンピシリン耐性遺伝子及びEBNA1遺伝子と、ColE1及びOriP要素と、pBabeに由来のピューロマイシン耐性遺伝子とから構成されている。pCEPUR中のピューロマイシン遺伝子の5'端にSV40プロモーター（pBabeに由来）が隣接し、3'端にSV40ポリアデニル化シグナル（pCEP4に由来）が隣接している。

プラスミドpCEPURをXhoI及びSalIで消化し、5'端にSV40プロモーターが連結されたピューロマイシン耐性遺伝子と、XhoI消化したpCEP-132に結合させて、～12.1kbのプラスミドを作製し、pCEPUR-132と命名した。従って詳細にはpCEPUR-132は、XhoI部位に挿入されたピューロマイシン耐性遺伝子とSV40プロモーターとを含むpCEP-132から成る。pCEPUR-132の主要要素は、チミジンキナーゼプロモーター及びポリアデニル化シグナルに連結されたヒグロマイシン耐性遺伝子と、CMVプロモーター及びSV40ポリアデニル化シグナルに連結された抗HIVリボザイム遺伝子と、SV40プロモーター及びポリアデニル化

10

20

30

40

50

シグナルに連結されたピューロマイシン耐性遺伝子とから成る。プラスミドはまた、アンピシリン耐性遺伝子及びEBNA1遺伝子とColE1複製起点及びOriPとを含む。

(C57BL/6JxCBA/J) F1雄マウスと予め交配した(C57BL/6JxCBA/J) F1雌マウス(例えば、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 429参照)から受精卵を調製した。これらのF2受精卵の雄性前核に、NruI消化によって直鎖化しておいたpCEPUR-132(〜3μg/ml)を注入した(Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。注入を受けた卵を代理母となる雌マウスに移植し、トランスジェニック子孫を发育させた。

10

これらの一次キャリアの子孫の尾細胞から単離したDNA中のトランスジーンが存在を分析した(後述の手順)。尾細胞中にトランスジーンを含んでいた(しかし全身の細胞にトランスジーンを含まなくてもよい、即ちキメラでもよい)7体のキャリアマウスを交配して非キメラまたは生殖系のヘテロ接合体を産生させ得る。ヘテロ接合体を更に交配してホモ接合体であるトランスジェニック子孫を産生させ得る。

2. 哺乳類人工染色体を用いるモデルトランスジェニックマウスの发育

受精マウス胚に、融合細胞系G3D5またはH1D3(前出)から単離したメガ染色体(1p1あたり0-1個の染色体を含む1-10p1の材料)を前述の手順で微量注入する。メガ染色体は本文中に記載の手順で単離する。どちらの細胞系から単離したメガ染色体も、抗HIVリボザイム(リボザイムD)遺伝子とヒグロマイシン耐性遺伝子及びβ-ガラクトシダーゼ遺伝子とを含む。注入を受けた胚を发育させ、前述のようなトランスジェニックマウスを得る。

20

あるいは、メガ染色体含有細胞系G3D5*またはH1D3*を、マウス胚幹細胞(例えば、米国特許第5,453,357号参照、市販物質;他の参考文献としてManipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994) Hoganら, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 253-289ページ)に、標準手順(例えば、Guide to Techniques in Mouse Development in Methods in Enzymology Vol. 25, Wassarman and De Pamphilis, eds. (1993), 803-932ページ参照)で融合させる。(また、(前出のような)マイクロセル手順を用いて単離メガ染色体を胚幹細胞に導入することも可能である)。幹細胞を線維芽細胞(例えば、ヒグロマイシン及びピューロマイシンに耐性のSTO線維芽細胞)の存在下で培養する。得られた融合細胞系の細胞はトランスジーン(即ち、抗HIVリボザイム遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子及びβ-ガラクトシダーゼ遺伝子)を担持するメガ染色体を含む。この細胞を次にマウス線維芽細胞に移植し、次いで代理母となる雌マウスに移植して发育させ、トランスジェニックマウスを得る。

30

40

この方法によって作製されたマウスはキメラである。トランスジーンの発現はマウスのいくつかの領域、例えば、頭部に限定され、従って全部の細胞で発現されることはない。

3. トランスジーン発現用トランスジェニックマウスの分析

上述のように作製したトランスジェニックマウスが3-4週齢に成長したときに、发育場所である胚(または受精卵)に導入されたトランスジーンの安定な発現を分析する。以下のような複数の方法でトランスジェニックマウスを分析し得る。

a. トランスジェニックマウスから得られた細胞の分析

トランスジェニックマウスから細胞サンプル(例えば、脾臓、肝臓及び腎臓の細胞、リンパ球、尾細胞)を採取する。どの細胞を用いてトランスジーン発現を試験してもよい。しかしながら、メガ染色体含有細胞を受精卵にマイクロインジェクションするかまたは胚幹

50

細胞と融合させることによって作製したキメラマウスの場合、トランスジーンを担持する領域のマウス細胞だけがトランスジーンを発現すると予想される。細胞がヒグロマイシン（細胞が2つの抗生物質耐性遺伝子の導入によって作製されたマウスに由来する場合にはヒグロマイシンとピューロマイシンまたはネオマイシン）上で増殖を維持する場合、この増殖維持は、これらの細胞がトランスジーンを安定に発現しているという指標となる。標準方法に従って細胞から単離したRNAをノーザンブロット手順によって分析し、細胞が、抗生物質耐性遺伝子に基づく核酸プローブにハイブリダイズする転写物を発現するか否かを判断し得る。更に、トランスジェニックマウスから得られた細胞によるβ-ガラクトシダーゼ発現の分析は、このマーカー酵素用の標準アッセイ（例えば、β-ガラクトシダーゼ及びX-gal基質が関与する反応の産物の直接染色、例えば、Jones（1986）EMBO 5:3133-3142、またはβ-ガラクトシダーゼ活性の測定、例えばMiller（1972）Experiments in Molecular Genetics pp. 352-355, Cold Spring Harbor Press参照）を用いて行うとよい。特に、胚に導入されたトランスジーンがβ-ガラクトシダーゼ遺伝子だけであるような対照トランスジェニックマウスから得られた細胞中のトランスジーン発現を評価するときは、β-ガラクトシダーゼ発現の分析を使用する。

トランスジェニックマウスから得られた細胞中の抗HIVリボザイム遺伝子の安定な発現は複数の方法で評価できる。第一の方法では、標準手順に従って細胞から単離したDNAを、リボザイム遺伝子配列に対応するプライマーを用いて核酸増幅する。遺伝子が細胞に含まれているとき、反応混合物とリボザイム遺伝子配列に基づく核酸プローブとのハイブリダイゼーションによって所定のサイズの増幅産物が検出される。更に、このような核酸プローブに対するハイブリダイゼーションについて、細胞から単離したDNAをサザンブロット法を用いて分析してもよい。第二の方法では、細胞がリボザイム遺伝子に基づく核酸プローブにハイブリダイズするRNAを発現するか否かを判断するために、細胞から単離したRNAをノーザンブロットハイブリダイゼーションで処理し得る。第三の方法では、例えば、Changら（1990）Clin. Biotech. 2:23-31に記載されているように、細胞中の抗HIVリボザイム活性の存在を分析し得る。この分析では、細胞から単離したRNAを、放射性標識したHIV gagターゲットRNAと混合する。このターゲットRNAは、Changら（1990）Clin. Biotech. 2:23-31に記載のようなgagターゲットのin vitro開裂に有利な反応条件下でgag遺伝子鋳型のin vitro転写によって得られる。反応の停止後、完全鋳型よりもサイズの小さい開裂産物が検出されるか否かを判断するために混合物をゲル電気泳動によって分析する。このような開裂フラグメントの存在は安定に発現されたリボザイムの存在の指標となる。

b. 完全トランスジェニックマウスの分析

抗HIVリボザイム遺伝子（並びに選択及びマーカー遺伝子）を胚または受精卵に導入することによって作製した完全トランスジェニックマウスにおけるトランスジーンが発現は、マウスをHIV感染で攻撃することによって分析し得る。高生産性HIV感染U937細胞（例えば、Locardiら（1992）J. Virol. 66:1649-1654参照）の腹膜組織内注入によってマウスをHIV感染させることが可能である。感染の成否は、HIV感染ヒト細胞を注入したトランスジェニックマウスから得られた末梢血単核細胞のような細胞から単離したDNAの分析によって確認し得る。例えば、HIV特異的プライマーを用いる核酸増幅によって証明されるように、感染トランスジェニックマウス細胞のDNAはHIV特異的gag及びenv配列を含むであろう。細胞が抗HIVリボザイムも安定に発現させているならば、細胞のRNA抽出物を分析したときに、リボザイムによるgag転写物の開裂によって生じた短縮gagフラグメントが検出されるであろう。

更に、抗HIVリボザイム遺伝子を担持するトランスジェニックマウスを、ヒトCD4（即ち、HIVの細胞性レセプター）（ヒトCD4を発現するトランスジェニックマウスの記述に関してはGillespieら（1993）Mol. Cell. Biol. 13:

10

20

30

40

50

2952-2958; Hannaら(1994) Mol. Cell. Biol. 14:1084-1094; 及びYeungら(1994) J. Exp. Med. 180:1911-1920参照)を発現するトランスジェニックマウスと交配し得る。CD4及び抗HIVリボザイムの双方のトランスジーンを発現するこれらの交配トランスジェニックマウスの子孫は、(抗HIVリボザイムを発現することなく)CD4を単独に発現するマウスよりも(細胞中の活性HIVレベルが低下した結果)感染に対して耐性であるに違いない。

4. 人工染色体を用いるトランスジェニックニワトリの発育

トランスジェニックニワトリの発育は、商業的に重要な農畜産品種である家禽を病気耐性遺伝子及び治療用タンパク質をコードする遺伝子によって改良するなどの多くの用途を有している。この分野では、トランスジェニックニワトリの作製を目指す研究が、ランダム導入によってレシピエント細胞に遺伝子を導入する従来の方法でニワトリ細胞にトランスジーンを安定に発現させることが難しいという問題に直面していた。人工染色体は、宿主細胞中でトランスジーンを安定に維持させるので、トランスジェニックニワトリの発育に特に有用である。

a. レシピエントニワトリ細胞にトランスジーンを導入するための人工染色体の調製

(i) 哺乳類人工染色体

本文中に記載のSATAC及びミニクロモソームのような哺乳類人工染色体は、検出可能なリポーター遺伝子及び/またはトランスジェニックニワトリの発育に使用される有益なトランスジーンを取込むように修飾され得る。あるいは、本文中に記載の方法を使用してニワトリ特異的人工染色体を構築し得る。より特定的には、本文中に記載のMACの作製方法を用いてニワトリ人工染色体(CAC)を調製し得る。また、上述のように、本発明によって提供されるMACにニワトリライブラリーを導入し、得られたMACをニワトリ細胞に導入し、ニワトリ細胞中で機能性のMACを選択し得る。

実施例4及び7並びに本文の他の箇所で記載したように、人工染色体を含むマウスLMTK-由来の細胞系またはミニクロモソームを含む細胞系とそのハイブリッドに、選択されたDNAをトランスフェクトし、DNA内部に含まれているヘテロログス遺伝子を機能的に発現させる外来DNAを組み込んだMAC(またはCAC)を作製し得る。

ニワトリ細胞中で発現させるべきトランスジーンを含むMACまたはCACを作製するために、MAC含有細胞系に、λDNAとニワトリ細胞中の遺伝子発現を駆動し得るプロモーターに作動可能に連結された有益なトランスジーンとを含むDNAをトランスフェクトし得る。あるいは、上述のように作製したミニクロモソームまたはMAC(またはCAC)を単離し、細胞に導入し、次いで選択されたDNAのターゲット化組み込みを行うとよい。ターゲット化組み込み用のベクターは本発明によって提供されるかまたは本文中に記載の手順で構築され得る。

有益なプロモーターは、ニワトリ細胞中の遺伝子発現を促進するために当業界で公知の構成性、誘発性の組織(または細胞)特異的プロモーターである。例えば、ニワトリ胞胚葉性細胞及び初代ニワトリ線維芽細胞中のlacZ遺伝子の発現が、マウス熱ショックタンパク質68(hsp68)プロモーター(phspPTlacZpA; Brazolotら(1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、Zn²⁺誘発性ニワトリメタロチオネイン(cMt)プロモーター(pCBcMtlacZ; Brazolotら(1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、タンデム配置のラウス肉腫ウイルス及びニワトリβ-アクチンプロモーター(pmiwZ; Brazolotら(1991) Mol. Reprod. Devel. 30:304-312参照)、構成性サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを用いて証明された。本発明に特に有益なプロモーターは、卵白アルブミン及びリゾチームのような卵中で発現される遺伝子に由来の卵特異的プロモーターである。

プロモーターの選択は、種々の要因、例えば、トランスジーン産物をトランスジェニックニワトリの全身で発現させるべきかまたは卵のような特定場所に限定するべきかなどの要因に左右される。ニワトリ体内で機能性の細胞特異的プロモーターとしては、卵白アルブ

10

20

30

40

50

ミンタンパク質をコードする遺伝子のステロイド応答性プロモーター (Gaubら (1987) EMBO J. 6:2313-2320; Toraら (1988) EMBO J. 7:3771-3778; Parkら (1995) Biochem. Mol. Biol. Int. (Australia) 36:811-816) がある。

(ii) ニワトリ人工染色体

更に、ニワトリ人工染色体を本文中に記載の方法を用いて作製し得る。例えば、初代ニワトリ線維芽細胞 (例えば、Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Dev. 30:304-312) のようなニワトリ細胞に、選択可能マーカー (例えば、抗生物質耐性を与えるタンパク質) をコードし且つ導入DNAを内在性ニワトリ染色体の動原体周囲領域にターゲットするDNA (例えばニワトリサテライトDNA) を含むDNAをトランスフェクトするとよい。次に、選択培地で増殖を維持するトランスフェクタントを本文中に記載の方法を用いて分析し、ミニクロモソーム及び特にSATACのような人工染色体の有無を判定する。次に、人工染色体含有トランスフェクタント細胞に、有益なトランスジーン (適当なプロモーターに融合) をコードするDNAを、外来DNAをニワトリ人工染色体にターゲットするDNAと共にトランスフェクトする。

10

b. 有益なトランスジーンを担持する人工染色体のレシピエントニワトリ細胞内導入

染色体をレシピエント細胞に導入するために、有益な (1つまたは複数の) トランスジーンを担持している人工染色体を含む細胞系 (即ち、ドナー細胞) をレシピエントニワトリ細胞に融合し得る。あるいは、例えば本文中に記載の方法 (例えば実施例10参照) を用いて人工染色体をドナー細胞から単離し、レシピエント細胞に直接導入してもよい。

20

代表的なニワトリレシピエント細胞系の非限定例は、X期胞胚葉細胞 (例えば、Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Dev. 30:304-312; Etchesら (1993) Poultry Sci. 72:882-889; Pettitteら (1990) Development 108:185-189参照) 及びニワトリ受精卵 (例えば、Loveら (1994) Biotechnology 12:60-63参照) である。

例えば、マイクロセル融合は、人工染色体を鳥類細胞に導入するための1つの方法である (マイクロセルをDT40ニワトリプレB細胞と融合させる方法に関しては例えば、Diekenら (1996) Nature Genet. 12:174-182参照)。この方法では、人工染色体含有細胞系からマイクロセルを調製し (例えば、実施例1. A. 5に記載の手順を用いる)、ニワトリレシピエント細胞に融合させる。

30

単離した人工染色体を、リポフェクション手順 (例えば、Brazolotら (1991) Mol. Reprod. Dev. 30:304-312参照) のような脂質伸介キャリア系を介してニワトリレシピエント細胞系に直接導入してもよく、または直接マイクロインジェクションを使用してもよい。人工染色体をニワトリ受精卵に導入する場合には概してマイクロインジェクションが好ましい (例えば、Loveら (1994) Biotechnology 12:60-63参照)。

c. トランスジェニックニワトリの発育

レシピエント細胞として (人工染色体を受容した) X期胞胚葉細胞を同じ発生期の胚に注入することによってトランスジェニックニワトリを発育させ得る (例えば、Etchesら (1993) Poultry Sci. 72:882-889; Pettitteら (1990) Development 108:185-189; Carsienceら (1993) Development 117:669-675参照)。卵殻内のレシピエントニワトリ胚を明りに透かして良否を判定して孵化させ、いずれかの細胞が (1つまたは複数の) トランスジーンを発現している生殖系キメラニワトリを産生させる。

40

あるいは、例えば直接マイクロインジェクションによって (例えば、Loveら (1994) Biotechnology 12:60-63参照)、人工染色体をニワトリ受精卵に直接導入してもよい。この場合、人工染色体はニワトリの細胞の少なくとも一部分に取込まれる。卵特異的プロモーターのような組織特異的プロモーターを組込むことによって、作動可能に連結されたヘテロログスDNAの適正な発現が確保される。

50

また、本発明で提供される方法によって有益なDNAをミニクロモソームに導入してもよい。ミニクロモソームは本発明によって提供されるものでもよく、または本文中に記載の方法を用いてニワトリ細胞中で作製したものでもよい。ヘテロログスDNAは、本発明で提供されるかまたは本発明の方法によって構築されたターゲティングベクターを用いて導入される。

いくつかの変形は当業者に自明であると考えられるので、本発明の範囲は請求の範囲の記載のみに限定されることを理解されたい。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1293

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

GAATTCATCA	TTTTTCANGT	CCTCAAGTGG	ATGTTTCTCA	TTTNCCATGA	TTTTAAGTTT	60
TCTCGCCATA	TTCTTGGTCC	TACAGTGTGC	ATTTCTCCAT	TTTNCACGTT	TTNCAGTGAT	120
TTCTGTCATTT	TCAAGTCCTC	AAGTGGATGT	TTCTCATTTN	CCATGAATTT	CAGTTTTCTN	180
GCCATATTTT	ACGTCCTACA	GNGGACATTT	CTAAATTTNC	CACCTTTTTT	AGTTTTCTCT	240
GCCATATTTT	ACGTCCTAAA	ATGTGTATTT	CTCGTTTNCC	GTGATTTTCA	GTTTTCTCGC	300
CAGATTCCAG	GTCTCTATAAT	GTGCATTTCT	CATTTNNCAC	GTTTTTCAGT	GATTTCTGCA	360
TTTTTTCAAG	TCGGCAAGTG	GATGTTTCTC	ATTTNCCATG	ATTTNCAGTT	TTCTTGNAAT	420
ATTCATGTCT	CTACAATGAT	CATTTTTAAT	TTTCCACCTT	TTCATTTTTT	CACGCCATAT	480
TTTATGTCTT	AAAGTGTATA	TTTCTCCTTT	TCCGCGATTT	TCAGTTTTCT	CGCCATATTC	540
CAGGTCCTAC	AGTGTGCATT	CCTCATTTTT	CACCTTTTTT	ACTGATTTCT	TCATTTTTCA	600
AGTCGTCAAC	TGGATCTTTC	TAATTTTCCA	TGATTTTTCAG	TTATCTTGTC	ATATTCCATG	660
TCCTACAGTG	GACATTTCTA	AATTTTCCAA	CTTTTTCAT	TTTTCTCGAC	ATATTGACG	720
TGCTAAAGTG	TGTATTTCTT	ATTTTCCGTG	ATTTTCAGTT	TTCTCGCCAT	ATTCCAGGTC	780
CTAATAGTGT	GCATTTCTCA	TTTTTCACGT	TTTTTCAGTG	TTTCGTCAAT	TTTTCCAGTT	840
GTCAGGGGGA	TGTTTCTCAT	TTTCCATGAG	TGTCAGTTTT	CTTGCTATAT	TCCATGTCTT	900
ACAGTGACAT	TTCTAAATAT	TATACCTTTT	TCAGTTTTTC	TCACCATATT	TCACGTCTTA	960
AAGTATATAT	TTCTCATTTT	CCCTGATTTT	CAGTTTCTCT	GCCATATTCC	AGGTCCTACA	1020
GTGTGCATTT	CTCATTTTTT	ACGTTTTTCA	GTAATTTCTT	CATTTTTTAA	GCCCTCAAAT	1080
GGATGTTTCT	CATTTTCCAT	GATTTTCAGT	TTTCTTGCCA	TATACCATGT	CCTACAGTGG	1140
ACATTTCTAA	ATTATCCACC	TTTTTCAGTT	TTTCATCGGC	ACATTTACAG	TCCTAAAGTG	1200
TGTATTTCTA	ATTTTCAGTG	ATTTTCAGTT	TTCTCGCCAT	ATTCCAGGAC	CTACAGTGTG	1260
CATTTCTCAT	TTTTCACGTT	TTTCAGTGAA	TTC			1293

配列番号：2

配列の長さ：1044

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

AGGCCTATGG	TGAAAAAGGA	AATATCTTCC	CCTGAAAAC	AGACAGAAAG	ATTCTCAGAA	60
TCTTATTTGT	GATGTGCGCC	CCTCAACTAA	CAGTGTTGAA	GCTTTCTTTT	GATAGAGCAG	120
TTTTGAAACA	CTCTTTTGT	AAAATCTGCA	AGAGGATATT	TGGATAGCTT	TGAGGATTTT	180
CGTTGGAAAC	GGGATTGTCT	TCATATAAAC	CCTAGACAGA	AGCATTCTCA	GAAGCTTCAT	240
TGGGATGTTT	CAGTTGAAGT	CACAGTGTTG	AACAGTCCCC	TTTCATAGAG	CAGGTTTGAA	300
ACACTCTTTT	TTGTAGTATC	TGGAAGTGGA	CATTTGGAGC	GATCTCAGGA	CTGCGGTGAA	360
AAAGGAAATA	TCTTCCAATA	AAAGCTAGAT	AGAGGCAATG	TCAGAAACCT	TTTTCATGAT	420
GTATCTACTC	AGCTAACAGA	GTTGAACCTT	CCTTTGAGAG	AGCAGTTTGT	AAACACTCTT	480
TTTGTGGAAT	CTGCAAGTGG	ATATTTGTCT	AGCTTTGAGG	ATTTCTGTTG	GAAACGGGAT	540
TACATATAAA	AAGCAGACAG	CAGCATTCCC	AGAAACTTCT	TTGTGATGTT	TGCATTCAAG	600
TCACAGAGTT	GAACATTCCC	TTTCATAGAG	CAGGTTTGAA	ACACACTTTT	TGATGTATCT	660
GGATGTGGAC	ATTTGCAGCG	CTTTCAGGCC	TAAGGTGAAA	AGGAAATATC	TTCCCCTGAA	720
AACTAGACAG	AAGCATTCTC	AGAAACTTAT	TTGTGATGTG	CGCCCTCAAC	TAACAGTGTT	780
GAAGCTTTCT	TTTGATAGAG	GCAGTTTGA	AACACTCTTT	TGTGGAATCT	GCAAGTGGAT	840
ATTTGTCTAG	CTTTGAGGAT	TTCTTTGGAA	ACGGGATTAC	ATATAAAAAG	CAGACAGCAG	900
CATTCCCAGA	ATCTTGTTTG	TGATGTTTGC	ATTCAAGTCA	CAGAGTTGAA	CATTCCCTTT	960
CAGAGAGCAG	GTTTGAACAC	TCTTTTATA	GTATCTGGAT	GTGGACATTT	GGAGCGCTTT	1020
CAGGGGGGAT	CCTCTAGAAT	TCCT				1044

配列番号：3

配列の長さ：2492

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

10

20

CTGCAGCTGG	GGGTCTCCAA	TCAGGCAGGG	GCCCCTTACT	ACTCAGATGG	GGTGGCCGAG	60
TAGGGGAAGG	GGGTGCAGGC	TGCATGAGTG	GACACAGCTG	TAGGACTACC	TGGGGGCTGT	120
GGATCTATGG	GGGTGGGGAG	AAGCCCACTG	ACAGTGCCTA	GAAGAGACAA	GGTGGCCTGA	180
GAGGGTCTGA	GGAACATAGA	GCTGGCCATG	TTGGGGCCAG	GTCTCAAGCA	GGAAGTGAGG	240
AATGGGACAG	GCTTGAGGAT	ACTCTACTCA	GTAGCCAGGA	TAGCAAGGAG	GGCTTGGGGT	300
TGCTATCCTG	GGGTTCAACC	CCCCAGGTTG	AAGGCCCTGG	GGGAGATGGT	CCCAGGACAT	360
ATTACAATGG	ACACAGGAGG	TTGGGACACC	TGGAGTCACC	AAACAAAACC	ATGCCAAGAG	420
AGACCATGAG	TAGGGGTGTC	CAGTCCAGCC	CTCTGACTGA	GCTGCATTGT	TCAAAATCCAA	480
AGGGCCCCCTG	CTGCCACCTA	GTGGCTGATG	GCATCCACAT	GACCCTGGGC	CACACGCGTT	540
TAGGGTCTCT	GTGAAGACCA	AGATCCTTGT	TACATTGAAC	GACTCCTAAA	TGAGCAGAGA	600
TTTCCACCTA	TTCGAAACAA	TCACATAAAA	TCCATCCTGG	AAAAAGCCTG	GGGGATGGCA	660
CTAAGGCTAG	GGATAGGGTG	GGATGAAGAT	TATAGTTACA	GTAAGGGGTT	TAGGGTTAGG	720
GATCAACGTT	GGTTAGGAGT	TAGGGATACA	GTAGGGTACC	GGTAGGGTTA	GGGGTTAGGG	780
TTAGGGGTTA	GGGTTAGGGT	TAGGGTTAGG	GTTAGGGTTA	GGGGTTAGGG	GTTAGGGTTA	840
GGGTTAGGTT	TTGGGGTGGC	GTATTTTGGT	CTTATACGCT	GTGTTCCACT	GGCAATGAAA	900
AGAGTTCTTG	TTTTTCCTTC	AGCAATTTGT	CATTTTAA	AGAGTTTAGC	AATTCTAACA	960
GATATAGACC	AGCTGTGCTA	TCTCATTGTG	GTTTTCAATT	GTAACCACAT	TGTGGTTTCA	1020
ATGTGTTTAC	TTGCCATCTG	TAGATCTTCT	TTGCGTGAGG	TGTCTGTTCA	GATGTGTGTG	1080
CATTTCTTGN	NTTNGGCTG	TTTAACTTAT	TGTTTGTGTT	TAATAATTTT	TTATATATTT	1140
GAAGACAAAT	CTTCTCAGA	TGTGTATTTG	CAAAATATTC	TTCAATATGA	GGCTTGCTTT	1200
TGCTCTTAAC	AAGGTCTCTT	CAGAGATAAC	TTAAATATAA	GAAATCCACA	CTGTCAC TTC	1260
TTTTGTGTAT	ATCTACTTTT	TGTGTCAATT	GTTAAAATTG	ATTACCAAAC	CCAAAGGCAG	1320
ATAGCTTTTC	TTCTATTGTT	TCTTCTAGAA	ATTTGTATAG	TTTTGCAATT	TTTGTGTAAG	1380
GATGATTTTG	AGTGATTATT	TGTGTAAGTT	GTAAAGTTTT	CGTCTATATC	CATATCATTT	1440
CTTATGGTTT	CCAATTAATC	GTTCCCTCAC	TATTTTGGG	AAAGACACAG	GATAGTGGGC	1500
TTTGTTAGAG	TAGATAGGTA	GCTAGACATG	AACAGGAGGG	GGCCTCCTGG	AAAAGGGAAA	1560
GTCTGGGAAG	GCTCACCTGG	AGGACCACCA	AAAATTCACA	TATTAGTAGC	ATCTCTAGTG	1620
CTGGAGTGGA	TGGGCACCTG	TCAATTGTGG	GTAGGAGGGA	AAAGAGGTCC	TATGCAGAAA	1680
GAAACTCCCT	AGAACTCCTC	TGAAGATGCC	CCAATCATTC	ACTCTGCAAT	AAAAATGTCA	1740
GAATATTGCT	AGCTACATGC	TGATAAGGNN	AAAGGGGACA	TTCTTAAGTG	AAACCTGGCA	1800
CCATAAGTAC	AGATTAGGGC	AGAGAAGGAC	ATTCAAAAGA	GGCAGGCGCA	GTAGGTACAA	1860
ACGTGATCGC	TGTCAGTGTG	CCTGGGATGG	CGGGAAGGAG	GCTGGTGCCA	GAGTGGATTTC	1920
GTATTGATCA	CCACACATAT	ACCTCAACCA	ACAGTGAGGA	GGTCCCACAA	GCCTAAGTGG	1980
GGCAAGTTGG	GGAGCTAAGG	CAGTAGCAGG	AAAACCAGAC	AAAGAAAACA	GGTGGAGACT	2040
TGAGACAGAG	GCAGGAATGT	GAAGAAATCC	AAAATAAAAT	TCCCTGCACA	GGACTCTTAG	2100
GCTGTTTTAAT	GCATCGCTCA	GTCCCCTCC	TCCCTATTTT	TCTACAATAA	ACTCTTTACA	2160
CTGTGTTTCT	TTTCAATGAA	GTTATCTGCC	ATCTTTGTAT	TGCCTCTTGG	TGAAAATGTT	2220
TCTTCCAAGT	TAAACAAGAA	CTGGGACATC	AGCTCTCCCC	AGTAATAGCT	CCGTTTTCAGT	2280
TTGAATTTAC	AGAACTGATG	GGCTTAATAA	CTGGCGCTCT	GACTTTAGTG	GTGCAGGAGG	2340
CCGTACACACC	GGGACCAAGA	GTGCCCTGCC	TAGTCCCCAT	CTGCCCCGAG	GTGGCGGCTG	2400
CCTCGACACT	GACAGCAATA	GGGTCCGGCA	GTGTCCCCAG	CTGCCAGCAG	GGGGCGTACG	2460
ACGACTACAC	TGTGAGCAAG	AGGGCCCTGC	AG			2492

