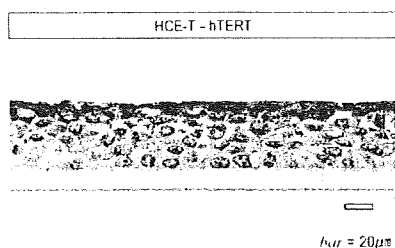


C-6. HCE-T hTERTを用いた三次元角膜培養モデル作製の試み

エアリフト法による培養を施した細胞をセルカルチャーインサートに載せたまま、SIPER FIXで固定し、通常の方法でパラフィン切片標本作製した。作製した標本は、HCE-T hTERTの分化能（細胞重層化）を評価するため、H.E.染色を行い観察したところ、セルカルチャーインサートのメンブレンに近い細胞から空気に暴露されている表面にむかって徐々に細胞が扁平となって重層化していることが明らかとなった。しかし、現在の条件では安定した三次元培養モデルが構築できていないことから、今後、さらに培養条件を検討する必要がある。



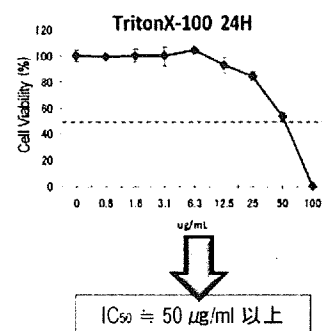
C-7. ヒト不死化角膜上皮細胞株における角膜上皮細胞特異的マーカーを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株（HCE-NY）を用いて、Triton X-100を被験物質（24時間反応）として、角

膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

角膜上皮細胞特異的マーカーの1つであるkeratin-3 mRNAの発現量は、Triton X-100を0.8~1.6 μg/mlで反応させた際は、Triton X-100を反応していないコントロールと同様であったが、3.1 μg/ml以上の濃度になるとkeratin-3 mRNAの発現量は低下し、Thresholdを0.3に設定することでkeratin-3 mRNAの発現の有無を判定できた。なお、内部標準物質としてのGAPDH mRNAの発現量は変化しなかった。

同時に実験を行ったNeutral Red法でのIC₅₀は、およそ50 μg/mlであった。



D. まとめ

D-1. 角膜輪部組織の免疫染色

既報にもあるように、角膜輪部組織において、Integrin $\beta 1$ (CD29) やp63などの角膜上皮幹/前駆細胞マーカー陽性の細胞が観察され、それらの細胞はp75NTR陽性であった。p75NTRは、水晶体上皮幹/前駆細胞や網膜幹前駆細胞で発現していることを既に報告しており、角膜上皮幹/前駆細胞においてもp75NTRが発現していることが今回の研究で明らかとなった。

D-2. HCEC-2とEHXVの継代培養

無血清培地 (EpiLife-KG2: EpiLife™+HCGS) を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件では、HCEC-2細胞は3継代目で殆どの細胞が増殖しなくなった。EHXVは3継代目で細胞の膨化が顕著となり、4継代で細胞が殆ど増殖しなくなった。以上の結果から、いずれの細胞においても、無血清培地を用いて、Non-CoatのディッシュでFeeder細胞の無い培養条件では細胞を角膜上皮細胞の形態を維持した状態で継代培養することは困難であった。

D-3. HCEC-2とHCEの継代培養と分析

市販されている正常角膜上皮細胞を無血清培地 (EpiLife-KG2: EpiLife™+HCGS) と血清含有上皮細胞培養用培地 (M-Stars C) で培養したところ、2継代目で既に上皮細胞様形態から変化し始め、3継代目では多くの細胞がディッシュに接着することが出来ず、その後、継代することが出来なかった。平成20年度の研究結果も合わせて考慮すると、市販の正常角膜上皮細胞

は、継代維持することが困難であることが明らかとなった。

一方、角膜輪部組織から分離培養したHCEは、4継代目までは上皮細胞様の多角形の細胞形態を呈しており、6継代目ぐらいから一部の細胞で紡錘形の形態に変化するものも観察されたが、今回の遺伝子導入実験を行うにあたっては、十分量の細胞を継代培養して確保することができた。

2継代目のHCEでは、p63陽性細胞は 78.6 ± 2.4 %、Integrin $\beta 1$ 陽性細胞は 98.7 ± 0.4 %、およびp75NTR陽性細胞は 70.2 ± 5.0 %であったことから、遺伝子導入実験を行った細胞は、角膜上皮幹/前駆細胞マーカーを発現している細胞であった。

D-4. HCE-2への遺伝子導入

HCEC2の遺伝子導入細胞をLipofection法で作成することは困難であった。HCEC2は購入時で既に3継代しており、角膜上皮幹/前駆細胞は含まれていない可能性が高いことから、円形の角膜上皮細胞の形態を維持することは困難であった。

D-5. HCEへの遺伝子導入

平成20年度までの研究手法において、角膜上皮細胞へ遺伝子を導入することは困難であった。しかし、平成21年度に実施した新しく開発した研究手法を用いることで、世界で初めてウイルスベクターを用いることなく、角膜上皮細胞へ高効率で遺伝子が導入できることを明らかとした。

結果として、SYN-2245-1とSYN-2245-2のいずれかの遺伝子を導入して選択分離した細胞 (HCE-NY) は、現在までに30回以上の継代を行っているが、細胞増殖は衰えることなく、

増え続けている。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を全ての細胞で発現していることから、角膜上皮細胞としての特性の一部は保持できていた。

D-6. リポフェクション法による遺伝子導入

8種類の試薬を各々4条件でDNAと混合し、計32種類の条件でリポフェクション法を実施した。現段階において、Lipofectamine 2000 Reagentを用いて、試薬とDNAの割合を1:3で混合した場合が最も導入効率が良いことが分かった。しかし、完全な定常発現にまでは至っていない。この原因として、ベクターに挿入したSV40とhTERTのサイズが大きいこと、使用したDS-Redのベクターの蛍光強度が予想以上に低かったことなどにより、結果として、導入効率の判定が悪くなった。

D-7. エレクトロポレーション法による遺伝子導入

最も多くの研究で使用されているエレクトロポレーター (Gene Pulser Xcell) を用いて検討を行ったが、結果としては、リポフェクション法よりも導入効率が悪いというのが、現段階での結果である。使用機器を変えて今後検討を行っていく。

平成20年度までの研究手法において、角膜上皮細胞へ遺伝子を導入することは困難であった。しかし、平成21年度に実施した新しく開発した研究手法を用いることで、世界で初めてウイルスベクターを用いることなく、角膜上皮細胞へ高効率で遺伝子が導入できることを明らかとした。

結果として、SYN-2245-1とSYN-2245-2のいずれかの遺伝子を導

入して選択分離した細胞 (HCE-NY) は、現在までに30回以上の継代を行っているが、細胞増殖は衰えることなく、増え続けている。なお、このHCE-NYでは、keratin-3を全ての細胞で発現していることから、角膜上皮細胞としての特性の一部は保持できていた。

D-8. HCE-TのCloningと細胞特性

不死化された角膜上皮細胞のHCE-Tは、Cloningされていない状態で分譲されている。そこで、角膜上皮細胞の特性の1つであるIntegrin β 1でソーティングし、Cloningを行った。その結果として、細胞形態を比較の揃えることができた。

次にCloningした細胞を継代培養し続けたところ、15継代後でも角膜上皮細胞マーカーのIntegrin β 1とKeratin-3のm-RNAとタンパク質の発現が観察された。なお、三次元培養についての検討も開始しており、HCE-T細胞が重層化することを倒立顕微鏡で確認した。

