

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6628285号
(P6628285)

(45) 発行日 令和2年1月8日 (2020. 1. 8)

(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019. 12. 13)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68 Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D

請求項の数 8 (全 83 頁)

(21) 出願番号	特願2016-501032 (P2016-501032)	(73) 特許権者	507371168
(86) (22) 出願日	平成26年3月10日 (2014. 3. 10)		ユニバーシティ オブ フロリダ リサー
(65) 公表番号	特表2016-515208 (P2016-515208A)		チ ファンデーション インコーポレーテ
(43) 公表日	平成28年5月26日 (2016. 5. 26)		ッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/022670		アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ
(87) 国際公開番号	W02014/159247		ル グリントー ホール 2 2 3
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成29年3月9日 (2017. 3. 9)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/786, 258	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	61/883, 219		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成25年9月27日 (2013. 9. 27)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A L S 関連ジアミノ酸リピート含有タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から得られる血液試料中の、ポリ (G l y - A l a)、ポリ (G l y - P r o)、ポリ (G l y - A r g)、ポリ (P r o - A l a)、またはポリ (P r o - A r g) タンパク質から選択される 1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを決定することを含み、対照レベルと比較して上昇した 1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルが、対象が A L S を有するかまたは A L S を発症する可能性が高いことを示す、

対象を、A L S を有するかまたは A L S を発症する可能性が高いものとして同定するための方法。

【請求項 2】

1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルが、アッセイを実施することにより決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アッセイが、免疫ベースアッセイを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

免疫ベースアッセイが、表 1、2、または 3 に記載の配列を含む抗原に特異的な単離抗体を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

免疫ベースアッセイが、1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質の C 末端

に特異的な単離抗体を含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

免疫ベースアッセイが、1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のジアミノ酸リピート領域に特異的な単離抗体を含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 7】

1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質が、ポリ (Pro-Ala) またはポリ (Pro-Arg) タンパク質から選択される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質が、2 つ以上のジアミノ酸リピート含有タンパク質である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国仮出願第 61/786, 258 号、2013 年 3 月 14 日出願の出願日の利益および米国仮出願第 61/883, 219 号、2013 年 9 月 27 日出願の出願日の利益を主張する。これらの参照された出願の両方の内容全体が、本明細書に参照により組み込まれる。

【0002】

連邦支援研究または開発

本発明は、アメリカ国立衛生研究所により授与された P O 1 N S 0 5 8 9 0 1 および R O 1 N S 0 4 0 3 8 9 の下での政府援助によりなされた。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

ヒト C 9 O R F 7 2 遺伝子のイントロン内の G G G G C C ヘキサヌクレオチド配列の伸長は、ヒトにおける筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭認知症の両方と関連付けられる。筋萎縮性側索硬化症 (A L S) は、急速に進行する衰弱、筋萎縮、筋痙直、発話困難 (構音障害)、嚥下困難 (嚥下障害)、および呼吸困難 (呼吸窮迫) を特徴とする様々な病因を有する消耗性疾患である。症状の順序および速度は人によって異なるとはいえ、最終的にはほとんどの対象が、歩行すること、自力でベッドから出ること、または自身の手および腕を使用することができなくなる。A L S を有する対象のほとんどが、通常は症状の発症の 3 年から 5 年以内に最終的に呼吸不全により死亡する。リルゾール (リルテック) は、A L S の唯一現在利用可能な処置であり、進行を遅らせ、生存率を限定的な範囲で増加させるのみである。前頭側頭認知症 (F T D) もまた破壊的な疾患群であり、脳の前頭葉および側頭葉の萎縮または縮化により生じる。この縮化または萎縮は、深刻な行動変化をもたらす。現在のところ、F T D の処置法は存在せず、F T D の症状を管理する限定的な薬物が存在するだけである。A L S および / または F T D を診断および処置するための新規方法は、A L S および F T D 対象に大きな利益をもたらすと考えられる。

【発明の概要】

【0004】

ヒト C 9 O R F 7 2 遺伝子のイントロン内の G G G G C C ヘキサヌクレオチド配列の伸長は、ヒトにおける筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭認知症の両方と関連付けられる。本明細書に記載のとおり、C 9 O R F 7 2 遺伝子のイントロン内の伸長 G G G G C C ヘキサヌクレオチドリピート配列は、センスおよびアンチセンスの両方の方向にヘキサヌクレオチドリピートを含有する R N A 転写物がもたらされるように転写されることが見出された。これらのセンスおよびアンチセンス転写物は、翻訳されてジアミノ酸リピート含有タンパク質をもたらすことが見出された。センス転写物 (5' - G G G G C C - 3' ヘキサヌクレオチドリピートを含有する) は、リピート関連非 A T G (R A N) 翻訳を通じて翻

10

20

30

40

50

訳され、結果としてポリ (G l y - A l a)、ポリ (G l y - P r o)、およびポリ (G l y - A r g) タンパク質がもたらされることが見出された。アンチセンス転写物 (5' - G G C C C C - 3' ヘキサヌクレオチドリピートを含有する) は、リピート関連非 A T G (R A N) 翻訳を通じて翻訳され、結果としてポリ (P r o - A l a)、ポリ (P r o - A r g)、ポリ (G l y - P r o) タンパク質がもたらされることが見出された。加えて、アンチセンス転写物は、A T G 開始翻訳を通じて翻訳され、M e t . . . ポリ (P r o - A r g) および M e t . . . ポリ (G l y - P r o) タンパク質をもたらしことが見出された。

【0005】

これらのジアミノ酸リピート含有タンパク質は、A L S 対象血液試料中に存在することが見出された。したがって、本開示の態様は、対象から得られる試料 (たとえば血液) 中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルの検出方法に関し、この方法は、対象の試料中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを測定することを含む。いくつかの態様において、ジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルの検出は、A L S もしくは F T D を有するかまたは A L S もしくは F T D を発症する可能性が高い対象を同定 (または診断) するかまたはその同定を補助 (または診断を補助) してもよい。代わりにまたは加えて、たとえば対象の血液試料中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルの検出は、対象を A L S または F T D の危険因子、たとえば対象のジアミノ酸リピート含有タンパク質または脳脊髄液中のタンパク質レベルの上昇を有するものとして同定 (または診断) するかまたはその同定を補助 (または診断を補助) してもよい。本開示の態様はまた、対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを減少または安定化させることによる、A L S または F T D を有する対象の処置に関する。

【0006】

加えて、アンチセンス転写物 (5' - G G C C C C - 3' ヘキサヌクレオチドリピートを含有する) の発現は、対照と比較して、伸長 G G G G C C ヘキサヌクレオチドリピートを有する対象において大きく上昇することが見出された。C 9 O R F 7 2 遺伝子のイントロン内の伸長 G G G G C C ヘキサヌクレオチドリピート配列を有する患者の脳および血液細胞における蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション (F I S H) を使用して、センスおよびアンチセンス転写物の凝集もまた検出可能であった。したがって、本開示の他の態様は、ヘキサヌクレオチドリピート含有転写物の検出方法に関し、この方法は、ヘキサヌクレオチドリピート含有転写物レベルを測定することおよび/またはヘキサヌクレオチドリピート含有転写物凝集の存在もしくは非存在を測定することを含む。いくつかの態様において、ヘキサヌクレオチドリピート含有転写物の検出は、対象を A L S もしくは F T D を有するかまたは A L S もしくは F T D を発症する可能性が高いものとして同定 (または診断) するかまたはその同定を補助 (または診断を補助) してもよい。代わりにまたは加えて、たとえば対象の血液試料中のヘキサヌクレオチドリピート含有転写物の検出は、対象を A L S または F T D の危険因子、たとえば対象のジアミノ酸リピート含有タンパク質または脳脊髄液中のタンパク質レベルの上昇を有するものとして同定 (または診断) するかまたはその同定を補助 (または診断を補助) してもよい。

【0007】

いくつかの態様において、本開示は、対象を A L S もしくは F T D を有するかまたは A L S もしくは F T D を発症する可能性が高いものとして同定するための方法に関し、この方法は、対象から得られる血液試料中の、ポリ (G l y - A l a)、ポリ (G l y - P r o)、ポリ (G l y - A r g)、ポリ (P r o - A l a)、ポリ (P r o - A r g)、M e t . . . ポリ (P r o - A r g) または M e t . . . ポリ (G l y - P r o) タンパク質から選択される 1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを決定することを含み、対照レベルと比較して上昇した 1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルは、対象が A L S もしくは F T D を有するかまたは A L S もしくは F T D を発症する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、1 つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルは、アッセイを実施することにより決定さ

れる。いくつかの実施形態において、アッセイは、免疫ベースアッセイを含む。いくつかの実施形態において、免疫ベースアッセイは、表1、2、または3に記載の配列を含む抗原に特異的な単離抗体を含む。いくつかの実施形態において、免疫ベースアッセイは、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のC末端に特異的な単離抗体を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、この方法は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルが対照レベルと比較して上昇した場合に、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象を処置することをさらに含む。いくつかの実施形態において、処置することは、対象に、リルゾール、パクロフェン、ジアゼパム、フェニトイン、トリヘキシフェニジルまたはアミトリプチリンのうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態において、処置することは、プラズマフェレーシスまたは骨髄移植から選択される処置を実施することをさらに含む。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、2つ以上のジアミノ酸リピート含有タンパク質である。

20

【0010】

本開示の他の態様は、ALSまたはFTDを有する対象を処置するための方法に関し、この方法は、対象の血中のポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることまたはその増加を予防することを含む。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることまたはその増加を予防することは、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質を対象の血液から除去することを含む。いくつかの実施形態において、対象の血液からの1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、プラズマフェレーシスまたは骨髄移植から選択される処置を使用して除去される。いくつかの実施形態において、骨髄移植は、同種骨髄移植である。

30

【0011】

また別の態様において、本開示は、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピートタンパク質に特異的な単離抗体に関する。いくつかの実施形態において、ジアミノ酸リピートタンパク質は、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される。いくつかの実施形態において、単離抗体は、表1、2、または3に記載の配列の配列または断片を含む抗原に特異的である。

40

【0012】

本開示の他の態様は、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定するための方法に関し、この方法は、対象から得られる血液試料中の、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび/または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを決定することを含み、対照レベルと比較して上昇した5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび/または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルは、対象がALSもしくはFTDを有するかま

50

たはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、このレベルは、アッセイを実施することにより決定される。いくつかの実施形態において、アッセイは、核酸ベースアッセイ、たとえばインサイチューハイブリダイゼーション（たとえば、FISH）またはRT-PCR（たとえば、定量RT-PCRまたは鎖特異的定量RT-PCR）を含む。いくつかの実施形態において、この方法は、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルが対照レベルと比較して上昇した場合に、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象を処置することをさらに含む。いくつかの実施形態において、処置することは、対象に、リルゾール、バクロフェン、ジアゼパム、フェニトイン、トリヘキシフェニジルまたはアミトリプチリンのうちの1つまたは複数を有効量投与することを含む。いくつかの実施形態において、処置することは、プラズマフェレーシスまたは骨髄移植から選択される処置を実施することを含む。いくつかの実施形態において、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルは、5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルである。

10

【0013】

本開示のまた他の態様は、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定するための方法に関し、この方法は、対象から得られる試料中の、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAを含有する凝集の存在または非存在を決定することを含み、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集の存在は、対象がALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、凝集の存在もしくは非存在または上昇したC9ORF72センスもしくはアンチセンスRNAレベルは、アッセイを実施することにより決定される。いくつかの実施形態において、アッセイは、核酸ベースアッセイ、たとえば鎖特異的RT-PCRまたはインサイチューハイブリダイゼーション（たとえば、FISH）を含む。

20

30

【0014】

本開示のまた他の態様は、トランスジェニックマウスに関する。いくつかの実施形態において、トランスジェニックマウスは、ヒトC9ORF72遺伝子および適宜ヒトフランキング配列を含む。いくつかの実施形態において、トランスジェニックマウスは、配列番号63を含む。

【0015】

これらおよび他の態様は、本明細書により詳細に記載され、非限定的な図面および実施例により例示される。

【0016】

図面についてまず記載する。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、転写物がC9ORF72遺伝子上でセンスおよびアンチセンス方向にもたらされること、ならびにリピート関連非ATG（RAN）翻訳タンパク質が、3つのすべてのリーディングフレームにおいてセンスおよびアンチセンスC9ORF72転写物の両方から翻訳されることを示す図である。この図はまた、Met...ポリ（Pro-Ar g）およびMet...ポリ（Gly-Pro）タンパク質が、アンチセンス転写物上のATG開始翻訳を通じて翻訳されることを示す。CT=c末端ドメインを含有すると予測されるおよび／または示される。*=タンパク質の末端（終止コドンによる）。M=メ

50

チオニン。

【図2A】図2Aは、細胞内でRAN翻訳タンパク質を発現させるための発現ベクターの図である。CMV＝サイトメガロウイルスプロモーター。6×Stop＝6つの終止コドン、各フレームに2つ。(GGGGCC)exp＝4、30、60、または120リピートで伸長するGGGGCCリピート配列。(GR)HA－(GP)Flag－(GA)MyC＝ポリ(Gly－Arg)、ポリ(Gly－Pro)、およびポリ(Gly－Ala)リピートタンパク質にそれぞれ対応するHA、flagまたはmycタグ。SV40poly(a)＝転写ターミネーターおよびポリAシグナル。

【図2B】図2Bは、GRおよびGP RAN翻訳タンパク質が、30、60または120GGGGCCリピート配列をトランスフェクトした細胞内で発現することを示すウェスタンブロットの写真である。

10

【図3】図3は、30、60または120GGGGCCリピート配列をトランスフェクトした細胞内でGP、GR、またはGA RANタンパク質を発現する細胞の免疫蛍光染色の写真である。

【図4】図4は、ポリ(GR)およびGR－c末端抗原の図ならびにポリ(GR)および(GR)－c末端抗体がポリ(GR) RANタンパク質を検出することを示す免疫蛍光染色の一連の写真である。

【図5】図5は、ポリ(GR)、ポリ(GP)、およびポリ(GA)ジアミノ酸リピート含有タンパク質をC9ORF72 ALS患者が発現することを示す、C9ORF72 ALS患者または対照患者からの組織の一連の写真である。

20

【図6】図6は、ポリ(PA)およびポリ(PR)ジアミノ酸リピート含有タンパク質をC9ORF72 ALS患者が発現することを示す、C9ORF72 ALS患者または対照患者からの組織の一連の写真である。

【図7A】図7Aは、GPリピートモチーフ(GP)または同じGP－RANタンパク質の特異C末端領域(GP－C)を認識するために生成された抗体が、20%の患者細胞内で共局在化することを示す、免疫蛍光染色の一連の写真である。GP－CおよびGPについて染色された細胞は、GP－RANタンパク質をセンス方向に発現し、GP染色のみを示す細胞は、アンチセンス鎖からRAN－GPまたはMet...GPを発現する。

【図7B】図7Bは、患者細胞内のGPおよびGP+GP－Cのパーセンテージを示すグラフである。

30

【図8】図8は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質がALSを有する対象の血液(PBL)および脳(FCX、前頭皮質)に見出されるが、対照には見出されないことを示す、ドットブロットの写真である。

【図9】図9は、GPリピートタンパク質がALSを有する対象の脳(FCX)に存在するが、対照には存在しないこと、ならびに、PAリピートタンパク質がALSを有する対象の血漿および血清に存在するが、対照には存在しないことを示す、ウェスタンブロットの写真である。

【図10】図10は、6X stops、CAGリピート領域、各CAGリピートフレームを検出するためのタグ、およびターミネーター配列を含有するRAN翻訳マウスモデルコンストラクトの概略図である。

40

【図11】図11は、ポリGlnタンパク質が、図10のコンストラクトを含有するRAN翻訳(RANT)マウスの脳内に蓄積したが、対照マウスには蓄積しなかったことを示す2枚の写真を示す。

【図12】図12は、G2C4アンチセンス転写物が鎖特異的RT－PCRにより上昇し、C9ORF72患者組織内にRNA凝集として蓄積することを示す、一連の概略図、グラフおよび画像である。(A)C9ORF72遺伝子ならびにアンチセンス転写物ならびに鎖特異的RT－PCRのためのプライマーおよびRACEプライマーの相対位置の概略図。(B)C9(+)およびC9(－)ALS患者の前頭皮質からのセンス(S)およびアンチセンス(AS)転写物(イントロン1bおよびエクソン1にまたがる)の鎖特異的RT－PCR。(C)C9(－)ALS患者と比較して、C9(+)において上昇したア

50

ンチセンスmRNAを示す鎖特異的qRT-PCR。(D)C9(−)の場合には見られなかった、C9(+)前頭皮質および末梢血白血球(PBL)におけるG2C4アンチセンスRNA凝集(矢頭印)を示す、G4C2-Cy3プローブとのインサイチュアハイブリダイゼーション。FCXにおける核酸凝集を矢頭印で示す。FCX=前頭皮質。PBL=末梢血白血球。

【図13】図13は、アンチセンスG₂C₄伸長のRAN翻訳についてのインビトロ(in vitro)での証拠および二重免疫検出方略を示す、一連の概略図、グラフおよび画像である。(A~C)(G₂C₄)_{EXP-3T}コンストラクト(A)のトランスフェクションから48時間後のHEK293T細胞の免疫プロット(B)およびIF染色(C)。トランスフェクト細胞内の(B)ウェスタンにより検出されたPRおよびGP伸長タンパク質ならびに(C)IFにより検出されたPA、PRおよびGP。(D)センスおよびアンチセンス転写物から翻訳された推定タンパク質の図。CT=C末端、f1~3:リーディングフレーム1~3。(E)α-PAウサギポリクローナル抗体の検証の例の要約。5'Flagエピトープタグ化PAタンパク質を有するコンストラクトをトランスフェクトしたHEK293T細胞のIF染色および対応する免疫プロット。リピートモチーフおよびCT領域に対して生成された8つの追加の抗体の追加の対照および検証については、図22および23を参照のこと。

【図14】図14Aおよび14Bは、G₂C₄ASリピートのRAN翻訳および毒性研究についてインビボ(in vivo)での証拠を示す、一連の画像およびグラフである。

(A)α-PA、α-PA-CT、α-PR、α-PR-CT抗体でプローブされたC9(+)およびC9(−)前頭皮質溶解物のドットプロット。(B)C9(+)およびC9(−)ALS前頭皮質溶解物の免疫プロット。(C)α-PA、α-PA-CT、α-PR、α-PR-CTおよびα-GP抗体で検出された、C9(+)ALS患者からの海馬神経細胞内のPA、PRおよびGPタンパク質凝集体のIHC検出。(D)マウスα-GP(矢頭印)およびウサギα-GP-CT(矢印)を用いたC9(+)海馬組織のIF染色であり、センス封入体は両方の抗体につて陽性(上パネル)、アンチセンス封入体はGPリピート抗体のみについて陽性(下パネル)である。(E)センス(S)およびアンチセンス(AS)染色を示す、より大きな領域のIF染色。(F)二重(センス)および単一(アンチセンス)標識化凝集体の定量。(G~J)RANおよびPR毒性研究。(G)G₂C₄伸長コンストラクト(+/-ATG-PR-3T)PRフレーム内の+/-ATG開始コドンおよび3'エピトープタグ。(H)(G)のコンストラクトをトランスフェクトした細胞内のPRおよびGPのレベルを示すタンパク質プロット。トランスフェクトHEK293T細胞の(I)LDHおよび(J)MTTアッセイ。

【図15】図15Aおよび15Bは、C9ORF72のアンチセンスおよびセンス両方の方向のRAN翻訳についてインビボでの証拠を示す、一連の画像である。センス(α-GR、α-GR-CT、α-GA、α-GP-CT)およびアンチセンス(α-PA、α-PA-CT、α-PR、α-PR-CT)に対する抗体ならびにセンスおよびアンチセンスの両方の方向に作製されたGPタンパク質を認識するα-GPを使用してIHCにより検出された細胞質封入体。凝集体は、C9(+)ALS剖検組織の海馬のアンモン角(CA)および歯状回(DG)領域ならびに運動皮質(MC)の神経細胞に見出された。

【図16】図16Aおよび16Bは、運動神経細胞内のクラスター化RANタンパク質凝集体およびRAN凝集体の一連の画像である。以下における細胞質α-GP凝集体を示すIHC。すなわち、(A)運動皮質の第III層内。(B)運動皮質の第V層内の上位運動神経細胞。(C)脊髄内の下位運動神経細胞(L-S₁C)。海馬の(D)アンモン角、CA、(E)および歯状回、DG領域内。(FおよびG)1人の患者からの前海馬台(PrSub)内の豊富なPAおよびPR細胞質封入体を示すIHC。

【図17】図17は、RANタンパク質のクラスター化染色の一連の画像である。(A)α-PA-CTを用いたIHC染色の低倍率画像は、領域I~IVにおいて染色度の変動を示し(灰色点が陽性)、挿入図は高倍率画像を示す。(B)領域Iからの凝集体の例は、リピートおよび特異C末端エピトープに対する抗体について類似する染色で、9つすべ

10

20

30

40

50

ての抗体に対する免疫活性を示す。

【図18】図18は、C9ORF72陽性ALS／FTD症例および対照における組織病理学的所見を要約する表である。

【図19】図19A～19Fは、一連の画像およびデータセットである。(A)は、C9(+)患者および正常対照のPBLのセンス(S)およびアンチセンス(AS)転写物(イントロン1にわたる)の鎖特異的RT-PCR検出を示す。(B)は、5'RACE産物の要約である。(C)は、細胞質RNA凝集の一例を示す、C9(+)症例からの前頭皮質のFISH染色を示す。(D)は、C9(+)においてアンチセンス(AS)G₂C₄およびセンス(S)G₄C₂RNA凝集の蓄積を示すが、C9(-)細胞において示さない、末梢血白血球のFISH染色を示す。(E)は、過量の非標識化(G₄C₂)₄オリゴがG₄C₂-Cy3アンチセンス(AS)の標識化を阻害するが、G₂C₄-Cy3標識化センス凝集を阻害しないことを示す、アンチセンス凝集特異性アッセイを示す。(F)は、予想されたDNase I耐性およびRNase I感受性を示すアンチセンスRNA凝集のための追加の対照を示す。

10

【図20】図20は、センスGGGGCCリピート伸長のRAN翻訳についてのインビトロでの証拠の一連の画像である。(A)は、上流の6X Stopカセットおよび各リーディングフレームに3'タグを有する、変化するGGGGCCリピート長を含有するコンストラクトを示す。30、60および120リピートを含有するコンストラクトをトランスフェクトした細胞内でRAN翻訳が3つすべてのフレーム(GP、GR、GA)において生じることを示す、免疫ブロット(B)および／または免疫蛍光染色(C)。

20

【図21】図21は、上から下にすべてのリーディングフレーム配列番号57～62についての、センスおよびアンチセンス方向の推定タンパク質産物の概略図である。下線配列を、ポリクローナル抗体を生成するために使用した。*=終止コドン。

【図22】図22A～22Eは、免疫蛍光およびタンパク質ブロットにより推定ポリPA、ポリPR、ポリGPタンパク質を検出するための二重抗体の検証を示す、一連の画像である。(A～D上)：内在性C末端配列を有するかまたは有しない、ATG開始N末端エピトープタグ化(V5またはFlag)リピートタンパク質を発現するコンストラクトの概略図。(A～D下パネル)、以下の新規開発抗体を使用した染色によるトランスフェクトHEK293T細胞内のα-Flagまたはα-V5染色の共局在。(A)α-PAまたはα-PA-CT(アンチセンス)、(B)α-PRまたはα-PR-CT、(C)ウサギα-GPまたはα-GP-CT(センス)、(D)マウスα-GP。類似の染色は、免疫前またはpcDNA3.1空ベクター対照においては見られなかった。(E)試験された7つの抗体のうち6つがまた、ウエスタンにより組換えタンパク質を検出することを示す、対応する免疫ブロット。

30

【図23】図23A～23Cは、追加のセンスリピートおよびC末端ポリクローナル抗体の検証を示す一連の画像である。(A、B上)：内在性C末端配列を有するATG開始N末端V5エピトープタグ化GRまたはGAリピートタンパク質を発現するコンストラクトの概略図。(A、B下パネル)、それぞれα-GR、α-GR-CTおよびα-GP-CTを用いた、トランスフェクトしたHEK293T細胞内のα-V5染色の共局在。類似する染色は、免疫前またはpcDNA3.1空ベクター対照においては見られなかった。(C)タンパク質ブロットによるFlag-GRトランスフェクト細胞内の組換えタンパク質のα-GR検出。

40

【図24】図24は、α-GP-CT、α-GR、α-GR-CTおよびα-GA抗体を用いた、C9(+)およびC9(-)ALS前頭皮質からの2%可溶性溶解物の免疫ブロットの一連の画像である。

【図25】図25は、センスおよびアンチセンスタンパク質に対する抗体を用いた、C9(-)ALS／FTD海馬断面の陰性IHC染色を示す、一連の画像である。

【図26】図26A～図26Dは、RAN翻訳およびPRタンパク質発現が細胞生存率に影響を及ぼすことを示す、グラフおよび一連の画像である。(A)qRT-PCRは、(-)ATG-PR-3Tおよび(+)ATG-PR-3Tコンストラクトをトランスフェ

50

クトしたHEK293T細胞内で伸長転写物の発現が類似することを示す。(B～D)空ベクター対照(pcdNA3.1)と比較した(－)ATG-PR-3TコンストラクトからのRNAおよびRANタンパク質を発現する細胞の細胞形態の変化ならびに増加したレベルのPRタンパク質を発現する(＋)ATG-PR-3T細胞内の悪影響を示す明視野顕微鏡画像。

【図27】図27は、RT-PCRおよびRACEのために使用されたプライマーを記載する表である(それら17個の配列番号は順番に、配列番号36、37、39、38、45～47、40、48～56)。

【図28】図28は、新規センスおよびアンチセンス抗体を記載する表である(順番に、配列番号20、23、19、25、21、21、22、18)。

10

【図29】図29は、トランスジェニックマウスを製造するために使用されたBACインサートの概略図である。

【図30】図30は、GGGGCCリピートを含有するヒトC9ORF72遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるセンスRNA凝集を示す一連の写真である。例示的な凝集を矢頭印により示す。

【図31】図31は、GGGGCCリピートを含有するヒトC9ORF72遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるアンチセンス(AS)RNA凝集を示す一連の写真である。例示的な凝集を矢頭印により示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

20

よく確立された翻訳開始規則が、遺伝子発現を理解し、疾患を引き起こす突然変異の結果を予測するための、分子生物学における基礎として使用されてきた。一般に、予測されるコーディングおよび非コーディング領域に位置するマイクロサテライト伸長突然変異(たとえば、CAG、CTG)は、タンパク質機能獲得もしくは喪失またはRNA機能獲得機構により疾患を引き起こすものと考えられてきた。翻訳の標準的規則はCTG・CAGリピート伸長に適用されず、CAGおよびCUG伸長転写物が、AUG開始コドンなしに3つすべてのフレーム内でホモポリマー伸長タンパク質を発現させることが以前に報告されてきた(たとえば、T. Zu et al., Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. PNAS 108, 260 (2011)を参照のこと)。AUG開始コドンから独立したこの翻訳は、リピート関連非ATG(RAN)翻訳と呼ばれる。RAN翻訳は、ヘアピン依存性であり、フレームシフトまたはRNAエディティングなしに生じる。RAN翻訳は、筋強直性ジストロフィー1型、筋強直性ジストロフィー2型、脊髄小脳失調症3型、脊髄小脳失調症8型およびハンチントン病と関連付けられるトリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、およびペンタヌクレオチドリピートから観察されてきた(PCT公開WO/2010/115033を参照のこと、これは本明細書に参照により組み込まれる)。

30

【0019】

C9ORF72遺伝子のイントロン内のGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートの伸長は、以前から筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭認知症の両方と関連付けられてきた。本明細書に記載のとおり、この伸長ヘキサヌクレオチドリピートは、C9ORF72遺伝子座からセンスおよびアンチセンスの両方の方向に発現するRNA転写物内に含有されることが見出されてきた。これらのヘキサヌクレオチドリピート含有転写物はRAN翻訳を受け、結果として、RNAから読まれるヘキサヌクレオチドリピートのフレームに応じて(センス転写物上の5'-GGGGCC-3'、5'-GGGCCG-3'、および5'-GGCCGG-3'、ならびにアンチセンス転写物上の5'-GGCCCC-3'、5'-GCCCCG-3'、および5'-CCCCGG-3'、図1を参照のこと)、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、またはポリ(Pro-Arg)タンパク質がもたらされることが見出された。加えて、アンチセンス転写物は、ATG開始翻訳を通じて翻訳され、Met...ポリ(Pro-Arg)およびMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質をもたらすこ

40

50

とが見出された。これらのRNAおよびATG開始タンパク質は、本明細書においてジアミノ酸リピート含有タンパク質と呼ばれる。センスおよびアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有転写物は、本明細書において、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA（センス）および5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA（アンチセンス）と呼ばれる。

【0020】

本明細書にさらに記載されるとおり、これらのジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ALSを有する対象からの血液試料中に存在することが予想外にも見出された。加えて、アンチセンス5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA転写物の発現は、伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列を含有するC9ORF72遺伝子を有する対象において大きく上昇することが見出された。さらに、センスおよびアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNA転写物の両方の凝集が、伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列を含有するC9ORF72遺伝子を有する対象に存在することが見出された。理論または機構に束縛されることを望まないが、ALSを有する対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質が時間経過とともに脳実質内に蓄積し、神経炎症性変化、CNS機能障害、および神経細胞死をもたらすと考えられる。したがって、本開示の態様は、対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルおよび／または対象からの試料中のヘキサヌクレオチドリピート含有RNAレベルを決定するための新規アッセイを提供することによる、ALSを有するかまたはALSを発症する可能性が高いものとしての対象の同定に関する。本開示の態様はまた、対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを減少または安定化させることによる、ALSまたはFTDを有する対象の処置に関する。

【0021】

ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象の同定

本開示の態様は、対象からの血液試料中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルに基づく、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象の同定に関する。いくつかの実施形態において、方法は、対象から得られる血液試料中の、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを決定することを含み、対照レベルと比較して上昇した1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルは、対象がALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルは、アッセイを実施することにより決定される。非限定的なアッセイを本明細書に記載する。

【0022】

本開示の他の態様は、対象からの試料中の5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルに基づく、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象の同定に関する。いくつかの実施形態において、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象の同定は、対象からの試料中の5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルに基づく。試料は、たとえば、対象から得られる流体または組織試料であってもよい。いくつかの実施形態において、方法は、対象から得られる血液試料中の、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを決定することを含み、対照レベルと比較して上昇したヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルは、対象がALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が

高いことを示す。いくつかの実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルは、アッセイを実施することにより決定される。非限定的なアッセイを本明細書に記載する。

【0023】

本開示のまた他の態様は、対象から得られる試料中の、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAを含有するRNA凝集の存在または非存在に基づく、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象の同定に関し、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集の存在は、対象がALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いことを示す。本明細書において使用される5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集は、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAおよび／または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの蓄積の面積を指し、これは核酸ベースアッセイ、たとえばFISHを使用して検出可能でありうる。いくつかの実施形態において、凝集は、たとえば、直径0.1から2マイクロメートル、直径0.1から1.5マイクロメートル、または直径0.1から1マイクロメートルであってもよい。いくつかの実施形態において、凝集は、少なくとも直径0.1マイクロメートルであってもよい。試料は2つ以上の凝集を含有していてもよいこと、ならびに、各凝集は異なるサイズであってもよいことが認められるべきである。たとえば、1つの凝集が直径0.2マイクロメートルであってもよく、一方で第2の凝集は直径1マイクロメートルであってもよい。凝集およびかかる凝集を検出する方法の非限定的な例は、実施例3に提供される。

【0024】

1つもしくは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベル、ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAのレベル、ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの存在もしくは非存在、またはそれらの任意の組合せに基づいて対象が同定されてもよいことが理解されるべきである。いくつかの実施形態において、この方法は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルが対照レベルと比較して上昇した場合に、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集(focus or foci)が試料中に存在する場合に、対象をALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルが対照レベルと比較して減少したかまたは同じである場合に、対象をALSもしくはFTDを有しないかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が低いものとして同定することをさらに含む。いくつかの実施形態において、この方法は、ヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集が試料中に存在しない場合に、対象をALSもしくはFTDを有しないかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が低いものとして同定することをさらに含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、対象の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルまたはアイデンティティが記録されてもよい。いくつかの実施形態において、記録には、対象のレベルまたはアイデンティティをコンピュータ、たとえば診療記録データベースに入力することが含まれる。

【0026】

本開示の他の態様は、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高いものとして同定される対象の処置に関する。本明細書において使用

される「処置する」または「処置」は、(a) A L SまたはF T Dの発症を予防するかまたは遅延させること、(b) A L SまたはF T Dの重症度を減少させること、(c) A L SまたはF T Dに特徴的な症状の発症を減少させるかまたは予防すること、(d) A L SまたはF T D症状の悪化を予防すること、および／または(e) 以前にA L SまたはF T Dの症状を示していた対象におけるA L SまたはF T D症状の再発を減少させるかまたは予防することを指す。

【0027】

いくつかの実施形態において、処置は、有効量の既知のA L S治療薬、たとえばリルゾール（リルテック、S a n o f i - A v e n t i s）を、A L Sを有するものとして同定される対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、処置は、有効量の既知のF T D治療薬、たとえばトラゾドン（デジレル、オレプトロ）または選択的セロトニン再取り込み阻害薬（S S R I）を、F T Dを有するものとして同定される対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、処置は、A L SまたはF T Dを有するものとして同定される対象における1つまたは複数のA L SまたはF T Dの症状を減少させる有効量の治療薬、たとえばバクロフェン、ジアゼパム、フェニトイン、トリヘキシフェニルおよび／またはアミトリプチリンを投与することを含む。いくつかの実施形態において、処置は、理学療法、作業療法、または言語療法のうちの1つまたは複数を含む。いくつかの実施形態において、処置は、対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを減少または安定化させるための本明細書に記載の方法、たとえば骨髄移植またはプラズマフェレーシスを含む。いくつかの実施形態において、処置は、上述の処置の任意の組合せまたは本明細書に記載の任意の他の処置を含む。

【0028】

有効量とは、医学的に所望される結果、たとえばA L SまたはF T Dの処置を提供するのに十分な治療薬の用量である。有効量は、処置される対象の年齢および健康状態、対象におけるA L SまたはF T Dの重症度、処置の持続期間、任意の併用療法の性質、具体的な投与経路等の保健従事者の知識および専門的意見の範囲内の要因とともに変化するであろう。

【0029】

処置の投与は、当技術分野において知られている任意の方法により達成されてもよい（たとえば、Harrison's Principle of Internal Medicine, McGraw Hill Inc.を参照のこと）。投与は局所または全身投与であってもよい。投与は、非経口（たとえば、静脈内、皮下、または皮内）または経口投与であってもよい。様々な投与経路のための組成物が、当技術分野においてよく知られている（たとえば、Remington's Pharmaceutical Science by E. W. Martinを参照のこと）。用量は、対象および投与経路次第であろう。用量は、当業者により決定されうる。

【0030】

本開示の他の態様は、A L SもしくはF T Dを有するかまたはA L SもしくはF T Dを有すると疑われる対象において処置に対する応答性をモニタリングするための方法に関する。いくつかの実施形態において、この方法は、第1の時点で対象から得られる血液試料中の、ポリ（G l y - A l a）、ポリ（G l y - P r o）、ポリ（G l y - A r g）、ポリ（P r o - A l a）、ポリ（P r o - A r g）、M e t . . . ポリ（P r o - A r g）またはM e t . . . ポリ（G l y - P r o）タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質の第1のレベルを決定すること、ならびに、第2の時点で対象から得られる血液試料中の、ポリ（G l y - A l a）、ポリ（G l y - P r o）、ポリ（G l y - A r g）、ポリ（P r o - A l a）、ポリ（P r o - A r g）、M e t . . . ポリ（P r o - A r g）またはM e t . . . ポリ（G l y - P r o）タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質の第2のレベルを決定することを含み、第1のレベルと比較して上昇したかまたは同じである第2のレベルは、対象が処置に対して無応答性であるかまたは無応答性である可能性が高いことを示し、第1のレベルと比較して減少した第2のレベルは、対象が処置に対して応答性であるかまた

は応答性である可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、第1の血液試料は対象の処置前に得られ、第2の血液試料は、対象の処置中または処置後に得られる。この方法はまた、ジアミノ酸タンパク質のレベルに加えてまたはその代わりに、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルまたはヘキサヌクレオチドリピート伸長含有RNAの凝集の存在もしくは非存在を決定することにより実施されてもよい。

【0031】

本明細書において使用される「上昇した」は、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルが、対照レベル、たとえば対照試料中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAの所定の閾値またはレベルを超えていることを意味する。対照および対照レベルは本明細書に詳細に記載されている。上昇したレベルは、たとえば、対照レベルを1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上超えるレベルを含む。上昇したレベルはまた、現象をゼロ状態（たとえば、ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNA発現が存在しないかまたは検出不能である）から、非ゼロ状態（たとえば、ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAがある程度存在するかまたは検出可能である）まで増加させることを含む。

10

【0032】

本明細書において使用される「減少した」は、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルが、対照レベル、たとえば対照試料中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAの所定の閾値またはレベルを下回ることを意味する。対照および対照レベルは本明細書に詳細に記載されている。減少したレベルは、たとえば、対照レベルを1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、またはそれ以上下回るレベルを含む。減少したレベルはまた、現象を非ゼロ状態（たとえば、ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAがある程度存在するかまたは検出可能である）から、ゼロ状態（たとえば、ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNA発現が存在しないかまたは検出不能である）まで減少させることを含む。

20

30

【0033】

ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよびジアミノ酸リピート含有タンパク質
本明細書に記載のとおり、C9ORF72遺伝子のイントロン内の伸長GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列は、センスおよびアンチセンスの両方の方向にヘキサヌクレオチドリピートを含有するRNA転写物がもたらされるように転写されることが見出された。ヒトC9ORF72遺伝子のGenBank Gene IDは203228である。センスおよびアンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有転写物の両方が、AUG開始コドンから独立した翻訳[リピート関連非ATG(RAN)翻訳]を受け、結果として、読まれるヘキサヌクレオチドリピートのフレームに応じて（センス転写物上の5'-GGGGCC-3'、5'-GGGCCG-3'、および5'-GGCCGG-3'、ならびにアンチセンス転写物上の5'-GGCCCC-3'、5'-GCCCCG-3'、および5'-CCCCGG-3'、図1を参照のこと）、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、またはポリ(Pro-Arg)ジアミノ酸リピート含有タンパク質がもたらされることを見出された。加えて、アンチセンスヘキサヌクレオチドリピート含有転写物は、ATG開始翻訳を通じて翻訳され、Met...ポリ(Pro-Arg)およびMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質をもたらしことを見出された。

40

【0034】

したがって、本発明の態様は、伸長ヘキサヌクレオチドリピートを含有するセンスおよ

50

びアンチセンスRNAならびにそれらの使用に関する。センスRNAは、5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAであり、アンチセンスRNAは、5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAである。

【0035】

5'-GGGGCC-3'および5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAは、それぞれ式 $(GGGGCC)_x$ または $(GGCCCC)_x$ のリピート核酸配列を含み、式中、Xは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも25、もしくは少なくとも30、または10~100、000、10~50、000、10~5、000、20~1、000、20~100、000、20~50、000、20~5、000、20~1、000、25~100、000、25~50、000、25~5、000、もしくは25~1、000から選択される範囲であってもよい。ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAはさらに、追加のNおよび/またはC末端核酸を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、N末端核酸配列は、センス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの上流の核酸配列またはアンチセンス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの上流のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、C末端核酸配列は、センス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のヌクレオチド配列またはアンチセンス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のヌクレオチド配列を含む。

10

20

【0036】

本発明の他の態様は、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質およびそれらの使用に関する。1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ポリ(Gly-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Gly-Arg)、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される。

【0037】

センス5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAおよびアンチセンス5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAは両方ともポリ(Gly-Pro)タンパク質をコードする。したがって、ポリ(Gly-Pro)タンパク質は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方から翻訳されたタンパク質を含んでいてもよい。センスおよびアンチセンス翻訳ポリ(Gly-Pro)タンパク質のC末端は、多様でありうることが予測される(表1を参照のこと)。したがって、センスポリ(Gly-Pro)タンパク質は、表1に記載のポリ(Gly-Pro)C末端配列を含んでいてもよい一方で、アンチセンスポリ(Gly-Pro)タンパク質は、追加のC末端配列を有しないリピート領域を含んでいてもよい。本明細書に記載の方法は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方から翻訳されたポリ(Gly-Pro)タンパク質の使用を含んでいてもよい。本明細書に記載の抗体は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方から翻訳されたポリ(Gly-Pro)タンパク質に特異的であってもよい。

30

【0038】

各ジアミノ酸リピート含有タンパク質はリピートアミノ酸配列を含み、これは、式 $(YZ)_x$ のジアミノ酸リピート単位を含有し、式中、Xは、2~10、000、5~10、000、2~5、000、5~5、000、2~1000、5~1000、5~500、5~300、5~200、10~500、10~300、または10~200でありうる。各ジアミノ酸リピート含有タンパク質のためのジアミノ酸リピート単位は、表1に提供される。

40

【0039】

【表 1】

表 1. ジアミノ酸リピート含有タンパク質

ジアミノ酸リ ピート含有タ ンパク質	ジアミノ酸リピート単位	予測される C 末端
ポリ (Gly-Ala)	(GA) _x または (AG) _x	WSGRARGRARGGAAVAVPAPAAAEQA VASG (配列番号 1) または AWSGRARGRARGGAAVAVPAPAAAEQA AVASG (配列番号 27)
ポリ (Gly-Pro)	(GP) _x または (PG) _x	GRGRGGPGGGPGAGLRLRCLRPRIIRRRR RWRVGE (配列番号 2、センス)、 PGRGRGGPGGGPGAGLRLRCLRPRIIRRRR RRWRVGE (配列番号 28、センス) または なし (アンチセンス)
ポリ (Gly-Arg)	(GR) _x または (RG) _x	GVVGAGPGAGPGRGCGCGACARGGGGA GGGEWVSEEAASWRVAVWGSAAGKRR G (配列番号 3) または RGVVGAGPGAGPGRGCGCGACARGGGG AGGGEWVSEEAASWRVAVWGSAAGKR RG (配列番号 29)
ポリ (Pro-Ala)	(AP) _x または (PA) _x	PSARLLSSRACYRLRLFPSLFSSG (配列番 号 4) または APSARLLSSRACYRLRLFPSLFSSG (配列 番号 30)
ポリ (Pro-Arg)	(PR) _x または (RP) _x	PLARDS (配列番号 5) または RPLARDS (配 列番号 31)
Met...ポリ (Pro-Arg)	(PR) _x	PLARDS (配列番号 5)
Met...ポリ (Gly-Pro)	(GP) _x	なし

X=丸括弧内の配列のリピートの数

【0040】

各ジアミノ酸リピート含有タンパク質は、さらに、非ジアミノ酸リピート配列を含むN
および/またはC末端アミノ酸配列を含んでもよい。いくつかの実施形態において、
N末端アミノ酸配列は、C9ORF72RNA転写物のヌクレオチド配列、たとえばセン
ス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGGGCC-3'ヘキサヌク
レオチドリピートの上流のヌクレオチド配列またはアンチセンス転写物のためのC9OR
F72のイントロン内の5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの上流の
ヌクレオチド配列から翻訳されたアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、C

末端アミノ酸配列は、C9ORF72 RNA 転写物のヌクレオチド配列、たとえばセンス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGGGCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のヌクレオチド配列またはアンチセンス転写物のためのC9ORF72のイントロン内の5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のヌクレオチド配列から翻訳されたアミノ酸配列を含む。5'-GGGGCC-3'または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のかかるヌクレオチド配列は、1つの終止コドンまたは複数の終止コドンに到達するまで翻訳されてもよい。

【0041】

C9ORF72 遺伝子配列の一部（センスおよびアンチセンス）を下に示す。5'-GGGGCC-3'または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートは、下線を引いて太字にしてある。5'-GGGGCC-3'または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの上流のヌクレオチド配列は、下線を引き太字にした配列の前にある。5'-GGGGCC-3'または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートの下流のヌクレオチド配列は、下線を引き太字にした配列の後にある。この5'-GGGGCC-3'または5'-GGCCCC-3'ヘキサヌクレオチドリピートは、これら配列にある回数を超えて反復されることが理解されるべきである。

【0042】

C9ORF72（部分配列、センス）

【化1】

CCCCATTTTCGCTAGCCTCGTGAGAAAACGTCATCGCACATAGAAAACAGACAGA
CGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTT
CCGCCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTCAGCCGTCCCTGCTGCCCCGGTTGC
TTCTCTTTTGGGGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTAGGAGGTGTGTG
TTTTTGTTTTTCCCACCCTCTCTCCCCACTACTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGG
GTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAAACCAGAAGAAAACAAGGAGGGAAA
CAACCGCAGCCTGTAGCAAGCTCTGGAAGCTCAGGAGTCGCGCGCTAGGGGCCG
GGGCCGGGGCCGGGGCGTGGTGGGGCGGGCCCCGGGGGCGGGCCCCGGGGCGG
GGCTGCGGTGCGGTGCTTGGCCCCGCGGCGGCGGAGGCGCAGGCGGTGGCGAG
TGGGTGAGTGAGGAGGCGGCA'ICCTGGCGGGTGGCTG'FTTGGGGTTGCGCTGCC
GGGAAGAGGCGCGGTAGAAAGCGGGGGCTCTCCTCAGAGCTCGACGCATTTTAA
CTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGCTGGGTGTGGGGCTTTTCGCCTCTAGCGAC
TGGTGGAATTGCCTGCATCCGGGGCCCCGGGCTTCCCGGCGGCGGCGGCGGCGGC
GGCGGCGCAGGGACAAGGGATGGGGATCTGGCCTCTTCCTTGCTTTCCCGCCCTC
AGTACCCGAGCTGTC'TCCTTC（配列番号6）

【0043】

C9ORF72（部分配列、アンチセンス）

20

30

40

【 0 0 4 7 】

【表 2】

表 2.