配列番号：4

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

GGGGAATTCA TTGGGATGTT TCAGTTGA

28

配列番号：5

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

30

40

50

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

CGAAAGTCCC CCCTAGGAGA TCTTAAGGA

29

配列番号：6

配列の長さ：47

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10

トポロジー：直鎖状

配列の種類：RNA

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

CCGCTTAATA CTCTGATGAG TCCGTGAGGA CGAAACGCTC TCGCACC 47

20

配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

30

配列の特徴：

配列：

CGATTTAAAT TAATTAAGCC CGGGC 25

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

40

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

TAAATTTAAT TAATTCGGGC CCGTCCA 27

配列番号：9

配列の長さ：69

50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c D N A

他の情報：I L - 2 シグナル配列

配列：

ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA CTA AGT CTT GCA CTT 48

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT

69

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr

10

配列番号：1 0

配列の長さ：9 4 5

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

起源：

配列の特徴：

特徴を表す記号：コーディング配列

存在位置：1 . . . 9 4 2

20

他の情報：R e n i l l a R e i n f o r m i s ルシフェラーゼ

公開情報：米国特許第 5 , 4 1 8 , 1 5 5 号

配列：

AGC TTA AAG ATG ACT TCG AAA GTT TAT GAT CCA GAA CAA AGG AAA CGG Ser Leu Lys Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg 1 5 10 15	48	
ATG ATA ACT GGT CCG CAG TGG TGG GCC AGA TGT AAA CAA ATG AAT GTT Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val 20 25 30	96	
CTT GAT TCA TTT ATT AAT TAT TAT GAT TCA GAA AAA CAT GCA GAA AAT Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn 35 40 45	144	
GCT GTT ATT TTT TTA CAT GGT AAC GCG GCC TCT TCT TAT TTA TGG CGA Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg 50 55 60	192	10
CAT GTT GTG CCA CAT ATT GAG CCA GTA GCG CGG TGT ATT ATA CCA GAT His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp 65 70 75 80	240	
CTT ATT GGT ATG GGC AAA TCA GGC AAA TCT GGT AAT GGT TCT TAT AGG Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg 85 90 95	288	
TTA CTT GAT CAT TAC AAA TAT CTT ACT GCA TGG TTG AAC TTC TTA ATT Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Leu Asn Phe Leu Ile 100 105 110	336	
TAC CAA AGA AGA TCA TTT TTT GTC GGC CAT GAT TGG GGT GCT TGT TTG Tyr Gln Arg Arg Ser Phe Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu 115 120 125	384	20
GCA TTT CAT TAT AGC TAT GAG CAT CAA GAT AAG ATC AAA GCA ATA GTT Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val 130 135 140	432	
CAC GCT GAA AGT GTA GTA GAT GTG ATT GAA TCA TGG GAT GAA TGG CCT His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro 145 150 155 160	480	
GAT ATT GAA GAA GAT ATT GCG TTG ATC AAA TCT GAA GAA GGA GAA AAA Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys 165 170 175	528	30
ATG GTT TTG GAG AAT AAC TTC TTC GTG GAA ACC ATG TTG CCA TCA AAA Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys 180 185 190	576	
ATC ATG AGA AAG TTA GAA CCA GAA GAA TTT GCA GCA TAT CTT GAA CCA Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro 195 200 205	624	

TTC AAA GAG AAA GGT GAA GTT CGT CGT CCA ACA TTA TCA TGG CCT CGT	672
Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg	
210 215 220	
GAA ATC CCG TTA GTA AAA GGT GGT AAA CCT GAC GTT GTA CAA ATT GTT	720
Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val	
225 230 235 240	
AGG AAT TAT AAT GCT TAT CTA CGT GCA AGT GAT GAT TTA CCA AAA ATG	768
Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met	
245 250 255	
TTT ATT GAA TCG GAT CCA GGA TTC TTT TCC AAT GCT ATT GTT GAA GGC	816
Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly	
260 265 270	
GCC AAG AAG TTT CCT AAT ACT GAA TTT GTC AAA GTA AAA GGT CTT CAT	864
Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His	
275 280 285	
TTT TCG CAA GAA GAT GCA CCT GAT GAA ATG GGA AAA TAT ATC AAA TCG	912
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser	
290 295 300	
TTC GTT GAG CGA GTT CTC AAA AAT GAA CAA TAA	945
Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln	
305 310	

配列番号：1 1

配列の長さ：3 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c DNA

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

TTTGAATTCA TGTACAGGAT GCAACTCCTG

30

配列番号：1 2

配列の長さ：3 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c DNA

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列の特徴：

配列：

TTTGAATTCA GTAGGTGCAC TGTTTGTAC

30

配列番号：1 3

配列の長さ：1 4 3 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10

20

30

40

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	AGAGCAGCGT	TGGGGGATAA	60
TGTCGACATT	TCCACTCCCA	ATGACGGTGA	TGTATAATGC	TCAAGTATTC	TCCTGCTTTT	120
TTACCACTAA	CTAGGAACCTG	GGTTTGGCCT	TAATTCAGAC	AGCCTTGGCT	CTGTCTGGAC	180
AGGTCCAGAC	GACTGACACC	ATTAACACTT	TGTCAGCCTC	AGTGACTACA	GTCATAGATG	240
AACAGGCCTC	AGCTAATGTC	AAGATACAGA	GAGGTCTCAT	GCTGGTTAAT	CAACTCATAG	300
ATCTTGTCCA	GATACAACCTA	GATGTATTAT	GACAAATAAC	TCAGCAGGGA	TGTGAACAAA	360
AGTTTCCGGG	ATTGTGTGTT	ATTTCCATTC	AGTATGTTAA	ATTTACTAGG	ACAGCTAATT	420
TGCAAAAAG	TCTTTTTCAG	TATATGTTAC	AGAATTGGAT	GGCTGAATTT	GAACAGATCC	480
TTCGGGAATT	GAGACTTCAG	GTCAACTCCA	CGCGCTTGGA	CCTGTCGCTG	ACCAAAGGAT	540
TACCCAATTG	GATCTCCTCA	GCATTTTCTT	TCTTTAAAAA	ATGGGTGGGA	TTAATATTAT	600
TTGGAGATAC	ACTTTGCTGT	GGATTAGTGT	TGCTTCTTTG	ATTGGTCTGT	AAGCTTAAGG	660
CCCAAACCTAG	GAGAGACAAG	GTGGTTATTG	CCCAGGCGCT	TGCAGGACTA	GAACATGGAG	720
CTTCCCCTGA	TATATGGTTA	TCTATGCTTA	GGCAATAGGT	CGCTGGCCAC	TCAGCTCTTA	780
TATCCCACGA	GGCTAGTCTC	ATTGTACGGG	ATAGAGTGAG	TGTGCTTCAG	CAGCCCGAGA	840
GAGTTGCAAG	GCTAAGCACT	GCAATGGAAA	GGCTCTGCGG	CATATATGTG	CCTATTCTAG	900
GGGGACATGT	CATCTTTCAT	GAAGGTTTCT	TGTCCTAGTT	CCCTTCCCCC	AGGCAAAAACG	960
ACACGGGAGC	AGGTCAGGGT	TGCTCTGGGT	AAAAGCCTGT	GAGCCTGGGA	GCTAATCCTG	1020
TACATGGCTC	CTTTACCTAC	ACACTGGGGA	TTTGACCTCT	ATCTCCACTC	TCATTAATAT	1080
GGGTGGCCTA	TTTGCTCTTA	TTAAAAGGAA	AGGGGGAGAT	GTTGGGAGCC	GC3CCCACAT	1140
TCGCCGTTAC	AAGATGGCGC	TGACAGCTGT	GTTCTAAGTG	GTAAACAAAT	AATCTGCGCA	1200
TGTGCCGAGG	GTGGTTCTTC	ACTCCATGTG	CTCTGCCTTC	CCCGTGACGT	CAACTCGGCC	1260
GATGGGCTGC	AGCCAATCAG	GGAGTGACAC	GTCTAGGCG	AAGGAGAATT	CTCCTTAATA	1320
GGGACGGGGT	TTCGTTCTCT	CTCTCTCTCT	TGCTTCTCTC	TCTTGCTTTT	TCGCTCTCTT	1380
GCTTCCCGTA	AAGTGATAAT	GATTATCATC	TACATATCAC	AACGTGCGTG	GAGG	1434

配列番号：14

配列の長さ：1400

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

10

20

30

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	AGAGCAGCGT	TGGGGGATAA	60
TGTCGACATT	TCCACTCCCA	ATGACGGTGA	TGTATAATGC	TCAAGTATTC	TCCTGCTTTT	120
TTACCACTAA	CTAGGAAGTG	GGTTTGCCCT	TAATTCAGAC	AGCCTTGCGT	CTGTCTGGAC	180
AGGTCCAGAT	ACAAC TAGAT	GTATTATGAC	AAATAACTCA	GCAGGGATGT	GAACAAAAGT	240
TTCCGGGATT	GCGTGTTATT	TCCATCCAGT	ATGTTAAATT	TACTAGGGCA	GCTAATTTGT	300
CAAAAAGTCT	TTTCCAGTAT	ATGTTACAGA	ATTGGATGGC	TGAATTTGAA	CAGATCCTTC	360
GGGAATTGAG	ACTTCAGGTC	AACTCCACGC	GCTTGGACCT	GTCCCTGACC	AAAGGATTAC	420
CCAATTGGAT	CTCCTCAGCA	TTTTCTTTCT	TTAAAAAATG	GGTGGGATTA	ATATTATTTG	480
GAGATACACT	TTGCTGTGGA	TTAGTGTTGC	TTCTTTGATT	GGTCTGTAAG	CTTAAGGCCC	540
AAACTAGGAG	AGACAAGGTG	GTTATTGCC	AGGCGCTTGC	AGGACTAGAA	CATGGAGCTT	600
CCCCTGATAT	ATCTATGCTT	AGGCAATAGG	TCGCTGGCCA	CTCAGCTCTT	ATATCCCATG	660
AGGCTAGTCT	CATTGCACGG	GATAGAGTGA	GTGTGCTTCA	GCAGCCCGAG	AGAGTTGCAC	720
GGCTAAGCAC	TGCAATGGAA	AGGCTCTGCG	GCATATATGA	GCCTATTCTA	GGGAGACATG	780
TCATCTTTCA	AGAAGGTTGA	GTGTCCAAGT	GTCCTTCCTC	CAGGCAAAAC	GACACGGGAG	840
CAGGTCAGGG	TTGCTCTGGG	TAAAAGCCTG	TGAGCCTAAG	AGCTAATCCT	GTACATGGCT	900
CCTTTACCTA	CACACTGGGG	ATTTGACCTC	TATCTCCACT	CTCATTAATA	TGGGTGGCCT	960
ATTTGCTCTT	ATTAAAAGGA	AAGGGGGAGA	TGTTGGGAGC	CGCGCCCA	TTCGCCGTTA	1020
CAAGATGGCG	CTGACAGCTG	TGTTCTAAGT	GGTAAACAAA	TAATCTGCGC	ATGCGCCGAG	1080
GGTGGTTCTT	CACTCCATGT	GCTCTGCCTT	CCCCGTGACG	TCAACTCGGC	CGATGGGCTG	1140
CAGTCAATCA	GGGAGTGACA	CGTCCTAGGC	GAAGGAAAAT	TCTCCTTAAT	AGGGACGGGG	1200
TTTCGTTTTT	TCTCTCTCTT	GCTTCGCTCT	CTCTTGCTTC	TTGCTCTCTT	TTCTGAAGA	1260
TGTAAGAATA	AAGCTTTGCC	GCAGAAGATT	CTGGTCTGTG	GTGTTCTTCC	TGGCCGGTCG	1320
TGAGAACGCG	TCTAATAACA	ATTGGTGCCG	AAACCCGGGT	GATAATGATT	ATCATCTACA	1380
TATCACAACG	TGCGTGAGG					1400

配列番号：1 5

配列の長さ：1 3 6 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

CCTCCACGCA	CGTTGTGATA	TGTAGATGAT	AATCATTATC	ACTTTACGGG	TCCTTTCACT	60
ACAACTGCCA	CGAGGCCCCG	TGCTCTGGTA	ATAGATCTTT	GCTGAAAAGG	CACACACATG	120
ACACATTACT	CAAGGTGGGC	TCATCTGAGC	TGCAGATTCA	GCTTAATATG	AATCTTGCCA	180
ATTGTGTGAA	ATCATAAATC	TTCAAAGTGA	CACTCATTGC	CAGACACAGG	TGCCCACCTT	240
TGGCATAATA	AACAAACACA	AATTATCTAT	TATATAAAGG	GTGTTAGAAG	ATGCTTTAGA	300
ATACAAATAA	ATCATGGTAG	ATAACAGTAA	GTTGAGAGCT	TAAATTTAAT	AAAGTGATAT	360
ACCTAATAAA	AATTAAATTA	AGAAGGTGTG	AATATACTAC	AGTAGGTAAA	TTATTTTCATT	420
AATTTATTTT	CTTTCTTAAT	CCTTTATAAT	GTTTTCTGCT	ATTGTCAATT	GCACATCCAT	480
ATGTTCAATT	CTTCACTGTA	ATGAAGAAAT	GTAGTAAATA	TACTTTCCGA	ACAAGTTGTA	540
TCAAATATGT	TACACTTGAT	TCCGTGTGTT	ACTTATCATT	TTATTATTAT	ATTGATTGCA	600
TTCTTCTGTT	ACTTGATATT	ATTACAAGGT	ACATATTTAT	TCTCTCAGAT	CTTCATTATA	660
CTCTAACCAT	TTTATAACAT	ACTTTATTTA	TTCAATTTCTT	ATGTGTGCTG	TGAGGCACAA	720
ATGCCAGAGA	GAACCTTGAGC	AGATAAGAGG	ACAAATTGCA	AGAGTCAGTT	ACCTCCTGCT	780
GTTCCCTTGA	AACTCAGGAT	CAAATTCAGG	TTGTCAGGCT	TGGCAGCATG	CACTTTTTCAC	840
CAGTGCCTCC	ATCTTGCTAG	CCCTGAACAT	CAAGCTTTGC	AGACAGACAG	GCTACACTAA	900
GTGAAC TGGT	CATTCACAGC	ATGCATGGTG	ATTTATTGTT	ACTTTCTATT	CCATGCCTTT	960
ACTATTTCTA	CTAGGTGCTA	GCTAGTACTG	TATTTTCGAGA	TAGAAGTTAC	TGAAAGAAAA	1020
TTACATTGTT	TTCTATAGAT	CCTTGATACT	CTTTCAGCAG	ATATAGAGTT	TTAATCAGGT	1080
CCTAGACCTT	TTCTTCACTC	TTATTAAATA	CTAAGTACAA	ATTAAGTTTA	TCCAAAACAG	1140
TACGGATGTT	GATTTTGTGC	AGTTCTACTA	TGATAATAGT	CTAGCTTCAT	AAATCTGACA	1200
CACTTATTGG	GAATGTTTTT	GTTAATAAAA	GATTCAGGTG	TTACTCTAGG	TCAAGAGAAT	1260
ATTAAACATC	AGTCCCAAAT	TACAACTTTC	AATAAAAGAT	TTGACTCTCC	AGTGGTGCGA	1320
ATATAAAGTG	ATAATGATTA	TCATCTACAT	ATCACAACGT	GCGTGAGG		1369

配列番号：1 6

配列の長さ：2 2 1 1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10

20

30

40

50

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GAATTC	CCCT	ATCCCTAATC	CAGATTGGTG	GAATAACTTG	GTATAGATGT	TTGTGCATTA	60
AAAACCCTGT	AGGATCTTCA	CTCTAGGTCA	CTGTTCAGCA	CTGGAACCTG	AATTGTGGCC	120	
CTGAGTGATA	GGTCCTGGGA	CATATGCAGT	TCTGCACAGA	CAGACAGACA	GACAGACAGA	180	
CAGACAGACA	GACAGACGTT	ACAAACAAC	ACGTTGAGCC	GTGTGCCAAC	ACACACACAA	240	
ACACCACTCT	GGCCATAAAT	ATTGAGGACG	TTGATTTATT	ATTCTGTGTT	TGTGAGTCTG	300	
TCTGTCTGTC	TGTCTGTCTG	TCTGTCTGTC	TATCAAACCA	AAAGAAACCA	AACAATTATG	360	
CCTGCCTGCC	TGCCTGCCTG	CCTACACAGA	GAAATGATTT	CTTCAATCAA	TCTAAAACGA	420	
CCTCCTAAGT	TTGCCTTTTT	TCTCTTTCTT	TATCTTTTTT	TTTTTCTTTT	TCTTCTTCCT	480	
TCCTTCCTTC	CTTCCTTCCT	TCCTTCCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTACTTTCT	540	
TTCTTTCTTT	CTTACATTTA	TTCTTTTCAT	ACATAGTTTC	TTAGTGTAAG	CATCCCTGAC	600	
TGTCCTGAAG	ACACTTTGTA	GGCCTCAATC	CTGTAAGAGC	CTTCCTCTGC	TTTTCAAATG	660	
CTGGCATGAA	TGTTGTACCT	CACTATGACC	AGCTTAGTCT	TCAAGTCTGA	GTTACTGGAA	720	
AGGAGTTCCA	AGAAGACTGG	TTATATTTTT	CATTTATTAT	TGCATTTTAA	TTAAAATTTA	780	
ATTTACACAA	AAGAATTTAG	ACTGACCAAT	TCAGAGTCTG	CCGTTTAAAA	GCATAAGGAA	840	
AAAGTAGGAG	AAAAACGTGA	G3CTGTCTGT	GGATGGTCGA	GGCTGCTTTA	GGGAGCCTCG	900	
TCACCACTCT	CACTTTGCA	ACCGGGCCAC	TAGAACCCGG	TGAAGGGAGA	AACCAAAGCG	960	
ACCTGGAAC	AATAGGTCAC	ATGAAGGCCA	GCCACCTCCA	TCTTGTTGTG	CGGGAGTTCA	1020	
GTTAGCAGAC	AAGATGGCTG	CCATGCACAT	GTTGTCTTTC	AGCTTGGTGA	GGTCAAAGTA	1080	
CAACCGAGTC	ACAGAACAAG	GAAGTATACA	CAGTGAGTTC	CAGGTCACTC	AGAGTTTACA	1140	
CAGAGAAACC	ACATCTTGAA	AAAAACAATA	AAATAAATTA	AATAAATATA	ATTTAAAAAT	1200	
TTAAAAATAG	CCGGGAGTGA	TGGCGCATGT	CTTTAATCCC	AGCTCTCTTC	AGGCAGAGAT	1260	
GGGAGGATTT	CTGAGTTTGA	GGCCAGCCTG	GTCTGCAAAG	TGAGTTCCAG	GACAGTCAGG	1320	
GCTATACAGA	GAAACCCTGT	CTTGAAAACT	AAACTAAATT	AAACTAAAA	AACTAAAA	1380	
AATATAAAAT	AAAAATTTTA	AAGAATTTTA	AAAAACTACA	GAAATCAAAC	ATAAGCCCAC	1440	
GAGATGGCAA	GTAAGTCAA	TCATAGCAGA	AATATTATAC	ACACACACAC	ACACAGACTC	1500	
TGTCATAAAA	TCCAATGTGC	CTTCATGATG	ATCAAATTTT	GATAGTCAGT	AATACTAGAA	1560	
GAATCATATG	TCTGAAAATA	AAAGCCAGAA	CCTTTTCTGC	TTTTGTTTTT	TTTTGCCCCA	1620	
AGATAGGGTT	TCTCTCAGTG	TATCCCTGGC	ATCCCTGCCT	GGAACCTTCT	TTGTAGGTTT	1680	
GGTAGCCTCA	AACTCAGAGA	GGTCCTCTCT	GCCTGCCTGC	CTGCCTGCCT	GCCTGCCTGC	1740	
CTGCCTGCCT	GCCTGCCTCA	CTTCTTCTGC	CACCCACACA	ACCGAGTCGA	ACCTAGGATC	1800	
TTTATTTCTT	TCTCTTTCTC	TCTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	1860	
CTTTCTTTCT	TTCTTATTCA	ATTAGTTTTT	AATGTAAGTG	TGTGTTTGTG	CTCTATCTGC	1920	
TGCCTATAGG	CCTGCTTGCC	AGGAGAGGGC	AACAGAACCT	AGGAGAAACC	ACCATGCAGC	1980	
TCCTGAGAAT	AAGTGAAAAA	ACAACAAAAA	AAGGAAATTC	TAATCACATA	GAATGTAGAT	2040	
ATATGCCGAG	GCTGTCAGAG	TGCTTTTTAA	GGCTTAGTGT	AAGTAATGAA	AATTGTTGTG	2100	
TGTCTTTTAT	CCAAACACAG	AAGAGAGGTG	GCTCGGCCTG	CATGTCTGTT	GTCTGCATGT	2160	
AGACCAGGCT	GGCCTTGAAC	ACATTAATCT	GTCTGCCTCT	GCTTCCCTAA	TGCTGCGATT	2220	
AAAGGCATGT	GCCACCACTG	CCCGGACTGA	TTTCTTCTTT	TTTTTTTTTT	TGGAAAAATAC	2280	
CTTTCTTTCT	TTTTCTCTCT	CTCTTTCTTC	CTTCCTTCCT	TTCTTTCTAT	TCTTTTTTTC	2340	
TTTCTTTTTT	CTTTTTTTTT	TTTTTTTTTA	AATTTGCCCTA	AGGTTAAAGG	TGTGCTCCAC	2400	
AATTGCCTCA	GCTCTGCTCT	AATTCTCTTT	AAAAAAAAC	AAACAAAAA	AAAACAAAA	2460	

10

20

30

CAGTATGTAT	GTATGTATAT	TTAGAAGAAA	TACTAATCCA	TTAATAACTC	TTTTTTCCTA	2520
AAATTCATGT	CATTCTTGTT	CCACAAAGTG	AGTTCCAGGA	CTTACCAGAG	AAACCCTGTG	2580
TTCAAATTTT	TGTGTTCAAG	GTCACCCTGG	CTTACAAAGT	GAGTTCCAAG	TCCGATAGGG	2640
CTACACAGAA	AAACCATATC	TCAGAAAAAA	AAAAAGTTCC	AAACACACAC	ACACACACAC	2700
ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACACACAG	CGCGCCGCGG	CGATGAGGGG	2760
AAGTCGTGCC	TAAAATAAAT	ATTTTTCTGG	CCAAAGTGAA	AGCAAATCAC	TATGAAGAGG	2820
TACTCCTAGA	AAAAATAAAT	ACAAACGGGC	TTTTTAATCA	TTCCAGCACT	GTTTTAATTT	2880
AACTCTGAAT	TTAGTCTTGG	AAAAGGGGGC	GGGTGTGGGT	GAGTGAGGGC	GAGCGAGCAG	2940
ACGGGCGGGC	GGGCGGGTGA	GTGGCCGGCG	GCGGTGGCAG	CGAGCACCAG	AAAACAACAA	3000
ACCCCAAGCG	GTAGAGTGTT	TTAAAAATGA	GACCTAAATG	TGGTGGAACG	GAGGTGCGCC	3060
CCACCCTCCT	CTTCCACTGC	TTAGATGCTC	CCTTCCCCTT	ACTGTGCTCC	CTTCCCCTAA	3120
CTGTGCCTAA	CTGTGCCTGT	TCCCTCACCC	CGCTGATTCT	CCAGCGACGT	ACTTTGACTT	3180
CAAGAACGAT	TTTGCCTGTT	TTCACCGCTC	CCTGTCATAC	TTTCGTTTTT	GGGTGCCCGA	3240
GTCTAGCCCG	TTCGCTATGT	TCGGGCGGGA	CGATGGGGAC	CGTTTGTGCC	ACTCGGGAGA	3300
AGTGGTGGGT	GGGTACGCTG	CTCCGTCTGT	CGTGCGTGAG	TGCCGGAACC	TGAGCTCGGG	3360
AGACCCTCCG	GAGAGACAGA	ATGAGTGAGT	GAATGTGGCG	GCGCGTGACG	GATCTGTATT	3420
GGTTTGTATG	GTTGATCGAG	ACCATTGTCT	GGCGACACCT	AGTGGTGACA	AGTTTCGGGA	3480
ACGCTCCAGG	CCTCTCAGGT	TGGTGACACA	GGAGAGGGAA	GTGCCTGTGG	TGAGGCGACC	3540
AGGGTGACAG	GAGGCCGGGC	AAGCAGGCGG	GAGCGTCTCG	GAGATGGTGT	CGTGTTTAAG	3600
GACGCTCTCT	AACAAGGAGG	TCGTACAGGG	AGATGGCCAA	AGCAGACCGA	GTTGCTGTAC	3660
GCCCTTTTGG	GAATAATGCT	AGGGTTGGTG	GCAACGTTAC	TAGGTCGACC	AGAAGGCTTA	3720
AGTCCTACCC	CCCCCCCCCT	TTTTTTTTTT	TTTCTCTCAG	AAGCCCTCTC	TTGTCCCCGT	3780
CACCGGGGGC	ACCGTACATC	TGAGGCCGAG	AGGACGCGAT	GGGCCCGGCT	TCCAAGCCGG	3840
TGTGGCTCGG	CCAGCTGGCG	CTTCGGGTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTCTCTCA	3900
GAAGCCTTGT	CTGTGCTGTG	CACCGGGGGC	GCTGTACTTC	TGAGGCCGAG	AGGACGCGAT	3960
GGGCCCCGGC	TTCCAAGCCG	GTGTGGCTCG	GCCAGCTGGA	GCTTCGGGTC	TTTTTTTTTT	4020
TTTTTTTTTT	TTTTTTTTCT	CAGAAGCCTT	GTCTGTGCGT	GTCACCGGGG	CCGCTGTACT	4080
TCTGAGGCCG	AGAGGACGCG	ATGGGTGCGC	TTCCAAGCCG	ATGTGGCGGG	GCCAGCTGGA	4140
GCTTCGGGTT	TTTTTTTTTT	CTCCAGAAGC	CCTCTCTTGT	CCCCGTCACC	GGGGGCGGTG	4200
TACTTCTGAG	GCCGAGAGGA	CGTGATGGGC	CCGGGTCCA	GGCGGATGTC	GCCCGGTCAG	4260
CTGGAGCTTT	GGATCTTTTT	TTTTTTTTTT	CCTCCAGAAG	CCCTCTCTTG	TCCCGCTCAC	4320
CGGGGGCACC	TTACATCTGA	GGGCGAGAGG	ACGTGATGGG	TCCGGCTTCC	AAGCCGATGT	4380
GGCGGGGCCA	GCTGGAGCTT	CGGGTTTTTT	TTTTTCTCTC	CAGAAGCCCT	CTCTTGTCCT	4440
CGTCACCGGG	GGCGCTGTAC	TTCTGAGGCC	GAGAGGACGT	GATGGGCCCG	GGTTCCAGGC	4500
GGATGTGCGC	CGGTGAGCTG	GAGCTTTGGA	TCATTTTTTT	TTTCCCCTCC	AGAAGCCCTC	4560
TCTTGTCCCC	GTCACCGGGG	GCACCGTACA	TCTGAGGCCG	AGAGGACACG	ATGGGCCTGT	4620
CTTCCAAGCC	GATGTGGCCC	GGCCAGCTGG	AGCTTCGGGT	CTTTTTTTTT	TTTTTCTCTC	4680
CAGAAGCCTT	GTCTGTGCGT	GTCACCGGGG	GCGCTGTACT	TCTGAGGCCG	AGAGGACCGC	4740
ATGGGCCCCG	CTTCCAAGCC	GGTGTGGCTC	GGCCAGCTGG	AGCTTCGGGT	CTTTTTTTTT	4800
TTTTTTTTTT	TTCTCCAGGA	AACCTTGTCT	GTCGCTGTCA	CCCGGGGCGC	TTGTACTTCT	4860
GATGCCGAGA	GGACGCGATG	GGCCCGTCTT	CCAGGCCGAT	GTGGCCCGGT	CAGCTGGAGC	4920
TTTGATCTTT	TTTTTCTCTA	GAGGACACGA	GAAGCCCTCT	CTTGTCCCCG	TCACCGGGGG	4980
CACCTTACAT	CTGAGGCCTA	TTTTTTTTTT	TGGGCCCCGG	TTCCAGGCCG	ATGTGGCCCC	5040
GTCAGCTGGA	GCTTTGGATC	TTTTTTTTTT	TTTTCTTCCA	GAAGCCCTCT	GGCCCGGCTT	5100
ACCGGTGGCA	CTGTACATCT	GAGGCGGAGA	GGACATTATG	GGCCCGGCTT	CCAATCCGAT	5160
GTGGCCCCGG	CAGCTGGAGC	TTTGGATCTT	ATTTTTTTTT	TAATTTTTTC	TTCCAGAAGC	5220
CCTCTTGTCC	CTGTACCGGC	TGGCACGGTA	CATCTGAGGC	CGAGAGGACA	TTATGGGCCC	5280
GGCTTCCAGG	CCGATGTGGC	CCGGTCAGCT	GGAGCTTTGG	ATCTTTTTTT	TTTTTTTTCT	5340
TTTTTCTCTC	AGAAGCCCTC	TCTGTCCCTG	TCACCGGGGG	CCCTGTACGT	CTGAGGCCGA	5400
GGGAAAGCTA	TGGGCGCGGT	TTTCTTTTCAT	TGACCTGTCT	GTCTTATCAG	TTCTCCGGGT	5460
TGTCAGGGTC	GACCAGTTGT	TCCTTTGAGG	TCCGGTTCTT	TTCTTATGAG	GGTCATTTTT	5520
GGGCCACCTC	CCCAGGTATG	ACTTCCAGGC	GTCGTTGCTC	GCCTGTCACT	TTCTCCCTGT	5580
TCTCTTTTAT	GCTTGTGATC	TTTTCTATCT	GTTTCTATTG	GACCTGGAGA	TAGGTACTGA	5640
CACGCTGTCC	TTTCCCTATT	AACACTAAAG	GACACTATAA	AGAGACCCCT	TGCATTAAAG	5700
GCTGTTTTGC	TTGTCCAGCC	TATTCTTTTT	ACTGGCTTGG	GTCTGTGCGG	GTGCCTGAAG	5760
CTGTCCCCGA	GCCACGCTTC	CTGCTTTCCC	GGGCTTGCTG	CTTGCGTGTG	CTTGCTGTGG	5820
GCAGCTTGTG	ACAACCTGGG	GCTGTGACTT	TGCTGCGTGT	CAGACGTTTT	TCCCGATTTT	5880
CCCGAGGTGT	CGTTGTGACA	CCTGTCCCGG	TTGGAATGGT	GGAGCCAGCT	GTGGTTGAGG	5940
GCCACCTTAT	TTCCGGCTCAC	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTCT	TTGGAGTCCC	GAACCTCCGC	6000
TCTTTTCTCT	TCCCGGTCTT	TCTTCCACAT	GCCTCCCGAG	TGCATTTCTT	TTTGTTTTTT	6060
TTCTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTGGGGAGGT	GGAGAGTCCC	GAGTACTTCA	CTCCTGTCTG	6120

