

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-517608
(P2008-517608A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 H 0 4 5
C O 7 K 16/06 (2006.01)	C O 7 K 16/06	
A O 1 K 67/02 (2006.01)	A O 1 K 67/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 159 頁)

(21) 出願番号 特願2007-538187 (P2007-538187)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月24日 (2005.10.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月20日 (2007.6.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/038582
 (87) 国際公開番号 W02006/047603
 (87) 国際公開日 平成18年5月4日 (2006.5.4)
 (31) 優先権主張番号 60/621,433
 (32) 優先日 平成16年10月22日 (2004.10.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

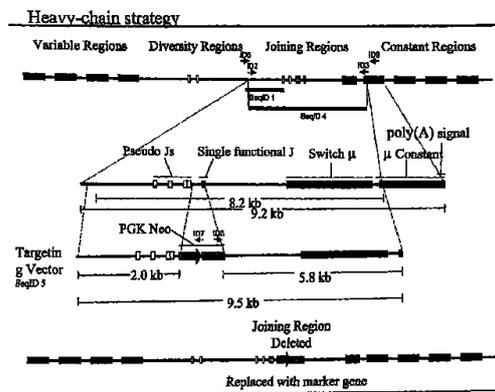
(71) 出願人 504364367
 レビビコア, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 バージニア 24060
 , ブラックスバーグ, クラフト ドラ
 イブ 1700, スイート 2400
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ウェールズ, ケビン
 アメリカ合衆国 バージニア 24073
 , クリスチャンズバーグ, カメオ コ
 ート 635

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子改変された免疫系を有する有蹄動物

(57) 【要約】

本発明は、機能的内因性免疫グロブリン遺伝子座の発現を欠く、有蹄動物、組織、および器官、ならびにこのような動物、組織、および器官由来の細胞および細胞株を提供する。本発明はまた、外因性(ヒトなど)免疫グロブリン遺伝子座を発現する、有蹄動物、組織、および器官、ならびにこのような動物、組織、および器官由来の細胞および細胞株を提供する。本発明は、さらに、有蹄動物(ブタなど)のブタの重鎖および軽鎖免疫グロブリンのゲノムDNA配列を提供する。このような動物、組織、器官、および細胞を、研究および医学療法で使用し得る。さらに、このような動物、器官、組織、および細胞の調製方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、トランスジェニック有蹄動物。

【請求項 2】

前記有蹄動物が、内因性重鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 3】

前記有蹄動物が、内因性軽鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 4】

前記有蹄動物が、内因性鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、請求項 3 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 5】

前記有蹄動物が、内因性鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、請求項 3 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 6】

前記有蹄動物が、ブタ、ウシ、ヒツジ、およびヤギからなる群から選択される、請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 7】

前記有蹄動物がブタである、請求項 6 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 8】

前記有蹄動物が、核移植によって生成される、請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 9】

前記有蹄動物が、外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現する、請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 10】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、重鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントである、請求項 9 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 11】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントである、請求項 9 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 12】

前記軽鎖遺伝子座が、鎖遺伝子座またはそのフラグメントである、請求項 11 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 13】

前記軽鎖遺伝子座が、鎖遺伝子座またはそのフラグメントである、請求項 11 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 14】

前記外因性遺伝子座が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントである、請求項 9 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 15】

人工染色体が、前記外因性免疫グロブリンを含む、請求項 9 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 15】

前記人工染色体が、哺乳動物人工染色体を含む、請求項 15 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 16】

前記哺乳動物人工染色体が、ヒト第 14 染色体、ヒト第 2 染色体、およびヒト第 22 染色体、またはそれらのフラグメントのうちの 1 つ以上を含む、請求項 15 に記載のトランス

10

20

30

40

50

ジェニック有蹄動物。

【請求項 17】

内因性 鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠く、トランスジェニック哺乳動物。

【請求項 18】

外因性免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するトランスジェニック有蹄動物であって、前記免疫グロブリンが、内因性有蹄動物染色体内に組み込まれた免疫グロブリン遺伝子座から発現される、トランスジェニック有蹄動物。

【請求項 19】

前記外因性免疫グロブリンが、ヒト免疫グロブリンまたはそのフラグメントである、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

10

【請求項 20】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、子孫に遺伝する、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 21】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、雄生殖系列を介して子孫に遺伝する、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 22】

前記有蹄動物が、ブタ、ヒツジ、ヤギ、またはウシである、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 23】

前記有蹄動物がブタである、請求項 22 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

20

【請求項 24】

前記有蹄動物が、核移植を介して生成される、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 25】

前記免疫グロブリン遺伝子座が B 細胞において発現されて、1 つ以上の抗原への曝露にตอบสนองして外因性免疫グロブリンを生成する、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 26】

前記人工染色体が、外因性免疫グロブリンを含む、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

30

【請求項 27】

前記人工染色体が、哺乳動物人工染色体を含む、請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 28】

前記人工染色体が、酵母人工染色体を含む、請求項 27 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 29】

前記人工染色体が、ヒト第 14 染色体、ヒト第 2 染色体、およびヒト第 22 染色体、またはそれらのフラグメントのうちの 1 つ以上を含む、請求項 26 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

40

【請求項 30】

請求項 1 に記載のトランスジェニック有蹄動物に由来する、トランスジェニック有蹄動物の細胞、組織、または器官。

【請求項 31】

請求項 18 に記載のトランスジェニック有蹄動物に由来する、トランスジェニック有蹄動物の細胞、組織、または器官。

【請求項 32】

前記細胞が、体細胞、生殖細胞、または胚細胞である、請求項 30 または請求項 31 に記載の細胞。

50

【請求項 3 3】

前記細胞が、B細胞である、請求項 3 2 に記載の細胞。

【請求項 3 4】

前記細胞が、線維芽細胞である、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 5】

外因性免疫グロブリン遺伝子座を含む、ブタ動物。

【請求項 3 6】

人工染色体が、前記外因性遺伝子座を含む、請求項 3 5 に記載のブタ。

【請求項 3 7】

前記人工染色体が、再配列する 1 つ以上の外因性免疫グロブリン遺伝子座を含み、かつ該人工染色体は、1 つ以上の抗原への曝露に反応して外因性免疫グロブリンを生成し得る、請求項 3 6 に記載のブタ。 10

【請求項 3 8】

請求項 3 5 に記載の動物に由来する、ブタ細胞。

【請求項 3 9】

前記細胞が、体細胞、B細胞、または線維芽細胞である、請求項 3 6 に記載のブタ細胞。

【請求項 4 0】

前記外因性免疫グロブリンが、ヒト免疫グロブリンである、請求項 3 5 に記載のブタ。

【請求項 4 1】

前記 1 つ以上の人工染色体が、哺乳動物人工染色体を含む、請求項 3 6 に記載のブタ。 20

【請求項 4 2】

前記哺乳動物人工染色体が、ヒト第 1 4 染色体、ヒト第 2 染色体、およびヒト第 2 2 染色体、またはそれらのフラグメントのうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 1 に記載のブタ。

【請求項 4 3】

外因性抗体を生成する方法であって、該方法は、

(a) 1 つ以上の目的の抗原を有蹄動物に投与する工程であって、有蹄動物の細胞は、1 つ以上の人工染色体を含み、かつ機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠き、それぞれの人工染色体は、再配列して該 1 つ以上の抗原に対する外因性抗体を生成する 1 つ以上の外因性免疫グロブリン遺伝子座を含む、工程；および

(b) 該有蹄動物から該外因性抗体を回収する工程； 30

【請求項 4 4】

前記免疫グロブリン遺伝子座が、B細胞中で再配列する、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、重鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントである、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記外因性免疫グロブリン遺伝子座が、軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントである、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記外因性遺伝子座が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントである、請求項 4 3 に記載の方法。 40

【請求項 4 8】

人工染色体が、前記外因性免疫グロブリンを含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記人工染色体が、哺乳動物人工染色体を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記哺乳動物人工染色体が、ヒト第 1 4 染色体、ヒト第 2 染色体、およびヒト第 2 2 染色体、またはそれらのフラグメントのうちの 1 つ以上を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

ブタ重鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントを含む単離ヌクレオチド配列であって、該重鎖免疫グロブリンは、少なくとも1つの連結領域および少なくとも1つの免疫グロブリン定常領域を含む、単離ヌクレオチド配列。

【請求項52】

前記重鎖免疫グロブリンが、少なくとも1つの可変領域、少なくとも2つの多様性領域、少なくとも4つの連結領域、および少なくとも1つの定常領域を含む、請求項51に記載のヌクレオチド配列。

【請求項53】

前記重鎖免疫グロブリンが、配列番号29を含む、請求項52に記載のヌクレオチド配列。

10

【請求項54】

前記重鎖免疫グロブリンが、配列番号4を含む、請求項51に記載のヌクレオチド配列。

【請求項55】

前記配列が、配列番号4または配列番号29と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同である、請求項53または請求項54に記載のヌクレオチド配列。

【請求項56】

前記配列が、配列番号4の少なくとも17個、20個、25個、または30個連続するヌクレオチドまたは配列番号29の残基1~9, 070を含む、請求項53または請求項54に記載のヌクレオチド配列。

20

【請求項57】

前記配列が、配列番号29の残基9, 070~11039を含む、請求項53または請求項54に記載のヌクレオチド配列。

【請求項58】

配列番号4または配列番号29とハイブリダイズする、単離ヌクレオチド配列。

【請求項59】

ターゲティングベクターであって、

(a) 配列番号29と相同な少なくとも17個連続する核酸を含む、第1のヌクレオチド配列、

(b) 選択マーカー遺伝子；および

30

(c) 前記第1のヌクレオチド配列と重複しない、配列番号29と相同な少なくとも17個連続する核酸を含む、第2のヌクレオチド配列；

を含む、ターゲティングベクター。

【請求項60】

前記選択マーカーが、抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項59に記載のターゲティングベクター。

【請求項61】

前記第1のヌクレオチド配列が、5'組換えアームに相当する、請求項59に記載のターゲティングベクター。

【請求項62】

前記第2のヌクレオチド配列が、3'組換えアームに相当する、請求項59に記載のターゲティングベクター。

40

【請求項63】

請求項59に記載のターゲティングベクターでトランスフェクトされた、細胞。

【請求項64】

ブタ重鎖免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1つの対立遺伝子が不活化されている、請求項63に記載の細胞。

【請求項65】

請求項64に記載の細胞を含む、ブタ動物。

【請求項66】

50

有蹄動物の 軽鎖免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含む、単離ヌクレオチド配列。

【請求項 67】

前記有蹄動物がブタである、請求項 66 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 68】

前記有蹄動物の 軽鎖免疫グロブリン遺伝子座が、少なくとも 1 つの連結領域、1 つの定常領域、および / または 1 つのエンハンサー領域を含む、請求項 66 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 69】

前記ヌクレオチド配列が、少なくとも 5 つの連結領域、1 つの定常領域、および 1 つのエンハンサー領域を含む、請求項 66 に記載のヌクレオチド配列。

10

【請求項 70】

配列番号 30 を含む、請求項 69 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 71】

配列番号 12 を含む、請求項 69 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 72】

前記配列が、配列番号 12 または配列番号 30 の少なくとも 17 個、20 個、25 個、または 30 個連続するヌクレオチドを含む、請求項 70 または請求項 71 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 73】

配列番号 12 または配列番号 30 とハイブリダイズする、単離ヌクレオチド配列。

20

【請求項 74】

ターゲティングベクターであって、

(a) 配列番号 30 と相同な少なくとも 17 個連続する核酸を含む、第 1 のヌクレオチド配列；

(b) 選択マーカー遺伝子；および

(c) 前記第 1 のヌクレオチド配列と重複しない、配列番号 30 と相同な少なくとも 17 個連続する核酸を含む、第 2 のヌクレオチド配列；

を含む、ターゲティングベクター。

【請求項 75】

前記選択マーカーが、抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項 74 に記載のターゲティングベクター。

30

【請求項 76】

前記第 1 のヌクレオチド配列が、5' 組換えアームに相当する、請求項 74 に記載のターゲティングベクター。

【請求項 77】

前記第 2 のヌクレオチド配列が、3' 組換えアームに相当する、請求項 74 に記載のターゲティングベクター。

【請求項 78】

請求項 74 に記載のターゲティングベクターでトランスフェクトされた、細胞。

40

【請求項 79】

鎖免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも 1 つの対立遺伝子が不活化されている、請求項 78 に記載の細胞。

【請求項 80】

請求項 79 に記載の細胞を含む、ブタ動物。

【請求項 81】

有蹄動物の 軽鎖免疫グロブリン遺伝子座を含む、単離ヌクレオチド配列。

【請求項 82】

前記有蹄動物がブタである、請求項 81 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 83】

50

前記有蹄動物がウシである、請求項 8 1 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8 4】

前記有蹄動物の 軽鎖免疫グロブリン遺伝子座が、J 単位 ~ C 単位のコンカテマーを含む、請求項 8 1 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8 5】

前記有蹄動物の 軽鎖免疫グロブリン遺伝子座が、例えば、配列番号 3 1 に示す、少なくとも 1 つの連結領域 - 定常領域対および / または少なくとも 1 つの可変領域を含む、請求項 8 1 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8 6】

配列番号 2 8 を含む、請求項 8 2 に記載のヌクレオチド配列。

10

【請求項 8 7】

配列番号 3 1 を含む、請求項 8 3 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8 8】

前記配列が、配列番号 2 8 または配列番号 3 1 の少なくとも 1 7 個、2 0 個、2 5 個、または 3 0 個連続するヌクレオチドを含む、請求項 8 6 または請求項 8 7 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 8 9】

配列番号 2 8 または配列番号 3 1 とハイブリダイズする、単離ヌクレオチド配列。

【請求項 9 0】

ターゲティングベクターであって、

20

(a) 配列番号 2 8 または配列番号 3 1 と相同な少なくとも 1 7 個連続する核酸を含む、第 1 のヌクレオチド配列；

(b) 選択マーカー遺伝子；および

(c) 該第 1 のヌクレオチド配列と重複しない、配列番号 2 8 または配列番号 3 1 と相同な少なくとも 1 7 個連続する核酸を含む、第 2 のヌクレオチド配列；

を含む、ターゲティングベクター。

【請求項 9 1】

前記選択マーカーが、抗生物質耐性遺伝子を含む、請求項 9 0 に記載のターゲティングベクター。

【請求項 9 2】

30

前記第 1 のヌクレオチド配列が、5 ' 組換えアームに相当する、請求項 9 0 に記載のターゲティングベクター。

【請求項 9 3】

前記第 2 のヌクレオチド配列が、3 ' 組換えアームに相当する、請求項 9 0 に記載のターゲティングベクター。

【請求項 9 4】

請求項 9 0 に記載のターゲティングベクターでトランスフェクトされた、細胞。

【請求項 9 5】

鎖免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも 1 つの対立遺伝子が不活化された、請求項 9 4 に記載の細胞。

40

【請求項 9 6】

請求項 9 5 に記載の細胞を含む、ブタ動物。

【請求項 9 7】

少なくとも 1 0 0 k b の DNA を環状化する方法であって、

その後、該 DNA を部位特異的リコンビナーゼによって宿主ゲノムに組み込み得る、方法。

【請求項 9 8】

少なくとも 1 0 0 k b、2 0 0 k b、3 0 0 k b、4 0 0 k b、5 0 0 k b、1 0 0 0 k b、2 0 0 0 k b、5 0 0 0 k b、1 0 , 0 0 0 k b の DNA を環状化し得る、請求項 9 7 に記載の方法。

50

【請求項 99】

前記 DNA の環状化が、前記 DNA 配列の各末端にて部位特異的リコンビナーゼ標的部位を結合すること、およびその後、該 DNA 配列への部位特異的リコンビナーゼを適用すること、によって行われ得る、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 100】

前記部位特異的リコンビナーゼ標的部位が、Lox である、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 101】

人工染色体が、前記 DNA 配列を含む、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 102】

前記人工染色体が、酵母人工染色体または哺乳動物人工染色体である、請求項 101 に記載の方法。 10

【請求項 103】

前記人工染色体が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントをコードする DNA 配列を含む、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 104】

前記ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントが、ヒト第 14 染色体、ヒト第 2 染色体、および/またはヒト第 22 染色体を含む、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

内因性免疫グロブリンの少なくとも 1 つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物であって、該免疫グロブリンは、重鎖、軽鎖、および軽鎖、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、トランスジェニック有蹄動物。 20

【請求項 106】

外因性免疫グロブリンが発現される、請求項 105 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 107】

請求項 106 に記載のトランスジェニック有蹄動物を生成するための方法であって、内因性免疫グロブリンの少なくとも 1 つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物が、外因性免疫グロブリンを発現する有蹄動物と交配させられ、該内因性免疫グロブリンは、重鎖、軽鎖、および軽鎖、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、方法。 30

【請求項 108】

前記有蹄動物が、ブタである、請求項 105 ~ 請求項 107 のうちいずれか 1 項に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 109】

前記外因性免疫グロブリンが、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントである、請求項 106 または請求項 107 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 110】

人工染色体が、前記ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含む、請求項 109 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 111】

請求項 105 に記載の有蹄動物に由来する、細胞。 40

【請求項 112】

異種抗原の発現を消失させるためのさらなる遺伝子改変をさらに含む、請求項 1、請求項 18、請求項 105、または請求項 106 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 113】

前記有蹄動物が、- 1, 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子の少なくとも 1 つの対立遺伝子の発現を欠く、請求項 112 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【請求項 114】

前記有蹄動物がブタである、請求項 112 に記載のトランスジェニック有蹄動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年10月22日出願の米国特許仮出願番号60/621,433号（その全体が本明細書中で参考として援用される）の優先権を主張する。

【0002】

（発明の分野）

本発明は、機能的内因性免疫グロブリン遺伝子座の発現を欠く、有蹄動物、組織、および器官、ならびにこのような動物、組織、および器官由来の細胞および細胞株を提供する。本発明はまた、外因性（ヒトなど）免疫グロブリン遺伝子座を発現する、有蹄動物、組織、および器官、ならびにこのような動物、組織、および器官由来の細胞および細胞株を提供する。本発明は、さらに、有蹄動物（ブタなど）のブタの重鎖および軽鎖免疫グロブリンのゲノムDNA配列を提供する。このような動物、組織、器官、および細胞を、研究および医学療法で使用し得る。さらに、このような動物、器官、組織、および細胞の調製方法を提供する。

10

【背景技術】

【0003】

（発明の背景）

抗原は、身体によって「外来物」として認識し得る因子または物質である。多くの場合、抗原として作用するより大きな外来物質（例えば、細菌の細胞壁成分）のたった1つの比較的小さな化学基である。ほとんどの抗原はタンパク質であるが、炭水化物も弱い抗原として作用し得る。細菌、ウイルス、および他の微生物は、一般に、多数の抗原を含み、花粉、チリダニ、カビ、食品、および他の物質も同様である。身体は、抗体の作製によって抗原に反応する。抗体（免疫グロブリン（Ig）とも呼ばれる）は、免疫系細胞によって生成され、抗原または外来タンパク質と結合するタンパク質である。血液の血清中の抗体は、外来抗原を検出するために循環し、血液タンパク質のグロブリン部分を構成する。これらの抗体は、ジグソーパズルの2片のような高特異的様式で抗原と化学的に相互作用し、抗原/抗体複合体（すなわち、免疫複合体）を形成する。この結合により、抗原が中和されるか、破壊される。

20

【0004】

脊椎動物が最初に抗原に遭遇した場合、一次体液性免疫応答を示す。数日後に動物が同一の抗原に遭遇した場合、より迅速かつより大きな規模で免疫応答が起こる。最初の遭遇により、特異的免疫細胞（B細胞）クローンが増殖し、分化する。子孫リンパ球には、エフェクター細胞（抗体生成細胞）だけでなく、記憶細胞クローンも含まれ、これは、元の抗原によるその後の刺激の際にエフェクター細胞および記憶細胞の両方を生成する能力を保持する。エフェクター細胞は、数日間しか生存しない。記憶細胞は、一生生存し、同一抗原での第2の刺激によって再活性化し得る。したがって、抗原に2回遭遇した場合、その記憶細胞は、迅速にエフェクター細胞を生成し、それにより、迅速に大量の抗体を生成する。

30

【0005】

抗体が高特異的様式で抗原と相互作用する固有の能力の活用によって、診断および治療への適用の両方のために製造および使用し得る分子としての抗体が開発されている。抗原エピトープに結合するその固有の能力のために、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を使用して、このエピトープを保有する分子を同定するか、エピトープ自体または他の部分と組み合わせて、診断または治療のための特異的部位に指向させることができる。実質的に任意の病原体または生物標的に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を生成し得る。用語「ポリクローナル抗体」は、通常、種々のアイソタイプおよび特異性を有する病原体特異的抗体を含む免疫血清をいう。対照的に、モノクローナル抗体は、1つの免疫グロブリン型からなり、1つの特異性を有する1つのアイソタイプを意味する。

40

【0006】

50

1890年に、北里柴三郎およびEmil Behringは、免疫動物から非免疫動物への血清の移入により、証明された免疫をある動物から別の動物に伝達し得るという基礎研究を行った。この画期的な実験は、臨床段階(clinical practice)への受動免疫の導入の基礎となった。しかし、外因性血清投与に関連する毒性および有効な抗菌化学療法への導入のために、1940年代に多くの血清療法が放棄された。現在、このようなポリクローナル抗体療法は、比較的少数の状況における感染症の治療(免疫グロブリン欠損患者の代償療法、数種のウイルス(例えば、狂犬病、麻疹、A型肝炎およびB型肝炎、水痘)に対する曝露後予防、および毒素の中和(ジフテリア毒素、破傷風毒素、およびボツリヌス毒素)など)で必要とされている。血清療法での使用に制限されているにもかかわらず、米国では、静脈内抗体療法のために毎年16メートルトンのヒト抗体が必要である。最も高度な工業国でも同程度のレベルで使用されており、開発途上国での受容が急速に高まると予想し得る。現在、受動免疫用のヒト抗体を、プールされたドナー血清から得ている。したがって、治療的および予防的療法に利用可能なヒト抗体の量には固有の限界がある。

10

【0007】

生物戦争因子に対する受動免疫のための抗体の使用は、非常に有望な防衛戦略である。このような因子に対する最終的な防衛線は、曝露個体の免疫系である。生物兵器に対する現在の防衛戦略には、強化された疫学的監視、ワクチン接種、および抗菌薬の使用などの手段が含まれる。生物戦争および生物テロの潜在的な脅威は、標的集団の免疫者数に反比例し、生物因子は、集団中の実質的に感受性を示す人々のみに対する潜在的な兵器である。

20

【0008】

防御応答を誘導し得る安全なワクチンが存在する場合、ワクチン接種により、特定の脅威に対する集団の感受性を軽減し得る。不運なことに、ワクチン接種による防御応答の誘導には、曝露から疾患の発症までよりも長い時間がかかり得る。さらに、多数のワクチンは、防御免疫応答を達成するために複数回投与する必要がある、非常時の攻撃後の迅速な予防に役立つには限度があるであろう。さらに、推奨された免疫化スケジュールを受けた後でさえも、すべてのワクチンレシピエントが防御応答を生じるわけではない。

【0009】

薬物を一定の因子への曝露後に投与した場合、薬物によって防御し得るが、生物戦争の多数の潜在的な因子に対して利用できない。現在、予め形成された毒素の曝露後に疾患を防止するのに利用可能な小分子薬物はない。迅速に免疫状態を得ることができる現在利用可能な唯一の介入は、防御抗体での受動免疫である(Arturo Casadevall「Passive Antibody Administration (Immediate Immunity) as a Specific Defense Against Biological Weapons」Emerging Infectious Diseases, Posted 09/12/2002)。

30

【0010】

防御免疫を得ることに加えて、現代の抗体ベースの療法は、新たに出現した病原性の細菌、真菌、ウイルス、および寄生虫に対して潜在的に有用なオプション(option)から構成される(A. CasadevallおよびM. D. Scharff, Clinical Infectious Diseases 1995; 150)。悪性腫瘍および癌患者の療法(C. Bottiら、Leukemia 1997; Suppl 2: S55-59; B. Bodey, S. E. Siegel, and H. E. Kaiser, Anticancer Res 1996; 16(2): 661)、移植臓器のステロイド耐性拒絶療法、および自己免疫疾患療法も、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の調製物の使用によって実現し得る(N. Bonnefoy-BerardおよびJ. P. Revillard, J Heart Lung Transplant 1996; 15(5): 435-442; C. Colby, ら、Ann Pharmacother 1996; 30(10): 1164-1174; M. J. Dugan, ら、Ann

40

50

Hematol 1997; 75 (1-2): 412; W. Cendrowski, Boll Ist Sieroter Milan 1997; 58 (4): 339-343; L. K. Kastrukoff, Can J Neurol Sci 1978; 5 (2): 175-178; J. E. Walker, J Neurol Sci 1976; 29 (2-4): 303-309。

【0011】

最近の抗体生成テクノロジーにおける利点により、ヒト血清療法に関連する毒性を回避しながらヒト抗体試薬を生成する手段が得られる。抗体ベースの療法の利点には、汎用性、低毒性、病原体特異性、免疫機能の増強、および好ましい薬物動態学が含まれる。

【0012】

モノクローナル抗体療法の臨床用途は、最近出現したばかりである。モノクローナル抗体は、現在、移植、癌、感染症、心血管疾患、および炎症の治療法として承認されている。広範な疾患を治療するためのさらに多くのモノクローナル抗体が臨床試験の最終段階にある。結果として、モノクローナル抗体は、現在開発中の薬物の最も大きなクラスの1つに相当する。

【0013】

最近、治療薬としてモノクローナル抗体が注目されているにもかかわらず、その使用にはいくらか障害がある。例えば、モノクローナル抗体を多数の治療に応用するには、特に、自己免疫または癌などの慢性疾患において繰り返し投与する必要がある。マウスは免疫化に便利であり、ほとんどのヒト抗原を外来物として認識するので、治療的潜在性を有するヒト標的に対するモノクローナル抗体は、典型的には、マウスに由来する。しかし、マウスモノクローナル抗体は、ヒトへの治療法として固有の欠点を有する。例えば、ヒト抗体よりもヒトにおける循環半減期が短いので、治療レベルのモノクローナル抗体を維持するために、これらをより頻繁に投与する必要がある。より重要には、マウス免疫グロブリンの反復投与により、ヒト免疫系がマウスタンパク質を外来物として認識し、ヒト抗マウス抗体応答を生じ、重篤なアレルギー反応を引き起こす可能性がある。この有効性および安全性が減少する可能性により、マウスモノクローナル抗体の免疫原性を減少させるための多数のテクノロジーが開発されている。

【0014】

ポリクローナル抗体は、複数の抗原標的に対して極めて強力である。これらは、複雑な疾患に関連する複数の「進化型標的 (evolving target)」をターゲティングして死滅させる固有の能力を有する。また、全薬物クラスのうち、ポリクローナルは、抗原変異事象で活性を保持する可能性が最も高い。さらに、モノクローナルは、感染因子に対する治療活性が制限されている一方で、ポリクローナルは、毒素を中和し、免疫応答を指示して、生物戦争因子だけでなく病原体も排除し得る。

【0015】

生成能力についての将来的需要を満たすためのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の生成プラットフォームの開発は、現在、多数の研究対象となっている有望な分野である。1つの特に有望な戦略は、マウスまたは大型家畜へのヒト免疫グロブリン遺伝子の導入である。このテクノロジーの拡大には、その内因性免疫グロブリン遺伝子の不活化が含まれるであろう。大型動物（ヒツジ、ブタ、およびウシなど）は、現在、ヒトに使用するための血漿由来の生成物（超免疫血清および凝固因子など）の生成で使用されている。これにより、安全性および倫理的観点からこのような種由来のヒトポリクローナル抗体の使用が支持されるであろう。これらの各種は、天然に、血清およびミルクの両方に相当な量の抗体を生成する。

【0016】

(免疫グロブリンをコードする遺伝子の配置)

抗体分子を、可変遺伝要素の組み合わせからアセンブリし、生殖系列中の多数の可変遺伝要素の組み合わせから得られる可能性により、宿主が非常に多数の抗原に対する抗体を合成し得る。各抗体分子は、2つのポリペプチド鎖クラス（軽(L)鎖(カッパ()L

10

20

30

40

50

鎖またはラムダ (λ) L 鎖のいずれかであり得る) および重 (H) 鎖) からなる。重鎖および軽鎖が連結して、エピトープのための結合領域が決定される。1つの抗体分子は、同一コピーの2つのL鎖および2つのH鎖を有する。各鎖は、可変領域 (V) および定常領域 (C) から構成される。可変領域は、分子の抗原結合部位の構成要素となる。多様な抗原認識を達成するために、可変領域をコードするDNAが遺伝子再配列する。定常領域のアミノ酸配列は、抗体を生成する宿主だけでなく抗体の特定のアイソタイプに特異的であり、それにより、再配列を受けない。

【0017】

DNAの再配列機構は、重鎖および軽鎖の遺伝子座の可変領域で類似しているが、軽鎖遺伝子の生成にはたった1つの連結事象しか必要でないのに対して、完全な重鎖遺伝子の生成には2つが必要である。最も一般的な再配列様式は、2つの遺伝子セグメント間のDNAのループアウト (looping-out) および欠失を含む。2つの遺伝子セグメントのコード配列がDNA中で同方向で存在する場合にこれが起こる。第2の組換え様式は、逆の転写方向を有する2つの遺伝子セグメント間で起こり得る。この組換え様式は、あまり一般的ではないが、このような再配列は、全V - J 結合の半分の割合を占め得る。ヒトV 遺伝子セグメントの半分の転写方向は、J 遺伝子セグメントの逆である。

10

【0018】

完全なV領域をコードするDNA配列を、個別の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって生成する。免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のV領域 (すなわち、Vドメイン) は、1つを超える遺伝子セグメントによってコードされる。軽鎖について、Vドメインは、2つの個別のDNAセグメントによってコードされる。第1のセグメントは、軽鎖の最初の95~101アミノ酸をコードし、ほとんどのVドメインをコードするので、V遺伝子セグメントと呼ばれる。第2のセグメントは、Vドメインの残り (13アミノ酸まで) をコードし、連結遺伝子セグメントまたはJ遺伝子セグメントと呼ばれる。V遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントとの連結により、軽鎖V領域全体をコードする連続エクソンが得られる。完全な免疫グロブリン軽鎖伝令RNAを作製するために、転写後のRNAスプライシングによって、V領域のエクソンをC領域配列に連結する。

20

【0019】

3つの遺伝子セグメント中の重鎖V領域がコードされる。VおよびJ遺伝子セグメント (軽鎖V_L およびJ_L と区別するためにV_H およびJ_H と示す) に加えて、多様性 (diversity) またはD_H 遺伝子セグメントと呼ばれる第3の遺伝子セグメントが存在し、これは、V_H 遺伝子セグメントとJ_H 遺伝子セグメントとの間に存在する。完全な重鎖V領域を生成する組換えプロセスは、2つの個別の段階で起こる。第1に、D_H 遺伝子セグメントをJ_H 遺伝子セグメントに連結し、次いで、V_H 遺伝子セグメントをDJ_H に再配列して完全なV_H 領域エクソンを作製する。軽鎖遺伝子と同様に、RNAスプライシングにより、アセンブリしたV領域配列を隣接するC領域遺伝子に連結する。

30

【0020】

抗体レパートリーの多様化は、以下の2つの段階で起こる：最初の骨髄中に存在するB細胞前駆体中でのIgV、D、およびJ遺伝子セグメントの再配列 (「V(D)J組換え」) 、ならびにその後の成熟B細胞が活性化された場合のこれらの再配列Ig遺伝子の体細胞変異およびクラススイッチ組換え。免疫グロブリン体細胞変異およびクラススイッチは、免疫応答の成熟および「記憶」応答の生成の中核をなす。

40

【0021】

抗体のゲノム遺伝子座は非常に巨大であり、これらは、異なる染色体上に存在する。免疫グロブリン遺伝子セグメントは、以下の3つのクラスターまたは遺伝子座に組織化される： λ 、 κ および重鎖遺伝子座。それぞれ、わずかに異なって組織化される。例えば、ヒトでは、免疫グロブリン遺伝子は、以下のように組織化される。軽鎖遺伝子座は、第22染色体上に存在し、V 遺伝子セグメントのクラスターの後に、それぞれ1つのC 遺伝子に連結した4組のJ 遺伝子セグメントが続く。軽鎖遺伝子座は、第2染色体上に存在し、V 遺伝子セグメントのクラスターの後にJ 遺伝子セグメントのクラスター

50

が続き、その後1つのC 遺伝子が続く。第14染色体上での重鎖遺伝子座の組織化は、遺伝子座の組織化と類似しており、V_H、D_H、およびJ_H 遺伝子セグメントの個別のクラスターの後にC_H 遺伝子が続く。重鎖遺伝子座は、以下の1つの重要な様式が異なる。1つのC領域の代わりに、次々に整列した一連のC領域を含み、それぞれ異なるアイソタイプに対応する。以下の5つの免疫グロブリン重鎖アイソタイプが存在する：IgM、IgG、IgA、IgE、およびIgD。一般に、細胞は、一度に1つのアイソタイプしか発現せず、IgMから出発する。他のアイソタイプ(IgGなど)の発現は、アイソタイプスイッチングによって起こり得る。

【0022】

種々のV、D、およびJ 遺伝子の連結は完全に無作為な事象であり、それにより、VDJ(H)では約50,000通りの組み合わせが得られ、VJ(L)では約1,000通り得られる可能性がある。H鎖およびL鎖のその後の無作為な対合により、抗体特異性の総数は、約10⁷通りになる。異なる遺伝子セグメントの不正確な連結によって多様性がさらに増大する。両DNA鎖で再配列が起こるが、転写されるのは1つの鎖のみである(対立遺伝子排除による)。DNAの不可逆的欠失により、B細胞の一生で一度だけ再配列が起こる。したがって、各成熟B細胞は、1つの免疫特異性を維持し、子孫またはクローンに維持される。これは、クローン選択の分子基盤を構成する。すなわち、各抗原決定基が特定の受容体分子を保有するBリンパ球の既存のクローンの応答を誘発する。V(D)J組換えによって確立されたB細胞の一次レパートリーは、主に、2つの密接に関連する遺伝子(組換え活性化遺伝子(RAG)-1および(RAG)-2)によって調節される。

【0023】

過去10年間で、脊椎動物間でのIg 遺伝子の多様性および抗体レパートリー発生における相当な多様性が明らかになった。げっ歯類およびヒトは、5つの重鎖クラス(IgM、IgD、IgG、IgE、およびIgA)を有し、それぞれが4つのIgGサブクラスおよび1つまたは2つのIgAサブクラスを有する一方で、ウサギは、1つのIgG重鎖遺伝子を有するが、異なるIgAサブクラスについて13の遺伝子を有する(Burnett, R. C.ら、EMBO J 8:4047; Honjo, In Honjo, T, Alt. F. W. T. H. eds, Immunoglobulin Genes 123頁 Academic Press, New York)。ブタは少なくとも6つのIgGサブクラスを有するが(Kacs Kovics, I.ら、1994 J Immunol 153:3565)、IgDを持たない(Butlerら、1996 Inter. Immunol 8:1897-1904)。IgDをコードする遺伝子は、げっ歯類および霊長類のみで説明されている。レパートリー発生機構の多様性は、げっ歯類および霊長類で認められるパターンと、ニワトリ、ウサギ、ブタ、および食用ウシについて報告されているパターンとの対比によって例示される。前者は7~10のファミリーに属する多数のV_H 遺伝子を有するのに対して(Rathbun, G. In Hongo, T. Alt. F. W. and Rabbits, T. H., eds, Immunoglobulin Genes, 63頁, Academic press New York)、後者の群の各メンバーのV_H 遺伝子は1つのV_H 遺伝子ファミリーに属する(Sun, J.ら、1994 J. Immunol 1553:56118; Dufour, V.ら、1996, J Immunol. 156:2163)。ウサギを除いて、このファミリーは、25個未満の遺伝子から構成される。げっ歯類および霊長類が4~6つのJ_H セグメントを使用し得るのに対して、ニワトリでは、レパートリー発生のために1つのJ_H しか利用できない(Reynaudら、1989 Adv. Immunol. 57:353)。同様に、Butlerら(1996 Inter. Immunol 8:1897-1904)は、ブタはたった1つのJ_H 遺伝子を有するニワトリと類似し得ると仮定した。これらの種は、一般に、より少ないV、D、およびJ 遺伝子を有し、ブタおよびウシでは、20未満の遺伝子セグメントからなる1つのVH遺伝子ファミリーが存在する(Butlerら、Advances in Swine in Biomedical Research

10

20

30

40

50

, eds: Tumbleson and Schook, 1996; Sinclairら、J. Immunol. 159: 3883, 1997)。より少数のJおよびD遺伝子セグメントを合わせて、これにより、遺伝子再配列によって得られる多様性は著しく少ない。しかし、これらの種においては、軽鎖遺伝子数がより多いようである。ヒトおよびマウスに類似して、これらの種は、1つの軽鎖を発現するが、複数の軽鎖遺伝子を発現する。しかし、これらは、再配列によって得られる制限された多様性に影響を与えないようである。

【0024】

100個を超える V_H 、20~30個の D_H 、および4~6個の J_H 遺伝子セグメントの組み合わせ連結が、ヒトにおける抗体レパートリーの主な生成機構であるので、より少ない V_H 、 D_H 、または J_H セグメントを有する種は、より小さなレパートリーを生成するか、別のレパートリー発生機構を使用しなければならない。反芻動物、ブタ、ウサギ、およびニワトリは、抗体多様性を得るために数種の機構を使用する。これらの種では、回腸パイエル板などの高度に特化されたリンパ様組織で起こる二次レパートリーの発生が重要なようである(Binns and Licence, Adv. Exp. Med. Biol. 186: 661, 1985)。これらの種では、体細胞変異プロセスによって二次レパートリーが発生し、これは無作為に起こり、完全に理解されていないプロセスである。このレパートリー多様化機構は、テンプレート化された変異(すなわち、遺伝子変換(Sunら、J. Immunol. 153: 5618, 1994)および体細胞超変異)のようである。

10

20

【0025】

遺伝子変換は、いくつかの高等脊椎動物(ニワトリ、ウサギ、およびウシなど)における抗体多様化に重要である。しかし、マウスでは、内因性抗体遺伝子間の変換事象は稀なようである。遺伝子変換は、ドナー抗体V遺伝子セグメントからアクセプターV遺伝子セグメントへの相同配列の移入によって特徴づけられる明確な多様化機構である。ドナーセグメントおよびアクセプターセグメントの配列が多数異なる場合、遺伝子変換により、1つの事象によって1組の配列のV領域への変化を導入し得る。種に依存して、B細胞分化中の抗原曝露の前および/または後で遺伝子変換事象が起こり得る(Tsaiら、International Immunology, Vol. 14, No. 1, 55-64, January 2002)。

30

【0026】

体細胞超変異により、すべての高等脊椎動物種で抗体遺伝子が多様化する。これは、抗体V(D)Jセグメントへの1つの点変異の導入に代表される。一般に、超変異は、抗原刺激によってB細胞で活性化されるようである。

【0027】

(ヒト化免疫系を有する動物の生成)

ヒト治療のためにマウスで生成された抗体の免疫原性を減少させるために、現在ではヒト化として公知のプロセスで、マウスタンパク質配列をヒトタンパク質配列と置換する種々の試みが行われている。免疫化の際にマウスがヒト抗体を生成するように、マウス自体の免疫グロブリン遺伝子をヒト免疫グロブリン遺伝子と機能的に置換したトランスジェニックマウスを構築した。マウスIg遺伝子の再配列および発現プロセスに關与する重要なシス作用配列を欠失させるための遺伝子ターゲティングテクノロジーの使用による胚幹(ES)細胞中でのマウスIg遺伝子の不活化によってマウス抗体生成が排除された。これらの変異マウス中でのB細胞の発生を、ヒト生殖系列の高次構造HおよびL鎖ミニ遺伝子座(minilocus)導入遺伝子を含むメガベースサイズのYACの導入によって修復し得る。これらのトランスジェニックマウス中の完全なヒト抗体の発現が支配的であり、血中レベルが数百 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。この発現レベルは、ヒトIg遺伝子が発現する野生型マウスで検出された発現レベルの数百倍であり、マウスによるヒト抗体生成の増強には内因性マウスIg遺伝子の不活化が重要であることを示す。

40

【0028】

50

第1のヒト化は、組換え抗体を構築するための分子生物学技術を使用して試みられている。例えば、ハプテンに特異的なマウス抗体由来の相補性決定領域(CDR)を、ヒト抗体フレームワークにグラフティングし、CDR置換を行った。新規の抗体は、CDR配列によって伝達された結合特異性を保持していた(P. T. Jonesら、Nature 321: 522-525 (1986))。次のレベルのヒト化は、全マウスVH領域となどのヒト定量領域との組み合わせを含んでいた(S. L. Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855頁(1984))。しかし、これらのキメラ抗体は、依然として30%を超える外因性配列を含み、完全に外因性の抗体よりもわずかしか免疫原性が低いことがある(M. Bruggemannら、J. Exp. Med., 170, 2153-2157頁(1989))。

10

【0029】

その後、マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子の導入が試みられ、それにより、ヒト配列を有する抗体を有する抗原に应答し得るトランスジェニックマウスが作製された(Bruggemannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6709-6713 (1989))。ヒト免疫グロブリンゲノム遺伝子座のサイズが大きいため、これらの試みは、利用可能なクローニング伝達体によって安定に維持し得るDNA量に制限されると考えられた。結果として、多くの研究者は、限られた数のV領域を含み、天然または生殖系列の立体配置と比較して遺伝子間の空間的距離が変化したミニ遺伝子座の生成に集中した(例えば、米国特許第5,569,825号を参照のこと)。これらの研究は、マウス中でヒト配列を有する抗体を生成することは可能であるが、抗体療法の高まる需要を満たすためには、これらのトランスジェニック動物から十分に多様な結合特異性およびエフェクター機能(アイソタイプ)を得ることにに関して重大な障害が残されていることを示した。

20

【0030】

さらなる多様性を得るために、トランスジェニック哺乳動物にヒトIg遺伝子座の巨大な生殖系列フラグメントを負荷する研究が行われている。例えば、ヒトゲノムの非再配列生殖系列ならびにヒトC μ およびC δ 定常領域中に見出された間隔を有するように配置された大部分のヒトV、D、およびJ領域の遺伝子を、酵母人工染色体(YAC)クローニングベクターを使用してマウスに導入した(例えば、WO94/02602号を参照のこと)。ヒトC δ 定常領域をコードする配列およびクラススイッチ組換えに必要な上流配列を含む22kbのDNAフラグメントを、その後上記導入遺伝子に付加した。さらに、V、J、およびC δ 領域の遺伝子を含み、かつヒトゲノムの非再配列生殖系列で見出される間隔と実質的に同一の間隔で配置したヒトIg遺伝子座の一部を、YACSを使用してマウスに導入した。遺伝子ターゲティングを使用して、マウスIGHおよび軽鎖の免疫グロブリン遺伝子座を不活化し、このようなノックアウト株を、上記トランスジェニック株と交配して、不活化マウス免疫グロブリンバックグラウンドにヒトV、D、J、C μ 、C δ 、およびC δ 定常領域ならびにヒトV、J、およびC δ 領域の遺伝子のすべてを有するマウス株を得た(例えば、KucherlapatiらのPCT特許出願WO94/02602号; Mendezら、Nature Genetics 15: 146-156 (1997)も参照のこと)。

30

40

【0031】

内因性遺伝子座の遺伝子ターゲティングおよびトランスジェニックマウス株の交配と組み合わせたクローニングベクターとしての酵母人工染色体により、抗体多様化に関する問題に対する1つの解答が得られた。このアプローチによっていくつかの利点を得られた。1つの利点は、YACを使用して、何百キロベースものDNAを宿主細胞に移入し得ることであった。したがって、YACクローニング送達体の使用により、すべてのヒトIg重鎖領域および軽鎖領域の実質的部分をトランスジェニックマウスに含め、これにより、ヒトで利用可能な潜在的多様性レベルに近づくことが可能である。このアプローチの別の利点は、マウス免疫グロブリン生成が欠損したマウスにおいて多数のV遺伝子がB細胞発生を完全に修復することを示したことである。これにより、任意の所与の免疫原に対し

50

て強いヒト抗体応答を得るために必要な細胞が備わったこれらの再構築マウスが得られることを裏付けた(例えば、WO94/02602号; L. GreenおよびA. Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495(1998)を参照のこと)。さらなる利点は、酵母における高頻度相同組換えの使用によって配列を欠失するか、YACに挿入し得ることである。

【0032】

さらに、Greenら、Nature Genetics 7:13-21(1994)は、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の245kbおよび190kbサイズの生殖系列の立体配置フラグメント(コア可変領域配列および定常領域配列を含む)をそれぞれ含むYACの生成を記載している。Greenらの研究は、最近、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖系列立体配置YACフラグメントの導入による約80%を超えるヒト抗体レパートリーの導入に拡大され、それにより、XenoMouse(商標)が得られている。例えば、Mendezら、Nature Genetics 15:146-156(1997), GreenおよびJakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998), 欧州特許第EP0463151B1号、PCT公開番号WO94/02602号、WO96/34096号、およびWO98/24893号を参照のこと。

10

【0033】

ヒト抗体を生成する哺乳動物の生成についてのいくつかのストラテジーが存在する。特に、GenPharm International, Inc. およびMedical Research Councilの研究に代表される「ミニ遺伝子座」アプローチ、Abgenix, Inc. (以前はCell Genesys)の研究に代表されるIg遺伝子座の巨大かつ実質的に生殖系列のフラグメントのYAC導入が存在する。すべてまたは実質的にすべての遺伝子剤の導入は、Kirin Beer Kabushiki Kaishaの研究に代表される微小核融合を使用する。

20

【0034】

ミニ遺伝子座アプローチでは、Ig遺伝子座由来の小片(各遺伝子)の封入によって外因性Ig遺伝子座を模倣する。したがって、動物への挿入のために、1つ以上のV_H遺伝子、1つ以上のD_H遺伝子、1つ以上のJ_H遺伝子、μ定常領域、および第2の定常領域(定常領域など)を構築物に形成する。例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,625,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、同第5,770,429号、同第5,789,650号、同第5,814,318号、同第5,591,669号、同第5,612,205号、同第5,721,367号、同第5,789,215号、同第5,643,763号; 欧州特許第0546073; PCT公開番号WO92/03918号、WO92/22645号、WO92/22647号、WO92/22670号、WO93/12227号、WO94/00569号、WO94/25585号、WO96/14436号、WO97/13852号、およびWO98/24884号; Taylorら、Nucleic Acids Research 20:6287-6295(1992), Chenら、International Immunology 5:647-656(1993), Tuailionら、J. Immunol. 154:6453-6465(1995), Choiら、Nature Genetics 4:117-123(1993), Lonbergら、Nature 368:856-859(1994), Taylorら、International Immunology 6:579-591(1994), Tuailionら、J. Immunol. 154:6453-6465(1995), およびFishwildら、Nature Biotech. 14:845-851(1996)を参照のこと。

30

40

【0035】

微小核融合アプローチでは、ヒト染色体の一部または全部を、マウスに導入し得る(例えば、欧州特許出願番号EP0843961A1を参照のこと)。このアプローチを使用

50

して生成しかつヒトIg重鎖遺伝子座を含むマウスは、一般に、1つを超える、潜在的には、全部のヒト定常領域遺伝子を有する。したがって、このようなマウスは、多数の異なる定常領域を有する特定の抗原に結合する抗体を生成する。

【0036】

マウスは、ヒトにおけるヒト免疫グロブリン発現について最も開発された動物でありつづけているが、最近の技術的進歩により、これらの技術が他の動物（ウシなど）に適用され始めている。マウスでの一般的アプローチは、マウスの胚性幹細胞を遺伝子改変してマウス免疫グロブリンをノックアウトし、次いで、ヒト免疫グロブリンを含むYACをES細胞に挿入した。しかし、ES細胞は、ウシまたは他の大型動物（ヒツジおよびブタなど）に利用できない。したがって、ノックアウトされ、かつヒト抗体を発現する免疫グロブリン遺伝子を有する大型動物を生成し得る前でさえ、基本的な開発を行うべきであった。遺伝子改変された動物を作製するための別のES細胞操作法は、遺伝子改変された体細胞を使用したクローニングである。核移植のための遺伝子改変された体細胞を使用したクローニングがごく最近になって行われた。

10

【0037】

1997年の成体体細胞からのドリー（クローンヒツジ）誕生の発表以来（Wilmut, L.ら（1997）Nature 385:810-813）、有蹄動物（ウシ（Cibelli, J.ら、1998 Science 280:1266-1258; Kubota, C.ら、2000 Proc. Natl. Acad. Sci 97:990-995）、ヤギ（Baguisi, A.ら、（1999）Nat. Biotechnology 17:456-461）、およびブタ（Polejaeva, I. A., ら、2000 Nature 407:86-90; Betthauser, J.ら、2000 Nat. Biotechnology 18:1055-1059）が含まれる）がクローン化されている。

20

【0038】

次の技術的利点は、遺伝子改変された動物を生成するための核移植前に細胞を遺伝子改変する技術の開発であった。PPL TherapeuticsのPCT公開番号WO00/51424号は、核移植のための体細胞のターゲティングされた遺伝子改変を記載する。

【0039】

基本的開発後、遺伝子の単一および二重の対立遺伝子ノックアウトおよびこれらの修飾を有する生きた動物の誕生が報告されている。2002年~2004年に、3つの独立したグループ（Immerge Biotherapeutics, Inc.（University of Missouriとの共同開発）（Laiら（Science（2002）295:1089-1092）& Kolber-Simondsら（PNAS.（2004）101（19）:7335-40））、Alexion Pharmaceuticals（Ramsondarら（Biol Reprod（2003）69:437-445））、およびRevivicor, Inc.（Daiら（Nature Biotechnology（2002）20:251-255）& Phelpsら（Science（2003）Jan 17; 299（5605）:411-4）））が、遺伝子欠損がターゲティングされた体細胞からの遺伝子移入によって-1,3-GT遺伝子の一方の対立遺伝子または両方の対立遺伝子を欠くブタを生成した。2003年に、Sedaiら（Transplantation（2003）76:900-902）は、ウシにおける-1,3-GT遺伝子の一方の遺伝子座のターゲティングされた破壊およびその後の遺伝子改変された細胞の核の首尾のよい核移植およびトランスジェニック胎児の生成を報告した。

30

40

【0040】

したがって、大型動物における免疫グロブリン遺伝子のノックアウトおよびその細胞へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の挿入の実現可能性が最近調査され始めている。しかし、免疫グロブリン遺伝子の複雑さおよび種差により、Ig、および重鎖のゲノム配列

50

および配置は、ほとんどの種であまり理解されていないままである。例えば、ブタでは、部分的なゲノム配列および組織化により、重鎖定常、重鎖定常 μ 、および重鎖定常についてしか説明されていない(BrownおよびButler Mol Immunol . 1994 Jun ; 31 (8) : 633 - 42 , Butlerら、Vet Immunol Immunopathol . 1994 Oct ; 43 (1 - 3) : 5 - 12 , およびZhaoら、J Immunol . 2003 Aug 1 ; 171 (3) : 1312 - 8)。

【0041】

ウシでは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座がマッピングされており(Zhaoら、2003 J. Biol. Chem. 278 : 35024 - 32)、ウシ遺伝子のcDNA配列が公知である(例えば、米国特許出願番号2003/0037347号を参照のこと)。さらに、約4.6 kbのウシ μ 重鎖遺伝子座が配列決定されており、ウシ μ 重鎖の一方または両方の対立遺伝子の破壊によって重鎖免疫グロブリン発現が減少したトランスジェニックウシが作製されている。さらに、ヒトIGH鎖およびL鎖のすべての非配置配列を含む哺乳動物人工染色体(MAC)ベクターを、ウシ胎児線維芽細胞の微小核媒介染色体移入および核移植テクノロジーを使用してウシ(TCウシ)に導入されている(例えば、Kuroiwaら、2002 Nature Biotechnology 20 : 889 , Kuroiwaら、2004 Nat Genet . Jun 6 Epub , 米国特許公開番号2003/0037347号、同第2003/0056237号、同第2004/0068760号、および特許文献1を参照のこと)。

10

20

【0042】

ヒト免疫グロブリンを発現するウシの生成が著しく進歩している一方で、他の大型動物(ヒツジ、ヤギ、およびブタなど)ではほとんど達成されていない。ヒツジ、ヤギ、およびブタの免疫グロブリンについてのcDNA配列情報はGenBankで既に利用可能であるにもかかわらず、大きな再配列するという免疫グロブリン遺伝子座に特有の性質により、mRNA(またはcDNA)中に存在することが公知の配列を超えて特徴づける必要がある。免疫グロブリン遺伝子座がモジュラーであり、かつコード領域が冗長であるので、既知のコード領域の欠失により、遺伝子座の機能の変化は確定的ではない。例えば、重鎖可変領域のコード領域を欠失させれば、何百もの他の機能可変遺伝子が遺伝子座中に留まるので、遺伝子座の機能が有意に変化するであろう。したがって、潜在的な「弱点」を同定するために、遺伝子座を最初に特徴づけなければならない。

30

【0043】

ウシにおけるヒト抗体の発現はいくらか進歩しているにもかかわらず、内因性ウシIg遺伝子の不活化、ヒト抗体の発現レベルの増加、および他の大型動物(ブタなど)(免疫グロブリン遺伝子の配列および配置がほとんど知られていない)におけるヒト抗体発現の生成についてより大きな課題が残されている。

【特許文献1】国際公開第02/07648号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0044】

したがって、本発明の目的は、有蹄動物免疫グロブリン生殖系列の遺伝子配列の配置を提供することである。

40

【0045】

本発明の別の目的は、新規の有蹄動物の免疫グロブリンゲノム配列を提供することである。

【0046】

本発明のさらなる目的は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く細胞、組織、および動物を提供することである。

【0047】

本発明の別の目的は、ヒト免疫グロブリンを発現する有蹄動物を提供することである。

50

【0048】

本発明のなおさらなる目的は、新規の有蹄動物の免疫グロブリン遺伝子配列の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く細胞、組織、および動物を生成し、そして/またはヒト免疫グロブリンを発現する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0049】

(発明の概要)

本発明は、有蹄動物の免疫グロブリン生殖系列遺伝子配列の配置および新規のそのゲノム配列を初めて提供する。さらに、重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く新規の有蹄動物細胞、組織、および、動物を提供する。この発見に基づいて、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を完全に欠く有蹄動物を生成し得る。さらに、これらの有蹄動物を、外因性(ヒトなど)免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するようにさらに改変し得る。

10

【0050】

本発明の1つの局面では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、有蹄動物は、内因性重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠くことができる。軽鎖免疫グロブリンは、および/または免疫グロブリンであり得る。さらなる実施形態では、内因性免疫グロブリンの少なくとも1つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンが、重鎖、軽鎖、および軽鎖またはその任意の組み合わせからなる群から選択される、トランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンの発現を、内因性免疫グロブリンの発現を防止するための内因性免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子ターゲティングによって行うことができる。1つの実施形態では、相同組換えによって遺伝子ターゲティングを行うことができる。別の実施形態では、トランスジェニック有蹄動物を、核移植によって生成し得る。

20

【0051】

他の実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を、外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するようにさらに遺伝子改変し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を含むブタ動物を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、鎖遺伝子座またはそのフラグメントおよび/または鎖遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に反応して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

30

40

【0052】

本発明の別の局面では、外因性免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンを、内因性有蹄動物染色体内に組み込まれた免疫グロブリン遺伝子座から発現し得る、トランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、トランスジェニック動物由来の有蹄動物細胞を提供する

50

。 1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、子孫に遺伝し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、雄生殖系列を介して子孫に遺伝し得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体 (AC) は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に応答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

10

【0053】

本発明の別の局面では、有蹄動物免疫グロブリンの重鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。1つの実施形態では、例えば、配列番号29に示す、少なくとも1つの可変領域、少なくとも2つの多様性領域 (diversity region)、少なくとも4つの連結領域、および少なくとも1つの定常領域 (μ 定常領域など) を含む、ブタ重鎖をコードする単離ヌクレオチド配列を提供する。別の実施形態では、例えば、配列番号4に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の少なくとも4つの連結領域および少なくとも1つの定常領域 (μ 定常領域など) を含む単離ヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、例えば、配列番号1に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の第1の連結領域の5'隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。なおさらに、例えば、配列番号4の3'領域に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の第1の連結領域の3'隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、配列番号1、4、または29に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号1、4、または29と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99% 相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号1、4、または29の少なくとも10、15、17、20、25、または30個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。1つの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号4の少なくとも17、20、25、または30個連続するヌクレオチドまたは配列番号29の残基1~9, 070を含む。別の実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号29の残基9, 070~11039を含む。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号1、4、または29とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

20

30

【0054】

別の実施形態では、有蹄動物免疫グロブリンの軽鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。本発明は、有蹄動物軽鎖領域の第1の報告されたゲノム配列を提供する。1つの実施形態では、ブタ軽鎖遺伝子座をコードする核酸配列を提供する。別の実施形態では、核酸配列は、軽鎖の少なくとも1つの連結領域、1つの定常領域、および/または1つのエンハンサー領域を含み得る。さらなる実施形態では、ヌクレオチド配列は、例えば、配列番号30に示す、少なくとも5つの連結領域、1つの定常領域、および1つのエンハンサー領域を含み得る。さらなる実施形態では、例えば、配列番号12に示す、ブタゲノム軽鎖の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは5つの連結領域および連結領域に対する3'隣接領域を含む単離ヌクレオチド配列を提供する。別の実施形態では、例えば、配列番号25に示す、第1の連結領域の5'隣接配列を含むブタゲノム軽鎖の単離ヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、例えば、配列番号15、16、および/または19に示す、ブタゲノム軽鎖の定常領域の3'隣接配列および任意選択的にエンハンサー配列の5'部分を含む単離ヌクレオチド配列を提供する。

40

50

【 0 0 5 5 】

さらなる実施形態では、配列番号 30、12、25、15、16、または 19 に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号 30、12、25、15、16、または 19 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% 相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号 30、12、25、15、16、または 19 の少なくとも 10、15、17、20、25、または 30 個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号 30、12、25、15、16、または 19 とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【 0 0 5 6 】

別の実施形態では、有蹄動物免疫グロブリンの 軽鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。本発明は、有蹄動物 軽鎖領域の第 1 の報告されたゲノム配列を提供する。1 つの実施形態では、ブタ 軽鎖ヌクレオチドは、J 単位 ~ C 単位のコンカテマーを含む。特定の実施形態では、単離ブタ 軽鎖ヌクレオチド配列 (配列番号 28 に示すものなど) を提供する。1 つの実施形態では、例えば、配列番号 32 に示す、ブタ 軽鎖ゲノム配列の第 1 の J / C 領域の 5' 隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。なおさらに、ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスタ領域の 3' 隣接配列 (例えば、J / C の約 200 塩基対下流) を含むヌクレオチド配列 (配列番号 33 に示すものなど) を提供する。あるいは、例えば、配列番号 34、35、36、37、38、および / または 39 に示す、ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスタ領域の 3' 隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、例えば、配列番号 31 に示す、少なくとも 1 つの連結領域 - 定常領域対および / または少なくとも 1 つの変領域を含み得る、ウシ 軽鎖遺伝子座をコードする核酸配列を提供する。さらなる実施形態では、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 に示す単離ヌクレオチドを提供する。配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% 相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 の少なくとも 10、15、17、20、25、または 30 個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、核酸ターゲティングベクター構築物も提供する。細胞中で相同組換えが行われるようにターゲティングベクターをデザインし得る。これらのターゲティングベクターを、相同組換えによって有蹄動物の重鎖、軽鎖、または 軽鎖の遺伝子をターゲティングするために哺乳動物細胞に形質転換し得る。1 つの実施形態では、ターゲティングベクターは、有蹄動物の重鎖のゲノム配列、軽鎖、または 軽鎖のゲノム配列 (例えば、上記の配列番号 1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または 31) のゲノム配列に相同な 3' 組換えアームおよび 5' 組換えアーム (すなわち、隣接配列) を含み得る。相同 DNA 配列は、ゲノム配列に相同な少なくとも 15 bp、20 bp、25 bp、50 bp、100 bp、500 bp、1 kb p、2 kb p、4 kb p、5 kb p、10 kb p、15 kb p、20 kb p、または 50 kb p の配列を含み得る。3' および 5' 組換えアームを、これらが、ゲノム配列の少なくとも 1 つの機能的変領域、連結領域、多様性領域、および / または定常領域の 3' 末端および 5' 末端に隣接するようにデザインし得る。機能的領域のターゲティングによってこれを不活化し、それにより、細胞が機能的免疫グロブリン分子を生成できなくする。別の実施形態では、相同 DNA 配列は、1 つ以上のイントロン配列および / またはエクソン配列を含み得る。核酸配列に加えて、発現ベクターは、選択マーカー配列 (例えば、増強緑色蛍光タンパク質 (e GFP) 遺伝子配列など)、開始配列および / もしくはエンハンサー配列、ポリ A テール配列、ならびに / または原核および / もしくは真核宿主細胞中で構築物を発

10

20

30

40

50

現させる核酸配列を含み得る。選択マーカーは、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在し得る。

【0058】

1つの特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ免疫グロブリン重鎖遺伝子座のJ6領域の3'および5'隣接配列の相同配列を含む5'および3'組換えアームを含み得る。J6領域がブタ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の機能的連結領域のみであるので、これにより、機能的ブタ重鎖免疫グロブリンの発現が防止される。特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、J6領域の5'側のゲノム配列(J1~4が含まれる)に相同な配列を含む5'組換えアームおよびJ6領域(μ 定常領域が含まれる)の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る(「J6ターゲッティング構築物」)(例えば、図1を参照のこと)。さらに、このJ6ターゲッティング構築物はまた、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在する選択マーカー遺伝子を含み得る(例えば、配列番号5および図1を参照のこと)。他の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ重鎖遺伝子座の多様性配列の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアーム、および多様性配列の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。さらなる実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ重鎖遺伝子座の μ 定常領域の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアーム、および μ 定常領域の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。

10

【0059】

別の特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の定常領域の3'および5'隣接配列の相同配列を含む5'および3'組換えアームを含み得る。ブタ免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の定常領域が1つしか存在しないことが本発明で発見されたので、これにより、機能的ブタ軽鎖免疫グロブリンの発現が防止される。特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、定常領域の5'側のゲノム配列(任意選択的に、連結領域が含まれる)に相同な配列を含む5'組換えアームおよび定常領域の3'側のゲノム配列(任意選択的に、エンハンサー領域の少なくとも一部が含まれる)に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る(「定常ターゲッティング構築物」)(例えば、図2を参照のこと)。さらに、この定常ターゲッティング構築物はまた、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在する選択マーカー遺伝子を含み得る(例えば、配列番号20および図2を参照のこと)。他の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ軽鎖遺伝子座の連結領域の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアーム、および連結領域の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。

20

30

【0060】

別の実施形態では、ターゲッティングベクターの3'配列および5'配列を生成するためのプライマーを提供する。オリゴヌクレオチドプライマーは、ブタ免疫グロブリンゲノム配列(上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31など)とハイブリダイズし得る。特定の実施形態では、プライマーは、ストリンジентな条件下で、上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31とハイブリダイズする。別の実施形態は、ブタ重鎖、軽鎖、または軽鎖の核酸配列(上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31など)とハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプローブを提供する。ポリヌクレオチドプライマーまたはプローブは、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズする少なくとも14塩基、20塩基、30塩基、または50塩基を有し得る。プローブまたはプライマーは、少なくとも14ヌクレオチド長、特定の実施形態では、少なくとも15、20、25、28、または30ヌクレオチド長であり得る。

40

【0061】

1つの実施形態では、機能的連結領域(J6領域)を含むブタIg重鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。1つの制限されない実施形態では、重鎖の増幅

50

フラグメントを配列番号4に示すことができ、このフラグメントを増幅するために使用されるプライマーは、5'組換えアームを生成するためにJ領域(配列番号2などであるが、これに制限されない)の一部に相補的であり、3'組換えアームを生成するためにIg重鎖 μ 定常領域(配列番号3などであるが、これに制限されない)の一部に相補的であり得る。別の実施形態では、ブタIg重鎖領域(配列番号4などであるが、これに制限されない)をサブクローン化し、ターゲティングベクターにアセンブリし得る。

【0062】

他の実施形態では、定常領域を含むブタIg軽鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。別の実施形態では、J領域を含むブタIg軽鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。1つの制限されない実施形態では、このフラグメントを増幅するために使用されるプライマーは、5'組換えアームを生成するためにJ領域(配列番号21または10などであるが、これに制限されない)の一部に相補的であり、3'組換えアームを生成するために定常領域(配列番号14、24、または18などであるが、これに制限されない)の3'側のゲノム配列に相補的であり得る。別の実施形態では、ブタIg重鎖(配列番号20などであるが、これに制限されない)をサブクローン化し、ターゲティングベクターにアセンブリし得る。

10

【0063】

本発明の別の局面では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子座の機能的領域の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く有蹄動物細胞を提供する。相同組換えの結果としてこれらの細胞を得ることができる。特に、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子の不活化により、有蹄動物抗体の発現能力が減少した細胞を生成し得る。他の実施形態では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の両方の対立遺伝子を欠く哺乳動物細胞を、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成し得る。さらなる実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した遺伝子ターゲティング事象によって、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子が不活化されたブタ動物を提供する。本発明の別の局面では、遺伝子ターゲティング事象によって、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の両方の対立遺伝子が不活化されたブタ動物を提供する。相同組換えによって遺伝子をターゲティングし得る。

20

30

【0064】

他の実施形態では、遺伝子を破壊し(すなわち、遺伝コードの一部を変化させることができる)、それにより、その遺伝子のセグメントの転写および/または翻訳に影響を与えることができる。例えば、置換、欠失(「ノックアウト」)、または挿入(「ノックイン」)技術によって、遺伝子破壊が起こり得る。既存の配列の転写を調整する望ましいタンパク質または調節配列のさらなる遺伝子を挿入し得る。有蹄動物免疫グロブリン遺伝子の複数の遺伝子改変を達成するために、1つの実施形態では、複数の遺伝子が改変されるように細胞を連続的に改変し得る。他の実施形態では、動物を交配させて、免疫グロブリン遺伝子の複数の遺伝子が改変された動物を生成し得る。例として、有蹄動物重鎖遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子の発現を欠く動物を、さらに遺伝子改変するか、軽鎖遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く動物と交配し得る。

40

【0065】

本発明の実施形態では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子の対立遺伝子を、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって不活化させ、その結果、機能的有蹄動物免疫グロブリンをもはや生成することができない。1つの実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、RNAに転写し得るが、タンパク質に翻訳することができない。別の実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、不活性な短縮形態に転写し得る。このような短縮RNAは、翻訳することができないか、非機能的タンパク質に翻訳し得る。別の実施形態では、ターゲッテ

50

ィングされた免疫グロブリン遺伝子を、遺伝子が転写されないような方法で不活化し得る。さらなる実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、転写し、次いで、非機能的タンパク質に翻訳し得る。

【0066】

本発明さらなる局面では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子の1つの対立遺伝子、任意選択的に両方の対立遺伝子を欠く有蹄動物（ブタまたはウシなど）の細胞を、レシピエントへの核移植のドナー細胞として使用して、クローン化されたトランスジェニック動物を生成し得る。あるいは、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子ノックアウトを胚性幹細胞中で作製し、次いで、これを使用して子孫を生成し得る。本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した機能的な有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の1つの対立遺伝子を欠く子孫を交配して、メンデル型遺伝によって両対立遺伝子の機能性を欠く子孫をさらに生成し得る。

10

【0067】

本発明の1つの局面では、(i)有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖のゲノム遺伝子座の生殖系列立体配置を分析すること、(ii)遺伝子座の少なくとも1つの機能的領域の5'末端および3'末端に隣接するヌクレオチド配列の位置を決定すること、ならびに(iii)隣接配列を含むターゲティング構築物を細胞にトランスフェクトすることによる、有蹄動物免疫グロブリン遺伝子の発現の破壊方法であって、首尾良く相同組換えされた場合、免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1つの機能的領域を破壊し、それにより、免疫グロブリン遺伝子の発現を減少または防止する方法を提供する。1つの実施形態では、ブタ重鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。例えば、図1に示すように、ブタ重鎖遺伝子座は、少なくとも4つの可変領域、2つの多様性領域、6つの連結領域、および5つの定常領域を含む。特定の実施形態では、6つの連結領域(J6)のうちのたった1つが機能的である。別の実施形態では、ブタ軽鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。例えば、図2に示すように、ブタ軽鎖遺伝子座は、少なくとも6つの可変領域、6つの連結領域、1つの定常領域、および1つのエンハンサー領域を含む。さらなる実施形態では、ブタ軽鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。

20

【0068】

さらなる局面では、本発明は、ヒト抗体（すなわち、免疫グロブリン(Ig)）遺伝子座の少なくとも一部を発現するようにさらに改変された、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成された、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子座の機能的領域の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く有蹄動物および有蹄動物細胞を提供する。さらなる実施形態では、外因性免疫グロブリンを発現するブタ動物を提供する。このヒト遺伝子座は、再配列されて、有蹄動物中で多様なヒト抗体分子集団を発現し得る。これらのクローン化されたトランスジェニック有蹄動物は、ヒト抗体（ポリクローナル抗体など）を補給可能に、理論的には無限大に供給し、治療、診断、精製、および他の臨床に関連する目的のために使用し得る。1つの特定の実施形態では、人工染色体(AC)（酵母または哺乳動物の人工染色体(YACSまたはMACS)）を使用して、有蹄動物細胞または動物でヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させることができる。ヒト免疫グロブリン遺伝子(Ig重鎖遺伝子(ヒト第414染色体)、Ig鎖遺伝子(ヒト第2染色体)、および/またはIg鎖遺伝子(ヒト第22染色体)など)の全部または一部を人工染色体に挿入し、次いで、有蹄動物細胞に挿入し得る。さらなる実施形態では、再配列されて多様なヒト抗体分子集団を発現する、少なくとも1つのヒト抗体遺伝子座の一部または全部を含む有蹄動物および有蹄動物細胞を提供する。

30

40

【0069】

さらなる実施形態では、外因性抗体を生成する方法であって、(a)1つ以上の目的の抗原を、その細胞が1つ以上の人工染色体を含み、かつ機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠く有蹄動物に投与する工程であって、それぞれの人工染色体が、再配列して1つ以上の抗原に対する外因性抗体を生成する1つ以上の外因性免疫グロブリン遺伝子

50

座を含む工程、および/または(b)有蹄動物から前記外因性抗体を回収する工程を含む方法を提供する。1つの実施形態では、免疫グロブリン遺伝子座は、B細胞中で再配列し得る。

【0070】

本発明の1つの局面では、本発明の任意の局面の方法によって、有蹄動物(ブタまたはウシなど)を調製し得る。これらのクローン化されたトランスジェニック有蹄動物(例えば、ブタおよびウシ動物)は、ヒトポリクローナル抗体を補給可能に、理論的には無限大に供給し、治療、診断、および精製の目的のために使用し得る。例えば、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成したトランスジェニック動物は、血流中にヒトポリクローナル抗体を生成し、これを使用して、所望の抗原に特異的な異なる抗体のアレイを生成し得る。感染症の治療および予防、生物戦争因子に対するワクチン接種、免疫系の調整、癌細胞などの望ましくないヒト細胞の除去、および特定のヒト分子の調整のために、大量のポリクローナル抗体を使用することもできる。

10

【0071】

他の実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した、機能的免疫グロブリンの発現を欠く動物または細胞は、異種抗原の発現を排除するためのさらなる遺伝子改変を含み得る。このような動物を、-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子(例えば、USSN 10/863, 116号を参照のこと)、iGb3シンターゼ遺伝子(例えば、米国特許出願60/517, 524号を参照のこと)、および/またはForsmanシンターゼ遺伝子(例えば、米国特許出願60/568, 922号を参照のこと)の少なくとも1つの対立遺伝子の発現を排除するように改変し得る。さらなる実施形態では、本明細書中に開示の動物はまた、フコシルトランスフェラーゼおよび/またはシアリルトランスフェラーゼを発現するための遺伝子改変を含み得る。これらのさらなる遺伝子改変を達成するために、1つの実施形態では、複数の遺伝子が改変されるように細胞を改変し得る。他の実施形態では、動物を交配させて、複数の遺伝子を改変し得る。1つの特定の実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した機能的免疫グロブリンの発現を欠く動物(ブタなど)を、-1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ発現を欠く動物(ブタなど)と交配し得る(例えば、W004/028243号に記載)。

20

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0072】

(詳細な説明)

本発明は、有蹄動物の免疫グロブリン生殖系列遺伝子配列の配置および新規のそのゲノム配列を初めて提供する。さらに、重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く新規の有蹄動物細胞、組織、および、動物を提供する。この発見に基づいて、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子を完全に欠く有蹄動物を生成し得る。さらに、これらの有蹄動物を、外因性(ヒトなど)免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するようにさらに改変し得る。

【0073】

本発明の1つの局面では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、有蹄動物は、内因性重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠くことができる。軽鎖免疫グロブリンは、および/または免疫グロブリンであり得る。さらなる実施形態では、内因性免疫グロブリンの少なくとも1つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンが、重鎖、軽鎖、および軽鎖またはその任意の組み合わせからなる群から選択される、トランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンの発現を、内因性免疫グロブリンの発現を防止するための内因性免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子ターゲティングによって行うことができる。1つの実施形態では、相同組換えによって遺伝子ターゲティングを行うことができる。別の実施形態では、トランスジェニック有蹄動物を、核移植によって生成し得る。

40

50

【 0 0 7 4 】

他の実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を、外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するようにさらに遺伝子改変し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を含むブタ動物を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、鎖遺伝子座またはそのフラグメントおよび/または鎖遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に応答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

10

20

【 0 0 7 5 】

本発明の別の局面では、外因性免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンを、内因性有蹄動物染色体内に組み込まれた免疫グロブリン遺伝子座から発現し得る、トランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、トランスジェニック動物由来の有蹄動物細胞を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、子孫に遺伝し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、雄生殖系列を介して子孫に遺伝し得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に応答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

30

40

【 0 0 7 6 】

(定義)

用語「組換えDNAテクノロジー」、「DNAクローニング」、「分子クローニング」、または「遺伝子クローニング」は、細胞または生物へのDNA配列の移入プロセスをいう。一方の生物由来のDNAフラグメントを、自己複製遺伝因子(例えば、細菌プラスミド)に移入することができ、これにより、他方の多くの生物でDNA(またはRNA)配列の任意の特定の部分のコピーが選択され、量的に無制限に生成し得る。プラスミドおよび人工染色体などの他のクローニングベクター型を使用して、遺伝子および他の染色体片をコピーし、さらなる研究のために十分な同一の材料を生成し得る。20kbまでの外来DNAを輸送し得る細菌プラスミドに加えて、他のクローニングベクターには、ウイルス、コスミド、および人工染色体(例えば、細菌人工染色体(BAC)または酵母人工染色

50

体 (Y A C)) が含まれる。染色体 D N A のフラグメントが研究室内で最終的にそのクローニングベクターと連結される場合、「組換え D N A 分子」と呼ぶ。組換えプラスミドを適切な宿主細胞に導入した直後に、新規に挿入したセグメントは、宿主細胞 D N A と共に再生される。

【 0 0 7 7 】

「コスミド」は、45 kb までの外来 D N A を輸送する人為的に構築されたクローニングベクターである。これらを、大腸菌細胞への感染のために、ファージ粒子にパッケージングし得る。

【 0 0 7 8 】

本明細書中で使用される、用語「哺乳動物」(「遺伝子改変された(または変化した)哺乳動物」)は、任意の非ヒト哺乳動物(ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ(ウシ)、シカ、ラバ、ウマ、サル、イヌ、ネコ、ラット、マウス、トリ、ニワトリ、爬虫類、魚類、および昆虫類が含まれるが、これらに限定されない)が含まれることを意味する。本発明の1つの実施形態では、遺伝子を変化したブタおよびその生成方法を提供する。

10

【 0 0 7 9 】

用語「有蹄動物」は、蹄のある哺乳動物をいう。偶蹄類は、偶数の脚の指を有する(蹄が割れた)有蹄動物であり、アンテロープ、ラクダ、ウシ、シカ、ヤギ、ブタ、およびヒツジが含まれる。奇蹄類は、奇数の脚の指を有する有蹄動物であり、ウマ、シマウマ、サイ、およびバクが含まれる。本明細書中で使用される、用語「有蹄動物」は、成体、胚、または胎児の有蹄動物をいう。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書中で使用される、用語「ブタ (p o r c i n e) 」, 「ブタ動物」, 「ブタ (p i g) 」, および「ブタ (s w i n e) 」は、性別、サイズ、または品種を問わない同一の動物型をいう一般名である。

【 0 0 8 1 】

「相同 D N A 配列または相同 D N A 」は、基準 D N A 配列と、少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% 同一である D N A 配列である。相同配列は、ストリンジェントな条件下で標的配列とハイブリダイズする。ストリンジェントなハイブリダイズ条件には、配列が少なくとも 85%、少なくとも 95%、または 98% 同一である場合にハイブリダイズが起こる条件が含まれる。

30

【 0 0 8 2 】

「同遺伝子系 (i s o g e n i c) または実質的に同遺伝子系の D N A 配列」は、基準 D N A 配列と同一またはほぼ同一の D N A 配列である。用語「実質的に同遺伝子系の」は、基準 D N A 配列と少なくとも約 97 ~ 99% 同一であるか、基準 D N A 配列と少なくとも約 99.5 ~ 99.9% 同一であるか、一定の用途では、基準 D N A 配列と 100% 同一である D N A をいう。

【 0 0 8 3 】

「相同組換え」は、配列相同性に基づいた D N A 組換えプロセスをいう。

【 0 0 8 4 】

「遺伝子ターゲティング」は、一方が染色体上に存在し、他方が存在しない2つの D N A 配列間での相同組換えをいう。

40

【 0 0 8 5 】

「非相同性組込みまたは無作為な組込み」は、相同組換えに関係なく D N A をゲノムに組み込む任意のプロセスをいう。

【 0 0 8 6 】

「選択マーカー遺伝子」は、その発現によって遺伝子を含む細胞が同定される遺伝子である。選択マーカーは、その遺伝子を持たない細胞の成長を妨げるか遅延させる培地で細胞を増殖させる遺伝子であり得る。例には、抗生物質耐性遺伝子および選択された代謝産物で成長させる遺伝子が含まれる。あるいは、この遺伝子は、細胞に容易に同定される表現型を付与することによって形質転換体の視覚的スクリーニングを容易にし得る。このよ

50

うな同定可能な表現型は、例えば、発光もしくは有色化合物の生成、または細胞周囲の培地の検出可能な変化であり得る。

【0087】

用語「連続する」を、本明細書中でその標準的な意味で使用する（すなわち、中断しないことまたは途切れないこと）。

【0088】

「ストリンジেন্টな条件」は、（１）洗浄に低イオン強度および高温を使用する条件（例えば、0.015M NaCl / 0.0015M クエン酸ナトリウム / 0.1% SDS、50）、または（２）ハイブリダイズ時に変性剤（例えば、ホルムアミドなど）を使用する条件をいう。当業者は、明瞭かつ検出可能なハイブリダイズシグナルを得るために、ストリンジエンシー条件を適切に決定し、変更し得る。例えば、ストリンジエンシーを、一般に、ハイブリダイズおよび洗浄時に存在する塩含有量の増加、温度の低下、またはその組み合わせによって低下させることができる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, (1989)を参照のこと。

10

【0089】

（I. 免疫グロブリン遺伝子）

本発明の1つの局面では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、有蹄動物は、内因性重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンのいかなる発現も欠くことができる。軽鎖免疫グロブリンは、および/または免疫グロブリンであり得る。さらなる実施形態では、内因性免疫グロブリンの少なくとも1つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンが、重鎖、軽鎖、および軽鎖またはその任意の組み合わせからなる群から選択される、トランスジェニック有蹄動物を提供する。1つの実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンの発現を、内因性免疫グロブリンの発現を防止するための内因性免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子ターゲティングによって行うことができる。1つの実施形態では、相同組換えによって遺伝子ターゲティングを行うことができる。別の実施形態では、トランスジェニック有蹄動物を、核移植によって生成し得る。

20

【0090】

本発明の別の局面では、（i）有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖のゲノム遺伝子座の生殖系列立体配置を分析すること、（ii）遺伝子座の少なくとも1つの機能的領域の5'末端および3'末端に隣接するヌクレオチド配列の位置を決定すること、ならびに（iii）隣接配列を含むターゲティング構築物を細胞にトランスフェクトすることによる有蹄動物免疫グロブリン発現の破壊方法であって、首尾良く相同組換えされた場合、免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1つの機能的領域が破壊され、それにより、免疫グロブリン遺伝子の発現が減少または防止される方法を提供する。

30

【0091】

1つの実施形態では、ブタ重鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。例えば、図1に示すように、ブタ重鎖遺伝子座は、少なくとも4つの可変領域、2つの多様性領域、6つの連結領域、および5つの定常領域を含む。特定の実施形態では、6つの連結領域（J6）のうちのたった1つが機能する。

40

【0092】

別の実施形態では、ブタ軽鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。例えば、図2に示すように、ブタ軽鎖遺伝子座は、少なくとも6つの可変領域、6つの連結領域、1つの定常領域、および1つのエンハンサー領域を含む。

【0093】

さらなる実施形態では、ブタ軽鎖遺伝子座の生殖系列立体配置を提供する。

【0094】

配列番号1~39に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号1~39のいずれ

50

か1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号1~39のいずれか1つの少なくとも10、15、17、20、25、または30個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号1~39とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【0095】

ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸配列レベルでの相同性または同一性を、配列類似性検索のために作製されたblastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxプログラム(例えば、Altschul, S.F.ら(1997) Nucleic Acids Res 25:3389-3402およびKarlinら(1900) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268を参照のこと)によって使用されるアルゴリズムを使用したBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)によって決定し得る。BLASTプログラムによって使用されるアプローチは、ギャップを使用するか使用せずに、クエリー配列およびデータベース配列の間の類似のセグメントを最初に考慮し、次いで、同定された全適合物の統計的有意性を評価し、最後に、予め選択した有意性の閾値を満たす適合物のみをまとめることである。例えば、Altschulら(1994)(Nature Genetics 6, 119-129)を参照のこと。ヒストグラム、記述、アラインメント、期待値(すなわち、データベース配列に対する適合物の報告のための統計的有意性の閾値)、カットオフ、行列、およびフィルター(low complexity)についての検索パラメータは、デフォルト値である。blastp、blastx、tblastn、およびtblastxによって使用されるデフォルトスコアリング行列は、85(ヌクレオチド塩基またはアミノ酸)を超えるクエリー配列長に推奨されるBLOSUM62行列(Henikoffら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919)である。

【0096】

(ブタ重鎖)

本発明の別の局面では、有蹄動物免疫グロブリンの重鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。1つの実施形態では、例えば、配列番号29に示す、少なくとも1つの可変領域、少なくとも2つの多様性領域、少なくとも4つの連結領域、および少なくとも1つの定常領域(μ 定常領域など)を含む、ブタ重鎖をコードする単離ヌクレオチド配列を提供する。別の実施形態では、例えば、配列番号4に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の少なくとも4つの連結領域および少なくとも1つの定常領域(μ 定常領域など)を含む、単離ヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、例えば、配列番号1に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の第1の連結領域の5'隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。なおさらに、例えば、配列番号4に示す、ブタ重鎖ゲノム配列の第1の連結領域の3'隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、配列番号1、4、または29に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号1、4、または29と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同な核酸配列も提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号1、4、または29とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【0097】

さらに、配列番号1、4、または29の少なくとも10、15、17、20、25、または30個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。1つの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号4の少なくとも17、20、25、または30個連続するヌクレオチドまたは配列番号29の残基1~9,070を含む。他の実施形態では、配列番号29の少なくとも50、100、1,000、2,500、4,000、4,500、5,000、7,000、8,000、8,500、9,000、10,000、または15,000個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。別の実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号29の残基9,070~11039を含む。

【 0 0 9 8 】

さらなる実施形態では、配列番号 1、4、または 29 に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号 1、4、または 29 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% 相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号 1、4、または 29 の少なくとも 10、15、17、20、25、または 30 個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジントな条件下で、配列番号 1、4、または 29 とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【 0 0 9 9 】

1つの実施形態では、例えば、配列番号 29 に示す、少なくとも 1つの可変領域、少なくとも 2つの多様性領域、少なくとも 4つの連結領域、および少なくとも 1つの定常領域 (μ定常領域など) を含む、ブタ重鎖をコードする単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号 29 では、重鎖の多様性領域を、例えば、残基 1089 ~ 1099 (D (偽)) に示し、重鎖の連結領域を、例えば、残基 1887 ~ 3352 (例えば、J (偽) : 1887 ~ 1931、J (偽) : 2364 ~ 2411、J (偽) : 2756 ~ 2804、J (機能的 J) : 3296 ~ 3352) に示し、組換えシグナルを、例えば、残基 3001 ~ 3261 (ノナマー)、3292 ~ 3298 (ヘプタマー) に示し、定常領域を、以下の残基に示す : 3353 ~ 9070 (J ~ C μイントロン)、5522 ~ 8700 (スイッチ領域)、9071 ~ 9388 (μエクソン 1)、9389 ~ 9469 (μイントロン A)、9470 ~ 9802 (μエクソン 2)、9830 ~ 10069 (μイントロン B)、10070 ~ 10387 (μエクソン 3)、10388 ~ 10517 (μイントロン C)、10815 ~ 11052 (μエクソン 4)、11034 ~ 11039 (ポリ(A)シグナル)。

10

20

【 0 1 0 0 】

【 化 1 】

配列番号 29	<pre> tctagaagacgctggagagggccagacttctcggaaacagctcaaagag ctcttcaaaagccagatccatcacacgtggccaccaataggccatgcca gcttccaaggccgaactgggttctcacggcgcacatgaagccctgcagc ctggctatcctcttccgtgtgaaaggccaggcccgggactggacgagg ggctagcagggtgtggtaggcacctgcgccccccccggcaggaaacc agagaccctggggctgagagtgagcctccaaacaggatgccccaccttc aggccaccttcaatccagctacactccacctgccaftctctctgggca cagggcccaagccctggatctggcctggctcgaactgcaccacggcgc acacacacacttctaactgctgctcgcctcaccctccccagcgtggtc catggcagcacggcagtgccgctccggcggtagtgagtgacagggctcc ttccccccccaggagccccagggtgtgtgcagatctggggctcctg tcccttacacctcatgccccctccataccaccctccaggcggggag gcagcgagaccttgcacgggactcagccaacggccacagggaggcca gcccacagcagctggctccaaaggagggtggaggtaggtccacagct gcccacagagaaacctgacggaccacaggggctcagccagccggaa ccagctcctctgtgggtgagcaatggccaggcccccgccggccaccagg ctggccttgcgccaactgagaactcacgtccagtgaggagactcaaga cagcctgtgcacacagcctcggatctgctccattcaagcagaaaaagg aaaccgtgcaaggcagccctcagcattcaaggattgtagcagcgccaac tattctggcagtgccgattagaatgacctgagagaaggcggagggg tctctgtggctctggccaacagccctggctccacctgcccctgc cagcccagggggttggggcagccaggaaccacagtgctaccgggacc acagtgactgaccaaactccggccagagcagccccaggccagccggct ctcgccctggaggactcaccatcagatgcacaggggcgaagtgtggaag agacgtgtcggcggcalttggaaaggcgaaggagcttccagtgga caggaggtgggacactccagcaaggactgggtcccaaggcctggg </pre>
----------------	--

30

40

【 0 1 0 1 】

【化 2】

```

gaagggtactggctgggggttagcctggccagggaacggggagcgggg
cggggggctgagcaggagggacctgacctcgtgggagcaggcaagtacg
gcttcaggcagcagccacatcccagaccaggagcagcaggcaggagg
gcttgcagcggggcggggcctcctggctcgggggctcctgggggacg
ctggcctcttttcgtgctcccgacacaggccagctcctggggccta
tgcttacctgtagctgaggccggggcctcagggtcgtcctcctcag
gggagagtcctcctgaggctacgctgggg*ggggactatggcagctccacc
aggggcctggggaccaggggcctggaccaggctgcagcccggaggagg
cagggctctggctcctccagcctcggccctggaaatggcagaaccctg
gggggtgagcagcagcaggcgggtcagacagacaggggccggccggaaa
ggagaagtgggggacagaccgccaggggccaggcccaaggctctgtgt
ggcaggcctggggggggcaccattgggtggggcctggcctacttaattcgt
ggggccaggcctcctggctaccgtctcctcaggtgagcctgggtctga
tgtccagctaggcctgggtggggcgggggtggcctgtctcaggctaggg
caggggcctgggagtgatgtaattgtaaggaggcaaacagggtgcaactg
tcccctggaaactgaccactggggcaggggcctcctgtcagctctcc
tcaggtaaagcggccctgtgcccctctcctggcagctggaaaagggaatt
ttcaagattcctgtgtgtggggccctcctggggcccccggggggg
ctcccctcggccagatggggcctcggcctggagcagcgggctgggca
cacagctcagctaggccacagaggccgggctcagggtctgtgtgg
cccggcagctggcagggggctcgggttttgacaccccataaggggc
cacagcactgtaccatctcagcctggggccaggagctcagggtcacc
gtctctcagggtgagctcctcagccctctcactctctgggggtt
fgctcatttgggggaaaaggatggcctgggtcagggtctaaagggt
ctaggggcagcggccggggccaggaaaggggccaggggccaggctggct
cggccaggagcagagcttccagacatcgcctcctggcggctgcaacta
ggccttggccgggggggctcagcaccaccaggcctcttggctcccagg
gtcccggcccccggctgcctaccaggcaccgtgcggggggggggggc
ctgtgctggccacccttcttaactgggatccgggcttagtctgcaa
tgtgacaacgggctcgaagctggggccaggggaccctagctacgacgc
ctgggggtgggtgctccgaccctcccacttccagcactggcggcaga
cctggggagctcagggtggtgggacacttggaggctcaggaaaggagctg
gggagagggtctgtcagcgggggtcagagatggggcccccctcaaggac
ggcctgcgggggcaaggccttctggcctggcctggcggcctcactg
ggcgtcagggggggctcccggggcaggcggctcagcagggcgggttga
attcgtgctgggttcgggggtcgggggtcggccttcatgaacagacag
cccaggcggggcgttgggtggccctgggggctgggtggaaatgcagggt
ctcgggaaagtcaggaggagcctggccagcagagggttccagccctgcg
ggcaggggacctggagacgggcaaggcattggcctcagaggccaggcc
acaccccccaGGTTTTTGTggggcgagcctggagattgcacCACTGTGAT
TACTATGCTATGGATCTCTGGGGCCCAAGGCGTTGAAGTCGTCGTCTCCTC
AGgtaaagacggccctccaggccttaattctgctcgtcgtggggc
tttctgactctgactcctgggggctgtgtgccccccggggatgag
ggcggctgccaaggagggtcagggaccaggagcctggggaagtctga
cgggggctgcaaggcgggagggcccccaccggggggcaggccaggccgc
tggggcggcaggagaccgtgagagtgccctgagggagggtgtctggga
accagaaaccccggcgggagggtgtgctgcaatggggcttccagacgg
gaggcgtcttggcctcaccgttctcaaggcccttggggctgaaaga
ggcattgctgagagagaaaggacaggcctgtccgactggccgagagcg
ggcagccccgggggagagcggggcgaatggcctgggctgtgaggccag
gtccaaggagagcgtgtgctcctgtgacagggtcactgcaaacctt
agaaagcgggtatgttgaagcggcctcctgattttaaagaaagggaga
ctglaaagttagcagctcctcaagtgtgtaagggtttaaaggtaaaag
gttttaaccttggactgcaagttagcaagcgtgggggagtgaaatgg
gggtccagggtggccgagggcagtacgaggcctgcccgtcctcaatt
cagggcttagtttgcagaataaagtcggcctgttttcaaaagcattgg

```

10

20

30

【 0 1 0 2 】

【化3】

```

tggctgctgagctgggtgggaggccggcggcagccctggccacctgcagc
aggfggcagggaagcaggtcggccaagaggctattttaggaagccagaaaa
cacggctgatgaattatagctctgtgttccaggagggtgggtgggcatg
gctttggcagcgcacagaaaccgaagtgcccactgagaaaaaacaact
cctgcttaattgcattttctaaaagaagaacagaggctgacggaaac
tggaaagtctctgttactactgaattgagtttccggcttagctta
tcaactgctcactagattcatttcaaacgtaaacgttaagagccgagg
cattcctalcctctctaaaggcgttattcggaggctcattaccgccca
gcacctccctgctgagcagcattgctgtcaccgtcaccgtgacggcgcg
cacattttcagttggcccgttcccctgtgattaggacagacggcggc
actctgcccagccgtctgtgctcagatctgcaggcgtcctctcggga
cggagctcagggggaagagcgtgactccagttgaacgtgatagtcggfctg
ttagagggagaccagtcgggtgtcagtcagaaggcccccgggcccga
ggccctggcagcagggcccgtgcccctgcatcacggcccagcgtcttag
aggcaggactctgtggagagttgtgagggtcctggggcccctcggagc
tggggcccgtcgggtgcaagggtggcctcggcggcgggttggctgttct
gcccggattggaggaattctccagtgtaggagtcgccagtaccggggc
accaggctgtaagaggaggcccccgtcgtggccagacagctggggagg
gttcggtaaaaggctcggcggcttcttaagaggacttctctggagg
gcatttagctagtcggaccgtttctgactcgggaagaggatgaggag
gaggcctatgtcccaggagccgaaggcccccgggggaagccagaggct
ctcctgtcccacagaggcgcagccactgcccagacagacaggccctt
ccctctgatgacggcaaaaggccctcggctctgcccgggtgttgggggg
agtgcgccgaagccctcaccagagccctgagggtgagactgaccga
tgcctctggcccggcctggggccggaccgaggggactcgtggaggca
gggcgatgtgtgctcggggagggaaccgtggccgagcccggcttg
gcatfcccggggagggccctcagccgaggccagtggtccgggggaac
cacccttctggcagcgcacagggcctcgggactgtccggggcgagc
ctgggctgcccgtggcaggccTGGGCTGACCTGGACTTCACCAGACAGAA
CAGGGCTTTCAGGGCTGAGCTGAGCCAGGTTTAGCGAGGCCAAGTGGGGC
TGAACCAAGGCTCAACTGGCCCTGAGCTGGGTGAGCTGGGCTGACCTGGGC
TGAGCTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGAC
TGGCTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCT
GGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGATCT
GAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCT
GGTTGAGTTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGGGCTGTGCTGGCTGAGCTA
GGCTGAGCTAGGCTAGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTG
GGCTGATTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCGTTGAGCTGGCTGG
GCTGGATTGAGCTGGCTGAGCTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGT
TGAGCTGAGCTGGACTGGTTTGGCTGGGTCGATCTGGGTTGAGCTGTCC
TGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTCAGC
AGAGCTGGGTTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGGCC
TGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGTGTTGAGC
TGGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGAGC
TGGGCTGGGCTGTGCTGACTGAGCTGGGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCT
GGGCTGAGCTGATCCGAGCTAGGCTGGGCTGGTTTGGGCTGAGCTGAGCT
GAGCTAGGCTGGATTGATCTGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTG
AGCTGGTCTGAGCTGGCCTGGGTCGAGCTGAGCTGGACTGGTTTGGGCTG
GGTCGATCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTG
AGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAAC
TAGCCTAGCTAGGTTGGGCTGAGCTGGGCTGGTTTGGGCTGAGCTGAGCT
GAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGGCTGGGTTG
AGCTGGGCTAGGTTGGAGCTGAGCTGGGTCGAGCTGAGTTGGGCTGAGCTG
GCCTGGGTTGAGGTTAGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTG
GCTGGGCTGGTTTGGCTGGGTCAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGGGTTGA
GCTGGGCTGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCCGACCTAGGCTGGGATGA

```

10

20

30

【0103】

【化4】

GCTGGGCTGATTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGG
 CTGAGCTGGGCTGGAGCCTGGCCTGGGGTGAGCTGGGCTGAGCTGCGCT
 GAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGCTGGGCTGGTTTGGCGTGGGTCAAGCTG
 GGCCGAGCTGGCCTGGGATGAGCTGGGCCGGTTTGGGCTGAGCTGAGCTG
 AGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGGTGA
 GCTGGGCTGAGCTAAGCTGAGCTGGGCTGGTTTGGGCTGAGCTGGCTGAG
 CTGGGCTCCTGCTGAGCTGGGCTGAGCTGACCAGGGGTGAGCTGGGCTGAG
 TTAGGCTGGGCTCAGCTAGGCTGGGTTGATCTGGCAGGGCTGGTTTGGCG
 TGGTCAAGCTCCCGGAGATGGCCTGGGATGAGCTGGGCTGGTTTGGGC
 TGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCT
 GAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAACT
 GGGCTAAGCTGGCTGAGCTGGATCGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTG
 GGGTTAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGCTGG
 GCTGGTTTGGCGTGGGTCAAGCTGGGCCGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGG
 GCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGAGCTGA
 GCTAGGCTGCATTGAGCTGGCTGGGATGGATTGAGCTGGCTGAGCTGGCT
 GAGCTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTG
 AGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTCAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTG
 GGTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTG
 GGTTGAGCTGGGCTCGAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCT
 GGGCTCAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCT
 AGCTGGGCTCAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAACTGGCCTG
 AGCTGGGCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGAGCTG
 GGCTGAGCAGAGCTGGGTTGGTCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTG
 GGCTGAGCAGAGTTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTA
 GGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGTTGGGCTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCGG
 AGCTGGGCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGGAACTGGGTTGATCTG
 AATTGAGCTGGGCTGAGCCGGGCTGAGCCGGGCTGAGCTGGGCTAGGTTG
 AGCTGGGTTGAGCTGGCCTCAGCTGGTCTGAGCTAGGTTGGGTTGAGCTA
 GGCTGGATTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGATCTGGCCTCAGCTGGGCTG
 AGGTAGGCTGAACTGGGCTGTGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCCAGTTT
 AGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGTGTTGATCTTTCCTGAACTG
 GGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTAGCTGGATTGAACGGGGTAAGCTGG
 GCCAGGCTGGACTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGAGCTGAGTTGAATTGG
 GTTAAGCTGGGCTGAGATGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCCAG
 GTCGGACTGGGTTACCTGGGCCACACTGGGCTGAGCTGGGCGGAGCTCG
 attaacctggctcaggctgagctgggtccagcagacatgcctggccaggc
 tggctgacctggacacgttcgalgagctgcttgggalggttcacctca
 gctgagccagggtggctccagctgggctgagctggtgacctgggtgacct
 cggtgaccagggtgctctgagctccgggccaagccgaggctgcatcagact
 cggcagaccacaaggctgggccccggctggcaagccaggggcggtgaagg
 ctgggctggcaggactgtcccgaaggagggtgcacgtggagccgcccga
 ccccgaccggcaggacctggaagacgctctcactcccccttctctct
 gtccccctcgggtcctcagAGAGCCAGTCTGCCCCGAATCTCTACCCC
 TCGTCTCCTGCGTCAAGCCCCCGTCCGATGAGAGCCTGGTGGCCCTGGGC
 TGCCCTGGCCCCGGGACTTCTGCCAGCTCCGTCACCTTCTCTGGAAC
 CAAGAACAGCAGCAAGGTCAGCAGCCAGAACATCCAGGACTTCCCGTCC
 G
 TCTGAGAGGGCGCAAGTACTTGGCCTCCTCCCGGGTGCTCCTACCCTCT
 GTGAGCATCCCCAGGACCCAGAGGCCTTCTGGTGTGCGAGGTCCAGCA
 CCCCAGTGGCACCAAGTCCGTGTCCATCTCTGGGCCAGgtgagctgggct
 cccccgtggctgtggcggggggggggccgggtgcccgggcacagtgc
 gccccgtctgctcagTCGTAGAGGAGCAGCCCCCGTCTTGAACAT
 CTTCTGCCCCACCCGGGAGTCTTCTCCAGTACTCCCCAGCGCACGTCCA
 AGCTCATCTGCCAGGCTCAGACTTCAGCCCCAAGCAGATCTCCATGGCC
 TGGTTCCTGTATGGGAAACGGGTGGTGTCTGGCGTCAGCACAGGCCCGT

10

20

30

【 0 1 0 4 】

【化5】

	<p>GGAGACCTACAGTCCAGTCCGGTGACCTACAGGCTCCACAGCATGCTGA CCGTACGGAGTCCGAGTGGCTCAGCCAGAGCGTCTTACCTGCCAGGTG GAGCACAAGGGCTGAACTACGAGAAGAACCGCTCCTCTCTGTGCACTC CAgtgagtgcagccctcgggcccgggcccgggcccgggagccacaca cacaccagctgctccctgagccttggcttccgggagtgccaaggcgggg aggggctgtcagggcagctggaggcactgtcagctgggcccagcacc ccctacccccggcagggcccgggctccgagggcccgcagtcgagggcc ctgctcttgggggaagccctacttggcccctcaggggcctgacgtccc cccacccacccccgcctagATCCCAACTCTCCCATCACCGTCTTCGCCAT CGCCCCCTCCTTCGCTGGCATCTTCCTACCAAGTCGGCCAAGCTTTCCT GCCTGGTCACGGGCTCGTCACCAGGGAGAGCCTCAACATCTCCTGGACC CGCCAGGACGGCGAGGTTCTGAAGACCAGTATCGTCTTCTTGAGATCTA CGCCAAAGGACCTTCGGGCCAGGGGCGAAGCCTCCGTCTCGGTGGAGG ACTGGGAGTCGGGCGACAGGTTACGTGCACGGTGACCCACAGGACCTG CCCTCGCCGCTGAAGCAGAGOGTCTCCAAGCCCAGAGGtaggcccctgccc tgccctgcctccgcccggcctgtgecttggcccggggggagccga gctgcccggaggagcctctggccccccggctccgaccacaccct cctgtctctcccagGGATCGCCAGGCACATGCCGTCCGTGTACGTGC TGCCGCCGGCCCCGGAGGAGCTGAGCCTGCAGGAGTGGGCTCGGTACCC TGCCCTGGTGAAGGGCTTCTCCCCGCGGACGTGTTCGTGCAGTGGCTGCA GAAGGGGGAGCCCCGTGCCCGGACAAGTACGTGACCAGCGCCGGTG C CCGAGCCCGAGCCCAAGGCCCCGCTCCTACTTCGTGCAGAGCGTCTTG ACGGTGAGCGCCAAGGACTGGAGCGACGGGGAGACCTACACTGCGTCG T GGGCCACGAGGCCCTGCCCCACACGGTGACCGAGAGGACCGTGGACAAG T CCACCGTAAACCCACCCTGTACAACGTCTCCCTGGTCTGTCCGACACG GCCAGCACCTGTACTGACCCCTGGCTGCCCGCCGCGGCGGGGCCAGA GCCCCCGGGCGACCATCGCTCTGTGTGGCCTGTGTGCAACCCGACCTG TCGGGGTGAGCGGTGCGATTTCTGAAAATTAGAaataaaAGATCTCTGTGC CG</p>
配列番号 1	<p>TCTAgAAGACGCTGGAGAGAGGCCagACTTCTCGGAACAGCTCAAAGAG CTCTGTCAAAGCCAGATCCCATCACAGTGGGCACCAATAGGCCATGCCA GCCTCAAAGGGCCGAAGTGGGTTCTCCACGGCGCACATGAAGCCTGCAGC CTGGCTTATCCTCTTCCGTGGTGAAGAGGCAGGCCCGGACTGGACGAGG GGCTAGCAGGGTGTGGTAGGCACCTTGGCCCCCAACCCGGCAGGAACC AGAGACCCTGGGGCTGAGAGTGAAGCCTCAAACAGGATGCCCAACCTTC AGGCCACCTTTCAATCCAGCTACACTCCACCTGCCATTCTCCTCTGGGCA CAGGGCCAGCCCCGGATCTTGGCCTTGGCTCGACTTGCACCCACGCGC ACACACACACTTCCTAACGTGCTGTCCGCTCACCCCTCCCCAGCGTGGTC CATGGGCAGCACGGCAGTGCAGCTCCGGCGGTAGTGAGTGCAGAGGTCCC TTCCCTCCCCAGGAGCCCCAGGGGTGTGTGCAGATCTGGGGGCTCCTG TCCCTTACACCTTCAAGCCCCCTCCCTCATAACCCACCTOCAGGGGGGAG GCAGCGAGACCTTTGCCAGGGACTCAGCCAACGGGCACACGGGAGGCC AGCCCTCAGCAGCTGGG</p>
配列番号 4	<p>GGCCAGACTTCTCGGAACAGCTCAAAGAGCTCTGTCAAAGCCAGATCCC ATCACAGTGGGCACCAATAGGCCATGCCAGCCTCCAAGGGCCGAAGTGG GTTCTCCACGGCGCACATGAAGCCTGCAGCCTGGCTTATCCTCTTCCGIG GTGAAGAGGCAGGCCCGGACTGGACGAGGGGCTAGCAGGGTGTGGTAG GCACCTTGGCCCCCAACCCGGCAGGAACCAGAGACCTGGGGCTGAGA G</p>

10

20

30

【化6】

TGAGCCTCCAAACAGGATGCCCAACCTTCAGGCCACCTTCAATCCAGC
TACTCTCCACCTGCCATTCTCCTCTGGGCACAGGGCCAGCCCTGGATC
TTGGCCTTGGCTCGACTTGCACCCACGCGCACACACACTTCTAACGT
GCTGTCCGCTCACCCCTCCCCAGCGTGGTCCATGGGCAGCACGGCAGTGC
GGCTCCGGCGGTAGTGAGTGACAGAGGTCCTTCCCCTCCCCAGGAGCCC
CAGGGGTGTGTGCAGATCTGGGGCTCCTGTCCCTTACACCTTCATGCCC
CTCCCCTCATAACCACCTCCAGGCGGGAGGCAGCGAGACCTTTGCCAG
GGACTCAGCCAACGGGCACACGGGAGGCCAGCCCTCAGCAGCTGGCTCCC
AAAGAGGAGGTGGGAGGTAGGTCCACAGCTGCCACAGAGAGAAAACCTG
ACGGACCCACAGGGGCCACGCCAGCCGGAACCAGCTCCCTCGTGGGTGA
GCAATGGCCAGGGCCCCGCCGCCACACGGCTGGCCTTGCGCCAGCTGA
G
AACTCAGTCCAGTGCAGGGAGACTCAAGACAGCCTGTGCACACAGCCTC
GGATCTGTCTCCATTCAAGCAGAAAAGGAAACCGTGCAGGCAGCCCTC
AGCATTCAAGGATTGTAGCAGCGGCCAACTATTCGTCCGCAAGTGGCCGA
TTAGAATGACCGTGGAGAAGGGCGGAAGGGTCTCTCGTGGGCTCTGCGGC
CAACAGGCCCTGGCTCCACTGCCCGCTGCCAGCCCGAGGGGCTTGGGCC
GAGCCAGGAACCACAGTGTCAACGGGACCACAGTACTGACCAAACCTC
CGGCCAGAGCAGCCCAAGGCCAGCCGGGCTCTCGCCTGGAGGACTCACC
ATCAGATGCACAAGGGGGCGAGTGTGGAAGAGACGTGTGCCCGGGCCA
T
TTGGGAAGGCGAAGGGACCTTCCAGGTGGACAGGAGGTGGGACGCACTC
C
AGGCAAGGGACTGGGTCCCCAAGGCCTGGGGAAGGGGTACTGGCTGGG
G
GTTAGCCTGGCCAGGGAACGGGGAGCGGGGGCGGGGGCTGAGCAGGGAG
G
ACCTGACCTCGTGGGAGCGAGGCAAGTCAGGCTTCAGGCAGCAGCCGCAC
ATCCAGACCAGGAGGCTGAGGCAGGAGGGGCTTGCAGCGGGCGGGGG
C
CTGCCTGGCTCCGGGGGCTCCTGGGGGACGCTGGCTCTTGTTCCGTGT
CCGCAGCACAGGGCCAGCTCGCTGGGCCTATGCTTACCTTGAATGCTGGG
GCCGGGGCGTCAGGTCGTCTCCTCAGGGGAGAGTCCCCTGAGGCTA
CGCTGGGG*GGGACTATGGCAGCTCCACCAGGGGCTGGGGACCAGGG
G
CCTGGACCAGGCTGCAGCCCGGAGGACGGGCAGGGCTCTGGCTCTCCAGC
ATCTGGCCCTCGGAAATGGCAGAACCCCTGGCGGTGAGCGAGCTGAGA
G
CGGGTCAGACAGACAGGGGCCCGCCGAAAGGAGAAGTTGGGGCAGAG
C
CCGCCAGGGGCCAGGCCAAGGTTCTGTGTGCCAGGGCCTGGGTGGGCAC
ATTGGTGTGGCCATGGCTACTTAGATTTCGTGGGGCCAGGGCATCCTGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTGAGCCTGGTGTCTGATGTCCAGCTAGGCGCTGGTG
GGCCGCGGGTGGCCTGTCTCAGGCTAGGGCAGGGGCTGGGATGTGTATT
TGTC AAGGAGGGGCAACAGGGTGCAGACTGTGCCCTGGAAACTTGACCA
CTGGGGCAGGGGCGTCTGGTACGCTCTCCTCAGGTAAGACGGCCCTGTG
CCCCTCTCTCGCGGACTGGAAAAGGAATTTCCAAGATTCCTTGGTCTG
TGTGGGGCCCTCTGGGGCCCCGGGGTGGCTCCCCTCCTGCCAGATGG
GGCCTCGGCCTGTGGAGCACGGGCTGGGCACACAGCTCGAGTCTAGGGCC
ACAGAGGCCCGGGCTCAGGGCTCTGTGTGGCCCGGCGACTGGCAGGGGG
C
TCGGTTTTTGGACACCCCTAATGGGGGCCACAGCACTGTGACCATCTT
CACAGCTGGGGCCGAGGAGTCGAGGTACCGTCTCCTCAGGTGAGTCCTC
GTCAGCCCTCTCTACTCTCTGGGGGTTTTGTGTCATTTGTGGGGGAA
AGAGGATGCCTGGTCTCAGGTCTAAAGGTCTAGGGCCAGCGCCGGGGCC
CAGGAAGGGGCCGAGGGGCCAGGCTCGGCTCGGCCAGGAGCAGAGCTTC

10

20

30

【0106】

【化7】

C
AGACATCTCGCCTCCTGGCGGCTGCAGTCAGGCCCTTTGGCCGGGGGGTCTC
TCAGCACCAACCAGGCCTCTTGGCTCCCGAGGTCGCCCGGCCCGGCTGCCT
CACCAGGCACCGTGC CGCGTGGGCCCGGCTCTTGGTCCGCCACCCTTC
TTAACTGGGATCCGGGCTTAGTTGTGCAATGTGACAACGGGCTCGAAAG
CTGGGGCCAGGGGACCCTAGT*TACGACGCCTCGGGTGGGTGTCCCGCAC
CCCTCCCCACTTTCACGGCACTCGGCGAGACCTGGGGAGTCAGGTGTTGG
GGACACTTTGGAGGTCAGGAACGGGAGCTGGGGAGAGGGCTCTGTCAGC
G
GGGTCCAGAGATGGGCCGCCCTCCAAGGACGCCCTGCGCGGGGACAAGG
G
CTTCTTGGCCTGGCCTGGCCGCTTCACTTGGGCGTCAGGGGGGGCTTCCC
GGGCGAGGCGGTGAGTCGAGGCGGGTGAATCTGAGTCTGGGTTCCGGG
GTTCCGGGTTCCGGCTTTCATGAACAGACAGCCAGGCGGGCCGTTGTTG
GCCCTGGGGCCCTGGTTGGAATGCGAGGTCTCGGGAAGTCAGGAGGGA
G
CCTGGCCAGCAGAGGGTTCAGCCCTGCGGCCGAGGGACCTGGAGACG
G
GCAGGGCATTGGCCGTCGCAGGGCCAGGCCACACCCCCAGGTTTTTTGTG
GGGCGAGCCTGGAGATTGCACCACTGTGATTAATGCTATGGATCTCTG
GGGCCAGGCGTTGAAGTCGTCTGTCTCAGGTAAGAACGGCCCTCCAG
GGCCTTTAATTTCTGCTCTGTCTGTGGGCTTTTCTGACTCTGATCCTCG
GGAGGCGTCTGTGCCCGCCCGGGGATGAGGCCGGCTTCCAGGAGGGGT
CAGGGACCAGGAGCCTGTGGGAAGTCTGACGGGGGCTGCAGGCGGGAA
G
GGCCCCACCGGGGGGCGAGCCCCAGGCCGCTGGGCGGCAGGAGACCCGT
G
AGAGTGCGCCTTGAGGAGGGTGTCTGCGGAACCACGAACGCCCGCCGGG
A
AGGGCTTGTGCAATGCGGCTTTCAGACGGGAGGCGTCTTCTGCCCTCAC
CGTCTTTCAAGCCCTTGTGGGTCTGAAAGAGCCATGTCGGAGAGAGAAGG
GACAGGCCCTGTCCCGACCTGGCCGAGAGCGGGCAGCCCCGGGGAGAG
G
GGGCGATCGGCCTGGGCTCTGTGAGGCCAGGTCCAAGGGAGGACGTGTG
G
TCCTCGTGACAGGTGCACTTTCGAAAACCTTAGAAGACGGGGTATGTTGGA
AGCGGCTCCTGATGTTAAGAAAAGGGAGACTGTAAAGTGAGCAGAGTCC
TCAAGTGTGTTAAGGTTTAAAGGTCAAAGTGTTTTAAACCTTTGTGACT
GCAGTTAGCAAGCGTTCGGGGAGTGAATGGGGTGCCAGGGTGGCCGAGA
G
GCAGTACGAGGGCCGTGCCGCTCTAATTCAGGGCTTAGTTTTGCAGAA
TAAAGTCGGCCTGTTTTCTAAAAGCATTGGTGGTCTGAGCTGGTGGAGG
AGGCCGCGGCAGCCCTGGCCACCTGCAGCAGGTGCCAGGAAGCAGGTC
G
GCCAAGAGGCTATTTTAGGAAGCCAGAAAACCGGTCGATGAATTTATAG
CTTCTGGTTCCAGGAGGTGGTTGGGCATGGCTTTGCGCAGCGCCACAGA
ACCGAAAAGTGGCCACTGAGAAAAACAACCTCCTGCTTAATTTGCATTTT
CTAAAAGAAGAAACAGAGGCTGACGGAACTGGAAAGTTCCTGTTTAAAC
TACTCGAATTGAGTTTTCCGGTCTTAGCTTATCAACTGCTCACTTAGATT
ATTTTCAAAGTAAACGTTTAAAGAGCCGAGGCATTCTATCCTCTTCTAAG
GCGTTATTCTGGAGGCTCAITCACCGCCAGCACCTCCGCTGCCTGCAGG
CATTGCTGTACCGTACCGTGACGGCGCGCACGATTTTCAGTTGGCCCG
CTTCCCTCGTGATTAGGACAGACGCGGGCACTCTGGCCAGCCGCTCTG
GCTCAGTATCTGCAGGCGTCCGTCTCGGGACGGAGCTCAGGGGAAGAGCG
TGACTCCAGTTGAACGTGATAGTCGGTGCCTTGGAGGAGACCCAGTCGG
GTGTCGAGTCAAGAGGGGCCCGGGGCCGAGGCCCTGGGCAGGACGGCC

10

20

30

【0107】

【化 8】

C
 GTGCCCTGCATCACGGGCCACGCGTCCCTAGAGGCAGGACTCTGGTGGAGA
 GTGTGAGGGTGCCTGGGGCCCTCCGGAGCTGGGGCCGTGCGGTGCAGGT
 TGGGCTCTCGGCGCGGTGTTGGCTGTTTCTGCGGGATTGGAGGAATTCT
 TCCAGTGATGGGAGTCGCCAGTGACCGGGCACCAGGCTGGTAAGAGGGA
 G
 GCCGCCGTGCTGGCCAGAGCAGCTGGGAGGGTTCCGTTAAAAGGCTCGCCC
 GTTTCCTTTAATGAGGACTTTTCTGGAGGGCATTAGTCTAGTCGGGAC
 CGTTTTGACTCGGGAAGAGGGATGCGGAGGAGGGCATGTGCCAAGGAG
 C
 CGAAGGCGCCGCGGGGAGAAGCCCAGGGCTCTCCTGTCCCCACAGAGGC
 G
 ACGCCACTGCCGACAGACAGAGGGCCTTCCCTCTGATGACGGCAAAGG
 CGCCTCGGCTCTTGCGGGGTGCTGGGGGGGAGTCGCCCGAAGCCGCTCA
 CCCAGAGGCTGAGGGGTGAGACTGACCGATGCCTCTTGCCCGGGCCTGG
 GGCCGGACCGAGGGGGACTCCGTGAGGCAGGGCGATGGTGGCTGCGGG
 A
 GGGAAACCGACCCTGGGCCGAGCCCGGCTTGGCGATTCCCGGGCGAGGGCC
 CTCAGCCGAGGCGAGTGGGTCCGGCGGAACCACCTTTCTGGCCAGCGCC
 ACAGGGCTCTCGGGACTGTCCGGGGCGACGCTGGGCTGCCCGTGGCAGGC
 CTGGGCTGACCTGGACTTACCAGACAGAACAGGGCTTTACAGGGCTGAGC
 TGAGCCAGGTTTAGCGAGGCCAAGTGGGGCTGAACCAGGCTCAACTGGCC
 TGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGACCTGGGCTGAGCTGAGCTGGGCTGGGC
 TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGACTGGCTGAGCTGAGCTGGGTT
 GAGCTGAGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCT
 GGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGATCTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCT
 GAGCTAGGCTGGGGTGGGCTGGGCTGAGCTGGTTTGGGTTGGGTTGAGCT
 GAGCTGAGCTGGGCTGTGCTGGCTGAGCTAGGCTGAGCTAGGCTAGGTTG
 AGCTGGGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGCTGATTGGGCTGAGCTG
 AGCTGAGCTAGGCTGCGTTGAGCTGGGCTGGGCTGGATTGAGCTGGCTGAG
 CTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGACTGGTT
 TGAGCTGGGTCGATCTGGGTTGAGCTGTCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTT
 TGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTCAGCAGAGCTGGGTTGGGCTGAGC
 TGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGC
 TGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGTGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGGGC
 TGAGCTGGATTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGGGCTGTGCTGACT
 GAGCTGGGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGATCCGAGCT
 AGGCTGGGCTGGTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGATTGATCT
 GGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGTCTGAGCTGGCCTG
 GGTCGAGCTGAGCTGGACTGGTTGAGCTGGGTCGATCTGGGCTGAGCTG
 GCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTG
 AGCTGAGGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAACTAGCCTAGCTAGGTTGGGCT
 GAGCTGGGCTGGTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCA
 GGCTGAGCTGGGCTGAGCAGGCTGGGTTGAGCTGGGCTAGGTTGGAGCT
 G
 AGCTGGGTCGAGCTGAGTTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGGTAGGCTG
 AGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGCTGGGCTGGTTGCGCTGG
 GTCAGCTGGGCCGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTCGGTTGAGCTGG
 GCTGAGCTGAGCCGACCTAGGCTGGGATGAGCTGGGCTGATTGGGCTGA
 GCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGGAGCCT
 GGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGCGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCT
 GGCTGGGCTGGTTTGGCTGGGTTCAAGCTGGGCCGAGCTGGCCTGGGATG
 AGCTGGGCCGGTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAG
 GCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTAGGCTGA
 GCTGGGCTGGTTGGGCTGAGCTGGCTGAGCTGGGCTCCTGCTGAGCTGG
 CTGAGCTGACCAGGGTTGAGCTGGGCTGAGTTAGGCTGGGCTCAGTAGG

10

20

30

【 0 1 0 8 】

【化 9】

```

CTGGGTTGATCTGGCAGGGCTGGTTTGGCGCTGGGTCAGCTCCCGGAGAG
TGGCTGGGATGAGCTGGGCTGGTTTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGC
TAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGGTGAGCT
GGGCTGGGTGGAGCTGAGCTGGGCTGAACTGGGCTAAGCTGGCTGAGCTG
GATCGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGGTTAGCTGGGCTGAGCTG
AGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGCTGGGCTGGTTTGGCGCTGGGTCAA
GCTGGGCCGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGAGCTGAGCTAG
GCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCTGG
CTGGGATGGATTGAGCTGGCTGAGCTGGCTGAGCTGGCTGAGCTGGGCTG
AGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTG
GGCTCAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTG
GGCTGAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTCGAGCA
GAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTCAGCAGAGCTGGGTT
GAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTAGCTGGGCTCAGCTAGGCTG
GGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAACTGGGCTG
AGCTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGAGCTGGGCTGAGCAGAGCTGGGTT
G
GTCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGAGTTGGGTTG
AGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGTTG
AGTTGGGCTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCAGGAGCTGGGCTGAACTGGGCTG
AGCTGGGCTGAGCGAACTGGGTTGATCTGAATTGAGCTGGGCTGAGCCG
GGCTGAGCCGGGCTGAGCTGGGCTAGGTTGAGCTTGGGTTGAGCTTGCCTC
AGCTGGTCTGAGCTAGGTTGGGTTGAGCTAGGCTGGATTGAGCTGGGCTG
AGCTGAGCTGATCTGGCCTCAGCTGGGCTGAGGTTAGGCTGAACTGGGCTG
TGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCCAGTTTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTG
AGCTGGGCTGTGTTGATCTTCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTG
GCCTAGCTGGATTGAACCGGGGTAAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTG
GCTGAGCTAGGCTGAGCTGAGTTGAATTGGGTTAAGCTGGGCTGAGATGG
GCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCCAGGTCGACTGGGTTACCCTGG
GCCACACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGCGATTAACTGGTCAGGCTGAG
TCGGGTCAGCAGACATGCGCTGGCCAGGCTGGCTTACCTGGACACGTT
CGATGAGCTGCCTTGGGATGGTTACCTCAGCTGAGCCAGGTTGGCTCCAG
CTGGGCTGAGCTGGTGACCCTGGGTTGACCTCGGTGACCAGGTTGTCTGA
GTCCGGGCCAAGCCGAGGCTGCATCAGACTCGCCAGACCCAAAGGCTGGG
CCCGGCTGGCAAGCCAGGGCGGTTAAGGCTGGGCTGGCAGGACTGTC
CCGGAAGGAGGTGCACGTGGAGCCGCCGACCCGACCCGACCCGACGAGCT
GGAAAGACGCTCTCACTCCCTTCTCTTCTGTCCCTCTGGGTTCTCA
GAGAGCCAGTCTGCCCCGAATCTTACCCCTCGTCTCTGCGTCAGCC
CCGTCCGATGAGAGCTGGTGGCCCTGGGCTGCTGGCCCGGACTTCT
GCCAGCTCCGTACCTTCTCTGGAA

```

10

20

(ブタ 軽鎖)

別の実施形態では、有蹄動物免疫グロブリンの 軽鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。本発明は、有蹄動物 軽鎖領域の第 1 の報告されたゲノム配列を提供する。1つの実施形態では、ブタ 軽鎖遺伝子座をコードする核酸配列を提供する。別の実施形態では、核酸配列は、 軽鎖の少なくとも1つの連結領域、1つの定常領域、および/または1つのエンハンサー領域を含み得る。さらなる実施形態では、ヌクレオチド配列は、例えば、配列番号30に示す、少なくとも5つの連結領域、1つの定常領域、および1つのエンハンサー領域を含み得る。さらなる実施形態では、例えば、配列番号12に示す、ブタゲノム 軽鎖の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは5つの連結領域および連結領域に対する3'隣接領域を含む単離ヌクレオチド配列を提供する。別の実施形態では、例えば、配列番号25に示す、第1の連結領域の5'隣接配列を含むブタゲノム 軽鎖の単離ヌクレオチド配列を提供する。さらなる実施形態では、例えば、配列番号15、16、および/または19に示す、ブタゲノム 軽鎖の定常領域の3'隣接配列および任意選択的にエンハンサー配列の5'部分を含む単離ヌクレオチド配列を提供する。

30

40

【0109】

さらなる実施形態では、配列番号30、12、25、15、16、または19に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号30、12、25、15、16、または19と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号30、12、25、15、16、または19の少なくとも10、15、17、20、25、または30個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。さらに、配列番号1、4、または29の少なくとも10、15、17、20、25、または30個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。他の実施形態では、配列番号30の少なくとも50、100、1,000、2,500、5,000、7,000、8,000、8,500、9,000、10,000、または15,

50

000個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号30、12、25、15、16、または19とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

【0110】

1つの実施形態では、例えば、配列番号30に示す、少なくとも5つの連結領域、1つの定常領域、および1つのエンハンサー領域を含む、軽鎖をコードする単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号30では、軽鎖のコード領域を、例えば、残基1~549および10026~10549に示すのに対して、イントロン配列を、例えば、残基550~10025に示し、軽鎖の連結領域を、例えば、残基5822~7207(例えば、J1:5822~5859、J2:6180~6218、J3:6486~6523、J4:6826~6863、J5:7170~7207)に示し、定常領域を、以下の残基に示す:10026~10549(Cエクソン)および10026~10354(Cコード)、10524~10529(ポリ(A)シグナル)、および11160~11264(SINEエレメント)。

10

20

30

40

【0111】

【化10】

配列番号30	<p>GCCTCCGAAGTCAAAAAATATCTGCAGCCTTCATGTATTTCATAGAAACAAG GAATGTCTACATTTTCCAAAGTGGGACCAGAATCTTGGGTCATGTCTAAG GCATGTGCATTTGCACATGGTAGGCAAAGGACTTTGCTTCTCCAGCACA TCITTTCTGCAGAGATCCATGGAAACAAGACTCAACTCCAAAGCAGCAAAAG AAGCAGCAAAGTTCTCAAGTGATCTCCTCTGACTCCCTCCCTCCAGGCTAA TGAAGCCATGTTGCCCTGGGGGATTAAGGGCAGGTGTCCATTGTGGCAC CCAGCCCGAAGACAAGCAATTTGATCAGGTTCTGAGCACTCCTGAATGTG GACTCTGGAATTTTCTCTCACCTTGTTGGCATATCAGCTTAAAGTCAAGTA CAAGTGACAAACAACATAATCTTAAGAAGAGAGGAATCAAGCTGAAGTC A AAGGATCACTGCCTTGGATTCTACTGTGAATGATGACCTGGAAAAATATCC TGAACAACAGCTTCAGGGTGATCATCAGAGACAAAAGTTCCAGAGCCAGg tagggaaacctcaagccttgcaagagcaaaatcagcattgggttct taactgctgagtgattactatattgactgtggaggcaaaagcctca aatagcctgggtaagtattgcaataaaagcaaaagtggtttctgta aatgtagacctgaggaaggaattgataactaccaataatttcaga atgattatagatgacacattgctcagctctccacccgcacctgac aagcagtttagaatttattcaagaattcagggttgctggggctacatg ggaatcagctcagtgaaaggtttggaatgattcaaaatttcta ttccagcataaatccaagaacctcagactagttattgacactgctt ttcttcataatccatctcctcctccatcaggacattgtagaat gacaggtcctggcagagactcacagatcctctgaaacatccttgcctt caagaatgaacagcacacataactaaggatctcagtgatcccaaatag ttttgccaatggttcttatgataaaagctttcattaacagcaaat gittataatggttctgcttataataaattgatgcttcttctt ttcttt tatgaaattcccaggetagggtcaaatcagaactacacctactggcct acggccagaccagcaactcaggtatcagccatgctgggactacac tacagctcatggcaatgccaatccttaaccatgagcagggcagggga tcgaacctatgctcctcatgatactagtcaggctcattatccgctgagcc ataacaggaactcccaggttctttatcaaaatggtagccctat gtttctgaaaaccacaaaatgaatgattcacataattttaaaggta aataatttagatatacaagacaatgaaagagaaaaagctcattgctct ttctccagcacaacacgctccttaattgattgaaagaataactactg agcattggttagtgaactcttcagcaatgagcttattcatagccat acataattcaattaaatgagatcatgatacacacaatacacaacataca gcctatagggttttacaatcattccacatgactacataaaaacctc cctaaaaaataaaacctcctcctcctccttattgctgctttgtgc tccatfaaaaagctctatcattatgggttagatgaggaatttcattt ctaccttcaagcaactttcaatgacagctctatatacacattgagc ctactttctttcttttttttttttttttttttttttttttttttttt ggctttttgtcttttaaggctgcatatggaggttccaggctagctg tctaatacagaactatagctgctgctcctacccaatccacagcaatacaa gatctgagccatgctgcaactacaccacagctcaccgcaacgggtgat cctaaaccactgagcaaggccaaggatcaaacccataacttcaggtct ctagttgatttgaaccactgagccatgaggtcaactctgagccatc tttttaacttcaaccctaggacactttttaagtttcaattttct ccccccacctctttttgaagtggtttgcttccactgggtgacttc actccagatctcactctgaggatactgcagctaaigtatgagctctg aattgaaatcccaactctgcaactcaaggagtaggatttccgatgtgg cccaatgggactagtggaactctgagctcaggtccagagcaggttccatcc ctggccacagcagtggttaagaatctggcattgctcagctgagggcat agatttcaattgtcctcagatctgactctggcccaaggactgcatatg cctcagggcaaccacaaaaagagaaaaaggggtgtagcattggttcta gatttgggggataaataaagtgatccatgtacaatgatggcattt tgtaaatgctcaacaatttcaactattatggagttccatcatggtctca</p>
---------------	--

50

【 0 1 1 2 】

【 化 1 1 】

gtggaagggaatctgattagcatcatgaggacacaggtccaacccggac
cttgcctcagtgggcattgctgtgagctgtggcatgggttacagacgaaac
tcggatctggcattgctgtgctgtggtgtaagccagcaactacagctct
cattcagcccctagcctgggaacctccatagcctaaagcaaaaaata
aaattlaaataaaaaaaagaaatgtaactattatgatgtgactgct
tgcattactgcaaaagaaatcactttctataactcttaatactttagttg
actgtgtgctcagtgaaacttttggacactaattccactctctctta
tctcaactgtgacaactctctctctctctgtggtagatccactgctg
actttgctcttaaggcaactagaaaagtgctcagtgacaaaacaaaga
aagttaccttaacttcagaaatacaacttaagttctctgtaaagctt
actattcagtggttagtattatctctgtgctccttaacaactatcagct
ctgatctattgctgatttcaactattatgttgaggtttttctctt
ttccctgttcaactgtgcaaatgttctgagcattgtcaagtgaagata
ctggactgggcttccaataatagacaatgaacatcgggagttctcat
tatgtgtcagcagaacgaatccaactaggaatgtgaggttcagggttc
gatccctgcccctgctcagtggttaaggatccagcattaccgtgagctg
tgggtatggttgcagacgtggctcagatccctgctgtgtgctgtggc
ataggctgtgcaactctgctgtgattcgaaccctagcctgggaacctcca
tgcgcccgagtgagcccttaaaaaaagcaaaaaaaagaagaagaaga
aagacaatgaacatacaacagcctaacatccagtaggtaagaagaatc
tggcaacagataagagcgattaaatgttctaggtccagtgacctgctc
tgtgctctacacagctgtgcccactgtgagggaagaagttctctctgag
ttgagctctgaaagacattagtttcaacaactaatgccagtgaatgaa
gggtttccaagcagagggaagtttgaanaagctggaatcagagaa
agactctaaagatttaggtgtgtgggcaacatacctgagatggggc
tggaaaggtaagagggaacaactataglaagfagaagctggactcacagc
aaagtgaagacctcagcatctgtatgggttaccatggaacaccaagg
cacacctgtattccaacacagcaggcactgtattcaccatgtgaca
tgggtggtaacctctagctctacctgttctgacaactgacaaccaac
gaagttaaagctggattttctactctgctgactctgttttttttca
cgtcatctatagcttcatgccaataatagttcaagtaagacggggcc
ttggtttatatactgtatctatctgtttgagacaataggtggcaa
ggaaagggttcaaacaggaaaactctctctaatatgattactgagaaa
agctaaagatgccatnatgacactgaatgaattcatattgcaaaag
cttccccccccaggagactataaaaaagtcatttttaaatgaa
ctatttcaaaaacagaaatagactcacagacataggaacgaacagatg
gttaccaaagggtgaaaggagtaggagggataaataaggatctgggtt
agcagatacaccccagtgatcaaaaataaacacagggacctactat
agcacagggaactatagcagtagcttaataaactlaaattggaaga
atgtgaaaaaagaatatagtatgctgtgtgtgtaactgaatcacttgc
tgaacctgaatcaacataacattgtaaatcaactacagttttttt
tttaagtgacagggtttgtgttttttttctattttgtttt
ttgtttttgtttttgggccacaccagacataggggttccagg
ctagggtctlaattagagctacagttgcccgttgcaccacagccacagc
aacatcagatccgagccgacttgcgacttacaccacagctcatggcaat
accagatccttaaccactgagcaaggccaggatctaccgcaacct
catgttctagtcagatcattctgctgctcaaatgggaactccaa
gtgcagtttttgtaattgtcttcttcttcttaaticatattcacc
tacttccaataaataaataacataaataaataacataccattgtaa
atcaactcaaatmttaaatgcaagggtttttgtttttttgt
ttgtcttttgcctttctagggccctccatggcatatggagggtcc
caggctaggggctgaatcggagcttagccaccggctaccgcaagcca
cagcaacccgggatccgagccgctctgcaacctacaccagctcacgg
caacgccgatcgttaaccactgagcaagggaaggatcgaacctgcaa
ctcatgttcttagtcagattcgttaactactgagccacaacggaaact
cctaaagtgcagttttaaatgtgctgtcttcttttgaatttaccac

10

20

30

【 0 1 1 3 】

【化 1 2】

```

aacctactccccataaataaataaataaataaataatcatagacatgg
ltgaattctaaagggaaggaccatcaggcccttagacagaaatcgtcatc
tctagtatttaaacacacacataaagaagacaacatgctctccagaga
agcccaggccctccacagctgcttcaaggaggtaggctcagtagct
gacccaaggctctgtctctctcagggaaaagggtttgtcagtgaga
cagcagacagctgctactgtgGTGGACGTTTCGGCCAAGGAACCAAGCTGG
AACTCAAACgttaagtaaatcaaacgttctctctgctgtctgtct
tacggctctgtggctcgaatgattcgtgctgactctctgaacca
gactgacatctccaggcacaactaaagcctgtcatcaactggaaac
tgagggcacatttctgggcagaactagagtcaggcactgggtgaggaa
aaactgttagaatgatgtttcagaacactactgggaagcaagcccat
gtctgaacagagctctgtcaaggctcaggagggaaccagttttgta
caggagggaagtgagacgaacccctgtTATATGTTTCGGCGCGGGGA
CCAAGCTGGAGCTCAAACgttaagtggttttccgactgaticttgtctg
tttctaattgtgtggcttttctcaatttcaagtittcactgaa
ttagtgtcaggaccaaacaactcctccagattaggtaccagggga
ggggacattgctcagtgaggagacagagggtgctaatttcaacgtttc
caagccaaaataactgggaagggggctgtctgtctgtgaggtaggtt
ttatagaagtggaaagtaagggaacactgtatgTTCACTTTTGGCTC
GGGGACCAAAGTGGAGCCCAAAAttgatcattttcatcaattattg
tgagattttctctgtgtctcattgtgcaagttttgacatttgggt
tgaatgagccactccaggaccacaaggatgagaccgaaaagttagaaa
agagccaacttttaagctgagcagacagaccgaattgttgagtttgag
gagagtaggggtttgtagggagaaaagggaacagatcgctgcttttctc
tgaattagccttctcaaggactggctcagagggggttttgatgag
gaagtgtctagagccttaactgtGGTTGTGTTTCGGTAGCGGGACCAAG
CTGGAAATCAAACgttaagtcacttttctactcttttctttatatac
gggtgtgaaattggggactttcattgtttgagtagatgagtgctcgt
tctgaagagagtgaggactcacaataatcaggagtagggctcagaac
agagttgtctcaggaagaacaagacctagttagtgatgagcagcta
aatgagtcagtgactgggaiccaaattggccagctcgtctgaacca
acaactcaatgagatgtagcagcaaaaagagattccattgaggggaaag
taaatgitaattgtGATCACCTTTGGTGAAGGGACATCCGTGGAG
ATTGAACgttaagtttttctactactctcagaattgtcctaagt
ccagtttgacttttagaggcctaagtgtcagtttgaaaaatgggtgta
aacaagagcatttcataatttattatcagtttcaaaagttaaacacgctc
caaaaatgaaattgtagacaaaagattaattagccaaaatgaaatgat
tcaagggaaaaaaaatagtgatgataaaaaggaaattctcagctcc
aaaagcaaaaagcaattaatttcttgaactttgcaaatcttgtaaa
tgattttgtcttacaatttaaaaggtagaagaatgtattcttag
tctgtttctctctgtctgataaattatataagataaaaaatgaa
aattaatagatgctcaaaaactcagtaagaagtttagaaaataatgt
ttaigttaaagttgccacitaaatgagaatcagaagcaatgttatttta
aagctlaaaatgagagataaacgtcaacttaaatctcagagattc
tatacttgacagatactcttttcaaaaatccaattctatgtaga
ctaaattgaaatgatcttctcataatggaggaaaagatggactgacc
ccaaaagctcagattaaagaaaactgttaagtgaagaaaataaaaga
actgcatttttaaggccccatgaaattgagaaaataggaaatattt
aataagtgattcttttattctctgttattactgtatgggttttata
ccgccaaggaggccgiggcaccgtcagtgatctgtagacccatggcg
gctttttcggattgaatgacttggcgggtgggtccccagggtctgg
tggcagcgcaccagccgctaaaagccgtaaaaactgcccctaaggcca
cagcaacecccgaccgcccgttcaactgtctgacacagtatacagat
aatgtcttaacagaggagaatagaatatgacgggcacacgctaagtgtg
gggaaaaagggaagccgtatttttttagagattctagagata
aaattcccagtattatcttttaataaaaatttctattaggagatta

```

10

20

30

【 0 1 1 4】

【化 1 3】

```

taaagaatttaagcattttttaagtgggtgtaattcttcagtagt
ctctgtcaaatggatttaagtaataagagcttaatccaaatgagagaaa
tagacgcataacccttcaaggcmaaagctacaagcacaanaatgaaaca
cagcagccagccatctagccactcagattttgatcagttttactgagttt
gaagttaataatcatgaaggataaattgctgataaaaaataagatacagg
fgtgacacatcttaagttcagaatttaattggctcagtaggattata
ttcacgtatacaaatctlaagcagataaaaaatgccattaatggaaac
ttaatagaataatattttaaatctctcattctgfcagagaaatttct
aatctgggtcttlaatacctacccttgaagagtttagtaatttct
attgccatcgtgttactccagcctaattcaaaagtgaacttgagaa
agattatttgggttgaaccacctggcaggactatttagggccattt
taaaactctttcaactaagtattttaactgttctaaaccatttaggg
ccttttaaaatctttcatgaattcaaaactcgttaaagttataag
gtctgtgcaagaactccttaataatgtcataatttaactgtta
atgcaggataaaaaaagtgatcaagcctgacccaacagggagat
cttcatagcataattcccctctttttctagaatcatatgatttgc
tgccaggctatttataaactctggaaaaaaatagtaatgaaggtt
aaaaggaagaaaatacagaacattagaattcggatfttactaactg
cttgtaacatgaagggtttatttttaaggtttctatttataaa
aatctgtccctttctgctgatttccaagcaaaagattctgattg
tttttaactcttactctccaccaaggccctgaatgcccaaaagggg
acttccaggagccatctggcagctgctcacctcagaaagtgaagccagc
cagttccctctggcagggtggccaaatcacagtggacccctctgctct
ggctgaaccctgcccataatggtgacagccatctggccaggccaggctc
tccctgaaagccttgggagagaggagagtgctggcccgatcacag
atcggaaggggctgactctcaaccggggtgcagactctcaggggtgg
ctggcccaacacacccaaaagcagcccaaggaaggaagcagcttgggt
atcactgcccagactagggagggcaccggaaaatgatctgccaagac
cgttctgtcttaactccgaggggtcagatgaaggttttcttctt
ttggcctgaagcactgttccctcagaagcggggaacacagaggaag
gagagaaaatgatgaacaagcatgcaaggaaaaaaagcccttagg
atggctgcaaggaagtttagttctctcattggctccttactgctctcg
atgcccaacaacaacgaccagctggagaactccctgttacttaaca
ccattctctgtgttctctcagGGGCTGATGCCAAGCCATCCGTCTT
CATCTTCCC GCCATCGAAGGAGCAGTTAGCGACCCCAACTGTCTCTGTGG
TGTGCTTGATCAATAACTTCTTCCCCAGAGAAATCAGTGTCAAGTGGAAA
GTGGATGGGGTGGTCCAAAGCAGTGGTCCATCCGGATAGTGTACAGAGCA
GGACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCTCTCGCTGCCA
CGTACAGTACCTAAGTCATAATTTATATTCCTGTGAGGTCACCCACAAG
ACCTGGCCCTCCCCTCTGGTCAACAAGCTTCAACAGGAACGAGTGTGAGGC
TtagAGGCCCAAGGCCCTGGCCCTGCCCCAGCCCCAGCCCCCTCCCC
ACCTCAAGCCCTCAGGCCCTTGGCCCCAGAGGATCCCTTGGCAATCCCCCAGC
CCCTCTCCCTCCTCATCCCTCCCTCTTTGGCTTAACCGTGTAAAT
ACTGGGGGGTGGGGGAATGAATAaataaGTGAACCTTTCACCTGTGAT
ttctctctctctgatttaaggttgtaaatgtgttttcccatta
tagttaacttttaaggaaactacactgagttgctaaaaactacacct
cacttataaaatcagccctctcagttctcccctcccctctctctcc
gtaagacagccctcgtgaaacccataagcacttctttacaccctctc
ctggccggggtgagagactttttgatctccctctcagcaagccctag
aaccatttggaggggacagttcttacagtcacat*tcctgtgatcaat
gactttgtaacgaaaagccaagtctcaaaaaaggggaacggctaga
aaccagtcatagaatataatataaataataataataatccatataat
glaaaatacaaaaataatgataacagcagtaggtcaacaggaacagggaa
fgttgaagtcacttggcactcaatttaagggaataggatgcttcat
tacttttaatacaatacacatggagagcttctctctgccaagacca
ctctgaatgcttccactcactcaaggttaaaagcattcattacaat

```

10

20

30

【 0 1 1 5】

【化 1 4】

	<p>gttgatcggagggttccggttggtcctcagcaggtaagaacgtgactgg tatccaggaggatgcgggttgggtccagcctcctcagtggttaagg atccagtggtctgcaagatcacgggctcagatcccgttctatggcta tgggttaggctggtagctgcatgcagccctaattgaccctagcctggg aactgccatagccacatgtagggccctaaacctaaagaaaaaa gaaaagaaatctttacaccaattatagataagagaagctaagggtg gcaggccaggatcaaaagccctacctgctcttgacacctgatacaaa tctgctcttaggggttccaactgcatagaacagagggtcaaacatg ctaccctccagggaactcctccctcaaatgacataaattttggtccca tctctggggcacaactcaacaatcaatggcctctctagtaaccaagcaag gcctctctatgaagcaaacctcgaagccagatcctatgacccaagg aagtaaaagacagggttactggtgaactgatacctcaatcaaatg tcaattccaactcccagtcctccgtaaatcaacccttggggaagaga gtccttgagatgtagccacgttaaaaagattatagaaaaggctagt gaggatgcagtaaacggatctttcatacattgctggggaatgtaaa atgctgcaggcacttagaaaataattgcccagttttgaaaaagctaaa caaaatagtttagtctcgggttaattatccccagaattaaaa ttatgtccgcacaaaacgtgtacataatcattacacagcctgtac</p>			10
--	--	--	--	----

配列番号 1 2	<p>caaggaaaccaagctggaactcaacgtaagtaacccaacgttccctcc ttggctgctgcttacggctctgtggctcgaatgattcatgtgc tgactctctgaaaccaactgacatctccaggcacaactaaagcctgt catcaaacctgaaaactgaggccacatcttctggcgaactaagagta ggcactgggtgaggaaaactgttagaagatgattcagaactact gggaagcaagcccattgtctgaacagactctcctcaagggtcaggagg ggaaccagttttgtacaggagggaagttagacgaacccctgtgtat ggttcggcggggaccacaagctggagctcaaacgtaaggcttttcc gactgactctgtctgttcaattgtgggtggctttttgccatmt cagtgtttctcgaattagtgtcagggaacaaacaattgcccctcca gattaggtaccagggaggggacattctgcatgggagaccagagggtggc taattttaacgtttccaagccaaaataactggggaaggggctgtgt cctgtgagggtaggtttatagaagtgaagtaagggaatcgtat ggttcacttttggctgggaccacaagtgaggcccaaaattgagtacatt ttccatcaattttgtgagattttgtcctgtgtgtcattgtgcaag ttttgacattttgtgaaatgagccattcccagggaacccaagggatga gaccgaaaagtgaagaaagccaacttttaagctgagcagacagaccgaa ttgtgagttgtgaggagagtaggggtttaggggaaagggaacaga tcgctggcttttctgaaatgacctttcaltgggactggctcagag gggtttttgtaggggaagtgtctagacccttaactgtgggtgtgt cggtagcgggaccagctggaaatcaaacgtaagtgcactttctactcc ttttcttctatacgggtgtgaaattggggacttttcatgttggagt atgagtgaggctgctgaaagagagtgaggactatccaaaaactgag gagtaagggtcagaacagagttgtctatggaagaacaagaccctagtta gttgatgaggcagctaaatgagctagtgactgggatccaaatggccag actctgtctgtaaccaacaatctaatgagatgtagcagcaaaaagagatt tcattgagggaagtaaaattgtaatatgtggatcacccttggta agggacatccgtggagattgaacgtaagtatttttctactactct gaaaattgtctaaatgccaagtgtgacttttagaggcttaaggtcaggt ttgaaaaattggtaaacaaagcatttcatatttatcagtttcaa aagtaaacctcagctcaaaaatgaaattgtagacaaaagattaattta agccaaattgaaatgattcaaaaggaaaaaaatgagtgatgaaaaag gaattctacagctccaaaggcaaaacggaattatttcttgaactt</p>			20
				30

【 0 1 1 6 】

【化 1 5】

	<p>tgccaaatctgtaaatgattttgtttctcaaatfaaaaagggtaga gaaatgtafttcttagctgttttctctctctgtctgataaattattat atgagataaaaatganaaataataggatgtgctaaaaatcagtaagaag rtagaaaaatatagtttatgtaaaagtgcacctaattgagaatcaga agcaatgttattttaagctcaaaatgagagataaacgtcaatactta aattctgcagagattctatacttgacagatactctttttcaaaaatc caattctatggtagactaaatttgaatgatcttccataatggagggg aaaaatggactgaccccaaaagctcagatt* aagaaaacctgtttaag * gaaagaaaaaaaagaactgcaattttaaggcccatgaaattgtaga aaaatagaaaatatttaataaggtattctttttctgtattac ttgatgggtttataccgccaaggaggccctgagaccgtcagtgat ctgtagacccttagggccctttttcggattgaatgacctggcgggtg ggctcccagggtctgggtggcagcgcaccagccgtaaaa gccctaaaa actgccgtaaaaggccacagcaaccggcgaccgccgtcaactgtgct gacacagtgatacagataatgtcgtacacagaggagaatgaaatgac gggcacacgctaagtgggaaagaggagaaagcctgattttatttt tagagattctagagataaaaatccagattatcttttaataaaaa ttctattagagattataaagaattaaagctatttttaagtggggt gtaattcttcagtagctctgtcaaaaggatttaagtaatagaggctt aatccaaatgagaaaatagacgcataacccttcaaggcaaaagctaca agagcaanaatgacaacagcagccagctctgccactcagatttga tcagttttactgagttgaaatgataatctatgaaaggataatgtctgata aaaaataagatacaggtgtgacacatcttaagttcagaaatataatg gcttcagtagattatattcagctatacaagatctaaagcagataaaa atgccattaatgaaacttaalagaatatttttaaatcttctctc tgtgacagaaattttctaactgtgcttttaacacctacccttgaaa gagtttagtaatttctatttgcctcgtcttactccagcatttca aaagtatacttgagaaaatattttgtgtgcaaccacctggcaggga ctattttgggccatttfaaaactctttcaaaactaagattttaaactg tttaaacctttggccctttfaaaaatcttttcatgaattcaaaact cgtfaaaagttaaaagggtctgcaagaaacttcttatacaaatatgct aatagttaalcgtttaaagcagagataaaaataaagtatcaaggctt gacccaacacaggagatctcctagcataatccctctctttttctag aattcatalgatttgcctgccaaggctatttataatactctggaaaaa aaatagtaatgaaaggtaaaagagaaatcagaacattaagaatt cggtatttactaactgcttggtaacatgaagggtttttatttataag gtttctatcttataaaaatctgttccctttctgctgatttctcaagc aaaaatctgattgtttttaaacttactctccaccacaaggccct gaatgcccacaaaagggaacttccaggagccatctgagctgctcaccg tcagaagtgaagccagccagctctctctggcaggtggcacaataacag ttgacccctctggtctggctgaaccttgcctatagtgacagccatc tggccaaggccaggtctccctctgaagccttgggagagaggagaggt ggctggccgatacagatgcggaagggtgactctcaaccgggtgct agactctgaggggtgctggcccaacacccaagcagccagga aggaaaaggcagctgtatcactgcccagagctaggagagaccgggaa aatgactgtccaagaccgttctgttctaaactccgaggggctaga tgaatgggttttcttggcctgaagcatggttccctgcaagaagc ggggaacacagagaaaggagaaaatgaaactgaacaagcatgcaag gcaaaaaggcccttagatggctgaggaagttatctctgcatggc tcttactgctctgctgacgcccaaaaacagcaccagtggaagact tccctgtaactaaacacattctctgtgttctccaggggctgat gccaagccatcggctctctctccgccatcgaaggagcagttagcgac cccaactgctctgtgtgtgctgacta</p>
配列番号 15	gatgccaagccatcggcttctatctccgccatcgaaggagcagttagc

10

20

30

【 0 1 1 7】

【化 1 6】

	<p>gacccaactgctctgtggtgctgatcaataacttctcccagag aaatcagtgcaagtggaagtggatgggggtgccaagcagtggtcat ccggatagtgacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcag cagcacccctcgtgcccacgacagtaacctaaagtcataattatatt cctgtgaggtcacccaagaacctggcctcccctgtgtcacAAGCTTC AACAGGAACGAGTGTGAGGCTTAGAGGCCACAGGCCCTGGCCTGCCCC CAGCCCCAGCCCCCTCCCCACCTCAAGCCTCAGGCCCTTGCCCCAGAGG ATCCTTGCAATCCCCAGCCCTCTCCCTCCTCATCCCCCTCTCT TTGGCTTTAACCGTGTAAATACTGGGGGGTGGGGGAATGAATAAAATAAAG TGAACCTTTGCACCTGTGATTTCTCTCCTGTCTGATTTAAGGTTGTT AAATGTTGTTTTCCCCATTATAGTTAATCTTTAAGGAACTACATACTGA GTTGCTAAAAACTACACCATCACTTATAAAATTCagCCTTCTCAGTTCT CCGCTCCCCTCCTGCTCCGTAAGACAGGCCCTCCGTGAAACCCATAAGC ACTTCTCTTTACACCCCTCCTGGGCCGGGGTAGGAGACTTTTTGATGTC CCCTeTTCAGCAAGCCTCAGAACCATTTTGAGGGGGACAGTTCTTACAGT CACAT*TCciGATCTAATGACTTTAGTTaCCGAAAAGCCAGTCTCTCA AAAAGAAGGGAAACGGCTAGAAACCAAGTCATAGAAATATATATGTATAAA ATATATATATATCCATATATGTAATAAACAATAATGATAACAGCATA GGTCAACAGGCAACAGGGAAATGTTGAAGTCCATTCTGGCACTCAATTTA AGGGAATAGGATGCCTTCATTACATTTTAAATACAAATACACATGGAGAGC TTCCTATCTGCCAAAGACCATCCTGAATGCCTTCCACTCACTACAAGG TTAAAAGCATTCAATTAACAATGTTGATCGAGGAGITCCCGTTGTGGCTCAG CAGGTTAAGAACGTGACTGGTATCCAGGAGGATGCGGGTTGGTCCCAG CCTCGCTCAGTGGATTAAGGATCCAGTGTGCTGCAAGATCAAGGGCTCA GATCCCGTGTCTATGGCTATGGGTAGGCTGGTAGCTGCATGCAGCCCT AATTTGACCCCTAGCCTGGGAACTGCCATAIGCCACATGTGAGGCCCTTA AAACCTAAAAGAAAAaAAAAGAAAAGAAATATCTTACACCCAATTTATAG ATAAGAGAGAAGCTAAGGTGGCAGGCCAGGATCAAAGCCCTACCTGCCT ATCTTGACACCTGAAACAAATTCTGTCTTCTAGGGHTCCAACACTGCAT AGAACAGAGGGTCAAACATGCTACCTCCCAGGACTCCTCCCTTCAAAT GACATAAATTTTGTGCCATCTCTGGGGGCAAAACTCAACAATCAATGG CATCTCTAGTACCAAGCAAGGCTCTTCTCATGAAGCAAAACTCTGAAGCC AGATCCATCATGACCAAGGAAGTAAAGACAGGTGTTACTGGTTGAAGT TATCTTCAATTCAATATGCTCAATTTCCAACCTCCAGTCCCGTAAATA CAACCCCTTTGGGAAGAGAGTCTTGCAGATGTAGCCACGTTAAAAAGA GATTATACAGAAAGGCTAGTGAGGATGCAGTGAACGGGATCTTTCATAC ATTGCTGGTGAAATGTAATAATGCTGCAGGCACTCTAGAAAATAATTTGC CAGTTTTTTGAAAAGCTAAACAAAATAGTTTAGTTGCATTTCTGGGTTATT TATCCCCCAGAAATTAATAATATGTCCGCACAAAAACGTGTACATAATC ATTCATAACAGCCTTGTACGAAAAGCTT</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
<p>配列番号 16</p>	<p>GGATCCTTAACCCACTAATCGAGGATCAAACACGCATCCTCATGGACAAT ATGTTGGGTTCTTAGCCTGCTGAGACACAACAGGAACTCCCCTGGCACCA CTTTAGAGGCCAGAGAAACAGCACAGATAAAATTCCTGCCCCTCATGAAG CTTATAGTCTAGCTGGGGAGATATCATAGGCAAGATAAACACATACAAAT ACATCATCTTAGGTAATAATAATACTAAGGAGAAAATTACAGGGGAGAA AGAGGACAGGAATTGCTAGGGTAGGATTATAAGTTCAGATAGTTCATCAG GAACACTGTTGCTGAGAAGATAACATTTAGGTAAGACCGAAGTAGTAAG GAAATGGACCGTGTGCTAAGTGGGTAAGACCATTCTAGGCAGCAGGAAC AGCGATGAAAGCACTGACGTGGGTGTTCACTGCACAGAGTTGTTCACTGC ACAGAGITGTGTGGGGAGGGGTAGGTCTTGCAGGCTCTTATGGTCACAGG AAGAATTGTTTTACTCCCACCGAGATGAAGGTTGGTGGATTTTGAGCAGA AGAATAATTTGCTGCTGGTTTATATAAACAAGGATTTCCCTGGGTGCTCTG ATGAGAATAATCTGTCAAGGGTGGGATAGGGAGAGATATGGCAATAGGAG CCTTGGCTAGGAGCCACGACAATAATTTCAAGTGAGAGGTGGTGTCTGCA</p>	<p>30</p>

【 0 1 1 8 】

【化 1 7】

TTGAAAGCAGGACTAACAAAGACCTGCTGACAGTGTGGATGTAGAAAAAGA
TAGAGGAGACGAAAGGTGCATCTAGGGTTTTCTGCCTGAGGAATTAGAAAG
ATAAAGCTAAAGCTTATAGAAGATGCAGCGCTCTGGGGAGAAAGACCAGC
AGCTCAGTTTTGATCCATCTGGAATTAATTTTGGCATAAAGTATGAGGTA
TGTGGGTTAACATTAATTTGTTTTTTTTTTTCCATGTAGCTATCCAACGT
TCCCAGCATCATTTATTTAAAAGACTTCCCTTCCCCTATTGGATTGTT
TTGGCACCTTCACTGAAGATCAACTGAGCATAAAAATGGGTCTATTTCTA
AGCTCTGATTCCATCCATGACCTATTTGTTTCATCTTACCCAGTAGA
CACTGCCTTGATGATTAAGGCCCTGTTACCATGTCTGTTTTGGACATGG
TAAATCTGAGATGCCTATTAGCCAACCAAGCAAGCAGGCCCTTAGAGAG
CTAGATATGAGAGCCTGGAATTCAGACGAGAAAAGGTCAGTCTTAGAGACA
TACATGTAGTCCATCACCATGCGGATGGTGTAAAAGCCATCAGACTGC
AACAGACTGTGAGAGGGTACCAAGCTAGAGAGCATGGATAGAGAAAACCA
AGCACTGAGCTGGGAGGTGCTCCTACATTAAAGAGATTAGTGAAGTGAAGG
ACTGAGAAGATTGATCAGAGAAGAAGGAaAATCAGGAAAATGGTGTCTGTC
cTGAAAATCCAAGGGAAGAGATGTTCCAAAGAGGAGAAaAACTGATCAGTT
GTCAGCTAGCGTCAATTTGGGATGAAAATGGACCATTGGACAGAGGGATGT
AGTGGGTGATGGGTGAATAGATAAGAGCAGCTTCTATAGAATGGCAGGGG
CAAAAATTCTCATCTGATCGGCATGGGTTcTAAAGAAAACGGGAAGAAAA
ATTGAGTGCATGACCAGTCCCTTCAAGTAGAGAGGTgGAAAAGGGAAAGGA
GGAAAATGAGGCCACGACAACATGAGAGAAATGACAGCATTTTTAAAAAT
TTTTATTTTATTTATTTATTTATTTTGTCTTTTAGGGCTGCCCTGC
AAcatatggagggtccagggttaggggtctaatcagagctatagctgcca
gcctacaccacagccatagcaatgccagatctacatgacctacaccacag
ctcacagcaacgccggatccttaaccactgagtgaggccagagatcaaa
cccatatccttatgatactatgctaggttaccactgagccaaaatg
ggaaATCCTGAGTAATGACAGCATTTTTAATGTGCCAGGAAGCAAAACT
TGCCACCCCGAAATGTCTCTCAGGCATGTGGATTATTTTGAGCTGAAAAAC
GATTAAGGCCCAAAAAACACAAGAAGAAATGTGGACCTTCCCCAACACGC
CTAAAAAATTAGATTGAGGGCTGTTCAGAGAATAGAGCTATTGCCAGA
CTTGTCTACAGAGGCTAAGGGCTAGGTGTGGTGGGGAAACCCCTCAGAGAT
CAGAGGGACGTTTATGTACCAAGCATTGACATTTCCATCTCCATGCCAAT
GGCCTTCTTCCCCTCTGTAGCCCCAAACCACCACCCCAAAATCTTCTTC
TGTCTTtagctgaaagatgggtgtgaaaggtgtagtTTcAGCCACTTTGGC
GAGTTCCcAGTTTGTCTGGGTCTTCTCCTCCGGATCCACATTATTCGACT
GTGTTTGATTTTCTCCTGTTTATCTGTCTCATTGGCACCCATTTCATTCT
TAGACCAGCCCAAAGAACCTAGAAGAGTGAAGGAAAATTTCTTCCACCTT
GACAAATGCTAAATGAGAATCACCGcCAGTAGAGGAAAATGATCTGGTgCT
GCGGGAGATAGAAGAGAAAAATcGCTGGAGAGATGTCACTGAGTAGGTGAG
ATGGGAAAGGGGGGGCACAGGTGGAGGTGTTGCCCTCAGCTAGGAAGACA
GACAGTTcacagaagagaagcgggtgctcgtGGACATCTTGCCTCATGGA
TGAGGAAACCGAGGCTAAGAAAGACTGCAAAAAGAAAAGTAAGGATTGCAG
AGAGGTGATCCATGACTAAAATCACAGTAACCAACCCCAAACCACCATG
TTTTCTCCTAGTCTGGCACGTGGCAGGTAAGTGTAGGTTTTCAATATTA
TTGGTTTGTAACAGTACCTATTAGGCCTCCATCcCCTCCTCTAATACTAA
CAAAAGTGTGAGACTGGTCAAGTAAAAATGGTCTTCTTCTCTATGCAAT
CTTTCTCAAGAAGATACATAACTTTTTATTTTATCATaGGCTTGAAGAGC
AAATGAGAAAACgCCTCCAACCTATGACACCGTAACAAAGTGTTTATGAT
CAGTGAAGGGCAAGAAACAAAACATACACaGTAAAGACCCTCCATAATAT
TGTGGGCTGGCCCAaCACAGGCCAGGTTGTAAAGCTTTTTATCTTTGA
TAGAGGAATGGATAGTAATGTTTCAACCTGGACAGAGAT*CATGTTCACT
GAATCCTTCCAAAAATTCATGGGTAGTTTGAATATAAGGAAAAAAGAC
TTAGGATAAATACITTTgTCCA*GATCCCAGAGTTAATgCCAAAAATCAGTT
TTCAGACTCCAGGCAGCCTGATCAAGAGCCTAAACTTTAAAGACACAGTC
CCTTAATAACTACTATTACAGTTGCACCTTTCAGGGCCAAAGACTCATT
GAATCCTACAATAGAATGAGTTTAGATATCAAATCTCTCAGTAATAGATG

10

20

30

【 0 1 1 9】

【化 1 8】

	<p>AGGAGACTAAATAGCGGGCATGACCTGGTCACTTAAAGACAGAATTGAGA TTC AAGGCTAGTGTCTTCTACCTGTTTTGTTTCTACAAGATGTAGCAA TGCGCTAATTACAGACCTCTCAGGGAAGGAATTCACAACCCTCAGCAAAA ACCAAAGACAAA TCTAAGACA ACTAAGAGTGTGGTTTAAATTTGGAAAAA TAAC TCACTAACCAAACGCCCTCTTAGCACCCCAATGTCTTCCACATC ACAGTGCTCAGGCCTCAACCATGCCCAATCACCCAGCCCCAGACTGGT TATTACCAAGTTTCATGATGACTGGCCTGAGAAGATCAAAAAAGCAATGA CATCTTACAGGGGACTACCCGAGGACCAAGATAGCAACTGTCATAGCAA CCGTACACTGCCTTGGTCA</p>
<p>配列番号 19</p>	<p>ggatcaaacacgcctcctcatggacaataigtgggtcttagcctgctg agacacaacaggaaactccctgcccacttttagggccagagaacacgc acagataaaattccctgcccctcatgaagcttatagcttagctggggagat atcatagggcaagataaacacatacaatacatccttaggtaataat atactaaaggagaaaatfacaggggagaaaggagcaggaattgctagggt aggattafaagttcagatagctcaggaacactgttgcagagagata acatttaggtaaaagaccgaagtagtaaggaaatggaccgtgcttaagt gggtaagaccattcttaggcagcaggaacagcgcgtaagacactgaggtgg gtgtcactgcacagatgttactgacagagttgtgtgggggggggt aggcttgcaggctcttatggtcacaggaagaattgtttactcccaccg agatgaagggttggattttgagcagaagaataattctgcttggttat ataaacaggaattccctgggtgctctgatgagaataatctgtaggggt gggafatgggagagatagggcaataggagccttggctaggagcccagaca ataattcaagtgaagggtgctgctgcatgaaagcaggactacaagac ctgctgacagtgtgagatgagaaaaataagaggagacgaaggtgcatct agggttttctgctgaggaattaagaagataaaagctaaagcttataaag atgcagcgtctggggagaaagaccagcagctcagtttgatcaactgg aataatttggcataaagtatgaggatgtgggttaacattattgttt tttttttccatgtagctatccaactgcccagatcattttttaa agacttcccttcccctattggattgtttggcacttcaactgaaatca actgagcataaaattgggtctatttcaagctcttgatccattccatga cctattgttcatcttaccaccagtagacactgcttggatgataaagcc cctgtaccatgctgtttggacatgtaactctgagatgacctatgac caaccaagcaagcacggcccttagagagctagatagagagcctggaatt cagacgagaaaagctcagctcagacatacatgtagtgcctaccatg cggatgggttaaaagccatcagactgcaacagactgtgagagggtacca agctagagagcattgtagagaacccaagcactgagctggagggtgctc ctacattaaagattagtagaagaaggactgagaagattgacagagaa gaaaggaaaatcaggaaaatggtgctgtcctgaaaatcagggaagagat gttccaaaaggagaaaactgacagttgtcagctagcgtcaattgggat gaaaatggaccattggacagaggatgtagtggtcatgggtgaatagat aagagcagctctatagaatggcaggggcaaaattctcactgacggca tgggttctaaagaaaacgggaagaaaatgagtgcatgaccagtcct tcaagtagagaggtgaaaagggaaggaggaaaatgaggccacgacaaca tgagagaaatgacagcattttaaataattttattttattttatt tattttgcttttagggctgcccctgcaacatagggagttccagggt aggggcttaatacagagctatagctgccacctacaccagccatagcaa tgccagatctacatgacctacaccagctcagcgaacgccgatcctt aaccactgagtgaggccagatcaaaacctatccttaggatactag tcaggttcattaccactgagccaaaatgggaaatctgagtaatgacagc atttttaattgcccaggaaagcaaaactggcccccgaatgtctca ggcattgggatttttagctgaaacgatttagcccaaaaacacaa gaagaaaatggacccttcccacaagcctaaaaaatttagattgagggc ctgttccgaalagagctatgccagactgtctacagaggctaagggc taggtgtggtgggaaacctcagagatcagaggacgttatatgtaacaa</p>