(GA) _x WSGRARGRARGGAAVAVPAPAAAEQAVASG (配列番号 8)	
(AG) _x AWSGRARGRARGGAAVAVPAPAAAEQAVASG (配列番号 9)	
(GP) _x GRGRGGPGGGPGAGLRLRCLRPRIIRRRRRRWRVGE (配列番号 10)	
(PG) _x PGRGRGGPGGGPGAGLRLRCLRPRIIRRRRRRWRVGE (配列番号 11)	
(GP) _x	10
(PG) _x	
(GR) _x GVVGAGPGAGPGRGCGCGACARGGGGAGGGGEWVSEEAAASWRVAVW GSAAGKRRG (配列番号 12)	
(RG) _x RGVVGAGPGAGPGRGCGCGACARGGGGAGGGGEWVSEEAAASWRVAV WGSAGKRRG (配列番号 13)	
(AP) _x APSARLLSSRACYRLRLFPSLFSSG (配列番号 14)	
(PA) _x PSARLLSSRACYRLRLFPSLFSSG (配列番号 15)	20
(PR) _x PLARDS (配列番号 16)	
(RP) _x RPLARDS (配列番号 17)	
MQAIPPVARGESPTPSFGQRNERESKNASSSEESPRFYPRLPAAEPQTATRQD AASSLTHSPPPAPPPRAQAPQPQPRPGPAPGPAPT(PR) _x PLARDS (配列番号 32)	
MRGKVKMRRALRRAPASTRASSRQPNPKQPPARMPPPHSPTRHRLRLRRRG RRHRNRSPAPGPPPGPPRPRP(GP) _x (配列番号 33)	30
MRRALRRAPASTRASSRQPNPKQPPARMPPPHSPTRHRLRLRRRGRRHRNRS PAPGPPPGPPRPRP(GP) _x (配列番号 34)	
MPPPHSPTRHRLRLRRRGRRHRNRSPAPGPPPGPPRPRP(GP) _x (配列番号 35)	

X=2~10,000、5~10,000、2~5,000、5~5,000、2~1000、5~1000、5~500、5~300、5~200、10~500、10~300、または10~200の間の数

【0048】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Gly-Pro)、ポリ(Pro-Arg)、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ポリ(Pro-Ala)、ポリ(Pro-Arg)タンパク質、Met...ポリ(Pro-Arg)またはMet...ポリ(Gly-Pro)タンパク質から選択される。

【0049】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上、または6つ以上、7つ以上、または8つのジアミノ酸リピート含有タンパク質である。

10

20

30

40

50

【0050】

対象

本開示の態様は、ALSもしくはFTDを有するかまたはALSもしくはFTDを発症する可能性が高い対象、たとえばヒトの同定および処置に関する。いくつかの実施形態において、対象はALSを有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象は、1つまたは複数のALSの症状、たとえば呼吸困難、嚥下困難、筋痙攣、筋収縮、筋衰弱、麻痺、会話障害、または体重減少を有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象はALSの症状を一切有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象はALSの家族歴を有していてもよい。

【0051】

いくつかの実施形態において、対象は前頭側頭認知症（FTD）を有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象は1つまたは複数のFTDの症状、たとえば嗜眠、自発性喪失、脱抑制、感情移入および他の対人能力の欠如、無感情、進行性非流暢性失語、意味性認知症、過食症、強迫行動、振戦、硬直、筋痙攣、協調運動不全、嚥下困難、および筋衰弱を有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象はFTDの症状を一切有していてもよい。いくつかの実施形態において、対象はFTDの家族歴を有していてもよい。

【0052】

いくつかの実施形態において、対象は、C9ORF72遺伝子（NCBI Entrez Gene ID: 203228）の対立遺伝子的一方または両方内にGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有していてもよい。いくつかの実施形態において、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピートは、C9ORF72遺伝子のプロモーターおよび／またはイントロン内にある。いくつかの実施形態において、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピートの数は、25、50、100、150、200、250、300、500、5,000、10,000以上である。リピートの数は、当技術分野において知られている任意のアッセイを使用して、たとえば核酸ベースアッセイ、たとえばサザンブロットを使用して検出できる[たとえば、DeJesus-Hernandez et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. Neuron 72, 245 (2011)、Renton et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron 72, 257 (2011)、およびGijssels et al. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: A gene identification study. Lancet Neurol. 11, 54 (2011)を参照のこと]。

【0053】

対照および対照レベル

本開示の態様は、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルの対照レベルとの比較に関する。いくつかの実施形態において、対照レベルは、健常対象または健常対象の集団から得られる試料、たとえば流体試料または組織試料中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルである。いくつかの実施形態において、試料は血液試料である。本明細書において使用される健常対象は、一見疾患を有せず、ALSまたはFTD等の病歴を有しない対象である。いくつかの実施形態において、健常対象は、C9ORF72遺伝子内に25個以下のGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有する対象である。

【0054】

いくつかの実施形態において、対照レベルは、標準的検出方法（たとえば、ウェスタンブロット、qPCR、ノーザンブロット、または免疫組織化学）を使用して、検出不能であるかまたは得られたバックグラウンド／ノイズレベルを下回る、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAの

10

20

30

40

50

レベルである。かかるレベルは、たとえば、ジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAを含まないことがわかっている試料中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを測定することにより得られる。

【0055】

本開示はまた、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを、毎回対照レベルを測定する必要のないように、所定のレベルまたは値と比較することを伴う。所定のレベルまたは値は、様々な形態をとりうる。それは、単一のカットオフ値、たとえば中央値または平均値でありうる。それは、ある定義された群がALSまたはFTDを有さないことがわかっており、別の定義された群がALSまたはFTDを有することがわかっている場合等、比較群に基づいて確立できる。それは、たとえば、被験集団が均等（または不均等）に複数の群、たとえば25個以下のGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有する対象、25個～50個のGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有する対象、および50個以上のGGGGCCヘキサヌクレオチドリピートを有する対象に分割された場合に、一定の範囲でありうる。

10

【0056】

試料

本開示の態様は、対象から得られた血液試料（たとえば、全血、血漿、または血清）中の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを決定することに関する。血液試料は、当技術分野において知られている任意の方法により、たとえば、針または指穿刺装置を使用して得られる。血液は、本明細書に記載の方法における使用前に処理されてもよい。かかる処理には、抗凝固剤の添加、血液細胞の除去、および／または血液の冷凍が含まれる。しかしながら、他の試料、たとえば組織試料（たとえば脳組織）または他の流体試料、たとえば唾液もしくは尿を使用できることが認められるべきである。

20

【0057】

本開示の他の態様は、対象から得られる試料中のヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを決定することに関する。試料は、流体または組織試料であってもよい。いくつかの実施形態において、組織試料は脳組織である。いくつかの実施形態において、流体試料は血液（たとえば、全血、血漿、または血清）、唾液、または尿である。いくつかの実施形態において、流体試料は血液試料（たとえば、全血、血漿、または血清）である。

30

【0058】

アッセイ

本開示の態様は、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質および／またはヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルまたは存在／非存在を決定するためにアッセイを実施することに関する。タンパク質およびRNAを検出するための当技術分野において知られているアッセイ（たとえば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York.を参照のこと。マイクロアレイ技術は、Microarray Methods and Protocols, R. Matson, CRC Press, 2009, or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに記載されている。）を、単独でまたは本明細書に記載のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを測定するための手法および組成物と組み合わせて使用できる。

40

【0059】

タンパク質レベルを検出するためのアッセイには、イムノアッセイ [本明細書において免疫ベース (immune-based or immuno-based) アッセイとも呼ばれ、たとえば、ウェスタンブロット、免疫組織化学およびELISAアッセイ]、質量分析、およびマルチプレックスビーズベースアッセイが含まれるが、これに限られる

50

ものではない。タンパク質レベル検出のためのかかるアッセイは、当技術分野においてよく知られている。タンパク質検出および定量方法の他の例には、たとえば米国特許第6939720号および第8148171号、および公開米国特許出願第2008/0255766号に記載のマルチプレックスイムノアッセイ、ならびにたとえば公開米国特許出願第2009/0088329号に記載のタンパク質マイクロアレイが含まれ、これら文献のすべての全体が本明細書に参照により組み込まれる。

【0060】

ジアミノ酸リピート含有タンパク質のための任意の好適な結合パートナーが、ジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルの検出のために考慮される。いくつかの実施形態において、結合パートナーは、本明細書に記載のジアミノ酸リピート含有タンパク質と特異的に結合する任意の分子である。本明細書に記載の「ジアミノ酸リピート含有タンパク質と特異的に結合する」は、分子が、非ジアミノ酸リピート含有タンパク質の一部または全部よりも、ジアミノ酸リピート含有タンパク質の一部または全部と結合する可能性が高いことを意味する。

【0061】

いくつかの実施形態において、結合パートナーは、抗体またはその抗原結合性フラグメント、たとえばFab、F(ab)₂、Fv、単鎖抗体、FabおよびsFabフラグメント、F(ab')₂、Fdフラグメント、scFv、またはdAbフラグメントである。抗体およびそれらの抗原結合性フラグメントを製造するための方法は、当技術分野においてよく知られている[たとえば、Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990)、およびRoitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)、WO2006/040153、WO2006/122786、およびWO2003/002609を参照のこと]。結合パートナーはまた、ジアミノ酸リピート含有タンパク質と特異的に結合する他のペプチド分子およびアダプターを含む。ペプチド分子およびアダプターを製造するための方法は、当技術分野においてよく知られている(たとえば、公開米国特許出願第2009/0075834号、米国特許第7435542、第7807351号、および第7239742号を参照のこと)。結合パートナーは、蛍光、酵素、親和性または同位体標識を含むが、これに限られない標識を含んでいてもよい。

【0062】

いくつかの実施形態において、アッセイは、免疫ベースアッセイを含む。いくつかの実施形態において、免疫ベースアッセイは、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的な単離抗体を含む。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的な単離抗体は、本明細書にさらに詳細に記載されている単離抗体である。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的な単離抗体は、表1、表2または表3に記載の抗原もしくは配列、または抗原もしくは配列の断片に特異的な単離抗体である。

【0063】

したがって、ジアミノ酸リピート含有結合パートナー(たとえば、ジアミノ酸リピート含有特異抗体)を、検出可能な成分で標識化できる。

【0064】

RNAを検出するためのアッセイには、ハイブリダイゼーションベースアッセイ、たとえばノーザンブロット解析、RT-PCR、シーケンシング技術、RNAインサイチュールハイブリダイゼーション(たとえば、FISHにおけるように試料中に存在するRNA分子とハイブリダイズするDNAまたはRNAプローブを使用する)、インサイチュールRT-PCR(たとえば、Nuovo GJ, et al. Am J Surg Pathol. 1993, 17: 683-90; Komminoth P, et al. Pathol Res Pract. 1994, 190: 1017-25に記載のもの)、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ[たとえば、試料に由来するポリヌクレオチド配列の、アドレス付け可能な位置(addressable locations)を有する固体表面(たとえ

ば、ガラスウェハー)、たとえばAffymetrixマイクロアレイ [Affymetrix (登録商標)、Santa Clara, CA] に結合したオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる] が含まれるが、これに限られるものではない。核酸結合パートナー、たとえばプローブを設計するための方法は、当技術分野においてよく知られている。いくつかの実施形態において、核酸結合パートナーは、本明細書において提供されるヘキサヌクレオチドリピート含有RNAの核酸配列の一部または全部と結合する。

【0065】

処置

本明細書に記載のとおり、ジアミノ酸リピート含有タンパク質が、ALSを有する患者からの血液試料中に存在することが見出された。理論または機構に束縛されることを望まないが、ALSを有する対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質が時間経過とともに脳実質内に蓄積し、神経炎症性変化、CNS機能障害、および神経細胞死をもたらすと考えられる。したがって、本開示の態様は、対象の血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルを減少または安定化させることによる、ALSまたはFTDを有する対象の処置に関する。

【0066】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることまたはその増加を予防することは、1つまたは複数(たとえば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つまたは8つ)のジアミノ酸リピート含有タンパク質を対象の血液から除去することを含む。いくつかの実施形態において、対象の血液からの1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質は、プラズマフェレーシスまたは骨髄移植から選択される処置を使用して除去される。いくつかの実施形態において、対象が発現するすべてのジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させるかまたはその増加を予防することは、有利でありうる。したがって、いくつかの実施形態において、方法は、対象が発現するすべての形態のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることまたはその増加を予防することを含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、対象の血液からの1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有は、造血幹細胞(HSC)移植を使用して除去される。HSC移植は、骨髄、末梢血、または臍帯血に通常は由来する造血幹細胞の、対象への移植である。造血幹細胞のソースは、同種(たとえば、健常対象等のドナーから)であってもよい。HSC移植の方法は、当技術分野においてよく知られている(たとえば、Bishop MR, Pavletic SZ. Hematopoietic stem cell transplantation. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2008:chap 32、およびVose JM, Pavletic SZ. Hematopoietic stem cell transplantation. In: Goldman L, Schafer AI. Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011:chap 181を参照のこと)。

【0068】

対象のHSC移植を準備するために、対象に存在するHSCを除去または消耗させてもよく、結果として移植細胞は、対象において支配的なHSC集団となりうる。対象のHSC細胞がアポトーシスまたは細胞周期停止となるようにするため、対象におけるHSCを、たとえば、化学療法、照射、または両方で対象を処置することにより消耗させてもよい。

【0069】

同種HSC移植において、HSCはドナーから得られる。ドナーは好ましくは健常対象、たとえば一見疾患を有せず、ALSまたはFTD等の病歴を有しない対象である。ドナーは、移植片対宿主病の危険性を減少させるために、移植を受ける対象とHLA適合性であることが好ましい。HLA適合性は、たとえば、HLAタイピングを使用して決定できる。HLAタイピングは一般に、少なくとも8つのHLAマーカー、すなわち2つのA、2つのB、2つのC、および2つのDRB1マーカー、ならびにまた適宜2つのDQマー

カーの検査を伴う。H L A タイピングは、たとえば血液検査を通じて達成できる。H L A 対立遺伝子同一性は、血清学または核酸ベースアッセイを使用して決定できる。一般に、ホストとドナーとの間で4つ～6つのマーカーの一致が好ましい。いくつかの実施形態において、ドナーは、C 9 O R F 7 2 遺伝子内に25個以下のG G G G C C ヘキサヌクレオチドリピートを有する対象である。

【0070】

H S C は、当技術分野において知られている任意の方法を使用してドナーから得られる。例示的方法には、骨髄採取および白血球除去が含まれる [たとえば、Transfusion. 2003 Feb;43(2):259-64. Leukapheresis after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a novel approach to harvest a second autograft. Schwella N, Braun A, Ahrens N, Rick O, Salama Aを参照のこと]。骨髄採取において、骨髄は典型的には、ドナーの一方または両方の寛骨の背部から除去される。白血球除去は、たとえば、連続フロー遠心分離または濾過を使用した、ドナーから得られる血液からのH S C の分離を伴う。新しいH S C の増殖を刺激し、結果としてより多くのH S C が血中に存在するようにするため、増殖因子G - C S F がドナーに投与されてもよい。H S C が得られると、次に同種H S C が移植を受ける対象に投与される。当技術分野において知られている任意の好適な投与方法、たとえば中心静脈カテーテルによるものが考慮される。

【0071】

いくつかの実施形態において、H S C 移植中またはその後に、H S C 移植を受ける対象は、追加の処置および／または療法、たとえば抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、輸血および／または免疫抑制療法を受けてもよい。かかる処置および／または療法は、H S C 移植回復期間中に感染および／または移植片対宿主病を予防するのに役立つ。

【0072】

いくつかの実施形態において、H S C 移植は、骨髄移植である。いくつかの実施形態において、骨髄移植は、同種骨髄移植である。

【0073】

プラズマフェレーシスは、体外で生じる医療処置（「体外処置」）であり、血液循環からの血漿（の成分）の除去、処置、および返還を指す。プラズマフェレーシスは、当技術分野においてよく知られており、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、ギラン・バレー症候群、狼瘡、および血栓性血小板減少性紫斑病を含む複数の疾患を処置するために使用されてきた（たとえば、Madore, Plasmapheresis Technical aspects and indications, Crit Care Clin 18: 375-392. 2002を参照のこと）。プラズマフェレーシス中に血液は最初に、たとえば、針または以前に埋め込まれたカテーテルを通じて体外に取り出される。次に血漿は、たとえば、血液成分分離装置を使用することにより、血液細胞から分離される。血漿分離後、血液細胞は補液と組み合わせられ、対象に再投与される。補液は、疾患関連成分を除去するよう処理された分離血漿または代替血漿（血漿交換とも呼ばれる）のいずれかであってもよい。

【0074】

血漿を血液細胞から分離するために使用される例示的処置は、以下を含む。すなわち、

1) 非連続フロー遠心分離：1本の静脈内カテーテルラインが使用される。典型的には、1度に血液の1つまたは複数のバッチが除去され、遠心分離されて血漿を血液細胞から分離する。次に血液細胞は、補液と組み合わせられて対象に戻される。

2) 連続フロー遠心分離：2本の静脈内ラインが使用される。血漿は連続的に血液から取り出され、分離された血液細胞は、対象に戻る前に補液を結合したラインを通じて供給される。

3) 血漿濾過：2本の静脈内ラインが使用され。血漿は、標準的な血液透析器具、たとえば平行板または中空繊維フィルターを使用して濾過される。分離された血液細胞は、対象に戻る前に補液を結合したラインを通じて供給される。フィルターは通常、血漿の通過を可能にする一方で細胞を保持するのに十分な直径0.2～0.6 μmの細孔を有する。

複数の膜血漿分離器が市販されている（たとえば、Asahi Medical Co., Ltd., Tokyo, Japan製Plasmaflo、Toray Industries, Tokyo, Japan製Plasmax、Baxter, Deerfield, IL, USA製CPS-10、Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Germany製Plasmaflux、Hospal, Lyon, France製Prisma TPE 2000）。

【0075】

分離血漿が補液として使用される場合、分離血漿はまず、分離血漿中に存在するジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させるよう処理される。いくつかの実施形態において、分離血漿中に存在するジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることは、本明細書に記載のとおり、分離血漿をジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的な1つまたは複数の単離抗体と接触させることを含み、そのことにより分離血漿中に存在するジアミノ酸リピート含有タンパク質は、1つまたは複数の単離抗体と結合する。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の単離抗体のための結合パートナーを分離血漿と接触させる。1つまたは複数の単離抗体のための結合パートナーは、たとえば、捕捉成分、たとえばビオチンもしくはストレプトアビジン、プロテインA、または1つもしくは複数の単離抗体に特異的な二次抗体であってもよい。かかる結合パートナーは、1つまたは複数の単離抗体が、分離血漿から除去されるのを可能にする。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の単離抗体は、フィルター、カラム、および／または固体支持体に結合される。かかる実施形態において、分離血漿は、フィルター、カラム、および／または固体支持体と接触させられ、そのことによりジアミノ酸リピート含有タンパク質は、フィルター、カラムおよび／または固体支持体に結合された単離抗体と結合する。

20

【0077】

理論に束縛されることは望まないが、ジアミノ酸リピート含有タンパク質は血中で凝集体を形成しうると考えられる。したがって、ジアミノ酸リピート含有タンパク質は、凝集体が分離血漿から単離されるように、フィルターを使用して分離血漿から除去されてもよい。

【0078】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質を発現する対象は、自己抗体を形成してもよい。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に対する自己抗体は、分離血漿から除去されてもよい。自己抗体は、当技術分野において知られている任意の方法、たとえば、自己抗体を認識する結合パートナー（たとえば、固体支持体に結合されるかまたはタグに結合される）を使用して除去されてもよい。いくつかの実施形態において、結合パートナーは、本明細書に記載の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質であってもよい。

30

【0079】

血漿交換が使用される場合、対象は、代替血漿を受ける。代替血漿は、たとえば、ドナー血漿またはアルブミン溶液（たとえば、生理食塩水中5～70%アルブミン）であってもよい。例示的代替血漿は、50%：50%（vol：vol）溶液中で0.9%生理食塩水と組み合わせられた5%アルブミンである。血液が凝固しないように維持する薬物（たとえば、抗凝固剤、たとえばクエン酸、クエン酸デキストロースまたはヘパリン）は、処置中に対象に与えられるかまたは対象の血液と接触させられてもよい。

40

【0080】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質のレベルを減少させることまたはその増加を防止することは、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを減少させることを含む。ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAのレベルを減少させることは、ヘキサヌクレオチドリピート含有RNAを標的にする有効量の抑制性核酸分子、たとえばshRNA、siRNA、miRNA、またはアンチセンス

50

核酸分子の投与を含んでいてもよい。

【0081】

s h R N A、s i R N A、m i R N A、およびアンチセンス核酸分子を製造するための方法は、当技術分野においてよく知られている[たとえば、Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, (Current Edition)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds., (Current Edition))、Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition)、Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition)を参照のこと]。いくつかの実施形態において、核酸抑制因子は、標的ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA配列の少なくとも一部を含むかもしくはそれに相当するか、または標的ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA配列と相補的な配列の少なくとも一部を含む。

10

【0082】

いくつかの実施形態において、処置は、対象において1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に対する自己抗体のレベルを減少または安定化させることを含んでいてもよい。自己抗体のレベルは、当技術分野において知られている任意の方法を使用して減少または安定化させられてもよい。いくつかの実施形態において、自己抗体のレベルを減少または安定化させることは、有効量のアタセプト、ベリムマブ、ブリシビモド、B R 3 - F c、リツキシマブ、オクレリズマブ、アツムマブ(a t u m u m a b)、エブラツズマブ、コルチコステロイド(たとえば、プレドニゾン)、ミコフェノール酸、メトトレキセート、シクロホスファミド、アザチオプリン、および/またはシクロスポリンの投与を含む。いくつかの実施形態において、自己抗体のレベルを減少または安定化させることは、プラズマフェレーシスを含む。

20

【0083】

抗体

本開示の態様は、ポリ(G l y - A l a)、ポリ(G l y - P r o)、ポリ(G l y - A r g)、ポリ(P r o - A l a)、ポリ(P r o - A r g)、M e t . . . ポリ(P r o - A r g)またはM e t . . . ポリ(G l y - P r o)タンパク質から選択されるジアミノ酸リピート含有タンパク質(たとえば、RANタンパク質)に特異的な単離抗体に関する。単離抗体は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質の領域(たとえば、リピート配列またはC末端)を認識するかまたはジアミノ酸リピート含有タンパク質全体を認識してもよい。

30

【0084】

標的またはエピトープに「特異的に結合する」抗体は、当技術分野において理解されている用語であり、かかる特異的結合を決定する方法もまた、当技術分野において知られている。分子は、それが代替的標的よりも、頻繁に、迅速に、長時間、および/または大きな親和性で、特定の標的抗原と反応または結合する場合に、「特異的結合」を示すと言われている。抗体は、それが他の物質に結合するよりも大きな親和性、結合力で、容易に、および/または長期間結合する場合に、標的抗原と「特異的に結合する」。たとえば、ポリ(G l y - A l a)タンパク質またはそのエピトープに特異的に結合する抗体は、それが他の抗原または同じ抗原の他のエピトープに結合するよりも大きな親和性、結合力で、容易に、および/または長期間、この標的抗原に結合する抗体である。この定義を読むことにより、たとえば、第1の標的抗原に特異的に結合する抗体が、第2の標的抗原に特異的に結合してもしなくてもよいこともまた理解される。かかるものとして、「特異的結合」は、排他的結合を(それを含みうるとはいえ)必ずしも要しない。必ずではないが一般に、結合への言及は特異的結合を意味する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の抗体は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質(たとえば、RANタンパク質)との好適な結合親和性を有する。本明細書において使用される「結合親和性」は、見かけの結合定数または K_A を指す。 K_A は、解離定数(K_D)の逆数である。本明細書に記載の抗体は、少なくとも 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M以下

40

50

の結合親和性 (K_D) を有していてもよい。増加した結合親和性は、減少した K_D に相当する。第2の標的と比較して第1の標的に対する、抗体のより高い親和性の結合は、第2の標的との結合についての K_A (または数値 K_D) より高い第1の標的との結合についての K_A (またはより小さい数値 K_D) により示されうる。かかる場合には、抗体は、第1の標的 (たとえば、第1のコンフォメーションのタンパク質またはその模倣物) について第2の標的 (たとえば、第2のコンフォメーションの同じタンパク質もしくはその模倣物、または第2のタンパク質) と比較して特異性を有する。結合親和性の差 (たとえば、特異性または他の比較について) は、少なくとも 1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000 または 10^5 倍でありうる。

10

【0085】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、または分光法を含む様々な方法により (たとえば、蛍光アッセイを使用して) 決定されうる。結合親和性を評価するための例示的条件は、たとえば、トリス緩衝液 (pH 7.5 で 50 mM トリス、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂) 中である。これらの手法は、結合された結合タンパク質の濃度を標的タンパク質の濃度の関数として測定するために使用できる。結合された結合タンパク質 ([Bound]) の濃度は、遊離標的タンパク質 ([Free]) の濃度および結合タンパク質のための標的上の結合部位の濃度と関係付けられ、(N) は、以下の式による1標的分子当たりの結合部位の数である。すなわち、

20

$$[\text{Bound}] = [N] [\text{Free}] / (K_d + [\text{Free}])$$

【0086】

とはいえ、 K_A を正確に決定することは必ずしも必要ない。なぜなら、 K_A に比例し、したがって、たとえば、より高い親和性が2倍高いのかどうかを決定することなどの比較に使用できる、ELISAまたはFACS解析等の方法を使用して決定される親和性の定量的測定値を得ること、親和性の定性的測定を得ること、または、機能的アッセイ、たとえばインビトロまたはインビボアッセイにおける活性により、親和性の推定を得ることだけで十分であることもあるからである。

【0087】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、ポリ (Pro-Ala)、ポリ (Pro-Arg)、Met...ポリ (Pro-Arg) または Met...ポリ (Gly-Pro) タンパク質から選択される1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的である。

30

【0088】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、表1に定義されるジアミノ酸リピートおよび/またはC末端配列またはそれらの断片を含む抗原に特異的である。いくつかの実施形態において、単離抗体は、表2に定義される配列の配列またはその断片を含む抗原に特異的である。

【0089】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、表3または図28の抗原に特異的である。いくつかの実施形態において、表3の抗原は、Nおよび/またはC末端修飾を含有しない。

40

【0090】

【表 3】

表 3. ジアミノ酸リピート含有タンパク質抗原

ジアミノ酸リピート含有タンパク質	標識	抗原	ジアミノ酸リピート含有タンパク質における抗原位置
ポリ (Gly-Arg)	GGGGCC F1 リピート	Ac- RGRGRGRGRGRGRGRGRC-ア ミド (配列番号 18)	リピート配列
ポリ (Pro-Arg)	GGGGCC- AS F2 リピ ート	Ac-RPRPRPRPRPRPRPRRC-ア ミド (配列番号 19)	リピート配列
ポリ (Pro-Ala)	GGGGCC- AS F1 リピ ート	H2N- APAPAPAPAPAPACKKKK- アミド (配列番号 20)	リピート配列
ポリ (Gly-Pro)	GGGGCC F3 リピート	H2N- GPGPGPGPGPGPGPGGCKK- アミド (配列番号 21)	リピート配列
ポリ (Gly-Pro)	GGGGCC F3 CT	Ac-CRRRRWRVGE-OH (配列番 号 22)	C 末端
ポリ (Pro-Ala)	GGGGCC- AS F1 CT	Ac-CYRLRLFPSLFSSG-OH (配 列番号 23)	C 末端
ポリ (Gly-Arg)	GGGGCC F1 CT	Ac-CRVAVWGSAAAGKRRG-OH (配列番号 24)	C 末端
ポリ (Pro-Arg)	GGGGCC- AS F2 CT	Ac-CRPRPLARDS-OH (配列番 号 25)	C 末端
ポリ (Gly-Ala)	GGGGCC F2 CT	Ac-CSGRARGRARGGA-アミド (配列番号 26)	C 末端

F1=リーディングフレーム1、F2=リーディングフレーム2、F3=リーディングフレーム3、AS
F1=アンチセンスリーディングフレーム1、AS F2=アンチセンスリーディングフレーム2、
AS F3=アンチセンスリーディングフレーム3

【0091】

単離抗体は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、またはそれらの抗原結合性
フラグメントであってもよい。それらの抗原結合性フラグメントは、たとえば、F a b、
F (a b) 2、F (a b') 2、F v、単鎖抗体、F a b フラグメント、s F a b フラグ
メント、F d フラグメント、s c F v、またはd A b フラグメントを含む。ポリクローナ
ルおよびモノクローナル抗体ならびにそれらの抗原結合性フラグメントを製造するた
めの方法は、当技術分野においてよく知られている [たとえば、Sambrook et al, "Molecular
Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1
989)、Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990)、およびRoitt
et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989

)、WO2006/040153、WO2006/122786、およびWO2003/002609を参照のこと]。また包含されるのは、組換え手段により製造される抗体、たとえばキメラ抗体（可変領域および定常領域が異なる種に由来）およびCDRグラフト化抗体（相補性決定領域が異なる種に由来）であり、これらは米国特許第4,816,567号および第5,225,539号に記載されており、これら文献はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。また包含されるのは、典型的には組換え方法により製造される、ヒト化抗体であり、ヒト配列は抗体の一部または全部を含む。また含まれるのは、完全ヒト抗体、たとえば遺伝的改変マウスにおいて製造されたものである（PCT出願番号93/12227を参照のこと、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0092】

いくつかの実施形態において、ジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的な単離抗体は、表4に列挙されたウサギポリクローナル抗体である。

【0093】

【表4】

表4. ジアミノ酸リピート含有タンパク質ウサギポリクローナル抗体

抗原	動物	力価
GGGGCC F1 リピート	H3147	1,575,500
GGGGCC F1 リピート	H3148	1,956,500
GGGGCC-AS F2 リピート	H3149	2,399,600
GGGGCC-AS F2 リピート	H3150	3,225,000
GGGGCC-AS F1 リピート	H3151	660,200
GGGGCC-AS F1 リピート	H3152	2,082,600
GGGGCC F3 リピート	H3154	752,300
GGGGCC F3 リピート	H3155	590,500
GGGGCC F3 CT	H3156	231,300
GGGGCC F3 CT	H3157	616,700
GGGGCC-AS F1 CT	H3158	6,300
GGGGCC-AS F1 CT	H3159	32,800
GGGGCC F1 CT	H3160	573,900
GGGGCC F1 CT	H3161	363,000
GGGGCC-AS F2 CT	H3162	2,261,700
GGGGCC-AS F2 CT	H3163	176,300
GGGGCC F2 CT	H3164	1,549,500
GGGGCC F2 CT	H3165	115,700

【0094】

抗体は、細菌細胞、たとえば、大腸菌、または真核細胞、たとえば、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞において製造できる。一実施形態において、抗体は、哺乳動物細胞において製造される。抗体またはその抗原結合性フラグメントを発現させるための哺乳動物宿主細胞

胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（たとえば、Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621に記載のとおり、DHFR選択可能マーカーとともに使用された、Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載のdhfr-CHO細胞を含む）、リンパ球細胞株、たとえば、NSO骨髓腫細胞およびSP2細胞、COS細胞、ならびにトランスジェニック動物、たとえば、トランスジェニック哺乳動物からの細胞が含まれる。抗体はまた、トランスジェニック動物により製造できる。たとえば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック哺乳動物の乳腺における抗体の発現方法を記載する。

【0095】

本開示の単離抗体はまた、それに結合された検出可能な標識を有していてもよい。標識は、たとえば、蛍光、酵素、親和性または同位体標識であってもよい。例には、蛍光による検出のためのフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、発色性基質の切断による検出を可能にする西洋ワサビペルオキシダーゼ、放射性同位体、たとえばオートラジオグラフィーによる検出のための I^{125} 、ならびに抗原および抗原保持細胞の抗体検出および親和性精製のためのアビジン／ビオチンが含まれる。

【0096】

本開示によりまた包含されるのは、ポリ（Gly-Ala）、ポリ（Gly-Pro）、ポリ（Gly-Arg）、ポリ（Pro-Ala）、ポリ（Pro-Arg）タンパク質、Met...ポリ（Pro-Arg）、Met...ポリ（Gly-Pro）、本明細書に記載のジアミノ酸リピート含有タンパク質のC末端ペプチド、および／またはそれらの2つ以上の組合せから選択されるジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を製造するハイブリドーマ細胞株である。

【0097】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、ALSを有する対象から得られる単離自己抗体であり、単離自己抗体は、本明細書に記載の1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質に特異的である。

【0098】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の単離抗体は、緩衝液中に含有される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の単離抗体は、固体支持体（たとえば、プレートまたはビーズの表面）に結合される。

【0099】

トランスジェニックマウス

別の一態様において、本開示は、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列を含むヒトC9ORF72遺伝子を含むトランスジェニックマウスに関する。いくつかの実施形態において、マウスは、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列ならびにヒトC9ORF72遺伝子の5'および3'末端上のフランキングヒト配列を含むヒトC9ORF72遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、5'および3'末端上のフランキングヒト配列は、それぞれ独立に、長さが少なくとも1キロベース（kB）、少なくとも5kB、少なくとも10kB、少なくとも20kB、少なくとも30kB、少なくとも40kB、または少なくとも50kBである。いくつかの実施形態において、5'および3'末端上のフランキングヒト配列は、それぞれ独立に、ヒトC9ORF72遺伝子の転写をセンスおよびアンチセンス方向にそれぞれ駆動可能なプロモーターを含む。したがって、いくつかの実施形態において、トランスジェニックマウスは、センスおよびアンチセンス転写物の両方（たとえば、本明細書に記載の5'-GGGGCC-3'および5'-GGCC-3'-ヘキサヌクレオチドリピート含有RNA）を発現する。いくつかの実施形態において、ヒトC9ORF72遺伝子およびフランキング配列は、下の配列を含み、（GGGGCC）_nは、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート配列の位置を示す。

【0100】

Chr9:27,527,137~27,625,470（逆相補）

10

20

30

40

【化 3】

AAGCTTGATAAATATTATCAAAATATTAGATAAATGIAAATATTAGAAGAAAACCTTTTTTTGAAAAAGATATATAAAAA
 AATTTCAITTCAAAATTTTTTATATTTAATTTTAAATTTTAAATGAAAATATATCTAAGTTTTTGACGCTTTAAATGT
 AATTATGTTTGATAATTTAATCAATTTACTATTTCGTTCTCTATTGCTGCCCTAACAAATTACCATAGTTTCAGTGGC
 TTACAAAACACAAATTTATTATCTTTACCATTCTGTGAGTCAAAATTCCAAATAGGTGTCACTAGGCATAAAATGA
 AGGACTGCATTTCTTCCTGCAGGCTCCAGGAGAGATCTATGTCCTACTCTTTTTCGGCTTCTTAAAGGCTGCCCCACA
 TTCCTCGACTAGTGGCGTCCCTCCTTCGTCTCTAAACCCAGCAACAACAGGTTGAGTCCCTCATGTCCATCTTTTC
 TTACCTTTCTGTCTCATCTCATCTCGCTGACTGCTGCTGGGAAAAATCTCCACTTTTAAAGGGCTATCAIGATTAGA
 CTATGCCCATAGATATAACAAAGATCTCAGATCCCTTAACCTCCATCAGATCTGCCAAAGTCTGCTTTTTGCCTCATAA
 AAGAGCTGAGGCTTTAGACGGGAGATCTTTAAGGGGCTATTATATCATGCTTACCATAATCACTGAGAAATAGTACA
 AGTTAAGATTATAATAGCAATAGAATATACAAACGTTGAAGCTCCAAAAGAACAAACAACAAAAAAGGTGAACZ
 GGAAAAAGAAACTGAAAATCTTTAAAAAGGCAGTCTGTTTAAATCTATAAAAACTGGAAAAAATGAGAGTGGAC
 AAATATCTGGTAAGCATGATGGACTTAAATTTGTGACTAGGGCATTACATTTTTTATATTAATGAAGAT
 TGAATTACTGATCAAAACAATTAAGCAAGAGAACTATTCTCATCAAATCTGCAACACGAAAGTTTCAGRCAA
 AATCCAACAACCTTCACATTTCTGAACATAATGAGGACTAATTACCAGTTGAGGCAATGAGAATATATGAGGTCT
 CCGTTTGCACTTTGCCAGGGAATCTGAAAACGTTGGGAGTAGGTCGGCTTCACCTTGAAGCCAGACCATCGACAGC
 CAGTTTCCCTCCCTTCTCCACCCACAGGTCCTTAGGCCCTCATCTTCCAGCCTCAGAACCTAGTCTCCAAAGAA
 GAGGAAAGTTAGAGGAGAGAGATAAATCGTTGAATAGGATGAAGGAGATGTGGGAAAAAGAAAAGAGAGGGCTGCA
 AGAGAGAGGGTCCCAGGGATAACTCTGCTCTTGGAAAGGGTGGCCACAGTCATGTGGTCCCAAGAGGCAACAAACA
 GCTTAGGAAGCCAGAGAAACCAGTTACAATCACATGCTACTCTTTTCGATTCTGTGTTGTTTAAAGAAATATCACCC
 GCCAGGAGTTCTCCAGAAACATTTTCCTGATTCATGTAAGTGTCTCAACCAAGTGAATGGTAATCCCATTTTGGT
 TTAGTCTCTGACCATCCCCATTTCCTCAAAATAAAGGGAAGATGGTGGGTTTATATCTTAAATTTCTACTTTTACTA
 AACTCAAGGGAATAGCCAAAGCAAAAACGAAAGCTGAGACTCTGCTAATTTATCTTTCCATAGAAATGTTTGGCTA
 AAATTCCTTTGTCAAGGAAGGAATAACAAGCTAGTCCACGCTCTGTATAGGGTGTTTCCAATTAGTTTATACCTTTA
 AAGTATAAGTATTTAACAATAATCTATAAATTTTGTAAATTAATTTACTTGTAGTGAAAAATGAGCCATTCTCAAGC
 AAATCACTTTTTTATTACACATTTCCAGAGAATAACCATAAAAAGGACATTTATTATAGCAAAAATAACCACATCTGC
 ATGGAACTTCAATCACCAGTATTTACTAAATAAATGCCCAAGAAAAAATAGTTCATCTTTAAITTCAGTCATCA
 TTAATAAAAAGCTGAAGTACCTCTTCAGATCTTTTGATCAITTTCTGTGGATTGTTTTCTTTTTACTGAGTTGCA
 AATGCTCTTTATATATTTTGGATACAAAGCTTTATCACATAGGCATTTTGAAGTATTTTTTCCAAGTTTTTTTA
 TCTTTTCATTTATTTAATAATATCTTTCAAAGAACGGGAATTTATAATTTTATGAAGTCCATTTATAATTTTT
 TCTTTATGGGTTGGTGGGGTGTGGGGTGTGTTTGCTTAAGAAATCTTGGCTCAACACAAAAAGATTAGTTTC
 TATATTTCTTTCTAGAAATTTTATAGTACGATCTCAGATCCATTTCASATGATGAATAAGCACATAAAAAAGGA
 TACTCATCGTTAGTCATTAGAGAAATGCATATTAACCATAAGGAAATACTACTATATACATATATTAGATAGG
 ATGAAGAGCAACTGGAATCTCATACAGTGTCTGATTGAAATGCAAAATGGCAAAACAACCTTTAGAAACCAATTTGG
 AAGCAGCTGTACTGACATGGAATTTTGAGCTGGAAGAAATCTAGAAAAAGAACTTTACCACCTCCCCATTCT
 CTTACCCCTGGGGAACCTGTTAAATGAGGAATTTGGGTTCAAGGAGGAACCTGTCTATATGCTTTCTCAGCTTTC
 CCGTGGTAATTACCATCTTGATAATATAACGTAATGTATGTATATGTTTATCAAATAATATAATATCTTCATCATFA
 TATTTATCATCTTCATAATGTTAGCTGTCTAGTGGTAACTTTTTTTTGTCTCTTTATTGCCTCCCTCTTTTTTCCC
 TCTTTGTGTTTTTTTGTACATCAATTAATGATATATGGTATATATTCTCACTGTAAAGATGTAACCAACACAAAG
 ATTATTGAACAAATCACGAAAGTAACCTTCTCTCATTTTACCCTATCCAACCTCATCTCCTCAGAAGAATAC
 ACCATTTTAGTTGTAAATGTTTTCTAGCTCTTTTCAATGTTCTACCTATATGCATGATGTAATGTATAT
 ACATACATATACATACATATTTGATATATACATATATAGAGGTATGGTTTTTTAACTTAAATGGAATTGCATTG
 TGGATATGTCTCATGACTTGCTTTCAACCAAAATATATGTCTTGGAAATACATACATATATTTAAAAAATATGT
 TATGTATATGTAACATACTATATGTGCATAATATATATTACATAGATATAATAAGGCCTAGGAAGAAATTTGTGTG
 CAACCTCTAGTACATCTTCTCTATATCTACTGTACATACATACAACCCATTCTTTTTTTAAATTTTTTTATTTTT
 TTAGACAGAATCTTGCTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCACCTCC
 TGGGTTCCAGCCATTTCTGCTGCTCAGCTCCCAAGTAGCTGGGAATACAGGCACCTGCCATCAGGCCAGCTAA
 TTTTTTTTGTATTTTTTAGTACAGATGGGGTTTCAAGCTGTATAGCAGGATGGTCTCCATCTCTGACCTGTGA
 TCCGCCCACCTCATCTCCCAAAGTGTGGGATTTACAGGCTGTAGCCACCAGCCGCCAGCCACAACCTATTGTGAG
 AGTAGTCCAAAATATGGATGGACTGTAGCTTAATTACTTATTTCTCCCATTTGATAGACACTTAGGACTTTTTCTAAT
 TTTTATAATTTAAAAATATGCTGCAATTAACAAACATTTCTTGTGTATCTTTTTTGTGTATGTATGCAATTTCTT

10

20

30

40

【化 4】

TAGTATGGGTTTTGGAGAGGAATCACAAAGGAGGCAIAGAATATAAATATTTTTATTTTGA AAAAATACAGTTGT
 AATTTAATAACCCACCACAAAGACTCTAACAGTTTAGATTACATCAACAGTGTAAGAACATGTCTGTTTTACTGC
 ATCCTTAACCCCACTGGTTATAAFACTTTTAATTAAACAATCTATGGATGAAGAATACTATCGCAATGTGTTTT
 AATGCATTTTTTCCAATTACTAGTGAGATTGAACATTAATTCITTTATTTTATGGATCACITGGCTTTTTCTCCTTCT
 GTGAACACTACCTGTTCACATCCTCTGCTTTTTAGCTCTTGAGCTGTTATCTTTTTCTTATTGATTTATATGAGCTC
 TTTATATATTTCAAGATGTTAATCATTTGTATTTTATGTATATGGCAATGATTTTCTTCCAAACCAATGCTTGTCT
 TTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTTATTTGAGACCGAGTCTCGCTCTGTGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCG
 CGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCTCCCGGGTTCACGCCATTCCTCTGCTCAGCCCTCTGAGTAGGTGGGA
 CTACAGGCGCCCGCTGCCACACCCGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCGTGTAGCCAG
 GATGCTCTCTATCTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTCGGCTTCCAAAGTGCTCGGATTACAGGCATGAGCCA
 CCACGCCCTGGCCAAATGCTTGTCTTTTTATCTCTGTTTTATGGCATCTTTTCATACATATGGACATTTTTATTTTTAT
 TTTTATGTTGATTTATTTCTTTGAATTGTATACATGTTAATTTATACCTAAGTTATTGTAAATACCTTAAAGCCAAGT
 TCTACACATATAATTTAATTTGCTTTCCCAATAGGTCTCTGAGGGAACACATTTTTTCAAATCACTTTGTTTCATC
 TTTTTTAGGTGTTGATCAATTTATTAAGGAGTTTGAATAATCATTTTAAACGGAATTCTTCAGATGAAAACATAAA
 GACATTTATCGGGTCAGAGCATTTGGTGGTTTACATACTCAGGATCAGTGGCTGGGTGGGCAGGCAGTGGGTGA
 ATGGAGAGCTGCAGGTATTGGAGAGAGAGCCAGTTGGATATGATGTTTCCAAAGATCATCAAGGCAGACAACCAA
 AGGGAAAACCGTGGGAAACACCTGCTTTGGGGCATCTAAGATGAGATGATAAAGTAAGGAAAGAGTTGAGCCCAAC
 ACAGTGATAGCCAATCTGAAAGCGGGCAGAACTGACAAGACCAAAACAAGTAGGTGAACTGGCTGCAGGCAGCCAG
 CCAACACAGGGACAGCGTGTACTCCAGGGACAAGCTCAAGGCTATAGGTAGTTAGTTCAAGGCTACTAGGGTGAG
 AAGAGCAGGAACTGAGTTCTATACCAAGTCTTCTCAAAACTAATGTGCATCCTAATCACCTGGAAATCTTGTAAA
 AATGTAGATTCTGATTGAGTCTGAAGCAGAGCTTAAGATACTACATGCTTAAACAAGAGCCTAGTTGATGCT
 GACACTGCTGCTTCTGAGCTCTCTTTGAGTAGCAGGCTTCTGGAAGGCTTGTGTCACTAAGCACAGAGAAGCC
 TCATTTATCAAACTCTGCACCAAAACAGGAAAACIAATGTGAAGAATAATGTGATGCACACGTCAGAGCATGAGGC
 AGTTGCTTTTCTCCTGAGGTTGCGCTCCAGATGCTTCTTAAGATGCGACAGGCTGATCTTGTCTGCTGGGGGTCC
 CGGAGGCTTTGGGCCACGGGAGAGACAGGACCTCAGAGGCTGGGAGACAGGCAGAGACAGAGAGAGTGCATCCTGC
 TGCTTTTGAATTTGCACATTCGTGAGAATAAIAACAGCAGTAAACTGTTACACAATATCTATTTCTCAGCATCTTG
 AAGCCCTTTTACATATTTGTTACTTCCATTAATGGGGCCCTTTGCTGCTATTTCTACTTTTCTCTTTCAGCTATCAA
 CAATATGGCTTTTCCACACCTCCATCAGACAGTAGCCAGATGAATAAATGTGCCAGAATGAAAACITGTTTCATT
 TGTCTACTTTTTTGCCAAGACTAGACAGGCAGGAAATTTGAATGTATTTTTTACAGAAAAGGTTTTTCAAACITTTTTT
 CCTCTGTGGCTCATTTAGGTAAACTAAAAGGCATAAGACCCACCTAAAACATGGGTTCCTGCTTTTTTATTGAG
 AAAGAACATAGTACTTTAAAABAAATACATAAAATAAATAAAGGAAAGACAAAGATAATGAAGGTTGTACATGGT
 ACCAAATTTTTGTATCCCATTAATACACATGAGTAGATCACTACTAAGTAGGTTTTAGTGACATATAGGAACAT
 TAAAATCTACAGAAATTTGCATTAATTTCTGTCAAAAAGGATCATTTCCACAGCCTTTTCAGGGGGAACCCATTGOC
 CACAGGAACICATGCATTCATGCTTTGAGGATCACIAGATCTAAGAAGCCTTCTTGGAGGTTCTAGCCTCCAA
 CCTTATTTTTAGTAAAGAGCTCCAGTTTTATCTGTTTTCTAAGTCAGACTACCAACAACATTGGGCTTAAAGA
 AAGGTTTTCCAGGGCTAAAGCAGACTTTGAGGATTAATAATCCAGTTAAATTTCTGTGTATTTATCTCTGATTT
 GACTTATTCACACTGGACTATCACTCATAAATATACATAATACAGAGTTAATCTATTTAAATTTATAAAGAGAGTA
 TTTTCTTTTTTAAIGAGCAAAACATGCTGCCAACIACITGGACCACATACTGATCCATAAATACIGACAGCTTTG
 TAAATGGAAATAAIAAATACACACTAATGAAGCATCTCAAAAGGGAAGGCCACAGGTAATCTGAGTGAATTAGGC
 ATTCATGTTAGGTTAGGCTTTGATCATTGTTTTTAATCGCAATTTTCATTGCACTGCATCTATAAATCCATGTCCA
 GAAGTATGAAGTGGTTCTATAGTAAGAATAAGATGCTACAGATAATGCGACTAAATAAGACACTATAGGTAATGA
 CACAGATTCAAGTCTTATTGTTGATGGGAAGAGGTCAATAAIGGATGATATAATACTACAGCAATGAGAAITTA
 TTGAATGTTTTCCAGACTCACTTGTATAATTTGCCATAACAGCAAAACAAAAACAGGTTCTGATAGCAAAATGAT
 ATACAGTACTAACAAGGTGAATCTTTGAGGTGAACCTTCTCTTTTAAAGTTTAAATAGTTTACCCCGACCTTTT
 CCCATAGTAGAACAGCCTAAAGATATCTTTTCACTAGAAATGCTAGTGTCTATGAGGTTTTCTTAAAGATATCATTT
 TTCAATTAATAATTTATTTTCAAAAAGACTCACATCTTGGCAGCCTTCAGGCTGAGTGTGATTGAGGCTGTGTC
 CAACGGCAACGATGAGTGAACCTTCTCACCCCTCAGAAATCACATGAGCATTCTCTGAGATGTTTTATCAGAGTGATAC
 CAACTTCAATTAATAGAATATTGAGTCCCTATTTCTTATATTCAATGTCTTTTCAAGCCCTAATTTTGTCCGGGTT
 GAAGGCAAGATCCAAATAATCAGATTGTCTTTGATAACTGAAACTGGGAGAACTGGGACIGTCTCAAGAGTTT
 TACGTGACTGTAGGTTGCAAGTACTGTGGTTGCATCTCCAATATTAACCAATCCCAAGTGACAATTCATGGGGT
 CTCTGAACCATGATCTCTCATGCTCCAGTGAAGGAAATGGGCAAGGGGATTCAAAAATCCCTTTTTGGAGGAAT
 AGGAAACTTCTGCTTTCTCTCATTTTCATAACATTTGCGATGGAACAAAGGCTTTTTTGAATGGAGCAACCAGAT
 CCTTTTTTGGGGGAATCAGCTTAAATGTCCTTCTCTCACTACTTTTATCTATGATGATCCTATTTCTTTCTG
 TTGTGGATTTGAATCATGTCCCTCAAAAAGATTGAATTTAGAGTGTGCTCTAAATTCATGTGGAGAAATTTGGAC