10

20

30

40

TGGTGTCCAA	GTGTTTCATGC	CACGTGCCTC	CCGAGTGCAC	TTTTTTTTGT	GGCAGTCGCT	6180
CGTTGTGTTT	TCTTGTCTTG	TGTCTGCCCC	TATCAGTAAC	TGTCTTGCCC	CGCGTGTAAG	6240
ACATTCTCTAT	CTCGCTTGTT	TCTCCCCGAT	GCGCGTCGTT	GCTCACTCTT	AGATCGATGT	6300
GGTGCTCCGG	AGTTCTCTTC	GGGCCAGGGC	CAAGCCGCGC	CAGGCGAGGG	ACGGACATTC	6360
ATGGCGAATG	GCGGCCGCTC	TTCTCGTTCT	GCCAGCGGGC	CCTCGTCTCT	CCACCCCATC	6420
CGTCTGCCGG	TGGTGTGTGG	AAGGCAGGGG	TGCGGCTCTC	CGGCCCCGAC	CTGCCCCGCG	6480
CGCACTTTTC	TCAGTGGTTC	GCGTGGTCTT	TGTGGATGTG	TGAGGCGCCC	GGTTGTGCCC	6540
TCACGTGTTT	CACTTTGGTC	GTGTCTCGCT	TGACCATGTT	CCCAGAGTCG	GTGGATGTGG	6600
CCGGTGGCGT	TGCATACCTT	TCCCGTCTGG	TGTGTGCACG	CGCTGTTTCT	TGTAAGCGTC	6660
GAGGTGCTCC	TGGAGCGTTC	CAGGTTTGTG	TCCTAGGTGC	CTGCTTCTGA	GCTGGTGGTG	6720
GCGCTCCCCA	TTCCCTGGTG	TGCCTCCGGT	GCTCCGCTCTG	GCTGTGTGCC	TTCCCGTTTG	6780
TGTCTGAGAA	GCCCCGTGAG	GGGGGGTCGA	GGAGAGAAGG	AGGGGCAAGA	CCCCCTTTCT	6840
TCGTCCGGTG	AGGCGCCCCA	CCCAGGACTA	GTACGCCTGT	GCGTAGGGCT	GGTGCTGAGC	6900
GGTCGCGGCT	GGGGTTGGAA	AGTTTCTCGA	GAGACTCATT	GCTTTCCCGT	GGGGAGCTTT	6960
GAGAGGCCCTG	GCTTTCCGGG	GGGACCGGTT	GCAGGGTCTC	CCCTGTCCGC	GGATGCTCAG	7020
AATGCCCTTG	GAAGAGAACC	TTCTGTGTGC	CGCAGACCCC	CCCGCGCGGT	CGCCCGCGTG	7080
TTGGTCTTCT	GGTTTCCCTG	TGTGCTCGTC	GCATGCATCC	TCTCTCGGTG	GCCGGGGCTC	7140
GTCGGGGTTT	TGGGTCCGTC	CCGCCCTCAG	TGAGAAAGTT	TCCTTCTCTA	GCTATCTTCC	7200
GGAAAGGGTG	CGGGCTTCTT	ACGGTCTCGA	GGGGTCTCTC	CCGAATGGTC	CCCTGGAGGG	7260
CTCGCCCCCT	GACCGCCTCC	CGCGCGCGCA	GCGTTTGCTC	TCTCGTCTAC	CGCGGCCCGC	7320
GGCCTCCCCG	CTCCGAGTTC	GGGGAGGGAT	CACGCGGGGC	AGAGCCTGTC	TGTCGTCTCG	7380
CCGTTGCTGC	GGAGCATGTG	GCTCGGCTTG	TGTGGTTGGT	AGGTGGGGAG	AGGGCTCCGT	7440
GCACACCCCC	GCGTGCGCGT	ACTTTCCTCC	CCTCCTGAGG	GCCGCCGTGC	GGACGGGGTG	7500
TGGGTAGGCG	ACGGTGGGCT	CCCGGGTCCC	CACCCGTCTT	CCCGTGCCTC	ACCCGTGCCT	7560
TCCGTCGCGT	GCGTCCCTCT	CGCTCGCGTC	CACGACTTTG	GCCGCTCCCG	CGACGGCGGC	7620
CTGCGCCGCG	CGTGTGCGT	GCTGTGTGCT	TCTCGGGCTG	TGTGGTTGTG	TCGCCCTCGC	7680
CCCCCTTCC	CGCGGCAGCG	TTCCACGGCT	TGGCGAAATC	GCGGGAGTCC	TCCTTCCCTT	7740
CCTCGGGGTC	GAGAGGGTCC	GTGTCTGGCG	TTGATTGATC	TCGCTCTCGG	GGACGGGACC	7800
GTTCTGTGGG	AGAACGGCTG	TTGGCCGCGT	CCGCGCGGAC	GTCGGACGTG	GGGACCCACT	7860
GCCGCTC3GG	GGTCTTCGTC	GGTAGGCATC	GGTGTGTCGG	CATCGGTCTC	TCTCTCGTGT	7920
CGGTGTGCGC	TCCTCGGGCT	CCCGGGGGGG	CGTCGTGTTT	CGGGTCGGCT	CGGCGCTGCA	7980
GGTGTGGTGG	GACTGCTCAG	GGGAGTGGTG	CAGTGTGATT	CCCGCCGGTT	TTGCCCTCGC	8040
TGCCCTGACC	GGTCCGACGC	CCGAGCGGTC	TCTCGTCCCT	TTGTGAGGAC	CCCTTCCGG	8100
GAGGGGCCCG	TTTCGGCCGC	CCTTGCCGTC	GTCGCCGGCC	CTCGTTCTGC	TGTGTGCTTC	8160
CCCCCTCCCC	GCTCGCCGCA	GCCGGTCTTT	TTTCTCTCTT	CCCCCCTCT	CCTCTGACTG	8220
ACCCGTGGCC	GTGCTGTGCG	ACCCCCCGCA	TGGGGGCGGC	CGGGCACGTA	CGCGTCCGGG	8280
CGGTACCCGG	GCTCTTGGGG	GGGGGCCGAG	GGGTAAAGAA	GTCGGCTCGG	CGGGCGGGAG	8340
GAGCTGTGGT	TTGGAGGGCG	TCCCGGCCCC	GCGGCCGTGG	CGGTGTCTTG	CGCTCCCTTG	8400
GAGAGGGCTG	CGTGCGAGGG	GAAAAGGTTG	CCCCGCGAGG	GCAAAGGGAA	AGAGGCTAGC	8460
AGTGGTCATT	GTCCCGACGG	TGTGGTGGTC	TGTTGGCCGA	GGTGCCTCTG	GGGGGCTCGT	8520
CCGGCCCTGT	CGTCCGTCGG	GAAGGCGCGT	GTTGGGGCCT	GCCGGAGTGC	CGAGGTGGGT	8580
ACCCTGGCGG	TGGGATTAAAC	CCCGCGCGCG	TGTCCCGGTG	TGGCGGTGGG	GGCTCCGGTC	8640
GATGTCTACC	TCCCTCTCCC	CGAGGTCTCA	GGCCTTCTCC	GCGCGGGCTC	TCGGCCCTCC	8700
CCTCGTTTCT	CCCTCTCGCG	GGGTTCAGAT	CGCTCGTCTG	CCTCCCCCTC	TCCGTCTTTC	8760
CATCTCTCGC	GCAATGGCGC	CGCCCGAGTT	CACGGTGGGT	TCGTCTCTCC	CCTCCGCTTC	8820
TCGCCGGGGG	CTGGCCGCTG	TCCGGTCTCT	CCTGCCCGAC	CCCCGTGGGC	GTGGTCTTCT	8880
CTCGCCGGCT	TCGCGGACTC	CTGGCTTCGC	CCGGAGGGTC	AGGGGGCTTC	CCGGTTCCCC	8940
GACGTTGCGC	CTCGCTGCTG	TGTGCTTGGG	GGGGGCCCGC	TGCGGCCTCC	GCCCCGCCGT	9000
GAGCCCCCTG	CGCACCCGCC	GGTGTGCGGT	TTCCGCGCGC	GGTCAGTTGG	GCCCTGGCGT	9060
TGTGTGCGGT	CGGGAGCGTG	TCCGCCTCGC	GGCGGCTAGA	CGCGGGGTGC	GCCGGGCTCC	9120
GACGGGTGGC	CTATCCAGGG	CTCGCCCCCG	CCGACCCCCG	CCTGCCCGTC	CCGGTGGTGG	9180
TCGTTGGTGT	GGGGAGTGAA	TGGTGCTACC	GGTCATTCCC	TCCCGCGTGG	TTTGAAGTGC	9240
TCGCCGGTGT	CGCGCTTCTC	TTTCCGCCAA	CCCCACGCC	AACCCACCAC	CCTGCTCTCC	9300
CGGCCCGAGG	CGGATGACGT	TCCGGTCTCT	CCTGAGCCGA	GGGGTTCCGG	ATTTGTGCCG	9360
GGGACCGAGT	GGAGAGCGGG	TAAGAGAGGT	CGCGAGGAGC	TGTCCCGGGG	CGACGCTCGG	9420
GTTGGCTTTG	CCGCGTGCGT	GTGCTCGCGG	ACGGGTTTGT	TCGGACCCCG	ACGGGGTCCG	9480
TCCGGCCGCA	TGCACTCTCC	CGTTCCGCGC	GAGCGCCCCG	CCGGCTCACC	CCCGGTTTGT	9540
CCTCCCGCGA	GGCTCTCCGC	CGCCGCCGCG	TCCTCTCTCT	CTCTCGCGCT	CTCTGTCCCG	9600
CCTGGTCTCT	TCCCAACCCC	GACGCTCCGC	TCGCGCTTCC	TTACCTGGTT	GATCCTGCCA	9660
GGTAGCATAT	GCTTGTCTCA	AAGATTAAGC	CATGCATGTC	TAAGTACGCA	CGGCCGGTAC	9720
AGTGAAACTG	CGAATGGCTC	ATTAAATCAG	TTATGGTTCC	TTTGGTCTGT	CGCTCCTCTC	9780

10

20

30

40

CTACTTGGAT	AACTGTGGTA	ATTCTAGAGC	TAATACATGC	CGACGGGCGC	TGACCCCCCT	9840
TCCCGGGGGG	GGATGCGTGC	ATTTATCAGA	TCAAAAACCAA	CCCGGTGAGC	TCCCTCCCGG	9900
CTCCGGCCCG	GGGTCCGGCG	CCGGCGGCTT	GGTGACTCTA	GATAACCTCG	GGCCGATCGC	9960
ACGCCCCCGG	TGGCGGCGAC	GACCCATTCT	AACGTCTGCC	CTATCAACTT	TCGATGGTAG	10020
TCGCCGTGCC	TACCATGGTG	ACCACGGGTG	ACGGGGAATC	AGGGTTCGAT	TCCGGAGAGG	10080
GAGCCTGAGA	AACGGCTACC	ACATCCAAGG	AAGGCAGCAG	GCGCGCAAAT	TACCCACTCC	10140
CGACCCGGGG	AGGTAGTGAC	GAAAAATAAC	AATACAGGAC	TCTTTCGAGG	CCCTGTAATT	10200
GGAATGAGTC	CACTTTAAAT	CCTTTAACGA	GGATCCATTG	GAGGGCAAGT	CTGGTGCCAG	10260
CAGCCGCGGT	AATTCCAGCT	CCAATAGCGT	ATATTAAAGT	TGCTGCAGTT	AAAAAGCTCG	10320
TAGTTGGATC	TTGGGAGCGG	GCGGGCGGTC	CGCCGCGAGG	CGAGTCACCG	CCCGTCCCCG	10380
CCCCTTGCTT	CTCGGCGCCC	CCTCGATGCT	CCTAGCTGAG	TGTCCCGCGG	GGCCCGAAGC	10440
GTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCCCGA	GCCGCCTGGA	TACCGCAGCT	10500
AGGAATAATG	GAATAGGACC	GCGGTTCTAT	TTTGTGTTG	TTCGGAAGT	AGGCCATGAT	10560
TAAGAGGGAC	GGCCGGGGGC	ATTCGTATTG	CGCCGCTAGA	GGTGAAATTC	TTGGACCGGC	10620
GCAAGACGGA	CCAGAGCGAA	AGCATTTGCC	AAGAATGTTT	TCATTAATCA	AGAACGAAAG	10680
TCGGAGGTTT	GAAGACGATC	AGATACCGTG	GATGTTCCGA	CCATAAACGA	TGCCGACTGG	10740
CGATGCGGCG	GCGTTATTCC	CATGACCCGC	CGGGCAGCTT	CCGGGAAACC	AAAGTCTTTG	10800
GGTTCCGGGG	GGAGTATGGT	TGCAAAGCTG	AAACTTAAAG	GAATTGACGG	AAGGGCACCA	10860
CCAGGAGTGG	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT	CAACACGGGA	AACCTCACCC	GGCCCGGACA	10920
CGGACAGGAT	TGACAGATTG	ATAGCTCTTT	CTCGATTCCG	TGGGTGGTGG	TGCATGGCCG	10980
TTCTTAGTTG	TTGGAGCGAT	TTGTCTGGTT	AATTCGGATA	ACGAACGAGA	CTCTGGCATG	11040
CTAACTAGTT	ACGCGACCCC	CGAGCGGTCT	GCGTCCCCCA	ACTTCTTAGA	GGGACAAGTG	11100
GCGTTAGACC	ACCCGAGATT	GAGCAATAAC	AGGTCTGTGA	TGCCCTTAGA	TGTCCGGGGC	11160
TGCACGCGCG	CTACACTGAC	TGGCTCAGCG	TGTGCCTACC	CTGCGCCGGC	AGGCGCGGGT	11220
AACCCGTTGA	ACCCCATTCG	TGATGGGGAT	CGGGGATTGC	AATTATTCCC	CATGAACGAG	11280
GAATTTCCAG	TAAGTGCGGG	TCATAAGCTT	GCGTTGATTA	AGTCCCTGCC	CTTTGTACAC	11340
ACCGCCCGTC	GCTACTACCG	ATTGGATGGT	TTAGTGAGGC	CCTCGGATCG	GCCCCGCCGG	11400
GGTCGGCCCA	CGGCCCTGGC	GGAGCGCTGA	GAAGACGGTC	GAACCTGACT	ATCTAGAGGA	11460
AGTAAAGTTC	GTAACAAGGT	TTCCGTAGGT	GAACCTGCGG	AAGGATCATT	AAACGGGA	11520
CTGTGGAGGA	GCGGCGGCGT	GGCCCGCTCT	CCCCGTCTTG	TGTGTGTCTT	CGCCGGGAGG	11580
CGCGTGCGTC	CCGGGTCCCG	TCGCCCCGCT	GTGGAGCGAG	GTGTCTGGAG	TGAGGTGAGA	11640
GAAGGGGTGG	GTGGGGTCCG	TCTGGGTCCG	TCTGGGACCG	CCTCCGATTT	CCCCCTCCCC	11700
TCCCTCTCTC	CTCGTCCGGC	TCTGACCTCG	CCACCCTACC	GCGGCGGCGG	CTGCTCGCCG	11760
GCGTCTTGCC	TCTTTCCCGT	CCGGCTCTTC	CGTGTCTACG	AGGGGCGGTA	CGTCTGTTACG	11820
GGTTTTTGAC	CCGTCCCGGG	GGCGTTCCGT	CGTCCGGGCG	CGCGCTTTGC	TCTCCCGGCA	11880
CCCATCCCCG	CCGCGGCTCT	GGCTTTTCTA	CGTTGGCTGG	GGCGGTTGTC	GCGTGTGGGG	11940
GGATGTGAGT	GTCGCGTGTG	GGCTCGCCCG	TCCCGATGCC	ACGCTTTTCT	GGCCTCGCGT	12000
GTCCTCCCCG	CTCCTGTCCC	GGGTACCTAG	CTGTCCGCTT	CCGGCGCGGA	GGTTTAAGGA	12060
CCCCGGGGGG	GTCGCCCTGC	CGCCCCCAGG	GTCGGGGGGC	GGTGGGCGCC	GTAGGGGAAGT	12120
CGGTGCTTCG	GGCGGCTCTC	CCTCAGACTC	CATGACCCTC	CTCCCCCGCG	TGCCGCGGTT	12180
CCCGAGGCGG	CGGTGCTGTG	GGGGGGTGGA	TGTCTGGAGC	CCCCCTCGGG	GCCGTGGGGG	12240
CCCGACCCGC	CCCGCCGGCT	TGCCCGATTT	CCGCGGGTCG	GTCTGTGTCG	TGCCGGTCTG	12300
GGGTTCCTCG	GTCGTTCCCG	TGTTTTTCCG	CTCCCCACCC	TTTTTTTTTC	CTCCCCCCCC	12360
CACGTGTCTC	GTTTCGTTCC	TGCTGGCCGG	CCTGAGGCTA	CCCCCTCGGT	CATCTGTTCT	12420
CCTCTCTCTC	CGGGGAGAGG	AGGGCGGTGG	TCGTTGGGGG	ACTGTGCCGT	CGTCAGCACC	12480
CGTGAGTTCC	CTCACACCCG	AAATACCGAT	ACGACTCTTA	GCGGTGGATC	ACTCGGCTCG	12540
TGCGTTCGAT	AAGAACGCAG	CTAGCTGCGA	GAATTAATGT	GAATTGCAGG	ACACATTGAT	12600
CATCGACACT	TCGAACGCAC	TTGCGGCCCC	GGGTTCCCTC	CGGGGCTACG	CCTGTCTGAG	12660
CGTCCGTTGA	CGATCAATCG	CGTCACCCGC	TGCGGTGGGT	GCTGCGCGGC	TGGGAGTTTG	12720
CTCGCAGGGC	CAACCCCCCA	ACCCGGGTCT	GGCCCTCCGT	CTCCCGAAGT	TCAGACGTGT	12780
GGGCGGTTGT	CGGTGTGGCG	CGCGCGCCCG	CGTCCGCGAG	CCTGGTCTCC	CCCGCGCATC	12840
CGCGCTCGCG	GCTTCTTCCC	GCTCCGCCGT	TCCCCGCCCT	GCCCGTGAC	CCCGGTCTCT	12900
GCCTCGCGTC	GGCGCCTCCC	GGACCGCTGC	CTCACCAGTC	TTTCTCGGTC	CCGTGCCCCG	12960
TGGGAACCCA	CCGCGCCCCC	GTGGCGCCCC	GGGTGGGGCG	CGTCCGCATC	TGCTCTGGTC	13020
GAGGTTGGCG	GTTGAGGGTG	TGCGTGCGCC	GAGGTGGTGG	TCGGTCCCCC	GCGGCCGCGG	13080
GGTTGTGCGG	GTGGCGGTCT	ACGAGGGCCG	GTCGGTCCGC	TGCGGTGGTT	GTCTGTGTGT	13140
GTTTGGGTCT	TGCGCTGGGG	GAGGCGGGGT	CGACCGCTCG	CGGGGTTGGC	GCGGTCGCCC	13200
GGCGCCGCGC	ACCCTCCGGC	TTGTGTGGAG	GGAGAGCGAG	GGCGAGAACG	GAGAGAGGTG	13260
GTATCCCCGG	TGGCGTTGCG	AGGGAGGGTT	TGGCGTCCCG	CGTCCGTCCG	TCCCTCCCTC	13320
CCTCGGTGGG	CGCCTTCGCG	CCGACGCGCG	CGGTCGGGGC	CGGTCCGGGG	CCGTGGCCCC	13380
CGTGGCTCTT	CTTCGTCTCC	GCTTCTCCTT	CACCCGGGCG	GTACCCGCTC	CGGCGCCGGC	13440

10

20

30

40

CCGCGGGACG	CCGCGGCGTC	CGTGCGCCGA	TGCGAGTCAC	CCCCGGGTGT	TGCGAGTTCG	13500
GGGAGGGAGA	GGGCCTCGCT	GACCCGTTGC	GTCCCGGCTT	CCCTGGGGGG	GACCCGGCGT	13560
CTGTGGGCTG	TGCGTCCCGG	GGGTTGCGTG	TGAGTAAGAT	CCTCCACCCC	CGCCGCCCTC	13620
CCCTCCCGCC	TGCCTCTCGG	GGACCCCTC	AGACGGTTTCG	CCGGCTCGTC	CTCCCGTGCC	13680
GCCGGGTGCC	GTCTCTTTCC	CGCCCGCCTC	CTCGCTCTCT	TCTTCCCGCG	GCTGGGCGCG	13740
TGTCCCCCCT	TTCTGACCGC	GACCTCAGAT	CAGACGTGGC	GACCCGCTGA	ATTTAAGCAT	13800
ATTAGTCAGC	GGAGGAAAAG	AAACTAACCA	GGATTCCCTC	AGTAACGGCG	AGTGAACAGG	13860
GAAGAGCCCA	GCGCCGAATC	CCCGCCGCGC	GTCGCGGCGT	GGGAAATGTG	GCGTACGGAA	13920
GACCCACTCC	CCGGCGCCGC	TCGTGGGGGG	CCCAAGTCCT	TCTGATCGAG	GCCCAGCCCG	13980
TGGACGCTGT	GAGGCCGGTA	GCGGCCCGCG	CGCGCCGGGC	TCGGGTCTTC	CCGGAGTCGG	14040
GTTGCTTGGG	AATGCAGCCC	AAAGCGGGTG	GTAAACTCCA	TCTAAGGCTA	AATACCGGCA	14100
CGAGACCGAT	AGTCAACAAG	TACCGTAAGG	GAAAGTTGAA	AAGAACTTTG	AAGAGAGAGT	14160
TCAAGAGGGC	GTGAAACCGT	TAAGAGGTAA	ACGGGTGGGG	TCCGCGCAGT	CCGCCCGGAG	14220
GATTCAACCC	GGCGGCGCGC	GTCCGGCCGT	GCCCGGTGGT	CCCGGCGGAT	CTTTCCCGCT	14280
CCCCGTTCCT	CCCGACCCCT	CCACCCGCGC	GTCTGTTCCCT	TCTTCTCTCC	CGCGTCCGGC	14340
GCCTCCGGCG	GCGGCGCGCG	GGGGTGGTGT	GGTGGTGGCG	CGCGGGCGGG	GCCGGGGGTG	14400
GGGTCCGGCG	GGGACCGCCC	CCGGCCGGCG	ACCGGCCGCC	GCCGGGCGCA	CTTCCACCGT	14460
GGCGGTGCGC	CGCGACCGGC	TCCGGGACGG	CCGGGAAGGC	CCGGTGGGGA	AGGTGGCTCG	14520
GGGGGGGCGG	CGCGTCTCAG	GGCGCGCCGA	ACCACCTCAC	CCCGAGTGTT	ACAGCCCTCC	14580
GGCCCGCTT	TGCGCGAATC	CCGGGGCCGA	GGAAGCCAGA	TACCCGTCGC	CGCGCTCTCC	14640
CTCTCCCCCC	GTCCGCTCTC	CGGGCGGGCG	TGGGGGTGGG	GGCCGGGCCG	CCCCTCCAC	14700
GGCGCGACCG	CTCTCCACCC	CCCCTCCGTC	GCCTCTCTCG	GGGCCCGGTG	GGGGGCGGGG	14760
CGGACTGTCC	CCAGTGCGCC	CCGGGCGTCG	TCGCGCCGTC	GGGTCCCGGG	GGGACCGTCG	14820
GTCACGCGTC	TCCCGACGAA	GCCGAGCGCA	CGGGTTCGGC	GGCGATGTCT	GCTACCCACC	14880
CGACCCGTCT	TGAAACACGG	ACCAAGGAGT	CTAACGCGTG	CGCGAGTCAG	GGGCTCGTCC	14940
GAAAGCCGCC	GTGGCGCAAT	GAAGGTGAAG	GGCCCCGCCC	GGGGGCCCGA	GGTGGGATCC	15000
CGAGGCCTCT	CCAGTCCGCC	GAGGGCGCAC	CACCGGCCCG	TCTCGCCCGC	CGCGCCGGGG	15060
AGGTGGAGCA	CGAGCGTACG	CGTTAGGACC	CGAAAGATGG	TGAACATATG	TTGGGCAGGG	15120
CGAAGCCAGA	GGAAACTCTG	GTGGAGGTCC	GTAGCGGTCC	TGACGTGCAA	ATCGGTCTCT	15180
CGACCTGGGT	ATAGGGGCGA	AAGACTAATC	GAACCATCTA	GTAGCTGGTT	CCCTCCGAAG	15240
TTTCCCTCAG	GATAGCTGGC	GCTCTCGCTC	CCGACGTACG	CAGTTTTATC	CGGTAAAGCG	15300
AATGATTAGA	GGTCTTTGGG	CCGAAACGAT	CTCAACCTAT	TCTCAAACCT	TAAATGGGTA	15360
AGAAGCCCGG	CTCGCTGGCG	TGGAGCCGGG	CTGGAAATGC	GAGTGCCTAG	TGGGCCACTT	15420
TTGGTAAGCA	GAAGTGGCGC	TGCGGGATGA	ACCGAACGCC	GGGTTAAGGC	GCCCGATGCC	15480
GACGCTCATC	AGACCCAGAA	AAAGGTGTTG	GTTGATATAG	ACAGCAGGAC	GGTGGCCATG	15540
GAAATCGGAA	TCCGCTAAGG	AGTGTGTAAC	AACTCACCTG	CCGAATCAAC	TAGCCCTGAA	15600
AATGGATGGC	GCTGGAGCGT	CGGGCCGATA	CCCGGCCGTC	GCCGCAGTCG	GAACGGAACG	15660
GGACGGGAGC	GGCCGCGGGT	GCGCGTCTCT	CGGGGTCCGG	GGTGCCTGGC	GGGGGCCCGT	15720
CCCCCGCCTC	CCCTCCGCGC	GCCGGGTTCC	CCCCCGCGGC	GTCGGGCCCC	GCGGAGCCTA	15780
CGCCGCGACG	AGTAGGAGGG	CCGCTGCGGT	GAGCCTTGAA	GCCTAGGGCG	CGGGCCCGGG	15840
TGGAGCCGCG	GCAGGTGCAG	ATCTTGGTGG	TAGTAGCAAA	TATTCAAACG	AGAACTTTGA	15900
AGGCCGAAGT	GGAGAAGGGT	TCCATGTGAA	CAGCAGTTGA	ACATGGGTCA	GTCGGTCTCT	15960
AGAGATGGGC	GAGTGCCGTT	CCGAAGGGAG	GGCGATGGC	CTCCGTTGCC	CTCGGCCGAT	16020
CGAAAGGGAG	TCGGGTTTCC	ATCCCCGAAT	CCGGAGTGGC	CTCCGTTGGC	CCCGCGAGGC	16080
CAGTGCGGTA	ACGCGACCGA	TCCCGGAGAA	GCCGGCGGGA	GGCCTCGGGG	AGAGTTCTCT	16140
TTTCTTTGTG	AAGGGCAGGG	CGCCCTGGAA	TGGGTTCCGC	CCGAGAGAGG	GGCCCGTGCC	16200
TTGGAAAGCG	TCGCGGTTCC	GGCGGCGTCC	GGTGAGCTCT	CGCTGGCCCT	TGAAAATCCG	16260
GGGGAGAGGG	TGTAAATCTC	GCGCCGGGCC	GTACCCATAT	CCGCAGCAGG	TCTCCAAGGT	16320
GAACAGCCTC	TGGCATGTTG	GAACAATGTA	GGTAAGGGAA	GTCGGCAAGC	CGGATCCGTA	16380
ACTTCGGGAT	AAGGATTGGC	TCTAAGGGCT	GGGTCCGGTC	GGCTGGGGCG	CGAAGCGGGG	16440
CTGGGCGCGC	GCCGCGGCTG	GACGAGGCGC	CGCCGCCCTC	TCCACGTCC	GGGGAGACCC	16500
CCCGTCCCTT	CCGCCCGGGC	CCGCCCTCCC	CTCTTCCCCG	CGGGGCCCCG	TCGTCCCCCG	16560
CGTCGTGCGC	ACCTCTCTTC	CCCCCTCCTT	CTTCCCGTCG	GGGGGCGGGT	CGGGGGTCGG	16620
CGCGCGGCGC	GGGCTCCGGG	GCGGCGGGTC	CAACCCCGCG	GGGGTTCCGG	AGCGGGAGGA	16680
ACCAGCGGTC	CCCGGTGGGG	CGGGGGGCCC	GGACACTCGG	GGGGCCGGCG	GCGGCGGCGA	16740
CTCTGGACGC	GAGCCGGGCC	CTTCCCGTGG	ATCGCCTCAG	CTGCGGCGGG	CGTCGCGGCC	16800
GCTCCCGGGG	AGCCCGGCGG	GTGCCGCGCG	GGGTCCCTC	CCCGCGGGGC	CTCGCTCCAC	16860
CCCCCATCG	CCTCTCCCGA	GGTGCGTGGC	GGGGGCGGGC	GGGCGTGTCC	CGCGCGTGTG	16920
GGGGGAACCT	CCGCGTCGGT	GTTCCCCCGC	CGGGTCCGCC	CCCCGGGCCG	CGGTTTCCCG	16980
CGCGGCGCCC	CCGCTCCGGC	CGGCGCCTAG	CAGCCGACTT	AGAACTGGTG	CGGACCAGGG	17040
GAATCCGACT	GTTTAATTAA	AACAAAGCAT	CGCGAAGGCC	CGCGGCGGGT	GTTGACGCGA	17100

