

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 12 月 9 日 (09.12.2004)

PCT

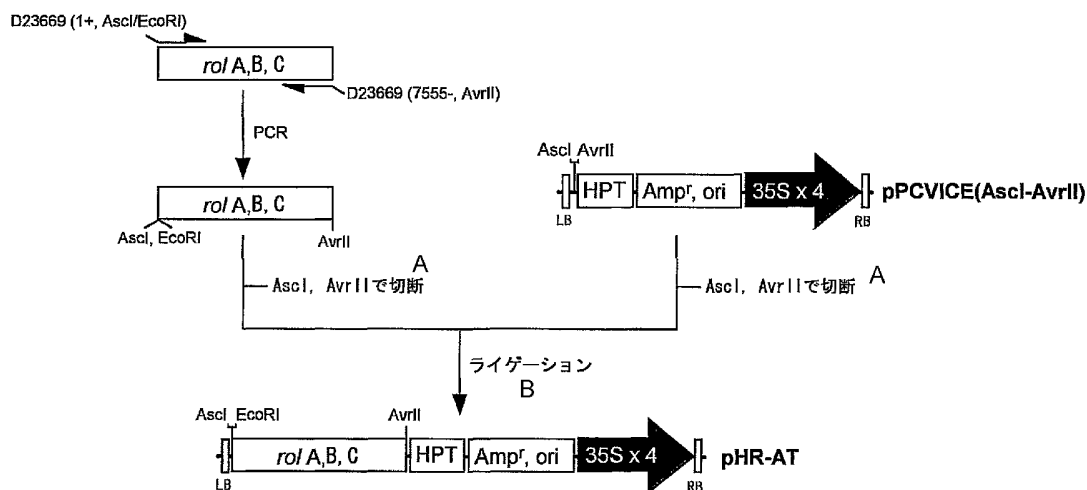
(10) 国際公開番号
WO 2004/106520 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/11, (72) 発明者; および
5/14, A01H 5/00, C12N 1/21 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村中 俊哉 (MURANAKA, Toshiya) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-2 2 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 関 光 (SEKI, Hikaru) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-2 2 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007789
- (22) 国際出願日: 2004 年 5 月 28 日 (28.05.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-153985 2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,

[続葉有]

(54) Title: PLANT GENE ACTIVATION VECTOR AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 植物遺伝子活性化ベクターおよびその利用



A... CLEAVAGE WITH Ascl AND AvrII
B... LIGATION

(57) Abstract: It is intended to provide a vector by which the transfer of an enhancer or promoter sequence and activation of a plant gene can be relatively easily and efficiently carried out and a method therefor. Namely, a plant gene activation vector comprising an expression cassette that has (1) a hairy root-inducing gene and (2) an enhancer and/or a promoter capable of acting in a plant and is substantially free from any terminator capable of acting in a plant downstream thereof.

(57) 要約: 本発明の目的は、エンハンサーあるいはプロモーター配列の導入から植物遺伝子の活性化までを比較的簡単に効率よく行うことができるベクターおよび方法を提供することである。本発明によれば、(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び/又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットから構成される植物遺伝子活性化ベクターが提供される。



NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

植物遺伝子活性化ベクターおよびその利用

技術分野

本発明は植物遺伝子活性化ベクターおよびその利用に関する。

背景技術

植物遺伝子を活性化させる方法として、アクティベーションタギング法がある。これは、植物細胞で機能可能なあるいはエンハンサーあるいはプロモーター配列をもつベクターを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を介して植物に導入し、ベクターのDNAが導入された形質転換植物において、挿入されたエンハンサーあるいはプロモーターの作用により、その近傍の遺伝子を活性化させる方法である（モデル植物の実験プロトコル、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ4、島本功、岡田清孝監修、秀潤社、1996、p135-142）。この方法により活性化された遺伝子がいくつか単離されているが、そのほとんどが、シロイヌナズナ由来の遺伝子である（Weigel ら、Plant Physiol. 122, 1003-1013 (2000)）。アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を用いたアクティベーションタギング法では、植物体にまで再分化させることが多く、そのため、形質転換植物体を数多く扱えるシロイヌナズナのような小型の実験植物に使用が限られていた。さらにこのような小型の実験植物であってもアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌の感染から、植物体の再分化、遺伝子の活性化に至るまでに、多大な時間と労力が必要であった。

発明の開示

本発明は、上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。すなわち、発明は、エンハンサーあるいはプロモーター配列の導入から植物遺伝子の活性化までを比較的簡単に効率よく行うことができるベクターおよび方法を

提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、植物遺伝子を毛状根において迅速に活性化する方法を確立することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、植物遺伝子活性化ベクターを発明し、該植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌の感染により誘発される毛状根を用いることによる遺伝子活性化法を見出し、本発明を完成した。すなわち、土壌細菌アグロバクテリウム・リゾゲネスを感染させることにより、感染部位から毛状根が誘発される。これは菌が持つRⁱプラスミド上のT-DNAに存在する毛状根誘発遺伝子が植物ゲノムに入ることによる。そこで毛状根誘発遺伝子、および、植物で機能可能なエンハンサーあるいはプロモーター配列の両者を持つ植物遺伝子活性化ベクターを発明し、該植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を植物に感染させることにより、感染部位から毛状根が誘発されることを見出した。しかも毛状根の誘発が、菌が感染した各々の細胞で独立に起こるイベントであるため、誘発された一本一本の根はそれぞれ異なる毛状根クローンであることを見出し、毛状根クローンにおける植物遺伝子活性化が生じることを見出した。

すなわち、本発明によれば、(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ(2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットから構成される植物遺伝子活性化ベクターが提供される。

好ましくは、毛状根誘発遺伝子は、rolB 遺伝子を含む。

好ましくは、エンハンサーは、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター由来である。

好ましくは、本発明の植物遺伝子活性ベクターは、配列番号13に記載の塩基配列を有するpHR-AT、又はこれと実質的に同一の塩基配列及び実質的に同一の機能を有するベクターである。

好ましくは、本発明の植物遺伝子活性ベクターは、配列番号14に記載の塩基

配列を有する pHR-AT-GFP、又はこれと実質的に同一の塩基配列及び実質的に同一の機能を有するベクターである。

本発明の別の側面によれば、上記した何れかの本発明の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を植物組織に感染し、
(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させることを含む、植物遺伝子の活性化方法が提供される。

本発明の別の側面によれば、上記した何れかの本発明の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を植物組織に感染し、
(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させた後に、上記エンハンサー及び／又はプロモーターによって遺伝子発現が誘発された毛状根を選抜することを含む、植物遺伝子の分析方法が提供される。

本発明の別の側面によれば、上記した何れかの本発明の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を植物組織に感染し、
(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させることにより得られる、植物遺伝子の発現が誘発された毛状根が提供される。

本発明の別の側面によれば、上記した何れかの本発明の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は pPCVICE (AscI-AvrII) の構造図を示す。HPT; ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子、Ampr; β -ラクタマーゼ遺伝子、ori; Col E1 複製

開始点、35S x 4; カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターエンハンサーの4タンデムリピート、RB; T-DNA ライトボーダー配列、LB; T-DNA レフトボーダー配列を示す。

図2は pHR-AT の構造図を示す。rolA, B, C; アグロバクテリウム・リゾゲネス MAFF03-01724 株の有する Ri プラスミド、pRi1724 上にコードされる rolA, rolB および rolC 遺伝子を示す。

図3は pHR-AT-GFP の構造図を示す。35SP; カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、GFP; Green Fluorescent Protein、NOST; ノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを示す。

図4はノザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

パネル上: At5g02710 をプローブとしたノザンハイブリダイゼーションを示す。

パネル下: トータル RNA の電気泳動を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、「モデル植物の実験プロトコル、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ4、島本功、岡田清孝監修、秀潤社」(1996)、「新版植物のPCR実験プロトコル、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ7、島本功、佐々木卓治監修、秀潤社」(1997)等に記載される通常の方法に準じて実施可能である。

(1) 毛状根誘発遺伝子

本発明で用いられる「毛状根誘発遺伝子」は、アグロバクテリウム・リゾゲネス菌の Ri プラスミド上に存在する遺伝子であって、該遺伝子で形質転換した植物細胞を根に分化する遺伝子のことである。たとえばアグロバクテリウム・リゾゲネス A4 株の rolB 遺伝子 (Slighton ら、J. Biol. Chem. 261, 108-121 (1986))、

アグロバクテリウム・リゾゲネス MAF03-1724 株の rolB 遺伝子（特開平 5- 1 9 2 1 5 4）などが例示できる。rolB 遺伝子は、単独で用いてもよいし、アグロバクテリウム・リゾゲネス菌の Ri プラスミド上に存在する rolA 遺伝子、rolC 遺伝子（Slighton ら、J. Biol. Chem. 261, 108-121 (1986)、特開平 5- 1 9 2 1 5 4）などと組み合わせて用いることもできる。

（２）エンハンサー

本発明で用いられる「植物で機能可能なエンハンサー」は、真核細胞およびウイルスのゲノムに存在する DNA 配列で、その近傍に存在する植物プロモーターからの転写を著しく促進する DNA 配列のことであり、たとえば、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター中の - 9 0 から 4 4 0 塩基の範囲の DNA 配列を例示することができる。このエンハンサー配列は単独で用いることもできるし、2 ないし 1 0 個、好ましくは 4 ないし 5 個直列に繋げて用いることができる。

（３）植物プロモーター

本発明で用いられる「植物で機能可能なプロモーター」は、植物で機能可能な転写および翻訳開始等の遺伝子発現調節に関与する領域を有する遺伝子のことであり、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCs)プロモーターなどの T-DNA 由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の 19S 及び 35S プロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、その他の公知の植物根で機能可能なプロモーターも挙げられることができる。好ましくは、タバコ TobRB7 遺伝子プロモーター、タバコ CIG2 遺伝子プロモーター、タバコ parAt 遺伝子プロモーターなどを根で高発現する遺伝子プロモーターを用いることができる。

（４）植物ターミネーター

本発明において、「植物で機能可能なターミネーター」とは、植物で機能可能

な転写終結等の遺伝子発現調節に関与する領域を有する遺伝子のことであり、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)ターミネーターなどの T-DNA 由来のターミネーター、タバコ parAt 遺伝子ターミネーター、その他の公知の植物根で機能可能なターミネーターも挙げられることができる。

(5) 発現カセット

本発明で用いられる「(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセット」とは、(1) 上記「毛状根誘発遺伝子」を有し、かつ (2) 上記「植物で機能可能なエンハンサーあるいはプロモーター」を有し、その下流に「植物根で機能可能なターミネーター」を実質的に含まない発現カセットである。「植物で機能可能なエンハンサーあるいはプロモーター」の下流の DNA 配列は、「植物根で機能可能なターミネーター」を実質的に含まない DNA 配列であれば特に限定されるものではなく、必要に応じて、葉緑体移行シグナル配列、ミトコンドリア移行シグナル配列などのシグナル配列遺伝子、その他、「植物根で機能可能なターミネーター」を実質的に含まない DNA 配列を付加することができる。また、本発明で用いられる発現カセットには、上記 (1) および (2) に加えて、必要に応じて、大腸菌における複製開始点を含む配列、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカー、あるいは、GFP 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、GUS 遺伝子などのレポーター遺伝子を含むことができる。

(6) 植物遺伝子活性化ベクター

本発明で用いられる「植物遺伝子活性化ベクター」は、上記「(1) 毛状根誘発遺伝子を有すること、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサーあるいはプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まないことを特徴とする発現カセット」から構成されているものである。通常、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス菌において複製可能であり、かつ、植物細胞

に遺伝子の移行が可能な BIN19(Bevan, Nucleic Acids. Res., 12, 8711-8721 (1984))を改変したバイナリーベクターのT-DNA右境界領域と左境界領域の間に、上記発現カセットを挿入し、植物遺伝子活性化ベクターとして用いられる。このような植物遺伝子活性化ベクターとして、pHR-AT、pHR-AT-GFPなどが例示できる。

(7) アグロバクテリウム菌

本発明で用いる「アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌」は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌に分類される菌であれば、特に限定されるものではない。例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス GV3101 (pMP90RK 株)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス EHA101 株、アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株などを例示できる。「植物遺伝子活性化ベクター」は、植物細胞工学 vol. 4 No. 3 p193-203 (1992)記載のエレクトロポレーション法、塩化カルシウム法などによってアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌に導入することができる（以下、本発明形質転換アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌とする）。

(8) 植物の形質転換

本発明の形質転換アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌は、植物細胞工学 vol. 4 No. 3 p193-203 (1992)記載のアグロバクテリウム・リゾゲネス菌を用いた毛状根誘発方法に沿って植物組織に感染させることにより毛状根を誘発することができる。感染する植物は特定されないが、ダイズ、エンドウ、アルファルファ、インゲン、ミヤコグサ、カンゾウなどのマメ科植物、タバコ、トマト、ナス、ジャガイモ、キンギンナスビなどのナス科植物、ダイコン、ナタネ、キャベツ、シロイヌナズナなどのアブラナ科植物、メロン、キュウリ、カボチャなどのウリ科植物、ニンジン、セロリなどのセリ科植物、ジョチュウギクなどのキク科植物などを例示できる。

(9) 遺伝子の活性化

本発明で得られた毛状根は、必要に応じて、一本ずつ分離してクローニングし

た後、使用してもよいし、複数の毛状根を集団のまま利用してもよい。本発明によれば、本発明で得られた毛状根には遺伝子が活性化されたものが含まれているので、例えば、植物ステロイドの生合成増強に関与する遺伝子が活性化されたものを取得したいのであれば、キャピラリー電気泳動と四重極／飛行時間ハイブリッド型質量分析計とを直列させた分析装置などで、毛状根抽出物を分析し、植物ステロイド含量が増加した毛状根クローンを選抜することができる。また、耐塩性に関与する遺伝子が活性化されたものを取得したいのであれば、複数の毛状根の集団を、高塩濃度の培養液で培養し、生育する毛状根クローンを選抜することができる。

これらの毛状根クローンから ISOPLANT（ニッポンジーン登録商標）DNA 抽出キットなどを用いてゲノム DNA を抽出し、新版植物の PCR 実験プロトコール、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 7、島本功、佐々木卓治監修、秀潤社、1997、p 83-89 に記載されている TAIL-PCR 法などによって、「本発現カセット」が挿入された植物ゲノム上の遺伝子の部分配列が判明する。また、これらの毛状根クローンが、植物遺伝子活性化ベクターに大腸菌での複製開始点を含む配列、薬剤耐性マーカーなどが含まれているベクターを保持する本発明の形質転換アグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌によって得られたものであれば、新版モデル植物の実験プロトコール、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 15、島本功、岡田清孝監修、秀潤社、2001、p135-142 に記載されているプラスミドレスキュー法により、「本発現カセット」が挿入された植物ゲノム上の遺伝子の部分配列が判明する。遺伝子の発現量は、新版植物の PCR 実験プロトコール、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 7、島本功、佐々木卓治監修、秀潤社、1997、p 106-115 に記載されている RT-PCR 法などにより検出することにより、遺伝子の活性化を検出することができる。

（10）活性化した遺伝子の利用

上記のように活性化した遺伝子を有する毛状根クローンは、そのまま培養して用いることができる。例えば、植物ステロイドが増強した毛状根クローンは、大

量培養することにより、植物ステロイドの生産に用いることができる。あるいは、常法によって遺伝子クローニングし、必要に応じて、他の植物に導入して用いることもできる。たとえば耐塩性に関して活性化した遺伝子は、耐塩性のない植物に導入することにより、その植物に耐塩性を付与することができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例 1 : rol-type アクティベーションタギングベクターpHR-AT の構築

オリゴヌクレオチド AscI-AvrII (ClaI+) (配列番号 1) およびオリゴヌクレオチド AscI-AvrII (ClaI-) (配列番号 2) を合成した。100 μ M の Asc I-Avr II (ClaI+) と、100 μ M の AscI-AvrII (ClaI-) を 20 μ l ずつ混合して、70°C で 5 分間熱処理後、室温に戻すことによって、上流側から制限酵素 AscI および Avr II サイトを含み、両末端に 5'-CG-3' の 5' 突出末端を持つを持つ 2 本鎖 DNA を調製した。次いで、該 2 本鎖 DNA を、制限酵素 Cla I で消化したベクター pPCVICE_n4HPT (RB に近接してタンデム化した 4 コピーのカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター中のエンハンサー領域、Col E1 の複製開始点および β -ラクタマーゼ遺伝子を T-DNA 部分に有する : Hayashi et al., Science 258: 1350-1353 (1992)) に DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造登録商標) を用いてキットに記載された方法に従ってライゲーションし、プラスミド pPCVICE (AscI-AvrII) を得た (図 1)。

アグロバクテリウム・リゾゲネス MAFF03-01724 株の有する Ri プラスミド、pRi1724 上にコードされる rolA, rolB および rolC 遺伝子を含む DNA 領域 (Tanaka et al., Biosci. Biotech. Biochem 58: 548-551 (1994)、GENBANK アクセッション番号 D23669 に記載) を鋳型として、制限酵素 AscI および EcoRI サイトを 5' 端に付加したセンスプライマー D23669 (1+, AscI/EcoRI) (配列番号 3) と制限酵素 AvrII サイトを 5' 端に付加したアンチセンスプライマー D23669 (7555-, AvrII)

(配列番号 4) を用いて、PfuTurbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社登録商標) で、94℃2 分間の後、94℃30 秒間次いで 62℃30 秒間さらに 72℃11 分間の保温を 1 サイクルとして 25 サイクルからなる PCR を行った。該 PCR により増幅された DNA をアガロースゲル電気泳動で分析した結果、約 7.6Kb の DNA 断片が得られた。この DNA 断片を制限酵素 AscI および AvrII で消化した。さらに、プラスミド pPCVICE (AscI-AvrII) を制限酵素 AscI および AvrII で消化し、上記の約 7.6Kb の AscI-AvrII 断片とを DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造登録商標) を用いてライゲーションし、pHR-AT を構築した (図 2)。pHR-AT の塩基配列 (17511bp) を配列表の配列番号 13 に示す。

実施例 2 : rol-type アクティベーションタギングベクター pHR-AT-GFP の構築

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、sGFP (S65T) 遺伝子およびノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを有する断片をプラスミド 35S omega-sGFP (S65T) (Chiu et al., Current Biol 6:325-330 (1996)) を鋳型として制限酵素 AscI サイトを 5' 端に付加したセンスプライマー 35S-5 (AscI) (配列番号 5) と制限酵素 EcoRI サイトを 5' 端に付加したアンチセンスプライマー NOS-T-3 (EcoRI) (配列番号 6) を用いて PfuTurbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社登録商標) で、94℃2 分間の後、94℃30 秒間次いで 60℃30 秒間さらに 72℃2 分間の保温を 1 サイクルとして 25 サイクルからなる PCR を行った。該 PCR により増幅された DNA をアガロースゲル電気泳動で分析した結果、約 1.4Kb の DNA 断片が得られた。この DNA 断片を制限酵素 AscI および EcoRI で消化した。さらに、実施例 1 で構築した pHR-AT を制限酵素 AscI および EcoRI で消化し、上記の約 1.4Kb の AscI-EcoRI 断片とをライゲーションし、pHR-AT-GFP を構築した (図 3)。pHR-AT-GFP の塩基配列 (18987bp) を配列表の配列番号 14 に示す。

実施例 3 : アグロバクテリウム・ツメファシエンスの形質転換

アグロバクテリウム・ツメファシエンス GV3101 (pMP90RK) 株を 2 ml の YEP 培

地 (bacto-tryptone 10g, yeast extract 10g, NaCl 5g、水 1L) で 28℃、200 rpm で約 24 時間振とう培養した。培養液全量を 50 ml の YEP 培地に移し、OD600 が約 0.8 になるまでさらに振とう培養を続けた。3000 x g, 10 分間の遠心分離により集菌した後、1 ml の 20 mM 塩化カルシウムに懸濁した。懸濁した菌液を 100 μ l ずつ分注し、液体窒素により凍結した後、使用するまで -80℃ で凍結保存した。この状態の菌をコンピテントセルとする。凍結したコンピテントセルに実施例 1 および 2 で得られた pHR-AT、pHR-AT-GFP を 1 μ g 添加し、37℃ で 5 分間処理した後、1 ml の YEP 培地を添加し、28℃、200 rpm で約 2 時間振とう培養した。12,000 x g, 2 分間の遠心分離により集菌した後、100 μ l の YEP 培地に懸濁した。この菌液をカルベニシリン 100mg/l, リファンピシン 100mg/l およびゲンタマイシン 25mg/l を含む YEP 寒天培地に添塗した。形質転換したアグロバクテリウム・ツメファシエンスは、導入されたプラスミドが有する β -ラクタマーゼ遺伝子により付与されるカルベニシリンに対する薬剤耐性を利用して該培地で選択する事によって得られた。形質転換したアグロバクテリウム・ツメファシエンスをカルベニシリン 100mg/l, リファンピシン 100mg/l およびゲンタマイシン 25mg/l を含む YEP 培地で 28℃、2 日間培養し、得られた培養液からプラスミド精製を行い、pHR-AT あるいは pHR-AT-GFP を有していることを確認した。

実施例 4 : シロイヌナズナ形質転換

シロイヌナズナのエコタイプ WS の種子を有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸溶液で滅菌処理した後、MS 寒天培地に置床し、2 日間 4℃ 処理した。26℃ 日長 16 時間で 9 日間培養し、発芽させた。発芽した幼植物から胚軸を切り取り、4 μ M の 2, 4-D および 0.4 μ M のベンジルアデニンを添加した MS 培地に置床し、26℃、日長 16 時間で 7 日間培養し、緑化したカルスを誘導した。実施例 3 で調製した pHR-AT あるいは pHR-AT-GFP を保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンスをカルベニシリン 100mg/l, リファンピシン 100mg/l およびゲンタマイシン 25mg/l を含む 2 ml の YEP 培地で 28℃、2 日間培養した。

12,000 x g, 2 分間の遠心分離により集菌した後、OD600=0.2 となるように滅菌水に懸濁した。菌液に胚軸カルスを 2 分間浸した後、滅菌濾紙上に移して余分な菌液を除いた。MS 寒天培地に置床し、26℃、日長 16 時間で 48 時間共培養した後、胚軸カルスを 250mg/l のクラフォラン（アベンティス・ファーマ株式会社、登録商標）を含む滅菌水で洗浄した。250mg/l のクラフォランおよび 25mg/l のハイグロマイシンを添加した MS 培地に置床し、26℃、日長 16 時間で培養した。感染処理 20 日前後から形質転換根が誘発され、pHR-AT-GFP を導入した全ての形質転換根で GFP の蛍光が観察された。

実施例 5：シロイヌナズナ形質転換根クローンの培養

実施例 4 において誘発した、pHR-AT-GFP が導入されたシロイヌナズナ形質転換根を根端を含むように一本ずつ切り取り、250mg/l のクラフォランおよび 25mg/l のハイグロマイシンを添加した HF 寒天培地 (Agric. Biol. Chem. 50, 2715 (1986)) で培養した。それぞれの形質転換根クローンを、30ml の HF 液体培地に入れ、イノーバプラットフォームシェーカー 2350 型（ニューブランズウィックサイエンティフィック社製）で、26℃、100 回転／分で旋回培養した。4 週間ごとに増殖した毛状根の一部約 1g 湿重を、新鮮な 30ml の HF 液体培地に入れ、継代培養した。

実施例 6：ゲノミックサザン解析による導入遺伝子の確認

液体培養した形質転換根クローンから Nucleon PhytoPure, plant and fungal DNA extraction kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、添付のプロトコールに従いゲノム DNA を抽出した。調製したゲノム DNA 10 μg を制限酵素 *NheI* で完全消化した後、全量を 0.8% アガロースゲル電気泳動分画に供した。泳動終了後、Chomczynski (Anal. Biochem. 201: 134-139 (1992)) の方法に従い、Hybond-N+ nylon membrane filter（アマシャム登録商標）に DNA をトランスファーした後、120℃で 30 分間ベーキングすることによりメンブラン上の DNA を固定した。ハイ

ブリダイゼーションに用いるプローブは、PCR DIG プローブ合成キット（ロシュ）を用いて調製した。pPCVICE_n4HPT プラスミド 1ng を鋳型として、センスプライマー AMPR5（配列番号 7）とアンチセンスプライマー AMPR3（配列番号 8）を用いて、70 μ M の DIG-11-dUTP 存在下で 94°C 2 分間の後、94°C 30 秒間次いで 55°C 30 秒間さらに 72°C 3 分間の保温を 1 サイクルとして 35 サイクルからなる PCR を行うことにより DIG 標識された β -ラクタマーゼ遺伝子 DNA 断片を得た。1ml あたり 2 μ l の PCR 反応液を含む DIG イージーハイブ（ロシュ）を用いて 42°C、16 時間のハイブリダイゼーションを行った後、1 x SSC, 0.1% SDS、10 分間、室温さらに 0.1 x SSC, 0.1% SDS、30 分間、68°C の条件でメンブランを洗浄した。アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（ロシュ）および CDP-Star（ロシュ）を用いて添付のプロトコールに従い、プローブとハイブリダイズしたゲノム DNA 断片を検出した。その結果、ゲノミックサザン解析に供した 10 ラインの形質転換根クローンの全てに関して pHR-AT-GFP 由来 T-DNA の挿入が確認された。

