

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年4月27日 (27.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/043354 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/864, A61K 35/76, 48/00, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/011088
- (22) 国際出願日: 2005年6月10日 (10.06.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2004-305870
2004年10月20日 (20.10.2004) JP
- (74) 代理人: 熊倉 禎男, 外(KUMAKURA, Yoshio et al.); 〒1008355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人放射線医学総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根井 充 (NENOI, Mitsuru) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 臺野 和広 (DAINO, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2006/043354 A1

(54) Title: INSERTION TYPE LOW-DOSE-RADIATION INDUCED VECTOR

(54) 発明の名称: 組込型の低線量放射線誘導性ベクター

(57) Abstract: An insertion type low-dose-radiation induced viral vector, characterized by including a DNA sequence including a p53 target gene promoter sequence and a therapeutic gene sequence. This vector is useful in gene therapy.

(57) 要約: 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターであって、p53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列を含むことを特徴とするベクター。本発明のベクターは遺伝子治療に有用である。

明細書

組込型の低線量放射線誘導性ベクター

技術分野

本発明は、遺伝子治療に有用な組込型の低線量放射線誘導性ベクター、該ベクターを含む遺伝子治療用医薬組成物、及び該医薬組成物を使用した遺伝子治療方法に関する。

背景技術

遺伝子治療においては、治療遺伝子を目的部位へ送達する技術が重要である。例えば、癌の遺伝子治療では、癌の増殖抑制に機能する治療遺伝子を病巣部へ的確に送達する技術が重要である。

かかる遺伝子送達を達成するために、組織特異的受容体やプロモーター配列／エンハンサー等が用いられている。例えば、癌胎児性抗原遺伝子のプロモーター配列を用い、当該プロモーター配列の制御下に治療遺伝子を置くことにより、当該治療遺伝子を癌胎児性抗原を産生している大腸癌や肺癌細胞において選択的に発現させることができる。

これらの送達手段の中で、放射線誘導性遺伝子のプロモーター配列を利用した治療遺伝子の癌組織への送達は有効な手段である。なぜなら、放射線誘導性遺伝子のプロモーター配列の制御下に置かれた治療遺伝子は、放射線照射によりその発現が誘導される（放射線誘導性）ので、放射線を照射した部位での選択的な遺伝子発現が可能になるからである。したがって、放射線誘導性遺伝子のプロモーター配列と、放射線治療分野で進展著しい定位照射技術とを組み合わせることにより、治療遺伝子の発現を空間的、時間的に精度よく制御することが可能となる。

早期増殖応答遺伝子 Egr-1 のプロモーター配列は、遺伝子治療用の放射線誘導

性遺伝子のプロモーター配列として最も研究が進んでいるプロモーター配列である。この Egr-1 遺伝子プロモーター配列の制御下に治療遺伝子としてのサイトカイン TNF α 遺伝子を接続したベクター「TNFerade」が開発され、既に第1相の臨床試験が終了し、現在第2相の臨床試験が行われている（例えば、Senzer N, et al., J Clin Oncol, 22, 592-601, 2004, TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors.参照）。TNFerade は、アデノウイルスをベースとする染色体非組込型ベクターである。

しかしながら、Egr-1 遺伝子プロモーター配列を用いて治療遺伝子を有意に発現させるには、高線量の放射線照射が必要である。実際、2 Gy以下の放射線照射による成功例は報告されていない。かかる高線量放射線照射は、放射線治療と組み合わせた遺伝子治療にとって好ましいものではない。なぜなら、放射線誘導性遺伝子プロモーター配列の制御下置かれた治療遺伝子を用いる遺伝子治療では、放射線照射により治療遺伝子が発現し治療遺伝子産物が病巣部に蓄積して治療効果を発揮するまでに一定の期間を必要とするため、高線量放射線照射により治療遺伝子の発現を誘導した場合、高線量放射線による治療効果（放射線治療による効果）が現れる時期と治療遺伝子産物による治療効果（遺伝子治療による効果）が現れる時期との間に時間差が生じ、放射線治療と遺伝子治療との組み合わせによる相乗効果が得られなくなるからである。また、治療遺伝子の発現のために高線量の放射線を照射した後、更に、放射線照射による放射線治療を行うことは、患者への負担が大きくなるので好ましくない。

一方、低線量放射線誘導性の遺伝子発現系として、癌抑制遺伝子産物である p53 が関与する系が知られている。かかる系では、低線量放射線照射によって活性化された p53 が、その標的遺伝子のプロモーター配列（p53 標的遺伝子プロモーター配列）に作用して、当該プロモーター配列の制御下にある p53 標的

遺伝子の発現を活性化することが知られている（例えば、Amundson SA, et al., Mol Cancer Res, 1, 445-452, 2003, Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation.参照）。更に、p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列を含む遺伝子治療用ベクターも開発されている（例えば、Worthington J, Robson T, Murray M, O'Rourke M, Keilty G, Hirst DG. Modification of vascular tone using iNOS under the control of a radiation-inducible promoter. Gene Ther 2000; 7: 1126-1131. 及び Worthington J, Robson T, O'Keeffe M, Hirst DG. Tumour cell radiosensitization using constitutive (CMV) and radiation inducible (WAF1) promoters to drive the iNOS gene: a novel suicide gene therapy. Gene Ther 2002; 9: 263-269.参照）。前記p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列を含む遺伝子治療用ベクターは、非ウイルスベクター（カチオン性リポソームおよびポリソーム）をベースとする染色体非組込型ベクターである。

しかしながら、前記のp 5 3 標的遺伝子プロモーター配列含有の非組込型ベクターは放射線照射による治療遺伝子の発現誘導性が低く、遺伝子治療用ベクターとしては満足できるものではなかった。

発明の開示

本発明者等は、p 5 3 によるp 5 3 標的遺伝子の発現誘導が、高次の染色体構造に依存した機構と関連していることを示唆する報告（例えば、Espinosa JM, Emerson BM. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. Mol Cell 2001; 8: 57-69. 及び Braastad CD, Han Z, Hendrickson EA. Constitutive DNase I hypersensitivity of p53-regulated promoters. J Biol Chem 2003; 278: 8261-8268.参照）に基づき、宿主細胞へ遺伝子導入されたp 5 3 標的遺伝

子プロモーター配列及びp 5 3標的遺伝子（治療遺伝子）の宿主細胞内における存在状態に着目して鋭意研究を行った。その結果、染色体組込み型ベクターであるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いてp 5 3標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子を宿主細胞へ遺伝子導入すると、低線量の放射線照射で治療遺伝子の発現が高度に誘導されることを見出した。本発明は、この知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、

（1）組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターであって、

p 5 3標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列を含むことを特徴とするベクター；

（2）遺伝子治療により治療可能な疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物であって、前記ウイルスベクターを含むことを特徴とする医薬組成物；並びに

（3）遺伝子治療方法であって、下記の工程：

（i）前記ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程

（ii）該医薬組成物を、遺伝子治療により治療可能な疾患を有する患者へ投与する工程、及び

（iii）該患者の治療遺伝子の発現が必要とされる部位に、該患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程

を含むことを特徴とする方法

に関するものである。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-P

LSのゲノム構造を示す模式図である。

図2は、実施例3及び比較例1で得られたルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導率の線量依存性を示す図である。

図3は、rAAV-PLS特異的プライマーを用いた、形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAのPCR分析の結果を示す図である。

図4は、制限酵素を用いた、形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAのサザンブロット分析の結果を示す図である。

図5は、本発明の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PtkSのゲノム構造を示す模式図である。

図6は、形質導入MCF-7細胞におけるHSV-tk遺伝子及びアクチン遺伝子の発現についてのRT-PCRの結果を示す図である。

図7は、HSV-tk遺伝子導入MCF-7細胞(PtkS-1及びPtkS-2)並びにルシフェラーゼ遺伝子導入MCF-7細胞(PLS)のX線照射後の相対的な生残細胞数を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターは、p53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列を含んでいる。

本発明のウイルスベクターは、そのDNA配列を宿主細胞の染色体へ組み込むことができる染色体組込型ウイルスベクターである。本明細書では、前記の染色体組込型ウイルスベクターを単に組込型ウイルスベクターと称する。

組込型ウイルスベクターは、組込型ウイルスをベースとして作成することができる。

本発明に利用可能な組込型ウイルスとしては、レトロウイルス及びパルボウイ

ルスが挙げられる。レトロウイルスの具体例としてはレンチウイルスが挙げられ、パルボウイルスの具体例としてはアデノ随伴ウイルスが挙げられる。これらのなかでは、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが好ましい。アデノ随伴ウイルスは、非病原性であり安全性が高く、更に、宿主領域が広いので分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも遺伝子導入ができるので特に好ましい。

アデノ随伴ウイルスは、キャプシドの中に直鎖状一本鎖DNAを含むパルボウイルス科に属するウイルスである。アデノ随伴ウイルスとしては、1～8型が挙げられるが、2型及び8型が好ましく、2型が特に好ましい。

本発明のウイルスベクターのDNA配列に含まれる「p53標的遺伝子プロモーター配列」とは、低線量の放射線照射によって活性化されたp53の作用を受けて、当該プロモーター配列の制御下にある治療遺伝子の発現を活性化することができるプロモーター配列をいう。

「p53標的遺伝子プロモーター配列」は、活性化p53認識配列として以下の配列：

RRRCWGWYYY (配列番号1)

(配列中、RはA又はG、WはA又はT、YはC又はTである。)

を有している。好ましくは「p53標的遺伝子プロモーター配列」は、以下の配列：

GAACATGTCCCAACATGTTG (配列番号2)

及び/又は

GGGCATGTCT (配列番号3)

を有している。本発明に用いることができるp53標的遺伝子プロモーター配列としては、p21遺伝子プロモーター配列、MDM2遺伝子プロモーター配列、GADD45遺伝子プロモーター配列、14-3-3 σ 遺伝子プロモーター配列、KARP-1遺伝子プロモーター配列、BAX遺伝子プロモーター配列、DR5