10

20

30

40

TGTGATTTCT	GCCCAGTGCT	CTGAATGTCA	AAGTGAAGAA	ATTCAATGAA	GCGCGGGTAA	17160
ACGGCGGGAG	TAACATATGAC	TCTCTTAAGG	TAGCCAAATG	CCTCGTCATC	TAATTAGTGA	17220
CGCGCATGAA	TGGATGAACG	AGATTCCAC	TGTCCCTACC	TACTATCCAG	CGAAACCACA	17280
GCCAAAGGAA	CGGGCTTGGC	GGAATCAGCG	GGGAAAGAAG	ACCCTGTTGA	GCTTGACTCT	17340
AGTCTGGCAC	GGTGAAGAGA	CATGAGAGGT	GTAGAATAAG	TGGGAGGCC	CCGGCGCCCG	17400
GCCCCGTCT	CGCGTCGGGG	TCGGGGCACG	CCGGCCTCGC	GGGCCGCCCG	TGAAATACCA	17460
CTACTCTCAT	CGTTTTTTTCA	CTGACCCGGT	GAGGCGGGGG	GGCGAGCCCC	GAGGGGCTCT	17520
CGCTTCTGGC	GCCAAGCGTC	CGTCCCGCGC	GTGCGGGCGG	GCGCGACCCG	CTCCGGGGAC	17580
AGTGCCAGGT	GGGGAGTTTG	ACTGGGGCGG	TACACCTGTC	AAACGGTAAC	GCAGGTGTCC	17640
TAAGCGGAGC	TCAGGGAGGA	CAGAAACCTC	CCGTGGAGCA	GAAGGGCAAA	AGCTCGCTTG	17700
ATCTTGATTT	TCAGTACGAA	TACAGACCGT	GAAAGCGGGG	CCTCACGATC	CTTCTGACCT	17760
TTTGGGTTTT	AAGCAGGAGG	TGTCAGAAAA	GTTACCACAG	GGATAACTGG	CTTGTGGCGG	17820
CCAAGCGTTC	ATAGCGACGT	CGCTTTTTTGA	TCCTTCGATG	TCGGCTCTTC	CTATCATTGT	17880
GAAAGCAGAAT	TCACCAAGCG	TTGGATTGTT	CACCCACTAA	TAGGGAACGT	GAGCTGGGTT	17940
TAGACCGTCG	TGAGACAGGT	TAGTTTTTACC	CTACTGATGA	TGTGTGTGTG	CCATGGTAAT	18000
CCTGCTCAGT	ACGAGAGGAA	CCGCAGGTTT	AGACATTTGG	TGTATGTGCT	TGGCTGAGGA	18060
GCCAATGGGG	CGAAGCTACC	ATCTGTGGGA	TTATGACTGA	ACGCCTCTAA	GTCAGAATCC	18120
GCCCAAGCGG	AACGATACGG	CAGCGCCGAA	GTGACCTCGG	TTGGCCCCCG	ATAGCCGGGT	18180
CCCCGTCCGT	CCCGCTCGGC	GGGGTCCCCG	CGTCGCCCCG	CGGCGGCGCG	GGGTCTCCCC	18240
CCGCCGGGCG	TCGGGACCGG	GGTCCGGTGC	GGAGAGCCGT	TCGTCTTGGG	AAACGGGGTG	18300
CGGCCGGA	GGGGGCCGCC	CTCTCGCCCC	TCACGTTGAA	CGCACGTTCC	TGTGGAACCT	18360
GGCGCTAAAC	CATTCTAGAA	CGACCTGCTT	CTGGGTCCGG	GTTTCGTACG	TAGCAGAGCA	18420
GCTCCCTCGC	TGCATCTAT	TGAAAGTCAG	CCCTCGACAC	AAGGGTTTGT	CTCTCGGGG	18480
TTTCCCGTCG	CACGCCCGCT	CGCTCGCACG	CGACCGTGTC	GCCGCCCGGG	CGTCACGGGG	18540
GCGGTGCGCT	CGGCCCCCGC	GCGGTTGCC	GAACGACCGT	GTGGTGGTTG	GGGGGGGGAT	18600
CGTCTTCTCC	TCCGTCTCCC	GAGGACGGTT	CGTTTCTCTT	TCCCCTTCCG	TCGCTCTCCT	18660
TGGGTGTGGG	AGCCTCGTGC	CGTCGCGACC	GCGGCCTGCC	GTCGCCTGCC	GCCGCGACCC	18720
CTTGCCCTCC	GGCCTTGCC	AAGCCGGAGG	GCGGAGGAGG	GGGATCGGCG	GCGGCGGCGA	18780
CCGCGGCGCG	GTGACGCACG	GTGGGATCCC	CATCCTCGGC	GCGTCCGTCG	GGGACGGGCG	18840
GTTGGAGGGG	CGGGAGGGGT	TTTTCCCGTG	AACGCCGCGT	TCGGCGCCAG	GCCTCTGGCG	18900
GCCGGGGGGG	CGCTCTCTCC	GCCCGAGCAT	CCCCACTCCC	GCCCCCTCCT	TTCGCGCGCC	18960
GCGGCGGCGA	CGTGCGTACG	AGGGGAGGAT	GTGCGCGGTG	GGAGGCGGAG	AGGGTCCGGC	19020
GCGGCGCCTC	TTCCATTTTT	TTTTCCCCAA	CTFCGGAGGT	CGACCAGTAC	TCCGGGCGAC	19080
ACTTTGTTTT	TTTTTTTTTC	CCCGATGCTG	GAGGTGCACC	AGATGTCCGA	AAGTGTCCCC	19140
CCCCCCCCC	CCCCCGGCG	CGGAGCGCG	GGGCCACTCT	GGACTCTTTT	TTTTTTTTTT	19200
TTTTTTTTTT	TTAAATTCCT	GGAACCTTTA	GGTCGACCAG	TTGTCCGTCT	TTTACTCCTT	19260
CATATAGGTC	GACCAGTACT	CCGGGTGGTA	CTTTGTCTTT	TTCTGAAAAT	CCCAGAGGTC	19320
GACCAGATAT	CCGAAAGTCC	TCTCTTTCCC	TTTACTCTTC	CCCACAGCGA	TTCTCTTTTT	19380
TTTTTTTTTT	TTTGGTGTGC	CTCTTTTTGA	CTTATATACA	TGTAAATAGT	GTGTACGTTT	19440
ATATACTTAT	CGAGGAGGT	CGACAGTAC	TCCGGGCGAC	ACTTTGTTTT	TTTTTTTTTT	19500
TCCACCGATG	ATGGAGGTGC	ACCAGATGTC	CGAAAGTGTC	CCGTCCCCC	CTCCCCCCC	19560
CCGCGACGCG	GCGGGCTCAC	TCTGGACTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTAAATTTT	19620
TGGAACCTTA	AGGTCGACCA	GTTGTCCGTC	TTTCACTCAT	TCATATAGGT	CGACCGGTGG	19680
TACTTTGTCT	TTTCTGAAA	ATCGCAGAGG	TCGACCAGAT	GTCAGAAAGT	CTGGTGGTGC	19740
ATAAATTATC	TGATCTAGAT	TTGTTTTTCT	GTTTTTCAGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19800
TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	19860
TTTGTGTTGT	GTTGTGTTGT	GTTGTGTTGT	GTTGTGTTGT	GTTGTGTTGT	GTTGTGTTGT	19920
GTTGGGTTGG	GTTGGGTTGT	GTTGTGTTGT	TTTGTGTTGT	TTGGTGTGTT	TGGTTTTGTT	19980
TTGTTTGCTG	TTGTTTGTG	TTTTGCGGGT	CGAACAGTTG	TCCCTAACCG	AGTTTTTTTT	20040
TACACAAACA	TGCACTTTTT	TTAAATAAAA	TTTTTAAAT	AAATGCGAAA	ATCGACCAAT	20100
TATCCCTTTC	CTTCTCTCTC	TTTTTTAAAA	ATTTTCTTTG	TGTGTGTGTG	TGTGTGTGTG	20160
TGTGTGTGTG	TGCGTGTGTG	TGTGTGTGTG	CGTGCAGCGT	GCGCGCGCTC	GTTTTATAAA	20220
TACTTATAAT	AATAGGTCGC	CGGGTGGTGG	TAGCTTCCCG	GACTCCAGAG	GCAGAGGCAG	20280
GCAGACTTCT	GAGTTCGAGG	CCAGCCTGGT	CTACAGAGGA	ACCCTGTCTC	GAAAAATGAA	20340
AATAAATACA	TACATACATA	CATACATACA	TACATACATA	CATACATACA	TACATATGAG	20400
GTTGACCAGT	TGTCAATCCT	TTAGAATTTT	GTTTTTAATT	AATGTGATAG	AGAGATAGAT	20460
AATAGATAGA	TGGATAGAGT	GATACAAATA	TAGGTTTTTT	TTTCAGTAAA	TATGAGGTTG	20520
ATTAACCACT	TTTCCCTTTT	TAGGTTTTTT	TTTTTTTCCC	CTGTCCATGT	GGTTGCTGGG	20580
ATTTGAACTC	AGGACCCTGG	CAGGTCAACT	GGAAAACGTG	TTTTCTATAT	ATATAAATAG	20640
TGGTCTGTCT	GCTGTTTGT	TGTTTGCTTG	CTGCTTGCT	TTGCTTGCT	TTGCTTGCT	20700
TGCTTTTTTT	TTTCTTCTGA	GACAGTATTT	CTCTGTGTAA	CCTGGTGCCC	TGAACTCAC	20760

10

20

30

40

TCTGTAGACC	AGCCTGGCCT	CAATCGAACT	CAGAAATCCT	CCTGCCTCTT	GTCTACCTCC	20820
CAATTTTGGG	GTAAAGGTGT	GCTACACCAC	TGCCTGGCAT	TATTATCATT	ATCATTATTA	20880
ATTTTATTAT	TAGACAGAAC	GAAATCAACT	AGTTGGTCCT	GTTTCGTTAA	TTCATTTGAA	20940
ATTAGTTGGA	CCAATTAGTT	GGCTGGTTTG	GGAGGTTTCT	TTTGTTTCCG	ATTTGGGTGT	21000
TTGTGGGGCT	GGGGATCAGG	TATCTCAACG	GAATGCATGA	AGGTTAAGGT	GAGATGGCTC	21060
GATTTTTGTA	AAGATTACTT	TTCTTAGTCT	GAGGAAAAAA	TAAAATAATA	TTGGGCTACG	21120
TTTCATTGCT	TCATTTCTAT	TTCTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCAGATA	AGGAGGTCGG	21180
CCAGTTCCTC	CTGCCTTCTG	GAAGATGTAG	GCATTGCATT	GGGAAAAGCA	TTGTTTGAGA	21240
GATGTGCTAG	TGAACCAGAG	AGTTTGGATG	TCAAGCCGTA	TAATGTTTAT	TACAATATAG	21300
AAAAGTTCTA	ACAAAGTGAT	CTTTAACTTT	TTTTTTTTTT	TTTCTCCTTC	TACTTCTACT	21360
TGTTCTCACT	CTGCCACCAA	CGCGCTTTGT	ACATTGAATG	TGAGCTTTGT	TTTGCTTAAC	21420
AGACATATAT	TTTTTCTTTT	GGTTTTCGCT	GACATGGTTT	CCCTTTCTAT	CCGTGCAGGG	21480
TTCCAGACG	GCCTTTTGAG	AATAAAATGG	GAGGCCAGAA	CCAAAGTCTT	TTGAATAAAG	21540
CACCACAACT	CTAACCTGTT	TGGCTGTTTT	CCTTCCCAAG	GCACAGATCT	TTCCCAGCAT	21600
GGAAAAGCAT	GTAGCAGTTG	TAGGACACAC	TAGACGAGAG	CACCAGATCT	CATTGTGGGT	21660
GGTTGTGAAC	CACCCACCAT	GTGGTTGCC	GGGATTTGAA	CTCAGGATCT	TCAGAAGACG	21720
AGTCAGGGCT	CTAAACCGAT	GAGCCATCTC	TCCAGCCCTC	CTACATTCC	TCTTAAGGCA	21780
TGAATGATCC	CAGCATGGGA	AGACAGTCTG	CCCTCTTTGT	GGTATATCAC	CATATACTCA	21840
ATAAAATAAT	GAAATGAATG	AAGTCTCCAC	GTATTTATTT	CTTCGAGCTA	TCTAAATTCT	21900
CTCACAGCAC	CTCCCCCTCC	CCCACACTGC	CTTCTCCCT	ATGTTTGGGT	GGGGCTGGGG	21960
GAGGGGTGGG	GTGGGGGCG	GGATCTGCAT	GTCTTCTTGC	AGGTCTGTGA	ACTATTTGCG	22020
ATGGCCTGGT	TCTCTGAAC	GTTGAGCCTT	GTCTATCCAG	AGGCTGACTG	GCTAGTTTTC	22080
TACCTGAAGT	CCCTGAGTGA	TGATTTCCCT	GTGAATTC			22118

配列番号：17

配列の長さ：42999

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GCTGACACGC	TGTCCTCTGG	CGACCTGTCTG	TCCGAGAGGT	TGGGCCTCCG	GATGCGCGCG	60
GGGCTCTGGC	CTCACGGTGA	CCGGCTAGCC	GGCCGCGCTC	CTGCCTTGAG	CCGCTGCCG	120
CGGCCCGCGG	GCTTGTGTT	CTCTCGCGG	TCCGAGCGTC	CCGACTCCCG	GTGCCGGCCC	180
GGGTCCGGGT	CTCTGACCCA	CCCGGGGGCG	GCGGGGAAGG	CGGCGAGGGC	CACCGTGCCC	240
CGTGCGCTCT	CCGCTGCGGG	CGCCCGGGGC	GCCGCACAAC	CCCACCCGCT	GGCTCCGTGC	300
CGTGCGTCTC	AGGCGTTCTC	GTCTCCGCGG	GGTTGTCCGC	CGCCCTTCC	CCGGAGTGGG	360
GGGTGGCCGG	AGCCGATCGG	CTCGCTGGCC	GGCCGCGCTC	CGCTCCCGGG	GGGCTCTTCG	420
ATCGATGTGG	TGACGTCGTG	CTCTCCCGGG	CCGGGTCCGA	GCCGCGACGG	GCGAGGGGCG	480
GACGTTCTGT	GCGAACGGGA	CCGTCTTCT	CGCTCCGCCC	GCGCGGTCCC	CTCGTCTGCT	540
CCTCTCCCCG	CCCGCCGGCC	GGCGTGTGGG	AAGGCGTGGG	GTGCGGACCC	CGGCCCCGAC	600
TCGCCGTCCC	GCCCGCCGCC	TTCGCTTCGC	GGGTGCGGGC	CGGCGGGGTC	CTCTGACGCG	660
GCAGACAGCC	CTGCCTGTCTG	CCTCCAGTGG	TTGTGCACTT	GCGGGCGGGC	CCCCTCCGCG	720
GCGGTGGGGG	TGCCGTCCCG	CCGGCCCGTC	GTGCTGCCCT	CTCGGGGGGG	GTTTGCGCGA	780
GCGTCCGGCTC	CGCCTGGGCC	CTTGCGGTGC	TCCTGGAGCG	CTCCGGGTTG	TCCCTCAGGT	840
GCCCCAGGCC	GAACGGTGGT	GTGTGCTTCC	CGCCCCCGGC	GCCCCCTCCT	CCGGTCGCCC	900
CCGCGGTGTC	CGCGCGTGGG	TCCTGAGGGA	GCTCGTCGGT	GTGGGGTTTCG	AGGCGGTTTG	960
AGTGAGACGA	GACGAGACGC	GCCCCCTCCA	CGCGGGGAAG	GGCGCCCGCC	TGCTCTCGGT	1020
GAGCGCACGT	CCCGTGCTCC	CCTCTGGCGG	GTGCGCGCGG	GCCGTGTGAG	CGATCGCGGT	1080
GGGTTCCGGC	CGGTGTGACG	CGTGCGCCGG	CCGGCCCGCC	AGGGGCTGCC	GTTCTGCCTC	1140
CGACCGGTCTG	TGTGTGGGTT	GACTTCGGAG	GCGCTCTGCC	TCGGAAGGAA	GGAGGTGGGT	1200
GGACGGGGGG	GCCTGGTGGG	GTTGCGCGCA	CGCGCGCACC	GGCCGGGGCC	CCGCCCTGAA	1260

10

20

30

40

CGCGAACGCT	CGAGGTGGCC	GCGCGCAGGT	GTTTCCTCGT	ACCGCAGGGC	CCCCTCCCTT	1320
CCCCAGGCGT	CCCTCGGCGC	CTCTGCGGGC	CCGAGGAGGA	GCGGCTGGCG	GGTGGGGGGA	1380
GTGTGACCCA	CCCTCGGTGA	GAAAAGCCTT	CTCTAGCGAT	CTGAGAGGCG	TGCCTTGGGG	1440
GTACCGGATC	CCCCGGGCCG	CCGCTCTGT	CTCTGCCTCC	GTTATGGTAG	CGCTGCCGTA	1500
GCGACCCGCT	CGCAGAGGAC	CCTCCTCCGC	TCCCCCTCG	ACGGGGTTGG	GGGGGAGAAG	1560
CGAGGGTTCC	GCCGGCCACC	GCGGTGGTGG	CCGAGTGC GG	CTCGTCGCCT	ACTGTGGCCC	1620
GCGCCTCCCC	CTTCCGAGTC	GGGGGAGGAT	CCCGCCGGGC	CGGGCCCGGC	GCTCCCACCC	1680
AGCGGGTTGG	GACGCGGCGG	CCGCGGGGCG	GTGGGTGTGC	GCGCCCGGCG	CTCTGTCCGG	1740
CGCGTGACCC	CCTCCGTCCG	CGAGTCGGCT	CTCCGCCCGC	TCCCGTGCCG	AGTCGTGACC	1800
GGTGCCGACG	ACCGCGTTTG	CGTGGCACGG	GGTCGGGCC	GCCTGGCCCT	GGGAAAGCGT	1860
CCCACGGTGG	GGGCGCGCCG	GTCTCCCGGA	GCGGGACCGG	GTCCGAGGAT	GGACGAGAAT	1920
CACGAGCGAC	GGTGGTGGTG	GCGTGTCCGG	TTCGTGGCTG	CGGTCCGCTC	GGGGCCCCCG	1980
GTGGCGGGGC	CCCCGGGCTC	GCGAGGCGGT	TCTCGGTGGG	GGCCGAGGGC	CGTCCGGCGT	2040
CCCAGGCGGG	GCGCCGCGGG	ACCGCCCTCG	TGTCTGTGGC	GGTGGGATCC	CGCGGCCGTG	2100
TTTTCTGGT	GGCCCGGCCG	TGCTGAGGT	TTCTCCCCGA	GCCGCCGCCT	CTGCGGGCTC	2160
CCGGGTGCCC	TTGCCCTCGC	GGTCCCCGGC	CCTCGCCCGT	CTGTGCCCTC	TTCCCCGCCC	2220
CCCCCGGCTG	GATCCTCTTC	TTCCCCCGGC	CGGCTCACC	GGCTTCACGT	CCGTTGGTGG	2280
CCCCGCTGG	GACCGAACCC	GGCACC GCCT	CGTGGGGCGC	CGCCCGCGGC	CAGTGCATCGG	2340
CCCCGGCTCC	GCGTCCCCCG	GCGCGCGCCT	TGGGGACCGG	GTCGGTGGCG	CGCCGCGTGG	2400
GGCCCGGTGG	GCTTCCCGGA	GGGTTCGGGG	GGTCGGCCTG	CGGCGCGTGC	GGGGGAGGAG	2460
ACGGTTCCGG	GGGACCGGCC	GCGGCTGCGG	CGGCGGCGGT	GGTGGGGGGA	GCCGCGGGGA	2520
TCGCCGAGGG	CCGGTCGGCC	GCCCCGGGTG	CCCCGCGGTG	CCGCCGGCGG	CGGTGAGGCC	2580
CCGCGCGTGG	GTCCCGGCTG	CGGTCCGGCG	CGCTCGAGGG	GTCCCCGTGG	CGTCCCCTTC	2640
CCCCCGGGCC	GCCTTTCTCG	CGCCTTCCCC	GTCGCCCGGG	CCTCGCCCGT	GGTCTCTCGT	2700
CTTCTCCCGG	CCCGCTCTTC	CGAACCGGGT	CGGCGCGTCC	CCCGGGTGCG	CCTCGCTTCC	2760
CGGGCCTGCC	GCGGCCCTTC	CCCGAGGCGT	CCGTCCCGGG	CGTCGGCGTC	GGGGAGAGCC	2820
CGTCTCTCCC	GCGTGGCGTC	GCCCCGTTCG	GCGCGCGCGT	GCGCCCGAGC	GCGGCCCGGT	2880
GGTCCCTCCC	GGACAGGCGT	TCGTGCGACG	TGTGGCGTGG	GTCGACCTCC	GCCTTGCCCG	2940
TCGCTCGCCC	TCTCCCGGG	TCGGGGGGTG	GCGCCCGGGC	CGGGGCCTCG	GCCCCGCTCG	3000
CTGCCTCCCG	TCCCGGGCGG	GGGCGGGCGC	GCCGGCCGGC	CTCGGTCCGC	CTCCCTTGGC	3060
CGTCGTGTGG	CGTGTGCCAC	CCCTGCGCCG	GCGCCCGCCG	GCGGGGCTCG	GAGCCGGGCT	3120
TCGGCCGGGC	CCCGGGCCCT	CGACCGGACC	GGCTGCGCGG	GCGCTGCGGC	CGCACGGCGC	3180
GACTGTCCCC	GGGCCGGGCA	CCGCGGTCCG	CCTCTCGCTC	GCCGCCCGGA	CGTCGGGGCC	3240
GCCCCGCGGG	GCGGGCGGAG	CGCCGTCCCC	GCCTCGCCCG	CGCCCGCGGG	CGCCGGCCGC	3300
GCGCGCGCGC	GCGTGGCCGC	CGGTCCCTCC	CGGCCGCGGG	GCGCGGGTCG	GCCCGTCCCG	3360
CTCCTCGCGG	GCGGGCGCGA	CGAAGAAGCG	TCGCGGGTCT	GTGGCGCGGG	GCCCCCGGTG	3420
GTCGTGTGCG	GTGGGGGGCG	GGTGGTTGGG	GCGTCCGGTT	CGCCGCGCCC	CGCCCCGGCC	3480
CCACCGGTCC	CGGCCGCGCG	CCCCGCGCCC	GCTCGCTCCC	TCCCGTCCGC	CCGTCCGCGG	3540
CCCGTCCGTC	CGTCCGTCCG	TCGTCTCTCT	CGCTTGCGGG	GCGCCGGGCC	CGTCTCTCGC	3600
AGGCCCCCCC	GCCGCCCGTC	CGGCCGCGTC	GGGGGCTCGC	CGCGCTCTAC	CTTACCTACC	3660
TGGTTGATCC	TGCCAGTAGC	ATATGCTTGT	CTCAAAGATT	AAGCCATGCA	TGCTCTAAGTA	3720
CGCACGGCCG	GTACAGTGAA	ACTGCGAATG	GCTCATTAAT	TCAGTTATGG	TTCCTTTGGT	3780
CGCTCGCTCC	TCTCCTACTT	GGATAACTGT	GGTAATTCTA	GAGCTAATAC	ATGCCGACGG	3840
GCGCTGACCC	CCTTCGCGGG	GGGGATGCGT	GCATTTATCA	GATCAAAACC	AACCCGGTCA	3900
GCCCCCTCTC	GGCCCCGGCC	GGGGGGCGGG	CGCCGGCGGC	TTTGGTGACT	CTAGATAACC	3960
TCGGGCGGAT	CGCACGCCCC	CCGTGGCGGC	GACGACCCAT	TCGAACGTCT	GCCCTATCAA	4020
CTTTCGATGG	TAGTCGCCGT	GCCTACCATG	GTGACCACGG	GTGACGGGGA	ATCAGGGTTC	4080
GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACATCCA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	4140
AATTACCCAC	TCCCGACCCG	GGGAGGTAGT	GACGAAAAAT	AACAATACAG	GACTCTTTTCG	4200
AGGCCCTGTA	ATTGGAATGA	GTCCAATTTA	AATCCTTTAA	CGAGGATCCA	TTGGAGGGCA	4260
AGTCTGGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATTCCA	GCTCCAATAG	CGTATATTAA	AGTTGCTGCA	4320
GTTAAAAAGC	TCGTAGTTGG	ATCTTGGGAG	CGGGCGGGCG	GTCCGCCGCG	AGGCGAGCCA	4380
CCGCCCGTCC	CCGCCCCCTG	CCTCTCGGCG	CCCCCTCGAT	GCTCTTAGCT	GAGTGTCCCC	4440
CGGGGCCCCGA	AGCGTTTACT	TTGAAAAAAT	TAGAGTGTTT	AAAGCAGGCC	CGAGCCGCCT	4500
GGATAACGCA	GCTAGGAATA	ATGGAATAGG	ACCGCGGTTC	TATTTTGTGG	GTTTTTCGGAA	4560
CTGAGGCCAT	GATTAAGAGG	GACGGCCGGG	GGCATTCCGT	TTGCGCCGCT	AGAGGTGAAA	4620
TTCTTGGACC	GGCGCAAGAC	GGACCAGAGC	GAAAGCATTT	GCCAAGAATG	TTTTCATTAAT	4680
TCAAGAACGA	AAGTCGGAGG	TTCAAGACG	ATCAGATACC	GTCGTAGTTC	CGACCATAAA	4740
CGATGCCGAC	CGGCGATGCG	GCGGCGTTAT	TCCCATGACC	CGCCGGGCAG	CTTCCGGGAA	4800
ACCAAAGTCT	TTGGGTTCCG	GGGGGAGTAT	GGTTGCAAAAG	CTGAAACTTA	AAGGAATTGA	4860
CGGAAGGGCA	CCACCAGGAG	TGGAGCCTGC	GGCTTAATTT	GACTCAACAC	GGGAAACCTC	4920