D-9. HCE-Tへの遺伝子導入

SYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入して選択分離した細胞 (HCE-T hTERT) では、Integrin β 1の発現が保持されていた。なお、SYN-2142-1 (hTERT) を導入した細胞は、細胞形態の異常 (癌化) などは起こらなかった。

D-10. HCE-T hTERTの分化能

最近の研究では、テロメラーゼを細胞に導入しても、その細胞の分化能は維持、あるいは増加することが分かってきたことから、本研究では分化能が減衰してしまったHCE-TにSYN-2142-1遺伝子 (hTERT) を導入

することで、分化能が回復するのではないかと考え、本実験を行った。

結果として、角膜上皮細胞の分化能を回復し、細胞の重層化と細胞形態の分化が観察された。

D-11. keratin-3 mRNAを指標とした被験物質による細胞障害の評価

ヒト不死化角膜上皮細胞株(HCE-NY)を用いて、Triton X-100を被験物質(24時間反応)として、角膜上皮細胞特異的マーカーのkeratin-3 mRNAの発現量の変化について、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

Triton X-100(24時間反応)において、従来のNeutral Red法でのIC₅₀(約50 µg/ml)よりも遥かに薄い濃度(3.1 µg/ml)において、細胞への障害を検出することができた。

E. 考察と結論

正常ヒト角膜上皮細胞株を用いて、不死化遺伝子の導入を検討したが、現段階での研究成果では、不死化細胞株を確立することはできなかった。しかし、不死化遺伝子のPlasmidの作製は終了していることから、今年度に検討することができなかった試薬や方法を用いて、平成21年度の研究を展開した。

既報の論文において、角膜上皮細胞に遺伝子を導入する研究では、全てウイルスベクターを使用している。つまり、ウイルスベクターを用いなければ、角膜上皮細胞に遺伝子を導入することが難しいということを示しているのかもしれない。確かに、今年度に検討した方法は、一般的な研究で使用している方法の90%以上を検証しているが、遺伝子導入は成功しなかった。

その一方で、本研究は“新規眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発”であることから、もし新しい角膜上皮細胞株が作製された場合、細胞を使用する環境が必ず管理された場所で実施されるということは保証されないことも考えられるため、ウイルスベクターを使用しない方がよいと考えている。

使用したベクターにおいては、定常発現ベクターと発現コントロールベクターでは、導入するベクターが1種類か2種類かの違いがある。遺伝子導入が他の細胞と比べて難しい角膜上皮細胞では、2種類のベクターを導入させる必要がある発現コントロールベクターによる細胞株の構築は、かなり難しいかもしれない。しかし、既にSV40の定常発現細胞であるHCE-Tでも、適切なCloningを行うことで、角膜上皮細胞の細胞特性を保持したまま継代し、さらに培養条件を変えることで分化する能力も保持しているのであれば、定常発現ベクターによる不死化角膜上皮細胞でも、眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で使用する細胞株としての条件は満たしていると考えている。なお、今年度は、細胞株樹立後の研究において、FITCやAlexa488などの緑の蛍光抗体を用いた研究が実施しやすいように、赤蛍光のDS-Redのベクターを用いたが、実際の実験結果としては、非常に蛍光が暗いため、平成21年度の研究では、GFPベクターに寄せ替える予定である。

平成21年度は、本研究の最終年度であるため、更なる検討を行い、眼刺激性試験・眼毒性試験代替法で利用できる新規角膜上皮細胞株の作製と検討を行う。さらに三次元培養による角膜上皮モデルの構築と代替法標準物質

(無刺激、MAS25、MAS50) による検討を行い、眼刺激性試験のGolden Standard法であるDraize法との比較・検討を行った。

正常ヒト角膜輪部組織から分離培養したHCEを用いて、ウイルスベクターを用いることなく、世界で初めて角膜上皮細胞の不死化細胞 (HCE-NY) の作出に成功した。今後、HCE-NYのクローニングを行い、不死化細胞株として確立させること、HCE-NYとHCE (正常角膜上皮細胞) の相同性評価と遺伝子導入による影響、および不死化細胞の証明実験を行っていく必要がある。

既報の論文において、角膜上皮細胞に遺伝子を導入する研究では、全てウイルスベクターを使用している。つまり、ウイルスベクターを用いなければ、角膜上皮細胞に遺伝子を導入することが難しいということを示していると考えている。平成20年度で検討した方法は、一般的な研究で使用している方法の90%以上を検証しているが、遺伝子導入は成功しなかったが、平成21年度に開発した新しい遺伝子導入・選択分離法を用いることで、不死化角膜上皮細胞を作出することができた。

本研究は“新規眼刺激性試験・眼毒性試験代替法の開発”であることから、もし新しい角膜上皮細胞株が作製された場合、細胞を使用する環境が必ず管理された場所 (例えばP2実験室など) で実施されるということは保証されないことも考えられるため、ウイルスベクターを元々使用しない細胞を用いることがベストである。

HCE-Tにおいても、平成21年度に開発した遺伝子導入・選択分離法を使用することで、hTERT遺伝子を導入することに成功し、結果として分化能

を回復させることができた。今後、HCE-T hTERT、およびHCE-NYを用いて、より安定した三次元角膜上皮培養モデルの培養法を検討していく必要がある。

眼刺激性試験代替法における新しい指標・評価マーカーの検索において、keratin-3が候補の1つとして利用できる可能性を示すことができた。今後、様々な被験物質による細胞障害を行い、指標・評価マーカーとしての有用性を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto N., Hirano K., Kojima H., Sumitomo M., Yamashita H., Ayaki M., Taniguchi K., Tanikawa A., and Horiguchi M.: A study of cultured human corneal epithelial stem / progenitor cells derived from the corneal limbus. In vitro Cell. Dev. Biol. (under submitted)

2. 学会発表

- Yamamoto N., Taniguchi K., Hirano K, Horiguchi M., Katoh M, Hata K. and Kojima H.: Cell surface marker of corneal epithelium stem cells and culture condition. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences 2009. [参考資料-⑦]
- 山本直樹, 平野耕治, 谷川篤宏, 加藤雅一, 畠賢一郎, 小島肇, 堀

口正之, 谷口孝喜. 角膜上皮細胞における組織幹細胞マーカーの検索と初代培養法および遺伝子導入の検討. 第82回日本組織培養学会, 2009. (栃木・宇都宮) [参考資料-⑧]

- ・ 山本直樹, 平野耕治, 谷川篤宏, 加藤雅一, 畠賢一郎, 小島肇, 綾木雅彦, 堀口正之, 谷口孝喜. 角膜上皮細胞の組織幹細胞マーカーと初代分離培養法および遺伝子導入法の検討. 第41回日本臨床分子形態学会総会, 2009. (兵庫・神戸) [参考資料-⑨]
- ・ 山本直樹, 平野耕治, 谷口孝喜. ヒト角膜上皮細胞の分離培養法と不死化細胞株の樹立. 第41回藤田学園医学会総会, 2009. (愛知・豊明) [参考資料-⑩]

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今のところ、新規特許出願については未定である。

本科研費交付前に申請・取得しているが、本研究の遂行には欠かせない特許は以下のとおりである。

- ・ 標本作製に関する特許:『難浸透性組織迅速固定液 (特許番号: 3723204)』山本直樹ほか. 2005.
- ・ 新規幹細胞マーカーについての特許出願状況:『網膜幹細胞の分離方法および網膜幹細胞 (出願番号: 特願2006-279917)』山本直樹ほか. 2006.

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

SV40 Large T Ag gene DNA シーケンス結果

GAATTCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA
GGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAATATTCCTCTGATGAGAAAGGCATATTTAAA
AAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAAGAAAAAATGAAGAAAA
TGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAGTAAAATATGCTCATCAACCTGACT
TTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGGTATTTGCTTCTTCCCTTAAATCCTGGTGT
GATGCAATATACTGCAAACAATGGCCTGAGTGTGCAAAAAAATGTCTACTAACTG
CATATGCTTGCTGTGCTTACTGAGGATGAAGCATGAAAATAGAAAATTATACAGGAA
AGATCCACTTGTGTGGCTTGATTGCTACTGCTTCGATTGCTTTAGAATGTGGTTTTG
GACTTGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACT
ACCTACAGAGATTTAAAGCTATAAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGATAATGTGT
AACTACTGATTCTAATTTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAACCTGATGAAT
GGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATG
CCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAG
AAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAG
TCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGA
AAAAGCTGCACTGCTATACAAAAAATLATGGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAG
TAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGA
GTGCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTA
AAGGGCTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTAACTAGAGATCCATTTTCTG
TTATTGAGGAAAGTTTGCCTGGTGGGTTAAAGGAGCATGATTTTAAATCCAGAAGAA
GCAGAGGAAACTAAACAAGTGTCTGGAAGCTTGTAACAGAGTATGCAATGGAAAC
AAAATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAAATTCAGTACAGTTT
TGAAATGTGTTTAAAATGTATTA AAAAAGAACAGCCAGCCACTATAAGTACCATGA
AAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGCTGACAGCAAAAACCAAAAAACCATATG
CCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGCTAAAAAGCGGGTTGATAGCCTACAACATA
CTAGAGAACAAATGTTAACAAAACAGATTTAATGATCTTTTGGATAGGATGGATATAA
TGTTTGGTTCTACAGGCTCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTGCTTGG
CTACACTGTTTGTGCCCCAAAATGGATTCAGTGGTGTATGACTTTTTAAAATGCATG
GTGTACAACATTCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATTGATAGTGGT
AAACTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGGGAAAGCTTTAAATGTT
AATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACCTTGGAGCTAGGAGTAGCTATTTGACCAGTTTTT
AGTAGTTTTTGGAGGATGTAAAGGGCACTGGAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCA
GGTCAGGGAATTAATAACCTGGACAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTTAA
GGTAAACTTAGAAAAGAAACACCTAAATAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAAT
AGTCACCATGAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTAAAAC
AATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCAGTGAGTTTTT
TGTTAGAAAAGAGGATAATTCAAAGTGGCATTGCTTTGCTTCTTATGTTAATTTGGT
ACAGACCTGTGGCTGAGTTTTGCTCAAAGTATTCAGAGCAGAATTGTGGAGTGGAAA
GAGAGATTGGACAAAGAGTTTAGTTTTGTCAGTGTATCAAAAAATGAAGTTTAATGT
GGCTATGGGAGTTGGAGTTTTAGATTGGCTAAGAAAACAGTGATGATGATGATGATG
ACAGCCAGGAAAATGCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGA
CTCAGGGCATGAAACAGGCATTGATTCA CAGTCTCAAGGCTCATTTCAGGCCCCCTC
AGCCCTCACAGTCCTCACAGTCTGTTCAATGATCATAATCAGCCATATCACATCTGTA
GAGGTTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAA
AATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAA
AGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGT
GGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCC

telomerase reverse transcriptase (hTERT) DNA シーケンス結果

GAATTCACCATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGC
AGCCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCCACGTTCTGTGCGGCGCCTGGGGCCCC
AGGGCTGGCGGCTGGTGCAGCGCGGGGACCCGGCGGCTTTCGCGCGCTGGTGG
CCCAGTGCCTGGTGTGCGTGCCCTGGGACGCACGGCCGCCCCCGCCGCCCCCTC
CTTCCGCCAGGTGTCCTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCGAGTGCTGCAGAGGCTG
TGCGAGCGCGGCGCGAAGAACGTGCTGGCCTTCGGCTTCGCGCTGCTGGACGGG
GCCCCGCGGGGGCCCCCGAGGCCTTACCACCAGCGTGCGCAGCTACCTGCCCA
ACACGGTGACCGACGCACTGCCGGGGAGCGGGGGCGTGGGGGCTGCTGCTGCGCC
GCGTGGGCGACGACGTGCTGGTTCACCTGCTGGCACGCTGCGCGCTCTTTGTGCT
GGTGGCTCCCAGCTGCGCCTACCAGGTGTGCGGGCCGCGCTGTACCAGCTCGGC
GCTGCCACTCAGGCCCGGCCCCCGCCACACGCTAGTGGACCCCGAAGGCGTCTGG
GATGCGAACGGGCTTGAACCATAGCGTCAGGGAGGCCGGGGTCCCCCTGGGCCT
GCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGGCGCGGGGGCAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTT
GCCAAGAGGCCAGGCGTGGCGCTGCCCTGAGCCGGAGCGGACGCCCGTTGG
GCAGGGGTCTTGGGCCACCCGGGACAGCGTGGACCGAGTGACCGTGGTTT
CTGTGTGGTGTACCTGCCAGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTGGAGGGTGC
CTCTCTGGCACGCGCACTCCCACCCATCCGTGGGCCCGCCAGCACACGCGGGCC
CCCATCCACATCGCGGCCACACGCTCCCTGGGACACGCCTTGTCCCCCGGTGTAC
GCCGAGACCAAGCACTTCTCTACTCCTCAGGCGACAAGGAGCAGCTGCGGCCCT
CCTTCTACTCAGCTCTCTGAGGCCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTCGTGG
GACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGGACTCCCCGCAGGTTGCC
CGCCTGCCCCAGCGCTACTGGCAAATGCGGCCCTGTCTTCTGGAGCTGCTTGGGA
ACCACGCGCAGTGCCCCCTACGGGGTGTCTCTCAAGACGCACTGCCCGCTGCGAGC
TGCGGTACCCCCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCCGGAGAAGCCCCAGGGCTCTGTG
GCGGCCCCCGAGGAGGAGGACACAGACCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTCCGC
CAGCACAGCAGCCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGC
TGGTGCCCCAGGCCTCTGGGGCTCCAGGCACAACGAACGCCGCTTCCCTCAGGAA
CACCAAGAAGTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCTG
ACGTGGAAGATGAGCGTGCGGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCCAGGGGTT
GGCTGTGTTCCGGCCGAGAGCACCGTCTGCGTGAGGAGATCCTGGCCAAGTTCC
TGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTCTGAGCTGCTCAGGTCTTTCTTTTATGTC
ACGGAGACCACGTTTCAAAGAAGCAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGGA
GCAAGTTGCAAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGA
GCTGTGCGAAGCAGAGGTGAGGACATCGGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGAC
GTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGACGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATG
GACTACGTGCTGGGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCA
CCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTTCAAGCGTCTCAACTACGAGCGGGCGCGGCCCC
CGGCCTCCTGGGCGCCTCTGTGCTGGGCCTGGACGATATCCACAGGGCCTGGCGC
ACCTTCGTGCTGCGTGTGCGGGCCAGGACCCGCGCCTGAGCTGTACTTTGTCA
AGGTGGATGTGACGGGCGCGTACGACACCATCCCCAGGACAGGCTCACGGAGGT
CATGCCAGCATCATCAAACCCAGAACACGTAAGTTCGCTGCGTCCGGTATGCCGTGG
TCCAGAAGGCCGCCCATGGGCACGTCCGCAAGGCCTTCAAGAGCCACGTCTCTAC
CTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAGACC
AGCCCGCTGAGGGATGCCGTGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGCCA
GCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTCATGTGCCACCACGCCGTGCGCATC
AGGGGCAAGTCTTACGTCCAGTGCAGGGGATCCCGCAGGGCTCCATCCTCTCCA
CGCTGCTCTGCAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAAACAAGCTGTTTGGGGGAT
TCGGCGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGATGATTTCTTGTGGTGCACCTC
ACCTACCCACGCGAAAACCTTCTCAGGACCCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTAT

GGCTGCGTGGTGAACTTGCGGAAGACAGTGGTGAACTTCCCTGTAGAAGACGAGG
CCCTGGGTGGCACGGCTTTTGTTCAGATGCCGGCCACGGCCTATTCCCCTGGTGC
GGCCTGCTGCTGGATACCCGGACCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATG
CCCGGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAG
GAACATGCGTCGCAAACCTTTTGGGGTCTTGCGGCTGAAGTGTACAGCCTGTTTC
TGGATTTGCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCCTC
CTGCTGCAGGCGTACAGGTTTCACGCATGTGTGCTGCAGCTCCCATTTTCATCAGCA
AGTTTGGGAAGAACCCACATTTTTCTGCGCGTCATCTCTGACACGGCCTCCCTCT
GCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCAGGGATGTCGCTGGGGGCCAAGGGCGC
CGCCGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCCGTGCAGTGGCTGTGCCACCAAGCATTCTG
CTCAAGCTGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGA
CAGCCCAGACGCAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGACGACGCTGACTGCCCTGGA
GGCCGCAGCCAACCCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTGATGG
GACGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATC

SV40 Large T Ag のアミノ酸配列 (708 アミノ酸残基)

1 mdkvlnrees lqlmdllgle rsawgniplm rkaylkkcke fhpdkggdee kmkkmntlyk
61 kmedgvkyah qpdfggfwda teiptygtde weqwwnafne enlfcseemp ssdeatads
121 qhstppkkkr kvedpkdfps ellsfshav fsnrtlacfa iyttkekaal lykkimekys
181 vtfisrhnsy nhnilffltf hrhrvsainn yaqklctfsf lickgvnkey lmysaltrdp
241 fsvieeslpg glkehdfnpe eaeetkqvsw klvteyamet kcddvlllg mylefqysfe
301 mclkcikkeq pshykyhekh yanaaifads knqkticqqa vdtvlakkrv dslqltreqm
361 ltnrfndlld rmdimfgstg sadieewmag vawlhcllpk mdsvvydfk cmvynipkkr
421 ywlfkgpids gkttlaaall elcggkainv npldrlnfe lgvaidqflv vfedvkggtg
481 esrdlpsgqg innldnrdy ldgsvkvnle kkhlnkrtqi fppgivtmne ysvpklqar
541 fvkqidfrpk dylkhclers efflekriiq sgiallmli wyrpvaefaq siqsrivewk
601 erldkefsls vyqkmkfnva mgigvldwlr nsdddeddsq enadknedgg eknmedsghe
661 tgidsqsqgs fqapqssqsv hdhnqpyhic rgftcfkpp tpppepet

備考

- ・ NCBI の Accession Number : NP_043127 を基準とした。
- ・ 623 I ⇒ V、637 E ⇒ D のアミノ酸置換が生じる。

SV40 Large T antigen の DNA シーケンス結果 (2,479 bp)

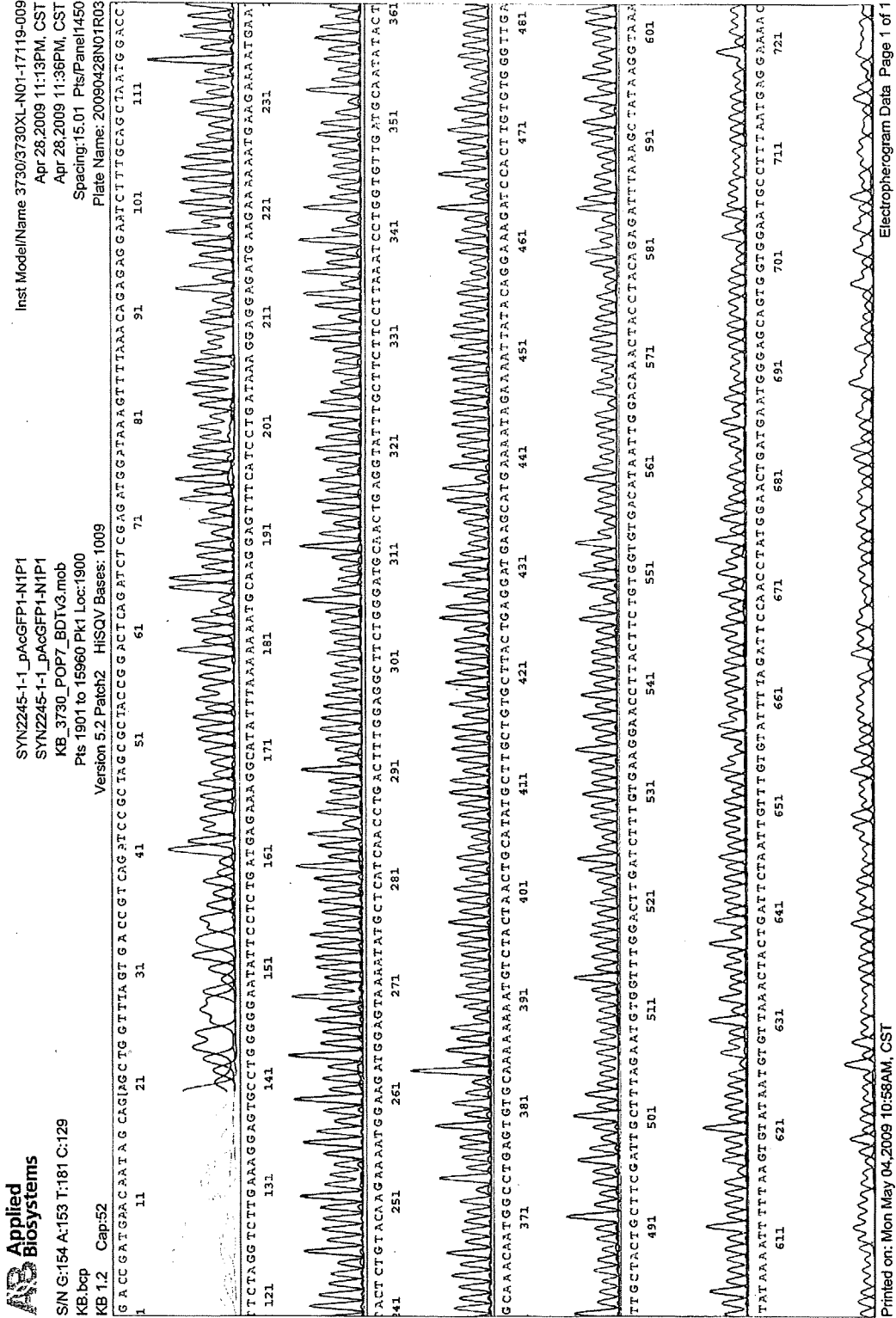
ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
TAGGTCTTGAAAGGAGTGCTTGGGGGAATATTCCTCTGATGAGAAAGGC
ATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAA
GAAAAAATGAAGAAAATGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAG
TAAAATATGCTCATCAACCTGACTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGA
GGTATTTGCTTCTTCCTTAAATCCTGGTGTGATGCAATATACTGCAAAC
AATGGCCTGAGTGTGCAAAAAAATGTCTACTAACTGCATATGCTTGTCT
GTGCTTACTGAGGATGAAGCATGAAAATAGAAAATTATACAGGAAAGAT
CCACTTGTGTGGGTTGATTGCTACTGCTTCGATTGCTTTAGAATGTGGT
TTGGACTTGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATT
GGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTATAAGGTAAATATAAAATTTT
TAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGA
TTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAA
TGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAG
GCTACTGCTGACTCTCAACATCTACTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGG
TAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCA
TGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGTCTTTGCTATTTACACCACAA
AGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAAAAATTATGGAAAAATATTCTGTGA
ACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTT
ACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATT
GTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGA
TGTATAGTGCCTTAACTAGAGATCCATTTTCTGTTATTGAGGAAAGTTTG
CCTGGTGGGTAAAGGAGCATGATTTAATCCAGAAGAAGCAGAGGAAA
CTAAACAAGTGTCTGGAAGCTTGTAACAGAGTATGCAATGGAAACAAA
ATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAATTTGAGTACA
GTTTTGAAATGTGTTAAAATGTATTA AAAAAGAACAGCCAGCCACTAT
AAGTACCATGAAAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGCTGACAGCAA
AAACCAAAAAACCATATGCCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGCTAAA
AAGCGGGTTGATAGCCTACAACCTAAGAGAACAAATGTTAACAAACA
GATTTAATGATCTTTTGGATAGGATGGATATAATGTTTGGTTCTACAGGC
TCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTGCTTGGCTACACTGTT
TGTTGCCCAAAATGGATTCAGTGGTGTATGACTTTTTTAAAATGCATGGT
GTACAACATTCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATTGATA
GTGGTAAAACCTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGGGGAA
AGCTTTAATGTTAATTTGCCCTTGGACAGGCTGAACTTTGAGCTAGGA
GTAGCTATTGACCAGTTTTTAGTAGTTTTTTGAGGATGTAAAGGGCACTG

GAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCTTCAGGTCAGGGAATTAATAACCTGGA
CAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTTAAGGTAAACTTAGAAAAG
AAACACCTAAATAAAAGAACTCAAATATTTCCCCCTGGAATAGTCACCAT
GAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTAAAACAA
ATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCAGTG
AGTTTTTGTTAGAAAAGAGGATAATTCAAAGTGGCATTGCTTTGCTTCTT
ATGTTAATTTGGTACAGACCTGTGGCTGAGTTTGCTCAAAGTATTCAGA
GCAGAATTGTGGAGTGGAAAGAGAGATTGGACAAAGAGTTTAGTTTGT
CAGTGTATCAAAAAATGAAGTTTAATGTGGCTATGGGAGTTGGAGTTTT
AGATTGGCTAAGAAACAGTGATGATGATGATGATGACAGCCAGGAAAAT
GCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGACTCAGGG
CATGAAACAGGCATTGATTCACAGTCTCAAGGCTCATTTCAGGCCCTC
AGCCCTCACAGTCCTCACAGTCTGTTTCATGATCATAATCAGCCATATCAC
ATCTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGA
ACCTGAAACA

【備考】

- ・ 開始コドンの ATG をボールドとアンダーラインで示した。
- ・ 塗りつぶし部分は、上記アミノ酸配列をコードしない非翻訳領域を示す。

SV40 Large T antigen (SYN-2245-1) のシーケンス片鎖解析

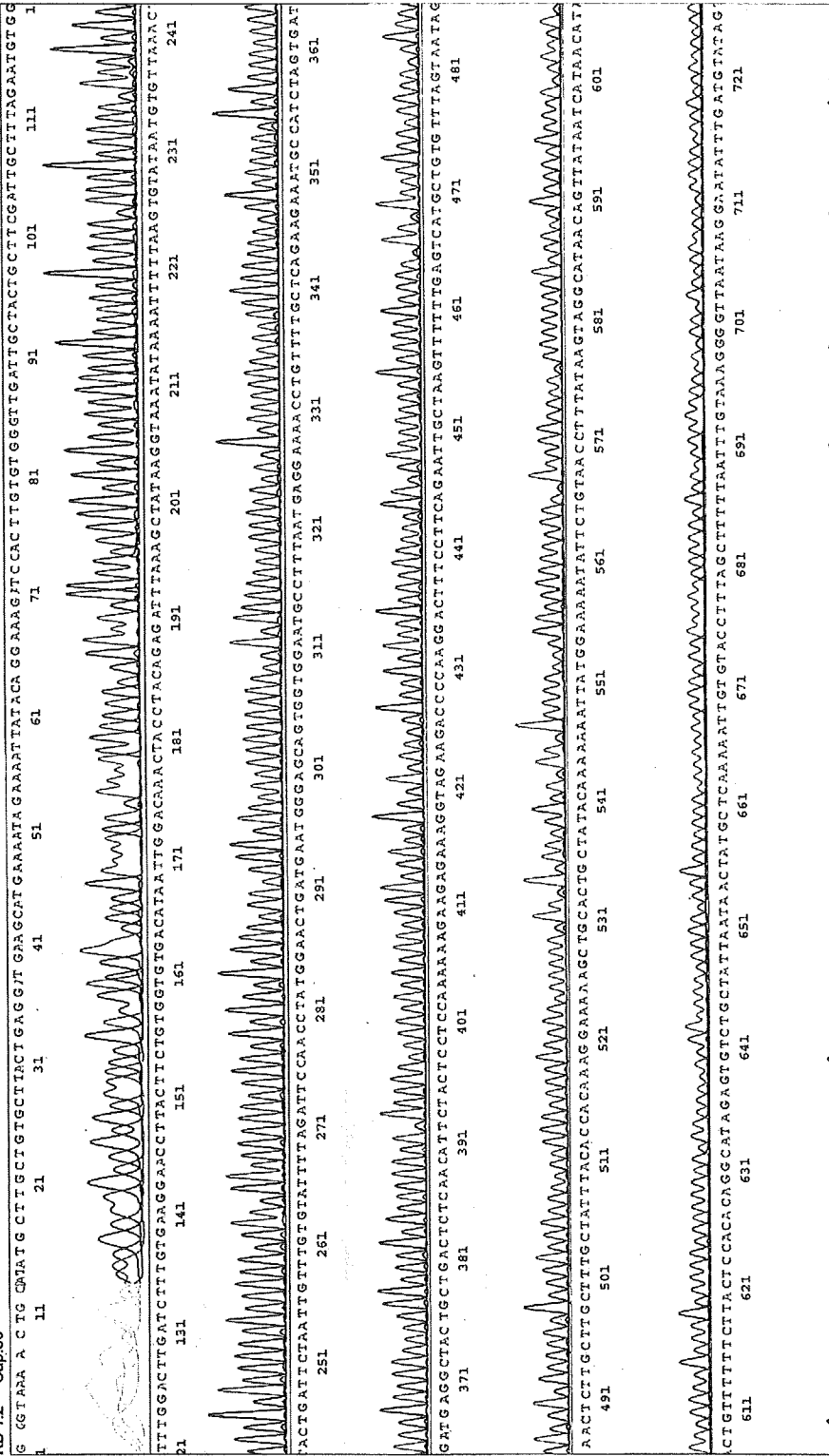




Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
 Apr 28, 2009 11:13PM, CST
 Apr 28, 2009 11:36PM, CST
 Spacing: 15.05 Pls/Panel1450
 Plate Name: 20090428N01R03

SYN2245-1-1_SYN2245P1
 SYN2245-1-1_SYN2245P1
 KB 3730_POP7_BD1V3.mob
 Pls 1890 to 15960 Pk1 Loc:1889
 Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1007

S/N G:157 A:174 T:256 C:143
 KB.bcp
 KB 1.2 Cap:50



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST
 Electropherogram Data Page 1 of 1



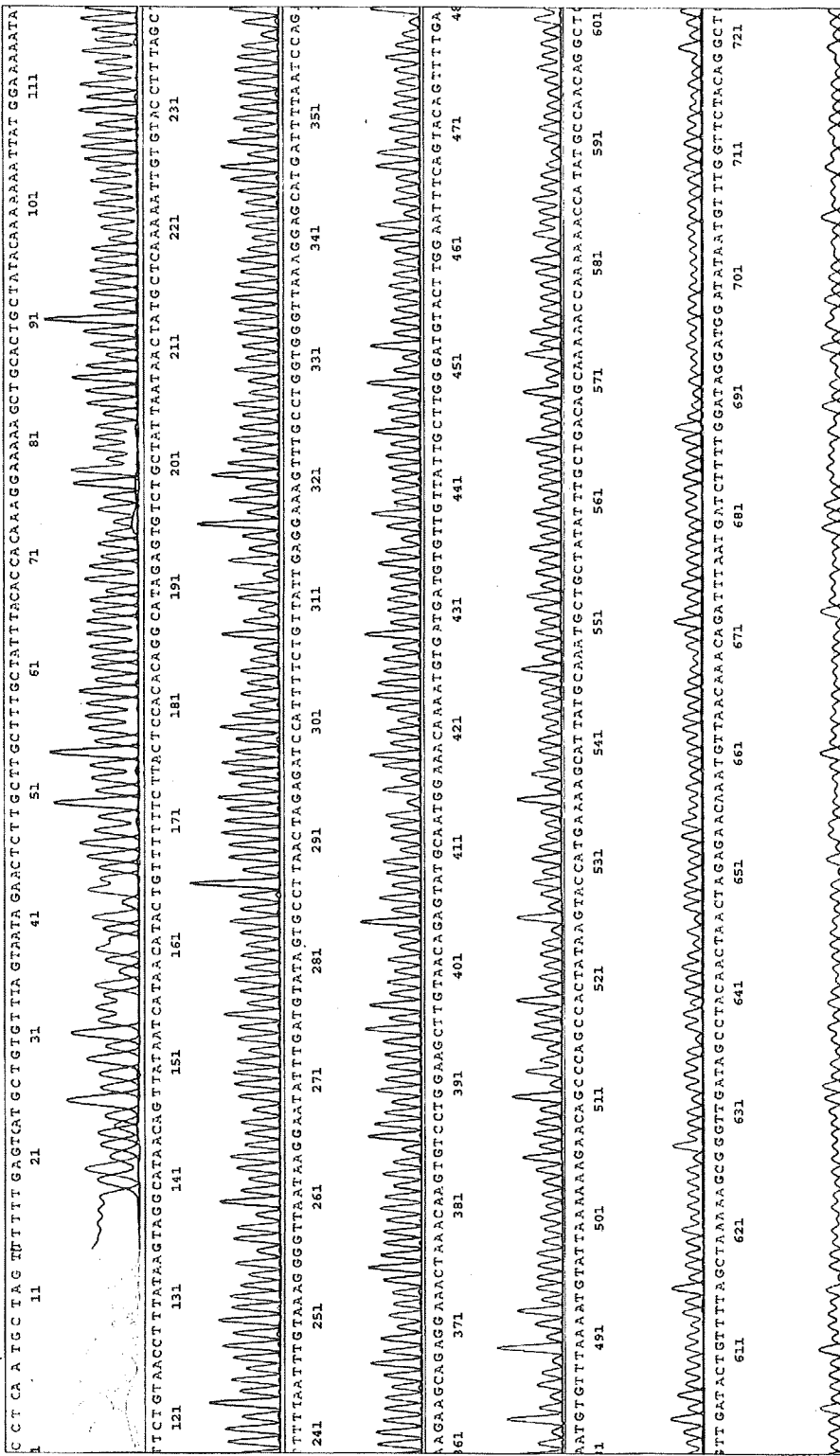
S/N G:170 A:199 T:272 C:161

KB.bcp

KB 1.2 Cap:79

SYN2245-1-1_SYN2245P2
SYN2245-1-1_SYN2245P2
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Pls 1895 to 15960 Pk1 Loc:1894
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 991

Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
Apr 28,2009 11:13PM, CST
Apr 28,2009 11:36PM, CST
Spacing:15.12 Pls/Panel1450
Plate Name: 20090428ND1R03