遺伝子プロモーター配列、B I D 遺伝子プロモーター配列、P U M A 遺伝子プロモーター配列及びN O X A 遺伝子プロモーター配列等が挙げられる。これらの中では、G A D D 4 5 遺伝子プロモーター配列及びp 2 1 遺伝子プロモーター配列が好ましく、p 2 1 遺伝子プロモーター配列が特に好ましい。これらのp 5 3 標的遺伝子プロモーター配列は公知であり、例えば、p 2 1 遺伝子のプロモーター配列は、D N A 塩基配列データベース (GenBank) 上にアクセッションナンバー Z 8 5 9 9 6 として公開されている。

本発明のウイルスベクターのD N A 配列に含まれる「治療遺伝子配列」とは、遺伝子治療の際に宿主細胞内で治療効果を発揮する遺伝子産物をコードする配列をいう。治療遺伝子は、遺伝子治療の対象となる疾患の治療に有効な遺伝子であれば特に限定されない。例えば、遺伝子治療の対象が癌である場合、治療遺伝子としては、T N F α 遺伝子、アポトーシス誘導タンパク質遺伝子、腫瘍抑制タンパク質遺伝子、脈管形成阻害タンパク質遺伝子、アンチセンス核酸遺伝子、プロドラッグ活性化剤遺伝子、放射線増感剤遺伝子等が挙げられる。これらの中では、T N F α 遺伝子及びプロドラッグ活性化剤遺伝子が好ましく、プロドラッグ活性化剤遺伝子が特に好ましい。プロドラッグ活性化剤遺伝子の例としては、プロドラッグであるガンシクロビルを活性化してD N A 合成阻害作用を発揮させることができるヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ (H S V - t k) をコードするH S V - t k 遺伝子があげられる。これらの治療遺伝子の配列は公知であり、例えば、プロドラッグ活性化剤遺伝子の配列は、D N A 塩基配列データベース (GenBank) 上にアクセッションナンバーV 0 0 4 7 0 として公開されている。

なお、ウイルスベクターへ挿入するD N A 配列の大きさ (すなわち、p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列と治療遺伝子配列との合計の大きさ (後述する、L e f t - I T R、ポリアデニル化シグナル配列及びR i g h t - I T R 等を含む場合は、これらをも含めた大きさ) は、挿入されるウイルスベクターが許容しうる

大きさの範囲内でなければならない。例えば、アデノ随伴ウイルスベクターの場合、挿入するDNA配列の大きさは4.7 kb以下でなければならない。

また、治療遺伝子配列は、p53標的遺伝子プロモーター配列の制御下で発現可能な状態で該プロモーター配列に結合していなければならない。

本発明のウイルスベクターのDNA配列の鎖の数は、ベースとするウイルスの種類に依存して変更しうるが、例えば、アデノ随伴ウイルスをベースとする場合、ウイルスベクターのDNA配列は一本鎖である。

本発明のウイルスベクターは、上記のDNA配列をキャプシド内に含むウイルス粒子の状態で存在する。例えば、アデノ随伴ウイルスをベースとする場合、本発明のウイルスベクターは直径約20 nmの正20面体状のキャプシドを有している。

本発明のウイルスベクターは「低線量放射線誘導性」を有する。「低線量放射線誘導性」を有するとは、ウイルスベクターのDNA配列を宿主細胞の染色体へ組み込んだ後に1 Gyの放射線を照射したとき、治療遺伝子の発現活性を、放射線非照射時の発現活性と比較して少なくとも100%、好ましくは少なくとも200%上昇させることができることをいう。

本発明のウイルスベクターは、一般的なウイルスベクターの構築方法、例えば、文献：Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; 72: 2224-2232. 及び Matsushita T et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 1998; 5: 938-945. に記載の方法にしたがい構築することができる。

一態様において、本発明の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターは、

- (a) Left-ITR、
- (b) p53標的遺伝子プロモーター配列、

- (c) 治療遺伝子配列、
- (d) ポリアデニル化シグナル配列、
- (e) Right-ITR、

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含むDNA配列を含んでいる。

前記一態様のウイルスベクターのDNA配列に含まれる(b) p53標的遺伝子プロモーター配列及び(c)治療遺伝子配列は前記と同様である。

前記一態様のウイルスベクターのDNA配列に含まれる(a)「Left-ITR」及び(b)「Right-ITR」とは、それぞれ逆方向末端反復(inverted terminal repeat)とも呼ばれる配列をいう。「Left-ITR」及び「Right-ITR」は、それぞれ逆方向に相補的な塩基配列を含み、T字型のヘアピン構造を採ることができる。Left-ITR及びRight-ITRは、ウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込みにおいて重要な役割を果たすと考えられている。例えば、ウイルスベクターのベースとしてアデノ随伴ウイルスを用いる場合、Left-ITR及びRight-ITRとしては、それぞれ配列番号4及び5で示される配列を用いることができる。

Left-ITR:

```
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCCT
```

(配列番号4)

Right-ITR:

```
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
```

(配列番号5)

前記一態様のウイルスベクターのDNA配列に含まれる(d)「ポリアデニル化シグナル配列」とは、mRNAにポリアデニル酸を付加する機能を有するポリ(A)ポリメラーゼが認識する領域をコードする配列をいう。ポリアデニル化シグナル配列は、宿主細胞内で転写された治療遺伝子のmRNAの安定化に役立つと考えられる。「ポリアデニル化シグナル配列」は、以下の配列：AATAAA(配列番号6)を有している。具体例としては、SV40由来ポリアデニル化シグナル配列、ヒト成長ホルモン遺伝子由来ポリアデニル化シグナル配列及びヒトベータグロビン遺伝子由来ポリアデニル化シグナル配列等が挙げられる。これらの中では、SV40由来ポリアデニル化シグナル配列及びヒトベータグロビン遺伝子由来ポリアデニル化シグナル配列が好ましく、SV40由来ポリアデニル化シグナル配列が特に好ましい。これらのポリアデニル化シグナル配列は公知であり、例えば、SV40由来ポリアデニル化シグナル配列は、文献：Levitt N, Briggs D, Gil A, Proudfoot NJ. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. GENES DEV. 1989 7:1019-25.に記載されている。

前記一態様のウイルスベクターのDNA配列は、配列：(a) Left-ITR、(b) p53標的遺伝子プロモーター配列、(c) 治療遺伝子配列、(d) ポリアデニル化シグナル配列、(e) Right-ITRを、5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含んでいる。なお、治療遺伝子配列は、p53標的遺伝子プロモーター配列の制御下で発現可能な状態で該プロモーター配列に結合していなければならない。

別の態様では、Left-ITRとRight-ITRとの間に含まれる配列として(b) p53標的遺伝子プロモーター配列の相補的配列、(c) 治療遺伝子配列の相補的配列、(d) ポリアデニル化シグナル配列の相補的配列を使用することもできる。この場合、ウイルスベクターのDNA配列は、配列：(a) L

eft-ITR、(d) ポリアデニル化シグナル配列の相補的配列、(c) 治療遺伝子配列の相補的配列、(b) p53 標的遺伝子プロモーター配列の相補的配列、(e) Right-ITR を、5' 末端側から 3' 末端側に向かって (a)、(d)、(c)、(b)、(e) の順で含んでいる。

本発明のウイルスベクターの DNA 配列は、上記の配列の他にプロモーター上流域にポリアデニル化シグナル配列を含んでいてもよい。プロモーター上流域のポリアデニル化シグナル配列は、放射線非照射時のバックグランド抑制の点で有用である。具体例としては、合成ポリアデニル化シグナル配列、ヒト成長ホルモン遺伝子由来ポリアデニル化シグナル配列が挙げられる。これらの中では、合成ポリアデニル化シグナル配列が特に好ましい。

前記一態様のウイルスベクターは、例えばアデノ随伴ウイルスをベースとする場合、以下の工程を含む三重トランスフェクション法によりウイルスベクターを構築することができる。

(1) 3 種類のプラスミド：(イ) 野生型アデノ随伴ウイルスの Left-ITR と Right-ITR との間に p53 標的遺伝子プロモーター配列、治療遺伝子及びポリアデニル化シグナル配列を挿入したベクタープラスミド、(ロ) ウイルス複製及びウイルス粒子形成に必要な遺伝子 (rep 及び cap) を含むヘルパープラスミド、並びに、(ハ) アデノ随伴ウイルスベクター産生に必要なアデノウイルス遺伝子 (E2A、E4 及び VA) を含むアデノウイルス遺伝子発現プラスミドを作製する工程；

(2) 該 3 種類のプラスミドを 293 細胞 (E1A、E1B 遺伝子を含む) にコトランスフェクトする工程、

(3) 該細胞をインキュベートして、293 細胞内でウイルスベクターを産生し、蓄積させる工程、

(4) 該細胞を凍結融解してウイルスベクターを回収する工程、及び

(5) 必要により、塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法又はアフィニティークロマトグラフィー法により、回収したウイルスベクターを精製及び／又は濃縮する工程。

本発明の医薬組成物は、前述の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含み、遺伝子治療により治療可能な疾患の治療に用いることができるものである。

本発明の医薬組成物の適用対象となるのは、遺伝子治療により治療可能な疾患である。具体例としては、癌、再狭窄、虚血性心疾患及び動脈硬化等が挙げられる。これらの疾患の中で、本発明の医薬組成物は、遺伝子治療と放射線治療との併用による相乗効果が得られる点で癌に対して特に優れた治療効果を発揮することができる。適用可能な癌としては、乳癌、前立腺癌及び脳腫瘍が挙げられる。これらの癌の中で、本発明の医薬組成物は、乳癌に対して優れた治療効果を発揮することができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを単独で含んでいてもよく、その他の活性物質を更に含んでいてもよい。その他の活性物質としては、プロドラッグ、放射線増感剤及び免疫賦活剤等が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容しうる担体を含んでいてもよい。医薬的に許容しうる担体としては、水、生理的食塩水及び緩衝液等が挙げられる。

本発明の医薬組成物の剤型としては、直接体内に適用する注射剤（懸濁剤、乳剤を含む）等が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、当該技術分野において周知の製剤方法にしたがい製造することができる。

本発明の遺伝子治療方法は、一般的に、下記の工程：

(1) p53 標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列

を含む組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程

(2) 該医薬組成物を、遺伝子治療により治療可能な疾患を有する患者へ投与する工程、及び

(3) 該患者の治療遺伝子の発現が必要とされる部位に、該患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程