実施例 7：プラスミドレスキュー法による T-DNA ライトボーダー近傍ゲノム断片のクローニング

実施例 6 において T-DNA の挿入を確認した形質転換根クローン (4-D) を材料に用い、モデル植物の実験プロトコール -イネ・シロイヌナズナ編-、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 4、島本功、岡田清孝監修、秀潤社、1996、p135-142 に記載されているプラスミドレスキュー法によって、T-DNA ライトボーダーに近接するシロイヌナズナのゲノム領域（約 1.6Kb）をクローニングした。プライマー #19T-DNA10067(-)（配列番号 9）および SKI015RB（配列番号 10）を用いてクローン化されたゲノム領域の塩基配列を決定した。The Arabidopsis Information Resource のホームページ (<http://arabidopsis.org/Blast/>) に記載の方法によって BLAST サーチを行った結果、Arabidopsis thaliana DNA chromosome 5, BAC clone F9G14 (accession no. AL162973) 中の配列と一致し、挿入された T-DNA 中の 35S エンハンサーリピートから約 500 bp の距離に At5g02710 遺伝子の翻訳開

始コドンが準方向に位置していることが判明した。

実施例 8 : ノーザンハイブリダイゼーション法によるライトボーダー近接遺伝子の発現解析

形質転換根クローン 4-D における At5g02710 遺伝子の発現が、近傍に挿入された 35S エンハンサーリピートの影響により活性化されているかをノーザンハイブリダイゼーション法により調べた。形質転換根クローン 4-D 及びネガティブコントロールとして、他の独立した形質転換根クローン (1-A および 4-A) から RNAWIZ™ (Ambion) を用いて添付のプロトコールに従いトータル RNA を調製した。得られた RNA 15 μ g を 1%ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、Chomczynski (Anal. Biochem. 201: 134-139 (1992)) の方法に従い、Hybond-N+ nylon membrane filter (アマシャム登録商標) に RNA をトランスファーした後、120°C で 30 分間ベーキングすることによりメンブラン上の RNA を固定した。プローブの調製は以下の方法により行った。形質転換根クローン 4-D から調製したトータル RNA を材料として、TakaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (宝酒造) を用いて添付のプロトコールに従い cDNA 合成を行った。得られた cDNA 2 μ l を鋳型として、TaKaRa Ex Taq™ (宝酒造) を用いてセンスプライマー At5g02710-5 (配列番号 1 1) とアンチセンスプライマー At5g02710-3 (配列番号 1 2) を用いて、94°C 2 分間の後、94°C 30 秒間次いで 55°C 30 秒間さらに 72°C 1 分間の保温を 1 サイクルとして 25 サイクルからなる PCR を行うことにより、At5g02710 遺伝子の全長コード領域に相当する約 540bp の cDNA 断片を単離した。得られた cDNA 断片を、TOPO TA Cloning キット (インビトロジェン) を用いて pCRII-TOPO ベクターにクローニングした後、塩基配列を決定して cDNA 断片の挿入方向を確認した。ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとして、*in vivo* で発現している At5g02710 遺伝子 mRNA に相補的な RNA を *in vitro* 転写反応により合成した。At5g02710 遺伝子 cDNA を含むプラスミドを制限酵素 EcoRV でリニアライズし、得られた DNA 断片 1 μ g を鋳型として SP6 RNA polymerase (ロシュ) および DIG RNA Labeling Mix

(ロシュ) を用いて 350 μ M の DIG-11-UTP 存在下で、添付のプロトコールに従って *in vitro* 転写反応を行い、DIG ラベルされたアンチセンス RNA を調製した。DIG イージーハイブ (ロシュ) を用いて 68°C、16 時間、100 ng/ml プローブ濃度のハイブリダイゼーションの後、1 x SSC、0.1% SDS、10 分間、室温、さらに 0.1 x SSC、0.1% SDS、30 分間、68°C の条件で洗浄を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (ロシュ) および CDP-Star (ロシュ) を用いて添付のプロトコールに従いプローブとハイブリダイズした mRNA を検出した。その結果、形質転換根ライン 4-D においては At5g02710 遺伝子の mRNA レベルが顕著に増高していることが確認された (図 4)。

産業上の利用の可能性

本発明により、植物遺伝子を毛状根において迅速に活性化できるようになった。本発明によって活性化された遺伝子は、有用成分の生産、ストレス耐性植物などの有用植物の作出などに利用することができる。

請求の範囲

1. (1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットから構成される植物遺伝子活性化ベクター。
2. 毛状根誘発遺伝子が、rolB 遺伝子を含む、請求項 1 に記載の植物遺伝子活性化ベクター
3. エンハンサーが、カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーター由来である、請求項 1 又は 2 に記載の植物遺伝子活性化ベクター
4. 配列番号 13 に記載の塩基配列を有する pHR-AT、又はこれと実質的に同一の塩基配列及び実質的に同一の機能を有するベクターである、請求項 1 に記載の植物遺伝子活性ベクター。
5. 配列番号 14 に記載の塩基配列を有する pHR-AT-GFP、又はこれと実質的に同一の塩基配列及び実質的に同一の機能を有するベクターである、請求項 1 に記載の植物遺伝子活性ベクター。
6. 請求項 1 から 5 の何れかに記載の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌を植物組織に感染し、(1) 毛状根誘発遺伝子を有し、かつ (2) 植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させることを含む、植物遺伝子の活性化方法。
7. 毛状根誘発遺伝子が、rolB 遺伝子を含む、請求項 6 に記載の植物遺伝子の活性化方法。
8. エンハンサーが、カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーター由来である、請求項 6 又は 7 に記載の植物遺伝子の活性化方法。
9. 請求項 1 から 5 の何れかに記載の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌を植物組織に感染し、(1) 毛状根誘

発遺伝子を有し、かつ（２）植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させた後に、上記エンハンサー及び／又はプロモーターによって遺伝子発現が誘発された毛状根を選抜することを含む、植物遺伝子の分析方法。

１０． 請求項１から５の何れかに記載の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を植物組織に感染し、（１）毛状根誘発遺伝子を有し、かつ（２）植物で機能可能なエンハンサー及び／又はプロモーターを有し、その下流に植物で機能可能なターミネーターを実質的に含まない発現カセットを植物組織に導入し、毛状根を形成させることにより得られる、植物遺伝子の発現が誘発された毛状根。

１１． 請求項１から５の何れかに記載の植物遺伝子活性化ベクターを保持するアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌。