10

20

30

【 0 1 2 0】

【化 1 9】

	<p>gcattgacatttccatctccatgcgaatggcctctccctctgtagcc ccaaacaccaccaccaccccaaatctctctgctttagctgaagatgggt tgaagtgatagttcagccacttggcgagttcctcagtttctgggt ctctctccTgatccacattatcgactggtttgatttctctgtta tctgtctcattggcaccattcattcttagaccagcccaagaacctag aagagtgaaggaaaattctccaccctgacaaatgtaaatgagaatca ccgcagtagaggaaaatgatctggtctgctgggagatagaagaaaatc gctggagagatgtcactgagtagtgagatgggaaagggtgacacaggt ggagggttgcctcagctaggaaagacagacagttcacagaagagaagcg ggtgtcogtggacatctgcctcagtgatgagaaaccgaggtcaagaaa gactgcaaaaagaaaggtaaggatgcagagaggtcgcctcactaaaa tcacagtaaccaccccaaccaccatgtttctcctagtctggcacgtg gcaggtactgttaggtttcaataattggtttgtaacagtcctatt aggcctccatcccctcttaataactaacaagagtgtagactggtcagt gaaaaatggtctcttctctatgaatcttctcaagaagatacataact tttattttatcataggccttgaagcaaatgagaacagcctccaaact atgacaccgtaacaaaatgttatgactcagtagggcaagaacaaaac atacacagtaaaagacctccataattgtggggcccaacacagggcca ggtgtataaaacttttattcttgataggaatgagatgaaatgtttc aacctggacagagatcgttctcactgaatctccaaaattcagggt gttgaaataaagaaaataagacttaggataaactttgtccaagat ccagagttaaigccaaaatcagtttcagactccagcagcctgatcaa gagcctaaacttaagacacagctccttaataactacttaccagttg cactttagggcgaagactcattgaatcctacaatagaaatgagtttag atataaactctcagtaataatgaggaactaaatgaggcctgagcc tggctactaaagacagaatgagattcaaggctagtgcttcttaoct gtttgitttacaagatgtagcaatcgcctaattacagacctcaggg aaggaaatcacaacctcagcaaaaacaaagacaaaatcaagacaacta agaggttgggttaattggaaaaaactcactaaccaaacgcccctct tagcaccecaatgtctccaccatcacagctcagggcctaacatgcc ccaatcacc</p>	10
配列番号 2 5	<p>GCACATGGTAGGCCAAAGGACTTTGCTTCTCCAGCACATCTTCTGCAGA GATCCATGGAAACAAGACTCAACTCCAAAGCAGCAAAGAAGCAGCAAGTT CTCAAGTGATCTCCTCTGACTCCCTCCTCCAGGCTAATGAAGCCATGTT CCCCCTGGGGGATTAAGGGCAGGTGTCCATTGTGGCACCCAGCCGAAGA CAAGCAAATTTGATCAGGTTCTGAGCACTCCTGAATGTGGACTCTGGAATT TTCTCCTCACCTGTGGCATATCAGCTTAAGTCAAGTACAAGTGACAAAC AACATAA TCCTAAGAAGAGAGGAAATCAAGCTGAAGTCAAAGGATCACTGC CTTGGATTCTACTGTGAATGATGACCTGGAAAAATATCCTGAACAACAGCT TCAGGGTGATCATCAGAGACAAAAGTTCCAGAGCCAGGTAGGGAAACCTT CAAGCCTTGCAAAGACAAAATCATGCCATTGGGTTCTTAACCTGTGAG TGATTTACTATA TGTTACTGTGGAGGCAAAGCGCTCAAATAGCCTGGGT AAGTATGTCAAATAAAAAGCAAAGTGGTGTCTTGAATGTTAGACCT GAGGAAGGAATATTGATAACTTACCAATAATTTTCAGAATGATTTATAGA TGTGCCTTAGTCAGTGTCTCTCCACCCCGCACCTGACAAGCAGTTTGA ATTTATTCTAAGAATCTAGGTTTGTCTGGGGGCTACATGGGAATCAGCTTC AGTGAAGAGTTTGTGGAATGATTCATAAATTTCTATTCCAGCATAA ATCCAAGAACCCTCTCAGACTAGTTTATTGACTGCTTTTCTCCATAAT CCATCTCATCTCCGTCCATCATGGACACTTTGTAGAATGACAGGTCTGG CAGAGACTCaCAGATGCTTCTGAAAACATCCTTTGCCCTTCAAAGAATGAAC AGCACATACTAAGGATCTCAGTGATCCACAAAATTAGTTTTTGCACAA TGGTTCTTATGATAAAAGTCTTTCATTAACAGCAAATTGTTTTATAATAG TTGTTCTGCTTTATAATAAATTGCATGCTTCACTTTCTTTCTTTCTTTT TTTTCTTTTTTGTCTTTTAGTGCCGAGGTgcagcatatgaaattcc caggctaggggtcaaatcagaactacactactgacctagccacagcca cagcaactcaggatctaagccatgtcggtagctacactacagctcatgg</p>	20
		30

【 0 1 2 1 】

【化 2 0】

```

caatgccagatccttaaccaatgagcgaggccaggatcgaacctatgt
ccicatggataclagtcaggctcattatccctgagccataacaggaact
cccGAGTTTGCTTTTTATCAAAAATTGGTACAGCCTTATTGTTTCTGAAAA
CCACAAAATGAATGTATTACATAATTTTAAAAGGTTAAATATTTATGA
TATACAAGACAATAGAAAAGAGAAAACGTCATTGCCTCTTCTTCCACGAC
AACACGCCTCCTTAATTGATTTGAAGAAATAACTACTGAGCATGGTTTAG
TGTACTTCTTTCAGCAATTAGCCTGTATTCATAGCCATACATATCAAIT
AAAATGAGATCATGATATCACACAATACATACCATACAGCCTATAGGGAT
TTTTACAATCATCTTCCACATGACTACATAAAAACCTACCTAAAAAAA
AAAAACCTACTTTCATCCTCCTATTGGCTGCTTTGTGCTCCATTA AAAAG
CTCTATCATAATTAAGGTTATGATGAGGATTTCCATTTTCTACCTTCAAG
CAACATTTCAATGCACAGTCTTATATACACATTTGAGCCTACTTTCTTT
TTCTTTCTTTTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTCTTTTTGTC
TTTTCTAAGctgctcatatggaggtcccaggctagctgctaatacagaac
10
talagctgctgacctagccacatccacagcaataacaagatcigagccat
gtctgcaacttacaccacagctcacagcaacgggtgagctcttaaccact
gagcaaggccaggatcaaacccatAACTTCATGGCTCCTAGTTGGATT
GTTAACCACTGAGCCATGATGGCAACTCCTGAGCCTACTTTTCTAATCAT
TTCCAACCCTAGGACACTTTTTTAAGTTTCATTTTTCTCCCCCACCCTC
TGTTTTCTGAAGiGTGTTTGGCTTCCACTGGGTGACTTCAC:CCCAGGATC
TCATCTGCAGGATACTGCAGCTAAGTGTATGAGCTCTGAATTTGAATCCC
AACTCTGCCACTCAAAGGGATAGGAGTTTCCGATGTGGCCCAATGGGATC
AGTGGCATCTCTGCAGTGCCAGGACGCaggttccatccctgcccagcac
agtgggtaagaatctggCATTGCTGCAGCTGAGGCATAGATTCAATTG
TGCTCAgATCTGATCCTTGGCCCAAGGACTGCATATGCCTCAGGGCAAC
CAAAAAGAGAAAAGGGGGGTGATAGCATTAGTTTCTAGATTGGGGGAT
AATTAATAAAGTGATCCATGTACAATGTATGGCATTGTGAAATGCTCA
ACAAATTTCAACTATTATggagttccatcatggctcagtggaagggaat
ctgattagcatccatgaggacacaggtCCAACCCCGACCTTGCTCAGTGG
20
GCATTGCTGTGAGCTGTGGCATGGTTACAGACGAAGCTCGGATCTGGCA
TTGCTGTGGCTGTGGTGTAAAGCCAgCAActacagctctcattcagccct
agcctgggaacctccatagccTAAAAGACAAAAAATAAAATTTAAATTA
AAAAATAAAGAAATGTTAACTATTATGATTGgTACTGCTTGCATTACTGCA
AAGAAAGTCACTTTCTATACTCTTAAATATCTTAGTTGACTGTGTGCTCA
GTGAACTATTTGGACACTTAAATTTCCACTCTCTTCTATCTCCAACCTGA
CAACTCTCTTTCCCTCTCTTCTGGTGAGATCCACTGCTGACTTTGCTCTTT
AAGGCAACTAGAAAAGTGCTCAGTGACAAAATCAAAGAAAGTTACCTTAA
TCTTCAGAAATTAACAATCTTAAAGTTCTCTTGTAAAGCTTACTATTTACAGT
GTTAGTATTATTCCTTGGTCCCTTACAACCTTATCAGCTCTGATCTATTGC
TGATTTCAACTATTTATTGTTGGAGTTTTTTCCITTTTTTCCCTGTTCAT
TCTGCAAATGTTTGTGAGCATTTGTCAAAGTGAAGATACTGGACTGGGCC
TTCCAAATATAAGACAATGAAACATCGGGAGTTCTCAITATGGTGCAGCA
GAaacgaatccaactaggaatgtgaggttcaggttcgatccctgcct
tgctcagtggttaaggatccagcattaccgtgagctggtggtgtaggtg
cagacgtggtcagatcctgctgctggtgctggtgcataggetggcag
ctctagctctgattcgaccgctagcctgggaacctccatGCGCCCGAGT
30
GCAGCCCTTAAAAGCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGACAATGAAA
CATCAAAACAGCTAACAAATCCAGTAGGGTAGAAAAGAAATCTGGCAACAGATA
AGAGCGATTAATGTTCTAGGTCCAGTGACCTTGCCTCTGTGCTCTACAC
AGTCGTGCCACTTGTGAGGGAGAAGGTCTCTCTTGTAGTTGAGTCTGAA
AGACATTAGTTGTTCAAACTAATGCCAGTGAGTGAAGGTGTTTCCAAG
CAGAGGGAGAGTTTGGTAAAAGCTGGAAGTACAGAAAAGACTCTAAAGA
GTTTAGGATGGTGGGAGCAACATACGCTGAGATGGGGCTGGAAGGTTAAG
AGGAAAACAATAAGTAAAGTGAAGCTGGACTCACAGCAAAGTGAGGACC
TCAGCATCCTTGATGGGGTTACCATGGAACACCAAGGCACACCTTGATT
TCCAAAACAGCAGGCACCTGATTACGCCAATGTGACATGGTGGGTACCC

```

10

20

30

【 0 1 2 2】

【化 2 1】

	<p>CTCTAGCTCTACCTGTTCTGTGACAACCTGACAACCAACGAAGTTAAGTCT GGATTTTCTACTCTGCTGATCCTTGTITTTTGTTCACACGTCATCTATAG CITTCATGCCAAAATAGAGTTCAAGGTAAGACGCGGGCCTTGGTTTGATAT ACATGTAGTCTATCTTGTITGAGACAATATGGTGGCAAGGAAGAGGTTCA AACAGGAAAATACTCTCTAATTATGATTAACCTGAGAAAAGCTAAAAGAGTC CCATAATGACACTGAATGAAGTTCATCATTGCAAAAAGCCTTCCCCCCCC CCCAGGAGACTATAAAAAAGTGCAATTTTTTAAATGAACITATTTACAAA ACAGAAAATAGACTCACAGACATAGGAAAACGACAGATGGTTACCAAGGGT GAAAGGGAGTAGGAGGGATAAATAAGGAGTCTGGGGTTAGCAGATACACC CCAGTGTACACAAAATAAACACAGGGACCTACTATATAGCACAGGGAAC TATATGCAGTAGCTTACAATAACCTATAATGGAAGAAGATGTGAAAAAGA ATATATGTATGCGTGTGTGTAACCTGAATCACTTTGCTGTAACCTGAAT CTAACATAACATTGTAATCAACTACAGTTTTTTTTTTTTTAAAGTGCAG GGTTTTGGTGTITTTTTTTTTCATTTTGTITTTTGTITTTTGTITTTTGC TTTTTAGGGCCACACCCAGACATATGGGGGTCCCAGGcTAGGGGTcTAA TTAGAGcTACAGtGCGCGCTTGCAAccacagccacagcaacatcatgacc gagccgcacttgcgacttacaccacagctcatggcaataccagatccta accactgagcaaggcccaggatgtagccgcaacctcatggtcctag tcagattcattCTGCTGCGCTACAATGGGAACCTCCAAGTGCAGTTTTTT GTAATGTGCTGTCTTTCTTTGTAATTCATATTCCTACTTCCCAATA AATAAATAAATACATAAATAAATAAACATACCATTGTAATCAACTACAAAT TTTTTTTAAATGCAGGGTTTTTGTITTTTGTITTTTGTITTTTGTITTTTGT CCTTTTCTAgggccgctccatggcatggaggttccaggctagggt cgaatcgagctgtagccaccggcctaccgagaccacagcaacgcggg atccgagccgcgtctgcaacctacaccacagctcagccaacgcggatc gtaaccactgagcaaggcaggatcgaacctgcaacctcatggtcc tagtcagattcgttaactacagccacaacggaaacTCCTAAAGTGCAG TTTTTAAATGTGCTGTCTTTCTTTGTAATTTACACTCAACCTACTTCCC AATAAATAAATAAATAAACAATAAATCATAGACATGGTTGAATTCTAAA GGAAGGGACCATCAGGCCTTAGACAGAAAATACGTATCTTCTAGTATTTT AAAACACTAAAGAAGACAACATGCTCTGCCAGAGAAGCCCAGGGCCT CCACAGCTGCTTGCAAAGGGAGTTAGGCTTCAGTAGCTGACCCAAAGGCTC TGTTCTCTTCAGGAAAAGGGTTTTTGTTCAGTGAGACAGCAGACAGCT GTCACTGTGgtggagcttggccaaggaaccagctggaactcaacGTA AGTCAATCCAAAACGTTCCCTTCCCTTGGCTGTCTGTGCTTACGGTCTCTGT GGCTCTGAAATGATTTCATGTGCTGACTCTCTGAAACCAGACTGACATTCT CCAGGGCAAAAATAAGCCTGTCATCAAAACGGAAAACTGAGGGCACATT TTCTGGGCAGAACTAAGAGTCAGGCACTGGGTGAGGAAAACTTGTTTAGA ATGATAGTTTCAGAACTTACTGGGAAGCAAAGCCCATGTTCTGAACAGA GCTCTGCTCAAGGGTCAGGAGGGGAACCAAGTTTTTGTACAGGAGGGAAGT TGAGACGAACCCCTGTGTAtatggttgggagggggaaccaagctggagc tcaaacGTAAGTGGCTTTTTCCGACTGATTTCTTGTGTITTTCTAATTGTT GGTTGGCTTTTTGTCCATTTTTCAGTGTTTTCATCGAATTAGTTGTCAGG GACCAAAACAAATTGCCTTCCCAGATTAGGTACCAGGGAGGGGACATTGCT GCATGGGAGACCAGAGGGTGGCTAATTTTAAACGTTTCCAAGCCAAAATA ACTGGGAAGGGGGCTTGTCTGCTGTGAGGGTAGGTTTTTATAGAAAGT GAAGTTAAGGGGAAATCGCTATGGTtaccittggctggggaccaaaagt ggagcccaaatgaGTACATTTTCCATCAATTATTTGTGAGATTTTTGT CCTGTTGTGTCAATTTGTGCAAGTTTTTGACATTTTGGTTGAATGAGCCAT TCCCAAGGGACCCAAAAGGATGAGACCGAAAAGTAGAAAAGAGCCAACTTT TAAGCTGAGCAGACAGACCGAATTGTTGAGTTTGTGAGGAGAGTAGGGTT TGTAGGGAGAAAAGGGGAACAGATCGCTGGCTTTTTTCTCTGAATAGCCCT TCTCATGGGACTGGCTTACAGAGGGGTTTTTGTATGAGGGAAGTGTCTAG AGCCTTAACTGTGgttgtgtcggtagcgggaccaagctggaatcaaa CGTAAGTGCACITTTCTACTCC</p>
--	--

10

20

30

40

50

(ブタ 軽鎖)

別の実施形態では、有蹄動物免疫グロブリンの 軽鎖遺伝子座をコードする新規のゲノム配列を提供する。本発明は、有蹄動物 軽鎖領域の第 1 の報告されたゲノム配列を提供する。1つの実施形態では、ブタ 軽鎖は、J 単位 ~ C 単位のコンカテマーを含む。特定の実施形態では、単離ブタ ヌクレオチド配列 (配列番号 28 に示すものなど) を提供する。

【0123】

1つの実施形態では、例えば、配列番号 32 に示す、ブタ 軽鎖ゲノム配列の第 1 の J / C 領域の 5' 隣接配列を含むヌクレオチド配列を提供する。なおさらに、ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスター領域の 3' 隣接配列 (例えば、J / C の約 200 塩基対下流) を含むヌクレオチド配列 (配列番号 33 に示すものなど) を提供する。あるいは、ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスター領域の 3' 隣接配列 (例えば、エンハンサーの近くに存在する J / C クラスターの約 11.8 kb 下流 (配列番号 34 によって示されるものなど)、エンハンサー領域を含む の約 12 kb 下流 (配列番号 35 によって示されるものなど)、 の約 17.6 kb 下流 (配列番号 36 によって示されるものなど)、 の約 19.1 kb 下流 (配列番号 37 によって示されるものなど)、 の約 21.3 kb

下流（配列番号 38 によって示されるものなど）、および/または の約 27 K b 下流（配列番号 39 によって示されるものなど）を含むヌクレオチド配列を提供する。

【0124】

なおさらなる実施形態では、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 に示す単離ヌクレオチド配列を提供する。配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、または 99% 相同な核酸配列も提供する。さらに、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 の少なくとも 10、15、17、20、25、30、40、50、75、100、150、200、250、500、または 1,000 個連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を提供する。任意選択的にストリンジェントな条件下で、配列番号 28、31、32、33、34、35、36、37、38、または 39 とハイブリダイズするヌクレオチド配列およびこれに相同なヌクレオチドをさらに提供する。

10

【0125】

【化 22】

<p>配列番号 28</p>	<pre> CCTTCTCTCTGCACCTGTCAACTCCCAATAAACCGTCTCTTGTTCATTC AGAAATCATGCTCTCCGCTCACTTGTGTCTACCCATTTTCGGGCTTGCAT GGGGTCATCTCGAAGGTGGAGAGAGTCCCCCTTGGCCTTGGGGGAAGTCG AGGGGGGGGGGGAGGGCTGAGGCATGTGCCAGCGAGGGGGGGTCACTC CACGCCCTGAGGACCTTCTAGAACCAGGGGCGTGGGGCCACCGCCTGAG TGGAAGGCTGTCCACTTTTCCCCGGGCCCCAGGCTCCTCTCCGTGT GGACCTTGTCCACCTCTGACTGGCCAGCCACTCATGCATGTTCCTCCG AAACCCAGGACGATAGCTCAGCAGCGACAGTGTCCCTCTGAGGGCC TCTGTCCATTTTCAGGACGACCCGCATGTACAGCGTGACCACTCTGTCTAC GCCACTCACACGTCCTAGAGCCCCACCCCAAGCCCATCTTAGGGGC ACAGCCAGeTCCGACCGCCCCGGGGACACCACCTCTGCCCTTcCCCAG GCCCTCCCTGTACACGCACCAACAGGGCCCTCCGTCCCGAGACCTGCTC CCTCATCCCTCGGTCCCTCAGGTAGCCTTCCACCCCGGTGTGTCCCAG GTCCCAGATGCAGCAAGGCCCTGGGACAACGCCAGATCTCTGTCTcCC CGACCCCTCAGAAGCCAGCCACGCCCTGGCCCCACCACTGCCTAAcG TCCAAGTGTCCATAGGCCTCGGGACCTCCAAGTCCAGGTTCTGCCTCTGG GATTCGCCCATGGGTCTGCCTGGGAAATGATGCACTTGGAGGAGCTCAGC ATGGGATGCCGGACCTTGTCTTAGGCGCTcCCTCAGGATCCCACAGCTG CCCTGTGAGACA CACAAACACGCATGCACGCACGCCGGCACACACGCTATTGCAGAGATG GCCACGGTAGCTGTGCCTCGAGGCCGAGTGGAGTGTCTAGAACTCTCGGG GGTCCCCTCTGCAGACGACTGCTCCATCCCCCGTGCCTGAAGGGC TCCTCACTCTCCATCAGGATCTCTCCAAGCTGCTGACCTGGAGAGGAAG GGGCTGGGACAGGGGGGACACTCAGACCTCCCTGTGCCCTCTCTCTG CTGGGCTTGGACGGCTCCCCCTTCCACGGGTGAAGGTGACAGTGGGG AGAGGGCACCCCTCAGCCTCCAGACCCAGACCAGCCCCGTGGCAGG GGCAGCCTGTGAGCCTCCAGCCAGATGCAGGTGGCCTGGGGTGGGGGGTG GAGGGGGGGGAGGTTTATGTTTGGGCTGTACTGTGTAATATTTTC GGCGGTGGGACCCATCTGACCGTCCCTCGGTGAGTCTCCCCTTTCTCTCC TCCTTGGGGATCCGAGTGAATCTGGGTGCATCTCTCTCCGTCTCTCTC CGACTGGGGCTGAGGTCTGAACCTCGGTGGGGTCCGAAGAGGAGGCCCTT AGGCCAGGCTCCTCAGCCCCTCCAGCCCGACcgGCCCTTGTGACACAGGG TCCAGCTAAGGGCAGACATGGAGGCTGCTAGTCCAGGGCCAGGCTCTGAG ACCCAAGGGCGCTGCCAAGGAACCTTGCCCAGGGACCTGGGAGCAA AGTCCCTCACTCAGAGCCTGCAGCCCTGGGGTCTGAGGACAAGGAGGGAC TGAGGACTGGGCGTGGGAGTTCAGGCGGGGACACCAGGTCCAGGGAGGT GACAAAGGCGCTGGGAGGGGGCGGACGGTGCCGGGACTCCTCTGGGCC CTGTGGGCTCGGGTCTTGTGAGGACCTGAGGGACTGAGGGGCCCTTG GGCCTAGGGACTTGCAGTgAGGGAGGCAGGGAGTGTCCCTTGAGAACGTG GCCTCCGCGGGCTGGGTCCCCCTCGTGTCTCCAGCC*GGGAGGACACCC AGAGCAAGCGCCCCAGGTGGGGCGGGAGGGTCTCTCACAGGGGCAGCTG ACAGATAGAGGCCCCCGCAGGCAGATGCTTGATCCTGGCAGTTATACTG GGTTC**GCACAACCTTCCCTGAACAAGGGGCCCTCCGAACAGACACAGA CGAACCCAGTTCAGCCaggCTCAGCACAgAAAAATGCACTGACACCCAAA ACCTCATCTgggGCCTGGCCGGeAtCCCGCCCCAGGACCCAAAGGCC TGCCCCCTGGCAGCCCTGGACACGGTCTCTGTGGGCGGTGGGGTcGGG CTGTGGTGACGGTGGCATCGGGGAGCCTGTGCCCTCTCCCTGAAAGGGGG GAGAGGCTCAAAGGGGACAGAAATGTCTCCCTAGGAAGACCTCGGAC GGGGCGGGGGGGTGGTCTCCGACAGACAGATGCCCGGGACCGACAGACC TGCCGAGGGAAGAGGGCACCTCGGTGGGTTAGGCTCCAGGCAGCACGAG GGAGCGAGGCTGGGAGGGTGAAGACATGGGAGCCTGAGGAGGAGCTGGAG ACTTACAGAGGCCCCAGCTCCGGCTTCCGGCTCTGAGATGCTCGGACG CAAGGTGAGTGACCCACCTGTGGCTGACCTGACCTCAgGGgGACAAGGC </pre>
-----------------------	--

20

30

40

【0126】

【化 2 3】

TCAGCCTGGGACTCTGTGTCCCATCGCCTGcACAGGGGATTCCCCTGAT
GGACTGAGCCAACGACCTCCCGTCTCTCCCCGACCCCCAGGTCAGCCC
AAgGCCaCTCCACGGTCAACCTCTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTCGG
CACCAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTAATAAGTGACTTCTACCCGGGG
CCGTGACGGTGACCTGGAAGGCAGGCGGCACCAACCGTCACCCAGGGCGTG
GAGACCACCAAGCCCTCGAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG
CTACCTGGCCCTGTCCGCCAGTGACTGGAATCTTCCAGCGGCTTACCT
GCCAGGTCACCCACGAGGGGACCATTGTGGAGAAGACAGTGAACCCCTCC
GAGTGGCCTAGGTCCCTGGGCCCCACCCTCAGGGGCTGGAGCCACAG
GACCCCGCGAGGGTCTCCCGCGACCCTGGTCCAGCCAGCCCTTCTCTC
TGACCTGTCAACTCCCAATAAACCGTCTCCTTGTCAATCAGAAATCA
TGCTCTCCGCTCACTTGTGTCTACCCATTTTCGGGCTTGCATGGGGTCAT
CCTCGAAGGTGGAGAGAGTCCCCCTTGGCCTTGGGgAAATCGAGGGGGG
GGGGGGAGGCCCTGAGGCATGTGCCAGCGAGGGGGGTCACTCCACGCCCC
TGAGGACCTTCTAGAAACCAGGGGCGTGGGGCCACCGCCAGAGTGAAGG
TGTCCACTTTTTCCCGGGGGCCCCAGGCTCCCTCCTCCGTGTGGACCTG
TCCACCTGTACTGGCCAGCCACTCATGCATTGTTTCCCGGAAACCCCA
GGACGATAGCTCAGCAGCGACAGTGTCCCCCTGTGAGGGCCTCTGTCCA
TTTCAGGACGACCCCGCATGTACAGCGTGACCACTGTCTCACGCCCACTC
ACCAAGTCTAGAGCCCAACCCAGCCCATCCTTAGGGGCACAGCCAG
TCCGACCCCGGGGACACCACCCTCTGCCCTTCCCCAGGCCCTCC
GTACACAGCACACAGGGCCCTCCGTCCCGAGACCCTGCTCCCTCATCC
CTCGGTCCCTCAGGTAGCCTTCCACCCGCGTGTGTCCCGAGGTCCCAGA
TGAGCAAGGGCCCTGGGACAACGCCAGATCTCTGCTTCCCGACCCCTC
AGAAGCCAGCCACGCCCTGGCCACACCACCTGCTAAAGTCCAAGTGTG
CATAGGCTCGGGAcCTcAaAgTCCAGGTTCTGCCTCTGGGATTCCGCCAT
GGGTCTGCCTGGAATGATGCACTTGGAGgAgCTCAGcATGGGATGcGGAA
CTTGTCTAGcGCTCCTCAGATCCAcAgcTGCCTGtAgAcacacacacac
acacacacacacAAAcAcGcATGCACGCACGCCGGCACACACGCTATTA
CAGAGATGGCCACGGTAGCTGTGCTCGAGGGCCGAGTGGAGTGTCTAGAA
CTCTCGGGGGTCCCTCTGCAGACGACACTGTCCATCCCCCGGTGCC
TGAAGGGCTCCTCACTCTCCATCAGGATCTCTCCAAGCTGCTGACCTGG
AGAGGAAGGGGCTGGGACAGGCGGGGACACTCAGACCTCCCTGCTGCC
CTCTCTGCTGGGCTTGGACGGCTCCCCCTTCCACGGGTGAAGGTGC
AGTGGGGAGAGGGCACCCCTCACCTCCAGACCCAGACCAAGCCCC
GTGGCAGGGGACGCTGTGAGCCTCCAGCCAGATGCAGGTGGCCTGGGGT
GGGGGTGGAGGGGGCGGGAGGTTATGTTGAGGCTGTATTCATCTGTG
TAATATHTCGGCGGTGGGACCCATCTGACCGTCCCTCGGTGAGTCTCCC
TtttctctctctggggatccgagtgaATeTGGGTCGATCTTCTCTC
CGTCTCTCCGACTGGGGCTGAGGTCTGAACCTCGGTgGGGTCCGAAGA
GGAGGCCCTAGGCC*GGCTcTCAGCCCTCCAGCCGACCCGCCCTCT
TGACACAGGGTCCAGCTAAGGGCAGACAT***GGTGCTAGTCCAGGGCC
AGGCTcTGAGACCCAAGGGCGCTGCCAAGGAACCTTCCCCAGGGACC
CTGGGAGCAAAGCTCCTCACTCAGAGCCTGCAGCCCTGGgGTCTGAGGAC
AAGGAGGGACTGAGGACTGGGCGTGGGGAGTTCAGGcGGGACACCGGTT
CCAGGGAGGTGACAAAGGGCTGGGAGGGGGCGGACCGGTGCCGAGACTC
CTCTGGGCCCTGTGGCTCGTGGTCTTGTGAGGACCTGAGGG*CTGA
GGGGCCCTGGGCCTAGGACTTGCAGTGAAGGAGGCAGGGAGTGTCCCT
TGAGAACGTGGCCTCCGCGGGCTGGGTCCCCCTCGTGTCCAGCAGGGA
GGACACCCAGAGCAAGCGCCCAAGGTGGGCGGGGAGGGTCTCTCACAG
GGGCAGCTGACAGATAGAC*GgcccCGCCAGACAGATGCTTGATCCTGG
TCag***TACTGGGTTCGCcACTTCCCTGAACAGGGGCCCTCCGAACAGA
CACAGACGCAGACCaggCTCAGCACAgAAAATGCACTGACACCCAAAACC
CTCATCTGgGGCCTGGCCGGCATCCCGCCCAAGGACCCAAAGGCCCTGC
CCCCTGGCAGCCCTGGACACGGTCTCTGTGGCGGTGGGGTcGGGCTG
TGTGACGGTGGCATCGGGGAGCCTGTGCCCTCCCTGAAAGGGCGGAG

10

20

30

【 0 1 2 7 】

【化 2 4】

	<p>AGGCTCAAGAGGGGACAGAAATGTCCTCCCTAGGAAGACCTCGGACGGG GGCGGGGGGGTGGTCTCCGACAGACAGATGCCCGGGACCGACAGACCTGC CGAGGGAAGAGGGCACCTCGGTCCGGTTAGGCTCCAGGCAGCAGGAGGA GCGAGGCTGGGAGGGTGAGGACATGGGAGCCTGAGGAGGAGCTGGAGACT TCAGCAGGCCCCAGCTCCGGGCTTCGGGCTCTGAGATGCTCGGACGCAA GGTGAGTGACCCACCTGTGGCTGACCTGACCTGACCAGGGGGACAAG GCTCAGCTGGGACTCTGTGTCCCATCGCTGCACAGGGGATTCCCCTG ATGGACACTGAGCCAACGACCTCCGCTCTCTCCCGACCCCAAGGTCAGC CCAAGGCCACTCCACGGTCAACCTCTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTC GGCACCAACAAGGCCACCTGGTGTGTCTA</p>
--	--

配列番号 3 2	<p>GCCACGCCACTCCATCATGCGGGGAGGGATGGGCAGACCTCCAGAAA GAAGCTCCCTGGGGTGACAGGTTAACAGCTTCCCAGACACAGCCAGTACT AGAGTGAGGTGAATAAGACATCCTCCTTGCTTGTGAAATTTAGGAAGTGC CCCCAAACATCAGTCATTAAGATAAATAATATTGAATGCACCTTTTTTTT TTTATTTTTTTTTTGTCTTTTAGGGCCTAATCTGCAGCAtatggaagt tcccaggctacaagtcgaaccagagctgcagctgccagctacatcacag ccacagcaacaccagatccgagccacatctgtaetaaacactgcagtca cagcaacgccagatccttaaccattgagtgaggccaggatcaaaccca catctctatgatactagtctgttctgtaaacactgaccaCAAGGGGA ACTCCTGAATGCAATATTTTTGAAAATTGAAATTAATCTGTCACTCTTT CACTTAAGAGTCCCCTTAGATTGGGGAAAATTTAAATATCTGTCACTTTA GTGCATCTTTGCTCATATGATGTGAATAAAATCCAAAATCCATATGAAT GAAGCATCAAAATGTACATGAAGTCAGCCTGACCCTGCACTGCCCTCACT TGCTCATGTACCCCCACCTCAAAGGAAGATGCAGAAAGGAGTCCAGCC CCTACACCGCCACCTGCCCCACCACTGGAGCCCTCAGGTCCTCCACCT CCTTTTCTGAGCTTCAGTCTTCTGTGGCATTGCCTACCTCTACAGCTGC CCCCTACTAGGCCCTCCCCCTGGGGCTGAGCTCCAGGCACTGGACTGGGA AAGTTAGAGGTTAAAGCATGGAATAATCCAAAAGCCACCAAGTCCAGGCT GCCCCCAACCCACCGCCACGTCCAAAAGGGGCATCTTCCAGACTCTCT GGCTGGTATTGGTAGGACCCAGGACATAGTCTTTATACCAATTTCTGCTGT GTGCTTAGGAAAGAaactctccctctgtctcagttctcatcaa taaaAGGAGCAGGCCAGGTTGGAGGGTCTGTGACGTCTGTGAAAGCAGCA GGATTCTCTCCTTTTGTCTGGAGGAGAAGTATCCTTCAACCCAGGAT CAACAGAGAAGCCAAGGTCTTCAGCCTTCTGGGGACCCCTCAGAGGGAA CTCAGGGCCACAGAGCCAGACCTGTATGCCAGAACCTTTGTATATGCC AGACGGAGACTTCATCCCCCTCCTCCTCAGACCTCAGGCCCAACAGT GAGATGCTGAAGATATTAAGAGAAGGGCAAGTCAGcTTAAGTTTGGGGGT AGAGGGGAACAGGGAGTGAGGAGATCTGGCCTGAGAGATAGGAGCCCTGG TGGCCACAGGAGGACTCTTTGGGTCTGTGCGATGCACACAGGGCGGCC GGGGGCATGTTGGAGCCCGGCTGTTCTTACCAGAGGCAGGGGGCACCT CTGACACGGGAGCAGGGCATGTTCCATACATGACACACCCCTCTGCTCCA GGCAGGTGGGTGCCGGCACAGAGGAGCCAGGGACTCTGAGCAAGGGGTC CACCAGTGGGGCAGTTGGATCCAGACTTCTCTGGGCCAGGAGAGTCTAG CCCTCAGCCGTTCTCTGTCCAGGAGGGGGTGGGGCAGGCCTGGGCGGCC AGAGCTCATCCCTCAAGGGITCCCAGGGTCTGCCAGACCCAGATTTCCG ACCGCAGCCACCACAAGAGGATGTGGTCTGCTGTGGCAGCTGCCAAGACC TTGCAGCAGGTGCAGGGTGGGGGGTGGGGGCACCTGGGGGCAGCTGGGG TCACTGAGTTCAGGGAAAACCCCTTTTTTCCCTAAACCTGGGGCCATCC CTAGGGGAAAACCACAACCTTCTGAGCCCTGGGCAGTGGCTGCTGGGAGGGA AGAGCTTCATCCTGGACCTGGGGGGGAACCCAGCTCCAAAAGGTGCAAGG GGCCCAGGTCCAAGGCTAGAGTGGGCAAGCACCGCAATGGCCAGGGAGT GGGGGAGGTGGAGCTGGACTGGATCAGGGCCTCCTTGGGACTCCCTACAC</p>
----------	--

10

20

30

【 0 1 2 8】

【化 2 5】

CCTGTGTGACATGTTAGGGTACCCACACCCCATCACCAGTCAGGGCCTGG
 CCCATCTCCAGGGCCAGGGATGTGCATGTAAGTGTGTGAGTGTGTGTG
 TGTGGTGTAGTACACCCCTTGGCATCCGGTTCGGAGGCCTTGGGTTCCTC
 CAAAGTTGCTCTCTGAATTAGGTCAAAGTGTGAGGTCCTGATCGCCATCA
 TCAACTTCGTTCTCCCACTCCCATCAITATCAAGAGCTGGGGAGGGTC
 TGGGATTTCTTCCACCCACAAGCCAAAAGATAAGCCTGCTGGTGATGGC
 AGAAGACACAGGATCCTGGGTGAGAGACAAAGGCCAGTGTGTACAGCGA
 GAGAGGCAGCCGACTATCAGCTGTACAGAGAGGCCTTAGTCCGCTGAA
 CTCAGAGGACAGTACTCTCTTCCACTGGGCACTGGCCCCCTCCACAG
 CGCCCCAGGCCAGGGAGAGGGCTCACAGCTTAGAGATGGCCCTGCTG
 AACAGGGAACAAGAACAGGTGTGCCCATCCAGCGCCCCAGGGTGGGAC
 AGGTGGGCTGGATTTGGTGTGAAGCCCTTGAGCCCTGgAACCCAAcCACA
 GCagGGCAGTTGGTAGATGCCATTTGGGGAGAGGCCCCAGGAGTAAGGGC
 CATGGGCCCTTgAGGGGGCCAGGAGCTGAGGACAGGGACAGAGACGGCCC
 AGGCAGAGGACAGGGCCATGAGGGGTGCACTGAGATGGCCACTGGCAGCA
 GGGGCAGCTGCCAACCCGTCCAGGGAACCTATTTCAGCAGTCAGCTGGAGG
 TGCCATTGACCCTGAGGGCAGATGAAGCCAGGCCAGGCTAGGTGGGCTG
 TGAAGACCCAGGGGACAGAGCTCTGCTCCCTGGGCAGCACTGGCCCTCA
 TTCTGCAGGGCTTgACGGGATCCCAAGGCCTGCTGCCCTGATGGTAGTG
 GCAGTACCGCCAGAGCAGGACCCAGCATGGAACCCCAACGGGACGCA
 GCCTGCGGAGCCACAAAACAGTAAGGAGCCGAAGCAGTCATGGCACGG
 GGAGTGTGGACTTCCCTTTGATGAGGGGCCAGGCATGAAGGACAGAAATGGG
 ACAGCGGCCATGAGCAGAAAATCAGCCGGAGGGGATGGGCCTAGGCAGAC
 GCTGGCTTTATTTGAAGTGTGGCATTGTCTGGTGTGTATTGTTGGTA
 TTGATTTTATTTTAGTATGTCACTGACATACTGACATAATTATGTAACGAC
 ATATTATTATGTTTTTAAGAAGCACTCCAAGGGAACAGGCTGTCTGTAA
 TGTGTCCAGAGAAGAGAGCAAGAGCTTGGCTCAGTCTCCCCAAGGAGGT
 CAGTTCCTCAACAGGGTCTAAATGTTTCTGGAGCCAGGCCTGAATCA
 AGGGGTCATATCTACACGTGGGGCAGACCCATGGACCATTTTCGGAGCA
 ATAAGATGGCAGGGAGGATACCAAGCTGGTCTTACAGATCCAGGGCTTg
 ACCTGTGACGGGGCGCTCCTCCAGGCAAGGGGAGAAGCCAGCAGGAAGC
 TTTCAGAACTGGGGAGAACAGGGTGCAGACCTCCAGGGTCTTGTACAACG
 CACCCTTTATCCTGGGTCCAGGAGGGTCACTGAGGGATTTAAGTGGGG
 GACCATCAGAACCAGGTTTGTGTTTTGAAAAATGGCTCCAAAGCAGAGA
 CCAGTGTGAGGCCAGATTAGATGATGAAGAAGAGGCAGTGGAAAGTCGAT
 GGGTGGCCAGGTAGCAAGAGGGCCTATGGAGTTGGCAAGTGAATTTAAAG
 TGGTGGCACCAGAGGGCAGATGGGGAGGAGCAGGCACTGTATGGACTGT
 CTATAGAAATCTAAAATGTATACCCTTTTTAGCAATATGCAGTGAGTCAT
 AAAAGAACACATATATATTTAAATTGTGTAATTCCACTTCTAAGGATTCA
 TCCCAAGGGGGAAAAATAATCAAAGATGTAACCAAAGGTTTACAAACAAG
 AACTCATCATTAACTTCCCTTGTGTTATTTCAACGATATTATTATTATT
 ACTATTATTAATTATTATTATThgtcttttgcatttttagggccactc
 ccacggcatagagaggtcccaggttaggggtcaaatcggagctacaget
 gccggcctacgccagaccacgaacgcaggatctgagccacagcaatg
 caggatctacaccacagctcatgtaacgtggatccttaaccaatgag
 tgaggccagggatcgaacctgtaactcatggttcttagtcggattcatt
 aaccactgagccacgacaggaactccAACATTATTAATGATGGGAGAAAA
 CTGGAAGTAACTAAATATCCAGCAGAAAGGGTGTGGCCAAAATACAGCAT
 GGAGTAGCCATCATAAGGAATCTTACACAAGCCTCCAAAATTGTGTTTCT
 GAAATTGGGTTTAAAGTACGTTTGCATTTAAAAAGCCTGCCAGAAAATA
 CAGAAAAATGTCTGTGATATGCTCTGGCTGATAGGATTTTGTCTAGITTT
 TAATTTGGCTTTATAATTTTCTATAGTTATGAAAAATGTTCAAGAAGA
 TATATTTCAITTTAGCTTCTAAAAATAATTATAACACAGAAGTAATTTGTG
 CTTTAAAAAATATTTCAACACAGAAGTATATAAAGTAAAAATTGaggagt
 tcccatctggtcagtgattaacaacccaactaglatccatgaggata
 tggatttgatccctggccttgcctcagtggttgggatccagtttgcctg

10

20

30

【 0 1 2 9】

【化 2 6】

```

tgagctgtggtgtaggtgcagacacagcactctgggtgctgtgact
tggcgtaggcggcagctacagctccattggacccttagctgggaacc
tccatagcctgagatagcggcccTAAAAAGTCAAAGCCAAAAAATAGT
AAAAATTGAGTGTCTACTTACCACCCCTGCCACATCTTATGCTAAAA
CCCGTTCTCCAGAGACAAACATCGTCAGGTGGGTCTATATATTTCCAGCC
CTCCTCCTGTGTGTATGTCCGTAACACACACACACACACACACAG
CACACACACACACAGTATCTAATTAGCATTGGTATTAGTTTTTCAAAG
GGAGGTCATGCTCTACCTTTTAGGGCGCAAATAGATTATTTAAACAAATC
TGTGACATTTTCTATATCAACCCATAAGATCTCCCATGTTCTTGGAAAG
GCTTTGTAAGACATCAACATCTGGGTAAACCAGCATGGTTTTTAGGGGT
TGTGTGGATTTTTTCATATTTTTTAGGGCACACCTGCAGcatatggagg
ttcccaggctagggttgatcagagctgtagctgccgcctacaccaca
gccacagcaacgccagatcctaaccactgagaaaggccaggattgaa
cctgcactcctatggATGCTGGTCAGATTTATTTCTGCTGAGCCACAACA
GGAACCTCCCTGAACCAGAAATGCTTTTAAACCATTCCACTTTGCATGGACAT
TTAGATTGTTCCATTTAAAAATACAAATTACAgggagttcccgtgagg
ctcagtggaacgaattggactaggaccatgagggttcgggttcgatcc
ctggcctgctcgtgggttaagatccagcatgatggatattggg
taggtcgcagacgtgctcggatcccaggtgctgtgctctggcgtagg
ccggcaacaacagctccgattcgaccctagccTGGgaacctccatgtc
cacaggagcagccctaGAAAAGGCCAAAAGACAAAAAATAAAAAATTA
AATGAAAAAATAAAAAATAAAAAATACAAATTACAAGAGACGGCTACAAGGAA
ATCCCCAAGTGTGTGCAAAATGCCATATATGTATAAAATGTACTAGTGTCT
CCTCGCGGAAAAGTTGCCTAAAAGTGGGTTGGCTGGACAGAGAGGACAGG
CTTTGACATTCTCATAGGTAGTAGCAAATGGGCTTCTCAAATGTCTGTCC
AGTTTACACTCACCATAGCAAATGACAGTGCCTCTTCTCACCCTTG
CCAATAATGTGACAGGTGGATCTTTTTCTATTTGTGTATCTGACAAGCA
AAAAATGAGAAACAggagttcctgtggtgagtgagacaatctgac
taggaaccatgaaattcgggttcaatccctggcctcactcagtggtaa
aggatccagggttcagtgagctgtgggttaggtcgcagacacagtgcaa
attggccctgtgtgctgtggttagggccgagctatagctccaatt
ggaccctagcctgggaacctccftalgcctgtgggtgaggccctAAAAAA
AAGAGTGCAAAAAAATAAAGAACAAAAATGATCATCGTTTAAATCTT
TTATTTGATCATTTGGTGAACCTTATTTTTCTTTTTATATTTTATGACTG
ATTTTATTTCTCTATGAATTTACCGTTCATAGTTTTGCCTGGGTGTTTT
TACTCCGGTTTTAGTTTTGGTTGGTTGTATTTTCTTAGAGAGCTATAGAA
ACTCTTCTATTTTGAATAGTAAATCCTCATTAAGTATTTGTGTGCA
AAAAATTTCCCTGATCTGTTTTATGCTTTTGTGTGGGGTCTTTTACG
AGAAAAGCCTTTTTAGTTTTTACACCTCAGCTTGGTTGTTTTTCTTGATTG
TGTCTGTAATCTGCGGCAACATAGGAAACACATTTTTACTTTAGTGTTT
TTTTCTATTTTCTCAAGTACGTCCATTTGTTTTGGTGTCTGATTTTACT
TTGCCGTGGGTTTTGTTTTGTGTGGCAGGAATATAAACTTATGTATTTTC
CAAATGGAGAGCCAATGGTTGTATATTTGTTGAATTCAAATGCAACTTTA
TCAAAACACAAATCATCGATTATCACAACCTTCTCTGGTTTTATGATC
TAATGATCAATCCTGTCCACGCTGTTTTAATTAATTTAGCTTTGTGGA
TTTTGGTGCCTGGTAGAGAACAAAGCCTCCATTATTTTCATTCAAAATAG
TCCCGTCTATTATCTGCCATTGTGTAGTATTAGACTTTAAATCAATTT
ACTGATTTTCAAAGTTATTCCTTTGGTGTATGTTGAATACTTTTACTTTC
ATAAGGTACATGGATTTCATTGTGGGGAATTGATGTCTTTGCTATTGTGG
CCATTTGTCAAGTTGTGTAATTTTTACCCATGCCAACTTTGCATATTGT
ATGTGAGTTTATCCCAGGGTTTTTAAATAGGATGTTTATTGAAATTGTCA
GTGTTTCCACAATTTTCATCGCCTCAGTGCTTACTGTTTGCATAAAAGGAA
ACCTACTCACTTTTGCCTATTGCTCTTGTATTCAATCATTTTAGTTAACT
CITGTGTTAATTTTGGAGTTTTTTCAGCTGACTGTCTGGGGTTTTCTTTA
ATAGACTAGCCCTTTGTCTGTAAAGAAATAATTTATCGAATTTTTCTTAA
CACTCACACTCTCCCACCCCCACCCCGCTCATCTCCTTTTATTGGGTC

```

10

20

30

【 0 1 3 0 】

【化 2 7】

AAATCTGTAGAATACAATAAAAAGTAAGAGTGGGAACCTTAGCCTTAAAGT
 CGATTTTGCCTTAAATGTGAATGTGCTATGTTTCGGGACATTCCTTT
 ATCAAGTTGCGGATGTTTCCCTAGATAAATAACTTAATAAAAAGACTGGAT
 GTTTGCTTTCTTCAAAATCAGAATTTGTGTGAATTTATATTGCTATTCTGT
 TTAATTTTGTTCAAAAAATTTACATGCACACCTTAAAGATAACCATGAC
 CAAATAGTCTCTGCTGAGAGAAAAATGTTGGCCCAATGCCACAGGTIA
 CCTCCCGACTCAGATAAACTACAATGGGAGATAAAATCAGATTGGCAAA
 GCCTGTGGATTCTTGCCATAACTCTCAGAGCATGACTTGGGTGTTTTTCT
 CTTTTCTAAGTATTTAATGGTATTTTTGTGTTACAATAGGAAATCTAGG
 ACACAGAGAGTGATTCAATGAGGGGAACGCATTCTGGGATGACTCTAGGC
 CTCTGGTTTGGGGAGAGCTCTATTGAAGTAAAGACAATGAGAGGAAGCAA
 GTTTCAGGGAACCTGTGAGGAATTTAGATGGGGAATGTTGGGTTTGGAGT
 TTCTATAGGGCACGCAAGCAGAGATGCCTCAGGAGGAAGAAGGAGCATA
 AATCTAGAGGCAAAAAGAGAGGTCAGGACTGGAAATAGAGATGCGAGACA
 CCAGGGTGGCAGTCAGAGAGCACAGTGTGGGTGAGAAGACAGTGGAAAGAA
 CACAAGGGACAGAGAGGGATCTCCAACCTCAGTGGGATGAGGGCCTTGT
 GGCCTTGACCTGAGAGATTTCCAGGAGTTGAGGGTGGGAAGGAGAGGGCT
 CCTGCACATGTCTGACATGAAACGGTGCACAGCATATGGGTGCTTGAA
 GACATTGTTGGACAGATGGATGGATGATGGATGATGGATGAATGGATGGA
 TGGAAGATGATGGATAAATGGATGATGGATGGATGGACAGAAGGACAAAAG
 AGATGGACAGAAAGACAGTGTGATCTGAGAGAGCAGAGAAGGCTTCATGAAA
 GGACAGGAACCTGAACCTGTCTCAGTGGGTGGAGACAATGGTGTAGGGGGTT
 TCCACATGGAGGCCACCAAGGGTCAGGAATAATCTAGTGTCCACAGGCCCA
 GGAAGGAAGCTGTCTGCAGGAAATTTGTGGGAAGAACCCTCAGAGTCTTA
 AATGAGGTCAGGAGTGGTCAGGAGGGTCTGATCAGGTAAGGACTCATGTC
 CATCATCACATGGTCACCTAAGGGCATGTAGCTCTCAGCATCTCCATCAG
 GACAGTCTCAGAATGGGGCGGGGTCACACACTGGGTGACTCAAGGCGTG
 GGCTATGCCTGCCTCGGACGTGGGCCCTGGGCATGGGGACACCTCCAGACC
 ATGGGCCCGCCAGGGCTGCACTGGcctctgggtggctagctaccgtcc
 aagcaacacaggacaagccctacctgctcaacctgtgcccgaacgc
 ccattgtctctgctccagcccggcccagggaacaggactcaggtgct
 ageccaatgggtttgtcagcctcagtcagcgtggTATTTCTCCGGC
 AGCGAGACTCAGTTCACCGCCTTAGGttaaagtggtctcatgaatttct
 agcagctctgactctgctatgcccggaaagtcactttgtcgtggtggg
 ctgttccccgtgcccctggagaatcaaggattgccaactttctctgtg
 ggggagtggtgctgtcttgggtgaccagcaggaaggccccaaaagcag
 gagcagctgcctccagAATACAACCTGTCCGGCTACAGCTCAAACAGGAGGC
 CTGGACTGGGGTTAACCACCAAGGGCGGCACGAAGGAGCGAGGCTGGGAG
 GGTGAGGACATGGGAGCCTGAGGAGGAGCTGGAGACTTCAGCAGGCCCCC
 AGCTCCGGGCTTCGGGCTCTGAGATGCTCGGACGCAAGGTGAGTGACCCC
 ACCTGTGGCTGACCTGACCTCAGGGGGAACAAGGCTCAGCCTGAGACTCTG
 TGTCCCATCGCCTGCACAGgggattcccctgatggacactgagccaacg
 acctcccgtctctcccagccccaggtcagcccaaggcccggccccacgg
 tcaacctctcccctctctctgaggagctggcaccacaaggccacc
 ctggtgtcttaataagtgactctaccggAAGGGCGAATTCAGCACAC
 TGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAG
 CTTGAGTATCIA

10

20

30

配列番号 3 3	<p>agatcttaaccaccgagcaaggccaggtcgaacccgatcctcatg aatcctagttgggtcgttaaccctgaaccacaatgggaactctGTCT TTCACATTTAATTCAACAACCTCTCCAGGATTCTGGGGTGGGTTGGGAAT CCTAGGTACCCACTGGGAAAGTAATCCAAGGGGAGAGGCTCACGGACTcT AGGGATCGGCGGAGGAGGGAAGGTATCTCCAGGAAACTGGCCAGGACAC ATTGGTCTCCGCCCTCCCTTCTCCACTCCTCTCCAGACAGGACTG</p>
----------	---

【 0 1 3 1 】

【化 2 8】

TGCCACCCCTGCCACCTTTCTGGCCAGAACTGTCCATGGCAGGTGACC
 TTCACATGAGCCCTTCCCTGCCTGCCCTAGTGGGACCCCTCCATACCT
 CCCCCTGGACCCCGTTGCTCTTTCTTTCCAGTGTGGCCCTGAGCATAACT
 GATGCCATCATGGGCTGCTGACCCACCCGGGACTGTGTTGTGCAGTGAGT
 CACTTCTGTGCATCAGGGCTTTGTAATTGATAGATAGTGTTCATCATC
 ATTAGGACCGGGTGGCCTCTATGCTCTGTTAGTCTCCAAACACTGATGAA
 AACCTTCGTTGGCATAGTCCAGCTTCTGTGCCCATCCATAAATCTTG
 ACTTAGGGATGCACATCCTGTCTCCAAGCAACCACCCCTCCCCTAGGCTA
 ACTATAAACTGGCCAATGGCCCTTGTGTGGTGCAGAGTTCATGCTTCC
 AGATCATTTTCTGCTAGATCCATATCTCACCTTGTAAAGTCATCCTATAA
 TAAACTGATCCATTGATTATTGCTTCTGTTTTTCCATCTCAAACAGC
 TTCTCAGTTCAGTTCGAATTTTTTATCCCTCCATCCACCCATACTTTCC
 TCAGCCTGGGGAAACCCTTGGCCCCAGTCCCATGCCCTTCTCCCTCTCG
 CCCAGCTCAGCACCTGCCACCCCTCACCTTCTGTCACTCCCTAGGACT
 GGACCATCCACTGGGGCCAGGACACTCCAGCAGCCTTGGCTTCATGGGCT
 CTGAAATCCATGGCCCATCTCTATTCCCTACTGGATGGCAGGTTTCAGAGA
 TGTGAAAGGTCTAGGAGGAAGCCAGGAAGGAACTGTTGCATGAAAGGCC
 GGCCTGATGGTTCAGTACTTAAATAATATGAGCTCTGAGCTCCCCAGGAA
 CCAAAGCATGGAGGGAGTATGTGCCTCAGAATCTCTGAGATTCAGCAA
 AGCCTTTGCTAGAGGGAAAAATAGTGGCTCAACCTTGGAGGCCAGCATCT
 GCACCACAGTTAAAAGTGGGTATTTGTTTTACCTGAGGCCTCAGCATTAT
 GGGAACCGGGCTCTGACACAAACACAGGTGCAGCCCGGCAGCCTCAGAAC
 ACAGCAACGACCACAAGCTGGGACAGCTGCCCTGAAACGGGGAGTCCACC
 ATGCTTCTGTCTGGGTACCACCAGGTCACCATCCCTGGGGGAGGTAGTT
 CCATAGCAGTAGTCCCTGATTTCCGCCCTCGGGCGTGTAGCCAGGCAAG
 CTCCTGGCTCTGGACCCAGGGTGGACCCTTGTCTCCCACTACCTGCACA
 TGCCAGACAGTCAAGACCACTCCACCTCTGTCTGAGGCCCCCTTGGGTG
 TCCCAGGGCCCCGAGCTGTCTACTCATGGTTCITCCACCTGGGTAC
 AAAAGAGGCGAGGGACACTTTTCTCAGGTTTGGCGCTCAGAAAGGTACCT
 TCTTAGGTTTGTCCACTGGGAGTCACTCCCTTGCATCTCAATGTCAGT
 GGGGAAAACCTGGGTCCCATGGGGGATTAGTCCACTGTGAGGCCCTGA
 AGTCTGGGGCCTCTAGACACTATGATGATGAGGGATGTGGTGA AAAACCC
 CACCCAGCCCTTCTTGGCGGGACCCCTGGGCTGTGGCTCCCCATTGCAC
 TTGGGGTCAGAGGGTGGATGGTGGCTATGGTCAGGCATGTTTCCCATGA
 GCTGGGGGACCCTGGGTGACTTTCTCCTGTGAATCCTGAATTAGCAGCT
 ATAACAAATGGCCAAACTCTTAGGCTTAAACAACACACATTTATTCTCT
 CTGGGTCCAGGGTCAGAAGTCCAAAATGAGTCCTATAGGCTAAAATTTGA
 GGTGTCTCTGGGTGAGCTCCTCCTGGAAGCCTTTTCCAGCCTCTAGAGT
 CCCAAGTCCTTGGCTCTGGGCCCTCCCTCAAGCTTCAAAGCCACAGAAG
 CTTCTAATCTCTCCCTTCCCTCTGACCTCTGCTCCCATCCTCATAACC
 CTGTCCCTCACTCTGACCCTCCTGCCTCCCTCTTCCCTTATAAAGACC
 CTGCAATGGGGCCACGGAGATAATCCAGGGTAATCGCCCTCTTCCAGCCC
 TAACTCCATCCCATCTGCAAAAATCCCTGTACCCCAATAATGGACCTACT
 GATGGTCTGGGGTTAGGACGTGGACAACCTTGGGGCCTTATTCATCTGAT
 CACAATCCAGTCCCAGACCCCCAGACCCCGGGCATTAGGGAAACTTC
 TCCAGTTCCTCCTCCTCTGTGTCTGCCCAGTCTCCAGGATGGGGCACT
 CCCGAGGGCCCTTCAGCTCAGGCTCCCCCTCCTTTCTCCTGGCCTCTTG
 TGGCCCCATCTCCTCCTCCGCTCACAGGGAGAGAACTTTGATTTTCAGCTT
 TCCAGGCTTACCTGTCACTCATCAAACCGCCCTTGGAGGAAGACCCTAA
 TATGATCCTTACCCTACAGATGGAGACTCGAGGCCAGAGATCCTGAGTG
 ACCTGTACATTACAGCAGGGACTGAACCCAGTCCACTACCCAACCTC
 CAGGGCTCAGCGCTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTgccttttgagggcc
 gctcccgaacatatggagattccaggctaggggtctaattggagcgt
 cgacactggcctaagccaaagccacagcaaacaggcgaagccgctctgc
 agcctataccacagctcacggcaatccggatccttaaccactgagcaa

10

20

30

【 0 1 3 2 】

【化 2 9】

	<p>agccagggaattgaacctgcaacctcatgttccctagtcaaatgttgaac cactgacctatgacgggaactcccAGGGCTCAGCTCTTGACTCCAGGTTCC GCAGCTGCCCTCAAAGCAATGCAACCCTGGCTGGCCCCGCCTCATGCATC CGGCCCTCTCCCAAAGAGCTCTGAGCCCACCTGGGCCTAGGTCCTCCTC CCTGGGACTCATGGCCTAAGGGTACAGAGTTACTGGGGCTGATGAAGGGA CCAATGGGGACAGGGGCCTCAAATCAAAGTGGCTGTCTCTCATGTCCC TTCTCTCCTCAGGGTCCAAAATCAGGGTCAGGGCCCCAGGGCAGGGGCT GAGAGGGCCTCTTTCTGAAGGCCTGTCTCAGTGCAGGTTATGGGGGTCT GGGGGAGGGTCAATGCAGGGCTCACCCCTCAGTGCCCCAAAGCCTAGAGA GTGAGTGCTGCCAGTGGCTTCCCAGGCCAATCCCTTGACTGCCTGGGA ATGCTCAAATGCAGGAACTGTCACAACACCTTCAGTCAGGGGCTGCTCTG GGAGGAAAAACACTCAGAAATTGGGGTTTCAGGGAAGGCCAAGTCCCAAGC ATAGCAGGAGCTCAGGTGGCTGCAGATGGTGTGAACCCAGGAGCAGGAT GGCCGGCACTCCCCCAGACCCCTCCAGAGCCCCAGGTTGGCTGCCCTCTT CACTGCCGACACCCCTGGGTCCACTTCTGCCCTTTCCACCTAAAACCTT TAGGGCTCCACTTTCTCCCAAATGTGAGACATCACACGGCTCCCAGGG AGTGTCCAGAAGGGCATCTGGCTGAGAGGTCTGACATCTGGGAGCCTCA GGCCCCACAATGGACAGACGCCCTGCCAGGATGCTGCTGCAGGGCTGTTA GCTAGGGCGGGTGGAGATGGGGTACTTTGCCTCTCAGAGGCCCGGCC ACCATGAAACCTCAGTGACACCCCATTTCCCTGAGTTACATACCTGTAT CCTACTCCAGTCACTTCCCCACGAACCCCTGGGAGCCCAGGATGATGCT GGGGCTGGAGCCACGACCAGCCCACGAGTGATCCAGCTCTGCCAATCAGC AGTCATTTCCCAAGTGTCCAGCCCTGCCAGGTCCACTACAGCAGTAAT GGAGGCCCCAGACACCAAGTCCAGCAGTTAGAGGGCTGGACTAGCACCCAGC TTTCAAGCCTCAGCATCTCAAGGTGAATGGCCAGTGCCTTCCCGTGGC CATCACAGGATCGCAGATATGACCCTAGGGGAAGAAATATCTGGGAGTA AGGAAGTGCCATACTCAAGGATGGCCCCCTCTGTGACCTAACCTGTCCCT GAGGATTTGACTTCCAGGCGTAAACAGTAGAACGCCCTGCCTGTGAACC CCCGCAAAGGACTGCTTGGGGAGGCCCTTAAACAGAAACACAGGCACT CCAGCAGGACCTCTGAACTCTGACCACCTCAGCAAGTGGCACCCCCGC AGCTTCCAAGGCAC</p>
--	--

10

20

配列番号 3 4	<p>AACAAGATGCTACCCACCAACAAAATTCACCGGAGAAGACAAGGACAGG GGGTTCTGGGGTCTGACAGGGTCACCAAAGAGGGTTCTGGGGCAGCAG CAACTCCAGCCGCTCAGAACAGAGCCTGGAAGCTGTACCCTCAGAGCAG AGGGCGAGAGAGAAAGGGCCTCTTGGTGGGTGACGAGGAGCAGAGGCTCA GAGGTGGGGGTTGCAGCCCCCCTTCAACAGGCCAACACAGTGAAGCAGC TGACCCTCCACTTGGAGACCCAGACTCCTGTCTCCACGCCACCTTG GTTTTAAGGTAATTTTATTTTATATCAGAGTATGGTTGACTTACAATG TTGTGTTGGTTTTCAGGTGACAGCAGAGTATTCACTTCTACATAGACTC ATATCTATTCTTCTCAGATTCTTTCCATATAGGTTATTACAGAATAT TGAGTAGATCCCTGCTGATACCCATTTTATAATTGTATATGTTAATCC CAAACCTCTAATTTATCCCTCCCAGACTATGATTCTTTATATCTCTATC TGTTTCTAATCTGTCTCCTTAAGTCAACCTAGGAGAGCAGAGGGGTCA CGTCTGCTGTCTGGCCAGCCACCTCTCCACCCAGGAATCCCTTG CATTTGGTGCCAAAGGGCCCCGCCCTAAAGAGAAAGGAGAACGGGA TGTGGACAGGACACCGGGCAGAGAGGGACAAGCAGAGGATGCCAGGGTAG GGAGGTCTCCAGGGTGGATGGTGGTCTGTCCGCAGGCAGGATGAGGCAGG AAGGGTGTGGATGTAAGTGGTGGAGGCTGGCGCATGGCCTGGAGTGTCTG AGCCCTGGGAGGCCCTCAGCCCTGGATCAGATCTGTGATTCCAAAGGGCCA CTGCATCCAGAGACCGTTGAGTGGCCCATTTGCTGAACCAATTTATAGAA CACAGGACAAGCGGTACCTGACTAAGCTGCTCACAGATTCCATGAGGCTG ATGCCAGGGTTGTCACCCCATCTCACAGGCAGGGAAACTGATGCATATAC TGCAGAGCCAGGCAGAGGCCCTCCAGTGCCCCCTCCAGCCTGTGGCCC</p>
-----------------	--

30

【 0 1 3 3 】

【化 3 0】

	CCCTCCAGTGGCTGGACACTGAGGCCACACTGGGGCACCTGTGGAGATC
--	---

配列番号 3 5	AGATCTGGCCAGGCCAGAGAAGCCCATGTGGTGACCTCCCTCCATCACTC CACGCCCTGACCTGCCAGGGAGCAGAAAGTAGGCCAGGGTGGACCCGGT GGCCACCTGCCACCCATGGCTGGGAGAAGGGAGGGCCTGGGCAAAGGGC CTGGGAAGCCTGTGGTGGGACCCAGACCCAGGGTGGACAGGGAGGGTC CCACACCCACAGCCATTGTCTCCCTCTGTGGGTTCACTGTCTCATCTC ATCTGTGGGGAGGGGGCTGATAATGAATCTCCCCATTGGGGTGGGCTTG GGGATTAAGGGCCAGTGTCTGTGATATGCCTGGACCATAGTGACCCCA CCCTCCCCAGCCATTGTGTCACTTCCGGGCTCTTGGCCAGGCCTGCCT GACATGCTGTGTGACCCTGGGCAAGATGATCCCCCTTTCTGGGCCCCAGC CTTCTCTGTCTCCGGAAGTGCTTCTGGGAAAACCTGTGGGCTGGATC CTATAGGAAACCTGTCCAATTCCTGGATGCACAGAGGGGCAGGGAGGCC TGGGCTGGAGGGGCAGGGAGGCTCGAGGTGGGAGCAGGGTAGGGGCCAG TCCAGGGCAAGGAGGTGGTGGTAGGGTG
----------	--

10

配列番号 3 6	GATCTGTGTCCATCTCAGAGCTATCTTAGCAGAGAGGTGCAGGGGCCTC CAGGGCCACAAAGTCCAGGCTCAGCCAGAGGCAATGGGGTATCGATGAG CTACAGGACACAGGCGTCAGCCAGTGTGAGGGAGAATCACCTGTGTTGT TTTCTGAGTTCCTCTTAAAAATAGAGTTAATTGGTCTTGGCCTTACGGTTT ACAATAACAACCTGCACCCTGTAACAACGTGAAGAGTACAGAAACAACAAA TGGGGGAAAAACATATTTCACTGAAAGAGCCACCGCTCATATTTTGATGG ATTTCCCTCTAGTTTAAATCCGTGTTTAAATTGTAACCTGTTAAAAACAAACA TAAATAAAGAAAATGCATCTGTAAGTTTAAAAAGTCATATCTATGGTGAT GGTTGCAAAACACTGTGAATGTTCACTTTGAAATCGTGAACCTTACGTGA TATGCATGTCCCGTTAATTAACCTCACAGGCTCAGAAATGTGGTTCATTAT TTCTTTAATTTTCTTTAATTTTATGTCCTCTGTGTGTCCTTAAACCA ACTACTTTTCAGCTCTGCTGTTTTTGACCTTCACATAGATGACATTTGT GAGTGTITTTCTTCTCAACTGGGTCTGATACCCACCCACGCTGTCTGC TGTCACTGCGGACGTGGAGGGCCACCACCCAGCTATGGCCCCAGCCAGGC CAACTGGATGAATCTGCCCCAGAGCAGGGCCACCAACTGGAGGTG CAGAGAGGGTTCTTCAAGGGCCATCATTATCCAAGGCATTGTTTCTACTG TAAGCTTTCAAAATGCTTCCCCTGATTATTAAGAAATAATAAGATGGG GGGAAAGTACAAGAAGGGAAGTTTCCAGCCAGCCTGAAGATCGTGCTGG TTGTATCTGGAGCCTGTCTTCTGACAGGCTCTATTCCCAGAGTTA
----------	--

20

配列番号 3 7	GGATCCTAGGGAAGGGAGGGCGGGGCTGGACAAAGGGGGCCTAAAGGA CATTCTCACCTATCCCCTGGACCctgctgtgctctgaggaggagca gagagggggtctgagccctttccagCTCCTCTGAGTCCCTCCTCCGAG CACCTGGACGGAAGCCCCTCCTCAGGGAGTCTCAGACCCCTCCCCCTCA GCCAGGTTGGCCTGTGTGGAGTCCCAGTAAGAATAGAATGCTCAGGGCT TCGAGCTGAGCCCTGGCTACTTGGGGGGGTGCTGGGGATTGGGGGTGCTG GGCGGGGAGCTGGGGTGTCACTAGATGCCAGTAGGCTGTGGGCTCGGGTC TGGGGGTCTGCACATGTGCAGCTGTGGGAAGGCCCTATTGGTGGTACCC TCAGACACATATGGCCCCTCAATTTCTGAGACCAGAGACCCAGTCTGGC CTTCCAGAACAGCTGCCCTGGTGGGGAGATGTAGGGGGGCTTCAAGC CCAGGACCCCAACGGCAGGGCCTGAGGCCCCATCCCCTGTCTGGGC CCAGAGCCTCAGCTATCAGGCCTATCAGAGATCCTGGCTGCCAGCTCAG GTTCCCAGGAGCCAGAGGGAGGCCAGGGTTACTAGGAAATCCGAAAG
----------	---

30

【 0 1 3 4】

【化 3 1】

GGTCTTTGAGGCTGGGCCCCACCTCTCAGCTTTCACAGGAGAAAACAGAG
 GCCACAGGGGGCAAAGGACTTGCCAGACTCACAATGAGCCCAGCAGCTG
 GACTCAAGGCCAGTGTTCGGCCCCACAACAGCACTCAGCTGCCCTTGAT
 CGTGAGGGGGCCCCCTCTCAGCCAGGCATTGACCTGTGACCTGCATCTA
 AGATTGAGCATCAGCCATTCTGAGCTGAAGAGCCCTCAGGGTCTGCAGTC
 AAGGCCACAGGGCCAGACCTCCAACGGCCAGACATCCCAGCCAGATTCTT
 TTCTGGTCAATGGGCCCCAGTCTGGCTTGGCTCCTGCAGGCCAGTGCCTG
 CCTTCTCCCTGGGCTGTGGAGTCCAGCCTTCAGTTTCCCACCCACA
 TCCTCAGCCACAATCCAGGCTCAGAGGCAATGTCCGTGGGCAGCCCTGT
 GTGACCCCTCTGTGGGTGATCCTCAGTCTACCCCTAGCAGACAGCGCAT
 GAGGGGCCCTTGAACCTGAGGGATACTCCATGTCCGAGGGGAGAAGCT
 GGCCTTCCCACCCCACTTCCAGGCCTTGGGGAGCAGAGAAAAGACCCCA
 GACCTGGGTCCCTTCTAACAGGCCAGGCCCAAGCCAGCTCTCCACCAGC
 CCCAGGGGCTCGGGTCCACGCCTGGGGACTGGAGGGTGGGCCTGTGAGG
 CGCTGACCCAGAGGCAGGACAGCCAAGTTCAGGATCCCAGCCAGGTGGTC
 CCCGTGCACCATGCAGGGGTGTACCCACACAGGGGTGTTGCCACCTCA
 CCTGACTGTCTCATGGGCCACATGGAGGTATCCTGGGTTCATTACGGT
 CAACATACCGTGTCCCTGCAGTGGCCCTCTGGGcgcagcggcgcagcg
 cacacgcacactcacaGAGGCTCCAGCCAACAGTGCCTCTAGTAG
 GCACTGTGTCACTTCTCTAAAAGGTGCAATCATACTTGTAAAGACCCA
 AGATTGTTGAGAAATCCCAGATGGAGAAAGTCTGGAAAGATCTTTTCTCC
 TTTACGGGCTGGGAAATGTGACCTGGCCAAGGTCACACAGCAAGTGGT
 GGAACCTGGCCCTGATTCCAGTCTATTCCAGTTCCTCAAGGCCCTGCCA
 GAGCCAGAGGCTGGGCCCTCTGGGGCAGAGGAGCTGGGGTCTCCCCCC
 TACACAGAGCACACAGCCCGCAAGAGAGAAGAGACACTTGGGGAGAGG
 AATCTCCAGACCAGAGATCCCAGTATGGGTCTCCTCTATGCTGACGGGAT
 GGGATGTCAAGAGGGGAGGGGGCTGGGCTTTAGGGAAACACAAAAAATC
 GCTGAGAACAAGGAGGTGCGACACACCCACCCCTAATGCTAACCTGTG
 GCCATTACTCAgact

10

配列番号 3 8
 GATCTTCTCCTAAGACCAAGGAAAACCTGGTCATACCAGGTCCACTTGTCC
 CCTGTGGCCATTGTCCTCCTTCCCAGAGAAGAAACAAGCACTTCCACTC
 CACAAGTAGCTCCTGATCAGCTTGGAAAGCCGGTGTCTCTGGGCCCTG
 GGGACACGGCAGGGGCATCAGAGACCAAAATCCTGGAACAAAGTTCAGTG
 GGTGAGGCAGGCCGGACAAGCAACACGTTATACCATAATATGAGGCAAAA
 TATAATGTGAGTCTTTATGAAAGGAAGGGGTTGCAGGTGCAACTGTTGG
 CTTAGGTGGATGGTCACCCCTGAATGGAGGAGGGGGTCCCAGGGCATGT
 GCCTGGGGAGAAGGGCTCCTGGCAGGAGGGACAGCAAGTGCAGGGCCCT
 GTGATCAAATGTGCCTGGCAAGTTGCAGGAACAGCTAGAAGGCCAGCAAG
 GTTGAACCAAGGAAGGGGTGAGGGGAGGGGCAGGGCCCTCAGGGCCTTG
 CCCAGCACCTGAGCATCTGGAGATTTGTCCAAAGTTCAAATGTACCTG
 GGCAACCTCATGCCATATACCATTCTAACTTCTGCACTTAACATCTCT
 AGGACTGGGACCCAGCCAGTCAAGCGGGGGACCCAGAGAGCTCCGGTGT
 GAACACCGAGGTGCTGGTGGGTCTGCGTGTGTGGACATAGGGCAGTCCC
 GTCCTTCTCACTAACACGGCCCGGAAGCCCTGTGCCTCCTGGTGCG
 CGGGTCCGGCCTTCCGGAGGGTACAGGCCCACTGGAGCCCGGGCACAGT
 GCATGCAAGTCCGGTTCACGGCAACCTGAGCTGGCTTGCAGGGCAGTGG
 GACTCACAGCCAGGGGTACAGGGCAGACCGGTCTGCTGCTGCGCCCTC
 CCTGGCCTGTGGCCCTGGACGTGATCCCAACAGTTAGCATGCCCGCC
 GGTGCTGAGAACCTGGACGAGGTCCGCAGGGCTCACTGGCGGGTCACTGA
 GCCCGCCAGGCCCTCTGCCCTTCTGGGGTGAACCGTGGACTCCTG
 GATGACCCCTGGACCCTAGACTTCCCAGGGTGTCTCGCGGAGGTTCTCAG
 CCAGGATCTGTGCTCTCCTCTCCATAGAGGGGACGGCGCCCTTGT
 GGCCAAGGAGGGGACGGTGGGTCCCGGAGCTGGGGCGGAGAACACAGGGA

20

30

【 0 1 3 5】

【化 3 2】

GCCCTCCCAGACCCCGCTCTGGGCAGAACCTGGGAAGGGATGTGGCCAT
 CGGGGGATCCCTCCAGGCCATCTCCTCAGATGGGGGCTGGTCGACTAGCT
 TCTGAGTCCCTCCAAGGAACCGGGTCTCTAGTCATGACTCTGCCAGAT
 GAAGAAGGAGAGCACTTCTCCTCAGGAGGATCTGAGCTTCTTAAAT
 TAGAATCAGCTCTTGGCTTCTACCCCTAAAAAAGGTACAGAAAATTT
 GCACCTTGATCCAGTATCAGGGGAATTTATCAATCAATGTGGGAGAAAT
 GGCATCTTTACCACACTGAATCTTTCAATCCATGAATATCCTCTCTCT
 TCCATGCATAGGTTTTAATAATTTCTCAATGGAGTTAATGTAAAGTTTTCC
 TCATAGACAAITGCCTITGGACATCTCTTAGACTCATCTCTAGTAAACT
 GATATTTTAAATGCAATTATAAAATGTATCCTGCTTAATGTTATTTCTA
 TTCATTTGCTGTTATATAGAGATACAATGAGTTTCCACATTTGAAAAGCTGG
 ATCTGGTAAATGGCTACCCCTTTTTTATAGAITCTATTAATTTTTATAC
 ATTCTGTGGGACTTGCTACATACTTAATCATGTACCTGTGAAGAATGAC
 AATTTGGTTGCTACCCCTCCCAATCTTATATGTCTCATTCTTTCCCTCT
 GCTGGTACTCTGGCAGCAGCAGGGAAGATAATGGGCCTCCTTATCTTGT
 ACAAAGGATGTTTTTAAAGATTTCTGTTATAAAACATAACGCTTCTGGT
 TTTCTTAAAGATTCTCTCACCAGCTTAAGAAAATTTTCTTATACTCTGT
 ATGATAAATGGGTTTTGACAATCATTGTGTCATTTTACCTAGTGTIT
 CICTGCATCTTATATGCTTTTTCTCCTTAAATCCTGAAAATTTGTTTCCA
 TTTTTCAACATTGAACCAATCTTACATTCCTGGAATGGATGGACCAGAC
 TAGTCCACATGTTTATCTGCCCAATGGCTAGATTTTGTGTTCaatatt
 tggcagaatggtgcatctatattctGAGTGAGACAGAGCTGCCCTTG
 TTAGGTTTTCACAACCGAGGTTGTGTAGCTTCATAAAATGAGACGTTTTAT
 TCTCTAAAAGAATTTGTTTGGCTTCTCTGGATGAATTTGTGTAAGGTTAGA
 ATTGCTTACCAGTGAagatctCGGGgCCAGTTCTTCTTAGGGGAAGATT
 TTCAACAATTAAGCTCAATGCCTTTAGAAGAACTGAGAGITTTCTATTATT
 TCTTGAGTTAAATATATGTATTTAATTAGACTTCTAGGAATAGTCTCAT
 TTCATCTCAAATAATTGACATATGCTATTAAGCAGATTCTCATGAACCA
 TTGTAGGTATTCCAGGCTTAGAAAAATGTTCCCTTTGCATCCCTAATGT
 GTTAAATTTACCTTCTTTCTTTGTTCTTGAGAAAATCACCAAAATCAT
 TTTCAATTTCAGTCATATCCCAAAGCAACCAACTCTCCTACCTTCTGTIT
 TATCATCCCTGCTGGATTTTTGTTATCTACTTTCAGTATTTGTTCTTC
 CCTTTCTTCTATTCCCTCATTCCTTTTTCCCTTGTITTTAACTTTCTGA
 GATATATGCTTATGCTTCTTATTGAAGCCTTTTTATTTCTTTTTTTTT
 TTTTGGTCTTTTTGTCTTTTGTGTTGTTGTTGTTGCTATTTCTGGGCCG
 CTCCCAGGCATATGGAGGTTCCAGGCTAGGAGTCAATCGGAGCTGTA
 GCCACCGGCTACGCCAGGCCACAGCAATGCGGGATCCGAGCCGCGTCT
 GCAACCTACACCACAGCTCATGGCAACCGCGGATCGTTAACCCACTGAGC
 AAGGGCAGGAACCGAACCCGCAACCTCATGGTTCCAGTCCGATTCGTA
 CCACTGTGCCACAACAGGAACCTCCGCTTTTTATTTTCTATAAAAAATTC
 TATGTACATTTAAGGTTATAGGTTTCTTCTATGTACCCATTGGCTGT
 ATCTCAGGGTCTGTGGAGTGAATTCATTTATTGTTCAAGTCAATATGT
 CTTCTGATTTTCAAATTTGAATACCTCTCAAATCAGTAGGTTGAATATT
 CTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTCTTTCAGCCAGGT
 CCATGGCATGCAGAAATCCCAGGCCAGGAATCAAATCTCACCATGGCA
 GTGACAATGTCCGATCCTTTACCCACTAGGCCACCAGGGAACCTGGGAG
 CATATGTTTTTATTTCCGACATCTGAGGATGCCTAGTATGTCTTCATTA
 TTGATTTCTAGTTTGGCACTGATTTCTAGTATTTGCTCATAGAGTGTAT
 GCTCAATGGTTTTGGTCAATTTGAAATGATTTAGTCTGCTTATGACCC
 AGTATGTGGTCAATTTGTTCAATGTTCTTTTTCTGCTTGAAGAGAACCTA
 CATGCTGTAACCTCGGGTGCATGTTCTGTATATAAGTCTATAGGCTGAGC
 CGGGGGAGCCTTCTAATCTGCCGTTATCTTCTCGAGTTATTCTAGGTAC
 TATTTCTTAGCCATAAACCTTTAAATTTGATATCAATATAATGACCCCA
 GCCCGCTTAGGGTCGGCACCTCATGTTATCTTTTCCATCCATTTAATCC
 CTCCCCACTGTTTTGGCCACACCCGTGGGATATGGGAGTTCTGGGCCAA
 GGATCaGATCTGAGCCGACCTGCCACCTATGCCACAGCAgagcaatga

10

20

30

【 0 1 3 6】

【化 3 3】

tggatcttaaccactgcaccacactgggattgaaccaagcctcagc
 agcaaccaagctactgcagagacaacaccagatccttaacctgctgtgc
 catageggaaTTTCCATCCATTTACTTTCAAGCCAGCTGAATAACCTAG
 CCCACCATGCCCTGGACATGGGTGCTCTGCTTCAAATGATTTTGTTCAGTC
 AGCATCCATCTCTGAAATGTGTGCCAAGCATTATATGCATGCAAGAGTC
 ATGTTGGCACTTCTATCATTTCCAACAGTTCAGTAGCCTTTGTATCATGA
 CATTTTTGGCCTTTTTCTCAATAATTTGAGGCTGAGCAGACTGGCCGT
 GCCCTGTCCATGCTTCCAGAGCCTGTGTGCAGACTTCTGCTTAGACAG
 AGACAGCTAACCATCCTGCAGTGCCAGAAAACCCAACTCAAAGACCCTC
 AAGTAAGGAAGGATTTATTGGCTCACGTAATCTGGAATCCAGGCATGGGG
 TATTAGGGCCACCTGAACCAAGAGGCCCTGGCCCTGTTCTTAAGCTTCT
 TCTGCCCTGCCCTCGTTCTGGAAGTGACCCTGAAGGACAGCAATGAAGG
 GCAGCTCCCCAGGGACAGATGACTGAGAGGTTCCATTTCAAGTCCAACT
 GGCCTAGATTGAGAGGCAGCAAGAAATATGGACCTACAGTGAGTCACAGG
 ATTTACAGTGGTTTTGGCTGGGTTGTCAGTGTACAGGCTAAACATTTGG
 GTCCCTCCAAAATTAACATGTTGCCACTTAACCACCAAAATCatggtat
 ttgggggtggggccttggaggttaattagtttagaaAGAATGAAGAGGG
 GGCCCTTGTGATGGGACTAGTGCCTTTATAGAGAGAGAGAGAGGG

40

【 0 1 3 7】

50

【化 3 4】

<p>配列番号 3 9</p>	<p>CACCTCATCCCCAACCACTGGATGGTGGCAAGTGGCAGGCTGAGAGGCT GCATATGAGCTCATCAAGAGGGTCCCCACCCACAGAGGCTGACCCAGCT GCCACTGCCACCTAGTGGCTGATCGGCCAAGAGCAGGAGCCCGAGGGGCA GCTCCATTCCCTGGGGCGGCCAGGGAACCACTGGTGGTAGGACAATTCC ATTGCACCTCATCCATCAGGAAAAGGTTTGCCTTCCCTGGCAGTAATGCA TCTTCCATAACATGGTCCCTGGCCTCTTGAATGGCTTGGCCACCGTCA TGGCTCACCCACAAAGCCTTGTGTCTCAGCAAGGAACTTATCCACAGC AAAGGACTTGCAGCCTGGAATGAAGTGGTCTGACTACATACCCCATGGCC CAGAAGTAGTGGTCTATTGCAAAGTGGAGTGGCTTACCCAAGACTCAGT TGTGCCAAAGTTGAGAGATAGCATCCTAAAATATGGGCTTATGTCTCACT GGCTGAGGTTTATTCTTTGAATCAAAGACAATTATATGGTGTGGTCCCCC CAGAGATAGAATACATGAGTCTGGGAATCAAGGGATAGAAGTAAGAAGAG ATTTTGTACCATTAATCCCAATAACTCGCCCAAAGAATATTGTCTTCT GTCTGGCAGCTCTGCTGCTTGGCAATAACTTCTAGAAATATAATGTCT CCACCAGGGGACTCCACAACGGTTCATTGATTTGAAGCCAATGGGCAGA GGAGGGGCTGCCTACTGGTCCGACTGGTCCAGCCCTGATTACTAAGGAGA AATCAGGCAACTTCAACAAAATAAGGCAGGGGGGACTTTGTCTAGAACC CAAAGCACTAAGCATCTTAGTACTTTTGTCTCAGAGCCTCAAGAAC AAAGATTTAGCCCTCAGCACCACAGGTAAGAAAGAAAGGTAATCCAGCT GAGGACAAGAGAAAATATTGAATGGATAGAGGAAGAAAGAAATTATAGATA TCAACTATGGCCTCATGACTAGAGTCTCCAGATTAAGCGGAATAAAAATA CAGATGATTaGATCTGAACATCAGGCCAAACAACGAACAACAGTTTAAGT GCGACCTAGGCAATATTGGGACATACTTATACTAAAATTTTTTCGCTAT TTGAGCATCCTGTATTTTACTGGCACTTTATTCATCCCTAGCGAAAAA GAAACTGTGGTAACTTAGTGTATTTTTACTTTGCTCAITATTGTATAT ACCTACTTGTATTTATCAATCATATTTACTCTGTTCTCAGTATTACTTTA TATAGCAGTTGGTGGTATGGTTAGCAACATATTCAGTGGAACTGTGACT GAATTTGAGGAGAAATTAACAGAGTTGGCTGTGGCTACAATAACCCCTTCG GGACATGTGTCCCCTCATTTTGGGGAGATGGTTAgatctCTGGGTAATG TTAGGGCATCTGAGCCAGAAACCAAGATTTTGGCAGCTGGTGAATGTCA GATTTTACCAGCAGAGGGTGCCAGAGGAATGCGGCAAAACCCGAGTGCCA GAAAGCACCTCCCTGTITTCAGCTTTTCTTCCITTTTATTIATTTIATT TACGGCCCAGGAGTCCGTAATAGCGCTGAGGATGGCCCAGGCTCTTCTCA GCAGCCCTGACTGACTAGTTCAGCAATGCGCTCAGGCCCATCTGGCCAC CGGGCACCTCTTCTGTGGTAGCTCCAGCCTCAGCCAGTGCAAAAAGGCTA</p>
	<p>CCCTACACTGGCGCCACTTCTACAATCAGCACTGGCCACACCCTCCACGC CATCCGGCAGGAGCCAGGTGATCTGCGGGCCAGATTGCAAGTTCGTGCTG CCTGAGTCCAGGTGATTACACTGGCTGCATCTTTCTTTCTGGACCAATC attccattttt</p>

10

20

(ウシ 軽鎖)

さらなる実施形態では、例えば、配列番号 3 1 に示す、少なくとも 1 つの連結領域 - 定常領域対および / または少なくとも 1 つの可変領域を含み得る、ウシ 軽鎖遺伝子座をコードする核酸配列を提供する。配列番号 3 1 では、ウシ C を、残基 9 9 3 ~ 1 3 3 3 に見出すことができ、J ~ C 対を、残基 3 3 8 4 8 ~ 3 5 6 2 8 に見出すことができ (C は 3 3 8 4 8 ~ 3 4 3 2 8 の相補物であり、J は 3 5 5 9 9 ~ 3 5 6 2 8 の相補物である)、V 領域を、残基 1 0 6 7 6 ~ 1 0 7 2 8、1 1 0 9 2 ~ 1 1 4 4 6、1 5 0 8 8 ~ 1 5 3 8 1、2 5 2 3 9 ~ 2 5 5 2 8、2 9 7 8 4 ~ 3 0 2 2 8、および 5 1 7 1 8 ~ 5 2 3 5 7 に (またはその相補物中に) 見出すことができる。配列番号 3 1 を、Genbank アクセション番号 AC 1 1 7 2 7 4 に見出すことができる。配列番号 3 1 の全部または一部 (配列番号 3 1 の少なくとも 1 0 0、2 5 0、5 0 0、1 0 0 0、2 0 0 0、5 0 0 0、1 0 0 0 0、2 0 0 0 0、5 0 0 0 0 0、7 5 0 0 0、または 1 0 0 0 0 0 個連続するヌクレオチド) を含むベクターおよび / またはターゲティング構築物ならびに破壊されたウシ 遺伝子を含むシール (c e e l) および動物をさらに提供する。

30

40

【0 1 3 8】

【化 3 5】

配列 番号 3 1	<p>1 tgggttctat gccaccagc ttggtctctg atggtcactt gagggcccca tctcatggca 61 aagagggaac tggattgcag atgaggacc gtgggcagac atcagagga cacagaaccc 121 tcaaggctgg ggaccagagt cagaggcca ggaaggctg gggacctgg gtctagggat 181 ccgggtcagg gactcggcaa aggtggaggc ctcccaagg ctccatggg cgggacctgc 241 agatcctggg ccggccaggg acccaggaa agtcaaggg gaagacggg gaggagaagg 301 tctgaactc agaactggg aaagatag gaggtcagg tcaggggac acggactct 361 gagctgcag gacacaccc tcagaagcag ggtccctga agaagcag agacaggta 421 cagggcagga aacctccaga cccaagaaga cttagaggg aacctgagct cagatctgc 481 gatgggggga ccgaggacag gcagacaggc tccccctga ccagcaca ggtccaagg 541 gacacagct tggagacca cggacgctt cgggcaaagg ctgaacaca catgtcagct 601 caaatatac ctggactgac tcacagggg ccaggaggc cacatcatcc actcaggga 661 cagactcca gccccaggca gacccaica accctcagc gggcaggcaa ggaagtgag 721 gctcagatgt ctgttggga aaccaagaac caggagctt caggacagc ctggcagggg 781 tccaggctca gctttcca ggaagatgg gaggtgctg agaaaaccc acccacttc 841 cttggcacag gccctctggc tcacagtggt gccctgactc ggggtctgc tggctctca 901 aagatcctg tctccctg tgacacagc tcagggtc ccatgacgg caccagacct 961 ctgattgg tcttctcc ctgcccact ttgaggta gcccaagtc acaccctgg 1021 tcacctgtt ccccccctc aaggaggagc tcagcacc aaaggccacc ctggtgtgc 1081 tcatcagca ctctaccg gtagcgtga ccgtgtcta gaaggcagc ggcagacca 1141 tcaccgcaa ctgtgagacc acccggcct ccaaacagag caacagcaag tacgggcca 1201 gcagctacct gagcctgat ggcagcact ggaatcgaa aggcagtic agctcaggg 1261 tcacgcaga ggggagacc gtgacgaaga cagtgaagcc tagagttt cttagggcc 1321 tgggcccaca cccggaaag tctaccctc ccacctggt tccccctagc ctttctct</p>
--------------------------	--

10

【 0 1 3 9 】

【化 3 6】

1381 gcacacaatc agctcttaat aaaatgtcct cattgtcatt cagaaatgaa tgcctctcgc
1441 tcaittttgt tgatacattl gytgcectga gctcagttat cticaaagga aacaaatct
1501 ctatgcttft gggaatcagg agagagggtg gaagcttggg ggtttgggga gggatgatt
1561 cactgtalc cagaatccc cagagaacat tctggaacag gggatggggc cactgcagga
1621 gtggaaagtct gtcaccctc cccatcagcc gccatgcttc ctctctgtg tggaccgtg
1681 ccagctctga tggtcacggc aacacactct ggttgcacg gggccagggc agtatctgg
1741 ctccctcac tgggtgctca gcaatcacat ctggaagctg ctctgctca agcggccctc
1801 tgcactta gatgatgacc cccctgaagt catgctgtt tggctgaaa ccccaccctg
1861 gtattccca gtcgtcacg ocaagactcc cccgactcg acctttcaa gggcactacc
1921 ctctgcccct ccccagggc tcccctcac agtctcagg ggaccggcaa gcccacaac
1981 ctggtcactc aletcacagt tcccaggtt cgcctctc ccacttgc atggcaggagg
2041 tcccagctga ctctgaggtc tctgaccagc ccagctctgc tctgagacc cttaaaactc
2101 agcccaccac ggagcccage accatctcag gtccaagtgg ccgtttgtg tgatgggtc
2161 ctgagctca agcccagaat caggttaggg aggtctgtgc gttgctcat ctgacctgg
2221 gtgtttctt aggagctcag aatgggagct gatacacgga taggtgtgc taggactcc
2281 cagggacca cactgtgca cgttagaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
2341 cacacacag tcactacaaa cagggccatg tgggttgc gcatctcag gaccagaggc
2401 gcttcagaa tccgccaagg cctcactctg cggagaccac agtctcatcc cctccggct
2461 gaaaaccgtc tctcaccct cccaccggg tgaacccaa agctgtcac gaggagccc
2521 caactctcc aggagaagt ccttgggacc cgggtgaca cccagccgtc cctctgccc
2581 ctccccgcc tggagaggg cgggcacca ttcccagg gtagactca aggaggggag
2641 ggttctctc cctcaccgc ccggaaggc aaccagccc ttgaccagg agggggcgg
2701 acctgggct ccgagctcag ctgcaggcgg gccccgggg gtagcggggc tggcggcag
2761 gttatgctg gaggctgtg cactgtgct gttgtctgg tggaggacc cagctggca
2821 tccggggga gctcctctc tccagcttc cggagctagg agtacaat gggtagatc
2881 tttgtttt ctaccatc tgggctgag gctctctca cctaggcct gtaacctcc
2941 ccttttagc ctgtctctc tgggctctc cagtttct tggggagac ttctactc
3001 acccagaaa gccagagaa tctcagatg gggcaggcaa tatggagcg caagctagc
3061 cacccttca ccttggctc ccgcccgtt ccgataatg tctgagctc ctccctgat
3121 gcttaccct ctgagactg gaggcaaga acccctccc caaaagggg gtagcccgac
3181 cccagctcag atgaactgct tgtgagggga ccttgggagt aagtgggct tggcgggac
3241 ctgactcatt gcagactgat gccccaggca gggtagaggg tcatggccc gcacaccag
3301 agctgcagg agcacaggcc gggggcaagt catgcagaca ggacaggagc tctgacctg
3361 aagagcaga gtgacacgc ggggggggg ccggagctcc cgagattag gcttgggtc
3421 taaccggatc caggaggtc cacgggcca cccagcct ctccctgac ccaatcaat
3481 tgcaataaaa cgtctctat tctctaca aaacctgct ctctgctat gttttct
3541 gccccgatt taatctca cctctcagg atctggac tgggggggg nnnnnnnnn
3601 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
3661 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn agctatgtg tggggcagg gggtagtag
3721 atcaaaagtg cttaaatia taaagccggc atgatatac agtttgata aaaaatagat
3781 ggaaaagtaa gaaaggacag ggggggggtg agggcgaaga aagggggag aaggaaaaa
3841 aataagaga gaggacaaa gaaaggagg gggccgggtg atgggggtg gatagaant
3901 aataatgga gtaaaagta cggggtggt gtaattccg ggggggata gagaaaaaa
3961 aaaaaaatg tgggggtgg cgttaagtat ggaattita taaatatt gttgggata
4021 atgagcggg gtagcgggc aagcggag taanaagggg cyagagaaaa aattaggat
4081 ggaatatat gggtaaitt taaatagag gtgatatac ttagatgag caagataaa
4141 atatagatg tgggggaaa gagacaagg tggcggcaa aacgcccctc cgtatcatt
4201 cgcctcttc cttaccac tcttcaaac tcttttca gaacctgaa cgggtcagg
4261 cggggctgg ggggggata cccgggagg gctcgcct cctctttgc agaggggtc
4321 gaggagggg agctgaggca ggagactgg aggtggaga gatgctgt gactctctc
4381 ctgttgaac tcacagtcac agtccagac ccactgaat gggtaata ccatattt
4441 ctggggagag agttagagc gagcagctga ggcgagctca tctatctac agggccgcca
4501 gtcgaggga cttgtgtgt gtcgtctc tctcagtt gttccgact cttatgact
4561 tcatgactg taacctcca gctctctg tccgtgaa tctccagca agaatactg
4621 agtgggtagc cactctc tccggggat ctctgacc caagaatca acctgagct
4681 cccgacttc aggcagctc ttcttctt gagccaccag ggaacctct taagtggag

10

20

30

【 0 1 4 0 】

【化 3 7】

4741	atctaaatag agtgtttagg agtataagag aaaggaagga cgtctataca agatccttcg
4801	gttccgtgtaa ctacgactcg agttaacaag cccctgtgtga gtgagtggcc agtaattatt
4861	gctaacctgt tctttcact cactgagcca ggtatocigt gagacggcat acttacctcc
4921	tcctcgcgat tccctgggat ggagctgtgc ggtggccctct aggactacca catcgaccag
4981	gtcagaccca gggacagagg altgctgaga tgcactgaga agttgtcag cctaggcttt
5041	caccacacaca gactgtgctg tctctacca cgttaottt cctgtccaaa gaactgctta
5101	aacgctcctg aagcgtattc tggctgtctt caaaaagtgc cttctcctt tataagtcc
5161	gccaatcctg gactttgtcc caggccagtc tactttatt gtgggaaagg ttttttgg
5221	ctttttgtt ttaaactctg cagaaattgc ttacacttt ggtgtgcaat ggctcaectc
5281	tacggctcta gctgtattca aaggggtgic ttttttgt ttttaaaget tttgaactg
5341	ggaccatttt taaagtcttt attaaactgc taacatcgt tctgtttat tttctgggg
5401	tctggccatg aggcctacgg gttttagctc ccttaccagg gtccaacca catcccttgc
5461	actggaecgc aaggtcttaa ccttgaacc accagagagc tctgaaagg ggctgctttt
5521	ctcaatctc cttgtctccc tgcctgctgg tagggattca gcaccctgc aatagccctg
5581	tctgtctta gggctcagt agccttctg cctgggtgtg gactgggggt tgaagagag
5641	cttatggat ttggacacga cctacgactc agaggtaaga ctccatcta gcctgttaat
5701	gactcttcc caacaaccac ccccaccac ctagaccact gatcaggaga gatgattctc
5761	tcctttatca tcaactgtgt cagtcocaaa ctgaccacc gccctgata gatgtagcag
5821	gtaagcaata aatattgtt gaatgttaag tgaattgaa taacataagt gaanaagaaa
5881	acacttaaaa acatgtgttt ttataattac acagtaaca tataatcatt gtgaaaaaaa
5941	atcgaaagag tggcgggggc caagtgaana ccaccatccc tggatgtcc accgcccgg
6001	gtagcccccag gtaagagggt cggacacgga tggccctgta gacacagaga cacagctca
6061	tatctgggtt ctgtctgtt gaaccttgg ggatgatgtt attttcacga tgcattcaa
6121	acccttacc acaccatttt tagagggtcg ttacatgtaa atcagttcac tgcctgttt
6181	tctgatttg aaagtgtcac atttctgag aaatgagaag gaacaggcgc gcataaggaa
6241	gaaagtaaac acgtggcctt gcctccaggg ggcactcagc gtgttgggtt gcacgtggc
6301	agctttttct ctgtgacagt calggccttt tcccaaaggf gggctcagat aagaccgct
6361	ccatccctt gtcctgtcc ccgtcccta cggtggaacc caccacaggc acgtctccga
6421	ggcccttgg ggcctgggac gttaggctgt gtggacatgc tgcctggggg gaccagggc
6481	tgggcagcac gtttccctg ggtcccgggc cagtgaggag ctcccaagga gcagggtctg
6541	tgggccaag ggcagtgctt cccgagcca tggacaaggg gatacttc ctctgaagg
6601	gtggactgc gttctccctg ggcctctgg agtcatgggc agtggggagg cctctgtca
6661	ccccgttcc caccatggc tcaagtctga gccaggagcc cctggggcct ggaagccag
6721	gcccagccc ctctctgctg tctgacggg ctcggtgacc ctgcccctc ctccctgggg
6781	ccctgtgac cgcgggggccc accccggcca gtictgagal tcccctggg tccagccctc
6841	caggatcca ggaaccagga tggcaaggat gttgaggagg cagctagggg gcagcatcag
6901	gcccagacc gggctgggca ggggtctggc gcaggcgggt ggggggctct gcaaccccc
6961	acctgnagc tgcnnnnnnn ttgntmncg tctcccctgn tctgtgtctg tcccgcgg
7021	ggggccccc ctgtctgtt ttttcccc tcccgtccc ttccccctt tttctgtct
7081	ctctctctt ttatttccc ccttggctc gttttttc cgtccctct tttttttt
7141	gtctttttt ttccccct ctctctctt gctctcttt tctctctgc gttttctgc
7201	tcccctctt ctccccccg ctlttttcc ctgtctgtt tttgtgtct cctctctac
7261	ccccctgca gcttatttt ttatatatc catttcccc tagtattgg cccccctta
7321	ctctcccta atttttatt tctttttt aactaaaac accgtgtgtt tataagttt
7381	aaccttttt gaccggcca caatgcaatc ttacgcagc cccccctgt cagctctct
7441	aaatacctt gctactgccc cccctcttg tataataacg cgtcacgtgg tcaaccatta
7501	taacctctc accacctac cacatttcc tcnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
7561	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
7621	nnnnnnnnn nntgaaaaa agaaaaggct gggcagggtt taatagggg gggttggagt
7681	ggaatgaaa tgcattggag tggttgcaac aaatgaaag gttcaggag cgtctctcc
7741	ccatcaggag ctgaaagaa gttgaaacaa agcaaggaaat tctgtctatg gccagaggc
7801	aggggcagg agctgcaag actgcccgtc gttgtgact gnccgtctcc ggggtcatt
7861	gttagcaggg aggcattaca ctcatgtct ggtttgctaa ctattctta ctattgta
7921	gttcaaggt catgtctgac tcttcaac ccagggactc cagccccca ggcctctctg
7981	tccatggat ttgcaggca agaatactgg aggtgttagc cattttctc acctgggat
8041	ctcccagc cagaaatgga acccgatcg cctctgtgc atgggtctg ctgcctaaca

10

20

30

【 0 1 4 1 】

【化 3 8】

8101	ggcagatatt tgacgtctga gccaacaggg aggcacagacg gtaattatc caaccattga
8161	aagaggaaft acacactaat cttatcaaa atcttcaaa cagtagagga gaaaggatac
8221	ttctagttt atccataaa gttggaatta cgcttatcaa taaagacatt acaagaaaa
8281	aaagtgaagc cccaaatgcc ttataaatat acaagaaaa atctttaag atattgcca
8341	acttaacaa caaaaaatgt atcaaaagtc caagtaacat tcacccagg aatgcaagt
8401	tggtcagcc taagacaatc agtcatgagt ataccacgga acaaaattaa agagaaaaga
8461	cattaatct cacaaatggt gcagaaaaag attfggcaat atcgaacatc ttctcatgac
8521	caaaggaaaa aaaagaaaca aaacaccaga aaattctgtg tagaagaat atatctcaac
8581	ccaatgaagg gcatttatga anaaccaca gcatacatca cactccatga gaaagactga
8641	aagctttccc cactgccatt gaactctgtc ctgaaattc tagtcacagc gacagaacaa
8701	gagaaagaaa taacggccgt claaactggt aggaagaaat caaagcgtct ctatctctg
8761	ggcgcataat acaatataga caaatttcta aagtccaca aaattccag agctcataat
8821	gaatccagaa atgctcagg gctcaagatt cagatgcaaa aatcgtctgg gtttgatgc
8881	accaacaac aatccatta acaataatc caaggaatta atttaacta gaagagaaaa
8941	gacttgitta cagagagtia taaaacattt ggtgatgaa taaataaga gtaactata
9001	tagaaacacc gttctgitt tggagaccta atgtcataaa cgtggcaaca cagagacgcc
9061	tcacggggaa ccttgagcct ccttcccaa acagccctgc tcatattc acaggtaac
9121	tgaccoccta aagctgact ctgaggcact ttagggcat gaagagagca gtagctctc
9181	ccatgggacc gacagtcaag gcccaaggaa tgaccactg gacagatgac ttccggcct
9241	catcagcagt cgtgtcagag tggccaccag ggggcagcag agagtgcctc aacactgcac
9301	ctggagatga ggcacactg gcatacaggt cccatcaggg gcttgatgac ccacacctc
9361	cactgagga cagggccgg cttctgtgg tctccctc tcaggatgca cagactccac
9421	cctctctct tgcattgaca gctctgtc ttctggagg acaagctcca ccttccccat
9481	ctctccccg gggcctggg ccaacagtgt tctctctgt ccaactcagg aacacagagc
9541	caagagattt attgtctta atagaaaa clattgtat tctgcaatt cccagtaac
9601	tgaaagcaac tttaaaaaat gtaattctg gacttccctg gttggccagt gcttagactc
9661	tgactccca gtgcatgggg cctgggtca atcccgtctc aggaactac atcccacagg
9721	ctgcaataa gatctgcat gccaccgat gcaggcaaa anaacaagtgt tggatgca
9781	tgatttcaac gtgagggtt tclataaft acagccagta ttctgtctta cacttagtca
9841	ttctttgag cacatgatc gtcgatggc cagaccacac acaggaatac tgaggccag
9901	caccacagg ctgccagaa cctcatgctc aagggctgac acttacagga cctcagggga
9961	ctttaagaa cgcctctgc tcttgccagc gtagcaggtt taagcatgce tctgtccctc
10021	gggagctgtg tctggctgc gtgcatcacc tctgtgtgg gctgtgtgag ggtcacogtc
10081	cagggccctc ctagggctcag aagaacctc ccttaaaagt tctagaggtg gactagaac
10141	cagaccacca tctgaactgc acccaaaaac agtgaagat gagacactc aaagtctctg
10201	gtgaaattaa gggccttccc ctgaaccagg atggagcaga ggaaggactt ggcctcagg
10261	aaacctgac gctccaccg tgaactctgc cgggctcag gcaggccca ggaactttg
10321	gtgcaagga ctagggctc ctgaaataa cagctccac cctgagccc tcaagtggaa
10381	ggccttctc cccagagtg gggcaaggac ccagattggg gttgagctgt cccccagac
10441	cctgagacca gcaggtgag gagcagccc gggctgagg gagtgtgag gacttcccc
10501	ccgcttcaa ccgctgtagc cctggctga gctctcca ccacggctgc aggcagccc
10561	cacccacc cccgacctg gctcggactg attgtatcc ccagcagca gggataaga
10621	cagcctggg aggagccctg cccagcctg gttggcgag cagactcagg gcgctccac
10681	catgctctg acccctctc cctcggctc ctgctcact gcacaggtga gcccagggt
10741	ccaccaccc cagcccagaa ctgggggaca ggcctggccc tpaactttag ctagtggga
10801	tctgcccgtg agggcaggag gctcctgggg ctgctcagg gtaggcagct ggaaggctg
10861	aaatccccct ctgtctcac tctaggtca gccctgagg ctgtgctgc cagggaaagg
10921	ggggtctct ttaactcagag actccatcca ccaggacat gagccggggg tctgagact
10981	gacggggagg gttctctgg gggccagaga atcttggca cttaactctc atcaggcagg
11041	ggccttctgt tctaggttc tcaactcca gctacctc ctctctct ctgaggcgc
11101	tggtctctc taagactga ctacgtacc cccggcatc atgtcccag gacagagcc
11161	caggatcag tttggggc ccagcgttg aggtganaat gttgagtgc accagcaga
11221	gccaggccag gctgtgctc tggctctta tggtagcat aaccgacca cgggggtccc
11281	tgaccagtic tctggcca actcaggaa catggcacc ctgcccata gcggggccc
11341	ggccaaggat gagccgact atactgtca gctgtggac agcagcagta acaatctca
11401	cagtacaca ggcagaggg agggagatg caaacccct gctggccc cgcggcccag

10

20

30

【 0 1 4 2 】

【化 3 9】

11461	ctctctcggg gcaagctcag gtcccctga gggccggctc cctctgtct caggccctct
11521	gtcaatctg ctgagcagcg gcaagtggc atgggtcca agtctcggg gcaatcagc
11581	accctgagc cagagggtta ggggttagg ttagggtag gctgtcctga gtctaggac
11641	agccgtgccc cctgtccatg ctcaagctct ctgagactg gtgggaagt tccagaacca
11701	ggcaggaaac cgtcagtcgc ttgtggcgc tgaagcagg agccatctg gtcagcctac
11761	cggatcctc agcactgaga cccggggcct ccttggagg caggagggtg gactgcagcc
11821	gggccccac accgtcacc caaacctcg gagaaccgg cccccagga cgcctgcccc
11881	ttgcaacct gacatccgaa catttcac agaactctg caaaatct acaccgtcc
11941	ttatgcaca ttccctcaga gctaaaagt atcatggct gctaacctc ctcttaaat
12001	attctctct aactcctc ttccctgct ctgagcgcg ttctatcc acatgtctta
12061	ctgcccctg tctgctcgt taattctt ttttttt ttatttga atatattgc
12121	gttacaatg tgaattgaa ttggttctg ttgacaaca atgtgaatta gttataatg
12181	tctgaggag gggcgctgc gtgggtcag gaggccgag aggagctact ccacgtcaa
12241	ggcaggagg ggcggcctg aggagatcc cctcgtcaa ggtaaagaa acccaagtaa
12301	gacgtaggt gttgcagag ggcacagag ggcagacaca ctgaaacct aatcacagaa
12361	actagccaat gtagcacac ggaccacag ctgtctaac tcaagtaaac taagccatgc
12421	ccatggggcc aaccaagatg ggcggctat gtcctatgg ggccaacca gatggcggg
12481	tcatgtgaa gaggtctg atgattgtt cactggaga agggaaagg aaacacttc
12541	agtattctg cctgagag cccatgaaca gtatgaaag gcaaatgat aggatactg
12601	aagaggaact cccaggta gtagggtccc aatgtctac tggagatcag tggagaata
12661	actccagaa gaataaggg atggagccaa agcaaaaaca ataccagtt gtggatgta
12721	ctggtgatag aagcaaggc caatgatga aagagcaata ttccatgga acctggaatg
12781	taagtccaa gannnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
12841	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nngaatitt
12901	gagcaactt ttactagct gtgagcagag tgcagtgtg cgtgatttg agcattctt
12961	ggcattgct ttcttggga ttggaatgaa aactgacct ttccaggcct gtggccactg
13021	ctgagtttc caaattgct ggcgtatga gtgcactact ttaacagcat catctttag
13081	gattgaaat agctcaactg gaattctac actttagta attccatca ttagctttg
13141	ttgtatgat gcttctaag gccccctgg cttatctc ctggatgct ggctctgtg
13201	agtatcaca ccgctgtat tcttgggtc atgaaggtct ttgtatag ttctcttag
13261	gaacagat ttagctccc atcttgcac ctggtatat ctgagaagc actgactcc
13321	ttcatgtga cgtcagatcc tcatgactaa caaatggct ttgtgaagat gagtgcctca
13381	tggtattgag cccccctg accaagacct ttagctgac ctcccactc gcccagggtg
13441	ctctcgaag cgtctgagat gccgcctccc aggcctcact cctcatttg ccccataaa
13501	aaactaact gcagctccc agctgtgcat ctgttttag ttgacagta aataatag
13561	gaaaattaa aftaaatata atctatggg agaaatcaa acatctatg agggagagag
13621	agggagagaa aggaaagaag aagaagcagg agggaggaga gagttagaa acagggggag
13681	ggggcaggg agacagagg gaggacacc agggaaagg gaggaggcg agtgcagtea
13741	gagagaggc agagttatc agagctgga ctgcagccc aatcccagg gtgtgtccc
13801	aagcaggga gagcctgag caggcggaga cagagctgt tctccagtc tctggcctg
13861	gacctggag tgtgtgta gccccctga cccagcctg gccctgtg ttgtcggagg
13921	cagtatcct ggacacagt tctgagctc tcttgaal cctgtggag ggcactca
13981	ggacgacct cgcctggccc cactggatc tgcaggcca gcccagatg gggcttctg
14041	cctggaactg agcagctgga gggcgtctg cccccagca gtggagcgc cccaggggc
14101	ctcagagctg ccgggggac acagagctg tctgagacc agggctctc tccaggggt
14161	cccctaagg gtctctgag cagggtcaga gccgggatg gcacaggct gactcagact
14221	ttcagagctg gtgctgcat ccttggggac agaggcctg gtcctaacct ggggtcaga
14281	ggcaggagc ggagcccag taccctgg gactggct cctctgtgt cccccggg
14341	cagtcacag tccccggac gtgactctg aggagacag ctgggctct gctgtcagga
14401	gggggttca gagggcacac tcaaggagg agaccctgg ctgcttgggt tgtactgag
14461	ttttgggt cctclaggag actctggccc tgcaggcct gcaaggtcat cictagtga
14521	gcaggactc acaagattga tgaactgaa cctctaggag aggtgtgtt gtgaggggc
14581	agcattctg aaccaacagc gtgtcaggt agctggacc gggctatg gggcgggca
14641	gggactcag ggccactag gggctgggg gattcaatg tccccacag actggctct
14701	ccatcagaat cccagactc acaagcagt ttggggatt aggtcagac gtgagggcca
14761	cagagagggt gtagggcct agacaagctc ttcacagaga gagctccagg ggccatgata

10

20

30

【 0 1 4 3 】

【化 4 0】

14821	agatgatgg gtctgtattg tcagtttccc cacatcaaca cegtgttccc gccagcccat
14881	aatgtctctgt ggaatgccct gtgcagagcc tacctggagg cccggggggc gggggccgct
14941	gggggctcag ctccggggta accggggcag gcccttccct gctgtgtcca cagtcctccc
15001	gggggtggag gagaagtga gcaggacagg aggggtttgt tctcactcc ctggctgtct
15061	gtgtcactgg gaacattgta actgccactg gccacggaca gacagtaata gtgggctca
15121	tcctgggcaac ggaccccact gatggccaag atggctgttt tggcggagct ggagccagag
15181	aactggtcag ggaatccctga gcgccgctta ctgtctttat aaatgaccag cttaggggccc
15241	tggcccggct tctgtggta ccactgagta tattgttcat ccagcagctc ccccggcag
15301	gtatcttgg ccgtctgtcc caagccaact gacctgaag tcaactgtgt cagttcatag
15361	gagaccacgg agcctggaag agaggaggga gaggggatga gaaggaaaga ctcttcccc
15421	aagtgaagaag ggcgcctccc ctgagggtgt gtctgggctg agctctgggt ttgaggcagg
15481	ctcagtcctg agtctggggg gaccagggcc ggggtgcaat gctggggggc cgcacctgtg
15541	cagagagtga ggagggggcag caggagaggg gtccaggcca tggtagactg cccccagct
15601	ctgcctctga gcccccagca gtgtgggctt ctctgagacc cttaattccc tctcagagct
15661	ttcagggggc cagtgaagggt ttgggtttat gcaaatcac cccccggggc cccctcctc
15721	agaggcgggg tcaccacacc atcagccctg tctgtcccca gcttccctct cggcttctca
15781	cgctgcaca tcagactgt cctcagggaac tggagttact gtcaccttcc ctgtgtctga
15841	ccactgacc actgtcccaa gcccccctgc ctgtgttctt gggctccca gtagggcggt
15901	cagctggca gcgtctggc cgtggactgc ggcatgggtt cctggggttc actgtgtatg
15961	tgacctcag aggtggcac tagttctgag gggatggcct gtccagctct gacttctgc
16021	caagcctgc tccctggaca cctgtggagc cacagggctg gttcccctga agccccgctt
16081	gggcagccca gccctgacc tgcctctctt gggcgcctc tctgtccccc tctgtgtac
16141	cccctgtgct gccctatga gagctgtgat tctcagcat aactgattac tctctccagt
16201	actttatgt cctctgacg gctctgatta gcaatttcca cactagagaa ccacagctct
16261	ctgtgtaaa gtgatcacac tctctctgt gggacttttg taaaagattc tgcagccagg
16321	agtcattgggt ggtcttagct gagaatgct ggaatcagaga gacctgataa ccgatgtgaa
16381	gaggggaacc tggaaagtct tcaattcagt tcaattcagt caticagitt tctccagctg
16441	ttggatcc catggactgc cacacgccag tccctcctgt ccatcaccia ctctgaagc
16501	ttgtcaaac tcatgtccat caagttggag atgccttca accatctcat cctctgtcat
16561	ccccctccc tcccgccttc aatcttccc agcattaggg tctttccgt gactcagctc
16621	ttgcctcag gtggccaagt ttggagttt cagtttcagc atcagttctt tcaatgaata
16681	gtaaggactg atttcttla ggaatgactg gtttgatc cttcagttc aaggagctct
16741	caagagtctt cccaacact gcaatgaaa gccatcaatt cttcgggtct cagcttctt
16801	tttggtaaaa ctctcactt catacagac taccgaaaa acattatgct tgtagaacca
16861	gtttggggct tcccagttg cctagttgtt aaagaatag cctgccact cagaagatgt
16921	aagagatggg gtcaatctc tgggtggga agatcccctg gagaaggcca tgaacaacca
16981	ctcagattt ttgcccggg gaatccatg gacagagaag cctgtggag tgcagttcat
17041	ggagctcac agagtcagac acgactgaag caacttagct acttggaaaa gagctatcac
17101	gaaactgtct aaaaaacag tcaagaagtc ttgttttg aaggttact gagaagttg
17161	atgcaactgt ccaacacttc ctctcagttg aaaagatcag aagcgttaga tcaaatgggtg
17221	gtcaatacct tggatgcgct ccaacaggtt atatctcag atggaatga aggcagttta
17281	ttgggttaact ggaggacaag atgagatcat acacttggaa cactgtctgg catcaaggc
17341	gtgtacagta aacattagct gttatagca aaataaatc agctgaaic acccaaatca
17401	gatggcattc taaagccac tgaatgtgaa aatcaggggt gtgcagccaa aacttccatt
17461	ttgactcatt atgattcca tgtcacaaga ctagaagtc actttctct cagcagaaga
17521	gaaggtgaa catittaac ttttttga gtgtcaaggg aattttgtt acactgtaaa
17581	gtcagtgaat atattgaagc tttcatttg tggaaaaat taatatgta aattgaaat
17641	tttaaaattt attcctgggt agttttgtt tccagtagt catgcatgga tgtgagatt
17701	ggactataaa gaaagctgag cgtgaagaa ttaatcttt tgaactgtg cactggagaa
17761	gactctttag agtcccctgg tctgcaagga gatcaacca gtccatccta aaggaaatca
17821	gtcttgata ttcactggaa ggaactatgc tgaagctgaa actccaatac ttggccacc
17881	tgatgtgaa aactgactca tatgaaaaga ctcagatgct gggaaagatt gaaggtggga
17941	ggagaagggg acgacagagg atgagatggc tgaatggcat caccgactcg atggacatga
18001	gtctgaataa gctctgggag ttgttgatgg acagggaggc cctggagtgc tgcagttcat
18061	gggattgcaa agagttggac atgactgagt gactgaactg aactgagttt ggtaacagat
18121	atgagaatta tataattaa ctctaaactc ttggtatttc tttcttggc ggttccaaaa

10

20

30

【 0 1 4 4】

【化 4 1】

18181	gagctgtccc tctgttaac tatataaac ctitttgaga attactaat tgataargt
18241	cacaagtat ccaattctc attactctta gtgtcagta taagaaatcc catttgatt
18301	atcatgttat agtatctgca actctaafag ttacgtctg acaaatittt attttaaa
18361	aaaatattgg catacagtaa aatttcaaac aatatacaat tctcccttc agtitaaaaa
18421	acaaaacaaa acaaaagtaa tattagttaa aaaaatccgg gaagaatcca agcatttaa
18481	attgcaicac atttctatgc tagacaagct gatataaagt tataatuaat aaaggattgg
18541	actatfaaac tctttacata tgaggtaaca tggctctcta gcaaaacatt taanaaatg
18601	ttgtgggtaa attattgtg tctftaaaga aataaaaaga cataagccta agcaattggn
18661	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
18721	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn aaatggataa ggggggagga
18781	catgggtagg ggagcgcgat ggaggaaagta aggtggctga gggagttggg gggggaataa
18841	gtgggtaaaa gggaaagcggg cggaaaggagg gggaaagcagg agagaggggt gggcgtcaga
18901	tcggggggag gggatgagg gagagggaaat ggtagacggg ggggtgggaag cataaaggaa
18961	aaagatgggg ggggnaaagt tagaagaaga atgaggggat aggcggaaag ggaaagagaaa
19021	tggggaaga acagaaaaat agggggaggg gggggctaaa ggggggggg gggggcaggt
19081	gtggagatga cagatacggg gaatgcccc gtataaaga gtatagcgg tggggcgaga
19141	aggctgcat cctgtggag gggggacggc gagaaccctt cgggctatag gaggattcg
19201	gggggatcgt tcgggaaggc agtcagcaca gcaccacca aggggtcagg gatggatcg
19261	gggtcccaaa gaagagccc aatcccgcgt ctggcagca aggagccctg gagactggga
19321	agttccagg acactgacc aggggtcga ggaaccaga agtgtgtctg tgaagatgtg
19381	ttttgtggg ggacagttcc agacttga gcagaaaagc gggcatggcc tgtggaggc
19441	caaccagct gatctttt aaaaaggitt tgtttgatg tggaccattt taaagtct
19501	cattgaatt gctacaat tgttctgt ttatgctctg gtttctcg ctgcaaggt
19561	ttgtgatcg tatctctca accaggactg aaccacagc cctgcactg gaaggcgaag
19621	tcttaacca gatgccagg aactccctt cctactga tctaatca gacctcatt
19681	aagaaaaac cgagattca agctcccca ggagactcg gtgggagga gagagccaag
19741	cactcagac tcagtccagc acggcgcct cctgtccag ggcgagggct cggccgaaag
19801	accaccggag accctgtcg attaccagt aggtattga ggaattcaa ctacttitt
19861	aaactgtct ctcaaggctg ttacaagcgg actttaccag taacttaaa gtgaaagg
19921	acttccagg cggcactgc ggtgaagaac ccggcggctg gtttaggag acataagaga
19981	ttgggttag atccctggt caggaggatt cccctggaga aggaatggc aaccacccc
20041	agtaattctg cctggaaagc ctacggaca gaggaggctg gggggctaca gtcacgggg
20101	tcgacacga ctgaatcgc ttacttcaa gttgagacag gaagggcag tgaactgtgg
20161	caaaacacc caccatgct cccaggggac ctgagcgt ctgttcatg agctgtctca
20221	acaaaaatca acccaacgag agggccagac agggggaagc tgaattcaic aaacacggc
20281	atgatgtga ggagataatc caggaaaggga cctgccaagc ccatgacaga ccggtgtct
20341	gtctgaggc gtcctggca gaggcgtgca gggcctccg agaccgccg agctcagac
20401	ccggctggg gctacaggtt ggggctgagc tgcaaggact ctgtgtgag ccccacgta
20461	gggaggatca cctgtttgt ttctgagtt tctctaaaa tagccttat gggctcgtg
20521	ctttgtttt aaaaatacaa ctgtctccg taacaacgt gaaaaaac aaacaggag
20581	aaaacaagc agcccgggca ttacaccgg aagagccgc tctaacatt tgaagggtg
20641	ccttctatt taaccctgt tcatgttaa actgtaaaa ccaatcata aataaafaa
20701	aggctctgt gaagtttaa aagtaagcat ggcgggtggc atggctgtgc cacaccgtga
20761	acgtctgtt caaacggta aattctagg accccctgtt ggtccagtgg gtagatttt
20821	gctccatg caggagcgt gggttgatc cctgtgtgg gaactaagat ccccatgct
20881	gtatggagt gccaanaaga attttga aatggtagt tttaggtac gtagatttc
20941	cattgatga ctacagggc tcagatgag ccaggccctc aggaagccc agtccaccgg
21001	tcttactt tctctagag ttatggct tctgtctg ccttaaac caccatgtt
21061	caacctate tgatttga cttataata aagttaggct ggtttcagg aaactttgt
21121	caglattctg taataatca aatgaaaga attgaaaa agagcagaca ctgtacatg
21181	cataactgaa tcaattggt gtacacctga aactcagtg cagccgtca gtcgtctcg
21241	accctgcac ccaacggact gcagcagcgg ggttccctg cccatcaca actcccggg
21301	ttactcaaa cacatgccc tgcactcgt gatccgtcc aaccgtca tectctgtc
21361	tcccctctc ctcccctt caactttc cagcactagg gttttcaa atgagtca
21421	tcttcaacc aggtggccag agtattggag ttacagctc agcatcagc ctccaacga
21481	cccccatc ctgaagctaa cacagtcta atccactgt ctccaacatg aaagaaaaac

10

20

30

【 0 1 4 5 】

【化 4 2】

21541	acatttita agttaggct gigtgtct tctctctc aacctcgt ctgaccocac
21601	ccacactgc cagcactgca tccccgtgg acaggaggcc cccctcccca cagctgcgtg
21661	ccggccggtc actgccgagc agacctgcc gccccagatg gggccctgg cactggggag
21721	aaggcagggg cctctccagg gccggctact gtcactgtt cctactggt tigtittcaa
21781	aagtggaggc agcgtaat tccccgatt ataaaaagaa gtacacaggt tctccacaaa
21841	taaacacagg gaaaagtata aagaatggaa gtcccgaca cagcctggag atcacgccgg
21901	gtcactctgg ggtgtcttc caggctggac ctcacattc acgcagacat cagaaggctg
21961	cgagatctac ccagaaggct ggttagatgg gggataggic agtgacaac agtagacaga
22021	gagatataca gacagatgat gtagacag acgtaagac accgagcag gggacagacg
22081	gatggaagac accatcttt gtcactgacc acacaccac atgggtgtgg tggccggct
22141	gtcactctg tgaacctgct gctctcaca caccagctgg gtcctccag cccagcgtc
22201	ccacacagca gactccggc tccatccca ggcaggaaic ccaccacca ctgggggtga
22261	ccctcccg caggaggctg tctgtctaa ggccttgaga gcaagtaca gacctactc
22321	tgggaagaca gcgcacaac gctaccgcc cagagcccag gaggaccctt gactctagg
22381	gaaggacaca cggcgctgg acggggagcg gccccaggac gctgcccaca acctctcca
22441	ctcactcct gctctgctt gaggcggggc gcagagagg gccctgagg cctctccag
22501	tcttgggag caccactgg gccgaacca gcccagaagc cccctctca aggtgtccc
22561	agaccactcc cctccacct cgggtctct gctctcggc agcaggggag cccagtgaga
22621	agagacagct ccaggctgtg alcttggccc ctggctgctc tggcagtgig ggggtggg
22681	gtcctggga gccctagat gctggggctc gggctgtga aagcactcg agctcagtgg
22741	gctgtgtgc ggcctctgc agtccgac ggttagagct gtcacagac acaggaggcc
22801	tggctagtg tccaagagt cagggccaaa ggaagggggt cgggcccctc tggctctca
22861	gctctgagg ccggggacct cagtctggc tggtagggg ggcgattgga gggtaaacg
22921	atccaaaga aaacacacat ctacagggga agagtctga gtaggagaga gctacacaga
22981	gggtctcac actcggaca ctgctggag tctgagact cagtgccgg gcacagttag
23041	cgaaggagg acggaacct caaggacacc gacggcag gcccagagac acagcactg
23101	ccatgaggc ccgctctc agacagggg gactctca ttaaggctc tgcctgata
23161	gtgaggagaa ctggccctgt gctggggaa acttagccca gaagaaacg tggccctggc
23221	ccaagatca nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
23281	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn tggccttgc
23341	ctccaggag gagggaagc tggacttgg gtttgcctg ggttaaag atccaccac
23401	tccittita gccactcct gigtgccaa ttcttaaga ctggagctg caaagatg
23461	gacacactga gcgagtgaa tgcactgagc ctgaagaaag tcttgaatt cctcaaca
23521	aaacacact gcttgggta ctctctgg tttgtaca aatgttgg cctctgttc
23581	tctggccag ctctgggtg tctttgac ctgacgagt caaaggagc ctggaccctc
23641	aaaactgta gaccagca cccctcact acactctgt tccccgca acgggcactg
23701	gttccgct ctggcgtat ggtgaagca cgtgtgata ctgggagtc ttaactgtt
23761	tctttctt ctgggtgac accaccatcc gcacactct gctgaatg gaacattgg
23821	gtattttag tggcccaga ccccccaac gaatgtact tcaagttgt tttctctt
23881	tataittgc ttigtgat agacacagga tccatcagt tgtatgagt gagaagtta
23941	aaaccactc agccttagt ggalggagt ctatgtaga gatagcact tagccgaaa
24001	tggaaattc agccagaat tgaagagct gctctggaag gagaagagg actcagccc
24061	gagcacact cccacgctg gacctcagg cctgacagc tttacctc ggggtctca
24121	tggacaggc catgagggc acgatccct tgaagatt ctggcttcc cactcattg
24181	gcaattgac gctttctc tctctaca tggagtta ctttatcc agacattg
24241	gtttctc tgaattgc caattgaca gatcttaca gtatttca accacataga
24301	attcggcag ggggtggg gacagggta ggtggggg agatgagg gggggctg
24361	caccagcag catctgggt cgtactccc tgcggggat agacctctg cccctcag
24421	gacagcagc agtctctc tctgaactc caggagct cctgcaatt acttaagaa
24481	agccatcaa ttaggatt tgggtgaca ttttacatt aagtgtgta gcagtgata
24541	tagtcatat cattttat ttctgatt ttactactt aaagggtt tgggttct
24601	tttittta aaagctaaa tctgtttt aattccatg aatacaaaa aaaaagtct
24661	gtagaatait taaagagtg aaggcttgt tgggaatg agccttgc tccactgac
24721	cgaacgtaa taacattg agaagagac cagagtgaaa ggtacctct ttattgagt
24781	gacatgacag caccatcgc gtgattat gctggagt tagagacag ccatgtgg
24841	ctaaactct tttctgtt ctacgctt gataataat cagaagctt cctgagag

10

20

30

【 0 1 4 6 】

【化 4 3】

24901	agtegggtca gctgtcagac tctaggtgt ctacctgcag cagggttggg ataaatgca
24961	gcagccagta galacgggat ggggcaagag gtcacctgt ccccttgtg ctgtggggag
25021	agaggttgt cctgtgtcca gggggccaa agctgtgact ttgtaccac aggatgtctc
25081	tgacctgcc ttgggtccc tgagggttga gggacagcag ggtctcccc gttccttggc
25141	cggagaagga cccccacc ctgtctct gacatcccc caggacttgc cccggagtgt
25201	gttctcagg atgggcatcc gggccccacc ctgactctg gagctggccg gctagagctt
25261	gctcagaat gaggccttgg ccattgcggc cctgaaggag ctgcccgtca agctctccc
25321	gagctgttt acggcggcct ttccaggag gcacacctat gccgtgaagg cgtatgttca
25381	ggcttggccc ttccctacc tccgatggg ggccctgatg aaggactacc agcctatct
25441	ggagacctc caggctgtac ttgatggct ggacctctg ctgtctagg aggtccggcg
25501	tagtaaggt cgacctggca gactggggg gccctggggg tgagcaaat gcagccaggc
25561	caggaaagt aggggtcacc tgggaacagg cgttgggtgt acaggactgg ttgagctca
25621	gaggggacaa aaggcacgtg ggctcccc ccagtgtccc taaagtggg aaccaagggg
25681	ggccccgag ccggaggagc tgtgtgtgt gtagtgcaga gccctcggg ggtctctgtg
25741	ccgtctggac tctcacagc tcaagcgtg ccccgcgcc cgttaggcgg tggaaagtgc
25801	aggtcttga ctgtccggg aacccccacc agggacttct ggacctgtg gtccggcatc
25861	aaggccagc tgtctcact gctggagccc gactcagccc agcccatgca gaagaggagc
25921	aggttagagg gttccagggg tggggctga agctgttgc gggcccttg gagtctgtg
25981	tcgacctgt cctcaaggag gacacgttg acgagacct ctgtacctg ctgaagaagg
26041	ccaagcagag gaggagcctg ctgcacctg cctgccaga gctgaggatc ttgccatgc
26101	ccatgcagag catcaggagg atctgagcc tggctcagct ggactccatc caggacctgg
26161	aggtgaactg cacctggaag ctggctggc cggatgggca acctgcggg ctgtctgtg
26221	ctgtcatgg cctgttccc cgcaccgcc ccgaccggga ggagcactgc gttggccagc
26281	tcaccgccca gttctgagc ctgccccacc tgcaggact ctacctggac tccatctct
26341	ttctcaagg cccgtgtcac caggtgtca ggtgaggcgt ggcgccagct ccaaagacca
26401	gagcaggcct cttgttgc gtcctcgtg gggacattc cagggtccc ggcacctgg
26461	aagtctcac gatccaccg ctctgacct gggcacttg tcaagttact tccctgtta
26521	gggtcaggg cgtggcctag gtaaatgt gtaaaaggg actcttctt gggagtccc
26581	atgttgggg ctgtgttga tggcttggg aattcttcc gagagagtga tgtctagt
26641	gagataatg cagataacta agcagaagg acggtccatc aggtgtgagg ttgaagtcc
26701	aaagcttgt ctctctcc cacttcccc ttctgtctg agctgttta ggctccaggt
26761	gagcttggg aagttgggta ttctgggat gacaagaag gatcaggagg gaaaaattg
26821	ggctctaaq cagtcagag aagagaaaa gtcaalaag cattattgt aaagtggctc
26881	cagctcttt aagtcacaa tataatata atttctctt aagactctg aatacatagg
26941	aaactctag taacaggta ttctctgcc ttgaacacag tgataaaagc tggaggatg
27001	cagcctaate tgtctgtgt aatgagttg atgattccc ttittggcag ctgcaaac
27061	caagcattag gaataaatat gttcactgag aacccccgag aaagaagaa agaaaaaaa
27121	aaagaattgt aggtgtgat ggacggttg tggccccga atatctggg gatgtcacc
27181	caggatcac gtttaactg tggaccccc agccccatg ccactgcac cagcctgtg
27241	ttgaattccg cggatcnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
27301	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnncaat
27361	tcagctcgg taccocaaag gtcctctag tcaaggctat ggttttcca gttgtcatg
27421	atggatgta gagtggact gtaagaaaag ctgagtcca aagaattat cttttgact
27481	gggttggga gaagactct gagactcct tgaactgca gaagatcca ccagtcggt
27541	ctaaaggaga tcagctctga atgtcattg gaaggactga tctgaagct gaaactcca
27601	tacttggcc acctgacgtg aagagttgac tcaatggaaa agaccatgat gctgagagg
27661	attgggggca gggaggaga gggacgacag aggatgagat ggttggatg catcaccac
27721	tcgatngac atgagtttg taaactcca ggagttggg atggacttg agccctggg
27781	tgttggatt catgggtcg cagagtcgga catgactgag cgactgaact gaactgaact
27841	gagctgaaga gctcactgt accagagctc ctacagctct cctgcaggcc tggctgtaat
27901	ggcccccagg taccctctt gccctctca tccatctct tcaagacagg ctgggagtgg
27961	ggtgaggtga gttgttgt atctagaat tctgcatgc acctcagag tgaatttag
28021	ctccagagaa ctgagctcca agattcatt ttctcttt etteittag atactacct
28081	ctctgagca gagacctat gtcaggaga agggactct gccctctca gccctttgt
28141	ctcccaagac ccacacggg aggtctgct gcttactga gccggaagt tcaattgctc
28201	atgtctcca gaaaccccc cccccccaga gacccccaga aataagttga acagcacctt

10

20

30

【 0 1 4 7 】

【化 4 4】

28261	gtttccaga caagtgggac acagttatg aaccacctca gtgataaaa taglaacctc
28321	tgigtatggt tatttactgg agaagaaac ggcaacctac tccactatc ctgectagaa
28381	aattccatgg gagagaagcc aggcaggcta cagtcacagg ggtcacagag actgaacata
28441	cacaagcaca tggagtgtg tttgcagta ttttaaat ttgtcagttc aacatggagt
28501	acaagaatic aaatcgtgaa gtcaattgac caagaaacca gaagaataca cigtgtgtg
28561	atctctgtgg aggtacaalg ggtacctgtg ctctgacct cacagcctct ggctctctct
28621	ctacatgtac atacacatat atttccatgt atgtatgtat tgggaagatt tcacatacgt
28681	ctaccagtc cacagcccc gcgttccctg atgcccagaa catctgtgat agctgtgat
28741	attgtacca gataagatct tccaggttc tgcactaca ttggtatca ggctctctg
28801	atccagcatt tctcagctaa gattccttgt gactcctggc tgcagaatct tctgcaaaag
28861	tcccacagag aggagtgtga tcaclgtaca caggagggcc gtgttctct agtgtgagaa
28921	aaagtaactc agcccgtcac agggacgtga atgtacctga gcacagtaac agttatgctg
28981	agaaatfaca gctctgtag aggcagcaca tggggtagcc agcagggggc agcagagcac
29041	ggccaggagc cgcaggctag aggtctggct gcccaagcgg ggttcacagg gaaccagccc
29101	tgcgggtcca caggtgtcca gggagcagcg ctggcagga agtcaggacc ggacaggcca
29161	tcccctcagg actagtacc acctctgagg gtcacatcca cagtgaacce cagagacca
29221	tgcctcagtc cacggccagg acgttgcagg gctgaccgcc ccactgggga gtccaggggg
29281	tccagagagc cggggggctt gggacagtga tcntgtgttc agacacagag aaggtgacag
29341	tgacctcagt cctgtaggac aagtctgatg tgcagacgtg agaagccgag gaggaaagctg
29401	gggacagaca gggctgatgg tftgtgtacc ccgctctca gtgaggggcc ccgctgggtg
29461	aatgtcata aacccaagcc ctactgccc ccaaaaagct ctgagaggga alaaaggggc
29521	tggagagacc cagcactgct gcgggctcag aggcagagct cggggcgctg ccaccatggc
29581	ctgggcccct ctgtactgc ccttctcac tctctgcga ggtgcggccc cccagcctg
29641	gtcccaagt gaccaggcct caggctggcc tctcagctca gcacaggggc tctctcagg
29701	aatcggggcc gctgggagga gacgctctc ccactctcc ctctctctc tctctctag
29761	gtacctggc ttctctcag ctgactcagc cgcctgggt gtctgtctc ttgggacaga
29821	cggccagcat caactgccc gggagcagct tagaaagcta ttatgtcac tggtaaccag
29881	agaagccaag ccaggcccc tftgtgttc attatagat ctagttagag acctcaggg
29941	atcccagacc ggttcttgg ctccagctca ggaacacagg ccacctgac catcagcggg
30001	gcccagactg aggcagagcc cgaacttacc tgtcagctat atgacagcag cgggtatcct
30061	cacagtaca cagacagacg gggagttag acacaaacct tccagctcgt ctacgctct
30121	ctctcagccc cgggaggact gtgggcacag caggagcagg cctggcccgg ttccccggga
30181	gtctagcccc caggcggccc cgcctcccgg ccttccagge aggtcttcca caggggcgtt
30241	agcagtggac gatggcctgg cagccctcgc tftgtcgggg tctggctgt ggaagtacct
30301	ggagaacgga ggcctggatg aggaclaaca gaggacaga gactcagtcg taatggcccc
30361	tgggtgtcca tgtgatgctg gctggacct cagcagccaa aatctcctgg attgacccca
30421	gaacttccca gatccagatc cactgtgctt tagaaaggct taggaggtga acaagtgggg
30481	tgaggctac catgtgacc tggaccagaa ctctgagac ccatggcacc ccactccagt
30541	actctccct ggaaaatccc atggacggag gagcctggaa ggcttcagcc catgggctg
30601	ctaagatga gacacgactg agcagcgtca ctctccctt tcaacttcat gcatggaga
30661	aggaaatggc aaccagtcce agtgttctg cctggaaaat cccagggaca ggggagcctg
30721	gtggctgccc atccatgggg ccacacagag tcagacacga ctgaagcaac ttgacagcag
30781	cagcagcagc ccaataaac tcagcttaag taatggcacc taaatggacc ctattgocaa
30841	ataagttcca ctgcgtgca ctctgttag gactcagtt cctgatgtg gagggtccc
30901	acaagacgtg tigtatatt ggtgttccc gaaaacagtg tcaatgtgag catcccagac
30961	tcataacct cctactccca ctattccatt gtctctgag gtatagaaca taaaggttaa
31021	gggcttatt agatggaaga ggaagtgaata ctgctctgt cttaacacat accaagtacc
31081	atcaagttcc ttctattta ttaactgtg tttaatcag aatatgcta tglagaagca
31141	tccggacgat agcccagrti acagacgggg aagctgagcc atgaagtict cagcaccttg
31201	ttcacgtca gactgaanac gggcagagc cggcagcaaa caaggttct ctcccagc
31261	gcccgtctt caccogcttc ctatggctc tcactgtct tcttaacta agetotccc
31321	aacctgtgg agacaggatt agagactta ggagaaaaga ccaggaaat cccacacccc
31381	accgagtga gccactaaga caagcttg taaggacaga accagcaggt gtctcagcg
31441	agccaggag agacctgca ccaaaaacaa taifttagca tctgacctt ggaacttga
31501	ctctcagaaa tgtgaaaag aaactgtgg ggttaatca actcaccgtt gttattgtg
31561	tatgactgce tgatfaaga aggagtggg aacactttag tftaggttt tatgaaat

10

20

30

【 0 1 4 8 】

【化 4 5】

31621	aagctctgtt tctctgaaat aaatcccaa gggataatt cctagggtgt agggtaactg
31681	ccacaaact aggcagctta taaaaaaca aagatatcac ttgocagca aaggctcata
31741	tagtcaaat atggtttita tagtagtcat gtaggtatgt aaaagtigga tcaataagaa
31801	ggctgagcac cagagaattg atccctcaa atcgtgtgct tggagaagac tcttagagat
31861	ccctggaca gcaaggagat ccaaccagtc aatcctaaag gaaatgaact gtgaatattc
31921	actggaagga ctgatgctga agctgaagat ccaatacttt gcccacctga tgcgaagagt
31981	tgactcattg gaaaagacc tgatgctgga aagcttgagg gcaggaggag aagaggcggg
32041	cagaggatga gacgggtgga tggcatcact gactcaatgg acatgattt gagccaactc
32101	tgggagacag tgaaggatag ggaaggctgg cgtggtacag tgcattcggg cacaagagt
32161	ctgacacatc ttatgactc aacaacgaca gcaacacagg catcacagc ttagtgtgat
32221	aageggcaga actgtttcc aggggtccga nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
32281	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
32341	nnnnnnnnng tacgaticga gctcggacc tgcattgtg agtcacgtca tgcagcgtg
32401	tttccggct ttacgggatt gtggacgatt tctgtttggg ttgctcatg ataatttagt
32461	tacagcttag gttcttctt ccaggccac gaggacatg tttcaggtg agatgacgtg
32521	gtgggggatg ggcggccaag ccccactgg ggggggaggg atctgtgtt gggcaggagt
32581	tggcagcacc cctgaaactga tgccttccga tccaggtgac aagaaccggg ggatattatt
32641	ctctgcctt ctcatgtcat gtctcgtgtt ctcatgatg azaacatag acaatacagg
32701	ggagttagat ttgggcgggc acaactctgg gtgggggacc cgggtgcaat gtgccagca
32761	ggccatcaa gatgagggcg acctgggtgg tcccctctc cctggggtc ttgthttcc
32821	ctctatgaa atgggatcag gcagcagcca tggaacaccg gcacctggc ttctccacc
32881	ttctcgtctg tgaatttggg tgggatacc aggcataag acctggggcg gggggacatc
32941	actctctgc agcaggagc ccgacagatc ctctgctcat gaggacttcg tccctgggct
33001	gacctctcg actgctggag gctgaagctg gaggcacagg cgggctcga ggcagggtc
33061	ctgaggacga cagagccagt ggggctgac ctctgagcag atggccctc gcccgggcc
33121	ctagcttgt gtgtccact gcaggttctc tcaagtgagc caclacgta tgggggagc
33181	gccctggca gggatcggg gtgctgactc ctccgagat ccgacctct ggggacatc
33241	tggccacat ctaagcctg caagagctg gttcactagt ctaactctc tctgaagtc
33301	caatggactc tctccatcg gcagtcactg gatggcctct ttatccccga tgggtctct
33361	ttccgtgac ctggctctc tgaccacctc ccagccccc accatacagg aagatggcac
33421	ctggccctg cagactaag tccaccctg gcctggctc agatgctac agtctcctg
33481	cggaggccc cgtctcccac taggcccaca gctgcccgtg tgagtctag tctcaactg
33541	aacctctc atttctcc agtctcagc tcccaaccc agagatcc cctgcccct
33601	tcaaggccct tctccctcc tgggggatg ggggttatgg gaggccaag ctgatcccc
33661	gagcctgtc cgtgacaat gtccgtctt ggtatcgc tcccctggct ctgagagctc
33721	ctgtctctt ggggatgggt tgggtgatg acaagtggat ggactctag gtcacacctg
33781	tccctctct aaggaaactga ccttaacc cgacactcgg ccagaccag aaagcactc
33841	agacatgct gctgataaat gagaaggctt ttattcaga gaaacaggaa caggagggga
33901	ggagaggccc ctggtgtgag gcgacctggg tagggctca gggctccatg gagagggtg
33961	ggaggggtg tggccagag gcccaccag ggtgggggtc cagggcccta agaacacctg
34021	gaggtctca ctgtctctg caccgtgct cctcgtgct tgcctcga gctgtaactg
34081	ctttcgatt tccagctct gccctcagg ctcaagctt gctggccgc lattgtgt
34141	tgctctgtt ggagcccgg gtggtctca cgttgcgggt gatggtctg cctctgct
34201	tccaggccac ggtcacccta cccgggtaga agtctgctgat gagacacacc aggggtgct
34261	tgttggcct gactctcag gtggggggcg ggaacagggt gaccgagggt gggacttgg
34321	gctgacctg gtggacagag gagagggtg aagaccggg ggggttctg acctgtccc
34381	cacggtagcc ctgttccct tctctgtgc ctccgacct tgcctcagc cctggggcg
34441	cagacagcc ctcaagaacc atgcaatcc actctcaa gaccagcca aactgtgct
34501	cagatcccc ggcctcgacc agggctctc tctctctc tcttgcccc gggagtctg
34561	gtctgtctt ggcactgacc cctgagccc tccagccctg ccagaccct cctgacct
34621	ccgtctatg agcccagggt cctctcctg gaaccgggt cccccccc acctgccc
34681	acgtctctga tgggagatgt ggggacaagc gtgctagggt catgtgcgga gccggcccc
34741	ggcctctc tctctcccc gccacccctc agctctctg gccaaagccc gggctctc
34801	tgaggtctg cctctctacc gtcccccctg cctgagtca gggccccctg cctcacctg
34861	ctcagggga cgggtcccc acacagcacc tccaagacc cagattctt gggagtca
34921	gacctgtca tctctctaa gtccaatgt cgttccagg ccagcggagg ccgacctc

10

20

30

【 0 1 4 9 】

【化 4 6】

34981	gacagggtg acccctgggt cccaggggat caggctccc agactgacga gttctgcc
35041	catgggacce gctccttct gaccgctgtc ctgagatcct ctggcagct tgcctcct
35101	cagctgtgtc caccggccc ctgagcccag agcggggcag acccctctct ctctgccctc
35161	caggcccttc cctcaggctg cctctgtgt tctggggccc tggctatagc ccccggcag
35221	cccccaagct cctgtctggc ctcccggctg gggcatggag ctacagcac agagcccggg
35281	gcttggagat gccctagtc agcaccagcc tctggcccgc accccagcgt ctgccctgca
35341	agaggggaac aagtccttgc attcctggac caaacaccag ccccggcgc ccgactggcc
35401	ccattggacg gtcggccaet ggatgtcct ctgtgttacc ccaagacca cccgctccc
35461	ctcccggccc caccgagaaa ggtggggatc ggccttaag gccgggggga cagagaggaa
35521	gctccccca gagcaagaga agtgacttc ccgagagagc agagggtag agaggctggg
35581	gtggggtag agccacttae ccaggacggt gaccaggtc ccccgccca agacaaaata
35641	cagagactaa gtctcggacc aaaaccgcc gggacagcgc ctggggcctg tccccgggg
35701	gggctggccc gagcgggaac ctgctggcgc tgacgggccc agggctcag ccggggggc
35761	tgtctctcc gctgaggggt gttgtggagc cagcctcca gaggccagg gacctgtgt
35821	cttggagggt cctgtgccc agccccttg ccgagcagc agccacacac gccctgggg
35881	tcaccagtg ccccctact cggaggctgt cctggcacc actgacct tagcctgag
35941	ggagacttgg agcgcctcgt ctgtcgggg cggcagagga gtaccggct ggttggacc
36001	tgcccagcc ctctggcct cactgaagg ccttgggtt ttctctccc acagtctca
36061	cagtcagcc aggcagctt ctctgggg ctgtggcac cgggctatc ctacggccc
36121	aagtgaggaa cctgcccct ttctccacc cagggagatc cagttcgtt tttctctc
36181	aatgaacat ctctcgtgc agatcctgt cttctgtac atctgttt ccatccatg
36241	atccaacatc cctccatcca tccatccc agccatccat ctgtcalcca acatccatc
36301	ttccatccat tgtccatca tctgtccatc ttgcatctg ctgtccaaca gtggccatca
36361	agcaccctgc tgccaagccc tgtgtcacac gctgggactt ggtgggggga gccctcggcc
36421	tcccaccctc ccatctctc tgaactctt ggggtcaagt taaacaagt cccatccgt
36481	ctagtctgag gtccccccgc agcctctct tccactctct ctgtcttga cccacactgt
36541	gcactggacc gaccaccagc ggccttga tccctgttc ctctcagacc tctttttt
36601	ggctctggat ttataacat tctgctctt ggaggcctct cagctgagt gtcccacaga
36661	cgctcagac tcagcatct ccatgaaac tctcccagg tcttgcaga cctgttccc
36721	cacattgtc tcaattcgtt agattctcc acaagccaga ggcctggact caccatata
36781	tgcctcccc tcaatgagc agcctctgt tctaccata accaaacat cccataaaa
36841	tcctagaaga acaaaaaag caccagatg gcactgtcag agttatgat pacaagaate
36901	ctcagttcag ttacgtact cagtcgtc cagactctt cagccccatg aatgcagca
36961	cgcagggcct cctgtccat caccacatc cggagtac tcagactcac gttcattgag
37021	tcagtgatc catccagcca tctcctctc tctctccc ttctctctt gcccacaatc
37081	cctcccagca tcagagtitt ttcaatgag tcaactctc gcgtgagggt accaaagtc
37141	tggagtcca gcttcagcat cctctccc aaagaaatcc cagggtgat ctcttcaga
37201	atggactggt tggatctct tacagtcaca gggacttca agactctct ccaaccacc
37261	agttcaaaag cctcaattct tggcgctca gctcttca cagttcaact ctacatcca
37321	tacatgacca caggaaaaac cataacctg actagatgga cctttgttg caaagtaatg
37381	tctctgctt taatatgct actaggttg ctcaaacct tccitcaag aagtaagtgt
37441	cttttaatt calggctgca atcaacatct gcagtgatt tggagccca aaaaataaag
37501	tctgcaactg ttccactgt ttcccactt attcccatg aagtatggg accagatgcc
37561	atgatcttg tttctgaat gttgacttt aagccaact ttactctcc actttcaat
37621	tcataaag gcttttagt tctcttca ttctccat aagggtggt tcatctgat
37681	atctgagggt atgataat ctctggcaa tctgatcc agtttgtt tctccagtc
37741	cagttttct catgaglac tctcatata agtaataaa gcagggtgat aatatacagc
37801	ctgacgtac tctttctt attggaacc agtctgtgt tccatgcca gttctaactg
37861	tgtctctg accctcaca agatttca agaggcaggt cagggtgtct ggtattccca
37921	tctcttccag aatttccac agttgattg gatccacaca gtaaaagct ttggcatagt
37981	caataaagca gaataagat tttctgaa actctcttgc ttttccatg atccagcaga
38041	tgtggcaat ttgatctct gttcctctgc ctttctaaa accagctga acatcaggaa
38101	gtcacgggt catgtatgc tgaagccttg ctggagaa tttagcatt cctttctag
38161	ctgtgagat gagtcaatt gtcggcagt ttgacatc ttggcattg cctttctg
38221	ggattggaat gaaaactgac ctgtccagg cctgtggcca ctgtttagt ttccaaatt
38281	gctgcatat tgaatgcagc acttccag catcacttt caggattga aatcgtcca

10

20

30

【 0 1 5 0 】

【化 4 7】

38341	ciggaattec atcacctcca cttagcttct ttgtatgat gctcictaag gcccaactga
38401	ctcacatc caggatgtct ggctctagat gagtgatcac accatcgtga ttatctgggt
38461	cglgaagatc ttittgtac agtttctctg tctattcttg ccacctcttc ttaatatct
38521	ctgctctgt taggccata ccgttctgt cctcctcat cgagccctcg cctcctacg
38581	tagagactct aagcaggaag gtagccctg ctgcactggg tccagcatgc tttaatfca
38641	gcagtggaac ttctgggca tgattgttt taaggatgc gcatacgatt ttgaagcaa
38701	aaftaacag gacagcagtg taaagtcagt acttattct gattaaagaa agcaaatatc
38761	cagccgttta ctaagtiaat taactaaaga aacatctca acttaataa cagtatctc
38821	tgaacttac agcatgctc acattaaag gcaaaacct tttagaggcc agggctcca
38881	cgcttacgtt tattattaa tatatgctac agatcaagc ccatgacaca aaatggggg
38941	aagagtgtga gtgttaggaa aaatgagata aaatggtt ttgcaggtga tggctagt
39001	tacttaaaa aaaaaacaa aacaagctca agatgaactg aaggactatt agaactggta
39061	caagagttaa cctgtgatcg aatacaagca ggctgggcaa aactcagcag gtttctct
39121	atcagggcag taatgattga gaatacgaaa cggcgggaag cttacaacc tctataacag
39181	ttctataaa agccclaggga atgaacttaa cagcggnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
39241	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
39301	nnnnnnnnn nnnngctcc cccaccctc cctctctcc cccaccctc cagtgcacca
39361	ggctctgtgc ccagagagct gaagatgcca gcaggcccg tgcctgctc gctcgcgtgg
39421	ccgggctcg ctgcccgtct gccgtcccag cacacagatg cagcccacg tctcctgccc
39481	accgcctcc cccagggcag actctcccac aacaccaagg gcctctctg gttcaggtg
39541	gcctctgtg aggtgtaag tcttcccgg ggctgagacg aatggccgg agatccaaac
39601	gagccaaagg ccgccaagcc gccctggcga gggcacccat ggtcagagc ggcccagctc
39661	cctcctccc tctcctccc cctgctctt tatgctccc gctatgcta ttattactt
39721	gcaattaga aatgatacc aaggacaaa accgttccc cigtgtctt gctataaac
39781	ctttatcac ttatctata gcgtgtccaa gtttgcctc taagtgaatg aaggaacct
39841	accacaagc agcaacgtc ccacacct cgcctgtca actgggaatg taatgtgct
39901	tcaaaagac ctaagttct atgtcaaaa ccgtgtgtg ttcttttgg gagtgaacct
39961	aggccactcg tgttctcc ttcaaaagca ttcttaaca ctctccaga cccaggcctt
40021	ggctacgtt tccagaatt ccaagacag acactlggaa acctgatga gaaggcctgt
40081	gagcacaga gggccgggg tactctaggt aggtggggg ctccgtgctg atggcacagg
40141	cttctactt ctatcgttg ccgtccagga tctctccc ctcggaggt ttacagagg
40201	tcagctgtt ggccaggctc gttatccat gacttcaac cagagacggg gctcggtea
40261	gcccggggc ggbcagcagg caggagcagc caggagcgc agcacacga ggtcctaca
40321	tgcaggaggt gggggaagc gctgtgacc tccagactgc ccgatgtgg cctctccaa
40381	agggccggcc tggaccctgg ctctccag aggcctgct gggccctcc cagagctcc
40441	agccacaggc cctcttggga caggaggct ccagagtga ccggccggcg ggaagaggtc
40501	tgacaccgt cagttccaca acacgaagc aggtggagat gggatgagg atgagaaca
40561	ctttctttt aaaaagag ccagagag tggaaagag tcttgcacac gcaatgaa
40621	ctctggccc cgggtccagc ggcgctggga gcccgatc tggcaatc gaccacagct
40681	tgcctaggga gccgggtgga gacggaggt taggggaagg cggctccca gggagcgcga
40741	ggcccgggt cgccaagct cggcagggc aagcgcagct aggggcagc ggtatgtag
40801	cggcactgca cccggcagc gaggccagc gaggggctga aagtcacag cagtgtgtg
40861	acaagaggt cggctctctg cgttaaaga acgctgtgga cagaccaga cagcggcag
40921	gacacactca taccggcagc actgctgagc gcacgcgc gcacacac acacacaca
40981	cacacacaca cacacggccc gggacacact caccgggac ggactggga gtcacggcg
41041	acacacacac ccaccacaca cacaccacc acacacacac ccaccacaca cacacaca
41101	cacacacac ccacacaca ccacacaca ccacacaca ccacacaca cacaccaca
41161	cacacacaca cacacacaca cacacacag gccgggtggc cccaggcgca cacagcagc
41221	agcaaacatg cacagagcac agagcagcg ctaggggacc ggctgccaga ccaggcgcca
41281	cgctatgat tgggggggg gacgggggg ggggggagca aacggnnnn nnnnnnnnn
41341	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
41401	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnngtatt aaagaagccg ggagcgagaa tatgagggca
41461	agaggatgta ggtggggcg gggcaagat aaagagagc gacggtagag gggatgcat
41521	tgtatgctg aagcgagac aggagtgat ccgtattaga ttgatgcaa gaggaacat
41581	aggaagggg ggggagagg ggggaggtg gggggtgtg ggtgggaag gaacttaaa
41641	aaaaagagg gagagttga ggggggata aacggcggt aaaaagac aatttgaat

10

20

30

【 0 1 5 1 】

【化 4 8】

41701	taccagggg gggcggccag ggggggtgatt cattcttga gggggcaaca tatgggggt
41761	ggctgtcgcg gatlaggaga aaataaatat caggggtgat taagtgttg gcgttgggga
41821	ataatgaagt aagaatacaa tatgaatcgc gttggcatc ttgacctg ggggaacat
41881	ttccatgca aggaacaagg atgtagaat gcgtccgtc gaaccaccgt cccggggctc
41941	cagttagact cgccgagctg atagtggcc gagcaacagt taaggggca gaagctgca
42001	caaaaccacc acctgccaaa gtagggctc caattacgga gtgcgctcc tgggtgtcgg
42061	tccaaccctt tggaaaggac ctggaaataa gtgctacca ccagatata atataaacc
42121	acctggccag gagaggcagg cgctgtctgc acaggaaagt tcccagact cagicatca
42181	ggtaataat attttggac ctccctggaa atocagtgt taggactctg cggttcaatc
42241	ctgtgtcggg gaactaagt ccacaagtc acaagacatg gccaaftta aaaaagaaaa
42301	aaagagagag aaatattag tcaataaggt ttagaatg aaattaagct cctgccacc
42361	cccaccccc aatctggatg aataaagcat tgaatagta agtgaagfca ggctctgaca
42421	tgcactgatg tgactacct taagcaacc ccacctagg actggtcggg gttccaggag
42481	ttcaggggtt gccaggaaga tggagtcac cccctgccct ctccccac cagctctcc
42541	actggagccg cctaccacc ctccaccct tccgacct gctaccccc accctgccc
42601	ccagctctcc cctgtctgt gctgagctc cacacttct gggcagctc tccctctca
42661	gctgttct gctgccct accggggccc tccctctgt tcaattcagt tcagtctct
42721	agtcattct gactcttct gaacctatg actgcagac accaggctc cctggccatc
42781	accaaccccc agaacttact caaactcatg tccatcagc cagtatgcc atccaacct
42841	ctatctctct gtcgacctc tctctggcc tcaatttcc ccagctcag ggtctttcc
42901	aatgagfagc ttcttgcac caggtagcca aagtattgga gttcagct cagcatcatt
42961	tttccaatg aatattcagg actcattcc ttgggatga actggttga tctctctca
43021	gtccaagga cctcfaagag tctctccaa caccacagt caaagcacc aattctcag
43081	tgctcagctc tctttagt ccaacttca catccatag tgaccactgg aaaaaccata
43141	gctcgaact gatggaact tggggcaaa gtaatgtct tcttttga tatgtgtct
43201	aggttggta taactttct tccaaggagc aagcgtctt taattctat gctcagctca
43261	ccatctgacg tgattttgg agcccaagaa aataaagct gtcactgtt ccactgttc
43321	ccctctatt taacggagg aaatttcca gagcccagc gttccagct gggcccacc
43381	ccactccat gtcccagaga gctgtctct cccagctcc cggctggcgc tggtaagtc
43441	cagatatag tctttacac aagtgtctg gttcttagg aaagaaact tccctctctg
43501	ttcctctgt cctctatcc cagaagtac tgcagctgc gggagtctg cagcttcca
43561	gaagccggag gattttccc ccatttctg aaagagagct cgggggggg gaagctctg
43621	caccoclagg atcaccagag gagccaggt cticagggt cccggggacc cctcagtggt
43681	ggctcaggaa ccacagagc agacctgat tccaaaaacc tggctacacc tccagatgac
43741	ctttgtccc ttggctccg ctaaatgt ccaagccca acagtgaagc gcttaagaga
43801	aggatccacc aggtttagt ttggggagga gggaaagtgg gactggggg agggctggg
43861	cctggagagc aggaatccac catggcttca ggcagggtct ctggggcctg cggggtegg
43921	agggggcagg agcagacaga ggtgactga cacgacacac cctctacc caaggaggt
43981	ggcaggggc gggcacaga ggaacaagag acctgagaa ggggtccacc gagcagactg
44041	ctggaccag acatcttga gccagctgga atccagctct aagccatgct cagccaggc
44101	aggglatag gcaggactga gtggagtggc cagagctgca gctgcatgg ctgggaaggc
44161	cctgcccctc cctgagggc cccccagggt ctgcccagac tcaatttcc gaccgcagca
44221	cacacaggag gaagtggctc ggttggagt ggcccaggc tctggcagg tccaggggtg
44281	gggaaggggg gcagctggag tcaccgctg aattcaggga cagtcctt tctccctga
44341	aacctggggc tctccgggg gccaccgac cctccaggca gcggggggac ccagccccc
44401	atatgtgaga agagcagtc ccaggctgga gagagcgaag caccatgtg gggagaagt
44461	agactggatc ggggccccla ggggtcccc cggacctgca cggcagcct cagggcacc
44521	gcaccctatt gctgtcagt gctggcagt gtccaaggcc agggatgtg gttgtgtgt
44581	gtcgtgctg cgtgctgt gttgtgctg gttgctcgt gctgctgt gttgtgtgt
44641	gctgtgctg gctgctgtag actgtgctg gctgctgct gtcgctgct gttgtgtgct
44701	actgctcag cccagctca gcactggacc aggcagcctg ggaftctcc aaaactgct
44761	ttgtagttg gtcaaacct gaggtctga tcaccgcat ccaatgcc cctctgccc
44821	ccctatcac cgtgtgtgt gtcattatg agagctgtg aggtctggg aggtcatccc
44881	acctggcag taaaccgtga ggtgcccga atgcactga tggggcaga cccgagagc
44941	ttgtccggag acgaagcca gcttgcacc ccgcccagc ggcagctgg ccacaagcat
45001	catccaagca gttgttct gagcccagc ggtgtatga aaggagccag gagacacctg