Printed on: Mon May 04,2009 10:58AM, CST

Electropherogram Data Page 1 of 1



S/N G:146 A:139 T:145 C:191

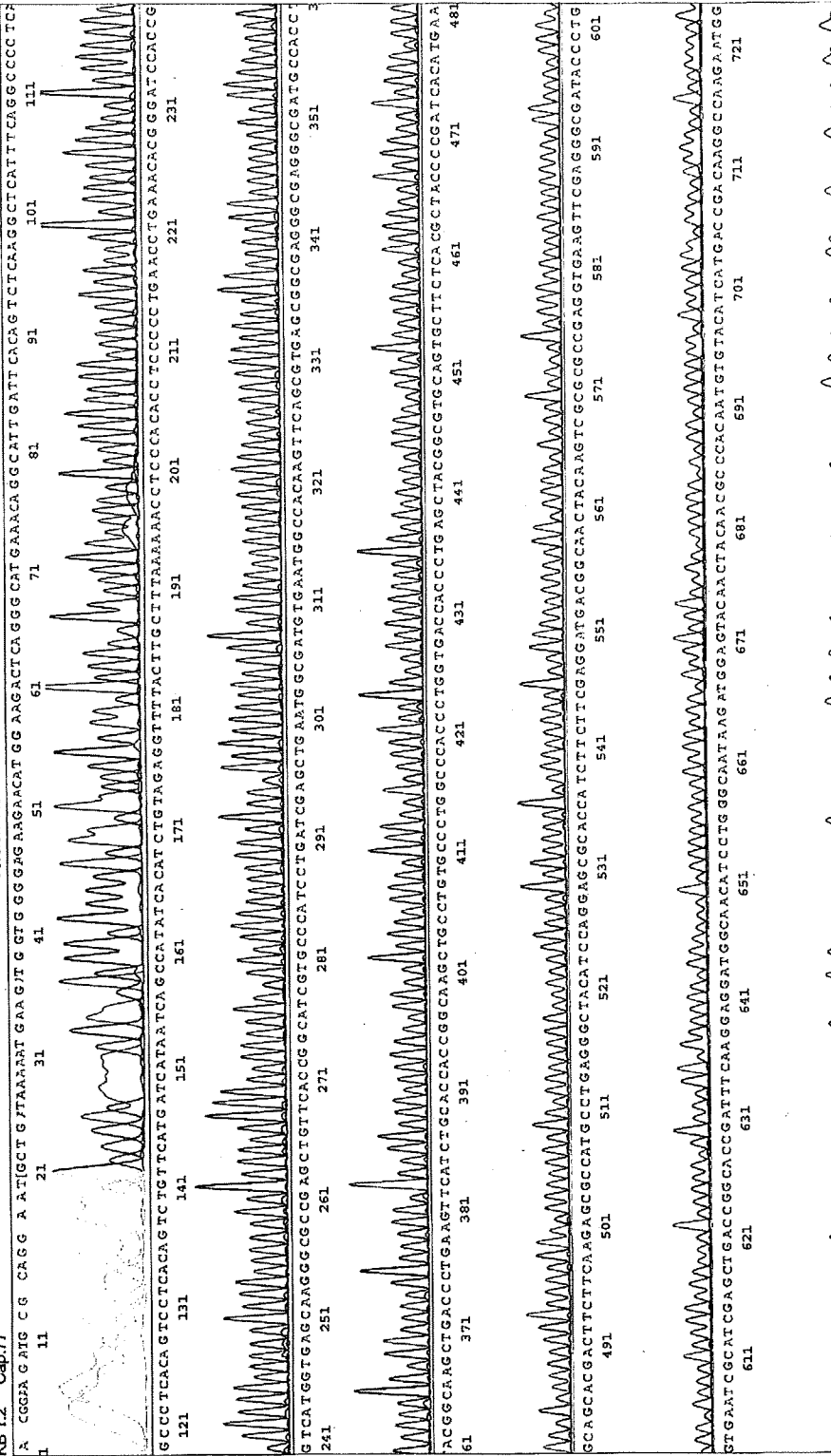
KB.bop

KB 1.2 Cap:77

SYN2245-1-1_SYN2245P5
SYN2245-1-1_SYN2245P5
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Pls 1891 to 15960 Pk1 Loc:1890

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1015

Inst ModelName 3730(3730XL-ND1-17119-009
Apr 28.2009 11:13PM, CST
Apr 28.2009 11:36PM, CST
Spacing:14.96 Pls:Panel1450
Plate Name: 20090428ND1R03





S/N G:177 A:205 T:326 C:290

KB1.dbp

KB 1.2 Cap:75

SYN2245-1-1_SYN2245P6

SYN2245-1-1_SYN2245P6

KB_3730_POPT7_BDTV3.mob

Pls 1901 to 15960 Pk1 Loc:1900

Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 1006

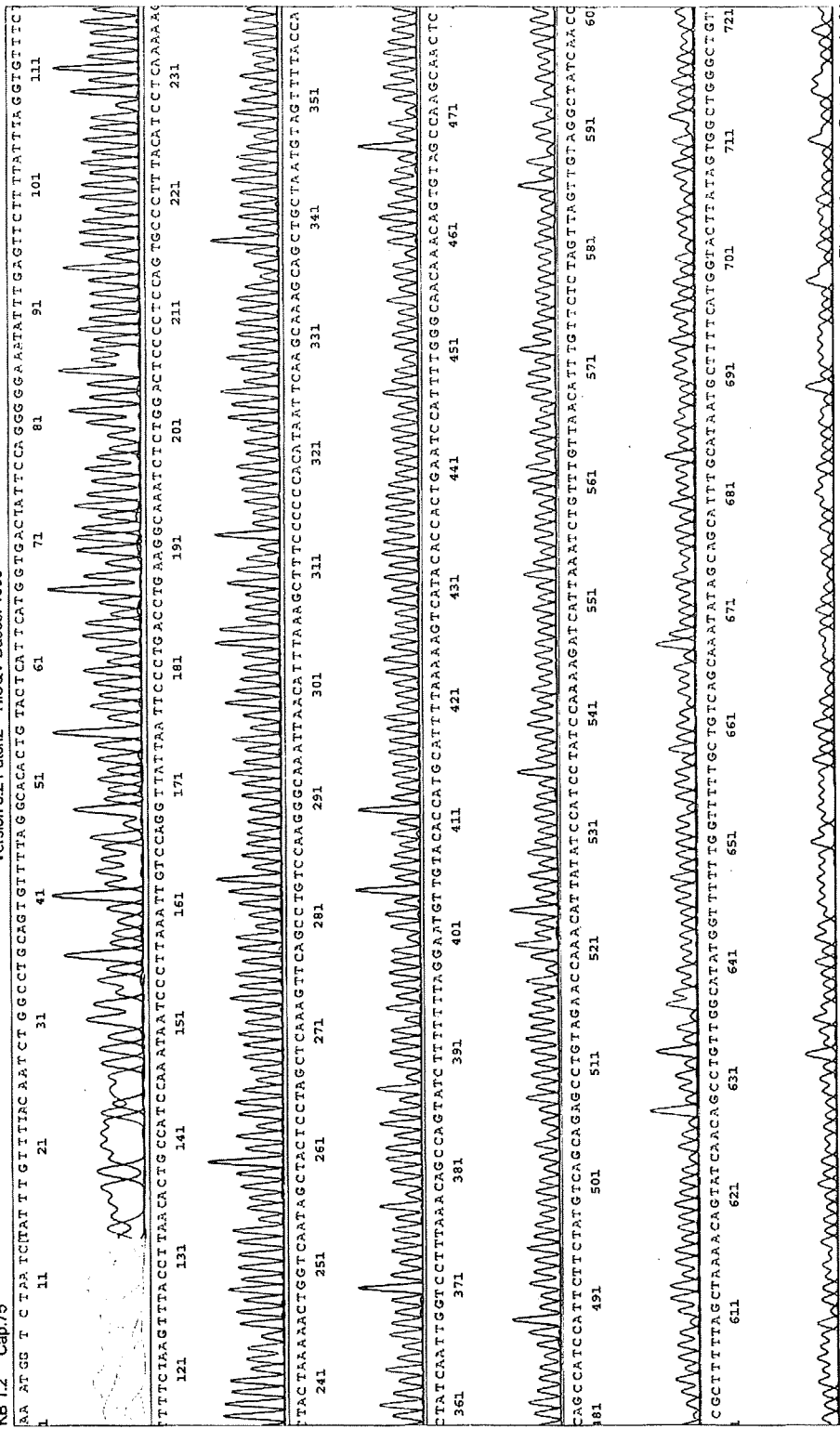
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28,2009 11:13PM, CST

Apr 28,2009 11:36PM, CST

Spacing:14.93 Pls/Panel1450

Plate Name: 20090428N01R03



Electropherogram Data Page 1 of 1

Printed on: Mon May 04,2009 10:58AM, CST



S/N G:115 A:99 T:104 C:58

KB.bcp

KB 1.2 Cap:54

SYN2245-1-1_SYN2245P7

SYN2245-1-1_SYN2245P7

KB_3730_POP7_BDTV3.mob

Pls 1924 to 15960 Pk1 Loc:1923

Version 5.2 Patch2 HSQV Bases: 991

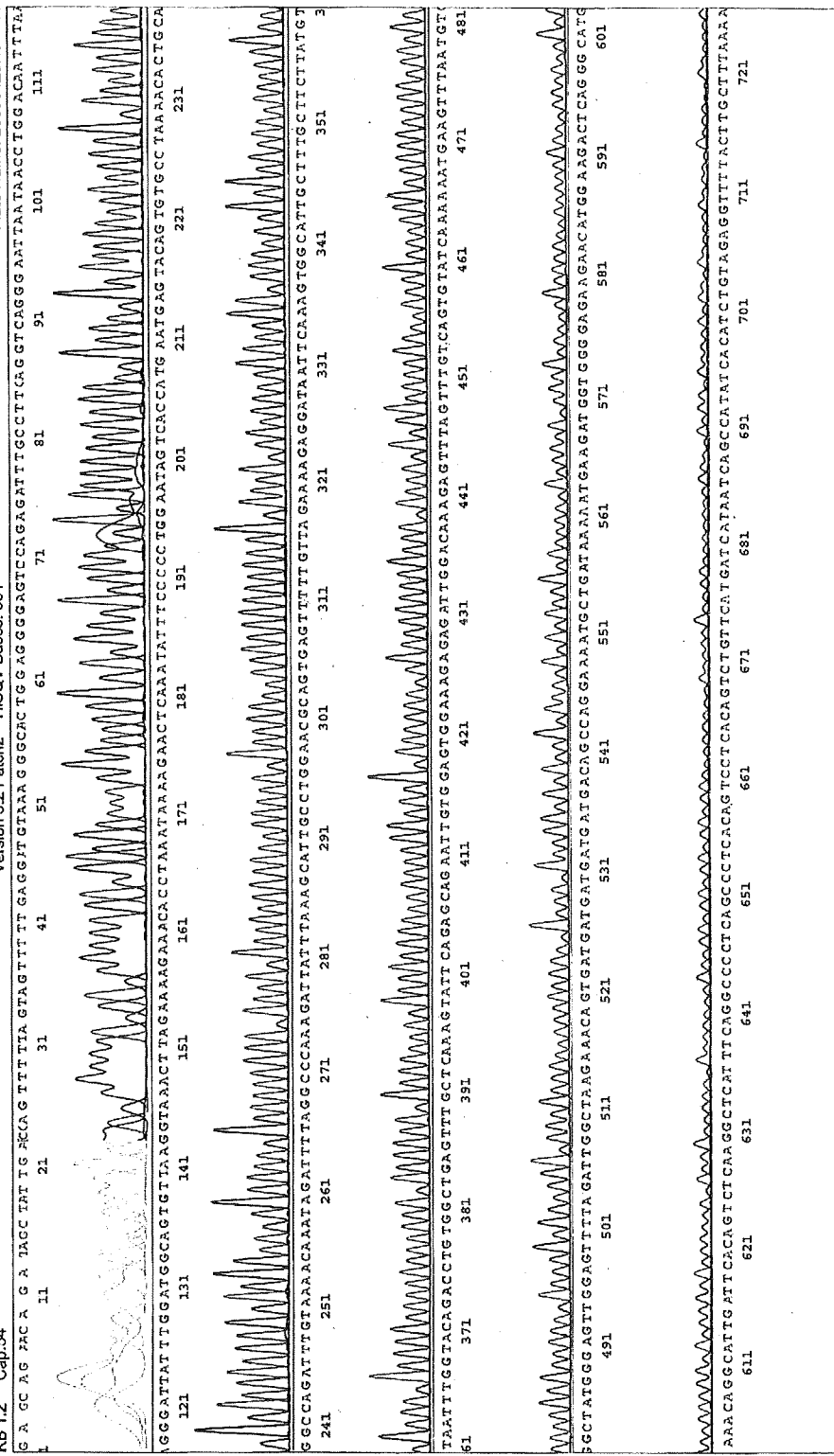
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009

Apr 28, 2009 11:13PM, CST

Apr 28, 2009 11:36PM, CST

Spacing: 15.0 Pts/Panel/450

Plate Name: 20090428ND1R03



Printed on: Mon May 04, 2009 10:58AM, CST Electropherogram Data Page 1 of 1

添付資料-⑥

SV40 Large T Antigen ORF の DNA シーケンス結果 (2,124 bp)

ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTC
TAGGTCTTGAAAGGAGTGCCCTGGGGGAATATTCCTCTGATGAGAAAGGC
ATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGGAGGAGATGAA
GAAAAAATGAAGAAAATGAATACTCTGTACAAGAAAATGGAAGATGGAG
TAAAATATGCTCATCAACCTGACTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGA
GATCCAACCTATGGAAGCTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTT
AATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATG
AGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAA
GGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTTGAGT
CATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCAC
AAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAAAAATATGGAAAAATATTTCT
GTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTT
CTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAA
ATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATT
TGATGTATAGTGCTTAAGTAGAGATCCATTTTCTGTTATTGAGGAAAGT
TTGCCTGGTGGGTAAAGGAGCATGATTTTAATCCAGAAGAAGCAGAGG
AACTAAACAAGTGTCCTGGAAGCTTGTAACAGAGTATGCAATGGAAAC
AAAATGTGATGATGTGTTGTTATTGCTTGGGATGTACTTGGAATTTTCAGT
ACAGTTTTGAAATGTGTTTAAAATGTATTA AAAAAGAACAGCCCAGCCA
CTATAAGTACCATGAAAAGCATTATGCAAATGCTGCTATATTTGCTGACA
GCAAAAACCAAAAACCATATGCCAACAGGCTGTTGATACTGTTTTAGC
TAAAAGCGGGTTGATAGCCTACA ACTAGAGAACAATGTTAACA
AACAGATTTAATGATCTTTTGATAGGATGGATATAATGTTTGTTCTAC
AGGCTCTGCTGACATAGAAGAATGGATGGCTGGAGTTGCTTGGCTACAC
TGTTTGTTGCCCAAATGGATTCAGTGGTGTATGACTTTTTAAAATGCAT
GGTGTACAACATTCCTAAAAAAGATACTGGCTGTTTAAAGGACCAATT
GATAGTGGTAAACTACATTAGCAGCTGCTTTGCTTGAATTATGTGGGG
GGAAAGCTTTAAATGTTAATTTGCCCTTGACAGGCTGAACTTTGAGCT
AGGAGTAGCTATTGACCAGTTTTTAGTAGTTTTTGAGGATGTAAAGGGC
ACTGGAGGGGAGTCCAGAGATTTGCCCTCAGGTCAGGGAATTAATAACC
TGGACAATTTAAGGGATTATTTGGATGGCAGTGTTAAGGTAAACTTAGA
AAAGAAACACCTAAATAAAAAGAACTCAAATATTTCCCCTGGAATAGTCA
CCATGAATGAGTACAGTGTGCCTAAAACACTGCAGGCCAGATTTGTAAA
ACAAATAGATTTTAGGCCCAAAGATTATTTAAAGCATTGCCTGGAACGCA
GTGAGTTTTTTGTTAGAAAAGAGGATAATTC AAAGTGGCATTGCTTTGCT
TCTTATGTTAATTTGGTACAGACCTGTGGCTGAGTTTGCTCAAAGTATTC

AGAGCAGAATTGTGGAGTGGAAAGAGAGATTGGACAAAGAGTTTAGTT
TGTCAGTGTATCAAAAAATGAAGTTTAATGTGGCTATGGGAGTTGGAGT
TTTAGATTGGCTAAGAAACAGTGATGATGATGATGATGACAGCCAGGAA
AATGCTGATAAAAATGAAGATGGTGGGGAGAAGAACATGGAAGACTCA
GGGCATGAAACAGGCATTGATTCACAGTCTCAAGGCTCATTCAGGCC
CTCAGTCCTCACAGTCTGTTCATGATCATAATCAGCCATATCACATCTGT
AGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTG
AAACA

【備考】

- ・ SV40 Large-T antigen (2,479bp) より非翻訳領域 (合計 355bp) を除いた 2,124bp の塩基配列を示す。