10

20

30

40

ACCCGGCCCCG	GACACGGACA	GGATTGACAG	ATTGATAGCT	CTTTCTCGAT	TCCGTGGGTG	4980
GTGGTGCAATG	GCCGTTCTTA	GTTGGTGAG	CGATTTGTCT	GGTTAATTCC	GATAACGAAC	5040
GAGACTCTGG	CATGCTAACT	AGTTACGCGA	CCCCGAGCG	GTCGGCGTCC	CCCAACTTCT	5100
TAGAGGGACA	AGTGGCGTTC	AGCCACCCGA	GATTGAGCAA	TAACAGGTCT	GTGATGCCCT	5160
TAGATGTCCG	GGGCTGCACG	CGCGCTACAC	TGACTGGCTC	AGCGTGTGCC	TACCCCTACGC	5220
CGGCAGGCGC	GGGTAACCCG	TTGAACCCCA	TTCGTGATGG	GGATCGGGGA	TTGCAATTAT	5280
TCCCCATGAA	CGAGGGAATT	CCCGAGTAAG	TGCGGGTCAT	AAGCTTGCGT	TGATTAAGTC	5340
CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCGTCCGTA	CTACCGATTG	GATGGTTTAG	TGAGGCCCTC	5400
GGATCGGCCC	CGCCGGGGTC	GGCCACCGGC	CCTGGCGGAG	CGCTGAGAAG	ACGGTCGAAC	5460
TTGACTATCT	AGAGGAAGTA	AAAGTCGTAA	CAAGGTTTCC	GTAGGTGAAC	CTGCGGAAGG	5520
ATCATTAAACG	GAGCCCGGAG	GGCGAGGCCG	GCGGCGGCGC	CGCCGCCGCC	GCGCGCTTCC	5580
CTCCGCACAC	CCACCCCCCC	ACCGCGACGC	GGCGCGTGCG	CGGGCGGGGC	CCGCGTGCCC	5640
GTTTCGTTCCG	TCGCTCGTTC	GTTCCGCCGC	CGGCCCGGCC	GCCGCGAGAG	CCGAGAACTC	5700
GGGAGGGAGA	CGGGGGGGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAA	5760
AGAAGGGCGT	GTCGTTGGTG	TGCGCGTGTC	GTGGGGCCGG	CGGGCGGCGG	GGAGCGGTCC	5820
CCGGCCCGCG	CCCCGACGAC	GTGGGTGTCG	GCGGGCGCGG	GGGCGGTTCT	CGGCGGCGTC	5880
GCGGCGGGTC	TGGGGGGGTC	TGGGTGCCCT	CCTCCCCGCC	GGGGCCCGTC	GTCCGGCCCC	5940
GCCGCGCCCG	CTCCCCGTCT	TGGGGGCCGG	CCGGATTCCC	GTCCGCTCCG	CCGCGCCGCT	6000
CCGCGCCGCC	GGGCACGGCC	CCGCTCGCTC	TCCCCGGCCT	TCCCGCTAGG	GCGTCTCGAG	6060
GGTCGGGGGC	CGGACGCCGG	TCCCCTCCCC	CGCCTCCTCG	TCCGCCCCCC	CGCCGTCCAG	6120
GTACCTAGCG	CGTTCCGGCG	CGGAGGTTTA	AAGACCCCTT	GGGGGGATCG	CCCGTCCGCC	6180
CGTGGGTCCG	GGGCGGTGGT	GGGCCCGCGG	GGGAGTCCCC	TGGGAGGGGG	CCCGGCCCTT	6240
CCCCGCGCTC	CACCGCGGAC	TCCGCTCCCC	GGCCGGGGCC	GCGCCGCCGC	CGCGTCCGCG	6300
GCGGCCGTCG	GGTGGGGGCT	TTACCCGGCG	GCCGTCCGCG	GCTGCGCGCG	CGTGTGGCGT	6360
GCGCCCCGCG	CCGTGGGGGC	GGGAACCCCC	GGGCGCCTGT	GGGGTGGTGT	CCGCGCTCGC	6420
CCCCGCGTGG	GCGGCGCGCG	CCTCCCCGTG	GTGTGAAACC	TTCCGACCCC	TCTCCGGAGT	6480
CCGGTCCCGT	TTGCTGTCTC	GTCTGGCCGG	CCTGAGGCAA	CCCCCTCTCC	TCTTGGGCGG	6540
GGGGGGCGGG	GGGACGTGCC	GCGCCAGGAA	GGGCCTCCTC	CCGGTGCGTC	GTCCGGGACG	6600
CCCTCGCCAA	ATCGACCTCG	TACGACTCTT	AGCGGTGGAT	CACCTCGGCT	GTGCGTAGAT	6660
GAAGAACGCA	GCTAGCTGCG	AGAAATTAATG	TGAATTGCAG	GACACATTGA	TCATCGACAC	6720
TTCGAACGCA	CTTGCGGCC	CGGGTTCCTC	CCGGGGCTAC	GCCTGTCTGA	GCGTCCGCTT	6780
CCGATCAATC	GCCCCGGGGG	TGCCCTCCGG	CTCCTCGGGG	TGCGCGGCTG	GGGGTTCCCT	6840
CGCAGGGCCC	GCCGGGGGCC	CTCCGTCCCC	CTAAGCGCAG	ACCCGCGCGC	GTCCGCCCTC	6900
CTCTTGCCGC	CGCGCCCCGC	CCTTCCCCCT	CCCCCGCGCG	GCCCTGCGTG	GTACGCGCTC	6960
GGGTGGCGGG	GGGAGAGGGG	GGGCGCGCCC	GCGTGAGAGA	GACGGGGAGG	GCGGCGCGCG	7020
CGCCCGAAGA	CGGAGAGGGA	AAGAGAGAGC	CGGCTCGGGC	CGAGTTCCCG	TGGCCGCCGC	7080
CTGCGGTCCG	GGTTCTCTCC	TCGGGGGGCT	CCCTCGCGCC	GCGCGCGGCT	CGGGGTTCCG	7140
GGTTCGTCCG	CCCCGGCCCG	GTGGAAGGTC	CCGTGCCCCG	CGTCGTCTGC	GTCCGCGCTC	7200
GTCGCGCGTG	GGGGCGTGTT	GCGTGCGGTG	TGGTGCTGGG	GGAGGAGGAA	GGCGGGTCCG	7260
GAAGGGGAAG	GGTGCCGGCG	GGGAGAGAGG	GTCGGGGGAG	CGCGTCCCGG	TCGCGCGGCT	7320
TCCCGCCGCC	GCCCCCGGTC	GCGGCCCGGC	GTCGCCCGGA	CCGGCCGCTC	CCCGCCGCCG	7380
TCCTCTCTCC	CGCCGCCCTT	CCTCCGAGGC	CCCGCCCGTC	CTCCTCGCCC	TCCCCGCGCG	7440
TACGCGCGCG	CGCCCGCCCG	CCCGGCTCGC	CTCGCGCGCG	GTCGGCCGGG	GCCGGGAGCC	7500
CGCCCCGCGG	CCCGCCCGTG	GCCGCGGCGC	CGGGGTTCGC	GTGTCCCCCG	CGGCGACCCG	7560
CGGGACGCGG	CGGTGTCTGC	CGCCGTCTCG	CGCCCGCCTC	CGGCTCGCGG	CCGCGCCGCG	7620
CCGCGCCGGG	GCCCCGTCCC	GAGCTTCCCG	GTCGGGGCGG	CGCGGCTCCG	CCGCGCGCTC	7680
CTCGGACCCG	TCCCCCGGAC	CTCCGCGGGG	GAGACGCGCC	GGGGCGTGCG	GCGCCCGTCC	7740
CGCCCCCGGC	CCGTGCCCCT	CCCTCCGGTC	GTCCCGCTCC	GGCGGGGCGG	CGCGGGGGCG	7800
CCGTGCGCCG	CGCGCTCTCT	CTCCCGTCTC	CTCTCCCCCT	CGCCGGGGCC	GTCTCCCGAC	7860
GGAGCGTCCG	GCGGGCGGTC	GGGCGGCGCG	GATTCCGTCC	GTCCGTCCGC	CGAGCGGCC	7920
GTCCCCCTCC	GAGACGCGAC	CTCAGATCAG	ACGTGGCGAC	CCGCTGAATT	TAAGCATATT	7980
AGTCAGCGGA	GGAAAAGAAA	CTAACAGGA	TTCCCTCAGT	AACGGCGAGT	GAACAGGGAA	8040
GAGCCAGCG	CCGAATCCCC	GCCCCGCGGG	GCGCGGGACA	TGTGGCGTAC	GGAAAGACCCG	8100
CTCCCCGGCG	CCGCTCGTGG	GGGGCCCAAG	TCCTTCTGAT	CGAGGCCAG	CCCGTGGACG	8160
GTGTGAGGCC	GGTAGCGGCC	GGCGCGCGCC	CGGGTCTTCC	CGGAGTCGGG	TTGCTTGGGA	8220
ATGCAGCCCA	AAGCGGGTGG	TAAACTCCAT	CTAAGGCTAA	ATACCGGCAC	GAGACCGATA	8280
GTCAACAAGT	ACCGTAAGGG	AAAGTTGAAA	AGAACTTTGA	AGAGAGAGTT	CAAGAGGGCG	8340
TGAAACCGTT	AAGAGGTAAA	CGGGTGGGGT	CCCGCAGTC	CGCCCGGAGG	ATTCAACCCG	8400
GCGGCGGGTC	CGGCCGTGTC	GGCGGCCCCG	CGGATCTTTC	CCGCCCCCGG	TTCTTCCCGA	8460
CCCTTCCACC	CGCCCTCCCT	TCCCCCGCGG	CCCTTCTCTC	TCCTCCCCCG	AGGGGGCGGG	8520
CTCCGGCGGG	TGCGGGGGTG	GGCGGGCGGG	GCCGGGGGTG	GGGTGCGCGG	GGGACCGTCC	8580

10

20

30

40

CCCGACCGGC	GACCGGCCGC	CGCCGGGCGC	ATTTCCACCG	CGGCGGTGCG	CCGCGACCGG	8640
CTCCGGGACG	GCTGGGAAGG	CCCGGCGGGG	AAGGTGGCTC	GGGGGGCCCC	GTCCGTCCGT	8700
CCGTCTCTCT	CCTCCCCCGT	CTCCGCCCCC	CGGCCCCCGG	TCCTCCCTCG	GGAGGGCGCG	8760
CGGGTCGGGG	CGCGCGGGGC	GGCGCGGGTG	GGCGCGGGCG	CGGGGGCGGC	GGGACCGAAA	8820
CCCCCCCCGA	GTGTTACAGC	CCCCCGGCA	GCAGCACTCG	CCGAATCCCG	GGGCCGAGGG	8880
AGCGAGACCC	GTCGCCGCGC	TCTCCCCCTT	CCCGGCGCCC	ACCCCCGCGG	GGAATCCCCC	8940
GCGAGGGGGG	TCTCCCCCGC	GGGGGCGCGC	CGGCGTCTCC	TCGTGGGGGG	GCCGGGCCAC	9000
CCCTCCCACG	GCGCGACCGC	TCTCCCACCC	CTCTTCCCCG	CGCCCCCGCC	CCGCGACCGG	9060
GGGGGGTGCC	GCGCGCGGGT	CGGGGGGCGG	GGCGGACTGT	CCCCAGTGCG	CCCCGGGCGG	9120
GTCGCGCCGT	CGGGCCCAGG	GGAGGTTCTC	TCGGGGCCAC	GCGCGCGTCC	CCCGAAGAGG	9180
GGGACGGCGG	AGCGAGCGCA	CGGGGTGCGC	GCGGACGTCG	GCTACCCACC	CGACCCGTCT	9240
TGAAACACGG	ACCAAGGAGT	CTAACACGTG	CGCGAGTCGG	GGGCTCGCAC	GAAAGCCGCC	9300
GTGGCGCAAT	GAAGGTGAAG	GCCGGCGCGC	TCGCCGGCCG	AGGTGGGATC	CCGAGGCCCT	9360
TCCAGTCCGC	CGAGGGCGCA	CCACCGGCCC	GTCTCGCCCC	CCGCGCCGGG	GAGGTGGAGC	9420
ACGAGCGCAC	GTGTTAGGAC	CCGAAAGATG	GTGAACATAT	CCTGGGCAGG	GCGAAGCCAG	9480
AGGAAACTCT	GGTGGAGGTC	CGTAGCGGTC	CTGACGTGCA	AATCGGTCTG	CCGACCTGGG	9540
TATAGGGGCG	AAAGACTAAT	CGAACCATCT	AGTAGCTGGT	TCCCTCCGAA	GTTTCCCTCA	9600
GGATAGCTGG	CGCTCTCGCA	GACCCGACGC	ACCCCGGCCA	TCGAGTTTTA	TCCGGTAAAG	9660
CGAATGATTA	GAGGTCTTGG	GGCCGAAACG	ATCTCAACCT	ATTCTCAAAC	TTTAAATGGG	9720
TAAGAAGCCC	GGCTCGCTGG	CGTGGAGCCG	GGCGTGGAAT	GCGAGTGCCT	AGTGGGCCAC	9780
TTTTGGTAAG	CAGAACTGGC	GCTGCGGGAT	GAACCGAACG	CCGGGTAAAG	GCGCCCCGAT	9840
CCGACGCTCA	TCAGACCCCA	GAAAAGGTGT	TGGTTGATAT	AGACAGCAGG	ACGGTGGCCA	9900
TGGAAGTCGG	AATCCGCTAA	GGAGTGTGTA	ACAACCTACC	TGCCGAATCA	ACTAGCCCTG	9960
AAAATGGATG	GCGCTGGAGC	GTCGGGCCCA	TACCCGGCCG	TCGCCGGCAG	TCGAGAGTGG	10020
ACGGGAGCGG	CGGGGGCGGC	GCGCGCGCGC	GCGCGTGTGG	TGTGCGTCGG	AGGGCGGCGG	10080
CGGCGGCGGC	GGCGGGGGTG	TGGGGTCCTT	CCCCCGCCCC	CCCCCCCACG	CCTCCTCCCC	10140
TCCTCCCGCC	CACGCCCCGC	TCCCCGCCCC	CGGAGCCCCG	CGGACGCTAC	GCCGCGACGA	10200
GTAGGAGGGC	CGCTGCGGTG	AGCCTTGAAG	CCTAGGGCGC	GGGCCCCGGT	GGAGCCGCGG	10260
CAGGTGCAGA	TCTTGGTGGT	AGTAGCAAAT	ATTCAAACGA	GAACTTTGAA	GGCCGAACTG	10320
GAGAAGGGTT	CCATGTGAAC	AGCAGTTGAA	CATGGGTCAG	TCGGTCCTGA	GAGATGGGCG	10380
AGCGCCGTTT	CGAAGGGACG	GGCGATGGCC	TCCGTTGCCC	TCGGCCGATC	GAAAGGGAGT	10440
CGGGTTCAGA	TCCCCGAATC	CGGAGTGGCG	GAGATGGGCG	CCGCGAGGCG	TCCAGTGCGG	10500
TAACGCGACC	GATCCCGGAG	AAGCCGGCGG	GAGCCCCGGG	GAGAGTTCTC	TTTTCTTTGT	10560
GAAGGGCAGG	GCGCCCTGGA	ATGGGTTCGC	CCCGAGAGAG	GGGCCCCGTG	CTTGGAAGAC	10620
GTCCGCGGTC	CGGCGGCGTC	CGGTGAGCTC	TCCGTGGCCC	TTGAAAATCC	GGGGGAGAGG	10680
GTGTAAATCT	CGCGCCGGGC	CGTACCCATA	TCCGCAGCAG	GTCTCCAAGG	TGAACAGCCT	10740
CTGGCATGTT	GGAACAATGT	AGGTAAGGGA	AGTCGGCAAG	CCGGATCCGT	AACTTCGGGA	10800
TAAGGATTGG	CTCTAAGGGC	TGGGTGCGTC	GGGCTGGGGC	GCGAAGCGGG	GCTGGGCGCG	10860
CGCCGCGCCT	GGACGAGGCG	CGCGCCCCCC	CCACGCCCGG	GGCACCCCCC	TCGCGGCCCT	10920
CCCCCGCCCC	ACCCGCGCGC	GCCGCTCGCT	CCCTCCCCAC	CCCGCGCCCT	CTCTCTCTCT	10980
CTCTCCCCCG	CTCCCCGTCC	TCCCCCTCC	CCGGGGGAGC	GCCGCGTGCG	GCCGCGGCGG	11040
GGGGAGAAGG	GTCGGGGCGG	CAGGGGCCGC	GCGGCGGCCG	CCGGGGCGGC	CGGCGGGGGC	11100
AGGTCCCCGC	GAGGGGGGCC	CCGGGGACCC	GGGGGGCCGG	CGGCGGCGCG	GACTCTGGAC	11160
GCGAGCTGGG	CCCTTCCCCG	GGATCGCCCC	AGCTGCGGCG	GGCGTCGCGG	CCGCCCCCGG	11220
GGAGCCCCGG	GGCGGCGCGG	CGCGCCCCCC	ACCCCCACCC	CACGTCTCGG	TCGCGCGCGC	11280
GTCCGCTGGG	GGCGGGAGCG	GTCGGGCGCG	GGCGGTGCGG	GGGCGGCGGG	GCGGGGCGGT	11340
TCGTCCCCCC	GCCCTACCCC	CCCGGCCCGG	TCCGCCCCCC	GTTCCCCCCT	CTCTCTCGGC	11400
GCGCGGCGGC	GGCGGCGGCA	GGCGGCGGAG	GGGCGCGGGG	CCGGTCCCCC	CCGCCGGGTC	11460
CGCCCCCGGG	GCGCGCGGTC	CGCGCGCGCC	TCGCCTCGGC	CGGCGCCTAG	CAGCCGACTT	11520
AGAACTGGTG	CGGACCAGGG	GAATCCGACT	GTTTAATTAA	AACAAAGCAT	CGCGAAGGCC	11580
CGCGGCGGGT	GTTGACGCGA	TGTGATTTCT	GCCCAGTGCT	CTGAATGTCA	AAGTGAAGAA	11640
ATTCAATGAA	GCGCGGGTAA	ACGGCGGGAG	TAACATATGAC	TCTCTTAAGG	TAGCCAAATG	11700
CCTCGTCATC	TAATTAGTGA	CGCGCATGAA	TGGATGAACG	AGATTCCCAC	TGTCCCTACC	11760
TACTATCCAG	CGAAACCACA	GCCAAGGGAA	CGGGCTTGCC	GGAATCAGCG	GGGAAAGAAG	11820
ACCCTGTTGA	GCTTGACTCT	AGTCTGGCAC	GGTGAAGAGA	CATGAGAGGT	GTAGAATAAG	11880
TGGGAGGCCC	CCGGCGCCCC	CCCGGTGTCC	CCGCGAGGGG	CCCGGGGCGG	GGTCCGCGGC	11940
CCTGCGGGCC	GCCGGTGAAA	TACCACTACT	CTGATCGTTT	TTTCACTGAC	CCGGTGAGGC	12000
GGGGGJGCGA	GCCCGAGGGG	CTCTCGCTTC	TGGCGCCAAG	CGCCCGCCCG	GCCGGGCGCG	12060
ACCCGCTCCG	GGGACAGTGC	CAGGTGGGGA	GTTTGACTGG	GGCGGTACAC	CTGTCAAACG	12120
GTAACGCAGG	TGTCCTAAGG	CGAGCTCAGG	GAGGACAGAA	ACCTCCCGTG	GAGCAGAAGG	12180
GCAAAAGCTC	GCTTGATCTT	GATTTTCAGT	ACGAATACAG	ACCGTGAAAG	CGGGGCCTCA	12240

10

20

30

40

CGATCCTTCT	GACCTTTTGG	GTTTTAAGCA	GGAGGTGTCA	GAAAAGTTAC	CACAGGGATA	12300
ACTGGCTTGT	GGCGGCCAAG	CGTTCATAGC	GACGTCGCTT	TTTGATCCTT	CGATGTCGGC	12360
TCTTCTATC	ATTGTGAAGC	AGAATTCGCC	AAGCGTTGGA	TTGTTACCCC	ACTAATAGGG	12420
AACGTGAGCT	GGGTTTAGAC	CGTCGTGAGA	CAGGTTAGTT	TTACCCTACT	GATGATGTGT	12480
TGTTGCCATG	GTAATCCTGC	TCAGTACGAG	AGGAACCGCA	GGTTCAGACA	TTTGGTGTAT	12540
GTGCTTGGCT	GAGGAGCCAA	TGGGGCGAAG	CTACCATCTG	TGGGATTATG	ACTGAACGCC	12600
TCTAAGTCAG	AATCCC GCCC	AGGCGAACGA	TACGGCAGCG	CCGCGGAGCC	TCGGTTGGCC	12660
TCGGATAGCC	GGTCCCCCGC	CTGTCCCCGC	CGGCGGGCCG	CCCCCCCCCTC	CACGCGCCCC	12720
GCCGCGGGAG	GGCGCGTGCC	CCGCGCGCGC	CCGGGACC GG	GGTCCGGTGC	GGAGTGCCCT	12780
TCGTCTCTGG	AAACGGGGCG	CGGCCGGA	GGCGGCCGCC	CCCTCGCCCC	TCACGCACCG	12840
CACGTTCGTG	GGGAACCTGG	CGTTAAACCA	TTCGTAGACG	ACCTGCTTCT	GGGTCGGGGT	12900
TTCTGTACGT	GCAGAGCAGC	TCCCTCGCTG	CGATCTATTG	AAAGTCAGCC	CTCGACACAA	12960
GGGTTTGTCC	GCGCGCGCGT	GCGTGCGGGG	GGCCCCGGCG	GCGTGCGCGT	TCGGCGCCGT	13020
CCGTCTTCC	GTCGTCTTTC	CTCCCTCCCC	GCCTCTCCCC	CCGACCGCGG	CGTGGTGGTG	13080
GGGTGGGGGG	GAGGGCGCGC	GACCCCGGTC	GGCCGCCCCG	CTTCTTCGGT	TCCCGCCTCC	13140
TCCCCGTTCA	CGCCGGGGCG	GCTCGTCCGC	TCCGGGCGCG	GACGGGGTCC	GGGGAGCGTG	13200
GTTTGGGAGC	CGCGGAGGCG	CCGCGCCGAG	CCGGCCCCCG	TGGCCCCGCC	GTCCCCGTCC	13260
CGGGGGTTGG	CCGCGCGGCG	CGGTGGGGGG	CCACCCGGGG	TCCCGGCCCT	CGCCGCTCCT	13320
TCCTCTCGC	TCCTCCGCAC	GGGTGACCCG	ACGAACCGCG	GGTGGCGGGC	GGCGGGCGGC	13380
GAGCCCCACG	GGCGTCCCCG	CACCCGGCCG	ACCTCCGCTC	GCGACCTCTC	CTCGTCCGGG	13440
CCTCCGGGGT	CGACCGCCTG	CGCCCGCGGG	CGTGAGACTC	AGCGGCGTCT	CGCCGTGTCC	13500
CGGGTCGACC	GCGGCC'TTCT	CCACCGAGCG	GCGGTGTAGG	AGTGCCCGTC	GGGACGAACC	13560
GCAACCGGAG	CGTCCCCGTC	TCGGTCGGCA	CCTCCGGGGT	CGACCAGCTG	CCGCCCGCGA	13620
GCTCCGGACT	TAGCCGGCGT	CTGCACGTGT	CCCGGGTCGA	CCAGCAGGCG	GCCGCCGGAC	13680
GCAGCGGCGC	ACGCACGCGA	GGGCGTCGAT	TCCCTTTCGC	GCGCCCGCGC	CTCCACCGGC	13740
CTCGGCCCGC	GGTGGAGCTG	GGACCACGCG	GAAC'TCCCTC	TCCCACATTT	TTTTTCAGCCC	13800
CACCGCGAGT	TTGCGTCCGC	GGGACCTTTA	AGAGGGAGTC	ACTGCTGCCG	TCAGCCAGTA	13860
CTGCCTCCTC	CTTTTTCGCT	TTTAGGTTTT	GCTTGCCCTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	13920
TTTTTTCTTT	CTTCTCTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CGCTTGTCTT	13980
CTTCTGTGT	TCTCTTCTTG	CTCTTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTGT	14040
CTCTCGCTCT	CGCCCTCTCT	CTCTTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTG	TCTCTCGCTC	14100
TCGCCCTCTC	TCTCTCTCTT	CTCTCTGTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	14160
GTCGCTCTCG	CCCTCTCTCG	CTCTCTCTGT	CTCTGTCTGT	GTCTCTCTCT	CTCCCTCCCT	14220
CCCTCCCTCC	CTCCCTCCCT	CCCTCCCTTT	CCTTGGCGCC	TTCTCGGCTC	TTGAGACTTA	14280
GCCGCTGTCT	CGCCGTACCC	CGGGTCGACC	GGCGGGCCTT	CTCCACCGAG	CGGCGTGCCA	14340
CAGTGCCCGT	CGGGACGAGC	CGGACCCGCC	GCGTCCCCGT	CTCGGTCGGC	ACCTCCGGGG	14400
TCGACCAGCT	GCCGCCCGCG	AGCTCCGGAC	TTAGCCGGCG	TCTGCACGTG	TCCCGGGTCG	14460
ACCAGCAGGC	GGCCGCCGGA	CGCAGCGGCG	CACCGACGGA	GGGCGCTGAT	TCCCGTTTAC	14520
GCGCCCGCGC	CTCCACCGGC	CTCGGCCCGC	CGTGGAGCTG	GGACCACGCG	GAAC'TCCCTC	14580
TCCTACATTT	TTTTTCAGCC	CACCGCGAGT	TTGCGTCCCG	GGGACCTTTA	AGAGGGAGTC	14640
ACTGCTGCTT	TCAGCCAGTA	CTGCCCTCTC	CTTTTTCGCT	TTTAGGTTTT	GCTTGCCTTT	14700
TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	14760
TTCTTTCTTT	CTTTCTCTCT	CGCTCTCTCG	CTCTCTCCCT	CGCTCGTTTC	TTTCTTTCTC	14820
TTTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTGTCTCTC	GCTCTCGCCC	TCTCTCTCTC	14880
TTTCTCTCTC	TCTCTGTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	CCTCCCTCCC	14940
TCCCCCTCCC	TCCCTCTCTC	CCCTTCCCTG	GCGCCTTCTC	GGCTCTTGAG	ACTTAGCCGC	15000
TGTCTCGCCG	TGTCCCGGGT	CGACCGGCGG	GCCTTCTCCA	CCGAGCGGCG	TGCCACAGTG	15060
CCCGTCGGGA	CGAGCCGGAC	CCGCCGCGTC	CCCGTCTCGG	TCGGCACCTC	CGGGGTCGAC	15120
CAGTGCCCGC	CCGCGAGCTC	CGGACTTAGC	CGGCGTCTGC	ACGTGTCCCC	GGTCGACCAG	15180
CAGGCGGCCG	CCGGACGCTG	CGGCGCACCG	ACGCGAGGGC	GTCGATTCCG	GTTACGCGC	15240
CGGCGACCTC	CACCGGCCTC	GGCCCGCGGT	GGAGCTGGGA	CCACGCGGAA	CTCCCTCTCC	15300
CACATTTTTT	TCAGCCCCAC	CGCGAGTTTG	CGTCCGCGGG	ACTTTTAAGA	GGGAGTCACT	15360
GCTGCCGTCA	GCCAGTAATG	CTTCCCTCCTT	TTTTTGCTTTT	TGGTTTTGCC	TTGCGTTTTT	15420
TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	15480
TCTCTGTCTC	TCTCTCTCTG	TCTCTCTCCC	CTCCCTCCCT	CCTTGGTGCC	TTCTCGGCTC	15540
GCTGCTGCTG	CTGCCTCTGC	CTCCACGGTT	CAAGCAAACA	GCAAGTTTTT	TATTTTCGAGT	15600
AAAGACGTAA	TTTACCATTT	TTGGCCGGGG	TGGTCTCGAA	CTCCCGACCT	AGTGATCCGC	15660
CCGCCTCGGC	CTCCCAAAGA	CTGCTGGGAG	TACAGATGTG	AGCCACCATG	CCCGGCCGAT	15720
TCCTTCCTTT	TTTCAATCTT	ATTTCTTGAA	CGCTGCCGTG	TATGAACATA	CATCTACACA	15780
CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACACA	CACACACCCC	GTAGTGATAA	15840
AACTATGTAA	ATGATATTTT	CATAATTAAT	ACGTTTATAT	TATGTTACTT	TTAATGGATG	15900