を含んでいる。

前記(1)の工程は、前述した低線量放射線誘導性ウイルスベクター及び該ベクターを含む医薬組成物に関する記載にしたがい実施することができる。

前記(2)の工程において、治療対象となる疾患は、前述した本発明の医薬組成物の適用対象となる疾患と同一である。

患者への医薬組成物の投与は、*in vivo* で治療遺伝子を導入する直接投与法及び *ex vivo* で治療遺伝子を導入する自家移植法が挙げられる。

直接投与法では、ベクターを含む医薬組成物を患者へ直接注入する。この際、静脈注射、動脈注射等による全身投与も可能であるが、ベクターに対する免疫反応を最小限にすることができるので、病巣部へ *in situ* で局所投与することが好ましい。

自家移植法では、患者の病巣部から採取した細胞を、ベクターを含む医薬組成物を用いて体外で処理し、その後、該ベクターのDNA配列を染色体中に組み込んだ細胞を再度患者へ戻す。

医薬組成物の投与量は、通常、疾患の種類及び患者の状態等に依存して変化するが、例えば、乳癌の場合、成人患者一人当たり、ウイルスベクターとして1回に $10^8 \sim 10^{11}$ 個、好ましくは $10^9 \sim 10^{11}$ 個、特に好ましくは $10^{10} \sim 10^{11}$ 個である。

また、投与回数は、1日1回～2回でよく、投与期間は1日～5日以上にわた

ってもよく、1～10回の投与を1セットとして、長期間にわたって断続的に多数セットを投与してもよい。

尚、本発明の医薬組成物は、患者の病巣部のp53遺伝子の状態を検査し、当該病巣部でp53遺伝子が正常に機能していることを確認した上で投与する。

前記(3)の工程において、照射する放射線の種類としては、X線、γ線、粒子線等が挙げられるが、γ線、粒子線が好ましく、粒子線が特に好ましい。

照射線量は、患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量であればよく、一般的には、0.5～2 Gy、好ましくは0.5～1 Gyである。

照射回数は、前記の線量の照射を1回すれば十分であるが、必要に応じて2～3回以上行ってもよい。

照射は、定位照射技術を用いて、組み込まれたベクターのDNA配列を発現させることが必要な領域のみに行うことができる。定位照射は、例えば、装置：HIMAC（製造者名：放射線医学総合研究所）を用いて行うことができる。

工程(2)にしたがい医薬組成物を投与した後、工程(3)にしたがい放射線を照射するまでの時間間隔としては、ベクターのDNA配列が患者の染色体に組み込まれるのに十分な時間が必要である。かかる時間間隔は、疾患の種類及び患者の状態等に依存して変化するが、例えば、乳癌の場合には、5～9週間、好ましくは5～7週間、特に好ましくは5～6週間である。

治療対象となる疾患が癌である場合、本発明の遺伝子治療方法は、前記(1)～(3)の工程に続いて以下の工程：

(4) 該治療遺伝子が発現している部位に、癌を治療するのに十分な線量の放射線を照射する工程

を含んでもよい。すなわち、本発明の癌の遺伝子治療方法は、下記の工程：

(1) p53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列

を含む組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程

(2) 該医薬組成物を、癌患者へ投与する工程、

(3) 該患者の癌病巣部位に、該患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程、及び

(4) 該治療遺伝子が発現している部位に、癌を治療するのに十分な線量の放射線を照射する工程

を含んでいる。

本発明の癌の遺伝子治療方法における(1)～(3)の工程は、対象となる疾患が癌であり、放射線の照射部位が癌病巣部であることを除いて、前述の一般的な遺伝子治療方法における工程(1)～(3)と同様である。

前記(4)の工程において、照射する放射線の種類としては、X線、 γ 線、粒子線等が挙げられるが、 γ 線、粒子線が好ましく、粒子線が特に好ましい。

照射線量は、癌を治療するのに十分な線量であればよく、癌の種類及び患者の状態等に依存して変化するが、例えば、乳癌の場合、一般的には、10～60 Gy、好ましくは10～30 Gy、特に好ましくは10～20 Gyである。

照射回数は、癌の種類及び患者の状態等に依存して変化するが、例えば、乳癌の場合、一般的には、30回である。

照射は、定位照射技術を用いて、癌病巣部のみに行うことができる。定位照射は、例えば、装置：HIMAC（製造者名：放射線医学総合研究所）を用いて行うことができる。

工程(3)にしたがい患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射した後、工程(4)にしたがい放射線を照射するまでの時間間隔としては、工程(3)の放射線照射によって患者の体内で治療遺伝子が発現し、治療遺伝子産物が癌病巣部に蓄積するのに十分な時間が

必要である。かかる時間間隔は、癌の種類及び患者の状態等に依存して変化するが、例えば、乳癌の場合には、3～12時間、好ましくは3～8時間、特に好ましくは3～6時間である。

(4)の工程を行うことにより、(1)～(3)の工程による遺伝子治療の治療効果と、(4)の工程による放射線治療の治療効果との組み合わせによる相乗的な治療効果が得られる。

前述の癌の遺伝子治療方法は、哺乳類、特にヒトを治療対象とするものであるが、ヒトを対象とする治療法の確立に先だって行われる動物実験は、例えば、下記の工程：

- (1) 乳癌細胞をヌードマウスへ移植して、癌のモデルマウスを作成する工程、
 - (2) p53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子としてのヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を含むDNA配列を含む組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程
 - (3) 該医薬組成物を、該モデルマウスの癌病巣部位へ注射する工程、
 - (4) 該モデルマウスの癌病巣部位に、該マウスの染色体に組み込まれた該ベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程
 - (5) 該モデルマウスにガンシクロビル（ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼにより細胞毒性を発現するプロドラッグ）を腹腔投与する工程、及び
 - (6) 該治療遺伝子が発現している部位に、癌を治療するのに十分な線量の放射線を照射する工程
- を含んでいる。

以下に実施例を示して具体的に説明するが、本発明は実施例により限定されるものではない。

実施例

(実施例 1)

組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクター

本実施例では、2型アデノ随伴ウイルスをベースとし、p53 標的遺伝子プロモーター配列として p21 遺伝子プロモーター配列を有し、治療遺伝子配列に対応するものとしてルシフェラーゼ遺伝子配列を有する低線量放射線誘導性ウイルスベクター rAAV-PLS を構築した。rAAV-PLS は、AAV Helper Free System (Stratagene) を用いた三重トランスフェクション法 (Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J Virol 1998; 72: 2224-2232. 及び Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. Gene Ther 1998; 5: 938-945.) により構築した。

はじめに、プラスミド wwp-Luc (El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75: 817-25.) から、HindIII を用いて、-2.2 kb 及び -1.4 kb に p53 認識部位を含む p21 遺伝子の 5' フランキング領域 (すなわち、p53 標的遺伝子プロモーター配列) :

```
AAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC
CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCCCTGGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGG
AAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTA
TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG
GAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTTTCAGGGCAGAAGTCCTCCCTTAGA
```

GTGTGCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGGTACTTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGAGCTAGAAGTTATAAAAAAATTCTTTCCC
AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT
TG TAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTTAAAAGCAAACCTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTGAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTFTTTGTCAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAGTCTGTGTTCCAACCT
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCAAATCCTCCCCTTCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCCTCCTTCCCGGAAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT
TTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGCTGTGTCCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA
ACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT

GCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCGGGGAGGGCGGTCC
CGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGCGGGCGGTTGTATATCAG
GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
番号7)

を切り出した。

切り出した p 2 1 遺伝子の 5' フランキング領域を、ルシフェラーゼ遺伝子配
列及び S V 4 0 由来ポリアデニル化シグナルを含む p G L 3 基本ベクター
(Promega、pGL3-Basic (Cat.# E1751)) のマルチクローニング部位へ挿入して
ルシフェラーゼ発現プラスミド P L S を構築した。プラスミド P L S の塩基配列
を以下に示す。

GGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCCAGGAACATGCT
TGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCTCTGGCA
TAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGCCTTGGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAG
GAGACCTCTAAAGACCCCAGGTAAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCC
TTGCGACAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGA
CTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTTTCAGGGCAGAAGTCCCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTC
AAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTACTTAAGAAAT
ATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGAGCTAGAAGTTATAAAAAAATTCCTTTCCAAAAACAACAACAAAAAGAA
TTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAAAAAAATTTT
CTCCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTTCAAGGCAG
TGGGAGAAGGTGCCTGTCCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCG
AAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCCCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTCTGGGGTTTAGCCAC
AATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGC
TCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCCTCCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGG
GCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGG

GTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAAGCAAAACTGC
AAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTGAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGC
GGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTCAGAAGAACCAGTAGACACTTCCAGAATTGTCCTTTATTTA
TGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTTTTGTCAATTTGGAGCCACAGAAATAAA
GGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAGTCCTGTGTTCCAATAAGTCAATTTCTTTGCTGCA
TGATCTGAGTTAGGTACCCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGGAG
TATTCAGGAGACAGAACTCACTCGTCAAATCCTCCCCTCCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGG
ATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCAATTCTTCTGTTTCCCTGGAG
ATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATCCCCTCCTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACCTTG
TATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTCCTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTC
AAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGG
AATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGAAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTT
TATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCTGCCAGAGTGGGTGAGC
GGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGTGTGCTCCTCCTGGAGAGTGCCAACCTCATTCTCCAAGTA
AAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGGAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGGCGAGGGACTGGGG
GAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGCCAGGCTC
AGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCCGGGGAGGGCGGTCCCGGGCGGCGCGGTGGGCCGA
GCGCGGGTCCCGCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGCGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCA
GCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCA
CCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAG
AGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCG
AGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGC
TGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGT
TATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCA
TTTCGACGCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAGCTCC

CAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTCAGTCGATGTACACGTTTCG
TCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAA
TTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCT
GCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTG
TTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCT
TAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGG
TGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAA
TTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTA
TCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGG
GCGCGGTCCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCG
TTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAACAATCCGGAAGCGA
CCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACT
TCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCCTGAATTGGAAT
CCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGAGGCTTCCCACGATGACGCCGGTGAAC
TTCCC GCCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCA
GTCAAGTAACAACCGCAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCG
GAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAT
TCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAA
CTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA
GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGG
TTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCCGTCGACCGATGCCCTTGAGA
GCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTC
TTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
GGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA
TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGC

GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGTAGGTA
TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTG
CGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG
CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACG
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTAT
CTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGCTCCAGATTTATCAGC
AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTAT
TAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTAC
AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGT
TACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTT
GGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATG
CTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
CCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGAAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAA
CTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA
AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTA
TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTCCGCG
CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTAC

GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGC
CACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACG
GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTT
TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCC
TATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGAT
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTGCCATTGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCCCAAGCTACCATGATAAGTAAG
TAATATTAAGGTACGGGAGGTACTTGGAGCGGCCGAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTT
GGTTTTTTGTGTGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAAACAAAACGAAAACAAAACAACTAGCA
AAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATCGATA (配列番号 8)

当該塩基配列中、p 2 1 遺伝子の 5' フランキング領域は以下の配列：

AAGCTTCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC
CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCCCTTGGGCTGCCTGTTTTAGGTGAGG
AAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTA
TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGGCAGAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG
GAGTCAGATTCTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTTCAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGA
GTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACTTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGTACTTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGCTGTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTGAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT

TGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTTAAAAGCAAACCTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTGAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTCAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTTTTGTTCAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAAGTCTGTGTTCCAAC
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCAAATCCTCCCTTCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTCAGGTGAGTGTAGGGGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCTCCTTCCCAGGAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT
TTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGCTGTGTCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA
ACGCAGGCGAGGGACTGGGGAGGAGGGAAGTGCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT
GCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCC
CGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCTCCTTGAGGCGGGCCCCGGGCGGGCGGTTGTATATCAG
GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
番号 9)

で表される領域であり、

ルシフェラーゼコード配列は以下の配列：

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAG
CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG
GTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCGGTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTG

AATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTTGGGCGCGTTA
 TTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATT
 TCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCA
 ATCATCCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTC
 ACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATT
 GCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGC
 GTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
 GTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTA
 ATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTG
 CCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAAACGATTTATCTAATTTACACGAAATT
 GCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATC
 AGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACGGGC
 GCGGTGCGTAAAGTTGTCCATTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTT
 AATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACC
 AACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTC
 TTCATCGTTGACCGCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCC
 ATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCT
 CCCGCCCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGAAAAGACGATGACGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGT
 CAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGA
 AACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

(配列番号 10)

で表される領域であり、

SV40 由来ポリアデニル化シグナルは以下の配列：

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
 GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT

GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
GTGGTA (配列番号 11)

で表される領域である。

構築したプラスミド PLS から、p21 遺伝子の 5' フランキング領域、ルシフェラーゼコード配列及び SV40 由来ポリアデニル化シグナルを含む 4.3 kb の Xho I / BamH I フラグメントを切り出し、平滑末端化した。得られたフラグメントを、Left-ITR 及び Right-ITR を有する pAAV-MCS (STRATAGENE 社 AAV Helper-Free System Cat # 240071) を Not I で消化し、Blunting kit (Takara) の使用により平滑末端化したものの両 ITR 間に挿入してプラスミド pAAV-PLS を得た。プラスミド pAAV-PLS の塩基配列を以下に示す。

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCGCG
GCCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCT
TTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTT
GGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAAACCTT
AGCCTGTTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGT
GTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTT
CAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTTA
AAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGAGCTAGA
AGTTATAAAAAAATTCCTTCCAAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTCAATTGTGAAGCTCAGTACCACAA
AAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAAATGTC
TAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGAC
ATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGT
GGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAG

GCCAAGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAG
CCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCT
GAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTAGTGGGATTTCTGTTC
GATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAA
GGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCT
GTCAGAAGAACCAGTAGACACTTCCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGA
GGGTTATTTGGCATTTTTGTCAATTTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGCAGGA
GGCAAAAGTCTGTGTTCCAACATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCT
GAGCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGAACTCACTCGTCA
AATCCTCCCCTTCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGGTAGGGTG
TAGGGAGATTGGTTCAATGTCCAATTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTC
CAATTCCTCCTTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTC
CTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCT
CCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTG
GAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTT
TCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTATTCTAAC
AGTGCTGTGTCTCCTGGAGAGTGCCAACCTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGT
GGGGAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGCGGAGGGACTGGGGGAGGAGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGC
GAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGGCTGGGCAGCCAGGAGC
CTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCCCGGGCGGCGGTGGGCCGAGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCC
CGGGCGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCAAGTCAG
TTCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA
GGCCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATAC
GCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTC
GAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGC

AGTGAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCG
AACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTGCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCC
AAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGAT
TCTAAAACGGATTACCAGGGATTCAGTCCGATGTACACGTTGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCT
ACTGGTCTGCCTAAAGGTGTGCTCTGCCTCATAGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATG
TTTACTACTCGGATATTTGATATGTGGATTTGAGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTT
CTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTCGCCAAA
AGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACT
ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTT
GAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGA
GGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTG
ATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTC
GACGCAGGTGTGCGAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCAC
GGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCCAGTCAAGTAACAACCGGAAAAAGTTGCGC
GGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAG
ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGA
GCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATT
TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAAT
TGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAA
TGTGGTAAAATCGATAAGGATCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT
CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCCTCAGTGAGC

GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
CACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTA
CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
CCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACC
CTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCCTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT
GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTAC
CGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA
TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCT
AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGA
AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC
TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA
AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
TATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAACTCGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT

AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCT
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGT
GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT
CTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT
GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGT
GCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCTGGAACAGGAGAGCGCACGA
GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
TGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGT (配列番号12)

当該塩基配列中、L e f t - I T R は以下の配列：

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCAGCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTAGGGGTTCT

(配列番号13)

で表される領域であり、

p 21 遺伝子の5' フランキング領域は以下の配列：

AAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC
CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTGTCCCTGGGCTGCCTGTTTTAGGTGAGG
AAGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAACCTTAGCCTGTACTCTGAACAGGGTA
TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG
GAGTCAGATTCTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCTTTTTTTCAGGGCAGAAGTCCCTCCCTTAGA
GTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGGTAATAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGTGAGCTAGAAGTTATAAAAAAAAAATTCTTTCCC

AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCCAGGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGTCTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT
TGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTTAAAAGCAAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTCAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTTTTGTGTCAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAAGTCTGTGTTCCAACCT
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCAAATCCTCCCCTTCCCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATCCCTCCTTCCCGGAAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT
TTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGCTGTGTCTCCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA
ACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT
GCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCCGGGGAGGGCGGTCC
CGGGCGGCGGGTGGGCCGAGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGGGGGGGTGTATATCAG

GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
番号14)

で表される領域であり、

ルシフェラーゼコード配列は以下の配列：

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAG
CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG
GTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTG
AATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTA
TTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATT
TCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCA
ATCATCCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTC
ACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATT
GCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGC
GTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTA
ATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTG
CCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATT
GCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATC
AGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGC
GCGGTCGGTAAAGTTGTCCATTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTT
AATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACC
AACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTC
TTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCCTGAATTGGAATCC
ATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTCCCAGCATGACGCCGGTGAACCT
CCCGCCCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCCAGT

CAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGA
AAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

(配列番号 15)

で表される領域であり、

SV40由来ポリアデニル化シグナルは以下の配列：

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
GTGGTA (配列番号 16)

で表される領域であり、

Right-ITRは以下の配列：

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
AGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCCTGCAGG

(配列番号 17)

で表される領域である。

ウイルス複製及びウイルス粒子形成に必要な遺伝子 (rep及びcap) を含むヘルパープラスミドとして、アデノ随伴ウイルス由来rep及びcap遺伝子をコードするpAAV-RC (STRATAGENE社 AAV Helper-Free System Cat#240071) を使用した。

プラスミドpAAV-RCの塩基配列を以下に示す。

GCGCGCCGATATCGTTAACGCCCCGCGCCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGAAGATCAGAAGTTC
CTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTGATCTGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTA
CGAGATTGTGATTAAGGTCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACTG
GGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCT
GACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCT

TTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACCACCGGGGTGAA
ATCCATGGTTTTGGGACGTTTTCTGAGTCAGATTCGCGAAAACTGATTCAGAGAAATTTACCGCGGGATCGA
GCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTCAAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGA
TGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGACTAATATGGA
ACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTC
GCAGACGCAGGAGCAGAACAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTC
AGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGA
GGACCAGGCCTCATACTCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGAACA
TGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACAT
TTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCT
GGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGAC
CAACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCC
CTTCAACGACTGTGTGACAAGATGGTGTCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCAAGGTGCTGGAGTC
GGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAAATGCAAGTCTCGGCCCAGATAGACC
GACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCTTCGAACA
CCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGT
CACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTA
CGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCG
CGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAAACA
ATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTC
AAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGTTTC
TGTCGTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGAC
TGCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGG
CTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAAGCTCA
AACCTGGCCCACCACCACCAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCCTGGGT

ACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCG
AGCAGGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACG
CGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGGGA
AAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGG
TAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAA
GATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAG
CCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCG
CCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATACCA
CCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAG
CCTCGAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCC
ACTTTTCACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGACCCAAGAGACTCAACTTCA
AGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTACGCAGAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCA
GCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCTCGGCTCGGGCGATCAAGGATGCC
TCCCGCCGTTCCAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGG
CAGTAGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTTCCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTTA
CCTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTCTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCA
TGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACAACCTCCAAGTGGAAACCACCACGCAGT
CAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGACCCT
GTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTA
CCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATG
AAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAATGTGGACA
TTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTT
CTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTC
CAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACG
GACATTTTCACCCCTCTCCCTCATGGGTGGATTTCGGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGA

ACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACT
CCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAA
TTCAGTACACTTCCAACATAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAG
AGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACGTTTAAT
TCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGTATTTCTTTCTTATCTAGTTTCCATGGCTACGTAGATAAGTAGC
ATGGCGGGTTAATCATTAACTACAGCCGGGCGTTTAAACAGCGGGCGGAGGGGTGGAGTCGTGACGTGAAT
TACGTCATAGGGTTAGGAGGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTGTTTTCGACATTTTTCGACACCATGT
GGTCTCGCTGGGGGGGGGGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGAGCG
CTGGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGC
CTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAG
TTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGT
AAATCAGCTCATTTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAG
ATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGC
GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGT
GCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACG
TGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGC
GCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAAATG
TGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCC
GATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCT
TTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATC
AGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG
AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCG
GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAA
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGG
CCAACCTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATG

TAAC TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC
CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC TATTA ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAAT
TAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTA
TTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG
AGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
TAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTT
TTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTTTGTTTGCCGGATCAAG
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGT
AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA ACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG
TCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA
ACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT
TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA
ATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAA
TTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAA (配列番号 18)

アデノ随伴ウイルスベクター産生に必要なアデノウイルス遺伝子 (E 2 A、E 4 及び V A) を含むアデノウイルス遺伝子発現プラスミドとして、アデノウイルス由来 V A、E 2 A 及び E 4 遺伝子をコードする p H e l p e r (STRATAGENE

社 AAV Helper-Free System Cat#240071) を使用した。

プラスミド pHelper の塩基配列を以下に示す。

GGTACCCAACCTCCATGCTTAACAGTCCCAGGTACAGCCCACCCTGCGTCGCAACCAGGAACAGCTCTACAG
CTTCTGGAGCGCCACTCGCCCTACTTCCGCAGCCACAGTGCAGATTAGGAGCGCCACTTCTTTTTGTCA
CTTGAAAAACATGTAAAAATAATGTACTAGGAGACACTTTCATAAAGGCAAATGTTTTTATTTGTACTC
TCGGGTGATTATTTACCCCCACCCTTGCCGTCTGCGCCGTTAAAAATCAAAGGGTTCTGCCGCGCATCG
CTATGCGCCACTGGCAGGGACACGTTGCGATACTGGTGTTAGTGCTCCACTTAAACTCAGGCACAACCATC
CGCGGCAGCTCGGTGAAGTTTTCACTCCACAGGCTGCGCACCATCACCACGCGTTTAGCAGGTGCGGCGCC
GATATCTTGAAGTCGCAGTTGGGGCCTCCGCCCTGCGCGCGGAGTTGCGATACACAGGGTTGCAGCACTGG
AACACTATCAGCGCCGGGTGGTGCACGCTGGCCAGCACGCTCTTGTCGGAGATCAGATCCGCGTCCAGGTCC
TCCGCGTTGCTCAGGGCGAACGGAGTCACTTTGGTAGCTGCCTTCCAAAAAGGGTGCATGCCAGGCTTT
GAGTTGCACTCGCACCGTAGTGGCATCAGAAGGTGACCGTGCCCGGTCTGGGCGTTAGGATACAGCGCCTGC
ATGAAAGCCTTGATCTGCTTAAAAGCCACCTGAGCCTTTGCGCCTTCAGAGAAGAACATGCCGCAAGACTTG
CCGAAAACTGATTGGCCGGACAGGCCGCGTCATGCACGCAGCACCTTGCGTCGGTGTGGAGATCTGCACC
ACATTTCCGCCCCACCGTTCTTACGATCTTGGCCTTGCTAGACTGCTCCTTCAGCGCGGCTGCCCGTTT
TCGCTCGTCACATCCATTTCAATCAGTGCTCCTTATTTATCATAATGCTCCCGTGTAGACACTTAAGCTCG
CCTTCGATCTCAGCGCAGCGGTGCAGCCACAACGCGCAGCCCGTGGGCTCGTGGTGTGTAGGTTACCTCT
GCAAACGACTGCAGGTACGCTGCAGGAATCGCCCCATCATCGTCACAAAGGTCTTGTGCTGGTGAAGGTC
AGCTGCAACCCGCGGTGCTCCTCGTTTAGCCAGGTCTTGATACGGCCGCCAGAGCTTCCACTTGGTCAGGC
AGTAGCTTGAAGTTTGCCTTAGATCGTTATCCACGTGGTACTTGTCCATCAACGCGCGCGCAGCCTCCATG
CCCTTCTCCACGCAGACACGATCGGCAGGCTCAGCGGGTTATCACCGTGCTTTCACTTTCCGCTTCACTG
GACTCTTCTTTTCTCTTGCCTCCGCATACCCCGCGCCACTGGGTGCTTTCATTAGCCGCGCGCACCCTG
CGCTTACCTCCCTTGCCGTGCTTATTAGCACCGGTGGGTTGCTGAAACCCACCATTTGTAGCGCCACATCT
TCTCTTTCTTCTCGCTGTCCACGATCACCTCTGGGGATGGCGGGCGCTCGGGCTTGGGAGAGGGGCGCTTC

TTTTTCTTTTTGGACGCAATGGCCAAATCCGCCGTCGAGGTCGATGGCCGCGGGCTGGGTGTGCGCGGCACC
AGCGCATCTTGTGACGAGTCTTCTTCGTCTCGGACTCGAGACGCCGCCTCAGCCGCTTTTTTGGGGGCGCG
CGGGGAGGCGGGCGGACGGCGACGGGGACGACACGTCTCCATGGTTGGTGGACGTCGCGCCGACCCGCGT
CCGCGCTCGGGGGTGGTTTCGCGCTGCTCCTCTTCCCGACTGGCCATTTCTTCTCTATAGGCAGAAAAAG
ATCATGGAGTCAGTCGAGAAGGAGGACAGCCTAACCGCCCCCTTGAGTTCGCCACCACCGCTCCACCGAT
GCCGCCAACGCGCCTACCACCTTCCCCGTCGAGGCACCCCGCTTGAGGAGGAGGAAGTGATTATCGAGCAG
GACCCAGGTTTTGTAAGCGAAGACGACGAGGATCGCTCAGTACCAACAGAGGATAAAAAGCAAGACCAGGAC
GACGCAGAGGCAAACGAGGAACAAGTCGGGCGGGGGACCAAAGGCATGGCGACTACCTAGATGTGGGAGAC
GACGTGCTGTTGAAGCATCTGCAGCGCCAGTGCGCCATTATCTGCGACGCGTTGCAAGAGCGCAGCGATGTG
CCCCTCGCCATAGCGGATGTCAGCCTTGCCCTACGAACGCCACCTGTTCTCACC GCGGTACCCCCAAACGC
CAAGAAAACGGCACATGCGAGCCCAACCCGCGCCTCAACTTCTACCCCGTATTTGCCGTGCCAGAGGTGCTT
GCCACCTATCACATCTTTTTCCAAAAGTCAAGATACCCCTATCCTGCCGTGCCAACCGCAGCCGAGCGGAC
AAGCAGCTGGCCTTGCGGCAGGGCGCTGTCATACCTGATATCGCCTCGCTCGACGAAGTGCCAAAAATCTTT
GAGGGTCTTGGACCGCAGGAGAAAACGCGCGGCAAACGCTCTGCAACAAGAAAACAGCGAAAAATGAAAGTCAC
TGTGGAGTGCTGGTGAACTTGAGGGTGACAACGCGCGCCTAGCCGTGCTGAAACGCAGCATCGAGGTCACC
CACTTTGCCTACCCGGCACTTAACCTACCCCCAAGGTTATGAGCACAGTCATGAGCGAGCTGATCGTGCGC
CGTGACGACCCCTGGAGAGGGATGCAAACCTTGCAAGAACAACCGAGGAGGGCCTACCCGCACTTGGCGAT
GAGCAGCTGGCGCGCTGGCTTGAGACGCGGAGCCTGCCGACTTGAGGAGCGACGCAAGCTAATGATGGCC
GCAGTGCTTGTACCGTGGAGCTTGAGTGCATGCAGCGGTTCTTTGCTGACCCGGAGATGCAGCGCAAGCTA
GAGGAAAACGTTGCACTACACCTTTCGCCAGGGCTACGTGCGCCAGGCCTGCAAAATTTCCAACGTGGAGCTC
TGCAACCTGGTCTCCTACCTTGGAAATTTGCACGAAAACCGCCTCGGGCAAAACGTGCTTCATTCCACGCTC
AAGGGCGAGGCGCGCCGCGACTACGTCCGCGACTGCGTTTACTTATTTCTGTGCTACACCTGGCAAACGGCC
ATGGGCGTGTGGCAGCAATGCCTGGAGGAGCGCAACCTAAAGGAGCTGCAGAAGCTGCTAAAGCAAACTTG
AAGGACCTATGGACGGCCTTCAACGAGCGCTCCGTGGCCGCGCACCTGGCGGACATTATCTTCCCCGAACGC
CTGCTTAAAACCTGCAACAGGGTCTGCCAGACTTACCAGTCAAAGCATGTTGCAAAACTTTAGGAACTTT

ATCCTAGAGCGTTCAGGAATTCTGCCGCCACCTGCTGTGCGCTTCCTAGCGACTTTGTGCCATTAAGTAC
CGTGAATGCCCTCCGCCGCTTTGGGGTCACTGCTACCTTCTGCAGCTAGCCTACTACCTTGCCTACCACTCC
GACATCATGGAAGACGTGAGCGGTGACGGCCTACTGGAGTGTCACTGTCGCTGCAACCTATGCACCCCGCAC
CGCTCCCTGGTCTGCAATTCGCAACTGCTTAGCGAAAGTCAAATTATCGGTACCTTTGAGCTGCAGGGTCCC
TCGCCTGACGAAAAGTCCGCCGCTCCGGGGTTGAACTCACTCCGGGGCTGTGGACGTCCGGCTTACCTTCGC
AAATTTGTACCTGAGGACTACCACGCCACGAGATTAGGTTCTACGAAGACCAATCCCGCCCGCAAATGCG
GAGCTTACCGCCTGCGTCATTACCCAGGGCCACATCCTTGGCCAATTGCAAGCCATCAACAAAGCCCGCAA
GAGTTTCTGCTACGAAAGGGACGGGGGGTTTACCTGGACCCCGAGTCCGGCGAGGAGCTCAACCCAATCCCC
CCGCCCGCGCAGCCCTATCAGCAGCCGCGGGCCCTTGCTTCCAGGATGGCACCCAAAAAGAAGCTGCAGCT
GCCGCCCGCCACCCACGGACGAGGAGGAATACTGGGACAGTCAGGCAGAGGAGGTTTTGGACGAGGAGGA
GGAGATGATGGAAGACTGGGACAGCCTAGACGAAGCTTCCGAGGCCGAAGAGGTGTCAGACGAAACACCGTC
ACCCTCGGTGCGATTCCCCTCGCCGGCGCCCCAGAAATTGGCAACCGTCCAGCATCGCTACAACCTCCGC
TCCTCAGGGCCCGCCGGCACTGCCTGTTCCGCCACCCAACCGTAGATGGGACACCACTGGAACCAGGGCCGG
TAAGTCTAAGCAGCCGCCCGCTTAGCCCAAGAGCAACAACAGCGCCAAGGCTACCGCTCGTGGCGGGGCA
CAAGAACGCCATAGTTGCTTGCTTGCAAGACTGTGGGGGCAACATCTCCTTCGCCCGCGCTTTCTTCTCTA
CCATCACGGCGTGGCCTTCCCCGTAACATCCTGCATTACTACCGTCATCTCTACAGCCCCTACTGCACCGG
CGGCAGCGGCAGCGGCAGCAACAGCAGCGGTCACACAGAAGCAAAGGCGACCGGATAGCAAGACTCTGACAA
AGCCCAAGAAATCCACAGCGCGGCAGCAGCAGGAGGAGGAGCGCTGCGTCTGGCGCCCAACGAACCCGTAT
CGACCCGCGAGCTTAGAAATAGGATTTTTCCCACTCTGTATGCTATATTTCAACAAAGCAGGGGCAAGAAC
AAGAGCTGAAAATAAAAAACAGGTCTCTGCGCTCCCTCACCCGAGCTGCCTGTATCACAAAAGCGAAGATC
AGCTTCGGCGCACGCTGGAAGACGCGGAGGCTCTCTCAGCAAATACTGCGCGTGACTCTTAAGGACTAGT
TTCGCGCCCTTTCTCAAATTTAAGCGCGAAAACACTACGTCATCTCCAGCGGCCACACCCGGCGCCAGCACCTG
TCGTCAGCGCCATTATGAGCAAGGAAATCCCACGCCCTACATGTGGAGTTACCAGCCACAAATGGGACTTG
CGGCTGGAGCTGCCCAAGACTACTCAACCCGAATAAACTACATGAGCGCGGGACCCACATGATATCCCGGG
TCAACGGAATCCGCGCCACCGAAACCGAATTCTCCTCGAACAGGCGGCTATTACCACCACACCTCGTAATA

ACCTTAATCCCCGTAGTTGGCCCGCTGCCCTGGTGTACCAGGAAAGTCCCGCTCCCACCCTGTGGTACTTC
CCAGAGACGCCAGGCCGAAGTTCAGATGACTAACTCAGGGGCGCAGCTTGCGGGCGGCTTTCGTCACAGGG
TGCGGTGCCCCGGCGTTTTAGGGCGGAGTAACTTGCATGTATTGGGAATTGTAGTTTTTTTTAAAATGGGAA
GTGACGTATCGTGGGAAAACGGAAGTGAAGATTTGAGGAAGTTGTGGGTTTTTTGGCTTTCGTTCTGGGCG
TAGGTTGCGGTGCGGTTTTCTGGGTGTTTTTTGTGGACTTAAACCGTTACGTCATTTTTTAGTCCTATATAT
ACTCGCTCTGTACTTGGCCTTTTTACACTGTGACTGATTGAGCTGGTGCCGTGTCGAGTGGTGTTTTTTAA
TAGGTTTTTTTACTGGTAAGGCTGACTGTTATGGCTGCCGCTGTGGAAGCGCTGTATGTTGTTCTGGAGCGG
GAGGGTGCTATTTTGCCTAGGCAGGAGGGTTTTTCAGGTGTTTATGTGTTTTTCTCTCCTATTAATTTTGT
ATACCTCCTATGGGGGCTGTAATGTTGTCTCTACGCCTGCGGGTATGTATCCCCCGGGCTATTCGGTCGC
TTTTTAGCACTGACCGATGTTAACCAACCTGATGTGTTTACCGAGTCTTACATTATGACTCCGGACATGACC
GAGGAACTGTCGGTGGTGCTTTTTAATCACGGTGACCAGTTTTTTTACGGTCACGCCGGCATGGCCGTAGTC
CGTCTTATGCTTATAAGGGTTGTTTTTCTGTTGTAAGACAGGCTTCTAATGTTTAAATGTTTTTTTTTTTG
TTATTTTATTTTGTGTTAATGCAGGAACCCGCAGACATGTTTGAGAGAAAAATGGTGTCTTTTTCTGTGGT
GGTCCGGAACTTACCTGCCTTTATCTGCATGAGCATGACTACGATGTGCTTGCTTTTTTGCGGGAGGCTTT
GCCTGATTTTTTGGAGCAGCACCTTGCATTTTATATCGCCGCCATGCAACAAGCTTACATAGGGGCTACGCT
GGTTAGCATAGCTCCGAGTATGCGTGTGATAATCAGTGTGGGTTCTTTTGTGATGGTTCCTGGCGGGGAAGT
GGCCGCGCTGGTCCGTGCAGACCTGCACGATTATGTTGAGTGGCCCTGCGAAGGGACCTACGGGATCGCGG
TATTTTTGTTAATGTTCCGCTTTTGAATCTTATACAGGTCTGTGAGGAACCTGAATTTTTGCAATCATGATT
CGCTGCTTGAGGCTGAAGGTGGAGGGCGCTCTGGAGCAGATTTTTACAATGGCCGGACTTAATATTCGGGAT
TTGCTTAGAGACATATTGATAAGGTGGCGAGATGAAAATTATTTGGGCATGGTTGAAGGTGCTGGAATGTTT
ATAGAGGAGATTCACCTGAAGGGTTTAGCCTTTACGTCCACTTGGACGTGAGGGCAGTTTGCCTTTTGGAA
GCCATTGTGCAACATCTTACAAATGCCATTATCTGTTCTTTGGCTGTAGAGTTTGACCACGCCACCGGAGGG
GAGCGGTTCACTTAATAGATCTTCATTTTGGGTTTTGGATAATCTTTTGGAAATAAAAAAAAAAAAAACATG
GTTCTTCCAGCTCTTCCCGCTCCTCCCGTGTGTGACTCGCAGAACGAATGTGTAGGTTGGCTGGGTGTGGCT
TATTCTGCGGTGGTGGATGTTATCAGGGCAGCGGCGCATGAAGGAGTTTACATAGAACCCGAAGCCAGGGGG

CGCCTGGATGCTTTGAGAGAGTGGATATACTACA ACTACTACACAGAGCGAGCTAAGCGACGAGACCGGAGA
CGCAGATCTGTTTGTACGCCCGCACCTGGTTTTGCTTCAGGAAATATGACTACGTCCGGCGTTCCATTTGG
CATGACACTACGACCAACACGATCTCGGTTGTCTCGGCGCACTCCGTACAGTAGGGATCGCCTACCTCCTTT
TGAGACAGAGACCCGCGCTACCATACTGGAGGATCATCCGCTGCTGCCCGAATGTAACACTTTGACAATGCA
CAACGTGAGTTACGTGCGAGGTCTTCCCTGCAGTGTGGGATTTACGCTGATTCAGGAATGGGTTGTTCCCTG
GGATATGGTTCTGACGCGGGAGGAGCTTGTAATCCTGAGGAAGTGTATGCACGTGTGCCTGTGTTGTGCCAA
CATTGATATCATGACGAGCATGATGATCCATGGTTACGAGTCTGGGCTCTCCACTGTCATTGTTCCAGTCC
CGGTTCCCTGCAGTGCATAGCCGGCGGGCAGGTTTTGGCCAGCTGGTTTAGGATGGTGGTGGATGGCGCCAT
GTTTAATCAGAGGTTTATATGGTACCGGGAGGTGGTGAATTACAACATGCCAAAAGAGGTAATGTTTATGTC
CAGCGTGTATGAGGGGTCGCCACTTAATCTACCTGCGCTTGTGGTATGATGGCCACGTGGGTTCTGTGGT
CCCCGCCATGAGCTTTGGATACAGCGCCTTGCACTGTGGGATTTTGAACAATATTGTGGTGTGTGCTGCAG
TTACTGTGCTGATTTAAGTGAGATCAGGGTGCCTGCTGTGCCCGGAGGACAAGGCGTCTCATGCTGCGGGC
GGTGCGAATCATCGCTGAGGAGACCACTGCCATGTTGTATTCTGCAGGACGGAGCGGGCGGGCAGCAGTT
TATTCGCGCGCTGCTGCAGCACCACCGCCCTATCTGATGCACGATTATGACTCTACCCCATGTAGGCGTG
GACTTCCCCTTCGCCGCCGTTGAGCAACCGCAAGTTGGACAGCAGCCTGTGGCTCAGCAGCTGGACAGCGA
CATGAACTTAAGCGAGCTGCCCGGGAGTTTATTAATATCACTGATGAGCGTTTGGCTCGACAGGAAACCGT
GTGGAATATAACACCTAAGAATATGTCTGTTACCCATGATATGATGCTTTTTAAGGCCAGCCGGGGAGAAAAG
GACTGTGTACTCTGTGTGTTGGGAGGGAGGTGGCAGGTTGAATACTAGGGTTCTGTGAGTTTGATTAAGGTA
CGGTGATCAATATAAGCTATGTGGTGGTGGGGCTATACTACTGAATGAAAAATGACTTGAAATTTTCTGCAA
TTGAAAAATAAACACGTTGAAACATAACATGCAACAGGTTACGATTCTTTATTCCTGGGCAATGTAGGAGA
AGGTGTAAGAGTTGGTAGCAAAAAGTTTCAGTGGTGTATTTCCACTTTCCAGGACCATGTAAAAGACATAG
AGTAAGTGCTTACCTCGCTAGTTTCTGTGGATTCACTAGAATCGATGTAGGATGTTGCCCTCCTGACGCGG
TAGGAGAAGGGGAGGGTGCCTGCATGTCTGCCGCTGCTCTTGCTCTTGCCGCTGCTGAGGAGGGGGCGCA
TCTGCCGAGCACC GGATGCATCTGGGAAAAGCAAAAAGGGGCTCGTCCCTGTTTCCGGAGGAATTTGCAA
GCGGGTCTTGCATGACGGGGAGGCAAACCCCGTTCCGCCAGTCCGGCCGGCCCGAGACTCGAACCGGGG

GTCCTGCGACTCAACCCTTGAAAATAACCCTCCGGCTACAGGGAGCGAGCCACTTAATGCTTTGCTTTCC
AGCCTAACCGCTTACGCCGCGCGGCCAGTGGCCAAAAAGCTAGCGCAGCAGCCGCCGCGCCTGGAAGGA
AGCCAAAAGGAGCGCTCCCCGTTGTCTGACGTGCGCACACCTGGGTTCGACACGGGGCGGTAACCGCATGG
ATCACGGCGGACGGCCGGATCCGGGGTTCGAACCCCGGTCGTCGCCATGATACCCTTGCGAATTTATCCAC
CAGACCACGGAAGAGTGCCCGTTACAGGCTCTCCTTTTGCACGGTCTAGAGCGTCAACGACTGCGCACGCC
TCACCGGCCAGAGCGTCCCGACCATGGAGCACTTTTTGCCGCTGCGCAACATCTGGAACCGCGTCCGCGACT
TTCCGCGCGCCTCCACCACCGCCCGGCATCACCTGGATGTCCAGGTACATCTACGGATTACGTGACGTT
TAAACCATATGATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCGACAGGACTATAA
AGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATAC
CTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGT
TAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGT
AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGA
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT
CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA
AGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT
CTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCA
GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGG
GAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTG
TCACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC

ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATA
CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA
CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCA
TCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGG
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGT
CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCGA
AAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTG
TTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCT
ATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCAC
TAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG
AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCA
CACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGATGGATCC (配列番号19)

構築又は入手した3種のプラスミド：pAAV-PLS、pAAV-RC及び
pHelperを、ProFectin Mammalian Transfection System (Promega) を用いたリン酸カルシウム法により、
 7×10^6 の293細胞（アデノウイルスE1遺伝子を安定して発現するHEK
293ヒト胚性腎細胞に由来する）(STRATAGENE 社 AAV Helper-Free System Cat#240071)へコトランスフェクトした。

インキュベーション（10%ウシ胎児血清を含む10mlのDMEM中、5%
炭酸ガスを含む37°C雰囲気中で培養）3日後、293細胞内で産生した低線量放
射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PLSを、4回の凍解サイクル（ドライ
アイスで冷やしたエタノール中で10分間凍らせた後、37°C湯浴で融解）により

回収し、続いて、10000gで10分間遠心分離して濃縮した。得られたrAAV-PLSのゲノム構造を図1に示す。rAAV-PLSの塩基配列を以下に示す。

```
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCAGGCGTCCGGGCGACCTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCG
GCCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCT
TTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTT
GGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCCAGGTAAACCTT
AGCCTGTTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGT
GTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTT
CAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACTTTTTTTTTTA
AAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGAGCTAGA
AGTTATAAAAAAATCTTTCCAAAAACAACAACAAAAGAATTATTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAA
AAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTC
TAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCCTCTGCTGGAC
ATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGT
GGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAG
GCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAAGAAG
CCTGTCTCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCT
GAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTCA
GATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAGCAAACCTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAA
GGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCT
GTCAGAAGAACCAGTAGACACTTCCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGA
GGGTTATTTGGCATTTTTGTCAATTTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGA
GGCAAAGTCTGTGTTCCAACATATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCT
```

GAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCA
AATCCTCCCCTTCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTCAAGTGAGTGTAGGGTG
TAGGGAGATTGGTTCAATGTCCAATTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTC
CAATTCCTCCTTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTC
CTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCT
CCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTG
GAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTT
TCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCCTGCCAGAGTGGGTGAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAAC
AGTGCTGTGCTCCTCCTGGAGAGTGCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGT
GGGAAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGC
GAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGC
CTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCCCGGGCGGCGGTTGGGCCGAGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGGGGGCC
CGGGCGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAG
TTCCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA
GGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATAC
GCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTC
GAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGC
AGTGAAAACCTCTTCAATTTCTTATGCCGGTGTGGGCGGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCG
AACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCC
AAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGAT
TCTAAAACGGATTACCAGGGATTTAGTTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCT
ACTGGTCTGCCTAAAGGTGTGCTCTGCCTCATAGAAGCTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATG
TTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTT

CTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAA
 AGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
 GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACT
 ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGTAAAGTTGTTCCATTTTTT
 GAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAAGTGTGTGTGAGA
 GGTCCATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
 CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCTGAAGTCTCTG
 ATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTC
 GACGCAGGTGTGCGAGGTCTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCAC
 GGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGC
 GGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGGTCTTACCGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAG
 ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGA
 GCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATT
 TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAAT
 TGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAA
 TGTGGTAAAAATCGATAAGGATCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT
 CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCGGGGCGCCCTCAGTGAGC
 GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 20)

当該塩基配列中、Left-ITRは以下の配列：

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTT

(配列番号 21)

で表される領域であり、

p21 遺伝子の 5' フランキング領域は以下の配列：

AAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC

CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGCCTTGGGCTGCCTGTTTTCAGGTGAGG
AAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTA
TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGGACAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG
GAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTTTCAGGGCAGAAGTCCCTCCCTAGA
GTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGGTACTTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCCCTGAGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT
TGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTTAAAAGCAAACCTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTGAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTCAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTFTTTGTCAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAGTCCCTGTGTTCCAAC
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACTCACTCGTCAAATCCTCCCCTTCCCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCTCCTTCCCGGAAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT

TTTTATAATTTATGAATTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTGAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGCTGTGTCCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA
ACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT
GCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCC
CGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGCGGGCGGTTGTATATCAG
GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
番号 22)

で表される領域であり、

ルシフェラーゼコード配列は以下の配列：

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAG
CAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG
GTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTG
AATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTA
TTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATT
TCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCA
ATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTCAGTCGATGTACACGTTGTC
ACATCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATT
GCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGC
GTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTT
GTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTCGAGTCGTCTTA
ATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGGCTGCTGGTG
CCAACCCATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAAACGATTTATCTAATTTACACGAAATT
GCTTCTGGTGGCGCTCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATC
AGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGC

GCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTT
 AATCAAAGAGGCCGAAGTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACC
 AACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTC
 TTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCC
 ATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCAGGTCTCCCGACGATGACGCCGGTGAAGTTC
 CCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGT
 CAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGTCTTACCGGA
 AAATCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

(配列番号 23)

で表される領域であり、

SV-40 由来ポリアデニル化シグナルは以下の配列：

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
 GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
 GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
 GTGGTA (配列番号 24)

で表される領域であり、

Right-ITR は以下の配列：

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
 AGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

(配列番号 25)

で表される領域である。したがって、rAAV-PLS は、(a) Left-ITR、(b) p53 標的遺伝子プロモーター配列、(c) 治療遺伝子配列、(d) ポリアデニル化シグナル配列、(e) Right-ITR、を 5' 末端側から 3' 末端側に向かって (a)、(d)、(c)、(b)、(e) の順で含む DNA 配列を含んでいた。

(実施例 2)

組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物

293細胞内で産生した低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PLSを、4回の凍解サイクルにより回収し、続いて、10000gで10分間遠心分離して濃縮した。得られた濃縮物は、低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PLS及び緩衝液を含んでいた。

(実施例 3)

組込型ウイルスベクターを用いた形質導入

(1) 形質導入

宿主細胞として、p53を発現するヒト乳癌細胞であるMCF-7細胞を使用した。

実施例2で作製した医薬組成物(ウイルス接種物)(5.5×10^8 個のrAAV-PLSウイルス粒子を含有)0.25mlと、 10^5 個のMCF-7細胞とを、12ウェルマイクロプレート中で混合し、24時間インキュベート(10%ウシ胎児血清を含む2mlのRPMI 1640中、5%炭酸ガスを含む37°C雰囲気中で培養)して、ウイルスベクターをMCF-7細胞に形質導入した(感染多重度: 5.5×10^3)。次いで、細胞をPBSで洗浄してウイルス接種物を除去し、10%FBS(JRH)、100ユニット/mlペニシリン及び100 μ g/mlストレプトマイシン(Life Technologies)を補充したRPMI 1640培地(Life Technologies)中、37°C、加湿雰囲気中の5%CO₂下で培養した。

(2) X線照射

形質導入後66日間培養したMCF-7細胞に、種々の線量(0.2Gy、0.5Gy、1Gy及び2Gy)のX線を照射した。X線は、0.5mm銅フィルタ

一及び0.5mmアルミニウムフィルターを備え、200kVp及び20mAで作動するPantakユニットから生成した。また、照射は、1.0Gy/分の線量率で行った。

(3) ルシフェラーゼ遺伝子発現の測定

形質導入したルシフェラーゼ遺伝子の発現を、MCF-7細胞中のルシフェラーゼによって生ずる発光量を指標として評価した。

X線照射6時間後のMCF-7細胞をPBSで洗浄し、次いで、Passive Lysis Buffer (Promega) で溶解した。細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性を、Luciferase Assay System (Promega) を用い、分析用照度計 (model LB9506; Berthold) により測定した。対照として、X線照射を除いてX線照射MCF-7細胞と同様の処理を行ったX線未照射MCF-7細胞を用いた。得られた測定値から、下記計算式に基づき、各照射線量におけるルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導率を算出した。

$$\text{誘導率} = \frac{\text{X線照射MCF-7細胞の発光量}}{\text{X線未照射MCF-7細胞の発光量}}$$

(比較例1)

非組込型プラスミドベクターを用いたトランスフェクション

(1) トランスフェクション

比較例として、本発明の組込型ウイルスベクターの作製過程で生じた非組込型プラスミドベクターであるプラスミドPLSを用いた。宿主細胞MCF-7へのトランスフェクションは、文献 (Nenoi M, Ichimura S, Mita K, Yukawa O, Cartwright IL. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. Cancer Res 2001; 61: 5885-5894) にしたがって、以下