10

20

30

40

【化 5】

ACAGAGGCAGACACACAGGGAGAACCCCGTGTGACAAATGGAGGAAGAGGATGCATTTATGCTGCCACAAGCCAAAG
GAACACCAAAGATTGTGACGAGCCACCAGAAAGCTAGGATAAAGGCATGGGCATCACTCCCTCTGAGCCCCCAA
AGGAGCCAAAGACTGCTAATACCTGTGATCTCGGACTTCTGGCCCTGAAACAGTGAGAGAATAAGGTTCTGTGTTTC
AAGCTACCCAGCTTGGGGTATTTTGTACAGAAAGCACAAGGAATCAAGTACATTTCTTTCTCAGCACTTGTGAT
AATTTGATTTTTTCTTTTACTCAGTGGTGTGTTTCACACCTATGTCCCATCAGACTGTAAGCTTAAAGAGACCTGG
ATCTGGTCTGTCTTACCACCTGTTGATTCATTACCAGCACAGTGCCTGGCCCATGCTCACTGAATAAACGTTTTGT
TGAGAGAAATGAATGTGCTTAAACAGAGTACTATTGACCTATTAGGCCAAGTTCAAGGTGCCTAACAGCTCAGCT
GTGAAGGATAACCTCTCCTTTTCACTCCTCTGTACATATGTCCCTGATAGATGTGTTATTTGTATCTCCTCCTGGC
CCTCAAGTTTTGTTTGGGGCAGGACCTTTTTTGTATATCTGTAGAGCTTCGTAGTACCTAAATACTACTTTTGCAT
TATATAATAAAGTTTTCGATAAATATTCAATTAATAAAGAAATAAATGAAATGACTAAGTTTTCTAAGATGTTACA
ACTAGATTGAAGATATTTAGCTCATTATTTAAACAAGAAAACIATGGTTAATTATGGTGTCTGTGTGAAAATGGT
TATAGTTTTGTTTTTAAATTAATAAAGCATGTATGTGCTATATCAGTATACACAAATTTGTGGTATGAGTGTGTTT
TGTCCTCTGCACACAGACCACGGAAATCCTGAGAAACAAACTGCCACCCAGAGCAGGTGCCTAACACAGAGACTT
TTAATCCTTTAAAGTTTTTCTATAACTAAGCAATGTTTTTCAAATGCAATAACACTGATATGCAGACATTTGAT
GTCCACTCACAAAGCCATTCTCAATATCATTACAACATGCCCTCTTTGAATGTGATTAATAAATAGATGTCTCAT
TTTTCTAGGACAAGTTGGCTGAAGTTCTGTCTTGAAAACCTGGTAAATAGAAAATACAATTTCTCAACCCGCTTTGGC
CTTTTAATTTCTGTCTTACAACTTGGCCAGTTCACITTTCAAAGTCAAGGGATGCATCTTGCAAAACCATGACATCT
TTTGAGTAACTCCTTCTGTCTTAAACACATATTCCCAGGAGCTTAATAAATATTGTTTTTGAACCTTGTGTTAGTG
GCAAAATAATGAGTCTTGGTGTATGCTTATCCTCTGTCTTTGCTATTAGAGAGATATAATTCAAGCTGTTTTAAA
CAATTAATTCAGGGCAGGGAAACAGTCTTAAACCTGTTAAATTCAAATACTTGGTCACTGTATGTGAGCAT
GTGTGTTCTAGAAAAGTCTTATTTTAAAAATATAAATTGAATCTTGTGAGAAATTAATGTGATATGAATATAT
TAATAACTGAAATGTGCGCAAGTTTACAAAAAGCCCTCAATGAACTGTGACCTTGTATAGACAAGGGCCTGTGG
AGGGACATTTTTAAACCATCTCTTTTTTATTTCTCTCATGAGATCTACATGTAACTGCATTAAGTTGATGAAT
GAATGTGAGTGAACATTTTCCGCTCTTTTGGCTTTTCAATTTGTCTATATTTCAAGCTTCACTGAAGTGAATGAT
TTTGGGCTTTTGGCACATTGTCTCTGATTGCTTCCCTCTGCTCCTCTCTTTTCTAGTGAATCTTTGTTTTTACTGG
TGGAATAATCTACATCTTTGTATCTTTGGCATTTTACTTTTCAATATCTCATAGATTTTATTTCAAGTTGCTATA
AAGTTATCAACTTTTATTTTTTAACTAATATTTATTTTAAACAATTAAGAAATTTGTTGACCAGGTAATTTCCAGCACT
TTGGGAAGCTGAAGCGGGAGGATCAGTGAGCCCAAGGAGCTCGAGACCAGCCTGGGCAATGCAAGGAGACTGTCT
CTACAAAATATAAAAATACATTAGCCAGGTTTGGCGSTGCAATGCCCTGGGGTCCAGCTATTCAAGGAAGCTGAGGTG
GGAGGATCACTTGAGCTGGAGAGGTTGAGGCTGCAGTGAGCAGTGATCGCACCCTGCCTCCAGTCTGGGTGAC
AGAGGAGACCCCTATCTCGAAAAAAGGAAAAAGAGAGGATTTTGTGCGCAAGATGGCTGAATAGGAATAGCTCC
GTTCTGAGCTTCCAGTGAGATCAATGCAGAAAGGAGGTTGATTTCTGCATTTTCAACAGAGGTAACCTGGTTTCATC
TCACTGGGACTGGTTGGAGGTTGGGTGAGCCCATGAGAGGTTGAGCAGAAAGTAGGGTGGGGCTGCTCCTCACTCA
GGAAAGTGCAAGGGGTCCTCTCTAGCCAAAGTGAAGCCGTGAGGAGTGTGCCATAAGAACAGTGCATCTGGTCT
CAGGCTTTTTCCACAGTCTTTGCAACCCACAGACCAGGAGATAACAAGCGGTGCCATATGCCACCAGGGCCCGGGG
TTTTCAAGCACAAAACCTGGGTGGCCATTTGGGCAGACATCAAGCTAGCTGCAGGAGTTTTTATTTTCAATACCCAG
TGGTGCCTTGAACGCCAGTGAGACAGAACCGTTCACTCCCCCTGGATAAGGGGCAGAAATCCAGGGAGCCAAGTGGT
CTGGCTTTGGCGGGTCCACACCCACGGCGCCAGCAAGCTAAGATCCACTGGCTTGAAACTCTCGCTTCCAGCAC
AGCAGTCTGAGGTTCCACCTGAGACGCCCCGGCTTGGTGTGGGGAGGGGCATCCACCATTGCTGAGGCTTGGAGTAG
GCGGTTTTTACCTCTACGGTGTAAACAAAGCTGCCCTGGAAGGTCCAGCTGGGCAAGGCTCCAGCTGAGGCTCACCAG
GCCGCTGTGGCCAGAGTGCCCTCTGGAATCCTCTCTCTGCGCAAGGCTATCTTGAAAAAAGGCAGCAGCGCC
AGTCAGAGACTTATAGATAAAACCCCATCACCTTGGGACAGAGCACCTCAGGGAAGGAGTGGCTGTGGGTGAG
TTTCAGCAGATTTAAACGTTTCTGCTGACAGCTCTGAGAGAGCAACAGATCTCCAGCACAGCGTTCAAGCTCT
GTTAAAGATCAGACTGCCTCTCAAGTGGGTCCCTGACTCCCATGTCTCTCTGATTGAGAGACAACCTCCAGTAGG
GGCTGACAAACRCCCTCATAAAGGAGAGCTCCAGCTGGCATCTGGCAGGTGCCCTCTGGGACGAAGCTTCCAGAG
GAAGGAACAGGCAGCAATCTTTGCTGTCTGCACTCTCAGCTGATGATACCCAGTCAAAACAGGTTCTGGAGTGA
CCTCCAGCAAACTCCAGCAGACCTGCAGCAGAGGGGCTGACCGTTAGAAGGAAAATTAACAAATAGAAAGGAAT
AGTATCAACATCAACAAAAGGACGTCCACTCAGAGACCCCATCCAAAAGTCAACCAACATCAAAAGACCAAGGTA
GATAAATCCACAAAGATGGGGAGAAACAGTGCAAAAAAGTCTGAAAATTTCCAAAACACAGAACGCTCTTCTCC
TCCAAAGAATCACCCTCTCTCACTAGCAAGGTAACAAAACCTGGACAGAGATGAGTTTGACAAATTCACAGAATT
AGTGTTCAGAAAGTGGGCAATAACAAAACCTCTCCAAGCTAACGGAGCATGCAAGGAAGCTAAGAACCCTTGA
AGTTAGAGCAATTGTCTAAGTGAATAACCAAGTTTAGAGAAAGACATAAATGACCTGATGGAGCTGAAAAACACAG
CACGAGAACTTTGTGAAGCATACACAAGTATCAATAGCCAAATCGATCACGTGGGAAGAAAGGATATCAGAGATTA
AAGATCAACTTAATGAATTAATTTGAGAAGACAAGATTAGAGAAAAAGAAATGAAGGAATGAACAAAGCCTCC

10

20

30

40

【化 6】

AAGCAATATAGGACTATGTGAAAAGACCAAATCTATGTTTIGACTGGTGTACCAGAAAGTGACGGGGAGCATGGAA
CCAAGCTGGAAAACACTCTTTCAGGATATTTATCCAGGAGAACCTCCCCAACCTAGCABAACAGGGCCACATTTAAA
TTCAAGAAATACAGACAACACCACAAAGATACCTCTCGAGAAGACCAACCCCAAGACACATAATCGTCAGATTCA
CCAGGTTGAAATGAAGAAAAAATGTTAAGGGCAGCCAGAGAGAAAGGTCAGGTTACCCACAAAGGAAGCCCAT
CAGACTAACAGCAGATCTCTCTGCGAGAAACCTTACAAGCCAGAAAGAGAGTGGGGGCCAATATTCACATTTTTTAA
AGAAAAGAATTTTTCAACCCAGAAATTTTCATGTCCAGCCAAACTAAGCTTCATAAGTGAAGGAGAAAAATAAATCCTT
TACAGACAACCAAATGCTGAGAGATTTTGTCAACAGCAAGCGTGCCTTACAAGAGCTCCTGAAGGAAGCACTAAA
CGTGGAAAGGAACAATCGGTACCAGCCACTGCAAAAGCACACCAAATTTTAAAGTCCATTGACACTATGAAAAAA
CTGCATCAACTAACAGGCAAAATAACCAAGCTAGCATCATAATGACAGGATCAAATTAACCTTAATTAAGTTAGCC
TTAAATGTAAACGGGCTAAATGCCCCAGTTAAAGACACAGACTGGCCACCTGTATAAAGAGTAAAGACCCCATCA
GTGTGCTATATTTCAGGAGACCCATCTCACATGAAAAGACACACATAGGCTCAAAATAAAGGGAATGGAGGAATATT
TACTAAGCAAATGGGAAGCAAGAAAAACAAGGCGAGGGGTTGCAATCCTAGTCTCTGATAAAACAGACTTTAAA
CCAACAAAGATCAAAATAGACAAACAAGGGCATTACATAATGGTAAAGGGATCAATGCAACAAAGACAGCTAACT
ATCCTAAATATATATGACCCCAATACAGGAGCAGCCAGATTTCATAAAGCAAGTTCTTAGAGACCTACAAAGAGAC
TTAGACTCCCACACAATAATAATGGGAGACTTTAACTCTCCACTGTCAATATTAGACAGATCAATGAGATAGGAA
ATTAACAAGGATACCTCAGGACTTGAACCTCAGTTCTGGAICAAAGTGGTCTTAATAGATACCTACAGAACTCTCCAC
CCCAATCAACAGAATTTACATTCTTCTCAGCACCACATCGCACTTATTCTAAAATTCACCACATAGTTGGAAGT
AAAACACTCCTCAGCAAATGCAAAAGAACGGAAATCATAACAGTCTCTTAGACCACAGTGCAGTCAAATTAGAAC
TCAGGATTAAAGAACTCACTCAAAACCGCACTACATGGAACCTGAACCTGTCTGAAATGACTACTGGGTAA
ATAATGAAATGAAGGGCAAAATAAAGAGTCTTTGAAACCAATGCAACAAACACACCAATGTACAGAAATCTCT
GGGACACATTTAAAGCAGTGTAAAGAGGGAAATTTATAGCACTAGATGCCAAAAAAGAAAGCAGAAAGATCTA
AAATCGACACCCCTAGCATCACAATTAAGAAGACTAGAGAAGCAAGAGCAAAACAAATTCAAAAGCTAGCAGAAGAC
AATAAATAAGATCAGAGCAGAACTGAAGAGGAGAGAGACATGAAAAACCCCTTCAAAAAATCAATGAATCCAGGA
GCTGGTTTTTTGAAGAGATTGACAAAACAGATAGACCACTAGCCAGACAATAAAGAAGGAGAGAAGAATCAAATA
GTGCAATAAAAAATGATAAAGGGGGTATCACCCTGATCCCACAGAAATACAACTACCATCAGAGAGATACT
ATAAACAACIACACAAATAAACTAGAAAACTTAGAAGAAATGGATAAATTCCTGGACACATACACCOCTCCCAAGT
CTAAACCAGGAAGAAGTTGAATCCCTGAATAGACCAATAACAAGTTCTGAAATTCAGGTAGTAATTAATAGCCTA
CCAACCAAAAAAAGTCCAGGACCAGACAGATTACAGCCGAATTTCTATCAGAGGTACAAACAGGAGCTGGTACCA
TTCTTCTGAAACTATTCCAATAGAAAAAGAGGGAATCCTCCCTAACTGATTGTATGAAGCCAGCATCATCGTGA
TACCAAAACCTGGCAGAGACACAACAAAAAAGAAATTTTCAGGCCAATATCCCTGATGAACATTGATGCGAAA
ATCCTCAATAAAATACTGGCAAGCGGAATCCAGCAGCGCATCAAAAAGCTTATCCGCCAGGATCAAGTCCGGCTTC
ATCTCTGGGATGCAAGGCTGGTTCAACATACCCAAATCAATAAACCATCATTCTCAGCAATTTATCAACAAGAACA
GAAAACCAAAACACCGCATGTTCTCACTCATAAGAGGGAGTTGAACAATGAGAACACGTGGACCCAAAGGAGGGGAA
CATCATACTCTCGGCTGTGAGGGATTTGGGGTTGAGGGAGTGATAGCAATTAGGAGAAAACCTAATGTAGGT
AACAGGTGATGGGTGACGCAAAACCAATGCGATGTGTATACCTACCTAACAAACCTGCACGTTCTGCACATGC
ACTCCAGAACTTAAAGTATAATAATAAAGGGCGTCCCTCAGGATGTAAAGTGTAAAGTGAACAAGGGGGCTGGGTGGC
AGCGTGGGCTCTGAGACTTTTGGTTGGCCGTGTCCGACGCTCGCCCGCAGCCGGCTCCCAATGGTCCGCTCC
GTTTGGCACGTGCGGATTGCGGTTCCAGACTGAAGGCTGCGGTGTTCTCTGCCGCCACAGCCCAAGTTTATTGTG
GCAACCGCCGGAGCAGCCTTCCCCGCTGTGGAGGAGCCTGGGGCTACCCCTCAGCGGTATTTGGGGCTGGTCTCTG
GGGGAGCTAAGCAGGGTTGTGGCAGCACTGCCTGAAAGTGTGAGACCAGACTCTAATCCTTATGGTTTTTCATGG
GAGTTGGTGATATGTGACGCTGTACATGGATTTTTCCTGTTCTCTTTTTTTGTGTGGAGAAGTTTATAGTCGGT
TGGGAGTCGGCTTTTATGTGGGAAGAGAAAAAAGCTTGTGTGAATGCTTTCTGGACTAATTGAAGAAAAAGCATAA
ACTACTTGAAAAATTTAGCCATGTTCAAAAAGAGTATGAAGGCTATGAAGTAGAGTCATCTTTAAAGAATGCCAG
CTTTGAGAAGGAGGCAACCTGTGAAAAGCTAAACAGGTCCAATTTCTGAACCTTGAGGATGAAATACTCTGTCTAGA
AAAAGAGTTAAATAAGAGAAATCTAACATTCTGAACAAGGTGAATTGATGGTGGATATTTCGAAAAGGATACA
GTCTCTAGAAGATGAGTCAAAATCCCTCAAAATGACAAGTACGCTGAAGCCAAATGAACCTGAAGATATTTCAAAT
GAATGAAGAACGACTGAAGATAGCAATAAAGATGCTTTGAATGAAAATTCTCAACTCCAGGAAAACGAGAGACA
GCTTTTGAAGAAGCTGAGGTATGGAAGAACAAGTGAGTGAACCTTAATAAACAGAAAAATAACATTTGAAGACTC
CAAAGTACATGCAAGAACGTTCTAAATGATAAAGAAAAATCACATCAAGACTCTGAACGCTTGTCTAAAAATGAAA
GATCAGGCTGCTATGCTTGGAGAGACATAACCGATGATGGTAACTTGGAAATTAGAAATGAACAGTGAATCGGAA
AATGGTGTCTTACTTAGATAATCCTCCGAAAGGAGCTCTGAAGAAACTGATTTATGCTGCTAAGTTAAATGCTTCT
TTAAAAACCTTACAAGGAGAAAGAAACCAATTTATAGTCAGTTATCTGAAGTTGATAAAGGAAGAGCTTACAGA
GCATATTAAAAATCTTCAGACTGAACAAGCATCTTTGCAGTCAGAAAACACACATTTTGAAAGTGAGAATCAGAA
GCTTCAACAAAAACTTAAAGTAATGATTGAATTTTATCAAGAAAATGAAATGAACTCCAGAGGAATTAACAGT

10

20

30

40

【化 7】

AGATGAAATTACCGGTTAGAAAAGGAAGAAAACTTTCTAAAGTACACGAAAAGATCAGCCGTGCCACTGAAGAG
TTGGAGACCTATAGAAAGTGAGCCAAAGATCTTGAAGAAGAGTTGGCGAGAAGTATTCATTCTTATCAAGGATGG
ATTATTTCCACAGAGAAAAAGCACATAAIAATTGGTTGGCAGCTTGGACTGCTGAAAGAAAACCTCAATGGTTTA
AGGAAAGAAAGTGTCTCACAACAGACAAAAATTAACIGAAGCAGAGTTTAAATTTGAACTTTTAGAAAAAGATCCT
TATGCACCTCATGTCTCCAMATACAGCATTGGCAGAGAGCAATCCCCATATGGTCCCTCACCCTGGGTGGGCT
TCATCCTAAACAAGAGCTTTTCTCTGAGGGGCCACTGAGACTCTCATCTTTGCTAACAGGAGGAGGAGGAAGAGG
CTCAAGAGGGTCCAGGGAATCTCTGGACCATCAGATTACCAATGAAAGAGGAGAATCAAGATGTGACAGGTTAAC
CAATCCTCACAGGGCTTCTCTGACACTGGGTCCCTGTCAACCICCATGGGAACAGGACCGIAGGATCATGTTTCTT
CCACCAGGACAATCATATCCTGATTGAGCTCTTCCCTCCACAAAGGCAAGACAGATTTTATTTCTAATTTCTGGCACA
CTGTCTGGACCAGCAGAACTCAGAAGGTTTAAATAGACTTCTTTGGATAAAGTGGATGGGTCAATGCTTTTCAGAA
ATGGAATCCAGCAGAAATGATACCAAGATGACCTTGGTAATTTAAATGTGCCTGATTCTCTCCCTGCTGAA
AATGAAGCAACTGGCCCTTACTTTTTCTCTCCACCTCTTGGTCCCAATCAGAGGTCCATTGTTTCCGGGGGATACA
AGGAGCCTGTTCATGAGAAGAGGACCTCCTTTCCCCCACCCTCCTCCAGGAACCATGTTTGGAGCTTCTCAAGAT
TATTTTCCACCAAGGGATTTCCAGATCCACCACATGCTCCATTGCAATGAGAAATGTCTATCCAGCGAGGCGT
TTCCCTCCTTACCTTCCCCCAAAACCTGGATTTTCCCCATAAAACCCACATTCTGAAGGTAGAAGTGAGTTCCCT
GCAGGGCTGATTCTGCTTCAAAATGAGCCTGCTACIGAACATCCAGAACCACAGCAAGAAACCTGACAATATTTT
TGCTCTCTTCAAAAGTAATTTTGAAGTATCTCATTTTCAGTTTAAAGTAACTGCTGTTACTTAAAGTGATTACACTT
TTGCTCCCACTGAAGCTTAATGGAATTATAATTTCTCAGGATAGTGTTTTCTAAATAAAGATGATTTAAATATGAA
TCTTATGAGTAAATTTATTTCCATTTTATGTTATTTCTGATAGTATAACTATTTTAAATTTGATAAACTAATCCACG
ATTATATAAACAATAATGGGAGTTTATATATGTAATCTTGCAGGTAGGGAGGCTTTAATTTAAGAGGTTGTGT
CTTTATGCCAAGAACTGTATTAACCTGTGGTTGTAGACAAATGTGAAAGTAATTTTATGCTTCATTAATTAATTT
TAGTTGATTTTTTTTTAAAAAAGAAAAATGGTTAATCTATCATTTAGGTGCATCATCAGTTGTTTAAACATTCTC
TCTTACTGAACATTGGGTGTGTTTAAAAAGTGTGTGTTTGAATCATGGTTTCACTGAACAAATTTGGACACAT
AACTTTTATCTGATGAGTTATTTTCTAAGGATCCAGCTCAGAACTCAGCACATAAACCTAATAAGAAAAAAC
AATTTGAAGTGGCTAACCTCTTATCCCAATAAAATGTGTATTTATGTTTGGATTTAGATGCTTTTCACTGGCTC
ATACCTTCACTTAACTTTTATGGATTCTACTTTTAAACATGTAGAGTGACTGTTTAAATCACCCTAAACTCACTGAG
TTTTAAGTTTCCTTTTTATTTCAACAAGACTGGATTGTTATGTTCCAGCTCCTCAAACTTAGTTACCAACCACCATCC
TAGAGAAGTGAATTCACATGAGGCCTGTCCAGAAGAACATCTCCCTTTTCACTGTCTCATGCACTGAGTGACCA
GAGACCAACCTTGATAAATTTATGAAAAAGTACAGCACATTCTGGAAGAGCCATGAAAGATCCAGATCATCTGGT
GCTGGATAAGAAATATTAATGGACAGGCTGGGCGCGGTGGCTCAGGCTGTAATCCTAGCACTTTGGGAGGCGGAG
GCGGGCGGAACATGAGGTGAGGAGATCGAGACCATCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGCTCTCTACTGAAAAATAC
AAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCAGCTACACGAGAGGCTGAGGCAGGAGAAATGGCGTG
AACC CGGGAGGCGAGAGCTTGTAGTGAGCCAGATGGCGCCATTGCACTTTCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTCC
GTTTTCAAAAAAAGAAAAAAGAAATATTAATGGACAAAAAGATTAAATGAAAGAACATATTGAAGCATCCAATTAC
CTGGTGCTCTGCTCAAAATGAGGAATCGGTGAGATAGGTGAGTTAGCAGTCAAGATTTATAAAGAGACAGATGGCCT
TGGGAGGGGCTGCCCTACTCGACTTTTTAATGGCTAGAAGCTATTAAGGGCTAAGCCAGAACCCTTCAGTATGGT
TCAGTGAGGATCCCAATTTGGGGTCCAAAAGTAAATGACAACCTCCAGGAACCATTAAGAATAAAAAATCATGGAG
CATTACTGAGAATTTATGTTATCTAAGTCTGAGGAAAAATTAATGTTAAGGAAGCTTTCAAAAGTCTAATATTTAC
ACCGAATTCAGGGCACCATGCTCTAAGACAAAGCACTCTGGTCTCTGCCCTCTCTCTTTCCCTCATGTTTTTTGGT
TCTTGGGATCCTTAAGGGTCAATGTTATTTCTTAAATACAGAGCATCCTGGAAACTAAAAAGTGGAAAGATATTC
AAATCTAATGAATGTAAGTGGCAGTATTTGATGATCATGGAGTATAACATAAAGACAAGAAATCCCTAGCCTCTTCC
ACCATACCTTGTAAATGGTAAGGAGAAAGGATAGAAATTTGAGAAGTCTGGGAAGACAATGATGATAACATCTGG
AGAAGCTCTGCATAAGTTACTTTTGTTCAGGCTTAAGAAAAATTTCTAGCTTGGCCCTGCAGTGTATCAGGTATC
ATGAAAGTAAATAAAACCTTTAAAGATTCTTCAAGCCAGCAGACTTCTATCTTCTCTATACTATCCTGTGATCCT
AAACTCTTAAAGATTACTACGTATAATTTCCCTACATTTGCTACTAGTATTTTATCATACACAATATTACACTCA
ATATTTCAAAAGTGGATGATTCTCTCCGAAGAGACTGCAAAATTCATGAGTTAAGATTTGAGAATACTATTTT
AGACAAGATTTAGTCAGATTTTAGAGAGTTAGAAACCTGTAACAATTTCTTAACAATACTGCTTCTCTTTTGTG
TATTAAGGAATTTTGTCTATCAAAGATAGTACGAGGTAGACCAGAAGTAACCTGCTTCAAAATGTCTGGAAT
GTAAATGGCAACAGTAGTATTTGGGGACTTCGTAGGGGATGGCCAATATACACCCATTCTTAGAGGTACTGATG
ATATAATGATAAGACAAAATCAAGTGGTCTCCATCACCATATAATGTTTAAATGGCAAGAGAGGAGCAGAACAA
AACACCCCTTTCGAAATCTCTTCATAGAATCTACCGTAATAAACTTGTACTTGTCTTAAAGTGTGTCTTTCAGTGG
TCTTATTACCACTACTTTGGGGAAAAATGAGGCTGCTTAAAGATTAAACAGACATTACATTTTACATACTGTGGC
AGAGAAAACACTATGTATTCACCAAAACCACTTCTTTTCCCTCCCACTGCTCGGGAAGAGGTCAATTTCTTTGTCC
CCTTTCACTTAAATGAGGTGCCGTGACTACTTCTAGACAGGCAATGTGAGCAGAAGGTATGCACGCCACGATAG

10

20

30

40

【化 8】

GCCYGGTCTTCAAAAATCCCTCAGATATGATCTTCTCTCTCGTCTCTTTCAITGGACAAACTACAGGCCATGTAA
TAAGGATGGTGGGGTTCCAAACTGAAAGAGCCTGGATTTCTGATTTACTGTTTTGAGAAGAGTTCACCGGGGAAA
CAGCCTGGAAATACGCACAGGAAATATGCACAGGACCCCTGTGTGAGCAAGATATAAAGATCTATTACATGGTGC
CATTAAGGTGAGAGTATTTGTCTTATAGIATCCAGCATTAAITATCCTCACTACTACAACCTTCITTTGTATCCATC
ATGTGGAAAAGTAGAGTATTTAATAATGATTAITGAGTTTATTACCTTTTTTATATTCBATCATTTGCTAATTTG
TACGTTACCTCATTTCAAGGTAAAGGTGAOCAGGGCTAAAGCAGTGTATCCAAACCAAGCCAGACATCAAAAT
CACACAAAACCTTTTGAATAACAACTTTGAAGATGCCATTACATAGATATTTATTTCAGTGGSTTTTCAAAATGG
AACCCTGGAACTACAGTCTTTAACAAGGCTTCCCAAGTTATTTCTGATATACAGCAGGCAATCTGAGAACCCT
GGACAAGAAGAAAATAAAGGCTATATCTTTGACACAACAAAGACAATGCCTTAAACATAGAATGTATTTCAATTAAA
GCTTGTAGAAAGATAGGTTTGTGAACAGGCACAGGCACTAGCCTCGAGCAATTAATAAGGGCAGCAATGTTTTT
CACTGAAACCAITATTCCCTCTATTTTATTTCTCTGCGGCTCTGTGTTTCTCTTCTCTATCAAAATCCATTCT
AAGGTTGGAGGTTGGGGGTATCTCTTGCCTACTCCATACAGCAAGGAATAAAATTAGTATTTCTCGAATCTCTG
TGACAGCAGACCCATTGTAGGCGAGTACTTTTGTAAATGCAATAAAAATTAACCTCTAGAGAATGAAATTTTAA
AATCACAGACATTCAAAATACAAATTCCAATTTTTTATTATTAACTGTAAGAAATTTAAATTTAAATCTCAATA
AATAAAATTAAGCAACATAAGATAGAAAAAATAAGCATTATGGATTGGCCAGTCTGCAACTGTATACACT
TTGCCAAACATGGGCATAAATTACTAAGAAGCAAAATCTTCCATCTGTAACATTTCCATTTCCATTGACAAT
GTGTGAGGGAAAGGAGGGATGCTTCTGTTTTAGAAATGCCAGGCGTCAGCTAACAAAGTGACAAATACCTATTGAGA
CTGAGATCTCCCCAGCCTCTCAGTAGTCAGCAAGAACATGTTGAGGCCTCTGTTTTTGACTAAAAAATTGGCCAG
TGCATGGGCAACATGCTAGGTTCTGAATGAAAAAATAAGCAGCAGCAAAATTTAAAGAATTTTCACAGCTAG
GCCACAGTAAATTTCTCAAGCCCTTCATCAGAACCCACTGTGGGGCCTCATTATGCTTTTGTTTTTTAAATTTG
GATGTGATCTTAAGATTCTTCTGTCAAAATTCCTAGCATGTGAAGGCACCAAAAGTTTAAATGTAAAAATTAA
CCCAAGTTAAGCTATTCCATTATTAAGCAATAGCAGATATAATTTGTTATTATATGAGAAGAAAGTTAACAGGGAG
CTAAGATTGATGTTACIGATAAGAAACAGAAACAAGACTTTAAATTTAAATATAATGAATTTATTTTAAATAAGA
ACCAATTTGACAGATTCTCGATAAAGACTGTAAAGATGCTTAAACATTAGGTGTATGGAGATAACATTGTAACT
TTGACAATTTATATGATGAGAAAAATCAAGGAATGTTATTGTTTTATTGGCAGAGTTCTAGAAATACBATTCCATC
ATTCTGTTTTGGGGAAGTTTCCCTTGAAGTAAATGATAACAGGGCTTGAATAGTACACCTCAGCATTTTGTTTA
TAAACTGTGGAAATAGGTAAGGTTTGTATTGTAACCTGAACCCAGGTTTCACTGCTTGTCTTAAAGCTAGACA
TAAGACAGGAAGGTTGGTGGGAGGAAAAGCGATTTTAACTGGAGAAGCAGCAAAACCAAGAAGATGGTGAACAATA
GTCACAGAACCATCTTAAATTTTAAATTTTAACTATAGAGTGTTCAAAGGAAAACTTGGTATGGGAGGCAATGCAGG
AGGGGTGCAGGGGGGGGGTCTGTGTGCTTGTTCCTCAATGGCTATCTCAGATAGTCACCCATCTGGAGGTCTAGT
TGGTATTTATTTGAATTCAGCCAGTGGTGGTGGACTGTCACTGACTCTCTGCTAAGCAGGAGGATTCTGCACCTC
AGGGCTCCATGCAATGTTTGTTCAGATTGGCCTCTGGAATTTCTCAAGCAAGAACATAATTAAATAAGCAGGC
ATTGCCAGAGGGGAGTGTCTGGAAAGGAAAGGAATGAAGAGATGAAAGGAAAGTGGGTGGTTAACTATATTTTT
AAAACGTAGGTTTCCAGTTATAGTATGTTTCCGACGCTTCCCCCATTTTATGACCCCTGACAGAAATTAAGTAAATC
TCCTCATCTTGTCTCTACTTCAGGTCCCTATCTGTCTTGTACTCTCCAGGGTTTCCTTTTCTTCTTCCAGC
CTTCTTCCCTGCAATTTTATAAGCTATTCTATCCAGTGATTTAGTTTTCAGCTTATAAAACGTGTCTTTGOC
ATTGTAATCAAAATGAAGGGCTCTGCTTCATGGTGGATTCTGTGACCAGGAGACTCTTACGAGGAGTTGGCCA
GGTCTCTGTITAGGAAAGCAAAAAGAACAAATGGAGGCAATTTATCCATTGATTTTCAGCTATAAAATCTTATTTGC
CTGAATTTGCTGAAACGATGAGTATTCTGTGAAAAATGCTGCTCTCTAGTGCAATAGAACTGCAAAATATGCACATC
TATTTCTTATAATCTCATCCACATACCCACAGAGATTGAGATCTAACAAAACAGAGGTGATTTGGTTATTGAAT
CATAATATAAATATGGGGAAGAGGAGGGGAAATTTCAAGCCTGAGGAAACTGTAGTAGGAGIAAGTATGCTGTGTT
TAAGAGGTACACAGATAAAATTAATATTACCAATCCATCAATAGGCAATTACTAATAGCTTACTACACACACAGGA
ATAAAATGTGAAGACAGAGGAAGTGTAAATGCGAGCCGCCAATCTACGGAGTTGTTTGCAATTTGGTCTGGTAG
AAAGCTATGAAATAAGGAAGTACATGATTGAGAGCTAGAGAATGTGGCACAGGCTCTGAACCCCGACCGTTCAAT
GTAGTAAGCTCTAGCCACACTGGACACTTGCAATGTGGCTTGTCCAAACTGACATGTGCTTTAAGTATAAAATAT
AATCCAGATTTCTAAGACTTCAAAAAAATGGAAATACTCATTAATAATCTTAAGTTTATTAACAGGTAGAAATG
ATAGATTAATAAATATATTGTCAAAATTCATTTGATCTGTTTCTACAGTATAACAAACCTTACTTGTGTGTTT
GCATTTTATTTCTACTGGATAACATGGCTTTAAAAATGGTATTTTAGAGGAAGGAAAGCTTGGTAGAGAATGGAC
TAATCCGGATCCCTGGAAGAAAATGGACCTTGAATGGGCTTTGATGACTTGGAGAGGCAGAGAGAGAAAAAGAAAA
GTCAAAACATAGGGAATTTGGTTGATAAAATGAAGGTGAGGGGAGAGGAACAGAGGGAGGAGAGATCCAGTTTGA
GGGATATTACAGCGAGCAGCCTGAGAAAGAGGATAAGAAAGGAGAGAAAAATGCAAGGGGAACTAACCTTCAA
AGCCAGTCAGAAAGTTTCTGGGTTCTCAGCAGCCAGAAAAAGAGCCGTTGAAAAGATCTGAGTAACGGAGATTCT
GGACGAAAACTGAAGTTATGGAAGGGAAGTTAGACATGGGTTATTAAACGCTTTAGCGCATTAGAAGTTTCTTA
TGTAATCACTAAATTCAGATCTGAAATAATGCCACAAGAATATACAGCTCAGCCACCCAATTCAATAAGAAGT

10

20

30

40

【化 9】

TACAGCACAGICTCACACATATCCAATTAACCTTGGCCCTTITAGTCAACATCTGGGTTCITTTTTGTCAITTTTCAAA
TACTATCACCAGAGGTGCTATGATTTATATTGGGGAGGGGATTAAAGAAAAATAAGTAAGTTGGTGATAAGAAA
AAGCTTTCAGATGATTCCATCTGAATTAACAGCCCTCITTTAGTTGTCTAGGAAAGAGGATGCTTTTTCTTGAAAG
TGCTTGTAAATGAAGATGTGCTTGTAGTAAACATCAATTAATTTTCAAAATCGTAATGTTTGCAGTITTTGCTTCC
TGTAAGCTCACCCTTTATGTAGGTCCAGAAATATGATTTGTCACAAATATCTGGGTGAGCAGACTATGAAATGTGGT
CATAAAGTAAGTGAATTAATTTCTAAACTCATCTTTGTCTACTCTAGTGTCTTCACAAAGCACTTTCTCTGGACTAC
AATTCATTTTAAATGTATCCCATCAGCACTATATCTGTATCCTGAGTGACTTCACAAATACCCCTCATTTTCAAGAGA
AACCAATCAGGTTATGGGTTTGTAGTAATAAAAAATTACCAAGGAGCAGTTTGTGGATGGTAAAAAGCAATGCAAA
TTCTAAAGAGAAGTCAAGAGCAATAATAAGCATCTCTCTCACTTCTTGGAAAGTGAACAAATCCAAAGCTCCCTG
AAGCAACACTTAACCTATCATATTAACAGTAATGGACAAATATTAGAAATGTTGATGTCAGCTTTCAGAAATCTG
TGGGCATCAAAACATCACTTAAGTTCTCCGAAGTATTTCTCTGTCAAGTTTCTCTTCTACAGTATTTCTTTCTACT
AGGACAGAGCCTTAAGCCCTAGAAAGATAATTTTGTCTGTGTGTTAATTATTTGTTTACTGGTTCATTCAGAGT
GTGAGCTGGAAAAAGGGGGAAGTGTCTATAAATAGTTTTTTATGGCCCATGGTTTTTCAACTACCTCACTATTGGT
AGCAGTTTCCACTGCAAGGATCTATTTGCAAAAGCCTAGGAAATTAAGCAAGCTGCTAGGAAAGACTTCAAC
AGTAAGTAGGCCACAGGCCCTCACACATTTTTCTCCACCCACAGCCTCTCTGAGAGTACTTGCTAAACCTCTGT
GACACATAAATGAAGCAAGAAAGTGTATAGAACACAGAAATTACACGGGCAGATCCTTGTTTCTCTCTCTCTCTCT
AAGGAATTTCTTGGACTGAAAAGCAGTTTATTTTGGAGGAGTGAGAAAGTGGTGACAGAAATTAGAAAGGGCCTGGG
AGGGCTTCAITTTTAGGAGACAGTTTTAGGCTGAAAAAGAGATTTCATGAGTGTGATTTACCTGAGGTGACTTTTGG
GGGCTCTTAAATAAAGGAAGTTTCAATGCTGAATGGGAGGTGGCTTCTGAGATGCAGATTCTGGTGAAGCTAAGAGGG
CTCGGTAAAGAGGAGGAGGAGGATTAAGTAGCCTGAACATATGCAAGTASCAGCCTTCTTCCCCCTTGTCTGGSGCA
GGTCATCACAAACCTTCTCAATAAAGGGGTCCAGGAACCACTAGGAATAAATGGGCATTGCACTTCAGGTGAAA
CCCATTTGTCTAACTGCTTGGACTTTAAGCTTACAAATAAAGAAAGAACACATATTTCCCTTTGCAAGCTTGATTT
AGTTAATGTCAITTTGAGAAAGAAAGAGACATTTGTTATCCCGTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGA
AGAGACTGGGACTCAGAGAAGTCAAGTGATTTTCCAGAACACAGAAACACAGAAAGTAGCAGAGCTGAGATGACT
ACTCCGGTCTTCTGATTCCAAATTCCAAATTCATTTCTTAAGCGATTTCCCAAAACGGGAATGGGTTTATCTT
CTATTTATGGGAAGTGATAGTGGTATTTCTATTTAGAGAAGTTATATAAAATCTTACTTTAAAAATAAATAATTTT
CAAAAAGTAAGCTTAATTTAAGAAAAATAATCAAGAAAGTCTGGTATATTTTACAAATATACCAATGACCTTG
CTCTAAAAATACATCTACTTTCCAGCAAGCCAAAGTGAACAAATTTGAATAAGTGGCATTACTGACCACTCCCT
AAAGTTACACAAAAAGAGGTACTACTCTAACTTAAATATACAAGGTGAAGAAATAGCTTACTCAGCCTGTTGGGC
TTCTCTCTCTACACTCTTGGGAAATGCCCTCCGTGTTAAACCAAGATTCTCAGGCCTTGGAGGGAGTTTTCATT
CTCAGTAAACTGAGATTGCAAGTTGCGGAAATTAAGAGGTATCTGTCCAGCACTTCATTTCCCTTAAGGTGAGGATC
TGTGCTTTTAAATAATGACATTTAGCTAACATATACAATTAAGCCATGCAATGAAGTAAGAGAAAGCTAGAGGAG
AAATTCAGGAGCCAGTTGCCCTTTCCAGACATCTTGTACAATAGTGTTCAAAGGACTAATTCAAAAGATGGGAT
TCTTCGCTTGAACCCAGGAGGTGGAGTTTGAGTGGAGCGGAGATCGCTCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAAA
GTGAGACCCCATCCAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGATGGGATTCTTTTTTAAAAAATAAATTTTACT
GCGTATTTTTAAGGTATACACCGTGATGTATATAAGATGGATATAGATAGTGAAAAGGTAACTGTAGTGAAGCAAA
TTAACATATTCATCTCATATAGTTATCTTTTATTTGTTTTGTTTTGATGGGATTTTTAAGATAGTAGAAAGG
AATGGTAGACAAATAAACATTTGAGGGAAAGTGGGGCTTTGTAGAAGTCTTAAATGACAGCAGGCACAAATGTCC
CCATTAATGCTTAAAGGGTAACCTGTTCTTACTTTTAGGGACAGCTGAGGGACATCAATGTAAATTTCTAAATGAC
TTCTGAACTTTTTATTTTTTATTTTTTGTATTTTTAGAGGAAATTAATAAACATCAAGCCACCTCTGGACCATA
TCGCTGCTGATATCATCAGCAATGGCAGTATTTCTTAAATCTTAAGATGCACTTTTCCCTTCAATTTCAACATTT
TGTGAAACTCGATTGTACCTACACCTGATTTTATATAAATGCAAGCCTTTCTTTTCTTTTGTCAITTGCACTTAA
CGCCTGATTTCTCTTGGAAATGAGTAAATATAATGCTTACATGTGTTAATAAGAAATGAGGTCACTCATATTTT
TTGAAATATGCCACCAATATAAGCCTTTCTACATATTGTTGACTTTGAAGTCATTTCTTTTTTAACTACTAAA
CAATAACACTTTTTTGTGAGAAAAATTGCATATGAACAAGAGACCAAGCAGGTAGAGAGAAAAAACTTTTAATA
ATCAAGAGAAATGTTACTGTGTCCCAAGGCTAAAGTCACTTACTATCAAGAGAGAAGGACAGGAACAGAGAGAA
CCAGGTAAATTAAGAAATTTCCATGGTTCAATTTATCTTTATTTTTAATAATTTCCATTTGTGTGATTTGTGT
TGACCACAAGGTCAATATGTTACTCTTCACTACTGACTTCTCATGTAAATTAATAAATAGTTTTATGCTAATGAT
TTATGGAGTAAGCTATTCATCTTTCCGACAGAGAGTTACCTACAAAGAAATAATTAATTTACCTCTGAGATGAAA
TATCATGAAGGAGTGGTTTTCCAGATATTTTGTCTTTTAAAGCTTAAAGAAATATATGTAGTATAAATTTCTAAA
GCAGGCAAAATTAATCTTTTACCAATCAAGATAGCGGCTACTTTTGGTGAGAAGGACAAAGGTAGTATAGAGAA
GGGGCTCAGGGGCTTTTCTGAAGACAGTGAGGTGGGCAATGGTATTTTCTTGACCTGGATGGTGATTAACAG
ATGTGTTTACTTTTGTGATAATGACTAGGCTGTGCACCTATGAAGTGCATCTTTTCCATATATGACTGTATTC
TTATACTTAAAAAGAAGTTTAAAAATAAATGCAACAGATATAGGACTTCTATATTACTGTTGACCAAAAAAAT

10

20

30

40

【化 1 0】

[illegible]

10

20

30

40

【化 1 1】

GAGTGGGCATCCTTGTCTTGTTCAGTACTCAAGAGAAATGCTTCCAGCATTACCTGTTTAGTATGATGTTGGC
TGTGGTTTGTGTCATAGGTGGATCTTATTATCTAAGGTATATTCCTTTGATGCCTAGCCTGTCGAGGGTTTTTAAT
CATGAATGGATATTGAATTTTTATTGAAGGTTTTTTCTGAAACTATTGAGATGATCATATGGTTTTTGTTTTTTCA
TTCTGTITATGTGGTGAATCACACTTATTGATTGTTAIGTTGAACCAGCCTTGCCATCCCAGGAATAAAGCCTAC
TTGATTGTTGTGAATTAACTTTTTGATGTGCTTCTTGATTTAGTTTGTCTCATATTTTGTGAGGATTTTCGTGTT
TATGTTAATCAGAGATATTGTCTGGAAGTTTTCTTTTTTCAATTGTGTCTCTGGCAGATTTTGATATCAGGATGAT
GCTGGCATTGTAGAATGAGTTAGGAGGAGGCCCTCTCCTTAATATTATGGAATAGTTTCAGTAAGATTACTATC
AGTCTCTTTTGTATGCTTGGTAGAATTCAGTGTGAATCCATCTGGTCCAGGGCTAAATTTGGTTGGTAGGTTTT
TTTTATTACTGATTCATTTTTGGAACCTGTTATAGGTCTGTTCAAGTTTTCACTTCCGCTCGTTCAATCTTGGG
AGGTTGTATGTTTTCCAGGAATTTATCCATTTCTCTAGATTTCTTACTTTGTGTGCATAGAGGTGTTTCATAACGG
TCTCTGAAAACTTTTGGCATTCTGTGCGGATTTGGTGTGAATGTCATTTTTTGTTCATTTCTTGTGCTTTTTTGGAACT
TCTGTCTGTTTTTCTCTGTTTTCTAGCTAGCAGTCTATTAGTCTTGTTTTATTCTTATGABAAACCAACTCTTTG
TTTCACTAACATTTTTATGGACTTTTGCATCTCAATTTTTATTAGTCAATTATCTGATTTTAGTATGCTTTTTCT
CTGCTAGCTGTGAGATTGAATTTGTGCTCTTTTTTCTAGTTCTCTAGTGTATGTTAGATTGTTTAGTTGAGAT
CTTTCTAACCTCTTGATGAAGGCATTTAGCACTATAAACTTTCTCTTAACTGCTTTTGTCTAACATCCCAAG
ATTTTGGAAAGTTGTGCTCTATTTTTCAATTAATTTCAAATAATTTTTTGATTTCTGCTTAAATTCATTTGTTTAC
CCAACAGTTATTCGGGAGCATGTGGCTTAATTTCCATGCTTTTGTGTAGTTTTGAGAGATCTTCTGCTATTGAT
TTCTATTTGTTATTTCACTATGATTTGAGAGTGGCTTTTGTATGATTTTAATTTTTTTTAAATTTATGAGACTTGC
TTTTATGACTGAGCATGTGGGCAATCTAGAATAAGTTCCATGTGCATATGAGAAGAATGTGTGTTCTGTCTATTG
TTGGCTTGAGTATCTAGAGAGGCTTATTAAGTCCAACTGGTCAAGTGTCAAGTTTAAATCCAGAAATCTTCTGT
CAGTTTTCTGCTCAGTGTCTGTCTAATGCTATCAGTGGAGTGATAAAGCCCCCACTAATATTGTGCTGCCATC
TAGCTTTTATTGTAGGCCAATAATTTGTTTTATGAATCTGAGTGTCTCCAGTGTGGGTGCATATATGTTTAGAAT
AGTTAAGTCTTTTTGTTCATTTGAACCTTTTATCAATTTATAATGCCCTTCTTTGTCTTCTGATTTGTTGTTGG
TTTTAAAGTATGTTTTAATCTGATTTAAGGGTAGCAACTCCCTGCTCTTTTTTGTTTTTTCAATTTGCAATGGTAGATCT
TTCTTCAATCTTTTCACTTTGAGCCTGTGAGTGTCAATTCATGTAGGATGCATCTTCTGAAAACAGCAGACAGTTGT
GTCTTGTCTTTTTATCCAGCTTACCCTTTATGCAITTTAAAGGGAGAGTGTAGACTGTTTACATTTAGGGTTAG
CATTGACATGTGAGATTTTGTCTCTGTCATTTGTGTGTTTAGCTGGTTGTTTTGTAGACTTCATTTGTGTAATAAG
TGTATTTTTATTGCTAGCAGGTTTTCTCTTTTCAATTTCCATGTTTAGCAATCACTTACGGATTTCTGTGAAGAATC
ATCTGGTGGTAATGAATCTCTTTGGTGTCTGCTTGTCTGAGAAGGATTTGATTTCTCTCTCACITATGAAACTCA
GTTTGGTGGGATATGAGTTCTTGGTTGAATTTATTTCTTTAATAATGCTGAAAATATAGGCCCCCCCATATCT
TCTGGCTTGTAAGGTTTTCTGCTGACAGAACTGTGCTGGCCGTGATGAGGTTCTTTTTGTAGGIGACCTGACCTTT
CTCACTAGCTGCCTTAACTAATTTTTCTTTTGCATTTGACCTTGGTGAATCTGATGACTATGTGACTTGGCAATGG
TTGTCTTGTATAGTGTCTCACAGGAGTTCTCTGATTTCTTGAATTTGTATGCCACCTCTCTGCTGAGATAGGG
GAAATTTTCATGGACTGCATCTCTCAGATGTAAGTTCTAAGTTGCTTACTCTCTTTCTCAGGAAATGACTGTGAGTC
ATAGACTTGGTCTCTTTACATAACCTCATAAATCTTGAAGGTTTTGTTCATGTTTTAAATCTTTTTCTTTAAT
TTTTGTCCAACCAAGTTGATTCAAATAACTGGTCTTCAAACCTCTGAGATTTCTTTCTCAGCTTGGTCTGTTCTGCT
GTTAATGCCCTCTGACTATATATGAATTTTTGAAGTTGATCCCTCAATTTCTGAAGTTGAGTTTTGTTCTTTCT
TAAATTAGCTATTTTCACTTTTAAAGCTCTTTGATCAITTTTCTGCTTCTTTGAGTTCTTTGTATTTGGGTTTCAAT
GATCTCTTGGATCTTTGATGTACTTCTTGGCATCCAGATTTCTGAATTTCTATGTATGTCAITTTGACTCATTTTAAAT
CTGGTTAAATCTCTTTGCTGGAGGACTTGTGTGTTTGTCTGAGGTAAGGAGACACCAGCTTTTTTGAATTTGCTA
GAGTTCTTGAGATGACTCTTTAACAATATGAGGGCTGGTGTTCATTAAACAATAGTGTACATTTGAGTATAGTCACT
TGGCTTCAITCTGAGTGTCTTTCAAAGGGCCAAAGCTCTGTACAGCATCTTTATTTGTGGCTAGATTTTTGCTTTA
GGTTTTCACAGGTGCTGTATATTGGAAAAATGTTTTTGGTGTGTGTCATTTGGGGTGCATCCAGTAGGTTGATGCTT
AAGAGTGGTAGCTGGCAGATAGGCTCTTACTCAGTCCACAGCTCTTTTGTATTTTGGTGCAGTCTCAGTAGTGC
TCTGTGGTGGTAGGGAGAGATGACCCCTCACCAGATACATTTCTGGGCTTGGGGGAGCCCTCTCTTATTACTG
GCACGTGACCTGCAITTTCAATTTATTAGGTGTCTTGGGCTGAGGGTGGCCCTCAGGCAGAGGCTGCGGCTGGAAAA
TAGACCATACCTTTCCCTGGCTGGCCCTGCACAAGGAGGACACCCCTGTTCTGAGCCAGTCCATGAACCCAGCT
GTCTCACCCCTCTCAGTGTCTGAGAGTAGGGGATCCCCCACTGCTTGAGCACCATGAGCCCTCTCTGCTACAG
GCAGTTGGGGTAGGTATAGTCTCTCAACCCACTGTCCAACCTGATTTCCAGGGTACAGAGAGCTGTGCTTGGCCA
CAGAGTTCCAGGCAGAGGCCAGGCCATTGTGCTGGAAGCTGATGCTAAGCCTTGTCTGATGATGGGAGATGAAGCA
ATGTAACGGCTCCCTAACCTGTGGCTTCTCTCAGGGCTATGGCAGCTGGCATGAGACTGCTCCAGGTCCCAAGGCCT
GTGGGACTTCTGTGGACTTGAGTTTTGCTCTGCAAACTCCAGCAACTCTCTATGTGACTCTAGAGGCCAG
GGACACGGATCAGGTATTGGGATGAAGGGTTCTCCAGTTCCAGGATTTACAGGTCCCTGTGGAAAGTGAGGA
TCCCCCAGGGGCTCTCACTCACTCACCTTTCTCTATGTTGGGAGCTTCCCTGGCTCCATGCCCCATCTTGGGT