10

20

30

40

AATATGTATC	GAAGCCCCAT	TTCATTTACA	TACACGTGTA	TGTATATCCT	TCCTCCCTTC	15960
CTTCATTCAT	TATTTATTAA	TAATTTTCGT	TTATTTATTT	TCTTTTCTTT	TGGGGCCGGC	16020
CCGCTTGGT	TTCTGTCTCT	GCGCTCTGGT	GACCTCAGCC	TCCCAAATAG	CTGGGACTAC	16080
AGGGATCTCT	TAAGCCCGGG	AGGAGAGGTT	AACGTGGGCT	GTGATCGCAC	ACTTCCACTC	16140
CAGCTTACGT	GGGCTGCGGT	GCGGTGGGGT	GGGGTGGGGT	GGGGTGGGGT	GCAGAGAAAA	16200
CGATTGATTG	CGATCTCAAT	TGCCTTTTAG	CTTCATTCAT	ACCCTGTTAT	TTGCTCGTTT	16260
ATTCTCATGG	GTTCTTCTGT	GTCATTGTCA	CGTTCATCGT	TTGCTTGCCT	GCTTGCCTGT	16320
TTATTTCCCT	CCCTCCTTCC	TTCTTTCCTT	CCTTCCTTCC	TTCTTTCCTT	CCCTCCCTTA	16380
CTGGCAGGGT	CTTCTCTGT	CTCTGCCGCC	CAGGATCACC	CCAACCTCAA	CGCTTTGGAC	16440
CGACCAAACG	GTCGTTCTGC	CTCTGATCCC	TCCCATCCCC	ATTACCTGAG	ACTACAGGCG	16500
CGCACCACCA	CACCGGCTGA	CTTTTATGTT	GTTTCTCATG	TTTTCCGTAG	GTAGGTATGT	16560
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTATCT	16620
ATGTATGTAC	GTATGTATGT	ATGTATGTGA	GTGAGATGGG	TTTCGGGGTT	CTATCATGTT	16680
GCCCCACGCTG	GTCTCGAACT	CCTGTCTCTA	AGCAATCCGC	CTGCCTGCCT	CGGCCGCCCA	16740
CACTGCTGCT	ATTACAGGCG	TGAGACGCTG	CGCCTGGCTC	CTTCTACATT	TGCCTGCCTG	16800
CCTGCCTGCC	TGCCCTGCCA	TCAATCGTCT	TCTTTTATAG	ACGGATGTCT	TCTCGCTTTA	16860
TTGTCCATGT	TCTGGGCACA	CGTGGTCTCT	TTTCAAACCT	CTATGATTAT	TATTATTGTA	16920
GGCGTCATCT	CACGTGTCTA	GGTGTATCTG	ACTTTTATAG	CTCCAGAGAT	CCTCCCGCAT	16980
CGGCCTCCCG	GAGTGTCTGT	ATGACACGCG	TGGGCACGGT	ACGCTCTGGT	CGTGTCTGTC	17040
GTGGGTCCGT	TCTTTCCGTT	TTTAATACGG	GGACTGCGAA	CGAAGAAAAT	TTTCAGACGC	17100
ATCTCACCBA	TCCGCCTTTT	CGTTCTTTCT	TTTTATTCTC	TTTAGACGGA	GTTTCACTCT	17160
TGTCGCCCCAG	GGTGGAGTAC	GATGGCGGCT	CTCGGCTCAC	CGCACCTCC	GCCTCCAGG	17220
TTCAAGTGAT	TCTCTGCCCT	CAGCCTTCCC	GAGTAGCTGG	AATGACAGAG	ATGAGCCATC	17280
GTGCCCCGCT	AATTTTTCTA	TTTTTAGTAG	AGATGGGGTT	TCTCCATCTT	GGTCAGGCTG	17340
GTCTTCAACT	TCCGACCGTT	GGAGAATCTT	AACTTTCTTG	GTGGTGGTTG	TTTTCTTTT	17400
TCTTTTTTTT	TCTTTTCTTT	TCTTTCTCTC	TCCTCCCCCC	CCCCCCCCC	TTGTCGTCGT	17460
CCTCTCTCTC	CTCTCTCTCC	TCCTCTCTCT	CCTCTCTCTC	CTCTCTCTCC	TCTTTCAATT	17520
CTTTTCAGCTG	GGCTCTCTTA	CTTGTGTTTG	TCTGTGTGCTC	ACGCTGGTCT	CAAACCTCTG	17580
GCCTTGACTC	TTCTCCCGTC	ACATCCGCGG	TCTGGTTGTT	GAAATGAGCA	TCTCTCGTAA	17640
AATGGAAGAG	ATGAAAGAAA	TAAACACGAA	GACGGAAAGC	ACGGTGTGAA	CGTTTCTCTT	17700
GCCGTCTCCC	GGGGTGTACC	TTGGACCCGG	AAACACGGAG	GGAGCTTGGC	TGAGTGGGTT	17760
TTCCGGTGCCG	AAACCTCCCG	AGGGCCTCCT	TCCCTCTCCC	CCTTGTCCCC	GCTTCTCCGC	17820
CAGCCGAGGC	TCCCACCGCC	GCCCCTGGCA	TTTTCATAG	GAGAGGTATG	GGAGAGGACT	17880
GACACGCCTT	CCAGATCTAT	ATCCTGCCGG	ACGTCTCTGG	CTCGGCGTGC	CCCACCGGCT	17940
ACCTTGCCACC	TTCCAGGGAG	CTCTGAGGCG	GATGCGACCC	CCACCCCCC	TGCACCTCCC	18000
GCTACCCCTCC	CCCGGCTGGC	CTTTGCCGGG	CGACCCACAG	GGAACCGCGT	TGATGCTGCT	18060
TCCGATCCTC	CGGCGAAGAC	TTCCACCGGA	TGCCCCGGGT	GGGCCGGTTG	GGATCAGACT	18120
GGACCACCCC	GGACCGTGCT	GTTCTTGGGG	GTGGGTTGAC	GTACAGGGTG	GACTGGCAGC	18180
CCCAGCATTG	TAAAGGGTGC	GTGGGTATGG	AAATGTCACC	TAGGATGCCC	TCCTTCCCTT	18240
CGGTCTGCCCT	TCAGCTGCCCT	CAGGCGTGAA	GACAACCTTC	CATCGGAACC	TCTTCTCTTC	18300
CCTTTCTCCA	GCACACGAT	GAGACGACG	AGAGGGAGAA	ACAGCTCAAT	AGATACCGCT	18360
GACCTTCATT	TGTGGAATCC	TCAGTCATCG	ACACACAAGA	CAGGTGACTA	GGCAGGGACA	18420
CAGATCAAAC	ACTATTTCCG	GGTCTCTCGT	GTGGGATTGG	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	18480
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCGCACGC	GCACGCGCGC	ACACACACAC	ACAATTTCCA	18540
TATCTAGTTT	ACAGAGCACA	CTCACTTCCC	CTTTTCACAG	TACGCAGGCT	GAGTAAAACG	18600
CGCCCCACCC	TCCACCCGTT	GGCTGACGAA	ACCCCTTCTC	TACAATTGAT	GAAAAAGATG	18660
ATCTGGGCCG	GGCACGCTAG	CTCACGCTG	TCACTCCGGC	ACTTTGGGAG	GCCGAGGCGG	18720
GTGGATCGCT	TGGGGCCGGG	AGTTCGAGAC	CAGGCTGGCC	GACGTGGCGA	AACCCCGTCT	18780
CTCTGAAAAA	TAGAACGATT	AGCCGGGCCCT	GGTGGCGTGG	GCTTGGAATC	ACGACCGCTC	18840
GGGAGACTGG	GGCGGGCGAC	TTGTTCCAAC	CGGGGAGGCC	GAGGCCGCGA	TGAGCTGAGA	18900
TCCGTGCCGTG	GCGATGCGGC	CTGGATGACG	GAGCGAGACC	CCGTCTCGAG	AGAATCATGA	18960
TGTTATTATA	AGATGAGTTG	TGCGCGGTGA	TGGCCGCTG	TAGTCGCGGC	TACTCGGGAG	19020
GCTGAGACGA	GGAGAAGATC	ACTTGAGGCC	CCACAGGTCG	AGGCTTCGGT	CGGCCGTGAC	19080
CCACTGTATC	CTGGGCAGTC	ACCGGTCAAG	GAGATATGCC	CCTTCCCGCT	TTGCTTTTCT	19140
TTTCTTCCCT	TCTCTTTTCT	TCTTTTGTCT	TCTCTTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	19200
TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTTTCTTTT	CTCTCTTCCC	CTCTTTCTTT	CCTGCCTTCC	19260
TGCTTTTCTT	CTTTTCTTCT	TTCTCTCCCT	CCTCCCTTCC	TTCTTTCCCT	CCGCCTCAGC	19320
CTCCCAAAGT	GCTGGGATGA	CTGGCGGGAG	GCACCATGCC	TGCTTGCCCC	AAAGAGACCC	19380
TCTTGGAAG	TGAGACGCAG	AGAGCGCCTT	CCAGTGATCT	CATTGACTGA	TTTAGAGACG	19440
GCATCTCGCT	CCGTCACCCC	GGCAGTGGTG	CCGTGCTAAC	TCACTCCCTG	CAGCGTGGAC	19500
GCTCCTGGAC	TCGAGCGATC	CTTCCACCTC	AGCCTCCAGA	GTACAGAGCC	TGGGACCGCG	19560

10

20

30

40

GGCACGCGCC	ACTGTGCCCA	CACCGTTTTT	AATTGTTTTT	TTTTCCCCCG	AGACAGAGTT	19620
TCACTCTCGT	GGCCTAGACT	GCAGTGCGGT	GGCGCGATCT	TGGCTCACCG	CAACCTCTGC	19680
CTCCCGGTTT	CAAGCGATTG	TCCTGCATCG	GCCTCCTGAG	TAGCCGGGAT	TGCGGGCATG	19740
CGCTGCCACG	TCTGGCTGAT	TTCTGATTTT	TAGTGGAGAC	GGGGCTTCTC	CATGTGATC	19800
GGGCTGGTTT	CGAACTCCCG	ACCTCAGGTG	ATCCGCCCTC	CCCGGCCCTC	GGAAGTGCTG	19860
GGATGACAGG	CGTGAGCCAC	CGCGCCCCGG	CTTCATTTTT	AAATGTTTTT	CCACAGACGG	19920
GGTCTCATCA	TTTCTTTGCA	ACCCTCCTGC	CCGGCGTCTC	AAAGTGCTGG	CGTGACGGGC	19980
GTGAGCCACT	GCGCCTGGAC	TCCGGGGAAT	GACTCACGAC	CACCATCGCT	CTACTGATCC	20040
TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTC	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTC	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTGA	20100
TGAATTATCT	TATGATTTAT	TTGTGTAATT	ATTTTCAGAC	GGAGTCTCGC	TCTGGGCGGG	20160
GCGAGGCGAG	GCGAGGCACA	GCGCATCGCT	TTGGAAGCCG	CGGCAACGCC	TTTCAAAGCC	20220
CCATTTCGTAT	GCACAGAGCC	TTATTCCCTT	CCTGGAGTTG	GAGCTGATGC	CTTCCGTCAG	20280
CTTGGGCTTC	TCTCCATTG	GAAGCTTGAC	AGGCGCAGGG	CCACCCAGAG	GCTGGCTGCG	20340
GCTGAGGATT	AGGGGGTGTG	TTGGGGCTGA	AAACTGGGTC	CCCTATTTTT	GATACCTCAG	20400
CCGACACATC	CCCCGACCGC	CATCGCTTGC	TGCGCCCTCTG	AGATCCCCCG	CCTCCACCGC	20460
CTTGACAGGCT	CACCTCTTAC	TTTCATTTCT	TCCTTTCTTG	CGTTTGAGGA	GGGGGTGCGG	20520
GAATGAGGGT	GTGTGTGGGG	AGGGGGTGCG	GGGTGGGGAC	GGAGGGGAGC	GTCCTAAGGG	20580
TCGATTTAGT	GTCTATGCTC	TTTCACCACC	ACCACCACCA	CCGAAGATGA	CAGCAAGGAT	20640
CGGCTAAATA	CCGCGTGTTC	TCATCTAGAA	GTGGGAACCT	ACAGATGACA	GTTCTTGAT	20700
GGGCAGAACG	AGGGGGACCG	GGGACGCGGA	AGTCTGCTTG	AGGGAGGAGG	GGTGAAGGA	20760
GAGACAGCTT	CAGGAAGAAA	ACAAAACACG	AATACTGTCTG	GACACAGCAC	TGACTACCCG	20820
GGTGATGAAA	TCATCTGCAC	ACTGAACACC	CCCGTCACAA	GTTTACCTAT	GTCACAATCT	20880
TGCACATGTA	TCGCTTGAAC	GACAAATAAA	AGTTAGGGGG	GAGAAGAGAG	GAGAGAGAGA	20940
GAGAGAGAGA	GACAGAGAGA	GACAGAGAGA	GAGAGAGAGG	AGGGAGAGAG	GAAAACGAAA	21000
CACCACCTCC	TTGACCTGAG	TCAGGGGGTT	TCTGGCCTTT	TGGGAGAACG	TTCAGCGACA	21060
ATGCAGTATT	TGGGCCCCGT	CTTTTTTTTT	CTTCTTCTTT	TCTTTCTTTT	TTTTTGACT	21120
GAGTCTCTCT	CGCTCTGTCA	CCCAGGCTGC	GGTCGCGGTG	GCGCTCTCTC	GGCTCACTGA	21180
AACCTCTGCT	TCCCGGGTTC	CAGTGATTCT	TCTTCGGTAG	CTGGGATTAC	AGGCGCACAC	21240
CATGACGGCG	GGCTCATATT	CCTATTTTCA	GAGAGACGG	GGTTTCTCCA	CGTTGGCCAC	21300
GCTGGTCTCG	AACTCCTGAC	CTCAAATGAT	CCCGCTTCTC	GGGCTCCCA	AAGTCTGGA	21360
AACGACAGGC	CTGAGCCGCC	GGGATTTTCA	CCTTTAAAG	CGCGGCCCTG	CCACCTTTCTG	21420
CTGTGGCCCT	TACGCTCAGA	ATGACGTGTC	CTCTCTGCCG	TAGGTTGACT	CCTTGAGTCC	21480
CCTAGGCCAT	TGCACTGTAG	CCTGGGCAGC	AAGAGCCAAA	CTCCGNCCCC	CCACCTCTCTC	21540
GCGCACATAA	TAACATACTA	ACAACTAATC	TAACATACTA	AACTAACTAA	CTAACTAAAA	21600
TCTCTACACG	TCACCCATAA	GTGTGTGTTT	CCGTGAGAGT	GATTTCTAAG	AAATGGTACT	21660
GTAÇACTGAA	CGCAGTGGCT	CACGTCTGTC	ATCCCCAGGT	CAGGAGTTCTG	AGACCAGCCC	21720
GGCCAACGTG	GTGAAACCCC	GTCTCTACTG	AAAATACGAA	ATGGAGTCAG	GCGCCGTGGG	21780
GCAGGCACCT	GTAACCCACG	CTACTCGGGA	GGCTGGGGTG	GAAGAATTGC	TTGAACCTGG	21840
CAGGCG3AGG	CTGCAGTGAC	CCAAGATCGC	ACCACCTGCAC	TACAGCCTGG	GCGACAGAGT	21900
GAGACCCGGT	CTCCAGATAA	ATACGTACAT	AAATAAATAC	ACACATACAT	ACATACATAC	21960
ATACATACAT	ACATACATAC	ATCCATGCAT	ACAGATATAC	AAGAAAGAAA	AAAAGAAAAG	22020
AAAAGAAAAG	GAAAATGAAA	GAAAAGGCAC	TGTATTGCTA	CTGGGCTAGG	GCCTTCTCTC	22080
TGTCTGTTTC	TCTCTGTTCG	TCTCTGTCTT	TCTCTCTGTG	TCTCTTTCTC	TGTCTGTCTG	22140
TCTCTTTCTT	TCTCTCTGTC	TCTGTCTCTG	TCTTTGTCTC	TCTCTCTCCC	TCTCTGCCTG	22200
TCTCACTGTG	TCTGTCTTCT	GTCTTACTCT	CTTTCTCTCC	CCGTCTGTCT	CTCTCTCTCT	22260
CTCTCCCTCC	CTGTTTGTTC	CTCTCTCTCC	CTCCCTGTCT	GTTTCTCTCT	CTCTCTTTCT	22320
GTCTGTTTCT	GTCTCTCTCT	GTCTGTCTAT	GTCTTTCTCT	GTCTGTCTCT	TTCTCTGTCT	22380
GTCTGCCTCT	CTCTTTCTTT	TTCTGTGTCT	CTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTGTCTGTCT	22440
GTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTGCCT	ATCTTCTGTC	TTACTCTCTT	TCTCTGCCTG	22500
TCTGTCTGTC	TCTCCCTCCC	TTTCTGTTTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCCCTCTC	22560
CCTGTCTGTT	TCTCTCCGTC	TCTCTCTCTT	TCTGTCTGTT	TCTCACTGTC	TCTCTCTGTC	22620
CATCTCTCTC	TCTCTCTGTC	TGTCTCTTTC	GTTCTCTCTG	TCTGTCTGTC	TCTCTCTCTC	22680
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCTGTCTG	TCTGTTTCTC	TCTATCTCTC	GCTGTCCATC	22740
TCTGTCTTTT	TATGTCTGTC	TCTTTCTCTG	TCAGTCTGTC	AGACACCCCC	GTGCGGGTA	22800
GGGCCCTGCC	CCTTCCACGA	AAGTGAGAAG	CGCGTGCTTC	GGTGCTTAGA	GAGGCCGAGA	22860
GGAATCTAGA	CAGGCGGGCC	TTGCTGGGCT	TCCCCACTCG	GTGTATGATT	TCGGGAGGTC	22920
GAGGCCGGGT	CCCCGCTTGG	ATGCGAGGGG	CATTTTCAGA	CTTTTCTCTC	GGTCACGTGT	22980
GGCGTCCGTA	CTTCTCCTAT	TTCCCCGATA	AGCTCCTCGA	CTTCAACATA	AACGGCGTCC	23040
TAAGGGTCTGA	TTTAGTGTCA	TGCTCTTTTC	ACCGCCACCA	CCGAAGATGA	AAGCAAAGAT	23100
CGGCTAAATA	CCGCGTGTTC	TCATCTAGAA	TGGGGAACCT	ACAGATGACA	GTTCTTGAT	23160
GGGCAGAACG	AGGGGGACCG	GGNACGCGGA	AGCCTGCTTG	AGGGRGGAGG	GGYGAAGGA	23220

10

20

30

40

GAGACAGCTT	CAGGAAGAAA	ACAAAACACG	AATACTGTCTG	GACACAGCAC	TGACTACCCG	23280
GGTGATGAAA	TCATCTGCAC	ACTGAACACC	CCCCTCACAA	GTTTACCTAT	GTCACAGTCT	23340
TGCTCATGTA	TGCTTGAACG	ACAAATAAAA	GTTCGGGGGG	GAGAAGAGAG	GAGAGAGAGA	23400
GAGAGACGGG	GAGAGAGGGG	GGAGAGGGGG	GGGGAGAGAG	AGAGAGAGAG	AGAGAGAGAG	23460
AGAGAGAGAG	AGAAAGAGAA	GTAAAACCAA	CCACCACCTC	CTTGACCTGA	GTCAGGGGGT	23520
TTCTGGCCTT	TTGGGAGAAC	GTTTCAGCGAC	AATGCAGTAT	TTGGGCCCGT	TCTTTTTTTC	23580
TTCTTCTTCT	TTTCTTTCTT	TTTTTTTTGGA	CTGAGTCTCT	CTCGCTCTGT	CACCCAGGCT	23640
GCGGTGCGGT	GGCGCTCTCT	CGGCTCACTG	AAACCTCTGC	TTCCCGGGTT	CCAGTGATTC	23700
TTCTTCGGTA	GCTGGGATTA	CAGGTGCGCA	CCATGACGGC	CGGCTCATCG	TTCTATTTTT	23760
AGTAGAGACG	GGGTTTCTCC	ACGTTGGCCA	CGCTGGTCTC	GAACCTCTGA	CCACAAATGA	23820
TCCACCTTCC	TGGGCCTCCC	AAAGTGCTGG	AAACGACAGG	CCTGAGCCGC	CGGGATTTEA	23880
GCCTTTAAAA	GCGCGCGGCC	CTGCCACCTT	TCGCTGCGGC	CCTTACGCTC	AGAATGACGT	23940
GTCCTCTCTG	CCATAGGTTG	ACTCCTTGAG	TCCCCTAGGC	CATTGCACTG	TAGCCTGGGC	24000
AGCAAGAGCC	AAACTCCGTC	CCCCCACCTC	CCCGCGCACA	TAATAACTAA	CTAACTAACT	24060
AACTAACTAA	AATCTCTACA	CGTCACCCAT	AAGTGTGTGT	TCCCCTGAGG	AGTGATTTCT	24120
AAGAAATGGT	ACTGTACACT	GAACGCAGGC	TTCACGTCTG	TCATCCCAG	GTCAGGAGTT	24180
CGAGACCAGC	CCGGCCCACG	TGGTGAAACC	CCCGTCTCTA	CTGAAAATAC	GAAATGGAGT	24240
CAGGCGCCGT	GGGGCAGGCA	CCTGTAACCC	CAGCTACTCG	GGAGGCTGGG	GTGGAAGAA	24300
TGCTTGAACC	TGGCAGGCGG	AGGCTGCAGT	GACCCAAGAT	CGCACCACG	CACTACAGCC	24360
TGGGCGACAG	AGTGAGACCC	GGTCTCCAGA	TAAATACGTA	CATAAATAAA	TACACACATA	24420
CATACATACA	TACATACAAC	ATACATACAT	ACAGATATAC	AAGAAAGAAA	AAAAGAAAAG	24480
AAAAGAAAGA	GAAAATGAAA	GAAAAGGCAC	TGTATTGCTA	CTGGGCTAGG	GCCTTCTCTC	24540
TGTCTGTTTC	TCTCTGTTCG	TCTCTGTCTT	TCTCTCTGTG	TCTCTTCTCT	TGTCTGTCTG	24600
TCTGTCTGTC	TGTCTGTCTC	TTTCTTTCTT	TCTGTCTCTG	TCTTTGTCCC	TCTCTCTCCC	24660
TCTCTGCCCT	GTCTCACTGT	GTCTGTCTTC	TATCTTACTC	TCTTTCTCTC	CCGTCTGTCT	24720
TCTCTCTCAC	TCCCTCCCTG	TCTGTTTCTC	TCTCTCTCTC	TTTCTGTCTG	TTTCTGTCTC	24780
TCTCTGTCTG	CCTCTCTCTT	TCTCTATCTG	TCTCTTTCTC	TGTCTGTCTG	CCCCTCTCTT	24840
TCTTTTCTCT	TGTCTCTCTG	TCTGTCTCTC	TCTCTCTCTG	TGCCATCTCT	CTGTCTTACT	24900
CTCTTTCTCT	CTCTGTCTGT	TCCCTGTCTG	TTTCTCTCTG	CTCCCTTTCT	GCTTCTCTCT	24960
CTCTCTCTCT	CTCTNNNCCC	TCTGTCTGTT	TCATTCTCTC	TGTCTCTGTC	TCTGTCTCTC	25020
TTTCTCACTG	TCTCTCTCTG	TCTGTGTGTA	TCTTTTGTCT	TACTCTCCTT	CTCTGCCTGT	25140
TCTCTCTCTG	TCTCTCCCTC	CTCTCTCCCT	GTCCCTCTCT	CTTCTGTCTT	GTTTCTCTCT	25200
CCGTCTGTCT	GTCTGTCTCT	CTGTCTCTGT	CTTTCTCTGT	CTGTCCCTTT	CTCTGTCTGT	25260
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTGTCTCTCT	TGTCTCTCTC	CTCTGTGCCT	ATCTTCTGTC	25320
CTGCCCTCTCT	CTTTCTCTTT	TCTATCTGTC	TGTCTCTCTC	TGTCTCTCTC	CTCGCTTCTC	25380
TTACTCTCTT	TCTCTGCCTG	TCTCGCTCTC	TCTGTCTTTT	TCTCTTTCTC	TCTGTTTCTC	25440
TGTTTCTCTC	TCTCTCCCTC	TGTCTTTTTC	TGTCTGTCTG	TCTCTCTCTT	TCTTTCTGTC	25500
TGTCTCTCTC	TGTCCGTCTC	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCCTTGTCT	CTCTCACTGT	25560
GTCTGTCTCT	GTCTCTGTCT	TCCTTCTCTG	CCGTGTCATC	TGTCTGTCTG	TCTCTCTCTC	25620
GTCTGTCTCT	TGCTTTACTC	TCTCTCTGTC	TCTCTCTGTC	TGTCTGTCTC	TGTCTGTCTC	25680
TCTCTCCCTA	CTTTTCTGTT	TGTCTGTCTC	TCTCTCTCTC	TGCTGTCTCT	ACTGTGTCTG	25740
TTTCTCTCTC	TGTCTTTTCTC	TCTCTCTCTC	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTTA	CTGTCTGTTT	25800
TCTCTGTCTC	TATCTCTTTT	CTCTCTCTGT	CTCTCTGTCT	GTCTCTGTCT	TTCTCTGTCT	25860
TCTTCTGTCT	CTCTCTCTTT	CTGCCGTGTT	CTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTTCCT	25920
CTCTCTCTCT	CTCTTTCTTT	TTCTGCGTCT	CTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	TGTGTGTCTG	25980
GTCTGCCCTCT	CTCTTTCTTT	TCCTTGCCCTG	CCGTGCTGTC	TGTGTGTCTG	TCTCTCTCTC	26040
ATCTTCTGTC	TTACTCTGTT	TCCCTTTCTC	TTTCTCTGTC	TCTCTCTCTC	TTTCTGGGTG	26100
TCTCTCTCTC	TCTCTCTCCC	CATCTCTGTC	TTTCTATGTC	TGTCTCTCTC	TTTCTCTCTG	26160
TTTCTCTCTG	TCTCTCTGTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTGTCTGTC	TCTCTCACTG	26220
TCTCTGTCTC	TGCCCTCTCT	TACTCTCCTT	CTCTGCCTGT	CCGTCTGTCT	GTCTGTCTCT	26280
TGTGTGTCTG	TCTTCTGTCT	CTGTTTCTCT	CTCTCTCTCT	TTCTGTCTGT	TTCTCTCTTT	26340
CCCTCTCTCT	CCCTCCCTTT	CTGTCTCTGT	CTGTCTCTCT	CTTCTTTTCT	CTCTGTCTCT	26400
CTCTCTCTGT	CTGTCTCTTT	CTCTCTGTCT	GTGCCTATCT	TCTGTCTTAC	TCTCTTCTCT	26460
CTGTCTCTCT	CTGTGTCTGT	TCTCTCTCTC	TGTCTGTCTC	CGTCCCTCTC	TCCCTGTCTG	26520
TGGCTGTCTG	CCTGTCTCTC	TCTCTCTCTC	TGTCTGTCTC	TTTCTCTGTC	TGTCTGTCTC	26580
TCTGTTTCTC	TCTCTGCCTC	TCTCTGTCTC	TCTCTGTGTC	TGTCTCTCTT	TCTGTGCCTA	26640
TCTTCTGTCT	TTTCTCTGTC	CTCTGGCTGT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	GCCTGTCTCC	26700
TCTTCTGTCT	TACTCTCTTT	CTGTCTCTCT	CTGTCTCTCT	GTCTCTCTGT	CCATCTCTGT	26760
GTCCCTCCCT	CCCTGTCTGT	CTCTCTGTCT	TCTCTCTCTC	CTCTCTCTGT	CTCTCTCTCT	26820
CTGTCTCTTT	CTCTTTCTCT	TTACTCTCTT	TCTCTTGCC	GCCCTCTCTG	CTGTCTGTCT	26880