10

20

30

【 0 1 5 2 】

【化 4 9】

45061	cgctccaag cgggggacc ccaggtctgt tatgccggac agtaaacag ftcagctccg
45121	gaeggagagg gtcccctac ctccagggt ttctcatcc acaaacatcc aaagacaatc
45181	cataccgaag gcgatccgtg cctttgctcc tgagacgtgc ggaagcacag agatccacag
45241	acactgtctc ccaggatcct atgtatgtaa aggaaccgaa gtcccaggct gttgtctgg
45301	taccacatcc cacggaacag gctggactga ttltaccaa atgtagcaga aacgtlaagg
45361	agtatacgt tcaaaatag agggccagac atgtctgaga agtcccitcc agaaaaagtc
45421	ctttgggtc ctcccacaga gttgctgaaa cagagaaccg gaaggctgc agagctgaa
45481	ttaaacact ggatgcaaa ggtccgtctc atcagagcga tggttttc agtggctag
45541	tatggatgag agagttggac cataaagaaa gctgagcgc gaagaatcga tgccttgaa
45601	ctctgggtt ggagaagact ctgagagtc cctggactg caaggagatc caaccagtca
45661	atctaaagg aaatcaatcc tgaatltca tgggaaggac tgatctgaa gctgaaactc
45721	caatacttg gccactgat gcaagaact gactcactgg aaaaaccctg atgtgggaa
45781	agttgaagg caggggaga aggggtcag agaggatgag atggtgggt ggcacacc
45841	accatggac tcaatggaca tgggtttgag taaacttgg gagtgggta tggacagaga
45901	atcctggcat gctgggtcc atggggctat agagatcag acacaactga ggcactgaca
45961	gaactgaagc aactggcaag ccggaggta ggtcccgtc gcgatgagc ggaactgca
46021	actgcccag tggagctct cctacacca gactctgac ggcactggga ccctagccct
46081	ccacggctc tccaggcca cagacacc tcacagaca gagaagcga acagagctgg
46141	tgtcagaac cagccccgg ggttgggcg ggcctgggtg gcaggctta gtgagaagcc
46201	ctttagcctt ggaaccagag cagagcaga cagtggcag agtccccct gggagaggcc
46261	ccccccag agtaccggcc ctggcccctt ggggagagg cggtctggg ggcagggaca
46321	gaaggcccag gcagaaggat ggcctcgtg gacggggcg accaaacag cccctggcag
46381	caagggaag ctggggact ttgcacccc tcaaggagg agcccacac agcgcactg
46441	cccaaggctc cctggccct gggggcaca tggcccagg ccaggccagg gggccatga
46501	ggccccag ggtcagtca gtgtcccag gcagcccgg cctctatcc tgcgggct
46561	ggcctttat cccgtggcg cccacggct gctccccg acagcggcg ctagagcac
46621	agccccgc atggaagccc cgtcaggaaa ggccttgg agcctgcag acaggtagg
46681	gcccaggag tcaatgtgca ggaagtggg gcttccctc gatggacc aggggtgat
46741	gaccagagg gcggggaaag agaagggaaa ccagctggag agaaaggacc tggcagagc
46801	tggctcagc cacagcgtg accctggcc cagtgctct ttgttggg tttatttt
46861	aatttgtat tgatgcta tttactctt ggagctttt ccgcccag aattgtacc
46921	cttggctgt gtcccttgg cctcaccgg cctctgtg caggcagac agggcgcaac
46981	ggggcagggc gtcaccaga ggcactgca tttgggggc agcggccca caaggcaggt
47041	ctgcttct cccctttac aggcagcag agaggtccag agaggtgag caagctgcc
47101	aatgtcac agcacagg cgcagctcca ggcactgaga aatccggga ctagacaggc
47161	accaggtgt cctgtttt taaaaaacg gcccaagaga agaggcaagt ctgcaaggcg
47221	tcccgggaag gcagcaggg ctggctcgg tctccccaa ggagggcagc tctcagcga
47281	ggttctaag tctaacgg agccaagcct gaaccaagg ggtcacgtc agctatggga
47341	cactgacctt ggatggggga gctocaggca aaggagtag ggaaggcaag gaggagagag
47401	gggtgcacag gctgcaggg agcttcaga gctgggaaa acggggtca gaccacgggg
47461	tcatgtcac cctcttta tctgggatc cggggcaggt attgaggat ttatgtcgg
47521	ggctgtag gtcagttc tctgtgaa aattgttc agatcaga ccagcgtgag
47581	gtcaggtag aggatgaga agaagctgt aaaaagtgat ggaagcggg gggacggctc
47641	tgggtatca ggcaccaga tgcctatgg aatccgagg cgaattaca gtgactcgt
47701	cagaggctg tgggggaga acagcactg tcatgactg gctacaaaa tctaaatgt
47761	gcacctttt cggcaatag cagcaagta taaaagaaa cgcatttct taaaatgg
47821	taattcctt tttaggaat cactgggg cgggggaca atcaaaaaa tgtgacaaa
47881	ggtttcaag ccaggaaagc aactcgtta tgaaggaga aaaccggaaa taacctgaat
47941	atccaacaga aagggtgtga tgaagcag catggcaca caccgcaag gaatcctaac
48001	acaaactcc aaaaatata ttctgactt gggttttaa agcatgcgt cactttcaa
48061	agctgtcag aaaaataga aatatccaa taatgtctc ctagccaaat ttttaatt
48121	ttgcttata atttataa gttataatg tatgaaatat aatgataaaa ttataacta
48181	taaaaagtt atgaaaatg tcaagaag atatacatg aattttatc tctacaatac
48241	ttttaaac cagaataac tgcctttaaa aaagattgag cacagaagc tataaagtaa
48301	aaatgagag ttctgtca ccaaccac gtctacctt aaaacccat cccagcag
48361	agacagtgc atgtggctc gtacactct ggccttctc ctaggcatg atgtccctga

10

20

30

【 0 1 5 3 】

【化 5 0】

48421	aaactcacac acacggclaa tgggtgctggg attttagtiti tcaaaacgga ctcatactct
48481	gcciatgagc ctgcaactat ttaticagtc lgttgagait ttctataca gccacatgg
48541	atccccgatg ttctctgaat ggcctctgat gaattcaag ttggaagaa gcagcgtgtc
48601	ttaatcatt cgcctattaa tggagcttg ggggtgttcc actacaaaan nnnnnnnnn
48661	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
48721	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn atacaattcg agctcggtac cciggtctga
48781	actatatgaa cagagaacga tgagaacagt ttctcaact tggaaacagt aacatttgg
48841	gctaataatg tctttttgt gtagggtgg cctatgaata gaggatata gcagcatcat
48901	ttaaccttia ctaactacat accigtgca actacatcct ctccattgt gtaatcaaa
48961	actctctccg gacatggaca agtgtgccc tggatgggt ggaatgacct ttgttaaga
49021	accactgggt cagagaatca tagattttg tctgttgac tttaaaaa tacatctgg
49081	ttttatttt attggttct gctctatct ttatgattac ctctcttta ctggggct
49141	ccctgataga ttctccttc tggctcagct ggtaaagaat ctgctgcaa tgcaggagac
49201	ctgggtttag tccctgggtt gggaggatcc cctggagagg agaagggcta cccaccocag
49261	tattctggcc tggaggatc catggagtgt atagtccatg ggtctcaga gtcggacatg
49321	actgagtga acacacac acatagtcc ctgtagctc agctagttaa gaatccacc
49381	cgcaatgca gaggccccg tcaattctt ggtctcggaa gattccctt ttttactcc
49441	ataagatct atctggggac aaaactaaca gctatgccag acctctgga catcagggaa
49501	ctgtaggggt gtaggactga cagatgtgt tgtctcca aacacaaaca tacatctga
49561	tacatgtaca tggagagagg gggaggagg ctgtgagtct ccaggggacc gtgcaacct
49621	gtgacatca tggaggcgt tgcgggtgat cactacacag ttctctctc tggttctg
49681	gtcaattgac tcaacaatc caattctat acttctttt agactgagg aattttcac
49741	tatgttaaga catatgata catgattat gttcagcgc atgaggctc attttgtgt
49801	tccatttgc ctggaacaa agttggactg attactctt aggggtgctt ggggtgtt
49861	ctggaggaca ggagcattg aaccaaggc ctctgtgaag catgacctc tctcaggtg
49921	gaccaggag gaacgcaag ccgaggaaag cagactctcc tctcctaa cccgaggtc
49981	ctgctcaga aaggacaat ataatgacta gaagaaaga aagaacatca cgtctggag
50041	gtttgtctc tggagcagat tcaacgttg aggtctatg gcaggaatic taggtgaaac
50101	agagcagta cccatgtgt ttgaaaatt ttaattaca ttgcagta cgaattgt
50161	taagccagac agggtagcac agcaaatgca ccatgtgtc acctgtgtt tgzaaaggag
50221	agagaactg ctggcacatt caggaaagg cgtctctcag cttggaggc acactgagag
50281	gccacaagca gatggtagg accaggtct cggcagagg gatcaatca ctgctctca
50341	ctttgccac atctgtgtc tctctactt ggcagagta gttcagtct catagctgg
50401	agttccatt ggtagaatc caatctgggt caftttaaa cctctctg tttacttaa
50461	tgttttaa atctcttg ctaagaaaa aaaataaca taatttaa ggtgtgtt
50521	ggccttgac tataaagta atattctgg ccalticaga gcatggtga ataatatc
50581	ttctgctta ctatagctc tatttctg attcttaca ggtaatit tttaggaac
50641	gggtactgt aatatttct tttgaatac ggaacttg tattttcc taattttt
50701	tttttca ttttgtt tactctcagg aaagtacta ggactcagga aagtctttg
50761	tccgctgtt attcagctt ctaccctgg gccaggcag cgttctctt ggcctaagt
50821	tcccacaac cggggccagt tctctact ctteacctg aggcctaat gaggagctc
50881	ctgctctg agcagccggc cctctctga cgtctgtgt tctctggca tggcctccg
50941	gtgctctgg aggtctctc ctctctgc tcactgtcc ccgactcga gctctcaggc
51001	tcaagcagt gtcgcagtg tcaagacct ctgtctact ctctctct caggactct
51061	ccctctgat gtgttttc ttggctcc ttggactcc gctctgaacg caggctgtg
51121	gctgagtgt atctctggag ggaagcctgg gaggctggac ggtctgccc tgggtgtg
51181	tgacagggtt gggctcggg cggggcctgc acgtctctt gaccagacc gggactggg
51241	tccggcctc aggcactact gactgaatc cctcacaaga ggggtcagg cctggcggg
51301	ggaaccgtct ctgcaatgac agcccctcc agggaggca cagcggggag ctgctgaggc
51361	tccagcccta gtaggagtc gggagacca gggagcggc ctgacggcc cacactggcc
51421	caggctgtt tcttctgt tctcagctc aacagaagct ccgaggact gggcagttc
51481	ctgaattct cccgggtt ttgctctga gttctctgc agcaccgtat ggacatcag
51541	agttcattag cagtggtctc tctctctg tctctctc atcaggctt ttgctcaggt
51601	caccacagg ccaacaccag gacagtctg tcccggcagc ccactgtccc tgggagccc
51661	ctgtgcagc ctgccaagg gccgggagg cgggggaacc gggccagcc tctctctct
51721	gtgtccacag tctcccggg gctggaggag agcgtgagca ggcaggagg gttgtctc

10

20

30

【 0 1 5 4】

【化 5 1】

51781	cactceccg tctgtctg tcactgtg gattatcact gctgtcagct gactgacagt
51841	aatagtcggc ctgctctcg gctggggccc cgtgacgtt cagcgtggct gittgacctg
51901	agctggagcc agagaaccg tcagagatcc ctgaggccg ctcactatct ttataaatga
51961	ccctccaggg gccctggccc ggctctgct ggtaccactg agtatattgt tcatccagca
52021	ggccccccga gcaggtgatc ttggccgtct gtcccaaggc cactgacact gaagtcggct
52081	gggtcagttc ataggagacc acggagccgg aagagaggag ggaaggggga tgagaaagaa
52141	ggacccttc cccgggcacc ccaccctgag gcggtgcttg gagtcactc tggcttcggg
52201	gcaggcccca gcccaaggct ctgtgtgccc ggagcctgcg ggcaggcccg gggggccgca
52261	ctgtgacaga gagtgaggag ggcagcagg agagggtcc agccatggt gcatcgccc
52321	cgactctgc ctctgagccc gcagcagcac tggctctct gagaccctt atccctctc
52381	agactttgc aggggccagt gagggttgg gttatgcaa atccacccc gggggcccct
52441	cactgagagg cggggtcacc acaccatcag cctgtctgt ccccagcttc ctctcgctt
52501	ctcactgtt gcacatcaga ctgtctca gggactgagg tcactgtcacc ctcccccgtc
52561	ctgaccaca tgaccactgt cccaagcccc ccggcctgtg gctctcccgt gactcccag
52621	tggggggctc agcctggcag catctgtccc gttgactgag gcatggtgt ctgggttca
52681	ctgtgatgt gacctcaga ggtggtcact agtctgagg ggatggctg tccagtctg
52741	actctctgc aagcgtgct cctggacag ctgtggacce gcaggctgc tcccctgaa
52801	gtccccttg ggcagccag cctctgacct gctgtcctg gccacgctct gctgcccctt
52861	gctgtggag gacatcagg gcagcggctc cctcccga ggtcaccca agcccctgt
52921	cagcagagag ggttggacc tgggagcca gccctgctg gccccagact agagcccgcc
52981	tgcaccgga agttgctgt ctgtgacct gctcaggcc gcatgatgacc gcgccctcc
53041	ttgtgtgt tagtgagtg gagggtccg gatgactca gccgtaact gccagctcc
53101	gtgcaacct gtgcgatgcc cccggggacc caggctcct tctctgtgtg taccaggtt
53161	ggcactagtc cacccccagg agggcactc gctgatggt tctctggcag ttgagtcat
53221	tgagaact acatcattt catcatcaca tctcatcac cagtatcac accaccatca
53281	ccatccate atctctctc tctttctt ttatgtcacc tcaaatctc acaccctca
53341	agagtttgca ttgtagcat attacttta gcacagtgt cctcttta ggaactggg
53401	gctctctgc tgatacccc ggaacccat ccagaattt tactgatgg tgaacccctg
53461	ctgttgatt ctggccagg agaccctag gcccaaatg tctctgaate actccatag
53521	taacaacac tcattggccc ttttatact ttaatttga aaaatactt tgaagttagt
53581	acctactcc acatttaca gcaggtaaag ctgcttcga ttgagagca agtcccaga
53641	caataaaga gaatgggatg aaccaggat ggggcccagg ggtcctgat tcagactcca
53701	gccgttagg acagaactg actaggtacg aagtgacgg ggtgggggg caactgggg
53761	ggaacttgg cacccccagg gctcggggcc atcccacca catctggct tcatcagta
53821	gccccctag cctgctgtg gaggaggcca ggaagctat ggtcaggct atgctggaga
53881	atatggggg ctgggtgtct gctgggtct aggggtctgg ccaggctctg ctgctctgc
53941	tggcagtgaa taattgtcc tcatctctt gagaagtcac gagtgacag tctctatgg
54001	ccaagctatt ggaaggagca gtgagcactc caccctcgc agacatctt ggaggcatca
54061	gtgtctctg aggtgtctt gggccttgg ccgggggacc tgagattcag ccattgactc
54121	tcagggggc cagctgtggg tgcagcggca gggctggcg gttggggata cctcaccaga
54181	gcaaaataa gatacacc aacggataga aattgactca cacccttgg tctggcact
54241	tctgttga aattctgt ggacaggaca cagtcctgg ataaaggat ttetatctg
54301	ctgtgcaat agactctgc acacgttgg ctgggacatg taatcttgg aacatggtat
54361	taattctgt tcaataacat ctgaaaggat tttgcatca ataaacctaa ggtatattgc
54421	ctgtcattt cctgtcttg tagtctctt gactaggctg gaagggttaa ccagcttacc
54481	aaatcgagtt aggaattcc ctattcttc cactgtctaa tagacttca taagattagt
54541	gtaattctt ctftaatcg ctgctataat catcactgtg gccaccgga ctgaatttt
54601	tgttaggatg attttaac aagcattta atgatttt ctattttt cgctgtctt
54661	gggtctctt gctgtctcc ggcgttctt cgtgtggcc agtggggcg ctgctctgc
54721	gttgcgaagc tgggcttct gactgcagt gctctctcg tgcagagcg cggctccag
54781	ggcctcagg ctgctgtgc tgcggcact gggctcagta gctctggcg acaggtgcag
54841	cagcctca gaactttg tcccagatg gtggctcgt cgaaccogtg tcccctgct
54901	tgaaggagg attcttacc gctggaccac cagcagctt cctggaggt tttaattat
54961	ggatttagc tctcattaga tctcttca catttctat tcttttga gtcagtttga
55021	tacttttt gtgtctgaa gttgtccat ttatacaag tcatctaat gttgataga
55081	caattatgg ttatgcatct aattgtgtt ttacaattt gagagcattg tcttcaatt

10

20

30

【 0 1 5 5 】

【化52】

55141	cttctatct gcaagattgg taataatc tcccaagagg agtcacaac tgaatgaga
55201	ttanatacag gcttttttt taaaagaatg aacttatgtt gttgccttc tcatagatct
55261	tactctitag catgactgta ctactgacti ggggcgtttt catgctgtg tggagagcta
55321	ccattagtag tcttatcgc ccaagacat cgggctcctg ggcacagfga aaacactct
55381	ttctgtgctt attttgcaa atatggccta gctagcgtc ataaggatc acagctgaca
55441	actgctggaa cagagggaca tgcgaagcaa cgtgaggctt ggaacctgga gggctctct
55501	tggggacagt ttaaccagct ataatggaca ttccagcatc tgggacatgg agctgtgaa
55561	tggaccnatg actgtcatt ttggaagaga aatccaggga gagaaggctc caggggaatc
55621	tgaggccgca tgcagtgcct caggacaggg gacaccttct ccagcagagc aggggggccc
55681	gcccaggccg cctgcagfga ttccaccagg aggatgca tccctgcaga cctctgacag
55741	cagggccctc tcttgagaca cagggctaca cccggggccc tggaaacctt tgagacccta
55801	aaacttctt tcttgacca cctgacagc agtctagctc agaacagaca tcttcattt
55861	cagcaggaaa atcctttcc tctttgagg gagcgactgg caccggagga gctgagtct
55921	ttaaacacag gctgcctgaa cctcaggat gacctgcagc tgcctcagagc aggctggagt
55981	gtgatagctc actctaatgt tactaaaagg aacataatgg acacccccic tctgaaaaat
56041	tccctcctg cctctcatct cttagtcac ttatgcgcg tttactgtct tttctatta
56101	ctactcttaa cgcacaacta tctatttcc cctccagtt taacacggtt tccctccac
56161	cegetctct taatctcaga agatctgcc tttctctta ttatcacag cccctattt
56221	tatttttt tcttacccgc cttttatcc ctcccctct cactctctat ttaattacc
56281	cttaactaca cgcctgcgc tatctcga tgtatcaaa tattttccc ttatataca
56341	ctccaggccg agcggctaac ttattataa tctttatag cgcctacta atttccctt
56401	attctaat atctatata acccatgcaa ttccnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
56461	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
56521	nnnnnnnnn nnnntgggt gtactgtata gagtaaacgc gcatgaaga gttggctcaat
56581	ctatggctgt gagaggcaga aataatatt atcatatata atttatgta taacacactg
56641	aggtgtggg ctctagaat agtcggcagc ggggaaaagg tgggaaggag aagacacaag
56701	agagagatgt tgcctcgcg ggatggatgg gcggagggat agaaagataa aaagaggaga
56761	ggtatagagg gggcggggg gcataacgtg tggtagggta aatagtaggc ggttaaitg
56821	aaaaaaagaa agcgggggg ggcggtaaca tagaatcgc aaaaaagfca tatactgaac
56881	ggggattagg gagaagagg ggggggcgtg ggggtcgggg gaaagaggig tgtgtataat
56941	tgtatggag tgttattga atatatata atgtaatag ggtgttaatt agtgaattg
57001	tggagatatt atattgggt gtgggggaca tggcaaatg atgacggga taaaaaagt
57061	aaagcaagag gggaggggaa aataaggggg gggagaaagt cgaagaaat aagaggaaga
57121	agaagaagc ggggtggcgc ggggggggg cggcgcctct gtatctgctt ttttttgt
57181	gtcgtgtgt gtcgcgct tttgggtcc gggcggggtg tgggaaaaa aaaaaaggc
57241	ggaggcccg ggcgggta cggggcacc ccggggctc ctggctctc ctccggcagc
57301	tccgggggtc ggtgagcctg cgcctccgg gcgcgggcc cagctgtgt ggcctctgga
57361	gaatcggagc cgtctggca gcacggcgg ggcgcgcga agggccacgg gacggacctt
57421	caaaggccgc ggcggagcgc ggcaagccga accgagggcg gcttggcgt cggccgagcc
57481	ctctccccc ctcccgcgtg gcccagggt cgggggtgga ctggggggg tacaaagc
57541	tcacccctc cccccccta gaaagcctc caggactctc acagagcacc cggcaggagg
57601	catccggtc cccctcggc tcagttcagt tgcctagtc tctccaact ttccgacc
57661	catgactgc agcaccaca gtttccctt ccatcaca ctcccagat ttactcaac
57721	tcatatag agtcagtat gccatcaac cgtctatcc tctgttcc ccttctct
57781	ccacttcaa tcttccag catcagggtc tticttatg agccagttc tcaatcagg
57841	tgtcagagt attggattt cagctcagc atcagctct ccaatgaaca ctcaggactg
57901	atttcttta ggatggactg gctggatgca gcgccagaca ccgaccgct ttacccctg
57961	tgtcttcc aatggctgc cctcggggc ctaggggcat tggctgggt ttgaatcctg
58021	tggcctttaa tttagcct tagttcagg tccagggcag ggccatccg attcaggatg
58081	ctcccagcc ctcaggat ggcaggttt catggtctt tctgagtgag tctgagtgg
58141	tcatatggt gcccttggca gggaggctc ctgacttcc tctctcaca tcactgtcc
58201	aaaccccaa gagaggctc ttggccagg gactgcagg aggtgaagt caggagcaga
58261	agcatgggtt agggggctca ggtggcaga ggaagccctt ctgtaggag gaacggcaag
58321	cgaggaggga acaggggac cggcagtc tggcaagctg ggtgatgca cgaactcct
58381	ccgaccacac agtctctca gccagccga gaagcaggcc cctccctga ccccctctg
58441	ggctgggtt tcaatttct cctccctga atggggtagc ttttgcctc caggagagg

10

20

30

【0156】

【化 5 3】

58501 gagcatgtaa aggtggccac tcctctcgg cagacatgcc aggcctgggc cagcctccac
58561 ccccttgctc ctgcagcccc tgcctgacct ctccctgttg ccacaccggc cccctcggg
58621 ctgctcaggc cccccctct gcaggaaacc ctctgggaca agcccagct gctgtaactg
58681 tggcttcca ctgtacctg caacgtggga ggctgtact taaaactccc atgactggg
58741 gatggccgt cccagaaca aggccacgca tcctggagg cccctgagac cattaaagg
58801 agtaaacat tttacttta tgcatttca tglgtatcag aaagaaaaa aatgtatcat
58861 cagttcatca aatccatgat ttctgacca atattgctaa gatgaggctg aaataggcat
58921 ttccatttt aaaaaactga atcaacttga agaacagat ggcaggctc cctgggtggtc
58981 cgggtggtta cagtcacgc ttccagtct gggggcatgg gttcgtacc tgaaaattt
59041 aaaaagggaag aaaaagatgg ctccccgc cctgggattc tccaggcaag aacctggag
59101 tgggtgcca ttctcttc cagtcatga aagggaaggg ggaagtgaa gtcgctcagt
59161 cgtgtcggac tcttagcaac cccatggact gcagcctacc agactctcc gttcatggga
59221 tticcaggc aagagtactg ggtgggggtg ccaatgctt ctccaggcaa acggcctgct
59281 actgctactg ctgtaaatc gcttactgc tctcaactc tglcgcacc catagacggc
59341 agcccaccag gctccccgt cctgggatt ctccaggcaa gaacctgga gtaggggtg
59401 atgctctca gctgctgct gctgctgcta agtctctca gtcgtgctg actctgtgtg
59461 accgcataga cggcagccca ccaggctccc ccgtccctgg gattctcag gcaagaacac
59521 tggagtgggt tgcatttcc ttctcaatg catgaaagt aaaagttaa gtgaaatgc
59581 cctctgtgt cagacttca gtagccaat ggactgcagc ctaccagggt cctccatcca
59641 tggattttc caggcaagag taciaggatg ggggtccatt cggcctagg agtgagaat
59701 cacggctgc ttccccttc tgcctctca ggggtctctg tggacctcc ctggagaggc
59761 cggcggggt cgggggactg ggggggagg ggggggtgag tcaagcggg gctccctcc
59821 cgtgcccgt ctctccctt tttagcaca agctggggc ctttttagg cgcagcctca
59881 ccttggggc cactgcccgt gtttggctc cccggagata aaacagatt cctgcaccc
59941 gggctcac aaggattga taccgttc ccagtgtct caaccctc cctctgatt
60001 tcaagagac gccctgect caggaggctg ctatccag gccaaagggc ggcgtgggt
60061 cccagcggc ccgcaacag actgctctt gaccactcc tccaacagc ttactgcca
60121 agaaggctc ctgaccctc atctgcccg gtggttga gaaacctca telggccct
60181 cctctcggg gctcagttt cccctctgt gaactggcg atttccca gtagctgt
60241 tggcagccg cctcccgtg gccagtctc cccgggacac agctgaatg cctgctcgg
60301 gatcacctt cccaagtgg cctgacgga ggggggggg agcagggaaa cccgactct
60361 ctacagcggc ccatcgaat ggggacgctg agcccccgg cagcggcaco ctctggcca
60421 gggctatct ccccccgc cccgtccct cggcctccg agaccgcagc cggcccgc
60481 cgggaagga cggatccc gggccgggc acccccctc cctggccgg ggcggggg
60541 gagtgcagaa caaagcggg gggcggggc ggggggggg cgggggggag gatataagg
60601 gggcggccg ycgccacccc agcaggccct gacccccg ggggatggc tgggcccgc
60661 ggcctcccg gggcggcctc gcgcgctt ttgtttgg tgaaggatg gggggcggc
60721 gggggtact attttcat ttataatgg gtattagca gcgagtga ccacacct
60781 atccaactat agccaattt tgcggggca tttacatta cagactgct cgcctctat
60841 ttcggtacag catatcagat cgtctctta ctacagact agtgattat gtttatagta
60901 cacaaaaaag acggtgtgt gggcgtaatg gtgcatttt cctcctcgt ttctcagc
60961 cacctcaatt acaccaacac tctactatt aaatcacgta ttgacgcca cctcccgc
61021 gcaactaaa agaagtgca gatatttga agataaaat gttctgtt acgcccgcg
61081 cgttccgct atattactct tagaactct tctgcccg agcagttat cccccccg
61141 aactagatg cgccttaata ttgttcaa cgttttga tictaacat aggcgggaaa
61201 ggtagacat cgaaccctac gacaactaaa atcgacgag acaggctatt tatalcga
61261 ccacacgcgc gcggtataca naccgtaaaa ttactaaca tcaagagtaa gggcacagag
61321 cgaatacaa cggcgtggt gggaggtgt tctgtatga attcgacct cggcggc
61381 cctctgtcg tgnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
61441 nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nngatataa
61501 tattaataa cagcggatag atgtgtgtaa gggaggagg gcataagaga taaagagag
61561 gggggggg agaaatagag tagaggaga tgagagaaa aagaagcaa gcgtaggtag
61621 aacggcgggt gggtagtag ataaagttag tttatatatt tgaagaaag aaggtagat
61681 gggatataa gaagtaagga gaggagagg cggcggagag agagagtga aagaaataa
61741 tgggcaag cggggggg tgaagagag tagaagaaa gatagagag ggggaaaaa
61801 gggaaaatga ggattagaac aagtaggaca gtagatgt gaaaaatgag atcaggctca

10

20

30

【 0 1 5 7 】

【化 5 4】

61861	ggtagagaaa aagtagaaac tgggctgga ttgtaaaaa gggaggccgc gatggggcag
61921	caccataagc gaagagatga altaatgaaa gcaaggcagg gagaatcaaa ttagttgggt
61981	ggaggaaagg ggcgtgact tctctcctg ccggaaagag aactagaata gccctgggct
62041	gtggggggag gtaaaataa agtgactct gggccctggg ggaggccag gaggttctac
62101	cgagctgagc tgggtgcctc tcccaaatg ccaacccct gagagtcgac gggagagcac
62161	agcctggcca aacctgggca gggcacactg gtcctcacc ccacagtggt cagagocca
62221	gcctggctcc tgcctctggc gggaaacaca gacctcaca cccacacaa ggtctcggcc
62281	gcctcaaat aacagcagcc gtgcccctg ggcgggtgac cggacacag agagalgaag
62341	tcgcctcic teagagtgcg ctgtctccg cccgctcagg cccggctcc ctgctctct
62401	gaggtcacca ggagggattg catgtgggtc tcaggacac aggttcagtg atgtgacaga
62461	gggtagtggg tcccagcagg gccagcttt ggaccgttt ttctgaaaag ccagttggcg
62521	acctggggtc acagcaaac tcatctgtt tggccaggag tctccagtg acggcctccc
62581	ccagaacatc gggcccagtg gggcctccag gggtagact tgcctccag ctacgcccc
62641	tgcttgaca agtccatgat ttgtaaaa taatttgtt tggatggagt tgaattagtg
62701	gtgtgtgagt ttctgtggc cagcaaatg aatcagttac gcataacat gttccagct
62761	cttctacga tctgtccc atataggta ttatggggg tcaggtagag ctctctgtgc
62821	tacgagtac ggcctattc agtgcctc agtctgtcc gactcctgt gaccocattg
62881	actgcagcac gccaggctcc ctgtccatc accaactct ggagcttat caaactcag
62941	tcctcagac cgggtatgcc atcaacctc ctatctctc gtcctctct ctctctctc
63001	cttctctct tcccagcacc cctlagagaa gggaaaggca aacctctg gttattctg
63061	cttgagaacc ccatgaacg tacggaaagt ccttattgt ttctattt atataagca
63121	gtgcacacgt gtcagccca atctcgaat ttatcacc cctccggcg cgaattgtag
63181	tcattgtgt ttctacatc tggactcta ttctgttt gtaaacaaat tcaattacac
63241	cacttttta gattctgac atactggca agcccacagc aaacatgctc aatggtagaa
63301	gactgaaagc uttctctca agatcaaaa caagcagagg atgtccactc actcctgtt
63361	tactcaaac agcctgaac gtctagcca tggcaatcag agaagagaaa gaaataagg
63421	aatccaaat ggaanaagc aagtaaacct cactcttg caatgatg acactatac
63481	ccagaanaac cttagatgc taccagataa ctattagc tcatcagta atttgttga
63541	ggatacaaaa ttaatacaca gaaatctct gcattctat agactgaca caaaagatc
63601	gagagagaaa ttaaggaaac catccacgg catgaaaag agtaaaatc ctaggataa
63661	agctacctaa agaggcaaaa gacctgtact cagaaaacta taaaactag acaaaaggaa
63721	tcagacgaca cagagagaga gagataccac gctctggat gagaagaatc gatagtga
63781	caatgactat actaccaga gaaacatac gatcagta aacctctac aaattccaa
63841	tggcatttt cacagaalca gaattagaac aaaaagttt acaagttca gggaaacag
63901	aaagatccta aagagccaga gcaatctga gaaagaaaa tggagctga agagtaggc
63961	tcctgagtt ctgactgtgt atacaagct ggcattgatt ttaacagcag ggggtgaaat
64021	gaactgttc acaaaacaga tgggtgggtg ggcctcctg gtggctcagc tggtaagaa
64081	tcctctgca acgagagga cctgggttcg atccctagc tgggaagatc cctggagaa
64141	gggaaaggct accactcca gttcttggc ctggaaaat ccaaggacca tatagctcat
64201	gggtttgcaa agagtcggac acgactgagc gacttcaat cctggaaacg tccattgtg
64261	gacggtgac tgggtgtgc caagctcag gtaaccgttt cctgagtagc tgacactct
64321	tctcatgggt taaaatgag ggcacaaggc caggaccaga ccccgctc agccaggcag
64381	acctgtgca gccccagcga gtgtgtggcc gccgtgaggt tctgtgccc catggccctc
64441	gactggagcc cctggagta gccattccc tcccagccc tgagagctg ggtgagccc
64501	taaccattc ccaccagtg acagatccc ctgtgtgaa acctctctt gtcccagg
64561	aacctggcag gactcaggga gaatgtcga gggcggccac agatcagggg ctggggggg
64621	agggctgggt ccagcagagg cctctgtccc actcccggga aagagcagct gatgtcagc
64681	atgaccacc agggcaccga cgcgtctg cacacaggcc gccctctat ggtgacactc
64741	tttctgtg gccacatc gcccccag gtcctctc cteccagct cctggcctgg
64801	gaactcttc ccccccgg ggacgtcagg gctgtgtcc actgagcact ccatcccgg
64861	gactgtctg atcaccagca cctgcacccc ctctgggtc tcaccagat gggcaactoc
64921	tgccatcca gcaaccgccc tctgggtac acatcgggg aggagggaga agcctggccc
64981	agacccccag tgggtcctc aaggaggaca gaaaggctgc cgtgggcca cagagagcag
65041	ctctgtgaga gactgggac cccagaccac ctgtgagcca cccgaggtt ctctgtcac
65101	acgggcccac agcccagcac tagtgtgac gagggtgagt ggtgagggcc caggtgcacc
65161	agggcaagtg ggtgagccc gactggacag ggtgagggg ttagggccc gtagaccag

10

20

30

【 0 1 5 8 】

【化 5 5】

65221	gcccattgtg gtagggccc ggtggaccag agttagcggg tgaggcccag gtaggacggg
65281	cgagcgggtg agggcccagg ggcacaggcc agcgggttag gcccgggtgg acaggggcag
65341	cggttggagg ccgggtggac agggcggagc ggttagggccc ggttggacag ggcgagtggt
65401	tgaggcccgg gtaggaccag gcgagtggtt gaggcccggg tggacaggcc gagggttga
65461	ggcccgggtg gaccaggccg agtgggttag gcccagggtg acagggttag tgggttaggc
65521	ccaggtagag caggggcccag agcaaaagcc cggctcagca gtagttctt gagogcccac
65581	tgttgcagg gacctcagc atgtaaggc agccctgtt gggtctccc actggggaca
65641	gcattcagag agcagtggt cccctggaga aacagccagg gcattggccg gcgccttccc
65701	aggtgcccc agggggccca gcttagcccc gaggcggcca gggcccggga cagccctgat
65761	tctgggttgg gggctgggg ccagagtccc ctctgtcag ctggcccgtt gacagtggcg
65821	ctctgctccc tggggggccc ggggggacgc tcaagtgaaa aatggaagtt tggggctc
65881	tgggggtgac agttgtccc atggcactg ggcctgttgg gcccagcagc cttagggcag
65941	cacccccggg gctcccacg ggcgccac cctacccca cgcagctggc ctggcgaac
66001	caagagccc tagcggcca aatagcagg aaaccccagc cagccgcca gccctggcag
66061	caagtgctc cctctccc ggttggggg aggggttct ccagtctgg aagcttcc
66121	cagccagct ggagaaagc ccacatcca gcaccaggc cggcccagcc cctgttcca
66181	ggcctggccc cctgagacca cgtcctcag aagcggcacc tcttaccca cgtactgtg
66241	tctggatcc tggaggtat ggccccctc gggcccag gaggccatct aagtccagg
66301	ctcagctg agctgccc gggacacaga gtagctggg ctggcctagg gcaccgggt
66361	cacactccc ctgcccctt tacttggga ctcttggcg gtagggactg agccaagtat
66421	ggggatggg aaaaaatg ggaacctac gatcattccc ctggagccc tgggtctt
66481	ggagtacaa tgcggtagt cgaagcacag ctgttccca caggccctca cagggtctt
66541	ctccaggga cgggacctca gatggccagt cactatcca tcccaccga ggcctcac
66601	ggtctctc caggggcgg gacctcagt gcccagtc tcatcatt cccatgagt
66661	ctcagggt ccttctcag gggcgggac ctacagtggc cagtactca tcatctccc
66721	acgagccctc acagggtct tctccaggg acgggacctc agatggcca gtcactc
66781	catccctgt tgcaccalc cgtccacca tcaaccttcc ctccatcct ctgaaagt
66841	ccctgagcc tcccggggg cccagcctgc atggcccct cagctctca tcccaggcca
66901	gtcagcccgc gcacagtcaa ggcacaagtc agacctgaa ggtcctgt ctaccaggg
66961	aggagggggg ctgtggcac agggcggccc atgcccctgc cagcttccc cccgtctc
67021	gcccagatc tgaggcacc gggggggcag gagggtggag agacaggcca gcttggggg
67081	ccagctccc cctggctgg ggtgagcaga ctgccccct caccacaggt acaggttcc
67141	ctgattccc ctgcccctc tgcctccc tccggtcca atcagagag tcccggact
67201	cagggtccc gtgtctcca tgggataaa aggtgggaa caagtaccg gcacgctc
67261	ctgagccac ccccaaac acacaaaaa atcctccac cggtaggact taccagct
67321	gttccaggg gactgccc ggggtcccc agcccagga agccaggggc caggcttca
67381	agtcacagc cataacaca tgtcagctga cacagagaga cagtgttgg tggacaggtg
67441	ccccaccg ctagcctgga gattgtggc ctgcttccc ccagcccgg tcaagtggt
67501	cagcaaccg tctccatcc cagcggcctg gcttcccct tggcccagg tcaagctc
67561	gggtgaaag taagtcagg agcctatcc atgcccagcc cggagcccac agogcatca
67621	agaaatgct ctccctcca tcaggnaaa ttagtggaa agacaagag tgggggtc
67681	tgggtctct ggggtacaga tgaagggtc tggagcagc agcagcctca ggcacccaa
67741	aaacagccc aggagctgga ctcccaggc tgggggagc agggaaaggaa ggcctctgg
67801	gggttggca tgagaaaag caccaggtg ggggctgagc accctcggc tggcacac
67861	agcccaccac tgcaglacct tcccctcgg agacctggg ctcccgtc cgcctggcc
67921	tgcactctg ctaccacc agaaatccct gattcgggt ccatgtact gggccttccc
67981	ctgggagga aggagattca gacagagag atgcccaggc agagaggggc gacagagga
68041	tgttggagg gggcccggg aggcctggg ggcaggggg caggagtct ccagggtgga
68101	cgctgtgt ctatgtcgg tagcacaga gccccgggt gtcccaggcc tgggaacca
68161	gcagaggggc agggcgggg ctcaaggac ccaaaggcc agcctgacc agacctgtg
68221	gtccagaag cagctgccc ctgagggcc ttagtggccc cgttctcca accaccgtg
68281	aaacaggga cacagttcc caggcggagc cactcttccc tccgggag ctcccagcg
68341	gctatcgt ccatccnca gggagggaaa ccgaggccca gataggaac atcccggca
68401	gcaggtcaa gccagccct ggggtccc ctccggcct ggggctccc ctctgagcc
68461	tgggaaccg agggcacaca gggctccat gggctgccc tctgagcc cctgacac
68521	ccgggtga cccccctc tctatcca gcccggcag gcccggaca cccctggat

10

20

30

【 0 1 5 9 】

【化 5 6】

68581	gacccccccc tctatcatcc cagccctggg ggacagatgg gagcccaag cgtggacccc
68641	ctggccaccc cctaccccac agccgggagg agccggggagc tgggtggccaa gggcctagag
68701	gagccagann nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
68761	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnca atatagagg
68821	gggtgggataa aggglaatat gatgtttagg tagttagatg taaatagaa gggtttggat
68881	aaagattaat aaaaitacaa gctacatat cgtgtgagtg tgggtgataa tatttggta
68941	tgtggggaat agaagtgagt gtgagtagta ttcaaatgtt aagtgtgcca atacaggtct
69001	gagcgatttg aatggaagtg aaaaaagcg tttgtgtgga ggagggggga gaggaagata
69061	gtgtggggga agaaaaaag gctagtgggt aaagaantat cagtggcgg ttgacgaaag
69121	aagaactagg aagaattaat ataaaaataa agggaggatt aaaaaataa gagggaggag
69181	gtaacygaaa tagttagtta agaaaaaat ggagagtgga ggttaagataa ataaggaggt
69241	aatgggagtg agggaggaata aataaaaaaa tgggtgggga aataagatga gaatgagaac
69301	aagaatgaaa aaggagtgta aggggtgtaa aaaaagtga gttgaaaaa gaggaaaaa
69361	aaggagaga taaaaaata aataaaaaa aggaaaaaaa agaaaaaag aaagaagggt
69421	taaaagacga aagaaggga agagaaaaa aatagttaa gtggggagg gtaaaaaaga
69481	attaataag taatatgtt tgggtcga aaaaaaaa aatgttgt gttgatgaga
69541	agaaaagaaa aaagaagaaa gggaaaagca aaaaagagg agagaaaaag acaaccccc
69601	cgccccggcg catggagggt gaggatggcg cagcccccg gatggcacag catcacgca
69661	atcctaaaac gtttcagac cgggtcctct tcaccgcgc gcgcccccgc ccggccctcc
69721	tccgcccctg accgcggacc cccaaccgca ccggggagcc tccccccc ccggggagcc
69781	tccgccacgc taaggtcagg actgcccga agacgcgcc ggttgaaaa gttttatct
69841	catgacataa cggagtggt tgaacaagg ttacaacc ctcgtgaaga cgcacctta
69901	gcgttaggt ttgttttt accatgtgac gatgcaacta ttttctct cttctccaca
69961	gtggctagtc gctccagag cgaagggtat cttctgata gagaccctg gaacatccgg
70021	aggtatttc ccactagg gtaaaagcag aaggctcat acgagggccg gggctctcg
70081	ggaaagggca gggccctggc gcagaggctc tggcaccctc gtgacacgca gaccacgcg
70141	ggcctgcagg cggcgggctc tgaagcagg caaagcccga tctgtgaca tcaagggttc
70201	cgcagcagc aaggtctg ccgcacctgg cccactggca ggggtaagc tctgctccc
70261	gcagcacgca ccaagttcag gaaggccac gcagacactg gtgagacacg cccccccgg
70321	agctgcccga gaagcttga cttgcaacta aagatctg gcgcggcca aaaatgtaag
70381	gcctctctc tttttctt aagacttga tattttacg atgtaataa taccagaag
70441	gcttttaac ttcagacaga tgaaggataa ttccccctg agccctgtg gttttgta
70501	gtaacgaac tcaaccaga aataccaaag gaaittcca aagagtcca aaagcgtta
70561	tcagcaatca ctgactgct gcatacatca tcactcccc aaacaatgc ctgctgtgc
70621	cagttactca aagtactct tactgacga aaacaatct agtctaagc tttttacaa
70681	gaaactccac tcttcgcca actttcaga aacaaccact cgaacagtg gcaggggacc
70741	gtggctggac tgggtgctgg ctctctctgt gaccagca cactgcccc tctcgccct
70801	cctacgect ctgacaaat gttcactgc tglaaagtc accccacag ggaccactt
70861	ctgctattc ccactactt accccattat aggagtttc ttgtgacag tttctgact
70921	ttcatggat ttagaggtt acataatcag gctgctgaa cagcatgaga gactggcca
70981	caaggtccct cctgcaect gccgcagggc cagggcgagt taictggct gagcgtggt
71041	accatcagg ggtaaacaca gttccaggga cgttttgac aagacactga cccggatgcc
71101	cccactacca ccgtcaggt cctgcagccc tcccagctc ccaggcccti cccgaggtcc
71161	cttcggaact tagggactc ggtctgccc cctgggttt cctgacca gttttgccc
71221	ctctggaac caggtttccc aatggaaaa cgaaggtgtg ggtatggaag ctccctgggc
71281	tcctctagc tgtgectctg catggtgatg acggctccc atcgggggg gcaggactgg
71341	ggcagctgc gacacccctc caagctgct acccccagt ggtgtggggc gctgtggcca
71401	cgctctgct agccacctc ctggaacca gcgctgccc tctgcccgg gcaaccggcc
71461	cgggagccaa gcaccactgc cgtcagagga gctgctgct gtgagtgga cccagctag
71521	ctctgaacc tggccaggcc tctgagtc tgaacattgt aaaatcagg cccggagcc
71581	aactgctct cctctgct gctgtgctc cataaactgc atctaggac aaatctctc
71641	actcaccagg gctgaacag aagactgcag ctatcttct caaatctag gttgtctaca
71701	gggcaagtc cagaaactgt ctggcctaag catctcatca gatccctgag acaagagctg
71761	tggagcccaa gctggagcca gagctctct cgttctgccc acctggcacc gcttccacc
71821	cagtaaacgc aggttgatt tcaaaagta ccaccgactc agagccaatg ctaaacgac
71881	cactttctt gccattaga ttgggtgag gtttcttaa tcaactgccc agtcaccaga

10

20

30

【 0 1 6 0 】

【化57】

71941	tgccgctct gteccacag gctggcgaag acctttctga gctacggcat gtegcaggca
72001	gcggcacctc tcttcagtac ggccagctgt caaggggagc gtttctgiga lgalgigaaa
72061	atacattgca tccggcccc tgittcatga acacgggtga ggaaaggaaa cacacaaagt
72121	tctgatgga ctgacagcac gggtctcata actcaatata agtcagacaa acccagggga
72181	gtcacaggga atcccaatag cctcatctag tctgaccatc atgaggctta attattcag
72241	tgatacaat cataaagagg gggaaaaatt gtaaaaaa aaaaaagaa agagtgaat
72301	gtgtaact gaaaactgt gctaggagaa gcaagcattg gcgtttgtaa ctgcttgac
72361	tcccaagac ccacactcgc ctctctaca aaggggagca ctgctgctca gtaattgac
72421	accggaactg cggattgta attaaaaat gtagtctgg acacagcaca agccagagac
72481	tgcaaaagt tgaggagac tgaagaact taatatact ggtgcatgct gccatgaca
72541	gtcagtcacc agctgattca atagagtgcc gaaaggtaac cittaaggta aggatgaagg
72601	ggcttgggc tcttactt gcaactaact agagttagtc cgagatctc gaagtggcag
72661	gtcctccca ttgtctatg gatctagctc agggagcgtc ggccctagc catccaaaa
72721	tcaagcattg ttctcccaac ctgtctctc gctgataatg gaaggtcaga accccaacc
72781	gcccaactca aagtcanaa acaccaagcc ggtgagtcct cactaagctc ggtgttcca
72841	atcagcgggt tcaggattcc agctggggca atgaggga gg gacgtgcca ggatccaac
72901	acctgcccc gtcgcagca agggataacc caacacccc ttctgtacg tccggctgga
72961	gttggaac tcagccgga cccggggcca ccgcgacccc cgggacctg ccgcgcggc
73021	gcattcccgc tgcgggaca cgggtaagcc tcccaaac gcgcgacgc ggccggggcc
73081	ttctcccca ccccccata ggccacgcc aaggacaagg atgtctgtc ccagacggc
73141	gggggggnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
73201	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnnn ggggggggg
73261	ggggggggg gggctggcgc gcgcgctata gacagctgt cgcccggct gggctcggc
73321	cggaatgac cccgcctctc cccgcctccc gcagccgcc cggcgccc ctgcccgcgc
73381	accgcctgc gcaaccgccc cctctggccc cggccccgc cccgcctcc tcggccagc
73441	ccggctgat ggcgcagatg gcgaccacc ccgcccaggt ggccgtggc tggctgtgg
73501	gccactgct gggcagcgt ctgaccgag cctcagtg ggaggctca gagccgcc
73561	agcctggc ccagcagtg agcaaggct caggggaaa tgaagcccga cacagagcc
73621	cagcaagag gatctactg gtaactggc tttggcctg ggtctcac agggggctc
73681	tcccaacca tccctgagg ccaagctcc tagaacccc tgggcagaca ccaaccagc
73741	ctttaaata ggggaacca aggtgcttag ggtcagaga tagccctagg tgcaccaac
73801	ctagtaga gggggctgt tgggttctt gaggcccc tctccccc cccgggagc
73861	ccctctga gcccaagggt gactgtagt cagtacttt gggctggcc acctgacc
73921	cactggcac cccaccagtc ctgaccaca ttgggctta gtaggggt caggatcat
73981	gagatcaat gttgctgag caggaaagt itaagacct tggcttga gttcaacca
74041	gcactgctt gggctttct agaccatgt cccgctct ccccactg ccccttcc
74101	gcaccccac cagcagggc aggggcttc agaggctgt gggctacc tattcagg
74161	atgagccgc taagacctg gcacactgc ccgtaggga cccctgagc accaggccc
74221	gggctctgc ggggggag ccgccacc ccgcttga gttctccc gggctccag
74281	ccgagctga tccgctgccc tccacagtg tcccaggg cccggagcc gcgcccgc
74341	agcccctga gatggggccc tgtctatg agatcaggca gttctggac tctccaca
74401	cccagagca cctgacctg tctgaggct tcagcaggg cctgaagcag tcaagtaca
74461	accaggtga gggctctg ccgactgac gccagggtg gaaggcggg ccagggctc
74521	cactcttc gggctctcc gctatcca ggtgctct cacttccat gttctcca
74581	ttctcttg tctctctt cctctggt gctctctg cctccagg ctcccctc
74641	tctctgct tctctctt cccggggct cctgacct cggcctgacc tctctctt
74701	acagcttga gttctctc ctaagagac agagcagat ggtggccag cctgaccc
74761	acctgaccc cctccacc gacagccga ccatgactc agatgtacc caccgagctg
74821	ggaccagag tggagggg gttctcacc ccacagatga cctgagatga aaactgcaa
74881	taaaagct ttatttag cgaacctgt gttctctc ttgtggact gttggggg
74941	ggggggggg agggagatg aagtccact gcgggtggg gttccacc ttacgtct
75001	gccccctg gggaggatg cctgtctc ctgctaat cgcaggcag cgcagaccg
75061	atgggaggg actaactgt gacctaaag ctaaggggc tccgactcc gccagctgga
75121	gacctggag gacgtggc cctctctc gttctggg gccctcgt ggtctcacc
75181	tctgtggc acctgcccc tctgtgat gcaattccc cgtaatgca gattcagac
75241	gaggaatgt tgggcttt gacctgacc gcatgagac aggtcaggg cagccccct

10

20

30

【0161】

【化 5 8】

75301	ggatctcagt ccagctcggc cgttggccc tgacgtcca ggtcacagg cctgccggca
75361	cagaggagca ggccctcag tgcctcag cactcggagc tgcctcctc gctgagtca
75421	ctcagtgtct acgcacagag cgcacctgt gtaccaggcc ctatccacg ticcacagt
75481	accagcccc caggcctggt ggggacctgc cctcgggtac actgtctcc gtcacgtggc
75541	ttacgtgtg tctctgagg aggtcgtcat tgcggctcac ctctcagcac aaacatctgt
75601	ccctcgggaa ggggggccca ttctgggtg cagcagccc cctgggtcc gttctcctc
75661	ctaacctggc tcaggcccc ggtcctcggg tctcggacag caggagcccc accctcggg
75721	gctgtggagg gggacctgc tctcggagg cagcccagg gccacggcg cgcctcggc
75781	cgctccctg agggagcagg cccgacgcca gcgcggctcc tctgtaggc cgggaaacc
75841	ctgctcagg gtcgggtgg gcaggctccc ctgccccag gctctctgt gtgagtaca
75901	ctaccagcc agctctggt gccaccctc cgggttctc aggggacct catagcggg
75961	ggggtccct cctcccccc tctctggagg gagggagtct gatactggg aggtcgtgg
76021	tccgtaccg cccccccgac tctggacgtg ttactacc cgcctgggc tcaggacagg
76081	gcatggatg ggaaggacag ggtcgggtc tggccaggct gggggctctg caggccatg
76141	gtccccctg ctctcttat attcaactg cactgcagg gggcgcaaat ctggacccc
76201	actactgat gatctcagc aggcataag tccccctcc tgcagcggg ggtcggcac
76261	ggaggcctg ggggaagccc cctctccag cccctcggc aggtcacca ggtccccac
76321	ctcagccagc agggcagcgc tgcctggag ggcggagagg gaggcaggc agggctgta
76381	cgaccctcc tggggcggg gggccctcag ccgtctctc agcaccttg ctgcccccc
76441	tcaccctcag gggcaccctg gccgctctg ctcagggtgg cggtaggggt cccaaggcca
76501	caccagctg tcaccagctc ccagcagctg gctgtggag aggggcagag gttggcgtat
76561	ggcaccgcc tccccccag accaggatgc tctccttcc tcccccaat ctccccagc
76621	atctgaaggc ctctgctc caccatgcag ccccgctcc accagaagt caggttccc
76681	ggccccctc cccgaagctg caggacctc gaccagcga gagatggagc agttgaaaca
76741	ccaactccc cagcagcggc acagcagctg tctgcccag aagagcccc ctgttccct
76801	caagcaact cccatggatg tcatccatg gacacccc tccccacac gctcctctg
76861	tctccccct caaggcagag ggaacgca cccacctgc tgcaggaca ggggaccca
76921	cttacctcg aacatcaact tgataaact gcccgtggt gggacagatc cctccagcc
76981	ccaactccg acctgggaa ggagctgggg tggagctca ctgaggggg gggccctgtg
77041	ggaggtgac ggggtgagag ggtgatgggt ggggtggctc aagcggact cctgctcag
77101	tccagcggg cctcagact agtccagat cctcagctt ctccccca ctggatcagg
77161	gaagactgag gttccctcc ctgcccccc acccagctc caagctggt tctgtggcag
77221	tggagctgc caagaggtct gaccggccag taccgggta accgggttg tggaggctc
77281	gggcatccc ggtcagggc tctagtggg gctggagcct cgggcccaga gctgtccaga
77341	gaccagctc cccccaccg cgcgcgccg aaggagagac agagctcca ggcggggagt
77401	cggaggttc tggaggggga gcatctcaa ctctcaggc cccctccca ggcgcactc
77461	cggcctccc gctctctg cctgctctt gttgaagtat gatggcata cagttcacg
77521	ccactctcg gagtgtct cacactaagg atacagaaca tctccctgt cccccaaac
77581	tcccagccag gctgtcaga agaggaggg ggcggcggg gcaggccct gcactcctg
77641	gtgtggggt cacagggtc gtcocctgt cgggtgccc ttcctctac gccaggagg
77701	tccccctg tggaggctc gttgatccg tgcctcctg ctcttgggt gtttcccgc
77761	atgggtgat gatgaagag ccaglacaga cactcggcag caggtctct ggtgaacag
77821	catttattc tcttctga ggcagatcc tggagtggt gtcgggacc gtcggggag
77881	agtatgctc ttttctaag aagctcctg gttcctcag gctctgacc atgtcacggc
77941	ccctctgct gctggactc aggagacctc ctctcagcg gccctcccc ccagggtgct
78001	aggcaatct tccccctg gggcagagc tcaagcggg aggcgggagc agggccagat
78061	cccagccag cccaccagc tgcctctg tccctggca tcatagctg gagaagggg
78121	aaggagcacc ggtgaagcc ccactcggg gacgcactc gatggcagca ggtctcaga
78181	ggtggcccc ggcagcalt cccagagca caggccagt ctctctcc aggcaccac
78241	tgtctcggg gaccgagtc ctgcagcag gtcgggagc gctgtccca gattcggcc
78301	tgcacctg gctcagcca ccaacctgt ttgcaagg gttttgtc ttcagccgc
78361	caggaggga gctttgtc tgcagtca cagaagtcc ataaagggg gccacagtg
78421	ggagcttat aacattggt cggaggctg taacaggta gggaggact tggggagcc
78481	ttcaggcgg atggagatg tctaaaatt ggtctggga caggctacag agatgtgg
78541	gtgtgtgt gtgtgtgt aaaacctg agccacagt gtaggtctg tcatgtgac
78601	ctacacagg agacctggt ggaagcagc cactgctct gactgcact gtagttcc

10

20

30

【 0 1 6 2 】

【化 5 9】

78661	agctcctgcc ctacaggcggc cctgcggggc ccactggctg acggggagac ggcaccgccc
78721	tcctccgctg tcagggtggg gggcctgacg atttgcattg cgtgtcaggg tccagcggcc
78781	tcctttgctg ggaggctccg aagcacctgg agcggcggcc gcagaacagc ggaactctgc
78841	ctgcctccct gctctggccc atggcctggc cgcctctggc ccctttctg ctggggggcc
78901	tcctggcagg tgagccctcc caaggcctgg ctcactagg gggtgttaag acagcacggg
78961	gctctagaag taatccgagg ggaagtaaat cgtagtgggc aggggggatg gtttccgaag
79021	gggcccctgag ggggacagga gacctggcct cagttcccc actgggtgagt gaccagatag
79081	ccagggtacc ttggactct gactctgggg ggctctcaga gactgtctc ctactcagt
79141	ttcagagggg gaagctggg tgcccttgtc actgcccctg agggcctcag ggacaagcta
79201	tcctgaggga ggtctccagc agtcagtggc cggagcctga gccgatgat atagtaacag
79261	cccaggcggc ctcttggggg tggctagcct ctgaccagggt ttggacagc ccgaagtac
79321	ctaagtgatg ggggtctgca gagcaaggga tgagggtggg cagcaggagg acccagagcc
79381	caccagccca cctctgaaat tctggacct tagctgcatg tggctcctg ggaagacggg
79441	gcttaagggt tggccctct gttggccaca cagtgtgat tccacagcac tggctgtgag
79501	ctttgggag cagattctc cgggagctt gaccaggct ttgtggggca ggggtggag
79561	ggaagggggc caggccagac ctgagtgtgt gctctcagc ctcccagcca gccctgacca
79621	agccagaagc actgtggtc ttcccaggac aagtggcca actgtctctg acgatcagcc
79681	cccattacg catgtcggg gactctggc gtctctgta tcagcagca gccaggcagc
79741	ccccccgct gctctctac taccctcag aggagacca acaccggcc cccggcatic
79801	cggaccgctt ctctgcagt cgggatgag cccacaacac ctgctctg accatcagcc
79861	ccgtcagcc cgaagatgac gccgattat actgcttgt ggtgactta ttctagggt
79921	tgaggatgag tgtcttccgt ctgctgcca ctctactcc tgacctggg accctctc
79981	tgagcctcag tttctcct ctgtgaaat ggttaatac actcaccatg tcaacaata
80041	ctgctctgag ggttatgaga tccctgtggc tgggggtg ggggtaggga tggctctggg
80101	gattactgca gaagaggag cacttgagac ccttggcgtg gggcccagcc tcccaccag
80161	ccccagggg ccagactgg tggctctg cttctgtga cgggaggagc tggagtgaga
80221	gaaaaaggaa ccagccttg ctgtcccg cctctcagc ctggttgggt tccaacact
80281	aacgagggga ctggaccggg tcttggggg cccctgccta ctctgggtg gggcaagggg
80341	gcaggtgta gtgtgtgt ggggtgca cactcagag caccgtgagg cagggtggca
80401	gagggcagg gaggcatgg cagcagcct cctgggtg agaggcaggc ttcccaccag
80461	aagcagaact tagccctgg aggggggtg ggggggtgaa gaacacagct ctctctctc
80521	ccggtctc taagaggcc cacatgaaca gggggactac ccatcagatg nnnnnnnnn
80581	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
80641	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn agagggtgg tgggtggaat ttaatatgt
80701	ggtgcgctg gagcgtggc ggcgcatta aggcgctcat ctaaatalgt ggalagggg
80761	tgtgtgaca ataacgggtg tgggatggtg ttaccggggg gtgcaatagt tctgattg
80821	tatgttct ctgatgggg ttccggcgtg tggacctac cctgagatg gtggggggg
80881	aaaacagtg aggtgtag ggalgggaaa tattgttga ggtcttgt tgggtattt
80941	ttgttata tgttgggtg tggagtgtg ggttgggtg aatttgcct gcgttatgt
81001	ttttttt ttctgtc gtgggtggg ttgggtgtg ctttgggtg ggggtgggt
81061	gtggataaa aaaaatgt tgggtgtct cagcttagcc ctataacgt cggcttgtt
81121	cttgttgt tctgtggcg tgagcggatg gtcgggct cgtgtctcg cggcggggc
81181	tcggcggcc tctgtctcc gctgtctg ctgctctg tcccggcc gccgtctg
81241	ctggccggg ccccgggcc gccggtgagt gccggcct cccagccc cccggccgc
81301	cccggcctc acgcgaggg ggcgggctc gcagagctgg atccaagggg gtgcccggga
81361	gtggccggc gggggcgtt acccgaac gctgtctgg tggccgggg gtgtgttga
81421	tgtgagct cctgtcctg gaagtatga agtgagccg gcggcgggat cgtctgggt
81481	ggctgtgag cggcgggac tggctgggc gctagacga cggccagc ccccagctc
81541	ccagacctg cactcccg cccggcggc cggatccc ggtgtgtgtg tgtgtgag
81601	gggagggaca ggggagtg ctacaggct cccgactac cgcagggaca aagaccgcg
81661	ggccccagc tggctcagc cggcaggtg gtggcctcg tgagcacacc tccaggcggg
81721	agggtgagg gaagcgtgt ggggaggga tgggggtct gacctgaa gagcggatg
81781	ctaccgctg gaccttga gttggggat tgggaggcta tggaatcagg aggcagccta
81841	agcgtgagc ctccgtgtg gcttggcggg ggtgtaggg ggggacgcc cctgtgtgt
81901	ccagcctgc tggccctaa agcctgccc ctcccact cctggggctt cgggggaca
81961	gtcagccct aggtactg aggcgcagc ctcccggga gccggcca cgggtgtgt

10

20

30

【 0 1 6 3 】

【化60】

82021	ccgctgagcc tccagcctgt cggggcaggg gtgggggca gggatgggt cgttagcggg
82081	gttggggca gacgccagg cagactctct gggcacagct ccggtgaca gggaggctcg
82141	gaaagcctgg gccctctctg tccagccacg ccagctctgc cctggccagt ctgccccct
82201	ggcagtctg gggatgaaag ggggagcggg taacctagtc tggggccct gccctccc
82261	cagcccggcc cggccccta ggctagggg cagagttag gggcacctc ggggagctgc
82321	tgaatccggc gglttagaa ccggaggac ctgggctttt gaaccactg gccctaggte
82381	agccctcgg gcctcggta gccctaccc ccagcctgt caggtggc ggtgggagg
82441	cgacagtgc cactctggg ctgaacagcg tctgacgga ggccaaggag gctgggcaca
82501	cggacagtt ccatcactg gactgccac tctgocact gtgcggggtc aggcggggtc
82561	tgagccgggc tgcactctg cacgccacg atatgacgg ggcactcgg gtcgctcgg
82621	acatgctat ccctggacg ctgtggcag gccgggag gctctgtaa tatitacca
82681	tcccagctca cagctttag ggttagtaa agccccggc ccccccact gttggggacc
82741	ccgctccc ttctggagc agcggggtga ggggggggg gagatggacc tgcctgcca
82801	ggagcagcc gtgtgactc ggcaggctac ttgacctc tgagccicag gggggccc
82861	tgatgggtg cggatgctc ctgctctc cccagctga ccagtctc ccctcgggg
82921	tgctctctg cccaccgag agggggggc tatggggacc tgggctgat gacggcagc
82981	cggaggggc atgcccggc cagcctgct cagcacttc cagtcaggg gcccccgca
83041	ctcccggc ctggtgctt cccatttcc cgattgacg ttggcccga gctgacgg
83101	agccttggc ttagctggga gactgaatc cccaagcaat tctcaagga tgtgtaggc
83161	tgtgtgtg tgcctacc ggagagggtg ggtgagcggg ctggccact ccgcccagg
83221	cagcccagg gagacgtcg ctgacagca ggcaggcctg caaggaggac gagcagccat
83281	ctcaggaaag tgggtttgg agacaagcca cagctgggg ggtgggggg ccatgggtg
83341	ggagccctga tccccaggc taggtocagc tctgggtcc ctcggctgt gacctgggc
83401	caagactgg acctctcgg gccctctc ttcccctgg aggtgggggc atgctctc
83461	cccattccc caggctctg gatgaggcag acgaggtgtg tctctacc cactcactg
83521	ctctcagca gcccccggc ggggggggtg tgggactgg cgcaccagg tggatcag
83581	gcctggagg tagggaggc ccccagccc caggccaga aggacacgg gagacagaat
83641	gcagggggc ggcagagcag gggccagcg tgggaaact gggccaaga gccctggag
83701	gatgtctcc aggaaggac ctctctcct ggggcttga tcttagacc tccagagcg
83761	gtgacctga cgtggcagc gaaccggagg ccccggctg caggtggacc cggcggagt
83821	cactctctc ctctggcct gagagctcc ttccagctc cctctctg tctaatgtc
83881	aagtctggag gccgggggg caggtgggg ctgactcca gttggggag ggcaggaat
83941	tggcagagca gcgtccaga gtgggagaag ccagccatg gaggggact tctcatgcc
84001	tctgcccga aagggcgtta tagagagagg tgggtacc cctccatg gccctctc
84061	cattgaacag atggaaagt ggggctgag agaaggctg gactgccc ggtctccgt
84121	ggcatggaac tgggctctg gactctcag ccgggatct cctgtctga ctgacacgc
84181	caggatcag ggtctgggc ctggacctg cgcctctgg gggcaagaga ggaaggcagc
84241	ctggcctgc ctgacccct caccaccac gttgctgt gctcaggct tctggggc
84301	agaggagag ggagattca ctctctgca gctaggccc tgggtctct gggctcgg
84361	gggaacaatg cagccctgt ctctctgag aggtctctg gacctccac aggttgagg
84421	aaaggattc tctctctc ggaggtcag gacccpact ggggaggagc agggcagc
84481	ccggggccca cactctcgt gtgagacctg gactgtgtc ctcccactg acgtgggg
84541	tgggggggtg gggccgggg gcatccagt aacctgccc ccaattgtc tggagagag
84601	cgggtactg gcaattccc ctctctc tctgctgccc ctgtgggga cagtctctc
84661	ctggggag ggggaccca gctgaagaa cagagcagag ctggggtag ggtgtgctg
84721	ggagcagca gacctctg ctctctctg tggctacc tgggtctct gtagtcgca
84781	ctgtggggg agcggctgg gctctctc gactctgg gtcaccagg cctgggagag
84841	tggcagagg ctgagggcca ggtggggcc ctggcggccc gctctctc ccaaatagg
84901	ctgggaagg ccacagcgg actgagcaga caggccggc cagacgggc ctgaggtcc
84961	cgctctctc cccagctcg ctgtacct cactcggc ccgggtgctc agggccccg
85021	ctgtctctc ccgtcttt gaggctgat cccagggct ctccctct ctctgactt
85081	ccgctttc caggcaggg aaccgcgacc tccaggtgg gacgcgggga ggtgtatgc
85141	gccaggtcag aatcaccct ccaccggag agctgtgctc aggggcctg gcagggtgg
85201	gaccgagcat ctgggaact ccagccccc ccacctatg agaggggaca tacagaccac
85261	acggaggctg tgcctcctg gcagcaact gagaacccc agcggggc aaacataat
85321	aactaaalaa laaaagttt aaagatgtt acttaaaaa caaggtgctc cccagtgatc

10

20

30

【0164】

【化 6 1】

85381	ggaccccagt tcccgggtgcc ctgagtggtg ccggccctgt gctgagcatg gcctgggtgg
85441	ttcaccccca gatccacaact aaagggtggg atcaccccta ctatgaggt gagcagatgc
85501	aggggggggag gggcggcagcc cctccatgct ggtgggtggc cgtgggggt gtctgggca
85561	ggagccagct cacggagctg gagaggacag acctgggggg ttggggggc ccaggaagaa
85621	acgcaggggg agaagggtct gccgggggtg ggggtccctt cgaggcttg cglgaagagg
85681	gcaggcgggc ctgcagccc acctaccgt ccccgccca aacggcggga gtaagtacc
85741	ctgggcaact gggggccctc aggagggggc gggagggcctt gggatcagca tctggacc
85801	agtcagcccg cggcagagcg ccatgctccc cgacggcctc cgtggagtg aggtgctgct
85861	gacaccaca cgtgaccc gggcctctt cccgctcagg atgcccocg ccggcacc
85921	gtgagcagag gggcaccagc ctggcccag gccctccc acagtgcgc cccggcctg
85981	gocaccagg agggccctcc gctgctgag cggccacag ctcccctg cggcgtgct
86041	gacctgccc atggggcag tggcccaac cgacagaagc ggttcgtct gtcggcggg
86101	cgtgggaga agacggacct cacctacagg tagggcagt gggcaccagc tggccttga
86161	ttccacctg ctgtcagga cacgtggag ctggggggag ggcagatccc tatggcaac
86221	aggctggagt gcccacaac tccgtgccc actgctaac acccaaac cacactaga
86281	tgcactcca tggcctccct tgggagcag gctccacac ccacctggc accccaca
86341	ccgtggggc acggccgta gtcaccac caacctctg gggcaccgt ctggggcca
86401	ggcctggga ctctcagta gggagggcaga cacggccct cctcggggg agcgagggtg
86461	ttcccacc ccgtcagct ctgaccgc actgggacc ctacaggga gggaccac
86521	ggggcaggcc aggtgacggc tgggtgacc tggcccctg gcgctgagc taccttct
86581	gcagtggggc gcaagatgg gttggtgct ccactgctt cgagcggga ctctggggc
86641	ctgggaagt tctggcgg gggcctggg gacaggaag ggcaggtt gggtccaag
86701	gcctcccac ggtcaggtt gggagggggc ctgggggctc tgggtctt tccgccagt
86761	gcagaccctc gggccacct aagggcacac agaccacaca aagctgtgc catgaggt
86821	ggggagtggt ggcaccctc agagcact gggccacat cacgcacgc tggccctca
86881	ctgtgctc ggggaaact ctggcccga cagccagcg ggtgagct acccgtgag
86941	ccagaccag gcccctca ccgcccctgt cctcccagg atctccgt tccatgga
87001	gctgctggc gaacagggtc ggcagaccgt gggggaggcc ctccaggtt ggaagatg
87061	cacaccgct accctacc aggtgacga gggccgccc gacatgta toacttca
87121	caggtgagc ggggctgag ggcacccca cctgggaag gaaaccatc tggcggcag
87181	cactgactt gccctacc acccccag aggtactgg accgggaca tctgctt
87241	gatggactg gggcatctt gggccacgc ttctccca agaccaccg agaaggatg
87301	gtccacttc actatgta gacctggacc atcggggaca accagggtag gggctgggg
87361	cccacttc gaggggccc tctgaggcc ccggagccg gccccggctc tgcctgct
87421	ggggagctc gcattgccc ggtgtctc ctctccag cacggtctc ctgaggtg
87481	cggcacaga gttggccac gtctggggc tgcagcac gacagctgc aaggccctga
87541	tgtcccctt ctaccctc cgtaccac tggcctcag cccagacgc cgcaggggca
87601	tccagcgt gtagggccc cctcagctg ctcccagtc caggcctcc gacctggcc
87661	ctggcaccg gggggacacc aacgagatc gcccctgga ggtgaggccc tctcccct
87721	ggccacgct gctctgca ctcaacatg ggtctctct aacctctc tctaccca
87781	gcccagccc ccaccgatg cctgccagt ctctttgac gcagccgca ccatcgtg
87841	cgagctctt ttctcaag caggcttgt gggcggctc cggggggcc ggtcagcc
87901	tggtaacct gcctggcct ctgcccactg gcaaggctg cccagccctg tggatcagc
87961	ctcaggac gcccaggcc acatctggt ctccaagt ggtgggagc cgggtcacac
88021	tcaggagct gcaggagcc aggaacgta tggccaagg tagggacaga cagactgat
88081	gagcagatg acagcggag ggggtcccgg agtttgggg cccaggaaga gctgactca
88141	ctctctggg cacagctggg aggtctctg gaggaggcgg ttctgaagc gggagttaga
88201	taaaaggtat tgcacccat gaagcagtg tgaacctgc cctagagac aaggctctg
88261	ggctcagag ggtgaaagt acccaatga gggcacagct tggagaatg cgggaggat
88321	gtgagctag tggccagag atggggcct gaggatgccc aaggggcagg gctgctgccc
88381	tgagagctg cactgggtg ggcagccaag tgcaggatg gaggggcgc ccagggtggc
88441	ctttctgc tcagaacgac ctctccatg tatacctccc agcggcctg gcatgcca
88501	gttctctt tggggcagg gttaccaagc aggcattat actggcctt tgttttat
88561	ggacaacgaa actgaggctg ggaaggtcc aggtggtgt gttggcggaa ggtggccgt
88621	ggcagccct gttgagcac acaccccca cccaccgtt ctcaacagg agctagtac
88681	tgggttatg acggtgaaa gccgctctg gcccggcgc cctctccga gctggcctg

10

20

30

【 0 1 6 5 】

【化62】

88741	caggggctcc cgaatcagc cgcctggcg tggggctccg agaagaaca gatctactc
88801	ttccgaagtg gggactactg gcgctccag cccagcggcc gccgcgtgga cagccctgtg
88861	ccgcgccggg tcaccgactg gcgaggggtg cctcggaga tcgacggcg cttccaggat
88921	gctgaagtg tgcaggggcg aggcctctg cccagccccc tcccattcg cccctctcc
88981	tgccaaggac tggtaact cctgtgctc catcttttg gcgtgggca ccaggcacgg
89041	catggagact gaggcccg cccaggtccc ttggatggtg ctagtgaat cagtcgagg
89101	ctccagcctc tgcaggctg ggtggcagct cagaccagac cctgagggca ggcagaaggg
89161	ctgcccaag ggtagaaga cctggggct tectgggtg ctcagacagt aaagcgtcg
89221	cctgcaatgc gggagacctg gattcgatcc ctgggtcagg gagatccct ggagaaggaa
89281	atggcaatgc cctccggtac tgttccttg aaaatfcal ggacagagca gcttggaaagc
89341	tcattgggtg cgcgaagagt cagacacaat ggagcgact cactgtctta agggccacct
89401	gaggctcca ggttcaagg aaccagcag tggccaaggc ctgtgccat cctctgtcc
89461	acttaccagg cctgacct cctgtctct caggcttgc ctacttctg cgtggccgcc
89521	tcctatgaa gttgacccc gtaagggtga aagccctgga gggtctccc cggtcgtgg
89581	ggcccgact cttcagctgt actgaggctg ccaacactt cctgtgata ccgctgggt
89641	gtctcaggc cctgacct ccaacagga gaccgtggcc gtgctgtg ctgtaggtac
89701	caggcaggc accgagctg gctgtctatg gggccaaggc agggcctgc caccaggact
-89761	gcagggggg ccacgggggt cgtggacct gccagcgact gctgagact gggcaggggg
89821	gctctggcat ggaagctgag ggtggtctg ggtggctcc accagcctg tgcaggtcac
89881	atggaacca gctgccatg gctccatcc acaccccca gggtcgggc tcagcaggc
89941	tggggagct ggaacctca cgtctctgc tggggctcc cataggggc tgcacgtgg
90001	gttcaagggt cctgcgcctc ctgcccaca cagggttgg ctctgctag gctgtcct
90061	ccagtttgt ggtctggag acctattcc caagatctg gccaaaaggc caggtcagct
90121	gggtgggggt ctctctcca gagacctgc accctggggg cccagcata cctcagctct
90181	atcacgggtc agatctcca aagccatga aatgtgata gttgtataa agctgtttg
90241	ttttcatt ttaaccgac tgcattaaa cacgtcgt tctactctc ctgctgggt
90301	gtctctgta gtcgaagcc agtatagggt gaaactggac caggagttg gggagcttg
90361	ctggggacc gctcagctcc ctgctctca gggctgggtg ttgctcagg gctcccctg
90421	ctcactca tctgcttga atgctacag tggcttaca gctgctcc catctccca
90481	gggctctc agaccgtct ccaccaagt ctgctcact ttccgatcc agccactgc
90541	aggacacaga accgaacta aggtactgt gctgaccc tcaactctg ggttctact
90601	gctgcccacc ctcaagagc caaggatcc cctgtatgc aggaagagt gaagctgctc
90661	agcaggtcc gactttgc aaccocatg gactgtagcc taccaggctc ctctgtctat
90721	gggattttc aggcaagagt gctggagtg gttccattt ccttctccag gggacttcc
90781	caaccctgt ctcccata gcaggagac tcttactgt ctgagccacc aggcaatgca
90841	gagacctag gttcagctc tgggtgggga agatcccctg gagaagggaa tgacaacctg
90901	ctcagatt cttgattgg gaatcccat gacaaaggag cctggaggcc tacagccat
90961	aggggtcaaa gagaccagc tgagcaagtc acacacagc agccctactg ggtgtctat
91021	agggcacct calagctgcc atgtacagg tttggcatg ggcagccatc agcagggggc
91081	cattctgac cactgctt gttccaccg atacacgggt gcttctgt gtgtggggc
91141	cactggctg tcagcgcaca agggcagggc tctgggagg cacagggcac agagitaagg
91201	aggggatggg gactttact cctcccagc tctcagcga tgcagcaggc aaaacaaag
91261	ctaggatcc tgcnaaacc ggtagtctt gccatgct gcccatccc cagagccaca
91321	agaacgggg ctgggggtg gccggagct gggatactg tccctgggc cggcatgtg
91381	ctggccgca cagctctc cgggggggga aactgaggca cgggcgcctc cggcttctc
91441	ccgcttcc gggcctgccc tcttctcc taccagggc agtatccag cccggctgt
91501	gagacggaga agggcggctg tgaatcagg gccgagctg ttattctgc cgggtgagcg
91561	cttccctgg tactccact tgagaggcgg ccgggaaggc cgagaacgg gccgagctc
91621	cttaagggg cccgtgggg cgcgccggc cctttgtcc ggggtggggc ggcggcgacg
91681	cgcgctcag cgtcaagcc cgcgctcgc cactgaggc ggctgctg tctgtcgg
91741	cggcgcgcc ggcggcgcg gaggaggcga acccatctg gcttggcaag agactgagnn
91801	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
91861	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnnn gcaggctcg gcggtgacg
91921	ggagctacac cgcggcctg gctcaccaca ccgcccctg ggtaacgccc cccgggggt
91981	gccaaggta cgattgacc ctccccccc cgaacctct cccctgggt ggttgggtg
92041	ggggcagtt tctaagatc cctggttcc cagcagctgg aactctcag tccctccag

10

20

30

【0166】

【化 6 3】

92101	ctctactca accccacact cgtgttccgg aagtccagg tgaggccgc ccgcccttg
92161	cactgtcgg cccaacctt cccgccage gctggcctga ccgccccca cccgccacc
92221	cccacgagg ttggaggct catccaac ttctctctt tggggccct gggattcagc
92281	ttcttca acatgctct cgtgtatct gcgccctgtt ggaagcggga ggaggcggg
92341	ggggggacc gggcgggagg cagcgggccc cgggaagctg agacctcca aggggacgc
92401	ttctatacc aaagccgag gttccgctac tgcctcatg tgaggagggg ctctctccg
92461	ggccgcacgg ccgacttct cttcatggt ctctcgggg gcgtctgat gactgtatc
92521	ttcccgggct cggggacctt tgggtccggg cctctgctgg ccttgaggcc ctgctgagc
92581	gcatccaca gaggagagt tggaccocg agctgagggt gttttgagc gtacatcac
92641	tgtcagctg caggtccccc tctgaactc caggctaca cccaaaatc cacagggcag
92701	gggtccagg ggtgagtc tgaatgcagg tagccaggag gatciaggc tggccccgg
92761	ggctggggtg aagtggagag gcaggggcca tcagggggcc cctggaggcc accgtttgt
92821	cttaggtgg gaagcgaac caacctgctt gagggttca ggggttagg aagtcaagg
92881	ggcctgggc agggcacaag acctgactc tggcccact actggggctc ctggtagcc
92941	ttcttctt gggccaggcc ctacagcca tgcgtgtga cgtgtggagc cggcgagcc
93001	ctgggtgag ggtcaactc ttggccctc tcaccttca ggcgccgtc ctgccctgg
93061	cgctcatgg ctttcaatg ctgctggga actccatct ggtggactg ctgggtgagc
93121	ctgcttcca gggagcctgc cccaagctgg gtgtgtcggg ccagagccct ggtctctcc
93181	ccgccccac cctcttccc cactctggc gccccatcc ttccagcccc tccaacaat
93241	cagcctatag gtttactta ttcgagctg acccattgc tgacgtgt gttggggccc
93301	accggtagg gatgggtgg tcaagggtgc tgcctacag tccacttct ctgactctc
93361	caggccagc ctctccagc gttctgcta ctctggcca agcttggccc cagctggcc
93421	tggctggccg tgcaggcat cagaccocca tgccttgggg gcttcaggc tgtggagggt
93481	ggcctaggca ttggcgcctc tcccacagg attgcggtgg gccactcta ctactctg
93541	gaggactct tcccaccca gcctggaggc aagaggctgc tgcctagccc cagcttctg
93601	tgagtctga cagcctccc caccocctc ccagatggc tctctaccc atgagggggg
93661	gggaccctgc cagctgccc tcaagctggg ctctcccca caggaaactg ctactggatg
93721	ccccagagg gaccaccaat tacctgccc tccccagga gccagccagg cccctgagc
93781	agtgaaggc acctaccca gagccgggtc ccccaocccc acccctggcc tgaacgag
93841	ctcccttcc tggaggcgg gcctgggccc agggccccc cctgaataa acaagtacc
93901	tgcagctgt tcccacagc actggtctc ctgccgggc cagccttcc acgggggca
93961	ggtgtctg gcccagagcc agggccacca agcctgact gcttccagc ccagaacat
94021	ggcacagctg gagcccca gagggtccag aacctgcca ctgccagca gaacttgag
94081	cacagaggc agccctctg ggttctcat cctgcccct cctgtccgt aaticagtt
94141	ccactgatg gctcacatc tcaggggcgg ggtgggact gggatgctg gttgtctga
94201	gctttggcg tggggccct cctgtcccga actagcaacc cccaaggga cctctgttc
94261	atttccagc caggccactg aaggacgggc caggtgcaga agaggccag gcccttctg
94321	tgactccga gccccaagt tcaagtgtt cagagtcag tggctgagg agaggcctc
94381	gggaagctt gccctggcg ttgcagctg agggcgagc gaccctacc tggctccag
94441	ctcacggca tggaggacc agtccgacg gtygttact cctgggtcg caccagccg
94501	cgccgctgt cctttcaca gaggataaaa gtactgctc tggagttga cttatggt
94561	gcatgaaac ctctggcca gcagcggct ccgcatggg tggcagtgga aggccctcc
94621	ccggcctct ccaggcaggt gccgcctgc cagcaggga ggcaggcagt gcatcccc
94681	actgctctg gggctcagg tacctctgc tgtgcccga acatctccc cagtgttga
94741	gccagctgc cgtgaggcca gctgggctg aaaccttct ctctgaagc ccgctgtcc
94801	cttgcctgt atggaggca gaggctggag cgcaggttcc taggatgtc ttgcagacc
94861	cccagccca gggcagagg ccatctcag ccaaccccga actggaacc ctggagctc
94921	tggcctctg ggtgtgagg cctgtctat gcacctcag cctgcccag aacggaagt
94981	gcaggcccg ggcaccagg ctaacgcaa ctgggctgg gtcacctgc gggcctgtc
95041	ccaggaggaa gacctagggt ccacctctt ggggtccacg tccaggtcac tggggacc
95101	gtccatgca cagaagatg aggtcacc ggtgactgg cgcggggccc tggcagagca
95161	ccagccggg gtggaggtgg gccccagctc tctgtcagg cacgtgtgc tgggaggtc
95221	ggccggagca gtgcccacca gctcagcag gacaggtggg cacaggccca ccagcagtc
95281	ccgacggga tgggcccctg caaggcccag agaagccag cctctggctg gggcctggc
95341	tggactgac aggtggcctt gcccttgcg cccactact tcccagccac ccggactcc
95401	aaggactgc tgactgggc aggtgggacg ccgaggggag tcaactgct cgtggggca

10

20

30

【 0 1 6 7 】

【化64】

95461	ggaggggcgg tccacagggc tgagccctga gctgaacctt ggccctgctc gtaggttgg
95521	gggtgggggg gtcacagggc gccttagccc tctgaggcc cagctgggac gtagcggccc
95581	gaggcgagg ggccagccca tgcctatctg tccccgtc tcagctccat gctaccactt
95641	tgaagaaaca gaacctgttg cctttatt tagaaagtgt tcttccctt gcctggggct
95701	tctataaaa aaacaacac agctcaactt ggctctctt gaccagagac gggcgggtggg
95761	gactggggct cagcagacgg aatgtgtccc cggcggcggg agaaccaggag gccctggccc
95821	cgctctcag gacggctggg ctgtccccc ctgttccctt ccgagccaga agatggaggga
95881	gagggtgggt gatctccaga tgcctcctgg gagccaagcc ccacgggggt gtcaccagcc
95941	cggggccgtg ttggccagac gcctcatccg cctgtgggag ggggaggcca gcaacccccg
96001	gatctctcag gcaaccagat gaggaggcag gagccccag cccctccctt ggccgctctg
96061	ctgcgtgggg ccttgaagtc gtcctctgtc tcgccccctt cccccgggag agtgagcctg
96121	ttctgggctg tggctagacc tccccaggc ccagcctcgc cggggccctt gtcctgctg
96181	gaaggggctg gggcagacc ttgtgtccg gtcctgttcc cggatctctt tctccatct
96241	tgcctcctc agggcttcca gcagcgggca ccactggica gctgcgctg tgttccggat
96301	ggcaatccc accgtgggca ggggggttct actgtggagg acgagagagg tagaccggctc
96361	acagagcagc tgcaggagag gcccttagaa agcagtgtcc acccctctgc gggcagacag
96421	gacatggagc ctggtttctg caccggctc ccgacacagg gcggccgggc acgtgcca
96481	catgtcatct cggggtctgc atgtggggag ggttccacag gacagtgtg caggtccagc
96541	catctccagt ggacttctg gtagggagg gggcctccgc cccgtctagt gtccagagga
96601	aaggagagca aaggagtcca tccaccagg agtggagtcc caggggccctt gccctgacca
96661	gctctcaggc gggccctcgg cccacatcac agggggccag aatccataag ccttgactgc
96721	ttcccccgg gggccctcaa agacgcgctt agactccgtc ctagggccac ctgcacacc
96781	ttggcgaaag tggactcagg gctgggggtc agcctcgtg aggcgcgaaa ggcctgggac
96841	ttctggcga gctgtgctt ctgccaggag ccagggccag cctgcccggc agcctcagcc
96901	acgcctcac ccaacctgcc cgcggcgcca cgtggcctc cgggtctctt cctctggcct
96961	ctctctgggc cactgtgtct cagccccagc agtcggcctg ccaggagccc tgcagagtea
97021	gccccagag gaggaggggg gcccggggga acagcacagg acaaaacaga cccctggcct
97081	tagttttag tctctatct gaaaatgggg acagtgtctt tcttggagg ggtttcagag
97141	gaccactgcc atgcaacacc cagcacacac ccactgcgtg ggggctcggg cccgagccgg
97201	tgccccgag tcccaggctg atggctgggc cggccccacc accctgcga cagctgtctt
97261	ccagccgggc ggtgtctcgg cagtccagaa gccagcactg cagaccaaa tgcactctt
97321	cacgttgcgg gctcccagct gccttcttg ggggcagcag acacgaaat caccaagccc
97381	acgcggcagg gagcaaac gcttctctt taacaagtg cgggtccgg aggcctgtg
97441	ttaccctcc tgtgctccg ggaagattgc atccccggg gttgttcaa accaagggtt
97501	gctcgggcca ggcctggaag gaggggcctg gagccaggag cccaccetta cgggacttcg
97561	gcttctggg ttcaaggcc gcttgggacc ctgacttccc accaccgcc aggtgcaagc
97621	aggagggccc tctcggagg ggcagaggcc ctggagggtc gttctcagc tgacctcaat
97681	ttacaacct cacaggtgag gcagggcagc tgggaggcat ggtgtgccc tcttggtaga
97741	tgaagacaag actgcaagg gtagtccccc tgaacttccc caaccaggag gagacaaaac
97801	tgggtgtcgc cctctgctt aagatcaact gactctggac aaggggocca gccacccca
97861	tggggaagg gcagctctt caacaagcgg tgcctgggag gggcccgcca ggccatggtt
97921	tctagctat gacaccagca gcacaagcac cccgagaaaa acagctaagc tggcactgt
97981	cacaagagt aactcaaac ccaagaaaac cacaanaagc ctgctgactt tcaatagt
98041	gggaagggac ctgtatctg aatgtatac gaactctga aagtgaaag tgttagtcac
98101	tcagtctgt cagctcttg caaccctag gacgtagcc tgcaggctc ctctgccc
98161	gggattctt aggcaagaat actggagtgg gttgcatgc ctctccag gggatctcc
98221	caaccaggg atgaaactg tctctctt gacttgcaag cggggttctt taccagtgc
98281	gccactgag tagaaacct ccagggtccc tgaatgtcag agcaggagg actcggccca
98341	ggcctgtgag gggaccctct ccgagtccc tctgtcacag cagtgaagg tgccttga
98401	gtcagcctc aggatgagg gacttgggtt cgaatcaat cccaggacct caggatctgc
98461	tttgggaagc gaggctccc aggtggccc caggccctgt ggcctcagt cgtgagccgt
98521	gcgtggacag gtgcatgag caggcctccc acgggactg gggcggccc tggaccocgg
98581	ggctgccagt gctcggggg gggccctgtt ggcggctgtt cctctctg ctccgagtc
98641	taggaacatg tggggcctg cctctcggg ttctgggaga agcagctgag atgcaaacag
98701	ccccagccg tccctcagt gttccctgt acgggtggcc ccttggtagc ggcctccatg
98761	caggagcctt gacagctga gcaagcgggt aaaaacacac ggggacgggt gcagctcag

10

20

30

【0168】

【化65】

98821	cagccgcgta aagcctgaca tccaattgg aagcctccc cagtggaga ggggcccggg
98881	gacgggctg ccggggcga gctccaccg gtcggggtc acgaggagcc caccgcgctc
98941	ccgcacca gacctggga ccagataccc tcccgcctc gaggcggcc tgaacgcgc
99001	ccctccac gggggcggc accgcctgt cgtggactga acaaggggc gcaatggcct
99061	ccagcccc tggggggg gcagacctg ccgagactga gcaacaagtc agggatgag
99121	caaggctc agtaatgicc ccaccgggac gggacgggag gaggcgacag aggcgctga
99181	ggtgggggc agccctcagt agctggcacc aaggcccag gcagfcccg ggcaccccc
99241	cagggggcg gggcgaccac cggcccagc ccaggcagtc ccggggcacc cctgcagcgg
99301	gcggggcga ccaccggccc gagccctacc tgaaggccta ggctctga tcccagctca
99361	gctgcccc gatgctgag gcatgggag tgaagaact cccgccagc ccagctgg
99421	agcacagct cagagcaac ttctggggc agtctcct cccagacat tcccactga
99481	actgctcac caaggagatg tccccactg gcatgttcag ctggcccggg agcacagaca
99541	tgagccagag cggcccctc tggggccagg ccgaccctc accaccctc ctcccggaa
99601	catcccggc tegtctgg ccgcgccct gtgctgtac ttgggtaag gaaaaaac
99661	cccatctc tgaanaagg taactagca ggaagatcg cttgtaact gaaaactcc
99721	taacaagaaa cgttgatct gatggctca ctggtgaalt ccaccaaca ttcaagcac
99781	taacacaa cctatcaaa tctgcaaaa aaactgaaa ggaaggaca catcataact
99841	ccctcctg ataccaaag cagacaaga tactacaga aaggaaagg gcagaccggc
99901	actactgtg gacattgat tgaacctca gcagacaga gcaaaactc atccaccg
99961	acgtcagaag aatcacac cgttataat gatggatga tgaacaacc acattataa
100021	cgtggggct tactctgtg atgtaaggc gctcagtaa gaaaccggt caatgcatg
100081	aaccactga acagatgaa gcaaaaaa cacacagta tctgataat tggaggaaa
100141	tcattagaca aactcaacg tctctcag ataaaaaac tcagtaact aagatcagat
100201	gaaaccaca tcaacaagt taatcagtc aaaaaatca ctgcaagt atcccacaat
100261	ggcagaagac tggtaactt tctctaaga tcagaaaga gcaaaagata cccagcttg
100321	ccactttgt tcaatagc gttggaatt ctactcagtc cagtgcagtc gctcagctc
100381	gtccgactct ttgacccc atggatcaca gcacgccag cctccctgc catccaac
100441	tcccggatt caccaaaact catgtcact gactcagta tgcctccag ccactcctc
100501	ctctgtctc cctctcct cctgctcca atcctcca gcagtiagg aagaaaaata
100561	aatcaagggt atccactgg aatggaaga gtaaaactat ctctgtcg agatgtta
100621	atctatgat cagagttaa gatgtaaca aaactatt agaactatg aatgaattca
100681	gcaaggtacc agatacaaa gtaacgtgc aaaaactgc cgcatttca catgtaaca
100741	ctgcacaac tgaagaaga aggatgaaca aattacaata acataaaaa gaataaaatc
100801	ctagaatt aactgatca aagagatga caatgaaca tataaacat acigaaaga
100861	atgagaata taaataatg gaaaaacat ctatgccat ggattggaag actaaaatt
100921	attaagctg caagcctat gttttccag tggctatga tggatgag agttgacta
100981	taagaaagc tgaaccaga agaagtgat ctttgaact gttggttg agaagactct
101041	tgagagctc ttgactgca aggatgcca accagctcc ctaaaagg atcagctctg
101101	ggtgttcat ggaaggact atgtaaac tgaactcca atacttggc caactgatg
101161	gaagagctga ctcatgaa aagacctga tctgggtaa gattgaggc gggaggggaa
101221	gggacaaca gaggatgaga tggttggat gcatcaccg ctcaatggac atgggttgg
101281	gtggactcg gaagtggg atggacagg aggcctggc tctgctgg catgggttg
101341	tgagagctg gacacagtc agcagctga ctgaactga calgaatcc caaagcaatc
101401	tcaaaagca aatgtaatc ctatcaaat ccaatagca ttctgcaga aacaggaaa
101461	aaaacttaa aatcatatg gaactaagg aaaaagcaag gatgctgt caaaaactg
101521	acgaaaaga caacaagct ggaagactca cactctga ttcagaact tactgcaag
101581	atacaaat gaaaacactg tggactaac gtaaaagcag acactgggc caacgggaca
101641	gccagaaa aaactctca ataaagcagc aatgatit caacagagat gccaagacca
101701	ctcagtgaag gaagtgtt gcaaccaag gtttggaa aaaaagacc acatgcgaaa
101761	gaatgaagt ggacctac ccagcccat ctacagaat caactcaaa cagacagaac
101821	atatggctca agccataaa cgtcagaaa aacagagca agctttatga tttggattt
101881	ggcgggtatt tctagatg gactcaag gcataggta taagcaaaa aataaactgg
101941	acttcaaaa aatacaac ttctatgat ccaaggcac taccgacgc atacaaggc
102001	agcccaggga aaggaggaaa catccgaaa tcacagcctc tgggaacaga ccgctgctg
102061	tgagatacg ggaaccgata aaacaagaa aacagcaaaa cccgactca aaaatgggaa
102121	ggactccag agacacagg acagacaag ccgctcagc gtaactaac agcaagcaag

10

20

30

【0169】

【化 6 6】

102181	gcccgaag gccgtatcc aaggctgtg ttttccagt ggtcatgrag gaaagagagc
102241	tgatcgtaa gaaagctgag cgtgaagaa tgattgaac tgggtgtg gagaagact
102301	tgagatgcc ctggactgc aagatcaaac cagtcaacc tgaaggagat cagtccgaa
102361	tagtactga aggactgat ctgtactcc aatactttg ccacctgatt cgaagaactg
102421	actcatggc aagaccctg atgctgggaa agattgaagg caggaggaga aggggacagc
102481	agagatgag atggttggat ggcactactg aciccatgga catgagctg ggcaagctcc
102541	gggagagagt gaaggacagg gaagcctggc gtgctgcagc ccgtggctcc caaatcttg
102601	gaccaagcga ctgaacaata acaaatcaac agggaaatgc aaatcaaac cacagtgaga
102661	tactgtccac caccaggcag gcgtttcca gcggggctg gggcagggtg tgcctcttc
102721	tctgtaacg ccccaggac cgcggggct gctgagacag catgggtgt gcttggccta
102781	gctgtccat gacaagagt gcagtgtct cgcctactg cgccttccc tctctgccc
102841	accagtggc ccacctgg gaccaccag ctccgctcc gtggacggca aggcgcagc
102901	agcggccga cagcccgaga acgtgtgccc ctccctaga gtcggctgt gccctctg
102961	ggacaagcc ccaagagac agcttccag agcctgccc cacaacacg accccagaca
103021	ggctctgtg gaggcctca cgcacctcc cactcgaa ccccaggaga caaggcagc
103081	ccgtcggg tgaggagcc ctaacttga taatagcgg ctgtctgac tggcttcca
103141	ggatgctgc cgtgggtag gactcagat cctgtctgat ggcagagga atggctgga
103201	cgaatgtcag tgggttca gtcaggtct cacagagaat ctctgagaac atctccggg
103261	tcactgctt cctgaaacg atgacggag gggggaacc ccagtggacc acaggccta
103321	cgctcagct gctcagccc ggcctcccc agccttccc cctctgccac cggcccccg
103381	ggtgacgaca ggaccccct gcagacgca gacagagct agtgacgccc agccaggcgc
103441	gggacggac cttcatgtt ccaggtaa gcatccgca gcttctgccc gtaacttcc
103501	atgtccagt ggtggggac cagcactcg ggcgggacg cgttctctg gatcacgct
103561	gggtctgct cgtgaagct ggaaggggg cgcggcgtg ctacgaaag cggcctggc
103621	tcctgtgccc agggctccc tctctgacc actgtctgt gagacctgccc cagagaggac
103681	ctgtccacta cggccgggc cggcagaaac agggctggc ggggtccacg cggggcggga
103741	gggagctgc cactcggca cgggacaag ctacagagt cctctcagga agagaggtt
103801	aagcccgaga gaggcagga ttctccagc agctgtggg aagaagggt atgtccgaa
103861	gaagaaccc tggacaag gcccggggc aggggggtt agggctgct tggagagcag
103921	tgaaggggg ctggcggct ggggggtgt gggagcctt ggtggccaag caccaggcc
103981	tcctccactg cagcctgac cccgagggg cccagagga cggagagca ggcagctcc
104041	cactcacacc tgccttag gatgggga agggagaga cggggctgc gggggcgaag
104101	gaaaccagg acgccccct tagaccggg ggcgagaacc acttccaag aacgcaggg
104161	cgcaatgat gaacaatgg tagcagccc caggcggag gcccggtgc cagggcccc
104221	caccagagc ggaaggtcc ctctgtgc cggccatgc ggttctgtt gatgtgtg
104281	gagcaggga cggctccag gtgtgag ctgtggga ggtgggac cactggctg
104341	ttctcttg cctctgtt cctgggag acagagccc gtcgctcag cctatggcc
104401	aaaagccc cccagccc caggtgtg ccagtggac cccgcatgc cctctgggc
104461	ccaggcccc atgggacct ctgtgccc agctccgag tggattec ccaggctca
104521	agcggacct gctcgggct accagttta gggagggag agaggcagg ggcgccagc
104581	cagtcttga gctgtacc ccaggctca agggacct gctcgggct accagttta
104641	gggagggag agaggcagg ggcgccagc cagtcttga gctgtacc ccaggctca
104701	agcggacct gctcgggct accagttta gggagggag agaggcagg ggcgccagc
104761	cagtcttga gctgtacc ccaggctca agggacct gctcgggct accagttta
104821	gggagggag agaggcagg ggcgccagc cagtcttga gctgtacc gtcctatgt
104881	ctggctgg cactcaggaa agaggctag ggttccgg ggggtggcc gcagattcc
104941	aggaagccc cagggcagc agagaggag ctacagtaa tggttggca gggggcagg
105001	gctggagaca cagaggggt ccgattcgg ggggtgccc tcagcaggt gctgggagt
105061	ctgggggt tgcacattt cgatcaggt gttattcag acgttggc cagctgaga
105121	caggtaatc ctctggcct cgggcttca gggatgaaa gatactag aaagcggac
105181	tcaagttae tcaaggaact cgcgtccc agtgggagc ccttctcc aattacatg
105241	ggcgtttac tacgagaaa ataccgaag ccgtttgag ctgaggctcc cggccgggc
105301	tgctgttg tgagactgt cgtaccct gggccatc cctgtggcc aaggggcaa
105361	tcagtgggt gactgcaga cacacctg cagccctcc ccacagctt caccatggt
105421	gactgccacc cctggagaa cctgacct gccgggttc ccgtaaac agcgccttc
105481	caggtggg gcagagga gggccttg ctttctact cctctctc agcggggc

10

20

30

【 0 1 7 0 】

【化67】

105541	ccctgcacc cagtgcaccg gccaccagg ccccttggg gtggggcagg gagggatcca
105601	caaccaagg ggagccagg ccccccaaa tctgtccc tccctgata cccgagacct
105661	gggaaacgg gggactgggg ctgatcggg caggaccaag aactgaggcg gtgagcggg
105721	gtcccacca caggccact ggctggcagt ttctactcc ggccctcagg ccaagaggga
105781	aaaggtgcc cactcagatc aggcgcctcc cgtcccagg gaggccctac aaggtcagat
105841	ctttgtaac ttccacgggc aaactggct tcttggcct gtgcggggcg catgggctg
105901	gaccaccaca ctttcccca ctgagctcc agccggagct gtaaccagg tccccaccg
105961	ccagccccc cccgccacct tgcagtagcc tctgtatcc aggccgaggc tggccgctc
106021	accctctct cctgatggc tcaagtggc aatgcgagc acgttgagc acgtgagtg
106081	gacgggcagc gccacgcggg gtccgggat ccgagtcca ccaactagcc tccctccgc
106141	tgcagagagg tctgtccaag agcctgggg gccatccagc cctgtcca cctggccggt
106201	gtggaagagg ggggtgcca cccctctgg ggggtggct gggcgtggg caggccctc
106261	ctaagagtgg agccactgg tggtttct gcagccccc ctccacacag cagttctac
106321	tgccagtaa caggaggcta ctggcttagc tctctccc gtgtgatga ctcaaccagg
106381	agcgtcacg gccccacaca ggttctcgg ctgtcctag aggatctca agcccatcc
106441	acgtgatgt aatctctcc ggtacttct ctagggaag ccgctatcc tggcatctc
106501	accgaccac caggggaga aaagccatct ccagcctca catccacaat gggccaggcc
106561	gtgagcacac caccttctc gggagggtg ggggggggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn
106621	nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn
106681	nnnnnnnnn nnnnnnnnn cgcgccccc cccccggg cggccgacc ccggcggcg
106741	gccccggcg ctgggagagc gtgcggggc gggccgctc gtgacctc agcccggag
106801	acggccccc gggccggcc cggctccag gccctggag cccggaggc cagagtcca
106861	gaggccgga gaccgggga aggcggaga gagggggaa gcacggggt ccagccctag
106921	gccattcag cccaaagcc atcgtgaaa ccatctcgg cccagataa aagcctgcc
106981	aactttca cccggcgga gacttagcg gtagctgccc cctagggg aatggaaaa
107041	ccaggatta ccagggggt ggaggtcac actgccaga tctgagaaa gagggtcag
107101	tggggcgga agattatgg ggagaggag ttccagaacc caagggaatg aaacgggct
107161	tgagggtgt taccagcag ccgccctcg cccctgagt gacgaaagg tggccctt
107221	atgtcacat ctccagctc ttgctagaa aacctagat ttaataact gtggcagcg
107281	agtcaacaa taaggaaaag ccgactctt tgagagccag gcacaaggc tctgtacag
107341	ggtctcagg ctgccattt gcagtctg aaacggagg ttttcgaga aggaggtct
107401	gggggtcct ccagaatgg agggggggc gcgggaaag aggaccaga agagaggct
107461	tggccctcg caaggaggc actggacct ggagctgag ccgacggca aactgaaac
107521	tcaaatctg tctcgtgcc agccacaag cctatgatt tcttggcga cgtcagcat
107581	cttaggaga gctggcggg gaggcggta gtcgtggg ggtgcaaca gggcaggaa
107641	gtggaagcc tgggctggt cagagagctg gttggagtga tggccatcg tggaccgct
107701	ggagaagcc ttagtagaga aggtctaag ttaacggga aggggtggc cagggtgga
107761	atgggtggg aagttgag aggggggca gtggagatgg ggtgtgag gaatggagt
107821	gagctagac gcttgagga tactcagtt ctgtcttt ttacacct gctgaaaat
107881	tactgaaa caaacaacc ctgtctgt gacagctag aggggtggg gggagctta
107941	agaggaggg gacgtgctg tccctatgg cgattcgt ggtgtacgg cagaaagca
108001	cacagtatgt aattaccct caattaaga tcaagtaca cttaaaaacc ccaaacaca
108061	cahtaatg cagtagact ccagtaaca ttacgtaag aagattcaac tgggaatgag
108121	tccgcccgt actatctga tgaattccc gtgtcttt gaggccatc ctcttgaac
108181	tccgtgtt ggggaagg gctttgat ggagctcga ggagtaaag agacggcct
108241	gtagaagcc tagtagtgc ttgcacgag cagatctca ataaccicga gttgtacca
108301	ttatgtacc tcaagatct ccttggagt tgcacggtt ctgaatggg tctgcgggg
108361	ctccctggg gctccacat ggggtgggg gctgagtg ggtgtccc cctctgctt
108421	gtccctgtg gaaccccc ttccaccga gcagctctg tttgtctt tgtttgtt
108481	tatatctct agattgtt tcagtgctc agtctgtcc aactccca cccatggac
108541	tgcagcac caggcctct gccttcca tctcccgg ctgtcicaa ctctgtcca
108601	ttagttgct gatccgtcc aacctctc tctctgtc tcccctct ctttgacct
108661	cagtcttcc cagcatagg gctttcca atgagtcag tcttctact aggtggcca
108721	gtattggag tcaagctca ttaactgct tccaatgaa tattcagggt tgaatttt
108781	taggattgag tgaactgac tcttgcagt ccaagggact ctcaagagtc ttcaacca
108841	cagttcaaa gcatcagtc ttggcctc agctcttt atgatcaac gccacatcg

10

20

30

【0171】

【化 6 8】

108901	gtacatgact actggaaaaa cttggctca gagataatg acttgattga atacaaagt
108961	ctttggcaaa aaataaaagt gtggcaagca gtactgacac aaaagcaagt ggcttttct
109021	ccgttgatgc attatttat tcagtggtg tgctcgtgta gagacggagc ggctgtgctg
109081	ggagctgggg ctccacttc agaggagccc cggacctgcc ctccgggagt tcacaggcag
109141	tgctgcgggg ggtcctgccca ggacgctgc cctgcgagtg cccagtgctg tgatggatg
109201	gtgtcccgca tctgcggcca ctggggccac gtgcccgaga ttgtccgggt ctgagggtgc
109261	agagaagagg aggcatttgg actgagctcg gaaaaatgag catgtggcca cgtgagaagc
109321	cagtggtagg gggaccagtc aggcgggagg aagagcggct catacagatt gtaggactgg
109381	aagcatgagg gtgtgtgaa gcagaggccg gggacagggc cgcaggpccg gccatggagg
109441	gcgtggctg ctgcaggctc ctgagaagg ggcgctgcc atcatgaccg ggfttaggtg
109501	ttgacctg gtgtccact agaggacaga tgtgtgggg gggagctgga gatggcctc
109561	catcgggagt cagcctggag agaggcagag accccgtcag tggccctca ggactggat
109621	gggctggatg ttgggaagat ctgactcctg ggttccggct gggctccgg gctgaggggg
109681	tgcccccac cgagcacagg aggcaaacag atgccctctc ccagcaagac cccagcccca
109741	gcacctccg gggccggact cggccctct tcagaaatg ctccctgct gctctgccc
109801	atcttccgg tgcctgagc ctctaagtc tggacaaccg cgtccgctt gcgctgttt
109861	ctgggaagtc tctggctgt ctctgactca cccaggaccg tctcagagg caaggtgtg
109921	tctgtgttc catctgctt ggggtccggc tctctgctgc ttgacctgt gatgtgacag
109981	tgctctgtt ttctttca gaatccgaga gcagctgtgt gtgtccaga cagaccagc
110041	cgctgggatg acgggccct ctgtggagat cccccggcc gccaaactgg gtgagcttt
110101	cgcttttgc ggcggctgg acatgcaggc agacctgtc gcggaggagg acctgggggc
110161	cccccttct caggggagg ctctggagca gatggccgc atctacaag agatccctt
110221	cgaggagcaa ggcaggagc aggacatta ccggggggac ttgatctgt gctccagccc
110281	tttctccct cagagcgtc cccccggaga cagggcccag gacgatgagc tgttggccc
110341	gacttctc cagaaaccag acccgactgc gtaccgata cgggcaagg gggaaagccg
110401	ggatccgct gccaggagg cgttggcag ggtgacttg gggctcagg ggcgccccag
110461	gaccgcgag cccgccaaag cctacgctg tgggagtg gccaaggct tcagccagag
110521	ctgcacctc ctccggacc tgggtattca caccggggag aagcctatg agtgcggca
110581	gtcggcaag gccttcagc agagctgca cctgtccgg caccaggcca tccacaccg
110641	ggagaagccg tacgagtgc gcgagtgcg caaggcctt cggcagagct cggcctggc
110701	gcagcacgc aagacgcaca gcggggagc gccctacgtc tggccgagt gggcaaggaa
110761	cttcagccg agctccagc tgcgcaagca ctagccatc cacaccggg gaagacccta
110821	cgctgcccag gactgcgca aggccttcaa ccagagctg ggcctgagc agcaccgaa
110881	gatccactg ctgcaggagc cgcacgctg cgagctgtg gggaaagct tctgccaccg
110941	ctcgcacct ctgcggacc agcgcgtcca caccggcaag aagccttgc cctgcggga
111001	ctcgggcaag gccttcagc agagctcaa cctcatcgag caccgcaaga cgcacaggg
111061	cgagaggccc taccggtgc acaagtgcg caaggcctt agccagagct cggcctcat
111121	cgagaccag cgcaccaca cggcgagag gccttacgag tgcggccagt gcgcaaggc
111181	cttccgccac agctcggcg tcatccagca ccagcgcag cacacggcc gcaagcccta
111241	ctgtgtgcaac gactgcggca aggccttcg ccaccgctg cgcctcatg agcactcaa
111301	gcgcacacg cgcgagcgg cctacgagt caaccgctc gccaaggct tccggggcag
111361	ctcgcacct ctccgccac agaaggcca cgcggcgac aagctctagg gtcccocgg
111421	ggcgaaggca cgcggccct ggcgccccc gccacgggg tggacctgg gggcagccg
111481	gacggcggaa tcccggcgg ctctctctg ccgtgacccc ggggggttg tttgccc
111541	catctgctt tctaaagt cagacgaata cagctagag gacgaagt gggtaagcc
111601	cccgggagac gtccggcgag ctctaagtc agacactga agaagtgaag cggactgca
111661	gcccgtacag cccggggaag atgagtcaa agtcgaggtt cacctggcc actgcagggt
111721	cgctcggcg tggggcggag cgggtgacag agggctctc ctggcttgg ggtggcaggc
111781	gaggaccgg cgcctcag cctcggcct gggttggctg agggcggcc tggctgtagg
111841	ccctccagc gaggtagg cgtgcccgg ctacgccag cacaggacc tgcacagag
111901	agtgcctc cgcagacc ggcgtccgg ctggggccc tgggggctt ccgtctgtg
111961	gtgggcagc ctgcgccctg tccagggatg aagggttcc ggtctgaag gctgggtca
112021	gggtccagct ctgcccctc ctgcttgggt gctctggagg aagcccag gctccgttc
112081	ctctccagg aggtggggac gttggaaatg ccacatccc ctggggggtg tctgtgtg
112141	tcaaaggct ccttcagac tggactgg cactcacgag cttggcaac tggcaactga
112201	ggacggagac ccagggtgac accccacct ctgtcggcg cccccggca ggggagacac

10

20

30

【 0 1 7 2 】

【化69】

112261	aggcccgtct ggttccaag atggcagggc cctcccctt ccagcttctg ccttgggtgt
112321	ggtcctggg gctacaaga cctttccgg ttcccggggc cagttcagct gggcatctc
112381	aggcggggc tctgaggtg ccatgttcc agagctctc ctctcccac cagtagcagg
112441	cggcggcca gctcccaggc agcccctgg catgcctag gtgcacact gccctgtgtg
112501	accagcaag gcttgaagg ggcctccca gtaagtccc ctgcccctg cocaggaaig
112561	ggctggggc gggccgcaic tggctgccc agaagcgtct giccttggcc tctggaggt
112621	ggcgtggic tctgtactg tccctgcag ggcctctag cactgtcgg ggaggaggtg
112681	ggctgaactg atttgaagt ttacatgtc tggcccgca gtctacgag cccgtcaggg
112741	tcatgtgtt tatttcagca gatggggctt gctcggcag ctggatggt cctgaataa
112801	aateggaagg ccagagctgt tctccatca gcaggcttg cagctggga cgttgaagg
112861	acagctctc tggctgggg agaccagctc tggcagcc ctgtctccg tgggggtact
112921	aaaccagccc ctgtgtcgc ccatctgagt ggcagcccgc ctggaggatc gccatcact
112981	tgtgagaatt gagagaatc tgacacccc gcttgggtca gggggacagg gcccccctag
113041	atctactcc ttgcccacc cccgggacc cctcagcctt ggccaggact gtcttactg
113101	ggcaggcag tcatcactt ccaaccttg cctctctc cgcgcgtgt gctcccagcc
113161	aaattgttt atttttcc aagcatcact tgcacagct caccactct ctaaaacca
113221	ccctccgga gtctctgtc cgtaaatgc cgtttcagc caacctgggt cccccccaa
113281	ccccagcaag cctgtcagc cccgcctc ccagctact cagctcgc tcaagctct
113341	aaacgggac cttccccc ccaccctat cctttttt tctgattat gtaacacgc
113401	aggtaagact cctctctga aggttgaca gactacaca aaaccgtgt cagaccaggc
113461	aagtctttt ttcaagaat gtgagcggaa cctagcttc agctcatgt cttctgtt
113521	ttctatgt gttcaatc ctttacttg gctccoga cagcagctt gtaagaggcc
113581	gtctggtag caittgaat gtctcagat tccgtctg gatttgtt tattgtctt
113641	gtttccctt ctttagcag acgttggta ctgtctaaa gctccagtc ttggtctgt
113701	ttactaata aattgtttg tcaagtaca tgtatttgc tctttctt atcttttt
113761	tgttaata ttaacattt acattctaa gattaattt ttggtaatt aataatttt
113821	aacatttca gtaaacgtg gtacttgggt ctgtttgtt ttctgtag ttacagctt
113881	ttctctcta tactgtgac gtctgggtt ttittgtc ttaggaaatt cctttgacc
113941	ccattatat tatttaatt agtattttt aataataa aattagtgt tttaattaa
114001	ccctaactt aaccccagtg atgactgctt cagtcattg ttacttat tatgtctgg
114061	tgtcaggatt tttaagctc catagacatt cctcagcct gaatatata tcaatttat
114121	acagcattg tttactctca agaaacgtg ttcaactc tcaatcgtt ttgtacctc
114181	agctttatg ttatttctt ccagtcgca ctgtctca ctgtctcc ctgcagggt
114241	tgaagagcc tggcagccc tgaagctgc gggctccgg gtctgtggcc caggcccca
114301	gcaaacctt gtgggtgtg gcaagcgtg gctgtccgg gaggaaacct gtggccccc
114361	ggtagttagg agcctgtgtt taccgttca caccagctc tggttttgt tcttttccc
114421	tgaagtttt ctgtttgcc ttggttcta tctgttta tgagtccgt ttacgtttg
114481	ttgtctatc cgttatctg atagacagg ttactgtat caagtatta cogtatttg
114541	agcagatgtc tatttaacag agatgaactg agaacctgt cctttgatg cctctttgc
114601	ctttttat cctctagct tcaacttct tttccaaa attataatg aaacctctg
114661	cttttttt tttaattgc atttcatga gatttatt agctggcat ttatttta
114721	aaattgtgt atatttttt gctatatac tgaacttat aaacagcaa ttattgatt
114781	tgtttctg atttctctg taatttctt tacataaga gttctctat gattaaact
114841	gctgttata gtgaggcatg atttattcc agcttagtat gtttgggtc ggtlaacccc
114901	caaaagctat gctatcccc gcccatctc ttgtgattt ttccaggtg tggagcggc
114961	tgttaggccc gacgagagac ccaccatcg gcacacctg cctctctgt ctgtcagtg
115021	ccggctctg tctgtatcc actctgatg ttacagctg gtgtctcag gacctggct
115081	gtgacagga ggtgtgtatg gcactgccc gcccatggg gcttggaga cttaaaggatg
115141	cacacctgcc tggcagactg agggcacagg ttittctac actgtcagc ttgtgaaata
115201	ttctttgat ttctacctt aactccaaa ggcgttcaa cataagctag aatgtactg
115261	ggtgtctgat tacatttag aaaagtcca gcaaatcca ctagatgag caaagaacta
115321	gacctcacag atcagggcgc ctgcataagg gaccccacac agtctggga gacggggacc
115381	ctctcccag tctgtctgt ccaaggatg tcccctacc cgcctctct cctcccctc
115441	ctctctgtg tggggccgg ccaccatcac agctgcagag cctcaagaag ggggtcggc
115501	tggcactcc ctgtgcagga gggacacag ggcaggagct taccggggt gcagtgtct
115561	cgatcagct cagctggccg ctccgggtc ggggggacag ttcagtgga ggcaggagcc

10

20

30

【0173】

【化 7 0】

115621	cccactacag ctgccaggac ttctcagagg tgacaagggg gttcagtcac ctacagccag
115681	gtggaacca aatggcctct tgcgcggctc ctggggccac gcggaggttc gctgggatca
115741	caggatctcg gatgtgtgcg ccatggacat gcaccacctt cgggggtaa ggggtgggga
115801	aaggcagccc cttcttttg ggggaccccc tcttcagttg ctgataacca ggaacccaa
115861	tcagaagggtg gtcgggggt gctgagcagg gtgtctocta caccacaggc cacacactca
115921	cacagcctcc aggactccag tgggctgag cgtggagac tcaccacctt ttgctacccc
115981	cccacccaag gccatccag aacagctgcc tgcctctca cggctggccc ctcccctcg
116041	gtctaaccca gttgggtgg gccggcctgg ggtctccacc tgcctctgc tgttccctgg
116101	gctgtggct gctgcagat gcggggccct ggcccggaga agcccctca gagcccagag
116161	gacgggagt gagcggggag gtgagccccg gagtctcag gggccagagg caaataactg
116221	ggctgtctc ctggaaggca gttcccatg aaacctcaa tataggccc cccagacgat
116281	cagcctcatc tgetacgtgg atctctccc gtagcgaatg gtgatgggt tctacatgga
116341	cccgggactt ctgttgaat tataacttt ccccactgc cctccaggc atctgaaaa
116401	tggaggcctt ggctagacc aagcttctc caagatttt tatgaaagg attcgaagag
116461	aaacagggtg tcagtaact gtgggggatg gagggtgag cgtctcgtt aacggttta
116521	ctgtgtctac gggaccagt ttgatgtct tcccctcaa gaagcagacc caaacaccga
116581	gatgtcagg ttgacgac agagcgggtt caicacaag gcaaccaggc agggagacca
116641	gagactctt ggaatctgcc tctctatgg cacggcctg gtgtctcag atgaagacca
116701	agcagcagt gccgtggggc gtggggagcc tgcggaaagc gatggacaag gtcgggacc
116761	ggctccgag cgtgtggacc aagctccgc tctgcctgc agcgcgagct gggggcggag
116821	atccaggga ccgcgacgc cgcctatgg gaggtccgc ggtccacca gtcctaacag
116881	ctcagctca gctagacc gccagctcc gcttctaga gagcaacccc ggcgggtatt
116941	ttatgtctt gccctctga ttggaggaca cgcgagctt agaaccctt tgaattgct
117001	ggcagggcg aatggattg actgatcac atctcagtt tcaccatct agggcccgc
117061	ctcaccocca cctatctgc caaaggggg gcctcgtgc tgagatcgg gccacacgtg
117121	actagaccg tggctacgc ctgtctga gccgaccgg gccatctct acaccgccac
117181	tggcccctt gctcaataa aggaaggaaa gcgggaaaag cgtttctgg ccgcgttggc
117241	ctcgcgctt cctccatgc catctctgg cagagcccgg catggcacc gctgcacaga
117301	aacctgggtg tccgttggg tgcctcacc ttgacccga gagagcacc tccgtccaa
117361	atgaaaaa caactctcca agagctatta taatcacag caattgtgt aatctctt
117421	ggatccact cacagtcca cggaacatc tctaacctc tgacaacctc tacataaagc
117481	aatactgaga agaaaaaac gttgttgata aatacaagg catacaaca laaggagcaa
117541	agaaaaaga cagctctcgc agttctgtt tgtctctc tcatgagt agtgagcagat
117601	aaaaacaga atgcccagtg aataattta gctaaagt gtcaccaata ctgctaatc
117661	tcaaatcta accitattt taaaataat atttttgct ggtcactca cagttcagc
117721	accaagcct ttgttctg actcctaact tttagacc tctgggtga ggagaccctc
117781	taactcagc agccatcac acagtcccc tggactaga ccttcttg cccatcacg
117841	ctgaccgaa gggccagccc atggccagc ctccgcccc ctggcgaca gactctcgc
117901	ggcagcccc ggagcccagg tgcagcccc cgtctctgg cgcctctag tgggaaaga
117961	tctctctg gtgtcccag tcatgggct gattttat agagaagatg ctgcctgac
118021	gatgatgat gttctacc gggaggcac ttggggcg gtcggctcag gggccagct
118081	attagctgc atcgcacca caggcatgc gtcocctga gccgggicag ctgtgggctg
118141	tctgacacg ggttcccc agtctctgc cgcctctcc tccaggta gttctcagcg
118201	tggcctctt ggttgggac ttgtcagcg gttcagcag atgaggggc gacctaaag
118261	gatgtatga ggcactcag cactctctc cgcaccaggt tctgtctag cagtgaagt
118321	accgggaaa gggctgtct tgggtcctt tcagagcct ggttagacc aaagtctt
118381	agaagattca ccatgacag gatcaaaa caaaactagg gttgtagca atctgtggg
118441	gattcggcg tgagggaatt ctgaatgta catgtaatg ttactatt gtagggaac
118501	atttttccc cctacaaca gcaggccaa atactgagat gtcagttg catcaagag
118561	cggtctcacc caaaggcaa ccagagaac ccttggatc tgcctcctg cgggcacag
118621	ctgggtctc acggaaga accaagcagc aggtggcgtg gggagtggg agcctggga
118681	aagcagtag caaggtcga ggaacctcg cgcagctgg agcggagct tccagggaca
118741	cgcggccag cccagtggg ggtcagcgg tccatcagt cctaacagct cagctccaac
118801	tagacgtcg tgagctggc ttctagaga acactccgg cgggtattt atgttttg
118861	ctcgtgact ggaggaggt caagictaa aacacctg attagtccg ggaggcggaa
118921	tggattgac tgatcacgac ccgacttc accatctag gggccccc caccctcc

10

20

30

【 0 1 7 4 】

【化 7 1】

118981	taccctacca aagggtgggg catcgggtcct gagatctggg gtgacacata aaatcaggtg
119041	aagtcttagg acagggggcc gattccaggt cctagggtgc agaaaaaac tacctggccc
119101	cggtctagac agcgtggagg gcgtggccc ggctgtgtca cagaagtgcc ccccaactgg
119161	tcagaagctg tgggagccca gggctggctc actcagaga gggctcctc gtggacagag
119221	tgggacctga gtgctctg aactgtctcc tcagggtgc tgagcagaca cgggccaatca
119281	tcactggctc ctgtctcga tagaaggag ggaaccagg aaagcaaagg cgtttatgg
119341	ccgctttgt gttcgcgt cctctagac cgtctccgg cagaacggg cattaatcc
119401	ctggccaaa cctcggggc cggcttggat gtcccctcc ttgtctcga gatcctacct
119461	ctcagcagt cccctggga caatgtcag aagatcgcac ctgacctgg agctcgggtg
119521	agaggggtcc ctgggttct tccgagttg ctggagtg aggtgctca tgttggctg
119581	ggaacgggag gaaggaaaca ggtcatgatt gagatctct agacagactg tccctgctct
119641	tgccaaatt cagaagattg tcttaataa atattccat tttgtatgc ccttaggtct
119701	attccagac actttaata tattgaaga ctttaatat ttatataaa atattatta
119761	tgactgtat aaaaggaaca gttgaactg gacttggac aacagactg ttcaaatag
119821	gaaaaggagt acgtcaagg tgtatattg caccctgct atttaacta tatgcagagt
119881	acatacag aaacgttgg ctggaagaa cacaagctgg aatcaagatt gccggagaa
119941	atacaataa cctcagatg gcagatgaca ccaccctat ggcagaaagt gaagaggaac
120001	tcaaaacct ctgatgag gtgaaagg agagcgaaaa agttggcta aagctcaaca
120061	ttagaanaac gaagatcag gcatctgtc ccatcactc atggaatat atgggaaac
120121	agttgagaca gtgcagact ttattttgg gggctccaat gaaftaaaa gacgttact
120181	tcttggagg aaagtatga ccaactaga cagcatata aaaagcagag acactactt
120241	gccagcaag gtccgtctag tcaaggctat ggttttcca gtgltcagt atggatgta
120301	gagttgact gtgaaagg ctgagcacc aagaagtat gctttgaac tgtgtgttg
120361	gagaagactc ttgagggcc ctggactgc aaggagatcc aaccgtcca tctgaaagga
120421	gatcaccoc tgggtgtca ttggaaggc tgatgtgaa gctgaaact cagtacttg
120481	gctacctaat gcgaagact gactcattg aaaaaccct gatctgga aagattgaa
120541	gtggaggag aaggggaca cagaggatga gatgttga ttgcatcact gactcagtg
120601	acgtgagct gagtgaagc tggagttgg tcatggccag ggagccctg gcgtcgtgc
120661	ggttcatgg gtcgcaaga gtcggccatg actgagtgac tgaactgaac tgaaccagaa
120721	atttaaaat aatataaaa ccaatccat gcagacaatt ataagcatat attataaat
120781	cataattata agcaagtata ttttatatt ataagtatt ataagtatt tataagcaag
120841	tataattat tataagcata attgtaagta gaagtaacti tggcttcc tgggtgctca
120901	gacagtaag aactcctc cagtacagga gaccgggtc gatccctgt ttgggaaat
120961	tccctgaga agggaaatgc aaccaactcc aacatgttg cctggagaat tccatgaca
121021	gaggagccc gaagggtgca gtcctgggg ttgcaagag ctggatacaa cagagtact
121081	aacacatga tataataaaa ttacctata tatttatat atattataa acataatcag
121141	atattataa taattagaaa catattatc atgtattaa atactgtat aaacataaat
121201	taaaaaata atttcagcc ctftggctg ggggtgtgt tgtggagtc ttgtgctac
121261	gttctgaa gtggagctct cccctccca accagcttt gaaatgactg ggaagcaat
121321	ggaatcata agcctcagga agatagcaac agagctgca ttctcagag aggtgtgtct
121381	tgagtgtga gcaagtcgg cagaatgtag acagattaat atagtatt aaaaatag
121441	tagcaaatf acgaggtgc atttcaagta taagactta ctggctctc cagttcagt
121501	cagtcgctg gttgtctc actctttg acccatgga ccgtagcac ccaggcctcc
121561	ctgtccata ccaactctg gattcactc aaactcatg ccatcagtc ggtgatgcca
121621	tccaaccatc tcatctctg gctccoctt cctctccac cttaactct tccagcacc
121681	agggtcttc ccagtgagtc agttttgc atcaggtgc cagagtgtg gatttcagc
121741	ttcagcatc gtcctccaa tgaataatt ggaactgatt cctttaggat tgaactgtg
121801	gatctcttg cagttcaag gactctcaag agtctctcc aacagcacag tctatgaa
121861	gaatagcaaa tgaatagaga ataacttta cgaggatata tttaactat gcataaata
121921	tatcagctg tagagaacg acttttccc agggagagg gtggtaggg atggagtgg
121981	agttngat cancagaagc gagctgttat atagaagatg gataaaaagg atacacaaca
122041	atgtctact gttgtgcaac gggacctata ttcagtagt tttgagaac catatcgac
122101	aagactgag aaaagtatat atatatgtat gtacttgagt tctttgctg tacagaagaa
122161	attaacacaa cattgaaat cgatattca atagaatcca ccccccaaa tatataagt
122221	tctctgagat ggagacgca acccaatcca ttcttgcac ccaatattct tgcctggagg
122281	atccatgga tagagatcg caagactcg gacataacc agcgactaac acttccctt

10

20

30

【 0 1 7 5 】

【化72】

122341	tcaaatgtgt aggttlacta cgttgaatct acagagatgc ccaagacatt cgtttatgag
122401	gaaaactcca caecagcctt cactgagaat tattaacct attaaagga gagagcgoca
122461	ggatattcat ggaatgaaag attcgtatgt gicaaagtgc cagtttccc caaactgatt
122521	ggtaaatfcc ccaggagctg gctcaaggcg caaaattccc ttacttttt ttaagagac
122581	gaagccaagg agccgattct ggttgagaga cgtcaggtc ctctgcccgg agagcagccc
122641	tctctccc ggtcctctgg cagatttoga ggccacgacc agaaggactt ggctccctgt
122701	gtcgcgact cagaagtctc ctctccctc ccaaggactc agaagctggg cgtctgccc
122761	gcagcagagg aggcagcctg gaggggcccc gggggcacag cggctcgggt ttagccgag
122821	ttgccccc cgccctcta ctggggcct gcccggcgc tccggggcg gccgtgctt
122881	ccgtggccc aaggcgtcgc tgcctcccgc ctggaagtgc tgaccggag gaaggggccc
122941	agacggaggg actcggagcc tccagatgac accctgggac tccagcgtt ggagcctgcc
123001	gtaccccag gcaggggcag tggggggccg gggcggggtc aggggctcc cccggttct
123061	attgacacc cgggggggtc gctgggcaca gttccagggg gccacgttcc gagcaggggc
123121	gcgatgcagg cccggggcgc gccttcccgc gggcggagtc cagctctt gcagaggctg
123181	ggcaggtcg cagtgacct cacagagacg cccactctg cggctccagg tggcctgtg
123241	ccccccagaa gtcctgacct gtcaccggg aaggcacagg gcccccagc calgtctg
123301	atggaagagc cggaaaccgc ccatgcccgt cctcgtgac cggcagggc cccgctgtg
123361	tcacacgct gagccatctg gctcccctg cttagacac acccaggacc tgagtgtca
123421	ggaaattaga aggggcaggt gttgtgacac gatccatcc agcatcact gagaacctgg
123481	acaaacctca gggggccagc ctgctctgt agggcccag gggcggccc tcccggacc
123541	ctccttga atccggccc actgcccgc ttctgctcc tggcgtgt cagacagcc
123601	tgagcccagg gccgtgca tctgtctcc ttctccagg actgctctc cccagctct
123661	tgctgggct cccctctc atcgggggt ggcctctt gttcagtggc tcagctgtg
123721	ccagctttg caaccctatg gactcagca cggcaggtt cctgtctt cactagctcc
123781	tggagttgc taaaactcat gtccattgag tcaagtatgc tatcaacca tctatcctt
123841	tgctgcccac ttcttctct gctcctaac ttcccagca tcaaggctt ttcaatgag
123901	ttagctctt gcattcagg gccaaagtat tggagcttca gcatcagtc ttccagtga
123961	tatcgaggtt tgatttccct tagaattgac tggttggatc tcttctgt ccagagaact
124021	ctcaagagtc ttcccagca ccacagtcgg agagcatcag ttctcagtg atcagtttc
124081	ttatagccc agctctaca tgggtacatg actattgaa aaccatagc ttgattaga
124141	tggacctca tggcaaatg gatggcctt catggcccct gcttttaac acacactca
124201	ggttctgt agtttctt ccaagagca aacatctt aattctctg ctgcagtaac
124261	catcatagt gattttgag cccaagaaa taaaactgc cactgttcc acttttccc
124321	ctctattg ctatgaagt aggggactgg atgccatg cttagttta accagcagtt
124381	gtaccccga ccccttctt tctaaagag cctcctacac ctcccactg aatgcaatg
124441	gttccctgc cgcctgctt accctcggg actttgctg aggtctggt ctctgagcc
124501	cttccctat cccagggcc cagagcagtc ctggcttgc agtccgatca gggactatgt
124561	gttggactg gatggtgctt gcttctctg ggaacgaga gacctggccc tgggaacga
124621	ggggacctg tggaccgga tctctcct cgggagagga gccaaagcag tggcacagc
124681	tcagtgtgc tgcctctg tggcaggtg tccgtctgt gctgtcac tggcattc
124741	ggtgttctg tgaaccagc cctcccctc ctgataccc atcccatcag cacagaggag
124801	actggcctg gggactctt ggtcctgaga ttctctccg catgtgact cccccctg
124861	ggggagcag gcaccgtgtg tgaaggagt gaaagcttt caagacccc agctttctg
124921	tcaccgggg cctcggcagg gccctgggag ctggaatgag ctggaatctg gcccagtg
124981	ggttccctg ggttaaga acccgcctg ccatcagca ggcataagag acgggggtc
125041	gatactggg tgggaagat cccctacag agggcatggc aaccactcc agttattt
125101	cttgaagaat ccttggaca gaggagcctg gttggctaca gctctgggg tggcaaggag
125161	tggacacga ctgaagcag taccatgca cgcacgggg gtcaggggc agggccgccc
125221	tgcttactg ctgtgtgacc ttaccaggt cacaccccc aggcctgta agagaacagt
125281	ctcccagac tgggcatcc aggtcttac agacgtcct gtagccttg tgaactggc
125341	ctgtggccc ctgagggcg ctgtccggc ggcctatgt cgtgacgc atgtgagcat
125401	gttgcatac gttgtgcat ctgtggggg cgcacgggtc ggggacacgg gcacgggtc
125461	aggaacgcag cccggacacc tccactggc ccgcagtac cgtcaggtg gggctgtg
125521	tcgctgtgt ggtgacccc cctcccccc gcaacgtgg tcatagta cccgctggt
125581	gggtcctga gctagccat cctgcccccc ggtcagctc ccagagccc cagcttagg
125641	ccccggctt gaccgaggc cccagggccc cggccttga gatggacct cctctggg

10

20

30

40

【0176】

【化73】

125701	ggctattct gctcccggag gccctggcagg cccctctct ttggcattgc ataccctgc
125761	attgggggtg gtaagcagac taccocatgc ctgtggccc gttggagcgg cctgctcagg
125821	gaggccggag cctcagctac agggctgtca caccgggctg cagaggaaga agacgggagc
125881	gaggcctaca ggaacctagc caggccctgg cccactgagc cgacaggaagc ctggccagag
125941	gcttgcacag gacgggggtg cggggggggt ggggtggggt gctgggccc gttgcttga
126001	ctgcagacc caggggctc tcagcttaga acggccaagc ctgagcttg ggggtgacg
126061	tcaggggg

(プライマー)

別の実施形態では、ターゲティングベクターの3'配列および5'配列を生成するためのプライマーを提供する。オリゴヌクレオチドプライマーは、ブタ免疫グロブリンゲノム配列(上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31など)とハイブリダイズし得る。特定の実施形態では、プライマーは、ストリンジェントな条件下で、上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、1

50

9、28、または31とハイブリダイズする。別の実施形態は、ブタ重鎖、軽鎖、または軽鎖の核酸配列（上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31など）とハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプローブを提供する。ポリヌクレオチドプライマーまたはプローブは、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズする少なくとも14塩基、20塩基、30塩基、または50塩基を有し得る。プローブまたはプライマーは、少なくとも14ヌクレオチド長、特定の実施形態では、少なくとも15、20、25、28、または30ヌクレオチド長であり得る。

【0177】

1つの実施形態では、機能的連結領域（J6領域）を含むブタIg重鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。1つの制限されない実施形態では、重鎖の増幅フラグメントを配列番号4に示すことができ、このフラグメントを増幅するために使用されるプライマーは、5'組換えアームを生成するためにJ領域（配列番号2などであるが、これに制限されない）の一部に相補的であり、3'組換えアームを生成するためにIg重鎖μ定常領域（配列番号3などであるが、これに制限されない）の一部に相補的であり得る。別の実施形態では、ブタIg重鎖領域（配列番号4などであるが、これに制限されない）をサブクローン化し、ターゲティングベクターにアセンブリし得る。

10

【0178】

他の実施形態では、定常領域を含むブタIg軽鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。別の実施形態では、J領域を含むブタIg軽鎖のフラグメントを増幅するためのプライマーを提供する。1つの制限されない実施形態では、このフラグメントを増幅するために使用されるプライマーは、5'組換えアームを生成するためにJ領域（配列番号21または10などであるが、これに制限されない）の一部に相補的であり、3'組換えアームを生成するために定常領域（配列番号14、24、または18などであるが、これに制限されない）の3'側のゲノム配列に相補的であり得る。別の実施形態では、ブタIg重鎖（配列番号20などであるが、これに制限されない）をサブクローン化し、ターゲティングベクターにアセンブリし得る。

20

【0179】

（II. 免疫グロブリン遺伝子の遺伝子ターゲティング）

本発明は、免疫グロブリン遺伝子（例えば、上記の免疫グロブリン遺伝子）を不活化するために遺伝子改変された細胞を提供する。遺伝子改変し得る動物細胞を、種々の異なる生物および組織（皮膚、間充組織、肺、脾臓、心臓、腸、胃、膀胱、血管、腎臓、尿道、生殖器、および胚、胎児、または成体動物の全部または一部の脱凝集調製物などであるが、これらに限定されない）から得ることができる。本発明の1つの局面では、細胞を、以下からなる群から選択し得るが、これらに限定されない：上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラノサイト、軟骨細胞、リンパ球（BおよびT）、マクロファージ、単球、単核細胞、心筋細胞、他の筋細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞、表皮細胞、内皮細胞、ランゲルハンス島細胞、血球、血液前駆細胞、骨細胞、骨前駆細胞、神経幹細胞、始原幹細胞、肝細胞、ケラチノサイト、臍帯静脈内皮細胞、大動脈内皮細胞、微小血管内皮細胞、線維芽細胞、肝臓星細胞、大動脈平滑筋細胞、心筋細胞、ニューロン、クッパー細胞、平滑筋細胞、シュワン細胞、および上皮細胞、赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、脂肪細胞、軟骨細胞、脾臓細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、耳下腺細胞、腫瘍細胞、グリア細胞、アストロサイト、赤血球、白血球、マクロファージ、上皮細胞、体細胞、下垂体細胞、副腎細胞、有毛細胞、膀胱細胞、腎細胞、網膜細胞、桿状体細胞、錐状体細胞、心臓細胞、ペースメーカー細胞、脾臓細胞、抗原提示細胞、記憶細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、筋細胞、卵巣細胞、子宮細胞、前立腺細胞、腔上皮細胞、精細胞、精巣細胞、生殖細胞、卵細胞、ライディッヒ細胞、尿管周囲細胞、セルトリ細胞、黄体細胞、頸部細胞、子宮内膜細胞、乳房細胞、卵胞細胞、粘膜細胞、繊毛細胞、非角化上皮細胞、角化上皮細胞、肺細胞、杯細胞、円柱上皮細胞、扁平上皮細胞、骨細胞、骨芽細胞、および破骨細胞。1つの別の実施形態では、胚性幹細胞を使用し得る。胚性幹細胞株を使用し得るか、胚性幹細胞を、宿主（ブタ動物など）から新た

30

40

50

に得ることができる。細胞を、適切な線維芽細胞支持層上で成長させるか、白血病抑制因子 (LIF) の存在下で成長させることができる。

【0180】

特定の実施形態では、細胞は線維芽細胞であり得る。1つの特定の実施形態では、細胞は、胎児線維芽細胞であり得る。成長中の胎児および成体動物から大量に得ることができるので、線維芽細胞は、適切な体細胞型である。これらの細胞を、急速な倍加期間にてインビトロで容易に増殖するか、遺伝子ターゲティング手順で使用するためにクローニングによって増殖させることができる。

【0181】

(ターゲティング構築物)

(相同組換え)

1つの実施形態では、免疫グロブリン遺伝子を、相同組換えによって細胞中で遺伝子をターゲティングし得る。相同組換えにより、内因性遺伝子が部位特異的に改変され、それにより、ゲノムに対して新規の変化を改変し得る。相同組換えでは、入ってくるDNAは、実質的に相同なDNA配列を含むゲノム中の部位と相互作用して組み込まれる。非相同(「無作為」または「不規則 (illicit) 」)組込みでは、入ってくるDNAは、ゲノム中の相同配列で見出されないが、他の場所(多数の潜在的な位置の1つ)で組み込まれる。一般に、高等真核細胞を使用した研究により、相同組換えの頻度が無作為な組込みの頻度よりはるかに少ないことが明らかとなった。これらの頻度の比は、「遺伝子ターゲティング」と直接的な関係を示し、これは、相同組換え(すなわち、ゲノム中の外因性「ターゲティングDNA」と対応する「標的DNA」との間の組換え)による組込みに依存する。

【0182】

哺乳動物細胞における相同組換えの使用は、多数の論文に記載されている。これらの論文の例は以下である: Kucherlapatiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3153 - 3157, 1984; Kucherlapatiら、Mol. Cell. Bio. 5: 714 - 720, 1985; Smithiesら、Nature 317: 230 - 234, 1985; Wakeら、Mol. Cell. Bio. 8: 2080 - 2089, 1985; Ayaresら、Genetics 111: 375 - 388, 1985; Ayaresら、Mol. Cell. Bio. 7: 1656 - 1662, 1986; Songら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6820 - 6824, 1987; Thomasら、Cell 44: 419 - 428, 1986; ThomasおよびCapecchi, Cell 51: 503 - 512, 1987; Nandiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3845 - 3849, 1988; および Mansourら、Nature 336: 348 - 352, 1988; EvansおよびKaufman, Nature 294: 146 - 154, 1981; Doetschmanら、Nature 330: 576 - 578, 1987; ThomaおよびCapecchi, Cell 51: 503 - 512, 1987; Thompsonら、Cell 56: 316 - 321, 1989。

【0183】

本発明は、細胞(上記の細胞など)中で免疫グロブリン細胞を不活化させるために相同組換えを使用し得る。DNAは、特定の遺伝子座に遺伝子の少なくとも一部を含むことができる。このDNAは、天然の遺伝子の少なくとも1つ、任意選択的に両方のコピーを変化させ、それにより、機能的免疫グロブリンの発現が防止される。この変化は、挿入、欠失、置換、またはその組み合わせであり得る。この変化が不活化される遺伝子のたった1つのコピーに導入される場合、標的遺伝子の1つの非変異コピーを有する細胞が増幅し、これを、第2のターゲティング工程に供し得る。この変化は、第1の変化と同一でも異なってもよく、欠失または置換される場合、最初に導入された変化の少なくとも一部と重複し得る。この第2のターゲティング工程では、同一の相同性アームであるが、異なる哺乳動物選択マーカを含むターゲティングベクターを使用し得る。得られた形質

10

20

30

40

50

転換体を、機能的標的抗原の不在についてスクリーニングし、細胞のDNAをさらにスクリーニングして、野生型標的遺伝子の非存在を確認し得る。あるいは、表現型に関するホモ接合性を、変異についてヘテロ接合性を示す宿主の交配によって達成し得る。

【0184】

(ターゲッティングベクター)

別の実施形態では、核酸ターゲッティングベクター構築物も提供する。細胞中で相同組換えが行われるようにターゲッティングベクターをデザインし得る。これらのターゲッティングベクターを、相同組換えによって有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子をターゲッティングするために哺乳動物細胞に形質転換し得る。1つの実施形態では、ターゲッティングベクターは、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖のゲノム配列(例えば、上記の配列番号1、4、29、30、12、25、15、16、19、28、または31に示す配列)のゲノム配列に相同な3'組換えアームおよび5'組換えアーム(すなわち、隣接配列)を含み得る。相同DNA配列は、ゲノム配列に相同な少なくとも15bp、20bp、25bp、50bp、100bp、500bp、1kbp、2kbp、4kbp、5kbp、10kbp、15kbp、20kbp、または50kbpの配列(特に、連続配列)を含み得る。3'および5'組換えアームを、これらが、ゲノム配列の少なくとも1つの機能的可変領域、連結領域、多様性領域、および/または定常領域の3'末端および5'末端に隣接するようにデザインし得る。機能的領域のターゲッティングによってこれを不活化し、それにより、細胞が機能的免疫グロブリン分子を生成できなくする。別の実施形態では、相同DNA配列は、1つ以上のイントロン配列および/またはエクソン配列を含み得る。核酸配列に加えて、発現ベクターは、選択マーカー配列(例えば、増強緑色蛍光タンパク質(eGFP)遺伝子配列など)、開始配列および/またはエンハンサー配列、ポリAテール配列、ならびに/または原核および/もしくは真核宿主細胞中で構築物を発現させる核酸配列を含み得る。選択マーカーは、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在し得る。

10

20

【0185】

細胞のターゲッティング遺伝子座を、細胞へのDNAの導入によって改変し得る。DNAが標的遺伝子座と相同であり、かつマーカー遺伝子を含む場合、組み込まれた構築物を含む細胞を選択可能である。標的ベクター中の相同DNAは、標的遺伝子座にて染色体DNAを組み換える。マーカー遺伝子を、相同DNA配列、3'組み換えアーム、および5'組み換えアームの両側に隣接させることができる。ターゲッティングベクターの構築方法は、当該分野で説明されている。例えば、Daira、Nature Biotechnology 20:251-255, 2002; WO00/51424号を参照のこと。

30

【0186】

標的遺伝子座での相同組換えのための種々の構築物を調製し得る。構築物は、標的遺伝子座と相同な50bp、100bp、500bp、1kbp、2kbp、4kbp、5kbp、10kbp、15kbp、20kbp、または50kbpの配列を含み得る。この配列は、免疫グロブリン遺伝子の任意の連続配列を含み得る。

【0187】

標的DNA配列の相同性範囲(例えば、標的遺伝子座のサイズ、配列の利用可能性、標的遺伝子座での二重交差事象の相対的効率、および標的配列の他の配列との類似性など)の決定において種々の考慮を行うことができる。

40

【0188】

ターゲッティングDNAは、DNAが所望の配列改変物(sequence modification)に実質的に同遺伝子系に隣接し、ゲノム中の対応する標的配列が改変される配列を含み得る。実質的に同遺伝子系の配列は、対応する標的配列(所望の配列改変物を除く)と少なくとも約95%、97~98%、99.0~99.5%、99.6~99.9%、または100%同一であり得る。特定の実施形態では、ターゲッティングDNAおよび標的DNAは、100%同一の少なくとも約75、150、または500塩基対のDNAを共有し得る。したがって、ターゲッティングDNAは、ターゲッティングさ

50

れる細胞株と密接に関連する細胞に由来し得るか、ターゲッティングDNAは、ターゲッティングされる細胞と同一の細胞株または動物の細胞に由来し得る。

【0189】

(ブタ重鎖ターゲッティング)

本発明の特定の実施形態では、ブタ重鎖遺伝子座をターゲッティングするためのターゲッティングベクターを提供する。1つの実施形態では、J6領域の3'および5'隣接配列の相同配列を含む5'および3'組換えアームを含み得る。J6領域がブタ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の機能的連結領域のみであるので、これにより、機能的ブタ重鎖免疫グロブリンの発現が防止される。特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、J6領域の5'側のゲノム配列(任意選択的にJ1~4が含まれる)に相同な配列を含む5'組換えアームおよびJ6領域(μ 定常領域が含まれる)の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る(「J6ターゲッティング構築物」)(例えば、図1を参照のこと)。さらに、このJ6ターゲッティング構築物はまた、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在する選択マーカー遺伝子を含み得る(例えば、配列番号5および図1を参照のこと)。他の特定の実施形態では、5'ターゲッティングアームは、J1の5'側の配列(配列番号1および/または配列番号4に示すものなど)を含み得る。別の実施形態では、5'ターゲッティングアームは、例えば、配列番号4のおおよその残基1~300、1~500、1~750、1~1000、および/または1~1500に示すJ1、J2、および/またはJ3の5'側の配列を含み得る。さらなる実施形態では、5'ターゲッティングアームは、例えば、配列番号4のおおよその残基1~300、1~500、1~750、1~1000、1~1500、および/または1~2000またはその任意のフラグメントまたは配列番号4の任意の連続配列またはそのフラグメントに示す定常領域の5'側の配列を含み得る。別の実施形態では、3'ターゲッティングアームは、定常領域の3'側の配列を含み、そして/または定常領域(例えば、配列番号4の残基7000~8000および/または8000~9000またはそのフラグメントなど)を含み得る。他の実施形態では、ターゲッティングベクターは、配列番号4の任意の連続配列またはそのフラグメントを含み得る。他の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ重鎖遺伝子座の多様性領域の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアームおよび多様性領域の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。さらなる実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ重鎖遺伝子座の μ 定常領域の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアーム、 μ 定常領域の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。

【0190】

さらなる実施形態では、ターゲッティングベクターには、任意の以下の配列が含まれ得るが、これらに限定されない：重鎖の多様性領域を、例えば、配列番号29の残基1089~1099(D(偽))に示し、重鎖の連結領域を、例えば、配列番号29の残基1887~3352(例えば、J(偽)：配列番号29の1887~1931、J(偽)：配列番号29の2364~2411、J(偽)：配列番号29の2756~2804、J(機能的J)：配列番号29の3296~3352)に示し、組換えシグナルを、例えば、配列番号29の残基3001~3261(ノナマー)、配列番号29の3292~3298(ヘプタマー)に示し、定常領域を、以下の残基に示す：配列番号29の3353~9070(J~C μ イントロン)、配列番号29の5522~8700(スイッチ領域)、配列番号29の9071~9388(μ エクソン1)、配列番号29の9389~9469(μ イントロンA)、配列番号29の9470~9802(μ エクソン2)、配列番号29の9830~10069(μ イントロンB)、配列番号29の10070~10387(μ エクソン3)、配列番号29の10388~10517(μ イントロンC)、配列番号29の10815~11052(μ エクソン4)、配列番号29の11034~11039(ポリ(A)シグナル)またはその任意のフラグメントもしくは組み合わせ。なおさらに、配列番号29の少なくとも約17、20、30、40、50、100、150、200、または300ヌクレオチドの任意の連続配列またはそのフラグメントおよび/も

10

20

30

40

50

しくは組み合わせを、重鎖ターゲッティングベクターのターゲッティング配列として使用し得る。一般に、ターゲッティング構築物をデザインする場合、一方のターゲッティングアームは、他方のターゲッティングアームの5'側であると理解される。

【0191】

他の実施形態では、ブタ重鎖遺伝子の発現を破壊するようにデザインされたターゲッティングベクターは、重鎖の定常領域をターゲッティングする組換えアーム（例えば、3'または5'組換えアーム）を含み得る。1つの実施形態では、組換えアームは、 μ 定常領域（上記またはSun & Butler Immunogenetics (1997) 46:452-460に開示のC μ 配列）をターゲッティングし得る。別の実施形態では、組換えアームは、定常領域（Zhaoら(2003) J Immunol 171:1312-1318に開示の配列など）または定常領域（Brown & Butler (1994) Molec Immunol 31:633-642に開示の配列など）をターゲッティングし得る。

【0192】

【化74】

配列番号5	GGCCAGACTTCCTCGGAACAGCTCAAAGAGCTCTGTCAAAGCCAGATCCC ATCACACGTGGGCACCAATAGGCCATGCCAGCCTCCAAGGGCCGAAC TGG GTCTCCACGGCGCACATGAAGCCTGCAGCCTGGCTTATCCTCTCCGTG GTGAAGAGGCAGGCCCGGGACTGGACGAGGGCTAGCAGGGTGTGGTAGG
-------	--

【0193】

【化75】

CACCTTGCGCCCCACCCCGGCAGGAACCAGAGACCCTGGGGCTGAGAG
 TGAGCCTCCAAACAGGATGCCCCACCCTTCAGGCCACCTTTCAATCCAGC
 TACACTCCACCTGCCATTCTCTCTGGGCACAGGGCCAGCCCTGGATC
 TTGGCCTTGGCTCGACTTGCACCCACGCGCACACACACTTCTAAACGT
 GCTGTCCGCTCACCCCTCCCAAGCGTGGTCCATGGGCAGCACGGCAGTGC
 GCGTCCGGCGGIAGTGAGTGCAGAGGTCCCTTCCCCTCCCCAGGAGCCC
 CAGGGGTGTGTGCAGATCTGGGGGCTCCTGTCCCTTACACCTTCATGCC
 CTCCCCTCATACCCACCCTCCAGGCGGGAGGCAGCGAGACCTTTGCCAG
 GGACTCAGCCAACGGGCACACGGGAGGCCAGCCCTCAGCAGCTGGCTCCC
 AAAGAGGAGGTGGGAGGTAGGTCCACAGCTGCCACAGAGAGAAACCCCTGA
 CGGACCCACAGGGGCCACGCCAGCCGGAACCAGCTCCCTCGTGGGTGAG
 CAATGGCCAGGGCCCGCCGGCCACCAAGGCTGGCCTTGGCCAGCTGAG
 AACTCAGTCCAGTGCAGGGAGACTCAAGACAGCCTGTGCACACAGCCTC
 GGATCTGTCTCCATTCAAGCAGAAAAAGGAAACCGTGCAGGCAGCCCTC
 AGCATTCAAGGATTGTAGCAGCGCCAATAATTCGTCCGCAAGTGGCCGA
 TTAGAATGACCGTGGAGAAGGGCGGAAGGGTCTCTCGTGGGCTCTGCGGC
 CAACAGGCCCTGGCTCCACTGCCCGTGCACGCCGAGGGGCTTGGGGC
 GAGCCAGGAACCACAGTGTCTACCGGGACCACAGTACTGACCAAACCTC
 CGGCCAGAGCAGCCCAAGGCCAGCCGGGCTCTCGCCCTGGAGGACTCACC
 ATCAGATGCACAAGGGGGCGAGTGTGAAGAGACGTGTGCCCGGGCCAT
 TTGGGAAGGGCAAGGGACCTTCCAGGTGGACAGGAGGTGGGACGCACTCC
 AGGCAAGGGACTGGGTCCCAAGGCCTGGGGAAGGGTACTGGCTTGGGG
 GTTAGCCTGGCCAGGGAACGGGAGCGGGGCGGGGGCTGAGCAGGGAGG
 ACCTGACCTCGTGGGAGCGAGGCAAGTCAAGCTTACAGCAGCAGCCGCAC
 ATCCAGACCAGGAGGCTGAGGCAAGGAGGGCTTGCAGCGGGCGGGGGC
 CTGCCTGGCTCCGGGGGCTCCTGGGGACGCTGGCTCTTGTTCGCTGTC
 CCGCAGCACAGGGCCAGCTCGCTGGGCCATGCTTACCTTGATGTCTGGG
 GCCGGGGCTCAGGTCGTCTCTCCTCAGGGGAGAGTCCCCTGAGGCTA
 CGGGTACAGACAGACAGGGGCCGGCCGAAAGGAGAAGTTGGGGCAGAGC
 CCGCCAGGGGCCAGGCCAAGGTTCTGTGTGCCAGGCCTGGGTGGGCAC
 ATTGTGTGGCCATGGCTACTTAGACGCGTGTCAAGGGCGAATTCCAGC
 AACTGGCGGCCCTTACTAGTggatccggcgccctaccggtagggg
 agggccttcccaaggcagcttgagcatgcgcttagcagccccgctg
 ggcacttggcgctacacaagtgcccttggcctcgcacacattccacatc
 cacggtagggcccaaccggctcctgttttggggcccccttgcgcccac
 ctctactctcccctagtcaggaaagttccccccgcccggcagctcggg
 tctgtaggagctgacaaatggaagtagcacgtctactagtctctgca
 gatggcagcaccgctgagcaatgggaagcggtaggccttggggcagcg
 gccaatagcagcttggctcctcgtctctggctcagagggctgggaag
 gggtagctccggggcgggctcagggcgggctcagggcggggcggcg
 cccgaaggtctccggaagcccggcattctgacgctcaaaagcgacg
 tctgcccgtgttctctctctctctcctcctcggccttgcactgca
 ccaatagggatcgccattgaacaagatggattgacgcaggttctcg
 gccgcttgggtgagaggctattcggctatgactggcacaacagacaat
 cggctgctctgagccgccgttccgctgtagcgcagggcgcccgg
 tcttttgaagaccgacctgtccgggtccctgaatgaactgcaggac
 gaggcagcgcggctatgtgctggccacgacggcgctcttgcgcagc
 tgtgtcagcttgcactgaagcgggaagggaactggctgctattggcg
 aagtccggggcaggatctctgtcatctcaccttgcctctgccgagaaa
 gtaaccatcattggctgagcaatcgccggctgatacagcttgcacggc
 tacctgccattcaccaccaagcgaacatcgatcgagcagcagcagta
 ctggatggaagccgcttctcaatcagagatctgacgaaagcagat
 cagggcctcgcagccgaactgctgcccagctcaaggcggcagctcc

10

20

30

【0194】

【化 7 6】

```

cgaaggcaggatcctcgtgaccatggcagcctgctgccgaata
tcatggtgaaaatgccccttctggattcactggtggccggctg
gggtggcggatcgtatcaggacatagcgtggctaccgtgatafge
tgaagagcttggcggcaatggcctgaccgcttctcgtgcttacgga
tcggcgtcccgattgcagcgcacgccttctatcgccttcttgacgag
tctctgaggggatcaatcTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGT
GTGATGGATATCTGCAGAATTCCGCCCTCCAGGCGTTGAAGTCGTGTGT
CCTCAGGTAAGAACGGCCCTCCAGGGCCITTAATTTCTGCTCTCGTCTGT
GGGCTTTTCTGACTCTGATCCTCGGGAGGGCTGTGTGCCCCCGGGGA
TGAGGCCGGCTTGCCAGGAGGGGTGAGGGACCAGGAGCCTGTGGGAAGTT
CTGACGGGGGCTGCAGGCGGGAAGGGCCCCACCGGGGGCGAGCCCCAGG
CCGCTGGGCGGCAGGAGACCCGTGAGAGTGCGCCTTGAGGAGGGTGTCTG
CGGAACCAACGAACGCCCGCGGGAAGGGCTTGTGCAATGCGGCTTTCAG
ACGGGAGGGCTCTTCTGCCCTCACCGTCTTTCAAGCCCTTGTTGGTCTGA
AAGAGCCATGTCCGAGAGAGAAGGGACAGGCCCTGTCCCGACCTGGCCGAG
AGCCGGGACGCCCGGGGGAGAGCGGGCGATCGCCCTGGGCTCTGTGAGG
CCAGGTCCAAGGGAGGACGTGTGGTCTCGTGACAGGTGCACTTGCAGAAA
CCTTAGAAGACGGGGTATGTTGGAAGCGCTCCTGATGTTAAGAAAAGG
GAGACTGTAAGGTGAGCAGAGTCTCAAGTGTGTTAAGTTTAAAGGTC
AAAGTGTTTTAAACCTTTGTGACTGCAGTTAGCAAGCGTGCGGGGAGTGA
ATGGGGTGCCAGGGTGGCCGAGAGGCAGTACGAGGGCCGTGCCGCTCT
AATTCAGGGCTTAGTTTTGCAGAATAAAGTCCGCCCTGTTTTCTAAAAGCA
TTGGTGGTGTGAGCTGGTGGAGGAGGCCGCGGGCACCCCTGGCCACCTG
CAGCAGGTGGCAGGAAGCAGGTCCGCCAAGAGGCTATTTAGGAAGCCAG
AAAAACCGGTCGATGAATTTATAGCTTCTGGTTTCCAGGAGGTGGTTGGG
CATGGCTTTGCGCAGCGCCACAGAACCAGAAAGTGGCCACTGAGAAAAAAC
AACTCTGCTTAATTTGCATTTTTCTAAAAGAAGAAACAGAGGCTGACGG
AAACTGGAAGGTTCTCTGTTTAACTACTCGAATTGAGTTTTCGGCTTAG
CTTATCAACTGCTCACTTAGATTCAATTTCAAAGTAAACGTTAAGAGCC
GAGGCATTCCTATCCTCTTTAAAGCGTTATTCCTGGAGGCTCATTACC
GCCAGCACCTCCGCTGCCCTGCAGGCATGTCTGCACCGTCAACCGTAGCGG
CGCGCACGATTTTCAAGTGGCCCGCTTCCCTCGTGATTAGGACAGACGC
GGGCACCTCGGCCAGCCGCTTGGCTCAGTATCTGCAGGCGTCCGCTCTC
GGGACGGAGCTCAGGGGAAGAGCGTGACTCCAGTTGAACGTGATAGTCGG
TGCGTGTAGAGGAGACCCAGTCGGGTGTGAGTCAAGAGGGGGCCGGGGC
CCGAGGCCCTGGGCAAGGACGGCCCGTCCCTGCATCACGGGCCAGCGTC
CTAGAGGCAGGACTCTGGTGGAGAGTGTGAGGGTGCCTGGGGCCCTCCG
GAGCTGGGGCCGTGCCGTGCAGGTTGGGCTCTCGGCGCGGTGTTGGCTGT
TTCTGCGGGATTGGAGGAATTTCTCCAGTGTGAGGAGTCCGCAAGTACC
GGGCACCAGGCTGGTAAGAGGGGAGGCCGCCGCTCGTGGCCAGAGCAGCTGG
GAGGGTTCGGTAAAAGGCTCGCCGTTTCCCTTAATGAGGACTTTTCTG
GAGGGCATTAGTCTAGTCGGGACCGTTTTTCGACTCGGGAAGAGGGATGC
GGAGGAGGGCATGTGCCAGGAGCCGAAGGCGCCGCGGGGAGAAGCCAG
GGCTCTCCTGTCCCCACAGAGGCGACGCCACTGCCGAGACAGACAGGGC
CTTTCCTCTGATGACGGCAAAGGGCGCTCGGCTCTTGGGGGTGCTGGG
GGGAGTCCGCCGAAGCCGCTCACCCAGAGGCTGAGGGGTGAGACTGA
CCGATGCCCTTGGCCGGGCTGGGGCCGACCGAGGGGACTCCGTGGA
GGCAGGGCGATGGTGCCTGCGGGAGGGAACCGACCCCTGGCCGAGCCCGG
CTTGGCGATTCCGGGGGAGGGCCCTCAGCCGAGGCGAGTGGTCCGGCG
GAACCAACCTTTCTGGCCAGCGCCACAGGGCTCTCGGGACTGTCCGGGGC
GACGCTGGGCTGCCCGTGGCAGGCCTGGGCTGACCTGACTTACCAGAC
AGAACAGGGCTTTCAGGGCTGAGCTGAGCCAGGTTAGCGAGGCCAAGTG
GGGCTGAACAGGCTCAACTGGCCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGACCT
GGGCTGAGCTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
GGACTGGCTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGGGCTGGGTTG
AGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGGGTTG

```

10

20

30

【 0 1 9 5 】

【化 7 7】

	<p>ATCTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGCTGAGCTGGGCTG AGCTGGTTTGGATTGGGTTGAGCTGAGCTGAGCTGGGCTGTGCTGGCTGA GCTAGGCTGAGCTAGGCTAGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGAGCTGAGCTAG GCTGGGCTGATTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGCTGAGCTGG CTGGGCTGGATTGAGCTGGCTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCT GGTTGAGCTGAGCTGGACTGGTTTGGCTGGGTCGATCTGGGTTGAGCT GTCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCT CAGCAGAGCTGGGTTGGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCT GGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGTGTT GAGCTGGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGATTGAGCTGGGTTGAGCT GAGCTGGGCTGGGCTGTGCTGACTGAGCTGGGCTGAGCTAGGCTGGGGTG AGCTGGGCTGAGCTGATCCGAGCTAGGCTGGGCTGGTTGGGCTGAGCTG AGCTGAGCTAGGCTGGATTGATCTGGCTGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGG GCTGAGCTGGTCTGAGCTGGCCTGGGTCGAGCTGAGCTGGACTGGTTTGA GCTGGGTCGATCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGTTGA GCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGGGCTGGGTTGAGCTGGGCT GAACTAGCCTAGCTAGGTTGGGCTGAGCTGGGCTGGTTTGGGCTGAGCTG AGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGAGCAGGCTGG GGTGGCTGAGCTAGGTTGGAGCTGAGCTGGGTCGAGCTGAGTTGGGCTGA GCTGGCCTGGGTTGAGGTTAGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGA GCTGGCTGGGCTGGTTTGGCTGGGTCAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG TTGAGCTGGGCTGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCCGACCTAGGCTGGG ATGAGCTGGGCTGATTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAG CAGGCTGAGCTGGGCTGGAGCCTGGCCTGGGGTGAGCTGGGCTGAGCTG CCTGGGTTAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCCGACCTAGGCTGGG GCTGGGCTGGGCTGGGATGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGAGCTGA GCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGG GTGAGCTGGGCTGAGCTAAGCTGAGCTGGGCTGGTTGGGCTGAGCTGGC TGAGCTGGGCTGCTGAGCTGGGCTGAGCTGACCAGGGTTGAGCTGGGCT TGAGTTAGGCTGGGCTCAGCTAGGCTGGGTTGATCTGGCAGGGCTGGTTT GGGCTGGGTCAGCTCCCGGAGATGGCCTGGGATGAGCTGGGCTGGGTTT GGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGCATTGAGCAGGCTGAGCTG GGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGAGCTGGGCTG AACTGGGTCAGCTGGCTGAGCTGGATCGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGG CCTGGGTTAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGG CTGGGCTGGTTTGGCTGGGTCAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGTTGAG CTGGGCTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGGGCTGAG CTGAGCTAGGCTGCATTGAGCTGGGCTGGGATGGATTGAGCTGGCTGAGCT GGCTGAGCTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTGGGTTGAGCTGGGCTGG GTTGAGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTCAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGA GCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGA GCTGGGTTGAGCTGGGCTCGAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTG AGCTGGGCTCAGCAGAGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTG AGCTAGCTGGGCTCAGCTAGGCTGGGTTGAGCTGAGCTGGGCTGAACTGG GCTGAGCTGGGCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGGGCTGAGCAGA GCTGGGCTGAGCAGAGCTGGGTTGGTCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGA GCTGGGCTGAGCAGAGTTGGGTTGAGCTGAGCTGGGTTGAGCTGGGCTGA GCTAGGCTGGGTTGAGCTGGGTTGAGTTGGGCTGAGCTGGGCTGGGTTGA GCGGAGCTGGGCTGAACTGGGCTGAGCTGGGCTGAGCGGAACTGGGTTGA TCTGAATTGAGCTGGGCTGAGCCGGGCTGAGCCGGGCTGAGCTGGGCTAG GTTGAGCTGGGTTGAGCTGGCTGAGCTGGCTGAGCTAGGTTGGGTTGA GCTAGGCTGGATTGAGCTGGGCTGAGCTGAGCTGATCTGGCCTCAGCTGG GCTGAGGTTAGGCTGAACTGGGCTGTGCTGGGCTGAGCTGAGCTGAGCCAG TTTGGCTGGGTTGAGCTGGGCTGAGCTGGGCTGTGTTGATCTTCTCTGA ACTGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGCCTAGCTGGATTGAACGGGGTAAAG CTGGGCCAGGCTGGACTGGGCTGAGCTGAGCTAGGCTGAGCTGAGTTGAA</p>	
--	---	--

10

20

30

【 0 1 9 6】

【化 7 8】

	<p>TTGGGTTAAGCTGGGCTGAGATGGGCTGAGCTGGGCTGAGCTGGGTTGAG CCAGGTCGGACTGGGTTACCCTGGGCCACACTGGGCTGAGCTGGGCGGAG CTCGATTAACCTGGTCAGGCTGAGTCGGGTCAGCAGACATGCGCTGGCC AGGCTGGCTTGACCTGGACACGTTTCGATGAGCTGCCTTGGGATGGTTAC CTCAGCTGAGCCAGGTGGCTCCAGCTGGGCTGAGCTGGTGACCCTGGGTG ACCTCGGTGACCAGGTTGCTCTGAGTCGGGCCAAGCCGAGGCTGCATCA GACTCCCGAGACCAAGGCCTGGGCCCGGCTGGCAAGCCAGGGGGGGTG AAGGCTGGGCTGGCAGGACTGTCCCGGAAGGAGGTGCAGTGGAGCCGCC CGGACCCCGACCCGAGGACCTGGAAAGACGCCCTCACTCCCTTTCTC TTCTGTCCCCTCTCGGGTCTCAGAGAGCCAGTCTGCCCGAATCTCTAC CCCCTCGTCTCCTGCGTCAGCCCCCGTCCGATGAGAGCCTGGTGGCCT GGGCTGCCTGGCCGGGACTTCTGCCAGCTCCGTCACCTTCTCTGGAA</p>	
--	--	--

40

(ブタ 鎖ターゲッティング)

本発明の特定の実施形態では、ブタ 鎖遺伝子座をターゲッティングするためのターゲッティングベクターを提供する。1つの特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の定常領域の3'および5'隣接配列の相同配列を含む5'および3'組換えアームを含み得る。ブタ免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の定

50

常領域が1つしか存在しないことが本発明で発見されたので、これにより、機能的ブタ軽鎖免疫グロブリンの発現が防止される。特定の実施形態では、ターゲッティングベクターは、定常領域の5'側のゲノム配列(任意選択的に、連結領域が含まれる)に相同な配列を含む5'組換えアームおよび定常領域の3'側のゲノム配列(任意選択的に、エンハンサー領域の少なくとも一部が含まれる)に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る(「定常ターゲッティング構築物」)(例えば、図2を参照のこと)。さらに、この定常ターゲッティング構築物はまた、5'組換えアーム配列と3'組換えアーム配列との間に存在する選択マーカー遺伝子を含み得る(例えば、配列番号20および図2を参照のこと)。他の実施形態では、ターゲッティングベクターは、ブタ軽鎖遺伝子座の連結領域の5'側のゲノム配列に相同な配列を含む5'組換えアームおよび連結領域の3'側のゲノム配列に相同な配列を含む3'組換えアームを含み得る。他の実施形態では、ターゲッティングベクターの5'アームには、配列番号12および/または配列番号25またはその任意の連続配列もしくはフラグメントが含まれ得る。別の実施形態では、ターゲッティングベクターの3'アームには、配列番号15、16、および/または19またはその任意の連続配列もしくはフラグメントが含まれ得る。

【0197】

さらなる実施形態では、ターゲッティングベクターには、以下の任意の配列が含まれ得るが、これらに限定されない：軽鎖のコード領域を、例えば、配列番号30の1~549および配列番号30の10026~10549に示すのに対して、軽鎖のイントロン配列を、例えば、配列番号30の550~10025に示し、連結領域を、例えば、配列番号30の5822~7207(例えば、J1：配列番号30の5822~5859、J2：配列番号30の6180~6218、J3：配列番号30の6486~6523、J4：配列番号30の6826~6863、J5：配列番号30の7170~7207)に示し、定常領域を、以下の残基に示す：配列番号30の10026~10549(Cエクソン)および配列番号30の10026~10354(Cコード)、配列番号30の10524~10529(ポリ(A)シグナル)、および配列番号30の11160~11264(SINEエレメント)、またはその任意のフラグメントもしくは組み合わせ。なおさらに、配列番号30の少なくとも約17、20、30、40、50、100、150、200、または300ヌクレオチドの任意の連続配列またはそのフラグメントおよび/もしくは組み合わせを、重鎖ターゲッティングベクターのターゲッティング配列として使用し得る。一般に、ターゲッティング構築物をデザインする場合、一方のターゲッティングアームは、他方のターゲッティングアームの5'側であると理解される。

【0198】

10

20

30

【化79】

配列番号20

```

ctcaaacgtaagtggctttccgactgattotttctgtttctaattgt
tggttgcttttggccaattttcagtgtrttcctcgaatagttgtcag
ggaccaaacaaaattgccttccagattaggaccaggaggaggacattgc
tgcattgggagaccagagggtggctaaattttaacggttccaagccaaaat
aaactggggaaggggcttctgtctctgtgagggtagggtttatagaagt
ggaaagttaagggaatcgtatggctcacttttgctcgggaccaaag
tggagcccaaaattgagtagcatttccatcaattatttggagattttg
tccctgtgtgtcattgtgcaagtittgacatttggttgaatgagcca
ttccaggggacccaaaaggatgagaccgaaaagtagaaaagagccaactt
ttaagctgagcagacagaccgaattgtgatttggaggagagtaggggt
tttagggagaagggggaacagatcgtggctttttctgaattagcct
tttcatgggactggcttcagaggggggtttttagagggaagtgttcta
gagccttaacttgggtgtgtcggtagcgggaccgaagctggaatcaa
acgtaagtgcacttttctactccttttcttatacgggtgtgaaat
tggggactttcattgttggagtagttaggtcagttctgaagagag
tgggactcaccaaaatctgaggagtagggcagaacagagttgtctc
atggaaagacaagacctagttgtagtaggcagctaaatgagtcagt
tgaacttgggacccaatggccagacttctgttaaccaacaactaatg
agatgtagcagcaaaaagagatttccattggggaaagtaaaattgta
ataattgtgatcacccttggtagggacatccgtggagattgaacgtaa
gtatttttctactactctcgaatttctctaaatgccagttgtac
tittagagcttaagtgtcagtttggaaaatgggtaaacagagcat
ttcattattatcagttcaaaagttaactcagctcaaaaatgaaat
ttgtagcaaaaagatttaattagccaaattgaatgattcaaggaaaa
aaaaattagtgtgatgaaaagggaattctacagctcaaaagcaaaa
ggcaattaatttcttgaactttccaaaactttgtaaatgattttgtt
ctttacaatttaaaaagggttagaagatttcttagtctgtttctc
tcttctgtgataaaattatataatagataaaaatgaaattaatagga
tgtctcaaaaatcagtagaagttagaaaatatgtttatgtaaaag

```

10

【0199】

20

【化 8 0】

```

ttgccacttaattgagaatcagaagcaatgttttttaagctctaaat
gagagataaactgtcaatactfaaattctcagagattclatacttgac
agatactctcttttcaaaatccaattctatggtagactaaattgaa
atgatctctcataatggaggaaagatggactgaccccaaaagctca
gatt* aagaaaacctgtttaag* gaaagaaaataaaagaactgcattt
ttaaggcccatgaattgtgaaaaataggaaatatttaataagfgta
ttctttattctctgttattacttgatgggttttataccgccaggga
ggcctggccacgctcagtgatctgtgaccccatggcggccttttcc
gcgattgaatgaccttggcgtgggtcccgaggcttggggcagcgca
ccagccgctaaaagccgctaaaaactgccgctaaaggccacagcaacccc
ggaccgcccttcaactgtgctgacacagtgatacagataatgtcgtca
acagaggagaatagaaatagacgggcacacgctaatgggggaaaagag
ggagaagcctgatttttttttagaattctagagataaaatcccag
tattatctcttttaaaaaatctctattaggagataaaagaattt
aaagctattttttaagtggggttaattcttccagtgctcttgcacaa
atggattaaagtaataagggcttaatacctcaaatgagagaaatagcgcata
acccttcaaggcaaaaagctacaagagcaaaattgaacacagcagccag
ccatctgaccactcagattttgatcagtttactgagttgaaagtaata
tcatgaaaggtaataatgtctgataaaaaaataagatacaggggtgacacat
cttaagttcagaatftaatggctcagtaggatatttccagctat
acaagatctaaagcagataaaaaatgcatatgaagaaactaataagaaa
tataatttaaatctctcattctgtgacagaaatttctaatctgggtc
tttaatacctacccttgaagagittagtaattgtctatttgcacatc
gctgtttactccaactaattcaaaagtgatacttgagaaagattatttt
tgggttcaaccacctggcaggaactatttgggccaatttaaacctt
ttcaactaagtaatttaactgttcaaacatttagggccttttaaaa
atcttttcaatgaattcaaaccttgtaaaagttatlaaggtgctggca
agaacttctatcaaatatgctlaatgtttaatctgtaatgcaggata
taaaattaaagtatcaaggcctgacccaaacaggagatctcatagca
tatttccctctcttttctagaattcatgatttgcctgccaaggct
attttataatctctggaaaaaataatgataaggttaaaagagaag
aaaaatcagaaactaagaattcggattttactaacgttggtaac
atgaagggtttattttaaggttctatcttataaaaaactgttcc
ctttctgtgatttccaagcaaaagattctgtattttttaaact
cttactctccacccaaggcctgaaatgcccaaaaaggggacttccagga
ggccactggcagctgctcaccgctcagaagtgaagccagccagttctcc
tgggcaaggtggcaaaaatfacagttgacccctctggctggtgacact
tgcctcatatggtagacccatctggccaggcccaaggtctccctctgaa
goccttgggaggagaggagagtgcttggcccacacagatcggaagg
ggctgactctcaaccgggtgacagactctgaggggtggtctgggcca
acacacccaaagcagcccaaggaaggaaggcagcttggatcactgccc
agagctaggagagaccgggaaaatgactgtccaagaccgttcttgc
ttctaaactccgaggggtcagaatgaaggtgttttcttggcctgaa
gcalctgttccctgcaagaagcggggaacacagaggaaggagagaaaag
atgaactgaacaaagcatgcaaggcaaaaaaggGGGTCTAGCCGCGGTCT
AGGAAGCTTTCTAGGGTACCTCTAGGGATCCC GGCGCCCTACCGGTA
GGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCC
GCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCA
CATCCACCGGTAGGGGCCAACC GGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTCGCG
CCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAAGTCCCCCCCCGCCCGCAGCT
CGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCG
TGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCCTTGGGGC
AGGGGCCAATAGCAGCTTTGGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGG
GAAGGGGTGGGTCCGGGGGGCGGCTCAGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGCGG
GGCGCCGAAGGTCTCCGGGAAGCCCGGCATTCTGCACGTCTCAAAAAGCG
CACGTCTGCCGCGCTGTCTCTCTCTCATCTCCGGGCCCTTTCGACCT

```

10

20

30

【 0 2 0 0】

【化 8 1】

	<p>GCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTC TCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGA CAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTCCGGCTGTACGGCAGGGGGCGC CCGGTTCITTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACCTGCA GGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGGC CAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTG GGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTACCTTGTCTCTGCCGA GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATC CGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA CGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTGTCAATCAGGATGATCTGGACGAAGA GCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCCGCGA TGCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGTTCGG AATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCG GCTGGGTGTGGCGGATCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATA TTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTAC GGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCCGCTTCTTGA CGAGTCTTCTGAGGGATCAATTCTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGGTGCCT TCCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCCTTTCCTAATAAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT GCTGGGGATGCGGTGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTG GGGGCGGCCCTcagcgccgccagtgatgatgatactcagaattc gcccttgatcaaacacgcatcctcatggacaatagtggggtcttagc ctgctgagacacaacaggaactccctggcaccattagggccagaga aacagcacagataaaattccctgccctcatgaagcttagctagctgg ggagatcatagcagaataaacacatacaaatcatcatcttaggtaa taataataactaaggagaaaattacaggggagaaaggagcagaattgc taggtaggattataagttcagatagttcatcaggaacactgtgtctgag aagataacattaggtaaacaccgaaagtagtaaggaaatggaccgtgtgc ctaagtgaggtagaccattctagcagcaggaacacgagtaaaagcactg aggtagggtgtcactgcacagagttgtcactgcacagagttgtgtggg agggttaggtctgcaggtcttatggtcacaggaagaattgtttactc ccaccgagatgaaggtgtgtgattttgacagaaagaataatctgctg gtttatataaacaggattccctgggtgtctgtgatgagaataatctgtc agggggtggataggagagatagcgaataggccttgctaggagccc acgacaataatccaagtgaaggtgtgtctgattgaaagcaggactaa caagacctgtgacagtgatgtagaanaagatagggagacgaaggt gcactagggtttctgctgaggaattagaagataaaagctaaagctta tagaagatgcagcgtctgggagaaagaccagcagctcagtttgatcc atctggaaatatttggcataaagtagggtatgtgggttaacattat ttgttttttttccatgtagctatc caactgtcccagcatcattat tttaaagacttcttccttccctattggattttggcaccctcactga agatcaactgagcataaaattgggtctatttctaagctcttgattccatt ccatgacctattgttcatcttacccttagacactgectgatgatt aaagcccctgttaccatgtctgtttggacatgglaaatctgagatgcct aitagccaaccaagcaagcagcggcccttagagctagatagagacct ggaatcagacgagaaaggtcagctcagacatacatgtatgaccatc accatcggatgggttaaaagccaactcagactgcaacagactgtgagagg gtaccaagctagagcattgatagagaaccacagcactgagctgggag gtgctctacattaagagattagtagatgaaggactgagaagattgac agagaagaagaaatcaggaaatgggtctgtcttgaatccaaggga agagatgttccaaagaggagaaactgacagttgtcagctagctcaat tgggatgaaatggaccattggacagaggatgtaggggtcatgggtga atagataagcagctctatagaatggcaggggcaaaattctcatctga tcggcatgggtctaaagaaaacgggaagaaaaattgagtcagacca</p>
--	--

10

20

30

【 0 2 0 1 】

【化 8 2】

	<p>gtccctcaagtagagagggtgaaaagggaaggagaaaatgagccacg acaacatgaga gaaatgacagcatttttaaaatfttttattttta tttattttttgctttttagggtgccctgcaacatgagggttcc cagggttaggggtc taatcagagctatagctccagcctacaccacagcca tagcaatgccagatclacatgacctacaccagctcacagcaacgccgg atcottaaccactgagtgaggccagagatcaaacccatcttatgga tactagtcagggttaccactgagccaaatgggaaatcctgagtaat gacagcatttttaatgtgccaggaagcaaaactggcccccgaatgt ctctcaggcatgtgattttttagctgaaacgattaaggcccaaaa acacaagaagaatgtggaccttcccccaacagcctaataaaittagtt gaggccctgttcccaaatagagctattgocagactgtctacagaggct aaggctaggtgtgtgggaaacctcagagatcagaggcagcttatg taccagaitgacatttccatctccatgcaatggccttctccctct gtgccccaaaccaccccccaaatcttcttcttctttagctgaaga tgggttgaaggtagatgttcagccacttggcagttcctcagttgt ctggcttctccctc Tgatccacattatcagctgtgttgatttctc tgtttatctctcatggcacccttctctcttagaccagcccaaaaga acctagaagagtgaaaggaaaatttccaccctgacaatgctaataga gaatcaccgcagtagaggaaaatgacttggctcgggagatagaagag aaaatcgtggagagatgtcactgagtagtgagatggaaaagggtgac acaggtggaggtgttccctcagctaggaagacagacagttcacagaaga gaaaggggtgtccgtggacatcttccctcatgaggaaccgaggct aagaaagactgcaaaagaaggtaaaggattgcagagaggtcgtccatga ctaaaaacagtaaccaccccccaaccacatgttttctcttagcttgg cacgtggcaggtactgttaggtttcaatattgtgttgaacagta cctattaggcctccatccccctcctaactaacaagaatgtgagactg gtcagtgaaaaatggcttcttctctatgaaatcttctcaagaagatac ataactttttatcatagcgtgaaagcaaatgagaacaacgcctc caacctatgacaccgtaacaaaatgtttatgatcagtgaaaggcaagaa caaaacatacacagtaaaagacctccataatattgtgggtgcccaaac aggccagggtgtaaaagcttttattcttttagataggaatgtagatgaa tgtttcaacctggacagagatcagctgactgaatcttccaaaatca tgggtagttgaaftataagaaaataagacttaggataaatactttgic caagatcccagagttaatgccaatcagttttcagactccagggcagct gatcaagagcctaaactttaaagacacagtccttaataactactattca cagttgcacttccaggcgcacaagactcattgaatcacaatagaatga gttagatatacaaatctctcagtaataagtaggagactaaatagccggc atgacctggctacttaagacaagaatgagattcaaggctagtgtcttt ctacctgtttttctacaagaatgtagcaatgcgctaattacagacctc tcagggaaggaa</p>
--	---

10

20

(ブタ 鎖ターゲットイング)

本発明の特定の実施形態では、ブタ重鎖遺伝子座をターゲットイングするためのターゲッティングベクターを提供する。1つの実施形態では、 を、最初のJ Cクラスターの5'側に存在する配列を含む5'アームおよび最後のJ Cクラスターの3'側の配列を含む3'アームを含むターゲットイング構築物をデザインし、それにより、 遺伝子座の機能的発現を防止することによってターゲットイングし得る(図3~4を参照のこと)。1つの実施形態では、ターゲットイングベクターは、配列番号28の任意の連続配列(連続配列の約17、20、30、40、50、75、100、200、300、または5000ヌクレオチドなど)またはそのフラグメントを含み得る。1つの実施形態では、5'ターゲットイングアームは、配列番号32(ブタ 軽鎖ゲノム配列の最初の J/C領域の5'隣接配列または任意の連続配列(連続配列の約17、20、30、40、50、75、100、200、300、または5000ヌクレオチドなど)またはそのフラグメントが含まれる)を含み得る(例えば、図5も参照のこと)。別の実施形態では、3'ターゲットイングアームは、1つ以上の以下を含み得るが、これらに限定されない:配列番号33(ブタ 軽鎖ゲノム配列のJ/Cクラスターの3'隣接配列(J/Cの約200塩基対下流から)を含む);配列番号34(ブタ 軽鎖ゲノム配列のJ/Cクラスターの3'隣接配列(J/Cクラスターの約11.8Kb下流でエンハンサー付近)を含む);配列番号35(エンハンサーを含め、 の約12Kb下流を含む);配列番号36(の約17.6Kb下流を含む);配列番号37(の約19.1Kb下流を含む);配列番号38(の約21.3Kb下流を含む);配列番号39(の約27Kb下流を含む)、または配列番号32~39の任意の連続配列(連続配列の約17、20、30、40、50、75、100、200、300、または5000ヌクレオチドなど)またはそのフラグメント(例えば、図6も参照のこと)。一般に、ターゲットイング構築物をデザインする場合、一方のターゲットイングアームは、他方のターゲットイングアームの5'側であると理解される。

30

40

50

【0202】

さらなる実施形態では、遺伝子座のためのターゲッティング構築物は、部位特異的組換え部位（例えば、loxなど）を含み得る。1つの実施形態では、ターゲッティングアームは、ターゲッティングされた領域内に部位特異的リコンビナーゼ部位を挿入し得る。次いで、2つの部位特異的リコンビナーゼ部位間の介在ヌクレオチド配列が切り出されるように、部位特異的リコンビナーゼを活性化し、そして/または細胞に適用し得る（例えば、図6を参照のこと）。

【0203】

（選択マーカー遺伝子）

内因性標的免疫グロブリン遺伝子を改変するようにDNA構築物をデザインし得る。構築物のターゲッティングのための相同配列は、1つ以上の欠失、挿入、置換、またはその組み合わせを有し得る。標的遺伝子上流配列を有する読み取り枠中に融合された選択マーカー遺伝子の挿入によって変化させることができる。

10

【0204】

適切な選択マーカー遺伝子には、以下が含まれるが、これらに限定されない：一定の培地基質で成長する能力を付与する遺伝子（HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）で成長する能力を付与するtk遺伝子（チミジンキナーゼ）またはhprt遺伝子（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ）など）；MAX培地（マイコフェノール酸、アデニン、およびキサンチン）で成長可能な細菌gpt遺伝子（グアニン/キサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ）。例えば、Song, K-Y, ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 84: 6820-6824 (1987)；Sambrook, J., ら、Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Chapter 16。選択マーカーの他の例には、以下が含まれる：抗生物質などの化合物に対する耐性を付与する遺伝子、選択された基質で成長する能力を付与する遺伝子、発光体などの検出可能なシグナルを発するタンパク質（緑色蛍光タンパク質、増強緑色蛍光タンパク質（eGFP）など）をコードする遺伝子。広範な種々のこのようなマーカーが公知かつ利用可能であり、例えば、以下が含まれる：ネオマイシン耐性遺伝子（neo）（Southern, P., およびP. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341 (1982)）およびハイグロマイシン耐性遺伝子（hyg）（Nucleic Acids Research 11: 6895-6911 (1983)）およびTe Riele, H., ら、Nature 348: 649-651 (1990)）などの抗生物質耐性遺伝子。他の選択マーカー遺伝子には、以下が含まれる：アセトヒドロキシ酸合成酵素（AHS）、アルカリホスファターゼ（AP）、ガラクトシダーゼ（LacZ）、グルクロニダーゼ（-glucoronidase）（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノパリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）、およびその誘導体。アンピシリン、プレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、フォスフィノスリシン、ピューロマイシ、およびテトラサイクリンに対する耐性を付与する複数の選択マーカーが利用可能である。

20

30

40

【0205】

抗生物質耐性遺伝子およびネガティブ選択因子の組込み方法は、当業者によく知られている（例えば、WO99/15650；米国特許第6,080,576号；米国特許第6,136,566号；Niwaら、J. Biochem. 113: 343-349 (1993)；およびYoshidaら、Transgenic Research 4: 277-287 (1995)を参照のこと）。

50

【0206】

選択マーカーの組み合わせも使用し得る。例えば、免疫グロブリン遺伝子をターゲッティングするために、neo遺伝子（上記考察のように、それ自体のプロモーターを含むか含まない）を、免疫グロブリン遺伝子に相同なDNA配列にクローン化し得る。マーカーの組み合わせを使用するために、ターゲッティングDNAの外側に存在するようにHSV-tk遺伝子をクローン化し得る（必要に応じて、別の選択マーカーを、反対側に隣接させて配置し得る）。ターゲッティングすべき細胞へのDNA構築物の導入後、細胞を、適切な抗生物質について選択し得る。この特定の例では、G418およびガンシクロビルに耐性を示す細胞は、相同組換えによって生じた可能性が最も高く、この相同組換えにおいて、neo遺伝子は免疫グロブリン遺伝子に組み込まれたが、二重交差領域の外側に存在するので、tk遺伝子は喪失している。

10

【0207】

欠失は、少なくとも約50bp、より通常には、少なくとも約100bp、一般に、多くて20kbpであり得る。欠失には、通常、コード領域の少なくとも一部（1つ以上のエクソンの一部、1つ以上のイントロンの一部が含まれる）を含むことができ、隣接非コード領域の一部（特に、5'非コード領域（転写調節領域））を含んでも含まなくてもよい。したがって、相同領域は、コード領域を超えて5'非コード領域まで伸長するか、3'非コード領域まで伸長し得る。挿入は、一般に、10kbpを超えず、通常、5kbpを超えず、一般に、少なくとも50bp、より通常には少なくとも200bpであり得る。

20

【0208】

相同性領域は変異を含むことができ、フレームシフトが起こるか重要なアミノ酸が変化する場合に変異によって標的遺伝子をさらに不活化し得るか、変異によって機能障害性対立遺伝子などを修復し得る。変異は、わずかな変化であり得るが、相補性隣接配列の約5%を超えない。遺伝子の変異が望ましい場合、マーカー遺伝子を、イントロンまたはエクソンに挿入し得る。

【0209】

当該分野で公知の方法にしたがって構築物を調製することができ、種々のフラグメントを、接合し、適切なベクターに導入し、クローン化し、分析し、次いで、所望の構築物が得られるまでさらに改変する。制限分析、切り出し、プローブの同定などのために、配列に種々の改変を行うことができる。必要に応じて、サイレント変異を導入し得る。種々の段階で、制限分析、配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応を用いた増幅、プライマー修復、インビトロ変異誘発などを使用し得る。

30

【0210】

細菌ベクター（原核生物複製系（例えば、大腸菌によって認識可能な複製起点）が含まれる）を使用して構築物を調製することができ、各段階で、構築物をクローン化し、分析し得る。マーカー（挿入で使用されるマーカーと同一か異なる）を使用することができ、これを、標的細胞への導入前に除去し得る。一旦構築物を含むベクターが完成すると、これを、細菌配列の欠失、線状化、相同配列の短い欠失などによってさらに改変し得る。最後の改変後、構築物を細胞に導入し得る。

40

【0211】

本発明は、さらに、免疫グロブリン遺伝子配列を含む組換え構築物を含む。構築物は、順方向または逆方向で本発明の配列が挿入されているベクター（プラスミドベクターまたはウイルスベクターなど）を含む。構築物は、配列に作動可能に連結された調節配列（例えば、プロモーターが含まれる）も含み得る。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、かつ市販されている。例として、以下のベクターを示す。細菌：pBs、pQE-9（Qiagen）、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a（Stratagene）；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRTT5（Pharmacia）。真核生物：pWLnco、

50

pSv2cat、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)pSVK3、
 pBPv、pMSG、pSVL(Pharmacia)、ウイルス起源のベクター(M
 13ベクター、細菌ファージ1ベクター、アデノウイルスベクター、およびレトロウイル
 スベクター)、高、低、および調整可能なコピー数のベクター、1つの宿主と組み合わせ
 て使用するための適合性レプリコンを有するベクター(pACYC184およびpBR3
 22)、および真核生物エピソーム複製ベクター(pCDM8)。他のベクターには、p
 cDNA II、pSL301、pSE280、pSE380、pSE420、pTrc
 HisA、B、およびC、pRSET A、B、およびC(Invitrogen, Co
 rp.)、pGEMEX-1、およびpGEMEX-2(Promega, Inc.)、
 pETベクター(Novagen, Inc.)、pTrc99A、pKK223-3、p
 GEXベクター、pEZZ18、pRIT2T、およびpMC1871(Pharmac
 ia, Inc.)、pKK233-2およびpKK388-1(Clontech, Inc
 .)、およびpProEx-HT(Invitrogen, Corp.)などの原核生
 物発現ベクターならびにその変異形および誘導体が含まれる。他のベクターには、pFa
 stBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV、およびpT
 et-Splice(Invitrogen)、pEUK-C1、pPUR、pMAM、
 pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA、およびp
 YACneo(Clontech)、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、
 およびpKK232-8(Pharmacia, Inc.)、p3'SS、pXT1、p
 SG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、およびpOG44(Stratag
 ene, Inc.)、およびpYES2、pAC360、pBlueBacHis A、
 B、およびC、pVL1392、pBlueBacIII、pCDM8、pcDNA1、
 pZeoSV、pcDNA3 pREP4、pCEP4、およびpEBVHis(Inv
 itrogen, Corp.)などの真核生物発現ベクターおよびその変異形または誘導
 体が含まれる。使用し得るさらなるベクターには、以下が含まれ得る:pUC18、pU
 C19、pBlueScript、pSPORT、コスミド、ファージミド、YAC(酵
 母人工染色体)、BAC(細菌人工染色体)、P1(大腸菌ファージ)、pQE70、p
 QE60、pQE9(quagan)、pBSベクター、PhageScriptベクタ
 ー、BlueScriptベクター、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH
 46A(Stratagene)、pcDNA3(Invitrogen)、pGEX、
 pTrsfus、pTrc99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK
 233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)、pSPORT1、pS
 PORT2、pCMVSPORT2.0、およびpSV-SPORT1(Invitro
 gen)、pTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcH
 is2、pRSET、pBlueBacHis2、pcDNA3.1/His、pcDN
 A3.1(-)/Myc-His、pSecTag、pEBVHis、pPIC9K、p
 PIC3.5K、pAO815、pPICZ、pPICZ、pGAPZ、pGAPZ
 、pBlueBac4.5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRe
 p5、pSinHis、pIND、pIND(SP1)、pVgRXXR、pcDNA2.
 1、pYES2、pZerO1.1、pZerO-2.1、pCR-Blunt、pSE
 280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、
 pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pcDNA3.1、pcDNA3.1/
 Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/RSV、pREP4、pREP7
 、pREP8、pREP9、pREP10、pCEP4、pEBVHis、pCR3.1
 、pCR2.1、pCR3.1-Uni、およびpCRBac(Invitrogen)
 ; ExCell、gtl1、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1 T
 、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pG
 EX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、pGEX
 -5X-3、pEZZ18、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、p
 MSG、pCH110、pKK232-8、pSL1180、pNEO、およびpUC4

10

20

30

40

50

K (Pharmacia); pSCREEN-1b(+), pT7Blue(R), pT7Blue-2, pCITE-4abc(+), pOCUS-2, pTAG, pET-32LIC, pET-30LIC, pBAC-2cp LIC, pBACgus-2cp LIC, pT7Blue-2 LIC, pT7Blue-2, SCREEN-1, BlueSTAR, pET-3abcd, pET-7abc, pET9abcd, pET11abcd, pET12abc, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b-pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21abcd(+), pET-22b(+), pET-23abcd(+), pET-24abcd(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28abc(+), pET-29abc(+), pET-30abc(+), pET-31b(+), pET-32abc(+), pET-33b(+), pBAC-1, pBACgus-1, pBAC4x-1, pBACgus4x-1, pBAC-3cp, pBACgus-2cp, pBACsurf-1, plg, Signal plg, pYX, Selecta Vecta-Neo, Selecta Vecta-Hyg, および Selecta Vecta-Gpt(Novagen); pLexA, pB42AD, pGBT9, pAS2-1, pGAD424, pACT2, pGADGL, pGADGH, pGAD10, pGilda, pEZM3, pEGFP, pEGFP-1, pEGFP-N, pEGFP-C, pEBFP, pGFPUV, pGFP, p6xHis-GFP, pSEAP2-Basic, pSEAP2-Contral, pSEAP2-Promoter, pSEAP2-Enhancer, pgal-Basic, pgal-Control, pgal-Promoter, pgal-Enhancer, pCMV, pTet-Off, pTet-On, pTK-Hyg, pRetro-Off, pRetro-On, pIRES1neo, pIRES1hyg, pLXSN, pLNCX, pLAPSN, pMAMneo, pMAMneo-CAT, pMAMneo-LUC, pPUR, pSV2neo, pYEX4T-1/2/3, pYEX-S1, pBacPAK-His, pBacPAK8/9, pAcUW31, BacPAK6, pTriplex, gt10, gt11, pWE15, および Triplex(Clontech); Lambda ZAP II, pBK-CMV, pBK-RSV, pBluescript IISK +/-, pBluescript IISK +/-, pAD-GAL4, pBD-GAL4 Cam, pSurfscrip, Lambda FIX II, Lambda DASH, Lambda EMBL3, Lambda EMBL4, SuperCos, pCR-Scrip Amp, pCR-Scrip Cam, pCR-Scrip Direct, pBS +/-, pBC KSK +/-, pBC SK +/-, Phagescrip, pCAL-n-EK, pCAL-n, pCAL-c, pCAL-kc, pET-3abcd, pET-11abcd, pSPUTK, pESP-1, pCMVLacI, pOPRSVI/MCS, pOPI3 CAT, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMC1neo, pMC1neo Poly A, pOG44, pOG45, pFRT GAL, pNEO GAL, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pRS413, pRS414, pRS415, および pRS416(Stratagene) およびその変異形または誘導体。以下のツーハイブリッドベクターおよび逆ツーハイブリッドベクターも使用し得る: 例えば、pPC86, pDBLeu, pDBTrp, pPC97, p2.5, pGAD1-3, pGAD10, pAct, pACT2, pGADGL, pGADGH, pAS2-1, pGAD424, pGBT8, pGBT9, pGAD-GAL4, pLexA, pBD-GAL4, pHis, pHis-1, placZi, pB42AD, pDG202, pJK202, pJG4-5, pNLexA, pYESTrp, およびその変異形または誘導体。宿主中で複製および生存が可能である限り、任意の他のプラスミドおよびベクターを使用し得る。

【0212】

DNA構築物を宿主に入れるために使用し得る技術には、例えば、リン酸カルシウムノ

DNA共沈、核へのDNAの微量注入、エレクトロポレーション、インタクトな細胞の細菌プロトプラスト融合、トランスフェクション、または当業者に公知の任意の他の技術が含まれる。DNAは、一本鎖もしくは二本鎖、線状もしくは環状、弛緩 (relaxed) 状、またはスーパーコイル状であり得る。哺乳動物細胞の種々のトランスフェクション技術については、例えば、Keownら、Methods in Enzymology Vol. 185, 527-537頁(1990)を参照のこと。

【0213】

1つの特定の実施形態では、ヘテロ接合性またはホモ接合性のノックアウト細胞を、同遺伝子系DNAから単離した免疫グロブリン遺伝子配列を含むノックアウトベクターへの初代胎児線維芽細胞のトランスフェクションによって生成し得る。別の実施形態では、ベクターを、例えば、IRES (内部リボソーム侵入部位) を使用したプロモーター補足ストラテジーに組み込んで、Neor遺伝子の翻訳を開始させることができる。

10

【0214】

(部位特異的リコンビナーゼ)

さらなる実施形態では、ターゲティング構築物は、部位特異的リコンビナーゼ (例えば、lox) を含み得る。1つの実施形態では、ターゲティングアームは、一方の部位特異的リコンビナーゼ標的部位が第2の部位特異的リコンビナーゼ標的部位の5'側に存在するように、ターゲティングされた領域に部位特異的リコンビナーゼ標的部位を挿入し得る。次いで、2つの部位特異的リコンビナーゼ部位間の介在ヌクレオチド配列が切り出されるように、部位特異的リコンビナーゼ部位を活性化し、そして/または細胞に適用し得る。

20

【0215】

部位特異的リコンビナーゼには、短い核酸部位または配列特異的標的部位 (すなわち、リコンビナーゼ認識部位) を認識して結合し、これらの部位に関連する核酸の組換えを触媒する酵素またはリコンビナーゼが含まれる。これらの酵素には、リコンビナーゼ、トランスポサゼ、およびインテグラーゼが含まれる。配列特異的リコンビナーゼ標的部位の例には、lox部位、att部位、dif部位、およびfRT部位が含まれるが、これらに限定されない。部位特異的リコンビナーゼの限定しない例には、バクテリオファージP1 Cre リコンビナーゼ、酵母FLPリコンビナーゼ、IntI インテグラーゼ、バクテリオファージ 80、P22、P2、186、およびP4リコンビナーゼ、Tn3 リゾルベース、Hinリコンビナーゼ、およびCinリコンビナーゼ、大腸菌xerCおよびxerDリコンビナーゼ、パチルス・チューリングゲンシスリコンビナーゼ、TpnI およびラクタマーゼトランスポゾン、および免疫グロブリンリコンビナーゼが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0216】

1つの実施形態では、組換え部位は、バクテリオファージP1のCreリコンビナーゼによって認識されるlox部位であり得る。lox部位は、バクテリオファージP1のcre遺伝子産物 (Creリコンビナーゼ) が部位特異的組換え事象を触媒し得るヌクレオチド配列をいう。種々のlox部位が当該分野で公知であり、天然に存在するloxP、loxB、loxLおよびloxR、ならびに多数の変異体または変異形、lox部位 (loxP511、loxP514、lox.DELTA.86、lox.DELTA.117、loxC2、loxP2、loxP3、およびloxP23など) が含まれる。lox部位のさらなる例には、loxB、loxL、loxR、loxP、loxP3、loxP23、lox86、lox117、loxP511、およびloxC2が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0217】

別の実施形態では、組換え部位は、Cre以外のリコンビナーゼによって認識される組換え部位である。1つの実施形態では、リコンビナーゼ部位は、酵母の2プラスミドのFLPリコンビナーゼによって認識されるFRT部位であり得る。FRT部位は、酵母2ミクロンプラスミドのFLP遺伝子産物 (FLPリコンビナーゼ) が部位特異的組換えを

50

触媒し得るヌクレオチド配列をいう。非Creリコンビナーゼのさらなる例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：部位特異的リコンビナーゼには以下が含まれる：バクテリオファージのIntリコンビナーゼによって認識されるatt部位（例えば、att1、att2、att3、attP、attB、attL、およびattR）、レゾルバーゼファミリーによって認識される組換え部位、パチルス・チューリングシスのトランスポサーゼによって認識される組換え部位。

【0218】

本発明の特定の実施形態では、ターゲッティング構築物は、本明細書中に記載のブタ免疫グロブリン遺伝子に相同な配列、選択マーカー、および/または部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含み得る。

10

【0219】

（相同組換え細胞の選択）

次いで、細胞を、適切に選択した培地中で成長させて、適切に組み込まれた細胞を同定し得る。免疫グロブリン遺伝子に挿入された選択マーカー遺伝子が存在すれば、宿主ゲノムに標的構築物が組み込まれている。次いで、所望の表現型を示す細胞を、制限分析、電気泳動、サザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応などによってさらに分析して、相同組換えまたは非相同組換えが起こっているかどうかを確認するためにDNAを分析し得る。挿入用プローブの使用およびその後の構築物の隣接領域を超えて伸長した免疫グロブリン遺伝子の存在についてのインサートに隣接する5'および3'領域の配列決定、または欠失が導入された場合の欠失の存在の同定によってこれを決定し得る。構築物内の配列に相補的なプライマーおよび構築物の外側かつ標的遺伝子座中の配列に相補的なプライマーを使用することもできる。この方法では、相同組換えが起こった場合に相補鎖中に存在する両プライマーを有するDNA二重鎖のみを得ることができる。プライマー配列または予想されるサイズの配列の存在の証明により、相同組換えが起こったことが支持される。

20

【0220】

相同組換え事象のスクリーニングのために使用したポリメラーゼ連鎖反応は、当該分野で公知であり、例えば、KimおよびSmithies, *Nucleic Acids Res.* 16: 8887-8903, 1988; および Joynerら、*Nature* 338: 153-156, 1989を参照のこと。ネオマイシン遺伝子を駆動するための変異ポリメラーゼエンハンサーとチミジンキナーゼプロモーターとの特定の組み合わせは、胚性幹細胞およびEC細胞の両方で活性であることが以下によって示されている：ThomasおよびCapecchi, (上記), 1987; NicholasおよびBerg (1983) in *Teratocarcinoma Stem Cell*, eds. Siver, MartinおよびStrickland (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. (469-497頁); ならびにLinneyおよびDonerly, *Cell* 35: 693-699, 1983。

30

【0221】

第1ラウンドのターゲッティングから得た細胞株はターゲッティングされた対立遺伝子にヘテロ接合性を示す可能性が高い。両対立遺伝子が改変されているホモ接合性を、多数の方法で実現し得る。1つのアプローチは、1つのコピーが改変された多数の細胞を増殖させ、その後これら細胞を異なる選択マーカーを使用した別ラウンドのターゲッティングに供することである。あるいは、伝統的なメンデル遺伝学による改変された対立遺伝子にヘテロ接合性を示す動物の交配によってホモ接合性を得ることができる。いくつかの状況では、2つの異なる改変された対立遺伝子を有することが望ましい。連続した遺伝子ターゲッティングまたはヘテロ接合体（それぞれ、所望の改変された対立遺伝子の1つを保有する）の交配によってこれを行うことができる。

40

【0222】

（相同組換えされた細胞の同定）

1つの実施形態では、選択方法は、相同組換えによる免疫グロブリン遺伝子のターゲッ

50

ティングされたノックアウトまたは非機能的もしくは非発現免疫グロブリンが得られる遺伝子変異のいずれかによって免疫グロブリン遺伝子の枯渇を直接検出し得る。スクリーニングのために、抗生物質耐性による選択が最も一般的に使用されている(上記)。この方法により、ターゲティングベクター上の耐性遺伝子の存在を検出し得るが、組み込みがターゲティングされた組換え事象または無作為な組み込みのいずれであるのかは直接示されない。一定のテクノロジー(ポリAおよびプロモーター捕捉テクノロジーなど)により、事象がターゲティングされる確率が高くなるが、所望の表現型(免疫グロブリン遺伝子発現が欠損した細胞)が得られた証拠は直接与えられない。さらに、負の選択形態を使用して、ターゲティングされた組み込みを選択することができ、これらの場合、ターゲティングされた事象のみによって細胞の死滅が回避されるような方法において細胞に致命的な因子の遺伝子が挿入される。次いで、これらの方法によって選択された細胞を、遺伝子破壊、ベクター組み込み、最後に、免疫グロブリン遺伝子の枯渇についてアッセイし得る。これらの場合、選択がターゲティングベクター組み込みの検出に基づくが、表現型の変化には基づかないので、ターゲティングされたノックアウトのみを検出することができ、点変異、遺伝子再配列もしくは短縮、または他のこのような改変を検出できない。

10

20

30

40

50

【0223】

機能的免疫グロブリン遺伝子の発現を欠くと考えられる動物細胞を、さらに特徴づけることができる。このような特徴付けを、以下の技術によって行うことができる: PCR分析、サザンプロット分析、ノーザンプロット分析、特異的レクチン結合アッセイ、および/または配列決定分析が含まれるが、これらに限定されない。

【0224】

当該分野で説明されているPCR分析を使用して、ターゲティングベクターの組み込みを決定し得る。1つの実施形態では、アンプリマーは、抗生物質耐性遺伝子に由来し、ベクター配列の外側の領域に伸長し得る。サザン分析を使用して、遺伝子座の巨視的改変(免疫グロブリン遺伝子座へのターゲティングベクターの組み込みなど)を特徴づけることもできる。それに対して、ノーザンプロットを使用して、各対立遺伝子から生成された転写物を特徴づけることができる。

【0225】

さらに、RNA転写物から生成されたcDNAの配列決定分析を使用して、免疫グロブリン対立遺伝子の任意の変異の正確な位置を決定することもできる。

【0226】

本発明の別の局面では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子座の機能的領域の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く有蹄動物細胞を提供する。相同組換えの結果としてこれらの細胞を得ることができる。特に、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子の不活化により、ブタ抗体の発現能力が減少した細胞を生成し得る。他の実施形態では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の両方の対立遺伝子を欠く哺乳動物細胞を、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成し得る。さらなる実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した遺伝子ターゲティング事象によって、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子が不活化されたブタ動物を提供する。本発明の別の局面では、遺伝子ターゲティング事象によって、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の両方の対立遺伝子が不活化されたブタ動物を提供する。相同組換えによって遺伝子をターゲティングし得る。他の実施形態では、遺伝子を破壊し(すなわち、遺伝コードの一部を変化させることができる)、それにより、その遺伝子のセグメントの転写および/または翻訳に影響を与えることができる。例えば、置換、欠失(「ノックアウト」)、または挿入(「ノックイン」)技術によって、遺伝子破壊が起こり得る。既存の配列の転写を調整する望ましいタンパク質または調節配列のさらなる遺伝子を挿入し得る。

【0227】

本発明の実施形態では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、または軽鎖の遺伝子の対立遺伝子を、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって不活化させ、その結果、機能的有蹄動物免疫グロブリンをもはや生成することができない。1つの実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、RNAに転写し得るが、タンパク質に翻訳することができない。別の実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、不活性な短縮形態に転写し得る。このような短縮RNAは、翻訳することができないか、非機能的タンパク質に翻訳し得る。別の実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、遺伝子が転写されないような方法で不活化し得る。さらなる実施形態では、ターゲティングされた免疫グロブリン遺伝子を、転写し、次いで、非機能的タンパク質に翻訳し得る。

10

【0228】

(III. ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む人工染色体の挿入)
(人工染色体)

本発明の1つの局面は、ヒト抗体(すなわち、免疫グロブリン(Ig))遺伝子座の少なくとも一部を発現するようにさらに改変された、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成された、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子座の機能的領域の少なくとも1つの対立遺伝子を欠く有蹄動物および有蹄動物細胞を提供する。このヒト遺伝子座は、再配列されて、有蹄動物中で多様なヒト抗体分子集団を発現し得る。これらのクローン化されたトランスジェニック有蹄動物は、ヒト抗体(ポリクローナル抗体など)を補給可能に、理論的には無限大に供給し、治療、診断、精製、および他の臨床に関連する目的のために使用し得る。

20

【0229】

1つの特定の実施形態では、人工染色体(AC)を使用して、有蹄動物細胞または動物にヒト免疫グロブリン遺伝子を移入することができる。ACにより、1つ以上の遺伝子を含むメガベースサイズのDNAフラグメントの組み込みをターゲティングすることが可能である。したがって、ACは、外因性DNAによってコードされた遺伝子産物の生成のために、選択された細胞に外因性DNAを導入し得る。1つの実施形態では、組み込まれたヒト免疫グロブリンDNAを有する1つ以上のACを、有蹄動物(ブタなど)へのヒトIg遺伝子の導入のためのベクターとして使用し得る。

30

【0230】

1983年に酵母に最初に構築されたACは、天然染色体の適切な複製および分配を担う不可欠なシス作用DNA配列エレメントから構築された人工線状DNA分子である(Murrayら(1983), Nature 301:189-193)。染色体は、機能するために少なくとも3つのエレメントが必要である。詳細には、人工染色体のエレメントは、少なくとも、(1)自律複製配列(ARS)(DNA複製開始の部位である複製起源の性質を有する)、(2)動原体(有糸分裂および減数分裂で複製された染色体の適切な破壊を担う動原体アセンブリ部位)、および(3)テロメア(末端を安定化させ、DNA分子の最末端(extreme termini)の完全な複製を容易にする線状染色体の末端に特殊化した構造)を含む。

40

【0231】

1つの実施形態では、ヒトIgを、有蹄動物染色体DNAと離れた独立した単位(エピソーム)として維持し得る。例えば、エピソームベクターは、DNA複製および細胞内でのベクターの維持に必要なDNA配列エレメントを含む。エピソームベクターは市販されている(例えば、Maniatis, T.ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual(1982)368-369頁を参照のこと)。ACは、安定して複製し、側面の内因性染色体に沿って分離し得る。別の実施形態では、ヒトIg DNA配列を、有蹄動物細胞の染色体に組み込み、それにより、新規の情報を複製し、天然染色体の一部として細胞の子孫に分配することが可能である(例えば、Wiglerら(1977), Cell 11:223を参照のこと)。ACを、有蹄動物細胞の内因性染色体に転位置させるか、挿入し得る。2つまたはそれを超えるACを、同時

50

または連続的に宿主細胞に導入し得る。

【0232】

さらに、ACは、1つ以上の遺伝子（1つのプロモーターに作動可能に連結された1つの遺伝子の複数のコピーまたは個別のプロモーターに連結したいくつものコピーが含まれる）を含むメガベースサイズのDNAフラグメントのターゲティングされた組込みのためのゲノム外遺伝子座を提供し得る。ACにより、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子を含むメガベースサイズのDNAフラグメントのターゲティングされた組込みが可能である。当業者に公知の染色体が破壊されてミニ染色体および前に二動原体染色体（*formerly dicentric chromosome*）を形成する条件下での二動原体染色体（すなわち、2つの動原体を有する染色体）を有する細胞の培養によってACを生成し得る。

10

【0233】

ACを、ヒト（ヒト人工染色体：「HAC」）、酵母（酵母人工染色体：「YAC」）、細菌（細菌人工染色体：「BAC」）、バクテリオファージP1由来人工染色体：「PAC」）、および他の哺乳動物（哺乳動物人工染色体：「MAC」）から構築し得る。ACは、動原体の起源に基づいてその名称が導かれている（例えば、YAC、BAC、PAC、MAC、HAC）。例えば、YACは、その動原体が酵母に由来し、他方では、活性な哺乳動物動原体を含む一方で、HACは、ヒト動原体を含む染色体をいう。さらに、植物人工染色体（「PLAC」）および昆虫人工染色体を構築することもできる。ACは、複製および維持の両方を担う染色体に由来するエレメントを含み得る。したがって、ACは、ヒトIgDNAなどの巨大なゲノムDNAフラグメントを安定に維持し得る。

20

【0234】

1つの実施形態では、YACを含む有蹄動物を提供する。YACは、酵母染色体（酵母など）由来のエレメントおよび外来DNAを含む遺伝子改変された環状染色体であり、従来のクローニングベクター（例えば、プラスミド、コスミド）によって許容されるよりもはるかに大きくし得る。YACにより、外因性DNAの非常に巨大なセグメント（Schlessinger, D. (1990), *Trends in Genetics* 6: 248 - 253）を哺乳動物細胞および動物内で増殖させることが可能である（Choiら (1993), *Nature Gen* 4: 117 - 123）。YACトランスジェニックアプローチは非常に強力であり、クローン化DNAを有効に改変する能力によって非常に増強される。酵母の主要な技術上の利点は、特定のゲノム改変をDNA媒介形質転換および相同組換えによって行うことができる容易さにある（Ramsey, M. (1994), *Mol Biotech* 1: 181 - 201）。1つの実施形態では、ヒトIgDNAが組み込まれた1つ以上のYACを、ヒトIg遺伝子の有蹄動物（ブタなど）への導入のためのベクターとして使用し得る。

30

【0235】

YACベクターは、酵母における複製のための特定の構造成分を含み、これには、以下が含まれる：動原体、テロメア、自律複製配列（ARS）、酵母選択マーカー（例えば、TRP1、URA3、およびSUP4）、および50kbを超える外因性DNAの巨大セグメントの挿入のためのクローニング部位。マーカー遺伝子により、YACを保有する細胞を選択し、特定の制限エンドヌクレアーゼの合成のための部位として使用し得る。例えば、TRP1およびURA3遺伝子を、確実に完全な人工染色体のみが改変されるための二重選択マーカーとして使用し得る。酵母選択マーカーを動原体の両側に運搬し、インピボでテロメア形成を促進する（seed）2つの配列を分離し得る。酵母細胞の総DNAの1%しか複製に必要なではないが、染色体の中心（動原体（有糸分裂時の姉妹染色分体と紡錘系部位との間の結合部位としての機能を果たす））、染色体の末端（テロメア（真核生物染色体の末端の維持に必要な配列としての機能を果たす））、および二重らせんがほぐれてそれ自体のコピーを開始し得るDNAセグメントとしての機能を果たすARSと呼ばれるDNAの別の短いストレッチを含む。

40

【0236】

50

1つの実施形態では、YACを使用して、約1、2、または3 Mbまでの免疫グロブリンDNAをクローン化し得る。別の実施形態では、少なくとも25、30、40、50、60、70、75、80、85、90、または95キロベース。

【0237】

酵母組込みプラスミドである複製ベクター（YACのフラグメントである）を使用して、ヒトIgを発現することもできる。酵母組込みプラスミドは、細菌（例えば、大腸菌）の成長のための複製起点および薬物耐性遺伝子、酵母中の形質転換体の選択のための酵母マーカー遺伝子、およびIg配列の挿入のための制限部位を供給する細菌プラスミド配列を含み得る。宿主細胞は、染色体へのプラスミドの直接組込みによって、このプラスミドを安定に獲得し得る。酵母複製ベクターを使用して、酵母中に遊離プラスミドサークルとしてヒトIgを発現することもできる。動原体配列の付加によって、酵母またはARS含有ベクターを安定化させることができる。YACは、動原体領域およびテロメア領域の両方を有し、組み換え体が発現的に酵母染色体として維持されるので、非常に巨大なDNA片のクローニングに使用し得る。

10

【0238】

YACを、例えば、以下に開示のように得る：米国特許第6,692,954号、同第6,495,318号、同第6,391,642号、同第6,287,853号、同第6,221,588号、同第6,166,288号、同第6,096,878号、同第6,015,708号、同第5,981,175号、同第5,939,255号、同第5,843,671号、同第5,783,385号、同第5,776,745号、同第5,578,461号、および同第4,889,806号；欧州特許第1356062号および同第0648265号；PCT公開番号WO03/025222号、WO02/057437号、WO02/101044号、WO02/057437号、WO98/36082号、WO98/12335号、WO98/01573号、WO96/01276号、WO95/14769号、WO95/05847号、WO94/23049号、およびWO94/00569号。

20

【0239】

別の実施形態では、BACを含む有蹄動物を提供する。BACは、細菌（大腸菌など）中で見出されたFベースのプラスミドであり、約300 kbの外來DNAを宿主細胞に移入し得る。一旦Ig DNAが宿主細胞にクローニングされると、新規に挿入したセグメントを、残りのプラスミドと共に複製し得る。結果として、何十億もの外來DNAコピーを非常に短期間に作製し得る。特定の実施形態では、ヒトIg DNAが組み込まれた1つ以上のBACを、有蹄動物（ブタなど）へのヒトIg遺伝子の導入のためのベクターとして使用する。

30

【0240】

BACクローニング系は、大腸菌F因子に基づき、その複製は、厳密に調節されるので、巨大構築物が確実に安定に維持される（Willems, N., およびR. Skurray (1987), Structure and function of the F-factor and mechanism of conjugation. In Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology (F. C. Neidhardt, Ed) Vol. 2 1110-1133頁, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.). BACは、種々の真核生物種由来のDNAのクローニングに広範に使用されている（Cairns (1995), Genomics 29: 413-425; Kimura (1996), Genomics 34: 213-218; Misumi (1997), Genomics 40: 147-150; Wo (1994), Nucleic Acids Res 22: 4922-4931; Zimmer, R. およびGibbins, A. M. V. (1997), Genomics 42: 217-226)。F-プラスミドの低発現によってDNAフラグメント間の組換え可能性が減少し、それにより、クローン化細菌遺伝子の致死的過剰発現を回避し得

40

50

る。BACは、100またはそれを超える世代の増殖後でさえも、宿主細胞中の1つのコピーベクター中でヒト免疫グロブリン遺伝子を安定に維持し得る。

【0241】

BAC(またはpBAC)ベクターは、約30~300kb対の範囲のインサートに対応し得る。1つの特定のBACベクター型(pBelobac11)は、インサート含有組換え分子とBACベクターを保有するコロニーとを色で区別するためのlacZ遺伝子の相補性を使用する。DNAフラグメントがpBelobac11のlacZ遺伝子にクローン化される場合、挿入活性化により、形質転換後にX-Gal/IPTGプレート上に白色コロニーが得られ(Kimら(1996), Genomics 34:213-218)、それにより、陽性クローンが容易に同定される。

10

【0242】

例えば、BACを、以下などに開示のように得ることができる：米国特許第6,713,281号、同第6,703,198号、同第6,649,347号、同第6,638,722号、同第6,586,184号、同第6,573,090号、同第6,548,256号、同第6,534,262号、同第6,492,577号、同第6,492,506号、同第6,485,912号、同第6,472,177号、同第6,455,254号、同第6,383,756号、同第6,277,621号、同第6,183,957号、同第6,156,574号、同第6,127,171号、同第5,874,259号、同第5,707,811号、および同第5,597,694；欧州特許第0805851号；PCT公開番号WO03/087330号、WO02/00916号、WO01/39797号、WO01/04302号、WO00/79001号、WO99/54487号、WO99/27118、およびWO96/21725号。

20

【0243】

別の実施形態では、バクテリオファージPACを含む有蹄動物を提供する。特定の実施形態では、ヒトIgDNAが組み込まれた1つ以上のバクテリオファージPACを、ヒトIg遺伝子の有蹄動物(ブタなど)への導入のためのベクターとして使用し得る。例えば、PACを、以下などに開示のように得ることができる：米国特許第6,743,906号、同第6,730,500号、同第6,689,606号、同第6,673,909号、同第6,642,207号、同第6,632,934号、同第6,573,090号、同第6,544,768号、同第6,489,458号、同第6,485,912号、同第6,469,144号、同第6,462,176号、同第6,413,776号、同第6,399,312号、同第6,340,595号、同第6,287,854号、同第6,284,882号、同第6,277,621号、同第6,271,008号、同第6,187,533号、同第6,156,574号、同第6,153,740号、同第6,143,949号、同第6,017,755号、および同第5,973,133；欧州特許第0814156；PCT公開番号WO03/091426号、WO03/076573号、WO03/020898号、WO02/101022号、WO02/070696号、WO02/061073号、WO02/31202号、WO01/44486号、WO01/07478号、WO01/05962号、およびWO99/63103号。

30

【0244】

さらなる実施形態では、MACを含む有蹄動物を提供する。MACは、高い有糸分裂安定性を有し、遺伝子発現が一貫して調節されており、クローニング能力が高く、免疫原性を示さない。哺乳動物染色体は、サイズが50~250Mbの範囲の連続した線状のDNA鎖から構成され得る。DNA構築物は、さらに、酵母細胞中DNA構築物が増殖するのに必要な1つ以上の配列を含み得る。DNA構築物はまた、選択マーカー遺伝子をコードする配列を含み得る。DNA構築物は、DNA構築物で形質転換された細胞中に染色体として維持されることができる。MACにより、目的のタンパク質をコードする遺伝子の導入のためのゲノム外特異的組込み部位が得られ、それにより、メガベースサイズのDNA組込みが可能となり、その結果、例えば、全代謝経路(非常に巨大な遺伝子(例えば、囊胞性線維症(CF)遺伝子(~600kb))または数個の遺伝子(多価ワクチンの調製

40

50

のための一連の抗原)) をコードする遺伝子を、細胞に安定に導入し得る。

【0245】

哺乳動物人工染色体(MAC)を提供する。MACSを使用して生成した他の高等真核生物種(昆虫および魚類など)の人工染色体も提供する。このような染色体の生成および単離方法を本明細書中に提供する。他の種(昆虫および魚類など)由来の人工染色体を構築するためのMACの使用法も提供する。人工染色体は、完全に機能的で安定な染色体である。2つの人工染色体型を提供する。本明細書中でSATAC(サテライト人工染色体)と呼ぶ一方の型は、安定な異質染色体であり、別の型は、真性染色質の増幅に基づいたミニ染色体である。本明細書中で使用される場合、前二動原体染色体は、それぞれが動原体の1つを有する2つの染色体が生成されるように、二動原体染色体が断片化して新規のテロメアを獲得した場合に生成される染色体である。各フラグメントは、複製可能な染色体であり得る。

10

【0246】

MACSを使用して生成された他の抗体真核生物種(昆虫および魚類など)のための人工染色体も提供する。1つの実施形態では、SATAC(サテライト人工染色体)を提供する。SATACは、安定な異質染色体である。別の実施形態では、真性染色質の増幅に基づいたミニ染色体を提供する。

【0247】

1つの実施形態では、人工染色体を、染色体が破壊されてミニ染色体および前二動原体染色体を形成する条件下での二動原体染色体を有する細胞の培養によって生成し得る。1つの実施形態では、SATACを、ミニ染色体フラグメントから生成し得る(例えば、米国特許第5,288,625号を参照のこと)。別の実施形態では、SATACを、前二動原体染色体のフラグメントから生成し得る。SATACを、短いサテライトDNAの反復単位から作製することができ、これは、完全に異質染色質であり得る。1つの実施形態では、外因性または外来DNAを挿入しない場合、SATACは、遺伝情報を含まない。別の実施形態では、選択的条件下での培養の繰り返しおよび前二動原体染色体から生成された染色体を含む細胞のサブクロニングによって形成される種々のサイズのSATACを提供する。これらの染色体は、7.5~10Mbのサイズの反復単位に基づき得る(すなわち、メガレプリコン)。これらのメガレプリコンは、外因性非サテライトDNAに隣接したサテライトDNAのタンデムブロックであり得る。外因性(「外来」)DNAに隣接した2つの逆方向メガレプリコンを含む同一染色体セグメント(それぞれ、アンプリコンと呼ばれる)のタンデムアレイを増幅し得る。選択培地で成長させた反復細胞融合および/またはBrdU(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もしくは薬剤(電離放射線(X線が含まれる)など)、およびサブクロニングにより、安定な異質染色体または部分的な異質染色体(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、およびこれらに由来する種々のより小さな安定な染色体が含まれる)を保有する細胞株を得ることができる。これらの染色体は、これらの反復単位に基づき、発現されるヒト免疫グロブリンDNAを含み得る(米国特許第6,743,967号も参照のこと)。

20

30

【0248】

別の実施形態では、例えば、以下に開示のように、MACを得ることができる:米国特許第6,743,967号、同第6,682,729号、同第6,569,643号、同第6,558,902号、同第6,548,287号、同第6,410,722号、同第6,348,353号、同第6,297,029号、同第6,265,211号、同第6,207,648号、同第6,150,170号、同第6,150,160号、同第6,133,503号、同第6,077,697号、同第6,025,155号、同第5,997,881号、同第5,985,846号、同第5,981,225号、同第5,877,159号、同第5,851,760号、および同第5,721,118;PCT公開番号WO04/066945号、WO04/044129号、WO04/035729号、WO04/033668号、WO04/027075号、WO04/016791号、

40

50

WO04/009788号、WO04/007750号、WO03/083054号、WO03/068910号、WO03/068909号、WO03/064613号、WO03/052050号、WO03/027315号、WO03/023029号、WO03/012126号、WO03/006610号、WO03/000921号、WO02/103032号、WO02/097059号、WO02/096923号、WO02/095003号、WO02/092615号、WO02/081710号、WO02/059330号、WO02/059296号、WO00/18941号、WO97/16533号、およびWO96/40965号。

【0249】

本発明の別の実施形態では、HACを含む有蹄動物および有蹄動物細胞を提供する。特定の実施形態では、組み込まれたヒトIgDNAを有する1つ以上のHACを、有蹄動物（ブタなど）へのヒトIg遺伝子の導入のためのベクターとして使用し得る。特定の実施形態では、ヒトIgDNAが組み込まれた1つ以上のHACを使用して、免疫化に応答してヒトIgを発現し、親和性成熟（affinity maturation）を受けた核移植によって有蹄動物（例えば、ブタ）を生成する。

10

【0250】

種々のアプローチを使用して、ヒト抗体（「ヒトIg」）を発現する有蹄動物を生成し得る。これらのアプローチには、例えば、有蹄動物への重鎖および軽鎖Ig遺伝子の両方を含むHACの挿入またはその胎児期もしくは出生後の有蹄動物（例えば、免疫不全または免疫抑制有蹄動物）へのヒトB細胞もしくはB細胞前駆体の挿入が含まれる（例えば、2000年11月17出願のWO01/35735号、2002年3月20日出願のUS02/08645号を参照のこと）。いずれかの場合、細胞および有蹄動物抗体生成B細胞を生成する両ヒト抗体が、有蹄動物中に存在し得る。HACを含む有蹄動物では、1つのB細胞は、有蹄動物ならびにヒトの重鎖および軽鎖タンパク質の組み合わせを含む抗体を生成し得る。さらに他の実施形態では、HACの全サイズは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10Mbである。

20

【0251】

例えば、以下などに開示のように、HACを提供し得る：米国特許第6,642,207号、同第6,590,089、同第6,566,066、同第6,524,799、同第6,500,642、同第6,485,910、同第6,475,752、同第6,458,561、同第6,455,026、同第6,448,041、同第6,410,722、同第6,358,523、同第6,277,621、同第6,265,211、同第6,146,827、同第6,143,566、同第6,077,697、同第6,025,155、同第6,020,142、および同第5,972,649号；米国特許出願番号2003/0037347号；PCT公開番号WO04/050704号、WO04/044156号、WO04/031385号、WO04/016791号、WO03/101396号、WO03/097812号、WO03/093469号、WO03/091426号、WO03/057923号、WO03/057849号、WO03/027638号、WO03/020898号、WO02/092812号、およびWO98/27200号。

30

40

【0252】

本発明で使用されるヒト免疫グロブリン配列を挿入し得るACのさらなる例には、例えば、BAC（例えば、pBelobAC11またはpBAC108L（例えば、Shizuyaら（1992）、Proc Natl Acad Sci USA 89（18）：8794-8797；Wangら（1997）、Biotechniques 23（6）：992-994を参照のこと）、バクテリオファージPAC、YAC（例えば、Burke（1990）、Genet Anal Tech Appl 7（5）：94-99を参照のこと）、およびMAC（例えば、Vos（1997）、Nat. Biotechnol. 15（12）：1257-1259；Ascenzioniら（1997）、Cancer Lett 118（2）：135-142）、HACなど（米国特許第

50

6, 743, 967号、同第6, 716, 608号、同第6, 692, 954号、同第6, 670, 154号、同第6, 642, 207号、同第6, 638, 722号、同第6, 573, 090号、同第6, 492, 506号、同第6, 348, 353号、同第6, 287, 853号、同第6, 277, 621号、同第6, 183, 957号、同第6, 156, 953号、同第6, 133, 503号、同第6, 090, 584号、同第6, 077, 697号、同第6, 025, 155号、同第6, 015, 708号、同第5, 981, 175号、同第5, 874, 259号、同第5, 721, 118号、および同第5, 270, 201号；欧州特許第1437400号、同第1234024号、同第1356062号、同第0959134号、同第1056878号、同第0986648号、同第0648265号、および同第0338266；PCT公開番号WO04/013299号、WO01/07478号、WO00/06715号、WO99/43842号、WO99/27118号、WO98/55637号、WO94/00569、およびWO89/09219も参照のこと。さらなる例には、例えば、以下に示されたACが含まれる：PCT公開番号WO02/076508号、WO03/093469号、WO02/097059号、WO02/096923号；米国特許公開番号US2003/0113917号およびUS2003/003435号；および米国特許第6, 025, 155号が含まれる。

10

【0253】

本発明の他の実施形態では、ACは、各世代での雄配偶子形成によって伝達された。ACは、組み込まれても組み込まれなくてもよい。1つの実施形態では、ACを、実質的にすべての分裂細胞における減数分裂によって伝達し得る。別の実施形態では、ACは、ヒト免疫グロブリン核酸配列の位置独立性発現 (position independent expression) を行うことができる。特定の実施形態では、ACは、雄および雌の配偶子形成による伝達効率は少なくとも10%であり得る。1つの特定の実施形態では、ACは、環状であり得る。別の特定の実施形態では、非組み込みACは、2000年3月27日にBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) にアクセッション番号LMBP 5473 CBで寄託されたACであり得る。さらなる実施形態では、雄配偶子形成によって伝達された外因性核酸を含む有糸分裂安定性単位を同定し、有糸分裂安定性単位中の侵入部位によって単位へのヒト免疫グロブリン遺伝子が組み込み可能になるACの生成方法を提供する。

20

30

【0254】

他の実施形態では、機能的動原体、選択マーカー、および/または固有のクローニング部位を含むACを提供する。他の実施形態では、ACは、1つ以上の以下の性質を示し得る：非依存性染色体として安定に分離し得ること、免疫グロブリン配列を制御様式で挿入してACから発現し得ること、雄および雌の生殖系列を介して効率よく伝達し得ること、および/またはトランスジェニック動物がその細胞の約30、40、50、60、70、80、または90%を超える染色体を保有し得ること。

【0255】

特定の実施形態では、ACを、ACが有糸分裂安定性を示す線維芽細胞（任意の哺乳動物またはヒト線維芽細胞）から単離し得る。ハムスター細胞へのACの移入後、10x (10xPなど) 部位および選択マーカー部位を挿入し得る。他の実施形態では、ACは、有糸分裂安定性を示すことができ、例えば、選択しない場合、有糸分裂あたりの喪失は約5、2、1、0.5、または0.25%未満である。US2003/0064509号およびWO01/77357号も参照のこと。

40

【0256】

(外因性免疫グロブリン遺伝子)

本発明の別の局面では、外因性免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを発現するトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンを、内因性有蹄動物染色体内に組み込まれた免疫グロブリン遺伝子座から発現し得る、トランスジェニック有蹄動物を

50

提供する。1つの実施形態では、トランスジェニック動物由来の有蹄動物細胞を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、子孫に遺伝し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を、雄生殖系列を介して子孫に遺伝し得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に应答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

【0257】

他の実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を、外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するようにさらに遺伝子改変し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を含むブタ動物を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、鎖遺伝子座またはそのフラグメントおよび/または鎖遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に应答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

【0258】

他の実施形態では、機能的内因性免疫グロブリンのいかなる発現も欠くトランスジェニック有蹄動物を、外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するようにさらに遺伝子改変し得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を含むブタ動物を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、鎖遺伝子座もしくはそのフラグメントおよび/または鎖遺伝子座もしくはそのフラグメントであり得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に応答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

【0259】

別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座を含むブタ動物を提供する。1つの実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。別の実施形態では、外因性免疫グロブリン遺伝子座は、鎖遺伝子座もしくはそのフラグメントおよび/または鎖遺伝子座もしくはそのフラグメントであり得る。なおさらなる実施形態では、人工染色体(AC)は、外因性免疫グロブリンを含み得る。1つの実施形態では、ACは、酵母ACまたは哺乳動物ACであり得る。さらなる実施形態では、外因性遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントであり得る。1つの実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、ヒト第14染色体、ヒト第2染色体、およびヒト第22染色体、またはそれらのフラグメントであり得る。別の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリンの任意のフラグメントを含み得る。さらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再配列を受け得るヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖の任意のフラグメントを含み得る。なおさらなる実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、抗原への曝露の際に抗体を生成し得る任意のヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。特定の実施形態では、外因性ヒト免疫グロブリンを、B細胞中で発現させて、1つ以上の抗原への曝露に応答して外因性免疫グロブリンを生成し得る。

【0260】

ヒト免疫グロブリン遺伝子(Ig重鎖遺伝子(ヒト第414染色体)、Ig軽鎖遺伝子(ヒト第2染色体)、および/またはIg鎖遺伝子(ヒト第22染色体)など)を、上記のようにAcsに挿入し得る。特定の実施形態では、ヒト重鎖、および/またはIg遺伝子の任意の部分を、ACに挿入し得る。1つの実施形態では、核酸は、ヒト由来の天然に存在する核酸の対応する領域と少なくとも70、80、90、95、または99%同一であり得る。他の実施形態では、1つを超えるヒト抗体クラスが有蹄動物によって生成される。種々の実施形態では、1つを超える異なるヒトIgまたは抗体が有蹄動物によって生成される。1つの実施形態では、ヒトIg重鎖遺伝子およびIg軽鎖遺伝子の両方を含むAC(自律ヒト人工染色体(「AHAC」、内因性に発現する制限エンドヌクレアーゼによってインビボで線状ヒト染色体に変換される環状組換え核酸分子))を導入し得る。1つの実施形態では、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座は、異なる染色体アーム上(すなわち、異なる動原体側)に存在する。1つの実施形態では、重鎖には μ 重鎖が含まれ、軽鎖は または 軽鎖であり得る。Ig遺伝子を、1つまたは1つを超えるACに同時または連続的に導入し得る。

【0261】

特定の実施形態では、有蹄動物または有蹄動物細胞は、再配列して1つを超えるヒトIg分子(ヒト抗体タンパク質など)を発現するヒトIg遺伝子の全部または一部をコードする1つ以上の核酸を発現する。したがって、ヒトIg鎖または抗体をコードする核酸は、非再配列状態である(すなわち、核酸は、V(D)J組換えを受けていない)。特定の実施形態では、抗体軽鎖のV遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントを、1つ以上のヌクレオチドによってJ遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントから単離し得る。特定の実施形態では、抗体重鎖のV遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントを、1つ以上のヌクレオチドによってD遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントから単離することができ、そして/または抗体重鎖のD遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントを、1つ以上のヌクレオチドによってJ遺伝子セグメントをコードするすべての核酸セグメントから単離し得る。非再配列ヒト

10

20

30

40

50

I g 遺伝子を含むトランスジェニック有蹄動物への抗原の投与後、ヒト I g 遺伝子座中で核酸セグメントを再配列し、抗原と反応性を示すヒト抗体を生成する。

【0262】

1つの実施形態では、A C は、免疫グロブリン遺伝子を含むヒト染色体の一部またはフラグメントを発現し得る。1つの実施形態では、Daviesら、1993 Biotechnology 11:911-914などに記載のように、A C は、少なくとも300または1300 kbのヒト軽鎖遺伝子座を発現し得る。

【0263】

別の実施形態では、A C は、少なくとも軽鎖遺伝子座（V 遺伝子セグメント、J 遺伝子セグメント、および1つのC 遺伝子が含まれる）を含むヒト第22染色体の一部を発現し得る。別の実施形態では、A C は、少なくとも1つのV 遺伝子セグメント、少なくとも1つのJ 遺伝子セグメント、およびC 遺伝子を発現し得る。他の実施形態では、Popovら、J Exp Med. 1999 May 17; 189(10):1611-20などに記載のように、A C は、遺伝子座の一部を含み得る。

10

【0264】

別の実施形態では、A C は、少なくとも軽鎖遺伝子座（V 遺伝子セグメント、J 遺伝子セグメント、および1つのC 遺伝子が含まれる）を含むヒト第2染色体の一部を発現し得る。別の実施形態では、A C は、少なくとも1つのV 遺伝子セグメント、少なくとも1つのJ 遺伝子セグメント、およびC 遺伝子を発現し得る。他の実施形態では、軽鎖遺伝子座の一部を含むA C は、例えば、Liら、2000 J Immunol 164:812-824およびLi S Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jun; 84(12):4229-33に記載のA C であり得る。別の実施形態では、Zouら、FASEB J. 1996 Aug; 10(10):1227-32などに記載のように、約1.3 Mbのヒト 遺伝子座を含むA C を提供する。

20

【0265】

さらなる実施形態では、A C は、少なくともヒト重鎖遺伝子座（V_H、D_H、J_H、およびC_H 遺伝子セグメントが含まれる）を含むヒト第14染色体の一部を発現し得る。別の実施形態では、A C は、少なくとも1つのV_H 遺伝子セグメント、少なくとも1つのD_H 遺伝子セグメント、少なくとも1つのJ_H 遺伝子セグメント、および少なくとも1つのC_H 遺伝子セグメントを発現し得る。他の実施形態では、Choiら、1993 Nat Gen 4:117-123および/またはZouら、1996 PNAS 96:14100-14105などに記載のように、A C は、少なくとも85 kbのヒト重鎖遺伝子座を発現し得る。

30

【0266】

他の実施形態では、例えば、Greenら、1994 Nat Gen 7:13-22; Mendezら、1995 Genomics 26:294-307; Mendezら、1997 Nat Gen 15:146-156; Greenら、1998 J Exp Med 188:483-495および/またはFishwildら、1996 Nat Biotech 14:845-851に開示のように、A C は、重鎖および軽鎖の両遺伝子座の一部（少なくとも220、170、800、または1020 kbなどを）を発現し得る。別の実施形態では、Nicholson J Immunol. 1999 Dec 15; 163(12):6898-906およびPopov Gene. 1996 Oct 24; 177(1-2):195-201などに記載のように、A C は、メガベース量のヒト免疫グロブリンを発現し得る。さらに、特定の実施形態では、Roblらの米国特許公開番号2004/0068760号などに記載のように、ヒト第14染色体（I g 重鎖遺伝子を含む）、ヒト第2染色体（I g 鎖遺伝子を含む）、およびヒト第22染色体（I g 鎖遺伝子）由来のM A C を、同時または連続的に導入し得る。別の実施形態では、M A C の全サイズは、約10、9、8、7メガベース以下である。

40

【0267】

特定の実施形態では、例えば、Babraham Instituteの米国特許第

50

5, 545, 807号に記載のように、Vh、Dh、Jh、および μ DNAセグメントがヒトDNAセグメントに対応する部分を含む免疫グロブリンのレパートリーを形成するように、生殖系列立体配置におけるヒト免疫グロブリンのヒトVh、ヒトDh、ヒトJhセグメントおよびヒト μ セグメントを、AC(YACなど)に挿入し得る。有蹄動物細胞への挿入および有蹄動物の生成後、このようなACは、重鎖免疫グロブリンを生成し得る。1つの実施形態では、これらの免疫グロブリンは、機能的重鎖-軽鎖免疫グロブリンを形成し得る。別の実施形態では、これらの免疫グロブリンを、有蹄動物の適切な細胞または体液からの回収が可能な量で発現し得る。このような免疫グロブリンを、Burke, D T, Carle, G F and Olson, M V (1987) "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors" Science, 236, 806-812などに記載のように、酵母人工染色体ベクターに挿入するか、または染色体フラグメントの導入(Richer, J and Lo, C W (1989) "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments" Science 245, 175-177などに記載)を行うことができる。

【0268】

ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む特異的ACに関するさらなる情報を、例えば、Giraldio & Montoliu (2001) Transgenic Research 10: 83-103およびPeterson (2003) Expert Review s in Molecular Medicine 5: 1-25による最近の概説に見出すことができる。

【0269】

(AC移入法)

ヒト免疫グロブリン遺伝子を、最初にACに挿入し、次いで、ヒト免疫グロブリン含有ACを有蹄動物細胞に挿入し得る。あるいは、ACを、有蹄動物細胞への挿入前に中間(intermediary)哺乳動物細胞(CHO細胞など)に移入し得る。1つの実施形態では、中間哺乳動物細胞はACも含み、第1のACを、哺乳動物細胞のACに挿入し得る。特に、酵母細胞中にヒト免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントを含むYACを、MACを保有する哺乳動物細胞に移入し得る。YACを、MACに挿入し得る。次いで、MACを、有蹄動物細胞に移入し得る。ヒトIg遺伝子を、相同組換えによって、ACに挿入し得る。次いで、得られたヒトIg遺伝子を含むACを、有蹄動物細胞に導入し得る。ヒトIgを含むACを含む1つ以上の有蹄動物細胞を、本明細書中に記載されている技術または当該分野で公知の技術によって選択し得る。

【0270】

ACの導入に適切な宿主を、本明細書中に提供し、任意の動物もしくは植物またはその細胞もしくは組織(哺乳動物、トリ、爬虫類、両生類、昆虫、魚類、クモ形類、タバコ、トマト、コムギ、単子葉植物、双子葉植物、および藻類)が含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、ACを、細胞への導入前に、当該分野で公知の任意の試薬(スペルミン、スペルミジン、ポリエチレンイミン、および/またはポリリジンが含まれるが、これらに限定されない)によって凝縮し得る(Marschallら、Gene Ther. 1999 Sep; 6(9): 1634-7)。ACを、細胞融合または微小核融合によって導入するか、当業者に公知の任意の方法(直接DNA移入、エレクトロポレーション、核移植、微小核融合、細胞融合、スフェロプラスト融合、脂質媒介移入、リポフェクション、リポソーム、微粒子銃、微量注入、リン酸カルシウム沈殿、および/または任意の他の適切な方法が含まれるが、これらに限定されない)によってその後単離し得る。細胞へのDNAの他の導入方法には、微量注入、エレクトロポレーション、インタクトな細胞を使用した細菌プロトプラスト融合が含まれる。ポリカチオン(ポリブレンおよびポリオルニチンなど)を使用することもできる。哺乳動物細胞の種々の形質転換技術

10

20

30

40

50

については、例えば、Keownら、Methods in Enzymology (1990) Vol. 185, 527-537頁；およびMansourら(1988) Nature 336:348-352を参照のこと。

【0271】

直接DNA形質転換、細胞または胚における微量注入、植物のためのプロトプラスト再生、エレクトロポレーション、微粒子銃、および当業者に公知の他のこのような方法によってACを導入し得る(例えば、Weissbachら(1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, N.Y., Section III, 421-463頁；Griersonら(1988) Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9を参照のこと；米国特許第5,491,075号；同第5,482,928号；および同第5,424,409号も参照のこと；例えば、米国特許第5,470,708号も参照のこと)。

10

【0272】

特定の実施形態では、ヒトIg遺伝子を保有する1つ以上の単離YACを使用し得る。単離YACを、当該分野で公知の任意の試薬(スペルミン、スペルミジン、ポリエチレンイミン、および/またはポリリジンが含まれるが、これらに限定されない)によって凝縮し得る(Marschallら、Gene Ther. 1999 Sep; 6(9): j1634-7)。次いで、凝縮YACを、当該分野で公知の任意の方法(例えば、微量注入、エレクトロポレーション、脂質媒介トランスフェクションなど)によってブタ細胞に移入し得る。あるいは、凝縮YACを、精子媒介遺伝子移入または卵細胞質内精子注入法(ICSI)媒介遺伝子移入によって卵母細胞に移入し得る。1つの実施形態では、スフェロプラスト融合を使用して、ヒトIg遺伝子を保有するYACをブタ細胞に移入し得る。

20

【0273】

本発明の他の実施形態では、ヒトIgを含むACを、成体、胎児、または胚有蹄動物細胞に挿入し得る。有蹄動物細胞のさらなる例には、未分化細胞(胚細胞(例えば、胚性幹細胞)など)、分化細胞または体細胞(上皮細胞、神経細胞、上皮細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラノサイト、軟骨細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、赤血球、マクロファージ、単球、線維芽細胞、筋細胞など)、女性生殖器形細胞(乳腺、卵丘、顆粒膜、または卵管細胞、生殖細胞、胎盤細胞など)、または任意の器官由来の細胞(膀胱、脳、食道、卵管、心臓、腸、胆嚢、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿管、尿道、および子宮など)および本明細書中に記載の任意の他の細胞型が含まれる。

30

【0274】

(部位特異的リコンビナーゼ媒介移入)

本発明の特定の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼ媒介移入によって、ブタ細胞(本明細書中に記載されているか当該分野で公知の細胞)へのヒト免疫グロブリン遺伝子を含むACの移入を行うことができる。1つの特定の実施形態では、ACを、ブタ線維芽細胞に移入し得る。別の特定の実施形態では、ACは、YACであり得る。

40

【0275】

本発明の他の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含む環状化DNA(ACなど)を、そのゲノム内に部位特異的リコンビナーゼ標的部位を有する細胞株に移入し得る。1つの実施形態では、細胞の部位特異的リコンビナーゼ標的部位を、外因性染色体内に配置し得る。外因性染色体は、宿主の内因性ゲノムに組み込まれない人工染色体であり得る。1つの実施形態では、ACを、生殖系列伝達を介して子孫に移入し得る。1つの特定の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントを含むYACを、部位特異的リコンビナーゼによって環状化し、次いで、MACを含む宿主細胞に移入することができ、ここで、MACは、部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含む。この時点でヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含むこのMACを、ブタ細胞

50

(線維芽細胞などであるが、これに限定されない)と融合し得る。次いで、ブタ細胞を、核移植のために使用し得る。

【0276】

本発明の一定の実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントを含むACを、有蹄動物細胞への移入前に、哺乳動物細胞(CHO細胞など)に移入し得る。1つの実施形態では、中間哺乳動物細胞はACも含み、第1のACを、哺乳動物細胞のACに挿入し得る。特に、酵母細胞中にヒト免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントを含むYACを、MACを保有する哺乳動物細胞に移入し得る。YACを、MACに挿入し得る。次いで、MACを、有蹄動物細胞に移入し得る。特定の実施形態では、ヒトIg遺伝子またはそのフラグメントを保有するYACは、部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含み得る。YACを、最初に、適切な部位特異的リコンビナーゼの適用によって環状化し、次いで、それ自体の部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含む哺乳動物細胞に挿入し得る。次いで、部位特異的リコンビナーゼを適用して、中間哺乳動物細胞中でMACにYACを組み込むことができる。部位特異的リコンビナーゼを、シスまたはトランスで適用し得る。特に、部位特異的リコンビナーゼを、トランスで適用し得る。1つの実施形態では、部位特異的リコンビナーゼを、部位特異的リコンビナーゼ発現プラスミド(Cre発現プラスミドなど)のトランスフェクションによって発現し得る。さらに、YACのテロメア領域を、選択マーカー(本明細書中に記載されているか当該分野で公知の選択マーカーなど)で改良することもできる。次いで、中間哺乳動物細胞のMAC内のヒトIg遺伝子またはそのフラグメントを、有蹄動物細胞(線維芽細胞など)に移入し得る。

10

20

【0277】

あるいは、ヒトIg遺伝子またはそのフラグメントを保有するAC(YACなど)は、各テロメア付近に任意選択的に存在する部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含み得る。YACを、最初に、適切な部位特異的リコンビナーゼの適用によって環状化し、次いで、ゲノム内にそれ自体の部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含む有蹄動物細胞に直接挿入し得る。あるいは、有蹄動物細胞は、部位特異的リコンビナーゼ標的部位を含むそれ自体のMACを保有し得る。この実施形態では、YACを、有蹄動物細胞の内因性ゲノムに直接挿入し得る。特定の実施形態では、有蹄動物細胞は、線維芽細胞または核移植に使用し得る任意の他の適切な細胞であり得る。例えば、図7、Callら、Hum Mol Genet. 2000 Jul 22; 9(12): 1745-51を参照のこと。

30

【0278】

他の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼによってDNAを宿主細胞に組み込むことができる、少なくとも100kbのDNAを環状化する方法を提供する。1つの実施形態では、少なくとも100、200、300、400、500、1000、2000、5000、10,000kbのDNAを環状化し得る。別の実施形態では、少なくとも1000、2000、5000、10,000、または20,000メガベースのDNAを環状化し得る。1つの実施形態では、DNA配列の各末端に部位特異的リコンビナーゼ標的部位を結合させ、その後、部位特異的リコンビナーゼを適用してDNAを環状化することによって、DNAの環状化を行うことができる。1つの実施形態では、部位特異的リコンビナーゼ標的部位は、loxであり得る。別の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼ標的部位は、Fltであり得る。一定の実施形態では、DNAは、人工染色体(本明細書中に記載されているか当該分野で公知のYACまたは任意のACなど)であり得る。別の実施形態では、ACは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはそのフラグメントを含み得る。

40

【0279】

別の好ましい実施形態では、YACを、人工哺乳動物染色体に変換するか、組み込むことができる。哺乳動物人工染色体を、ブタ細胞に移入するか、ブタ細胞内に保有させる。人工染色体を、当該分野で公知の任意の方法(分裂中期染色体の直接注入、脂質媒介遺伝子移入、または微小核融合が含まれるが、これらに限定されない)によってブタゲノム内に導入し得る。

50

【0280】

部位特異的リコンビナーゼには、短い核酸部位または配列特異的リコンビナーゼ標的部
位（すなわち、リコンビナーゼ認識部位）を認識して結合し、これらの部位に関連する核
酸の組換えを触媒する酵素またはリコンビナーゼが含まれる。これらの酵素には、リコ
ビナーゼ、トランスポサーゼ、およびインテグラーゼが含まれる。配列特異的リコンビ
ナーゼ標的部位の例には、lox部位、att部位、dif部位、およびfrr部位が含ま
れるが、これらに限定されない。部位特異的リコンビナーゼの限定しない例には、バクテ
リオファージP1Cre リコンビナーゼ、酵母FLPリコンビナーゼ、Intiインテ
グラーゼ、バクテリオファージ、80、P22、P2、186、およびP4リコンビ
ナーゼ、Tn3リゾルベース、Hinリコンビナーゼ、およびCinリコンビナーゼ、大
腸菌xerCおよびxerDリコンビナーゼ、パチルス・チューリングゲンシスリコンビ
ナーゼ、TpnIおよびラクタマーゼトランスポゾン、および免疫グロブリンリコンビ
ナーゼが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0281】

1つの実施形態では、組換え部位は、バクテリオファージP1のCreリコンビナーゼ
によって認識されるlox部位であり得る。lox部位は、バクテリオファージP1のc
re遺伝子産物（Creリコンビナーゼ）が部位特異的組換え事象を触媒し得るヌクレオ
チド配列をいう。種々のlox部位が当該分野で公知であり、天然に存在するloxP、
loxB、loxLおよびloxR、ならびに多数の変異体または変異形、lox部位（
loxP511、loxP514、lox.DELTA.86、lox.DELTA.1
17、loxC2、loxP2、loxP3、およびloxP23など）が含まれる。lox
部位のさらなる例には、loxB、loxL、loxR、loxP、loxP3、lox
P23、lox86、lox117、loxP511、およびloxC2が含ま
れるが、これらに限定されない。

20

【0282】

別の実施形態では、組換え部位は、Cre以外のリコンビナーゼによって認識される組
換え部位である。1つの実施形態では、リコンビナーゼ部位は、酵母の2プラスミドの
FLPリコンビナーゼによって認識されるFRT部位であり得る。FRT部位は、酵母2
プラスミドのFLP遺伝子産物（FLPリコンビナーゼ）が部位特異的組換えを
触媒し得るヌクレオチド配列をいう。非Creリコンビナーゼのさらなる例には、以下が
含まれるが、これらに限定されない：部位特異的リコンビナーゼには以下が含まれる：
バクテリオファージのIntリコンビナーゼによって認識されるatt部位（例えば、a
tt1、att2、att3、attP、attB、attL、およびattR）、レゾ
ルバーゼファミリーによって認識される組換え部位、パチルス・チューリングゲンシスのト
ランスポサーゼによって認識される組換え部位。

30

【0283】

（IV．遺伝子改変動物の生成）

本発明のさらなる局面では、本明細書中に記載の遺伝子改変を含む有蹄動物を、当業者
に公知の任意の方法によって生成し得る。このような方法には、以下が含まれるが、これ
らに限定されない：核移植、卵細胞質内精子注入法、接合体の直接改変、および精子媒介
遺伝子移入。

40

【0284】

別の実施形態では、このような動物（例えば、ブタ）のクローン化方法には、以下が含
まれる：卵母細胞の除核、少なくとも1つの免疫グロブリン細胞の少なくとも1つの対立
遺伝子が不活化された細胞由来のドナー核との卵母細胞の融合、および代理母への核移植
由来の胚の移植。

【0285】

あるいは、胚性幹細胞中の免疫グロブリン遺伝子の両方の対立遺伝子の不活化による、
機能的免疫グロブリンのいかなる発現も欠く生きた動物の生成方法を提供し、その後、こ
の動物を使用して子孫を生成し得る。

50

【0286】

別の局面では、本発明は、免疫グロブリン遺伝子の両方の対立遺伝子が不活化された生き動物（ブタなど）の生成方法を提供する。1つの実施形態では、免疫グロブリン遺伝子の両方の対立遺伝子が不活化された細胞由来のドナー核を使用したクローニングによって動物を生成する。1つの実施形態では、遺伝子ターゲティング事象によって免疫グロブリン遺伝子の両方の対立遺伝子を不活化する。

【0287】

接合体の直接改変によって作製し得る遺伝子が変化した動物。哺乳動物について、改変接合体を、動物を妊娠し得る偽妊娠雌の子宮に導入し得る。例えば、免疫グロブリン遺伝子を欠く全動物が望ましい場合、この動物由来の胚性幹細胞をターゲティングし、その後、改変細胞をキメラ動物に成長させるために線維芽細胞に導入し得る。胚性幹細胞について、胚性幹細胞株または新たに得た幹細胞のいずれかを使用し得る。

10

【0288】

本発明の適切な実施形態では、全能性細胞は、胚性幹（ES）細胞である。線維芽細胞からのES細胞の単離、ES細胞株の確立、およびその後の培養を、例えば、以下に記載の従来の方法によって行う：Doetichmannら、*J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45 (1985)；Liら、*Cell* 69:915-926 (1992)；Robertson, E. J. 「*Tetracarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*」E. J. Robertson編, IRL Press, Oxford, England (1987)；Wurst and Joyner, 「*Gene Targeting: A Practical Approach*」A. L. Joyner編, IRL Press, Oxford, England (1993)；Hogénら、「*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*」Hogan, Beddington, CostantiniおよびLacy編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1994)；およびWangら、*Nature* 336:741-744 (1992)。本発明の別の適切な実施形態では、全能性細胞は、胚性生殖（EG）細胞である。胚性生殖細胞は、ES細胞と機能的に等価な未分化の細胞であり、これらを、培養してインビトロでトランスフェクトし、キメラの体細胞系列および生殖細胞系列に寄与し得る（Stewartら、*Dev. Biol.* 161:626-628 (1994)）。EG細胞は、始原生殖細胞（配偶子の前駆体）の成長因子（白血病抑制因子、スチール因子（steel factor）、および塩基性線維芽細胞成長因子）と組み合わせた培養によって誘導する（Matsuiら、*Cell* 70:841-847 (1992)；Resnickら、*Nature* 359:550-551 (1992)）。Donovanら「*Transgenic Animals, Generation and Use*」L. M. Houdebine編, Harwood Academic Publishers (1997)の文献および本明細書中に引用した元の文献に記載の方法を使用して、EG細胞の培養を行うことができる。

20

30

【0289】

例えば、Jamesら、*Genet. Res. Camb.* 60:185-194 (1992)；NagyおよびRossant, 「*Gene Targeting: A Practical Approach*」A. L. Joyner編, IRL Press, Oxford, England (1993)；またはKubiakおよびTarkowski, *Exp. Cell Res.* 157:561-566 (1985)に記載のように、天然の接合体生成および成長または2細胞胚の電気融合による公知の方法によって本発明で使用される四倍体線維芽細胞を得て、その後、培養し得る。

40

【0290】

線維芽細胞へのES細胞の導入を、当該分野で公知の任意の方法によって行うことができる。本発明の目的に適切な方法は、Wangら、*EMBO J.* 10:2437-24

50

50(1991)に記載の微量注入法である。

【0291】

あるいは、改変胚性幹細胞トランスジェニック動物を生成し得る。遺伝子改変された胚性幹細胞を、従来技術にしたがって線維芽細胞に注入し、雌宿主哺乳動物を妊娠させた。次いで、ヘテロ接合性子孫を、PCRまたはサザンブロッティングなどの技術を使用して、標的遺伝子座部位の変化の存在についてスクリーニングし得る。同種の野生型宿主との交配後、得られたキメラ子孫を交差交配(cross-mated)させて、ホモ接合性宿主を得ることができる。

【0292】

免疫グロブリン遺伝子を変化させるためのターゲティングベクターでの胚性幹細胞の形質転換後、細胞を、適切な培地(例えば、ウシ胎児血清増強DMEM)中の支持層にプレートし得る。構築物を含む細胞を、選択培地の使用によって検出し、コロニーを十分な時間成長させた後、コロニーを選別し、相同組換えの発生について分析し得る。構築物配列を持つか持たないが、標的遺伝子座を対象とするプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応を使用し得る。次いで、相同組換えを示すコロニーを、胚の改変および胚盤胞注入に使用し得る。胚盤胞を、過剰排卵雌から得ることができる。次いで、胚性幹細胞をトリプシン処理し、胚盤胞を含む液滴に改変細胞を添加し得る。少なくとも1つの改変胚性幹細胞を、胚盤胞の胚盤腔に注入し得る。注入後、少なくとも1つの胚盤胞を、擬妊娠雌の各子宮角に戻すことができる。次いで、雌を認識させ、得られた同腹子を、構築物を有する変異細胞についてスクリーニングする。胚盤胞を、形質転換したES細胞と異なる起源のために選択する。胚盤胞およびES細胞の異なる表現型を得ることによって、キメラ子孫を容易に検出し、改変免疫グロブリン遺伝子の存在を探索するために遺伝子型同定を行うことができる。

10

20

【0293】

他の実施形態では、精子媒介遺伝子移入を使用して、本明細書中に記載の遺伝子改変された有蹄動物を生成し得る。内因性免疫グロブリン遺伝子の発現を排除するか、外因性免疫グロブリン遺伝子を挿入するための本明細書中に記載の方法および組成物を使用して、本明細書中に記載されているか当該分野で公知の任意の技術によって精子細胞を遺伝子改変し得る。次いで、遺伝子改変された精子を使用して、人工受精、細胞質内精子注入法、または他の公知の技術によって雌レシピエントを妊娠させることができる。1つの実施形態では、精子および/または精子の頭部を、外因性核酸と十分な時間インキュベートし得る。十分な時間には、約30秒間~約5分間、典型的には約45秒間~約3分間、より典型的には約1分間~約2分間が含まれる。特定の実施形態では、本明細書中に記載の有蹄動物中での外因性(例えば、ヒト)免疫グロブリン遺伝子の発現を、細胞質内精子注入法によって行うことができる。

30

【0294】

遺伝子移入のためのベクターとしての精子細胞の潜在的用途は、Brackettら、Proc, Natl. Acad. Sci. USA 68:353-357(1971)によって最初に示唆されていた。これに続いて、裸のDNAによってインキュベートされた精子での卵母細胞のインピトロでの受精後のトランスジェニックマウスおよびブタの生成が報告されたが(例えば、Lavitranoら、Cell 57:717-723(1989)およびGandolfiら、Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series 4, 10(1989)を参照のこと)、他の研究者はこれらの実験を繰り返すことができなかつた(例えば、Brinsterら、Cell 59:239-241(1989)およびGavoraら、Canadian Journal of Animal Science 71:287-291(1991)を参照のこと)。それ以来、ニワトリ(例えば、NakanishiおよびIritani, Mol. Reprod. Dev. 36:258-261(1993)を参照のこと);マウス(例えば、Maione, Mol. Reprod. Dev. 59:406(1998)を参照のこと);およびブタ(例えば、Lavitr

40

50

anoら、Transplant. Proc. 29:3508-3509 (1997); Lavitranoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14230-5 (2002); Lavitranoら、Mol. Reprod. Dev. 64-284-91 (2003)を参照のこと)における首尾のよい精子媒介遺伝子移入がいくつか報告されている。類似の技術は、以下にも記載されている: 2002年4月23日に付与された米国特許第6,376,743号; 2001年11月22日に公開された米国特許公開番号20010044937号および2002年8月8日に公開された同第20020108132号。

【0295】

他の実施形態では、細胞質内精子注入法を使用して、本明細書中に記載の遺伝子改変有蹄動物を生成し得る。受精卵母細胞の細胞質への外因性核酸および精子の同時挿入によってこれを行って、トランスジェニック受精卵母細胞を形成し、トランスジェニック受精卵母細胞をトランスジェニック胚、必要に応じて、生きた子孫に成長させることができる。精子は、膜破壊精子頭部または脱膜 (demenbrated) 精子頭部であり得る。同時挿入工程は、精子の外因性核酸との十分な時間 (例えば、約30秒間~約5分間、典型的には、約45秒間~約3分間、より典型的には約1分間~約2分間) のプレインキュベーションサブ工程を含み得る。精子および外因性核酸の卵母細胞への同時挿入を、微量注入によって行うことができる。精子と混合される外因性核酸は、本明細書中に記載の1つを超える導入遺伝子にトランスジェニックな胚を生成するための1つを超える導入遺伝子を含み得る。当該分野で公知の任意の技術によって細胞質内精子注入法を行うことができる (例えば、米国特許第6,376,743号を参照のこと)。特定の実施形態では、本明細書中に記載の有蹄動物中での外因性 (ヒトなど) 免疫グロブリン遺伝子の発現を、細胞質内精子注入法によって行うことができる。

【0296】

当該分野で公知の任意のさらなる技術を使用して、動物に導入遺伝子を導入し得る。このような技術には、以下が含まれるが、これらに限定されない: 前核微量注入 (例えば、Hoppe, P. C. and Wagner, T. E., 1989, 米国特許第4,873,191号を参照のこと); 生殖系列へのレトロウイルス媒介遺伝子移入 (例えば、Vander Puttenら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152を参照のこと); 胚性幹細胞における遺伝子ターゲティング (例えば、Thompsonら、1989, Cell 56:313-321; Wheeler, M. B., 1994, WO94/26884を参照のこと); 胚のエレクトロポレーション (例えば、Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814を参照のこと); 細胞銃; トランスフェクション; 形質導入; レトロウイルス感染; アデノウイルス感染; アデノ随伴ウイルス感染; リポソーム媒介遺伝子移入; 裸のDNAの移入; および精子媒介遺伝子移入 (例えば、Lavitranora、1989, Cell 57:717-723を参照のこと) など。このような技術の概説については、例えば、Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229を参照のこと。特定の実施形態では、本明細書中に記載の有蹄動物外因性 (ヒトなど) 免疫グロブリン遺伝子の発現を、これらの技術によって行うことができる。

【0297】

(クローン化トランスジェニック子孫を生成するための体細胞核移植)

本発明のさらなる局面では、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の1つの対立遺伝子、任意選択的に両方の対立遺伝子を欠く有蹄動物 (ブタまたはウシなど) の細胞を、レシピエント細胞への核移植のドナー細胞として使用して、クローン化されたトランスジェニック動物を生成し得る。あるいは、有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子ノックアウトを胚性幹細胞中で作製し、次いで、これを使用して子孫を生成し得る。本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した機能的な有蹄動物の重鎖、軽鎖、および/または軽鎖の遺伝子の1つの

対立遺伝子を欠く子孫を交配して、メンデル型遺伝によって両対立遺伝子の機能性を欠く子孫をさらに生成し得る。

【0298】

別の実施形態では、本発明は、 $-1, 3$ -GT 遺伝子についてヘテロ接合性の雄ブタと $-1, 3$ -GT 遺伝子についてヘテロ接合性の雌ブタとの交配による、機能的な $-1, 3$ -GT 遺伝子のいかなる発現も欠く生きたブタの生成方法を提供する。1つの実施形態では、 $-1, 3$ -GT 遺伝子の1つの対立遺伝子をこの対立遺伝子の発現を妨害するように遺伝子改変されているので、ブタはヘテロ接合性である。別の実施形態では、 $-1, 3$ -GT 遺伝子の1つの対立遺伝子に点変異が存在するので、ブタはヘテロ接合性である。別の実施形態では、点変異は、 $-1, 3$ -GT 遺伝子のエクソン9の第2の塩基でのT G点変異であり得る。1つの特定の実施形態では、 $-1, 3$ -GT 遺伝子のエクソン9の第2の塩基でのT G点変異を含む雄ブタを、 $-1, 3$ -GT 遺伝子のエクソン9の第2の塩基でのT G点変異を含む雌ブタと交配させる、機能的な $-1, 3$ -GT のいかなる発現も欠くブタ動物の生成方法を提供する。

10

【0299】

本発明は、体細胞核移植による機能的な免疫グロブリン遺伝子を欠く動物（ブタなど）のクローニング方法を提供する。一般に、以下の工程：ドナー核供給源として使用すべき所望の分化細胞を得る工程と、動物から卵母細胞を得る工程と、卵母細胞を除核する工程と、例えば、融合または注入によって所望の分化細胞または細胞核を除核卵母細胞に移入してNT単位を形成する工程と、得られたNT単位を活性化する工程と、培養したNT単位を宿主動物に移入して、NT単位を胎児に成長させる工程とを含む核移植プロセスによって動物を生成し得る。

20

【0300】

核移植技術または核移植 (nuclear transplantation) 技術は、当該分野で公知である (Daiら、Nature Biotechnology 20:251-255; Polejaevaら、Nature 407:86-90 (2000); Campbellら、Theriogenology, 43:181 (1995); Collasら、Mol. Report Dev., 38:264-267 (1994); Keeferら、Biol. Reprod., 50:935-939 (1994); Simsら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6143-6147 (1993); WO94/26884; WO94/24274, およびWO90/03432, 米国特許第4,944,384号、および同第5,057,420号)。

30

【0301】

免疫グロブリン遺伝子を変化させるように改変したドナー細胞核を、レシピエント卵母細胞に移入する。この方法の使用は、特定のドナー細胞型に制限されない。ドナー細胞は、本明細書中に記載のとおりであり得る (例えば、Wilmutら、Nature 385:810 (1997); Campbellら、Nature 380:64-66 (1996); Daiら、Nature Biotechnology 20:251-255, 2002、またはCibelliら、Science 280:1256-1258 (1998)も参照のこと)。正常な核型の全細胞 (核移植で首尾よく使用し得る胚細胞、胎児細胞、成体細胞が含まれる) を使用し得る。胎児線維芽細胞は、特に有用なドナー細胞クラスである。一般に適切な核移植法は、Campbellら、Theriogenology 43:181 (1995), Daiら、Nature Biotechnology 20:251-255, Polejaevaら、Nature 407:86-90 (2000), Collasら、Mol. Reprod. Dev. 38:264-267 (1994), Keeferら、Biol. Reprod. 50:935-939 (1994), Simsら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:6143-6147 (1993), WO-A-9426884, WO-A-9424274, WO-A-9807841, WO-A-9003432, 米国特許第4,994,384号、および米国特許第5,057,420号に記載されている。分化したまたは少な

40

50

くとも部分的に分化したドナー細胞も使用し得る。休止期の核ドナー細胞は、インビトロで休止期に入るか休止期から出るように誘導し得る細胞である。先行技術の方法は、クローニング手順で胚細胞型も使用していた (Campbellら (Nature, 380: 64-68, 1996) および Sticeら (Biol. Reprod., 2054: 100-110, 1996))。

【0302】

体細胞性核ドナー細胞を、種々の異なる生物および組織 (皮膚、間充組織、肺、膵臓、心臓、腸、胃、膀胱、血管、腎臓、尿道、生殖器、および胚、胎児、または成体動物の全部または一部の脱凝集調製物などであるが、これらに限定されない) から得ることができる。本発明の適切な実施形態では、核ドナー細胞は、上皮細胞、線維芽細胞、神経系細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラノサイト、軟骨細胞、リンパ球 (BおよびT)、マクロファージ、単球、単核細胞、心筋細胞、他の筋細胞、extended細胞、卵丘細胞、上皮細胞、内皮細胞からなる群から選択される。別の実施形態では、核ドナーは胚性幹細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞として線維芽細胞を使用し得る。

10

【0303】

本発明の別の実施形態では、本発明の核ドナー細胞は、動物の胚細胞である。胚期、胎児期、または成体期での動物種の任意の胚細胞を、核ドナー細胞として使用し得る。適切な実施形態では、核ドナー細胞は、胚生殖細胞である。

【0304】

アクセプター細胞と確実に同調させるために、核ドナー細胞を、細胞周期の任意の段階 (G0、G1、G2、S、M) で停止させることができる。当該分野で公知の方法を使用して、細胞周期を改変し得る。細胞周期の調節方法には、以下が含まれるが、これらに限定されない: 培養細胞の接触阻害によって誘導されたG0休止期、血清または他の必須栄養素の除去によって誘導されたG0休止期、老化によって誘導されたG0休止期、特定の成長因子の添加によって誘導されたG0休止期、物理的または化学的手段 (熱ショック、高圧、または化学物質、ホルモン、成長因子、もしくは他の物質での他の処理など) によって誘導されたG0またはG1休止期、複製手順の任意の時点を妨害する化学物質での処理によるS期抑制、蛍光標識細胞分取、有糸分裂シェイクオフ (mitotic shake off)、微小管破壊薬での処理、または有糸分裂の進行を破壊する任意の化学物質を使用した選択によるM基抑制 (Freshney, R. I., 「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」 Alan R. Liss, Inc, New York (1983) 参照のこと)。

20

30

【0305】

卵母細胞の単離方法は、当該分野で周知である。本質的に、これは、動物の卵巣または生殖器官からの卵母細胞の単離を含み得る。容易に利用可能な卵母細胞の供給源は、食肉処理場の材料である。遺伝子改変、核移植、およびクローニングなどの技術の組み合わせのために、卵母細胞を、一般に、インビトロで変異させなければならず、その後、これらの細胞を核移植のためのレシピエント細胞として使用するか、精子細胞によって受精させて胚に成長させることができる。このプロセスは、一般に、哺乳動物卵巣 (例えば、食肉処理場から得たウシ卵巣) からの成熟 (前期I) 卵母細胞の回収、受精または除核前から卵母細胞が中期II段階に達するまで成熟培地中で卵母細胞を成熟させること (ウシ卵母細胞の場合、一般に、吸引後約18~24時間で起こる) が必要である。この期間は、「成熟期」として公知である。一定の実施形態では、未経産ブタ (gilt) から卵母細胞を得る。「未経産雌ブタ」は、子孫を産んだことのない雌ブタである。他の実施形態では、卵母細胞を、経産ブタ (sow) から得る。「経産ブタ」は、以前に子孫を産んでいる雌ブタである。

40

【0306】

中期II段階の卵母細胞は、レシピエント卵母細胞となることができ、この段階では、受精した精子と同様に卵母細胞が導入された核を処理するのに十分に「活性化」され得るか、活性化されると考えられる。インビボで成熟した中期II段階の卵母細胞を、核移植

50

技術で首尾よく使用されている。本質的に、成熟中期 I I の卵母細胞を、発情期発生またはヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) または類似のホルモンの注射から 35 ~ 48 時間後または 39 ~ 41 時間後に非過剰排卵動物または過剰排卵動物から外科的に回収し得る。卵母細胞を、適切な培地 (ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase) 溶液など) 中に入れることができる。

【0307】

約 10 ~ 40 時間、約 16 ~ 18 時間、約 40 ~ 42 時間、または約 39 ~ 41 時間の範囲の定時成熟期後、卵母細胞を除核し得る。除核前に、卵母細胞を取り出し、卵丘細胞の除去前に適切な培地 (1 mg/ml のヒアルロニダーゼを含む HECM など) に入れることができる。次いで、裸の卵母細胞を、極体についてスクリーニングし、極体の存在によって決定した中期 I I 卵母細胞を選択し、核移植に使用し得る。除核を以下に示す。

10

【0308】

公知の方法 (米国特許第 4,994,384 号に記載の方法など) によって除核を行うことができる。例えば、中期 I I 卵母細胞を、任意選択的に 7.5 μg/ml サイトカラシン B を含む HECM に入れるか (迅速な除核用)、適切な培地 (例えば、胚培養培地 (CR1aa) + 10% 発情期ウシ精子) に入れ、次いで、24 時間以下または 16 ~ 18 時間以下などで除核し得る。

【0309】

マイクロピペットを使用して顕微外科的に除核して極体および隣接細胞質を除去し得る。次いで、卵母細胞をスクリーニングして、首尾よく除核されているものを同定し得る。卵母細胞の 1 つのスクリーニング方法は、卵母細胞を 1 μg/ml 33342 Hoechst 色素の HECM 溶液で染色し、次いで、10 秒未満の紫外線照射下で卵母細胞を目視することである。次いで、首尾よく除核された卵母細胞を、適切な培養培地 (例えば、CR1aa + 10% 血清) に入れることができる。

20

【0310】

次いで、除核した卵母細胞と同種の 1 つの哺乳動物細胞を、NT 単位を生成するために使用した除核卵母細胞の卵黄周囲腔に移入し得る。当該分野で公知の方法にしたがって、哺乳動物細胞および除核卵母細胞を使用して、NT 単位を生成し得る。例えば、細胞を、電気融合によって融合し得る。原形質膜が一過性に破壊するのに十分な電気パルスの印加によって電気融合を行う。膜が迅速に再形成されるので、原形質膜のこの破壊は非常に短い。したがって、2 つの隣接する膜の破壊が誘導されて、再形成の際に脂質二重層が混ざり合う場合、2 細胞間に小さな通路を開けることができる。このような小開口部の熱力学的不安定性により、2 つの細胞が 1 つになるまで、開口部は大きくなる。例えば、Prather らの米国特許第 4,997,384 号を参照のこと。種々の電気融合培地を使用することができる。例えば、スクロース、マンノース、ソルビトール、およびリン酸緩衝溶液が含まれる。融合誘導因子としてセンダイウイルスを使用して融合を行うこともできる (Graham, Wister, Inot, Symp. Monogr., 9, 19, 1969)。また、エレクトロポレーション融合を使用するよりも、卵母細胞中に核を直接注入し得る。例えば、Collas および Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38: 264-267 (1994) を参照のこと。融合後、得られた融合 NT 単位を、活性化するまで適切な培地 (例えば、CR1aa 培地) に入れる。典型的には、その後短期間で (例えば、融合から 24 時間未満、約 4 ~ 9 時間後、または、最適には、1 ~ 2 時間後) 活性化し得る。特定の実施形態では、融合から少なくとも 1 時間後および成熟から 40 ~ 41 時間後に活性化する。

30

40

【0311】

NT 単位を、公知の方法によって活性化し得る。このような方法には、例えば、生理学的温度未満での NT 単位の培養、非常に低温 (cold) または実際には低温 (cool) での NT 単位のショックが含まれる。胚が通常曝露される生理学的温度条件と比較して低い室温で NT 単位を培養することによってこれを最も都合よく行うことができる。あるいは、公知の活性化剤の適用によって活性化し得る。例えば、受精時の精子による卵母細胞

50

胞の穿通により、融合前の卵母細胞を刺激して、より多数の生存可能な妊娠が得られ、核移植後に複数の遺伝的に同一の子牛が得られることが示されている。また、電気ショックおよび化学的ショックなどの処理を使用して、融合後のNT胚を活性化し得る。例えば、Susko - Parrishらの米国特許第5,496,720号を参照のこと。ECM 2001 Electrocell Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA) を使用して、5Vで5秒間のACパルスおよびその後の1.5kV/cmで60 μ 秒のDCパルスの印加によって融合および活性化を誘導し得る。さらに、卵母細胞中の2価陽イオンの増加および卵母細胞中の細胞タンパク質のリン酸化の減少を同時または連続的に行うことによって活性化し得る。一般に、例えば、イオノフォアの形態の2価の陽イオン（例えば、マグネシウム、ストロンチウム、バリウム、またはカルシウム）を卵母細胞の細胞質に導入することによってこれを行うことができる。2価陽イオンレベルの他の増加方法には、電気ショック、エタノールでの処理、およびケージ化(caged)キレート剤での処理が含まれる。公知の方法（例えば、キナーゼインヒビター（例えば、セリン-トレオニンキナーゼインヒビター（6-ジメチル-アミノプリン、スタウロスポリン、2-アミノプリン、およびスフィンゴシンなど）の添加）によってリン酸化を減少させることができる。あるいは、卵母細胞へのホスファターゼ（例えば、ホスファターゼ2Aおよびホスファターゼ2B）の導入によって、細胞タンパク質のリン酸化を阻害し得る。

10

【0312】

次いで、活性化NT単位（すなわち、「融合胚」）を、細胞コロニーが生成するまでインピットの培養培地中で培養し得る。胚の培養および維持に適切な培養培地は、当該分野で周知である。胚の培養および維持のために使用し得る公知の培地の例には、Ham F-10+10%ウシ胎児血清(FCS)、組織培養培地-199(TCM-199)+10%ウシ胎児血清、Tyrodes-アルブミン-ラクテート-ビルベート(TALP)、Dulbeccoリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、Eagle培地、Whitten培地が含まれ、1つの特定の例では、活性化NT単位を、NC SU-23培地にて、約38.6%の加湿5%CO₂大気下で約1~4時間培養し得る。

20

【0313】

その後、培養NT単位を、洗浄し、次いで、適切な培地を含み、適切なコンフルエントの支持細胞層を含み得るウェルプレートに入れることができる。適切な支持層には、例として、線維芽細胞および上皮細胞が含まれる。NT単位がレシピエント雌への移入または細胞コロニーを生成するために使用し得る細胞を得るために適切なサイズに到達するまで、NT単位を支持層上で培養する。これらのNT単位を、少なくとも約2~400細胞、約4~128細胞、または少なくとも約50細胞まで培養し得る。

30

【0314】

次いで、活性化NT単位を、雌ブタの卵管に移入し得る。1つの実施形態では、雌ブタは、発情期同調化レシピエント未経産ブタであり得る。交雑未経産ブタ(ラージホワイト/Duroc/Landrace)(280~400lb)を使用し得る。試料に混合した18~20mgのRegu-Mate(Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ)の経口投与によって未経産ブタをレシピエントブタと同調化し得る。Regu-Mateを、14日間連続して与えることができる。1000単位のヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG, Intervet America, Millsboro, DE)を、最後のRegu-Mate処置から約105時間後に筋肉内(i.m.)投与し得る。次いで、hCG注射から約22~26時間後に胚移入を行うことができる。1つの実施形態では、妊娠し、5匹の生きた子孫を得ることができる。別の実施形態では、妊娠を初期に終了させ、胚細胞を採取し得る。

40

【0315】

(所望のホモ接合性ノックアウトマウスの交配)

別の局面では、本発明は、免疫グロブリン遺伝子にヘテロ接合性雄と免疫グロブリン遺伝子にヘテロ接合性の雌との交配による、機能的免疫グロブリン遺伝子のいかなる発現も

50

欠く生きた動物の生成方法を提供する。1つの実施形態では、動物は、免疫グロブリン遺伝子の1つの対立遺伝子のこの対立遺伝子の発現を防止するための遺伝子改変により、ヘテロ接合性である。別の実施形態では、免疫グロブリン遺伝子の1つの対立遺伝子中の点変異の存在により、動物はヘテロ接合性である。さらなる実施形態では、このようなヘテロ接合性ノックアウトを、外因性免疫グロブリン(ヒトなど)を発現する有蹄動物と交配し得る。1つの実施形態では、内因性免疫グロブリンの少なくとも1つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物であって、免疫グロブリンが、重鎖、軽鎖、および軽鎖、またはその任意の組み合わせからなる群から選択される、トランスジェニック有蹄動物と、外因性免疫グロブリンを発現する有蹄動物との交配によって動物を得ることができる。別の実施形態では、重鎖、軽鎖、および軽鎖の1つの対立遺伝子の発現を欠くトランスジェニック有蹄動物と、外因性(ヒトなど)免疫グロブリンを発現する有蹄動物との交配によって動物を得ることができる。さらなる実施形態では、重鎖、軽鎖、および軽鎖の1つの対立遺伝子の発現を欠き、かつ外因性(ヒトなど)免疫グロブリンを発現するトランスジェニック有蹄動物と、重鎖、軽鎖、および軽鎖の1つの対立遺伝子の発現を欠き、かつ外因性(ヒトなど)免疫グロブリンを発現する別のトランスジェニック有蹄動物とを交配し、それにより、重鎖、軽鎖、および軽鎖の1つの対立遺伝子の発現を欠き、かつ外因性(ヒトなど)免疫グロブリンを発現するホモ接合性トランスジェニック有蹄動物が生成されることによって動物を得ることができる。このような動物の生成方法も提供する。

10

20

【0316】

1つの実施形態では、免疫グロブリン遺伝子が二重ノックアウトされているドナー細胞由来の核移植から生成した性的に成熟している動物を交配し、その子孫を、ホモ接合性ノックアウトについて試験し得る。次いで、これらのホモ接合性ノックアウト動物を交配して、より多くの動物を生成し得る。

【0317】

別の実施形態では、性的に成熟している二重ノックアウト動物由来の卵母細胞を、2つの遺伝的に異なるブタ系列由来の野生型精子を使用してインビトロで受精させ、適切な代理動物に胚を移植し得る。これらの交配由来の子孫を、ノックアウトの存在について試験し得る。例えば、これらを、cDNA配列決定および/またはPCRによって試験し得る。次いで、性的に成熟時に、これらの各同腹子由来の動物を作製し得る。本発明の局面の一定の方法では、早期に妊娠を終了させ、それにより、胎児線維芽細胞を単離し、表現型および/または遺伝子型についてさらに特徴づけることができる。次いで、免疫グロブリン遺伝子の発現を欠く線維芽細胞を、本明細書中に記載の方法にしたがって核移植のために使用して、複数を妊娠させ、所望の二重ノックアウトを保有する子孫を生成し得る。

30

【0318】

(さらなる遺伝子改変)

他の実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した機能的免疫グロブリンの発現を欠く動物または細胞は、異種抗原の発現を排除するためのさらなる遺伝子改変を含み得る。本明細書中に記載のトランスジェニック細胞および動物から得た細胞のさらなる遺伝子改変、または本明細書中に記載の動物と、さらに遺伝子改変した動物との交配によるさらなる遺伝子改変を行うことができる。このような動物を、1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子、CMP-Neu5Acヒドロキシラーゼ遺伝子(例えば、USSN 10/863, 116号を参照のこと)、iGb3シンターゼ遺伝子(例えば、米国特許出願60/517, 524号を参照のこと)、および/またはForsmanシンターゼ遺伝子(例えば、米国特許出願60/568, 922号を参照のこと)の少なくとも1つの対立遺伝子の発現を排除するように改変し得る。さらなる実施形態では、本明細書中に開示の動物はまた、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、および/またはグルコシルトランスフェラーゼファミリーの任意のメンバーを発現するための遺伝子改変を含み得る。これらのさらなる遺伝子改変を達成するために、1つの実施形態では、複数の遺伝子が改変されるよう

40

50

に細胞を改変し得る。他の実施形態では、動物を交配させて、複数の遺伝子を改変し得る。1つの特定の実施形態では、本明細書中に記載のプロセス、配列、および/または構築物にしたがって生成した機能的免疫グロブリンの発現を欠く動物(ブタなど)を、
- 1
、3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ発現を欠く動物(ブタなど)と交配し得る(例えば、WO04/028243号に記載)。

【0319】

別の実施形態では、外因性拒絶を担うさらなる遺伝子の発現を、排除または減少させることができる。このような遺伝子には、CMP-NEUAcヒドロキシラーゼ遺伝子、イソグロビオシド3シンターゼ遺伝子、およびForsmanシンターゼ遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。さらに、補体媒介溶解の抑制を担う補体関連タンパク質をコードする遺伝子またはcDNAを、本発明の動物および組織中で発現することもできる。このような遺伝子には、以下が含まれるが、これらに限定されない：CD59、DAF、MCP、およびCD46(例えば、WO99/53042号；Chenら、Xenotransplantation, Volume 6 Issue 3頁194 - August 1999(CD59/DAF導入遺伝子を発現するブタを記載している)；Costaら、Xenotransplantation, 2002 Jan; 9(1): 45 - 57(ヒトCD59およびH-トランスフェラーゼを発現するトランスフェニックブタを記載している)；Zhaoら；DiamondらTransplantation, 2001 Jan 15; 71(1): 132 - 42(ヒトCD46トランスジェニックブタを記載している)。

10

20

【0320】

さらなる修飾には、以下が含まれ得る：組織因子経路インヒビター(TFPI)、ヘパリン、アンチトロンピン、ヒルジン、TFPI、ダニ抗凝固ペプチド、またはヘビ毒因子、(WO98/42850号および米国特許第6,423,316号、タイトル「Anticoagulant fusion protein anchored to cell membrane」などに記載)；または細胞によって細胞接着分子の発現が下方制御される抗体などの化合物(WO00/31126号、タイトル「Suppression of xenograft rejection by down regulation of a cell adhesion molecules」などに記載)、および外因性ドナー生物由来のCTLA-4の可溶性形態の器官レシピエントへの投与などによってシグナル2による同時刺激が妨害される化合物(例えば、WO99/57266号、タイトル「Immunosuppression by blocking T cell co-stimulation signal 2(B7/CD28 interaction)」に記載)。

30

【0321】

本発明の一定の局面を、以下の非限定的な実施例でより詳細に説明する。

【実施例】

【0322】

(実施例1：ブタ重鎖ターゲッティングおよび重鎖発現を欠くブタ動物の生成)

ブタIg重鎖遺伝子座の一部を、3X重複(redundant)ブタBACライブラリーから単離した。一般に、BACライブラリーを、ブタ総ゲノムDNAの断片化によって生成し、次いで、これを使用して、全動物のゲノムの3倍に相当するBACライブラリーを駆動し得る。次いで、ブタ重鎖免疫グロブリンを含むBACを、本明細書中に記載のブタ重鎖免疫グロブリンに選択性を示すプローブのハイブリダイズによって選択し得る。

40

【0323】

クローン由来の配列(配列番号1)を使用して、J領域の一部に相補的なプライマーを生成した(プライマーを、配列番号2に示す)。個別に、Ig重鎖μ定常領域の一部に相補的なプライマーをデザインした(プロモーターを、配列番号3に示す)。これらのプライマーを使用して、ブタIg重鎖の一部(配列番号4に示す)を増幅し、機能的連結領域(J領域)およびターゲッティングベクターのデザインおよび構築に十分に隣接した領域

50

を得た。このフラグメントおよびこのフラグメントのサブクローンを元の状態で維持するために、これらのフラグメントを保有する大腸菌 (Stable 2, Invitrogen、カタログ番号1026-019) を、30 で維持した。配列番号4の領域をサブクローン化し、これを使用して、配列番号5に示すターゲティングベクターをアセンブリした。このベクターを、ブタ胎児線維芽細胞にトランスフェクトし、その後、G418での選択に供した。得られたクローンを、PCRによってスクリーニングして、潜在的なターゲティング事象を検出した (配列番6および配列番号7、5'スクリーニングプライマー; および配列番号8および配列番号9、3'スクリーニングプライマー)。ターゲティングを示すスキームについては、図1を参照のこと。サザンブロッティングによってターゲティングを確認した。核ドナーとしてターゲティングされた胎児線維芽細胞を使用した核移植によって子孫を生成した。

10

【0324】

(核移植)

ターゲティングされた胎児線維芽細胞を、核ドナー細胞として使用した。当該分野で周知の方法によって核移植を行った (例えば、Daira, Nature Biotechnology 20:251-255, 2002; および Polejaeva, Nature 407:86-90, 2000を参照のこと)。

【0325】

ウシ血清アルブミン (BSA; 4 g l^{-1}) を含む予め加温した Dulbecco リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を使用した卵管の逆噴流によって、hCG 注入から46 ~ 54 時間後に卵母細胞を回収した (Polejaeva, I. A., ら (Nature 407, 86-90 (2000) に記載)。Polejaeva, I. A., ら (Nature 407, 86-90 (2000) に記載のように、インビトロで成熟させた卵母細胞 (BioMed, Madison, WI) の除核を、成熟から40 ~ 42 時間後に開始した。回収した卵母細胞を、 4 g l^{-1} BSA を含む38 の PBS で洗浄し、ライブラリーに輸送するために38 の無カルシウムリン酸緩衝化 NCSU-23 培地に移した。除核のために、本発明者らは、 $5 \mu \text{ g ml}^{-1}$ サイトカラシン B (Sigma) および $7.5 \mu \text{ g ml}^{-1}$ Hoechst 33342 (Sigma) を含む無カルシウムリン酸緩衝化 NCSU-23 培地中で卵母細胞を38 で20分間インキュベートした。次いで、第1の極体の真下の少量の細胞質を、 $18 \mu \text{ M}$ ガラスピペット (Humagen, Charlottesville, Virginia) を使用して吸引した。吸引した核質を紫外線に曝露して、中期板の存在を確認した。

20

30

【0326】

核移植のために、1つの線維芽細胞を、核除核卵母細胞と接触させて透明帯下に置いた。ECM2001 Electrocell Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA) を使用した5Vで5秒間のACパルスおよびその後の1.5 kV/cmで60 μ 秒のDCパルスの印加によって、融合および活性化を行った。融合した胚を、NCSU-23 培地にて、約38.6 の加湿5% CO₂ 大気下で約1 ~ 4 時間培養し、発情期同調レシピエント未経産ブタの卵管に移した。交配未経産ブタ (Large white/Duroc/Landrace) (280-400 lb) を、試料に混合した18 ~ 20 mg の Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) の経口投与によってレシピエントブタと同調化した。Regu-Mate を、14日間連続して与えた。ヒト絨毛ゴナドトロピン (hCG, 1000 単位; Intervet America, Millsboro, DE) を、最後の Regu-Mate 処置から約105時間後に筋肉内投与した。hCG 注射から約22 ~ 26 時間後に胚移入を行った。

40

【0327】

核移植によって、4つの同腹子から18頭の健康なブタが誕生した。これらの動物は、1つの機能的な野生型 Ig 重鎖遺伝子座および1つの破壊 Ig 重鎖遺伝子座を有する。

【0328】

50

【化 8 3】

配列番号2: J~C重鎖の増幅のためのButlerサブクローン由来のプライマー(637Xba5')	ggccagacttctctcggaacagctca
配列番号3: J~C重鎖の増幅のためのCのプライマー(JM1L)	tccaggagaaggtagcggagct
配列番号6: 5'スクリーニング用の重鎖5'プライマー(HCKOXba5'2)	tctagaagacgctggagagagccag
配列番号7: 5'スクリーニング用の重鎖3'プライマー(5'arm5')	taaagcgcagctccagactgcctt
配列番号5: 3'スクリーニング用の重鎖5'プライマー(NEO4425)	catgccttctatcgccttctt
配列番号9: 3'スクリーニング用の重鎖3'プライマー(650+CA)	Aagtaactgccgcctctcagga

10

20

細胞およびブタ組織サンプルのサザンプロット分析。細胞または組織サンプルを、溶解緩衝液(10 mM Tris (pH 7.5)、10 mM EDTA、10 mM NaCl、0.5% (w/v) Sarkosyl、1 mg/ml プロテイナーゼK)中で60で一晩溶解し、エタノールでDNAを沈殿させた。次いで、DNAを、NcoIおよびXbaI(使用プローブによる)で消化し、1%アガロースゲルで分離した。電気泳動後、DNAを、ナイロンメンブレンに移し、ジゴキシゲニン標識プローブ(NcoI消化物については配列番号4、XbaI消化物については配列番号40)で探索した。化学発光基質系(Roche Molecular Biochemicals)を使用してバンドを検出した。

30

【0329】

(重鎖サザン用のプローブ)

(HCJプローブ(XbaI消化物と使用))

【0330】

【化 8 4】

CTCTGCACTCACTACCGCCGGACGCGCACTGCCGTGCTGCCATGGACCA
CGCTGGGGAGGGGTGAGCGGACAGCACGTTAGGAAGTGTGTGTGCGCG
TGGGTGCAAGTCGAGCCAAGGCCAAGATCCAGGGGCTGGGCCCTGTGCC
AGAGGAGAATGGCAGGTGGAGTGTAGCTGGATTGAAAGGTGGCCTGAAGG
GTGGGGCATCCTGTTGGAGGCTCACTTCAGCCCCAGGGTCTCTGGTTC
CTGCCGGGGTGGGGGGCGCAAGGTGCCTACCACACCCTGCTAGCCCCCTCG
TCCAGTCCCAGGGCTGCCTCTTACCACGGAAGAGGATAAGCCAGGCTGC
AGGCTTCATGTGCGCCGTGGAGAACCCAGTTCGGCCCTTGGAGG (配列番号40)

40

(HC Muプローブ、(NcoI消化物と使用))

【0331】

【化 8 5】

GGCTGAAGTCTGAGGCCTGGCAGATGAGCTTGGACGTGCGCTGGGGAGTA
CTGGAGAAGGACTCCCGGGTGGGGACGAAGATGTTCAAGACGGGGGCTG
CTCCTCTACGACTGCAGGCAGGAACGGGGCGTCACTGTGCCGGCGGCACC
CGCCCCGCCCCGCCACAGCCACAGGGGGAGCCCAGCTCACCTGGCCCA
GAGATGGACACGACTTGGTGCCACTGGGGTGTGGACCTCGCACACCAG
GAAGGCCTCTGGGTCTGGGGGATGCTCACAGAGGGTAGGAGCACCCGGG
AGGAGGCAAGTACTTGCCGCCTCTCAGGACGG (配列番号41)

50

(実施例 2 : ブタ 軽鎖ターゲッティングおよび 軽鎖発現を欠くブタの生成)

ブタ Ig 軽鎖遺伝子座の一部を、3X重複 (redundant) ブタ BACライブラリーから単離した。一般に、BACライブラリーを、ブタ総ゲノムDNAの断片化によって生成し、次いで、これを使用して、全動物のゲノムの3倍に相当するBACライブラリーを誘導し得る。次いで、ブタ軽鎖免疫グロブリンを含むBACを、本明細書中に記載のブタ 差免疫グロブリンに選択性を示すプローブのハイブリダイズによって選択し得る。

【0332】

J領域の一部に相補的なプライマー (プライマーを、配列番号10に示す) および C領域の一部に相補的なプライマー (配列番号11に示す) を使用して、ブタ Ig 軽鎖 のフラグメントを増幅した。得られたアンプリマーを、プラスミドベクターにクローン化し、Stable 2細胞中にて30 で維持した (配列番号12)。略図については、図2を参照のこと。

10

【0333】

個別に、C領域の一部に相補的なプライマー (配列番号13) および エンハンサー領域の一部に相補的なプライマー (配列番号14) を使用して、ブタ Ig 軽鎖 のフラグメントを増幅した。得られたプライマーを、制限酵素によって断片化し、生成されたDNAフラグメントをクローン化し、30 でStable 2中に維持し、配列検定した。この配列決定の結果として、2つの非重複コンティグをアセンブリした (配列番号15、アンプリマーの5'部分および配列番号16、アンプリマーの3'部分)。下流コンティグ由来の配列 (配列番号16) を使用して、プライマー組 (配列番号17および配列番号18) をデザインし、これを使用して、エンハンサー (配列番号19) 付近の連続フラグメントを増幅した。配列番号12および配列番号19のサブクローンを使用して、ターゲッティングベクター (配列番号20) を構築した。このベクターを、ブタ胎児線維芽細胞にトランスフェクトし、その後、G418での選択に供した。得られたコロニーを、PCRによってスクリーニングして、潜在的なターゲッティング事象を検出した (配列番号21および配列番号22、5'スクリーニングベクター; および配列番号23および配列番号43、3'スクリーニングベクター、および配列番号24および配列番号24、内因性スクリーニングプライマー)。サザンプロットングによってターゲッティングを確認した。さらなる配列のクローニングによってサザンプロットストラテジーデザインを容易にし、これは、生殖系列 転写物 (配列番号25) のテンプレートに対応する。核移植によって胎児ブタを生成した。

20

30

【0334】

(核移植)

ターゲッティングされた胎児線維芽細胞を、核ドナー細胞として使用した。当該分野で周知の方法によって核移植を行った (例えば、Dai et al., Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002; および Polejaeva et al., Nature 407: 86-90, 2000を参照のこと)。

【0335】

ウシ血清アルブミン (BSA; 4 g l^{-1}) を含む予め加温した Dulbecco リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を使用した卵管の逆噴流によって、hCG注入から46~54時間後に卵母細胞を回収した (Polejaeva, I. A., et al (Nature 407, 86-90 (2000) に記載)。Polejaeva, I. A., et al. (Nature 407, 86-90 (2000) に記載のように、in vitroで成熟させた卵母細胞 (BioMed, Madison, WI) の除核を、成熟から40~42時間後に開始した。回収した卵母細胞を、 4 g l^{-1} BSAを含む38のPBSで洗浄し、ライブラリーに輸送するために38の無カルシウムリン酸緩衝化NC SU-23培地に移した。除核のために、本発明者らは、 $5 \mu \text{ g ml}^{-1}$ サイトカラシンB (Sigma) および $7.5 \mu \text{ g ml}^{-1}$ Hoechst 33342 (Sigma) を含む無カルシウムリン酸緩衝化NC SU-23培地中で卵母細胞を38で20

40

50

分間インキュベートした。次いで、第1の極体の真下の少量の細胞質を、18 μ M ガラスピペット (Humagen, Charlottesville, Virginia) を使用して吸引した。吸引した核質を紫外線に曝露して、中期板の存在を確認した。

【0336】

核移植のために、1つの線維芽細胞を、各除核卵母細胞と接触させて透明帯下に置いた。ECM2001 Electrocell Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA) を使用した5Vで5秒間のACパルスおよびその後の1.5kV/cmで60 μ 秒のDCパルスの印加によって、融合および活性化を行った。融合した胚を、NCSU-23培地にて、約38.6%の加湿5%CO₂大気下で約1~4時間培養し、発情期同調レシピエント未経産ブタの卵管に移した。交配未経産ブタ (large white/Duroc/Landrace) (280-400lb) を、試料に混合した18~20mgのRegu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) の経口投与によってレシピエントブタと同調化した。Regu-Mateを、14日間連続して与えた。ヒト絨毛ゴナドトロピン (hCG, 1000単位; Intervet America, Millsboro, DE) を、最後のRegu-Mate処置から約105時間後筋肉内投与した。hCG注射から約22~26時間後に胚移入を行った。

10

【0337】

ターゲティングされた細胞を使用した核移植によって、5つの同腹子から33頭の健康なブタが誕生した。これらのブタは、1つの機能的な野生型ブタI g 軽鎖 対立遺伝子および1つの破壊I g 軽鎖 対立遺伝子を有する。

20

【0338】

【化86】

配列番号10: J~KJ~C5' プライマー (kj c5' 1)	caaggaqaccaagctggaactc
配列番号11: KJ~C3' プライマー (kj c3' 2)	tgatcaagcacaccacagagacag
配列番号13: KC~E用の5' プライマー (porkCS1)	gatgccaagccatcgcgtttcacc

30

【0339】

【化 8 7】

配列番号 14 : κC~E用の3' プライマー (porKCA1)	tgaccaaagcagtgtagcgggttc
配列番号 17 : エンハンサー領域の増幅のためのκ5' プライマー (K3' arm1S)	ggatcaaacacgcacccatcggac
配列番号 18 : エンハンサー領域の増幅のためのκ3' プライマー (K3' arm1A)	ggtagtgaggcagtggtgagg
配列番号 21 : κスクリーニング、5' プライマー、5' (kappa5arms)	cgaacccctgtgtatagtt
配列番号 22 : κスクリーニング、3' プライマー、5' (kappaNeoA)	gagatgaggaagaggagaaca
配列番号 23 : κスクリーニング、5' プライマー、3' (kappaNeoS)	gcattgtctgagtaggtgctt
配列番号 24 : κスクリーニング、3' プライマー、5' (kappa5arm Probe3')	cgcttctgcagggaacacgat
配列番号 43 : κスクリーニング、3' プライマー (kappa3armA2)	GTCTTTGGTTTTTGCTGAGGGTT

10

20

細胞およびブタ組織サンプルのサザンプロット分析。細胞または組織サンプルを、溶解緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.5)、10 mM EDTA、10 mM NaCl、0.5% (w/v) Sarkosyl、1 mg/ml プロテイナーゼ K) 中で 60 で一晩溶解し、エタノールで DNA を沈殿させた。次いで、DNA を、SacI で消化し、1% アガロースゲルで分離した。電気泳動後、DNA を、ナイロンメンブレンに移し、ジ

30

【0340】

(サザン用のプローブ)

(Kappa5 Arm Probe 5' / 3')

【0341】

【化 8 8】

gaagtgaagccagccagttcctcctggcaggtggccaaaattacagttg
accctcctggtctggotgaacctgcccataatggtgacagccatctgg
ccagggccaggtctcccctgaagccttgggaggagaggagagtgcc
tgcccgatcacagatcggaagggtgctgacccctcaaccggggtgcaga
ctctgaggggtgggtctggcccaacacacccaaagcagccaggaagg
aaaggcagcttggatcactgcccagagctaggagagcaccgggaaat
gatctgccaagaccgttctgcttaaacctcggagggtcagatga
agtggtttttcttggcctgaagcatcgtgtccctgcaagaagcgg (配列番号 42)

40

(実施例 3 : ブタ 遺伝子座の特徴付け)

無効なブタ を破壊するために、J~C 発現カセットのコンカテマーを含む 遺伝子座領域を除去または破壊するターゲティングストラテジーを導いた。ブタゲノムの一部を含む BAC クローンを、生成し得る。ブタ Ig 鎖遺伝子座の一部を、3X 重複ブタ BAC ライブラリーから単離した。一般に、一般に、BAC ライブラリーを、ブタ総ゲノム DNA の断片化によって生成し、次いで、これを使用して、全動物のゲノムの 3 倍に相当す

50

る B A C ライブラリーを誘導し得る。次いで、ブタ 鎖免疫グロブリンを含む B A C を、本明細書中に記載のブタ 鎖免疫グロブリンに選択性を示すプローブのハイブリダイズによって選択し得る。

【 0 3 4 2 】

J ~ C 領域を含む B A C クローン (図 3 を参照のこと) を、独立して断片化し、プラスミドベクターにサブクローン化した。各サブクローンを、J ~ C イントロンの一部の存在について P C R によってスクリーニングした。一方の C 領域から次の C 領域までの増幅によってこれらのカセットのいくつかをクローン化した。任意の 1 つの C 領域内の多岐にわたって伸長するように配向したプライマーの使用によってこの増幅を行った (配列番号 2 6 および配列番号 2 7) 。首尾よく増幅させるために、伸長産物は、隣接 C 領域を起源とする伸長産物に収斂する (同一の C 領域と対立する) 。このストラテジーにより、主に、一方の C 領域から次の C 領域まで伸長したアンプリマーが生成される。しかし、いくつかのアンプリマーは、隣接 C から隣接 C を超えて存在する次の C にわたる増幅の結果である。これらの多遺伝子アンプリマーは、C の一部、次の J 単位 ~ C 単位の J および C 領域、第 3 の J 単位 ~ C 単位の J 領域、および第 3 の J 単位 ~ C 単位の C 領域の一部を含む。配列番号 2 8 は、1 つのこのようなアンプリマーであり、除去または破壊されなければならない配列を示す。

10

【 0 3 4 3 】

クローン化された他のブタ 鎖配列には、以下が含まれる：配列番号 3 2 (ブタ 軽鎖の第 1 の J / C 領域の 5 ' 隣接配列を含む) 、配列番号 3 3 (ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスター領域の 3 ' 隣接配列を含む (J / C の約 2 0 0 塩基対下流から)) 、配列番号 3 4 (ブタ 軽鎖ゲノム配列の J / C クラスター領域の 3 ' 隣接配列を含む (J / C クラスターの約 1 1 . 8 K b 下流)) 、配列番号 3 5 (の約 1 2 K b 下流を含む (エンハンサー配列が含まれる)) 、配列番号 3 6 (の約 1 7 . 6 K b 下流を含む) 、配列番号 3 7 (の y a k u 1 9 . 1 K b 下流を含む) 、配列番号 3 8 (の約 2 1 . 3 K b 下流を含む) 、配列番号 3 9 (の約 2 7 K b 下流を含む) 。

20

【 0 3 4 4 】

【 化 8 9 】

配列番号 2 6 : λ C ~ C アンプリマー用の 5 ' プライマー (1 a m C 5 ')	ccttctcctgcacctgtcaac
配列番号 2 7 : λ C ~ C アンプリマー用の 3 ' プライマー (1 a m C 3 ')	tagacacaccagggtggccttg

30

(実施例 4 : 遺伝子ターゲティングベクターの生成)

1 つの例では、J 1 の上流領域に相同な 1 つのアームおよび最後の C の下流の領域に相同な他のアームを使用して、ベクターをデザインし、構築した。J 1 の下流をターゲティングするように 1 つのターゲティングベクターをデザインした。本明細書中に記載されているか当該分野で公知の正および負の選択マーカーの任意の組み合わせを使用し得る。単純ヘルペスチミジンキナーゼ (T K) および T n 5 アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (N e o 耐性) 遺伝子のコード領域から構成される融合遺伝子を使用する。この融合遺伝子は、本明細書中に記載されているか当該分野で公知の任意の部位特異的リコンビナーゼ (S S R R S) の認識部位 (l o x 部位など) に隣接している。G 4 1 8 選択の使用によるターゲティングされた細胞の単離の際、マーカー遺伝子を欠失するために C r e がトランスで供給される (図 5 を参照のこと) 。マーカー遺伝子を欠失した細胞を、T K によって有毒産物 (ガンシクロビルなど) に代謝され得る当該分野で公知の任意の薬物の付加によって選択する。次いで、得られた遺伝子型を、第 2 ベクターでターゲティングする。第 2 のターゲティングベクター (図 6) を、最後の C の下流をターゲッ

40

50

ィングするようにデザインし、特異的リコンビナーゼ部位 (lox) と1つの端のみが隣接する正/負選択系を使用する。組換え部位を、第1のターゲッティング事象に関して離れて配置する。ターゲッティングされた遺伝子型の単離の際、第1のターゲッティング事象中で提供された組換え部位から第2のターゲッティング事象中で送達された組換え部位までの欠失を媒介するために、Creは、再度トランスで供給される。全J~Cクラスターが除去される。適切な遺伝子型を、ガンシクロピルの投与によって再度選択する。

【0345】

別の例では、挿入ターゲッティングベクターを使用して、独立して各C領域を破壊する。個別のC領域遺伝子を破壊するように挿入ターゲッティングベクターをデザインし、アセンブリする。J~Cクラスター中に少なくとも3つのJ~C領域が存在する。本発明者らは、第1および最後のC領域をターゲッティングし、かつターゲッティングベクター中に部位特異的リコンビナーゼ部位を含むようなベクターのデザインを始めている。一旦両インサートが作製されると、部位特異的リコンビナーゼを使用して、介在領域を欠失する。

10

【0346】

(実施例5: 単一ロックアウトブタを使用した重鎖単一ロックアウトの交配)

1つの破壊されたIg重鎖遺伝子座および1つの破壊されたIg軽鎖対立遺伝子の両方を有するブタを生成するために、単一ロックアウト動物を交配した。第1の妊娠によって4頭の胎児が得られ、そのうちの2頭は、PCRおよびサザンの両方によって重鎖およびターゲッティング事象について陽性とスクリーニングされた(プライマーについては、実施例1および2を参照のこと)。胎児線維芽細胞を単離し、拡大し、凍結した。重鎖単一ロックアウトを使用した単一ロックアウトの交配に由来する第2の妊娠により、4頭の健康な子豚が得られた。

20

【0347】

重鎖単一ロックアウトおよび鎖単一ロックアウトを含む胎児線維芽細胞を、さらなるターゲッティングに使用する。このような細胞を使用して、本明細書中に記載の方法および組成物によって遺伝子座をターゲッティングする。得られた子孫は、重鎖、鎖、および鎖についてヘテロ接合性ロックアウトである。これらの動物を、本明細書中に記載のヒトIg遺伝子を含む動物とさらに交配し、その後他の単一Igロックアウト動物と交配して、ヒトIg置換遺伝子を有する豚Ig二重ロックアウト動物が得られる。

30

【0348】

本発明を、その好ましい実施形態を参照して説明した。本発明の上記の詳細な説明から、本発明の種々の変更形態および修正形態が当業者に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0349】

【図1】図1は、ブタ重鎖免疫グロブリン遺伝子の連結領域の発現を破壊するターゲッティングベクターのデザインを示す。

【図2】図2は、ブタ軽鎖免疫グロブリン遺伝子の連結領域の発現を破壊するターゲッティングベクターのデザインを示す。

【図3】図3は、J~C配列のコンカテマーおよびJC領域の5'側に可変領域を含む隣接領域を含む、ブタ免疫グロブリン遺伝子座のゲノム組織化を示す。細菌人工染色体(BAC1およびBAC2)は、BACライブラリーから得ることができるブタ免疫グロブリンゲノムのフラグメントを示す。

40

【図4】図4は、ブタ軽鎖免疫グロブリン遺伝子のJCクラスター領域の発現を破壊するターゲッティングベクターのデザインを示す。「SM」は、ターゲッティングベクターで使用し得る選択マーカー遺伝子を示す。

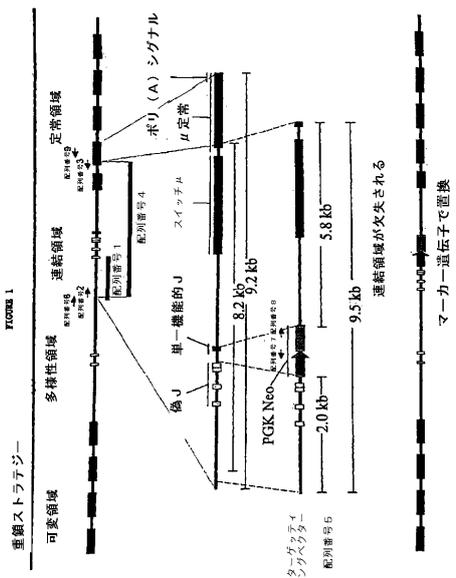
【図5】図5は、ブタ免疫グロブリン遺伝子座のJCクラスター領域の5'側の領域に部位特異的リコンビナーゼ標的的部位または認識部位を挿入するためのターゲッティングストラテジーを示す。「SM」は、ターゲッティングベクターで使用し得る選択マーカー遺伝子を示す。「SSRRS」は、特異的リコンビナーゼ標的的部位または認識部位を示す。

50

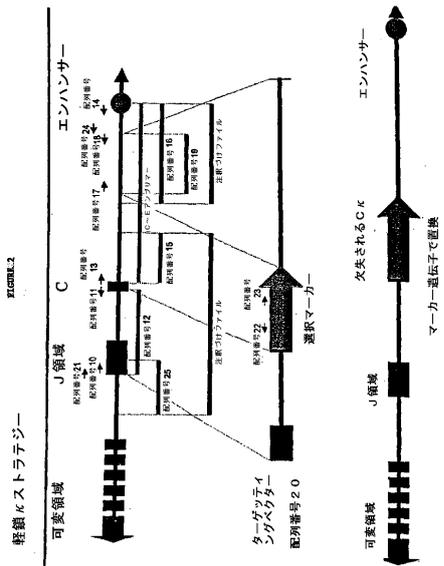
【図6】図6は、ブタ 免疫グロブリン遺伝子座のJ/Cクラスター領域の3'側の領域に部位特異的リコンビナーゼ標的的部位または認識部位を挿入するためのターゲッティングストラテジーを示す。「SM」は、ターゲッティングベクターで使用し得る選択マーカー遺伝子を示す。「SSRRS」は、特異的リコンビナーゼ標的的部位または認識部位を示す。

【図7】図7は、宿主ゲノムへのYACの部位特異的リコンビナーゼ媒介移入を示す。「SSRRS」は、特異的リコンビナーゼ標的的部位または認識部位を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

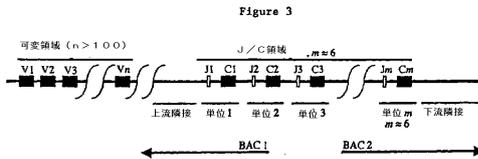


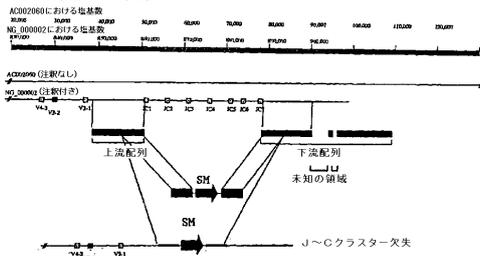
Figure 3

【 図 4 】

Figure 4

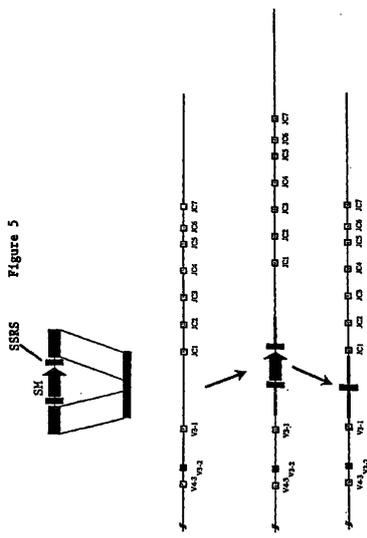
J-Cクラスターに隣接するプタスコンテイングを有するヒト配列
AC002060およびNG_000002のグラフ図

およよそのスケール：1ブロックは約1 kbである



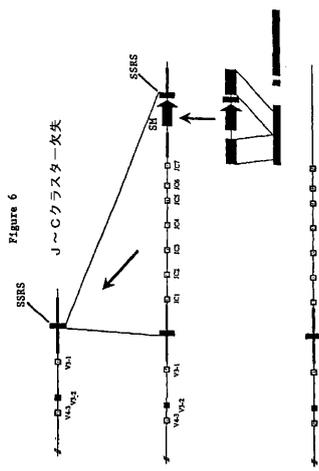
【 図 5 】

Figure 5



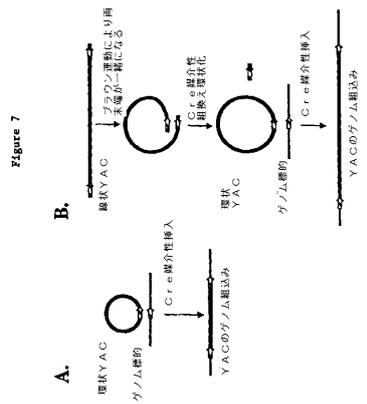
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【配列表】

2008517608000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/38582
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A01K 67/00(2006.01),67/033(2006.01),67/027(2006.01);C12N 15/00(2006.01) USPC: 800/8,14,15,17,21,22,24 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) U.S. : 800/8,14,15, 17,21,22,24 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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/02602 A1 (KUNCHERLAPATI et al.) 3 February 1994 (03.02.1994).	1-14, 17-25, 30-40, 105, 106, 108, 109, 111
X	US 2003/0056237 A1 (GOLDSBY et al) 20 March 2003 (20.03.2003).	1-14, 17-25, 30-40, 105, 106, 108, 109, 111
X	US 2004/0068760 A1 (ROBL et al) 08 April 2004 (08.04.2004), page 8, paragraphs 46-47; page 19, paragraph 166; Example 1, page 22, for example.	1-14, 17-25, 30-40, 105, 106, 108, 109, 111
X	US 2003/0037347 A1 (ROBL et al) 20 February 2003 (20.02.2003), page 2, paragraph 13 and paragraph 20, for example.	1-14, 17-25, 30-40, 105, 106, 108, 109, 111
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"I" 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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 December 2006 (23.12.2006)		Date of mailing of the international search report 23 FEB 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Thaian N. Ton  Telephone No. 571-272-0500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/38582

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-14,17-25,30-40,108,109,111,405 and 406

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/38582**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

Group I, claim(s) 1-14, 17-25, 30-40, 105, 106, 108, 109, 111, drawn to a transgenic ungulate that lacks any expression of functional endogenous immunoglobulins.

Group II, claim(s) 15, 16, 26-29, 41, 42 and 110, drawn to a transgenic ungulate that lacks any functional expression of endogenous immunoglobulins and expresses an xenogenous immunoglobulin locus, wherein the xenogenous immunoglobulin is contained on an artificial chromosome. Note: 2 claim number 15 exist, both are included in this group.

Group III, claim(s) 43-50, drawn to methods of producing xenogenous antibodies comprising administering one or more antigens of interest to an ungulate whose cells comprise one or more artificial chromosomes and lack any expression of functional endogenous immunoglobulin.

Group IV, claim(s) 51-53, 55-58, drawn to an isolated nucleotide sequence comprising porcine heavy chain immunoglobulin or fragment thereof, wherein the heavy chain immunoglobulin comprises SEQ ID NO: 29, a sequence 80, 85, 90, 95, 98 or 99% homologous to SEQ ID NO: 29, nucleotide sequences that contain residues 1-9070 of SEQ ID NO: 29, or 9070-11039 of SEQ ID NO: 29, or sequences that hybridize to SEQ ID NO: 29.

Group V, claim(s) 54, 56, 58, drawn to an isolated nucleotide sequence comprising porcine heavy chain immunoglobulin or fragment thereof, wherein the heavy chain immunoglobulin comprises SEQ ID NO: 4, nucleotide sequences that contain at least 17, 20, 25 or 30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 4, or sequences that hybridize to SEQ ID NO: 4.

Group VI, claim(s) 59-65, drawn to targeting vectors comprising a first nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 29, a selectable marker gene, a second nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 29, which does not overlap with the first nucleotide sequence, cells comprising the targeting vector, and animals comprising the cell.

Group VII, claim(s) 66-70, 72, 73, drawn to an isolated nucleotide sequence comprising an ungulate kappa light chain, wherein the sequence comprises SEQ ID NO: 30, and nucleotide sequences that contain at least 17, 20, 25 or 30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 30, and an isolated nucleotide sequence that hybridizes to SEQ ID NO: 30.

Group VIII, claim(s) 66, 69 71-73, drawn to an isolated nucleotide sequence comprising an ungulate kappa light chain, wherein the sequence comprises SEQ ID NO: 12, and nucleotide sequences that contain at least 17, 20, 25 or 30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 12, and an isolated nucleotide sequence that hybridizes to SEQ ID NO: 12.

Group IX, claim(s) 74-80, drawn to a targeting vector comprising a first nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 30, a selectable marker gene, a second nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 30, which does not overlap with the first nucleotide sequence, cells comprising the targeting vector, and animals comprising the cell.

Group X, claim(s) 81-85, 87-89, drawn to an isolated ungulate lambda light chain immunoglobulin locus, wherein the locus comprises a concatamer of J to C units, represented by SEQ ID NO: 31, nucleotide sequences that contain at least 17, 20, 25 or 30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 31, and an isolated nucleotide sequence that hybridizes to SEQ ID NO: 31.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/38582

Group XI, claim(s) 81, 85, 86, 88, 89, drawn to drawn to an isolated ungulate lambda light chain immunoglobulin locus, wherein the locus comprises a concatamer of J to C units, represented by SEQ ID NO: 28, nucleotide sequences that contain at least 17, 20, 25 or 30 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 28, and an isolated nucleotide sequence that hybridizes to SEQ ID NO: 28.

Group XII, claim(s) 90-96, drawn to a targeting vector comprising a first nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 28, a selectable marker gene, a second nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 28, which does not overlap with the first nucleotide sequence, cells comprising the targeting vector, and animals comprising the cell.

Group XIII, claim(s) 90-96, drawn to a targeting vector comprising a first nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 31, a selectable marker gene, a second nucleotide sequence comprising at least 17 contiguous nucleic acids homologous to SEQ ID NO: 31, which does not overlap with the first nucleotide sequence, cells comprising the targeting vector, and animals comprising the cell.

Group XIV, claim(s) 97-104, drawn to methods of circularizing at least 100 kb of DNA.

Group XV, claim(s) 107, drawn to methods to produce a transgenic ungulate.

Group XVI, claim(s) 112-114, drawn to a transgenic ungulate that comprises additional genetic modifications to eliminate expression of a xenoantigen.

The inventions listed as Groups I-XVI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Unity of Invention between different categories of inventions will only be found to exist if specific combinations of inventions are present. Those combinations include:

- 1) A product and a special process of manufacture of said product
- 2) A product and a process of use of said product
- 3) A product, a special process of manufacture of said product, and a process of use of said product
- 4) A process and an apparatus specially designed to carry out said process
- 5) A product, a special process of manufacture of said product, and an apparatus specially designed to carry out said process.

The allowed combinations do not include multiple products, multiple methods of using said products, and methods of making multiple products as claimed in the instant invention.

37 CFR 1.475 (c) states that:

"If an application contains claims to more or less than one of the combination of categories of invention set forth in paragraph (b) of this section, unity of invention might not be present."

37 CFR 1.475 (d) states:

"If multiple products, processes of manufacture or uses are claimed, the first invention of the category first mentioned in the claims of the application and the first recited invention of each other categories related thereto will be considered as the main invention in the claims, see PCT Article 17(3)(a) and 1.476(c)."

37 CFR 1.475(e) states:

"The determination whether a group of inventions is so linked as to form a single general inventive concept shall be made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternative within a single claim."

Groups I-XVI lack the same or corresponding special technical feature. The technical feature of Groups I-XVI is determined to be a mammal or transgenic ungulate that lacks any expression of functional endogenous immunoglobulins and expresses a xenogenous immunoglobulin locus. However, this fails to provide a special technical feature, because a "special technical feature" is defined as one that defines a contribution over the prior art (see PCT Rule 13.2). The mammal, as instantly claimed, does not contribute to the prior art, because this mammal is known. For example, Robl *et al.* (Pub. No. US 2003/0037347 A1, published February 20, 2003), teach the production of transgenic bovine that have an inactivation and lack of expression in the endogenous antibodies, and the expression of xenogenous antibodies (see Abstract). They teach that the transgenic ungulate can have one or more mutations in the endogenous Ig genes and additionally, carry a xenogenous immunoglobulin that is contained within an artificial chromosome (p. 3, paragraph 25). Accordingly, unity of invention is lacking because the invention fails to have a corresponding special technical feature. Each of the nucleic acids has been designated as a different product because they represent distinct nucleic acids which encode distinct polypeptides that have different functions and/or modes of operation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/38582

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, LIFESCI
search terms: knockout, ungulate, bovine, porcine, exogenous, xenogeneic

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アヤレス, デイビッド

アメリカ合衆国 バージニア 24060, ブラックスバーク, セミノル ドライブ 300
Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA04 DA02 EA10 GA11
4B065 AA90X AA94Y AB01 BA01 CA44
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 EA20 FA74