図 1

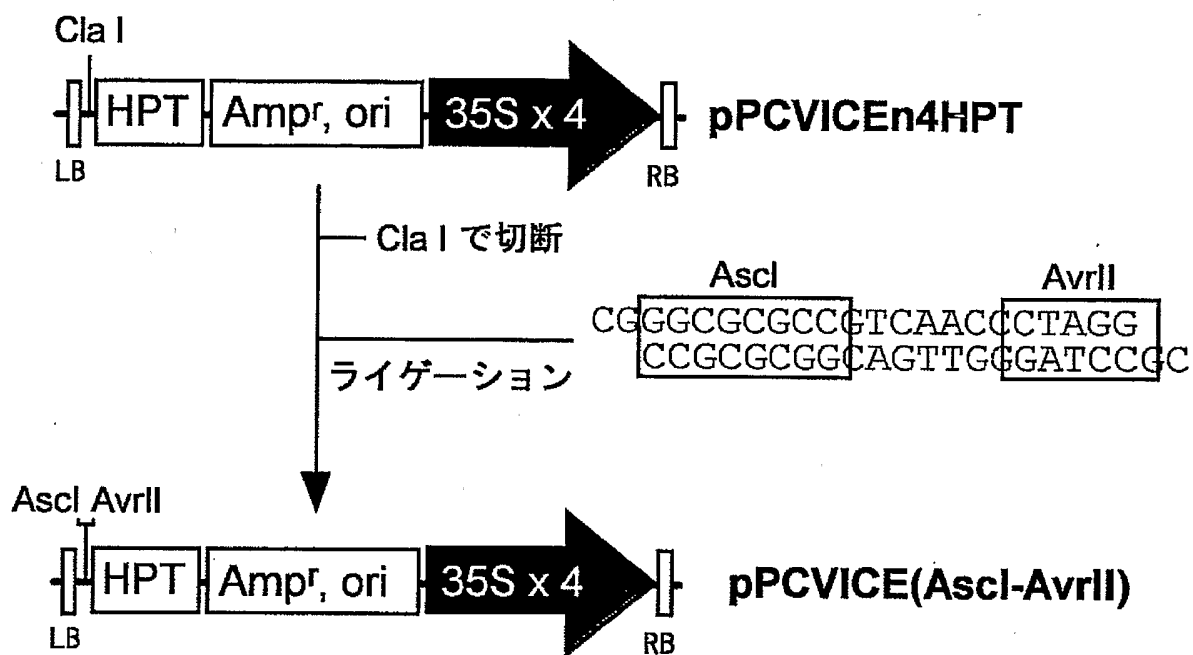


図 2

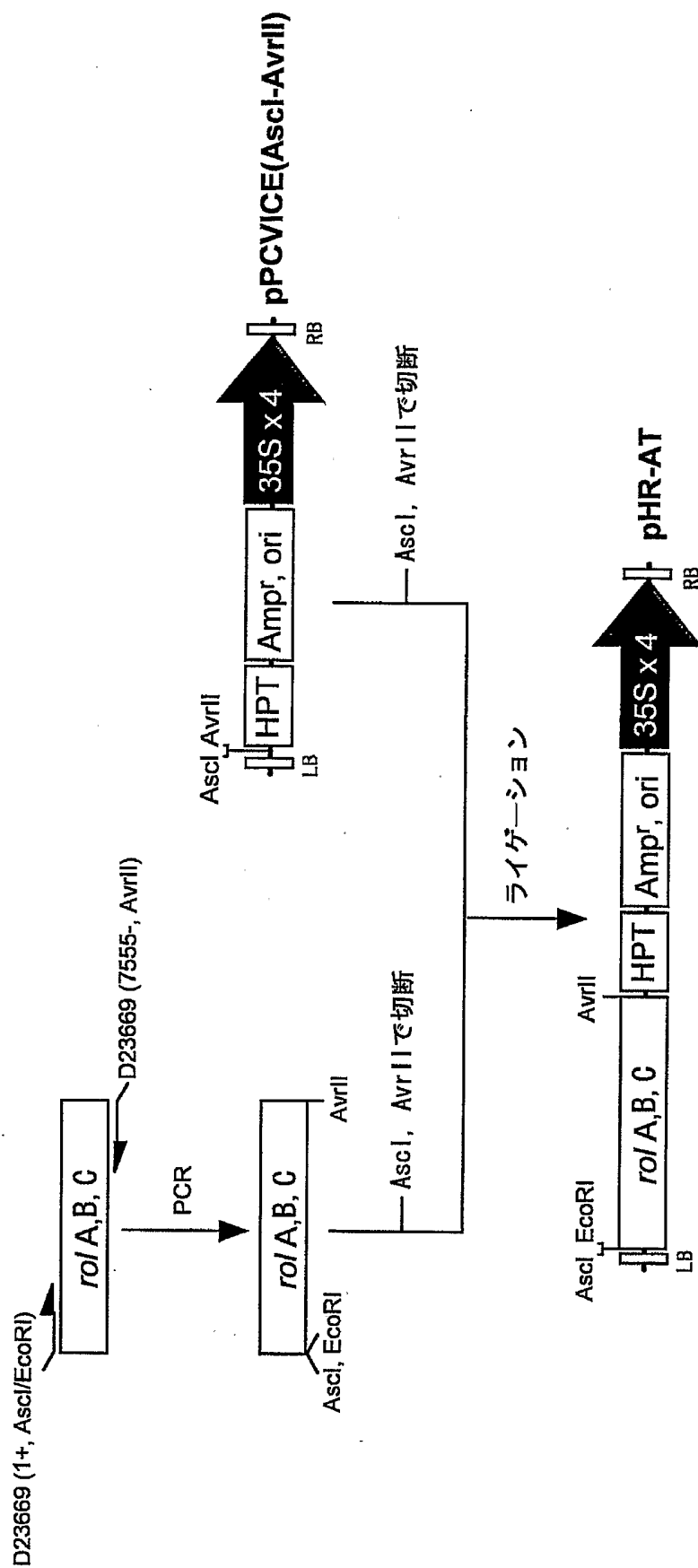


図 3

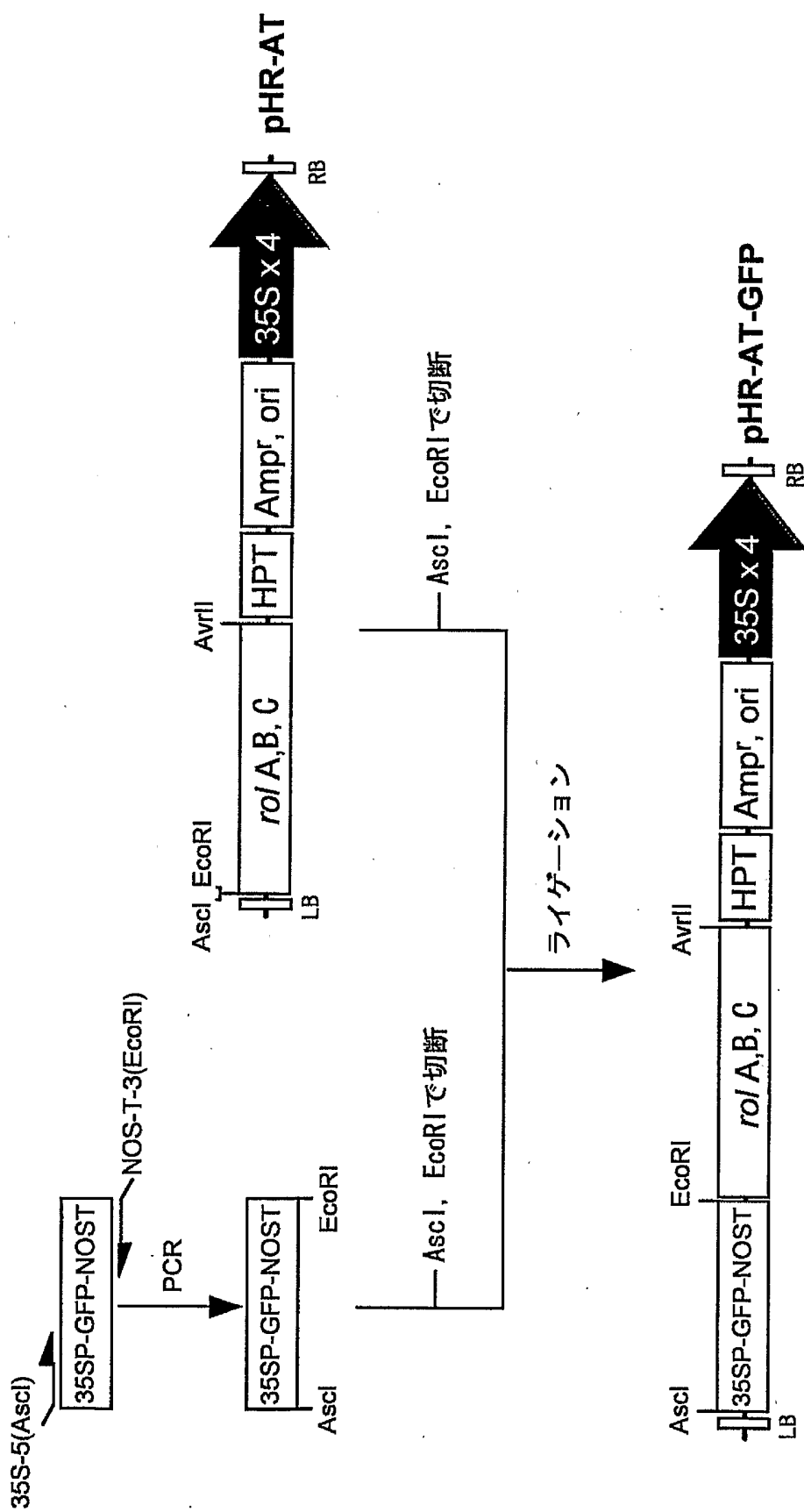
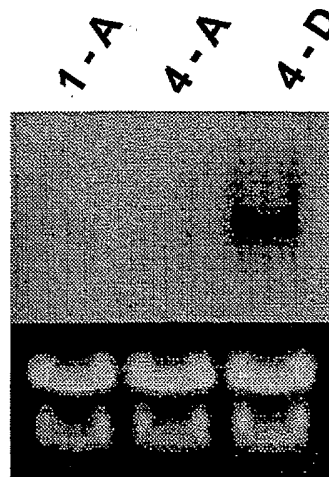


図 4

At5g02710



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A vector for the activation of a plant gene and use thereof

<130> A41343A

<160> 14

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

cggg'gcgcgcc gtcaacccta gg 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cgcctagggt tgacggcgcg cc 22

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

cttggcgcgc caaggaattc cagcggatat ctggagg 37

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

cgatcctagg gatacgctag aaaaggaagc attc 34

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

cttggcgcgc cccctcaga agaccagagg gct 33

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

cgaggaattc tcatgtttga cagcttatca tc 32

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

atgagtattc aacatttcg tg 22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ttaccaatgc ttaatcagtg a 21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

acgtcgcggt gagttcaggc 20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

ctagatccga aactatcagt g

21

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

atggatatgt cgcttgcgtt atc

23

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

tatctgacta atcaactcga gc

22

<210> 13

<211> 17511

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Recombinant DNA

<400> 13

ctagatccga aactatcagt gtttgacagg atatattggc gggtaaacct aagagaaaag 60
agcgtttatt agaataatcg gatattttaa agggcgtgaa aaggtttatc cgttcgtcca 120
tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cctcgggagt gcttggcatt ccgtgcgata 180
atgacttctg ttcaaccacc caaacgtcgg aaagcctgac gacggagcag cattccaaaa 240
agatcccttg gtcgctctgg gtcggctaga aggtcgagtg ggctgctgtg gcttgatccc 300
tcaacgcggt cgcgacgta gcgcagcgcc gaaaaatcct cgatcgcaa tccgacgctg 360
tcgaaaagcg tgatctgctt gtcgctcttt cggccgacgt cctggccagt catcacgcgc 420
caaagttccg tcacaggatg atctggcgcg agttgctgga tctcgccttc aatccgggtc 480
tgtggcggga actccacgaa aatatccgaa cgcagcaaga tatcgcggtg catctcggtc 540
ttgcctgggc agtcgccgc gacgccgttg atgtggacgc cgggcccgat catattgtcg 600
ctcaggatcg tggcgttgtg cttgtcggcc gttgctgtcg taatgatata ggcaccttcg 660
accgcctgtt ccgcagaggt gcaggcctcg atctgaaacc cgaaccgctg gagattgcgg 720
gagcagcgag cagtagcctc ggggtcgatg tcgtaaagtc gtatccgata gacgccgata 780
agcgccttga aggccaaagc ctggaactca ctttgggcac cgttgccgat cagcgccatc 840
gtgcgcgaat ctttacgggc cagatacttt gccgcgacgc cggaggtcgc ggccgttcgc 900
aaggccgtca ggattgtcat ttccgacagc agcagcggat agccgctata gacatcggag 960
agcacgccga acgcggttac cggcctcttc atcgggaatg cgcgcgacct tcagcatcgc 1020
cggcatgtcc ccctggcgga cgggaagtat ccagctcgag atccggattt ttagccctg 1080
gccgacggcc agcaggtagg ccgacaggct catgccggcc gccgccgcct ttctctcaat 1140
cgctcttcgt tcgtctggaa ggcagtacac cttgataggt gggctgccct tcctggttgg 1200
cttggtttca tcagccatcc gcttgccctc atctgttacg ccggcggtag ccggccagcc 1260
tcgcagagca ggattcccgt tgagcaccgc caggtgcgaa taaggacag tgaagaagga 1320
acaccgcctc gcgggtgggc ctacttcacc tatectgcc ggctgacgcc gttggataca 1380
ccaaggaaag tctacacgaa ccctttggca aaatcctgta tatcgtgca aaaaggatgg 1440
atataccgaa aaaatcgcta taatgacccc gaagcagggt tatgcagcgg aaaagcgctg 1500
cttcctgtct gttttgtgga atatctaccg actggaaaca ggcaaatgca ggaaattact 1560
gaactgaggg gacaggcgag agacgatgcc aaagagctac accgacgagc tggccgagtg 1620

ggttgaatcc cgcgcggccca agaagcgccg gcgtgatgag gctgcggttg cgttcctggc 1680
ggtgagggcg gatgtcgagg cggcgtttagc gtccggctat gcgctcgtca ccatttggga 1740
gcacatgcgg gaaacgggga aggtcaagtt ctccctacgag acgttccgct cgcacgccag 1800
gcggcacatc aaggccaagc ccgccgatgt gcccgccaccg caggccaagg ctgcggaacc 1860
cgcgccggca cccaagacgc cggagccacg gcggccgaag caggggggca aggctgaaaa 1920
gccggccccc gctgcggccc cgaccggctt caccttcaac ccaacaccgg aaaaaagga 1980
tctagcgtgg actcaaggct ctgcgcaatg gctcgcgttg gaaactttca ttgacacttg 2040
aggggcaccg cagggaattt ctctccttg cgagaaccgg ctatgtcgtg ctgcgcatcg 2100
agcctgcgcc cttggcttgt ctgccccctc tccgcgtcgc tacggggctt ccagcgcctt 2160
tccgacgctc accgggctgg ttgccctcgc cgctgggctg gcggccgtct atggccctgc 2220
aaacgcgcca gaaacgccgt cgaagccgtg tgcgagacac cgcgcccgcc ggcgttgttg 2280
atacctcgcg gaaaacttgg ccctcactga cagatgaggg gcggacgttg acacttgagg 2340
ggccgactca cccggcgcgg cgttgacaga tgaggggcag gctcgatttc ggccggcgac 2400
gtggagctgg ccagcctcgc aaatcggcga aaacgcctga ttttacgca gtttcccaca 2460
gatgatgtgg acaagcctgg ggataagtgc cctgcggtat tgacacttga ggggcgcgac 2520
tactgacaga tgagggggcg gatccttgac acttgagggg cagagtgtg acagatgagg 2580
ggcgcaccta ttgacatttg aggggctgtc cacaggcaga aaatccagca tttgcaaggg 2640
tttccgcccc tttttcggcc accgctaacc tgtcttttaa cctgctttta aaccaatatt 2700
tataaacctt gtttttaacc agggctgcgc cctgtgcgcg tgaccgcgca cgccgaaggg 2760
gggtgcccc ccttctcgaa ccctcccggc ccgctaacgc gggcctcca tcccccagg 2820
ggctgcgccc ctcgcccgcg aacggcctca cccaaaaat ggcagcgtg gcagtccttg 2880
ccattgccgg gatcggggca gtaacgggat gggcgatcag cccgagcgcg acgcccggaa 2940
gcattgacgt gccgcagggt ctggcatcga cattcagcga ccagggtccg ggcagtgagg 3000
gcggcggcct ggggtggcggc ctgcccttca cttcggccgt cggggcattc acggacttca 3060
tggcggggcc ggcaattttt accttgggca ttcttggcat agtggtcgcg ggtgccgtgc 3120
tcgtgttcgg ggggtgaattg caagctagct tgcttggtcg ttccggtacc gtgaacgtcg 3180
gctcgattgt acctgcgttc aaatactttg cgatcgtgtt gcgcgcctgc ccggtgcgtc 3240.