10

20

30

40

CTCTCCCTCC	ATGTCTCTCT	CTCTCTCTCA	CTCACTCTCT	CTCCGTCTCT	CTCTCTTTCT	26940
GTCTGTTTCT	CTCTCTGTCT	GTCTCTCTCC	CTCCATGTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCACTCA	27000
CTCTCTCTCC	GTCTCTCTCT	CTCTTTCTGT	CTGTTTCTCT	CTCTGTCTGT	CTCTCTCCCT	27060
CCATGTCTCT	CTCTCTCCCT	CTCACTCACT	CTCTCTCCGT	CTCTCTCTCT	CTTTCTGTCT	27120
GTTTCTTTGT	CTGTCTGTCT	GTCTGTCTGT	CTGTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	27180
CTCTCTGTTT	GTCTTTCTCC	CTCCCTGTCT	GTCTGTCTGT	CTCTCTCTCT	CTGTCTCTGT	27240
CTCTGTCTCT	CTCTCTTTCT	CTTTCTGTCT	GTTTCTCTCT	ATCTCTCGCT	GTCCATCTCT	27300
GTCTTTCTAT	GTCTGTCTCT	TTCTCTGTCA	GTCTGTCTCA	CACACCCGTG	CCGGTAGGGC	27360
CCTGCCCTTC	CACGAGAGTG	AGAAGCGCGT	GCTTCCGGTG	TTAGAGAGGC	CGAGAGGAAT	27420
CTAGACAGGC	GGGCCTTGCT	GGGCTTCCCC	ACTCGGTGTA	CGATTTCCGG	AGGTCGAGGC	27480
CGGGTCCCCG	CTTGGATGCG	AGGGGCATT	TCAGACTTTT	CTCTCGGTCA	CGTGTGGCGT	27540
CCGTACTTCT	CCTATTTCCC	CGATAAGTCT	CCTCGACTTC	AACATAAACT	GTTAAGGCCG	27600
GACGCCAACA	CGGCGAAACC	CCGTCTCTAC	TAAAAATACA	AAGCTGAGTC	GGGAGCGGTG	27660
GGGCAGGCCC	TGTAATGCCA	GCTCCTCGGG	AGGCTGAGGC	GGGAGAATCG	CTTGAACCAG	27720
GGAAGCGGAG	GCTGCAGGGA	GCCGAGATCG	CGCCACTGCA	CTACGGCCCA	GGCTGTAGAG	27780
TGAGTGAGAC	TCGGTCTCTA	AATAAATACG	GAAATTAATT	AATTCATTAA	TTCTTTTCCC	27840
TGCTGACGGA	CATTTGCAGG	CAGGCATCGG	TTGTCTTCGG	GCATCACCTA	GCGGCCACTG	27900
TTATTGAAAG	TCGACGTTGA	CACGAGGGA	GGTCTCGCCG	ACTTCACCGA	GCCTGGGGCA	27960
ACGGGTTTCT	CTCTCTCCCT	TCTGGAGGCC	CCTCCCTCTC	TCCCTCGTTG	CCTAGGGAAC	28020
CTCGCCTAGG	GAACCTCCGC	CCTGGGGGCC	CTATTGTTCT	TTGATCGGCG	CTTTACTTTT	28080
CTTTGTGTTT	TGGCGCCTAG	ACTCTTCTAC	TTGGGCTTTG	GGAAGGGTCA	GTTTAATTTT	28140
CAAGTTGCCC	CCCGCTCCC	CCCCTACTAC	ACGTCCCTTC	ACCTTAATTT	AGTGAGNCGG	28200
TTAGGTGGGT	TTCCCCCAA	CCGCCCCCGT	CCCCCGCCT	CCCAACACCC	TGCTTGGAAA	28260
CCTTCCAGAG	CCACCCCGGT	GTGCTCCCGT	CTTCTCTCCC	CTTCCCCCAC	CCCTTGCCGG	28320
CGATCTCATT	CTTGCCAGGC	TGACATTGTC	ATCGGTGGGC	GTCAGGCCTC	ACTCGGGGGC	28380
CACCGTTTTT	GAAGATGGGG	GCGGCACGGT	CCCCTTCCC	CGGAGGCAGC	TTGGGCCGAT	28440
GGCATAGCCC	CTTGACCCGC	GTGGGCAAGC	GGGCGGGTCT	GCAGTTGTGA	GGCTTTTCCC	28500
CCCGCTGCTT	CCCGCTCAGG	CCTCCCTCCC	TAGGAAAGCT	TCACCCCTGGC	TGGGTCTCGG	28560
TCACCTTTTA	TCACGATGTT	TTAGTTTCTC	CGCCCTCCGG	CCAGCAGAGT	TTCACAATGC	28620
GAAGGGCGCC	ACGGCTCTAG	TCTGGGCCTT	CTCAGTACTT	GCCCCAAATA	GAAACGCTTT	28680
CTGAAAATA	ATAACTTTNC	TCACTTAAGA	TTTCCAGGGA	CGCGCGCTTG	GCCCGTGTTT	28740
GTTGGCTTGT	TTTGTTTTCG	TCTGTTTTGT	TTTGTTCGTG	TTTTTCCTTT	CTCGTATGTC	28800
TTTCTTTTCA	GGTGAAGTAG	AAATCCCCAG	TTTTTCAGGAA	GACGTCTATT	TTCCCCAAGA	28860
CACGTTAGCT	GCCGTTTTTT	CCTGTTGTGA	ACTAGCGCTT	TTGTGACTCT	CTCAACGCTG	28920
CAGTGAGAGC	CGGTTGATGT	TTACNATCCT	TCATCATGAC	ATCTTATTTT	CTAGAAATCC	28980
GTAGGCGAAT	GCTGCTGCTG	TCTTGTGTC	TGTTGTTGTT	GTTGTGTTG	TCGTCGTTGC	29040
TGTTGTCTGT	GTCGTTGTTG	TTGTCTGTTG	CGTTGTTTTT	AAAGTATACC	CCGGCCACCG	29100
TTTATGGGAT	CAAAAGCATT	ATAAAATATG	TGTGATTATT	TCTTGAGCAC	GCCCTTCCCTC	29160
CCCCTCTCTC	TGTCTCTCTG	TCTGTCTCTG	TCTCTCTCTT	TCTCTGTCTG	TCTTCTCTCT	29220
CTCTCTCTCT	CTGTGTCTCT	CTCTCTCTGC	CTGTCTGTTT	CTCTCTCTCT	GCCTCTCTCT	29280
CTCTCTCTCT	CTCTGCCTGT	CTCTCTCACT	GTCTGTCTCT	TCTGTCTTAC	TCCCTTTCTC	29340
TGTCTGTCTG	TCGGTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCCCTGTCTG	TATGTCTCTC	TCTGTCTCTG	29400
TCTCTCTCTC	TCTTTCTGTT	TCTCTCTCTC	CGTCTCTGTC	TTTCTCTGAC	TGTCTCTCTC	29460
TTTCTTCTC	TCTGTCTCTC	TCTGCCTGTC	TCTCTCACTC	TGTCTTCTGT	CTTATCTCTC	29520
TCTCTGCCTG	CCTGTCTCTC	TCCTCTCTCT	TCTCTGTGTC	TCTCTCTCTC	TCTTTCTGTT	29580
TCTCTCTGTC	TCTCTGTCCG	TCTCTGTCTT	TCTCTGTCTG	TCTCTTTGTC	TGTCTGTCTT	29640
TGTCTTTTCT	TCTCTCTGTC	TCTCTCTCTC	TCCTGTGTC	TGTCTTCTGT	CTTAGTCTCT	29700
CTCTCTCTCT	CTCCCTGTCT	GTCTGTCTCT	CTCTCTCTCT	CCCCCTGTCT	GTTTCTCTCT	29760
CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCTGTCTTT	GTCTTTCTTT	CTGTCTCTGT	CTCTCTCTCT	29820
CTCTCTGTGT	GTCTGTCTTC	TGTCTTACTG	TCTTTCTCTG	CCTGTCTGTC	TGTCTGTCTC	29880
TCTCTGTCTG	TCTCTCTCTC	TCTCTCCCCC	TGTCGGCTGT	TTCTCTGTCT	CTGTCTGTGT	29940
CTCTCTTTCT	GTCTGTTTCT	CTCTGTCTGT	CTTTCTCTCT	CTGTCTCTTT	CTCTCTGTCT	30000
CTCTGTCTGT	CTCTGTCTCT	CTCTGTCTGT	CTCTCTCTCT	GTGGGGGTGT	GTGTGTGTGT	30060
GTGTATGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	TCTGCTCTCT	TCTTACTCTC	TTTCTGTGCC	30120
TGTCTGTCTG	CCTGTCTGTT	TGTCTCTCTC	TCTCTGCCTG	TCTCTCTCCC	TTCCTGTCTG	30180
TTTCTCTCTC	TTTCTGTTTC	TCTCTGTCTC	TGTCCATCTC	TGTCTTTCTC	CGTCTGTCTC	30240
TTTATCTGTC	TCTCTCCGTC	TGTCTCTTTA	TCTGTCTCTC	TCTCTCTTTC	TGTCTTTCTC	30300
TCTCTGTGTA	TCGTTGTCTC	TCTCTGTCTG	TCTCTGTCTC	TGTCTCTCTG	TCTCTCTCTC	30360
TCTCTCTCTC	TCTGTCTCTG	TCTGTCCGTC	TGTCTGTCTC	GGTCTCTGCG	TCTCGCTATC	30420
TCCCGCCCTC	TCTTTTCTTG	CAAAAGAAGC	TCAAGTACAT	CTAATCTAAT	CCCTTACCAA	30480
GGCCTGAATT	CTTCACTTCT	GACATCCAG	ATTTGATCTC	CCTACAGAAT	GCTGTACAGA	30540

10

20

30

40

ACTGGCGAGT	TGATTTCTGG	ACTTGGATAC	CTCATAGAAA	CTACATATGA	ATAAAGATCC	30600
AATCCTAAAA	TCTGGGGTGG	CTTCTCCCTC	GACTGTCTCG	AAAAATCGTA	CCTCTGTTCC	30660
CCTAGGATGC	CGGAAGAGTT	TTCTCAATGT	GCATCTGCCC	GTGTCCTAAG	TGATCTGTGA	30720
CCGAGCCCTG	TCCGTCCTGT	CTCAAATATG	TACGTGCAAA	CACCTCTCTC	CATTTCCACA	30780
ACTACCCACG	GCCCCTTGTG	GAACCACTGG	CTCTTTTGAAA	AAAATCCCAG	AAGTGGTTTT	30840
GGCTTTTTTG	CTAGGAGGCC	TAAGCCTGCT	GAGAACTTTC	CTGCCCAGGA	TCCTCGGGAC	30900
CATGCTTGCT	AGCGCTGGAT	GAGTCTCTGG	AAGGACGCAC	GGGACTCCGC	AAAGCTGACC	30960
TGTCCACACG	AGGTCAAATG	GATACCTCTG	CATTGGCCCC	AGGCCTCCGA	AGTACATCAC	31020
CGTCACCAAC	CGTCACCGTC	AGCATCCTTG	TGAGCCTGCC	CAAGGCCCCG	CCTCCGGGGA	31080
GACTCTTGGG	AGCCCCGGCT	TCGTCCGCTA	AAGTCCAAAG	GGATGGTGAC	TTCCACCCAC	31140
AAGGTCCAC	TGAACGGCGA	AGATGTGGAG	CGTAGGTCAG	AGAGGGGACC	AGGAGGGGAG	31200
ACGTCCCGAC	AGGCGACGAG	TTCCCAAGGC	TCTGGCCACC	CCACCCACGC	CCCACGCCCC	31260
ACGTCCCGGG	CACCCGCGGG	ACACCGCCGC	TTTATCCCTT	CCTCTGTCCA	CAGCCGGCCC	31320
CACCCACCA	CGCAACCCAC	GCACACACGC	TGGAGGTTCC	AAAACCACAC	GGTGTGACTA	31380
GAGCCTGACG	GAGCGAGAGC	CCATTTACAG	AGGTGGGAGG	GGTGGGGGTG	GGGTGGGTTG	31440
GGGGTTGTGG	GGTCTGTGGC	GAGCCCGATT	CTCCCTCTTG	GGTGGCTACA	GGCTAGAAAT	31500
GAATATCGCT	TCTTGGGGGG	AGGGGCTTCC	TTAGGCCATC	ACCGCTTGCG	GGACTACCTC	31560
TCAAACCCCTC	CCTTGAGGCC	ACAAAATAGA	TTCCACCCCA	CCCATCGACG	TTTCCCCCGG	31620
GTGCTGGATG	TATCCTGTCA	AGAGACCTGA	GCCTGACACC	GTGGAATTAA	ACACCTTGAC	31680
TGGCTTTGTG	TGTTTGTGTT	TTTCTGAGAT	GGAGTCTTGC	TCTGTCCCCC	AGGCTGGAGT	31740
GCAGTGGCGT	GATCTCAGCT	CACTGGAACC	TCTGCCTCCT	GGGTTCAGT	GATTCTCCTG	31800
TCTCAGCGCC	ACCATGGCCG	GCTCATTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTGGTAG	ACACGGGGTT	31860
TCACCCCTCT	TCATTGGTTT	TCACTGGAGA	TTCTAGATTC	GAGCCACACC	TCATTCCGTG	31920
CCACGAGAG	ACTTCTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTAAAGC	CAACGCAACA	TGCTGCCTT	31980
ATTTGAGTGG	CTTCCTATAT	CATTATAATT	GTGTTATAGA	TGAAGAAACG	GTATTAACA	32040
CTGTGCTAAT	GATAGTGAAG	GTGAAGACAA	AAGAAAGGCT	ATCTATTTTG	TGGTTAGAAT	32100
AAAGTTGCTC	AGTATTTAGA	AGCTACCTAA	ATACGTCAGC	ATTTACACTC	TTCTAGTAA	32160
AAGCTGGCCG	ATCTGAATAA	TCCTCCTTTA	AACAACACAC	ATTTTGTGATA	GGGTTAAGAT	32220
TTTAAAAAGA	ATGCGACTCC	TGCAAAATAG	CTGAACAGAC	GATACACATT	TAAAAAATA	32280
ACAACACAAG	GATCAACCAG	ACTTGGGAAA	AAATCGAAAA	CCACACAAGT	CTTATGAAGA	32340
ACTGAGTTCT	TAAAATAGGA	CGGAGAACGT	AGCTATCGGA	AGAGAAGGCA	GTATTGGCAA	32400
GTTGATTGTT	ACGTTGGTCA	GCAGTAGCTG	GCACATCTTT	TTTGGCCATC	TTTCGGGCAA	32460
TGTAACACT	ACAGCAAAAT	GAGATATGAT	CCATTAAACA	ACATATTCGC	AAATCAAAAA	32520
TGTTTTCAGT	AATATAATGC	TTCAGATTTA	GAAGCAAATC	AAATGATAGA	ACTCCACTGC	32580
TGTAATAAGT	CACCCCAAAG	ATCACCCTAT	CTGACAAAAT	AACACACACA	GGGTTATGAC	32640
TTCAGAATCA	TACTTTCCTC	TTGATATTTA	CTTATGTATT	TATTTTTTT	AATTTATTTT	32700
TCTTGAGACG	CGTCTCGCTC	TGTCGCCCCAG	GCTGGAGTGC	GATGGTGTGA	TCTCGGCTCA	32760
CTGCAACCGC	CACCTCCCTG	GGTTCAAGCG	ATTCTCCTGC	CTCAGCCTCC	CGAGTAGCTG	32820
GGACTACAGG	TGCCCCGCCAC	CACGCCCCAGC	TAATCTTTAT	ACTTTTAATA	GACACGGGGT	32880
TTACCCGTGT	CGGCCCGGAT	GGTCTCGATC	TCTTGACCTC	GTGACCCGCC	CGCCTCGGCC	32940
TCCCAAAGTG	AGGCGTAGAC	ACTGGGATGAC	CACCTAGCCC	GGCCTTCTCT	TGACGTTTAA	33000
ACTATGAAGT	CAGTCCAGAG	AAACGCAATA	AATGTCAACG	GTGAGGATGG	TGTTGAGGCA	33060
GAAGTAGGAC	CACACTTTTT	CCTATCTTAT	TCAGTTGATA	ACAATATGAC	CTAGGTAGTA	33120
ATTTCTATG	TGCCTACTTA	TACACGAGTA	CAAAAGAGTA	AAACAGAGAG	ACTGCTAAAT	33180
TAAAGGGTAC	GTGAAGTTCT	TCATAGTAAC	TCCGTAAACT	GGAACACTGT	CAAAAAGCAG	33240
CAGCTAGTGA	ATTGTTTCCA	TGTATTTTTT	TATTATCCAA	TAAGTGAACT	ATGCTATTCC	33300
TTTCCAGTCT	CCCAAGCACT	TCTTGTCCCC	ATCACCCTT	CGGTGCTCGA	AGAAAAAGTA	33360
AGCAAATCAA	GGAACACAAG	CTAAAGAAAC	ACACACACAA	ACCAAAGACA	ACTACAGCGT	33420
CTGCAAAAGT	TTGCTAGAAG	ACTGAAACTG	TTGAGTATAA	GGATCTGGTA	TTCTACGATC	33480
ATGAGTTCAC	TTCAGAGTTT	GTTCAAGACA	TACGTTTTCT	AAGGAAACAT	CTTAGTTAGA	33540
AGTTATTACG	CAGTAGGTAC	CATCCCTAAG	TATTTTTTAC	CAATCCGTG	ACAATAAAGA	33600
GCTATCTAAC	CAGAAAAATT	AGCGAGTACG	GGCACCATCC	ATAGGGCTTT	GTCTTTACGC	33660
TTCATTAGCA	CTTACCATGC	CTTACAATGT	CTAGGATTGA	CCCTGATAGC	ATTTCGAAAA	33720
CAAGCTAATG	CTTTGTCCAG	TTCTTCAGTG	AAGACAATC	ACGCCCTAAT	GCGCTATAGG	33780
CATAAGCATC	ATTTGATCC	ACTTCGAGAG	TTCTCTGGAA	GAATTGAATC	GCAATATCGT	33840
GTTCCCGTTT	GCAGACCGAA	ACAGTTTCCC	TGCAGCACAC	CAGGCCTCTG	GCTGGCGAAT	33900
TTTTATCCAT	GTCTGTGAAG	TCTTTGGACA	GAACCTGAAAG	AGCAACCTCT	TTCGGAGGAT	33960
GCCAAAGTGT	TGTAGAGTAG	ATCTCCATGC	CTTCGACTCT	GTAATTTCTCA	ATCCTCCTAA	34020
CCTCTGAGAA	TTGTCTTTCA	GCTTGCCTGG	ACTCTGAAAG	TTTACAATAG	GCCNTTTCCG	34080
ATTTGGCACA	GTACCCAACC	GGTATTGCAG	TGGTGAGAAG	CTAGATGGCT	CAAGATGCTG	34140
ATAGCTTCTT	TGCCGTGGTA	AGAACACAAA	GCTAAATAAC	CTTTCCCCCT	TTACGAAGA	34200

10

20

30

40

AGGCTCATCA	AGCCTTCCGC	TGCTGCTTTT	TGTAGATTAA	AAGCCTGAAT	CTGAGGCGCG	34260
ATTGCGGCTA	TTTTCCCTTC	TGAAATGACG	GAAGAGTCCA	ATTTTGTCCAC	TTCCAGGCTA	34320
TCACTTATGT	TCGGTGGAGT	TATTGCTCCT	TTATTAGTTT	TACTTTTGGT	TCTTCTGTTT	34380
GGGATTTTAG	GTGGAAACTT	CATTTTAAAT	TTTCTCCTAA	TTCTCCTCGG	TTGTGGAGCT	34440
GTCAC TAGTC	AAGAGTCGTG	AATTTCTTCG	AGGNCGGTGC	ATTTGGGGGA	GATGCCATAG	34500
TGGGGCTCAA	TACCTGAGGT	GTTGCCCTTG	TCGGCGGACC	AGAACTTTGT	GTTTTTGCAA	34560
GGACTGGAGT	TACCTTTCCG	CTCTTTCCCC	TCTGCGAGAA	GACAGACGGT	GTTCCGGTTT	34620
GGCCGATTCT	GGCAACAGGC	TTTTCTGAAG	GGGCTCCGGT	GGATGGCACG	TCAGTGACAG	34680
ACGGTGTCTC	ATACCAGTGC	AGTTTTGTCA	ATAGGGTCCG	TCTCCGGGAC	TTGGGGTTTC	34740
TAATGGCAAA	ATGCCAACAC	TTGGGGTTAA	TGGACTAACA	GCTGCTGGTC	CTCCTAATAA	34800
ACTTCGACCA	GTTTTTGTTT	TATGTTGATT	TGTTTATAGT	CATATGGAAG	TTCTGTTC	34860
CAGTGGGACA	GTATCAGGTG	AAAGGACAGC	TGAATCGATA	GAAGACACTG	GGGAGTCTGT	34920
ATTCAAGGAG	TACTTTGAAT	TGGAAGATTC	TAAATTCCAT	CCGTTTCATT	CGACGGTGTC	34980
CTGGGGTGTT	TCCGTAAGAA	CGGTCTCGGG	CTGTCTGTGA	CATAAACTAG	GACGAGGTCC	35040
AAGTGTGTGT	GCGCAACACT	TGGACAGGCA	GTTCGTAAAG	CTCTCTAGAG	AGGTGAATCA	35100
AAATGTTTGG	TCAGGATCTG	GCTTTTCCCC	CCTATTTTCC	ATCATGATTC	AAAGGGACAC	35160
CAGAGGAAAG	GATTTCAACG	AAGGCTCTTT	TGGTCACATT	CTGATCCTTT	GGTAAGCCGA	35220
TCTGTCTTGC	AATATACATG	TCCCAGCATG	GGAAGGGGAA	AGCGAGCTGA	ATCACCACAA	35280
TCAGGAACGA	TAATATCATC	GTGGCTTTTC	TGCTTATGAA	ACACTCCACC	CGATAAGATT	35340
TGATCCCTTT	CTGCAAGCTT	GCTGAGATCA	ACACAACATT	TCGCAAGCAG	GCATTTGCAT	35400
TGCGGGGTAG	TACAACCTGT	TCCTTTCAAG	AGTCTATATG	TTTTATAGGC	CTTTCCTGAG	35460
CGGTAAGAAG	AGGTCGCCAG	TAAGAACAAG	GCTTCTTCTG	AGTGTACTTC	TGCATAAAGG	35520
CGTTCTGCGG	GGGAACCCG	ATCTCGGTAG	GCATAGTGGT	TTAGTGCTTG	CCATATAGCA	35580
GCCTGGACGG	GTCCCTGCAG	CACCGCCATC	CTCGAGGCTC	AGGCCCACTT	TCTGCAGTGC	35640
CACAGGCACC	CCCCCCCCC	CATAGCGGCT	CCGGCCCGGC	CAGCCCCGGC	TCATTTAAAG	35700
GCACCAGCCG	CCGTTACCGG	GGGATGGGGG	AGTCCGAGAC	AGAATGACTT	CTTTATCCTG	35760
CTGACTCTGG	AAAGCCCGGC	GCCTTGTGAT	CCATTGCAAA	CCGAGAGTCA	CCTCGTGTTC	35820
AGAACACGGA	TCCACTCCCA	AGTTCAAGTG	GGGGATGTGA	GGGGTGTGGC	AGGTAGGACG	35880
AAGGACTCTC	TTCCCTTCTG	TTCCGTCTGC	ACAGTGGGGC	CTAGGGCTGG	AGCTCTCTCC	35940
GTGCGGACCG	CTGACTCCCT	CTACCTTGGG	TTCCCTCGGC	CCCACCCTGG	AACGCCGGGC	36000
CTTGGCAGAT	TCTGGCCCTT	TCTGGCCCTT	CAGTCGCTGT	CAGAAACCCC	ATCTCATGCT	36060
CGGATGCCCC	GAGTGACTGT	GGCTCGCACC	TCTCCGGAAA	CATTGGAAAT	CTCTCCTCTA	36120
CGCGCGGCCA	CCTGAAACCA	CAGGAGCTCG	GGACACACGT	GCTTTCGGGA	GAGAATGCTG	36180
AGAGTCTCTC	GCCGACTCTC	TCTTGACTTG	AGTTCTTCGT	GGGTGCGTGG	TTAAGACGTA	36240
GTGAGACCAG	ATGTATTAA	TCAGGCCCTG	TGCTGGTGCC	TCACGCCTGT	AACCCCAACA	36300
CTTTGGGAGG	CCGAGGCCGT	AGGATCCCTC	GAGGAATCGC	CTAACCTTGG	GGAGGTTGAG	36360
GTTGCAGTGA	GTGAGCCATA	GTTGTGTCAC	TGTGCTCCAG	TCTGGGCGAA	AGACAGAATG	36420
AGGCCCTGCC	ACAGGCAGGC	AGGCAGGCAG	GCAGGCAGAA	AGACAACAGC	TGTATTATGT	36480
TCTTCTCAGG	GTAGGAAGCA	AAAATACAG	AATACAGCAC	TTAATTAATT	TTTTTTTTTT	36540
CCTTCGGACG	GAGTTTCACT	CTTGGTGCCC	ACGCTGGAGT	GCAGTGGCAC	CATCTCGGCT	36600
CACCGCAACC	TCCACCTCCC	GCGTTCAAGC	GATCTCCTCG	CCTCAGCCTC	CTGAGTAGCT	36660
GGGATTACAG	GGAGGAGCCA	CCACACCCAG	CTGATTTTGT	ATTGTTAGTA	GAGACGGCAT	36720
TTCTCCATGT	GGGTCAAGCT	GGTCTCGAAC	TGGCGACCCC	AGTGGATCTG	CCCGCCCCGG	36780
CCTCCCAAAG	TGCTGGGGTG	ACAGGCGTGA	GCCATCGTGA	CTGGCCGGCT	ACGTTTATTT	36840
ATTTATTTT	TTAATTATTT	TACTTTTTTT	TAGTTTTTCCA	TTTTAATCTA	TTTATTTATT	36900
TACATTTATT	TATTTATTTA	TTTATTTACT	TATTTATTTA	TTTTCGAGAC	AGACTCTCGC	36960
TCTGCTGCCC	AGGCTGGAGT	GCAGCGGCGT	GATCTCGGCT	CACTGCAACG	TCCGCCTCCC	37020
GGGTTACACG	CATTCTCCTG	CCTCAGCCTC	CCAAGTAGCT	GGGACTACAG	GCGCCCGCCA	37080
CCGTGCCCCG	CTAACTTTTT	GTATTTTGAG	TAGAGATGGG	GTTTCACTGT	GGTAGCCAGG	37140
ATGGTCTCGA	TCTCCTGACC	CCGTGATCCG	TCCACCTCGG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATG	37200
ACAGGCGTGA	GCCACCGGCC	CCGGCCTATT	TATCTATTTA	TTAACTTTGA	GTCCAGGTTA	37260
TGAAACCAGT	TAGTTTTTGT	AATTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTGAGA	CGAGGTTTCA	37320
CCGTGTTGCC	AAGGCTTGGA	CCGAGGGATC	CACCGGCCCT	CGGCCTCCCA	AAAGTGCGGG	37380
GATGACAGGC	GCGAGCCTAC	CGCGCCCGGA	CCCCCCTTT	CCCCTTCCCC	CGCTGTCTTT	37440
CCCGACAGAC	AGTTTCACGG	CAGAGCGTTT	GGCTGGCGTG	CTTAAACTCA	TTCTAAATAG	37500
AAATTTGGGA	CGTCAGCTTC	TGGCCTCACG	GACTCTGAGC	CGAGGAGTCC	CCTGGTCTGT	37560
CTATCACAGG	ACCGTACACG	TAAGGAGGAG	AAAAATCGTA	ACGTTCAAAG	TCAGTCATTT	37620
TGTGATACAG	AAATACACGG	ATTACCCAA	AACACAGAAA	CCAGTCTTTT	AGAAATGGCC	37680
TTAGCCCTGG	TGTCCTTGCC	AGTGATTCTT	TTCCGGTTTG	ACCTTGACTG	AGAGGATTCC	37740
CAGTCGGTCT	CTCGTCTCTG	GACGGAAGTT	CACAGATGATC	CGATGGGTGG	GGGACTTAGG	37800
CTGCGTCCCC	CCAGGAGCCC	TGGTCGATTA	GTTGTGGGGA	TCGCCTTGGA	GGGCGCGGTG	37860