10

20

30

40

【化 1 2】

GGCCAGCTGCCCAGCTTCACCTCTTCCCTGTTCTCTGTGTCCCTCAGCTCCCTTAATTGTCCIGATAICGTTCCCTT
AGGTGATCTACTTTGCAGAGGCAGTGTCTTACTCCCCACTTGTCTTCTCTCTGTGAGAGTAGGCACACACTAGCTGCT
ACTCACTCAGCATCTTTGAATTCTTCCCATCTGAAAAAGTTTCAACTGCAATCAGAGTTAAAGAAATACAAAAACA
ATAGCACTCTAAGTTACAACCTTCTCACCTATAGAAITCAAAAACATCCAAATGATTAACTAAACATTTGTTTGGT
AGATCTGTGGGAAAACATGATTCCTTGTGAATTACTGGAGAAAATGAAATGATGCAACACTTATGGRAGAAAA
TTTGGGGATTTTTGGGGGGGAGGGGAACAATATATTTAAAACATAAATGCATTTATCCTAGCAATTCTATGAAT
GGGGATTTATCTTAGGGTACACCTGCACACTTAGGAAAATAATGTATGCAGTCATTTCATTACAGAATTGTTTGTAA
TAGCAACAACCTGAAAAGCAACTCATATATCCATCCATCACACAGGGACTGGTTTCATGACTACGGTTCATGAAT
ACTCTGCAGCCCTTAGAAAAGATGAGGAAGTGGCCGGGACGGTGGCTCATGCCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA
GGCCGAGCGGGGTGGATCACGAGGTCAGGAGATCAAGACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGCTCTCTACTA
AAAACAATACAAAAAAATTAGCCAGGCAGGCGCTATAGTCCCAGCTATTCCGGGAGGCTGAGGCGGGAGAATGGC
ATGAACCCCGGGAGGCAGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATAACGCCACTGCCTCCATCCAGCCTGGGCGACAGAGCG
AGACTCCGTCAAAAAAAGAGGAAGTCTCTATGCGCTGACATGGAAGGAAGACAGATGGTIGATGA
AAAAAGTACATAAATTAGCCATAAAGTGTAAAGACTTTTGTCTAAAAAAGAAGGGTGATATAATTGCATATTTATA
TTTTCTTCCATTTATATTAAGAGATAATAAAGGTACACAAATGGCTAGAATAAAGTGGTTTCCATATAAAGGGTA
AGAGTAAATTCAGTGGATGAAGACTAGGGTACGGGATAGATTTCTCAGTGTATTTCATTTAAATATATGATTCATT
TTATATATGTAATAATTTTATATATGTTATTTTATATTTTGTATTTTCTTAAACATAAATATATTATTCCTTC
ATAAAATTAACCTTGATACATTTTGTATTACTAGATATGTAGAAAGCATTATGTTTCAGTACCACAGTAATACTTT
CAAACCACTACAATTAGTATTTATGAGCACTATGTGCCAGACATTGTGTTCTGCTTTGGTGGTGGGGGTAGA
GGAGGAAAGGAAACCATGGCTTACATAGGAGTGGAGTCTTGTCTTCACTTTGCACCTCTCTCTCTCAGACCTA
GCATAAATATGACCTTAGGGGAGGCAGAACACATATGATAAAGAGATAACTAGCAAGAGACATAATAGTAGCTAA
ATAAATCTGAAGGAAAAATTCAGGAAGAGGTAGGAAGGATATGCCTCATCACTTCCACCTGTAAAGAAAACTT
TAGACATTCCTGCCAATATTCCTTATTTGCCCTGTCTTTGAACAAATGCCATTATCACTAGAGTGAAATGATATT
CATTTGATGTTTTGATTTGCATTTCTCTCATGATCGGTGATGTTGAGCACCTTTTATATACCTGTTTGGCATTG
TATGTCTCTCTTTGAAAAATGTCTATTTCAGATCTTTGCCCATTTTAAATGGCGTAAATACATTTTTTCTTATGA
GTTGTTGAGTTCCTTATATATTTCTGGTTATTAATCCCTTGTGATGAATAAATTTGCAAAATTTTTCTCCATT
CTGAGGATTACCAGAGGCTCAGAGGGGTAAATGGTGGTGGGGGAGAATAAAATGGTTAATGAGTACAAAAATATA
GATAGGACTAATAAGATCTAGTATCTGATAGCACAAACAGGGTAATTACAGCCACAAAAATTTATTTGTGCAATTC
AAAATAACTAAGAGTATAAATTGGAATGTCTGTAACACAAAGAAGCAATAAATGCTTGAGGTGATGTGAGGGGATG
GATATCTAATTTACCTTGATGTGATTATTACATATTGTATGCCTGCATCAAAATAGCTCATGTATCTTATAAGTA
TATACACCTATTATGTACCCATTAAATTTTTAAGAACCTTAAACAAATCAAAATTAACAGAGTTTAAATGGGCA
AAGAAATGATTTAGGATCAGGCAACCCCGAGAAACAGAAAGAGGTTCAAAGCAACTCAGTCTCTGTCACATGGTTGG
AGAGGATTTATGGGCAGAAAAGGGAAAGAGAGATACAGAAAATGGAAGTGAAGTACACAAACAGCTGGATTGGTT
ACAGCTTGCCATTTGCGTTATTTGAACATAATCTGAACAGTTGGCTGTCTTTGCTTGACCAAAACCTTGGTGTG
GTACAGAGCAGATTAACAGTCTATTTACACATCCAGTTAGTTTACAGTTCACTATACACCAAGAAAGAAACCTTTA
AGCAGAACTTAAAATATGCAAGAGGGAAGCTTTAAGTTAAACTTAATTTAACACACCCCAATTATCAAAAAATGAG
TAGCTCTGCAAAAGTGGATTTTCTGGTCACTCTTTGGTACTTCTTAAAAAAGAGAAAAGTAGTACTCACGATAA
AAAAAAGAGTCCCTCAAGTCTTTATTTTATTCCTTTCCAATTTAAATGTACATCATCTGAGGAAGGTTTTTC
CCTTGACCGCTTTTCATAGACATTTCTTCTGCATGGGTGGCCAGAAATCAGAAAGTAATTGTAACTTTCTGTTC
TTGTCTACAGTTACAAAGCGGTTTCACTTTGTAAATGCTCTTTGGATGGCAGGAACCAAGCAGCCATGAAAAGA
GGAGTTACACCTTTAAAGGAGTCAATTCATCATGACTCTCAGGACTGGAACATGGAATACCTGAATGGCTCTTT
GGCACAGATAGGCCACCTTTGAAGGTGTTCCAAGCTAGGAACCTCACTACCACTGTTACATCGATGCAACTCTGT
GAGAAGTTTTTATCTGGTGATGGAAAATCTCATCTCTTCAACACACTGACTACTACCACTCTCAGAACCTGTAA
ACAAGATTCATTCATCTCAAAATGGGTTAAAGCAGTCAACCTGCTTACATTAGTTTGGAAATAAGGATGAGGGGA
TGGTGGTAGAGGAGGGGAGTGGATGATGATTTTTTATTTGTTAATTTGATTCTAAAGAAACTTCTATACATTTTGC
ATTTAAATTAATATGTTTTTAAACATGTTTGGATTAATTCAAAATAGGATATTTATATCTATTTATTTAAATAT
ACTATTTAATCATCTTGTGACCAATGCAACTTAAACATGTAAATGGTAAATAGCATAAATAATTGCTCTCTAA
GCTGCACTATAAAGTATTTCAAGTGGCTCAATTAATAAGGACCAAGGTGCCCAAGAAACAAATTTAGTAATC
ATAAACAAAGAGACAAACCTACTTCTTTTCCCCAGAGTTCTGGCCACATTGAAATAAGGTGTTTGAATGCTTAAT
AAGAAATTTTTGGCCACACAGTGGCTCATGCCCTGTAATCTCAGCACTTTGGGATGCCAAGGTGAGCAGATCAC
TTGAGGCCAGGAGTTCAAGACCAGCGTGGCCAAAGTGGTGAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCC
CGGTGTGGTGGTACACGCCTATAGTCCCAGCTACTCGGGAGACTGAGGTGGGAGAAATCACTTGAACCCGGGAGGC
CAAGGCTGCAATATCGAGATCACACCACTGCACCTTAGCCCTGGGCAACAGAGTGAGAGTGAGACTCTTTCTCGGA
AAAAAAGAAAGAAATTTTGAACAAAGTGTCTGTCACCTAAGTTAGCAAACTCCAAGCAAGGTTTTTGGCTC

10

20

30

40

【化 1 3】

TGTAAGGAAAGAAATTAGCCTACTCATTTGGAAATTTAGTGGTGTGTTGTAATGCAGAAAGTGACAGTGAGACTGGA
 AAGGGATTGGCTTTGGGGCTTGTCTGCTTTATAAATAAATAATGAATCTTCTCCAACATGAAGTAATGTGAATTA
 AAAAAAAAAAATCTGTCTTAGAGTACAAAATTAATTCATAACCCAATCTGCATTTCTCCACTCCAAGCATATTT
 TCTGGGAGTTTCTACTTAGAGAGTGAAAGCTGCTGTGTGTGTGATAAATTAATTTTAAACAAACACTTGGCAAACTGA
 GCTGGACTATGTATAAGCTACCCCTAGACTAAGCATGAATTTGAACTGCACCTTTTTATGGTGTGTTTTCCACAATG
 ACATTTATTTAGGCATTTAAAGTTATCTGAACCTGCAATTTTTTGTCTCTTTTTTTTTTAAATTTGACTTTTTAAAAA
 AATTATTCCTGAATAAAGAGGCAGTTTGTAAAACCTGAGAACTGTGAGAGATAAATTGGATCTTTGTGTAGCAAAA
 ACTAGAAGGGTGTGGGTATCTGCCTCTTTATCAAATGGACCACTTACTTTTTCTTTTTTTTGGCCTGTGTTC
 GAAAACAAATGTGGCTGTCTCCGTATTTATAATGTATAGTTTCAATTAATGGAGAAAGTGCTTGAGAATTAGATCCT
 AATGTCAATTTCCCATGCAGCATCTTCATTTCTTTCTAAAGCACTATTTGGTAAAAACAACCTGATAGTCGTCAGAG
 GTGATCAGCAATGTTTGAGCACTATTTCTTTTTTATATCTTGCACATGGAATATGGACAGGCAAAACAAATCATTT
 CCAAGTAAGAAAAATAAATTTTGGGGAGTTTAACTATAATTTGAAAGTAATAACCTCCTATTTATCCATCTAGT
 TTGTTGTCTGTACTAAATTTATTTGTGCATGTCTCTGTGTCTATAATTTATGTGAAACTTTGCACAATCTTAAAT
 AGGACAAAATAGACATTTCTGTAATTTCCAGGCAAGCTATTTAAGGTGACTATCTCTCTACATATTTGAGATGAA
 AAACAATAACATGACAATCCATCCCTTCTTAGGTTTTGTAAAGCAGACTTACTACCTGTGACTCAGTTTTGTTCT
 CACAGGGTACTAATTAATCCTTCACGATAATAACCTGTCAAATTTCCATTACTTCTGTAAAGGCAATACTTTATAT
 TTGTTTGTATTTCAAATTTTAACTGTATGTTAAATGCCGTGGGTGCAACTGCAGGTTAAAAATATGTGTTTGAATC
 TCTTATTTCTTTTTGCTTGGCAATTGTATGAAATAACTGCTCTTTCTAGAAATCTTGATGATGAAGTGGCCTGTTGT
 TTTGTCACTTAAAAATGCAATAATGTTCAAATTAAGCTTTTTCTTTATTAACATCACTTGAATGTGTGCCATATTT
 AGAGCTTAGTGAAATTTAATCTACACATTGATTAATAACATTTTATTTATTTCTTGTTTCTAAATGGGAACCTTTCT
 TTGTTTCTAATGGGAACCTTTCTTAAATTAATTTACATCCAACATTTATTTAAAGACCTAAAAACATAGGCAATTA
 GTGCTTAGAGGAAAAGCGCAGACGAAAGTGAAATCAGACAAGTTCCCTGCCCTCCGGAAGCTTTTCACTCTAGTGAT
 GAGAAAGACGTATACACACCTTATGTTGATTTAAAAAAGCTCTTACCTGGTTGCTGGCATAATGAAAGT
 GTTAGTTACAGATCTGCCCCAACTTAAAGGTGTCACTCTGAGTAAATCTCTTTCCCTTTCCCTTTCAATCTCTTC
 ATCTATAAACTAGGGGTTGGGAATACATTTTAAACAAACACAAATTGAGCGTCTACCATGTGATAATAGTAGCT
 AAACCTTACTGAGCAATTACCATGGGGCAGGTATCAAGATAAACCCCTTTATGATGGTAACCTCAATTAATCTCTCA
 AGCAATTTCCATTTTCAAGAGGAGGAATTTGAGGCTCAAAAATGTTAAGTAACCTCCCCAAGGATGCAAAAGTGATT
 GAGCCAGAATTCAGACTAGGTTGGTTGACTCCAAAATCATGCCATTAAACCTTATTTGTCTACTGCAAAACAA
 CTCTAATAGTTTTCAAAATTTAGTTCTATTAATATTAATATACCATTAATTTGCCCCCAAAATGTAAATGTAAAT
 ACAAGAGTTTTGGTTTTTGTATTACTAGTGGAGTTAAAGGTGCACAATGGAATTTATTCAACTGGGAAAAATCCA
 GGAAGACTTCATGGAGGAGGCAGCATATGGCTGCAGTTAATAAGGTTTTGCTCACACAAAATGGAGAGGTGAGGAC
 ATTTACAGGCAGAGAGAATTATATGAGAGGTTACAGAGCAGTAAACAGTCATGCGTCTGCAAGATCAAAGGGAAAG
 GGCGGTAAAGAGAGAAGCTTGAAAGTCAAGTGGAGCCAGATTGTGGAAAACTAGAGAGTCATGCCAAGGACCTTG
 ACATAAGAAAAATGGGAAGCCCTGAAAGGTGAAGAACATGAGAGTGAAATGATTAGTAACTTTTTGGTTTAGGA
 CTTGTTTTTTTTGTGTTTTGGTTGCTTTCTGTTTTGTTTTGTTGGTTTTTAAATTTACAAACCAATAAGAAT
 ATTTAGTAAGGTTTCCAAATACATCATGAATATATAAACTAGCCTGACTCAAGGATAATAATTTCTGGGTAGTTG
 GAGTGAAGTTTCAATCAGCTACGTGGCATTTGCTAATCATCTGATATGAGCTAACATAAAGGAGTTAACAAATA
 AACTGTCAGCCITACAGTCCAGGGTCTCAAAATGCAATGTGACATAGTTGAGAAGCAGTTTTCCATATCATACATGA
 AATAACTAAAGAACTACTTACAAAGCACTATACCAGTAACATAAATAAATAACAATAACATGCAAAATAATG
 CTGAAAGCTGCAAGTAGAGGGGTAAAGCTAGGCCAGTTGCTCAGGGGAACCATTTCTGAAGTGGATTGGGAAGTAT
 GTCTAGAAGGGGAGCCATTGCTGTGAGAGTGTGAGGCTCACTGCTACTAGTCCCCCACTACTCAGGCATATGG
 TAGGTCAGTAACAAAACCAATCATTTGTGCACCTGTCTTTCCATCTAAATTCATCAATTAAGCAACCTATCAA
 GGTACTAGTTCAAATTTCTCTCTTCTCTATAAGCTAGTGGTCTTCTCTTAAATTTAAGAAGATCGTGTCTCATCTT
 CCTACTTCTTGTCTCTTCTTCTGTGTTTTCTGAGGCTGCAATGAACTAGGAACCTTCTCTCCCCAGAACTCTG
 TATTCAGGCTTAGATCACTCAAACTGTTGCTTATAAAGTGCAGAGAATCAACAGAGAAGGAATAGAGGTTAA
 TGTCTGGTCAAAGATGTGATTCTCTTGTGAAAGTTCAATAGCTTATTTATATAGAAATCATAAGTCCAGGAA
 AAACCAAAAGGAAATATATATTGGATCCTAATGATATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCCATTCG
 CCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATAATCTCAGCTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGGGACTCTCTGCT
 CAGCCTTCCAAGTAGATGGGATTACAGGCATGTGCCACCATCTGGCTAATTTTTTTTTTTTGTATTTTAGTAGAG
 ATGGGGTTTTCAACATGTTAGTCAGGCTGGTGTGAACCTCTGACCTCAAATGATCCACCAGCCTCGGCTCCAG
 TGTGCTGGGATTGCAGGCGTGAGCCACCACACCCCGGCTGATATTTCTCTTGCAAGGGCAATGTTTTACATTTGTCTA
 TCATCAGAACTGTAGAGTGTGGCTCCAGGCACAGAACCCCTAGAGTTTTGTAAACCATTTATATCACACTGGCA
 ACCAGAAGTAACCTTTATATACTCAAGAAATCAAGATTTACCTAGAAGTACCTCAGGTAGGTGTTGGTTTCATTCAC
 ATTCCAACCAAAAGATAATGTACCTAAAGTGCATACCGCTAGTCCGTAATGATTAAGGCAACCAACATAAAATC

10

20

30

40

【化 1 4】

TCATTATTTAAAGAAATTAAGTCCAGGCACGGTGGCTCACCCTGTAACTCTCAGCACCTTCGGGAGGCCAAGGAG
GGCAGATCACCTGAGGTTGGGAGTTTGGAGACCAGCCTGATCAACATGGAGAAATCCCATCTCTACTAAAAATACA
AAATTAGCGGGGCGATGGTGGTGCATGCCATATAATCCCAGCTACCTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAACTCAGTTGAAC
CCAGGAGGTTGGAGGTTGAGATCGTGCCATTGCACCTCCAGCCTGGACAACAAGAGTGAAACTCTGTCTCAAAAAAG
AAAAAAGAAAAAGAAATTAATGCACATATGGTTTATGGAGCGGTATTCCTCCTCCATGTCCCTACATAAGATCTT
TCACATGCCAGTCACAGTTAAATCTAATTTGCTGTAACTCTGGATAAATGGGAGCTAATCAACAAGCTCTCAGCTC
TAGCTCTGAATCAGCAGCAGATATTGCATTTTGAATACACTAATAGCAAGAATGCCTTCTGACAACAACCTGG
CATTTTTCACACAGCAGGAAGTTTATCTGGATTCTGATATAATAGTTATTGGAAATCATAATAGGTACATAGTTT
AAAAGGCTAATAAGTCATTTGTTATTGCTTTTATTATCTCTGCATAGTTAGTAAAATTGAGATTAGAACCACTTC
TCGAATGTACTGTTCTAAATCCTTAGCTTGCTTGATCACACATGACCCTCACAATGATCCTAGGAGAAATTATTC
TGCATGCCATTTTGTAGCTGGGAAACTGAGGCACAGAGAAATACAGTACTGCCCAAAATGTCTAATAATCAA
AGGCAAGACAACTACTCACACAGCTCTGATTCCAGAGCCCACTCTCTTAACCATATGCTTTTCTGCTTCCTAG
TTGTAGAGTCTTTTGTATGACTGCATTAATTAATGTGAAGASTTCAAAAATTTCTATATAAGGCTCTTTAAGG
GTGTCACTCTGGTTGAAAATGGAGGACTAGGCTTCTCAGTTGAAGACATATTTCTGTAGAAAAACCTATTTTCAT
TTAGATGCTACAGTTACTTGATGTGGTTAATAAACAGTTAACAGAGTATGAAAAGGATAAGGTTAAAGCCCTC
CCAAGCCATCTTTCAITGCTGCTAATATGAATCACATTACIAGATACTTAAATATCATTTTTCCTTTGGTTCCOCAG
AAGACTGCATATATGCTAGAAATATTTGCTCCTCTTTTACCCCTTTCAGGCAATAAAGTATTTTGGACCCTGT
CTATGTTATAATTAATGTTTCTCTCTGATTTTTTTGTCTCCAATCTAATGAAAGACATACAAGCTACTATACTGC
TACACAATGACTAAATACCTGTGGATTAGGTGGGGGGAAGATACACAGTCACTGGCTAGAAAGCATCATGCATA
CAGAGCCATTTTACCATATATTTTATTTCTCATGATCATGTAGAAATTTAGGCTTTGGTGTGATTAATTTCTCTC
TTAGGAAACATAGTTGTTTTCAGGCTTGATATCACAAAAAACAGAAAAACCTATTTCGAGAAAAGGAAAAATTAAT
GTCTGTAGGCCAAATTTTGAAGTAGGAAAACTGCTTTTGGAGTTGTATTCCCTCCAGGCATTAATCCAAGT
TCCAGTCTTATCTAAACCTGGGATGCTAGTATTAACCACCATAGGAGTTATCTGAGATGAGTTATCATCAACTT
GGTACCAGGTTGTTGCTCTGACTCAGTGAGCTCTAGAAATGCATGAAACTGGCCCTAATTTATCAAAGTATGT
AGCCTTTGGGTAAATAATTCAGCTCTCAGAGGTCAGTTATCTCTCTGTAAAACATATCTACATCTTAGGGATG
ACAATATCTACATCTTAGAGATGTCAGGAGGATTAAAGTGTAATTTTAAATTGTATGTAATTTAAATGGGCAA
CATAATGTTTTGATATACACGTGTATAGTGATTACACAGTCAAGCAAAATTAACATATCCATTTTCAITAGCTA
CCTTTTATGTAATGATAAGATTATCTAAATCTATTTCTCTTACCATAATTTCCAGTATACAATATTGATATGGTT
TGATCCATATCCCCATCCAAATCTCATGTTCAAGTTGCAATCCCCAACGTTGGAGATGGAGCCTGGTTGGAGGTGA
TTGGATCACAGGGGTGGCTTCTAATGGTTTCAGCACCCTCTTTCTGGTACTGTATAGTGAGTAAGTTCTCACGA
GATCTGGTTGTTTTAAAGTGTGTAACACCTCCCCACCTTTCCCTCTCTCTGTTCCTCTGCTCCCGCTATGTGAA
GTGCCAGCTCCCTCTTTGCTTCCGCCATGATTGTAAGTTCTCTGAGGCATCCCCAGAGCTGATCTGCCATGC
TTCTATACAGCCTGCAGAACCATGAGTCAATTAACCTCTTTCTTTGTAAATTAACCACTCTCAAGTATTTCT
TTATAGCAATGCAAGAATGGACTAATACAGAAAAATTTTACTGAGAAGAAGGGCAATGCTATAAAGATACCTGAA
AATGTAGAAGTGACTTTTGAACCGGCTAACAGGCAGAGTTTGAACATTTTAGAGGGCTCAGAAAGACAGAAA
GATGAGAGAAAGTTTGAACCTGCTAGGAACCTTGTGAGTGTGTTAACCATAATCTGATAGTGATATAGACAG
TGAAGTCCAGGCTGAGGAGGTTCTCAGATGGAATGAGAAATTTATGGGAATGAGTAAAGGTCAGGTTTGTATG
CTTTAGCAAAAGAGCTTAGCTGCATTGTTCTCTGTTCTAGGGATCTGTGAAATCTTAGACTTAAAGAAATGATGATT
TAGGGTATCTGGCAGAAGAAATTTCTAAGCAGCAGAGTGTTCAGGAAGTAACCTAGCTGCTTCTAATAGCCTATG
CTCATAGGCATGAGCACAGAAATGACCTGAAATTTGGAACCTACACTTAAAAGGGAGCAGAGCATAAAAGTTTGT
AAATTTTGCAGCCTGGCCATGTGGTAGTAAAGAAAAGCTGTTCTCAGGAGAGGAAGTCAAGCAGGCTGCATAAA
TTTGATAAATAAAAGGAAGGCAAGGGCTGATAACCAAAACAAATGGGGAGAAAGACTCATAGGACTAACAGGCAT
TTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTATTTATTTATTTATTTTAAAGTTTATAGGTTACATGTGCACAAATGTCAGGTTA
GTTGCATATGTATACATGTGCCATGCTGGTGTGCTGCACCCATTAACCTGCTCATTTAGCATTAGGTATATCTCT
AATGCTATCCCTCCCCCTCCCCACCCACACAGTCCCCAGAGTGTGATGTTCCCTTCTGTGTCATGTGT
TCTCAITGTTCAATTCACCTATGAGTGAGAACATGTGGTGTGGTTTGTGACCTTGCATAGTTTACTGAG
AATGACGATTTTCAATTTTCACTCATGTCCCTACAAAGGACATGAACCTCATCATTTTATGAGCTGCATAGTATTC
CATGGTGTATATGTGCCACATTTTCTTAATCCAGTCTATCACTGTTGGACATTTGGGTTGGTTCCAGTCTTTGC
TATTGTGAAATAGTGCCACAATAAACATAGTGTGCAATGTGCTTTATAGCAGCAGGATTTATAGTCTTTGGGTAT
ATACCCAGTGTAGGATGGCTGGGTCAAATGGTATTTCTAGTTCTAGATCCCTGAGGAATCGCCACACTGACTTC
CACAAATGGTTGAAGTATTTACAGTCCCACCAACAGTGTAAAGTGTTCCTAATAGGCATTTTAGGCTTTTCATGG
TGGTCCCTCTCATCACAGGCCCGAGGCTTAGGAGGACTGAATCATTTCTGGGCCAGGCCTAGGCCCCCTGCTC
CCTCTTACAGCCTTGGGACTCTGCTCCCTGAATCCCAGCTGCTCAAAAGGGGCCAGGTACTGTTACAGTAGGTAG
CTAATCAGGCAIGAGTGGGTAAAGAGAGAAGTCCCCACCACCCACAGGAATGTACAGGCAACCATCAGATGATGG

10

20

30

40

【化 1 5】

TCAGGCAGTTCGATACCTGCTCTCTAAAATAGTAAATGGTTCAGCCAGCACCAGGGAGAGGCAACCTCTCAAT
 AGATAGAAACACCTGAAATTTGGTAACTGGGCGCTTCCAATAAGATCTCAGGAACTGAGAGAGTGGGCTTAACATG
 CACATTAAAGAGGCAAAATGGTGAAGTATGACCTTTGGGGGCATTCCACCGAAAAGGGAAGAAAGCCCTCAGGTAA
 GCATGTATACAACTCCAGTAAACACACTGCACACGCTCACCCTCCAGTGCAGCAGGGCACCATTGCATGCGGCA
 AGCTCACCCCTTAGGGGAAGGACCAAGGGAAGGGGCACAAGATGTCAGAAAGTAGGCCAGTGTATAAGATCCTAGGT
 TCAAGGTCAAACAGGGCACTTGACCTCCAAGGTGCCACTTTGGGCGCTCTTCCAAATGTACTTTCCCTTTTATTCCCT
 GTTCTAAAGCTTTTTTAATAAACTTTTACTCCTGCTCTGAAACTTTGTCGAGTCTCTTTTCTGCTTATGCTCT
 TGGTCAAATTCCTTTCTCTGAGGAGGCAAGAATTTAGAGTTGCTGAGACCCACATGGATTTGCAGCTGGTAACTC
 AGATAACTTTTACCAGTAAGAATACAGTTTACGGCTGCTGCTTACAGGGTGCCAGGCATAAGCCTTTGGTGGCTTC
 CATAAGCTGTGAAGCCCGGGCGGCACATAATGCAAGAGTTGAGGCTTAAAGAGCTCTGCCCTAGATTTTAGAGGA
 TGTATGAAAAAGCCCTGGATGTCCAGACAGAAGCCTGTTACTGGGGTGGAAATCCTCATGGAGAACATCTACTAGGG
 AAGCAAGGAGAAGAAATGTGGGGTTGCAGCCCCACAGAGAGTCCCTGGGGCACTGCCCTAGCAGAGCTATGACA
 AGACAGCCACCGTCTCCAGACCCAGAAATGGTAGATCCACCAACAACCTTGCACCCCTGCAGCCTGGAAAAAGCTGC
 AAGCACTCAATGCTAGCCCATGAGAGCAGCTGTGGGAGATGAACCTGGAAAAACACAGGGGTGGTTCCTGCCCAA
 GGTTTTGGGAGCCCACTGATTGCATCAGTGTTCCTGGGTGTAGTCAAAGGAGATTATTTAGAGCTTTAACTC
 TTAATGACITGCCCGGCTGGCTTTTACAGACTTGCAATGGGGCCCTATAGCCTCTTCTTTTGGCAGATTTCCTCCTT
 TCGGAATGGCAGTATCTGCCCAATGCCATATACCCCAATTGTATCTTTGAAGCAATTACCTTGTTTTTTGAATTTTAC
 AGGTTCAIAGGTAGAAAGGACTAGCTTCGTCTCAGGTGAGACTTTGGGACTTTTGACTTTTGAATGAATGCTGGAT
 CGAGTTAASACTTTGGGGAATCTGTGGTAAGGCACGACAGTATTTTGCATATGAGAAGGACATTAGATTTGGGA
 GGGGCCAGAGTTGGAATAACATGGTTTGGATCTCTGTCCCAACCCAAATCTCATGTTCAACTGTAATCCCAAGT
 TTGGAGGTGGGGCTGGTGGGAGGTGAGTGGATTATGGGGTGGCTTCTAATGGTTTGTACAGTCCCTCTTGGT
 ACTATATAGTGAAGTCTGACAAGATCTAGTTGTTTAAACGATGTAGCACTCCCATTTCTCTCTTCCCCCAGTT
 CCTGCCATGTAAGTCTGGGGTCTCCCTATGCCCTTCCATCAATGATTTTAAAGTTCCCTATGGCTGCCCAGAAGCT
 GATCCAGCCATGCTTCTTGTACAGCCTGCAGAACTGTGAGCCATTAACCTTTCTTTATAAATTACCCAGTTTCA
 GTTATTTCTTTATAGCAGTGTAAAGATGGACTAACACAAATTATTAACGCTAGTCTCATGTTGTATACATTAATCT
 CTAGATGTAATTAGACGTAACCTGCAACTTTGTACCTTACCTTACAATTTTCTTTCCCCCAAGCCCCCAACCAAG
 GGCTACCTCTGTTTTCTATAAATTCAGTTGTTTTTAAATTCACGTATAGTGAAGTACAACCTCAGTGTAGAACT
 TGGTAAATGCTAGCTACTTGTATTAAGCTGTGAGTCAAAATAAAATACAGAGATGAATCTCTAAATTAAGTGAT
 TTATTTGGGAAGAAAGAAATTCGAATTAGGGCATACATGTAGATCAGATGGTCTTCCGTATATCCACACAACAAAG
 AAAAGGGGGAGGTTTTGTAAAAAAGAGAAATGTTACATAGTGTCTTTGAGAAAAATTCATTGGCACTATTAAAG
 ATCTGAGGAGCTGTGAGTTTCAACTGGTGAGTGAATGGTGGTGAATAAAATAGAGCTGCAGCAGGTCAITTTAG
 CAATATTAGATAAAACTGGTCTCAGGTCAACAACGGGCAGTTGCAGCAGCTGGACTTGGAGAGAAATACACTGTG
 GGAGCAGTGTCAITTTGTCTAAGTGCTTTTCTACCCCTACCCCACTATTTTAGTTGGGTATAAAAAAGAAATGAC
 CCAATTTGTATGATCAACTTTTACAAAAGCATAGAACAGTAGGAAAAGGGTCTGTTTCTGCAGAAAGGTGTAGAGT
 TGAGAGCCATTTTGTGTATTTATTTCTCCCTTTCTTCTCGGTGAATGATTAAACCTTCTGTGTGATTTTGTAGT
 GATGAAAAAGATTAAATGCTACTCACTGTAGTAAAGTGCATCTCACACTTGCGATCAAAAGGCACACAGTTTAA
 AAAACCTTTGTTTTTTTACACATCTGAGTGGTGTAAATGCTACTCATCTGTAGTAAAGTGGAAATCTATACACTGC
 AGACCAAAAGACGCAAGGTTTTCAAAAATCTTTGTGTTTTTTTACACATCAAAACAGAAATGGTACGTTTTTCAAAAGT
 TAAAAAAAACAACCTCATCCACATATTGCAACTAGCAAAAATGACATTTCCCCAGTGTGAAAAATCATGCTTGAGAG
 AATTTCTTACATGTAAAGGCAAAATTTGCGATGACTTTGCAGGGGACCGTGGGATTCCCGCCCGCAGTGGCGGAGCT
 GTCCCTTACCAGGTTTGCAGTGGAGTTTGAATGCACTTAAACAGTGTCTTACGGTAAAAACAAAATTTTCAATCA
 CCAATTATGTGTTGAGCGGCCACTGCCTACCAAGCACAAACAAAACCATTCAAAACCAAGAAATCGTCTTCACTT
 TCTCCAGATCCAGCAGCCTCCCTATTAAGGTTGCGACACGCTATTGCGCCAAACGCTCTCTCAGAGCGGGTCTTA
 AGATAAAAGAACAGGACAAGTTGCCCGGCCCAATTTGCTAGCCTCGTGAGAAAAAGTCAATGACATAGAAAAAC
 AGACAGACGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGCCACGTAATA
 GATGACGCTTGGTGTGTCAGCGCTCCCTGCTGCCCGGTGCTTCTCTTTTGGGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGG
 TGTGGGTTTAGAGAGGTGTGTGTTTTGTTTTTCCCACTCTCTCCCACTACTTGTCTCACAGTACTGCTGA
 GGGTGAACAAGAAAGACCTGATAAAGATTAAACAGAGAAGAAACAAGGAGGGAAACAACGCGAGCCTGTAGCAAG
 CTCTGGAACCTCAGGAGTGCAGCGCTAGGGGCC (GGGGCC)_n
 GGGGCCGGGGCGTGGTGGGGCGGGGCCGGGGCGGG
 CCGGGGGCGGGCTGGGTTGGGTTGGCTGGCGCCCGGGCGGGGAGGCGCAGGCGGTGGCCAGTGGGTGAGTGA
 GGAGGCGGCACTCTGGCGGGTGGCTGTTTGGGGTTGGCTGCCGGGAAGAGGCGCGGGTAGAAGCGGGGGCTCTC
 CTCAGAGCTCGACGATTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGCTGGGTGTGGGGCTTTGGCTCTAGC
 GACTGGTGAATTCCTGCTATCCGGGCCCGGGCTTCCCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGAGGACAAGG

10

20

30

40

【化 1 6】

GATGGGGATCTGGCCTCTTCCTTGCTTTCGCCGCCCTCAGTACCCGAGCTGTCTCCTTCCCGGGGACCCGCTGGGA
 GCGCTGCCGCTGCGGGCTCGAGAAAAGGGAGCCTCGGGTACTGAGAGGCCTCGCCTGGGGGAAGGCCGAGGSGTG
 GGCGGGCGCGGGCTTCTGCGGACCAAGTCGGGGTTCGCTAGGAACCCGAGACGGTCCCTGCCGGCGAGGAGATCA
 TGCGGGATGAGATGGGGGTGTGGAGACGCCCTGCACAAATTCAGCCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGAAGTACTTCCA
 TATGAGGGCAGCAATGCAAGTCGGTGTGCTCCCATTTCTGTGGGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCCGAGAT
 GACACAGACTTGTCTAAAGGAAGTGACTATTGTGACTTGGGCATCATTGACTGATGGTAAATCAGTTGTCTAAAG
 AAGTGCACAGATTACATGTCCGTGTGCTCATTGGGTCTATCTGGCCGCGTTGAACACCACCAGGCTTTGTATTCA
 GAAACAGGAGGGAGGTTCCTGCACTTTCAGGAGGGGTGGCCCTTTCAGATGCAATCGAGATTGTTAGGCTCTGG
 GAGAGTAGTTGGCTGGTTGTGGCAGTTGGTAAATTTCTATTCAAACAGTTGCCATGCACCAGTTGTTTCAACAACAA
 GGGTACGTAATCTGTCTGGCATTACTTCTACTTTTGTACAAAGGATCAAAAAAAAAAAGATACTGTTAAGATAT
 GATTTTCTCAGACTTTGGGAACTTTTAAACATAATCTGTGAATATCACAGAAACAAGACTATCATATAGGGGAT
 ATTAATAACCTGGAGTCAGAACTTGAATACGGTGTCTATTGACACGGGCATTGTTGTACCACCTCTGCCAA
 GGCTGCCACTTTAGGAAAACCTGAATCAGTTGGAACTGCTACATGCTGATAGTACATCTGAAACAAGAACGA
 GAGTAATTACCACATTCCAGATTGTTCACTAAGCCAGCATTTAACCTGCTCCAGGAAAAAATTACAAGCACCTTAT
 GAAATTGATAAAATATTTTGTGGCTATGTTGGCACTCCACAATTTGCTTTCAGAGAAAACAAAGTAAACCAAGG
 AGGACTTCTGTTTTTCAAGTCTGCCCTCGGGTTCATTTACGTTAATTAGATAGTTCCAGGAGGACTAGGTTA
 GCCTACCTATTGCTGAGAACTTGGAACTGTGAGAAATGGCCAGATAGTGATATGAATTCACCTTCCAGTCTT
 CCTGATGTTGAAGATTGAGAAAGTGTGTGAACCTTCTGGTACTGTAAACAGTTCACTGTCTTGAAGTGGTCC
 TGGCAGCTCCTGTTGTGGAAAGTGGACGGTTTAGGATCCTGCTTCTCTTTGGGCTGGGAGAAAAATAAACAGCAT
 GGTACAAAGTATTGAGAGCCAGGTTGGAGAAAGGTGGCTTACACCTGTAATGCCAGAGCTTTGGGAGGCGGAGGCA
 AGAGGATCACTTGAAGCCAGGAGTTCAAGCTCAACCTGGGCAACGTAGACCCTGTCTCTACAAAAAATTAAAAAC
 TTAGCCGGGCGTGGTGTATGTGCACCTGTAGTCTTAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGGTCAATTGAGCCCA
 AGAGTTTGAAGTTACCGAGAGCTATGATCCTGCCAGTGCATTCCAGCCTGGATGACAAAACGAGACCCTGTCTCT
 AAAAAACAAGAAGTGGGGCTTTATGATTGTAGAAATTTCACTACAATAGCAGTGGACCAACCACCTTTCTAAAT
 ACCAATCAGGGAAGAGATGGTTGATTTTTTAAACAGACGTTTAAAGAAAAAGCAAAACCTCAAACCTTAGCACTCTA
 CTAACAGTTTTAGCAGATGTTAATTAATGTAATCATGTCTGCAIGTATGGGATTATTTCCAGAAAGTGTATTGGG
 AABCTCTCATGAACCTTGTGAGCAAGCCACCGTCTCACTCAATTTGAATCTTTGGCTTCCCTCAAAGACTGGCT
 AATGTTTTGGTAACTCTCTGGAGTAGACAGCACTACATGTACGTAAAGATAGGTACATAAACAACATTGTTTTGA
 GCTGATTTTTTTCAGCTGCATTTGCATGTATGGATTTTCTCACCAGAACGATGACTTCAAGTATTAGTAAAAAT
 AATTGTACAGCTCTCCTGATTATACTTCTCTGTGACATTTTCAATTTCCAGGCTATTTCTTTTGGTAGGATTTAAA
 ACTAAGCAATTCAGTATGATCTTTGTCTTCTATTTCTTTCTTTTGTGTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGT
 TCTTGAGGCAGAGTCTCTCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCCATCTCAGCTCATTGCAACCTCTGCC
 AACTCCGGGTTCAAGAGATTCTCCTGCCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGTCCACCACCACACCCCG
 GCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGGTGGGGTTTCAACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAGCTCCTGACCTCAG
 GTGATCCACCTGCCTCGGCCTACCAAAGAGCTGGGATAACAGGTGTGACCCACCATGCCCGGCCCATTTTTTTTTT
 TCTTATTTCTGTTAGGAGTGAGAGTGTAACTAGCAGTATAATAGTTCAATTTTTCACAACGTGGTAAAGTTTCCCT
 ATAATTCAATCAGATTTTGTCTCAGGGTTTCACTTCTGTTTTAGGAAATACTTTTATTTTCACTTTAATGATGAAA
 TATTAGAGTTGTAATATTGCTTTTATGATTATCCACCTTTTAAACCTAAAGAAATGAAAGAAAAATATGTTTGA
 ATATAATTTTTAGGTTGTATGTAACTTAATTCATTTATGTTGGCCTCCAGTTTGTGTTGTTAGTTATGACAGCA
 GTAGTGTCAATTACATTTCAATTCAGATTACATTCTATATTTGATCATTGTAAACTGACTGCTTACATTGTATT
 AAAAAAGTGGATATTTTAAAGAGCTGTACGGCTTATACTAGTGCTGTCTCTTAAAGACTATTAATTTGATACA
 ACATATTTAAAGTAAATATTACCTAAATGAATTTTGAATTTACAAATACACGTGTTAAACTGTCTGTTGTGT
 CAACCATTTCTGTACATACTTAGAGTTAACTGTTTTGCCAGGCTCTGTATGCCTACTCATAATATGATAAAGCA
 CTCACTAATGCTCTGTAAATAGAAGTCAGTGTCTTCCATCAGACTGAACTCTCTTGACAAGATGTGGATGAAAT
 TCTTTAAGTAAATTTGTTTACTTTGTATACATTTACAGATCAAATGTTAGCTCCCAAGCAATCATATGGCAAA
 GATAGGTATATCAIAGTTTGCCTATTAGCTGCTTTGTATTGCTATTATTATAAATAGACTTTCACAGTTTLAGACT
 TGCTTAGGTGAAATTTGAATTTCTTTTACTTTTCACTCTTAGATAACAAGTCTTCAATTATAGTACAAATCACACAT
 TGCTTAGGAATGCATCATTAGGCGATTTTGTCAATTATGCAACATCATAGAGTGTACTTACACAAACCTAGATAG
 TATAGCCTTTATGTACCTAGGCGTATGGTATAGTCTGTGCTCCTAGGCCACAAACCTGTACAACTGTACTGT
 ACTGAATACTATAGACAGTTTGAACACAGTGGTAAATATTTATCTAAATATATGCAACAGAGAAAAAGGTACAGT
 AAAAGTATGCTATAAAGATAATGGTATACCTGTGTAGGCCACTTACCACGAATGGAGCTTGCAGGACTAGAAGT
 TGCTCTGGGTGAGTCACTGAGTGGTGAATTAATGTGAAGGCCCTAGAACACTGTACACCCTGTAGACTATA
 AACACAGTACGCTGAAGCTACACCAATTTATCTTAACAGTTTTTCTTCAATAAAAAATTATAACTTTTTAACTT
 TGTAAACTTTTTAATTTTTTAACTTTTTAAATTAATTAGCTTGAACACAAATACATTGTATAGCTATACAAAAAT

10

20

30

40

【化 17】

ATTTTTTCITTTGTAFCCTTATCTAGAAAGCTTTTTTCTAIIITTTCTATTTTAAATTTTTTTTTTTTACTIGITAGTC
 GTTTTTGTTAAAACTAAACACACACACTTTTACCTAGGCATAGACAGGATTAGGATCATCAGTATCACTCCCT
 TOCACCTCACTGCCCTTCCACCTCCACATCTTTGTCCCACTGGAAAGTTTTTAGGGGCAATAACACACATGTAGCTG
 TCAOCTATGATAACAGTGCCTTCTGTGTAATACCTCCGGAAGGACTTGCCCTGAGGCTGTTTTACATTTAACTTAA
 AAAAAAAGTAGAAGGAGTGCACTCTABAAATAACAATAAAGGCATAGTATAGTGAATACATAAACACAGCAA
 TGTAGTAGTTTTATTATCAAGTGTGTGACACTGTAATAATTGTATGTGCTATACTTTAAATAACTTGCAAAATAGT
 ACTAAGACCTTATGATGGTTACAGTGTCACTAAGGCAATAGCATATTTTCAGGTCCATTGTAACTCAATGGGACT
 ACCATCAIATAIGCAGTCTACCATTGACTGAAACGTTACATGGCACAATACTGTATTYGAAGAATGATTGT
 TACATTAATAACATAGGATGTACCTTTTTAGAGTGGTATGTTTTATGTGGATTAAGATGTACAAGTTGAGCAAG
 GGGACCAAGAGCCCTGGGTTCTGTCTTGGATGTGAGCGTTTTATGTCTCTCTCATGTCTGTTTTCTCATTAAA
 TTCAAAGGCTTGAACGGGCCCTTATTTAGCCCTTCTGTTTTCTACGTGTCTAAATAACTAAAGCTTTTTAAATTCCT
 AGCCATTTAGTGTAGAACTCTCTTTGCACTGATGAATGCTGTATTGGTTTTCTTGGCTAGCATATTAATATTTT
 TATCTTTGTCTTGATACTTCAATGTGTTTTAAACATCAGGATCGGGCTTCAGTATTTCTCATAACCAGAGAGTTC
 ACTGAGGATACAGGACTGTTTGCCCATTTTTTGTATAGGCTCCAGACTTGTGGTATTTCCATGTCTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTGACCTTTTAGCGGCTTTAAAGTATTTCTGTTGTAGGTGTTGTATTACTTTTCTAAGATTACTT
 AACAAAGCACCAAACTGAGTGGCTTTAAACAACAGCAATTTATCTCTCACAATTTAGAGCTAGAAAGTCCG
 AAATCAAAGTGTGTGACAGGGCCATGATCTTCAAGAGAGAGAAGACTCTTTCCTTGCCCTCTTCTGGCTTGTGGT
 TACCAGCAATCTGAGTGTCTCTTCTTGCTTGTAGTTTTCAACAATCCAGTATCTGCCTTTTGTCTTCACATGG
 CTGTCTACCATTTGTCTCTGTCTCTCCAAATCTCTCTCTTTATAAACACAGCAGTTATTGGATTAGGCCCTCCTC
 TAATCCAGTATGACCCCATTTTAAACATGATTACACTTATTTCTAGATAAGGTCACTTACAGTACACCAAGGCT
 AGGAATTTGAACATATCTTTTTGGGGGACACAATTTCAOCCACAGTGTCACTCTCTAGCTGAGCCCTTCCCTTCC
 TGTTTTTCTCCTTTTTTAGTGTCTATGGGTTAGGGGCCAAATCTCCAGTCACTAGAAATGACATGGACTGGAT
 ATTTGGGAATACGCGGGCTATTTCTATGAGCTTTAGTATGTAACATTTAATATCAGTGTAAAGAAGCCCTTTTT
 TAAGTTATTTCTTTGAATTTCTAAATGTATGCCCTGAATATAAGTAACAAGTTACCATGTCTTGTAAATGATCA
 TATCAACAACATTTAATGTGCACCTACTGTGCTAGTTGAATGTCTTTATCCTGATAGGAGATAACAGGATTCCA
 CATCTTTGACTTAAAGAGGACAAACCAAAATAGTCTAAATCAITTTGGGCTTTTGATGGATACTTTAAATTTGCTGA
 ACCTAATCAITTTGTTTCTATGTCTATTGTATTAGATATCTCCGGAGCATTTGGATAATGTGACAGTTTGAATGCA
 TGATGTGCACTCTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGCAATCACCTT
 TATTAGCAGCTACTTTTTGCTTACTTGGGACAATATTTCTTGGTCTTAGAGTAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAG
 AACAGGTACTTCTCAGTGTAGGAGAAATAACTTTTTCTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATCTTTCGAAATG
 CAGAGAGTGGTGTATAGATGTAAAGTTTTTGTCTTTGCTGAAAAGGGAGTGATTAATGTTTTCAITTAATCTTTG
 ATGGAACCTGGAATGGGGATCCGAGCACATATGGACTATCAATTTACTTCCACAGACAGAATTTAGTTTCTACC
 TCCACTTTCATAGAGTGTGTGTTGATAGATTAAACACATATAATCCGAAAGGAAGATATGGATGCATAAGGTAA
 GTGATTTTTAGCTTTATTAATCATGTGTTAAOCTATCTGTTGAAAGCTTATTTTTCTGGTACATATAAATCTTATTT
 TTTAATTTATATGCAGTGAACATCAAAACAATAAATGTTATTTATTTGCAATTTACCCTATTAGATACAAATACATC
 TGGTCTGATACCTGTCTCTTCTATTTAACTGTGGAAGGTACGAAATGGTAGCTCCACATTATAGATGAAAAGCT
 AAAGCTTAGACAAATAAAGAACTTTTAGACCCCTGGATTCTTCTTGGGAGCCCTTTGACTCTAATACCTTTTGT
 CCCCCATTTGACAAATCTGTCTTTTTGCTTACTACTATGTGTAAAGTATAACAGTTCAAAGTAATAGTTTCTATAA
 GCTGTTTGGTCTAGTAGCTTTTGGTCTCTTTAACCTCTTTGCCAAGTTCCAGGTTCTATAAATGAGGAGGTGAA
 TGGAAATGGTTCCCAAGAGAAATCTCTTTAATCTTACAGAAATTTATGTTTTCTTAAATCTGTAGTTGAATATAT
 AATGCTATTTACATTTCAATATAGTTTTGATGTATCTAAAGAACACATTTGAATTCCTTCCCTGTGTTCCAGTTT
 GATACTAACCTGAAAGTCCATTAAGCATTACCAGTTTTAAAGGCTTTTGGCCATAGTAAGGAAAAATATATC
 TTTTAAAGAAATATTTTTTACTATGTTTGCAGGCTTACTTCCCTTTTCTCACATTATGAAACTCTTAAATCA
 GGAGAAATCTTTTAAACAACATCATATATGTTTAAITTTGAAAAGTCAAGTCAATCTTTTCTTTTGAAGTATGC
 AGATGTTACATTGACTGTTTTCTGTGAAGTTATCTTTTTTCTACCTGCAGAAATAAAGGTTGTTTTGATTTTTT
 GTATTGTTTTAIGAGAACATGCAITTTGTYGGGTTAAITTTCTACCCCTGCCCCCATTTTTTCTCTAAAGTAGAAAG
 TATTTTTCTTGTGAATTAATTTACTACACAAGAACATGTCTATTGAAAAATAAGCAAGTATCAAAATGTTGTGGG
 TTGTTTTTTTTTAAATAAATTTTCTCTTCTCAGGAAAGACAAGAAATGTCCAGAAGATTATCTTAGAAGGCACAG
 AGAGAATGGAAGATCAGGTATATGCAAAATGCACTACTGTCAAAATGTTTTCTCACAGCAITGATCTGTATAAGGT
 TGATGGCTACATTTGTCAAGGCCCTTGGAGACATACGAATAAGCCTTTAAATGGAGCTTTTATGGAGGTGTACAGAA
 TAAACTGGAGGAAGATTTCCATATCTTAAACCCAAAGAGTTAAATCAGTAAACAAAGGAAAAATAGTAATTCATC
 TACAAATTAATATTTGCTCCCTTTTTTTTTCTGTTTGGCCAGAAATAAATTTTGATAAATTTGTTTATAGTAAAAA
 TAAAAAAATTTGCTCTGTATGTTCTTTAAGGTACTTCTCTGAACTTTCCCTAGAAAGTAGCTGTAAACAGAA
 GGAGAGCATATGTACCCCTGAGGTATCTGTCTGGGGTGTAGGCCAGGTCCACACAATATTTCTTCTAAGTCTTA

10

20

30

40

【化 18】

TGTTGTATCGTTAAGACTCATGCAATTTACATTTTATTCCTAATACTATTTTAGTATTAAAAATTTGTCAGTGATAT
TTCTTACCCTCTCCTCTAGGAAAATGTGCCATGTTTATCCCTTGGCTTTGAATGCCCTCAGGAACAGACACTAA
GAGTTTGAGAAGCATGGTTACAAGGGTGTGGCTTCCCTGCGGAAACTAAGTACAGACTATTTCACTGTAAAGCA
GAGAAGTTCCTTTGAAGGAGAATCTCCAGTGAAGAAAGATTTCTTCACTTTTACTTCCATTTCCCTCTGTGGGTG
ACCTCAATGCTCCTTGTAAACTCCAATATTTTAAACATGGCTGTTTGGCTTTCTTTGCTTCTTTTAGCATG
AATGAGACAGATGATACTTTAAAAAGTAATTTAAAAAATACTTGTGAAAATACATGGCCATAATACAGAAOC
CAATACAATGATCTCCTTTACCAAATTTGTTAIGTTTGTACTTTTGTAGATAGCTTTCCAATTCAGAGACAGTTAT
TCTGTGTAAAGGCTGACTTAACAAGAAAAGATTTCCCTTTACCCAAAAGAAATCCAGTCCTTATTTGCTGGTCAA
TAAGCAGGGTCCCCAGGAATGGGGTAACTTTACGACCCCTCTAACCCACTAGTTATTAGTAGACTAATTAAGTAA
ACTTATCGCAAGTTGAGGAACTTAGAACCACTAAAATTCIGCTTTTACTGGGATTTTGTTTTTTCAAAACCAGA
AACCTTTACTTAAAGTTGACTACTATTAATGAATTTTGGTCTCTCTTTTAAAGTGCTCTTCTTAAAAATGTTATCTT
ACTGCTGAGAAGTTCAGTTTGGGAAGTACAAGGAGGAATAGAACTTAAGAGATTTTCTTTTAGAGCCTCTTCT
GTATTTAGCCCTGAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTCTGTGTGAGCTTCAGTGAGGCTATTCATTCA
CTTATACTGATAATGCTGTGAGATACTGTGAATGAAATACATATGATGCTTAAACCTAAGAGGAAATATTTCCCA
AAATTTATCTTCCGAAAAGGAGGAGTTGCCTTTTGATTGAGTTCTTGCAAATCTCACAACGACTTTATTTTGAA
CAATACTGTTTGGGAATGATGCTTAGTTTGAACAACCTTCAGTTGTAGCTGTCACTGTATAAAATGCTTCA
GGGAAGGAAATTTAACACGGATCTAGTCATTATTTCTTTAGATTGAATGTGTGAATTTGTAATTTGTAACAGGCA
TGATAATTATTACTTTAAAAACTAAAAACAGTGAATAGTTAGTTTGTGGAGGTTACTAAAGGATGGTTTTTTTTTA
AATAAACTTTACGATTATGCAAATGGGCATATGGCTTAGGATAAACTTCCAGAAGTAGCATCACATTTAAAT
TCTCAAGCAACTTAATATATGGGGCTCTGAAAACTGGTTAAGGTTACTCCAAAATGGCCCTGGGTCTGACAA
AGATTCTAAGTTAAAGATGCTTATGAAGACTTTGAGTAAATCATTTTCAATAAAATAGTGAGGAAACAACTAG
TATTAAATTCATCTTAAATATATGATGATTTAAAAAATATGTTTAGCTAAAAATGCATAGTCATTTGACAATTC
ATTTATATCTCAAAAAATTTACTTAAACAGTTGGTCACAAAACCTGATGAGACTGGTGGTGGTAGTGAATAATG
AGGGACCATCCATTTTGAAGACACTTTACATTTTGTATGTTGTTATCTGAATTTTTCAGTTTGTATCTATAGACTA
CAAATTTCAAAATTTACATTTCAAGATGTATTAAGTAGTATATCTTGAAATAGCTCTAAAGGGAATTTTCTGT
TTTATTGATTCTTAAAAATATATGTGCTGATTTTGATTGGATTGGGTAGATTATACTTTTATGATATGGAGGT
TAGGTATTGATTCAAGTTTTCCTTACCTATTTGGTAAGGATTTCAAAAGTCTTTTGTGCTTGGTTTTCTCATTT
TTAAATATGAATATATGTGATGACCTTTAACAAATTTTTTTTATCTCAAAATTTTAAAGGAGATCTTTCTAAAAAG
AGGCATGATGACTTAATCATTTGCATGTAACAGTAAACGATAAAACCAATGATTCCATACTCTCTAAAGAAATAAAAG
TGAGCTTTAGGGCCGGCATGGTCAGAAATTTGACACCAACCTGGCCACATGGCGAAACCCCGCTCTCTACTAAA
AATACAAAATCAGCCGGCATGGTGGCGGCACCTATAGTCCAGCTACTTGGGAGGATGAGACAGGAGAGTCAC
TTGAACCTGGGAGGAGAGGTTGCGAGTGAGCTGAGATCACGCCATTTGCACTCCAGCCTGAGCAATGAAGCAAAAC
TCCATCTCAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAATAAAGTGAAGCTTTGGATTGCATATAAATCCTTTAGACATGT
AGTAGACTTGTGTAATCTGTGTTGAACAAATTTACGAAGTATTTTCATCAAAGAATGTTATGTTGATGTTAT
TTTTATTTTTTATGGCCAGCTCTCTCATATTTACGTGATTTCTTCACTTCATGTCACTTTATTTGTGAGGGTC
AGAGTATTATTCAAATGCTTACTGGAGAAGTGATTTCTGTAAATGGAAGTCTTTTCACTATGAATACACAGATG
TTCCTGAAGAAATAGATGTAAGTTTAAATGAGAGCAATTTATACACTTTTATGAGTTTTTTTGGGGTTATAGTATTAT
TATGTATATTTAATATTTCTAATTTTAAATAGTAAGGACTTTTGTACATACATATTTACATACAGTATTAGCCA
CTTTAGCAAAATAAGCACACACAAAATCCTGGATTTTATGGCAAAACAGAGGCATTTTGTATCAGTGTGACAAAA
TTAAATTCATTTTGTATTATTCTATTTTATAATTTCTTAAAGTGGGAGGATCCCAGCTCTTTATAGGAGCAAT
TAATAITTAATGATGATGCTTTTGAACAAAACCTGTGTGCAAGTAGTAACCATTAATGGAAGTTTACTTGTAG
TCACAAATTTAGTTTTCTTAAATCATTTGTTGAGGACGTTTTGAATCACACACTATGAGTGTAAAGAGATACCTTT
AGGAAACTATTTCTGTGTTTCTGATTTTGTCTATTTAGGTTAGTCTCTGATTCTGACAGCTCAGAAAGAGGAAG
TTGTTCTTTGTAATAATTTGTTAACTGCTTGACCAGCTTTTACATTTGTTCTTCTGAAGTTTATGGTAGTGACA
GAGATTGTTTTTGGGGAGTCTTGATTCTCGGAAATGAAGGAGTGTGTTATATTGAATCCAGACTTCCGAAAAC
TTGTATATTTAAAGTGTATTTCAACACATATGTTACAGCCAGACTAATTTTTTTATTTTTTGTATGCAATTTAGAT
AGCTGATACAGTACTCAATGATGATGATATTGGTGACAGCTGTCTATGAAGGCTTTCTTCTCAAGTAAGAAATTTT
CTTTTCATAAAAGCTGGATGAAGCAGATAACATCTTATGCTCACCTATGACAAGATTTGGAAGAAAGAAAATAAC
AGACTGTCTACTTAGATTGTTCTAGGGACATTACGTAATTTGAAGTGTGCTTAAATTTGTGTTATTTTCACTCA
TTATATTTCTATATATATTTGGTGTATTTCCATTTGCTATTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACAAGAAAT
CATGGCCCTTGTCTGATTCTGGTTTCTTGTTTTTACTTCTCATTTAAAGCTAACAGAAATCCTTTCAATTAAGTTG
TACTGTAGATGAACCTTAAGTTATTTAGGCGTAGAACAAAATTTATCATATTTATACTGATCTTTTTCCATCCAGC
AGTGGAGTTTAGTACTTAAAGTTTGTGCCCTTAAACCAGACTCCCTGGATTAAATGCTGTGTACCCGTGGGCAAG
GTGCCGTGAATTTCTATACACCTATTTCTCATCTGTAAAAATGGCAATTAATAGTAATAGTACCTAATGTGTAGGG

10

20

30

40

【化 1 9】

TTGTTATAAGCATTGAGTAAGATAAATAATATAAAAGCACITAGAACAGTGCCTGGAACATAAAAAACACTTAATAA
TAGCTCATAGCTAACATTTCCCTATTTACATTTCTTCTAGAAATAGCCAGTATTTGTTGAGTGCCTACATGTTAGT
TCCTTTACTAGTTGCTTTACATGTAATATCTTATATTTCTGTTTAAAGTTCCTTCACAGTTACAGATTTTCATGA
AATTTTACTTTTAAATAAAAGAGAAGTAAAGTATAAAGTATTCACCTTTTATGTTACAGATCTTTCCCTTTAGGCT
CATGATGGAGTATCAGAGGCATGAGTGTGTTTAACTAAGAGCCTTAATGGCTTGAATCAGAAGCACTTTAGTCC
TGTATCTGTTTACAGTGTACAGCCTTTTCATACATCATTTTAAATCCCATTTGACTTTAAGTAAGTCACCTTAATCTCTC
TACATGTCAATTTCTTCAGCTATAAAATGATGGTATTTCAATAAATAAATACATTAAATTAATGATATTTATACTG
ACTAATTTGGGCTGTTTTAAAGGCTCAATAAGAAAATTTCTGTGAAAGGTCTCTAGAAAATGTAGGTTCCCTATACAA
ATAAAAGATAACATTTGTGCTTTATAGCTTCGGGTGTTTATCATATAAAGCTATTCTGAGTTATTTGAAGAGCTCACC
TACTTTTTTTTTGTTTTTAGTTTGTAAATTTGTTTTATAGGCAATGTTTTTAATCTGTTTTCTTTAACTTACAGTG
CCATCAGCTCAGACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTAAATAAGGTAG
TTTATTTTATAATCTAGCAAATGATTTGACTCTTTAAGACTGATGATATATCATGGATTGTCATTTAAATGGTAG
GTTGCAATTAATAATGATCTAGTAGTATAAGGAGGCAATGTAATCTCATCAAATTTGCTAAGACACCTTTGTGGCAAC
AGTGAGTTTGAATAAACTGAGTAAGAAATCATTTATCAGTTTATTTTGATAGCTCGGAAATACCAGTGTCASTAG
TGTATAAATGGTTTTGAGAAATATATTAABATCAGATATATAAAAAAATTAATCTTCTATTTCCCAATGTTATCT
TTAACAATCTGAAGATAGTCATGTACTTTTGGTAGTATTTCCAAAGAAATGTTATTTGTTTATTCATCTTGATT
TCATTTGCTTTCCGCTTTCCCTTCTAAATCTGTCCCTTTCTAGGGAGCTATTGGGATTAAAGTGGTCATTTGATTATTATA
CTTTAATTCAGTAATGTTTTCTGACCCCTTTCCCTTCAGTGCTACTTTGAGTTAATTAAGGATTAAATGAACAGTTACATT
TCCAAGCATTTAGCTAATAAACTTAAAGGATTTTGCACCTTTTCTTCACTGACCATTTAGTTAGAAAAGATTTCAGAGAT
AAGTATGTGTAICTTTCAATTTTCAGCAACCTAATTTTTTAAAAAAGTTTTACATAGGABATATGTTGGAATG
ATACTTTACAAAGATATTCATAATTTTTTTTTGTAATCAGCTACTTTGTATATTTACATGAGCCTTAATTTATAT
TTCTCATATAACCATTTATGAGAGCTTAGTATACCTGTGTCTATTATATTGTCATCTACGAACAGTGAACCTTATTC
CTTCGTGTTACCTTCAAACAGGTGGCTTTCCATCTGIGATCTCCAAAGCCTTAGGTTGCACAGAGTGACTGCGGAGC
TGCTTTATGAAGGGAGAAAGGCTCCATAGTTGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACATTTTTCCCATCTCCA
TCCTCTTGAGGGGAGAAATAGCTTACCTTTTATCTTGTTTTAATTTGAGAAAGAAGTTGCCACCCTCTAGGTTGAA
AACCACCTCCTTTAACATAATAACTGTGGATATGGTTTGAATTTCAAGATAGTTACATGCCCTTTTATTTTTCTTA
ATAGAGCTGTAGGTCAAATATTTATTAGAAATCAGATTTCTAAATCCACCCAATGACCTGCTTATTTTAAATCAAA
TTCAATAATTAATTTCTCTTTCTTTTTGGAGGATCTGGACATTTCTTTGATATTTCTTTACAACGAATTTTCATGTGTAG
AACCACATAAACAGAGCTATAAAAGTTGCATGGTCAAATAAGTCTGAGAAAGTCTGCAGATGATATAATTCACCT
GAAGAGTTCACAGTATGTAGCCAAATGTTAAAGGTTTTGAGATGCCATACAGTAAATTTACCAAGCATTTTCTAAA
TTTTATTTGACCACAGAATCCCTATTTTAAAGCAACAACCTGTTACATCCCATGGATTCCAGGTGACTAAAGAATACT
TATTTCTTAGGATATGTTTTATTTGATAATAACAATTAATAATTTTCAGATATCTTTTCATAGCBAATCAGTGGTCTT
TTTACTTCATGTTTTAATGCTAAATATTTTCTTTTATAGATAGTCAGAACATTATGCTTTTTCTGACTCCAGC
AGAGAGAAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAAATCATCATTTAAATATGAGTCAGGGCTCTTTGTACAAAGGCCT
GCTAAAGGTATAGTTTTCTAGTTATCACAAGTGAAACCCTTTTCTAAATCATTTTTTGAGACTCTTTATAGACAA
ATCTTAAATATTTAGCATTTAATGTATCTCATATTTGACATGCCAGAGACTGACTTCTTTACACAGTTCTGCACA
TAGACTATATGCTTTATGGATTTATAGTTAGTATCATCAGTGAACACCATAGAATACCTTTGTGTTCCAGGTG
GGTCCCTGTCTTACATGCTCAGCTCAGGACTTTTTTTTTTTTTTAAACACATGCTTAAATCAGGTTGCACATCAAA
AATAAGATCATTTCTTTTTAACTAAATAGATTTGAATTTTATTTGAAAAAAATTTTTAAACATCTTTAAGAAGCTT
ATAGGATTTAAGCAATTCCTATGTATGTGTACTAAAATATATATATTTCTATATATAATATATATTAGAAAAAAA
TTGTATTTTTCTTTTTATTTGAGTCTACTGTCAAGGAGCAAAACAGAGAAATGTAATTTAGCAATTTATTTATAATA
CTTAAAGGGAAGAAAGTTGTTTACCTTTGTTGAATCTATTATTTGTTATTTCAATTTATAGTCCCAAGACGTGAAGAA
ATAGCTTTTCTTAATGGTTATTTGATTTGTCTCATAGTGAATCTTTCTTGAGGATGTAGCCACGCCAAAATGAAT
AAAAAAATTTAAAAATTTGTTGCAATACAAAGTTATATTAGGCTTTTGTGCTTTTCAATAATGTGCTGCTATGAA
CTCAGAAATGATAGTATTTAAATATAGAACTAGTTAAAGGAAACGTAGTTTCTATTTGAGTTATACATATCTGTA
AATTAGAATCTCTCTGTTAAAGGCATAATAAAGTGCTTAAATCTTTTGTTCCTCAGCACCCCTCATTTAATTT
ATATAATTTTAGTTCTGAAAGGGACCTATACCAGATGCTTAGAGGAAATTTCAAACTATGATCTAATGAABAAA
TATTTAATAGTTCTCCATGCAATACAAATCATATAGTTTTCAGAAAATACCTTTGACATTTACAAAGATGAT
TATCAGAGCATTAATAATAGTAAAAAATGGAAATAGCCTCTTTCTTCTGTTCTGTTTCATAGCCACAGTGCCTCATA
CCAGTAGGTTATTTATTTACATGGTAACTGGCTACCCCAACTGATTAGGAAAGAAATTTGTTTTATAAAAAT
ACATACTCATTTGAGGTGCATAGAAATAATTAAGAAATTAAGACACTTGTAAATTTTGAATCCAGTGAATACCCAC
TGTTAATATTTGGTATATCTCTTTCTAGTCTTTTTTCCCTTTTGCATGTATTTCTTTAAGACTCCCAACCCCA
CTGGATCATCTCTGATGTTCTAATCTGCTTTTTTTCACAGCAGATTCTAAGCCTCTTTGAATATCAACACAACT
TCAACAACCTTCACTATAGATGCCAAATAATAAATTCATTTTTTAATTTACTTAACCCTTCTTTGGATGCTTAGG

10

20

30

40

【化 2 0】

TCATTCTGATGTTTTGCTATTGAAACCAATGCTATACTGAACACITCTGTCACTAAAACITTCACACACTCATG
 AATAGCTTCTTAGGATAAATTTTTAGAGATGGATTTGCTAAATCAGAGACCATTTTTTTAAATTAACAAACAATT
 AITCAIATCGTTTTGGCATGTAAGACAGTAAATTTTCCITTTATTTTTGACAGGATTCAACTGGGAAGCTTTGTGCTG
 CCTTTCGGGCAAGICATGTATGCTCCATATCCACCACACACATAGATGTGGATGYCAATACTGTGAAGCAGATG
 CCACCCGTGTCATGAACATATTZATAATCAGCGTAGATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCACT
 TCAGAAGAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTACACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGTAAGTAATGCTC
 TGCCGTGCTGGTACTGTAGTCAAGCAATATGAAATTTGTGCTTTTTACGAATAAAAAACAAACAGAAAGTTGCATTTA
 AAAAGAAAAGAAATATTACCAGCAGAAATTATGCTTGAAGAAACATTTAATCAAGCAYTTTTTTCITAAATGTTCTT
 CTTTTTCCAIACAATTGTGTTTTACCCTAAAAATAGGTAAGATTAACCCCTTAAAGTAAATATTAACTATTTGTTTTA
 ATAAATATATATTAGCTCCTAGGCACTGTTCTAGGTACCGGGCTTAATAGTGGCCAACCAGACAGCCCCAGCCC
 CAGCCCTACATTGIGTATAGTCTATTATGTAACAGTTATTGAATGGACTTATTAACAAAACCAAAGAAGTAATT
 CTAAGTCTTTTTTTTTCTTGACATATGATATATAAATACAGCAAACTGTTAAATATATTAATGGAACATTTTTT
 TACTTTGCAITTTATATTGTTATTCACTTCTTATTTTTTTTTTAAAAAAAAGCCTGAACAGTAAATTCAAAAGG
 AAAAGTAATGATAATTAAATTGTTGAGCATGGACCCAACTTGAAAAAAAATGATGATGATAAATCTATAATCCT
 AAAACCTTAAGTAAACACTTAAAGATGTTCTGAAATCAGGAAAAAGAAATTATAGTATACTTTTGTGTTTTCTCTTT
 TATCAGTTGAAAAAAGGCACAGTAGCTCATGCCGTGAAGAACAGAGCTTTGGGAGTGAAGGCAGGCCGATCACT
 TGAGGCCAGGAGTTCCAGACCAGCCTGGGCAACATAGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATAAAAAAGAATTATT
 GGAATGTGTTTTCTGTGTGCTGTAATCCTAGCTATTCOGAAAGCTGAGGCAGGAGGATCTTTTGASCCAGGAGT
 TTAGGTTACAGGGAGTTATGATGTGCCAGTGTACTCCAGCCTGGGGAACACCCGAGACTCTGCTTATTTAAGAA
 AAAAAAATAAATAGCTTGCATTAATGCCCTGGCACATAGAAGGTAACAGTAAAGTGTAACTGTAATAACCCAGG
 TCTAAGTGTGTAAGGCAATAGAAAAATTGGGGCAATAAGCCTGACCTATGTATCTACAGAATCAGTTTGAGCTT
 AGGTAACAGACCTGTGGAGCACCAGTAATTACACAGTAAGTGTAAACAAAAGCATAGAAATAGGAATATCTTGTT
 CAAGGGACCCCCAGCCTTATACATCTCAAGGTGCAGAAAGATGACTTAATATAGGACCCATTTTTTCTTAGTCT
 CCAGAGTTTTTATTGGTCTTGAGAAAGTAGIAGGGGAATGTTTTAGAAAATGAATTGGTCCAACCTGAAATTAAC
 TGTCAGTAAGTTTTTATATATTGGTAATTTTAGTAGACATGTAGAAGTTTTCTAATTAATCTGTGCTTGAAAC
 ATTTTCTTTTTTCCCTAAAGTGCTTAGTATTTTTCCGTTTTTGATTGGTTACTTGGGAGCTTTTTTGAGGAAAT
 TTAGTGAAGTGCAGAAATGGTTTTGCAACCATTTGGTATTTTTGTTTTGTTTTTAGAGGAATGATGTTGTTATTTA
 ACATTTCTTAATCATTTTTTAGCCAGCTATGTTTTGTTTTGCTGATTTGACAACTACAGTTAGACAGCTATTTCTCA
 TTTTGCTGATCATGACAAAAAATATCCTGAATTTTTAAATTTTGCAATCCAGCTCTAAATTTCTAAACATAAAA
 TTGTCCAAAAAATAGTATTTTCAGCCACTAGATTGTGDTTAAAGTCTATTGTACAGAGTCATTTACTTTTTAG
 TATATGTTTTTACATGTTAATATGTTTGTATTTTAAATTTTAACTTTTTAAATAATTCAGTCACTGCCAAT
 ACATGAAAAAATGGTCACTGGAAATTTTTTTTTGACTTTTTATTTTAGGTTTCATGTGTACATGTCAGGTTGTGTTA
 TACAGGTAATTTGGTGTGTCATGAGGGTTTTGGTGTACAGGTGATTTTCATTACCCAGGTAATAAGCATAGTACCCAA
 TAGGTAGTTTTTTGATCTCCACCCCTTCTCCACCCCTCAAGTAGGCCCTGGTGTGCTGTTTTCTTTTGTGTC
 ATGTATACICAGTGTTTAGCTCCCACTTAGAAGTGASAAATGCGGTAGTTGGTTTTCTGTTCTGATTAGTTC
 ACTTAGGATAATGACCTCTAGCTCCATCTGGTTTTTATGGCTGCATAGTATTCATGGTGTATATGTATCACATT
 TTCTTTAACCAGTCTACCATTGATAGGCATTTAGGTTGATTCCCTGTCTTTGTTATCATGAATAGTGTGTGATG
 AACATACACAATGATGTGCTTTATGGTAGAAAAATTTGATTTCTTTAGGTACATATAGAATAATGGGGTGTGCT
 AGGGTGAATGGTAGTTCTATTTTCAGTTATTTGAGAAATCTTCAAACCTGCTTTTCATAATAGCTAAACTAATTTA
 CAGTCCCGCCAGCAGTGTATAAGTGTTCCTTTCTCCACAACCTTGCCAAACATCTGTGATTTTTTGACTTTTTTA
 ATAAATAGCCATTCTAGAGAATTGATTTGCAATTTCTCTATTAGTGATATTAAGCATTTTTTCAIATGCTTTTTAG
 CTGCTGTATATATTTCTGTGAABAAATTTCAATGCTTTTGCCAGTTTGTAGTGGGGTGGGTGTTTTGCTT
 GTTAATTAGTTTTAAGTTCCCTCCAGATTCTGCATATCCCTTTGTTGGATACATGGTTTCAGATATTTTTCTCC
 CATTTGTAGTTGTCTTTTACTCTGTTGATAGTTTTCTTTTGCATGCAGGAGCTGTTAGGTCCCATTTGTGTT
 TGTTTTTGTGAGTTGCTTTTGGCGTCTTCATCATAAAATCTGTGCCAGGGCCTATGTCCAGAATGGTATTTCC
 TAGGTTGCTTCCAGGGTTTTTACAAATTTAGATTTACGTTTTATGCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTGT
 ATATGGCACAAGGAAGGGGTCCAGTTTCACTCCAATTTCTAIGGCTAGCAATTATCCAGCACCATTATTTGAAT
 ACGGAGTCTTTTCCCATTTGCTTTTGTGTTTGTGCAACTTTGTTGAAGATCAGATGGTTGTAAGTGTGTGGCTTTAT
 TTCTTGGCTCTCTATTCTCCATTTGGTCTATGTGCTGTTTTTATAACAGTACCCTGCTGTTCCAGTTCTTATAGC
 CTTTTAGTATAAATCGGCTAATGTGATGCCCTCAGCTTTGTTCTTTTTGCTTAGGATGCTTTGGCTATTTGGG
 CTCCTTTTTGGGTCCATATTAATTTTAAACAGTTTTTCTGGTTTTGTGAAGGATATCATTTGGTAGTTTATAGG
 AATAGCATGAATCTGTAGATTGCTTTGGGCGATAGGCCATTTTAAACAATATTAATTTCTTCCATCTATGAATA
 TGGAATGTTTTCCATGTGTTTGTGTCATCTCTTTATACCTGATGTATAAAGAAAAGCTGGIATTTATCTTACTC
 AATCTGTTCCAAAAAATTGAGGAGGAGGAACCTTCCCTAATGAGGCCAGCATCATTTCTGATACCAAAACCTGGC

10

20

30

40

【化 2 1】

AGAGACACACACACAGAAAAAGAAAAAACTTCAGGCCAAATATCCTTGAITGAATATAGATGCAAAAAACCCICAACAAAAAT
ACTAGCAAAACCAAATCCAGCAGCAGCATCAAAAAGCTGATCTACTTTTGATCAAGTAGGCTTTTATCCCTGGGGATGCA
AGGTTGGTTCAACATACACAAATCAATAAGTGTGATTCAATCACATAAACAGAGCTAAAAACAAAACCACAGAT
TATCTCAAATAGGTAGAGAAAAAGGTTGTCAATAAAATTTAAACATCCTCCATGTATAAAAACCTTCAGTAGGTCAGGT
GTAGTGACTCACACCTGTAATCCCAGCACCTTTGGGAGGCCAAGGCGGGCATATCTCTTAAAGCCAGGAGTTCAG
ACGAGCCTAGGCAGCATGGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATTTAGCTTTGGTATGGTGAC
ATGCACCTATAGTCCCAGCTATTCAGGAGGTTGAGGTGGGAGGATGTTGTGTAGCCCGGGAGGCAGAGGTTGGCAG
CGAGCTGAGATCATGCCACCGGCATCCAGGCTGGGCAACGGAGTGGAGCCCTGTCTCAAAAAGAAAAATACAA
ACAATCCTAAACAAACTAGGCATTGAAGGAACATGCCCTCAAAAAATAAGAAOCCATCTATGACAGACCCATAGCC
AATATCTTACCAAAATGGGCAAAAGCTGGAAGTATTCTCCTTGAGAACCGTAACAAGACAGGATGTCCACTCTCT
CCACTCCTTTTCAGCATAGTTCTGGAAGTCTAGCCAGAGCAATCAGGAAAGAGAAAGAAAGAAAGACATTTCAG
TAGGAAGAGAGAAGAGTCAAACATATTTCTGTTTGCAGGCAGTATATTTCTGTACCTAGABAATCTCATAGICTCTG
CCCAGAAACTCCTAAATCTGTTAAAAATTTTCAGCAAAGTTTTGGCATTCTCTATACTCCAACACCTTTCCAAAGTG
AGAGCAAAATCAAGAACACAGTCCCATTCACAATAGCCGCAAAACGAATAAAATACCTAGGAATCCAGCTAACCA
GGGAGGTGAAAGATCTCTATGAGAATTACAAACACTGTCTGAAAGAAATCAGAGATGACACAAACAAATGGAAAT
GTTCTTTTTTAAACACCTTGCTTTTATCTAAATCACTTATGATGAAGATACTCAATTCAGTGGAAACAGGTATAATAAG
TCCACTCGATTAAATATAAGCCTTATTTCTCTTTCCAGAGCCCAAGAGGGGCCACTATCAGTGCCCGAGTCAATAAT
GACGAAATGCTAATATTTTTCCCTTTTACGGTTCTTTCTTCTGTAGTGTGGTACACTCGTTTTCTTAAAGATAAGG
AACTTGAACATACCTTCCGTGTTTGTCTTCTACACATACCCATCTCTTTTTTGGCAGCTTGGTCAGGTATAGGAT
GATCCCTACCCTTTTCAGTTAAAAAACTCCTCCTCTTAACTAAATGTTCTCTTACCCTCTGGCTGAGTAGAAGCCTA
GGGAAAAATGGAAGAGAAAAAGATGAAAGGGAGGTGGGGCCTGGGAAGGGAATAAGTAGTCTGTGTTGTTGTTGTTG
TTTGTCTTTAGCACCTGCTATATCTTAGGTGCTGTGTTAGGCACACATTATTTTTAAGTGGCCATTATATTACTACT
ACTCAGCTCIGGTCTGTTGCCAAGGTAGGTAGTACTTTCTTGGATAGTTGGTTCATGTTACTTACAGATGGTGGGCT
TGTTGAGGCCAAACCCAGTGGATAATCATCGGAGTGTGTTCTCTAATCTCACTCAAATTTTTCTTCACATTTTTTG
GTTTGTTTTGGTTTTTGATGGTAGTGGCTTATTTTTGTTGCTGGTTGTGTTTTTGTTTTTTTTTTGAGATGGCAAG
AATTGGTAGTTTTATTTATTAATTCCTAAGGGTCTCTACTTTTTTTTAAAGATGAGAGTAGTAAAAIAGATTGA
TAGATACATACATACCCCTTACTGGGGACTGCTTATATTTCTTTAGAGAAAAAATACATATTAGCCTGACAAACAC
CAGTAAAAATGTAATATATCCTTGAGTAAATAAATGAATGTATATTTGTGTCTCCAAATATATATATCTATATT
CTTACAAATGTGTTTTATATGTAATATCAATTTATAAGAACTTAAAAATGTTGGCTCAAGTAGGGGATTGTGGAAGG
TAGCATATATGTGCCATTTCACCAATTTGAACTTTTCTTTCTCTCAATTTCTTTCTTTCTTCAGGAATATTTTT
CAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAGTGAAGGCCCTCCGTGATCAGGTAAATGTGTAACCTTGAGATTGTCAGA
GTGAATGATATGACATGTTTTCTTTTTTAATATATCCTACAAATGCCTGTTCTATATATTTTATATTCCCTGGATC
ATGCCCCAGAGTTCTGCTCAGCAATTGCAGTTAAGTTAGTTACACTACAGTTCYAGAAAGAGTCTGTGAGGGCAT
GYCAAGTGCATCATTACATTGGTGGCTTGTGCTTAGATTAAIGCTTCGGGAATTCAGACCTTTGTTTTACAATA
TAATAAATAATTATGCTATCTTTTAAAGATATAATAAATAGATATAAAGTTGACCACAACTACTGTTTTTTGAAA
CATAGAAATCCTGGTTTACATGTATCAAAGTGAATCTGACTTAGCTTTTACAGATATAATATATACATATATAT
ATCCTGCCAATGCTTGTACTATATATGTAGTACAAGTATATATATATGTTTGTGTGTATATATATATAGTACGG
GCATATATACATATTACCAGCATTTGTAGGATATATATATGTTTTATATATTAATAAAGTTATAAACCTTAAAC
CTATTATGTTATGTAGAGTATATGTTATATATGATATGTAATAATATATAACATATACTCTATGATAGAGTGTAA
ATATTTTTTATATATATTTTTAACATTTATAAATGATAGAAATGAAGATTAGAGTCTTAATCTGTTTTATTAGGT
CTTTTTGAGTGTCTGGTCTTTCTTAAAGTGTCTAAAGTATTTTTCTTTTTCAGCTTATTAATTGGGGAGAGCCTGT
ATATTAACAATTAAGAGTGCAGCATTCCTATACGTCAAAACAAACAAACATTTTAAATTCAGCAATTAACCTATAACAA
GTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGAAAGGGAGGTTGTTTTATTTGCCTGAAATGACTCAAAAAATATTTTTGAAACA
TAGTGTACTTATTTAAATAACATCTTTATTGTTTCATTCTTTTAAAAAATATCTACTTAATTACACAGTTGAAGG
AATCGTAGATTATATGGAACCTTATTTCTTAATATATTACAGTTTGTATAATAACATTCTGGGGATCAGGCCAG
GAACTGTGTATAGATAAAGCTTTGAAATAATGAGATCCTTATGTTTACTAGAAATTTTGGATTGAGATCTATG
AGGTCTGTGACATATTGCGAAGTTCAAGGAAAATTCGTAGGCCCTGGAATTTCTATGCTTCTCAAGCTGACATAAAA
TCCTCTCCCACTCTCCACCTCATCATATGCACACATTCTACTCCTACCCACCCACTCCACCCCTTGCAAAAGTACA
GGTATATGAAATGCTCAAAACCATAGGCTCACTCTCTAGGAGCTTCAATGTTATTTGAAGATTITGGGCAGAAAAA
ATTAAATTAACGAAATAACTTATGTATGAGTTTTTAAAGTGAAATTAACATGGATGTATTTCTGAAGTAGAATGC
AAAATTTGAATGCATTTTTTAAAGATAAATTAGAAAACTTCAAAAACGTTCAGATTGTCTGGCCCTGGTGGCTTA
TGCCCTGTAATCCAGCATTCTGGGAGTCCGAGGTGGGTGGATCACAAGGTCCAGGAGTCGAGAACCTCTGCCAA
CATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAGTATACAAAAATTAGCTTGGCGGTGGCAGCGTGTGCTGTAAATCCCGACTA
CTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATCGCTTGAACCCAGGAGGTGTAGGTTGACAGTGAATCAAGATCCCGCACTG

10

20

30

40

【化 2 2】

ACTTTAGCCTGGTGACAGAGCTAGACTCCGTCACAAAAAATATCAGATTGTTCCTACACCTAGTGC
TTCTATACCCACACTCCTGTTAGGGGGCATCAGTGGAAATGGTTAAGGAGATGTTTAGTGTGTATTGTCTGCCAAG
CACTGTCAACACTGTCTATAGAACTTCTGTACGAGTGAATGTGAGCAAATATATGTGTTGAAATGGTTCCCTCCTC
CTGCAGGTCCTTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGAAAGTACTTTCCTTGACAGTTCCTACTTGTCTTCAC
AGAAAAGCCTTGACACTAATAAATATATAGAAAGCATACGTGAGTAAACCTCCTACACGGAAGAAAACCTTT
GTACATTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTCTTTGTACATTCTATATATCATAAATTTTGGGCTTCTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTCCATTATTTTTTAGGCAGAAAGGAAAAAGCCCTTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGATAGAAC
TTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAATGGCTCTGGCTGAGAAAATTAACAGGCTACACTCTT
TTATCTTTGGAAGACCTTTCTACACTAGTGTGCAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTAAATGTGTAACCTAA
TAAGCCTATTTCCATCACAATCATGATCGCTGGTAAAGTAGCTCAGTGGTGTGGGGAACGTTCCCTGGATCATA
CTCCAGAATTCCTCTCAGCAATTGCAGTTAAGTAAAGTTACACTACAGTTCTCACAAGAGCCCTGTGAGGGGATG
TCAGGTGCATCATTAACATTGGGTGTCTCTTTTCTAGATTATGCTTTTGGGATACAGACCTATGTTTACMAAT
AATAAATATTATTGCTATCTTTTAAAGATATAATAATAGGATGTAAACTTGACCACAACCTACTGTTTTTTGAAA
TACATGATTCAATGGTTTTACATGTGTCAAGGTGAAATCTGAGTTGGCTTTTACAGATAGTTGACITTTCTATCTTT
GGCATTTCTTTGGTGTGTAGAATTACTGTAATACTTCTGCAATCAACTGAAAACCTAGAGCCCTTTAAATGATTTCAA
TTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTGAACATAGGATGAGCTTTAGAAAGAAAATTGATCAAGCAGATGTTTAAATGG
AATDGATTATTAGATCCTACTTTGTGGATTAGTCCCTGGGATTCAGTCTGTAGAATGTCTAATAGTTCTCTAT
AGTCTTTGTTCTGGTGAACACAGTTAGGGTGTTTTGTTTATTTTATTGTTCTTGCTATTGTGATATTCTATG
TAGTTGAGCTCTGIAAAAGGAAATTTGATTTTATGTTTTAGTAAATGTTGCCAATTTTTTAAATTAATTTTCAIT
ATTTTTGAGCCAAATTTGAATGTGCACCTCCTGTGCTTTTTTCTCTTAGAAAATCTAATTAACITGGAACTAAGT
TCAGATTTTCACTGGTCACTCATTTTCTATCTTTGTTTTCTTCTGTAAGTCTTACCATGTACCTGCTTTTGGCAATC
ATTGCAACTCTGAGATTATAAATGCCTTAGAGAAATATACTAATAAAGATCTTTTTTTTACAGAAACAGAAAAT
AGTTCTTTGAGTACTTCTCTTCTGCAATTTCTGCTATGTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTGCCTGCAATAGGCTAT
AAGGAATAGCAGGAGAAATTTTACTGAAGTGTGTTTTCTTAGGTGCTACTTTGGCAGAGCTAAGTTATCTTTTG
TTTTCTTAATGCGTTTTGGACCATTTTGTGCTATATAAATAACTGATTAATATAATTTCTACACAATGTTGACAT
TGTAAGTTACACAAACACAAATATAATTTTTATTTAAATTTCTGGAAGTAATATAAAGGGGAAATATAATTTATAA
GAAAGGGATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCACCACCAATTTACACAACAAAATGACATGTTTGAATG
TGAAAGGTACATAAATAGCTTTTCCATCATGAATCAGAAAGATATGTGACAGCTTGATGTTTTAGACAACCACTGAAAC
TAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCAGTCATTTAAAAAATATATAAATACTACCTTGTAGTGTCCCATACTGTGTT
TTTTACATGGTAGATTCTTATTTAAGTGTCTAAGTGGTTATTTCTTTGGCTGGTTTATTTGACTGTTTATACAGAA
TGTAAGTTGTACAGTGAATAAGTTATTTAAAGCATGTGTAAACATTGTTATATATCTTTTCTCTAATGGAGAA
TTTTGAATAAATAATATTTGAAATTTTGCCTCTTTTCAAGTTGTTTCAATTCAGAAAAAATACTATGATATTGGAAG
CTGATCAGCTTCTGTTTCAAGCTGACAGTCATGCTGGATCTAAACTTTTTTTTAAATTAATTTTGTCTTTTCAAGA
AAAAATATTTTAAAGAAGCTTTATAATATAATCTTATGTTAAAAAACTTTCTGCTTAACCTCTCTGGATTTCATTT
TGATTTTTCAAAATTAATATTAATATTTCAATGTAAAAATACTATTTAGATAAATTTGTTTTTAAACATTTCTTATT
ATTATAATATTAATAAATACTAACTGAAGTTATTTATCTCCAGGTATCTAATACATGTATCCAAAGTAAAAATCC
AAGGAATCTGAACACTTTTCTCTGCAAGCTAGGAATAGGTTTGACATTTTCACTCCAAGAAAAAGTTTTTTTTT
GAAAATAGAAATAGTTGGGATGAGAGGTTTTCTTTTAAAGAGACTAAGTGCATCATTACTATGATTTCTCAAGAA
GAAACCAAAACTTTTATATAATACTATAAAGTAAATATAAATAGTTCTCTATAGTATAATTTCTAATAATGCTAC
AGTTTTAAACAGATCACTCTTATATAATACTATTTTGAATTTTGAAGTGAATTTGCACAAATTTGATTTTCTCTAT
GATCTGCAGGGTATAGCTTTAAAGTAAACAAAAACAGTCAACCACTCCATTTAACACACAGTAAACATATGGGACT
AGTTTTATTTACTTCCATTTTACAAATGAGGAACTAAAGCTTAAAGATGTGTAATACACCGCCCAAGGTACACACA
GCTGGTAAAGGTGGATTTTCTCTCCAGACAGTTACAGTCATTTGCCATGGGCACAGCTCCTAACTTAGTAACTCCAT
GTAAGTGGTACTCAGTGTAGCTGAATTTGAAAGGAGAGTAAGGAAGCAGGTTTACAGGTCTACTTGCCTATTCTA
GAGCCCGAGTGTGAATCCCTGCTGTGCTGCTTGGAGAGTTACTTAACTATGCAAGGTTCAATTTTGTAAATATT
GGAAATGGAGTGATAATACGTAATTCACAGAGGATTTAATGAGACCTTATACGATCTTATGTTTCACTACCTGAC
TAGTGCTTCATAAATGCTTTTTTCTCCAACTCTGACAACTCTCCAGCTTGTAAATTTGGGGCATTTAGAACATTTAATA
TGATTAATTTGGCATGGTAGGTTAAAGCTGTCTCTTGTGTTTTCTATTTGTTCTTTTTTGTTTTTCTCTACTTTT
GGATTTTTTATTTCTACTATGCTTTTTCTATTTGCTTTTAACTATACTCTTTGATTTATTTTAGTGGTTGTTTT
AGGGTTATACCTCTTTCTAATTTTACCAGTTTTATAACAGTTTTATATACTACTTGACATATAGCTTAAAGAACTTA
CTGTTGTGTGCTTTTTTGTGTTATGGTCTTAAAGTTTTTATTTCTACAAACATTATAAAGCTCCACACTTTATTGT
TTTTTAATTTTACTTATACAGTCAATTTATCTTTTTAAAGATATTTAAATATAAATCAAAACACCCCAATTTAA
AGTCAGAGATTGTTAATACCACATGATCTCATTACACACAGAAATGAAAACTTGGAACCTATAGAAAGCAGAGA
GTAAAAACATGGTTTACCAGGTGCTGGGAGAGGCGGTGGGCTGGGAGATGTTGGTCAAAGTTAGACAGGAGAA