ggctgatctc acggatcgac tgcttctctc gcaacgccat ccgacggatg atgtttaaaa 3300
gtcccatgtg gatcactccg ttgccccgtc gctcacgggtg ttgggggggaa ggtgcacatg 3360
gctcagttct caatggaaat tatctgccta accggctcag ttctgcgtag aaaccaacat 3420
gcaagctcca ccgggtgcaa agcggcagcg gcggcaggat atattcaatt gtaaattggct 3480
tcatgtccgg gaaatctaca tggatcagca atgagtatga tggatcaatat ggagaaaaag 3540
aaagagtaat taccaatttt ttttcaattc aaaaatgtag atgtccgcag cgttattata 3600
aaatgaaagt acattttgat aaaacgacaa attacgatcc gtcgtattta taggcgaaag 3660
caataaacia attattctaa ttcggaaatc tttatttcga cgtgtctaca ttcacgtcca 3720
aatgggggct tagatgagaa acttcacgat cgatatctag atctcgagct cgagatctag 3780
atatcgggcg cgccaagaat tccagcggat atctggaggg tgggagaaac tactatacca 3840
cgggtgtgaa cggaacggca ggaagctgat cgctccgatg gatatctttt ccatgctgag 3900
aggtcggcgt tatgaagaag cctcggagc aaggcgggct tggctcaggg agtttgataa 3960
tttcactttc catgccgtc tggctgagat cttcagctgc ggtgtcgaga gtcttgggtg 4020
ggcggcatgg caaacaactg attttgcgtc tttcgggatg atgagattgg gcggcggccg 4080
agtttcttcc tgttacaccc tactgttttc gacagtcttg gactggataa tcaatgggta 4140
cgaggaggac cagcatatct ctgttgagg ggttcatctt ttgcaggctc tgatgcgcat 4200
tgagatattc aagagaaaag taggattcca ttttgacccc ctgcgtggac tagccaagga 4260
gggcgggaaa gtgaaggat gcatgaaaga tggccgttcg cgcgtttttg accaggtcat 4320
cattggcggg cgaggtgggc ccgatgcaac taatatcact ccggttagcc atgtgacctg 4380
tgtcggctat gatatcgaag cccccgctgg aaactcgtct gctactgtta acgcagcact 4440
tttcatgac acaaagcaaa aattctggct tgatgacgat atcccagctt tgatctggac 4500
ggatgggctc gtccgtgagc tctgttgtat tgacatcgaa tcgcatcgg ggagaggcgc 4560
ttgttatttt tcattatgaa atgaacgact atctatcccc cccgttccag tccgatgaga 4620
agaagagaag gtgcttggat ttagtcagag aacttgctgc tgtctttcct gaattggctt 4680
gtcatttggg tccagtcaac gaagattatg aagaatatgt cttcgacggc cacttgaagg 4740
atggtttcag ggcctcttta tggagggaaa attctcttaa aaaatgtcag tacagccaag 4800
atccgcatat gtatgattct ccgttaatgg agcatggggc agtttgccag attgacagta 4860

aggactgcgt aaacggagct ttgttcgaag agcagggttaa gacgggcatc ataacggcct 4920
gcaccgtcat tcgcagcacc ggcgggacac tatcttcact ccatcccctg gattggaata 4980
aaatatatatt tcttgcttga gtatattaat gtattagtgc gtattaatcc cgtaagcctg 5040
taagctgcag tagcggcgct caacttagtt ttccatgaat aataatgttt ttcctttatt 5100
tttgattgaa tcttgcttaa aaaatattct ttgagtgggc ttaaaatgac attaatcaga 5160
ttccaaaaat ttccatctgt gaccattagc gccttgatcg atgacattaa agtcttcaca 5220
tctccagaga aataccttcg tgattgcttg tctccacgtg ctttcgcatc ttgacagcta 5280
atagcgggcc ccttgacaca ctagccggcc acgcaattcg agatattccc actaacccca 5340
atgaggtcac tgcatctgc attggcagcc gcccacttg cattcgccac tgtgccgttt 5400
ggggtccact agccgctaatt taggactgca tatatttttg acgagctaag gggtcactat 5460
caccttcggt ttgaatttcc ttttcacaag actttaatgt tgccaattga gcaggctgaa 5520
agaaaatccg caatcaacgg agaaaggtta acagccaaac aaaaaagaa tgcttcatca 5580
ttgcataggg tctacaacga ccattacttt cggcggtggg cctgctacta ttttttctt 5640
agtcttcggc cagccatttg ttaacgtcct atatagatcg cttcaccaga agaatgaatt 5700
atttagatca tgctgtaatg cttcaatgct gtaagttcta aatgtttgtt tcgttttgca 5760
agaaaatctat tttgctaaca gcacttcttt tattctcagg atggaactag ccggaataaa 5820
cgttgtcgga atggcccaga cctttggaga ggctcgctc gttgtctccg acctatttcg 5880
gcgggctaag gtcaagaaga agaaggccaa acgtgtgtcg ccgggcgatt tctccctga 5940
ccaaattgca gagcttgatg atctgagcgt cactcctctg gctataactt ctctgggcc 6000
taccgtgatg gtcaatgatc acggaattgc tacgagggga cgctttgtcg ctggaccgga 6060
atattcagac ctacgggggt aatacgcagt tctaaacaaa cctacgggat taatacgcac 6120
gtggctctat aatttcgatt catctctccg ccggagatga tatcggtat tttctcgttg 6180
gtacaataag ttgcgagcca ccgtgcgatt gtttttaatt ttctatatag tactttaacg 6240
tctctctatg gcgatttgta atgtttggaa tattattgtc tgtaaggcg cttttgtaac 6300
aatatcaatg taaaagcatt atcagtattg tgtgagacct ctataaatat cgaaatgatt 6360
tgctatttt ctgaaaattg gcggcagaaa taatgctgta ataatttatt tcaacacaag 6420
taaaatacat cgtagcgtac gctacacaac tcctaacagg agcaatggct acgcggaaaa 6480

catggaaatc ctaccaaact tatagttaaa ggtggcctgc aggggacctc aagtcgccga 6540
ggtttctttc ttcagattta ctatagcagg cttcatatca ccctcttcac gtttctggtt 6600
gggtcccgag agccgcaggg tgaggtctgg ctccggtgac ggtaccgccg gtcgtggcat 6660
cacgccagca tttttggtga actgtgtgat gccgaagca atgacgtcat aggagcggtt 6720
tccagtgcct tgccgcacga agaaggtgca ggctacctcc ctgccgtaca catttgtcac 6780
ttttaactcc agcaggtgaa tgaacaaggt acttgcaaaa atggcgataa agccttccag 6840
atcaggttct tccacgcggc ggtgcggcca agcaatgttg tgagcacgga ccatctcctg 6900
gaggacgagg tcgctacgat agggttgcat cgtggtcgcc agcacggcct ccaatccaaa 6960
cgtgatggat ttttctcca gtactttctg catcttctcg cgagatagat agacaaatac 7020
atgtcggtcg ttttctctgg caagatccgg gtgatcgaca agcatgggag ggtgataaca 7080
tactttgttt ttcagaagat gggccagttg ttttaagtatg accaccggcg gagcgttttc 7140
ctccaaatca agcacgcctt gggcccacct tttctggaaa tccatgagag ttttgctata 7200
gacttggcta tagattaaaa aagcaaattg gatctcatcg aacaagttaa gctggttcca 7260
ggcttttgtg agatctcgtg gttgaaagcg ttgaaggaat agtgatcgag gagccattgt 7320
gatgtgaggt tggggataac tatggaataa cggcaagttc agtgccattt aaagtgcacc 7380
gccggcaagt ggcaccaatc aggcacagtc tccggtcggg aaagccagag gcaatctggc 7440
aataatcacc atcgcatcaa aatcgatgct cggacatggc ggccttaaaa cctggatcaa 7500
gcgaaaaata atgcccgtt gatttggtcac gaggtcatag tagtgggcct agcttttttg 7560
ttttttttgt ttggcttttag tgaaagtatg tctaaaagat acatgaaatg aggagggttg 7620
ggtagagctt aaagttggcc gaatatagga tttcgtgaaa gctgcacggg aaaacgtgtt 7680
tatggttgca ctctcgatgc tatttataat taagatgtaa ttattgccga caatatcaat 7740
taaactctatt gatatatgtg ttatattttg aaagtgcata tgtctgcca tacaataat 7800
ttatttcaat tacgcaatta ctcttatgcc aataaaatgt ggattatata gcaattgtaa 7860
tattaaatac actttggacc tatacgactt aatattgcca cgccaggcaa acagtccatt 7920
cggatcttgc tataggtgcc atcctgatac aagttttaga tttgaagccc atcaatcgtt 7980
ttagggccca aaaatcaaaa tgggccgaaa tagcatttat ctaaaagaag gagtcgtggc 8040
tagttaagtg ctttgaatga gatcccatgg aaaagcgaca cctgtgtggt gcagacaggc 8100

ctaacgtggt gcacaggttg aaaaagtagt gccttttcgc aacataaata aaggtaggcg 8160
cgtgcgacca taattaaagg aaaaagaaag atgctattga cgatgtgaca ccattattgg 8220
acagcagaac ctattccac cegtgtttt gcaaagatgc aaaaccctta aaggccattt 8280
taagtacaga cacgtgccgg tctataatta tttacaaat gtgagacgtg gaacatctat 8340
agtcgtataa tttatgaata ttgggttttg cagctatacc taactgatat tcaaatcata 8400
taagcaaaaag catctataaa aggaatgatg cttccagttc tgggtgcacg ccactattat 8460
ttcctacttt gtaacatgg cggaatttga cctatgtgct ctcttttcca gtcttaaggt 8520
aggcgacgta tcgtccagcg atgagctaaa gaaacacatc cagagcgctt caaaggagcg 8580
gacccccctg acggagccgg gtgaggcca gtgatggat attgacgaag agggcggtcg 8640
ccaagaccct gggatactgt acctctacgt cgactgccc acgatgatgc gatgctttta 8700
tggagggtct ttgccctaca attccaggca cggcgcgctc atcaccaatc ttccaccgta 8760
ccagaaagat gtaagtctcg gtgagggtg cagggggctt aggcaggcat caggattctt 8820
tggatacgag gatgttatcc ggagcgccta cttcgccga ctttctgtcc ccgggtactt 8880
cgtcaagctg gatgggcaga tggagctaac ttcaacaaag ggaaagtctc tgaccttca 8940
cctttatgcc agcaaccagc tcaggctcga acctggtcgc ttggtgaggc atggcgaatg 9000
caaatttga atggagtgat ggcagtagct gttctgacgg tgcccagagg ctggagggtg 9060
tacctgtttc acgctagaaa tataaatgta ataaacatca tggatctggt tgatgtaacc 9120
tgcgccattg atgcacttgt tcttttttct tccgatgaat gggttgtttg cttgaaatga 9180
aacctgcctg ttcgagattt ggttattacc ttttccattt atgtttttta ttatttgtgt 9240
attaaagaaa atagttcaca tagccgcaat atatgaccga agctggccca caatgccga 9300
atagatgatt aatttgtcaa acttagctat caatatctcg ataggagtgc cgacatgttt 9360
aaaccaggca aactcgttct ctttgaaaac tgataataaa gacaagaaaa ttagccact 9420
ctaaaaagtc acatagcaaa ttcaacataa agaaaccaga agtcagagga aagactttta 9480
atccttgatt atgtgaacaa aatagccgca atacgcaaaa gtgtgcctt catgattgtt 9540
caataatttc tgtagcaaat ggaaaacgtt ttacaaacaa tgtggtcttg gagtaataat 9600
cggaagaaaa gttcataagt cagataattt gcgttgctga cactagtac caagcacctt 9660
taaatacctc tgcttccat gcattttgcc aagttaacct aaactggcag ttgaatggct 9720

cggtatttcg gcagtagctc tcaacggctt catgtcgatg attttcgttt tatcaaggag 9780
cccactcgac taaaggctca gcttgttaat gtggtgaaaa cctacaaggc tgtacaaaca 9840
gagacgttaa agtactatat atcatctgca actgagcgtg tggctcatgt ggaggcagtc 9900
catgtcgaca atgcagaaat ggggctgcat ccggccgggt ttaagtatcc tctgtccttc 9960
gtctttacct ccctggccgt ggctaaagcc tgcaaggaga acaagcatct cgtgtgcgag 10020
gagcatttgg agggagatct gatatcgtgc gtcgttcctc cctatcagac aaatgtctct 10080
ctcgtgctt taagggaagt ccacaattcc gtttcgggag gaggttacct ggattcggat 10140
ccaacagaca tggattatth tgtggcgatc ttgccagatg aaaatttcga ctatcagagc 10200
tgcgaaattg tcaccaaaaa tggcggcgaa ggactttgca agatttatag cagacaactg 10260
gatgggccct tagcttatga agccatactg gcaattggca aggtcctgtt ggaatagggc 10320
agtgcaccgc ttatccaacg ggggtttcga ttatatttcg tattatctta catgacttaa 10380
gatcatgcat gtttcgcttg ttctcccggtg tgcggttac gttattgtgt taaaataacg 10440
ggatgatgct atcaagtgct attgtaaaat atgttatatt ttgaatatct ataatatagc 10500
gctgtgtgcg ctcgatgggc agttacatga tcatgatata tattattggg taatcaatcg 10560
cattacagtg gcgtgtgctt attgaaataa cataatgata aaattattta tttaatatct 10620
gataacatat caaagggtac aacgtgataa caaagacggt ggatacagcg tttattggga 10680
tatccgctgg ccagttatac gtaaataata cagacagagt ttgagagagc acgcagattg 10740
tagccaagtt gagtgacttg ccggtagcac cgaagctaag ctgaggtgtt ccaaattgac 10800
tggcgtcgag gtgacgagca cgacgacctt gccggacaat gcggtcgag gggactcaag 10860
gcgggtggct tgtaacggac cttgtgcttc ttgtttagc tttcgttgac cataaccatt 10920
gggaagggtg ctgaacaacg gtagcgcacc tttttcaagc gaggtggca gaagaacata 10980
tttgcccgtc ggcagacggc ggtgagcatg acagctgcta agggagttac tggaatcgcg 11040
tgagcgggtga gcatgccgtc ctgactatcg gcgccaatc aacaggacat cctcaacatg 11100
ttttccaatt ccttgaacct atctttatag cattgatctc caaccgatct cgattgaggc 11160
caaatttaat attcaaaaga gagtttagtg gaaatggaat ataatcccggt ggcggaagaa 11220
gagccttcaa aaatggcagt ccaactaggac agtcaataat atccaaaaag cattgaaatt 11280
gggttgggca cgagagactg acgcggatgc cactcgattg ctaatggaat gtttcctttt 11340

ctagcgtatc cctaggcgat aagcttgcac gcctgcaggt cgacggatca gcttcacgct 11400
gccgcaagca ctcagggcgc aagggtgct aaaggaagcg gaacacgtag aaagccagtc 11460
cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg acaagggaaa 11520
acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga tagctagact 11580
gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggtaagg 11640
ntgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaagatc tgatggcgca 11700
ggggatcaag atcatgagcg gagaattaag ggagtcacgt tatgaccccc gccgatgacg 11760
cgggacaagc cgttttacgt ttggaactga cagaaccgca acgttgaagg agccactcag 11820
ccgcgggttt ctggagtta atgagctaag cacatacgtc agaaaccatt attgcgcgtt 11880
caaaagtcgc ctaaggtcac tatcagctag caaatatttc ttgtcaaaaa tgctccactg 11940
acgttccata aattcccctc ggtatccaat tagagtctca tattcactct caatccagat 12000
ctgatcccg ggggcaataa gatatgaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga 12060
agtttctgat cgaaaagtgc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag 12120
aatctcgtgc tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct 12180
gcgccgatgg tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcacg gccgcgctcc 12240
cgattccgga agtgcttgac attggggcat tcagcgagag cctgacctat tgcatctccc 12300
gccgtgcaca ggggtgtcac ttgcaagacc tgacctgaaac cgaactgccc gctgttctgc 12360
agccggctgc ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tcttagccag acgagcgggt 12420
tcggccccatt cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg 12480
cgattgctga tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt 12540
ccgtcgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggccga ggactgcccc gaagtccggc 12600
acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag 12660
cggtcattga ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct 12720
tcttctggag gccgtggttg gcttgatgg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc 12780
atccggagct tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgtatat gctccgcatt ggtcttgacc 12840
aactctatca gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcg cagggtcgat 12900
gcgacgcaat cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gccgcgagaa 12960

gcgcggccgt ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtgga aaccgacgcc 13020
ccagcactcg tccgagggca aaggaataga gtagatgccg accgggatca acgcagccgc 13080
tttcgacgga ttcgaaggtc atccgttcgg aatgtattag gttacgccag ccctgcgtcg 13140
cacctgtctt catctggata agatgttcgt aattgttttt ggctttgtcc tgttgtggca 13200
gggcggcaaa tacttccgac aatccatcgt gtcttcaaac tttatgctgg tgaacaagtc 13260
ttagtttcca cgaaagtatt atgttaaatt ttaaaatttc gatgtataat gtggctataa 13320
ttgtaaaaaat aaactatcgt aagtgtgcgt gttatgtata atttgtctaa atgtttaata 13380
tatatcatag aacgcaataa atattaaata tagcgctttt atgaaatata aatacatcat 13440
tacaagttgt ttatatattcg ggtaccgagc tcgcgaaagc ttggcactgg ccgtcgctttt 13500
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc 13560
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt 13620
gcgcagcctg aatggcgaat ggcgctgat gcggtatfff ctcttacgc atctgtgcgg 13680
tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag 13740
ccagccccga caccgccaac caccgctga cgcgcctga cgggctttgt ctgctcccgg 13800
catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag agggtttcac 13860
cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatff ttataggtta 13920
atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg 13980
gaacccctat ttgtttatff ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat 14040
aaccttgata aatgcttcaa taatatgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 14100
gtgtcgccct tattccctff tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa 14160
cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac 14220
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 14280
tgagcactff taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag 14340
agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca 14400
cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca 14460
tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa 14520
ccgctttfff gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc 14580

tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa 14640
cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag 14700
actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt cggctggct 14760
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 14820
tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa 14880
ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcattggt 14940
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac ttagattga tttaaaactt catttttaat 15000
ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaate ccttaacgtg 15060
agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 15120
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccgagcgtg 15180
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga 15240
gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccaccn cttcaagaac 15300
tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt 15360
ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgga tcaagacgat agttaccgga taaggcgag 15420
cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc 15480
gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag 15540
gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca 15600
gggggaaacg cctggatatc ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt 15660
cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc 15720
tttttacggg tcctggcctt ttgctggcct ttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc 15780
cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc 15840
cgaacgaccg agcgacgca gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa 15900
ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac 15960
tggaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agtcactca ttaggcaccc 16020
caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataacaa 16080
tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttggctgcag gtcgacggat 16140
ccccaacatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc 16200

agaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggtg atatcgggaa acctcctcgg 16260
attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aagatggctt 16320
ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcggt caagatgcct ctaccgacag 16380
tggtcccaaa gatggacccc caccacgag gaacatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 16440
cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctagatc cccaacatgg tggagcacga 16500
cactctcgtc tactccaaga atatcaaaga tacagtctca gaagaccaga gggctattga 16560
gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa ctcctcggg ttccattgcc cagctatctg 16620
tcacttcacg gaaaggacag tagaaaagga agatggcttc tacaatgcc atcattgcga 16680
taaaggaaag gctatcggtc aagatgcctc taccgacagt ggtcccaaag atggaccccc 16740
accacgagg aacatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtggg 16800
ttgatgtgat atctagatcc ccaacatggg ggagcacgac actctcgtct actccaagaa 16860
tatcaaagat acagtctcag aagaccagag ggctattgag acttttcaac aaagggtaat 16920
atcgggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cacttcacg aaaggacagt 16980
agaaaaggaa gatggcttct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg ctatcgttca 17040
agatgcctct accgacagtg gtcccaaaga tggaccccc cccacgagga acatcgtgga 17100
aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctagatccc 17160
caacatgggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga 17220
agaccagagg gctattgaga cttttcaaca aagggtataa tcgggaaacc tcctcggatt 17280
ccattgccc gctatctgtc acttcacgga aaggacagta gaaaaggaag atggcttcta 17340
caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctcta ccgacagtgg 17400
tcccaaagat ggacccccac ccacgaggaa catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac 17460
gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctagatccga aactatcagt g 17511

<210> 14

<211> 18987

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Recombinant DNA

<400> 14

ctagatccga aactatcagt gtttgacagg atatattggc gggtaaacct aagagaaaag 60
agcgtttatt agaataatcg gatattttaa agggcgtgaa aaggtttatc cgttcgtcca 120
tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cctcgggagt gcttggcatt ccgtgcgata 180
atgacttctg ttcaaccacc caaacgtcgg aaagcctgac gacggagcag cattccaaaa 240
agatcccttg gtcgtcttgg gtcggctaga aggtcgagtg ggctgctgtg gcttgatccc 300
tcaacgcggt cgcggacgta gcgcagcgcc gaaaaatcct cgatcgcaaa tccgacgtg 360
tcgaaaagcg tgatctgctt gtcgctcttt cggccgacgt cctggccagt catcacgcgc 420
caaagttccg tcacaggatg atctggcgcg agttgctgga tctcgcttc aatccgggtc 480
tgtggcggga actccacgaa aatatccgaa cgcagcaaga tatcgcggtg catctcggtc 540
ttgcctgggc agtcgccgcc gacgccgttg atgtggacgc cgggcccgat catattgtcg 600
ctcaggatcg tggcgttgtg cttgtcggcc gttgctgtcg taatgatata ggcaccttcg 660
accgcctgtt ccgcagaggt gcaggcctcg atctgaaacc cgaaccgtg gagattgcgg 720
gagcagcgag cagtagcctc ggggtcgatg tcgtaaagtc gtatccgatc gacgccgatc 780
agcgcccttga aggccaaagc ctggaactca ctttgggcac cgttgccgat cagcgccatc 840
gtgcgcgaat ctttacgggc cagatacttt gccgcgatcg cggaggtcgc ggccgttcgc 900
aaggccgtca ggattgtcat ttccgacagc agcagcggat agccgctatc gacatcggag 960
agcacgccga acgcggttac cggcctcttc atcgggaatg cgcgcgacct tcagcatcgc 1020
cggcatgtcc ccctggcgga cgggaagtat ccagctcgag atccggattt ttagccctg 1080
gccgacggcc agcaggtagg ccgacaggct catgccggcc gccgccgct tttcctcaat 1140
cgctcttcgt tcgtctggaa ggcagtacac cttgataggt gggctgccct tcctggttgg 1200
cttggtttca tcagccatcc gcttgccctc atctgttacg ccggcggtag ccggccagcc 1260
tcgcagagca ggattcccgt tgagcaccgc caggtgcgaa taaggacag tgaagaagga 1320
acacccgctc gcgggtgggc ctacttcacc tatcctgcc ggctgacgcc gttggataca 1380
ccaaggaaag tctacacgaa ccctttggca aaatcctgta tatcgtgcga aaaaggatgg 1440
atataccgaa aaaatcgcta taatgacccc gaagcagggt tatgcagcgg aaaagcgctg 1500

cttccttgc tttttgtgga atatctaccg actggaaaca ggcaaatgca ggaaattact 1560
gaactgaggg gacaggcgag agacgatgcc aaagagctac accgacgagc tggccgagtg 1620
ggttgaatcc cgcgcggcca agaagcgccg gcgtgatgag gctgcggttg cgttcctggc 1680
ggtgagggcg gatgtcgagg cggcgtttagc gtccggctat gcgctcgtca ccatttgga 1740
gcacatgcgg gaaacgggga aggtcaagtt ctctacgag acgttccgct cgcacgccag 1800
gcggcacatc aaggccaagc ccgccgatgt gcccgaccg caggccaagg ctgcggaacc 1860
cgcgccggca cccaagacgc cggagccacg gcggccgaag caggggggca aggctgaaaa 1920
gccggcccc gctgcggccc cgaccggctt caccttcaac ccaacaccg aaaaaagga 1980
tctagcgtgg actcaaggct ctgcggaatg gctcgcgttg gaaactttca ttgacacttg 2040
aggggcaccg cagggaaatt ctctccttg cgagaaccg ctatgtcgtg ctgcgcacgc 2100
agcctgcgcc cttggcttgt ctgcacctc tccgcgtcgc tacggggctt ccagcgcctt 2160
tccgacgtc accgggcttg ttgccctcgc cgctgggctg gcggccgtct atggccctgc 2220
aaacgcgcca gaaacgccgt cgaagccgtg tgcgagacac cgcggccgcc ggcgttgttg 2280
atacctcgcg gaaaacttgg ccctcactga cagatgaggg gcggacgttg acacttgagg 2340
ggccgactca cccggcgcg cgttgacaga tgaggggag gctcgatttc ggccggcgac 2400
gtggagctgg ccagcctcgc aaatcggcga aaacgcctga ttttacgcga gtttccaca 2460
gatgatgtgg acaagcctgg ggataagtgc cctgcggtat tgacacttga ggggcgcgac 2520
tactgacaga tgaggggagc gatccttgac acttgagggg cagagtgtg acagatgagg 2580
ggcgcaccta ttgacatttg aggggctgtc cacaggcaga aaatccagca tttgcaagg 2640
tttccgcccc tttttcgcc accgctaacc tgtcttttaa cctgctttta aaccaatatt 2700
tataaacctt gtttttaacc agggctgcgc cctgtgcgcg tgaccgcgca cgccgaagg 2760
gggtgcccc ccttctcgaa ccctcccggc ccgctaacgc gggcctcca tccccag 2820
ggctgcgccc ctgcggcg aacggcctca ccccaaaaat ggcagcgtg gcagtccttg 2880
ccattgccgg gatcggggca gtaacgggat gggcgatcag cccgagcgc acgcccggaa 2940
gcattgacgt gccgcaggtg ctggcatcga cattcagcga ccaggtgccg ggcagtgagg 3000
gcggcgccct ggggtggcggc ctgcccttca cttcgccgt cggggcatte acggacttca 3060
tggcggggcc ggcaattttt accttgggca ttcttggcat agtggtcgcg ggtgccgtgc 3120

tcgtgttcgg gggatgaattg caagctagct tgcttggtcg ttccggtacc gtgaacgtcg 3180
gctcgattgt acctgcgttc aaatactttg cgatcgtgtt gcgcgcctgc ccggtgcgtc 3240
ggctgatctc acggatcgac tgcttctctc gcaacgccat ccgacggatg atgtttaaaa 3300
gtcccatgtg gatcactccg ttgccccgtc gctcacgggtg ttggggggaa ggtgcacatg 3360
gctcagttct caatggaaat tatctgccta accggctcag ttctgcgtag aaaccaacat 3420
gcaagctcca ccgggtgcaa agcggcagcg gcggcaggat atattcaatt gtaaatggct 3480
tcatgtccgg gaaatctaca tggatcagca atgagtatga tggatcaatat ggagaaaaag 3540
aaagagtaat taccaatfff ttttcaattc aaaaatgtag atgtccgcag cgttattata 3600
aaatgaaagt acatfffatg aaaacgacaa attacgatcc gtcgtattta taggcgaaag 3660
caataaacia attattctaa ttcggaaatc tttatttcga cgtgtctaca ttcacgtcca 3720
aatgggggct tagatgagaa acttcacgat cgatatctag atctcgagct cgagatctag 3780
atatcgggcg cgcctccctc agaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggtta 3840
atatcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca 3900
gtagaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt 3960
caagatgcct ctaccgacag tgggtccaaa gatggacccc caccacagag gaacatcgtg 4020
gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact 4080
gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga 4140
agttcatttc atttggagag gacaggttc ttgagatcct tcaacaatta ccaacaacia 4200
caaacaacia acaacattac aattactatt tacaattaca gtcgactcta gaggatccat 4260
ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtgggtgcc atcctggtcg agctggacgg 4320
cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg 4380
caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct 4440
cgtgaccacc ttcacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccctgacc acatgaagca 4500
gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggtacgtc caggagcgca ccatcttctt 4560
caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggg 4620
gaaccgcac gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia 4680
gctggagtac aactacaica gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg 4740

catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga 4800
ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta 4860
cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct 4920
gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tcacggcatg gacgagctgt acaagtaaag 4980
cggccgccccg gctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc 5040
tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat 5100
aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccga 5160
attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc 5220
gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc gatgataagc tgtcaaacat gagaattcca 5280
gcggatatct ggagggtggg agaaactact ataccacggg tgtgaacgga acggcaggaa 5340
gctgatcgct ccgatggata tcttttccat gctgagaggt cggcgttatg aagaagcctc 5400
ggaagcaagg cgggcttggc tcaggaggtt tgataatttc actttccatg ccgctctggt 5460
cgagatcttc agctgcggtg tcgagagtcc tgggtggggcg gcatggcaaa caactgattt 5520
tgctgctttc gggatgatga gattgggcgg cggccgagtt tcttctgtt acaccctact 5580
gttttcgaca gtccctggact ggataatcaa tgggtacgag gaggaccagc atatctctgt 5640
tgagggggtt catcttttgc aggctctgat gcgcattgag atattcaaga gaaaagtagg 5700
attccatttt gacccccctgc gtggactagc caaggagggc gggaaagtga aggtatgcat 5760
gaaagatggc cgttcgcgcg tttttgacca ggtcatcatt ggcgggcgag gtgggccccg 5820
tgcaactaat atcactccgg ttagccatgt gacctgtgtc ggctatgata tcgaagcccc 5880
cgctggaaac tcgtctgcta ctgttaacgc agcacttttc atgatcaca agcaaaaatt 5940
ctggcttgat gacgatatcc cagctttgat ctggacggat gggctcgtcc gtgagctctg 6000
ttgtattgac atcgaatcgc catcggggag aggcgcttgt tatttttcat tatgaaatga 6060
acgactatct atcccgcccc ttccagtccg atgagaagaa gagaagggtc ttggatttag 6120
tcagagaact tgctgtgtc tttcctgaat tggcttgtca tttggttcca gtcaacgaag 6180
attatgaaga atatgtcttc gacggccact tgaaggatgg tttcagggcc tctttatgga 6240
gggaaaattc tcttaaaaaa tgtcagtaca gccaaagatcc gcatatgtat gattctccgt 6300
taatggagca tggggcagtt tgccagattg acagtaagga ctgcgtaaag ggagctttgt 6360

tcgaagagca ggttaagacg ggcatcataa cggcctgcac cgtcattcgc agcaccggcg 6420
ggacactatc ttcactccat cccctggatt ggaataaaat atattttcct gcttgagtat 6480
attaatgtat tagtgcgtat taatcccgta agcctgtaag ctgcagtagc ggcgctcaac 6540
ttagttttcc atgaataata atgtttttcc tttatttttg attgaatcct gcttaaaaaa 6600
tattctttga gtgggcttaa aatgacatta atcagattcc aaaaatttcc atctgtgacc 6660
attagcgcct tgatcgatga cattaaagtc ttcacatctc cagagaaata ccttcgtgat 6720
tgcttgcttc cacgtgcttt cgcactctga cagctaatag cgggcccctt gacacactag 6780
ccggccacgc aattcgagat attcccacta accccaatga ggtcactgca ttcgtcattg 6840
gcagccgccc cacttgcatc cgccactgtg ccgtttgggg tccactagcc gctaattagg 6900
actgcatata ttttgacga gctaaggggt cactatcacc ttcggtttga atttcctttt 6960
cacaagactt taatgttgcc aattgagcag gctgaaagaa aatccgcaat caacggagaa 7020
aggtaacag ccaaacaaaa aaagaatgct tcatcattgc atagggtcta caacgaccat 7080
tactttcggc ggtgggcctg ctactatttt tttcttagtc ttcggccagc catttggttaa 7140
cgtcctatat agatcgcttc accagaagaa tgaattatit agatcatgct gtaatgcttc 7200
aatgctgtaa gttctaaatg tttgtttcgt tttgcaagaa atctattttg ctaacagcac 7260
ttcttttatt ctccagatgg aactagccgg aataaacgtt gtcggaatgg ccagacctt 7320
tgagagggcc tcgctcgttg tctccgacct atttcggcgg gctaaggcca agaagaagaa 7380
ggccaaacgt gtgtcgccgg gcgatttcct ccctgaccaa attgcagagc ttgatgatct 7440
gagcgtcact cctctggcta taacttctcc tgggcctacc gtgatggtca atgatcacgg 7500
aattgctacg aggggacgct ttgtcgctgg accggaatat tcagacctac ggggttaata 7560
cgcagttcta aacaaaccta cgggattaat acgcacgtgg ctctataatt tcgattcatc 7620
tctccgccgg agatgatata ggctattttc tcgttggtac aataagttgc gagccaccgt 7680
gcgattgttt ttaattttct atatagtact ttaacgtctc tctatggcga tttgtaatgt 7740
ttggaatatt attgtctgtt aaggcgcctt tgtaacaata tcaatgtaaa agcattatca 7800
gtattgtgtg agacctctat aaatatcgaa atgatttgcc tattttctga aaattggcgg 7860
cagaaataat gctgtaataa tttatttcaa cacaagtaaa atacatcgta gcgtacgcta 7920
cacaactcct aacaggagca atggctacgc ggaaaacatg gaaatcctac caaacttata 7980

gttaaaggtg gcctgcaggg gacctcaagt cgccgaggtt tctttcttca gatttactat 8040
agcaggcttc atatcacctt cttcacgttt ctggttgggt cccgagagcc gcagggtgag 8100
gtctggctcc ggtgacggta ccgccggtcg tggcatcacg ccagcatttt tggatgaactg 8160
tgtgatgccg caagcaatga cgtcatagga gcggtttcca gtgccttgcc gcacgaagaa 8220
ggtgcaggct acctccctgc cgtacacatt tgtcactttt aactccagca ggtgaatgaa 8280
caaggtactt gcaaaaatgg cgataaagcc ttccagatca ggttcttcca cgcggcgggtg 8340
cggccaagca atgttgtgag cacggacat ctcctggagg acgaggtcgc tacgataggg 8400
ttgcatcgtg gtcgccagca cggcctcaa tccaaacgtg atggattttt cctccagtac 8460
ttctgcac cttctcgcgag atagatagac aaatacatgt cggtcgtttt ctctggcaag 8520
atccgggtga tcgacaagca tgggagggtg ataacatact ttgtttttca gaagatgggc 8580
cagttgttta agtatgacca ccggcggagc gttttcctcc aaatcaagca cgccttgggc 8640
ccaccttttc tggaaatcca tgagagtttt gctatagact tggctataga ttaaaaaagc 8700
aaattggatc tcatcgaaca agttaagctg gttccaggct tttgtgagat ctctgtggtg 8760
aaagcgttga aggaatagt atcgaggagc cattgtgatg tgaggttggg gataactatg 8820
gaataacggc aagttcagt ccatttaaa tgaccgcgcg gcaagtggca ccaatcaggc 8880
acagtctccg gtcgggaaa ccagaggcaa tctggcaata atcaccatcg catcaaaatc 8940
gatgctcgga catggcggcc ttaaaacctg gatcaagcga aaaataatgc ccgcttgatt 9000
ggtcacgagg tcatagtagt gggcctagct tttttgtttt ttttgtttgg ctttagtgaa 9060
agtatgtcta aaagatacat gaaatgagga ggggtgggta gagcttaaag ttggccgaat 9120
ataggatttc gtgaaagctg cacgggaaaa cgtgtttatg gttgcactct cgatgctatt 9180
tataattaag atgtaattat tgccgacaat atcaattaaa tctattgata tatgtgttat 9240
attttgaaag tgcatatgtc tgccataca aataatttat ttcaattacg caattactct 9300
tatgccaata aaatgtggat tatatagcaa ttgtaatat aaatacactt tggacctata 9360
cgacttaata ttgccacgcc aggcaaacag tccattcgga tcttgctata ggtgccatcc 9420
tgatacaagt tttagatttg aagcccatca atcgtttttag ggcccaaaaa tcaaaatggg 9480
ccgaaatagc atttatctaa aagaaggagt cgtggctagt taagtgtttt gaatgagatc 9540
ccatggaaaa gcgacacctg tgtggtgcag acaggcctaa cgtggtgcac aggttgaaaa 9600

agtagtgcct tttcgcaaca taaataaagg taggcgcgtg cgaccataat taaaggaaaa 9660
agaaagatgc tattgacgat gtgacaccat tattggacag cagaacctat tcccaccgt 9720
gcttttgcaa agatgcaaaa cccttaaagg ccattttaag tacagacacg tgccggtcta 9780
taattatfff acaaagtga gacgtggaac atctatagtc gtataattta tgaatattgg 9840
gttttgcagc tatacctaac tgatattcaa atcatataag caaaagcatc tataaaagga 9900
atgatgcttc cagttctggg tgcacgccac tattatttcc tactttgcta acatggcgga 9960
attgacctta tgtgctctct tttccagtct taaggtaggc gacgtatcgt ccagcgatga 10020
gctaaagaaa cacatccaga gcgcctcaaa ggagcggacc cccctgacgg agccgggtga 10080
gggccagtcg atggatattg acgaagaggg cggtcgccaa gaccctggga tactgtacct 10140
ctacgtcgac tgcccagca tgatgcgatg cttttatgga gggcttttgc cctacaattc 10200
caggcacggc gcgctcatca ccaatcttcc accgtaccag aaagatgtaa gtctcggtga 10260
gggtgtcgagg gggcttaggc aggcacagg attctttgga tacgaggatg ttatccggag 10320
cgctacttc gccgcacttt ctgtccccgg gtacttcgtc aagctggatg ggcagatgga 10380
gctaacttca acaaaggga agtctctgac cttcgacctt tatgccagca accagctcag 10440
gctcgaacct ggtgcgttgg tgaggcatgg cgaatgcaaa tttggaatgg agtgatggca 10500
gtagctgttc tgacggtgcc cagaggctgg aggtggtacc tgtttcacgc tagaaatata 10560
aatgtaataa acatcatgga tctggttgat gtaacctgcg ccattgatgc acttgttctt 10620
ttttcttccg atgaatgggt tgtttgcttg aaatgaaacc tgcctgttcg agatttggtt 10680
attacctttt ccatttatgt ttttaattat ttgtgtatta aagaaaatag ttcacatagc 10740
cgcaatatat gaccgaagct ggcccacaat gccgcaatag atgattaatt tgtcaaactt 10800
agctatcaat atctcgatag gagtgccgac atgtttaaac caggcaaact cgttctcctt 10860
gaaaactgat aataaagaca agaaaattag ccactctaa aaagtcacat agcaaattca 10920
acataaagaa accagaagtc agaggaaaga cttttaatcc ttgattatgt gaacaaaata 10980
gccgcaatac gccaaagtgt cgccttcatg attgttcaat aatttctgta gcaaatggaa 11040
aacgttttac aaacaatgtg gtcttggagt aataatcgga agaaaagttc ataagtcaga 11100
taatttgcgt tgctgacact agtgaccaag cacctttaaa tacctctgct tcccatgcat 11160
tttgccaagt taacctaaac tggcagttga atggctcgtt atttcggcag tagctctcaa 11220

cggttcatg tcgatgattt tcgttttatac aaggagccca ctcgactaaa ggctcagctt 11280
gttaatgtgg tgaaaaccta caaggctgta caaacagaga cgttaaagta ctatatatca 11340
tctgcaactg agcgtgtggc tcatgtggag gcagtccatg tcgacaatgc agaaatgggg 11400
ctgcatccgg ccgggtttta gtatcctctg tccttcgtct ttacctccct ggccgtggct 11460
aaagcctgca aggagaacaa gcatctctg tgcgaggagc atttggaggg agatctgata 11520
tcgtgcgtcg ttcctcccta tcagacaaat gtctctctcg ctgctttaag ggaagtccac 11580
aattccgttt cgggaggagg gtacctggat tcggatccaa cagacatgga ttattttgtg 11640
gcgatcttgc cagatgaaaa tttcgactat cagagctgcg aaattgtcac caaaaatggc 11700
ggcgaaggac ttgcaagat ttatagcaga caactggatg ggcccttagc ttatgaagcc 11760
atactggcaa ttggcaaggt cctgttgga tagggcagt caccgcttat ccaacggggg 11820
tttcgattat atttcgtatt atcttacatg acttaagatc atgcatgttt cgcttgttct 11880
cccgtgtgtc ggttacgtta ttgtgttaaa ataacgggat gatgctatca agtgcatttg 11940
taaaaatatgt tatattttga atatctataa tatagcgtg tgtgcgctcg atgggcagtt 12000
acatgatcat gatatatatt attgggtaat caatcgcatt acagtggcgt gtgcttattg 12060
aaataacata atgataaaat tatttattta atatctgata acatatcaaa ggttacaacg 12120
tgataacaaa gacggtggat acagcgttta ttgggatatc cgctggccag ttatacgtaa 12180
ataatacaga cagagtttga gagagcacgc agattgtagc caagttgagt gacttgccgg 12240
tagcaccgaa gctaagctca ggtgttccaa attgactggc gtcgaggtga cgagcacgac 12300
gaccttgccg gacaatgcgg tcgcagggga ctcaaggcgg gtggcttgta acggaccttg 12360
tgcttcttgt ttagctttc gttgaccata accattggga aggttgctga acaacggtag 12420
cgcacctttt tcaagcgagg gtggcagaag aacatatttg cccgtcggca gacggcgggtg 12480
agcatgacag ctgctaaggg agttactgga atcgcgtgag cggtagcat gccgtcctga 12540
ctatcggcgc ccaatcaaca ggacatcctc aacatgtttt ccaattcctt gaacctatct 12600
ttatagcatt gatctccaac cgatctcgat tgaggccaaa tttaatatc aaaagagagt 12660
ttagtggaat tggaatataa tcccgtggcg gaagaagagc cttcaaaaat ggcagtccac 12720
taggacagtc aataatatcc aaaaagcatt gaaattgggt tgggcacgag agactgacgc 12780
ggatgccact cgattgctaa tggaatgctt ctttttctag cgtatcccta ggcgataage 12840

ttgcatgcct gcaggtcgac ggatcagctt cagctgccg caagcactca gggcgcaagg 12900
gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtccgca gaaacgggtgc tgaccccgga 12960
tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaag agaaagcagg 13020
tagcttgtag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc ggttttatgg acagcaagcg 13080
aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggntgg gaagccctgc aaagtaaact 13140
ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg atcaagatca tgagcggaga 13200
attaaggagg tcacgttatg acccccgcgc atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 13260
aactgacaga accgcaacgt tgaaggagcc actcagccgc gggtttctgg agtttaatga 13320
gctaagcaca tacgtcagaa accattattg cgcgttcaaa agtcgcctaa ggtcactatc 13380
agctagcaaa tatttcttgt caaaaatgct ccactgacgt tccataaatt cccctcggtg 13440
tccaattaga gtctcatatt cactctcaat ccagatctga tcccgggggg caataagata 13500
tgaaaaagcc tgaactcacc gcgacgtctg tcgagaagtt tctgatcgaa aagttcgaca 13560
gcgtctccga cctgatgcag ctctcggagg gcgaagaatc tcgtgcttgc agcttcgatg 13620
taggagggcg tggatatgtc ctgcgggtaa atagctgcgc cgatggtttc taaaagatc 13680
gttatgttta tcggcacttt gcacggccg cgtcccgat tccggaagtg cttgacattg 13740
gggcattcag cgagagcctg acctattgca tctcccgccg tgcacagggt gtcacgttgc 13800
aagacctgcc tgaaaccgaa ctgcccgtg ttctgcagcc ggtcgcggag gccatggatg 13860
cgatcgctgc ggccgatctt agccagacga gcgggttcgg cccattcgga ccgcaaggaa 13920
tcgggtcaata cactacatgg cgtgatttca tatgcgcgat tgctgatccc catgtgtatc 13980
actggcaaac tgtgatggac gacaccgtca gtgcgtccgt cgcgcaggct ctgatgagc 14040
tgatgctttg ggccgaggac tgccccgaag tccggcacct cgtgcacgcg gatttcggct 14100
ccaacaatgt cctgacggac aatggccgca taacagcggc cattgactgg agcgaggcga 14160
tggttcgggga ttcccaatac gaggtcgcca acatcttctt ctggaggccg tggttggctt 14220
gtatggagca gcagacgcgc tacttcgagc ggaggcatcc ggagcttgca ggatcgccgc 14280
ggctccgggc gtatatgtc cgcattggtc ttgaccaact ctatcagagc ttggttgacg 14340
gcaatttcga tgatgcagct tgggcgcagg gtcgatgca cgcaatcgtc cgatccggag 14400
ccgggactgt cgggcgtaca caaatcgccc gcagaagcgc ggccgtctgg accgatggct 14460

gtgtagaagt actcgccgat agtggaacc gacgcccag cactcgtccg agggcaaagg 14520
aatagagtag atgccgaccg ggatcaacgc agccgctttc gacggattcg aaggtcatcc 14580
gttcggaatg tattaggtta cgccagccct gcgtcgcacc tgtcttcac tggataagat 14640
gttcgtaatt gtttttggct ttgtcctgtt gtggcagggc ggcaaatact tccgacaatc 14700
catcgtgtct tcaaacttta tgctggtgaa caagtcttag tttccacgaa agtattatgt 14760
taaattttta aatttcgatg tataatgtgg ctataattgt aaaaataaac tatcgtaagt 14820
gtgcgtgtta tgtataattt gtctaaatgt ttaatatata tcatagaacg caataaatat 14880
taaatatagc gcttttatga aatataaata catcattaca agttgtttat atttcgggta 14940
ccgagctcgc gaaagcttgg cactggccgt cgttttaca cgctcgtgact gggaaaaccc 15000
tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag 15060
cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg 15120
cctgatgcgg tattttctcc ttacgcactc gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac 15180
tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc 15240
cgctgacgcg ccctgacggg ctttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga 15300
ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggg tttcacgcgc atcacgaaa cgcgcgagac 15360
gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt 15420
agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 15480
aaatacatte aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 15540
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 15600
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 15660
aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 15720
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 15780
gtggcgcgggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 15840
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 15900
tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taaccatgag tgataaacct gcggccaact 15960
tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 16020
atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 16080

agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 16140
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 16200
caggaccact tctgcgctcg gcccttcggg ctggctgggt tattgctgat aaatctggag 16260
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 16320
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 16380
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 16440
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatTTaa aaggatctag gtgaagatcc 16500
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 16560
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 16620
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccga gcggtgggtt gtttgccgga tcaagagcta 16680
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt 16740
ctagtgtagc cgtagttagg ccacncttc aagaactctg tagcacgcgc tacatacctc 16800
gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 16860
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg 16920
tgcaacacgc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 16980
ctatgagaaa gcgccacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 17040
agggctcgga caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 17100
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 17160
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggccttttgc 17220
tggccttttg ctacatgtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 17280
accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 17340
gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg 17400
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac 17460
gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 17520
gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 17580
catgattacg ccaagcttgg ctgcaggtcg acggatcccc aacatggtgg agcacgacac 17640
tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccagaggg ctattgagac 17700

ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca 17760
cttcatcgaa aggacagtag aaaaggaaga tggcttctac aaatgccatc attgcgataa 17820
aggaaaggct atcgttcaag atgcctctac cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc 17880
cacgaggaac atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg 17940
atgtgatatc tagatcccca acatgggtgga gcacgacact ctcgtctact ccaagaatat 18000
caaagataca gtctcagaag accagagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc 18060
gggaaacctc ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac ttcatcgaaa ggacagtaga 18120
aaaggaagat ggcttctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga 18180
tgctctacc gacagtggc ccaaagatgg acccccaccc acgaggaaca tcgtggaaaa 18240
agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga tgtgatattc agatccccaa 18300
catgggtggag cacgacactc tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga 18360
ccagagggct attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca 18420
ttgccagct atctgtcact tcacgaaaag gacagtagaa aaggaagatg gcttctacaa 18480
atgccatcat tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctaccg acagtgggtcc 18540
caaagatgga cccccaccca cgaggaacat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 18600
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatattc gatccccaac atgggtggagc acgacactct 18660
cgtctactcc aagaatatca aagatacagt ctcagaagac cagagggcta ttgagacttt 18720
tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt 18780
catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg cttctacaaa tgccatcatt gcgataaagg 18840
aaaggctatc gttcaagatg cctctaccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac 18900
gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg 18960
tgatatctag atccgaaact atcagtg 18987

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/11, C12N5/14, A01H5/00, C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/11, C12N5/14, A01H5/00, C12N1/21		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	A Spena, et al., "Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulation abnormal growth in plants.", EMBO J. (1987), Vol.6, No.13, pages 3891 to 3899	<u>1-3, 6-11</u> 4, 5
<u>X</u> Y	Nobukazu TANAKA et al., "Nucleotide sequence of the rol region of the Mikimopine-type root-inducing plasmid pRI1724.", Biosci. Biotech. Biochem. (1994), Vol.58, No.3, pages 548 to 551	<u>1-3, 6-11</u> 4, 5
A	Slightom J.L. et al., "Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of Agrobacterium rhizogenes agropine type plasmid. Identification of open reading frames.", J. Biol. Chem. (1986), Vol.261, No.1, pages 108 to 121	1-11
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June, 2004 (18.06.04)		Date of mailing of the international search report 06 July, 2004 (06.07.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007789

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Weigel D. et al., "Activation tagging in Arabidopsis.", Plant Physiol.(2000), Vol.122, No.4, pages 1003 to 1013	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl ⁷ C12N15/11, C12N5/14, A01H5/00, C12N1/21			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl ⁷ C12N15/11, C12N5/14, A01H5/00, C12N1/21			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
<u>X</u> Y	A. Spena, et. al., Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulation abnormal growth in plants., EMBO J (1987), Vol. 6, No. 13, p. 3891-3899	<u>1-3, 6-11</u> 4, 5	
<u>X</u> Y	Nobukazu TANAKA, et. al., Nucleotide sequence of the rol region of the Mikimopine-type root-inducing plasmid pRil724., Biosci. Biotech. Biochem. (1994), Vol. 58, No. 3, p. 548-551	<u>1-3, 6-11</u> 4, 5	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 18.06.2004		国際調査報告の発送日 06.7.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高 美葉子	4N 9839
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Slightom JL, et.al., Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of Agrobacterium rhizogenes agropine type plasmid. Identification of open reading frames., J Biol Chem. (1986), Vol. 261, No. 1, p. 108-121	1 - 1 1
A	Weigel D, et.al., Activation tagging in Arabidopsis., Plant Physiol. (2000), Vol. 122, No. 4, p. 1003-1013	1 - 1 1