10

20

30

40

ACCCACTGTG	CTGTGGGAGC	CTCCATCCTT	CCCCCACC	CCTCCCCAGG	GGGATCCCAA	37920
TTCATTCCGG	GCTGACACGC	TCACTGGCAG	GCGTCGGGCA	TCACCTAGCG	GTCACCTGTTA	37980
CTCTGAAAAC	GGAGGCCTCA	CAGAGGAAGG	GAGCACCAGG	CCGCCTGCGC	ACAGCCTGGG	38040
GCAACTGTGT	CTTCTCCACC	GCCCCGCCCC	CCACCTCCAA	GTTCCCTCCCT	CCCTTGTTC	38100
CTAGGAAATC	GCCACTTTGA	CGACCGGGTC	TGATTGACCT	TTGATCAGGC	AAAAACGAAC	38160
AAACAGATAA	ATAAATAAAA	TAACACAAAA	GTAACATACT	AAATAAAATA	AGTCAATACA	38220
ACCCATTACA	ATACAATAAG	ATACGATACG	ATAGGATGCG	ATAGGATACG	ATAGGATACA	38280
ATACAATAGG	ATACGATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	ATACAATACA	38340
ATACAATACA	ATACAATACG	CCGGGCGCGG	TGGCTCATGC	CTGTCATCCC	GTCACCTTGG	38400
GATGCCGAGG	TGGACGCATC	ACCTGAAGTC	GGGAGTTGGA	GACAAGCCCC	ACCAACATGG	38460
AGAAATCCCC	TCTCAATTGA	AAATACAAAA	CTAGCCGGGC	GCGGTGGCAC	ATGCCTATAA	38520
TCCCAGCTGC	TAGGAAGGCT	GAGGCAGGAG	AATCGCTTGA	ACCTGGGAAG	CGGAGGTTGC	38580
AGTGAGCCGA	GATTGCGCCA	TCGCACTCCA	GTCTGAGCAA	CAAGAGCGAA	ACTCCGTCTC	38640
AAAAATAAAT	ACATAAATAA	ATACATACAT	ACATACATAC	ATACATACAT	ACATACATAC	38700
ATAAATTAAT	ATAAATAAAT	AAAATAAAAT	AAATAAATGG	GCCCTGCGCG	GTGGCTCAAG	38760
CCTGTCAATC	CCTCACTTTG	GGAGGCCAAG	GCCGGTGGAT	CAAGAGGCGG	TCAGACCAAC	38820
AGGGCCAGTA	TGGTGAAACC	CCGTCTCTAC	TCACAATACA	CAACATTAGC	CGGGCGCTGT	38880
GCTGTGCTGT	ACTGTCTGTA	ATCCCAGCTA	CTCGGGAGGC	CGAGCTGAGG	CAGGAGAATC	38940
GCTTGAACTT	GGGAGGCGGA	GGTTGCAGTG	AGCCGAGATC	GCGCCACTGC	AACCCAGCCT	39000
GGGCGACAGA	GCGAGACTCC	GTCTCCAAAA	AATGAAAATG	AAAATGAAAC	GCAACAAAAT	39060
AATTAATAAG	TGAGTTTCTG	GGGAAAAAGA	AGAAAAGAAA	AAAGAAAAAA	ACAACAAAAC	39120
AGAACAACCC	CACCGTGACA	TACACGTACG	CTTCTCGCCT	TTCGAGGCCT	CAAACACGTT	39180
AGGAATTATG	CGTGATTTCT	TTTTTTAACT	TCATTTTATG	TTATTATCAT	GATTGATGTT	39240
TCGAGACGGA	GTCTCGGAGG	CCCGCCCTCC	CTGGTTGCC	AGACAACCCC	GGGAGACAGA	39300
CCCTGGCTGG	GCCCGATTGT	TCTTCTCCTT	GGTCAGGGGT	TTCTTGTCT	TTCTTCTGTT	39360
CTTTAACCCG	CGTGGACTCT	TCCGCCTCGG	GTTTGACAGA	TGGCAGCTCC	ACTTTAGGCC	39420
TTGTTGTGTT	TGGGGACTTT	CCTGATTCTC	CCCAGATGTA	GTGAAAGCAG	GTAGATTGCC	39480
TTGCCTGGCC	TTGCCTGGCC	TTGCCTTTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTA	TTACTTTCTC	39540
TTTTTCTTCT	TCTTCTTCTT	CTTTTTTTTG	AGACAGAGTT	TCACTCTTGT	TGCCCAGGCT	39600
AGAGGGCAAT	GCGCGGATCT	CGGCTCACC	CACCCCTCCG	CTCCAGGTT	CAAGCGATTC	39660
TCCTGCCTCA	GCCTCCTGAT	TAGCTGGGAT	TACAGGCATG	GGCCACCGTG	CTGGCTGATG	39720
TTTGTACTTT	TAGTAGAGAC	GGTGTTTTTT	CATGTTGGTC	AGGCTGGTCT	CCCCTCCCA	39780
ACCTCAGGTG	GTCCGCCTGC	CTTAGCCTCC	CAAAGTGCTG	GGATGACAGG	CGTGCAACCG	39840
CGCCAGCCT	CTCTCTCTCT	CTCTCTCTCT	CTCGCTCGCT	TGCTTGCTTG	CTTTCGTTGCT	39900
TTCTTGCTTT	CCCGTTTTCT	TGCTTTCTTT	CTTCTTTTCG	TTTCTTTTCT	GCTTGCTTTT	39960
TTGCTTGCTT	GCTTGCTTTT	GTGCTTTCTT	GCTTTCTGTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	40020
TTTCTTTCTT	TTGTTTCTTT	CTTGCTTTCT	TTCTTTCTTG	CTTGCTTTCT	TTGCTTTCTT	40080
CTTGCTTTCT	TGTTTTCTTT	CTTCTTTCTT	TTCTTTCTTT	TCTTTCTTGC	TTGCTTTCTT	40140
GCTTGCTTGC	TTTCGTGCTT	TCTTGTTTTT	TCGATTTCTT	TCTTTCTTTT	GTTTCTTTCT	40200
TGCTTGCTTT	CTTGCTTTGCT	TGCTTTCTG	CTTCTTGCTT	TCCTGTTTTT	TTTCTTTCTT	40260
TCTTTCTTTT	GTTTCTTTCT	TGCTTGCTTT	CTTGCTTTGCT	TGCTTTCTG	CTGCTTTGTT	40320
TCTCGATTCT	TTTCTTTCTT	TTGTTTCTTT	CCTGCTTGCT	TTCTTGCTTG	ATTGCTTTCT	40380
TGCTTTCTTG	CTTCTTTGTT	TTCTTTCTTT	CTTTTGTTTT	TTTCTTTCTT	GCTTCTTTGT	40440
TTTCTTGCTT	TCTTGCTTGC	TTGCTTTCTG	GCTTTCTTGT	TTTCTTGCTT	TCTTTCTTTT	40500
GTTTCTTTCT	TGCTTGCTTT	CTTGCTTTCT	TGTTTTCTTG	CTTCTTTGCT	TGCTTGCTTT	40560
CGTGCTTTCT	TTCTTGCTTT	CTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TTTCTTTCTT	TTCTTGCTTT	40620
CTTTTCTTTT	ATCATCATCT	TTCTTTCTTT	CCTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTATCTTTT	40680
TTTCTTTCTT	TCTTTCTTTT	TTTCTTTCTT	TCTTTCTGTT	TCGTCTTTT	GAGACAGAGT	40740
TTCACTCTTG	TTTCCACGGC	TAGAGTGCAA	TGGCGCGATC	TTGGCTCACC	GCACCTTCCG	40800
CCTCCCGGGT	TCGAGCGCTT	CTCCTGCCTC	CAGCCTCCCG	ATTAGCGGGG	ATTGACAGGG	40860
AGGCACCCCC	ACGCCTGGCT	TGGCTGATGT	TTGTGTTTTT	AGTAGGCACG	CCGTGCTCTT	40920
CCATGTTGCT	CAGGCTGGTC	TCCAACCTCC	GACCTCCTGT	GATGCGCCCA	CCTCGGCCTC	40980
TCGAAGTGCT	GGGATGACCG	GCGTGACGAC	CGTGCCCGGC	CTGTTGACTC	ATTTCGCTTT	41040
TTTATTTCTT	TCGTTTCCAC	GCGTTTACTT	ATATGTATTA	ATGTAAACGT	TTCTGTACGC	41100
TTATATGCAA	ACAACGACAA	CGTGTATCTC	TGCATTGAAT	ACTCTTGCGT	ATGGTAAATA	41160
CGTATCGGTT	GTATGGAAAT	AGACTTCTGT	ATGATAGATG	TAGGTGTCTG	TGTTATACAA	41220
ATAAATACAC	ATCGCTCTAT	AAAGAAGGGA	TCGTCGATAA	AGACGTTTAT	TTTACGTATG	41280
AAAAGCGTCG	TATTTATGTG	TGTAAATGAA	CCGAGCGTAC	GTAGTTATCT	CTGTTTTCTT	41340
TCTTCTCTCT	CTTCGTGTTT	TTCTTCTTCT	CTTCTTCTCT	TTCTCTCTCT	CTTTAGGTTT	41400
TTCTTCTCTT	CTTCTTCTCT	TTCTTCTCTT	CTTCTTCTCT	TTTTTCTCTT	CGTGCTTTAT	41460
TTCTTCTCTG	TTCCCTGTGT	TTCTTCTCTT	TTTCTTCTCT	CTCTGTTTCT	TTTTCCCTTC	41520

10

20

30

40

```

TTTCCTTCGT TTCTTTCTCTC ATTCTTTCTC TCTTTTTCTG TGTTCCTTTC CTTCCTGCTCT 41580
GTCTTTTAAA AAATTGGAGT GTTTCAGAAG TTTACTTTGT GTATCTACGT TTTCTAAATT 41640
GTCTCTCTTT TCTCCATTTT CTTCCTCCCT CCCTCCCTCC CTCCCTGCTC CCTTCCCTCC 41700
CTCCTTCCCCT TTCGCCATCT GTCTCTTTTC CCCACTCCCC TCCCCCGTC TGTCTCTGCG 41760
TGGATTCCCG AAGAGCCTAC CGATTCTGCC TCTCCGTGTG TCTGCAGCGA CCCCAGCACC 41820
GAGTCCTTGT GTGTTCTTTC TCCCTCCCTC CCTCCCTCCC TCCCTCCCTC CCTCCCTGCT 41880
TCCGAGAGGC ATCTCCAGAG ACCGCGCCGT GGGTTGTCTT CTGACTCTGT CGCGGTCGAG 41940
GCAGAGACGC GTTTTGGGCA CCGTTTGTGT GGGGTTGGGG CAGAGGGGCT GCGTTTTTCGG 42000
CCTCGGGAAG AGCTTCTCGA CTCACGGTTT CGCTTTCGCG GTCCACGGGC CGCCCTGCCA 42060
GCCGATCTG TCTCGCTGAC GTCCGCGGCG GTTGTGCGGC TCCATCTGGC GGCCGCTTTG 42120
AGATCGTGCT CTCGGCTTCC GGAGCTGCGG TGGCAGTGC CGAGGGAGGG GACCGTCCCC 42180
GCTGTGAGCT AGGCAGAGCT CCGGAAAGCC CGCGGTGCTC AGCCCGGCTG GCCCGGTGGC 42240
GCCAGAGCTG TGGCCGGTCC CTTGTGAGTC ACAGCTCTGG CGTGCAGGTT TATGTGGGGG 42300
AGAGGCTGTC GCTGCGCTTC TGGGCCCCGCG GCGGGCGTGG GGCTGCCCGG GCCCGTCGAC 42360
CAGCGCGCCG TAGCTCCCGA GGCCCCGAGCC GCGACCCGGC GGACCCGCGG CGCGTGGCGG 42420
AGGCTGGGGA CGCCCTTCCC GGCCCCGTCG CGGTCCGCTC ATCTTGGCCG TCTGAGGCGG 42480
CGGCCGAATT CGTTTCCGAG ATCCCCGTGG GGAGCCGGGG ACCGTCCCCG CCCCCTCCCC 42540
CGGGTGCCGG GGAGCGGTCC CCGGGCCGSG CCGCGGTCCC TCTGCCGCGA TCCTTTCTGG 42600
CGAGTCCCCG TGGCCAGTCG GAGAGCGCTC CCTGAGCCGG TCGGGCCCCG GAGGTCGCGC 42660
TGGCCGGCCT TCGGTCCCTC GTGTGTCCCG GTCGTAGGAG GGGCCGGCCG AAAATGCTTC 42720
CGGTCCCCGC TCTGGAGACA CGGGCCGGCC CCTGCGTGTG GCCAGGGCGG CCGGGAGGGC 42780
TCCCCGGCCC GGCCTGTGTC CCGCGTGTGT CCTTGGGTTG ACCAGAGGGA CCCCAGGCGC 42840
TCCGTGTGTG GCTGCGATGG TGGCGTTTTT GGGGACAGGT GTCCGTGTCC GTGTCGCGCG 42900
TCGCCTGGGC CGGCGGCGTG GTCGGTGACG CGACCTCCCC GCCCGGGGGG AGGTATATCT 42960
TTCGCTCCGA GTCGGCAATT TTGGGCCGCC GGGTTATAT 42999

```

配列番号：18

配列の長さ：175

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

CTCCGGCGCG GCCCCGTGT TCGCCGTTCC CGTGGCGCGG ACAATGCGGT TGTGCGCGTCCA 60

CGTGTGCGTG TCCGTGCAGT GCCGTTGTGG AGTGCCTCGC TCTCCTCCTC CTCCCCGGCA 120

GCGTTCCAC GGTGTTGGGAC CACCGGTGAC CTCGCCCTCT TCGGGCCTGG ATCCG 175

配列番号：19

配列の長さ：755

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GGTCTGGTGG	GAATTGTTGA	CCTCGCTCTC	GGGTGCGGCC	TTTGGGGAAC	GGCGGGGTCG	60
GTCGTGCCCC	GCGCCGGACG	TGTGTCGGGG	CCCACTTCCC	GCTCGAGGGT	GGCGGTGGCG	120
GCGGCGTTGG	TAGTCTCCCC	TGTTGCGTCT	TCCCGGGCTC	TTGGGGGGGG	TGCCGTCGTT	180
TTCGGGGCCG	GCGTTGCTTG	GCTTACGCAG	GCTTGGTTTG	GGACTGCCTC	AGGAGTCGTG	240
GGCGGTGTGA	TTCCCGCCGG	TTTTCCTCG	CGTCTGCCTG	CTTTGCCTCG	GGTTTGCTTG	300
GTTCGTGTCT	CGGGAGCGGT	GGTTTTTTTT	TTTTTCGGGT	CCCGGGGAGA	GGGGTTTTTC	360
CGGGGGACGT	TCCCGTCGCC	CCCTGCCGCC	GGTGGGTTTT	CGTTTCGGGC	TGTGTTCTGT	420
TCCCTTCCCC	CGTTTGGCCG	TCGGTTCTCC	CCGGTCGGTC	GGCCCTCTCC	CCGGTCGGTC	480
GCCCGGCCGT	GCTGCCGGAC	CCCCCTTCT	GGGGGGGATG	CCCGGGCACG	CACGCGTCCG	540
GGCGGCCACT	GTGGTCCGGG	AGCTGCTCGG	CAGGCGGGTG	AGCCAGTTGG	AGGGGCGTCA	600
TGCCCCCGCG	GGCTCCCGTG	GCCGACGCGG	CGTGTTCTTT	GGGGGGGCCT	GTGCGTGGCG	660
GAAGGCTGCG	CACGTTGTCT	GTCCTTGCGA	GGGAAAGAGG	CTTTTTTTTT	TTAGGGGGTC	720
GTCCTTCGTC	GTCCCGTCGG	CGGTGGATCC	GGCCT			755

10

配列番号：20

配列の長さ：463

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

20

配列：

GGCCGAGGTG	CGTCTGCGGG	TTGGGGCTCG	TCCGGCCCCG	TCGTCCTCCG	GGAAGGCGTT	60
TAGCGGGTAC	CGTCGCCGCG	CCGAGGTGGG	CGCACGTCGG	TGAGATAACC	CCGAGCGTGT	120
TTCTGGTTGT	TGGCGGCGGG	GGCTCCGGTC	GATGTCTTCC	CCTCCCCCTC	TCCCGAGGC	180
CAGGTCAGCC	TCCGCCTGTG	GGCTTCGTCT	GCCGTCTCCC	CCCCCTCAC	GTCCCTCGCG	240
AGCGAGCCCC	TCCGTTTCGAC	CTTCTTCCG	CCTTCCCCCC	ATCTTTCCGC	GCTCCGTTGG	300
CCCCGGGGTT	TTCACGGCGC	CCCCCACGCT	CCTCCGCCTC	TCCGCCCGTG	GTTTGGACGC	360
CTGGTTCCGG	TCTCCCCGCC	AAACCCCGGT	TGGGTGTTTC	TCCGGCCCCG	GCTTGCTCTT	420
CGGGTCTCCC	AACCCCGGCC	CGGAAGGGTT	CGGGGGTTCC	GGG		463

配列番号：21

配列の長さ：378

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

30

配列：

GGATTCTTCA	GGATTGAAAC	CCAAACCGGT	TCAGTTTCCT	TTCCGGCTCC	GGCCGGGGGG	60
GGCGGCCCCG	GGCGGTTTGG	TGAGTTAGAT	AACCTCGGGC	CGATCGCACG	CCCCCGTGG	120
CGGCGACGAC	CCATTGGAAC	GTCTGCCCTA	TCAACTTTCG	ATGGTAGTCG	ATGTGCCTAC	180
CATGGTGACC	ACGGGTGACG	GGGAATCAGG	GTTTCGATTCC	GGAGAGGGAG	CCTGAGAAAC	240

40

GGCTACCACA	TCCAAGGAAG	GCAGCAGGCG	CGCAAATTAC	CCACTCCCGA	CCCGGGGAGG	300
TAGTGACGAA	AAATAACAAT	ACAGGACTCT	TTCGAGGCCC	TGTAATTGGA	ATGAGTCCAC	360
TTTAAATCCT	TTAAGCAG					378

配列番号：22

配列の長さ：378

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GATCCATTGG	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATTCCAGCTC	CAATAGCGTA	60
TATTAAAGTT	GCTGCAGTTA	AAAAGCTCGT	AGTTGGATCT	TGGGAGCGGG	CGGGCGGTCC	120
GCCGCGAGGC	GAGTCACCGC	CCGTCCCCGC	CCCTTGCCTC	TCGGCGCCCC	CTCGATGCTC	180
TTAGCTGAGT	TGTCCCAGCG	GGCCCGAAGC	GTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTTGTTTCA	240
AAGCAGGCCC	GAGCCGCCTG	GATACCGCCA	GCTAGGAAAT	AATGGAATAG	GACCGCGGTT	300
CCTATTTTGT	TTGGTTTTTC	GAAGTGAGCC	CATGATTAAG	GGAAACGGCC	GGGGGCATTC	360
CCTTATTGCG	CCCCCCTA					378

10

配列番号：23

配列の長さ：719

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GGATCTTTCC	CGCTCCCCGT	TCCTCCCCGC	CCCTCCACCC	GCGCGTCTCC	CCCCTTCTTT	60
TCCCCCTCTC	GGAGGGGGGG	GAGGTGGGGG	CGCGTGGGCG	GGGTGCGGGG	TGGGGTCGGC	120
GGGGGACCGC	CCCCGGCCGG	CAAAGGCCCG	CCGCCGGGCG	CACTTCAACC	GTAGCGGTGC	180
GCCGCGACCG	GCTACGAGAC	GGCTGGGAAG	GCCCCGACGG	GAATGTGGCT	CGGGGGGGGC	240
GGCGCGTCTC	AGGGCGCGCC	GAACCACTC	ACCCGAGTG	TTACAGCCCT	CCGGCCGCGC	300
TTTCGCGGAA	TCCCGGGGCC	GAGGGGAAGC	CCGATACCCG	TCGCCGCGCT	TTTCCCCTCC	360
CCCCGTCCGC	CTCCCGGGCG	GGCGTGGGGG	TGGGGGCGCG	GCCGCCCCCT	CCACGCCCGT	420
GGTTTCTCTC	TCTCCCGGTC	TCGGCCGGTT	TGGGGGGGGG	AGCCCGGTTG	GGGGCGGGGC	480
GGACTGTCTC	CAGTGCAGCC	CGGGCGTCGT	CGCGCCGTCG	GGCCCGGGGG	GTTCTCTCGG	540
TCACGCCGCC	CCCGACGAAG	CCGAGCGCAC	GGGGTCGGCG	GCGATGTCGG	CTACCCACCC	600
GACCCGTCTT	GAAACACGGA	CCAAGGAGTC	TAACGCGTGC	GCGAGTCAGG	GGCTCGCACG	660
AAAGCCGCCG	TGGCGCAATG	AAGGTGAAGG	GCCCCGTCCG	GGGGCCCGAG	GTGGGATCC	719

30

配列番号：24

配列の長さ：685

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

40

CGAGGCCTCT	CCAGTCCGCC	GAGGGCGCAC	CACCGGCCCG	TCTCGCCCGC	CGCGTCGGGG	60
AGGTGGAGCA	CGAGCGTACG	CGTTAGGACC	CGAAAGATGG	TGAACTATGC	CTGGGCAGGG	120
CGAAGCCAGA	GGAAACTCTG	GTGGAGGTCC	GTAGCGGTCC	TGACGTGCAA	ATCGGTCGTC	180
CGACCTGGGT	ATAGGGGCGA	AAGACTAATC	GAACCATCTA	GTAGCTGGTT	CCCTCCGAAG	240
TTTCCCTCAG	GATAGCTGGC	GCTCTCGCAA	CCTTCGGAAG	CAGTTTTATC	CGGGTAAAGG	300
CGGAATGGAT	TAGGAGGTCT	TGGGGCCGGA	AACGATCTCA	AACTATTCT	CAAACCTTAA	360
ATGGGTAAGG	AAGCCCGGCT	CGCTGGCGTG	GAGCCGGGCG	TGGAATGCGA	GTGCCTAGTG	420
GGCCACTTTT	GCTAAGCAGA	ACTGGCGCTG	CGGGATGAAC	CGAACGCCCG	GTTAAGGCGC	480
CCGATGCCGA	CGCTCATCAG	ACCCCAGAAA	AGGTGTTGGT	TGATATAGAC	AGCAGGACGG	540
TGGCCATGGA	AGTCGGAATC	CGCTAAGGAG	TGTGTAACAA	CTCACCTGCC	GAATCAACTA	600
GCCCTGAAAA	TGGATGGCGC	TGGAGCGTCG	GGCCCATACC	CGGCCGTCGC	CGGCAGTCGG	660
AACGGGACGG	GACGGGAGCG	GCCGC				685

配列番号：25

10

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GAGGAATTCC CCTATCCCTA ATCCAGATTG GTG**33**

20

配列番号：26

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AAACTGCAGG CCGAGCCACC TCTCTTCTGT GTTTG**35**

30

配列番号：27

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AGGAATTAC AGAAGAGAGG TGGCTCGGCC TGC**33**

40

配列番号：28

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AGCCTGCAGG AAGTCATACC TGGGGAGGTG GCCC

34

配列番号：29

配列の長さ：80

10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

AAACTGCAGG TTAATTAACC CTAACCCTAA CCCTAACCCT AACCTAACC CTAACCCTAA

60

20

CCCTAACCCT AACCCGGGAT

80

配列番号：30

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

TTGGGCCCTA GGCTTAAGG

19

配列番号：31

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列：

GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGT

25

配列番号：32

配列の長さ：26

配列の型：核酸

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列：

GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAAC

26

配列番号：3 3

10

配列の長さ：2 6

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列：

TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGAT

26

20

配列番号：3 4

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N o

アンチセンス：N o

フラグメント型：

起源：

配列：

GGGTTTAAAC AGATCTCTGC A

21

30

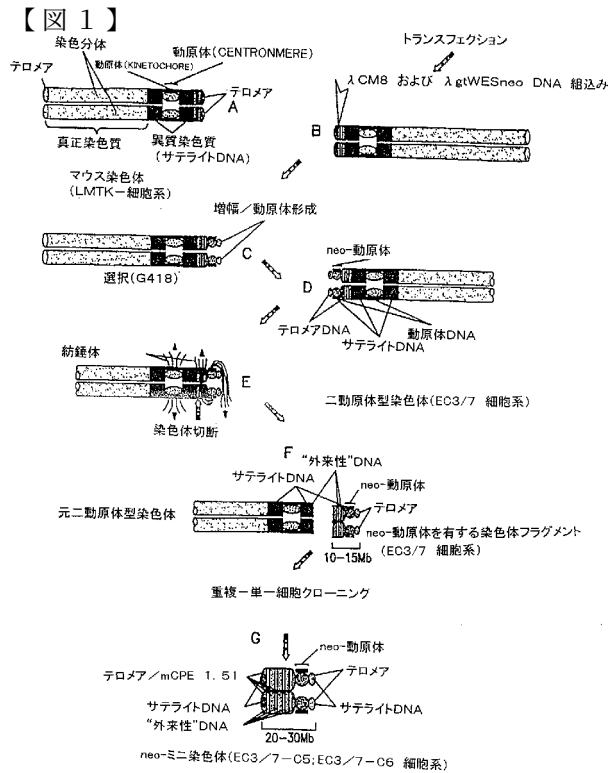


FIG. 1

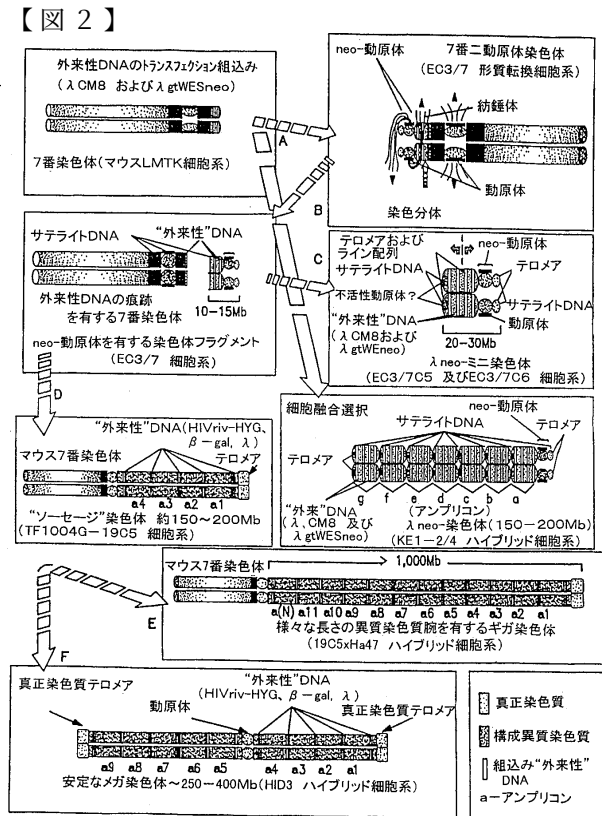


FIG. 2

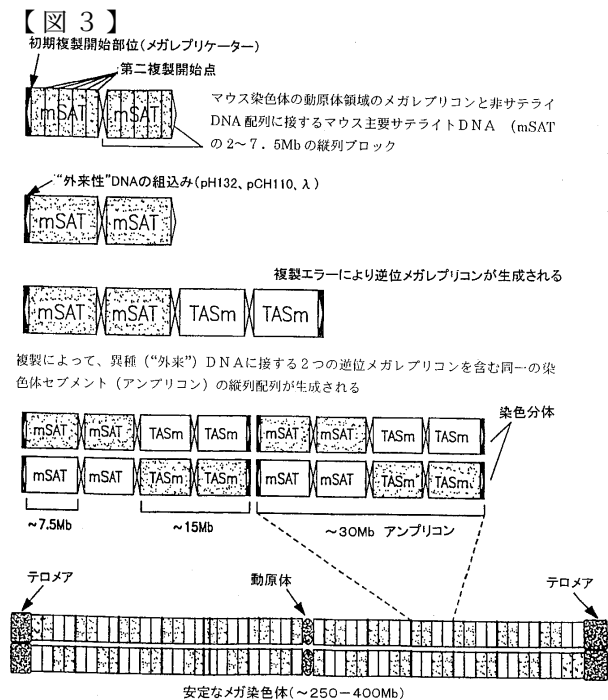


FIG. 3

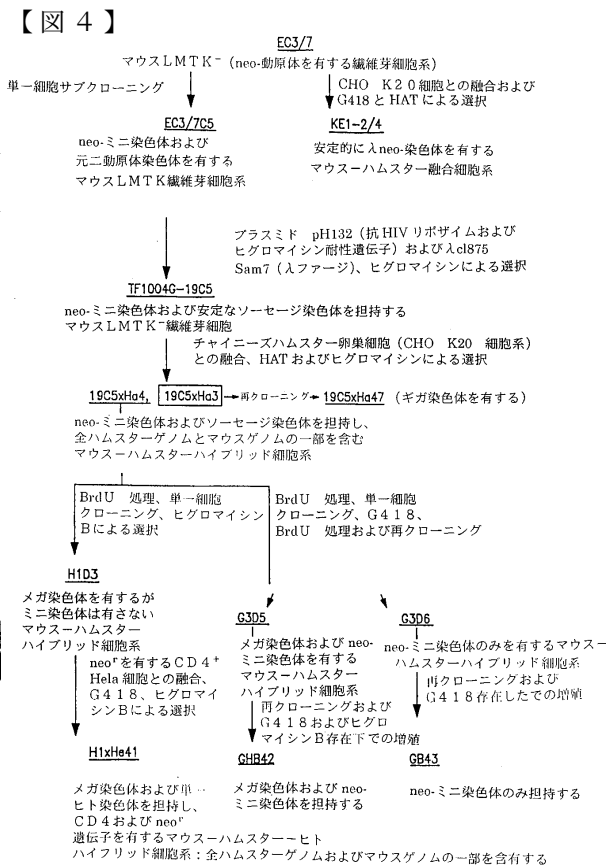
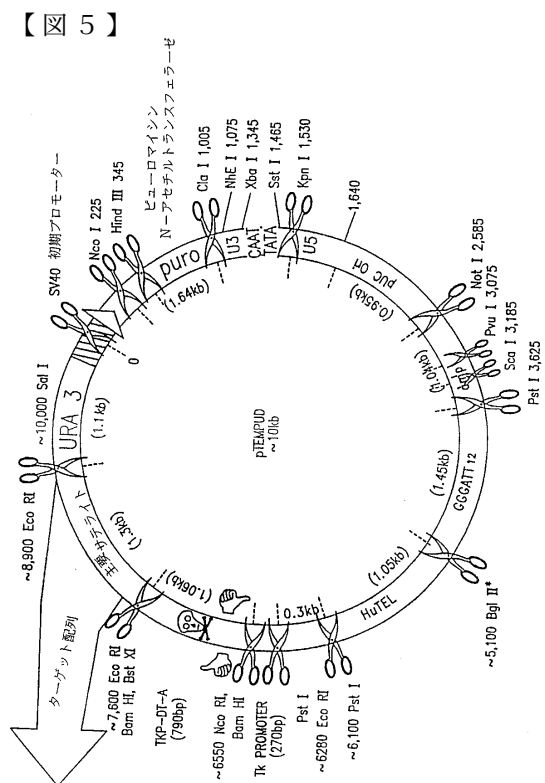


FIG. 4

FIG. 5



【図 5】

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 695,191
(32)優先日 平成8年8月7日(1996.8.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ECACC 96040926
微生物の受託番号 ECACC 96040927
微生物の受託番号 ECACC 96040928
微生物の受託番号 ECACC 96040929

早期審査対象出願

- (73)特許権者 503051213
クロモス・モレキュラー・システムズ・インコーポレーテッド
カナダ国、ブイ・５・エイ・ダブリュ・９・ブリテイツシュ・コロンビア、バーナビー、ロウヒー
ド・ハイウエイ・８０８１
(74)代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(72)発明者 ハドラツキー, ジュラ
ハンガリー国、ハー—６７２３・セゲド、ポステユエニ・ウ・６
(72)発明者 サーレイ, アラダー・エイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２３４６、ハイランド、フェアウッド・７３２７

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特表平１１－５０７５４０（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－１７７８８１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９５／３２２９７（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第９４／２３０４９（ＷＯ，Ａ１）
EMBO J., Vol.14,No.21(1995)p.5444-5454
Proc.Natl.Acad.Sci.USA., Vol.88,No.24(1991)p.11042-11046
Chromosome Res., Vol.4,No.3(1996)p.226-239
Chromosome Res., Vol.4,No.3(1996)p.240-247
Proc.Natl.Acad.Sci. USA., Vol.88,No.18(1991)p.8106-8110
Nucleic Acids Res., Vol.22,No.18(1994)p.3728-3736
FEBS Lett., Vol.167,No.2(1984)p.263-268
DNA, Vol.4,No.4(1985)p.283-291
Nucleic Acids Res., Vol.18,No.22(1990)p.6649-6657

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed