

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-521829

(P2013-521829A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04 ZNA	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B064
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37	4H045
C07K 16/28 (2006.01)	C12N 15/00 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-501365 (P2013-501365)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月22日 (2011. 3. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月6日 (2012. 11. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/029314
 (87) 国際公開番号 W02011/119531
 (87) 国際公開日 平成23年9月29日 (2011. 9. 29)
 (31) 優先権主張番号 61/359, 029
 (32) 優先日 平成22年6月28日 (2010. 6. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/316, 321
 (32) 優先日 平成22年3月22日 (2010. 3. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511234895
 エソテリックス ジェネティック ラボラ
 トリーズ, エルエルシー
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 215, パーリントン, サウス メイ
 ン ストリート 358
 (71) 出願人 512246190
 ナガン, ナラシマーン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01
 560, サウス グラフトン, ダッフ
 オデイル コート 30
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 嚢胞性線維症に関連する突然変異

(57) 【要約】

本発明は、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子 (CFTR) 遺伝子において同定された新規突然変異を提供するものであり、この突然変異は、嚢胞性線維症 (CF) および CF 関連障害のより正確な診断のために用いることができる。CFTR 遺伝子における 1 つ以上の突然変異の存在を決定するために 5 人の被験体から得た試料を検査する方法を提供し、この場合、1 つ以上の突然変異の存在は、その被験体が CF もしくは CF 関連障害を有する、または CFTR 突然変異の保因者であることを示す。

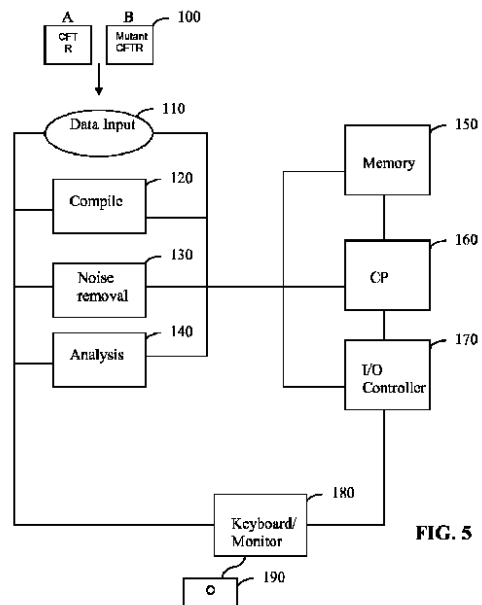


FIG. 5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（CFTR）遺伝子またはタンパク質における表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異の存在を決定するために被験体から得た試料を検査する工程を含む方法であって、前記 1 つ以上の突然変異の存在が、前記被験体が嚢胞性線維症（CF）もしくは CF 関連障害を有するか、CF もしくは CF 関連障害を発症する危険性があるか、または CFTR 突然変異の保因者であることの指標となる、方法。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の突然変異が、表 1、2 または 3 から選択される、請求項 1 に記載の方法

10

【請求項 3】

前記 1 つ以上の突然変異が、表 1 または 2 から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 1 つ以上の突然変異が、表 1 から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の突然変異が、CFTR 突然変異パネルの一部である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が、核酸を含む、前述の請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記検査する工程が、核酸配列決定を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記検査する工程が、ハイブリダイゼーションを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ハイブリダイゼーションが、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される前記 1 つ以上の突然変異に対応する CFTR 遺伝子（配列番号：1）内の領域に特異的な 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを使用し、かつ単一ヌクレオチドミスマッチを許容しないように、十分にストリンジентな条件下で行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ハイブリダイゼーションが、マイクロアレイを用いて行われる、請求項 7 または 8 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記検査する工程が、制限酵素消化を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】

前記検査する工程が、PCR 増幅を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 PCR 増幅が、デジタル PCR 増幅またはリアルタイム PCR である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記検査する工程が、プライマー伸長を含む、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記プライマー伸長が、一塩基プライマー伸長である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記検査する工程が、マルチプレックス対立遺伝子特異的プライマー伸長（ASPE）を行うことを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料が、タンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記検査する工程が、アミノ酸配列決定を含む、請求項 16 に記載の方法。

50

- 【請求項 19】
前記検査する工程が、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異に対応する 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の抗体を使用してイムノアッセイを行うことを含む、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 20】
前記検査する工程が、プロテアーゼ消化を含む、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記プロテアーゼ消化が、トリプシン消化である、請求項 19 に記載の方法。
- 【請求項 22】
前記検査する工程が、2Dゲル電気泳動をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。 10
- 【請求項 23】
前記検査する工程が、質量分析を用いて前記 1 つ以上の突然変異の存在を決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 24】
前記質量分析の形式が、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化、飛行時間型 (MALDI-TOF)、エレクトロスプレー (ES)、IR-MALDI、イオンサイクロロン共鳴 (ICR)、フーリエ変換、およびそれらの組み合わせの中から選択される、請求項 22 に記載の方法。
- 【請求項 25】
前記試料が、細胞、組織、全血、口内洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、頸部洗浄液、およびそれらの組み合わせから得られる、請求項 1 に記載の方法。 20
- 【請求項 26】
CFTR 突然変異についての追加の検査と共に用いられる、請求項 1 に記載の方法。
- 【請求項 27】
正常 CFTR 遺伝子には特異的に結合するが、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR 遺伝子には結合しない核酸プローブ。
- 【請求項 28】
正常 CFTR 遺伝子には特異的に結合するが、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR 遺伝子には結合しない 1 つ以上のプローブを含むアレイ。 30
- 【請求項 29】
表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR 遺伝子には特異的に結合するが、正常 CFTR 遺伝子には結合しない核酸プローブ。
- 【請求項 30】
表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR 遺伝子には特異的に結合するが、正常 CFTR 遺伝子には結合しない 1 つ以上のプローブを含むアレイ。 40
- 【請求項 31】
正常 CFTR タンパク質には特異的に結合するが、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR タンパク質には結合しない抗体。
- 【請求項 32】
表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異を含有する突然変異体 CFTR タンパク質には特異的に結合するが、正常 CFTR タンパク質には結合しない抗体。
- 【請求項 33】
正常 CFTR 遺伝子またはタンパク質と表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 50

つ以上の突然変異を含有する突然変異体 C F T R 遺伝子またはタンパク質とを区別する 1 つ以上の試薬を含むキット。

【請求項 34】

前記 1 つ以上の試薬が、1 つ以上の核酸プローブを含む、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 35】

前記 1 つ以上の試薬が、1 つ以上の抗体を含む、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 36】

前記 1 つ以上の試薬が、マイクロアレイの形態である、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 37】

プライマー伸長のための試薬をさらに含む、請求項 32 に記載のキット。

10

【請求項 38】

健常個体の指標となる対照をさらに含む、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 39】

個体が、C F もしくは C F 関連障害を有するかどうか、C F もしくは C F 関連障害を発症する危険性があるかどうか、または C F T R 突然変異の保因者であるかどうかを決定する方法についての指示をさらに含む、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 40】

表 1、表 2、表 3 および表 4 に示す 1 つ以上の突然変異に対応する情報をコードするコンピュータ可読媒体。

【請求項 41】

20

(a) 被験体から得た試料を提供する工程；

(b) C F T R 遺伝子またはタンパク質における、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される所定の位置での突然変異の存在について、前記試料を検査する工程を含む方法であって、

前記所定の位置での前記突然変異の存在が、前記被験体の C F もしくは C F 関連障害を発症する危険性が増大しているか、または前記被験体が C F T R 突然変異の保因者であることの指標となる、方法。

【請求項 42】

前記検査する工程が、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される前記所定の位置でのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の正体を決定することを含む、請求項 40 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記突然変異の存在が、前記所定の位置でのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の正体を対照と比較することによって決定される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記突然変異が表 1、表 2、表 3 または表 4 に載っているかどうかを決定する工程をさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2010 年 3 月 22 日に提出された米国特許出願第 61/316,321 号、および 2010 年 6 月 28 日に提出された同第 61/359,029 号に対する優先権を主張する。米国特許出願第 61/316,321 号および同第 61/359,029 号の各々の開示は、本明細書にそれらの全体が参考として明確に援用される。

【背景技術】

【0002】

嚢胞性線維症 (C F) は、白人集団における最も一般的で重篤な常染色体劣性障害である。北米では 2,500 人中およそ 1 人の白人産児が C F に罹患する (非特許文献 1)。この疾患発病率は、アフリカ系アメリカ人、ラテンアメリカ人およびアジア人にお

50

るほうが低い。25人中およそ1人の白人は、この疾患の保因者である。その原因遺伝子は、染色体7の長いアーム上に存在する250,000塩基対ゲノム配列に局在定位されている。この配列は、「嚢胞性膜貫通調節因子」（すなわち「CFTR」）と呼ばれる膜結合タンパク質をコードする。CFTR遺伝子は、27のエキソンを含有し、1480アミノ酸のタンパク質をコードする。幾つかの領域がCFTRタンパク質において機能的な重要性を有すると考えられており、それらの領域としては、ヌクレオチド結合ドメイン（NBF）と呼ばれるATP結合のための2つの領域；プロテインキナーゼAおよびCによるリン酸化のための多数の潜在的部位を有する調節（R）領域；および細胞膜と相互作用すると考えられている2つの疎水性領域が挙げられる。

【0003】

古典的嚢胞性線維症の主症状としては、慢性肺疾患、膵外分泌機能不全、男性先天性精管欠損症、および高い汗中電解質レベルが挙げられる。これらの症状は、外分泌障害であるCFと一致する。CF患者細胞の上皮の頂端膜を横断するイオン輸送の分析は最近進歩してきているが、クロライドチャネルの異常調節がこの疾患の唯一の欠陥に相当することは明確でない。CFTR遺伝子における突然変異は、非定型CFならびに単一症候性疾患、例えば男性先天性精管欠損症、特発性慢性膵炎および慢性副鼻腔炎、にも関連している（非特許文献2；非特許文献3）。様々なCFTR遺伝子突然変異が公知である。それらの1つは、第一の推定NBFドメイン内のフェニルアラニン残基508の欠落をもたらす。F508と呼ばれるこの突然変異は、白人患者におけるCFTR染色体の約70%を占めており、白人CF患者の染色体において見出される主ハプロタイプに高度に関連していた（非特許文献4；非特許文献5）。しかし、あまり一般的ではないがF508を伴わない白人CF染色体に関連したハプロタイプも存在し、これは、対立遺伝子異質性がCFおよびCF関連障害に存在することを裏付ける。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Boatら、The Metabolic Basis of Inherited Disease、(1989)第6版、2649-2680頁、McGraw Hill、NY

【非特許文献2】NooneおよびKnowles、Respir. Res.、(2001)第2巻、328頁

【非特許文献3】Southern、Respiration、(2007)第74巻、241頁

【非特許文献4】Keremら、Science、(1989)第245巻、1073頁

【非特許文献5】Lemnaら、New Engl. J. Med.、(1990)第322巻、291頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、白人CF患者の残りの30%に存在する他のCFTR突然変異体対立遺伝子、ならびに他の人種および民族群において見いだされる他の対立遺伝子についての、より有効な遺伝子スクリーニングが必要とされている。そのような対立遺伝子についての知識は、スクリーニングおよび/または検査用のプローブを設計するために、ならびに他のスクリーニングおよび/または検査法を考案するために、用いることができる。CFTR突然変異体対立遺伝子に利用可能なプローブセットが完全であるほど、診断は正確になる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、CFおよびCF関連障害のより正確な診断に用いることができる、CFTR遺伝子において同定された新規突然変異に関する方法、製品およびシステムを提供する。

【0007】

10

20

30

40

50

1つの態様において、本発明は、C F T R 遺伝子における突然変異について検査するための方法を提供し、この方法は、C F T R 遺伝子またはタンパク質における表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異の存在を決定するために被験体から得た試料を検査することを含み、この検査において、前記 1 つ以上の突然変異の存在は、前記被験体が C F もしくは C F T R 関連障害を有するか、C F もしくは C F 関連障害を発症する危険性があるか、または C F T R 突然変異の保因者であることを示す。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1、2 または 3 から選択される。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1 または 2 から選択される。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1 から選択される。一部の実施形態において、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される前記 1 つ以上の突然変異は、C F T R 突然変異のパネルの一部である。

10

【0008】

本発明のさらに他の実施形態は、前記方法を行うためのシステムを含む。例えば、前記システムは、C F T R 遺伝子またはタンパク質における表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異の存在を決定するために被験体から得た試料を検査するためのステーションまたはデバイスを具備することができ、この検査において、前記 1 つ以上の突然変異の存在は、前記被験体が C F もしくは C F T R 関連障害を有するか、C F もしくは C F 関連障害を発症する危険性があるか、または C F T R 突然変異の保因者であることを示す。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1、2 または 3 から選択される。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1 または 2 から選択される。一部の実施形態において、前記 1 つ以上の突然変異は、表 1 から選択される。一部の実施形態において、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される前記 1 つ以上の突然変異は、C F T R 突然変異のパネルの一部である。また、前記システムは、データの分析および/または解釈のためのデバイスを具備することができる。例えば、本発明の突然変異のうちの 1 つの存在についてのデータを分析するためのソフトウェアを有するコンピュータを前記システムに含めることができる。

20

【0009】

以下の実施形態を本発明の方法またはシステムのいずれかにおいて用いることができる。一部の実施形態において、前記試料は、単離された核酸を含有する。一部の実施形態において、前記検査する工程は、核酸配列決定を含む。一部の実施形態において、前記検査する工程は、ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態において、前記ハイブリダイゼーションは、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異に対応する C F T R 遺伝子（配列番号：1）（図 1）内の領域に特異的な 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、および単一ヌクレオチドミスマッチを許容しないように、十分にストリンジентな条件下で行われる。一部の実施形態において、前記ハイブリダイゼーションは、マイクロアレイを用いて行われる。一部の実施形態において、前記検査する工程は、制限酵素消化を含む。一部の実施形態において、前記検査する工程は、P C R 増幅を含む。一部の実施形態において、前記 P C R 増幅は、デジタル P C R 増幅である。一部の実施形態において、前記検査する工程は、プライマー伸長を含む。一部の実施形態において、前記プライマー伸長は、一塩基プライマー伸長である。一部の実施形態において、前記検査する工程は、マルチプレックス対立遺伝子特異的プライマー伸長（*m u l t i p l e x a l l e l e - s p e c i f i c p r i m e r e x t e n s i o n*）（A S P E）を行うことを含む。さらに他の実施形態において、前記検査する工程は、リアルタイム P C R を行うことを含む場合がある。

30

40

【0010】

一部の実施形態において、前記試料は、精製または部分精製タンパク質を含有する。一部の実施形態において、前記検査する工程は、アミノ酸配列決定を含む。例えば、一定の実施形態において、前記システムは、アミノ酸配列決定用のデバイスを含む。一部の実施形態において、前記検査する工程は、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される 1 つ以上の突然変異に対応する 1 つ以上のエピトープを特異的に認識する 1 つ以上の抗体を使用

50

してイムノアッセイを行うことを含む。一部の実施形態において、前記検査する工程は、プロテアーゼ消化（例えば、トリプシン消化）を含む。一部の実施形態において、前記検査する工程は、2Dゲル電気泳動を行うことを含む。

【0011】

一部の実施形態において、前記検査する工程は、質量分析を用いて前記1つ以上の突然変異の存在を決定することを含む。一部の実施形態において、前記質量分析の形式は、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)、エレクトロスプレー(ES)、IR-MALDI、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)、フーリエ変換、およびそれらの組み合わせの中から選択される。

【0012】

一部の実施形態において、前記試料は、細胞、組織、全血、口内洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、頸部洗浄液(transcervical lavage fluid)、およびそれらの組み合わせから得られる。さらなる実施形態において、前記試料は、該試料が含有する胎児核酸における1つ以上のCFTR突然変異の存在について該試料を検査するために、妊婦から得られる。例えば、一定の実施形態において、前記システムは、前記試料を処理するためのステーションを具備する。

【0013】

さらにもう1つの態様において、本発明は、CFTR突然変異についてスクリーニングおよび/または検査するための方法を提供し、この方法は、(a)被験体から得た試料を提供する工程；(b)CFTR遺伝子またはタンパク質における、表1、表2、表3または表4から選択される所定の位置での突然変異の存在について、前記試料を検査する工程を含み、前記所定の位置での突然変異の存在は、前記被験体のCFもしくはCF関連障害を発症する危険性が増大しているか、または前記被験体がCFTR突然変異の保因者であることの指標となる。

【0014】

本発明のさらに他の実施形態は、前記方法を行うためのシステムを含む。例えば、前記システムは、CFTR遺伝子またはタンパク質における表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異の存在を決定するために被験体から得た試料を検査するためのステーションまたはデバイスを具備することができ、この検査において、前記1つ以上の突然変異の存在は、前記被験体がCFもしくはCFTR関連障害を有するか、CFもしくはCF関連障害を発症する危険性があるか、またはCFTR突然変異の保因者であることを示す。一部の実施形態において、前記1つ以上の突然変異は、表1、2または3から選択される。一部の実施形態において、前記1つ以上の突然変異は、表1または2から選択される。一部の実施形態において、前記1つ以上の突然変異は、表1から選択される。一部の実施形態において、表1、表2、表3または表4から選択される前記1つ以上の突然変異は、CFTR突然変異のパネルの一部である。また、前記システムは、データの分析および/または解釈のためのデバイスを具備することができる。例えば、本発明の突然変異のうちの1つの存在についてのデータを分析するためのソフトウェアを有するコンピュータを前記システムに含めることができる。

【0015】

以下の実施形態を本発明の方法またはシステムのいずれかにおいて用いることができる。一部の実施形態において、前記検査する工程は、表1、表2、表3または表4から選択される所定の位置でのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の正体を決定することを含む。

【0016】

一部の実施形態において、前記突然変異の存在は、前記所定の位置でのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の正体を対照と比較することによって決定される。

【0017】

一部の実施形態において、前記方法は、前記突然変異が表1、表2、表3または表4に

10

20

30

40

50

載っているかどうかを決定する工程をさらに含む。

【0018】

もう一つの態様において、本発明は、本明細書に記載する新規CFT R突然変異を検出するための製品、例えば試薬、を提供する。そのような試薬を、タンパク質配列および/または核酸配列における本明細書に記載する突然変異の検出のために使用することができる。

【0019】

一部の実施形態において、本発明は、正常なCFT R遺伝子に特異的に結合するが、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT R遺伝子にはしない核酸プローブを提供する。一部の実施形態において、本発明は、多数のプローブ(例えば、リアルタイムPCRもしくは配列決定のために使用することができるようなもの)、または1つ以上のプローブを含有するアレイを提供し、これらのプローブは、正常なCFT R遺伝子に特異的に結合するが、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT R遺伝子にはしない。一部の実施形態において、本発明は、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT R遺伝子に特異的に結合するが、正常CFT R遺伝子にはしない核酸プローブを提供する。一部の実施形態において、前記アレイは、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT R遺伝子に特異的に結合するが、正常CFT R遺伝子にはしない1つ以上のプローブを含む。

10

【0020】

一部の実施形態において、本発明は、正常なCFT Rタンパク質に特異的に結合するが、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT Rタンパク質にはしない抗体を提供する。一部の実施形態において、本発明は、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT Rタンパク質には特異的に結合するが、正常CFT Rタンパク質には結合しない抗体を提供する。

20

【0021】

一部の実施形態において、本発明は、正常CFT R遺伝子またはタンパク質と表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFT R遺伝子またはタンパク質とを識別する1つ以上の試薬を含むキットを提供する。そのようなキットは、例えばCFT R突然変異についてのスクリーニングおよび/または検査に、有用であり得る。一部の実施形態において、前記1つ以上の試薬は、1つ以上の核酸プローブを含む。一部の実施形態において、前記1つ以上の試薬は、1つ以上の抗体を含む。一部の実施形態において、前記1つ以上の試薬は、マイクロアレイの形態で備えられる。一部の実施形態において、前記キットは、プライマー伸長用の試薬をさらに含む。または、突然変異の検出用のプローブを備えさせることができる。一部の実施形態において、前記キットは、健常個体の指標となる対照をさらに含む。一部の実施形態において、前記キットは、個体が、CFもしくはCF関連障害を有するかどうか、CFもしくはCF関連障害を発症する危険性があるかどうか、またはCFT R突然変異の保因者であるかどうかを決定する方法についての指示を含む。

30

40

【0022】

さらにもう一つの態様において、本発明は、表1、表2、表3および表4に示す1つ以上の突然変異に対応する情報をコードするコンピュータ可読媒体を提供する。そのようなコンピュータ可読媒体は、本明細書に記載のシステムの一部であり得る。

【0023】

本発明の他の特徴、目的および利点は、後続の詳細な説明およびクレームでわかる。しかし、詳細な説明、図面およびクレームは、本発明の実施形態を示すものであるが、限定としてではなく単に実例として与えるものである。本発明の範囲内の様々な変更および変形が当業者に明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

50

【図 1 - 5 0】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 1】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 2】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 3】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 4】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 5】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 1 - 5 6】図 1 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子のゲノム配列である。

【図 2 - 1】図 2 は、本発明の実施形態による C F T R の c D N A 配列である。

【図 2 - 2】図 2 は、本発明の実施形態による C F T R の c D N A 配列である。

【図 2 - 3】図 2 は、本発明の実施形態による C F T R の c D N A 配列である。

【図 3】図 3 は、本発明の実施形態による C F T R のアミノ酸配列である。

【図 4 - 1】図 4 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子の 5' 末端のヌクレオチド配列である。

【図 4 - 2】図 4 は、本発明の実施形態による C F T R 遺伝子の 5' 末端のヌクレオチド配列である。

【図 5】図 5 は、本発明の実施形態によるシステムの略図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

定義

本発明をより容易に理解するために、一定の用語を先ず定義する。以下の用語および他の用語についての追加の定義を本明細書中いたるところに示す。

【0026】

本願において、「または」の使用は、別の言明がない限り、「および/または」を意味する。本願において用いる場合、用語「含む (comprise)」およびこの用語の語尾変化形、例えば「含む (動名詞形: comprising)」および「含む (三人称単数現在形: comprises)」は、他の添加物、成分、整数または工程を除外しないためのものである。本願において用いる場合、用語「約」および「おおよそ」は、同義語として用いる。約/おおよそを伴うまたは伴わない、本願において用いるいずれの数詞も、当業者によって理解されている任意の通常のゆらぎをカバーすることを意図したものである。一定の実施形態において、用語「おおよそ」または「約」は、別の言明がない限り、または別様に文脈から明白でない限り (そのような数値が、可能な値の 100% を超える場合を除き)、言明する参照値の両方向に (より大きいまたはより小さい) 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満の範囲内に入る値の範囲を指す。

【0027】

抗体: 本願において用いる場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされている 1 つ以上のポリペプチドから成るポリペプチドを指す。認知されている免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、典型的にカッパまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、典型的にガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、そしてまたこれらが、免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D および I g E をそれぞれ規定する。典型的な免疫グロブリン (抗体) 構造単位が四量体を構成することは公知である。各四量体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一のペアから成り、各ペアは、1 本の「軽」鎖 (約 25 k D) および 1 本の「重」鎖 (約 50 ~ 70 k D) を有する。各鎖の N 末端は、抗原認識を主として担当する約 100 から 110 以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語「可変軽鎖」(V L) および「可変重鎖」(V H) は、これらの軽および重鎖をそれぞれ指す。抗体は、特定の抗原に特異的であることができる。抗体またはその抗原は、分析物または結合パートナーのいずれか

10

20

30

40

50

であり得る。抗体は、インタクト免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼでの消化によって生成される多数の十分に特性づけされたフラグメントとして、存在する。従って、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域内のジスルフィドリンケージより下で抗体を消化して $F(ab')_2$ を生成し、この $F(ab')_2$ は Fab の二量体であり、この Fab は、それ自体、ジスルフィド結合によって $VH-CH1$ に連結されている軽鎖である。 $F(ab')_2$ を穏やかな条件下で還元して、ヒンジ領域内のジスルフィドリンケージを破壊し、それによってその $F(ab')_2$ 二量体を Fab' 単量体に変換することができる。 Fab' 単量体は、本質的に、ヒンジ領域の一部を伴う Fab である（抗体フラグメントのより詳細な説明については、*Fundamental Immunology*、W. E. Paul 編、Raven Press、N. Y. (1993) を参照のこと）。様々な抗体フラグメントが、インタクト抗体の消化の点から定義されているが、化学的にまたは組換え DNA 方法論を利用することによってそのような Fab' フラグメントを新たに合成できることは当業者には理解されるであろう。従って、用語「抗体」は、本願において用いる場合、全長抗体の修飾によって生成された抗体フラグメント、または組換え DNA 方法論を用いて新たに合成された抗体フラグメントも含む。一部の実施形態において、抗体は、可変重および軽鎖が互いに（直接またはペプチドリンカーによって）連結されて連続ポリペプチドを形成する一本鎖 $Fv(scFv)$ 抗体などの一本鎖抗体である。一本鎖 Fv （「 $scFv$ 」）ポリペプチドは、直接連結されているまたはペプチドをコードするリンカーによって連結されている VH をコードする配列と VL をコードする配列とを含む核酸から発現され得る、共有結合型 $VH::VL$ ヘテロ二量体である（例えば、Hustonら (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*、85:5879-5883 を参照；この全内容は参照により本明細書に援用されている）。抗体 V 領域からの自然に凝集した、しかし化学的に分離された軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造と実質的に同様の三次元構造にフォールディングすることとなる $scFv$ 分子に変換するために、多数の構造が存在する。例えば、米国特許第 5,091,513 号および同第 5,132,405 号および同第 4,956,778 号を参照のこと。

【0028】

対立遺伝子：本願において用いる場合、用語「対立遺伝子」は、同じ遺伝子座（例えば遺伝子）のヌクレオチド配列の異なるバージョンを指す。

【0029】

対立遺伝子特異的プライマー伸長 (ASPE)：本願において用いる場合、用語「対立遺伝子特異的プライマー伸長 (ASPE)」は、対応する DNA 配列にハイブリダイズするプライマーであって、そのようなプライマーの 3' 末端ヌクレオチドのハイブリダイゼーション成功に依存して伸長されるものであるプライマーを利用する、突然変異検出方法を指す。典型的に、ターゲット配列との完全マッチを生じさせる 3' 末端ヌクレオチドを有する伸長プライマーを伸長させて、伸長生成物を形成する。修飾ヌクレオチドを伸長生成物に組み込むことができ、そのようなヌクレオチドは、検出のために伸長生成物を有効に標識する。あるいは、そうではなく、伸長プライマーは、ターゲット配列とのミスマッチを生じさせる 3' 末端ヌクレオチドを含むことがある。この場合、プライマー伸長は、伸長に用いられるポリメラーゼがエキソヌクラーゼ活性を偶発的に有さない限り起こらない。

【0030】

増幅：本願において用いる場合、用語「増幅」は、ターゲット核酸をコピーするための方法であって、その結果、選択核酸配列のコピー数を増加させるものである当該技術分野において公知の任意のコピー方法を指す。増幅は、指数関数的であることもあり、または線形であることもある。ターゲット核酸は、DNA または RNA のいずれであってもよい。典型的に、このようにして増幅された配列は、「アンプリコン」を形成する。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）、転写ベースの増幅、等温増幅、ローリングサークル増幅などをはじめとする（しかしこれらに限定されない）様々な方法で遂行することができる。プライマーペアの相対的に類似した量のそれぞれのプライマーを用いて増幅を行

10

20

30

40

50

って、二本鎖アンプリコンを生じさせることができる。しかし、当該技術分野において周知であるように（例えば、Poddarら、Molec. And Cell. Probe 14:25-32(2000)）、非対称PCRを用いて、主としてまたは排他的に一本鎖生成物を増幅することができる。これは、それぞれのプライマーペアを、一方のプライマーの濃度をそのペアの他方のプライマーに対して有意に低減させること（例えば、100倍の差）によって使用して、果たすことができる。非対称PCRによる増幅は、一般に線形である。加えて、リアルタイムPCRなどの方法を利用することができる。当業者は、異なる増幅法と一緒に用いることができることがわかるであろう。

【0031】

動物：本願において用いる場合、用語「動物」は、動物界の任意の構成員を指す。一部の実施形態において、「動物」は、任意の発育段階のヒトを指す。一部の実施形態において、「動物」は、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。一定の実施形態において、前記非ヒト動物は、哺乳類（例えば、齧歯動物、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および/またはブタ）である。一部の実施形態において、動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、および/または蠕虫が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物、および/またはクローンであり得る。

10

【0032】

おおよそ：本願において用いる場合、用語「おおよそ」または「約」は、関心のある1つ以上の値に適用するとき、言明する参照値に類似している値を指す。一定の実施形態において、用語「おおよそ」または「約」は、別の言明がない限り、または別様に文脈から明白でない限り（そのような数値が、可能な値の100%を超える場合を除き）、言明する参照値の両方向に（より大きいまたはより小さい）25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満の範囲内に入る値の範囲を指す。

20

【0033】

生体試料：本願において用いる場合、用語「生体試料」は、生物源から得られる任意の試料を包含する。生体試料としては、非限定的例として、血液、羊水、血清、尿、糞便、表皮試料、皮膚試料、チークスワブ、精液、羊水、培養細胞、骨髄試料および/または絨毛膜絨毛を挙げることができる。適便な生体試料は、例えば口腔前庭の表面から細胞を擦過採取することによって、得ることができる。用語生体試料は、本明細書に記載の検出のために核酸またはタンパク質を遊離するように処理したまたは別様に利用可能にした試料を包含する。例えば、生体試料としては、生体試料中の細胞からRNAの逆転写によって得たcDNAを挙げることができる。前記生体試料は、胎児、若年成人、成人およびこれらに類するものなどのライフステージから得ることができる。固定または凍結組織も使用することができる。

30

【0034】

保因者：用語「保因者」は、CFに関連して用いる場合、症状のない人であるが、彼の/彼女の子供に伝えられ得るCFTR突然変異を保有する人を指す。典型的に、保因者は、病理性突然変異を含有する1つのCFTR対立遺伝子と、正常であるまたは疾患に関連のない第二の対立遺伝子とを保有する。CFおよびCF関連障害は、「常染色体劣性」疾患であり、これは、突然変異が、非疾患関連対立遺伝子を伴うヘテロ接合構造で存在するとき表現型効果を殆どまたはまったく生じさせないが、人が、ホモ接合性である、すなわち両方のCFTR対立遺伝子が同じ病理性突然変異を含有する突然変異体対立遺伝子である、または複合ヘテロ接合性である、すなわち両方のCFTR対立遺伝子が2つの異なる病理性突然変異を含有する突然変異体対立遺伝子である、とき「疾病状態」を生じさせることを意味する。保因者ステータスは、ある人が保因者であるか否かである。

40

【0035】

コード配列対非コード配列：本願において用いる場合、用語「コード配列」は、転写お

50

よび/または翻訳されて、mRNAをおよび/またはそのポリペプチドもしくはそのポリペプチドのフラグメントについてのmRNAを生成させることができる、核酸もしくはその補体の配列、またはそれらの一部を指す。コード配列は、細胞の生化学的機構によって互いに連結されて成熟mRNAを生じさせる、ゲノムDNAまたは未成熟一次RNA転写産物内のエキソンを含む。アンチセンス鎖は、そのような核酸の補体であり、コード配列をそこから推論することができる。本願において用いる場合、用語「非コード配列」は、インビボでアミノ酸に転写されない、またはtRNAがアミノ酸を配置するように相互作用しないもしくはアミノ酸を配置するように試みない、核酸もしくはその補体の配列、またはその一部を指す。非コード配列は、ゲノムDNAまたは未成熟一次RNA転写産物内のイントロン配列と、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなどのような遺伝子付随配列の両方を含む。

10

【0036】

補体：本願において用いる場合、用語「補体」、「相補的」および「相補性」は、ワトソン/クリック対合規則によるヌクレオチド配列の対合を指す。例えば、配列5'-GCGGTCCCA-2'は、5'-TGGGACCGC-3'の相補的配列を有する。相補的配列は、DNA配列に相補的なRNAの配列である場合もある。天然核酸において一般に見いだされない一定の塩基が、イノシン、7-デアザグアニン、ロックド核酸(LNA)およびペプチド核酸(PNA)をはじめとする(しかしこれらに限定されない)相補的核酸の中に含まれていることがある。補体は、完全である必要はない;安定したデュプレックスが、ミスマッチ塩基対、変性したまたはマッチしていない塩基を含有することもある。核酸技術分野の技術者は、例えばオリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成および配列、イオン強度ならびにミスマッチ塩基対の発生率を含む多数の変数を考慮して、経験的にデュプレックス安定性を決定することができる。

20

【0037】

対照：本願において用いる場合、用語「対照」は、結果を比較する標準物質であるという、その技術分野で了解されている意味を有する。典型的に、対照は、変数を分離することによるそのような変数について推断するための実験において完全性を増大させるために用いられる。一部の実施形態において、対照は、比較対照を得るために検査反応またはアッセイと同時に進行される、反応またはアッセイである。1つの実験では、「検査」(すなわち、検査される変数)を適用する。第二の実験「対照」では、検査される変数を適用しない。一部の実施形態において、対照は、歴史的対照(すなわち、以前に行われた検査もしくはアッセイのもの、または既知である量もしくは結果)である。一部の実施形態において、対照は、印刷されたまたは別様に保存された記録である、または前記記録を含む。対照は、陽性対照であることもあり、または陰性対照であることもある。

30

【0038】

粗製の：本願において用いる場合、用語「粗製の」は、生体試料に関連して用いるとき、実質的に未精製状態試料を指す。例えば、粗製試料は、細胞溶解産物または生検組織試料であり得る。粗製試料は、溶解状態で存在することもあり、または乾燥標本として存在することもある

欠失：本願において用いる場合、用語「欠失」は、天然に存在する核酸から1つ以上のヌクレオチドを除去する突然変異を包含する。

40

【0039】

エピトープ：本願において用いる場合、用語「エピトープ」は、特定の抗体または抗体様タンパク質と接触する、分子または分子化合物(例えば、ポリペプチドもしくはタンパク質複合体)のフラグメントまたは一部分を指す。

【0040】

家族歴：本願において用いる場合、用語「家族歴」は、親および兄弟を含む、個人の直近の血縁関係の家族(immediate family member)に関係する事象(例えば、CF疾患、CF関連障害またはCFTR突然変異保因者)の存在を概して指す。時として、家族歴は、祖父母も含むことがある。

50

【0041】

隣接する：本願において用いる場合、「隣接する」は、プライマーが、ターゲット核酸にハイブリダイズして、該ターゲット上の増幅しようとする関心のある領域と隣り合うことを意味する。好ましいプライマーは、適するDNAポリメラーゼによってヌクレオチドがプライマーの3'末端に付加され得るように、関心のある領域（ターゲット二本鎖DNA分子のそれぞれの鎖に1つ）から3'にハイブリダイズするプライマーのペアであることは、当業者にはわかるであろう。例えば、突然変異体CTFR配列に隣接するプライマーは、実際には該突然変異体配列にアニールするのではなく、むしろ該突然変異体配列と隣り合う配列にアニールする。一部のケースでは、CTFRエキソンに隣接するプライマーは、一般に、該エキソン配列にアニールするのではなく、むしろ該エキソンと隣り合う配列（例えば、イントロン配列）にアニールするように設計される。しかし、一部のケースでは、増幅プライマーがエキソン配列にアニールするように設計され得る。

10

【0042】

遺伝子型：本願において用いる場合、用語「遺伝子型」は、生物の遺伝子構造を指す。より具体的には、この用語は、個体内に存在する対立遺伝子の同一性を指す。個体またはDNA試料の「遺伝子型決定」は、既知多型部位に個体が有する2つの対立遺伝子の、ヌクレオチド塩基の点からの、性質を同定することを指す。

【0043】

ヘテロ接合性：本願において用いる場合、用語「ヘテロ接合性」または「HET」は、同じ遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する個体を指す。本願において用いる場合、用語「ヘテロ接合性」は、「複合ヘテロ接合性」または「複合ヘテロ接合性突然変異体」を包含する。本願において用いる場合、用語「複合ヘテロ接合性」は、2つの異なる対立遺伝子を有する個体を指す。本願において用いる場合、用語「複合ヘテロ接合性突然変異体」は、対立遺伝子の2つの異なるコピーを有する個体を指し、このような対立遺伝子は、遺伝子の突然変異体形態として特徴づけられる。用語「突然変異体」は、本願において用いる場合、突然変異した、またはことによると非機能性の遺伝子形態を指す（「CTFR遺伝子の突然変異」を参照のこと）。

20

【0044】

ホモ接合性：本願において用いる場合、用語「ホモ接合性」は、同じ対立遺伝子の2つのコピーを有する個体を指す。本願において用いる場合、用語「ホモ接合性突然変異体」は、同じ対立遺伝子の2つのコピーを有する個体を指し、このような対立遺伝子は、遺伝子の突然変異体形態として特徴づけられる。用語「突然変異体」は、本願において用いる場合、突然変異した、またはことによると非機能性の遺伝子形態を指す。

30

【0045】

ハイブリダイズ：本願において用いる場合、用語「ハイブリダイズ」または「ハイブリダイゼーション」は、2つの相補的核酸鎖が、適度にストリンジেন্টな条件下で互いにアニールするプロセスを指す。ハイブリダイゼーションに適するオリゴヌクレオチドまたはプローブは、典型的に、長さ10~100ヌクレオチド（例えば、長さ18~50、12~70、10~30、10~24、18~36ヌクレオチド）を有する。核酸ハイブリダイゼーション技術は、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N.Y.を参照のこと。当業者は、少なくとも所望のレベルの相補性を有する配列は安定的にハイブリダイズするが、より低い相補性を有するものはないようにハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーをどのように推定または調整するか承知している。ハイブリダイゼーション条件およびパラメータの例については、例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N.Y.；Ausubel、F.M.ら、1994、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley

40

50

& Sons、Secaucus、N. J. を参照のこと。

【0046】

挿入または付加：本願において用いる場合、用語「挿入」または「付加」は、天然に存在する分子と比較して、それぞれ、1つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドの付加を生じさせる結果となる、アミノ酸またはヌクレオチド配列の変化を指す。

【0047】

インビトロ：本願において用いる場合、用語「インビトロ」は、多細胞生物の体内ではなく、人工的環境で、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養などで、発生する事象を指す。

【0048】

インビボ：本願において用いる場合、用語「インビボ」は、非ヒト動物などの多細胞生物の体内で発生する事象を指す。

【0049】

単離された：本願において用いる場合、用語「単離された」は、(1) (天然にであろうと、および/または実験環境であろうと) 最初に生産されたときに会合していた成分のうち少なくとも一部から分離された、および/または(2) 人の手によって生産、調製および/または製造された、物質および/またはエンティティーを指す。単離された物質および/またはエンティティーは、それらが当初会合していた他の成分の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%、実質的に100%、または100%から分離され得る。一部の実施形態において、単離された薬剤は、約80%より高く、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、実質的に100%、または100%純粋である。本願において用いる場合、物質は、他の成分が実質的にないとき、「純粋」である。本願において用いる場合、用語「単離された細胞」は、多細胞生物に含有されていない細胞を指す。

【0050】

標識された：用語「標識された」および「検出可能薬剤または部分で標識された」は、エンティティー(例えば、核酸プローブ、抗体など)を、例えば別のエンティティー(例えば、核酸、ポリペプチドなど)への結合後に、可視化することができることを明記するために本明細書では交換可能に用いている。測定できるシグナルであって、その強度が結合されたエンティティーの量に関係づけられる(例えば比例する)ものであるシグナルを生じさせるような検出可能薬剤または部分を選択することができる。タンパク質およびペプチドを標識および/または検出するための多種多様なシステムが当該技術分野において公知である。標識されたタンパク質およびペプチドは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的または他の手段により検出可能である標識の組み込みまたは前記標識へのコンジュゲーションによって、調製することができる。標識または標識部分は、直接検出可能であることがある(すなわち、それは、検出可能であるためにいずれのさらなる反応もしくは操作を必要としない; 例えば、蛍光体は直接検出可能である)、または間接的に検出可能であることがある(すなわち、検出可能である別のエンティティーとの反応もしくは結合によってそれを検出可能にする; 例えば、ハプテンは、蛍光体などのレポーターを含む適切な抗体との反応後、免疫染色によって検出可能である)。適する検出可能薬剤としては、放射性核種、蛍光体、化学発光剤、マイクロ粒子、酵素、比色標識、磁性標識、ハプテン、分子ビーコン、アプタマービーコン、およびこれらに類するものが挙げられるが、それらに限定されない。

【0051】

マルチプレックスPCR：本願において用いる場合、用語「マルチプレックスPCR」は、別個のプライマーペアを使用してそれぞれプライミングされる、2つ以上の領域の増幅を指す。

【0052】

マルチプレックスASPE：本願において用いる場合、用語「マルチプレックスASP

10

20

30

40

50

E」は、多型を検出するための、マルチプレックスPCRと対立遺伝子特異的プライマー伸長を併用するアッセイを指す。典型的には、マルチプレックスPCRを用いて、ASPEプライマーのためのターゲット配列としての役割を果たすDNAの領域を先ず増幅する。対立遺伝子特異的プライマー伸長の定義を参照のこと。

【0053】

CFTR遺伝子の突然変異：本願において用いる場合、用語「CFTR遺伝子の突然変異」は、野生型CFTR遺伝子配列と比較して1つ以上の異常な核酸配列を指す。「CFTR遺伝子の突然変異」を「突然変異体CF配列」とも呼ぶ。CFTR遺伝子の突然変異は、置換（例えば、一塩基多型（SNP））、欠失、挿入、付加および/または重複を包含する。

10

【0054】

プライマー：本願において用いる場合、用語「プライマー」は、核酸試料中の相補的配列にハイブリダイズすることができる短い一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。典型的に、プライマーは、テンプレート依存性DNA合成のための開始点としての役割を果たす。デオキシリボヌクレオチドをDNAポリメラーゼによってプライマーに付加させることができる。一部の実施形態において、プライマーへのそのようなデオキシリボヌクレオチド付加は、プライマー伸長としても公知である。用語プライマーは、本願において用いる場合、ペプチド核酸プライマー、ロックド核酸プライマー、ホスホロチオアート修飾プライマー、標識プライマーおよびこれらに類するものを含めて、合成することができるすべての形態のプライマーを含む。PCR反応のための「プライマーペア」または「プライマーセット」は、「フォワードプライマー」および「リバースプライマー」を概して含む1セットのプライマーを概して指す。本願において用いる場合、「フォワードプライマー」は、dsDNAのアンチセンス鎖にアニールするプライマーを指す。「リバースプライマー」は、dsDNAのセンス鎖にアニールする。

20

【0055】

多型：本願において用いる場合、用語「多型」は、1つ以上の形態の遺伝子またはその一部分の共存を指す。

【0056】

純粋なまたは実質的に純粋な：本願において用いる場合、用語「純粋なまたは実質的に純粋な」は、天然に随伴する成分から分離されている化合物、例えばタンパク質またはポリペプチド、を指す。典型的に、化合物は、試料中の全材料の（容量で、湿潤もしくは乾燥重量で、またはモルパーセントもしくはモル分率で）少なくとも10%、さらに好ましくは少なくとも20%、さらに好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも60%、さらに好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%が、関心のある化合物であるとき、実質的に純粋である。純度は、任意の適切な方法により、例えば、ポリペプチドの場合はカラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動またはHPLC分析により、測定することができる。化合物、例えばタンパク質は、天然に会合している成分が本質的にないときも、またはその天然状態ではそれに随伴する生得の不純物から分離されているときも、実質的に精製されている。

30

40

【0057】

リアルタイムPCR：本願において用いる場合、用語「リアルタイムPCR」は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Q-PCR/qPCR/qrt-PCR）またはキネティックポリメラーゼ連鎖反応（KPCR）を指し、PCRに基づく実験室技術であって、ターゲットにしたDNA分子を増幅し、同時に定量するために用いられる。それは、DNA試料中の1つ以上の特異的配列の検出と（コピーの絶対数、またはDNAインプットもしくは追加の正規化用遺伝子に正規化したときの相対量としての）定量の両方を可能にする。

【0058】

センス鎖対アンチセンス鎖：本願において用いる場合、用語「センス鎖」は、機能性タ

50

ンパク質のコード配列の少なくとも一部分を含む、二本鎖DNA (dsDNA) の鎖を指す。本願において用いる場合、用語「アンチセンス鎖」は、センス鎖の逆補体である、dsDNAの鎖を指す。

【0059】

特異的：本願において用いる場合、用語「特異的」は、オリゴヌクレオチドプライマーに関連して用いるとき、適切なハイブリダイゼーションまたは洗浄条件下で、関心のあるターゲットにはハイブリダイズすることができ、関心のない核酸には実質的にハイブリダイズすることができない、オリゴヌクレオチドまたはプライマーを指す。高い配列同一性レベルが好ましく、それらとしては、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%配列同一性が挙げられる。一部の実施形態において、特異的オリゴヌクレオチドまたはプライマーは、ハイブリダイズまたは増幅される核酸の部分と配列同一性の少なくとも4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70塩基またはより多くの塩基を、該オリゴヌクレオチドと該核酸をアラインしたとき、含有する。

10

【0060】

被験体：本願において用いる場合、用語「被験体」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物を指す。被験体は患者であり得、患者は、疾患の診断または処置のために医療従事者に診察を受けに行くヒトを指す。ヒトは、出生前および出生後形態を含む。特に好ましい被験体は、CFTR保因者状態、CF疾患またはCF関連障害状態の存在について検査を受けるヒトである。

20

【0061】

実質的に：本願において用いる場合、用語「実質的に」は、関心のある特性または性質の全またはほぼ全程度または度合を呈示するという質的条件を指す。生物学的および化学的現象は、完了まで行くおよび/または完全まで進むまたは絶対的結果に達するまたは絶対的結果を回避することがあるにせよ滅多にないことは、生物技術分野の当業者にはわかるであろう。従って、用語「実質的に」は、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の潜在的欠如をとらえるために本明細書では用いている。

【0062】

実質的に相補的：本願において用いる場合、用語「実質的に相補的」は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることができる2つの配列を指す。実質的に相補的な配列が、それらの全長に沿ってハイブリダイズする必要がないことは、当業者にはわかるであろう。一部の実施形態において、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、次のものと少なくとも同様にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を指す：50%ホルムアミド、5×SSC、50mM NaH₂PO₄、pH6.8、0.5%SDS、0.1mg/mL超音波処理サケ精子DNAおよび5×デンハルト溶液中、42℃で一晩のハイブリダイゼーション；45℃で2×SSC、0.1%SDSでの洗浄；および45℃で0.2×SSC、0.1%SDSでの洗浄。一部の実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、20連続ヌクレオチドのストレッチに関して2塩基より多く異なる2つの核酸のハイブリダイゼーションを可能にしないはずである。

30

40

【0063】

置換：本願において用いる場合、用語「置換」は、1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドの、それぞれ、その天然に存在する分子と比較して異なるアミノ酸またはヌクレオチドによる置換を指す。

【0064】

に罹患している：疾患、障害および/または病態「に罹患している」個体は、その疾患、障害および/または病態と診断されており、その疾患、障害および/または病態の1つ以上の症状を示す。

【0065】

50

に罹患しやすい：疾患、障害および/または病態「に罹患しやすい」個体は、その疾患、障害および/または病態と診断されていない。一部の実施形態において、疾患、障害および/または病態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害および/または病態の症状を呈示しないことがある。一部の実施形態において、疾患、障害および/または病態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害および/または病態を発症するであろう。一部の実施形態において、疾患、障害および/または病態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害および/または病態を発症しないであろう。

【0066】

野生型：本願において用いる場合、用語「野生型」は、天然に存在する典型的なまたは最も一般的な形態を指す。例えば、野生型CFTR遺伝子またはタンパク質は、天然集団中に存在するCFTR遺伝子またはタンパク質の典型的なまたは最も一般的な形態を指す。本願において用いる場合、「野生型」を「天然に存在する」と交換可能に用いる。一部の実施形態において、野生型CFTR遺伝子またはその遺伝子座は、NCBI GenBank遺伝子座ID M58478 (HUMCFTC) (配列番号：4) (図4)において見つけられるCFTR遺伝子配列を指す。CFTR遺伝子は、染色体7上に位置し、これは、NCBI GenBank遺伝子座AC000111およびAC000061において見つけることができる；これらの内容はそれら全体が参照により本明細書に援用されている。CFTR遺伝子のcDNAは、Audrezetら、Hum. Mutat. (2004) 23(4)、343-357において見つけられる。

10

【0067】

詳細な説明

本発明は、数ある中でも、CFおよびCF関連疾患についてのスクリーニングおよび/または検査の際に嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (CFTR) 遺伝子における新規突然変異を使用する方法、製品およびシステムを提供する。例えば、本明細書において提供する新規突然変異は、CF疾患、CF関連疾患、障害もしくは病態、または保因者ステータスの臨床診断を支援するために、および遺伝子カウンセリングのために(例えば、CFを発症することまたはCFTR突然変異の保因者であることについての個体の危険度の評価のために)使用することができる。本明細書において提供する新規突然変異は、CFTR突然変異のパネルの一部として単独使用することまたは他の公知CFTR突然変異と併用することができる。

20

30

【0068】

本発明の様々な態様を以下のセクションで詳細に説明する。セクションの使用は、本発明を限定することを意図したものではない。各セクションが本発明の任意の態様にあてはまり得る。本願において、「または」の使用は、別の言明がない限り、「および/または」を意味する。

【0069】

CFTR遺伝子における新規突然変異

CFTR遺伝子は、染色体7にマッピングされており、例えば、米国特許第6,201,107号および同第5,776,677号に記載されている；これらの開示は、それら全体が参照により本明細書に援用されている。CFTRゲノム配列は、GenBank Accession番号NC_000007(範囲：117120016...117308718；この全内容が参照により本明細書に援用されている)に記載されている(配列番号：1)(図1)。CFTR遺伝子は、27エキソンを含有する。これらのエキソンに1、2、3、4、5、6a、6b、7、8、9、10、11、12、13、14a、14b、15、16、17a、17b、18、19、20、21、22、23および24という番号をつける。CFTR cDNA配列は、GenBankアクセッション番号AR016032.1に記載されている(配列番号：2)(図2)。

40

【0070】

CFTRタンパク質は、例えば米国特許第5,543,399号に記載されている；こ

50

の開示は、その全体が参照により本明細書に援用されている。CFTRタンパク質配列も GenBank アクセション番号 AAC90840.1 に記載されている（配列番号：3）（図3）。

【0071】

実施例1において説明するように、本願の発明者らは、CFTR遺伝子における様々な新規突然変異を同定した（表5）。CFに罹患していることもしくは家族歴のため保因者である可能性が高いことがわかっていたまたは他のCF検査に基づきCFに罹患している疑いがあった個体から得た、臨床検査のために提出された検体におけるCFTRの配列分析により、これらの突然変異を同定した（表5に載せる臨床適応を参照のこと）。患者試料からのCFTR遺伝子配列を野生型CFTR遺伝子またはタンパク質配列（配列番号：1～3を参照）と比較することにより、突然変異を同定した。表5に示すように、これらの突然変異を保有する患者は、白人、アフリカ系アメリカ人、ラテンアメリカ人およびアジア人を含む異なる民族群からの者であった。従って、これらの突然変異は、非白人人種群からの患者についてのより有効な遺伝子検査の開発に特に有用であり得る。

10

【0072】

本明細書に記載する新規突然変異は、イントロン（例えば、イントロン3、イントロン6a、イントロン11、イントロン14a、イントロン19、イントロン20、イントロン21、およびイントロン23）およびエキソン（例えば、エキソン2、エキソン3、エキソン4、エキソン5、エキソン6a、エキソン6b、エキソン7、エキソン9、エキソン10、エキソン11、エキソン12、エキソン13、エキソン14a、エキソン14b、エキソン15、エキソン16、エキソン17a、エキソン17b、エキソン19、エキソン20、エキソン21、エキソン22、およびエキソン24）内に位置する。前記新規突然変異の一部は、ナンセンス突然変異、すなわち、停止コドンを生じさせる結果となる突然変異である。前記新規突然変異の一部は、ミスセンス突然変異、すなわちアミノ酸置換を生じさせる結果となる突然変異、である。前記新規突然変異の一部は、インフレーム挿入および/または欠失の原因となる。前記新規突然変異の一部は、リーディングフレーム内でのシフトをもたらすような様式で1つ以上のヌクレオチドを欠失させる。前記新規突然変異の一部は、スプライス接合部、例えばコンセンサススプライス部位 ag/gt または他のスプライス部位、の配列を改変させる。従って、本明細書に記載する新規突然変異の大部分は、CFTR遺伝子またはタンパク質発現または機能を破壊する可能性が高い。

20

30

【0073】

「ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007」(Richards SCら、Genetics in Medicine、10:294-300;これは参照により本明細書に援用されている)には、本明細書に記載する新規突然変異を以下のグループに分類するための追加の検査結果および臨床情報と共に、使用することができる配列変異の解釈上のカテゴリーおよび定義が提供されている。

【0074】

グループI：患者は、ACMGガイドラインに従ってカテゴリー2に分類することができる新規配列変化（すなわち、ナンセンス、フレームシフト（FS）、コンセンサススプライス部位 ag/gt）を有する。患者は、別の十分に確立されたCF病因性突然変異（すなわち、F508、W1282Xなど）を有する。患者の適応症は、CFを有する疑いがある、CFに罹患していることがわかっている、または新生児スクリーニングによって同定される。特に関心があるグループI突然変異を表1に示す。これらの突然変異は、CFまたはCF関連疾患、障害もしくは病態を引き起こすと予想される。

40

【0075】

グループIIA：患者は、ACMGガイドラインに従ってカテゴリー3に分類することができる新規配列変化（すなわち、ミスセンス、インフレーム ins/del、他のスプ

50

ライス部位突然変異など)を有する。患者は、別の十分に確立されたCF病因性突然変異(すなわち、F508、W1282Xなど)を有する。患者は、CFを有する疑いがある、CFに罹患していることがわかっている、または新生児スクリーニングで陽性であることによって同定される。グループIIA突然変異を表2に(サブセクション・グループIIAに)示す。

【0076】

グループIIB:患者(Patient)は、ACMGガイドラインに従ってカテゴリー3に分類することができる新規配列変化(すなわち、ミスセンス、インフレームinsertion/deletion、他のスプライス部位突然変異など)を有する。患者は、CFを有する疑いがある、CFに罹患していることがわかっている、または新生児スクリーニングで陽性であることによって同定される。グループIIB突然変異を表2に(サブセクション・グループIIBに)示す。

10

【0077】

グループIII:患者は、ACMGガイドラインに従ってカテゴリー3に分類することができる新規配列変化(すなわち、ミスセンス、インフレーム挿入/欠失、他のスプライス部位突然変異など)を有する。患者は、別の十分に確立されたCF病因性突然変異(すなわち、F508、W1282Xなど)を有する。患者は、CFを有する疑いがある、CFに罹患していることがわかっている、または新生児スクリーニングによって同定される。患者は、臨床的有意性不明の追加の変化(単数または複数)を有する。グループIII突然変異を表3に示す。

20

【0078】

グループIV:上で定義したグループI、IIおよびIII突然変異以外の突然変異。グループIV突然変異を表4に示す。

【0079】

しかし、本発明による新規CFTR突然変異は、表1~4において確認される特異的ヌクレオチドまたはアミノ酸変異に限定されず、表1~4において確認されるいずれかの位置に存在し得る、野生型CFTR遺伝子またはタンパク質配列と比較して、異常な任意のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を包含する。

【0080】

【表 1 - 1】

表 1. グループ I 突然変異

配列変化	突然変異のタイプ	AA変化	民族	他の突然変異	臨床情報	エキソン
1824del A	フレームシフト (FS)	n/a	白人	F508del	22歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	e12
2957del T	FS	n/a	白人	F508del	1歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	e15
4089ins 4	FS	n/a	白人	F508del	7歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	e21
4374+2T >C	スプライス部位突然変異	n/a	1. 白人 2. 白人	1. F508del 2. F508del	患者#1: 45歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。 患者#2: 52歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	i23
3064A>T	ナンセンス	K978X	アフリカ系アメリカ人	Q1042X	26歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となる可能性が高い第二の突然変異Q1042Xを保有した。	e16
246C>G	ナンセンス	Y38X	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	e2

10

20

30

40

【0081】

【表 1 - 2】

グループ I I A						
269C>T	ミスセンス (MS)	A46V	1) 白人 2) 黒人 3) アフリカ系アメリカ人	1) 3849+1219 2G>A 2) F508del 3) なし	患者#1：胎児超音波診断で見つかった異常のため検査を受けた32歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性不明の第二の突然変異（3849+1219 2G>A）を保有した。 患者#2：陽性の新生児スクリーニングについての追跡調査に基づき検査を受けた生後2カ月の患者において突然変異を同定した。この患者は、嚢胞性線維症の原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。 患者#3：陽性の新生児スクリーニングについての親追跡調査として検査を受けた24歳の患者において突然変異を同定した。	e2
2902G>T	MS	D924Y	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者はまた、陽性の汗クロライド試験を有し、およびCFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e15
3814G>A	MS	E1228K	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、境界線の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e19
502G>C	MS	G124R	提供されていない	F508del	生後2カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e4
1520G>T	MS	G463V	白人	F508del	17歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e9

10

20

30

40

【表 1 - 3】

511_513 dup TTA	インフレーション重複	L127dup	白人、 アジア人	W1282X	CFが疑われると診断された新生児において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験として胎便性イレウス、エコー源性的腹部および膵機能不全を含むCFの臨床症状を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (W1282X) を保有した。	e4
978A>T	MS	E282D	1. 提供されていない 2. 提供されていない	1. 3120+1G>A 2) なし	患者#1: 10歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (3120+1G>A) を保有した。 患者#2: CFが疑われると診断された患者であって、CFの家族歴を有する4歳の患者において突然変異を同定した。	e6b
843G>C	MS	Q237H	白人	F508del	生後2カ月のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	e6a
829C>T	MS	L233F	白人	D1152H	陽性の新生児スクリーニングに従って検査し生後1カ月の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (D1152H) を保有した。	e6a
4096- 6C>T	スプライス部位突然変異	なし	白人	F508del	58歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	i21
4375- 7delT	スプライス部位突然変異	なし	白人	F508del	6歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、家族歴、境界線の汗クロライド試験および再発性肺炎を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	i23

10

20

30

40

【0083】

【表 1 - 4】

1586 G>C	MS	S485T	白人	S1235R	2歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、様々なCF表現型を有する個体において報告されている第二の突然変異S1235R(3837T>G)を保有した。	e10
グループ I I B						
875+4G >T	スプライス部位突然変異	n/a	アフリカ系アメリカ人	なし	陽性の新生児スクリーニング検査を有した生後1カ月の患者において突然変異を同定した。	i6a
4005+3 G>T	スプライス部位突然変異	n/a	白人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、40歳の患者において突然変異を同定した。	i20

10

【 0 0 8 4 】

【表 3】

表 3. グループ I I I 突然変異

配列変化	突然変異のタイプ	AA変化	民族	他の突然変異	臨床情報	エキソン
2711T>C	MS	1860T	白人	F508del, E528E	58歳のCFが疑われると診断された女性において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の追加の突然変異（E528E）を保有した。	e14a
3891G>C	MS	L1253F	提供されていない	G85E, L15P	32歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（G85E）および臨床的有意性不明の追加の突然変異（L15P）を保有した。	e20
2524C>T	MS	P798S	アフリカ系アメリカ人	F508del, R74W, G921E, D1270N	5歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の3つの追加の突然変異（R74W, G921E, D1270N）を保有した。	e13
2894G>A	MS	G921E	アフリカ系アメリカ人	F508del, R74W, P798S, D1270N	5歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の3つの追加の突然変異（R74W, P789S, D1270N）を保有した。	e15

10

20

30

【 0 0 8 5 】

【表 4 - 1】

表 4 グループ I V 突然変異

配列変化	突然変異のタイプ	A A 変化	民族	他の突然変異	臨床情報	エキソン
405+102 47C >T	スプライス部位変異の可能性あり	n/a	白人	F508del	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、35歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	i3
405+102 55d e1C	スプライス部位変異の可能性あり	n/a	提供されていない	F508del, 12 4del23bp	10歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の2つの第二の突然変異（F508delおよび124del123）を保有した。	i3
1811+16 43 G>T	スプライス部位変異の可能性あり	n/a	1. ラテンアメリカ人 2. ラテンアメリカ人 3. 提供されていない	1. F508del 2. F508del 3. なし	患者#1：1歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。 患者#2：6歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。 患者#3：生後8カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。	i11
1812- 13A>G	スプライス部位突然変異	n/a	白人	なし	15歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、慢性副鼻腔炎を有した。	i11
2752- 33insA	スプライス部位変異の可能性あり	n/a	アフリカ系アメリカ人	F693L	6歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性不明の第二の突然変異（F693L）を保有した。	i14a
3849+12 192 G>A	スプライス部位変異の可能性あり	n/a	白人	A46V	胎児超音波診断で見つかった異常のため検査を受けた32歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性公知の追加の突然変異（A46V）を保有した。	i19

10

20

30

40

【表 4 - 2】

724G>A	MS	A198T	ラテンアメリカ人	なし	生後4カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。	e6a
3899C>T	MS	A1256V	ガイアナ人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、45歳の患者において突然変異を同定した。	e20
3986C>T	MS	A1285V	提供されていない	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、23歳の患者において突然変異を同定した。	e20
901G>A	MS	E257K	ラテンアメリカ人	なし	4歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、喘息および再発性肺炎を有した。	e6b
392 T>C	MS	F87S	提供されていない	なし	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。	e3
3463T>C	MS	F1111L	ラテンアメリカ人	なし	6歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、喘息を有した。	e17b
1757G>A	MS	G542E	ラテンアメリカ人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、25歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、G542Eの2つのコピーを保有した。	e11
4025G>C	MS	G1298A	アジア人	G970D, Q1352H	先天性精管欠損症を有する34歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性不明の2つの他の突然変異（G970DおよびQ1352H）を保有した。	e21
4129G>T	MS	G1333W	提供されていない	なし	8歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、再発性呼吸器感染症および慢性咳を有した。	e22
663T>G	MS	I177M	白人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。	e5
3200T>C	MS	I1023T	ラテンアメリカ人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。	e17a

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

【表 4 - 3】

4412 T>C	MS	I1427T	アジア人	S1444S	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的に良性である可能性が高いと考えられるもう1つの突然変異(S144S)を保有した。	e24
620A>C	MS	K163T	白人	なし	CFの家族歴を有する32歳の患者において突然変異を同定した。	e4
1738 A>G	MS	K536E	ラテンアメリカ人	I488I	息子が陽性の新生児スクリーニング検査結果を有する19歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的に良性である可能性が高いと考えられるもう1つの突然変異(I1488I)を保有した。	e11
3370A>C	MS	K1080Q	白人	なし	9歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、喘息および成長障害を有した。	e17b
1129 C>T	MS	L333F	アジア人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、37歳の患者において突然変異を同定した。	e7
2383C>T	MS	R751C	白人	2183del AA >G	CF保因者であるパートナーのため検査を受けた36歳の患者において突然変異を同定した。この患者も、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(2183delAA>G)を保有した。	e13
2761del TCT	イン フ レ ム I 欠 失	S877de	白人	F508del , D1152H	陽性の汗クロライド試験を有する生後1カ月の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の2つの第二の突然変異(F508delおよびD1152H)を保有した。	e14b
1106A>G	MS	Y325C	白人	R334W	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、35歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(R334W)を保有した。	e7
622A>G	MS	T164A	白人	なし	生後3カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。	e5

10

20

30

40

CFTR 突然変異の検出

本発明にて開示するCFTR 遺伝子突然変異を検出するために当該技術分野において公知の様々な方法を用いることができる。例えば、以前に同定されたCFTR 遺伝子突然変異を検出するために用いられた方法は、記載されており、本発明との使用に適応可能である。例えば、Audrezetら、「Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms」、Hum Mutat.、2004 April; 23(4): 343-57; S

50

piegelmanおよびLemによる「Method for the detection of multiple genetic targets」と題する、PCT国際公開第2004/040013号A1および対応米国出願第20040110138号；Dunlopらによる「Approaches to identify cystic fibrosis」と題する、米国特許第出願公開第2003/0235834号；およびN. Broudeによる「Novel compositions and methods for carrying out multiple PCR reactions on a single sample」と題する米国特許出願公開第2004/0126760号を参照のこと；これらの各々の内容全体は、参照により本明細書に援用されている。

10

【0088】

核酸分析

一定の実施形態において、本明細書において開示するCFTR遺伝子突然変異は、核酸レベルで検出される。例えば、配列決定、ハイブリダイゼーション、PCR増幅、制限酵素消化、プライマー伸長、例えば一塩基プライマー伸長またはマルチプレックス対立遺伝子特異的プライマー伸長(ASPE)によって、核酸を分析することができる。

【0089】

ゲノムDNA、メッセンジャーRNA、および/またはcDNAを用いて核酸分析を行うことができる。多くの実施形態において、核酸は、生体試料から抽出される。一部の実施形態において、核酸は、増幅せずに分析される。一部の実施形態において、核酸は、当該技術分野において公知の技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR))を用いて増幅され、増幅された核酸は、その後の分析において使用される。プライマーペアの多数のセットを使用して幾つかのアンプリコン(例えば、異なるゲノム領域からのもの)が同時に増幅されるマルチプレックスPCRを利用してもよい。加えて、当該技術分野において公知であるようなリアルタイムPCRなどの方法を用いて核酸分析を行ってもよい。

20

【0090】

一部の実施形態において、核酸は、野生型対立遺伝子についての増幅生成物が突然変異体対立遺伝子のものとサイズの点で異なるような様式で、増幅される。従って、増幅生成物のサイズの差を例えば電気泳動ゲルで検出することにより、特定の突然変異体対立遺伝子の存在または不在を決定することができる。例えば、CFTR遺伝子領域の欠失または挿入は、サイズに基づくアプローチの使用に特に適しているだろう。

30

【0091】

一定の例示的核酸分析法を下で詳細に説明する。

【0092】

対立遺伝子特異的増幅

一部の実施形態において、CFTR遺伝子突然変異は、対立遺伝子特異的増幅アッセイを用いて検出される。このアプローチは、特異的対立遺伝子のPCR増幅(PASA)(Sarkarら、1990 Anal. Biochem. 186:64-68)、対立遺伝子特異的増幅(ASA)(Okayamaら、1989、J. Lab. Clin. Med.、114:105-113)、対立遺伝子特異的PCR(ASPCR)(Wuら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、86:2757-2760)、および増幅困難な突然変異系(ARMS)(Newtonら、1989、Nucleic Acids Res.、17:2503-2516)と様々に呼ばれる。これらの参考文献のそれぞれの全内容は、本明細書に援用されている。この方法は、一塩基置換および微小欠失/挿入に適用可能である。

40

【0093】

例えば、PCRベースの増幅法については、異なる対立遺伝子間の(例えば、野生型対立遺伝子と突然変異体対立遺伝子との)区別ができるように、増幅プライマーを設計することができる。従って、増幅生成物の存在不在を用いて、CFTR遺伝子突然変異が所与の核酸試料に存在するかどうかを決定することができる。一部の実施形態では、増幅生成

50

物の存在がC F T R 遺伝子突然変異を示すように対立遺伝子特異的プライマーを設計することができる。一部の実施形態では、増幅生成物の不在がC F T R 遺伝子突然変異を示すように、対立遺伝子特異的プライマーを設計することができる。

一部の実施形態において、2つの相補的反応が用いられる。一方の反応は、野生型対立遺伝子に特異的なプライマーを利用し(「野生型特異的反応」)、他方の反応は、突然変異体対立遺伝子のためのプライマーを利用する(「対立遺伝子特異的反応」)。これら2つの反応は、共通の第二のプライマーを利用することができる。特定の対立遺伝子(例えば、野生型対立遺伝子または突然変異体対立遺伝子)に特異的なPCRプライマーは、一般に、そのターゲットの一方の対立遺伝子変異体と完全にマッチするが、他方の対立遺伝子(例えば、突然変異体対立遺伝子または野生型対立遺伝子)にはミスマッチする。このミスマッチをプライマーの3'末端に/付近に配置して、完全マッチ対立遺伝子の優先的増幅をもたらすことができる。増幅生成物を一方の反応から検出できるのか、または両方の反応から検出できるのかが、突然変異体対立遺伝子の不在または存在を示す。野生型特異的反応のみからの増幅生成物の検出は、野生型対立遺伝子のみの存在(例えば、野生型対立遺伝子のホモ接合体)を示す。突然変異特異的反応のみからの増幅生成物の検出は、突然変異体対立遺伝子のみの存在(例えば、突然変異体対立遺伝子のホモ接合体)を示す。両方の反応からの増幅生成物の検出は、(例えば、ヘテロ接合体)を示す。本願において用いる場合、このアプローチを「対立遺伝子特異的増幅(A S A)」と呼ぶこととする。

10

【0094】

その接合部を部分的に越えてハイブリダイズするプライマーを使用することにより、対立遺伝子特異的増幅を用いて重複、挿入または逆位を検出することができる。接合部オーバーラップの程度を変えて、特異的増幅を可能にすることができる。

20

【0095】

サイズによって核酸を分離するために(例えば電気泳動によって)ゲルの中を泳動させた核酸のバンドを(例えば、1つ以上の色素で)可視化することによる方法を含めて、当該技術分野において公知の方法により、増幅生成物を調査することができる。

【0096】

対立遺伝子特異的プライマー伸長

一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー伸長(A S P E)アプローチが、C F T R 遺伝子突然変異を検出するために用いられる。A S P Eは、対立遺伝子間の(例えば、突然変異体対立遺伝子と野生型対立遺伝子との)区別ができる対立遺伝子特異的プライマーを伸長反応に利用するので、伸長生成物は、特定の対立遺伝子(例えば、突然変異体対立遺伝子または野生型対立遺伝子)の存在下でのみ得られる。伸長生成物は、例えば、標識されたデオキシリボヌクレオチドを伸長反応に利用することにより、検出可能であり得、または検出可能にすることができる。放射性標識、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識などをはじめとする(しかしこれらに限定されない)任意の様々な標識がこれらの方法での使用に対応できる。一部の実施形態において、ヌクレオチドは、後に検出可能標識を(直接または間接的に)結合させることができるエンティティー、例えば、ストレプトアビジンコンジュゲート型蛍光色素を結合させることができるビオチン分子、で標識される。一部の実施形態において、反応は、例えば同じ伸長反応において多くの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、マルチプレックスで行われる。

30

40

【0097】

一部の実施形態において、伸長生成物は、数ある中でもビーズ、マトリックス、ゲルなどの、固体または半固体支持体にハイブリダイズされる。例えば、伸長生成物に特定の核酸配列(例えば、対立遺伝子特異的プライマーの一部として含まれるもの)でタグ付けすることができる、および固体支持体を「抗タグ」(例えば、前記増幅生成物中のタグに相補的な核酸配列)を取り付けることができる。その固体支持体を用いて伸長生成物を捕捉および検出することができる。例えば、ビーズを選別し、検出することができる。このようにして用いることができる1つのそのようなシステムは、L u m i n e x C o r p o r a t i o nによる嚢胞性繊維状突然変異検出に適応させることができるおよび汎用ビーズ

50

アレイ (TAG-IT (商標)) として市販されている、LUMINEX (商標) MAP システムである (例えば、実施例 2 を参照のこと)。

【0098】

追加の ASPE 法および試薬は、例えば、米国特許出願公開第 2008/013880 3号 A1 に記載されている；この全内容が参照により本明細書に援用されている。

【0099】

単一ヌクレオチドプライマー伸長

一部の実施形態では、1つだけのヌクレオチドが伸長されるようにプライマーを設計する、単一ヌクレオチド伸長 (SNuPE) アッセイが用いられる。このような方法において、プライマーの 3' 末端のすぐ下流 (例えば 3') のヌクレオチドの同一性は既知であり、突然変異体対立遺伝子におけるものは野生型対立遺伝子と比較して異なる。1つの特定の種類のデオキシヌクレオチドだけが標識される (例えば、標識 dATP、標識 dCTP、標識 dGTP、または標識 dTTP) 伸長反応を用いて、SNuPE を実施することができる。従って、検出可能な伸長生成物の存在を、関心のある位置 (例えば、プライマーの 3' 末端のすぐ下流の位置) でのヌクレオチドの同一性の指標として、および従って、その位置での突然変異の存在または不在の指標として、使用することができる。SNuPE は、米国特許第 5,888,819 号；米国特許第 5,846,710 号；米国特許第 6,280,947 号；米国特許第 6,482,595 号；米国特許第 6,503,718 号；米国特許第 6,919,174 号；Piggee, C.R., Journal of Chromatography A 781 (1997), 367-375 頁 (「Capillary Electrophoresis for the Detection of Known Point Mutations by Single-Nucleotide Primer Extension and Laser-Induced Fluorescence Detection」)；Hoogendoorn, B., Human Genetics (1999) 104: 89-93 (「Genotyping Single Nucleotide Polymorphism by Primer Extension and High Performance Liquid Chromatography」) に記載されているように行うことができる；これらのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用されている。

10

20

30

【0100】

一部の実施形態では、突然変異の存在または不在の正確で迅速な検出のためにプライマー伸長を質量分析と併用することができる。Haffら の米国特許第 5,885,775 号 (一塩基多型分析の質量分析による分析)；Koster の米国特許第 7,501,251 号 (質量分析に基づく DNA 診断) を参照のこと；これら両方の教示は参照により本明細書に援用されている。適する質量分析形式としては、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化、飛行時間型 (MALDI-TOF)、エレクトロスプレー (ES)、IR-MALDI、イオンサイクロトロン共鳴 (ICR)、フーリエ変換、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0101】

オリゴヌクレオチド・ライゲーション・アッセイ

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド・ライゲーション・アッセイ (「OLA」または「OL」) が用いられる。OLA は、ターゲット分子の単一鎖の隣接配列にハイブリダイズすることができるように設計される 2 つのオリゴヌクレオチドを利用する。典型的に、前記オリゴヌクレオチドの一方はビオチン化され、他方は、例えばストレプトアビジンコンジュゲート型蛍光部分で、検出可能に標識される。的確な相補的配列がターゲット分子内で見つかけられると、オリゴヌクレオチドは、それらの末端が隣接するようにハイブリダイズし、ライゲーション基質を作り、この基質を捕捉および検出することができる。例えば、Nickersonら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8923-8927、Landegren, U.ら (1988) Science 241: 1077-1080、および米国特許第 4,998,617 号

40

50

を参照のこと；これらの全内容は、それら全体が参照により本明細書に援用されている。

【0102】

ハイブリダイゼーションアプローチ

一部の実施形態において、核酸は、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異に対応するCFTR遺伝子（配列番号：1）内の領域に特異的な1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを使用する、および単一オリゴヌクレオチドミスマッチを許さない十分にストリンジентな条件下での、ハイブリダイゼーションによって分析される。一定の実施形態において、適する核酸プローブは、正常CFTR遺伝子と、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR遺伝子とを区別することができる。例えば、適する核酸プローブは、正常CFTR遺伝子に特異的に結合するが、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR遺伝子にはしない。あるいは、核酸プローブは、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR遺伝子に特異的に結合するが、正常CFTR遺伝子にはしない。本発明のプローブは、表1、表2、表3または表4に載せた1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR対立遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるものを含む。本発明のプローブは、CFTR遺伝子の特定の領域内の正常対立遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができる、従って、正常対立遺伝子と表1、表2、表3または表4に載せた1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR対立遺伝子とを区別することができるものも含む。それ故、例えば、当業者は、個体が特定の対立遺伝子についてホモ接合性であるのか、またはヘテロ接合性であるのかを決定するために本発明のプローブを使用することができよう。

10

20

【0103】

核酸ハイブリダイゼーション技術は、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N.Y.を参照のこと。当業者は、少なくとも所望のレベルの相補性を有する配列は安定的にハイブリダイズするが、より低い相補性を有するものはしないようなハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーをどのように推定または調整するか承知している。ハイブリダイゼーション条件およびパラメータの例については、例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Cold Spring Harbor Press、Plainview、N.Y.；Ausubel、F.M.ら、1994、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Secaucus、N.J.を参照のこと。

30

【0104】

一部の実施形態において、突然変異体または野生型CFTR配列にハイブリダイズするプローブ分子は、増幅生成物中のそのような配列を液相または、さらに好ましくは、固相ハイブリダイゼーションにより検出するために使用することができる。固相ハイブリダイゼーションは、例えばマイクロチップにCFTRプローブを取り付けることによって、果たすことができる。

40

【0105】

核酸プローブは、リボ核酸および/またはデオキシリボ核酸を含むことがある。一部の実施形態において、提供される核酸プローブは、オリゴヌクレオチド（すなわち、「オリゴヌクレオチドプローブ」）である。一般に、オリゴヌクレオチドプローブは、CFTR遺伝子の相同領域に特異的に結合するに足る長さであるが、該プローブと検査される試料との間の1ヌクレオチドの差がハイブリダイゼーションを中断させるに足る短さである。典型的に、オリゴヌクレオチドプローブのサイズは、おおよそ10から100ヌクレオチドまで様々である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドプローブは、長さが15から90、15から80、15から70、15から60、15から50、15から40、15から35、15から30、18から30、または18から26ヌクレオチドまで様

50

々である。当業者には理解されるように、オリゴヌクレオチドプローブの最適な長さは、そのオリゴヌクレオチドプローブが利用され得る特定の方法及び/または条件に依存し得る。

【0106】

一部の実施形態において、核酸プローブは、例えば核酸増幅および/または伸長反応のための、プライマーとして有用である。

【0107】

一部の実施形態において、核酸プローブは、本明細書に記載の検出可能部分で標識される。

【0108】

アレイ

本明細書において言及する様々な方法を、数セットの突然変異を1回の実験で分析および/または検出することを可能にするアレイとの使用に適応させることができる。例えば、本明細書(例えば、表1、表2、表3または表4)に記載する多数の新規CFTR突然変異を同時に分析することができる。加えてまたは代替的に、本明細書(例えば、表1、表2、表3または表4)に記載する1つ以上の新規CFTR突然変異を、当該技術分野において公知の他のCFTR突然変異と一緒に、同時に分析することができる。詳細には、核酸試薬(例えば、プローブ、プライマー、オリゴヌクレオチドなど)の使用を伴う方法は、アレイベースのプラットフォーム(例えば、マイクロアレイ)への適応に特に適している。一部の実施形態において、本明細書(例えば、表1、表2、表3または表4)に記載するCFTR突然変異の検出に特異的な1つ以上のプローブを含有するアレイを設計し、本明細書に記載する様々な方法に適応させることができる。加えてまたは代替的に、本明細書(例えば、表1、表2、表3または表4)に記載するCFTR突然変異の検出に特異的なプローブを、当該技術分野において公知のCFTR突然変異に特異的なプローブと併用することができる。一部の実施形態において、多数のプローブを含有するアレイは、突然変異体パネルとして公知である。例えば、Wallら、「A 31 - mutation assay for cystic fibrosis testing in the clinical molecular diagnostics laboratory」、Human Mutation、1995; 5(4): 333 - 8を参照のこと; この全内容が参照により本明細書に援用されている。他の方法としては、本明細書に記載のCFTR突然変異を検出するためのプローブを用いるリアルタイムPCRの使用を挙げることができる。

【0109】

タンパク質ベースの分析

一定の実施形態において、CFTR突然変異は、タンパク質(またはペプチドもしくはポリペプチドレベル)で検出される、すなわち、CFTR遺伝子突然変異からの遺伝子産物が分析される。例えば、CFTRタンパク質またはそのフラグメントを、アミノ酸配列決定法によって、または本明細書(例えば、表1、2、3もしくは4)に記載する1つ以上の新規突然変異に対応する1つ以上のエピトープを特異的に認識する1つ以上の抗体を使用するイムノアッセイによって、分析することができる。CFTRタンパク質をプロテアーゼ消化(例えば、トリプシン消化)によって分析することもでき、一部の実施形態では、それらの消化されたタンパク質生成物を2Dゲル電気泳動によってさらに分析することができる。

【0110】

突然変異体タンパク質の抗体検出

例えば、正常CFTRタンパク質と突然変異体CFTRタンパク質とを識別することができる特異的抗体を、当該技術分野において公知の任意の様々な方法で利用して、CFTR突然変異を検出することができる。一定の実施形態において、適する抗体は、正常CFTRタンパク質と、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異(one or mutations)を含有する突然変異体CFTRタンパク質とを区別す

10

20

30

40

50

ることができる。例えば、適する抗体は、正常CFTRタンパク質には特異的に結合するが、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTRタンパク質には結合しない。あるいは、適する抗体は、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTRタンパク質には特異的に結合するが、正常CFTRタンパク質には結合しない。

【0111】

特定のエピトープに対する抗体、ポリペプチドおよび/またはタンパク質（例えば、突然変異体もしくは正常CFTRタンパク質）を、当該技術分野における任意の様々な公知の方法を用いて生じさせることができる。例えば、抗体が望まれるエピトープ、ポリペプチドまたはタンパク質を生成し、動物、典型的には哺乳類（例えば、ロバ、マウス、ウサギ、ウマ、ニワトリなど）に注射し、その動物によって生産された抗体をその動物から回収することができる。不死細胞系を用いて関心のある抗体を発現するハイブリドーマを産生させることにより、モノクローナル抗体を生産することもできる。CFTR突然変異を検出するための抗体の生産方法および使用に関するさらなる詳細については、例えば、米国特許第5,776,677号を参照のこと；この全内容が参照により本明細書に援用されている。

10

【0112】

一部の実施形態において、抗体は、本明細書に記載の検出可能部分で標識される。

【0113】

抗体検出方法は当該技術分野において周知であり、それらとしては、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）およびウエスタンブロットが挙げられるが、これらに限定されない。一部のそのような方法は、アレイ形式で行うことに適している。例えば、それぞれがCFTRタンパク質内の異なるエピトープに特異的である様々な異なる抗体をアレイに固定し、ELISAなどのアッセイで使用することができる。

20

【0114】

検出可能部分

一定の実施形態において、本発明に従って使用されるおよび/または本発明によって提供される一定の分子（例えば、核酸プローブ、抗体など）は、1つ以上の検出可能エンティティまたは部分を含む、すなわち、そのような分子は、そのようなエンティティまたは分子で「標識」されている。

30

【0115】

任意の多種多様な検出可能薬剤を本発明の実施に使用することができる。適する検出可能薬剤としては、様々なリガンド、放射性核種；蛍光色素；化学発光剤（例えば；アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタン、およびこれらに類するものなど）；生物発光剤；スペクトル分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）；マイクロ粒子；金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金など）；ナノクラスタ；常磁性金属イオン；酵素；比色標識（例えば、色素、コロイド金、およびこれらに類するものなど）；ビオチン；ジオキシゲニン；ハプテン；および抗血清またはモノクローナル抗体を利用できるタンパク質が挙げられるが、それらに限定されない。

【0116】

一部の実施形態において、前記検出可能部分は、ビオチンである。ビオチンをアビジン（例えば、ストレプトアビジン）に結合させることができ、該アビジンは、概して、それら自体が検出可能である他の部分（例えば、蛍光部分）に（直接または間接的に）コンジュゲートしている。

40

【0117】

他の検出可能部分の一部の非限定的な例を下に記載する。

【0118】

蛍光色素

一定の実施形態において、検出可能部分は、蛍光色素である。多種多様な化学構造および物理的特性の非常に多数の公知蛍光色素が、本発明の実施の際の使用に適する。蛍光検

50

出可能部分をレーザーによって刺激して、放射光を検出器によって捕獲することができる。前記検出器は、その強度を記録する、電荷結合デバイス（CCD）または共焦点顕微鏡であり得る。

【0119】

適する蛍光色素としては、フルオレセインおよびフルオレセイン色素（例えば、フルオレセインイソチオシアニン、すなわちFITC、ナフトフルオレセイン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、すなわちFAM、など）、カルボシアニン、メロシアニン、スチリル色素、オキソノール色素、フィコエリトリン、エリスロシン、エオシン、ローダミン色素（例えば、カルボキシテトラメチル-ローダミン、すなわちTAMRA、カルボキシローダミン6G、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、リサミンローダミンB、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン（TMR）など）、クマリンおよびクマリン色素（例えば、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、アミノメチルクマリン（AMCA）など）、オレゴングリーン色素（例えば、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514など）、テキサスレッド、テキサスレッド-X、SPECTRUM RED（商標）、SPECTRUM GREEN（商標）、シアニン色素（例えば、CY-3（商標）、CY-5（商標）、CY-3.5（商標）、CY-5.5（商標）など）、ALEXA FLUOR（商標）色素（例えば、ALEXA FLUOR（商標）350、ALEXA FLUOR（商標）488、ALEXA FLUOR（商標）532、ALEXA FLUOR（商標）546、ALEXA FLUOR（商標）568、ALEXA FLUOR（商標）594、ALEXA FLUOR（商標）633、ALEXA FLUOR（商標）660、ALEXA FLUOR（商標）680など）、BODIPY（商標）色素（例えば、BODIPY（商標）FL、BODIPY（商標）R6G、BODIPY（商標）TMR、BODIPY（商標）TR、BODIPY（商標）530/550、BODIPY（商標）558/568、BODIPY（商標）564/570、BODIPY（商標）576/589、BODIPY（商標）581/591、BODIPY（商標）630/650、BODIPY（商標）650/665など）、IRDye（例えば、IRD40、IRD700、IRD800など）、ならびにこれらに類するものが挙げられるが、それらに限定されない。適する蛍光色素のより多くの例、ならびに蛍光色素を他の化学エンティティ、例えばタンパク質およびペプチド、にカップリングさせるための方法については、例えば、「The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products」、第9版、Molecular Probes, Inc.、Eugene、ORを参照のこと。蛍光標識剤の好適な性質としては、高いモル吸光係数、高い蛍光量子収率、および光安定性が挙げられる。一部の実施形態において、標識用蛍光体は、スペクトルの紫外（すなわち、400nmより低い）領域ではなく可視（すなわち、400nmと750nmの間の）領域での吸収および発光波長を呈示する。例えば、リアルタイムPCR手順での使用に適する色素としては、SYBRグリーンを挙げることができる。

【0120】

検出可能部分は、1つより多くの化学エンティティ、例えば蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）におけるもの、を含むことがある。共鳴移動は、発光強度の総合的強化をもたらす。例えば、Jurá（1995）Proc. Nat'l Acad. Sci.（USA）92：4347を参照のこと；この全内容は、参照により本明細書に援用されている。共鳴エネルギー移動を果たすために、第一の蛍光分子（「ドナー」蛍光体）は、光を吸収し、励起された電子の共鳴によってそれを第二の蛍光分子（「アクセプター」蛍光体）に移動させる。1つのアプローチでは、ドナー色素とアクセプター色素の両方を互いに連結させ、オリゴプライマーに取り付けることができる。ドナーおよびアクセプター色素を核酸に連結させる方法は、以前に、例えばLeeらの米国特許第5,945,526号に記載されている；この全内容が参照により本明細書に援用されている。使用することがで

10

20

30

40

50

きる色素のドナー/アクセプターペアとしては、例えば、フルオレセイン/テトラメチルローダミン、I A E D A N S /フルオレセイン、E D A N S / D A B C Y L、フルオレセイン/フルオレセイン、B O D I P Y F L / B O D I P Y F L、およびフルオレセイン/Q S Y 7色素が挙げられる。例えば、Leeらの米国特許第5,945,526号を参照のこと。これらの色素の多くが、例えばMolecular Probes Inc. (オレゴン州ユージーン)から、市販されている。適するドナー蛍光体としては、6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(TET)、2'-クロロ-7'-フェニル-1,4-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(VIC)、およびこれらに類するものが挙げられる。

【0121】

10

酵素

一定の実施形態において、検出可能部分は、酵素である。適する酵素の例としては、ELISAの際に使用されるもの、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。他の例としては、ベータ-グルクロニダーゼ、ベータ-D-グルコシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。リンカー基、例えばカルボジイミド、ジイソシアナート、グルタルアルデヒドおよびこれらに類するもの、を使用して、酵素を分子にコンジュゲートさせることができる。

【0122】

20

放射性同位体

一定の実施形態において、検出可能部分は、放射性同位体である。例えば、分子を同位体標識することができ(すなわち、自然界で通常見出される原子質量もしくは質量数とは異なる原子質量もしくは質量数を有する原子によって置換されている1つ以上の原子を含むことができ)、または同位体を分子に取り付けることができる。分子に組み込むことができる同位体の非限定的な例としては、水素、炭素、フッ素、リン、銅、ガリウム、イットリウム、テクネチウム、インジウム、ヨウ素、レニウム、タリウム、ビスマス、アスタチン、サマリウムおよびルテチウムの同位体(すなわち、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I 、 ^{135}I 、 ^{186}Re 、 ^{187}Re 、 ^{201}Tl 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu)が挙げられる。

30

【0123】

一定の実施形態において、シグナル増幅は、標識された dendrimer を検出可能部分として使用して果たされる(例えば、Physiol Genomics、3:93-99、2000を参照;この全内容は、それら全体が参照により本明細書に援用されている)。蛍光標識された dendrimer は、Genisphere (ニュージャージー州モントベール)から入手できる。これらを当該技術分野において公知の方法によってオリゴヌクレオチドプライマーに化学的にコンジュゲートさせることができる。

【0124】

40

キット

一定の実施形態において、本発明は、本発明に従って使用するためのキットを提供する。一般に、本発明のキットは、正常CFTR遺伝子またはタンパク質と、表1、表2、表3または表4から選択される1つ以上の突然変異を含有する突然変異体CFTR遺伝子またはタンパク質とを識別する1つ以上の試薬を含む。例えば、キットは、本明細書に記載の1つ以上の試薬(例えば、試薬の組み合わせ)、および場合により追加の成分を含むことができる。例えば、本発明によるキットは、当該技術分野において周知の他のCFTR突然変異を検出することができる試薬も含むことができる。

【0125】

適する試薬としては、核酸プローブおよび/または抗体もしくはそれらのフラグメントを挙げることができる。一定の実施形態では、適する試薬は、アレイ、例えばマイクロア

50

レイ、またはC F T R突然変異パネルの形態で提供される。

【0126】

一部の実施形態において、提供されるキットは、本明細書に記載する様々な検出法（例えば、配列決定、ハイブリダイゼーション、プライマー伸長、マルチプレックスA S P E、イムノアッセイなど）を行うための試薬をさらに含む。例えば、本発明によるキットは、本明細書に記載する方法において使用するための、例えば、プライマー誘導型増幅（*primer-directed amplification*）による核酸の増幅、E L I S A実験の実施、などのための、緩衝液、酵素および/または試薬を場合により含むことがある。

【0127】

一部の実施形態において、提供されるキットは、健常個体の指標となる対照、例えば、C FまたはC F関連障害と関連づけられるC F T R突然変異を保有しない個体からの核酸および/またはタンパク質試料、をさらに含む。一部の実施形態において、提供されるキットは、公知C F T R突然変異体対立遺伝子（例えば、F 5 0 8）を示す対照をさらに含む。キットは、個体が、C FもしくはC F関連障害を有するかどうか、C FもしくはC F関連障害を発症する危険性があるかどうか、またはC F T R突然変異の保因者であるかどうかを決定する方法についての指示も含有することができる。

【0128】

一部の実施形態では、表1、表2、表3および表4に示す1つ以上の突然変異に対応する情報をコードするコンピュータ可読媒体を提供する。そのようなコンピュータ可読媒体を本発明のキットに含めることができる。

【0129】

システム

1つの実施形態において、本発明は、本発明の分析を行うためのシステムを提供する。従って、1つの実施形態において、本発明は、本明細書に記載する方法についてのプログラミングコードをコードしているコンピュータ可読媒体を含む。また、1つの実施形態において、本発明は、コンピュータ可読媒体と通信しているプロセッサであって、本明細書に記載する方法を行うように設定されたものであるプロセッサを具備するシステムを含むことができる。本発明の様々な実施形態に適するプロセッサおよびコンピュータ可読媒体を、より詳細に下で説明し、図5に図示する。

【0130】

従って、一定の実施形態において、本発明は、少なくとも1つの遺伝子の活性を予測するためのシステムを含み、このシステムは、コンピュータ可読媒体と、該コンピュータ可読媒体と通信しているプロセッサとを具備し、該プロセッサは、少なくとも1つの遺伝子における個々の突然変異の影響を推定するように設定されたものである。前記プロセッサは、一定の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子の一部分についての多数の配列に関するデータを含むデータベースとさらに通信することがあり、この場合、前記プロセッサは、被験体から得た生体試料中の少なくとも1つの遺伝子の一部分に突然変異があるかどうかを決定するために前記少なくとも1つの遺伝子の一部分の核酸および/またはアミノ酸配列と前記少なくとも1つの遺伝子の一部分についての多数の配列に関するデータとを比較するように設定される。

【0131】

他の実施形態において、本発明は、少なくとも1つの遺伝子の活性を予測するためのプログラムコードをコードしているコンピュータ可読媒体を含み、該プログラムコードは、該少なくとも1つの遺伝子における個々の突然変異の影響を推定するためにモデルを適用するためのコードを含む。一定の実施形態において、前記プログラミングコードは、被験体から得た生体試料中の少なくとも1つの遺伝子の一部分に突然変異があるかどうかを決定するために前記少なくとも1つの遺伝子の一部分のアミノ酸および/または核酸配列とデータベースに記憶された前記少なくとも1つの遺伝子の一部分についての多数の配列に関するデータとを比較するように設定されたコードを含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

本発明のシステムおよびコンピュータ可読媒体の一部の実施形態を様々な遺伝子に適用することができる。一定の実施形態において、前記少なくとも1つの遺伝子は、C F T R 遺伝子を含む。

【 0 1 3 3 】

本明細書において述べるように、特定の被験体について評定したときの少なくとも1つの遺伝子の一部分の配列および関心のある生物活性を、多数の被験体について評定したときのアミノ酸および/または核酸配列ならびに生物活性のデータベースと比較することができる。従って、前記システムおよびコンピュータ可読媒体の一部の実施形態において、前記データベースは、前記少なくとも1つの遺伝子の一部分の配列を決定した多数の試料に関して測定したときの生物活性についてのデータを含む。

10

【 0 1 3 4 】

本主題の態様による実施形態をデジタル電子回路部品、コンピュータハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、または前述のものの組み合わせに実装することができる。1つの実施形態において、コンピュータは、プロセッサ（単数または複数）を具備することができる。前記プロセッサは、該プロセッサに連結されたランダム・アクセス・メモリなどのコンピュータ可読媒体を具備することができる、または該コンピュータ可読媒体にアクセスできる。前記プロセッサは、サンプリングルーチンを含む1つ以上のコンピュータプログラムの実行、および本明細書に詳細に記載する分析を生じさせるためのアウトプットの生成に適するプログラミングなどの、メモリに記憶されたコンピュータ実行可能プログラム命令を実行することができる。

20

【 0 1 3 5 】

そのようなプロセッサは、マイクロプロセッサ、デジタル・シグナル・プロセッサ（DSP）、特定用途向け集積回路（ASIC）、フィールドプログラム可能ゲートアレイ（FPGA）、およびステート・マシンを具備することができる。そのようなプロセッサは、プログラム可能電子デバイス、例えば、PLC、プログラム可能割り込みコントローラ（PIC）、プログラム可能論理デバイス（PLD）、プログラム可能読み取り専用メモリ（PROM）、電子的プログラム可能読み取り専用メモリ（EPROMもしくはEEPROM）、または他の同様のデバイスをさらに具備することができる。

【 0 1 3 6 】

そのようなプロセッサは、媒体、例えば、そのプロセッサによって実行されたときに本明細書にプロセッサによって行われるまたは支援されると記載する工程をそのプロセッサに実施させることができる命令を記憶することができる有形コンピュータ可読媒体、を具備することができる、または前記媒体と通信状態にあることができる。コンピュータ可読媒体の実施形態は、ウェブサーバー内のプロセッサなどのプロセッサにコンピュータ可読命令を与えることができるすべての電子、光学、磁気または他の記憶デバイスを含むが、これらに限定されない。媒体の他の例は、フロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、磁気ディスク、メモリーチップ、ROM、RAM、ASIC、設定されたプロセッサ、すべての光学媒体、すべての磁気テープもしくは他の磁気媒体、またはコンピュータプロセッサが読み取ることができる任意の他の媒体を含むが、これらに限定されない。また、様々な他のデバイスは、コンピュータ可読媒体、例えばルーター、私設もしくは公衆ネットワーク、または他の伝送装置を含むことができる。前記プロセッサおよびその処理は、1つ以上の構造のものである場合があり、および1つ以上の構造によって分散される場合がある。前記プロセッサは、本明細書に記載する方法（または方法の部分）のうちの1つ以上を行うためのコードを具備することができる。

30

40

【 0 1 3 7 】

前記システムは、データ・コンパイルング・システム、および分析が進むにつれてユーザーが該システムと対話するための手段を含むことができる。従って、1つの実施形態において、本発明は、多数のアッセイ測定からのデータを読み込むおよび/またはコンパイルする、および/またはデータを順序づける、およびデータをコンピュータに送信するた

50

めのシステム、ならびに分析結果をユーザーに送信するためのシステムを含むことができる。本発明のシステムを、DNAおよび/またはアミノ酸配列決定データの高スループット分析用に設計することができる。従って、1つの実施形態において、前記多数の測定シグナルは、少なくとも1つの細胞タイプから単離された多数の公知DNA配列を含む。

【0138】

図5は、本発明のソフトウェアを具備するシステムにおける情報の流れの実施形態を示す。上で論じたように、コンピュータプロセッサまたはCPUは、例えば、インプットを処理すること、アルゴリズムを実行すること、およびタッチセンシティブ・インプット・デバイスから受け取ったインプットに反応して必要に応じてアウトプットを生じさせることができる、デジタル論理プロセッサを含むことができる。本明細書において詳述するように、そのようなプロセッサは、マイクロプロセッサ、例えばASIC、およびステート・マシン、および/または他の構成要素を含むことができる。そのようなプロセッサは、そのプロセッサによって実行されたとき、そのプロセッサに本明細書に記載する工程を実施させる命令を記憶する媒体、例えばコンピュータ可読媒体、を含む、または前記媒体と通信状態にあることができる。

10

【0139】

従って、1つの実施形態において、起点は、正常CFTR遺伝子(100A)および突然変異体CFTR遺伝子(100B)を含むことができる、データ(100)を含むことができる。前記データが読み込まれたら(110)、必要に応じて任意の標準的な表計算ソフトウェア、例えばMicrosoft Excel、FoxPro、Lotusまたはこれらに類するもの、を使用してそれをコンパイルすること(120)および/または変換することができる。1つの実施形態において、前記データは、各実験のためのシステムに入力される。あるいは、前の試行からのデータがコンピュータメモリ(150)に記憶され、必要に応じて使用される。

20

【0140】

前記分析の各時点で、ユーザーは、キーボード(180)、フロッピー(登録商標)ディスク、リモートアクセス(例えば、インターネット経由)(190)、または他のアクセス手段によって命令をインプットすることができる。ユーザーは、試行のオプション、レポートをプリントアウトすべきかどうか、およびこれらに類することをはじめとする命令を入力することができる。また、各分析工程で、当該技術分野において一般的な記憶デバイス、例えばディスク、ドライブまたはメモリ(150)、を使用してコンピュータにデータを記憶させることができる。当該技術分野において承知されているように、プロセッサ(160)およびI/Oコントローラ(170)は、コンピュータ機能の多数の態様に必要とされる。また、1つの実施形態では、1つより多くのプロセッサが存在し得る。

30

【0141】

ノイズを除去するようにデータを処理することもできる(130)。一部のケースでは、ユーザーは、キーボード(180)、フロッピー(登録商標)ディスクまたはリモートアクセス(190)によって、分析のために変数または制約を、例えばノイズを決定するための閾値として、インプットすることを望むことがある。その後、分析結果を、ユーザーによる見直しのための形式でコンパイルし、提供することができる(140)。

40

【0142】

以下の実施例は、本発明の例証に役立つ。これらの実施例は、いかなる点においても、本発明の範囲を限定するためのものでない。

【実施例】

【0143】

実施例1

CFTR遺伝子における新規突然変異の同定

CF全配列決定アッセイを用いてCFTR遺伝子における新規突然変異を同定した。典型的に、CF全配列決定アッセイのために提出された試料は、CF突然変異パネルにおける検査に情報価値がなかったまたは部分的に情報価値がなかった個体からのものであった

50

。これらの個体としては、1) 特発性慢性膵炎を有する患者；2) 先天性両側精管欠損症 (CBAVD) を有する患者；3) 突然変異分析により陽性/陰性の検査結果を示すカップル；4) 1つの突然変異が同定されたまたは突然変異が同定されなかった、CFに罹患しているまたはCFが疑われる患者；5) まれな家族性突然変異の絶対保因者；6) 他の方法論による突然変異分析が陰性である、CFの家族歴を有する患者；7) CF関連疾患または病態を有する患者が挙げられる。患者遺伝子配列を野生型遺伝子配列と比較することにより、CFTR遺伝子における配列変化を同定した。以前に報告されていないCFTR遺伝子における新規突然変異を表5にまとめる。

【0144】

表5に示すように、これらの新規突然変異を保有する患者は、白人、アフリカ系アメリカ人、ラテンアメリカ人およびアジア人を含む、異なる民族群からの患者であった。前記突然変異の一部は、イントロン(例えば、イントロン3、イントロン6a、イントロン11、イントロン14a、イントロン19、イントロン20、イントロン21、およびイントロン23)内に位置する。前記突然変異の一部は、エキソン(例えば、エキソン2、エキソン3、エキソン4、エキソン5、エキソン6a、エキソン6b、エキソン7、エキソン9、エキソン10、エキソン11、エキソン12、エキソン13、エキソン14a、エキソン14b、エキソン15、エキソン16、エキソン17a、エキソン17b、エキソン19、エキソン20、エキソン21、エキソン22、およびエキソン24)内に位置する。

10

【0145】

表5に示すように、同定された新規突然変異の大部分は、CFTR遺伝子発現および/またはタンパク質機能に影響を及ぼす可能性が高い、コドン変化または改変された遺伝子スプライシング部位を生じさせる結果となる。詳細には、前記突然変異の一部は、ナンセンス突然変異(すなわち、停止コドンの導入を生じさせる結果となると予想される突然変異)である。前記突然変異の一部は、コンセンサススプライス部位 ag/gt に影響を及ぼす。これらの突然変異の一部は、少なくとも1ヌクレオチドの挿入または欠失である。これらの突然変異は、ACMGガイドラインによるとカテゴリ2突然変異であり、CFまたはCF関連疾患、障害もしくは病態の原因となると予想されるタイプのものである。

20

【0146】

一部の突然変異は、ミスセンス突然変異である。一部は、インフレーム挿入および/または欠失の原因となると予測される。一部は、スプライス部位に影響を及ぼす可能性が高い。これらの突然変異は、ACMGガイドラインによるとカテゴリ3突然変異である。

30

【0147】

従って、本明細書において提供する新規突然変異は、保因者検査を含むCFTR検査アッセイにおいてCFまたはCF関連障害を検出するために、単独で用いることができ、または他の公知CF突然変異と併用することができる。

【0148】

【表 5 - 1】

表 5. C F T R 遺伝子における新規突然変異

配列変化	突然変異のタイプ	AA変化	民族	他の突然変異	臨床情報	エキソン
1824del A	フレームシフト (FS)	n/a	白人	F508del	22歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	e12
2957del T	FS	n/a	白人	F508del	1歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	e15
4089ins 4	FS	n/a	白人	F508del	7歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	e21
4374+2T >C	スプライス部位突然変異	n/a	1. 白人 2. 白人	1. F508del 2. F508del	患者#1: 45歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。 患者#2: 52歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	i23
3064A>T	ナンセンス	K978X	アフリカ系アメリカ人	Q1042X	26歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となる可能性が高い第二の突然変異 Q1042X を保有した。	e16
246C>G	ナンセンス	Y38X	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異 (F508del) を保有した。	e2

10

20

30

40

【0149】

【表 5 - 2】

269G>T	ミスセンス (MS)	A46V	1) 白人 2) 黒人 3) アフリカ系アメリカ人	1) 3849+1219 2G>A 2) F508del 3) なし	患者#1：胎児超音波診断で見つかった異常のため検査を受けた32歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性不明の第二の突然変異（3849+1219 2G>A）を保有した。 患者#2：陽性の新生児スクリーニングについての追跡調査に基づき検査を受けた生後2カ月の患者において突然変異を同定した。この患者は、嚢胞性線維症の原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。 患者#3：陽性の新生児スクリーニングについての親の追跡調査として検査を受けた24歳の患者において突然変異を同定した。	e2	10
2902G>T	MS	D924Y	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者はまた、陽性の汗クロライド試験を有し、およびCFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e15	20
3814G>A	MS	E1228K	白人	F508del	生後1カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、境界線の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e19	
502G>C	MS	G124R	提供されていない	F508del	生後2カ月のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e4	30
1520G>T	MS	G463V	白人	F508del	17歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	e9	
511_513dup TTA	インフレーム重複	L127dup	白人、アジア人	W1282X	CFが疑われると診断された新生児において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験として胎便性イレウス、エコー源性の腹部および脾機能不全を含むCFの臨床症状を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（W1282X）を保有した。	e4	40

【表 5 - 3】

978A>T	MS	E282D	1. 提供されていない 2. 提供されていない	1. 3120+1G>A 2)なし	患者#1: 10歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(3120+1G>A)を保有した。 患者#2: CFが疑われると診断された患者であって、CFの家族歴を有する4歳の患者において突然変異を同定した。	e6b	10
843G>C	MS	Q237H	白人	F508del	生後2カ月のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	e6a	
829C>T	MS	L233F	白人	D1152H	陽性の新生児スクリーニングに従って検査し生後1カ月の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(D1152H)を保有した。	e6a	20
4096-6C>T	スプライス部位突然変異	None	白人	F508del	58歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	i21	20
4375-7delT	スプライス部位突然変異	None	白人	F508del	6歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、家族歴、境界線の汗クロライド試験および再発性肺炎を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異(F508del)を保有した。	i23	30
1586G>C	MS	S485T	白人	S1235R	2歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、様々なCF表現型を有する個体において報告されている第二の突然変異S1235R(3837T>G)を保有した。	e10	
875+4G>T	スプライス部位突然変異	n/a	アフリカ系アメリカ人	なし	陽性の新生児スクリーニング検査結果を有した生後1カ月の患者において突然変異を同定した。	i6a	40
4005+3G>T	スプライス部位突然変異	n/a	白人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、40歳の患者において突然変異を同定した。	i20	

【0151】

【表 5 - 4】

2711T>C	MS	I860T	白人	F508del, E528E	58歳のCFが疑われると診断された女性において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の追加の突然変異（E528E）を保有した。	e14a
3891G>C	MS	L1253F	提供されていない	G85E, L15P	32歳のCF既知診断患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（G85E）および臨床的有意性不明の追加の突然変異（L15P）を保有した。	e20
2524C>T	MS	P798S	アフリカ系アメリカ人	F508del, R74W, G921E, D1270N	5歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の3つの追加の突然変異（R74W, G921E, D1270N）を保有した。	e13
2894G>A	MS	G921E	アフリカ系アメリカ人	F508del, R74W, P798S, D1270N	5歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は陽性の汗クロライド試験を有した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）および臨床的有意性不明の3つの追加の突然変異（R74W, P798S, D1270N）を保有した。	e15
405+102 47C >T	スプライス部位突然変異の可能性あり	n/a	白人	F508del	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、35歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の第二の突然変異（F508del）を保有した。	i3
405+102 55d e1C	スプライス部位突然変異の可能性あり	n/a	提供されていない	F508del, 124del23bp	10歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、CFの原因となることが公知の2つの第二の突然変異（F508delおよび124del23）を保有した。	i3

10

20

30

【0152】

40

【表 5 - 5】

1811+16 43 G>T	スプラ イス部 位突然 変異の 可能性 あり	n/a	1. ラテン アメリカ 人 2. ラテン アメリカ 人 3. 提供さ れていな い	1. F508del 2. F508del 3. なし	患者#1: 1歳のCF既知診断患者にお いて突然変異を同定した。この患者は、 陽性の汗クロライド試験を有した。この 患者は、CFの原因となることが公知の 第二の突然変異(F508del)を保有した。 患者#2: 6歳のCF既知診断患者にお いて突然変異を同定した。この患者は、 CFの原因となることが公知の第二の突 然変異(F508del)を保有した。 患者#3: 生後8カ月のCFが疑われる と診断された患者において突然変異を同 定した。	i11	10
1812- 13A>G	スプラ イス部 位突然 変異	n/a	白人	なし	15歳のCFが疑われると診断された患 者において突然変異を同定した。この患 者は、慢性副鼻腔炎を有した。	i11	
2752- 33insA	スプラ イス部 位突然 変異の 可能性 あり	n/a	アフリカ 系アメリ カ人	F693L	6歳のCF既知診断患者において突然変 異を同定した。この患者は、臨床的有意 性不明の第二の突然変異(F693L) を保有した。	i14a	20
3849+12 192 G>A	スプラ イス部 位突然 変異の 可能性 あり	n/a	白人	A46V	胎児超音波診断で見つかった異常のため 検査を受けた32歳の患者において突然 変異を同定した。この患者は、臨床的有 意性公知の追加の突然変異(A46V) を保有した。	i19	30
724G>A	MS	A198T	ラテンア メリカ人	なし	生後4カ月のCFが疑われると診断され た患者において突然変異を同定した。	e6a	
3899C>T	MS	A1256V	ガイアナ 人	なし	保因者であるかどうかを決定するために 検査を受けた、CFの家族歴のない、4 5歳の患者において突然変異を同定した 。	e20	
3986C>T	MS	A1285V	提供され ていない	なし	保因者であるかどうかを決定するために 検査を受けた、CFの家族歴のない、2 3歳の患者において突然変異を同定した 。	e20	40
901G>A	MS	E257K	ラテンア メリカ人	なし	4歳のCFが疑われると診断された患者 において突然変異を同定した。この患者 は、喘息および再発性肺炎を有した。	e6b	
392 T>C	MS	F87S	提供され ていない	なし	生後1カ月のCFが疑われると診断され た患者において突然変異を同定した。	e3	

【表 5 - 6】

3463T>C	MS	F1111L	ラテンアメリカ人	なし	6歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、喘息を有した。	e17b
1757G>A	MS	G542E	ラテンアメリカ人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、25歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、G542Eの2つのコピーを保有した。	e11
4025G>C	MS	G1298A	アジア人	G970D, Q1352H	先天性精管欠損症を有する34歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的有意性不明の2つの他の突然変異(G970DおよびQ1352H)を保有した。	e21
4129G>T	MS	G1333W	提供されていない	なし	8歳のCFが疑われると診断された患者において突然変異を同定した。この患者は、再発性呼吸器感染症および慢性咳を有した。	e22
663T>G	MS	I177M	白人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。	e5
3200T>C	MS	I1023T	ラテンアメリカ人	なし	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。	e17a
4412T>C	MS	I1427T	アジア人	S1444S	保因者であるかどうかを決定するために検査を受けた、CFの家族歴のない、34歳の患者において突然変異を同定した。この患者は、臨床的に良性である可能性が高いと考えられるもう1つの突然変異(S1444S)を保有した。	e24
620A>C	MS	K163T	白人	なし	CFの家族歴を有する32歳の患者において突然変異を同定した。	e4

実施例 2

CFTR 突然変異検出アッセイ

本実施例は、マルチプレックスASPEアッセイを用いて、本明細書に記載する新規嚢胞性線維症突然変異を検出することができることを実証するものである。マルチプレックスASPEは、マルチプレックスPCRと対立遺伝子特異的プライマー伸長を兼ね備えている。マルチプレックスPCRを行って、試料中のゲノムDNAからの本明細書に記載する新規配列変異体を含むCFTR遺伝子内のターゲット領域を増幅する。次に、対立遺伝子特異的プライマーを使用してマルチプレックスプライマー伸長反応を行って、すなわち、前記ターゲット配列と完全補体を形成する3'末端ヌクレオチドを有する伸長プライマーを伸張して、伸長生成物を形成し、検出のために修飾ヌクレオチド(例えば、ピオチン化dCTP)をその伸長生成物に組み込む。あるいは、伸長プライマーは、その代わりに、ターゲット配列とミスマッチを形成する3'末端ヌクレオチドを含むことがある。この場合、プライマー伸長は起こらない。次に、プライマー伸長生成物を、捕捉および検出のために、「抗タグ」配列(タグ配列に相補的な配列)を有する汎用アレイビーズにハイブリダイズさせる。

10

20

30

40

50

【0154】

一部のケースでは、本明細書に記載する新規突然変異を、他の公知CF突然変異、例えば、米国遺伝子学会 (American College of Genetics) および米国産婦人科学会 (American College of Obstetricians and Gynecologists) によって推奨されている突然変異、ならびに他の一般的で臨床的に意義のある突然変異、例えば F508 (エキソン10)、G542X (エキソン11)、G551D (エキソン11)、R117H (エキソン4)、W1282X (エキソン20)、N1303K (エキソン21)、3905insT (エキソン20)、3849+10KbC>T (イントロン19)、G85E (エキソン3)、R334W (エキソン7)、A455E (エキソン9)、1898+1G>A (エキソン12) および/または 2184delA (エキソン13) など、と併せて検出することができる。

10

【0155】

様々なASPEキットを使用して、本明細書に記載する検出方法を行うことができる。例えば、LuminexのTAG-IT (商標) キットおよびData Analysisソフトウェアを修正して、本明細書に記載する1つ以上の新規突然変異を含むCF突然変異のパネルを検出することができる。突然変異検出キットは、非同位体蛍光技術、および結果分析と遺伝子型呼び出しとを自動化するような自動化に対応できる96ウエルアッセイ形式を用いることができる。

20

【0156】

対立遺伝子特異的プライマー

当該技術分野において公知の様々な方法およびソフトウェアを用いて、表5に示す配列変異体およびCFTRゲノム配列 (エキソンおよびイントロン配列を含む) に基づき、対立遺伝子特異的プライマーを設計することができる。汎用タグ配列を対立遺伝子特異的プライマーに付加させることができる。

【0157】

検体およびアッセイ形式

分析すべきゲノムDNAを含有する検体は、次の源 (しかしこれらに限定されない) から得ることができる: 全血 (例えば、EDTA、ACD-A、ACD-B中の全血)、新鮮または凍結組織、羊水、CVS (絨毛膜絨毛試料採取) 組織、培養細胞 (例えば、CVS、羊水、線維芽細胞、POC (妊娠産物))、血斑、臍帯血、口内洗浄液、外部研究所によって抽出されたゲノムDNA。血液および血斑DNA試料を、典型的には、未希釈で5μLインプット容量で試行する。5から200ngの量のDNAをインプットとして使用する。出生前試料および口内洗浄液試料を検査するために、一般に、20ngと150ngの間、例えば、約20ng、25ng、30ng、35ng、40ng、45ng、50ng、55ng、60ng、65ng、70ng、75ng、80ng、85ng、90ng、95ng、100ng、110ng、120ng、130ng、140ngまたは150ngをインプットとして使用する。

30

【0158】

96ウエル・アッセイ・プレートを使用する。2つのゲノムDNA対照を各アッセイプレートに含める。特異的対照をアッセイプレートを通して順次交替させる。各アッセイプレートは、2つのカクテルブランクおよびASPE (対立遺伝子特異的プライマー伸長) 対照も含む。校正用96ウエルフィルタープレートもデータ獲得中に使用する。

40

【0159】

単一ウエルマルチプレックスPCR

コンセンサス隣接イントロン配列を使用して、マルチプレックスPCRを行って、本明細書に記載する突然変異を含有するエキソンを増幅する。一般に、アンプリコンは、サイズが約150bpと600bpの間 (両終点を含む) の範囲である。

【0160】

典型的に、当該技術分野において公知のPCR増幅条件または常例的な実験を用いて最

50

適化 / 修正された PCR 増幅条件を用いて、5 ng ~ 200 ng の DNA を増幅して、多数のアンプリコンを含有する生成物を生成する。

【0161】

PCR 後の酵素的クリーンアップ

PCR 生成物をエキソヌクレアーゼ I およびエビのアルカリホスファターゼで処理して、対立遺伝子特異的プライマー伸長反応に干渉するであろう残留プライマーを除去する。標準的なプロトコル、または当業者によって容易に発展させられる修正プロトコルに従って、PCR 生成物を酵素と共にインキュベートし、その後、酵素を熱不活性化する。

【0162】

単一ウエル対立遺伝子特異的プライマー伸長 (ASPE) 反応

Luminox ビーズセットを使用して、典型的に 100 以下の配列変異体を単一ウエル反応において区別することができる。例えば、タグ配列を有する 1 セットの対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) プライマー (野生型対照 ASO を含む) を使用する。

10

【0163】

当該技術分野において公知のまたは当業者によって容易に修正される PCR 反応条件を用いて、Exo-SAP 処理 PCR 生成物を、タグ付きプライマーとビオチン化 dCPT とを含有する対立遺伝子特異的プライマー伸長反応に付す。

【0164】

汎用アレイ選別および検出

各ビーズをタグ配列 ASPE プライマーに相補的な抗タグ配列とカップリングさせる。従って、存在する場合には任意の ASPE 生成物を遺伝子型分析のために捕捉することができる。各アンプリコンについての野生型対照を含める。野生型対立遺伝子からのシグナルは、各アンプリコンについての対照として役立ち、および検出された突然変異についての対立遺伝子比計算 (典型的に、野生型対立遺伝子のシグナルに対する突然変異体対立遺伝子のシグナルの比を計算することによって得られる) のための情報を提供する。

20

【0165】

ASPE プライマーに対する抗タグを含有する汎用ビーズアレイに ASPE 生成物を添加し、ハイブリダイゼーションのためにインキュベートする。その後、ビーズを捕捉し、ビオチンを含有する一切のハイブリダイズしていない ASPE 生成物を除去するフィルターを用いて、ハイブリダイゼーション反応物を洗浄する。ビーズハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野において公知であり、当業者によって容易に適応され得る。

30

【0166】

ストレプトアビジン R - フィコエリトリンコンジュゲートをそのフィルタープレート上のハイブリダイズした生成物に添加し、室温でインキュベートし、その後、ビーズを選別し、検出する。例えば、修正した LUMINEX (商標) 100 IS (商標) または 200 IS (商標) を使用することができる。LUMINEX (商標) 100 IS (商標) をテキストファイルまたはバーコードからサンプルシートにアップロードすることができる。検出時間は、1 ウエルにつき平均 20 ~ 100 秒である。

40

【0167】

結果

LUMINEX (商標) システムにおいて、結果を <.csv> ファイルとして生じさせ、バッチでエクスポートする。TAG-IT (商標) Data Analysis Software (TDAS) バージョン 6.0 におけるバッチ・アウトプット・ファイル (.csv) を開き、一定の個々に検査された突然変異に関しては対立遺伝子比についての所定のアルゴリズムに基づいて、および残りの突然変異に関してはシグナルの存在または不在に基づいて、結果を自動的に生じさせる。

【0168】

突然変異確認

本明細書に記載する任意の突然変異について陽性の試料を第二のアッセイ試行によって

50

確認することができる。陽性試料を直接DNA配列決定によって確認することもできる。

【0169】

実施例3

嚢胞性線維症配列決定アッセイ

嚢胞性線維症全配列決定アッセイおよび単一エクソン配列アッセイを用いて、直接、患者試料中のCFTR遺伝子における突然変異を検出することができる。嚢胞性線維症全配列決定アッセイおよび単一エクソン配列アッセイは、CFスクリーニングパネルを補足するために用いることもでき、および/または多重突然変異について陽性である試料もしくはCF突然変異検出アッセイにおいて正常な対応物のない試料についての確認アッセイとして役立つように用いることもできる。

10

【0170】

CF全配列決定アッセイは、CFTR遺伝子の全コード領域に加えて各イントロンの3'末端の15bp(e17bについては公知突然変異をカバーするために30bp)および各イントロンの5'の初めの6bpを配列決定する。

【0171】

加えて、前記アッセイは、エクソン2、3欠失、1811+1.6kbでのA>G突然変異、および3849+10kbでのC>T突然変異の同定に有用なイントロン1、3、11および19の部分を含む。典型的に、前記アッセイは、31のアンプリコン:e1、i1、e2、e3、i3、e4、e5、e6a、e6b、e7、e8、e9、e10、e11、e12、e13a、e13b、e14a、e14b、e15、e16、e17a、e17b、e18、e19、i19、e20、e21、e22、e23およびe24、の分析を含む。各アンプリコンは、エクソンの大きなサイズのためアンプリコンが2つのフラグメントに分割される13.1および13.2を除き、エクソンの完全コード領域を含む。CFシグナル・エクソン・配列決定・アッセイは、必要に応じて、個々の塩基でだが、同じプライマーを使用する。

20

【0172】

この実施例におけるCF単一エクソン・配列決定・アッセイで検査した試料としては、1)CF突然変異アッセイ(例えば、実施例2において説明したようなマルチプレックスASPEアッセイ)において陽性の検査結果を有したが、確認を必要とする個体;2)CF全配列決定アッセイにおいて陽性の検査結果を有したので反復検査を必要とする個体;

30

【0173】

検体およびアッセイ形式

分析すべき検体は、次の源(しかしこれらに限定されない)から抽出されるゲノムDNAであり得る:全血(例えば、EDTA、ACD-A、ACD-B中の全血)、血斑、羊水、絨毛膜絨毛試料(CVS)(単一エクソン配列決定のためのみ)、培養細胞(例えば、CVS、羊水、線維芽細胞、POC)、口内洗浄液(単一エクソン配列決定のためのみ)。

40

【0174】

96ウエル形式を用いる。カクテルブランクを各アッセイ時にすべてのアンプリコンについて試行する。

【0175】

PCR増幅

本明細書に記載する突然変異を含有するターゲット領域を、先ず、PCR増幅によって増幅する。典型的に、5ng~200ngのDNAを25μL容量の反応で増幅する。PCRプライマーは、5'UPSタグ-フォワードプライマーのためのUPS1およびリバースプライマーのためのUPS2を含む。表6は、一定の例示的ターゲットエクソンまたはイントロン領域の増幅に使用した例示的プライマーの配列を提示するものである。

50

【 0 1 7 6 】

【 表 6 - 1 】

表 6. プライマー配列

アンプリコン	プライマー名	配列 (5' -3')	アンプリ コン長	配 列 番号
エクソン配列のためのプライマー				
CFエクソン 1	UP1CFe1F	TTTAACCTGGGCAGTGAAG	373	5
	UP2CFe1R	AACCCAACCCATACACA		6
CFエクソン 2	UP1CFe2F	CAAATCAAGTGAATATCTGTTC	316	7
	UP2CFe2R	AGCCACCATACTTGGCTCCTA		8
CFエクソン 3	UP1CFe3F2	CTAAAATATTTGCACATGCAAC	333	9
	UP2CFe3R	TTTCTTAGTGTTTGGAGTTGG		10
CFエクソン 4	UP1CFe4F2	TCATTTTAAGTCTCCTCTAAAG	407	11
	UP2CFe4R	CGATACAGAATATATGTGCCA		12
CFエクソン 5	UP1CFe5F2	AACAAGTGAAGCATGCCAG	394	13
	UP2CFe5R2	GTTGTATAATTTATAACAATAGTG		14
CFエクソン 6 a	UP1CFe6aF2	GGAAGATACAATGACACCTG	353	15
	UP2CFe6aR3	CTGAAGATCACTGTTCTATGC		16
CFエクソン 6 b	UP1CFe6bF3	ATGACTTAAAACCTTGAGCAGT	336	17
	UP2CFe6bR2	GGAAGTCTACCATGATAAACAT		18
CFエクソン 7	UP1CFe7F2	GAGACCATGCTCAGATCTTCC	507	19
	UP2CFe7R	ACTTTTATAACTTCTAGTGAAG		20
CFエクソン 8	UP1CFe8F2	AAGATGTAGCACAATGAGAGTA	268	21
	UP2CFe8R	CAGTTAGGTGTTTAGAGCAA		22

10

20

30

40

【 0 1 7 7 】

【表 6 - 2】

CFエキソン9	UP1CFe9F	GTATACAGTGTAAATGGATCATG	402	23
	UP2CFe9R4	CACCAAATTAAGTTCTTAATAG		24
CFエキソン10	UP1CFe10F	TTCTGCTTAGGATGATAATTGG	479	25
	UP2CFe10R	GCATAGGTCATGTGTTTTATTA		26
CFエキソン11	UP1CFe11F	CAGATTGAGCATACTAAAAGTG	240	27
	UP2CFe11R	TACATGAATGACATTTACAGCA		28
CFエキソン12	UP1CFe12F	GCTACTTCTGCACCACTTTTG	344	29
	UP2CFe12R	CAGTCTGTCTTTCTTTTATTTA		30
CFエキソン13a	UP1CFe13F3	CAAAATGCTAAAATACGAGAC	388	31
	UP2CFe13R5	TCCAGGAGACAGGAGCATC		32
CFエキソン13b	UP1CFe13F4	CTCATGGGATGTGATTCTTT	714	33
	UP2CFe13R2	GATACACCTTATCCTAATCCTA		34
CFエキソン14a	UP1CFe14aF3	ACCACAATGGTGGCATGA	299	35
	UP2CFe14aR	TGTATACATCCCCAAACTATC		36
CFエキソン14b	UP1CFe14bF2	TGGGCATGGGAGGAATAGGTG	228	37
	UP2CFe14bR	TTACAATACATACAAACATAGTGG		38
CFエキソン15	UP1CFe15F2	AAGTAACTTTGGCTGC	416	39
	UP2CFe15R2	CTGCCATTAGAAAACCA		40
CFエキソン16	UP1CFe16F2	AAGTCTATCTGATTCTATTTGC	307	41
	UP2CFe16R2	GTTTTTTTAATAATACAGACATACT		42
CFエキソン17a	UP1CFe17aF3	TGTCCACTITGCAATGTGAA	317	43
	UP2CFe17aR3	CAATAAAGAATCTCAAATAGCTCT		44

10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

【表 6 - 3】

CFエキソン17b	UP1CFe17bF3	TAGTCTTTTTCAGGTACAAG	516	45
	UP2CFe17bR6	CAATGGAAATTCAAAGAAATCACT		46
CFエキソン18	UP1CFe18F6	GAATACTTACTATATGCAGAGCA	416	47
	UP2CFe18R3	GTTCTTCCTCATGCTATTACTC		48
CFエキソン19	UP1CFe19F	GCCCGACAAATAACCAAGTGA	494	49
	UP2CFe19R2	CTAACACATTGCTTCAGGCTA		50
CFエキソン20	UP1CFe20F	AAGGTTGTTTGTCTCCATATAT	544	51
	UP2CFe20R	GCCTATGAGAAAAGTCACT		52
CFエキソン21	UP1 CFe21 F	ACATGGGTGTTTCTTATTTA	428	53
	UP2CFe21 R2	GTTAGGGGTAGGTCCAGT		54
CFエキソン22	UP1CFe22F	GCTTGAGTGTTTTTAACTCTGTG	314	55
	UP2CFe22R	ATGATTCTGTCCCACTGTGC		56
CFエキソン23	UP1CFe23F	GTTCTGTGATATTATGTGTGG	226	57
	UP2CFe23R	CAAGGGCAATGAGATCTTAAG		58
CFエキソン24	UP1CFe24F2	AGTTTCTGTCCCTGCTCT	356	59
	UP2CFe24R	GAGCAAATGTCCCATGTCAAC		60
イントロン配列のためのプライマー				
CFイントロン1	UP1CFin1F2	AATGGTGTTTACCTACCTAGAGAA	250	61
	UP4CFin1R2	CCTCCTCTGATTCCACAAG		62
CFイントロン3	UP3CFin3F3	CTGAGATTCTGTTCTAGGTGTG	366	63
	UP2CFin3R	CCTACACTCAGAACCCATCAT		64

10

20

30

40

【 0 1 7 9 】

【表 6 - 4】

CFイントロン19	UP1CFin19F	TTCAGTTGACTTGTGCATCTTG	223	65
	UP2CFin19R	AATATGTTGAAAGTTAAACAGTG		66
CFイントロン11	UP1CFin11F	GTTACACTATAAAGGTTGTTTTAGAC	292	67
	UP2CFin11R	CACAGTTCCCATATTAATAGAAATG		68
(Seq)	CFe9. SEQ. F	TTTTTAACAGGGATTTGGG	N/A	69
(Seq)	CFe6bF2	GATTGATTGATTGATTGATT	N/A	70
(Seq)	UPS1	GCGGTCGCATAAGGGTCAGT	N/A	71
(Seq)	UPS2	CGCCAGCGTATTCCAGTCA	N/A	72

10

PCR条件は表7に示すとおりである。

【0180】

20

【表7】

表7：CF全配列決定アッセイについてのPCR増幅条件

サイクル	温度(°C)	時間	機能
1	95	5分	酵素の変性
35	95	20秒	dsDNAの変性
	55	20秒	アニーリング
	72	40秒	伸長
1	72	7分	最終伸長
1	8	永遠	終了

30

PCR後の酵素的クリーンアップ

PCR生成物をエキソヌクレアーゼI (Exo) およびエビのアルカリホスファターゼ (SAP) で処理して、配列決定に干渉し得る残留プライマーを除去する。以下のインキュベーション条件を用いる：

30分間 37 (酵素消化)

15分間 99 (酵素不活性化)

保管まで 8 で保持

生成物を、例えば - 80 または - 20 で、保管することができる。

40

【0181】

配列決定

Exo-SAP処理生成物を水で1:2希釈し、3µLを、Big Dye v3.1 (ABI) を含有する7µLのフォワードおよびリバース配列カクテルそれぞれに添加する。二方向配列決定結果を得るために、UPS1プライマーとUPS2プライマーの両方を使用して、各アンプリコンにつき2配列決定反応を行う。遺伝子特異的プライマーを使用する追加のフォワード配列決定反応をエキソン6bおよび9について行って、繰り返し

50

領域を超えて読み取り可能な配列を得る。表 8 に示す条件を用いてサーモサイクラーでサイクル配列決定を行う。

【 0 1 8 2 】

【 表 8 】

表 8 : CF 全配列決定アッセイの配列決定反応についてのサーモサイクラー条件

サイクル	温度(° C)	時間	機能
1	96	1分	酵素の変性
25	96	10秒	dsDNAの変性
	53	5秒	アニーリング
	60	3秒	伸長
1	8	永遠	終了

10

アッセイプレートを、例えば - 8 0 で 2 週間まで、分析されるまたはさらに操作されるまで、保管することができる。

20

【 0 1 8 3 】

配列決定後の精製

Performa DTR Ultra 96 Well Plate (Edge Biosystems) を使用してシーケンス生成物を精製する。配列決定反応物を 1 : 2 希釈し、10 μL を Edge Plate によって精製する。

【 0 1 8 4 】

配列決定試行 : ABI 3730 遺伝子分析装置およびデータ分析

3730 x 1 遺伝子分析装置を用いて 1 kV / 14 秒注入を行う。POP7 ポリマーおよび 50 cm アレイを最適分解のために使用する。典型的な配列決定試行についてのパラメータを表 9 に示す。

30

【 0 1 8 5 】

【表 9】

表 9：典型的な配列決定試行についてのパラメータ

特徴	CF全配列決定についての パラメータ
試行温度	60 ° C
試行前の電圧	15.0Kボルト
試行前の時間	180秒
注入電圧	1.0Kボルト
注入時間	14秒
電圧のステップ数	30
電圧ステップ間隔	15秒
データ遅延時間	240秒
試行電圧	13.4Kボルト
試行時間	2400秒

10

20

SEQSCAPE (商標) ソフトウェア (ABI) を使用してシーケンスデータ分析を行う。

【0186】

等価物

当業者は、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態の多くの等価物を思い出すだろう、または常例的な実験以上のものを用いずにそれらを突きとめることができるだろう。本発明の範囲を上の説明に限定することを意図せず、むしろ本発明の範囲は添付のクレームに示すとおりである。冠詞「a」、「an」および「the」は、本願において本明細書およびクレームにて用いる場合、相反する明確な指示がない限り、複数の指示対象を含むと解釈すべきである。グループの1つ以上の構成員間に「または」を含むクレームまたは説明は、相反する指示がない限り、または別様に文脈から明らかでない限り、前記グループ構成員の1つ、1つより多く、またはすべてが、所与の生成物またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している場合、履行されると考えられる。本発明は、前記グループのまさに1つの構成員が、所与の生成物またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している実施形態を含む。本発明は、前記グループ構成員の1つより多く、またはすべてが、所与の生成物またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している実施形態も含む。さらに、本発明は、別の指示がない限り、または矛盾もしくは不一致が生ずることが当業者に明らかでない限り、1つ以上のクレームからの1つ以上の制限、要素、節、記述的用語などが同じ基本クレーム（または、関連性がある場合には、任意の他のクレーム）に従属する別のクレームに導入される変型、組み合わせおよび順序を包含すると解釈しなければならない。要素がリストとして、例えばマーカッシュグループまたは類似の形式で、提示されている場合、前記要素の各サブグループも開示されていると、および任意の要素（単数または複数）が前記グループから除去され得ると解釈しなければならない。一般に、本発明、または本発明の態様、が特定の要素、特徴などを含むと言われている場合、本発明の一定の実施形態または本発明の態様は、そのような要素、特徴などから成る、または本質的に成る。明快さのために、それらの実施

30

40

50

形態は、あらゆるケースに関して、本明細書に具体的に示されていない。本発明のいずれの実施形態も、例えば先行技術の中で見つけられるいずれの実施形態も、具体的な除外が本明細書において述べられているかどうかにかかわらず、本請求項から明示的に除外される場合があることも理解すべきである。

【0187】

相反する明確な指示がない限り、1つより多くの行為を含む本願において特許請求するいずれの方法においても、前記方法の行為の順序は、前記方法の行為が列挙されている順序に必ずしも限定されず、本発明は、前記順序がそのように限定されない実施形態を含むことも理解すべきである。さらに、本クレームが組成物を述べるものである場合、本発明は、該組成物の使用方法および該組成物の作製方法を包含する。本クレームが組成物を述べるものである場合、本発明は、該組成物の使用方法および該組成物の作製方法を包含すると解釈すべきである。

【0188】

参考文献の援用

本願に引用されるすべての出版物および特許文献は、個々の出版物または特許文献それぞれの内容が本願に援用されていると同程度に、それら全体が参照により援用される。

10

【図1-1】

1 aat1ggaagc aaatgaactc acagcaggtc agagaaaaag ggt1gagcgg caggcacccc
61 gagttagtag tctttggcat taggagottg agccagagc gcocctagcag ggacccccagc
121 ccccgagaga caatgcagag gtgcocctctg gaaaaggcca gcgctgtctc caaacctttt
181 ttcaggtgag aaggtggcca accgagcttc ggaaagcacc gtgcccacga aagagggagg
241 cgtgtgtatg ggt1gggttt ggggtaaagg aataagcagt ttttaaaaag atgcgcctac
301 attcattggt tgaagaagaa atgtgggtat tgtagaataa aacagaaagc aatgaagaag
361 gatggaagaa tgaactgaag ctgattgaat agagagccac atctactgtc aactgaagaa
421 ttgaagatct aagactcaag tagctacta tgcactctgt tctattctat tttctaaaga
481 actaaaaata ctgttaata agtaoctaag tatggtttat tggttttccc cctctatgoc
541 ttgacacact gatgtctctc ttggcaacat caggtggcat gcotgcatat agtaagtgtc
601 cagaaaaact tctctgactg aat1taocca acaaaaattt tgggtaggt agaaaaata
661 tgcttaaagt atttattggt atgagaotgg atatatctag tatttgcac agtaaatga
721 tttctcaaaa attgaaagca aattttgtga aatatttatt ttgaaaaaag ttaactcaaca
781 agctataaat tttaaaagcc ataggaatag atacogaagt tatatccaac tgacatttaa
841 taaattgtat tcaatagccta atgtgatgag ccacagaagc ttgcaaaact taaatgagat
901 ttttaaaaata gcatctaagt tcggaaactt aggocaaagt tggttagatg tagocctca
961 talttgaagt gtctcttggg taltgcatct actttgtccc tgttattata ctgg1gtgaa
1021 tgaatgaata ggtactgctc tctcttggga cactacttga cacataaata cccaatgaat
1081 aagcactactg aggtatcaaaa aagtcocaaat atgttataaa tagctcaat atgtgtgtag
1141 gggggaagga atttactctt cacactctcc ttagctttag tctctcgcag gtcagattga
1201 tctcggaaact cggctgtctg agagagactg ttcgcocttg aagggagctc cctcagttta
1261 gatgagagag aagactatta ctctttggaa ttaacttttt ggtgtgatg tatccaactt
1321 ttgtactoc accataaaaa tccgcttact tattgatctg ttttctagc tottaaaaag
1381 tcaaaattgtt aattggcata aattatagac ttttttttag agagaacttt gaggaaccta
1441 aatgccaacc agtctaaaaa tgcagtttctc agagaatga atatttctag gatagtcta
1501 aataactaagt aacttataaa tagcttacta tttgatctgc aaggtgggtt tttataaat
1561 tttcttttta caaatcact gacacattta atatagttta aaaaaaggtt tttcagctgt
1621 ttccaagaag aatgtattac aaggtctctc aaggtgttga agagataact caattctggt
1681 ctcaaaaata tttcataaag atttgaaga ataggtatgt ttttaaaagt taatttcta
1741 ctatttatag gaactgaaca tcaactaaaa tacaagtat tacaacactc ctctcgcct
1801 tctggaactgc aattctaaaa gtgtaaaaa catattttct gcatttaagt agcagattt
1861 gcttagtllt caaagtggta ggccttggag ttagattlca ttgat1caga tctactactc
1921 actggttagt agctgtgtg cctgagcagc gtcocctaac atctctgtg gtagactgac
1981 ctttaaaaat tggagactgt cttaggggtt aatccttga gaaatgaat tgaaaaagt
2041 agcctaagtgt taactgctat tatttatgat taccatttt tcaactctac cacagctact
2101 gcoccttgtt aataaagat tcttcaattca tctttgagta taattttgt actctcaatc
2161 tggatatgca atgagtggc ctgatagaga atttcaatta tgaaaaaattg ttttcaact
2221 ggccttacca gatatacag aaacagtca catgtttcta ttgatgttg ttaaatgct
2281 tagaatttta ctctctagat aggtactctt cagttttgaga gtcataaaaag agtaaaaata
2341 ttatgtgtatg agttatagat gttatgaaat acttctttat atgtctagg ttgtctatg
2401 gaaaaccaaa aagtttggaa aaaaaactca agttattct tactttcta attttgtg
2461 gattccactc caagtataaa atttgaaga catctgaact acataaaccc atatatatat
2521 ataaaaataa cataactcaa gagagaattt ccacctgaaa aattcaggtta gttctagact
2581 atcagagcaa acagactaac taaattgaaa ctlttatgaa aataaacatt ttgaaatagg
2641 aagctatttt taaactagaa gtgatattt acatataat ttaataatca taaaaagt
2701 ggttattgatt taaattgctc acccaacagag atttgtgat taaatttggg aaaaatttt
2761 aaaaatttact tttctcaaca tttttaaagt agttattcag ttgtctctc tctgtctct
2821 ctctcactgc ctgaattttt catattctgt ttagtgttaa ggtgtatat caaacactgt
2881 gtcacatgac atactgtga tttttctgt gatatctgt ctatgtctag gctctactg
2941 agaacactgtg ccgaaccocac agaatcoga tatacagtc cactgatttc ttaacagga
3001 tgtgggggtct ccttaaaact ctgactgat tctcaagta gaccaaaagc ataaaattg
3061 tttagatcta agtggaaact tgaagaaag atcaactagt ctaagtctcg agtttaacag
3121 taagataaat ttgttaact ttgttaact taacaacaaa gtaatgagat attttaaac
3181 aaaaacaaac actcgaattt atatatoga atggttatgg tggttcaaaa tagctatca
3241 ataaaaacca cactccattt ctcaaaactt gactttgac aaaaataatt tggattctt

FIG. 1

【図1-2】

3301 attatgaat tgcctttota aataatacat aaattttctc toataagat atattagoca
3361 cattatttta ttgttattgt tttatattoa tagcttgott tagatataaa attatattac
3421 ccagactggt ctctggact tgcctccaag tgaactttga ctgtatcaaa aatccaatt
3481 cactctgaaa atataaagat ttttcaatc atttctcttt gttaacagcc gatacgtacc
3541 taatttttag ttgtttcatt aaaaaaaat gcaatgcasa ctbtaagac aatctctttg
3601 ttgttttgt ttaaaaagc agagctcac tctgtgccc aggtagagc gcaagtgaac
3661 aatcaatact cactgcaac tccactctc gggctcaagt gactctcca tctgtctca
3721 cagtagctgt ggtctcag tgtaacagtg tgcacacca ggcotgcta actttttt
3781 ttttaaagt atataagag agtatctac tatgtctoc aggtctctc tgggtctct
3841 ggcctcaagt tctctccca ctacgtctc caaagtctg ggtatcacag cgtaaccca
3901 ctccactctg cagcctaag acagtgtta atgaagaaa atataatgc tttgagcaat
3961 ggaagtata ttaaaattt actatgaa atttataag atgaccttt tgaatggag
4021 cacacttat tggttatata aattatgata cactatataa aattcactat gatgattg
4081 tatttactat ttatttact gtttgaatt ttgagggaaa gctaaaaat ttgctaagc
4141 aataatatt ttgcaagtt ttgaggggt ttgtaaaag gttccaag agaccaagt
4201 gctaccocaa acaaggggtt agcttagtc tgaatcaac atacaatta tctcaggtt
4261 gctatcaga aaaaacttag gttatccaaa tcaaaataaa atagatgcat aaacaaagg
4321 coaatatgt ttgacaact abattgtat atcaactgc caagctcca cgaattcca
4381 gactccatt agcactcca ttggcaattg ccactaatga gaacagccc gggtttccat
4441 attctctct ggccttaact cctatagaaa ttgagggccc ccaactctg gataggacc
4501 ctctgtctt gaacaatgt ttctgaaac taacaagtgt tgaottcta cacactccc
4561 tcaatagct ttttattta tcttttctg gaocatttt tttattaca cagttagat
4621 tttcagctg gaaactgtg ttaattttg ataaatttt attagttta ctccaagat
4681 tcaaaaagta cctcctgac ctgatatag acaaaaatta taattact ttttatata
4741 taaaatct ttgatatgt aaaaatct ttttatata atataat ttttctctt
4801 aattttgcaa atttataaaa gttctcttt gtttgaagt ttattctat agtttttat
4861 atgttagtta aattataat cactgtatc aagtaaat ctataact taaaagaa
4921 agttagttt taatattaa tctctgta aagagagaa tggaaatct ttttctagc
4981 tacttcaat atattttat ttgatgtga cagcaaaat accocaga gctaaactgt
5041 acactagga aatcaggt tccagttt coacttatg gttatggag gtaggaaa
5101 ttatgtat attattcaat acataaagt tcaactctt taaaggtct ttgagtagt
5161 actgataa aatgcaatt tattgtagt gctcttca acagagctt aaltctagt
5221 ttgatagact acaataaag tatagtatg caaacctcc aggaagcct ttaactatt
5281 agcagcagt tatgtgttg ttgcaaac gttcaaaa ctctgact acogaactt
5341 ttggcaatt ttgactgtg gcaotctgt agggctctt cctgagaaa agocctgag
5401 atgcaatg gttcaaaagg gaaaacagc tatgataag atcaagttg ttgagactt
5461 ttgagaaa ttaatttaca aatattgca ttgacttat ctggagaaa acattgct
5521 tctgtgtg tctctcaga gctctagat caatttaca catagttgt tcaagtgtg
5581 attagoata cagaaggtt ttaagcttt acttagggc agctagggc caaagactt
5641 aggtctctt tagcaagag ctgtaaaaa tttatattac ttttagitt ctgtagt
5701 agaatcaat tctcagag cctgaaaaa tttctctga agttttca cagctgact
5761 caagtgaaa ggttgcac ctgtgatt tttctgga gctgtttaa ctatttta
5821 tttttgaa taaattatg tccaaattg caaagctgt gatgacgg cttttcta
5881 ttgttttag atgatttca gacatttca agactctcc ggggacaat ttaaaaag
5941 tttttttg atgtaatga gttcagtggt atcaactca gagactctg tttttagt
6001 atcagatgc tcaaacact ctgactgt ggaactct ttgataaaa gcttcaaac
6061 aagtgagct gttggcag ttttaact tagaacaat atcaactca agttttct
6121 ttgcctct ccttagct tttaggata cagctgtgc taattctgt ctactgggt
6181 aagaaatga agatttttg taggtccta ggaattatg gactactag cctgaagct
6241 atgctggat atagocaga aactctcca tagctctc aactgaaa agatacaga
6301 gactctct tttaggtca gattctgggt aactgaaa atgacctat tcaattctg
6361 tattctatg gagaattga gaagtagag gttggaaa agaaattct gttgcttt
6421 atggaacaaa ttactgaaa cccaggttct cagaggtct caittagta ctcaactgg
6481 gacttaac cagctaaag ctgctcag agaggtct ggggaagt tctttgat
6541 tcaacctaa aggaattat tcaattaga ttactcaag aggttaga ttgctcaga
6601 aaaaattaaa caggtagt ggaggacta caggataag agcaggtca ccttcaaat

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 】

Table with multiple columns of alphanumeric sequences (e.g., 6661 atcctgagaa gttcctcatg acgngaacaat aaaaatgtg acagagattt gtggagatg)

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 4 】

Table with multiple columns of alphanumeric sequences (e.g., 10021 gttgcooact tccagccatt tgtatocctt gaaaatgatc tcatattcta ottctcttt)

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 】

Table with multiple columns of alphanumeric sequences (e.g., 13441 gottttgagg taagagtotta ttaattcttt ggtaaacott gagcoaatg tttgtctatg)

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 6 】

Table with multiple columns of alphanumeric sequences (e.g., 16801 agtgggtgca tcaattttaa ttoccttcaoc caatgttgga gtgtttcaat ttttccocac)

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 7 】

20161 tcagggtttt coaaaagaaa ggggtggctg agtitttgac taactaatat ttcataaagt
20221 gctaaagatg agatgctggt taattttttg tattttttga accgtgctga ggtagggatg
20281 gggaaatott ttgtgggaca taatttttct ctttggctgt ctggagtgt agggocaaat ctctgtctac
20341 tgagaagagg ttgtgtcttt ttgtttagag ttttaagagt agtggocaaat agtggocaaat cgtagctgga
20401 tgcaactccc gctcccccga ttccagaact ttcccccact cagctgtccg agtagctgga
20461 attacagggc gctcccccga ttccagaact ttcccccact cagctgtccg agtagctgga
20521 tttctccatg ttggtcaggc ttgcttggag ttccttaact cagggtgatcc accocaccctg
20581 gctcccccga ttgctggagt ttgcttggag agcccccagg cctggcctga ttggacacatc
20641 ttctcatcct atttttatgt ttaaccatgt caaataaaaa tattttcccta agtagctaacct
20701 gtggctcatt ttgggcaaca ttgaactaat ggggttttag tatcataatt taactcaaaa
20761 ccaatttga ttccagata taagttaggg ttattgttag tgaacttccc aggaattgct
20821 aagtataact aataatata gaaataggg ttaagttagg taacttctga atttgtttg
20881 ttgttagtat cttagctgat gcaatctgtg taactcaaaa ggtgtgtcat ggtgtcaaat
20941 aactttacta atgtggcaca gaataaacag gaagcttttt aaaaaagag actcaacaat
21001 gygtttactt gaattgactt ggcactttat gggaaaggtc actgggtgtg aaataaggac
21061 caaaagagtt aggttttat tttttaaa aggttagaga gatttttttt gatattttct
21121 gaaaatgct atttttgact ttggatggca agtagttaga attgtgtcca ttgttaaatc
21181 tagtgcata tttaaaatc ttcaacaata ttgaataagc agaattttat aaatggtgga
21241 gcaacttttc ttgttttact aattttttct ttgttttctc atttccactc acacacagctg
21301 ccattaccct cactcttaag ctttcaaaaa ttggcagata agtgcactgc tgcacttaagc
21361 ttcttccagc tgaactgatt tttaaaattt cagaaaattt gtagagctat ttgttaaacct
21421 ggcacttatt aaaaattaaa ttattttcact cattaactaa ataaattata ttaaaaacaaa
21481 agtattaaaa actcaaaagt taagctgggc cactgctcca cgtctgtaat cccagcactc
21541 tgggagaccg aggcaggctg attgtccgaa gtccggggtt cgagaccac acagcaacca
21601 tgggaaaacc ctgtctcac taaaaatata aaaaaatagc gggcgtgtgt ggtgtgtgc
21661 tgaatcccc gctactcagg aggtcaggc agggaaattg cttgaacca ggaggtggag
21721 gtgtgggaa gctgagatg ggcacttggc ctccagctgt ggaacaagg ggaacaactc
21781 gctocaaaa aaaaaaaa aaaaaaag aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaagaa
21841 ccaaaaacaa aaaaataat tctacccttc taatattttt gcaattttat atatctatg
21901 ctattaacgt tatttgctt cactttctt taagttagg atatatctta ttgcaacttt
21961 attgactact atttctaact gcaactgtgt atccccctcc aactctgtgt tcaatgactt
22021 tataattggt tgcctttaa atgtacagt gagagtatt atatcataga acacagcaaa
22081 tgcctgaagt cagttttgt ttgttttttt gttttccgga gaggggattg ttaattttt
22141 gctcgtatgc acaaccaata cttcagctct gctacttttt gtttctccgt attccagct
22201 cctctccagc ctgtctctct agcaacacc acataccaaa attttttaa atgtggaaag
22261 ttgaactggt taaaagaagt atgaagtcca aagaagtgtg gaaagaccta ggtttccca
22321 tttaagaaag tttagactct taactccctct attctttat caataaaaa ttgcactggt
22381 cctttttagt tttagccact taagaagatt tctcaataga acaaaaaact gacatagct
22441 tatgaagga cttttgaaag ctttaaatat agggtttt attagtagta acaactact
22501 tcaacttttt cactttctga cttagttta caggggtcca taatctaaat tatataata
22561 attgctgac cagatttttt taacagctaa ttggccactg tatgttccag ttctctctg
22621 ttctttatgt tagatactgg gatagctgg accaggtggg ttgtcccatc ctttctcaga
22681 tgaatgccc tgaagactg cagatgatc ggcacttaat ttctctctg attccaagct
22741 gctccacaat cctttttat ttgctccag gaaaaatac aaatgatca gactggccaa
22801 tgaagggttaa acctaaatt cgcctttgt taagaacagc ttgtgttaa atccggata
22861 tgaacataaa tggaaaaaat atgaactagt acaaacact cacttttaa ttacttagta
22921 aggaatatt tagaagttta gacccacta gaccactaat tcaagtaatt ttaataag
23081 gacaagttgt agaatatctg aagaacccag gcaggtgctt actgaaaga ttccagacca
23141 aggaagtala aagaagacc ttgggtggag cagtagactt ggaltagag gccactggca
23201 aagttttgoc cagaacagt gcaaaaatgt ttgattttg catagccctt cctctttttt
23261 tctctgagc cttcttctga atctctctt tttaactggt tttaactgag atttttgata
23321 tgcataagc cctccctttg aattttggg tttaactggt atttttgata atttttgata
23381 taaggtctga atgaacaaa tttagactt cttccagaga aagaaggtt atagggaaa
23441 aagcataggt ttgggacata cttaaoccc ttctctctct ttcttttaa ataatattc
23501 aatttttact gaaaaagct ttgtctctc gaattttct tagaaatttc ttgtttgca
23561 ttgttgatt cacaactctt ccttgcctc cttctctact ttcttttct tagatttttc
23621 tatctttatg aagattattc tgccttctcc tcaacagtta gaaaacatatt tttagaatt

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 8 】

23681 cactaagcta tctcctcatg tgatttccca tgcacaacct actaatttcc attataaatt
23741 attatttttt gatgcctaga gggcagatga gtagtagtgc tttagagtag taagcaacaaa
23701 caaaaagaaa ttatgctctc accctcaggt accctcaggt tctttttctt taagtcaaca
23761 aaatgataga aactcaatc ttatgatgca ttctttcaat ttctttcaat gaaatagctc
23821 ttactgagta tgcattgctac agtaacaaaa ctatataagc ctgtttgata aattgtttgt
23881 aagtcgatct ctathtoca ggttttttat atttgaagt taagagagct gactcagta
23941 attgtgata aactcctagt attgattat tccggggcag ttatttttata aagaataatt
24001 taaaatagga atgttttaga gttgtttttt tcccttggaa aaacctatac attttctcct
24061 ccaactcctc ttgacaagt gacagctaca ttatgtaga gatattgat tttaacagc
24121 gttagctg taagagatga agcctgglat ttatagaat tgactttatc tatttcaata
24181 ttactatggt cataatttcc catatccgat aaaaagtagg tagtatatac ttccaactt
24241 gtatggagac caaactaagt gaatctcgt ctctccctcc ttatttttag ctggaccaga
24301 ccaattttga gaaagagata cacagaccgc ctgaattgtg cagacatata ccaactcct
24361 tctgtttagt cttctgacaa ctctgacaa tctatctgaa ttatggaaa ggtatgtca tgcactgtc
24421 ttatgttag agagaatttc atatattaa ctctttag agagaattat acaactatta caactatta
24481 taagtttat tcttatattt aaaaataga tccagagtag tgcctgagag cgtgtaagt accagcact
24541 caactttct ggaagccaa atgagagatg aaaaataaaa agttagctg gaatgtagt
24601 gggcaacata gcaagatgtt atctctcac caaataaaa agttagctg gaatgtagt
24661 goactgctc attccagct actcaggag actcaggag actcaggag actcaggag
24721 gtttaggtt goactgact atgatgtgc cactcactc cagctgggt gacacagca
24781 aacctctct cttcaaaaa aaaaaaaa aaaaactc acttttoca tgaactatc
24841 gactgaaatc ataaaaaat aaaaactc aaaaactc aaaaactc aaaaactc
24901 tttttttct tgaaaaaact acatttggt tgaaaaaact aaaaactc aaaaactc
24961 gatggattt gtgaaaaact aagtaaac acatttggt aaaaactc aaaaactc
25021 caaaaactc atatttgaat acaaatgac ttcttagct cttttacat cttttacat
25081 ggttatcaaa caaatgaaa aatgtatc ttttagctc cttttacat cttttacat
25141 tatctctct cagcactct gagtggaaa cagttatga cagttatga atgatggag cagttatga
25201 actagagtag tatacttgc aggttagt gatgttagt gatgttagt gatgttagt
25261 gctaggctt gatttgcct gctcttagt attttttagt attttttagt attttttagt
25321 tactagctta agtaataaa aggaacgat ttatggctc atagtagct atagtagct
25381 taactagct agtaataaa aggaacgat ttatggctc atagtagct atagtagct
25441 agactgctt ggaagactgt ctttagaac ctttagaac ctttagaac ctttagaac
25501 ggtggactt gctattgct ggttttatt ttttagaac ctttagaac ctttagaac
25561 ttggtcctg gtttagaac tttttagaac ttttagaac ttttagaac ttttagaac
25621 ttgctctgc taaagttag aaaaactc aaaaactc aaaaactc aaaaactc
25681 gcaactctc gcttagactt aactaggtt aactaggtt aactaggtt aactaggtt
25741 caataaaaa ggttagtagt gggggataa aaataga ca taactata attttgact
25801 caaagtaaa acatgtagt gactgcat ttgttttct taatatac atttttct
25861 ttgttagct ttgagagca agtaagatc taactatac taactatac taactatac
25921 gaaataaagt agtgggata gcaactcct ctttagaac ttttagaac ttttagaac
25981 ttgaaactt ggtgtagca aatgcaaa gtaggagata cttttttt tttttttt
26041 ttattttagt tgcattctt ttgttttaga tttagctc atagtagct atagtagct
26101 gcaatgtag taactcaat aaatttgc tttagaac atagtagct atagtagct
26161 atgactac atagaaact gtagactgc tttagaac atagtagct atagtagct
26221 ttgagatg attagaac gtttttatt tttagaac atagtagct atagtagct
26281 ttgtttgt gctgttct tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26341 atgtttag tttagaac tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26401 cagctcctc agtagctgt tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26461 tttagact gtaggact tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26521 tttagact cactgctc cccaaaact tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26581 gtttagata tttagaac tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26641 tttagact aaatgtag tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26701 tttagact atctgcta aaattttt tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26761 gactaaact aaaaataa cttttttt tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26821 ccaactctt cttatttt ttgttttt tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26881 ttcttataa attgtagt taattttt tttagaac atagtagct atagtagct atagtagct
26941 ttgtagct gtagctgt accctggg atgtagct gtagct gtagct gtagct gtagct

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 9 】

27001 cttgtgaca tggccctcaa gttttggca gatggtgaa gaaactaac ctattggct
27061 caattttgtg accatgattt gaactcctca cataactgca gttgcaaac cacactccg
27121 tccaagatgt gatccagga taactcctca taagaataaa accctctccc tctgtgatc
27181 gggcctggtg ttgttctca tcaagcaaac ctactcaact cttgtgtcca caaatttga
27241 gcccagaagt gttcaagttt caccactaaa agaaattccc gcaactgctc ttctcctag
27301 gaaactacc cactcactt ttctctcat agtacaact cctgtcctc cttgtctcc
27361 tacttcaact tcaattcaat ctcaactcct gaagtatgt ttcccactg ttcaaacac
27421 taactgccc aggtcacta ttgaactctt atgaaattc acaaacactc tcaactaac
27481 tctctggtgg acccctttt ccaattgaa cttttttt gttttatgta cccccctt
27541 cttcgttttt cccacttgc attttccc tttagggag aggtgagtc ttccactat
27601 ttactcttt actctgagt acaaatggt tttaggggga ggttagctc gttgtgaga
27661 gaaaggtgga gctcagtaa gggaggaaa tagatggaa aggttaata ggotttaga
27721 aagggctccc atttagaac tttaggggga tgcgaagtc atgttaga gttgccaag
27781 ctgtctctca aactcactg cttgactact cctttatgt ttgtttgt ttgtttgt
27841 ttgtttttag acagactgt cttgtctca cccagctgga gttgaggt gtttagctag
27901 ctcaactgca actctgctc ttgtctcaa gctccttag gctctgtag gctctgtag
27961 tacaggctg cccccagg cctgctaat tttttagag aggggttt gcttagctg
28021 ccaggctgtg cttagaactc tgaactcaag tgaactgccc gcttggctc ccaaaaagt
28081 tggattag gttgagcc actgcccc cttactctc ctttagagt atttagagc
28141 attttact ttgttaact gaaactaag gaaataaca ctgatgaa gtaaagctc
28201 gttctaattg tttaactgt ttccctttg ggtctatga ttcttctct gtttagctg
28261 ttgaaaataa agatgatac atttagact attttatc tttagaga gaaaaagc
28321 ttctttaa cgaactaagt ggaactaac taataaac atoaactgct gttctcata
28381 gtattttaa gaaaaagaa agtataact atttcaagc ttlttaagc taatttagt
28441 ctattctta taaatagca aatataact ttgatctt tctcaatt caaagact
28501 taatacaga tttagtagt tgaactgaa tttaagat agtttagt tctacttta
28561 aaaaacaa cttaacagtt ttctcaagt taatacagc aaaaagccc atgactatc
28621 aactgttt ttatttga cgtaaactt ataaatgcc cagacttca acaactaaa
28681 gatcaagtt taaggaaaa atgtagaat ttgtgtctc tttttttc accctgtat
28741 aagcagca algactact gtaaacctg tacttttt gcccactc ttcaagtt
28801 tggattag tttagact gaaactaag taaataac cttagact tttagact
28861 octcagct gatataag agactatga attgocaa atctgctc atactgct gaggtttg
28921 ttgttagt ttccatagc attttctc taataact ggttactc octttagat
28981 actgtgtg atcaactat gtttaagaaa taataact taaataatt ccaactgca
29041 ctattgct caactttta ctttttga gaaatggga tagagact gctctcaag
29101 aaaaactaa actcaattt gctctggc gatttttt cttagagtt atgtctatg
29161 gaacttttt atatttagg tgaaggatc cactttgca tctattatc atcaactaa
29221 tatattcatt ttgttata ttgaactag acgaaactg atcaactat gtaaaaat
29281 aagatgaa tccaactcc caactaaga caaacctaaa aactcacta agtaattg
29341 aaaaactt gaaactaaa ttctggaa caagggctc aatttcaat octaaggg
29401 tcaaaaaa aatgtgct cttaaaaa atttttct tttagctc atcaacta
29461 tctactagt actagatt ctttagctc ttattctt gcccactc ttcaagtt
29521 agagcaat gtagcaga tttagcaca tgcactat taactata atattgta
29581 atatttga tttaactct cacttagat ttgtcaag aaaaactc aaaaataa
29641 gtagcagc ttcaactat aaaaataa tactaaaat taagaatt octtagat
29701 attttttaa tctattact ctaactag tgaattgt caacttgaa actcagct
29761 ttgtgtgt taagctct ctgtcttc gaaagtgt ccaactgctc atgttat
29821 tattttct atcaagaa cttatttga atctggct gaaactata aaagagaca
29881 gatcagac ttgttaact ctttttga agctgtcc atattgt ttggggct
29941 taactatc atgattgac ttgttttt atgttctt atgtcagg gactataca
30001 gttgtccc gaaaaagc attttgta taactgtg aaaaagat taatacacc
30061 ccaactgaaa atcaattaa aacttattc caaaagat atgactata gggcaagat
30121 gttctact atctttga ttacttata gaaatttga agaaatttt ctgactttt aaaaaaga
30181 tcaataact atacttat gaaatttga atacttct gactttggg gaaaagta
30241 ttatttatg aattttat gatttttga gataatata taactttta aatttttt
30301 agatgatt ttcaactag agcaaaccc agagctttga gaaaactt taaccagc
30361 tctgtattc atttgatga atttttaga aatagattt gctgggtgt tgaactagg

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 10 】

30421 gtatggagta cagttaactc tgatcctatc taataatac tgaagata taacatttc
30481 aataagtagt tgttttagt aagttaga tatttcaagt aattgtatg tcaactgcca
30541 gatttcagt aaactcaaaa ttctcctg ttgttctc ttcttctc
30601 gattacaata agcaactact agtagaagt gaaagctgg tcaataga agcccctt
30661 ctactgctc cttgctctg aaaaattt aaaaattt aaaaattt aaaaattt
30721 ttgttagtc aaaaacccc acccaagt caaagttgt atgataatg gaactata
30781 tagatttt ttgtctgt ttgctgca ataaataa tgaataga gaattata
30841 ttatttagt accaactg ttccagta attagaagt ctttttag atttttct
30901 taaatttctc tagtaactcc atggacaaa aattcactc atttataa acaggaatt
30961 gaggctggc caaataagt aaacttcca aaacttcca aaacttcca aaacttcca
31021 tccccactc tttagctca aagccttga ccccttcca atcaactat gtagtctca
31081 ttaatatata atataata taatgatt taatgatt taatgatt taatgatt
31141 gtaaccagc ttggtctc gtagcttc ttgtcttc caggagacc aggtcagca
31201 cttttaga ttgagact tttaggact tccaggtca aaactgaaa ctttctcag
31261 gacagaaa aacagact tctcaatc atcaactc aaactgaaa atgttaga
31321 caccagaac ccagctagc tttaggccc tttaggccc tttaggccc tttaggccc
31381 ggaattgta tggagaaga cttaattgt tttaggccc tttaggccc tttaggccc
31441 gaaaagaa tctgaaaag cttttagc tttaggccc tttaggccc tttaggccc
31501 gaaagaaa cttgaaaag cttttagc tttaggccc tttaggccc tttaggccc
31561 agctgttc cactactca actcactc ataacactc ataacactc ataacactc
31621 ttctgggga agaacagct gaaattgta gttgagag cagagagag aatattta
31681 ttggagatg caactgct atgagctg aggttttc aggttttc aggttttc aggttttc
31741 caactgact accatgact tttaagct gagaattc gagaattc gagaattc gagaattc
31801 aatttagata aactatgct caatttagc atttagatc atttagatc atttagatc
31861 ttgtttctc ctttttctc tttaggctc tttaggctc tttaggctc tttaggctc
31921 tagtattct ctaactttc ttgtctctc ttgtctctc ttgtctctc ttgtctctc
31981 atgttatc tttaggctc tttaggctc tttaggctc tttaggctc tttaggctc
32041 gattttgaa actactgaa cactctctc aaaaactc aaaaactc aaaaactc
32101 taactattc tagctctc ataaactc tttaggctc tttaggctc tttaggctc
32161 caggactgt agagaagat ctaaaaaa tttaggctc tttaggctc tttaggctc
32221 ggggtgca tcttagaga gatactc tttaggctc tttaggctc tttaggctc
32281 tttagact tttagact tttagact taactatg taactatg taactatg taactatg
32341 agatagact aacttagct ttaactta agactctg agactctg agactctg agactctg
32401 caactcctc atcccagc tttaggagc tttaggagc tttaggagc tttaggagc
32461 ttagaccagc cttgcaata ggtgaaac cttgcaact taaagtaca aaactcagc
32521 aggtgtgt gctgtgtg gggccactg gggccactg gggccactg gggccactg
32581 agaatgct gaactggg ggcagaggt gcaactcact caaaaaaaa aaaaactc
32641 cagctgggt gacagagca gactcact tgaattgag agttagta gtaggtttg
32701 gaaactgct gttgaaaac tttaggccc tttaggccc tttaggccc tttaggccc
32761 agggagcca agtaggaga gctctcaaa ggtctcaaa ggtctcaaa ggtctcaaa
32821 ttgatttt atgataaga atcaaacg atcaaacg atcaaacg atcaaacg
32881 agctgtgtc atatttcc caaaaaact atatttcc caaaaaact atatttcc caaaaaact
32941 taactttt caataact caaaaaact atatttcc caaaaaact atatttcc caaaaaact
33001 ttgtgaca taactatg atggcaag agctctc atgtctc atgtctc atgtctc
33061 acttggta gcaattgaa tttagtaa taactgaa taactgaa taactgaa taactgaa
33121 ccaaaagt ttgtgaa taactgaa taactgaa taactgaa taactgaa taactgaa
33181 atatttat atgtatac atgtatac atgtatac atgtatac atgtatac atgtatac
33241 taggaagt ttagaact ctttaggt taactgaa taactgaa taactgaa taactgaa
33301 acaagctt agtggaga caggttag caaggttag caaggttag caaggttag
33361 aggggtgt tttagtag taactggt taactggt taactggt taactggt taactggt
33421 ttctttcc gaactggca ggttaggt ggttaggt ggttaggt ggttaggt ggttaggt
33481 aaaaaaaa gcttagaga gggagagc gggagagc gggagagc gggagagc gggagagc
33541 attttccc caaaaaag ctttaggt atatttcc atatttcc atatttcc atatttcc
33601 atttaaaa atgtagata aatattgt gggactgt tttaggt tttaggt tttaggt
33661 agaatgata gtttaggt tttaggt tttaggt tttaggt tttaggt tttaggt
33721 tttagtata ttctcttc tttaggt tttaggt tttaggt tttaggt tttaggt
33781 tcaaatgtc tttaggt taacttctc taacttctc taacttctc taacttctc taacttctc

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 19 】

61141 ttattattat caactatttg gctctgagac taagttagtg tgagatctgt gatttagaca
61201 aagtggtgaa tagatgagat aatcaatgta agtagatctg gttctgttgt
61261 tagccatgag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag
61321 ctggagagaa tcaactgata gctcactaga gctcactaga gctcactaga
61381 gggagagaaa gagagagaaa aaaaagagag tagagagagaa caagagagaaa
61441 caaggcaaaa caaggcattt ttattatttt taattggcca agactctgac
61501 ttaattcttc ctctgctctc taactctctc agggaaactg atttggagtc tcaatagag
61561 cccctctctt agaatcacag ttgtgctctc taaaactagt tatataacct cacatgcttc
61621 cttaaccacc agaatgagtg cttaagagtc ccttaataag gagcgtgcta ttaagttaga
61681 gacattcatt tttttctctc gtaataagtc ggaataagtc acattagtag taactagag
61741 gttgctttg taactctaca aaactgttag aaaaatacat atggttagag agtattcttc
61801 atgttaaac taatgtataa aaagtttat aaaaatacat atggttagag agtattcttc
61861 aaaaatgagt aactcagtg ttggccaact taactttaga aactaataaa aaaaatttta
61921 ttaagaanaa attactattt catlataaaa attactattt aagatgtag acatagagag
61981 taaaagtag atgataaact gctcaatgag aatataaact aatataaact aatataaact
62041 cttttataaa taggattctc taacaagca aatataaact aatataaact aatataaact
62101 gaactacaga gttagttagg aagaatgaac abctctctg gggagagaca gaatttttaa
62161 aaaaatgatt gcttaaaaaa ctaactgttt tctctctctg tgaatagga ttactctca
62221 atggcgaaata aaaaatgata ctgtgagac tctgtgagac tctgtgagac tctgtgagac
62281 tattttctag atataagag agggagagag ccaagctctg atggtgtgaa tctcagcact
62341 ttggagagac aaggcgggtg gtaacactga ggtcagagtc tcaagagacc cctggccaac
62401 atggtaaaaa cgtctctaca ctaaaaaa ctaaaaaa ctaaaaaa ctaaaaaa
62461 ttgagtcccc cgtctctgag agggagagca agggagagca agggagagca agggagagca
62521 gttgcagtag cttaagatac cggcaatgca ctccagcctg ggaacaaggg agagactctg
62581 ttgcaaaaag aaaaataaaa aaaaataaaa aaaaataaaa aaaaataaaa aaaaataaaa
62641 atataaaaag tttttttatt ttaagactca acaattgtct tcaataaaa gatcagaaa
62701 taatacacag atcabaagt ttggagctgg gttggaact ttggctctgc attttcttc
62761 tggtaactag aagcaagtt actgaactct actgaactct actgaactct actgaactct
62821 gggagatatt aatatttacc ttgcaagttt gttgtaga ctaagagaga gaatttaggt
62881 aaaaacttca toagagtag atgcaaacg ttgtcttca aaaaacttca gaatttttag
62941 ttgcaagttc cagtctaaag ttgcttata ataccagaca aaaaagagat gggagagaga
63001 tataccagtg tattgtttta aactatttta aactatttta aactatttta aactatttta
63061 atcaactcgc tcaacataaa aaaaatttca aatgttttt agctctgaa gtccaatttt
63121 ttgatttaga gcaacactga tgaagtttta gttctctct actttacatg gttgtgaaa
63181 ggttagagag ataaaaactg ttgctctagt ctaaaatctt ctaaaatctt ctaaaatctt
63241 tcttgatgat aagtaaacag atgcaacag cttcatttta cttcatttta cttcatttta
63301 gtaagagtaa tctccactct cctagcaaaa ttggtttgta gaaaagtttg tgaatagat
63361 tttttttact ttgatttagg gaattctcag ttctctctc gaaatgagag aaaaactatg
63421 gtttgtagag agggagata taactagctc gttgtagtag ttgagagag aaaaactatg
63481 aactctctg tcaactctc taactctctc taactctctc taactctctc taactctctc
63541 agcactag atagaacttt ttactctctc ttcccaataa attctcaacg aattctctg
63601 aactaaataa aatataattt tcaactctca caataataaa atggaggttt caaaaagtt
63661 agggactctg ctgactcacc aggactgaaa aggactgaaa aggactgaaa aggactgaaa
63721 tctagagtag gacccctctc actaaactgt tctctctc ctggtggcat actctctc
63781 cagctctctg cagccctctc ctggcactg ctctgagca tttactatg atgtgtgac
63841 ttgttaact tctgtttgag gactctaacg tcaataaaa ttgactctc aataactgac
63901 ttgaaactta tctttttag taactctctt aaaaactctt tcttttagt ataatcag
63961 tttgttagc actcgaact tcaactctt tcaactctt ggaactgttg actctgaaa tctctctc
64021 agctggaa tctcaactt tcaactctt ttgactctt aatctcaact ttactctc
64081 tcaactctc cagactctc agctctctc attctctct tgaactctc actgattta
64141 gtttgtag agggagata taactctctc gttgtagtag ttgagagag aaaaactatg
64201 ccttttgtag attttttt tctcaacga aactcaact taactgatt ttgagagaga
64261 gttgtagtag gtaaacaga ttgctctctg ttgactctg tcaactgaa ttttttaga
64321 ttattgtttt aaaaactctt atctctctc atctctctg gaaaactctt gattgtgct
64381 ttaactctc tcaactctc ctaaaactg atctcaact ttactcaact tcaaaactg
64441 cccctctctt ctcaagat ctcaagctc agtagagac ctgctctcc acaactag
64501 gaaataag aggcacact caatttgaa ttgtctca tctctctc aacttgaa

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 20 】

64561 ttattttttt cttctttttg gctcaagaga aagatgtata cttcttctt cctctgtctg
64621 aactctctca ttctctctca tctctctca acagggacc agaatattt cttctctcag
64681 agctctcaac atctctctg actctctctc ttctctctt taatttttt caagttaaac
64741 aattttcttc ctgactctg ctcaagcaac cctctctctc aaactctctc actctctctc
64801 cttctctctc caagctgtt ctactctt ctactctct cttctctctc ccaactcaac
64861 atagattctg ctataccaca totattaaaa ctgttatctt cttgtggaat ttactcttca
64921 atttagcttc agtgaacact tctctctca ttattttgc ctcaagcaac ttactctaac
64981 tctgctctg ttgcaactta agttagtag gggcagttg tccccacta ggcctctgtg
65041 ttatctctg ttcatgtgc tgataaagc ataccagaa atgcaactt lacagaaag
65101 aggggttga ggaactcaac gttccatggt actggagag cctcaacta atgttgtag
65161 atgaaagca ttctcaact ggaggagat aactgtgca gggaaactc
65221 ctttttttaa acaaccagct ctgtgagac tctctctca tcaagaaat agatgggca
65281 agaacctccc caatgattca attatctccc attctctccc tcccagaaa atvggaaat
65341 atggagata taactcaaga ttgacttgg ttggagact gttgagact agtcaactc
65401 cttctgtctt ttatgtctt cttgtgtga cttctctct cttctctct cttctctct
65461 gctgagact ctaactgtg gctctctg ctctctct cttctctct cttctctct
65521 ttctcaaat ttctctctg taactcaagg ttctctctc taactctca agctctcaa
65581 agcatctg tttagtgat tctctctc tctctctc atctctca atccactcc
65641 ttgtgagta tatacaact cttctctct ctaactca agtaagtaa cactctact
65701 acaatattag gaagctgag cttagacgt tttagaac ctcaagcaac taacaacta
65761 gctagggag agtcaaatg tcaagctag cttctctg taactcaac tttctcaact
65821 agcatctc caactattt tttttttt caactctca atttttttt tttttttt
65881 tagaactct ctactcaag ttggtgtgag ttgactgca caactcagc tcaactgaa
65941 ctgaaactg ggtcactg atctctct cttctctct ttgactgca ggtcactca
66001 caacacacc cagctctg taattttat ttatttttt ttatttttt agacagact
66061 tcaactctc acccagctg gggagagtt ggtgagtt ggtgagtt ggtgagtt
66121 cccgggctt aagcattct cttgtctca cttctctct cttctctct agctggagtt
66181 gctactgct caactaat ttgtattt tagtagtag ggggtttccc actctctgccc
66241 aggtctgt ttgaaactg actctctg actctctg actctctg actctctg actctctg
66301 attagcgtg ttgagcaca cgtctgcca ctaactaat tttttttt tttagtaga
66361 caactctc ctactgctc cagctgtctc ggtgagtt tttagaac ttctctctg
66421 cctgagcacc ccaagtgca gggattcac ggtgagtt tttagaac ttctctctg
66481 ttgattttg tatagttaa tatacatt tttagaac tttagaac tttagaac
66541 ggaagtat caactgaa tttaaacata tttagaac tttagaac tttagaac
66601 tctctctt ttctgttt ttctgttt ttctgttt ttctgttt ttctgttt
66661 cagaataaaa agttattagt acaaacact tctctctc tttagaac tttagaac
66721 agtcaactc ctaagatga taactcaac tttagaac tttagaac tttagaac
66781 atatactt gactcaagca ctcaagca ctcaagca ctcaagca ctcaagca
66841 aaaaactg gtagagat caactctc tttagaac tttagaac tttagaac
66901 gaactcact ttactctc actagctg actagctg actagctg actagctg
66961 gttgtgtt ctctgact ttactgca ttactgca ttactgca ttactgca
67021 agactctg aatataat ctgtctct ctgtctct ctgtctct ctgtctct
67081 taacacag atatactca aaaaactt attagaac tttagaac tttagaac
67141 aaaaactg gtagagat caactctc tttagaac tttagaac tttagaac
67201 aaaaactg tttagaac attagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67261 atgactct gaaactct tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67321 gcaaatgat tagttttt tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67381 ttcaaaaact tgaactgca gtttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67441 aaaaactg ctactgca agtcaact ctaactaa tttagaac tttagaac
67501 gttgtgtt tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67561 aaaaactg aaaaactg tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67621 gactcaag atagtaga cttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67681 actctctc cttagaac tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67741 actctctc tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67801 gtagtagac tagtaga cttagaac tttagaac tttagaac tttagaac
67861 gggagagca cttagaac tttagaac tttagaac tttagaac tttagaac

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 21 】

67921 aatttttaga aagagtgaat agagtctctt aaaaactg gactctctt cactctctc
67981 aactctctc actgctctc ttgattgaa gactctctc ccaagctctc
68041 aatagttag caaaaagga atactctctt cttagctctc tttagctctc
68101 gaattctctt gaactctc gaaactctc ctactctct ctaactctc
68161 aaaaactg gactctc caagctctc gaaactctc gaaactctc gaaactctc
68221 gggtagtaga ctttaaaact agtctctctc agtctctct cctgctctc
68281 gtttgtag agggagata taactctctc gttgtagtag tttagtag
68341 ttgttagtag cctgctctc agggagagag gttgtagtag ttggtgtg
68401 ttgttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
68461 ttgttagtag caaactctt agtctctc ctgctctc agaaactct tttagtag
68521 tttagtag taagtaga agtctctc tttagtag tttagtag tttagtag
68581 caaactctc actaaacta agcaactct gaaactct gaaactct gaaactct
68641 tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
68701 agcaactca aaaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
68761 gaaactct actctctc gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct
68821 caactctg gggctctc actctctc gaaactct gaaactct gaaactct
68881 cttaagaa ctttaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
68941 ggtattttg gaaactct taactctc taactctc taactctc taactctc
69001 taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
69061 agtctctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
69121 ttgtagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
69181 agcaactca ctttttaga gctgctcag gaaactct actctctc tttagtag
69241 accaactca ctaactgct ctaactgct taactctc atttcaag tttagtag
69301 tttagtag atataacta agggaaact cttagtag atagttttt gaggaaact
69361 atagaaact taatttctc cttagtag atagttttt gaggaaact
69421 taactctc atattgtag atactctc aaaaactg gattagaaa aaaaactc
69481 aaaaactca aaaaactg gactctc gactctc gactctc gactctc
69541 cactgtag aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg
69601 gcaactgaa aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg
69661 gcaactgaa aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg
69721 tttagtag gaatagga cttagtag caactctc aaaaactg caactctc
70081 atttgtctc aggtctctc cactgctc caactctc cactgctc cactgctc
70141 agggagtag atctctc tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
70201 caactctc aaaaactca aaaaactg atagctctc gttgtgtg gttgtgtg
70261 tccactgct tttagtag gactctc gactctc gactctc gactctc
70321 agttagtag gattgcaact cttagtag gactctc gactctc gactctc
70381 agttagtag gattgcaact cttagtag gactctc gactctc gactctc
70441 atagtag gattgcaact cttagtag gactctc gactctc gactctc
70501 tttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
70561 tttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
70621 aaaaactg tttagtag gaaactct taactctc taactctc taactctc
70681 atctctc tttagtag atactctc tttagtag tttagtag tttagtag
70741 aaaaactg agactctc gaaactct taactctc taactctc taactctc
70801 gataactg gactctc gactctc gactctc gactctc gactctc
70861 agggagtag agtctctc tttagtag taactctc taactctc taactctc
70921 ctcaactg gactctc tttagtag taactctc taactctc taactctc
70981 gcaactgaa cttagtag aaaaactg gaaactct aaaaactg aaaaactg
71041 aaaaactg actctctc taactctc taactctc taactctc taactctc
71101 taactctc actctctc taactctc taactctc taactctc taactctc
71161 taactctc actctctc taactctc taactctc taactctc taactctc
71221 taactctc tttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc
71281 aaaaactg tttagtag gactctc gactctc gactctc gactctc

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 22 】

71341 aagagttaga aagagtgaat agagtctctt aaaaactg gactctctt cactctctc
71401 ataaactct atgtagtag atagctctc cttagaac taactctc agttagaac
71461 tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
71521 taagtaga actgtaga cttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
71581 aaaaactg gactctc gactctc gactctc gactctc gactctc
71641 gactctc tttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc
71701 gactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
71761 gaaactg tttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc
71821 atctctc tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
71881 gctgtgtag acaactct gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct
71941 gactctc tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
72001 gactctc tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
72061 tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
72121 caactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72181 tttagtag agttagtag cttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
72241 acttagtag gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct
72301 gtttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag
72361 attagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag
72421 taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72481 attagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72541 tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
72601 aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg aaaaactg
72661 caactctc gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct
72721 cttagtag gattctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72781 cttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72841 caactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
72901 tttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag
72961 gtttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73021 gtttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73081 gtttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73141 gtttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73201 aaaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73261 gaaactca acacacac acacacac acacacac acacacac acacacac
73321 caactctc gattctc gattctc gattctc gattctc gattctc gattctc
73381 caactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73441 caactctc tttagtag tttagtag aggtctc gaaactct caactctc
73501 tttagtag gattctc gattctc gattctc gattctc gattctc gattctc
73561 caactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73621 aaaaactg cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag
73681 tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
73741 taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73801 attagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73861 taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73921 gtttagtag taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
73981 cttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74041 gactctc agaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74101 aaaaactg cttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74161 caactctc actctctc tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74221 aaaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74281 caactctc taactctc taactctc taactctc taactctc taactctc
74341 gactctc gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct gaaactct
74401 caactctc cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag cttagtag
74461 aaaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74521 aaaaactg tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74581 gggagtag agttagtag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74641 aaaaactg aggttag tttagtag tttagtag tttagtag tttagtag
74701 gtttagtag gaaactca aaaaactg gtttagtag tttagtag tttagtag

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 2 3】

74761 tggatccocg gaaccocaaact gatgccaagc agaaggggtg tatcaactag gccaatgctc
74821 cactccatca gtaagatgaa acgtgtataa ttaaccgggt tottctgaaa tccaggatga
74881 actccgagac taatgaaagc aactgtagag aggtgcocaa cccagccaga tgaatataga
74941 asagataaga ggaagaataa ggaacacac acatgacacat tgaatgocitaa tcttttggat

【図 1 - 2 4】

78181 tatgaagtoa ctgtattgtc tctaggctat atgtatctgt gagggtgtgt gatatgtgtg
78241 gattattggt tttttttttttc gctctatatt ctgtttccagc ggctatactt aaataataa
78301 actttatggt aaattttttc tctctatgga cttctctatg gaactataag ccaatatagc

FIG. 1 (続き)

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 2 5】

81601 taataataa gggttttttg tgcctaaata agcttctaaa gaagataag gtaaggaatc
81661 atccattcagc aaatatttat taagacttgc tttattttat acagtgtact aggaactgga
81721 gatgaaaata tgatgtgaa acatgacata cactctggga atttggtagc tagtgggaaa

【図 1 - 2 6】

85021 atttctaac ttccagtctc ctctctctca aaocgtcca tctctattt taactatcct
85081 actttaaac gagattatag aagaatgaat tcttagaaca agtgcactct atttttaaat
85141 actattagct atccctgtgc ccaataaact ctctctctcc ttgtctctcc ctgtgtccca

FIG. 1 (続き)

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 2 7 】

88441 agggagataa tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
88501 gtaaaatttt tataaatttt taataaatttt gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
88561 attttttaaa attttttaca attttttaca gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
88621 catttaacaa atgattgttt tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
88741 ttoataacat attoatacat toataaatttt taataaatttt gtagatataa gacttggcag
88801 ggctctactc totagaacat tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
88861 acaactatac attagactcc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
88921 tgacaacaat ctctccattc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
88981 ggtggatagt agtactatct gtagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89041 ttggaaatgc ttggagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89101 aagagatgtt ttgggtgaaa tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89161 agtccacaga ttgggtgata tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89221 acagattttc aagaaatttc taataaatttt taataaatttt gtagatataa gacttggcag
89281 gtaacaaaga agtagactaa gtagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89341 gaaggagaaa agtagactaa gtagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89401 gtagagacc tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
89461 cttagtcaaa tcaataataa agtagatata acccagatc caaaaataga gtagagacc
89521 aagaaagaaa tgaattttaa attagaacat atacaatgc atacaatgc gtagatataa
89581 atataatagt aagaaagaaa aaataaatac acaactggcc atgactaaat acaactagg
89641 gggagcctga gaagagagag atttgaaat tcaagtaaac aagagaaaag gggtagacta
89701 tagaaaagaa agtagagacc attagaacat attagaacat taagactcaa acagtagtgc
89761 gggacccctt gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
89821 gtagtagagt gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
89881 agttagctgt gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
89941 gtttagactc togtgtaact taactttcac tttagagacc attagaacat attagaacat
90001 aagcaataa tatgtgtttc acactcaac attagaacat attagaacat attagaacat
90061 caggaaagat gtttttagg tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90121 ctctctctc tttagagacc tttagagacc tttagagacc attagaacat attagaacat
90181 tactatagag coactcaact tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90241 aaaaaaacaa aaaaaaacaa aaaaaaacaa aaaaaaacaa agggagagaa agcagagag
90301 tctctccact actttccact gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90361 agctatagaa gaggttggga aggttagtgc tttagagacc attagaacat attagaacat
90421 gggcctggaa gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
90481 tagcccaaac ataattttag gaggtttcat cttagtgcac tttagagacc attagaacat
90541 aatgaaaatg ttgtggttag attttttagg taacttttag attagaacat attagaacat
90601 gaggaaatg tttagagacc tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90661 taacttcaaa atcaaacact tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90721 agaaactttc tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
90781 acttactact agtactttaa attagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
90841 atttttctat tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
90901 tcttagaaca taatttttag aaatatttgc agtagatata tttagagacc attagaacat
90961 tcaagctaac ataatcttaa attagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
91021 tgaattttaa attagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91081 ttctctctc actttggaaa aaatctttgc attagagacc attagaacat attagaacat
91141 aagtcagagt gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91201 ctctctctc aataaagtag tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
91261 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91321 atgttagaaa attagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91381 tactagaaa agagtttttt tcaagagtag gattttttc agtagagacc attagaacat
91441 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91501 aatcttaga acttttaga tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
91561 agggcatttt gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91621 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
91681 tatttccaaa cotacccaaa acacttttaa tcaactgct cttagagacc attagaacat
91741 atgttagagt tatttagttt taataaatac taactcaat caactcaat taataaatac
91801 ttaagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 2 8 】

91861 ttatataaa aactgaatc taagtgtttg atattatgta caaaaatgtc aactccact
91921 atattatgta tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92041 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92101 atgattctgg ctcaactcaa ctctctctc ccagggtcaa gtagatataa gacttggcag
92161 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92221 gtagaagacc gtagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
92281 ctgctggcct tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92341 ctttttattt tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92401 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92461 caactttccc taataaatac gaaccccaat attagaacat attagaacat attagaacat
92521 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92581 attagaacat tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92641 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92701 attagaacat tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92761 attagaacat tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92821 gtagatataa tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
92881 taacaaatac agcttctaac ctctctctc taacaaatac agcagagacc attagaacat
92941 taacaaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93001 taacaaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93061 taacaaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93121 taacaaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93181 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93241 taataaatac gaaatataa acattttagt attagaacat attagaacat attagaacat
93301 gtagatataa attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93361 cttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93421 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93481 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93541 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93601 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93661 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93721 gaaatatttt attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93781 ctctctctc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93841 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93901 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
93961 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94021 cttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94081 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94141 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94201 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94261 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94321 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94381 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94441 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94501 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94561 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94621 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94681 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94741 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94801 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94861 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94921 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
94981 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95041 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95101 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95161 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95221 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 2 9 】

95281 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95341 atctctactc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95401 atattttttc atgtttgtta gtagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
95461 taagttatgt tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95521 tgaatgagag cccagagatc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag
95581 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95641 gtagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95701 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95761 gtagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
95821 atatttccc taataaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95881 cttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
95941 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96001 attttttgtt ctctctctc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96061 taatggcaaa agttttgaaa tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
96121 aagaaactaa tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
96181 agtccctctc ctctctctc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96241 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
96301 taacaaatac tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96361 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
96421 taagtagagt aagtagatca gaagtagatt aaagtagaca ggaagtagtg catagtagc
96481 atgaaatac taacccattt atataaaggt cttagagacc attagaacat attagaacat
96541 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96601 taactgttta atctcaactc agtagactc taataaatac caataaatac tttagaacat
96661 tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96721 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96781 ctctctctc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96841 taacccctca cttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96901 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
96961 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97021 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
97081 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
97141 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97201 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97261 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97321 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
97381 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
97441 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
97501 attttttatt aactgagaaa caaaaaggtc tttagagacc attagaacat attagaacat
97561 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97621 attttttaga tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97681 caataacagt acatctcaaa agaaactaac acagctgcta tttagagacc attagaacat
97741 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97801 taacaaatac attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97861 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
97921 aagaaatagt aactgatttc agaaagaaa taactcaata tttagagacc attagaacat
97981 caagctctac tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98041 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98101 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98161 caaagtattt attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98221 caagtagatt tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98281 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98341 taactccacc tttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98401 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
98461 aagtagaggt taactgaggt cttagagacc attagaacat attagaacat attagaacat
98521 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
98581 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98641 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 0 】

98701 tttagagacc tttagagacc tttagagacc gtagatataa gacttggcag gtagaagaa
98761 gtagagacc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98821 ctctctctc attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98881 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
98941 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99001 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99061 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99121 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99181 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99241 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99301 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99361 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99421 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99481 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99541 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99601 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99661 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99721 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99781 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99841 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99901 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
99961 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10002 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10008 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10014 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10020 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10026 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10032 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10038 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10044 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10050 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10056 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10062 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10068 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10074 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10080 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10086 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10092 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10098 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10104 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10110 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10116 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10122 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10128 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10134 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10140 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10146 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10152 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10158 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10164 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10170 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10176 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10182 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10188 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10194 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10200 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat
10206 attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat attagaacat

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 3 1】

102121 tccacttggg tigttaacatt ttaattccatt gotttatatt tatagaatta cttttataaat
102181 gccaattttt taatttttcaat agtttagoact cttttatgaaa atataaaactat tttttgaccoc

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 3 2】

105541 tcoctgtttt taataatgta ttagaataat tgcotttttt tcaaaaagctt acagtgaatc
105601 tattctataca aggcacaaagc aaaaocattct ctttcattgat tttttttctc caaaaagatt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 3 3】

108961 taaaataaag gaagttgatt gttttttatct gtagagaaaa gtaagactta ttttaagaat
109021 tccacaattt tagataaagt agactatagc atccacaata gacaactggtt gacactgatt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 3 4】

112381 gaggattctg atgagccctt agagagaagg ctgctcctag taccagattc tgaagagga
112441 gaggcgatcc tgcctcgcat cagcgtgcat cagactggcc caccgctgca ggcacgaagg

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 5 】

```

115801 atgctaccat taactaagga ggctgaggtt ggagaatcgc ttgagcctgg gaggcacaag
115802 ctgctccgca atgctgagtg gccatctgat tccagccctg gtcgcccaga gaagaccotat
115803 ctctaaataa ataaataagt aataataata ccagaaacaa caaaaaacaa caaagaacat
115804 ctgactaaa ttgttaatt ttctgaggg ttgagagat gtgagagatc gctgagacc
116041 tgcctcaact ccaggccact cttgagcttg accgccactc tggctgtgag tgagagacc
116101 ttcagccctc ccagccactg ttggaagcc tttctggctt ggccaagccc agagccgcgt
116161 cccctcagctt ccggggaggt ttggggaggg agggcctggg gaaactgggg ctccgggtg
116221 cttgtggggc agcccagatg cttgggtggg ttgggtctgg aggcocccag cctcagagca
116281 gcgggcgggg ccocagocag ccagcaggtg agggcctggg caoactggcc agcactgct
116341 gtactcgatt ttcaactggg cttcaactgc ctcocctggg gcccaggctg gggaccctgc
116401 gctcggcatt cctgagccct cccccaactc gcocctggag tgggctcctg cgtgcoccaa
116461 gctcctagc gagcaaccgc cccctgctca cggacaocag tcccaatagc gcccacaagg
116521 ctgagcagtg tgggtcgagg gcgcagggct ggcagcagc tcccaactgc gcccacaggt
116581 gggatccact gggggaagcc agctgggctt ctgagctgg ttgggactgg gaggactctt
116641 atgtctagtg aagatctgt aatcaaccca ctccagcga tgcatttagc taagatgttg
116701 taacaacac aatcagacc cttgtcttag ctcaaggttt gtaatatgac caatcagacc
116761 tctgatctca gttactctg ttgagacttg gagaaccttt atgctatgct aaggatgtt
116821 aatataccat atgtcaactc tgatcttag ctaaggtttg taataccact aatcagact
116881 cctctgtctg ctcaaggttt gaaatacac caatgaaoc ttgtatctc ctaaatctag
116941 tgaggaggtg gagaactttt gtctcttag caggatgtt aaagcaacca atcagaccac
117001 tctcaaaacg gaccaactcg ctgtctctga acoactctg ctgctctgaa ctaaggacca
117061 tcagccagat ggggtgggg ccagataaga gaataaaagc aggtcgcctg agccagaagt
117121 gccaactcgc tgggctctg aggaactgt tcttttggtt ttctgtcaat atgcttctca
117181 ctgctcaact ttgggtcgc cagtggctt atgactgctg acactcactg ggaagctctg
117241 cagctcaact cttgagcag ccagatcac gaaccocaa gaagaagaag actccactaa
117301 catcagacca tcaagaagaa caaactcagg acacggggc tttaaagact ataacactca
117361 ctgcaaggct ccttgccctc tcaagttagc tcaagttagc caagaaccca ccaattccgg
117421 acocacttgg actcagaaa atagatgccc caactgggg ttcccgtggg cccacttggg
117481 agaaagaagg agtgcctctt gctccacact aaataactc tactataga tagagctaa
117541 agaaaagaaa aagtccatg cgttaatt ttgtagtgc ccacaccaaa gatgcaata
117601 tggctctcta tccaaagggt tgaacaaccg tgccttagat attttatat taatattgca
117661 gggcaactat gtttaactg agattcttc acaaatgac atcaaatgca ctataattg
117721 gcttagcact catcttagac ccaacttta gagatcaca tcacacact gctccagaa
117781 atttgtgtg ctcaactgg ccactgtgg ttcttctacc agcctctcac tggctctcac
117841 atcccaactg taataaaata aaagggcggg gggccgcaga tgaaaatgc atgttaggcc
117901 acaagtccag atctccact acagaagag tgccctgaag agtggatgag gctttctat
117961 gctgcatgag cagccacata aatgcttaa agggcctgag aggatgca agcggctg
118021 tgggtggga gcgaacttg agagacttg ttctccgtt acatctaga agcagcctg
118081 atccagacc agctcagggc ttcccaggg gagactggg atccagctt caactctt
118141 tttgatcaca gttatagaca ttcccaactg tttcttgg ccatttatct cactttaa
118201 atccgggtg ttgatataa aaaaacaac gaataaac ctatggcca cacaataca
118261 cctctgtggt tggacttagc ttgtgagt atctctgag atatttatc tagagacc
118321 ccctgggtat gcttaacta aaaaactaaa cttccatgag agctccatg taacctcaga
118381 gaataaatga cccagaaaaa ccagaccctc tccaaaggaa gtataaatt gtaataact
118441 gagaccocaa cttaacactg taactcttt ttactgtgg cttgttctca cctcaacta
118501 agaaagctgt atgatattg taaagtctc tcactccac atgttccag taactctca
118561 cactccacca ttgtccagta acactcgaat ggtcaagaaa tctataaac ttagtaccaa
118621 aaattgtgt atactactg accaataaac acttgtctt catttgtact ctgagtgg
118681 taataactgt tatlctgoc tttgttgtaa ataaacaa ccaatggagg cttagtggaa
118741 gatgcatgag agcatagtc caactcaga cccgcactc caagggctg aattotaact
118801 ctgtctatc acaacatga acacttaga gttagttaa acctgggg ccactttg
118861 catlltaca atgagatct taatagtae gctcaatg ccactttgg ttttaaata
118921 catcatggt atgaacact taatgtagg ctctgactc aatgagcag gtttgtgt
118981 gtatcatla atacactta ttoacttat tataaactt gagatgta gtttggaa
119041 agttcatac agcaatataa tgaaaatlt aataactct tttatactc acaaaaaa
119101 cgagtgtgg taattataa ttttaccg agtaataat atgacttaa aatataat
119161 aaatttaca cattaactc tgcagctca gccaatgag caacatgat gtaataaaa

```

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 6 】

```

119221 ctacgtctgt gccacttaa tcttaaccaa ccoctttata ttgttaatg ttgaaacctc
119281 tgccttgaaa gatcaacta cctgatgttc cccaactat ctgaaatgtg tagtctttc
119341 tggaaactta taggactctt gctccatgca cctcagcaga gctgaactta tgcacctta
119401 aatggatata tactatata attcaactgt gatctgtc acactgat aatataa
119461 gctcaactaa caaagaacac agtggctcct taggagaag aactaaata caaacagaa
119521 tabaacaact atataaat ctattatta ctattatta ccaactattt caaaaaat
119581 ccttttagtg gaaaaacaa ttgatattg ccttttggg aaaaagaat ctgataata
119641 tgatgaatg ttttggccc latccttag acctgtgc atactgcac ttaaacatt
119701 tgaataata aaactgggt atagtagaaa atagtaatt ttttaaagc ttgagocaa
119761 ttatacaact aaacaatca ttcacagtg tccaaactc taactaac ttgatacaa
119821 atttacata gttttcttt tagactaag cctattatga taacaggtg cccattctc
119881 ataccattt aaatgtctc tagactgtc cctgtctat ccaactgca atcagagtg
119941 acagttagt tcttttaa tccacttggg cctcttatc tagcacaaga gaactaaag
12001 aaaggttaag atacattat tcootgggt aagttgatg ctacttllta gtttcttaa
120061 gggatbat tcaattaga ttcttttla caggttagtt aactaggtc tcoctttgc
120121 aatatgaaat atgactct tttaaact ttccaact cttcaaacg tattaactg
120181 aatttggat attcagttt tagactta ccttagaag tagagagtg ctactctt
120241 gattttgat acattctcc tactcaagg cagatattt tgaagttt tagatata
120301 caocaaaaa ataggcaaaa aaactatt atgttaact ttgaagacc ttgttggag
120361 tgactcatt actagatgga gaagaaatg aataatca ttagaagca gttcctgg
120421 tctttgaaa caactagag agctctgtg tctgatgaa tatctgaag ctgtttaa
120481 tgccttact ctatgatgt taagaatag cctagactg cctgatact gttcttt
120541 gcttccctt cttgttggg attagaac attagaac tttacatt ttgtacagta
120601 gatattgat atattccat aataccact ctgtattga cttaattga taattttag
120661 ggaacttat gacagtgg ttattgtta tttctttt gttgtgga ttgaactgaa
120721 tctgggact aagcaactg tttcttagt ggttagaat gatcttaa gctcagaa
120781 atggaaaaa aaaaatatt ttctttta ccaataac ctactgca cactatca
120841 aaactggat aaacttata acoctaaac ttctggaa tgaatgaa gaactgtt
120901 actcaatgc ttctatata cccaatatt ttttcaag atatgtatg acoctgaaa
120961 aatttggc etactcaata gaagcagtt agttgtgg tctatgga aaactgg
121021 gaaataatt tatattaga tgactagcc agttttgca ctacactg ttatgttc
121081 actagtaa tattataat attctgga ttactccc tcaagag atttggag
121141 ccagactat taactctc cttagtaga caaagagaa atgataac aaaaataat
121201 atagcmeta taaagatga cttagaag caccactat ctgactag actgttt
121261 atattctta gaaatacac tttgtgca gaacaagac ttttgaata gctattct
121321 ggggtcttt tcaattgaa ttaactgaa atctgaaa caaaggtag tttaacga
121381 tacagtgat aagagctcg tgcataca gaaagtta gaagaatg aaaaact
121441 tagattttc atctgtac tactgatat agagattaa ctaaaaata taaactc
121501 tagactact cctaatgaa ttctaat ttactatg aaagtggc tttttata
121561 taactaaag tactgtaa tattdaag taactaaag taaaatag actgtgt
121621 actttacc aagcatatt gttctccc tatatttt tttctgtg tcacttca
121681 aattttata ctaactact ttgttttt atgtttct ctggtgaa gttactat
121741 gggaaattg aaatttcag tgcattct atactcaa ttgtatga atcaacaa
121801 gataaatt ctctacatg ttatgaga tgaagtga aatgaaata gaacagca
121861 cagatgatc aaataaaa agaactaca aaactcag ttttaaaa gtttlttg
121921 ttgttatat atgtgca caattgtc attagccaa ttgctocac tggagaagc
121981 atagagact ctatgtac ctagtaca taatagtt ttaactgt tactatca
122041 tttactata acactgact tttacact gtgaacttt ctttttga acactctac
122101 ctgctgccc agctggag gtgagctgg agcagctgg ctcttctg atcttacc
122161 ctgtgccc agaaactcg gctccagg cctcagta gttgagta gttggatca
122221 ccaagccc tgatagat ttctgaat ctatagat gattgata caaaactg
122281 ccaagctg ctcaactcc ggcctcag tcatgtgt gctgtgct cacaactg
122341 tggatata aggtgagcc actgctcgt gctcaact catactc ttccat
122401 ttaactata ccttllca taataatg atactcaa taactgccc ctatagct
122461 tgaagtcta ataaaat ttatgcaa cagattaa ctotgccc actctgag
122521 ttttaccg aaaaatg ttatttla aactcagg tgtgactg gcttctg
122581 gaggctcat agttctat tagtaagga gagaatg agagaatta cttcagtg

```

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 7 】

```

122641 atttgaatc cattaactta atgtggctc atcaaaaata atagtacta gcaaccctag
122701 tacagctgt ggaacocagg acaaaaagca atagtgtgt gacttgat
122761 ttgttacaca ccaaacctg ttgatgta ttatagat gggcagatg taacctagt
122821 aagatgtag aaaaaactc actgctct ctttccact caggggct ctcttltg
122881 ttgctgtgg tctctgaa aagtagatt ccaactcct ttgttaga ttgtttt
122941 tctgtgat taabatgt aatcactat ttgttctt atgttaatc actttgtg
123001 atttctcca agcatatg tagtgaag ataggttt ttgtttaa gatgactt
123061 agtgggga gttgagca tctgactg ctactctc caagctgt ccagagga
123121 tcaactgag ccagaggtt agggctgg ttgtgata ttgtggtag accccagc
123181 ccagctcga caataatg tcaactata ttcaaaaata aataaaaata aatgaata
123241 tttgagat ctgcaactc tgaactctc aaagaataa gttctgtc atttctgta
123301 acaacataaa aataattga aaataacta catatttag gttttctc gttttttta
123361 ttaataaag aacaactca ttactcaca tagtgaaa acatactat ttcttcca
123421 taatagatg atttgagtt taagggtag tcttctca atgcaaaa ttgtattg
123481 ttgactcaga tttagctc atttcaat atggaatt cagtaagtaa ctgttgcg
123541 caaatacga tttactgt gttctaac aactctctc agacaagg ctgttggct
123601 catatgaga aataagct tgaactg atccacga ccaagtctg atttgtgtt
123661 taacttag tgaacttag ccaactctg atctctag gatctccag aggttacc
123721 ctctgact cttactac aatcaggg atttccc aaaaatgt acatctgt
123781 ctccagacc atgtgca cctcaaccg tttaaagcc gatcttaact aggttaaga
123841 atgaacact ctgacccc ctctgggt ttgttgtt ttactaaag ctatagag
123901 tgcctgctc tgcacagag catctgccc ttgtgaac tccatttgc tggctcgc
123961 atgtctcaga tattatagt tatcatab ttgtctct atattttg tttagata
124021 ttgagtgc ttgtttga agaatggt ctgttggga ctgtagcaga caaagaact
124081 ccttagtgt cagtcaacc tctctttca aatattgt ctagctct ctggtgac
124141 ttgtgtcca tatatgat gctccaagg ggcagatg ttgaagtgc caagaaa
124201 atatttttt tattgttaa ttctctca gggtagaat aactaaat atgtaactg
124261 cccaaagta tatgtagg ggaaccocaa ttattttaa aactatttt atactatc
124321 atttgaatg atagaagtt agatagcg ataaaagta caaaaatlt taaaactaa
124381 taaggaact tgaagaact caatlagt gatctctca taacaaat ttgacttaa
124441 gactgggt aataagtt tccoaagt ttcttag accactggg caacttct
124501 tttgggact ttatgtat gcaaaaag aaagacag ttbtgccc gaaagatc
124561 acaggtaga ggaagtagt cacaaaaac atttgata agcagaaa taacttca
124621 gactaaact ttcaaaact agataagaa aaocccata tatlctgt
124681 taacaaaaa tcaagtgt tcaactgt gaaagatc gatatttt ctgagccc
124741 tttgtgtg tgaatttg cgcacttgc ataatccct cccactctc ttgtttgag
124801 ctaagaat tttagcagg atgctcaat aagtgatc attgatttt ttltttg
124861 aaactcaga accocagg agggagat ttgcccact ttgaaagaa tgcagatg
124921 gogagtgg acagtggaa gaactcagc atgtcctg ctctgaggt gctcaataa
124981 acagtgat atggagact agcctctg ccactctg cccctcact taaatgag
125041 aaaaat tttcagaagt ctttggaga ttgaaacag gcaatctc tgcctctg
125101 atagcaagt gaaactca atagctcc cttctggg tctctggg ttgtttcc
125161 accagaggt cactgcact tcaactct cttctcag cctctcag ccttaccg
125221 ttgactagg ttgtccaa accattgaa tataaaga accagagat ttbtctt
125281 ccccaaac aaattctat ttcaaacac ttgtataaa ttcaactg tacttllc
125341 atttttgatt atcatgaaa tttcaaaa ttgttaata aatgttaa agaatgatt
125401 aataaata ttataaaa tctcaacta taaggcttt ttgtggg tattggtg
125461 caaaataa ttgtgcaact cccctgag ctctagcatt taataacta taagagagt
125521 ttatgatgt ttataagtt ctactgata agactgat atagctaa gaacagag
125581 caaacaca ttatcaagt atgtccag gaggaagaa ttaactccag gtaagaaa
125641 cactgatgct ttctgtag agggacat gatttgaaa agggagaaa atagatgt
125701 gacaatgaga gctgagggga aggggttct aggtggagg aocccagtt gaaagaaat
125761 gaggtagga gctgtagat gttgttaa atagacc ttggctgaa aagcaagt
125821 tgagagag actctgac taggaggt gtttggag aatatgaga agcactaa
125881 aagatttgg gacttctg gactttga gggtaggt gggtaggt gaaagag
125941 aatactact ttattgaca gttattgt acttttcc aatgttgg tttaactt
126001 gcttagaca tgaactctc aaggcaag agcactgct atcactca gtaattcag

```

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 3 8 】

```

126061 tgcctgact tgtgctggt acaaagtga cactgtata taaccttt taatggagc
126121 acaagctgt caacctaca aatgtaact cgtgactag atgacagtt gaaagtga
126181 ttgctgcga agagggcaga aagagagt aagcaagg acacagagc ttgagctg
126241 agggagag agcaaccag gttccgttag aggtatga aaaaagtga aagcagat
126301 gagaaggaa cccatgtt atagaatac atagaagg aatgatgac aacatgag
126361 tgcataaaa tgaaggttg caaagtgg atgtgaaag aggatgata cccactatt
126421 ctctcata ttatagaa agcatatg agagaatg gtagaattg gtagactt
126481 agaatctga acttttaa agttttaa gtaaaagca aactaata acactaata
126541 ttgaagat ttgaaaga caaaaat ttctagct atctatct ttgcaact
126601 ttattgggt ttgaaagg tctatgta tcaactgta gattgata ttgata
126661 tctttaaaa attagtgt tttagaat ttgctact gatatata ttgtggact
126721 ttaatagtt ctccaaag atagcaat tggctccc cttctctt acctatltg
126781 actcaca ggtatgaaa aataagac gttatagtt ctgtatgt taataaaa
126841 ataaaagg caaatgag ttgtttca ttgtttca ttgtattg gaaactccg
126901 tctatgat taatttga atatacaa gctcacaata tagacatag ttatgat
126961 caataatga ctcaactg ctcaactgg actgaactc ggaactcag acttagat
127021 taatagat ctaactgga gtgattgag aggcacaaa gaacatttt ccaaaaact
127081 ctgcaacaa agtggact ttggacttt gcatcaact tagctttgt ttgactctc
127141 caaaaagc ctcaactc ggaactcag tagtgatg gtagactg gtagactg
127201 cccaacta gaaacttg gcaagata gtagcoca gctccccc taagaact
127261 aggaagga cagaacaa gataagtt ttgaaagg agaggggaa gaaaact
127321 agggttat gaggctct cctgagtat agatgtat aggtcccag gcagctgt
127381 ctcaagct gaacttgg ttgagggt actgagtg ttgaggtg agaaaaga
127441 gggagtga gaggtaag tgacttgg accatagg tcaactgt acagatta
127501 agagttgt taagctggt ttgtggcc agbtttga acagctct gagctcctg
127561 actggttag ctcaactcc agagacaa ttgcaact ctactgac ctgtgaa
127621 acagtggaa taggatgt cccatgtt gatggact ttgctctc ttcttctc
127681 ctacctg aaaaataa tactgatt gtagaact ataaacaa agaatgaa
127741 tcaatagt atgtatat acaacaa atactgatt ggaacaaa actgcaag
127801 tgcctcact gaaatgt acacaaaa atatatct tagctttg ttgcaaac
127861 attttga ttctgatt ttctgta atagataa gaaactag taggagag
127921 ataaact atgctgaa ttctgact tagactaa caaaacaa ttgctgag cactaagc
127981 tgaactgt tttactgt aagatgaa actgctgc caaatata taattaca
128041 taagaaaa actggaatg gaacctta actgtgtc gaaagtgt gacttctg
128101 cctctgata atatttgg gctcaactc gaacctct gaaagttt attttaat
128161 atgattta taataaca ttttgaat atgtgtct ctcaatt ttctttt
128221 ccagcttga atcttctg ctcaatlt tttttat gggatggc ctactctg
128281 ttgccagg ggagtgact gatgcaat ttgctgact gcaactcc ctctoggt
128341 caagactc tctgcatca gctccagg tagctggat caactggc cccaactg
128401 cctgataa tttgtata ttaactaga tgggttca ccaactgg cagctgtc
128461 tgaactct gaactcga ctccagtg cctcaact cctcaact cagactct
128521 atlataggt gtagccact gcccaggc tctttatc tttaact taacttctg
128581 gttgtgtt caaagatg tagccagg cctttact ataacaa atttactg
128641 taagagat tcaattag gaaactaa atagcaact ccaaatag taaactt
128701 ttaattgt atttttla ataatlaa caagggoc tcaaatgt gactcctc
128761 gttatata atgttacc ttggttata ctaataa caaaatga atctact
128821 atactgat ttcaagaa agactctg tctcaata agcatcact taatttct
128881 tttttaaa aaagtctt gttcaacta ttcttata ttctttt ttaaaat
128941 gaaatttt gtggaact cactaac ctactact gatgttac attatagt
129001 gtaaaata atattgtca cactgggta atgtgca cagactct gaaactat
129061 actttgacc tactgaatt ttataact tagttttg cctccact cctctctc
129121 cctgctct taccatgt ttgctctt gacttctg gacttctg ttgtaact
129181 atgtaact tcaatctt tctaacct tagcttct tgcacaa tttctacc
129241 ttggact gtatgtaa aatgaaat ctgcttct ctcaact tcccaact
129301 gaaactga atagatg ttggatga caagacta caaactga tcaactgt
129361 taaacctg ataatgct tttaagtt caaagtgt tttagtca tcaactgt
129421 cactttgt aagggtaga gaactgct actgaacc atagatgt tataagtg

```

FIG. 1 (続き)

【図1-43】

143161 ttgggctaaa ctctaataa cagaagctgt cacaaactat gtcaggatt ctcccccaa
143221 aatgaagat ggggttoatt ggtcotoatt tttgggttcc ttgttccatt atttccattt
143261 tcccaagtc gccaagaag gctcctacag gctcctacat ttggacaact gacacactc
143301 gttctctgtg cacaggaagc agcagctgtg ggttaagagc ttggcaatcc caccactct
143361 gataatttgc gaataatgat aatttataat aggcactcga cacaactcag ttagctacaa
143381 gtttttatgt ctacagtgaa aatgttata aggcactcga aatgagaaa aggtttagt
143381 gagggttaaaa gctcaatgaa caaataatga ttgactcaca aatagtcocaa ttgacttga
143361 ctctccatct ctacccaagc caatgaatat ttggagctgt aggcctgtag ggcgtaaaat
143701 gacgcctgga ctactgtcta aatagtcocaa acagcactgt cactcttact ggcagacac
143761 tgctttctgc atagagatga gaataatgaa tccattttat attacaacaa attttatag
143821 tgactgcagt gtcgtaacca ctgactggtg agggatgttt tgaactcggc attgtttgag
143881 taaaacaagg aactccttga acgaggttca ttatocaggc agaatttgtt caatacgaag
143941 cctalgagac aaagaaocaa gttcctctca cgtgcaggaa ctccctttga ggcctctaga
144001 tcaattttat gttgcaagtt ttgacttggg ttcttttttg ttccaaagtt gaacttttga
144061 cttaagcttt aggtctocaa aaactcgtat ctacccctgg ctcaagctat gaacttttga
144121 ctatgaaatt asgtgtacaa gaactatgac ttactttttt ctgtgtgtga gtttttttcc
144181 tatttgagca cgtactccac ttgagtgaag aataatatac attgaattca gagattttgc
144241 ttgggtctaa ttggagttta cagaatgaca tgatatttag aatlaaggag ttgtttggcc
144301 tacatcatct ttccogctgt ctacactctg ctggagcact gatgttctca ttgactcag
144361 aggggctatg tccagctatg cactctctct cctgtttctc actgtgagct ctgtctgtct
144421 gacctctctt cagtttctct catgcccctg aggggttaaa agattcaaat ctcaagctat
144481 atccaagcct ctgtgcatag aacttccaa caaacactgt cactctctca cctccgtctc
144541 atgcaaggca cagaagctgt cactatggca ttgactttct ctgggctttg ccttggaaat
144601 gaggcaocgg ctactcttgt tctaaaatc cccaaatctc cttggaggta caacagagat
144661 ttggttgcaa ggcagaactt ttctttaggg acctggtctc taaaacctct tgttaccccc
144721 atttatggga cccatttatg ggttagagg agtcagctgt tcaatccatc caatattttt
144781 gctctaggct acctgttttg calagcaact atgtttttag tctttaggct ttgcttttga
144841 gogotttaag tcccaatttc acatgtgcca aaattttcaa atgactccta tgcactttga
144901 gttttcaaaa toagtttttg aaatttaaa gatocgaatt gatttttctt ctctgttctc
144961 tgatgtggcc tctctcttca gaggtactgg agttagaata tccaaagtggt aaagcccacg
145021 ctacaagaa attgttttag aatctaatg tgatagctct caactctatt cgtattggcc
145081 atttccagtg tccgcaactc gacctaggtg aatagctctg cacaagccac ttctttctg
145141 ttgcagaaaa ttgtctcaac ctactgaatg aatgactctg tgctctatgt tttgtatga
145201 ttgcccacat taaagatata acaacactgt ctbtggctat catattttgg actctgtctg
145261 gggattttaa ttgactgtct tagactcaca ttgaacogct agacagacaa ttgattggaa
145321 agttacattt tctaattttg atttgcactt tccattttgc acattttgca ttgaaagata
145381 ttgattcaoc tctatagttg agttcacta atgttgcagc caatttgcaa ttgtcaaaa
145441 caagttgaa acagaaaaa ttgatgtcta ctctccagc ctacactcag ttactgtttg
145501 aaagctctta ttctataata ctactatgtg taattttgag tcaatttagat agcaagatt
145561 aaatgtttta ttgattttta ggaatata taatgtgaa gatttttttt attatagctg
145621 ttctctatct tgcattataa aatataagtt ttgactttgt tatgaaata caactcaaaa
145681 atatacaact tcaactttat acagttaact taactttgtg tataccccct aatttttca
145741 agagagggat acctatttca ttgcagataa atacaataag atatttttaa tgaattttaa
145801 ctactctctt gctcactttc tcaactatgt atgtttact ttatctcaga gactttata
145861 ttgactagca gctctctatg aaaaatagc acagttgtgag ttgtttttaa tccaagttta
145921 atcaagaaag actgactcaa gatttagtca cccctgaaa taactcataa ttcaagatt
145981 aaaaattacc atgtgaaaca ctactgacta tatgctcttt actttctota tcaattttta
146041 ggttggggct ttgggtctc ttccaactcc gttlaaacgt ggotttgact tcaaaagata
146101 tttcttgaa ttgtgataa ttgtgaaqa caatttggag atattttcaa gatgaaggaa
146161 agttgaaa agatcaca ta gctgaaaaa agactcaca aaactctgg agactttgag
146221 atgagggg atactgtag ttactgttag atttgtaag atgaaatga atgactcaat
146281 taagatata tcttcaactc cctctgtttt ttccacaact cactccatat taagaatgaa
146341 gaattgttcc tttaocact ttgataagg aaaaatgaaa ataacagaa aaaaatacag
146401 ttgcccocaa tttttttcca aaaaataaa ttgtttgaat ctaaaacttt ggttgaata
146461 agatgatgtg ttaaatgtg aaaaagaa tagtttagtt ttgactgaa ttgaaocagc
146521 atcaaatatt actagtaaga ctaaaataa gagogttaa atgtgtctca atcagctact

FIG. 1 (続き)

【図1-44】

146581 aatattctgg aaggattgag ccacaggatc aaagatgta tcttttaaaa atagaagtg
146641 agtgaatcog gcttccaaat ttctttcttt tctttcttta tattttatta ctatagatg
146701 ttactatcc ttacttccg ttacttccg ttacttccg caactcccg taactatct ttacttaga
146761 tttttaaaa aaattgaaa ccttttaaaa ctctcaagc cttttttct ttgatcttt
146821 tttaataaaa ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat
146881 aaagataaaa ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat
146941 tcaataataa ccttatatgt caattatatt ttactaaat ttactaaat ttactaaat
147001 aattttatatt aaagtgttaa ttatttaact ttactaaat ttactaaat ttactaaat
147061 aaagattata gcaagttgt ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat
147121 gttgacact aaattatag ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat
147181 agttagtttt ttgaggtgtg ttactaaat ttactaaat ttactaaat ttactaaat
147241 agtctgtct ttgactgaaa atagtagaaa taacttttca cttttgctg
147301 taactaaact agaattaggt gatcacaata ataacagag ctatcacag cccatttata
147361 taactcctg ttactttctt ttactttctt ttactttctt ttactttctt ttactttctt
147421 ttactttgaa agcccgaca ataacagag ttactttctt ttactttctt ttactttctt
147481 ttacttttag gaactcaca actaatctt ttactttctt ttactttctt ttactttctt
147541 gtttttttt ttactttctt ttactttctt ttactttctt ttactttctt ttactttctt
147601 caacagaaat aaactcaca agtcaacca actacaagc aatgcccac ttgcccagt
147661 ttgattatgt gagaattcac aogtgaaga aogtgaoca ttgcccagt ttgcccagt
147721 gactgtcaaa gatctcaag caaatacac agagttgga aatgcccac ttgcccagt
147781 ttactttctt ataatgtctg cccagaggtt gaattttgaa cctgtctgc ttgttagac
147841 ttgtttcagt aagtgaatc cagtagctg aagcaactg aagcaactg ttgttagac
147901 cactttatt gtacagtag atcaatata atcaactat ttactttctt ttgttagac
147961 attttataa tgaatttaa ttgcaagat ctgcaacta taaaatggt ttattttaa
148021 ttgttagtt ttgcaagat atcaactat ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148081 aataataca aattttaa ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148141 ttactttctt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148201 gttgacttt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148261 ttgcaacta gatttttt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148321 cacttttt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148381 aatataact gattttct ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148441 ttactttctt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148501 aatctagaca agatttat atatttttt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148561 ttgaaactat atgcaact gaattttta actttttct ttgttagtt ttgttagtt
148621 cagatacaa aatagaga gagatacgt ttcaaaat ttgttagtt ttgttagtt
148681 actcagtag aaacagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148741 gatttttag atattgata caactttat ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148801 ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148861 ttactttctt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
148921 ttgaaactat atgcaact gaattttta actttttct ttgttagtt ttgttagtt
148981 ttgaaactat atgcaact gaattttta actttttct ttgttagtt ttgttagtt
149041 ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149101 ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149161 agcaaatga gaaagata atgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149221 aaaaaggg atgctgtct agtaactat ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149281 gaaatgaa atactcaca taaggttat ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149341 caacaaatt agttttaa cctcagtag cttttttct ttgttagtt ttgttagtt
149401 ctactttca caaattgag taagtttcc aataaagg aaaaagaa ttgttagtt
149461 agcaaaaa aaaaaggg atgaaagca aaaaagaa aaaaagaa ttgttagtt
149521 caaagttat ttctttgaa ggtggggca aggaagca ataatgaaa agtcaactat
149581 gaaactat ttctttgaa ggtggggca aggaagca ataatgaaa agtcaactat
149641 actgtttgag gaactcagc ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149701 gatttttct ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149761 cctttagca gagctaat taaaactat ttgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
149821 aagggactc ctactttta ttgaggtat ctactttct ttgttagtt ttgttagtt
149881 tattttct ttactttat ttactttat ttactttat ttactttat ttactttat
149941 tccaactg aggaactga ggttcaata agttagtaag gaagcagca ttttaaccc

FIG. 1 (続き)

【図1-45】

150001 agataccatt gctctctt aaagtgaa gaaocaaaa catggggcag gggaaagag
150061 aaagttctt tcccaagca ttgatactca aaagggaaaa ogtaagatcc actgaaactc
150121 gaggcagat tattgtgca taaacaagg taaagcttca cctgtcag
150181 ccaacttga cccactatga tcaattttg ttttataat totataact ttactttga
150241 aaagacogc ogtoocaaat ttcaagcttt tgggcccaca aaactcctga aatgcccctg
150301 aatagagat atccaagtaa atgctatgaa aatccaag aggaagcagt ttgtatcag
150361 ttggggaaa ttgactat ttgaaagctt ttatattag gtaaaaggt ttgttagaa ttgctctc
150421 ctttagaac ttgattgtgt atttgaagaa gtaaaaggt ttgttagaa ttgctctc
150481 ttgtctat ttaaaacogc gtttttctca catgctcgg aaaaattag caacagata
150541 acttagaaca ttgattttat ttggcaaaaa ggaaaaaaa aaaaactcagc
150601 aatccagat ggaactctg tcaagattg atttcccagc ccccaaaa gactcaaga
150661 gatcgggct ctcccctg taactgcaa atttcccag gctcccaca ctcccctta
150721 ttgtgcatg gggactcag tcaagctgac gaaactcagc acaagcttg ggcactctg
150781 ctctctctg caaaaactg acttagtaa aacttaggg ttgttggag attctctgg
150841 accctttt ttctctat gctagacta ttgctgtct cagtgggtg aaaaaggtc
150901 tccagcaaaa gggcaaaaa ttgagcaaaa ggcactgaa gcaacttga atgtctcag
150961 tccagttgg ggtgcocaaa ggaagtatt ggagcaaaa ttggacaaga atagataaga
151021 gattgggat ttctttct ttatctatc aaatacac agacagggc tcaactagtt
151081 gcccgggt ttgactat ttgactcaaa agactcagc caactcoca ttgtgatt ttgagattaa
151141 gctagatta gggactat gcaactgccc caactcoca ttgtgatt ttgagattaa
151201 agcaatatt tcaaaaactc aaatacoca ggtagatt ttgactat ttgagattaa
151261 tctgttaca gagtcaaac ccttggatt ttactatgaa taagatcac aggcactct
151321 ttgtttat ctgtctctc atagtctct agagaatac agagataaa aggttaata
151381 gatctttgt ttatcaatc agccctat caactcoca ccaatttota ttatgaat
151441 gcttttgg agtccctaa agcagagtt gggaaaggg ttgttggag ttgactcaat
151501 ttgaaacttt actctccc ctgactccc agggaggtt ggttggctga aattgtgt
151561 aatcaacaa ttggcaaaa tttaocaa actgctat taatgaagc acccagtaa
151621 acttactg aaactttg agagctcca ggtgtgtgaa gacattgag ttgtcaaga
151681 ttgtattcc agagagaca cagaactct gttcccctt ccaactat ttgtctatc
151741 actctccc ctggctgt ctggaggt acggctat aaaaacag taactagat
151801 agtaactgt ttgactat ctgctccc atgtctcc caactcoca ttgactaa
151861 actgataag tcaatttca gcaactgccc caactcoca ttgtgatt ttgagattaa
151921 actgactat tcaaaaactc aaatacoca ggtagatt ttgactat ttgagattaa
151981 gctctgcta ataacaga ttgtcaga ttgctctg ttgaaaaccc acttttgg
152041 ttgcaagaat attgtcaga ggtagggaa caacgtttg ttcttttt ttgtgtctt
152101 ttgtctct taagacag gctctcoca gttgtctc ttgaaocaga tcaactgtac
152161 cagtaagaa ctatagaaa atgtctatc ttggcccaca aaaaagaa aaaaactctg
152221 aggggtgaa cgggtctga ttctcagca aactctcoca caactgtct gaaactctg
152281 caagcatga aagccctccc ttgtttaa aggcactat gggcgggtg ggtgtctat
152341 gctgttaac gagactttg agagaacta gttggggat cactgtagc ctgtgtctg
152401 agcaagct gggcaactg gcaaaactg gttcccoca aatcaca aataggtg
152461 ggggtgtg ttgactata gggcaacta cttagaga ttgagcaga gaaactgtg
152521 agcccagg attaaagctg cagcagct ttggtgca actcaagc ggtagaca
152581 gtagaacct ttgcaaaa aaaaagaa aaaaagaa aaaaagaa gaaatgaa
152641 aaagaagc attagttata attagaact ggtaaaagc cagttgaaa aggttagga
152701 atgggtgtt actgaata gaagttat gaacactat ttgtgtg ggaagta
152761 aagcaagac actgctgt gtaggtgt catagcaat gcaattgaa ggcattgoc
152821 ttgcaactg ggaagaa acttttcaa atgttggaa aaagagata agtgaata
152881 aaagaacct ttgagcaag agttggaaa ctgaaggt ttgtgtgt ctcccact
152941 cttaacta acttaagc taaaacctg aaactgtat agttcagtt attgactt
153001 ttctctct ttgatacag ttgtgctat ttggctct ttgctctct ttgtactt
153061 aagaactg ttgcaactg gcaaaaact actgctg actttgatt ttgtgtct
153121 aatctatag ttgaggtg gaagactga cttctgca atgttgaag ttctactta
153181 taatagaa attttccc attttctga cttctgca atgttgaag ttacttagt
153241 ttctctat agttttta atattttg atattttg taactttta taacttagt
153301 gaatgcaat gaaattgta ttgtatttt aatttcaa tcaatttt cactgtctg
153361 atatagaaa atgattttt ttgacttta gcttatac ttcaactt gotataatc

FIG. 1 (続き)

【図1-46】

153421 atattgata gtttcaagg ttttttggc aattatttg aactctctc atagatctc
153481 atactgaa cttagttta ttctctctt ccaactctt atactttct cctctctct
153541 tatttca gtaggactt ccaactatg ttgaaagta ggtgtgag ggaatctct
153601 gttctgtc ttactatga ttggaact tcaacttt ttactatga ttactatga
153661 gttggagg ttgttagaa ttgttttt ttgttttt ttgttttt ttgttttt
153721 agttctga tttttaaaa caactcagaa ttggtgttaa attttggaa atgtttct
153781 gaaacttg atttgac ttattttg ttactttg ttactttg ttactttg
153841 attgatttt gactgcaa tcaacttt ttgtttgaa ttactttg ttactttg
153901 tatataata ttgtataa gtttagtt gattttgaa taactttg taactttg
153961 atggttct atgaaaaa atttgtgt ttgtttgt gactcttt gactctttg
154021 gtttaagtt aatgtggc ctatagct ttactagtt ttactttct actttctatc
154081 ttgaaagag atgcaaga attagtaa ttactttt aatatttt ttgaaactc
154141 cagtagaac actgcaact ggtctctt ttgtttgaa gcttaatt attttaaa
154201 agataggg actcagat taactatt ttctctgag agttttaga attttctg
154261 caaggaatt gctattca tttagttat caaacttt acytagct ttactatg
154321 atttttat tatcttca atgtgaa atgttagtt ttgttagtt ttgttagtt
154381 atgtatata gaaatttt ttactttt ttactttt ttactttt ttactttt
154441 ttctattt ttgacttt gaaacttt ttactttt ttactttt ttactttt
154501 ttgtttg gaactcag ttgtctg ttactttt ttactttt ttactttt
154561 ttgttagt ttactagtt gaaacttt ttactttt ttactttt ttactttt
154621 tcaatgag taaattct ttactttt ttactttt ttactttt ttactttt
154681 gtttttat ttgtttat ttgtttgaa ttgtttgaa ttgtttgaa ttgtttgaa
154741 ttgcccagtt ttgacttag agtgtgtt ttactttt ttactttt ttactttt
154801 ttattttgt ttactgatt ctagttaa ttactttt ttactttt ttactttt
154861 aattttat tttaaaa ttgttaa gttttatg ttgttaa gttttatg
154921 ttgttagt tcaatgaa ctttgaaga ctgttagt ttgttaa gttttatg
154981 gctatag atcaattat ttactttt ttactttt ttactttt ttactttt
155041 tactgatt caacttca ttactttt ttactttt ttactttt ttactttt
155101 ctactagtt gaatttca ttctttg ttactttt ttactttt ttactttt
155161 ttgacttt ttgctgaaa catcacatc aaaaactg agaatggg ttactttt
155221 actttat ctactagc cctcocaag ttctttg ttgtttg ttgtttg
155281 aaaaatag actctcag ttctttg ttgtttg ttgtttg ttgtttg
155341 cccctact tttagttat atgtgttt ttactttt ttactttt ttactttt
155401 aatgtctag agtttttt cgtcact ttactttt ttactttt ttactttt
155461 ttgacttt atattttag gattatga ttactttt ttactttt ttactttt
155521 tactgttt ttgtttta actactgt ttactttt ttactttt ttactttt
155581 ttctttct ttgtttta actgact ttactttt ttactttt ttactttt
155641 agtaattt tttaaaaa caacttttt ttactttt ttactttt ttactttt
155701 ttcaactaa tcaagtca tttaaaa atactaaa atttcatt ttactttt
155761 caactttt aaaaaaac tcccagtt ttactttt ttactttt ttactttt
155821 tttagttca ttactatatt gggtaact agatatac atactatc ttactttt
155881 atattagtt gaatttca ttgaaaaact ttactttt ttactttt ttactttt
155941 ttactttt atttttat aaaaat ttactttt ttactttt ttactttt
156001 ttctttta ttgactgaa agttttg actttttt ttactttt ttactttt
156061 ttgttaaa ttcttcaa gcccagct ttcaocaa ttctttta ttctttg
156121 ttgtagact actttttt ttctgact ttgaata atttcccag ccaagact
156181 cttaggtgt gattttct cttcaact ttactttt ttactttt ttactttt
156241 ttgacttt ctgagaatt agataaatt actatttt agattttt ttactttt
156301 ttctttct gctctctc actttttt ttactttt ttactttt ttactttt
156361 aactgatat gctttttt ttgaaacta gatgtttt ttactttt ttactttt
156421 ttctgtct gttttctt agttttct ttactttt ttactttt ttactttt
156481 gaaaaaact tcaactta ttgctaaa ttgctaaa ttactttt ttactttt
156541 cctctctg ttacttat aactagtt ttactttt ttactttt ttactttt
156601 gctgtctg ttcttagg ttgaaaaact ttactttt ttactttt ttactttt
156661 gactttct aaactcag actttct ttactttt ttactttt ttactttt
156721 caaagctt ttactttt atactagtt ttactttt ttactttt ttactttt
156781 ttctgact ttactttt ttctgctt actctgct ttactttt ttactttt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 47】

156841 catgaaaacc tttagctttt tttttttt tttttgagt gtagctocac ttttcccaag
156901 gctggagctc agtgggtgta ttttggctga cttgaaocct tgcctccctg gttccaaagtga
156961 tctctctctc agtggctcca agtagctcga cttgaaocct tgcctccctg gttccaaagtga
157021 tttttttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157081 ctaaacctca gtgactctgc caacttagcc tcccaaatct ctgggattat aggtgtgagc
157141 ccaactgcc ttgocctttag ctttctttagc tagttgtttt aaactctgta tctgttaatt
157201 ccaactcacc ttgctatctt gacttgggtt ctgtagcttg cctctgtttt tcaaatgggt
157261 tttttttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157321 tgcctggtaa aaggaactgt agtaaaactg ccttagtata tgcactggta tgcctgtagc
157381 aggttgaggg aagatattctg tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157441 cctctgtagc ttgaaagacc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157501 actagtgtag cctggagctg tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157561 cctgatagtt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157621 aagatgctc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157681 aaggaagttg gttcctcaga tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157741 cctctgtagc ttgaaagacc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157801 gctactcaga aggtgagctg tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
157861 ccaagattgt ttgocctcga ctttctttagc ttgaaagacc tttagctttt tttagctttt
157921 aaagaatgc ttgocctcga ttgaaagacc ttgaaagacc tttagctttt tttagctttt
157981 ctgtagaacc cttgtagaag tctctatagc aaactcaga aaactcaga aaactcaga
158041 ttgactggac ccaacttagt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158101 tttttcactt acagtttag tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158161 taattgtttc ttgttttag tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158221 gggggcagtt gtttgcctct tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158281 tttttcagtt gtttgcctct tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158341 caaacagat cagaactcgt aagctcctgt tttttttt tttttttt tttttttt
158401 ttgtactat cttaaacat tttaataag tttaagata gtttatatc actcttagt
158461 tatagtctc cttaaacat tttaataag tttaagata gtttatatc actcttagt
158521 tccagcact ttggaagcca agtgcctgct atcaactggg ctgagaggt gaagaccaga
158581 ctggtcaaca ttgaaacac ttgctcctgc aaaaataca aaaaataca aaaaataca
158641 ttgctccatc gtaactccag ctactagga agtcaagcca ttgaaactgc ttgaaactgc
158701 ggggtgagtt ttgocctcga ttgocctcga ttgocctcga ttgocctcga ttgocctcga
158761 caaacctcca tctcataat aaataataa taataataa taataataa taataataa
158821 taaataaaaa caaaaattt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
158881 gcttttagaa cttataaac cactccgcaa actatacaca gatgctcaca actactctc
158941 ttgtgtgta cttaaagact caactcaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159001 caaacactg caactcagc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159061 tttagactc aagtgagat cttgcttact ttttaagta tttttttt gttgttatg
159121 tttagactc aagtgagat cttgcttact ttttaagta tttttttt gttgttatg
159181 gtagaggtt gaaaagata aaactctgt gaagaagaa taatcaggt tttagctttt
159241 actgagact ttaatttaa gaactatac tttaagttt tttttttt atgactgaa
159301 aatgtagacc cttatttaca actcttact ttaaaatcca tttttttt taactcaca
159361 tagttttt ttaaacctc ttgactttt ttttaagta tttttttt gaactcaca
159421 caaacctaga atctctact cttttttt tttttttt cctcacaat gctactggg
159481 aaactaatt ttgactcag ttctcagat aaactcagc taactcaca ttctcagat
159541 gttatattg tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159601 tttttttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159661 atcagaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159721 caaacactc actgtttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159781 ggggttaag tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159841 caactcagc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159901 atcagaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
159961 atcagaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160021 aatgtttat tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160081 tcaaacat tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160141 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160201 ctttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 48】

160261 attatgtgoc agttatataa caaagaagac tttgtgggtt acaaacactg gatcctctgc
160321 atttggaaaa ttgtccagat atcatgact caacagcact caatgataa aggaacacag
160381 agtaatagct aaaaactta aagctaaac aaagcttcc aaatgataa atctccactg
160441 ctttccacc cttaaaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160501 gaacatggac atttatctaa tctcacttag aaactcagc aatgataca tttagctttt
160561 cctoaagca ttcttaccaa aattcttag atgocctat agcaaatat tttagctttt
160621 tgaactttcc ttcttttat tctcctgac ctaocctgc ctggccatc tcaagtgtct
160681 tatacaacc ttactatgt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160741 acatgtagct attcataat aaaaatggtc attgaaata caactattt taaatattg
160801 agtttatcta gcaattgaa caaactgact aaactcact ttgttagat tttagctttt
160861 acataagtc attcactgc ctaataact atcactcct cctcctgct atccttagt
160921 caactcaat aaatattat ggggcaact tttagctttt tttagctttt tttagctttt
160981 aaacaagata gaactcctct tctttgtga actattat ttgtgacaa caaaagcact
161041 atcaagaaa aaataaaaa agtactgat tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161101 gtagtact taacttga tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161161 gaaatctc tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161221 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161281 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161341 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161401 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161461 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161521 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161581 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161641 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161701 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161761 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161821 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161881 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
161941 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162001 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162061 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162121 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162181 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162241 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162301 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162361 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162421 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162481 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162541 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162601 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162661 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162721 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162781 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162841 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162901 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
162961 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163021 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163081 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163141 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163201 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163261 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163321 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163381 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163441 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163501 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163561 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163621 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 49】

163681 gtagtgcag atgatctaaa caactgaaat acaagtatcc aaggtgata
163741 gacttaggca agtaaaaaat ttgaaagacc gaaagaaacc ttggtgatag aagatggtg
163801 ttattcagta caacttagt cttttggctc caacttttat gaaaaatgt gaattttgt
163861 gttttttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163921 taattcagtt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
163981 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164041 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164101 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164161 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164221 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164281 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164341 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164401 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164461 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164521 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164581 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164641 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164701 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164761 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164821 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164881 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
164941 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165001 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165061 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165121 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165181 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165241 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165301 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165361 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165421 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165481 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165541 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165601 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165661 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165721 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165781 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165841 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165901 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
165961 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166021 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166081 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166141 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166201 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166261 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166321 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166381 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166441 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166501 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166561 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166621 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166681 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166741 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166801 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166861 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166921 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
166981 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167041 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt

FIG. 1 (続き)

【図 1 - 50】

167101 actgagaaat attttatcca tctaattata gctactttgt tctaactaat agatattctt
167161 gaaacaaaag caaacctttt ttggagacag agctctcact ttgcaactgt ttgcaactgt
167221 ttgctcttga actccagggc tccagtgatc ccttccocct taagtccact tttagctttt
167281 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167341 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167401 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167461 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167521 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167581 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167641 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167701 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167761 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167821 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167881 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
167941 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168001 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168061 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168121 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168181 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168241 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168301 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168361 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168421 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168481 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168541 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168601 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168661 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168721 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168781 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168841 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168901 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
168961 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169021 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169081 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169141 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169201 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169261 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169321 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169381 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169441 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169501 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169561 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169621 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169681 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169741 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169801 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169861 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169921 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
169981 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170041 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170101 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170161 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170221 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170281 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170341 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170401 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt
170461 tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt tttagctttt

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 1 】

170521 ttccaggcca gaactgcatt actacaacat ctttggcaac cacattgcoct ttcaatacct
170581 tctgtcagtg tctgtagcgt acaactcttgg gcoctccccc taacactctcc ccgcagctcct
170641 ccatgatata gcoactatct cgttccaact cgttgcctcc catcggatgt ctagactctcc
170701 ttgaaagata taagtagggt gttccaacata cgttccaact cgttgcctcc catcggatgt
170761 aaaggaagaa taactctctca agactcagtag cctctgggcta gaggatgga taattgttta
170821 aataaagaat atgctgtctca agctctgatgg gctctttatg taaccttttg taactgctgt
170881 cccaactctt. taactctctca agactcagtag taggaagaa. aaaaagtctc. acaagaattt.
170941 tgagccattt. tgcctgtggt. gactctctca. cgggtcttga. gacaaaacct. cctgtgtttg.
171001 aactccagct. cctactatct. cctagctaa. tgaactctca. caagtctctc. acaactctca.
171061 accctgctgt. tctcaactga. ttaactctca. ttaactctca. ttaactctca. ttaactctca.
171121 aaagagtaac. atataagact. accctgtccc. aggactcgt. taactgata. tctgcctata.
171181 atgggagcta. tctgtccacc. gcttctggag. taactctca. taactctca. taactctca.
171241 tctgtgatac. tctgttaacc. cctcaactta. taactctca. taactctca. taactctca.
171301 aactctctt. ttaagaagca. acaactctca. ttaactctca. ttaactctca. ttaactctca.
171361 aactctctt. ggcacagctt. ttaactctca. ttaactctca. ttaactctca. ttaactctca.
171421 tgaactgact. caagctctca. gactctctca. tctgtctct. cctctctct. cctctctct.
171481 ctcaactaat. gaactctctca. taactctct. agttctct. gaactctct. taactctct.
171541 aaagatttgg. aagtggatac. acaactctca. cctctcaata. tctctatgac. ctatgagta.
171601 ttaactctca. ttaactctca. cctctctaa. gaactctct. taactctct. taactctct.
171661 ttaactctca. ttaactctca. cctctctaa. gaactctct. taactctct. taactctct.
171721 tgagactctg. acaactctca. cctctctaa. gaactctct. taactctct. taactctct.
171781 ctcaactgat. cctcaactaa. tctgtctct. tctgtctct. taactctct. taactctct.
171841 gacacagaca. ccaactctca. cctctctaa. gaactctct. taactctct. taactctct.
171901 gccactaat. atctctct. caagctct. ggttaact. ggttaact. ggttaact.
171961 ccttaactct. atctctct. ggttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact.
172021 ttaactct. ggttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact.
172081 gcttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact. ggttaact.
172141 ttttaact. aataagtag. aactctct. aggtctct. ggttaact. ggttaact.
172201 taactctct. gaactctct. atgcaact. taactctct. atctctct. taactctct.
172261 ctcaactct. gtttaact. taactctct. cctctctca. taactctct. taactctct.
172321 tctctctct. cctctctca. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172381 aactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172441 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172501 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172561 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172621 tctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172681 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172741 aactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172801 atctctct. acaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172861 cctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172921 tctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
172981 aactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173041 tctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173101 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173161 agagctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173221 tctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173281 gactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173341 cctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173401 ttggagctg. aagaactca. gactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173461 cctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173521 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173581 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173641 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173701 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173761 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173821 aactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
173881 tctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 2 】

173941 ttcaaaaata aatggtagaa caggcacagg cttagacagc cactttcaaa aagaagaat
174001 aaaaagaata aatggtagaa caggcacagg cttagacagc cactttcaaa aagaagaat
174061 ttctctctg. ttggctctca. ttggctctca. ttggctctca. ttggctctca. ttggctctca.
174121 ttggagctc. atctctctca. atctctctca. atctctctca. atctctctca. atctctctca.
174181 ttcaactct. atgctctct. atgctctct. atgctctct. atgctctct. atgctctct.
174241 atctctct. atgctctct. atgctctct. atgctctct. atgctctct. atgctctct.
174301 gctgtgact. cactctctg. cactctctg. cactctctg. cactctctg. cactctctg.
174361 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
174421 tctctctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct.
174481 gcttctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
174541 gcttctctg. gactctctg. gactctctg. gactctctg. gactctctg. gactctctg.
174601 atctctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct.
174661 ttctctct. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
174721 atctctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct. atactctct.
174781 ttctctct. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
174841 gactctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
174901 gctctctct. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
174961 aaagctct. ttgaactct. ttgaactct. ttgaactct. ttgaactct. ttgaactct.
175021 taactctct. atctctctg. atctctctg. atctctctg. atctctctg. atctctctg.
175081 ctactctct. ttgactctg. ttgactctg. ttgactctg. ttgactctg. ttgactctg.
175141 ttctctct. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg. ttctctctg.
175201 ccaactct. aactctctg. aactctctg. aactctctg. aactctctg. aactctctg.
175261 ttctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
175321 tttctctca. gtaactct. gtaactct. gtaactct. gtaactct. gtaactct.
175381 aggacacaa. cagctctct. cagctctct. cagctctct. cagctctct. cagctctct.
175441 atctctct. aactctct. aactctct. aactctct. aactctct. aactctct.
175501 ccaactct. gtaactct. gtaactct. gtaactct. gtaactct. gtaactct.
175561 ttctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
175621 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
175681 cctctctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
175741 ccaactct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
175801 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
175861 tctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
175921 aaagctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
175981 gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
176041 gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
176101 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176161 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176221 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176281 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176341 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176401 gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
176461 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176521 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176581 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176641 gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct. gctctctct.
176701 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176761 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176821 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
176881 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177001 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177061 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177121 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177181 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177241 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177301 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 3 】

177361 ttttataat ttcaactca caaagtagt gatgtagtc taaacttaat gtaactgagtg
177421 ctttgtagtg tagtgtaag ctttgtagtg gatgtagtg gctttttga tagtagtga
177481 taaggttttg tagtgtaag ctttgtagtg gactcaaaa acaagaagca tagtagtga
177541 gagaagca caaagtagt ggtttctaa gctcaaggg ctaggctta gtaactgagtg
177601 gctgtaata caactgtct caaagtagt gtttgggtg gtaaaaacg taactgagtg
177661 aggaactat gacaaaagt caaagtagt ctttgtagtg caaagtagt gtaactgagtg
177721 ctcaactct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177781 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177841 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177901 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
177961 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178021 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178081 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178141 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178201 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178261 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178321 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178381 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178441 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178501 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178561 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178621 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178681 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178741 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178801 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178861 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178921 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
178981 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179041 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179101 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179161 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179221 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179281 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179341 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179401 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179461 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179521 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179581 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179641 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179701 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179761 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179821 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179881 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
179941 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180001 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180061 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180121 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180181 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180241 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180301 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180361 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180421 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180481 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180541 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180601 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180661 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.
180721 taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct. taactctct.

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 4 】

180781 ataaagatt ctgctgcaac agatcaactaa atcagtagt ccttagcaat ttcctgttg
180841 ttgtttttt gccatagtg cttatctctt tgaacagtaa tttctcact actattttc
180901 tcccttttg gacataatt tctttaagc cagactcct tctctctct ctttagctt
180961 ggggtctct agatcaacta gaatttaata aactcctct agagcctct tgaagaata
181021 tttaactaa caactctca cactcaaaa ctccctaga gaattctct gacactctg
181081 gttgctaac aataacttg taactctca caactctca taactctct taactctct
181141 atgtttact actcaatt taactctca caactctca taactctct taactctct
181201 gatttaaaa agcttttac tatactctc agtcaataa acagtagat aagaattg
181261 caaactgct cctgtcttg taactctca caactctca taactctct taactctct
181321 aataacttg cactctct taactctca caactctca taactctct taactctct
181381 aataacttg cactctct taactctca caactctca taactctct taactctct
181441 ggggaaaaa atactctg cactctct taactctca caactctca taactctct
181501 agctttcta gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181561 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181621 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181681 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181741 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181801 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181861 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181921 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
181981 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182041 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182101 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182161 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182221 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182281 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182341 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182401 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182461 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182521 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182581 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182641 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182701 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182761 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182821 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182881 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
182941 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183001 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183061 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183121 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183181 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183241 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183301 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183361 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183421 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183481 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183541 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183601 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183661 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183721 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183781 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183841 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183901 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
183961 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
184021 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
184081 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct
184141 taactctca gtagctct aggaactag taactctca caactctca taactctct.

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 5 】

```

184201 tttatgctat cttttgtcct cagctcatgc agagtagaag atggggagta gcaccaagga
184261 ttagtgcata cttccatcct ttaatgcaca ttctattctc tgcctacata agatgtcaata
184321 ctgagaggaga tatctgcaat gtatacatat ttcttttccc agatcgcatc cagtlgtggt
184381 ggaataaatt atgacaactt gatacaactt tgaagctcac aagaagcatt tgccaagrat
184441 ttttttctta ctactttttg ggatacctgg caagtaaatg acactcattg aaagtttctc
184501 aatgaatgaa gtaacaagat aaaaocagtt atagactgat tttttggagc ttccaagttt
184561 gtaaatagac ttttgcctca tcaattcoaa tggtgogagg tagtgggggt agagggattg
184621 gtatgaaaaa caataagctt cagaactctc gtgtttattt ttagaatgic aactccttga
184681 gtgtttttta ctctgtggta tggaactcat ctctotbaac tgcaggttgg ctccagatctg
184741 gtgatagaa acgtttccctg aatgactgac ttgtctcttg tggatggggg ctgtgtccca
184801 agccatggcc acagaagcgt gactgtgctg gctagatctg ttctcagtaa ggcgaagatc
184861 ttgtgctgtg atgaaocagc tgcctatttg tgccactgtg gagtttcgac tgtttctgta
184921 cttaaatgca cagtgggaa acagtcaatta tgcctgcttc atggtgcaac atattttcat
184981 taggtgtgca tgtctgtctg tgggggtctc ccccagaata tgaataaatt gccocagtga
185041 aatgagcata aatgctcatt tctctgtcaa gactgtctg ttctctctgg ttctctctgg
185101 ttgtttctat acaactctct cccctctgic acactgatg taactctgat gaagctttta aatacaagg
185161 cctaaactga tccattgat ttgcttttgt tccocatta taccoatagc atgtttatag
185221 ccccaataaa agaagtaact gtattctcac ataatgaaa atgactcat ttaataaagt
185281 tcttttgaat ttttttctc gtttattat ggatacttag agtctacccc atggttgaia
185341 agctgattgt gctcaacgct atatacaat tagtgaaaa gaacttaag aaataagtaa
185401 ttaaaagaga taatagaaca atagacatat tatcaagga aatacagatc attaactgtc
185461 tgtgatatta tgtgtggtat tttctttctt ttctagaaca taccataata ttagaagaac
185521 tctaaaacaa gcatttggct attgcaacag aattctctgt gaacacagga tagaagcat
185581 gctggaaatg caacaatttt tggtagctct ttataacttt acttaagatc tcaittgcctc
185641 tgaattctct gataacaatc tcaactgtga tagtctctgc aaattgcaac aatgtaaca
185701 tctttttcaa aatatgtag cacaagcca tccagcttta ctaaaatag ctgcacaagt
185761 ttttcaactt gatctgacc atgtgtgag gttgaaatc agtaaatc aatggcagc
185821 atattactaa gttatgttta laaaatagat atataactt tttagacctc ttatttggag
185881 accaagctat acaaaactct ctactgttta agattttaaa aaaggtctct gtagattttt
185941 caataactaa atgtcccatg gatgggtct gggacagccc tagtgtctt acagctgat
186001 ttatggtatt aatgacaag ttgagagcca cacttoactt ttctagccat gatttgggtt
186061 caggtagtag cttctcaac cactctctc ctgtctctaa aaaaactgtc acatggccag
186121 gcacagctgc ttaactctgt aatcccaata ctttggggag ctgaggtggg gggattactt
186181 gaggccagga atcaagacc agcccagcca acatagtag gcccactctg tctttataa
186241 acaaaaacaa aactgtcaac gotttttcca agttagtctt acaaaatccc tatggttag
186301 tccaaagaaa gttctgagga tgaatgata cgtcattctt gttcagctt ttgagctcc
186361 tggaggtaaa tggtttctct actgaagctt tttttatcc atgattatac ctaagcttga
186421 agtaacaat agtggggga gactcaaac cttctgccc gacttggaca agtcaagaa
186481 tctaaagaaa gtctctcatt gtctgactt gacttgcct gacttgcct taaagctca agccaaagag
186541 gtgtattaaa ctgagcaca tctgacaaa ttgaaatcc ttgaagctca gatcactctg
186601 gaagagctc aactcttat ggtgcttag acttaccctc attttctagg taattataa
186661 gggactaat atttgtttt caaagcaact tcaagttcac taaactccc tgaagaactc
186721 tccagctgct gagttagaaa tcaacaacta tttcacagat ggtagaacct ctttagaca
186781 aaaggacaca gcaagttaat gtgacatcc tgaattgtca aaatgcaag ctctggacat
186841 tgcattcttt gacttttatt tctctttag cctgtgccc ttctgtccc tgcctgtctg
186901 tgacctgctc tctgtcccag atctcaacta cagocatttc cctaggtcat agaagagaa
186961 aaagtgcgac agtaagcttc catccagaaa ctgctgaac agaggagctc ctccggcaa
187021 gccatcgacc cctccagacc ggtgaaactc tttcccacc ggaactcaag caagtgcag
187081 tccaagcccc agattgctgc tctgaaagag gagacagaa aagaggtgca agatacaag
187141 ctttagagag cagcaataat gtgacagtg gacatttgc ctggaattg gactgtctg
187201 gacagcaac cctgcaactt ggaactctg gaaacttac ctctgctca gaaaagag
187261 atgaaatag tttttttta aaaaagaa atttggtag ggaattgag gaaactgata
187321 tgggtcttga taaatgctc cctggcaata gtaaaattg gtaaaagga ctcaaaactc
187381 tgaagattt accactgtg ttttgaagc cagatttccc tgaaaaacct tgcactgtg
187441 tagtaattg aaagcagct ctaaatgtca atcagcttag ttgactagct tattgttag
187501 tgaactcgt taattttag tgttggaga gaaactgaa cataactct aggttattga
187561 ttaagttag ataaaggaa actcoagcgg tttataga ctgtattccc tttttctct

```

FIG. 1 (続き)

【 図 1 - 5 6 】

```

187621 ctctcccact gatgtttag aacacaacta tattgtttgc taagctatcc aactatctca
187681 ttccaagca agtatttaga taccacaaga accacaagac tgcacatcaa aatattgccc
187741 atcaacatc tagtgagcag tccagaaaga gaactcccaa atccctgaaa tccaggttag
187801 tattgtccag gttctacaaa aatctcaata tttccaaa tcaactata tctctactc
187861 gggaaagggc tgtataatc ttccaagagg gaaagcagc ttcccttagt gaagaagttg
187921 atatgcttt tcccaactcc agaaagtag agctccagc aactctgac tagagtttag
187981 ctggaaaagt atgttagtgc aaattgtcac aggaacccc tcttttccc agaagctcca
188041 gtagaagggg tgttagtag ataggccatg ggcactgtgg gtgagacac atgaagctca
188101 agcatttaga tgttagggt gatgggtga ttgtttcagg ctgagtagat gtaactcaatg
188161 ctgtctaac taagagagaa tgagagacac actgaagaag cccaactcat gaattagtt
188221 tatatgctc tgttttataa ttttggagg caaaattttt tctctagaa atattattt
188281 taataatggt tcaaacata atacaatgc tgtattttaa aagaatgatt atgaattaa
188341 ttgttataaa ataattttta tttttgaaat atgactttt tagggacta gtaattctat
188401 gaaatattat gtlaaaactg ggacagggga gaactclagg tgaattaac caggggcatc
188461 gaataacttt ttggtctga ggaagcctt ggggtgatg cagttgttg ccaagctgtg
188521 atgatttcca gcaagacagc ctctcttag gactcttga aagaatttg acccaagctc
188581 tggctgtct ctaaaaggt acactgctt ctaactcca acactgact taagaagct
188641 gcaattatt tattaactga agaaatatic acttgcact aaaaactca catttgttg
188701 aaa

```

FIG. 1 (続き)

【 図 2 - 1 】

```

1 aattggaagc aafatgacac acagcaggfc agaaaaaag ggttgagcgg caggcaccca
61 gagtagtagg tctttggcat taggagcttg agcccagagc gccctagcag ggaacccagc
121 gccccagaga ccaatgagag gtcctccctg gaaaagccca gccgttctc caaaactttt
181 ttcagctgga ccagcaactf ttgagaaaag ggatacagac agccgctctc atttccatg
241 atatacaaa tccctctctg tgaatctgat gacaactcat ctgaaaattf ggaagaagaa
301 tggatagagc agctggctct aaaaagaatt cctaaactca tfaatgcctf tccgctctga
361 tttttctgga gattatgtct ctatggactc tttttatatt taggggaagt caccacaaga
421 tgcagccctc tttttctgga aagaatcafa gcttctatf acccgafata caaaggagaa
481 cgtctatcgc cgattatct aggcattagc ttatgctct tctttattg taggacactg
541 ctctacacc cagcaatttt tggcctfcat cacattgaa tgcagatgag aatagctag
601 tttagttga ttataagaa ctctcaagcc ctgcaagcc ttaaaatgt 3241
661 attggacaac ttgttagct cctttccaac aactgaaac aatttgatga agacttgcga
721 ttggcaactf tctgtgctgc cgtctcttgc caagtggcac tctcatggg 3361
781 gagttgttac aggcctctgc ctctctgga ctgtgtttc tgaatgctt tgccctttt
841 cagctgtggc gatgatgaag gatgatgaag tacagagatc agagagctgg gaagatcgt
901 gaaagacttg tgattacctc agaatgattf gaaaatfacc aatctgttaa ggcatactgc
961 tggagagaag caatgaaaaa aactatgaa aacttaagac aaacagactc gaaactgact
1021 cgggaagcag cctatgtgag alactfcaat agctcagctc tcttctctc aggttcttt
1081 gttgtgttt tatctgtgct tccattgca ctaalcaag gaatcactc atggaaaata
1141 ttaccacca tctacttgc cattgttgc tcaactgcga tcaactccgg 3781
1201 gctgtacaaa catgtatga ctctctgga gcaataaaca aaatcagga ttcttcaaa
1261 aagcaagat atagacatt ttgaatatac ttaacgacta cagaatagat gatggagaat
1321 gtaacagctc tctggagga gggattttgg gaattttatf agaaaacaaa caaaaactat
1381 acaaatagaa aaactctaa ttgtgatgac agccttctc tcaatgtatf ctaactctf
1441 ggactctctg tctgaaaga tattaattic aagatagaaa gaggacagtf gfgcgggtf
1501 cctgactcca ctggagcagg caagacttca ctctaafta tgatttggg agactggag
1561 ccttcagagg gtaaaatfa gcacagtga agaattcat tctgttcca gtttcttgg
1621 atattgctg gccactfaa agaaaatct atcttgggt ttctatga tgaatagaa
1681 tacagaagcg tccaacagc atcaaacfa gaagagaca ttccaagt ttccaagaa
1741 gacaatagc tcttggaga agtggatc acactgagtg gaggtaacc agcaagatf
1801 tcttagcaa gacagfata caaagatgct gattgtattf tattagact tcttttga
1861 tactagatg ttttaacaga aaaaagaata ttgaaactf gttctgtaa acgtactgct
1921 acaaaaacta gggatttggf cactctaaa atfgaacatt taagaagagc tgaacaata
1981 ttaattfctg atagagctg cagctattf ttggagact ttgacaactf ccaaaacta
2041 cagccagact gtaactcaa actacttga ttgacttct tgcaccaat ttgtcagaa
2101 agagaatf caactcaac ttgacctta accctttct cattagaag agactctct
2161 tctctctgga ctgaaacaaa aaacaactc tttacaga ctggaagtt tgggaaaaa
2221 agcaagaatt atttctca catcaaac tcaactaac aattttcc ttgcaaaaag
2281 actccctac aafatgagc catgcaagc gattctgat agcctttaga gaaagggctg
2341 tctttagc agattctga ctcagggagc gcgactgct ctgcactag cgtgactag
2401 actgcccaca cgtctcagg acgaagagg cagctgtccc tgaacctgac gacacactc
2461 gtttaaccag ctgacaagc taccgaaag acaacagact atatttcaa gaaggttatc
2521 gccctcagg caaactgac tgaactggat atatttcaa gaaggttatc tcaagaact
2581 gcttggaaa taagtgaaga aattacgaa gaagactta aggaggtct tttttagat

```

FIG. 2

【 図 2 - 2 】

```

2641 atggagaga taccagcagt gactacatgg aacacatacc ttcgatfat tactgtccac
2701 aagagcttaa tttttgct aatttggic ttatgtaatt ttcgtcaga ggtgtctct
2761 tcttggttg tctgtgctt ccttggaaac actctctc aaagacaaga gaatgactf
2821 catfatagaa ataacacta tgcagfatg actccagctc caacagttg tlatgtttf
2881 tacatttacc tggagtagc cgacacttg ctgtatfg galfctcag agcttclaca
2941 ctgtctcafa ctctatcac agtctgaaa atttacacc acaaaattf acactttg
3001 ctcaagcac ctatgcaac cctcaacc ttgaacaag gttgactct taatgattc
3061 tccaagata tgaacttt ggatgacct ctgctctta ccaatfag ctctacagc
3121 ttgtataa ttgtattg agttagaca gttgtcag tttfcaacc ctactctt
3181 gttgcaagc tggcagtag agtggcttt atatttga gcaattttc cctccaacc
3241 tcaagcaac tcaaacact ggaacttga gcaatttgc caattttac tcaattctf
3301 acaagctaa aggactatg gacactctg gccctggag ggcagctta cttagaact
3361 ctgttccaa aagcttga ttacatct gccaactg gccaactg ggcagctta cttagaact
3421 cgtctgtcc aatgagaat agaatgatt ttgtactc tctcaact tgttactc
3481 atttccatt taacaacag agaaaggaa ggaagattg gttactct gttactct
3541 atgaatata tgaatcaat gcagtgctc gtaaaccca gcatagatf ggaatgctc
3601 atgcatctg tgaagcagf ctttaagtc atgacatg caacagagf taacctacc
3661 aatcaacca aacatacaa gaatggccaa tctgctgg tctgattat tgaactaca
3721 cactgaaaga aagatgact ctggccctca gggggccaaa tgaacttca agacttca
3781 gcaaaatac cagaaggtgg aatggcata ttgagaaca tttcttctc aataagctc
3841 gccagaggg tggccctct ggaagaact ggaactgga agacttct gttactct
4321 tttttgagc tactgaac tactagaga atccagatg atctgtctc ttggattca
3961 ataaccttg acagctggag gaaagcttt ggaatgac cacaagatf atttttt
4021 tctgaaat ttgaaaaa ctggactcc ttgaaactf ttgaaactf aaaaattg
4081 aaagtgcag atgaggttg gctcagatf gtagaagac agtttctg gaagctgac
4141 ttgtcttg tggatgggg ctgtctca agcatggcc acaagactf gatgtctg
4201 gctagatct ttctagtaa ggcgaagatc ttgtctgg gccaactg ttgctattg
4261 gatccagtaa catacaaat aattagaaga actcaaac aagcattfg ttgtacca
4321 gtaattctc tgaacacag atfgtgaaf tctagaagca gccaactf ttgtcata
4381 gaagagaaa aagtggcca gtacatfct atccagaac tctgacaag gaggacctc
4441 tctcggaa ccaacgccc ctccgacag gtagactct ftcccacc gaaactgac
4501 aagtgcagt ctaagccca gatgctct ctgaagagg agacagaag agaggtgca
4561 gafacaagg tttagagag acataaag ttgacatg ttgacttct acattgctc atggaattg
4621 agctgtggg agctcact catgcaatf gagctctgg agacttacc aacagttacc
4681 aaacaagga tgaattagt tttttttaa aaagaacaa ttgttaagg gaaattgag
4741 caactgatf gggctttag aaatgcttc tcaactgat tgaagattf tgaagctct
4801 tcaactctf tgaagattf ccaactgtf ttgcaagc agatttct gaaaacctf
4861 ccaactgct agtaattga aagcagctf taattcaaa taagctctf tgaactg
4921 atgtctatf gaaactgt aattttagf ctgagagag ctgagagag aactgaaac
4981 gttttagat taagtaaga taactgaaa ctccagctf ttataagc ttgtactc
5041 tttctctc tctcccag atgtttaga acacaactf atgtttg atgactcca
5101 actatctat tccaagaa gttatagat accacagaa ccaacagct gcactcaaa
5161 atgtccca atfgagcag atfgagag atctcaatf ttcagataa cacaactat
5221 cagggttag atgtccag ttataact ttcaagctf accagattf accagattf
5281 cccctacct ggaaggctt gttataact ttcaagctf accagattf accagattf

```

FIG. 2 (続き)

【 図 2 - 3 】

```

5341 aagaagtga tatgctttt cccaactca gaaagtaca agctcacaga ctttgaact
5401 agagttagc tggaaaagta tgttagtaca aattgtcaca ggacagccct tcttccaca
5461 gaagctccag gtgaggggtg gtgaaagtaga taggcccattg gcactgtggg tagacacaca
5521 tgaagctcaa gcatttagat gtataggttg atgggtgat gtttccaggc tagatgtatg
5581 tacttcatgc tftctacact aagaagagaat gagagacaca ctgagaagac accaatcatg
5641 aattagtitt atatgctct gtttataat tfttgaagc aaaattttt ctctagaaa
5701 tattatttt aafaattgtt caaacatata ttacaatgct gtaatttaa agaattatta
5761 tgaattacat tftataaaa taattttat attgaaata ttgactttt atggcactag
5821 tatttttat aafattatg ttaaaactgc gacagggag aacctagggt gatattaacc
5881 aggggccatg aatcaccttt tggfctggag ggaagccttg gggctgatcg agaatgtgtc
5941 cacagctgta tgaattccag ccagacacag cctcttagat gcagttctga agaagatggt
6001 accaccagtc tgactgttcc cacaagggtt acactgectt ctaactcca aactgactct
6061 taagaagact gcattatatt tattactgta agaaaatata acttgtcaat aaaatccata
6121 catttgtgta

```

FIG. 2 (続き)

【 図 3 】

```

1 mqrspiekas vvskllfswt rplrtkyrq rielsdiyq psvdsadnis eklerewdr
61 laskmpkli nalrcffwr finfygflly govtkavpl ligraysyd pdnkcersia
121 iylgic1e1l fivrtllhp aifghhigm qmriamfshl yktdklsrs vldklsigql
181 vslslnnk fdegalahf vwaiplqval lmgilwellq asafcgjfl ivlafgagl
241 grmmmkyrdq ragkiseriv isemioniq svkaycweea mekmienlrq telktrkaa
301 yrvyissarf fsgfivvfl svjpyalik iilrkifru sfvirmav trqfwavqt
361 wydsigaink iqdlfkyq kleynttt evmenvtaf weegfelfe kakomnmrk
421 tsngdlsff anfljgqv kdimficer gallavagst gagetkllmm ingelpepsg
481 kikhgrist csqfswmpg tkienifgv sydezyrsv ikacqlcedi skfakdniv
541 lgeggilsg ggrarislar avykdadyl ldsprfyldv ltkesfese vcklmanktr
601 ilvskmehl kkadkililh egssyfygf selqnlpdf sskimgcdf dqfsarns
661 iltelhrfs legdapvswt etkqsftqt gefgekkrns ilmpnsirk fsivqtpq
721 mngieedsde plerlslvp dseagcalp risvisgtg rilarrsvl nlmthsvng
781 qnlhrktas trkvslapqa ntelidiyr rlsqetglei seeneedlk ecffdmesi
841 pavtwtlyl ryitvhksli fvlwlvif laevaavsv lwlgnlplq kdgnstsm
901 nsyaviist ssvyfyiyv gvadllamg ffrjplvht iitvskilh kmhsvlqep
961 mstlntkag gilnrfskdi aiddlplf ifdijilli vigaavvav lpyyfatv
1021 pvivafiml ayfltsqql kqlesegrsp ifhivlsk glwtrafgr qpyfetfkh
1081 alnhtanwf lylstrwfq mriemfvif fiavtfsil ttegegrvq iiltammim
1141 silqwavns idvslmrsv srvfkdmp tegkpsksk pykngsksv mienshvk
1201 ddwvpsggqm tkdltakyt eggnaleni sfsipgarv gltgrtsgk stltsafrl
1261 lntegeld gvwdsilq qwrkalvsh qkvfllsfl rnkicpyeqw sdqewkvad
1321 evglsvieq fpgkdlfvv dggvslshg kalmearsv lskakilld opshltpvt
1381 yqitrltkl afadevile chrtaemlec qdlvicoek vrydsiqkl lnerslfrq
1441 ispsrvklf phmsksks kpajalkee tevezqtrl

```

FIG. 3

【 図 4 - 1 】

```

1 gaattcaag gaaaacataa gatgcaatc gttcccca ggaggttga gggaagagg
61 gttatgaalgtatgtaaaagaaagtgggtgctgtgtgtttataaaca gaattgcag
121 accaaacattatfingaaagcagtaaaaagt aaactagaa ctggcctagt catgtccag
181 gacaccttt caaagctgt gaacalcitt gtaagctgt aatgtgtgt tactcctag
241 gtaactactg tggcccactg tgaagagct gttgctgtc ttaccctct agttagataa
301 actataagc acaaccagac tacatataat gaagtgaga gacctgtct titttaacg
361 agctttctt cccagataga gtgactatt ctittctct tccacattf caggttttag
421 tgtactgtg atgtctacc actatacact atfaagctt actcaggaga gaactcaga
481 aacacterca aattaagttg aacatgatgg ataaagaa tattgtgaaa gttactctc
541 atgattcta atggtaaac ctggcaggtg gactaatct tgcagagaag gttactact
601 ataacttctc atattatgag atcatttga agaagcacc agcaactgc tgaacacaa
661 gttagtata aataaattgt gcttctctt tctctactc atctctgct tcttttaa
721 tafacttta aatgatgccc acagaaagt ccacccaatc tctatatt aagtcagtt
781 ctgcatlga gaaattcat aggggaagta tgaagatg gtgtgctag tcaataaag
841 ctggctctt gcccacagat tgttaagtt taactccag ttctcttt tattataat
901 tftgcaact gcttggaaa acatgaaact tgtttctc caggttact atctgtaata
961 tatagtaat gaagaagttt cctgtccat gaaggtgtg taaagataa aaaagcaca
1021 tttagctgtg tattgtcat aataatggc atatatgta atgtaccac aaccataagg
1081 tattataaa ttgtataaa atgatagag ctatctfga gcagcatgaa agaagactt
1141 cactgttca cctaactaca cctggcca ttactctct tectgtctt gacattcag
1201 agalactgtt aggaattcaa tcatgactt aagccactt tgaacaatt tctgtgtag
1261 aagctctcat tcccactlla tctatgacc tagatgcaa tctgaaatf catgtcgaa
1321 ttatgctc tggactct tgcactgtt gttaaagtc tgaataatg taaagtlla
1381 tttaccaca aaaaattgt ggcgtgaa tttatgata aaaaactgt gcttctcat
1441 gtactatgt gtgtcatgc taaatgca atgtatagt taagttaat tcaataaag
1501 tatgtaactc cagtgctac ttatgtgct tactgttt gtaattctt gcttctgt
1561 tttattgta aacagctca gaagtata tttactgaa ctatgtgag gaaaagact
1621 atgtgatat ataatgaca ttataaat acatgaggga tgaattgat agaagcagta
1681 ttacacagt ataggatga tggttlaga ctatgctag gttgaactt tagctctc
1741 atfatagcca ttactaac tttctgtt tgcactagc aaaaactg aataaacac
1801 ctatttact gttgttata aggtttat gaataatgt tggcaaatg taagaactca
1861 agtaactgt tcacltctc cagaaggga ttgctgaaa aattttga gctctccca
1921 gccatctcc ttgtcagct tctatgacc tcttggagc ttaactta atccctat
1981 ttactctg ttgtgata caaagaaga ctatattata attattca aatgcatgt
2041 atattatgt atggccaca ctacagta taaaccaa acagatgg gaatgggaa
2101 gttgatgtg ttgattcaat cacatgtct ggaaaagca atagtgaaga cagagctca
2161 caattttt tcaatgga gagatgaaa cacagtaga gatttcaa caacagatg
2221 gatgtgagt taaaatgt gaaattctt cctgtgtct aactaatgc aatgtgtt
2281 atctcttgc tctttctc actattcaa tttagataa taaagtata atgtttca
2341 atcttctt acaatcaa gaaaaaagg tatcttgg cccacggaag gccaagcag
2401 agctatgaa acctgctga cacattctt atttcaaca caggtctgt tcttccatc
2461 atgaaatgca cattttatt gtaactatt tgggtgacca caagtcaaca acaagataat
2521 tcaacagacc ctgctcag atgtctgccc aataagata tcaagccaaa attttactt
2581 tctttgaa tttaactc aaacaaatg tatgtctgt tttaactag aggttcagg
2641 gattagagg ttgctctt taaaaccgtc agagacacag gcaatctac acaaaactt
2701 cagaaggaag gcgctcagc ctggaaagc ccagatccc ctacagagt tgaagatg

```

FIG. 4

【 図 4 - 2 】

```

2761 gtttctgta gtcagtcaca agttaacata ttactctgc tcaaaagact gcttggctc
2821 ctltggctg attagtcaag atgtttgct gactgagact aggaactca tggagggcg
2881 gtttagtita cattttctt tgcattatc gtaaaacac tcaaaagct tcttataaa
2941 tgcgactgct gtaaaaaag atagacaagg aacaactct gggccgftaa ttacgaaa
3001 cattatctc tctactcc ttgacagatt tttttctc ttactactgt gctcaatg
3061 ttctgcca ccttggagt tcaactcact aaactgaaa ctataaagc ttgtcttt
3121 tctcagac gcaaaagag cgctagata aatgcatcag accaactct cggcgagct
3181 ttctgctct cttaggctgt atttgatat acgaaagga catttctt cctttcaa
3241 aatgacctt gcaaaagca caggaacccc actagatca tgggaaaag gaggaggag
3301 aggaagggc gctccggga agctggctg agcgggctt gggcttggc gacctgagc
3361 cgaaggggg tetaggaagc tctccggga gccgcttcc cggcgggct cttctctg
3421 cctccagct tgcacaactg acctaaagag agcccgagc tgcgcccac ctgcccgat
3481 ggcctgtgc tggcggctca ggcactgac ctgaaaggag cgcgcggag ggaaggagc
3541 tggagctag aatcggaaa gggaggtgc gggcggcag ggaagagg aggaagagc
3601 gaagagcgc gaggggtct ggcggggct cgtatgagt ggaagaagc gctagagca
3661 atttggggc ggaccagca gcaactcgt ttaactctg cagtgaaag cggggagag
3721 agcaaaaga aggggtgtg tgcggagtg ggtgtggg ggggaattg aagcaaatg
3781 cactacaga gctcagaaa aaagggtga ggcgagcca cccagatg tagtcttgc
3841 gcaataggc ctgagcca gaccgcca cggagacc cagcccga gagaccatc
3901 agaggtcgc tctgaaaag gcccgtgt tctcaaac tttttcaag tgagaaggtg
3961 gccaaccag cttcggaaa acagctgcc acgaaagag agggcgtgt tatgggttg
4021 gtttgggta aaggataag cagttttaa aaagtggc tatcattat tttttgaa
4081 gaaaatgct gttgtgata ataaacaga aagcattag aagatgga agaatgact
4141 gaagctgatt gaatagaga ccaactct tgcactga aagattgaa tctcaagct
4201 caagtact actatgact tttttatt cattttca agaaactaa aatctgtt
4261 aataatgac laagtatgt ttatggtt tcccctca tgcctggac actgattgt
4321 ctcttggca catacaggtt ccatgctgc atatgtaag tctcagaa acattctgt
4381 actgaact

```

FIG. 4 (続き)

【 図 5 】

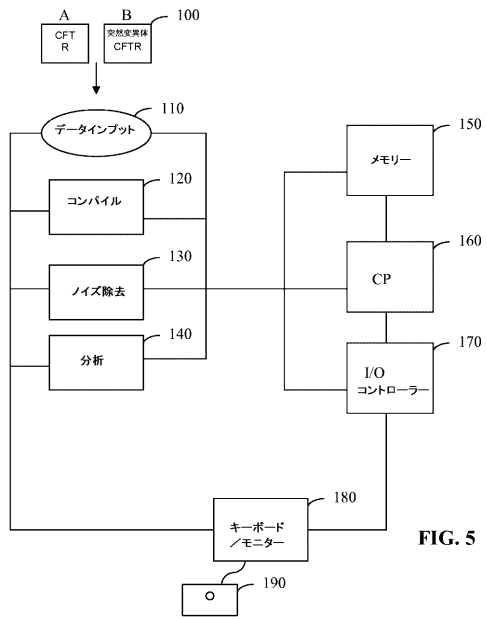


FIG. 5

【 配 列 表 】

2013521829000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/29314									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2011.01) USPC - 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/68 (2011.01) USPC - 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Scholar and GenCore: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR, mutat\$, substitut\$, delet\$ OR Insertion, diagnos\$, risk, carrier, cystic fibrosis, 1824delA, 1824 delA, 1824, 1823delA, 1823 delA, 1823, 1822delA, 1822 delA, 1822, 110401, 110402, 110403											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2005/0048544 A1 (GARDNER et al.) 03 March 2005 (03.03.2005) table 1; para [0006], [0028]-[0029], [0031]-[0032], [0080]-[0084], [0086]</td> <td style="text-align: center;">1-30 and 33-44</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2008/0153088 A1 (SUN et al.) 26 June 2008 (26.06.2008) claim 20; para [0006]-[0007], [0018], [0056]-[0058]</td> <td style="text-align: center;">31-32</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 2005/0048544 A1 (GARDNER et al.) 03 March 2005 (03.03.2005) table 1; para [0006], [0028]-[0029], [0031]-[0032], [0080]-[0084], [0086]	1-30 and 33-44	A	US 2008/0153088 A1 (SUN et al.) 26 June 2008 (26.06.2008) claim 20; para [0006]-[0007], [0018], [0056]-[0058]	31-32
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	US 2005/0048544 A1 (GARDNER et al.) 03 March 2005 (03.03.2005) table 1; para [0006], [0028]-[0029], [0031]-[0032], [0080]-[0084], [0086]	1-30 and 33-44									
A	US 2008/0153088 A1 (SUN et al.) 26 June 2008 (26.06.2008) claim 20; para [0006]-[0007], [0018], [0056]-[0058]	31-32									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 06 August 2011 (06.08.2011)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">10 AUG 2011</div>									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <div style="text-align: center;">Lee W. Young</div> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/29314

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NO: 1 (nucleotides 1-9990); SEQ ID NO: 2, 1824delA, 2957delT; and 4089ins\$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/29314

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I-: claims 1-44, drawn to a method of method comprising:
testing a sample obtained from a subject to determine the presence of one or more mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene or protein, wherein the presence of the one or more mutations indicates that the subject has cystic fibrosis (CF) or a CF related disorder, is at risk of developing CF or a CF related disorder, or is a carrier of a CFTR mutation. The first invention is restricted to a 182 delA mutation, the first mutation shown in Table 1. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional specific mutation(s) to be searched.

.....Continued in Supplemental
Box.....

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims 1-44, restricted to 182delA, 2957delT, and 4089ins4.
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/29314

***** Supplemental Box *****

Continuation of: Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

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

The inventions of Group I+ share the technical feature of a method of method comprising: testing a sample obtained from a subject to determine the presence of one or more mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene or protein, wherein the presence of the one or more mutations indicates that the subject has cystic fibrosis (CF) or a CF related disorder, is at risk of developing CF or a CF related disorder, or is a carrier of a CFTR mutation. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2005/0048544 A1 to Gardner (hereinafter "GARDNER") that discloses a method (para [0028], [0029]) comprising:

—testing a sample obtained from a subject to determine the presence of one or more mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene (table 1; para [0028], [0029]),

wherein the presence of one or more mutations indicates that the subject has cystic fibrosis (CF), or is a carrier of a CFTR mutation (para [0028], [0029], [0083]). As said method was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific mutation recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because US 2006/0292572/A1 to STUART, et al. (hereinafter "Stuart") discloses at least 1-9990 nucleic bases of the claimed SEQ ID NO: 1 (Stuart, nucleic bases 1-9990 of SEQ ID NO 36699). Therefore, no structural similarities can readily be ascertained among the mutations. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ローフス, エリザベス エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 4 8, ホプキントン, ウィンター ストリート
1 1 1

(72)発明者 シルコ - オサダ, デボラ アレクサ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 3 6, ノース グラフトン, ブリガム ヒル ロ
ード 1 4 9

(72)発明者 ロゼンブルム, リン サラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 4 8, ホプキントン, テレサ ロード 2

(72)発明者 ナガン, ナラシマーン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 6 0, サウス グラフトン, ダッフオディル コ
ート 3 0

(72)発明者 ジョー, ジャオチン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 6 0, ネイティック, ヌーベル ウェイ 1 0
ユニット エス7 0 7

(72)発明者 ヘイム, ルース エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 5 4 5, シュリユーズバリー, レイク ストリート
3 9 6

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA02 CA09 CA12 DA03 HA14 HA15

4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48

QR55 QS33 QS34 QX01

4B064 AG27 DA13

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50

专利名称(译)	突变与囊性纤维化有关		
公开(公告)号	JP2013521829A	公开(公告)日	2013-06-13
申请号	JP2013501365	申请日	2011-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	哪敢突破马恩		
申请(专利权)人(译)	密宗扫描遗传实验室, LLC 哪敢, Narashiman		
[标]发明人	ローフスエリザベスエム シルコオサダデボラアレクサ ロゼンブルムリンサラ ナガンナラシマーン ジョージャオチン ヘイムルースエー		
发明人	ローフス, エリザベス エム. シルコ-オサダ, デボラ アレクサ ロゼンブルム, リン サラ ナガン, ナラシマーン ジョー, ジャオチン ヘイム, ルース エー.		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/37 C07K16/28 C12N15/02 G01N33/53 G01N37/00 C12P21/08		
CPC分类号	C12Q1/6816 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/16 G01N33/6872 G01N2800/382 C12Q2535/125 C12Q2565/627 C12Q2600/112		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/04.ZNA C12Q1/68.A C12Q1/37 C12N15/00.F C07K16/28 C12N15/00.C G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/359029 2010-06-28 US 61/316321 2010-03-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了在囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 基因中鉴定的新突变, 其对于囊性纤维化 (CF) 和CF相关病症更准确。它可以用于诊断。本发明提供了一种测试从五个受试者获得的样品以确定CFTR基因中一个或多个突变的存在的方法, 其中一个或多个突变的存在表明受试者是CF或CF相关疾病, 或是CFTR突变的携带者。