10

20

30

40

【化 2 3】

TAAGTTCAGAGATCTATTGTACAACTTATTCAGTTAGATAGGAGGAATAAGCTAAAGATCAAGAGATCTATTGT
ACAATGTGACTATAACCAACAACATATATTGTACACTTGAAAATTGCTAACAGTATCTTTTAAAGTGTCTCTCTA
CAAATAAAATATGTGAGGTAATGTATATATTAATTAACTGTAGTCAATTTTCACAATGTATACCTTAATTTCAAAACATC
ATATTGTATGCTATAAAATATATACAACCTTTTATTTTCAATTTTATAGAAATGTCCTTAAAAAATCAGATTTTCAGA
TCAGATAAAAAAGCAAGACCCCACTATATGCTGCCAACAGGAAACACACCTTAAAAATAAAGGACGAACAAACAG
ATTAAGAGTAAAGGATGGAGAAAAGATACATCATATTGGTAAATTAGAAGAAAACCTGGAGTGACAATATGAAACA
AAATAGATTTTCAGAGCAAGAATATTACCAGGGGTAAAAATGATCATTTTATAATGATAAAAGAGTCAGTTCCAGC
AAAAGGATATAACAGTCCATAATGTTTTTTCACCTCATAGCTGTGTCAAATAGATGAAGCAAAAACCTGATAGAA
CTGTAAGAAGTAGACAAGTCCACAATTATGTTTTGGAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCGCCAGGCTGGAGT
GCAGTGGCAGGATCTCAGCTCACTGCAAGCTCCGCCCTCCAGGTTTACGCCATTCTCCTGCTTCAGCCTCCCCAG
TAGCTGGGACTACAGGCGGCCACCACCAGCCTGGCTAAATTTTTTGTATTTTATAGTAGAGACGGGGTTTCACCG
TGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCTGCCTGCCTCGGCCCTCCCAAGTGTCTGGGATTACAG
GCATGAGCCACTGACAGCAGCCTGGAGATTTTAAATATCCTTTCAATGTTTAGTAGAACAAGAATACACAAAATCA
GTAAGGATATAGAAGATTAGAACAAGACTATCAAACAATTTGACTTAAATGACATTTGTAGAGCACAGCAGTCCC
CAACAACAATAAATCACACATTTCTTTCCAAGAGTACATGAAACATGTACCAAGATAGACCGTATTTTGAGCCATG
AAACAATCTTGATAAATTTTAAAGGATTCAGATCATAGAAAAATGTTCTCTGACCACAAITGGAATTAATTTAT
TAACCAATAACAATATCTGGGAAAACCTCAAAAACCTGGACACCAGCGCTTTTAAAGAGACTAATAATTTCTAA
ATTATCTGTGTTTGGGGGGAAAAGAGAAATGGATTAGAGAGCAAAAAGGGTATCAGAGTGTGTGGTACGATTTT
ATGAAGAGTGGAAACAGAATCTGCCTTTGGCGTTTCCCACTACAGGCCATTCTTCACATIGATAACAGCATGATC
CTTCTAAATTAATCTAACGATCATTCTGCTTAAATGGCTCTCCAACACTTACAGAATTAGGTCACAAAATTTCTA
GCACAGTTTCTGTTTCATCTTTCTAACCTTTCTTCCACAGGCTCTAGCTAGTACGTATTTCTTTTATTTGATTTAT
TACACTATTCCTTTGCTTATCTATCTCCCCACCTAGGCTAAAGAACAAAGATTCTTTGCTTTTTTCAATTTTGTGTC
TCAGTGCCTAGCAITGGTGGCAGGCACACAGCATGCTTCCAGTAAATGTTAGCTGGATGGATGTAATGAGTATAT
AAATATTAATTTTATTTGTTTTTCCCAAAAAGAATTAATTTCTGCAAAATCAAGGAAATTGCTTTCTTTATATAAT
CAAAAACCTATTTTCCAGAAAGATTCTTCATTAATAATTAAGCCTATGCACAACCTAGCTCTAAAGTTTCAAGA
TTTTAGGCAGCAATTTTCAATCTTTTTGAAGTAATACATTTGAATCTTTTCAAATTTCTGTTTCTGCATTTGTG
CCACACCATCTCATCTCTTGTGTAATGTTTTGTTAAATTAATTTGCTTGATAAATTTGCTAAGTACTTTTCATCA
GACCAATTAGGACAATAGTAAAGTATCCATCTGTGGAGCGCGGACATTCAAGAAATCTGATCCAGTATTTAGAAAG
TCATTCCTGAGCTGAGTTGGCTCAAACCTGGCACCTTCTGCGATTGCTTGTGGGTGGGGAATGTGGAATGCTTTG
AAAGCTGAATGAGTTTGTCAAGTTTAAATTTCCCTTATGGCTAAAGGAAAAACAACATTCATTGTTTAAAAACAC
CAITGTTTGTTTTTTCTGCTTTTTTGTTCCTTGGAGCCTGAATCTGCAAAAACACTCACACCCAGCAITTTGCTT
CATGTACCCTCTTAAGATGTTTTTAGAGACTTGAATAGTGTCTCCGCACTACTTTTTTATTTGTGATTGTTTCAGAA
TGTTTATAACAAATGGTAAAAAGTCAGTTTTTAGTGCTCAAATTGAGTTTTATGGAGAAAGACCATAATTTATGTT
TGTCATTGTAAATTGATAGGAGAATTTTGGAAAGTTTGGCTCTAGAACCAAGATTTCCAAGGCTCAGATCTTAT
TTTCTCACTTCCTAGCTGTGTGACCTTAGACAAGGTATTAACCTGTCTGTGCTGCCTCAGTGTCTCTCACTATT
CTTTAAGAGTAAGAATAGAACCTACCCGATAGAGTCACCTGAAGATTAAAGTGGGTAGTAAATTCAGAAATGCTTG
GAACAGTAACCTAGCACAGAATAAGTGTCCAATAAAATTTGGGTGACGCTATTATCAGTATTAATCTGTGCTAAT
CATCATCACCATTAAAGCAATTAATGTAGAGTTCCAAAATTTGATTATGAACCTACAGTTATACAGCCATGATT
CCGGTGATAACCACGTCAGTAACAAGATTATTTCCCTTAGCTTGAGCCAGTCACTACCTCAITGCTATGTGGCAGAGT
GTGTTGCCGTAGGCAAAATGTCATTGTAGGGAATGAAAAAAAATTTGCCGTGTGAGCTGCTCTCCAGAGGCTCATC
CCAATTTCCCATCTGTCACCTTTACTCCATCTCCACTGCCACTATTAGGACCTTATCAATTTCTGTCTAGATTAAT
TCAACAGCTTCCTTCCTTCTAGTCTCCATGATTTCAACCACTAGCCATCCCTTCCCTTTTGGCCAAATTTCTTCCA
TTTATGGTAGAGTGATCTTTCTAATAGGAACTCTGACTTGCTTAAAAAGCCCTCATTGAGGCCGGAGGTGGT
GGCTCATGCCTGTAATCCAGCACCTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACGAGGTCAAGAGATTGAGACCATCG
TGACTAACACAGTGAAACCCCATCTGTACTAAAAATACAAGAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCGGGTGCCTGTAGT
CGCAGCTACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAAIGCCGTGAACCCGGGAGGCAGAGCTTGAGTGGAGCCGAGATTGC
GCCACTGCCTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAGCCCTCATTGACAACCTTCAA
CCCACAATCCATGGTGAAGCACAGGAGCCTTTGGGATCTGCCCCAGCACACCTCTCCACCTTTGCTCTCACTG
CTCCTGCCTTCATGGAGAGCCCTGATGAACATTTTGTAGTTTCCCTGACTCACCTTGCTGTGTACITGGGCGCTGTG
TGCGTGTGTGCTCCCACTACCTGCAATACGCTTACCCACTTCACCTGGGTGAACCTTTACTTAGGATTACCTTAGG
TGGGCATCATGTTCTTCCAGGCCCTCTCTAATCTTTAGTTGAGAGTATTCCAGACTTAAAGGCTCCATGGGATA
GGGATCTGTCTATGCACAGCTTATTTCCCACTGCCTGGCAGTAAATGCATTTATTAATATATATTTGAATTGA
TTACCTACTTTGGGCTCTTTGTTTGTCTTACACTTACAGTTCTAGCATAGCACTTAACTCATTATCATGCATCA
TTATTAAGGGTTTTGTTTTGTCTCCATTAGACTGTGAGCTCCACAAGGCTGTGTCTTGTCTTATACATCATTTGT

10

20

30

40

【化 2 4】

ATTTCCAGCTTCCAACATAGTGTCTTGCCATGACACAGGAAGTCAGTAAGCTCTGAATGAATGAATAGTATCTACA
TACCATTAAATCTGAGGTTTTAAAGTTTTCCCCAAATTTCTGAAGCAAGGGGATTTACGGACTTCCCTGACAAATTTTGTG
GATGTCAATCCCAATGATACCACTAACATTTTAAGGGACAGCTTGCATATATACATTTTTCTGGATGGCAGTTTTT
TTTCCACAGGCTTCATCAGATATTTCTCCATAGCCTTCCCTCAGATTTCTCAAAGGGGTCTCTGATTTCCCAAAA
GATAAGAACTGTCTATAAAAAATTATTTCTAAATATCAATTTGTTAAATAAAATGTTTGCARAGCAGCCTGATGAA
TCATTTTCAGGCCACTTGACCCCGATGAGTTAGAGAGTTTTGTCTCTGCAATCTGACTGCTTCCAGCAGTCTCACT
GCTGCTGGACTGTGGCACTTCCAATTGGCAGCAGGGCAAGTTTTCTTCTGGATGAATATTCTGTCTATAGGGGTCC
CCTTCCACACATACCTGTAGGAGCAGTTTGAAACTCATATGCAATGGTCTTCTCTGGTTCTAGGCACATGAGTCATT
TAAGCTGCTGGAGCCAGGACCAGCTAGTATGCTAGCCCGGCATTTCAGAAAGTTAAAATTTGGGGTCAAAAACCTGAG
AACTTCTTTGATCCACCTTGGCCAGACATTTCTCTGGCTTCCATTATAGCCTCAACATTTTTTTTTTTTTCTG
GCCTAGACCCACACAGGCAAGAGACCAGAGCTTCTCTAAGGAGCTAAGGGAAAGCACATTTTAAAAATAACTTGA
GCAATGAATTTCTCTGGCAAAAGCAACCCCACTACGTAATAATAAACCTTTTTAGTTTCGCAATAGCAGTTCCTG
AAAATGTAAACAACCTCAGGGTCTACATGCACATCAATTTGCTGAACAGAAAGTCCCTGGTCCAAATTTCTGCA
AGAATAAACACCTTACAAAACCTAGGGGTCAATGACCTTCTATATGGGAACAAGGAGGGTGTGGGGGSCAGCAACCC
ACCTGAGGACAATGAGAAAGTCTTGAGACTTGATATTCAAAATGCTGGCTTTCTAAACCAAAAACCTGGCATGAG
TGGAGGGAGAAGGGGAGGGTGGGCACAGTCTATGCTCAGGCTCTTGTCTCAGACCCCTACAGGCCCCCTGCTTCC
CTAGGGAAAAGCGAGAGTCTACTCACTGTCTGTAAGCCAGAGGAAGGCCCTGCAGGTTTCACTGTGTGTTCTGTG
ACAAGATGATGGTTCCATTGAAACTGTAATAACATACTTGGCCAACTAAGCCCATACGATCGTAGTAACCTTTGTA
CCCAGTCCCTAGCTTTTCAACATAATGATAATATGTTCTTTCTAATGTGGCCCATACTGTTCTAAATGAACCTTATG
CTGAGTTTTTCTGAGTACTAGATAATATTTCCCCATAAATAATAGATATAATTTATTTCTCAATTAATAATTTGGTA
GCTCTTTCTTAAAGCAGAAAGTATTTTCTCATTTCTTACTAGAACCTTTCTGTGTGAGGAGCAGCTGAGCTAGAAC
CCATATCTTAGAATGGTCAGAAATTTGGAGAAATTCAGGGAAAAGGCACTGGACTCATTTTTAAAGACTAGAAAAT
GCAACCTCCAGAAAAGATTCAAGAGTTTTTACTCCAGAGATGTAGGAAAGATTGGAGTAAATCTTAATATTA
TATTTTCAGGTAAACAAAGGATCACTGTCAAAAATAGCAGCATTTATTTAGTAATGGCTGTGTGCCAGGTACTTTAC
AGTTTCACATTTAACCCTCATATAACCTTGTAAAGTGGATATCCCTCAGTACATGATGAGAACACTGAAGCTT
AGGTTAAATGATTTGCCAAATCGGACATCAATTTCAAAATCTCCCCCTTTTTTTCTCCTTTCTATCTGCAAGG
CAGATGGCCCTTTCCCTTTTCAGTGAACCTTGTGCAATGACCACATGACTCTCTTTGGCCAAATGAACATGAACAAAG
CAGCGTTTATCACCTTTTCAGATGGAAGGCTTTGCATCAGCTTTTGCCTCTTTTCACTCTGCCACAGTGGCCACTAA
CATTCCAGATAGTGGCGCTCTGCAGGCTAGGTCTCTATAGTGGGAGCTATGGGCAGAGCCCCCTTTCCCAACCCCA
TCAAGATGTGCTGCTGCATAAGCCATGCAATTAATCTTTGCAAGTTTAAAGCCACTAAGTTTGGAGTTATATTA
TCATTAATCATGCTTCTCAAGAGAACAGAGTGGGGAGTGGTATTCATTATGGGAATGGCTTACATGATTATG
GAAGCTGAGTAGTCCCCAGTCTGCTGTTTTTGAGCTGGAGAAGTATAGAGGAGCCAGTGGTATTAATCAGCCCCAAG
CCTGAAGGCCTGAGAAATGGGATGGGGGAATTGGGAGGGTGGGTGTGCTAGGGTAGGATAAGTCTGAASTTCAA
AGGCCAGCCAGAAAGGTGGATGTTTTAGCAACAGAGAGAGAGCAAAATTCGCTTTTTCTTCTGCTTTTTTGTCTCT
CTGGGCCCCCAATGGATTGGATGATGCCCTCCCACTTGGTAAGGGTGGATCTTCTATCTCAGTCTGCTAATTT
CTTCCAGAAACATCTTTCACAGACACATCCAGAAATAATGTTTTACCAGCTATCTCGGTATCCCTTAGCCTAGTCC
ATATTTAAAAATTAATGATCACAAGCAGTTGTTTGTTCACAGCAAAACCTGGGTGACAGACCAAGTGACCCAG
ATGACTAGAATTTTACCTTTCTTTTGTGGCCACACCACTACTCTGAACATAACATGCYGTGCTGCTTCCAAAGTGG
GAATGATGGCTAAGTATCTTCTACCTAATTTGAGTCACAGAAAAAAGGTTATTAACCTGCAGTGACAA
GAATTTGTGATTCCCAAGGGGCGAGATCAAGACTGATAGATAAGAGAAGTGAGGAACATCTGGGGAATGTCCATTG
AAAATTTACTCAGAAGAGAAGAATTAATTAATAATAATATGATATATTGAATTATAATAATAATATTTGATG
TATTTCTTCCAGGCAATGTTTAAAGTTATAGACTTTGAGTATATTTCTCAAAGGGGGTCTATGTAAGAGACTAT
TTCTTAATATAGTTTCTAGCTTGGAAATGCTCTTCTGCTTTAAGCTGAGCTTATTTTATACAGACTTCACAAC
AATAACGTTTTCTTCACTAGTCACTACCAAGATGGTCTTCAATTTCCAGTTTGGAAATCCCACTATCAGAGCC
TGAGACAAGGACTAGTATGCAGTTAGTTTGTTTGGGAGGTGATCCAGGAAGTGGGAATGAGAGATCAGTCAGCC
TGCAACACGAAGGAGGAAAAGTCAATATAAGGATGAATTTGGCAATTTGGCCGTTTCATGCAACTGGGGCTAAAT
TTGCTTGGCTCTCTAAGAAATGTAAAGATGCCTCCCGTAATTTGCTCACCTCAAGTATTTATTCATTGGCTCTCA
TGCTCCATTGGTTGTCCATGAGAACTTTAGCCCTCCCTCCCTGACAGCACAGACACTGTGCTTTCTCTAGGCTGA
GCAAGCTCTCTGCACTCTGTGGAAACCGTCCCGGGGCGAGATAGTGAATAATGACTGCTGCGGTGCTTGAGATCTGGG
AAGAGGGCCACATCATAAGTGCACCTGAAATCAGAGATGTGTCAAGAGATGTGACACAGGGCATCTGAGGTGTCTA
CTGCACCAGCTATAACTCCCTAAACCGCTAATCTCAGTCTTACAGAGGGGATGGATGCAAGGGAACTGATGAT
TGAGAGCACCCGAAGAAGCTCTGTATGAACCTTAGGCAAGTTTCTTAATCTCCAAATGAAGGTAAATAATACCCAC
CATCCAAGATCTTCGGGAGGAATAGATGAACATAATGTATGTGAAATGTCCAGCACAGGTCTTAACCCATAGTAG
GTGCTCACCAATGTTAGTTCCCTGCCCCACCGTTGTGTGTATCCGGAGCTGCACATAGATGCTGAGGCAATGG

10

20

30

40

【化 2 5】

TCTCAAAATGTAAGTTTAAACACTTAATGACTGAGATTTTTCTGAGCTGCTTACAGGTTATTTGACTATATTCATTAT
TAATAATAATATATATAGGCCACTTCAGGCAACTGGGGCTAAATTTTGCTTGGCTCTCTAAGAAATGTAAAGAATG
CCTCCTGTAATTTGCTCACCCTCAAGTATTTATTCATTGGCTCTCGTGTCTTATTTGGTGTCTCCCTGAGGACCTTAGC
CCTCTCTCACTGCAGCAGACAGACTGTGCTTTCTCCTAGTTTTCTGTGGCAAGTGACAGGAGGCCACCTCAAACTA
AAGCAAAAGGGGACTTCATTGGCTCTTGTAGCTAGGAATTCAGGGTTGGCACTGGCTTTGGGCACTACTGGATGC
AGGAATTCAAACAATGTCTTCAACTCTTTCTTTTGGTGTCTCTCAGCTGTGCTTTCTCTTGTCTGTTCTTTTC
CCATTTTACAGATAAGTTTCTCCGTAAGTGAAGAGGGTGAAGAGGGGATGGCTGCAGAGAACTCTGGCTTATATC
ATCCTTGTCTTGTCTGACCTCAAGGTCCATGTATAAAATTCAGAGAGAAGGCCCTCTGGTITGGTGAAGCTTGGAAC
ATGCCCTGGAGGGTGGGGCCCTTGAAGTGGAGCTTGGTGGAAACCACATGGGCTGGAGCAAGGCCCTAGGGCCAGA
AGAGAGAGGTAGGCAGGGCTGCTGGCCAGGCACCTCTTACCAGACAGGCAAGAGGAGGGGCATGATTGAGGCA
GTGATACAGAAAGCAGACAGTAGAGGTGCTGGGCAAGTGTGCGGTTACTTGTACCTGTGGTITGATGGGAGAGTCA
CACCACATTTAGGAGGAGAGAAATCCATTTGCCACTTCTGACAAATGCCACAAGAATCAGATATTTTATCCAGAGGT
TGAATTTGGCCCATGCTGAGCTTTAAATACAGAGCTGTCTTGGAACTATGGCTCAGTACATTCATTTTGGTGTCC
AACAAAGCCTGCTCTGTGTGCTTCCCTCTCTCTGTGTGCTTCAAGATCTTCAATTTGTGCTTTGGGGAGAGAAA
GAGAAAATGTATATCAGGGTAGCTCAGCCCATGTGTCTTGGACTCAGGAAAAGAGTATCTTATCACCTTACTCT
TTTGTATATATAAAAAATAAGTTGAACGCTTCAAAATAAAATAAAGAGTATAGAAAAATTTTAAATTAACCT
GTTATGATTTTACCTAGAGAACCATTTGTCAACATCTTGGTATATGTACTTCCAGATACTTTCTATGAATATATA
CAITGTAGATTTTTTAATATTAAAGGCTATCATGTCTGCTTTGTATACAGGCTTTCTTTACTGATATGTAATATA
ATACACAGACAAATATACAAATCCTAAGCCATCAACTCAITGAATTTTATTCATTTGTTTTAATACCTGATGTG
TGTTCATTTGTAGGCTATGTACACATATTTAATTAAGCCCTATTGATGAATATTAATTTACTCTATTTGCC
AGTTCAITCCAGTCCAACATTTATTGAGTGTCTACTTACGGGCCAGGCACTCTTGTATTCATCAAGATCACCACA
TTATCTGTATCAGTTATTTATTGGCCAAATAAAACTGCATAACAAATCACTCCAAAATGTAGCACCTTAAACTA
CAACTACTTATTTATTTCTCAAGTCAATGGGTGAGCTGAGCAGTCTGCGGATAGGGGTCAAGGTCAACACAT
TCAACTAGACTACTTTGTAAAAAAGATGAGTGTCTGGTGGGTGTGTTCTTCTAAAAATAAAACAAGGAATGAGG
AAATTTGAGGTAGGATAAGAGGGGTGGTTGGCAACCAACCCACAAAAGGCAGACAAATTTTAAGGAAACATAA
TGCCAGACTCTTATGTATCATCCAGTAGATGAGTGAAGTATAACCTGGGGCGTAGTAGGGTAGGAGTGGGGA
GAGCAGAGGAGAAGGAAGGGGAGATTGCTTTTATCACTTTTGGATCCCTAATAACAGACATGACTGCCAGTATT
AAAATTTAAACAAGGATATCTGATCATTAATTTTCTGTATAAGTCACTGGTGATCTTCAACATCTCTCCCTCC
TTCTCCCTTCTTCTCTCCAGCCCTCCCTTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
CTTTTGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
AATCAAAATAACAGGAGCAGGGCCCTGAGAAAAGCACCITGSCATCTGTAGGCAAAACCATTTGTTCTTAAAGAA
GGGACTGAGAGATTGAGGAGCTCAGGACATTTGCCAAATGAACAGGCAAGCACATTTATTCAGTACCBAACBAAC
GGAAAACGGCCCTTTCCAAATACTGACCTATAAAACAGCCCTTTTACACAGAGTACOGTAATTACTGGCCACAGC
AACAAATGAAAAACAACCTCCCAACAAAGAAATTTTCTGGATTTAAAGCCATGAGATCTGGATTCTAACAGCTG
TGCTCTCTCAAACTACAAGTACAAATCTGGCTCTAACTAACAGCTATGAGCCTCAAACTGATGACTGGCATGT
TTGGGTCTCCATCTCTTCTTGGGGGTGGGGTCTTAGAGACCCCTTTTCCAGCCCTGATTCTCTTACTAGTGTG
TATGCTTTCTTTTGGCTTCTCATGCTGACCGTCTGAGCAGGAGTGAGAAGCAATTTCAAAGGAAAACATCGTTT
ATCATCTGCTGAAAGAAACCAAAAGAACACAGGAAAACAAAAGACAGGAAAGGGAAATGAAAATGTAAATTCAT
TTTATTAAGAAAGAAGATTTATTTCTTCTGGGACACTGGATAGAAACCTTAATGAGTTACCTAGCTATCATAAATCC
TCTAACAGAGAAGAGAAGAGAAAGAAACAAAGACGGAAGAGGGCAGGATAAAAGAAAGBAAGAAAGGAAGGAAAA
ATGAAGGAAGGAAGTTATCTATTCATTCTACAGAGACTCTGCTGAGCAGTAGACAAGAAGACTTGGGAAAAAT
TAACTGAAACTTTTCCAAAAATCTTTTCAAGGGGATTTTCTCTCTGAAAAGCATCATTAGAGGCTGTTCATAA
CCCAAGGCAAGCCCTCTTTTATATTTACTTACTGTACATGAACACTCATGCAATTTAGGGCTAGCCAGAGGCCATTT
AGAAATTCAAATAATTATTCAACCCAAAGGGGCTTTTCCAAATGCTGAAGTAGCTTCTTAAAGAGGAAATTAATATTGA
GCAGTATAGCAACCTAATTGGAATCTTGAGAAAATAGTTCTGTGTCTTGAACAGCTAGAGGCTAAAGAAAGAT
CAGGTITGGATGATACCTTCATTTTGTCTCTTTCCCTTAAATTAAGTGTAAAGGGAAAAATCTTGTTTATTTCTA
TGCCAGGAGGGTAGAGGGTGAATTTGGAGAGGTTCCAAAGTTTATCAAAATCTACCTTCAGTCTGGCAGTAGAAAAG
TTTACTTCTCTTCAATTTCTTCTTATAGACATTCAAAGAGAGCTAAGGAGATCCAAAAACCTTTTTTTCTATATTT
GCAATGCAAGGCAGTTGGGAATTAATGACTGATTTGTTGGTGGGAGGAGTGGGCATTTGATCACAAAAGCAGTAAA
GCTGTGTTTCTCAAGAGAGAAAGTCTCTTTGAGATCTTCAATATTTTACTATTTAGAAAGAGAAAGGGGCGTTAT
ATCAGCTTGGAAAGCATCCATGAGTCACTAGTCTCTTCTCTATCTTTCTATGCTTTCTGTATTAATTACTTTGAA
AGCAACAACATTTCAAACCCATTGAGCACACAGTGGTCTGATTTCTTCCACTTGTGAAAGGGTGTAAAGTCTCACTG
TAGGATTAATTTGGGGGTCCAGGCTATGGGCTTGTAGATATGACTACCTTAGACTTTGGTTCTCTTGGCAACTAA
CCCTTTTTGGATCGIATCTAAGTTGAACCTGTTTACAGTGAAGAACTCTCTCCATTTACTCAGAAATACGTAGGC

10

20

30

40

【化 2 6】

AGATCACAAAGTGTACACACCTGGCTAATGTTAAGCCAGACAGAAACATCAGGCTCATCTCTTGAGAAAGAGGGT
CGCTTATTAAGGATACAACTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGGGTCTCATTGCCAGGTTAGAGTGCAGT
GGTGCAATCATAGCTCAGCTGCAGCCTCAACCACATGGGATTTTTTAAATAAGAAAAAATACCATCTGATAGATA
TGAAGGAGCATTTGGGTCATATAAACAAAAACAGATTCTAAGAGCAGGAAGAAAGAGTACAGTCTCTTTTCAATAA
TTTTTTTTTAAACITGGGAAAGAACACTCACTCTATTTCTATAGACCAGAAAGCAGATAATTTGCCATTATGATT
CCACATGACACTAICTTTGTTTCAGCTGTCACTGAAACAACCTTTGAACACTGTCTATATGTTCTTCCAGCTCTTGAA
CTCTGACCTTTTTATGCCTTAGTTCCACTTTCACAAAAAGGGATTGATGTAATGTGCATTTTCAGAGGAAACGACT
ATAGACATTTAGTGTCAATTATAAATGTTGAGAAGTATGCTGGCAGAAATTAAGCTTAAGATCATATATGGATTCT
TTGTATGGTTTTGAAATTTGCTTAAAGATATATATGATCTCTAAAATGTGTGTGTATATATATATGATGCTCTCTT
ATATATCTATATGTGATATATTTATATATATATAAATCTGTGTATATCACATATATAAATTTGCTGTTAATTTGAA
TTGCCATTACCTCAGTGTCTTAGGGGAAGCCATGCACGTTTGTCTCTTTTTCAGTACCCAGAGTTAAATTAACATAAG
TTATCACAGAAGCTCCCATAGCATTGAGACAAATTTCTCTATACCTGTGACTATTTAAGGTTTTGAAAAACAAAAC
AGAAGCAGGTAAGGAGGAAGTACGCTTTACTATTTGAAGATTTATTAGGTACACATTTAGATTTGTGAACTCACAT
TGCTTAGGATGAAAGGGACTCTTTGAGGATGTCTGCTGTTTGTAGTGAAGTGCCTGTAACAATTACAATTAGCAC
ACACATGAGCACAAATGAAGTGGGTAGTCACTCAGCCAAAATGAATAGAAATAGCCTCTTACCAAAATTTACTTT
GAGTAGCCCTTTGGACTCTGAGCACTGTGCCCAGACCAATATGACTGTAGGTCCAAGTTTGTCAATGACTATGCA
AATGTGCTTTCTTTGCTTTTTACTCTATTGTCACTGTCTATTTACAATGTTGCTATGGTGACACCTTTCCAATATC
CCTGTGCTTTCTTTGGTATCCTCTAAGGGGAAGCTGTAATGAAGTGGCTTTGGCAAAAGAAATCCTCTTGAATTTTT
TTTTTTTTCAATGCTACTGAAAACAGCATGATTTTCTCTTTATGGGAAATGTATAAAGTATGAGTTGGAAATGA
TGGABATTAATCTGTACTGACTTGGGCAAGGAATGTGAATGTTATTCATTCTGTTCCAAACTACCTGMAATATT
CTCTTTCTGTTCTTACTTTTCCAGGAGATAACATCTTAAGGGACACTGAAGCTTTGTGCGTGTGTGACTAGAACACG
TGCTGGGGGGCTCTTGAGCTCATGAGGGAGGGGCTACATGTGCGGTGGGGTGATAACTGTATGCTGGAAACAATGAT
AGGTGGTGACCCIGGAGCACTTACCATGTGACAGGTTGTAAGCTAAGCATGTTGTATGCAATTCCTTCATTGAATG
ACAGCTACCTATATATCTCTCATTTTATAAGATGAGGTAACAGAGCTTCAGAAAGGTTAGACTCAGCTGCTATGG
GTCTGTCTGACTCIGGTGTTCTTCCCTCTTAAAAACTGGGGCACTTTGGAAATGAGATTCCTCGGTGATGAACAGA
AATATTGCTTAGCGGCTGTATTTTTGTATCTGGCAGTTTTTCCCATATTTGAGTCTTAATTTACAAATCGGTATCT
TTACATTACACAAAAGTGTACACAGAAATAGAGTCAATTAATCCAGGGTTGATATCATTAAAGTCAAGTATTTAT
TAAATGTTTTCTTACAATATCTGAGATGATATTGCAAAAGATGTAAGTATTTTAGAAGTTCTCACTTCGTATGTA
GTTGCAGAAACCTCTTTTTGGAGGAGGGATGTTTTCTCTATATATCTTAATTTCTACTTAATATATTTCCACACCT
CTTTGAAGTGTGTAGTAAGAAATGGTAAAATGCAGTACTTCGTCAATTTGGTACAGTTCAATCAATATGCATTAAAG
TGTGATCATATGGTAATAGAAATGTGAAGATCCAATTTCTTTTTCTCCAGAAGGCAGGAAGCTCATATTTGA
TTTCTGTTACTATAAACTATAAAAACGTTTCAAAATGTAGTTTACCCGTAACCATCACCTGCAAGGCTGATATTG
CTCCCCGCCAATTTACGGAGGAGAACTAGAGGCTTTAAGGTTGTAGATAGACCAAGACCACCAAGTAGAGAGT
GGCGGGCTGIGGGGTTGAGCTTTAAAAATCCAGGTTTCAATGACTCCCAGTGTGTTCTAGTAAATCCACTAGAAT
CTGAGTATTTTTCCAATGATTTATGCTCCGCTCTGTGTGAGGCAAGTTTCAATGATTTTTTCAACAAATCAGAAAATCC
TGGGGAAGGCAAACTGTTTCCCCCTCTCTAGGTGCTTTGGAAGTGGCGTTGTGGACCCAGAGATCATCTTTCT
GATCTGACACCTTCTTCACTGCCCCTGGCCAGTGTCTTTTCTGCAAGGCTGGAAGCCCCCTTAGACTGGTCACTGT
CCATCTCTTTTCCGGAGGGAAGATGATCCCAAAGACGACTTTTCTCTCCAGGTGCTGCCATACCCGAGGCGGC
GCCAGGGGTCCCCGCTCGGCGTCCCCGCGAGACAGTCCAGGCCCGGCGGGCTGCGCGGCGCGCTGGGTGCATGAG
GGGGCTGCTCCGAGCGACGGCGGCTGCAGCTGGAGCCAGGCGCTCGCCCGTCCGCGGTTTGGCTCGCCGGGACC
TCGCGCACCCGGCGGAGAGTCCCTTTCGTGGATTGGCAAGCGACGCCACCTGCCCCGAGCTCAACATTTTCTT
TCGCGCTGGCTGCAGCTGACCCGGCGAAGGGAGCCGACCGGGCCCTGGGCTGGAGGTAAACCCCAAGGTGAGTA
AGAACCCGCTCCAAGCTAGGGGAGGCGCGCAGCCCGGTGGCTGCTGCTCCGATCTCGCCCGGCGGCGGCGG
AGGTTTGGGGCGCACCTGGGCGCGGGTGCAAGAAAGGTGCGGGAGGCGGCGGACCGGTTCTTCTGCCCCGCCGCGC
GGGCTTCCGGGGCTGGAGTCTCTTCAGACCCCTGCCGGCGCTGGGTTTCTGGCCGGCTCTCTGTGTGCACTTC
CCGGCAGGAACAAGGGTCCGCCACTTTCCACCCCGGGATCTTGATTTGTCTTTGATTTGAAAAGATATAAATCAA
TAAGATGCTCTTCTTTTGGGGTGCAAGACTCCGAGCCCATCCCCAGCCGGGACGCTGCAGGGTGGGTGTTGG
GCTGTGGGTGGCGGGAAGACAACTTTTACAAAAGTGGGCTGGGCTGGGGGACAACGCTTGGGGCTCTCTGATCC
TGAGGAGGAGGATCTCGGCTTGGGGCAGCGTAGGGGAAGTCCGACCGTCAGCCAGGTGCGCCCCGGGGCTGACGA
TGCCCTCACGGAGGTGGGGAGCGTGTAAAGGCCGTACAAATCGCGCTTAACCTTTGGGGCCAACAACTGTCAAAAT
CTGGAATCCAGCCCCCTCCCTTTCCCTGAAGTGGGGAAGAAGGTGAAAACCTTTCAAGTTTTCTTTGATTTGCCCC
TTCCACCTTTCAGACCCCTGCTGGGAGGGTAAAGGCGCCAGCCCTGGTGCCTGGCAAGTACCAGAGACTCTAAAT
CTCTCGGGATCCCCCCCCCTCGCGCTCTTTCTGACCCCTCTCCCTAACCTCCCCACAGAGATCTCTCTACGCAG
CCGACGTAGATCGTGGCGAATGGCTTTTTGTTTTCTCCGCTTTCCCTATTGTTTGCCTTTCCAAACATCTGGCGG

10

20

30

40

【化 27】

GGCTTGGGGAGAGAAGGAAGCCCCCTCTGGTCCCCCTCCCCGGGCCCCACGCCAGCTCCGGCAGGGGATCCAGCT
 GGGAAAGTGGAGGAGCCCCGACCCAGCGAGGCCCGCCCCACCCCGCCCTTGTGGTTAGAGGGCGGAGGGAAAGTGT
 TTCCCTTCCCCGCCCTCCGCTGCTGCTTGTGGTGGTGGGCGCAITTTCTCAGATCTCAGCCCAGGGCGGCCGCAAGG
 CTCAAAATCCGAGAAGGTGCTGCTTTTCGAGACAGTGGAAAGCGGTTCGGCCCCAATCCAGAGCGTCCAGTGGTGG
 TTCCAGAGGATTTCAATCTCTAGCCAAAGGCGTTGGGGCTGGGCCGCTGCTAGGGCAGTGGGAGGGGATCCGGGC
 ACCTTTGGTAGCCGGAAGCTGAGATTCTGGGGTCCACAAGTTTCCAAGGGCGGGAGGGCAGGGCTAGTCCGCAAA
 AAGAGAACGAAGATGCAAAATAACGAGGAAGCCTTATGACGTTGCTGGAAATAGTAGTGTGGTGGTTCACTCCGG
 AATGAACGTGGAGTTCTGGCTTTGAGTACCGCTCCAAGTTTAAATCCCAAGTCCCTTTCTTCATTGTAGAAAAA
 GAGGACTCAGACGACCAACACAGATAACGGCTAGAGCACAGTTTCTGCTTCCACGTCCAGAGAACAAAGTGGCTT
 AGGATGGTCCCCGAGTTCCTCTGTGGGTGCGCTTGTGGGTTCAGGCGGCCCTGTTTCCCTGCACAAAGTCAGATG
 CTTACACATTGTGTTCAATTCTTAGTGTGGATTATTGATTAAAGAACTGGGGCAAAAGCAAAGTAGCTACTCTGAG
 AAGTCAGGGTCCCCAGATGGTGGCCAGCGAGTTGTCTTGGCTCTGAGGGGAGGGCTGACTGAGACTGTGCACTGT
 TAGAACCTATGCTACCCCATAGCCTTGCAGTTGACTTGTGTTGCCAGCTTTTCTGTGGGATCCCCAATGAGTC
 CCTCTTCCAGGAAGCTCAATTACACTTTTGTATTCCTCTCAACCCAGGGGAAGAAAGAGGCTTCTGTAGGAACA
 TTATGATCTATGTAACCACTCAGACATTGTGAGTGGATACCAGAAGCTTGGCTCTGCACAGCTCTGAGACTTTTC
 CCTTTGCGAAGCTCAACAGAAGCTTTTGTAGTTTCCATTAAACATAAAAGAGTGAAGTGTGACTGCTAAGCCAGGAATGCGA
 CACATAGAGCACTTTCTCTAGTGTATTTCTGGGTATTATATCTCTTTACCTTCCCAACGGTGGAAACAGGAAAAAG
 AAAAAAGCAACATCTTTGAAGTACTGCAAGGCACCTTTACAAACATTTCATTATGAAAATGATCCCCAAGGAAG
 ATTCTTTGAAATTTAGCAGCAGCAACCCAGAAGCAACAAAAAGACCAAGTACTCAAGAAGTACCCAAAGGC
 ATCATTAAACAAAATAAAAGAGCATTCTTGTCTTGGCTTACCCCGCTAAGGAACACAGGGTAATTATAGTGAAG
 TTAAGCTTG (配列番号63)

10

【0101】

いくつかの実施形態において、ヒトC9ORF72遺伝子およびフランキング配列は、
 たとえば、上の配列と少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、ま
 たは99%同一である配列を含む。本明細書において使用される「パーセント配列同一性」
 または「パーセント同一性」または「%同一性」は、同一性分率に100を掛けたもの
 である。基準配列と最適にアラインされた配列の「同一性分率」は、最適アラインメント
 におけるヌクレオチド一致数を、基準配列のヌクレオチド総数、たとえば基準配列全体の
 全長のヌクレオチド総数で割ったものである。

20

【0102】

いくつかの実施形態において、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート [たとえば、
 配列番号63における(GGGGCC)_n] の数は、300~800、300~700、
 400~600、または500~600である。いくつかの実施形態において、GGGG 30
 CCヘキサヌクレオチドリピート [たとえば、配列番号63における(GGGGCC)_n
] の数は、500~600である。いくつかの実施形態において、GGGGCCヘキサヌ
 クレオチドリピート [たとえば、配列番号63における(GGGGCC)_n] の数は、3
 00、400、500、600、700または800である。いくつかの実施形態におい
 て、GGGGCCヘキサヌクレオチドリピート [たとえば、配列番号63における(GG
 GGGC)_n] の数は、500を超える。いくつかの実施形態において、トランスジェニ
 ックマウスは、FVB、balb-cまたはC57B/6系統マウスである。いくつかの
 実施形態において、トランスジェニックマウスは、FVB系統マウスである。いくつか
 の実施形態において、マウスは、ALSまたはFTDの処置のための処置法、たとえば本明
 細書に記載の処置法または候補治療薬をスクリーニングするために使用できる。

40

【0103】

本明細書に記載のトランスジェニックマウスは、当技術分野において知られているかま
 たは本明細書、たとえば実施例4に記載されている任意の方法を使用して製造できる(た
 とえば、PCT公開番号WO2001010199およびWO2013022715、米
 国公開番号US20110113496および20060031954も参照のこと、こ
 れら各文献は本明細書に参照により組み込まれる)。たとえば、本明細書に記載のトラン
 スジェニックマウスは、導入遺伝子(たとえば、適宜フランキング配列を有する、ヒトC
 9ORF72遺伝子)をマウスの生殖系列に導入することにより製造できる。様々な発生
 段階の胚性標的細胞を、導入遺伝子を導入するために使用できる。胚性標的細胞の発生段
 階に応じて、異なる方法が使用される。本開示を実施するために使用される任意の動物の

50

特定の系統は、概して良好な健康状態、良好な胚産生、胚における良好な前核可視性、および良好な生殖適応度について選択される。加えて、ハプロタイプは重要な因子である。たとえば、トランスジェニックマウスが製造されるとき、C57BL/6またはFVB系統等の系統が使用されることが多い（Jackson Laboratory、Bar Harbor、Me.）。系統はそれ自体トランスジェニックであってもよく、且つ／またはノックアウト（たとえば、部分的または完全に抑制されている1つまたは複数の遺伝子を有する動物から得られる）であってもよい。導入遺伝子コンストラクトは、単一の段階の胚に導入されてもよい。接合体が、マイクロインジェクションの好ましい標的である。遺伝子導入のための標的としての接合体の使用は、ほとんどの場合注入されたDNAが第一卵割の前に宿主遺伝子に組み込まれる点において、大きな利点を有する [Brinster et al. (1985) PNAS 82:4438-4442]。通常は、受精胚は、前核が現れるまで好適な培地においてインキュベートされる。この頃には、導入遺伝子を含むヌクレオチド配列は、下に記載するとおり雌性または雄性前核導入されている。いくつかの種、たとえばマウスにおいて、雄性前核が好ましい。外来性遺伝物質が、卵核または接合体雌性前核により処理される前に、接合体の雄性DNA相補体に付加されることが最も好ましい。卵核または雌性前核は、おそらくは雄性DNAのプロタミンをヒストンに置き換えることにより、雄性DNA相補体に影響を及ぼす分子を放出し、そのことにより雌性および雄性DNA相補体の結合を促進し、二倍体接合体を形成すると考えられている。したがって、外来性遺伝物質は、それが雌性前核の影響を受ける前に、DNAの雄性相補体またはDNAの任意の他の相補体に付加されるべきである。たとえば、外来性遺伝物質は、雄性前核の形成後にできるだけ早く初期雄性前核に付加され、これは、雄性および雌性前核が十分に分離し、両方が細胞膜に近接して位置するときである。

【0104】

あるいは、外来性遺伝物質は、脱凝縮を受けるよう誘導された後の精子核に付加されうる。次に、外来性遺伝物質を含有する精子が卵子に付加されうるか、または脱凝縮された精子が卵子に付加され、その後できるだけ早く導入遺伝子コンストラクトが付加されうる。外来性遺伝物質の核遺伝物質への付加を可能にする任意の手法を、それが細胞、核膜、または他の存在する細胞性もしくは遺伝的構造を破壊しない限り、利用できる。胚への導入遺伝子ヌクレオチド配列の導入は、当技術分野において知られている任意の手段、たとえばマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクションにより達成されてもよい。外来性遺伝物質は、優先的には、マイクロインジェクションにより核遺伝物質内に挿入される。細胞および細胞構造のマイクロインジェクションは、当技術分野において知られており、使用されている。マウスにおいて、雄性前核は、直径およそ20マイクロメートルのサイズに到達し、これは、1~2 p lのDNA溶液の再現性のある注入を可能にする。胚への導入遺伝子ヌクレオチド配列の導入後、胚は、インビトロで様々な時間インキュベートされてもよく、または代理宿主内に再移入されてもよく、またはその両方でもよい。成熟するまでのインビトロインキュベーションは、本発明の範囲内である。常法の1つは、種に応じて、胚をインビトロで約1~7日間インキュベートするものであり、次にそれらを代理宿主に再移入する。

【0105】

代理宿主のトランスジェニック仔は、任意の好適な方法により、導入遺伝子の存在および／または発現についてスクリーニングされてもよい。スクリーニングは多くの場合、導入遺伝子の少なくとも一部と相補的なプローブを使用したサザンブロットまたはノーザンブロット解析により達成される。導入遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体を使用したウエスタンブロット解析が、導入遺伝子産物の存在のスクリーニングの代替的または追加的方法として用いられてもよい。典型的には、DNAは尾部組織から調製され、サザン解析またはPCRにより導入遺伝子について解析される。あるいは、導入遺伝子を最高レベルで発現すると考えられる組織または細胞が、導入遺伝子の存在および発現について、サザン解析またはPCRを使用して試験されるが、任意の組織または細胞タイプをこの解析について使用できる。

【0106】

導入遺伝子の存在を評価するための代替または追加の方法には、好適な生化学的アッセイ、たとえば酵素および／または免疫学的アッセイ、特定のマーカーまたは酵素活性のための組織染色、フローサイトメトリー解析等が含まれるが、これに限られるものではない。血液の解析もまた、血中の導入遺伝子産物の存在を検出するため、ならびに導入遺伝子が様々なタイプの血液細胞および他の血液成分のレベルに与える影響を評価するために有用であってもよい。

【0107】

トランスジェニック動物の後代は、トランスジェニック動物を好適なパートナーと交配させることにより、またはトランスジェニック動物から得られる卵および／もしくは精子の体外受精により得られてもよい。パートナーとの交配が実施される場合、パートナーは、トランスジェニックおよび／またはノックアウトであってもなくてもよく、トランスジェニックである場合には、それは同じかもしくは異なる導入遺伝子、または両方を含もっている。あるいは、パートナーは親系統であってもよい。体外受精が使用される場合、受精胚は、代理宿主内に移入されるかもしくはインビトロでインキュベートされるか、またはその両方であってもよい。いずれかの方法を使用して、後代が、上述の方法、または他の適切な方法を使用して導入遺伝子の存在について評価されてもよい。

【0108】

本開示の態様はまた、配列番号63を含むポリヌクレオチド、たとえば細菌人工染色体(BAC)ベクターに関する。

【0109】

さらなる詳述なしに、当業者は上の記載に基づいて、本開示をその最大限の範囲まで利用すると考えられる。したがって、以下の特定の実施形態は、単なる例示的なものとして解釈されるべきであり、本開示の他の部分をいかなる仕方であっても限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されるすべての出版物が、本明細書において参照される目的または主題のため、参照により組み込まれる。

【実施例1】

【0110】

CMVプロモーター、GGGGCCの4、30、60、または120リピートのいずれかを含有する(GGGGCC)伸長モチーフ、およびHA、FLAG、またはMYCタグを含有するコンストラクトを、細胞にトランスフェクトした(図2A)。ポリ(GR)およびポリ(GP)タンパク質が、GGGGCCの30、60または120リピートを含有するコンストラクトをトランスフェクトした細胞内で生成されることが、ウェスタンブロットにより示された(図2B)。GGGGCCの30、60または120リピートを含有するコンストラクトをトランスフェクトした細胞内でGP-flag、GR-HA、およびGA-MYCタンパク質が発現することが、細胞の免疫蛍光を使用してさらに示された(図3)。これらの結果は、GGGGCCリピート領域が、AUG開始コドンから独立に翻訳を開始可能であること(リピート関連非ATG(RAN)翻訳)、ならびに、ポリ(GP)、ポリ(GR)、およびポリ(GA)リピートタンパク質が生成されることを示す。

【0111】

ポリ(GR)配列またはポリ(GR)リピートタンパク質のC末端に対する抗体が生成された。これらの抗体を使用した蛍光染色は、これらの抗体がポリ(GR)リピートタンパク質を検出可能であることを示した(図4)。

【0112】

ポリ(GP)配列およびポリ(GA)リピートタンパク質のC末端に対する抗体がさらに生成された。次に、抗ポリ(GR)、抗ポリ(GP)、および抗ポリ(GA)C末端抗体を、C9ORF72 ALSを有する患者または対照からの脳組織の断面を染色するために使用した(図5)。

【0113】

次に、C9ORF72の転写物が、センスおよびアンチセンスの両方の方向に生成されることが仮定された（図1を参照のこと）。これらのアンチセンス転写物がまた、アンチセンス転写物に存在する5'-GGCCCC-3'リピートからさらなるリピートタンパク質を生成するRAN翻訳を受けうることがさらに仮定された。図6に示すとおり、ポリ(PA)およびポリ(PR)タンパク質の両方が、C9ORF72 ALSを有する患者からの脳組織試料において検出可能だったが、対照においては検出可能でなかった。これらの結果は、ジアミノ酸リピート含有タンパク質、たとえばRANタンパク質が、C9ORF72遺伝子座から生成するセンスおよびアンチセンス転写物の両方から生成することを示す。

【0114】

図7は、抗GP抗体(GP)で検出された凝集体のおよそ20%がまた、センスGPタンパク質の固有のC末端に対する抗体(GP-C)と共局在化することを示す。罹患した脳に見られるアンチセンス転写物の増加レベルと一貫して、これらの共局在データは、GPジペプチド凝集体の約80%超がC9ORF72アンチセンス転写物から発現することを示唆する。

【0115】

加えて、アンチセンス転写物が、対照と比較してALSを有する対象において劇的に上昇したことが見出された（図12）。アンチセンス転写物レベルを検出するためのqPCRアッセイのためのプライマーが、下の表に示される。

【0116】

【表5】

ORF F2	AGTCGCTAGAGGCGAAAGC (配列番号 36)	c9orf72 アンチセンス orf 中のプライマー
ORF R2	CGAGTGGGTGAGTGAGGAG (配列番号 37)	
ORF F2+IK	CGACTGGAGCACGAGGACACT GAAGTCGCTAGAGGCGAAAGC (配列番号 38)	
ORF R2+Ik	CGACTGGAGCACGAGGACACT GACGAGTGGGTGAGTGAGGAG (配列番号 39)	RT 第1鎖用
リンカー	CGACTGGAGCACGAGGACACT GA (配列番号 40)	ORF F1 および F2 を用いた RT-pcr 用

【0117】

さらに、ジアミノ酸リピート含有タンパク質は、ALSを有する対象の血中（血清および血漿を含む）および脳に存在することが見出された（図9および図10）が、対照対象には見出されなかった。

【実施例2】

【0118】

本開示のいくつかの態様によれば、血中および脳脊髄液(CSF)中のジアミノ酸リピート含有タンパク質（たとえばRANタンパク質）蓄積は、C9ORF72 ALS/FTDに実質的に寄与し、プラズマフェレーシスおよび骨髄移植は疾患の進行を止めるであろう。本開示のいくつかの態様によれば、血中および循環CSF中のジアミノ酸リピート

含有タンパク質蓄積は、脳実質に浸潤し、タンパク質蓄積、神経炎症性変化、CNS機能障害および神経細胞死をもたらす。本開示の態様は、以下に部分的に基づく。第一に、血液脳関門(BBB)障害がALS患者における疾患の初期の特徴であり(4、5)、より高率のALSおよび他の神経疾患が、外傷性脳損傷を有する患者に見出される(6)。いくつかの実施形態において、理論に束縛されることは望まないが、ALSは部分的には、ALS/FTDを促進する免疫細胞および他の有害な物質のCNS侵入を可能にするBBB破壊により引き起こされる。第二に、本明細書に記載のとおり、ジアミノ酸リピート含有タンパク質が、ALS患者血液試料において蓄積することが見出された(図8および図9)。

【0119】

プラズマフェレーシスおよび骨髄移植が、過去にALSのための治療戦略として試験されてきたとはいえ、これらのケースのいずれがC9ORF72陽性であったか、または処置が有効であるのに十分な程度早期であったかは明らかではない。したがって、いくつかの実施形態において、ALS処置(たとえば、プラズマフェレーシスまたはBMT)は、対象の血中に正常レベルを超える1つまたは複数のジアミノ酸リピート含有タンパク質が検出されるときに開始される。

【0120】

C9ORF72 ALS患者組織および血液におけるジアミノ酸リピート含有タンパク質蓄積に関して本明細書において提示されたデータは、血中(およびおそらくまたCSF中)ジアミノ酸リピート含有タンパク質の量の減少が、C9ORF72 ALS患者においてALSの処置に役立ちうることを示す。本開示のいくつかの態様によれば、減少はたとえば、プラズマフェレーシスまたは骨髄移植を使用して達成されてもよい。

【0121】

方法

C9ORF72ファミリー(CNSA-1)からの遺伝子保持者、および、運動神経細胞疾患もしくは前頭側頭認知機能障害または両方の初期徴候を有する遺伝子陽性患者を含む通院患者について、詳細な評価が実施される。ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現は、CNSAファミリー試料および医院において回収された追加試料におけるリピート長と相関する。血中のジアミノ酸リピート含有タンパク質発現は、長期的に回収された試料において決定され、疾患発症および臨床的重症度と相関する。これらの方法は、C9ORF72陽性拡大研究対象におけるジアミノ酸リピート含有タンパク質発現を特徴付け、ジアミノ酸リピート含有タンパク質発現が一生を通じて生じるかまたは加齢とともに増加するかどうか、ならびに、ジアミノ酸リピート含有タンパク質レベルが、疾患重症度と定量的に相関するかどうかを決定することが予測される。

【0122】

プラズマフェレーシスは、血中およびCSF中のより低いジアミノ酸リピート含有タンパク質の量が、疾患の徴候を止めるかどうかを決定するために試験される。プラズマフェレーシスは、疾患の初期徴候を有する5人のC9ORF72陽性の個人に対して実施される。各回2リットルの正常ヒトアルブミンとの交換を伴う6回のプラズマフェレーシスを、2週間にわたり実施し、次の6カ月間、毎週1回のプラズマフェレーシスを実施する。この研究は、必要であれば延長できる。一次的な結果尺度は、Appel ALS Rating Scale(AALRS)である。神経学的検査、発話評価、神経心理学的試験、ALS Functional Rating Scale(ALSFRS)、EMG、および外側広筋の免疫組織病理学的評価のための針筋生検を含む臨床評価を、疾患進行を評価するために処置期間の直前および直後に実施する。RAN翻訳およびATG翻訳産物の血清の濃度およびCSFレベルを評価するため、6カ月の処置期間の前後に(または適用可能であれば、延長期間後にも)、静脈穿刺および腰椎穿刺もまた実施する。

【0123】

モデル動物における骨髄移植が、血中および脳内のBMTがジアミノ酸リピート含有タンパク質蓄積を予防するかどうかを決定するために試験される。動物の第1のコホートに

10

20

30

40

50

において、脳内のタンパク質凝集体の量が減少するかどうかを試験するため、RANT陽性マウスからの骨髄が除去され、野生型ドナー骨髄と置き換えられる。実験の並行セットにおいて、CNSタンパク質蓄積が造血細胞においてのみ導入遺伝子を発現する動物において生じるかどうかを試験するため、RANT陰性動物に、RANT陽性骨髄が移植される。処置動物の両方の群が、行動的、機能的および神経病理学的評価の組合せを使用して、野生型および未処置RANT対照動物と比較される。

【0124】

RAN翻訳モデルマウスが生成された。6つの終止コドン（各リーディングフレームに2つ）をCAG伸長突然変異のすぐ上流に含有し、各リーディングフレームにおける3つの別個のエピトープタグが続くコンストラクトを使用して、トランスジェニックマウスが生成された（図10）。CAGリピートは、ポリGln RANタンパク質を生成し、これは以前はヒトにおける疾患、たとえば脆弱X染色体症候群と関連付けられていた。RANTモデルマウスはポリGln RANタンパク質をもたらし、これは、脳脊髄液に曝露されている脳内の軟膜表面下で高レベルに局在化することが見出された（図11）。このRANTモデルマウスは、実施例2に要約された研究において使用される。したがって、ポリアミノ酸リピート含有タンパク質（たとえば、モノまたはジアミノ酸リピート含有タンパク質）の検出は、ポリアミノ酸リピート含有タンパク質と関連付けられる脳障害の危険性の指標でありうる。したがって、本明細書に記載の方法は、他の神経疾患を検出または処置するために使用できる。

【実施例3】

【0125】

イントロダクション

これまで同定された家族性FTDおよびALSの最も一般的な原因である、ALS/FTDの染色体9p21関連形態は、染色体9オープンリーディングフレーム72（C9ORF72）のイントロン1における伸長GGGGCC（ G_4C_2 ）ヘキサヌクレオチドリピートにより引き起こされる（1、2）。C9ORF72突然変異は、家族性ALS症例の40%および散発性ALS症例の7%ならびに家族性FTD患者の21%および散発性FTD患者の5%に見出される（3）。C9ORF72伸長の発見は、かなりの興奮をもたらした。なぜならそれは、ALSおよびFTDを、マイクロサテライト伸長突然変異により引き起こされる大きな疾患群と関連付けるからである（4）。

【0126】

従来、予測されるコーディングおよび非コーディング領域に位置するマイクロサテライト伸長突然変異は、タンパク質機能獲得もしくは喪失またはRNA機能獲得機構により疾患を引き起こすものと考えられていた（4）。タンパク質機能喪失は、C9ORF72起因ALS/FTDの基礎をなすと提案されてきた。なぜなら、伸長突然変異が、変異体1転写物のレベルの減少およびC9ORF72タンパク質発現の潜在的減少をもたらすからである（1、2）。加えて、C9ORF72 G_4C_2 伸長突然変異はイントロンに位置するので、C9関連ALS-FTDは、 G_4C_2 伸長RNAが核RNA凝集における重要な細胞因子を隔離する毒性RNA機能獲得機構の結果であるという仮説を、複数の研究が追求してきた。複数の G_4C_2 RNA結合タンパク質が同定されてきたが、これまでのところ、これらの候補のいずれかが、内在性伸長転写物に直接結合するかまたは患者細胞もしくは生検組織内で観察されるRNA凝集と共局在化することは実証されていない（5～8）。

【0127】

この機構において、ヘアピン形成マイクロサテライト伸長転写物が、AUG開始コドンなしに1つまたは複数のリーディングフレームにおいてタンパク質を発現させる（9）。近年様々な名称がこれらのRAN翻訳タンパク質に帰されてきた（たとえば、ホモポリマー性、ジペプチド、RANT）一方で、混乱を防止するため、ATG開始コドンの非存在下でマイクロサテライト伸長突然変異を通じて発現するすべてのタンパク質を、RANタンパク質と呼ぶことが提案される。なぜなら、RAN翻訳を受ける追加の伸長突然変異が

同定されるからである。

【0128】

ここで、GGCCCC (G₂C₄) 伸長を含有するC9ORF72 ALS/FTD アンチセンス転写物が、核の、そしてまれに細胞質の凝集として、患者の脳内に蓄積したことが示される。加えて、リピートモチーフおよび特異C末端領域の両方に対する新規な一群の抗体が開発され、センスおよびアンチセンスRANタンパク質の両方が、C9ORF72患者CNS生検組織に蓄積することが実証された。C9ORF72患者脳内のアンチセンスG₂C₄RNA凝集および3つの新規アンチセンスRANタンパク質の発見は、双方向的転写およびRAN翻訳が、C9ORF72 ALS/FTDの基本的な病理学的特徴であることを示唆する。

10

【0129】

結果

C9ORF72伸長患者におけるアンチセンスRNA凝集

アンチセンス (AS) C9ORF72伸長転写物がAS G₂C₄RNA凝集を形成し、RAN翻訳によりまたは短いASオープンリーディングフレーム (AS-ORF) からASタンパク質を発現させるという仮説を試験するため、一連の実験が実施された。まず、イントロン1b、アンチセンスG₂C₄伸長の5'、およびエクソン1aにおけるセンスおよびアンチセンス転写物の発現を比較するために、リンカー (linker) 鎖特異的RT-PCR方略を使用して、C9ORF72アンチセンス転写物が発現することが確認された。イントロン1bにおけるアンチセンス鎖について、RT反応のためにLK-ASORF-RプライマーならびにアンチセンスcDNAを特異的に増幅するPCRのためにASORF-FおよびLKを使用して鎖特異的RT-PCRを実施した (図12A)。同様の方略を、イントロン1bの同じ領域からのセンス転写物ならびにエクソン1aにおけるセンスおよびアンチセンス転写物を増幅するために使用した。イントロン1bアンチセンス転写物が、C9 (+) ALS/FTD患者からの前頭皮質においてRT-PCRにより検出されたが、C9 (-) ALS/FTDまたは正常対照からは検出されず (図12B)、qRT-PCRは、これらの転写物が6つのC9 (+) ALS/FTD症例の間で劇的に増加することを示す (図12C)。対照的に、イントロン1bセンス転写物は、前頭皮質においてRT-PCRにより検出されなかった (図12B)。血中では、イントロン1bセンスおよびアンチセンス転写物の両方が検出可能であり、イントロン1bアンチセンス転写物の劇的なC9 (+) 上昇は観察されなかった。5' RACEは、イントロン1b AS転写がG₂C₄リピートの251~455塩基対 (bp) 上流の様々な部位で開始することを示した (図12A、図19B)。対照的に、G₂C₄リピートの40および90bp 3'に位置する3' GSP1または3' GSP2プライマーを使用した3' RACEは、転写物を検出しなかった。これらのデータは、AS転写物の3'末端が、アンチセンスG₂C₄リピートの170bp 3'に位置するセンスエクソン1a領域と重ならないことを示した。この結果と一致して、センス転写物は、エクソン1aと重なるプライマーを使用した鎖特異的リンカーRT-PCRにより検出されたが、アンチセンス転写物は検出されなかった (図12B)。アンチセンス転写物がG₂C₄リピート伸長を含むかどうかを決定するため、Cy3標識化 (G4C2) 4プローブを使用してRNA蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) を実施し、推定アンチセンスG₂C₄RNA凝集を検出する。結果は、核 (図12D) の、そしてまれに細胞質 (図19C) のG₂C₄RNA凝集が、C9 (+) ALS前頭皮質において蓄積するが、C9 (-) ALS前頭皮質には蓄積しないことを示した。細胞質内の凝集の検出は、アンチセンス伸長転写物が、タンパク質翻訳機構と同じ細胞内コンパートメントに見出されうることを示したのであり、おそらくそこでRAN翻訳は生じる。末梢組織におけるRNA凝集は、疾患のバイオマーカーを提供しうるので、末梢血白血球 (PBL) を検査し、C9 (+) PBLにおいてセンスおよびアンチセンスRNA凝集の両方が検出されたが、C9 (-) PBLにおいては検出されなかった (図12D、図19D)。AS凝集を検出するCy3-G4C2プローブからのRNA-FISHシグナルが、過度の非標識化G4C2オリゴと競

20

30

40

50

合しうるものであり、これらの凝集がDNase Iに耐性でありRNase I消化に感受性であることが発見された（図19E、F）。まとめると、これはC9ORF72アンチセンス転写物がC9（+）ALSにおいて前頭皮質内で上昇するが、C9（-）ALSまたは正常対照においては上昇しないことを示す。C9（+）前頭皮質において、核の、そしてまれに細胞質のRNA凝集において、G₂C₄伸長突然変異を含有するアンチセンス転写物が発現し、蓄積することもまた初めて示された。加えて、センスおよびアンチセンス凝集が血中に蓄積し、容易にアクセスできる組織においてC9ORF72 ALS/FTDの潜在的バイオマーカーを提供することが示された。

【0130】

インビトロでのGGCCCCリピー伸長のRAN翻訳

10

アンチセンスG₂C₄伸長がRAN翻訳を受けるかどうかを試験するため、40または70リピーのG₂C₄伸長およびすべてのリーディングフレームにおけるタンパク質発現[たとえば、3つのフレームにおいて翻訳されたG₂C₄EXP転写物は、Gly-P（GP）、Pro-Ala（PA）およびPro-Arg（PR）RANタンパク質をもたらす]をモニタリングするための3つの異なるC末端エピトープ8タグの上流に6X STOPコドンカセット（各フレームに2つの停止）を挿入することにより、ATG開始コドンを欠いている、三重タグ化G₂C₄ミニ遺伝子、（G₂C₄）EXP-3Tを生成した（図13A）。免疫ブロッティングは、2つのエピトープタグ化RANタンパク質、PR-MycおよびGP-Flagを検出したが、PAHAは検出しなかった（図13B）。（PR）40-および（PR）70-3xMycタンパク質は、それぞれ、およそ20および27kDaの予測サイズで移動した。対照的に、（GP）40-および（GP）70-3xFlagタンパク質は、予測サイズ（10～15kDa）よりも実質的に高く、それぞれ、50および75kDaで移動した（図13B）。このプロット上のかすかな低い分子量バンドは、細菌培養中に見られるリピー伸縮または翻訳開始位置の差異により生じうる。免疫蛍光（IF）は、アンチセンスRANタンパク質が、すべての3つのリーディングフレームにおいて発現することを示した（図13C）。ウエスタンブロッティングでは検出されなかったIFによるPA-HAの検出は、これらコンストラクトからRAN PA-HAを発現する細胞のより低い頻度により引き起こされうる。加えて、組換えGP-flagおよびPA-HAタンパク質は、細胞質に局在していた一方で、PR-Mycタンパク質は、核および細胞質の両方に分布していた。これらの局在の差異は、このエピトープタグ化コンストラクトにおいて見出されるリピーモチーフまたはC末端フランキング配列の異なる特性により生じうる。一連の追加実験においてまた、30、60および120リピーを含有するセンスG₄C₂伸長コンストラクトが、GP-Flag、GR-HAおよびGA-Myc RANタンパク質を発現させることが示された（図20）。要約すると、これらのデータは、組換えG₂C₄およびG₄C₂伸長転写物が、6つのすべてのリーディングフレームにおいてRANタンパク質を発現させることを示した。

20

30

【0131】

RANタンパク質を検出するための二重免疫学的方略

40

アミノ酸リピーが様々な異なるタンパク質に見出されうるので、二重免疫学的方略を使用し、本明細書に記載の予測されるリピーモチーフまたはそれらに対応する固有のC末端領域を認識する抗体を開発した。8つの推定C9ORF72 RANタンパク質を示す概略図を、図13Dおよび図21に示す。予測されるタンパク質には、6つの推定RANタンパク質および追加のATG開始N末端を有する2つの推定タンパク質が含まれる。固有のC末端領域は、6つの予測されるリーディングフレームのうちの5つにおいて予測される。インビボでのこれらのタンパク質の蓄積について試験するため、予測されるリピーモチーフまたは利用可能な対応するC末端領域に対する一連のポリクローナル抗体を開発した（図13D、図21）。推定アンチセンスタンパク質[ウサギα-PA、α-PA-CT、α-PR、α-PR-CT、α-GP、α-GP-CT（センス）、およびマウスα-GP]について試験する抗体を生成し、それらの特異性が、ウエスタンブロット

50

および I F 検出により、エピトープタグ化組換えタンパク質を発現するコンストラクトをトランスフェクトした細胞内で実証された (図 1 3 E、図 2 2)。センス方向に発現するリピートおよび C 末端領域を検出する追加の抗体を、図 2 3 に特徴付ける。

【0132】

アンチセンス G_2C_4 RAN タンパク質は脳内に蓄積する

複数のアプローチを、新規アンチセンス (AS) タンパク質が C9ORF72 伸長陽性生検組織において発現するかどうかを決定するために使用した。凝集タンパク質がヒト脳から単離することが困難であるという障害を克服するため、冷凍 C9 (+) および C9 (-) ALS 前頭皮質剖検試料上で連続的タンパク質抽出プロトコル (sequential protein extraction protocol) (23) を使用した。アンチセンス PA および PR タンパク質を、1% Triton-X100 不溶性物質、2% SDS 可溶性抽出物、免疫ドットブロット上の α -PA、 α -PA-CT、 α -PR、 α -PR-CT で、C9 (+) ALS 患者のサブセットから検出したが、C9 (-) ALS 患者からは検出しなかった (図 1 4 A)。C9 (+) ALS / FTD 前頭皮質におけるセンス RAN タンパク質 (GP、GR、GA) 10 蓄積についての証拠を示す追加の免疫ドットブロットを図 2 4 に示す。 α -PA、 α -PR および α -GP 抗体もまた、8% SDS を含有する試料緩衝液におけるペレットの再懸濁後に、C9 (+) ALS 前頭皮質試料からの 2% SDS 不溶性画分における高分子量スミアを検出した (23) (図 3 B)。1 つまたは複数のバンドとして移動する組換えタンパク質について移動パターンの差異が見られ (図 1 3 B)、患者組織抽出物において観察されたスミア (図 1 4 B) は、患者試料および高度に不溶性の凝集体からのそれらの抽出物における、はるかに長いリピート領域による RAN タンパク質における差異を反映する。免疫組織化学 (IHC) が、次に、タンパク凝集体が、リピートモチーフに対する抗体 (α -PA、 α -PR、 α -GP) を、PA および PR リピート領域を越える予測される C 末端配列に対する抗体 (α -PA-CT および α -PR-CT) とともに使用して、C9 (+) ALS / FTD 剖検組織からの海馬神経細胞の周核体において検出可能であるが、C9 (-) ALS 患者または対照対象において検出可能でないことを示すために使用された (図 1 4 C、図 2 5)。GP リピートモチーフに対する抗体を使用する以前の研究は、センス鎖から発現すると仮定される凝集体を検出した (10、11)。GP リピート含有タンパク質が、センスおよびアンチセンス転写物の両方から発現すると予測されることが注目される (図 1 3 D)。センス方向に、予測される RAN GP タンパク質は、固有の C 末端 (CT) 配列を含有する。対照的に、アンチセンス GP タンパク質は、リピートの直後に停止コドンを含む。センス GP RAN タンパク質をアンチセンス GP タンパク質と識別するため、ウサギ α -GP-CT をセンス GP タンパク質の CT 領域を検出するために、マウス α -GP をセンスおよびアンチセンス GP 伸長タンパク質の両方を検出するために使用して、C9 (+) ヒト海馬剖検切片上で二重標識 I F 実験を実施した。二重標識化は、2 つのタイプの封入体を示した。すなわち、a) マウス α -GP およびウサギ α -GP-CT センスで二重標識化された推定センス封入体ならびに、b) マウス α -GP で単一標識化された推定アンチセンス封入体 (図 1 4 D)。およそ 18% の封入体が、二重標識化でセンスパターンを示し、82% の封入体が、アンチセンスパターンを示し、 α -GP について陽性、 α -GP-CT センスについて陰性であった (図 1 4 E、F)。これらのデータは、リピートおよび C 末端抗体の両方を有するタンパク凝集体を特徴付けることの重要性を示した。まとめると、これらの結果は、不溶性、凝集体形成アンチセンス RAN タンパク質が、3 つのすべてのアンチセンスリーディングフレームから発現することを示す。

【0133】

G_2C_4 伸長および RAN タンパク質は、細胞に対して毒性を有する

RAN 翻訳により発現するアンチセンス GP および PR RAN タンパク質に加えて、2 つのアンチセンスリーディングフレームが、ATG 開始 GP および PR タンパク質 (M-GPAS および M-PRAS) の両方をもたらさう上流 ATG 開始コドンを含む (図 1 3 D、図 2 1)。ATG 開始コドンの存在が、RAN 翻訳が 3 つすべてのリーディン

10

20

30

40

50

グフレームにおいて生じることを阻害しないことが示された(9)。したがって、アンチセンスGPおよびPRタンパク質は、AUG開始および／またはRAN翻訳の両方により発現してもよい。ATG開始コドンがG₂C₄伸長に関してRANタンパク質発現に対して有する効果を探究するため、ATG開始コドンをG₂C₄リピートの前に置くことにより、追加のミニ遺伝子コンストラクトを生成した(図14G)。PRフレームを、解析のために選択した。なぜなら、ATG開始コドンはこのリーディングフレームにおいて天然で生じるからである。ウエスタンブロッティングは、(+)ATG-PR-3TをトランスフェクトしたHEK293T細胞が、(-)ATG-PR-3Tトランスフェクト細胞と比較して、実質的に高いレベルのPRタンパク質を発現することを示す(図14H)。対照的に、qRT-PCRおよびウエスタンブロッティングは、転写物レベル(図26A)およびRAN翻訳GPのレベル(図14H)が同等であることを示した。図13と同様に、RAN翻訳PAは、ウエスタンブロッティングにより検出可能ではなかった。次に、細胞生存率に対するこれらコンストラクトの効果を、相補性アッセイ、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)検出およびメチルチアゾールテトラゾリウム(MTT)を使用して試験した。LDHアッセイについては、(-)ATG-PR-3Tまたは(+)ATG-PR-3Tコンストラクトをトランスフェクトした細胞は、ベクター対照細胞と比較して、それぞれ1.9および2.9倍の細胞死の増加を示した(p=0.008および0.001)。加えて、上昇したレベルのPRタンパク質を発現する(+)ATG-PR-3Tトランスフェクト細胞は、(-)ATG-PR-3Tコンストラクトをトランスフェクトした細胞と比較して1.5倍の細胞12死の増加を示した(p=0.034)。MTTアッセイは、同様の結果を示した。(-)ATG-PR-3Tおよび+ATG-PR-3Tコンストラクトをトランスフェクトした細胞は、代謝的に活性な細胞の数の劇的な減少を示し、未処置細胞または空ベクター対照と比較してそれぞれ33%(p<0.00001)および43%(p<0.00001)であった(図14J)。加えて、(+)ATG-PR-3Tをトランスフェクトした細胞内の上昇したPR発現は、(-)ATG-PR-3T細胞と比較して有意に低いレベルの代謝活性を有していた(p<0.05)。光学顕微鏡細胞分離により、対照細胞と比較して-ATG-PR-3Tにおける細胞形態の変化が明白であり、これらの表現型は、上昇したレベルのPRを発現する(+)ATG-PR-3T細胞において悪化した(図26B~D)。まとめると、これらのデータは、以下のことを実証した。すなわち、1)G₂C₄伸長突然変異は、細胞に対して毒性を有し、この毒性は、DNA、G₂C₄RNAおよび／またはRAN翻訳PR、GPまたはPAタンパク質の効果により引き起こされうる、2)(+)ATG-PR-3Tコンストラクトをトランスフェクトした細胞内で発現する増加したPRタンパク質は、DNA、G₂C₄RNAおよびRANタンパク質効果により引き起こされるレベルを超えて細胞毒性および細胞死を増加させる。したがって、PRタンパク質は、本質的に細胞に対して毒性を有することが示された。

【0134】

6つのすべてのRANタンパク質が脳内に凝集体を形成する

センスおよびアンチセンスRNA鎖の両方からの6つのすべてのRANタンパク質が、C9(+)ALS患者において発現するかどうかを決定するため、これらタンパク質のリピート伸長および／またはC末端配列に対する9つのポリクローナル抗体を使用して、パラフィン埋込み脳組織の切片上でIHC染色を実施した。C9(+)症例において、豊富な球状および不規則的な形状の神経細胞細胞質封入体(NCI)が海馬に存在し、その大多数が歯状回およびCA領域の錐体細胞内に存在した。これらRAN封入体はまた、C9(+)運動皮質において検出された(図15)。α-GPを使用して、海馬において、運動皮質においてと同様に、GP陽性封入体がすべての検査されたC9(+)症例において検出されたが、C9(-)症例または正常対照切片においては検出されなかった。13海馬のCA領域および運動皮質において、凝集体のクラスターが、C9(+)症例において、>20%の神経細胞において凝集体を伴って、頻繁に見出された(図27)。より少ない凝集体が、α-GP-C Tセンス抗体を使用して検出され、これは、ほとんどのGP凝集

10

20

30

40

50

体がC9ORF72アンチセンス鎖から翻訳されたことを示した二重標識化実験と一致している(図14D~F)。PA封入体が、6つのC9(+)症例のうち4つにおける海馬および2つの運動皮質試料のうち1つに検出された(図27)。C9(+)症例において、PA封入体の頻度は、GP封入体と比較して、海馬および運動皮質において有意に低かったが、>50%の神経細胞に見出される極度に大きなPA封入体を伴う高強度領域染色(high-intensity regional staining)が、1人の患者に見出された(図27)。PR陽性封入体がまた、検査されたすべてのC9(+)症例における海馬および試験された2つのC9(+)症例のうちの1つにおける運動皮質に見出された。PA染色と同様に、PR封入体は、頻度は低い、強度の高い領域染色が時折観察された。センス方向に、GR陽性封入体が、検査されたすべてのC9(+)症例において、海馬および運動皮質に見出されたが、GP凝集体よりも頻度は低いようであった。GA封入体は、IHCにより小さな核周囲封入体として海馬および運動皮質において時折検出されたのみであった(図15、図27)。様々なタイプの凝集体の頻度の見かけ上の差異は、タンパク質コンフォメーションおよびエピトープ利用可能性の差異または異なるエピトープに対し設計されたこれら抗体の親和性の差異により生じうる。まとめると、このデータは、6つのすべてのRANタンパク質がC9(+)剖検脳内に凝集体を形成することを示した。

10

【0135】

上位および下位運動神経細胞におけるRANタンパク質の封入体

20

ALSの中心的な特徴は、運動皮質における上位運動神経細胞および脳幹および脊髄における下位運動神経細胞の漸進的な縮退および死である。上位および下位運動神経細胞にRANタンパク質が蓄積するかどうかを試験するため、センスおよびアンチセンスの両方の方向の予測されるタンパク質に対する9つのすべての抗体を使用してIHCを実施した。C9(+)症例において、豊富なGP陽性神経細胞細胞質封入体が、運動皮質のすべての層において見られ、第III層の錐体神経細胞および第V層全体において頻度の高いGP凝集体を伴っていた(図16A)。細胞死および萎縮が第V層の運動神経細胞の同定を困難にするとはいえ、残りの上位運動神経細胞におけるGP封入体が見出された(図16B)。加えて、PA、PR、GRおよびGA陽性封入体もまた、運動皮質に見出された(図15、図27)。脊髄切片において実施された同様の一連の実験を使用して、検査された3つすべての症例におけるGP凝集体および3人のC9(+)患者のうち2人における下位運動神経細胞の凝集体が検出されたが、C9(-)ALS症例または正常対照においては検出されなかった(図16C)。これが、運動神経細胞内のRANタンパク質蓄積の最初の報告である。上位および下位運動神経細胞の両方におけるGP凝集体の発見は、C9 RANタンパク質蓄積を、ALSにおいて選択的に脆弱な神経細胞と結び付ける。

30

【0136】

RANタンパク質凝集体の高密度クラスター化

センスおよびアンチセンスタンパク質の両方が、C9ORF72剖検脳の神経細胞内に蓄積した。一般に2つのタイプの凝集パターンが観察された。すなわち、1)単離細胞質凝集体および2)約10から50%を超える神経細胞が陽性であった高密度クラスター化細胞質凝集体クラスター化凝集体は、GPについて最も頻度が高く検出され、歯状回(DG)および海馬のCA1~4に見出された(図16D、E)。DGにおけるクラスター化GP凝集体は、CA領域の大きな細胞質凝集体よりも小さく頻度が低かった。追加のクラスター化GP凝集体が、海馬の海馬台および前海馬台において、15運動皮質におけるのと同様に頻繁に見出された。連続切片の免疫染色は、複数のタンパク質が多くの場合同じ領域に見出されることを示した。たとえば、PA、PR、GP、GAおよびGRタンパク質についての強度の高いクラスター化染色は、1人のC9(+)患者からの連続切片において前海馬台の同じ領域に見出された(図16F、Gを参照のこと)。PAについての免疫染色は、いくつかの脳領域が豊富な凝集体を有する一方で、同じ切片の他の領域には相対的に変化がないことを示した。たとえば、図17Aは、1人の患者の単一の切片の海馬領域全体にわたるPA封入体の勾配(前海馬台>海馬台>CA1)を示す。この患者にお

40

50

けるPA封入体は、前海馬台（I）において数が多く（＞50%の神経細胞）、（II）海馬台において中程度であり、CA1海馬領域（IIIおよびIV）においてはまれである。この切片に見られる限局的な領域染色と一致して、PA染色は、同じ患者から採取された海馬組織の別個のブロックからの切片においては検出されなかった。これらのデータは、PA-RANタンパク質の発現が細胞によって可変的であること、または、パーキンソン病のモデルマウスにおいて提案されてきたように、1つの細胞内のPAの凝集が隣接する細胞内の凝集をトリガーすることを示す（24）。次に、このC9（+）症例からの連続切片を、リピートモチーフ（ α -PA、 α -PR、 α -GP、 α -GR）および対応するC末端領域（ α -PA-CT、 α -PR-CT、 α -GP-CT、 α -GR-CT、 α -GA-CT）の両方に対する抗体が、前海馬台の同じ濃い染色領域（領域I）において凝集体を検出することを示すために使用した（図17B）。これらの結果は、センスおよびアンチセンスRANタンパク質凝集体の両方が、この領域に蓄積することを示した。リピートモチーフまたは特異的C末端領域のいずれかを認識する抗体を使用した同様の凝集体の検出は、これらの抗体が、 G_2C_4 および G_4C_2 伸長転写物の両方にわたって発現するタンパク質を認識していることを確認し、C9ORF72-ALS/FTDにおけるRAN翻訳の生物学的影響を理解するための新規ツールを提供する。

【0137】

論述

C9ORF72におけるイントロンマイクロサテライト伸長突然変異が、一般的な形態の家族性および散発性ALS/FTDの両方を引き起こすことの発見については、かなりの興奮があった（1、2）。この疾患について検討されている3つの主要な病理学的機構には、ハプロ不全（1、2）、RNA機能獲得（5～8）、およびRAN翻訳（9、11～13）が含まれる。これまでのところ、この疾患の分子機構を理解しようとする努力は、センス方向のC9ORF72伸長突然変異の結果の理解にのみ焦点を当ててきた。本明細書において報告された結果は、C9ORF72伸長突然変異がまた、アンチセンス方向に発現することを示し、アンチセンスRNA凝集およびアンチセンスRANタンパク質がC9ORF72-ALS/FTDに寄与することを示す。本発明者らは、以下のことを初めて示す。すなわち、1）アンチセンスC9ORF72はC9（+）剖検組織において上昇するが、センス転写物は上昇しない、2）アンチセンス G_2C_4 伸長転写物は、C9+脳内および血中に蓄積するRNA凝集を形成する、3）RAN翻訳が、細胞培養においてアンチセンス G_2C_4 伸長コンストラクト全体にわたり生じる、4）センスおよびアンチセンスRANタンパク質は、リピートおよびC末端抗体の両方に二重免疫学的アプローチを使用して、C9（+）剖検脳内に蓄積する、5）RANタンパク質凝集体は、上位および下位運動神経細胞に蓄積し、RAN翻訳をALSの重要な病理学的特徴に直接結び付ける。 G_4C_2 RNA凝集がC9ORF72-ALS/FTD患者組織において蓄積するという初期の報告（1、2）以来、主たる仮説は、 G_4C_2 センス転写物が、DM1、DM2およびSCA8におけるMBNLタンパク質の隔離と同様に、RNA結合タンパク質を隔離して調節不全にするというものである（4）。複数のグループが、 G_4C_2 結合タンパク質をすでに報告しており、疾患におけるそれらの潜在的役割を試験している（5～8）。アンチセンス G_2C_4 凝集がまた患者細胞内に蓄積するという発見は、 G_2C_4 アンチセンスRNAおよび結合タンパク質が、役割を果たしうることを示す。加えて、C9（+）末梢血におけるセンスおよびアンチセンス凝集の発見は、容易にアクセス可能なC9ORF72-ALS/FTDのバイオマーカーとして有用となりうる。センスおよびアンチセンス転写物の両方をモニタリングするバイオマーカーが、特に重要でありうる。なぜなら、一方の鎖の発現を減少させる処置法は、他方の鎖の発現を減少させるからである。二重免疫学的アプローチを使用して、 G_2C_4 アンチセンス転写物が、RAN翻訳によりおよび／または2つの短いORF（Met-AS-PRおよびMet-AS-GP）から新規アンチセンスタンパク質（PA、PR、GP）を発現させることが示された。

【0138】

材料および方法

cDNAコンストラクト。上流6×Stopコドンを含むCCCGGGGCC (GGGGCC)₂GGGGCCC (配列番号64)およびCCCGGGGCC (GGGGCC)₂₈GGGGCCC (配列番号65)断片が、合成され、Integrated DNA TechnologiesによるpIDTSmartベクターへとクローニングされた。6×Stops-(GGGGCC)₄-3Tおよび6×Stops-(GGGGCC)₃₀-3Tコンストラクトが、NheI/XhoI断片を、三重エピトープを含むpcDNA3.1ベクターへとサブクローニングすることにより生成された。GGGGCCリピートのサイズを伸長させるため、SmaI/XhoI断片を、pcDNA-6×Stops-(GGGGCC)_{EXP}-3TのT4 DNAポリメラーゼ/XhoIで平滑末端化したPspOMIへとサブクローニングした。pcDNA-6×Stop-3Tコンストラクト内のGGGGCCリピートの配向を逆転させるため、SmaI/ClaI断片をpBluescript SK+へとサブクローニングし、pBluescript-(GGGGCC)_{EXP}を生成した。AfeI/XhoI断片pBluescript-(GGGGCC)_{EXP}を、pcDNA-6×Stop-3Tへとサブクローニングし、pcDNA-6×Stop-(GGGGCC)_{EXP}-3Tコンストラクトを製造した。

10

【0139】

RT-PCR。1) 剖検組織における鎖特異的RT-PCR：総RNAが、TRIzol (Invitrogen) を使用して、ALS患者および健常対照の前頭皮質剖検組織および末梢血リンパ球(PBL)から単離される両方の鎖から転写物を検出するため、0.25 μgの総RNAから、リンカー鎖特異的リバースプライマーを用いたSuperScript IIIシステム(Invitrogen)ならびに鎖特異的フォワードおよびリンカー(LK)プライマーを用いたPCRを使用して、cDNAを生成した。PCR反応は、以下のとおり実施された。すなわち、94℃で3分間、次に、94℃で45秒間、58℃で45秒間および72℃で1分間を35サイクル、続いて72℃で6分。PCR増幅の特異性を検証するため、バンドをクローニングしてシーケンシングした。2) 293T細胞における毒性アッセイのためのRT-PCR：miRNeasy Miniキット(Qiagen)を製造者のプロトコルに従って使用して、細胞からの総RNAを抽出した。総RNAを、Superscript III RTキット(Invitrogen)およびランダムヘキサマープライマーを使用して逆転写した。異なるG4C2-3XTagコンストラクトの発現を、3xTag-Fwおよび3xTag-Rvのプライマーセットを使用してRT-PCRおよびqPCRにより解析した。β-アクチン発現を、プライマーセットACTB3およびACTB4を用いて増幅される参照遺伝子として使用した。プライマー配列は、図27に列挙される。

20

30

【0140】

リアルタイムRT-PCR。MyCycler Thermal Cyclerシステム(Bio-Rad)上で、SYBER Green PCR Master Mix (Bio-Rad) およびASORF鎖特異的cDNAおよびプライマーセットを使用して、2ステップ定量PCRを実施した。ヒトベータアクチンプライマーACTB3およびACTB4を用い、オリゴdT合成総cDNAを鋳型として使用して、対照反応を実施した。2段階PCRを、三重にされた各試料cDNA/プライマーペアを有する光学96ウェルプレートにおいて40サイクル(95℃30秒、60℃30秒)実施した。最初に各実験Ct値を、それらのベータアクチンCt値に標準化し、次に健常対象アンチセンスΔΔCtに標準化することにより、相対フォールド変化(relative fold changes)を生成した。プライマー配列は、図28に列挙される。

40

【0141】

5'および3' cDNA末端の急速増幅(5'および3' RACE)。2人のC9(+)ALS患者および2人のC9(-)ALS患者の前頭皮質剖検組織からの4 μgの総RNAを、5'および3' RACEのために使用した(5' RACEシステムおよび3' RACE、Life Technologies)。5' RACEにおいて、プライマーA

50

S O R F Rを、遺伝子特異的第1鎖cDNA合成のために使用し、ネスト化リバープライマーは5' G S P 1および5' G S P 2である。3' R A C Eにおいて、ネスト化フォワードプライマーは3' G S P 1および3' G S P 2である。3' R A C Eおよび5' R A C E産物をゲル抽出し、T O P O T A C l o n i n g (I n v i t r o g e n)を用いてクローニングし、シーケンシングした。プライマー配列は、図28に列挙される。

【0142】

ポリクローナル抗体の産生。ポリクローナルウサギ抗体を、New England Peptideにより生成し、ポリクローナルマウス抗体を、University of FloridaのInterdisciplinary Center for Biotechnology Research (ICBR)により生成した。センス鎖 (G G G G C C) において、抗血清を、合成ポリ (G P)、ポリ (G R) ペプチドおよび予測されるG P、G RおよびG A R A Nタンパク質のC末端領域に対して産生させた (図21)。アンチセンス鎖 (G G C C C C) において、抗血清を、合成ポリ (P A)、ポリ (P R) ペプチドおよび予測されるP AおよびP R R A Nタンパク質のC末端領域に対して産生させた。アンチセンスおよびセンスタンパク質の両方に対する抗体を生成するために使用されるペプチドならびにウエスタンブロット、免疫蛍光 (I F) および免疫組織化学 (I H C) のためのそれらの使用は、表S3に要約される。

【0143】

細胞培養およびトランスフェクション。H E K 2 9 3 T細胞を、10%胎仔ウシ血清を添加したD M E M培地中で培養し、5% C O 2を含有する湿気のある大気中において37℃でインキュベートした。L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 R e a g e n t (I n v i t r o g e n)を製造者の指示に従い使用して、D N Aトランスフェクションを実施した。

【0144】

ヒト試料。6人のC9 (+) A L S、5人のC9 (-) A L S対照および1人の正常対照からの試料が含まれる、生化学的および組織学的解析のための冷凍前頭皮質組織試料を、本研究において使用した。加えて、C9 (+) A L S / F T DおよびC9 (-) A L S / F T D症例ならびに正常対照からのパラフィン埋込み固定組織。末梢血リンパ球 (P B L) を、2000×gでの短い遠心分離後の新しく回収された全血の軟膜から単離した。赤血球 (R B C) を、優先的には、R B C L y s i s B u f f e r (R o c h e) を使用して溶解し除去し、P B Lを遠心分離し、P B Sで一度洗浄し、スライド上で乾燥させた。本研究は、ヘルシンキ宣言を遵守して実施された。University of FloridaおよびJohns Hopkins Universityの施設内審査委員会が本件球を認可した。筆記されたインフォームドコンセントを参加者または関係者から登録時に得た。

【0145】

免疫蛍光。高分子タンパク質の細胞内分布を、トランスフェクトH E K 2 9 3 T細胞内で免疫蛍光により評価した。細胞を8ウェル組織培養チャンバー上にプレートし、翌日プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、P B S中の4%パラホルムアルデヒド (P F A) 中で30分間細胞を固定し、P B S中の0.5% t r i t o n X - 1 0 0 中において15分間氷上で透過処理した。細胞をP B S中の1%正常ヤギ血清中で30分間ブロッキングした。ブロッキング後、細胞を1時間室温で、ウサギ抗Myc (A b c a m)、マウス抗HA (C o v a n c e)、マウス抗Flag (S i g m a)、ウサギ抗G Rおよびウサギ抗G R - C T一次抗体を、1:400の希釈度で含有するブロッキング溶液中でインキュベートした。スライドをP B S中で3回洗浄し、1時間室温で、Cy3にコンジュゲートされたヤギ抗ウサギ (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h、P A) およびA l e x a F l u o r 4 8 8 (I n v i t r o g e n) にコンジュゲートされたヤギ抗マウス二次抗体を1:200の希釈度で含有するブロッキング溶液中でインキュベートした。スライドをP B S中で3回洗浄し、D A P Iを含有

する封入剤 (Invitrogen) を用いて封入した。

【0146】

RNA-FISH。細胞を有するスライドを、PBS中の4%PFA中で10分間固定し、前もって冷蔵した70%エタノール中において30分間氷上でインキュベートした。2×SSC中の40%ホルムアミド中での10分間の再水和後、スライドを、ハイブリダイゼーション溶液(40%ホルムアミド、2×SSC、10mg/ml BSA、100mg/ml 硫酸デキストランおよび10mg/ml 酵母tRNA)を用いて10分間55℃でブロッキングし、次に200ng/ml 変性RNAプローブとともにハイブリダイゼーション溶液中において55℃で2時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、スライドを2×SSC中の40%ホルムアミドで3回洗浄し、PBS中で1回簡単に洗浄した。リポフスチンの自己蛍光を、70%エタノール中の0.25%のスーダンブラックBにより消光させ、スライドを、DAPIを含有する封入剤(Invitrogen)で封入した。RNA凝集の特異性を、FISH検出前にRNase(2×SSC中100μg/ml)、DNase(DNase I緩衝液中1U/μl)またはプロテアーゼK(2mM CaCl₂、20mM トリス中120μg/ml、pH7.5)を用いて細胞を処理することにより決定した。処理細胞を、37℃で30分間インキュベートし、PBSで3回、次に2×SSCで3回洗浄した。続くFISH検出は、上述のとおり実施した。アンチセンス凝集特異性を、最初にスライドを10倍過量非標識化(G4C2)4オリゴとハイブリダイズさせ、その後G4C2-cy3(アンチセンスプローブ)またはG₂C₄-cy3(センスプローブ)とハイブリダイズさせる、標準的FISH検出を使用して決定した。続く処理および検出は、上述のとおり実施した。

【0147】

ウエスタンブロッティング。6ウェル組織培養プレートの各ウェルのトランスフェクト細胞をPBSですすぎ、プロテアーゼ阻害剤カクテルを伴う300μLのRIPA緩衝液中において45分間氷上で溶解させた。21ゲージ針を通過させることによりDNAを剪断した。細胞溶解物を16,000×gで15分間、4℃で遠心分離し、上清を回収した。細胞溶解物のタンパク質濃度を、タンパク質アッセイ染料試薬(Bio-Rad)を使用して決定した。20マイクログラムのタンパク質を4~12%NuPAGE Bis-Trisゲル(Invitrogen)中で分離し、ニトロセルロース膜(Amersham)に移した。膜を、0.05%Tween-20を含有するPBS(PBS-T)中の5%粉乳中でブロッキングし、ブロッキング溶液中で抗Flag(1:2000)、抗Myc(1:1000)、抗HA(1:1000)、またはウサギポリクローナル抗体(1:1000)を用いてプローブした。膜を抗ウサギまたは抗マウスHRPコンジュゲート二次抗体(Amersham)とともにインキュベートした後に、バンドをECLプラスWestern Blotting Detection System(Amersham)により視覚化した。患者前頭皮質剖検組織の連続抽出を以下のとおり実施した。すなわち、組織を1%Triton-X100、15mM MgCl₂、0.2mg/ml DNase Iおよびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するPBS中で均質化し、16,000×gで15分間、4℃で遠心分離した。上清を回収した。ペレットを2%SDS中に再懸濁させ、室温で1時間インキュベートし、次に16,000×gで15分間、4℃で遠心分離した。上清を回収し、タンパク質ブロッキングのため、2%SDS不溶性ペレットを8%SDS、62.5mM トリスHCl pH6.8、10%グリセロールおよび20% 2-メルカプトエタノール中に再懸濁させた(25)。

【0148】

タンパク質スロットブロット。連続抽出からの1%Triton-X100可溶性画分および2%SDS可溶性画分をニトロセルロース膜上に、Bio-Dot 96ウェル精密濾過システム(Bio-Rad)を用いて真空下で固定化した。膜をPBS-Tにおいて洗浄し、ウエスタンブロッティングと同じプロトコルを使用して、各ウサギポリクローナル抗体(1:2000)を用いてブロットした。

【0149】

10

20

30

40

50

免疫組織化学。10マイクロメートル切片を、キシレン中で脱パラフィンし、等級アルコールにより再水和し、95～100%ギ酸とともに5分間インキュベートし、蒸留水を用いて10分間洗浄した。クエン酸緩衝液、pH6.0中において90℃で30分間切片を蒸気処理することによりHIERを実施した。非特異的免疫グロブリンをブロッキングするため、無血清ブロック (Biocare Medical) を30分間適用した。ウサギポリクローナル抗体を、無血清ブロック (Biocare Medical) 中1:5000から1:15,000の希釈度で適用し、一晚4℃でインキュベートした。結合試薬 (ストレプトアビジンおよび／またはアルカリホスファターゼ、Covance) を30分間室温で適用した。これらの切片を、3%H₂O₂中で15分間インキュベートし、内在性ペルオキシダーゼ活性をブリーチした。次に、標識化試薬 (HRP、Covance) を30分間室温で適用した。ペルオキシダーゼ活性をNovaRed基質 (Vector) を用いて発達させ、切片をヘマトキシリンで対比染色した。

10

【0150】

細胞毒性アッセイ。すべてのトランスフェクション実験を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を製造者の指示に従い、60%細胞コンフルエンスで使用して実施した。500ngの各ベクターを35mmウェル中でトランスフェクトさせた。細胞死を、Cytotoxicity 96非放射性細胞毒性アッセイ (Promega) を製造者の指示に従い使用して、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 細胞放出を測定することにより決定した。吸光度は490nmで記録され、総LDH放出を1%Triton X-100を用いて細胞を溶解させることにより測定した。各実験において、決定は、各実験条件について五重に実施し、平均データを計算した。単一比較のために両側独立スチューデントt検定 ($p < 0.05$) および複数の対になった条件が比較されるときには分散分析 (ANOVA) を使用して、統計学的有意性を決定した。

20

【0151】

細胞生存率アッセイ。HEK293T細胞に96ウェルプレート中でトランスフェクトし、トランスフェクション42時間後に、3-(4,5-ジメチチアゾール-2-イル)-5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) アッセイを用いて細胞生存率を決定した。MTTを細胞培養培地に0.5mg/mL最終濃度で添加し、45分間37℃でインキュベートした。次に、培地除去の際に細胞を100μLのDMSOを用いて溶解し、吸光度を595nmで測定した。各実験において、決定は五重に実施される。スチューデントt検定 ($p < 0.05$) を使用して統計学的有意性を決定した。

30

【実施例4】

【0152】

センスおよびアンチセンス転写物の両方がALS/FTDに寄与するという仮説を試験するためのC9ORF72 ALSのBACトランスジェニックマウスモデル。

原理：センスおよびアンチセンス転写物を再現するC9ORF72 ALS/FTDモデルマウスは、この疾患のモデリングのために決定的に重要である。BACクローンを、約800G4C2リピートを含有するヒト患者から単離した。これらのBACクローンは、8つの樹立系統を生成するために使用した。これらのマウスはたとえば、以下の問いに答えるために有用である。すなわち、RANタンパク質発現およびRNA機能獲得の両方がC9ORF72 ALS/FTDに寄与するのか？センスおよびアンチセンス機構の両方がC9ORF72病原性において重要であるのか？

40

【0153】

アプローチ：約800GGGGCCリピートを有する完全ヒトC9ORF72遺伝子プラスランキング配列を含有するBACクローンを、ヒト患者から単離し、pCC1BAC (商標) プラスミド [Episentre (登録商標)] 内に挿入した。マウスにおける使用のために選択されたBACインサートは、第9染色体上のヒトゲノム参照配列のbp27,625,470から27,527,137まで伸長した (図29)。上の座標は、この患者からの余分なリピートを含まない。BACインサートDNAが、いくつかのクローン調製物において約800リピートを含有することが見出されたが、非常に不安定だ

50

った。前核注入を実施し、8つのFVB樹立系統を生成した。2つの独立系統は伸長突然変異が確認された。マウスにおけるBACリピートサイズは、約500リピートであるが、後代間で変化し、マウスコロニーが拡張し、追加のマウス世代が実験室において繁殖すると、サイズが伸びたり縮んだりしうる。BAC伸長マウスは、C9ORF72遺伝子のセンスおよびアンチセンスバージョンの両方を発現した。センスおよびアンチセンスGGGGCCRNA凝集が、GGGGCCリピートを有するマウスに存在したが、対照マウスには存在しなかった(図30～図31)。

【0154】

少なくとも2つの伸長および2つの対照系統が、詳細な特徴付けのために選択される。行動的特徴付けには、ロータロッド解析、握力、平均台およびオープンフィールド評価が含まれる。センスおよびアンチセンス転写物ならびにRANタンパク質の分子的特徴付けが、RT-PCR、RACE、免疫ブロット、免疫組織化学および免疫蛍光により実施される。免疫組織化学、免疫蛍光およびFISH研究は、RNA凝集およびC9-RANタンパク質蓄積の部位を病理学的変化と関連させるために実施される。CNS、CSF、筋肉、血液および他の組織におけるRANタンパク質蓄積が、発達中に様々な時点で検査される。

10

【0155】

関連性：これら研究からの結果は、RAN翻訳がC9ORF72 ALS/FTDにおいて果たす役割のよりよい理解をもたらすであろう。加えて、これらの研究は、剖検組織においてどのタンパク質が最も頻繁に見出されるのかを決定し、個別のRANタンパク質の毒性における明白な差異を同定することにより、個別のタンパク質標的の優先順位の決定に役立つであろう。モデル細胞およびマウスからの情報はまた、様々な処置方略の有効性に関する将来の研究について教えてくれるであろう。

20

【0156】

参考文献

【表 6】

1. DeJesus-Hernandez M, *et al.* (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72(2):245-256.
2. Renton AE, *et al.* (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72(2):257-268.
3. Majounie E, *et al.* (2012) Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 11(4):323-330. 10
4. Nelson DL, Orr HT, & Warren ST (2013) The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron* 77(5):825-843.
5. Reddy K, Zamiri B, Stanley SY, Macgregor RB, Jr., & Pearson CE (2013) The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J Biol Chem* 288(14):9860-9866. 20
6. Mori K, *et al.* (2013) hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol* 125(3):413-423.
7. Xu Z, *et al.* (2013) Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(19):7778-7783.
8. Almeida S, *et al.* (2013) Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol*. 30
9. Zu T, *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1):260-265.
10. Ash PE, *et al.* (2013) Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77(4):639-646.
11. Mori K, *et al.* (2013) The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide- Repeat Proteins in FTLD/ALS. *Science*.

【表 7】

12. Todd PK, *et al.* (2013) CCG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron* 78(3):440-455.
13. Ash PEA, *et al.* (2013) Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS *Neuron*.
14. Strausberg RL, *et al.* (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16899-16903. 10
15. Venter JC, *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
16. Beausoleil SA, Villen J, Gerber SA, Rush J, & Gygi SP (2006) A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol* 24(10):1285-1292.
17. Sopher BL, *et al.* (2011) CTCF regulates ataxin-7 expression through promotion of a convergently transcribed, antisense noncoding RNA. *Neuron* 70(6):1071-1084. 20
18. Chung DW, Rudnicki DD, Yu L, & Margolis RL (2011) A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Hum Mol Genet* 20(17):3467-3477.
19. Wilburn B, *et al.* (2011) An antisense CAG repeat transcript at JPH3 locus mediates expanded polyglutamine protein toxicity in Huntington's disease-like 2 mice. *Neuron* 70(3):427-440.
20. Ladd PD, *et al.* (2007) An antisense transcript spanning the CCG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Hum Mol Genet* 16(24):3174-3187. 30
21. Moseley ML, *et al.* (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* 38(7):758-769.
22. Cho DH, *et al.* (2005) Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell* 20(3):483-489.

【表 8】

23. Li H, Wyman T, Yu ZX, Li SH, & Li XJ (2003) Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum Mol Genet* 12(16):2021-2030. 40
24. Luk KC, *et al.* (2012) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338(6109):949-953.

【0157】

さらなる詳述なしに、当業者は上の記載に基づいて、本開示をその最大限の範囲まで利用することができると考えられる。したがって、以下の特定の実施形態は、単なる例示的 50

なものとして解釈されるべきであり、本開示の残りの部分をいかなる仕方であっても限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されるすべての出版物が、本明細書において参照される目的または主題のため、参照により組み込まれる。

【0158】

他の実施形態

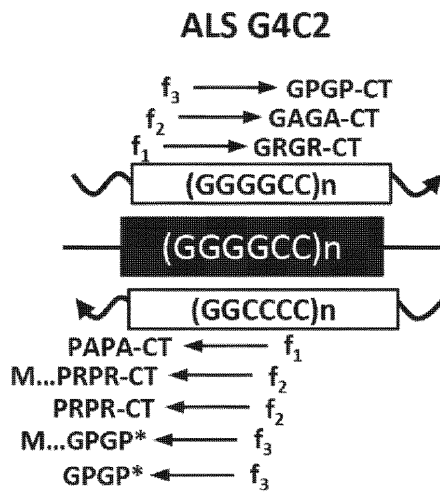
本明細書に開示の特徴のすべてが、任意の組合せで組み合わせられてもよい。本明細書に開示の各特徴は、同じ、等価な、または類似の目的に資する代替的特徴により置き換えられてもよい。したがって、そうでないことが明示的に述べられない限り、開示の各特徴は包括的な一連の等価なまたは類似の特徴の一例にすぎない。

【0159】

上の記載から、当業者は、本開示の本質的な特徴を容易に確認でき、その趣旨および範囲から逸脱することなく、本開示に様々な変更および修正を、それが様々な用途および条件に適合するように加えることができる。したがって、他の実施形態もまた特許請求の範囲内である。

10

【図1】



【図2】

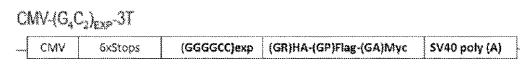
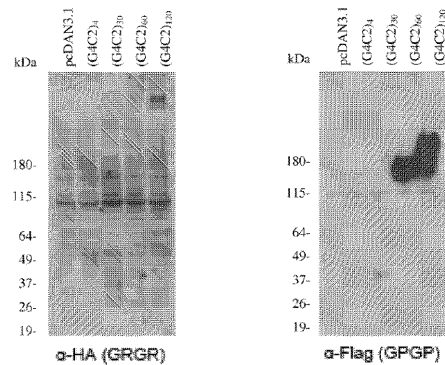


FIG. 2A



【図 3】

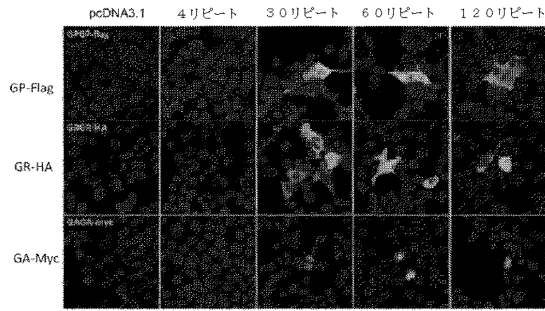


FIG. 3

【図 4】

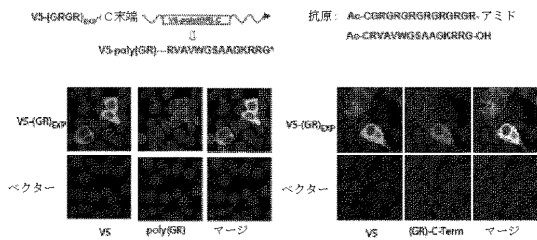


FIG. 4

【図 5】

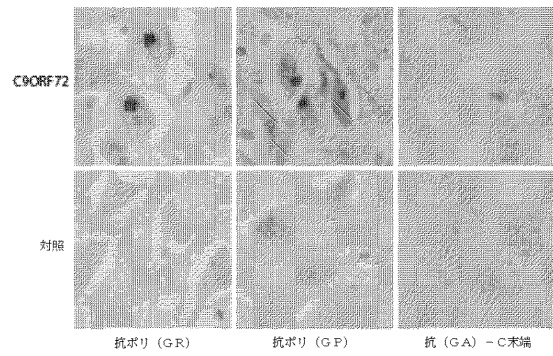


FIG. 5

【図 6】

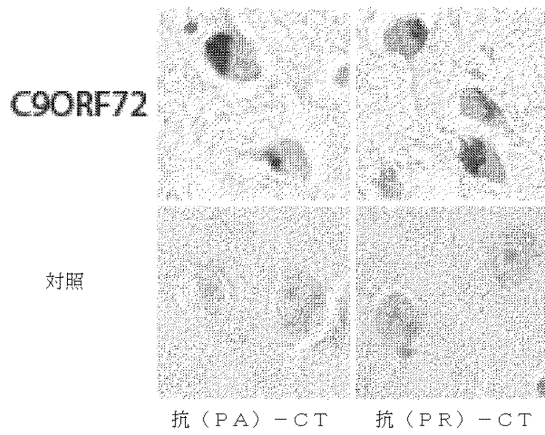


FIG. 6

【図 7】

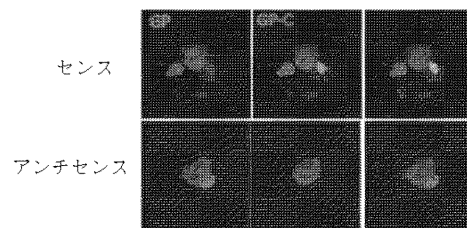


FIG. 7A

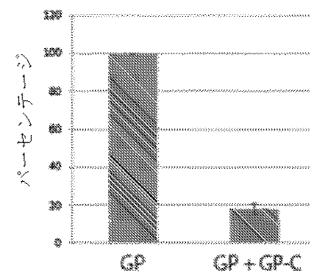


FIG. 7B

【図 8】

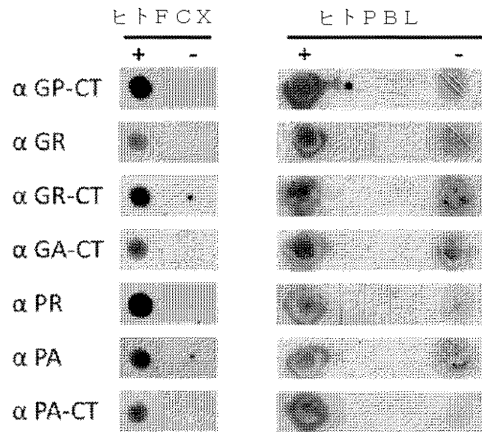


FIG. 8

【図 9】

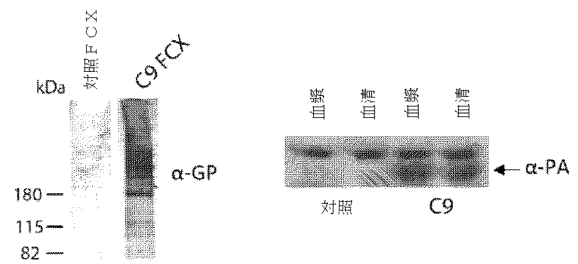


FIG. 9

【図 10】

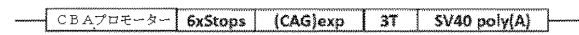


FIG. 10

【図 11】

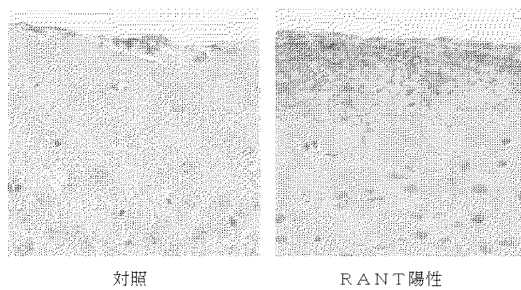


FIG. 11

【図 12】

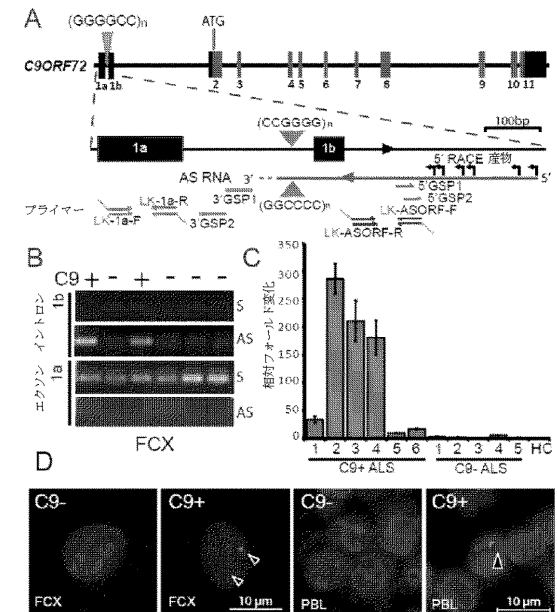


FIG. 12

【図 13】

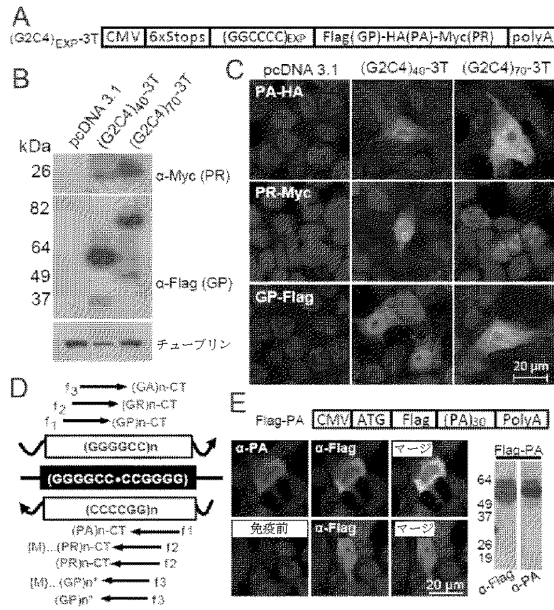


FIG. 13

【図 14-1】

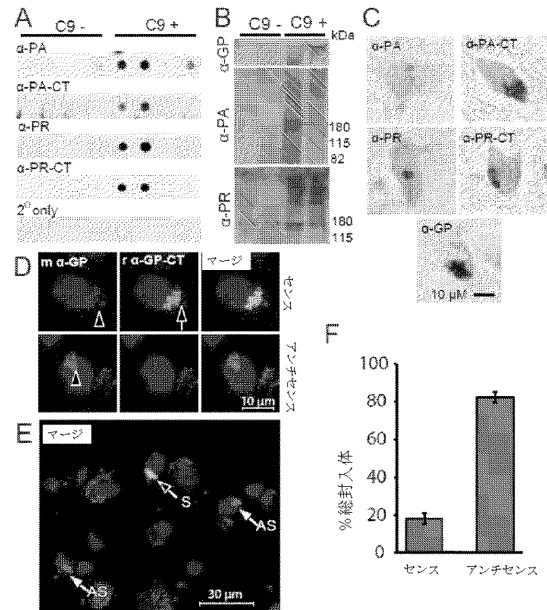


FIG. 14A

【図 14-2】

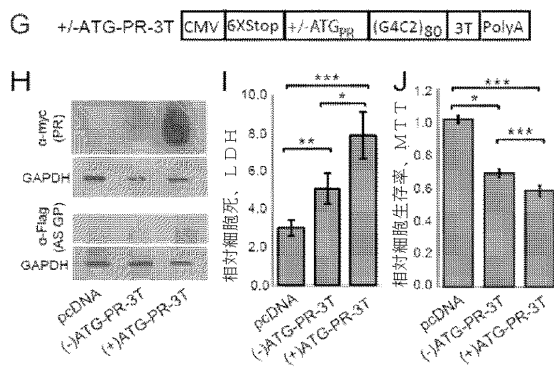


FIG. 14B

【図 15 B】

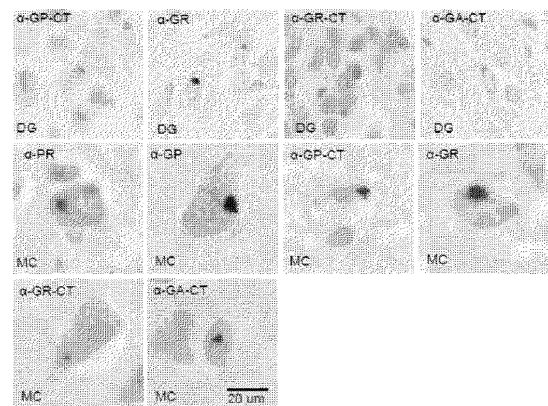


FIG. 15B

【図 15 A】

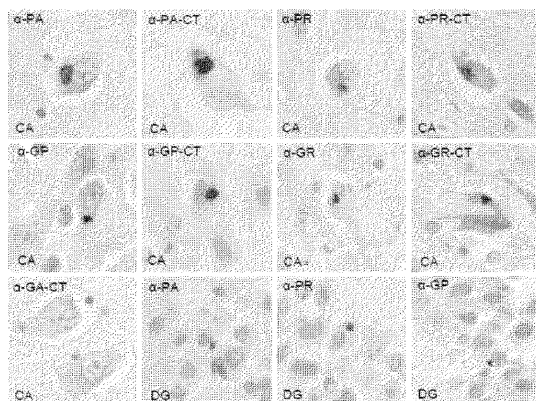


FIG. 15A

【図 16-1】

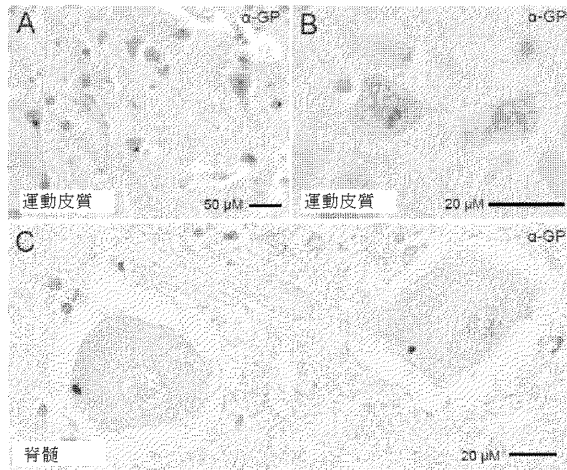


FIG. 16A

【図 16-2】

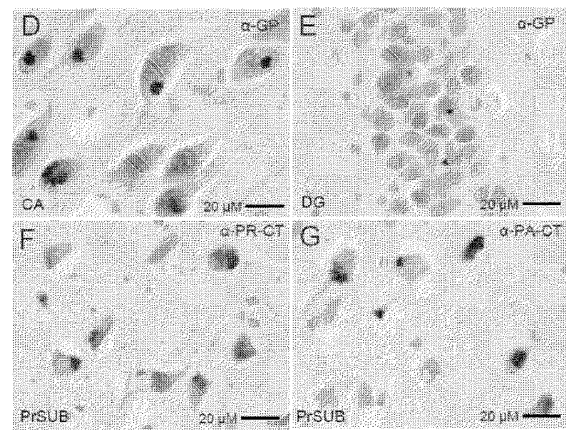


FIG. 16B

【図 17】

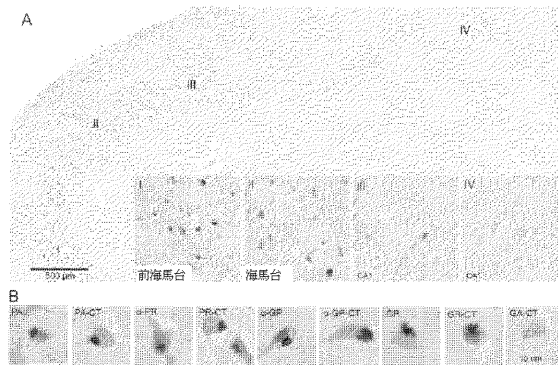


FIG. 17

【図 18】

		症例情報				RAN封入体					
症例	C9 EXP	年齢	性別/人種	PMD	DX	GP	PA	PR	GR	GA	
海馬	1	+	59	F/W	4	ALS	+++	+	+	++	++
	2	+	42	M/W	10	A/T	+++	+	NA	NA	NA
	3	+	74	F/W	16	FTD	+++	+++	+++	++	+
	4	+	45	M/W	3	ALS	+++	-	+	++	+
	5	+	82	F/W	12	FTD	+++	+	+	++	+
	6	+	86	F/W	10	A/T	++	-	+	++	-
	7	-	76	M/W	7	ALS	-	-	-	-	-
	8	-	55	M/W	7.5	ALS	-	-	NA	NA	NA
	9	-	60	M/W	16	CON	-	-	NA	NA	NA
	10	-	81	M/W	6	FTD	-	NA	NA	-	-
	11	-	83	M/W	17	FTD	-	-	-	-	-
	12	-	77	M/W	16	CON	-	-	-	-	-
運動皮質	1	+	59	F/W	4	ALS	+++	-	+	++	++
	2	+	42	M/W	10	A/T	+++	+	+	+	++
	7	-	76	M/W	7	ALS	-	-	-	-	-
	8	-	55	M/W	7.5	ALS	-	-	-	-	-
脊髄	9	-	60	M/W	16	CON	-	-	-	-	-
	7	+	42	M/W	6	A/T	+	-	-	-	-
	13	+	53	M/W	10	ALS	+	-	+	-	-
	14	+	55	F/W	7	A/T	+	-	-	-	-
	7	-	76	M/W	7	ALS	+	-	-	-	-
	8	-	55	M/W	7.5	ALS	-	-	-	-	-
	9	-	60	M/W	16	CON	-	-	-	-	-
	15	-	64	F/W	0	ALS	-	-	-	-	-
	16	-	79	M/W	33	ALS	-	-	-	-	-
	17	-	79	M/W	10	ALS	-	-	-	-	-

(-) 封入体なし。(+) 時折。(++) 中程度。(+++) 多くの封入体。(v) 切片間で可変的な染色。DX=診断。FTD=前頭側頭認知症。ALS=筋萎縮性側索硬化症。F=女性。M=男性。PMD=死後期間。NA=利用不可。HIFPO=海馬。M Cortex=運動皮質。様々な封入体の頻度の見かけ上の差異は、タンパク質コンフォメーションおよびエピトープ利用可能性の差異またはこれらの抗体の親和性の差異を反映しうる。

FIG. 18

【図 19-1】

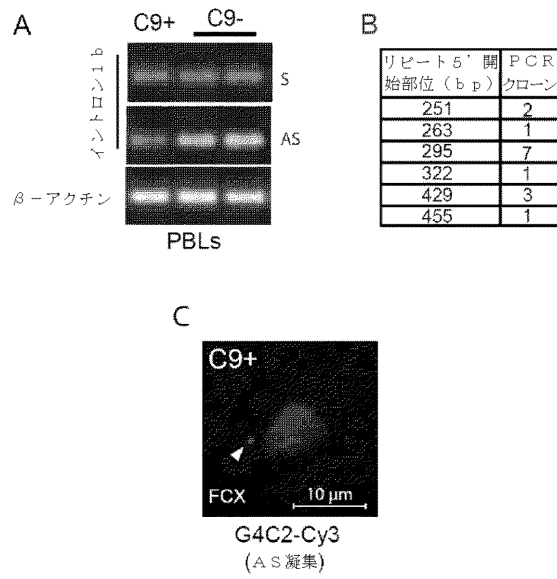


FIG. 19A-C

【図 19-2】

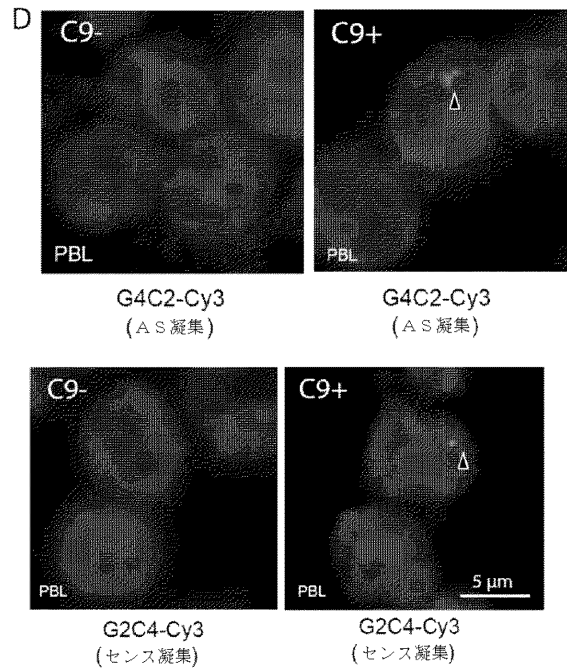


FIG. 19D

【図 19-3】

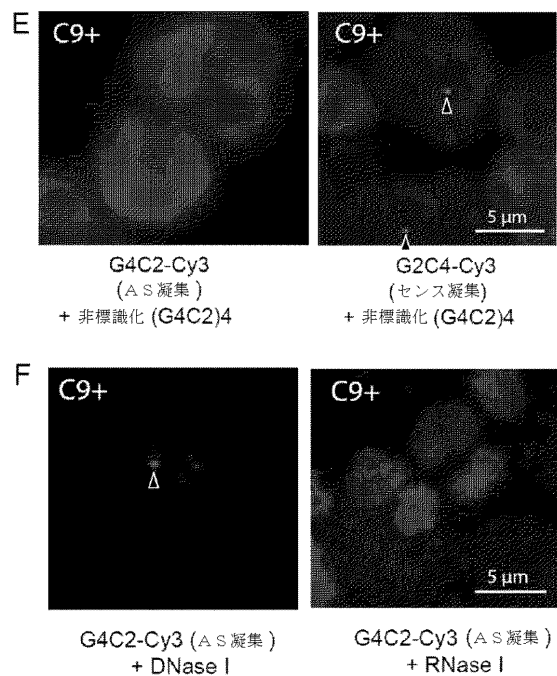


FIG. 19E-F

【図 20】

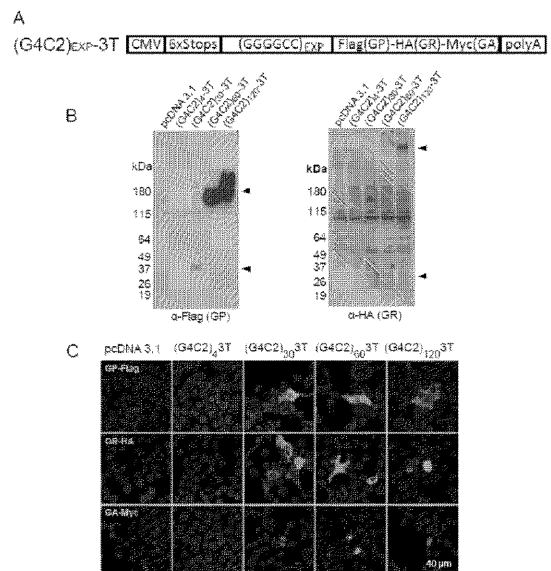


FIG. 20

【図 2 1】

G₂C₄鎖

フレーム1
*GEPPLLPAPLPGSRTPNSHPGCRLLTHPLATACASAAAGAGTATAAPPRARPRARPDHAPAPA
PAPAPAPAPAPAPATPA_{11/10}PAPAPASARLLSSRACYRIRLEPSLESSG*

```

フレーム2
MDAIPPVARGESPTPSFGQNRERESKNASSSEESPFRYPRLFPAAEPTATRODAASSLTHSPPP
APPPPACGAPCPDPGPAPGAPPTTPPDRDPRDPRRDRDPRRR(R)10PRRPPLARD*

```

フレーム3
MRGKVKHRRALRRAPASTRASGRPNPKQPPARMPPPHSPTRHRLRLRRRGRRHNENSPAGPDP
GPPRPPEPGFGDGPGEPRGGSGPSGPG(GP)₁₀GPG*

G₄C₂鎖

フレーム1
GPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGAGLRLRCLRPFRFRFRFRFRWRVGE

フレーム2
*RLTRRKGGKQPPVASSGTQESRAECGGCGCGCPGPRGCGGGG(GR)₁₂GGRCGVVGAGPGAG
PGRGCGCGACARGGGGAGGGG^WSEAAASWRYVAVWGSAAAGRRG*

フレーム3
*DALELRSRALGAGACAGAGAGAGAGAGA(GA),,,GAGAWSGRGRGRBGGGA~~VAVVPAPAAAE~~
A~~AVASG~~*

【図 2 2 - 1】

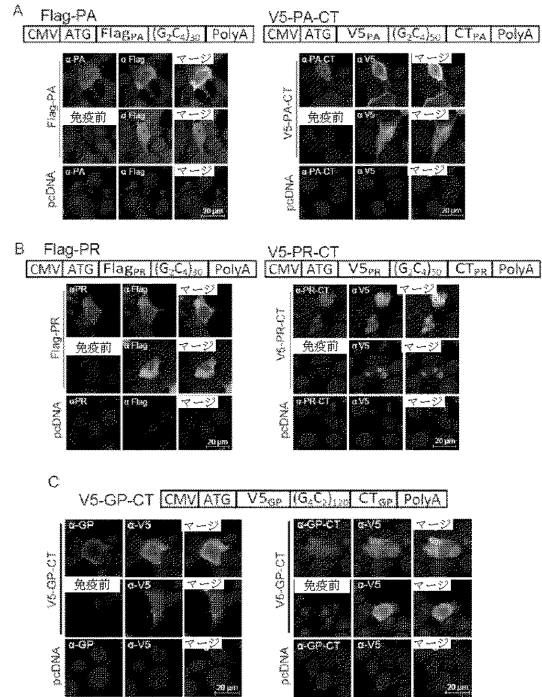


FIG. 22A-C

【図 2 2 - 2】

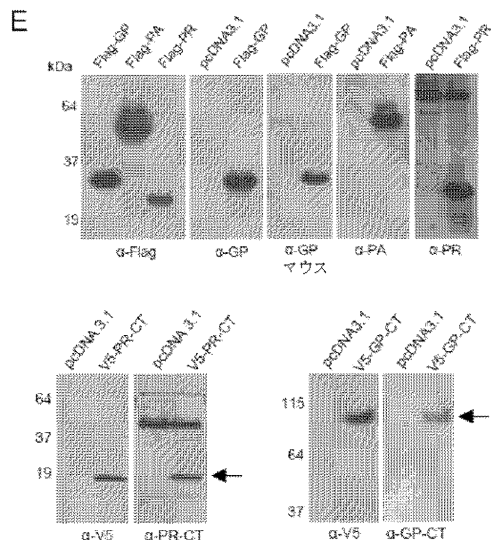
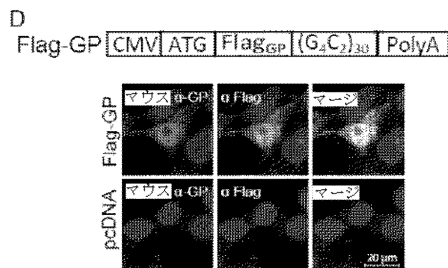


FIG. 22D-E

【図 2 3 - 1】

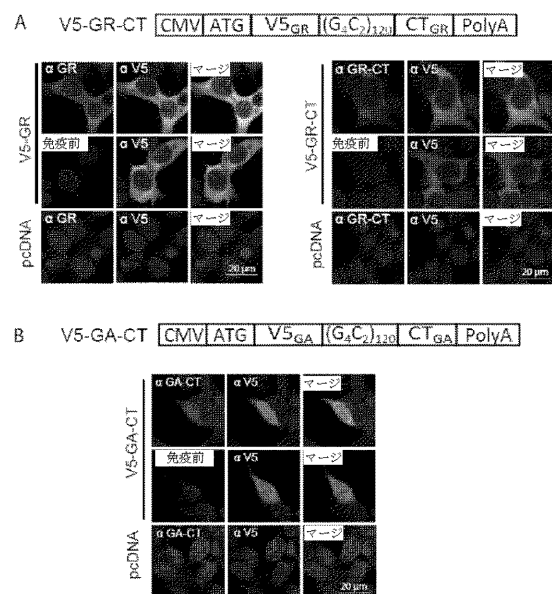


FIG. 23A-B

【図 23-2】

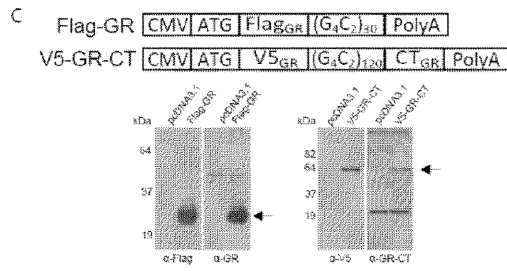


FIG. 23C

【図 24】

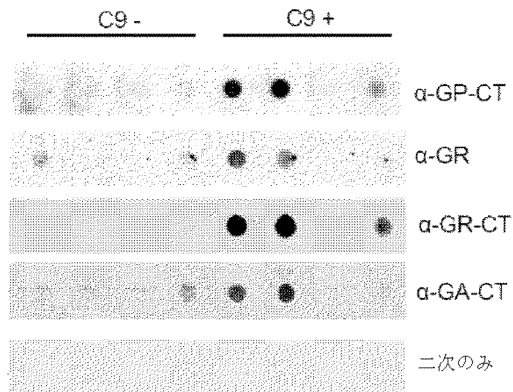


FIG. 24

【図 25】

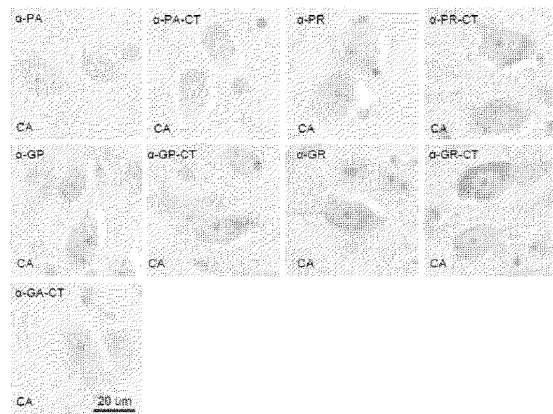


FIG. 25

【図 26-1】

A

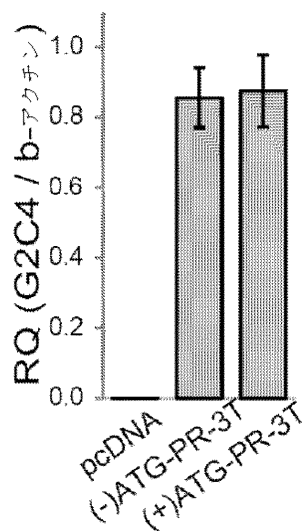


FIG. 26A

【図 26-2】

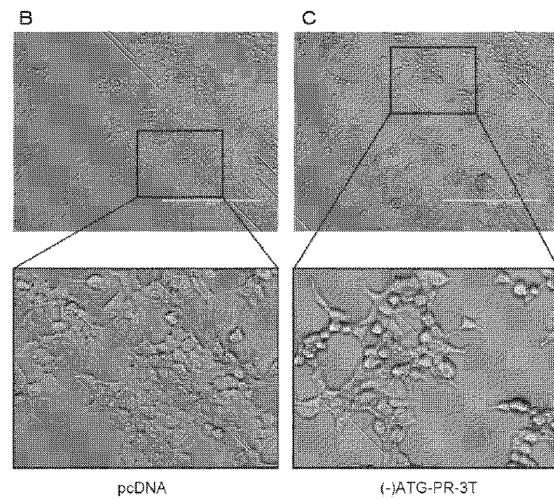
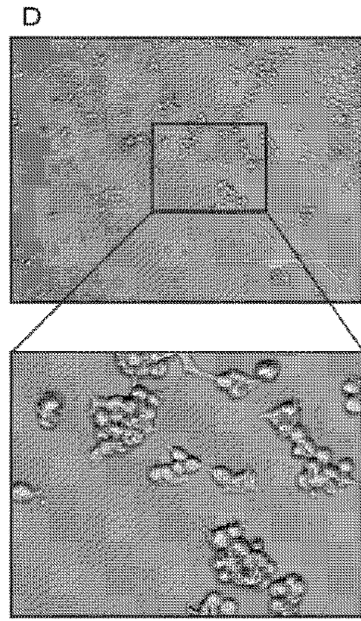


FIG. 26B-C

【図 26-3】



(+)ATG-PR-3T

FIG. 26D

【図 27】

プライマー名	プライマー配列 (5' から 3')
ASORF-F	AGTCGCTAGAGGCCAAAGC
ASORF-R	CGAGTGGGTGAGTGGAG
LK-ASORF-R	CGACTGGAGCACGAGGACACTGACGAGTGGGTGAGTGGAG
LK-ASORF-F	CGACTGGAGCACGAGGACACTGAACTCGCTAGAGGCCAAAGC
1a-F	GCCACGTAAAGATGACGC
1a-R	CCTCTAAACCCACACCTGC
LK-1a-R	CGACTGGAGCACGAGGACACTGACCTCTCTAAACCCACACCTGC
LK-1a-F	CGACTGGAGCACGAGGACACTGAGCCACGTAAAGATGACGC
LK	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
5'GSP1	GCTTTCGCCCTCAGCGACT
5'GSP2	TCTAGCGACTGGTGGAAATGGCT
3'GSP1	CTGCGGTTGTTCCTCCCTT
3'GSP2	TTTCTGTTCACCTCAGCGA
ACTB3	CTGGAAACGGTGAAGGTGACA
ACTB4	GGGAGAGGACTGGGCCATT
3xTag-Fw	ACGACATCGATTACAAGGACG
3xTag-RV	ATCAGCTTCTGCTCGCTATG

FIG. 27

【図 28】

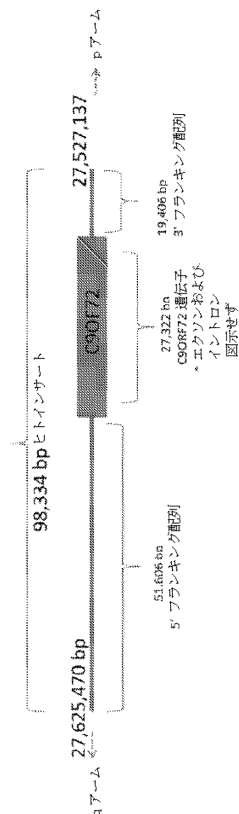
種	抗原	ID #	配列	種	IS	IHC	IF
AS-G ₂ C ₂	ポリ(PA)	H3152	12N-APAPAPAPAPAPACCKKK-アミド	ウサギ	Y	Y	Y
	PA C-末端	H3150	Ac-OYRLRFFSLFSSG-OH	ウサギ	Y	Y	Y
	ポリ(PR)	H3150	Ac-RPRPRPRPRPRPRPRC-アミド	ウサギ	Y	Y	Y
両鎖	PR C-末端	H3152	Ac-CRPRPLRDS-OH	ウサギ	Y	Y	Y
	ポリ(GP)	H3154	H2N-GPGPGPGPGPGPGPGCKK-アミド	マウス	Y	Y	Y
	ポリ(GP)	F3M1	H2N-GPGPGPGPGPGPGPGCKK-アミド	マウス	Y	Y	Y
S-G ₂ C ₂	GP C-末端	H3157	Ac-CRRRRWRVGE-OH	ウサギ	Y	Y	Y
	ポリ(GR)	H3148	Ac-RGRGRGRGRGRGRRC-アミド	ウサギ	Y	Y	Y
	GR C-末端	H3150	Ac-CRVAVVGSAGKRRG-OH	ウサギ	Y	Y	Y
	GA C-末端	H3154	Ac-CGRARGRARGGA-アミド	ウサギ	Y	Y	Y

認識される抗原を含むセンスおよびアンチセンス抗体の要約。同定番号 (ID #)、およびウサギまたはマウスにおける注入のために使用されるペプチド配列。様々な方法による組換えタンパク質の検出を右側に要約する。I B =免疫プロット、I H C =免疫組織化学、I F =免疫蛍光。Y =イエス、N =ノー、A S =アンチセンス、S =センス。

FIG. 28

【図 29】

マウスモデルの製造に使用されるBACインサートのマップ



- 1) BACインサートは、第9染色体上のヒトゲノム参照配列のb p 27, 625, 470から27, 527, 137まで伸張する。
- 2) インサートは約800GGGCCリピートを有する患者からクローニングされた。上のサイズ推定値はこの患者からの部分なリピートを含まない。
- 3) BACインサートDNAは、いくつかのクローン複製物において約800リピートを含有するが、非常に不安定である。
- 4) マウスにおけるBACリピートサイズは約500リピートであるが、これは後代間で変化する。マウスコロニーが拡張し、追加のマウス世代が実験室で繁殖すると、サイズが傾いたり縮んだりしてもよい。
- 5) BAC挿入マウスは、C9orf72遺伝子のセンスおよびアンチセンスパージョンの両方を発現する。

FIG. 29

【図 30】

558KKおよび561KK系統におけるセンス (GGGGCC) RNA発現

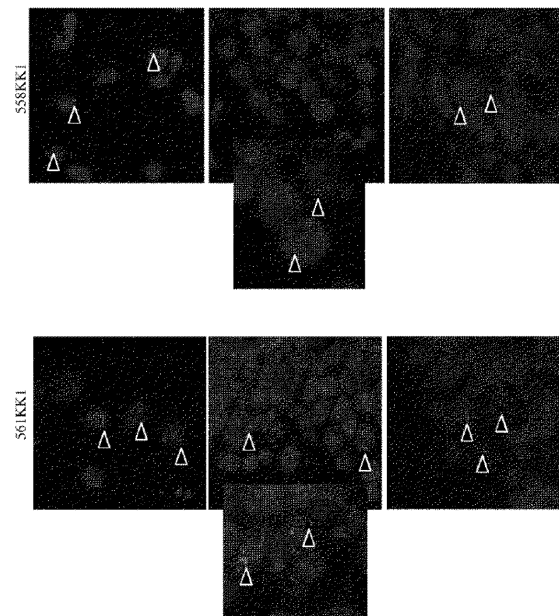


FIG. 30

【図 3 1】

558および561系統におけるAS-RNA凝集 (GCCCC)

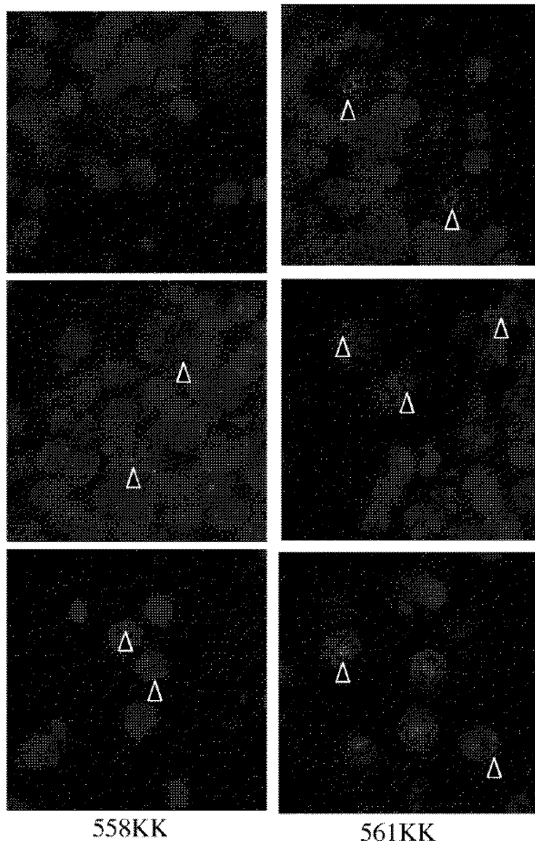


FIG. 31

【配列表】

0006628285000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ローラ・レイナム

アメリカ合衆国32653フロリダ州ゲインズビル、ノースウエスト・フィフティセカンド・レイ
ン6804番

(72)発明者 タオ・ズー

アメリカ合衆国32606フロリダ州ゲインズビル、ノースウエスト・フォーティシックス・ブ
レイス4867番、アパートメント107

審査官 磯田 真美

(56)参考文献 国際公開第2014/116865 (WO, A1)

MORI, K. et al., The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Di-peptide-Re
peat Proteins in FTL/ALS, Sciencexpress, 2013年 2月 7日, pp. 1-6

ASH, P.E.A. et al., Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates I
nsoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS, Neuron, 2013年 2月20日, Vol. 77,
pp. 639-646

SHA, J.S. et al., Treatment implications of C9ORF72, alzheimer's research & therapy,
2012年, Vol. 4, No. 46, pp. 1-7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 — 33/98

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

专利名称(译)	ALS相关的二氨基酸重复序列蛋白		
公开(公告)号	JP6628285B2	公开(公告)日	2020-01-08
申请号	JP2016501032	申请日	2014-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会股份有限公司Retiddo大学		
申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会股份有限公司Retiddo大学		
当前申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会股份有限公司Retiddo大学		
[标]发明人	ローラレイナム タオズー		
发明人	ローラ・レイナム タオ・ズー		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61P21/02 C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/6896 G01N2800/2835 A61K35/28 B01D21/262 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2800/285		
FI分类号	G01N33/68.ZNA C12Q1/68 G01N33/53.D		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/786258 2013-03-14 US 61/883219 2013-09-27 US		
其他公开文献	JP2016515208A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了用于鉴定和/或治疗患有或可能患有肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 或额颞痴呆 (FTD) 的受试者的方法和组合物。 本文还提供了对一种或多种含二氨基酸重复序列的蛋白质具有特异性的抗体。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6628285号 (P6628285)
(45) 発行日 令和2年1月8日 (2020. 1. 8)	(24) 登録日 令和1年12月13日 (2019. 12. 13)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/68 (2006. 01) C 1 2 Q 1/68 (2018. 01) G 0 1 N 33/53 (2006. 01)	F 1 G O 1 N 33/68 Z N A C 1 2 Q 1/68 G O 1 N 33/53 D	
請求項の数 8 (全 83 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-501032 (P2016-501032) (86) (22) 出願日 平成26年3月10日 (2014. 3. 10) (65) 公表番号 特表2016-515208 (P2016-515208A) (43) 公表日 平成28年5月26日 (2016. 5. 26) (86) 国際出願番号 PCT/US2014/022670 (87) 国際公開番号 W02014/159247 (87) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014. 10. 2) (87) 審査請求日 平成29年3月9日 (2017. 3. 9) (31) 優先権主張番号 61/786, 258 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US) (31) 優先権主張番号 61/883, 219 (32) 優先日 平成25年9月27日 (2013. 9. 27) (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(73) 特許権者 507371168 ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファンデーション インコーポレーテ ィッド アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲーンズビ ル グリントー ホール 2 2 3 (74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄 (74) 代理人 100084146 弁理士 山崎 宏 (74) 代理人 100122301 弁理士 富田 憲史	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 A L S 関連シアンノ酸リポド含有タンパク質		