の手順で行った。

5×10^6 個のMCF-7細胞を、FBSを含まないRPMI 1640培地で洗浄し、 $10 \mu\text{g}$ のプラスミドPLSと混合した。MCF-7細胞とプラスミドPLSとの混合物を、4mmの電極間隙を有するエレクトロポレーションキューベットへ移し、水中に5分間置いた後、 $960 \mu\text{F}$ のキャパシタンスを用いて220Vでパルスをかけた。水中で10分間インキュベートした後、FBSを含む48mlの予熱RPMI 1640中に均一に懸濁し、X線照射までインキュベート（10%ウシ胎児血清を含む2mlのRPMI 1640中、5%炭酸ガスを含む 37°C 雰囲気中で培養）した。

(2) X線照射

トランスフェクション後48時間培養したMCF-7細胞に、種々の線量（0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、3 Gy及び5 Gy）のX線を照射した。X線は、0.5mm銅フィルター及び0.5mmアルミニウムフィルターを備え、200kVp及び20mAで作動するPantakユニットから生成した。また、照射は、1.0 Gy/分の線量率で行った。

(3) ルシフェラーゼ遺伝子発現の測定

トランスフェクトしたルシフェラーゼ遺伝子の発現を、MCF-7細胞中のルシフェラーゼによって生ずる発光量を指標として評価した。

X線照射48時間後のMCF-7細胞をPBSで洗浄し、次いで、Passive Lysis Buffer (Promega) で溶解した。細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性を、Luciferase Assay System (Promega) を用い、分析用照度計 (model LB9506; Berthold) により測定した。対照として、X線照射を除いてX線照射MCF-7細胞と同様の処理を行ったX線未照射MCF-7細胞を用いた。得られた測定値から、下記計算式に基づき、各照射線量におけるルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導率を算出した。

誘導率 = X線照射MCF-7細胞の発光量 / X線未照射MCF-7細胞
の発光量

ルシフェラーゼ遺伝子発現の放射線誘導率における組込型ウイルスベクターと非
組込型プラスミドベクターとの比較

実施例3及び比較例1で得られたルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導率の線量依
存性を図2に示す。

比較例1の非組込型プラスミドベクターは、0.5 Gy、1 Gy、2 Gy、3
Gy及び5 GyのX線を照射したとき、それぞれ、非照射時の1.1倍（1
0%）、1.3倍（30%）、1.4倍（40%）及び1.5倍（50%）のルシ
フェラーゼ遺伝子発現誘導を示した（カッコ内の数値は非照射時の発現活性と比
較したときの上昇率を示す）。この結果は、非組込型プラスミドベクターは、低
線量放射線照射下で治療遺伝子発現を十分に誘導することができないことを示し
ている。

一方、本発明の組込型ウイルスベクター（アデノ随伴ウイルスベクター）は、
0.2 Gy、0.5 Gy、1 Gy及び2 GyのX線を照射したとき、それぞれ、
非照射時の1.3倍（30%）、1.7倍（70%）、2.1倍（110%）及び
3.1倍（210%）のルシフェラーゼ遺伝子発現誘導を示した（カッコ内の数
値は非照射時の発現活性と比較したときの上昇率を示す）。この結果は、本発明
の組込型ウイルスベクターは、低線量放射線照射下で治療遺伝子発現を高度に誘
導することができることを示している。

ここで、実施例3と比較例1とは、遺伝子導入後からX線を照射するまでの培
養期間において相違（実施例：形質導入後66日間；比較例：トランスフェクシ
ョン後48時間）している。しかしながら、（1）実施例3及び比較例1で用い
た導入遺伝子は細胞の通常の生理状態に影響すると考えられる因子を含んでいな

いこと、及び、(2) 遺伝子導入の操作から長時間が経過しており一過性の細胞変化は終息していることから、遺伝子導入後からX線を照射するまでの培養期間の相違は放射線誘導率に影響しないと考えられる。

この結果に関し、本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、本発明のウイルスベクターが低線量放射線誘導性を有するのは、低線量放射線照射により活性化されたp53による標的遺伝子の発現活性化が高次の染色体構造に依存した機構と関連するところ、本発明の組込型ウイルスベクターによりp53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列が宿主細胞の染色体に組み込まれた状態で存在しているためであると考えられる。

以上より、本発明の組込型ウイルスベクターは低線量放射線誘導性を有することが理解される。

(参考例)

rAAV-PLSを形質導入したMCF-7細胞における遺伝子導入状態

本発明の組込型ウイルスベクターが宿主染色体への遺伝子組み込みを起こすことができることを検証するために以下の2つの実験を行った。

(1) rAAV-PLS特異的プライマーを用いた形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAのサザンブロット分析

実施例3(1)の形質導入法にしたがい、実施例1で作製した組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PLSを、MCF-7細胞に形質導入した。

形質導入後66日間培養したMCF-7細胞から、DNAzol(Invitrogen)を使用してMCF-7細胞のゲノムDNAを単離した。単離したゲノムDNAを、以下の配列：

TCCTGGAGAGTGCCAACTCATTCTC (配列番号 26) 及び

TTCCAGGAACCAGGGCGTATCTCTTC (配列番号 27)

を有する 2 種の rAAV-PLS 特異的プライマー、LA Taq ポリメラーゼ (宝酒造) 及び GC バッファ (宝酒造) を用いて PCR 増幅 (反応条件: 95°C で 1 分、60°C で 30 秒、72°C で 1 分) した。結果を図 3 に示す。

図 3 は、rAAV-PLS を形質導入した MCF-7 細胞から単離したゲノム DNA を鋳型として 31 回以上の PCR サイクルに付した結果、rAAV-PLS の DNA 配列に特異的な生成物が明りようなバンドとして現れたことを示している。この結果より、rAAV-PLS を形質導入した MCF-7 細胞から単離したゲノム DNA 配列中に、当該 rAAV-PLS の一部に相当する配列が存在していることが理解される。

(2) 制限酵素を用いた形質導入 MCF-7 細胞ゲノム DNA のサザンブロット分析

本実験は、rAAV-PLS の DNA が MCF-7 細胞の染色体中へ実際に組み込まれていることを検証するために行った。

実施例 3 (1) の形質導入法にしたがい、実施例 1 で作製した組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクター rAAV-PLS を、MCF-7 細胞に形質導入した。

形質導入後 66 日間培養した MCF-7 細胞から、DNAzol (Invitrogen) を使用して MCF-7 細胞のゲノム DNA を単離した。単離したゲノム DNA を、3 種類の制限酵素: BglII、EcoRI 及び BamHI のいずれか 1 種で消化した。

ここで、BglII は、rAAV-PLS ゲノム中の p21 プロモーターの

5'末端付近だけでなく、MCF-7細胞が固有に有するMCF-7細胞ゲノムDNA中のp21プロモーターの5'末端付近の領域をも切断することができる制限酵素である。一方、EcoRI及びBamHIは、MCF-7細胞ゲノムDNAを切断することができるが、rAAV-PLSゲノムを切断することができない制限酵素である。

各種制限酵素を用いて得られたそれぞれの消化物を0.7%アガロースゲル中の電気泳動に付し、GeneScreenナイロンフィルターにプロットした。

フィルターと、rAAV-PLSのDNA配列の一部（ルシフェラーゼコード配列及びp21遺伝子プロモーター配列の一部）に相当する以下の配列：

```
AGTACTAGACACTTAGTAGGTAAGAAAATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGAGCTAGAAGTTATAAAAA  
AAATTCTTTCCAAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATA  
ATTCATTACAAGCCTTTATTAACAAAAATTTTCTCCCAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTG  
AAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCCTCTGCTGGACATTTGACAACC  
AGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCCCTGAG  
GCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGGT  
CTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCTCC  
CGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGA  
GATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATC  
CATCCTCTGCAATTTTTTAAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCA  
GGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTGAGAAGAAC  
CAGTAGACACTCCAGAATTGCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGG  
CATTGTTGTCATTTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCGGGCAGGAGGCAAAAGTCC  
TGTGTTCCAACACTATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTT  
TCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCAAATCCTCCCTT  
TCCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTG
```

GTTCAATGTCCAATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCTCC
TTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTCCTCATCTGTGA
AATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTC
TGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGA
GAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATT
GGGTAAATCCTTGCCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGCTGTGTC
CTCCTGGAGAGTGCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGAAATGTG
TCCAGCGCACCAACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGG
ACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCGG
GGAGGGCGGTCCCGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGCGGGCG
GTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTTGA
AGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCC
ATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCC
TGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACT (配列番号 2
8)

を有するプローブとをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションシグナル強度を、BAS2000 Bio-Imaging Analyzer (Fuji Film) により測定した。結果を図4に示す。

形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAをBglIIで消化したとき、>10 kbの位置及び5 kbの位置に2つのバンドが観察された。

>10 kbのバンドは、MCF-7細胞が固有に有するp21遺伝子プロモーター領域を含むフラグメントに対応するものであると考えられる。5 kbのバンドは、rAAV-PLSが縦列に連なった状態でMCF-7細胞ゲノムへ組み込まれ、各rAAV-PLSのDNA配列中に存在するp21プロモーター領域中のBglII制限部位における切断によって生成したフラグメントに対応するも

のであると考えられる。

形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAをEcoRIで消化したとき、>10 kbの位置にバンドが観察された。このバンドは、MCF-7細胞が固有に有するp21遺伝子プロモーター領域を含むフラグメントに対応するものであると考えられる。

形質導入MCF-7細胞ゲノムDNAをBamHIで消化したとき、>5 kbの位置にバンドが観察された。このバンドは、MCF-7細胞が固有に有するp21遺伝子プロモーター領域を含むフラグメントに対応するものであると考えられる。

MCF-7細胞へ導入されたrAAV-PLSのDNAがMCF-7細胞の染色体外に存在しているならば、rAAV-PLSゲノムを切断することができないEcoRI又はBamHIで消化したとき、無傷のrAAV-PLSのDNAに対応する同一の大きさのバンドが現れるはずである。しかしながら、そのようなバンドは観察されなかった。したがって、rAAV-PLSのDNAはMCF-7細胞の染色体中へ組み込まれていると考えられる。

rAAV-PLSのDNAの染色体への組み込み状態について、rAAV-PLSのDNAがMCF-7細胞染色体の特定の位置へ組み込まれるのであれば、EcoRI又はBamHIで消化した後、決まった長さの(rAAV-PLSのDNAを含む)DNAフラグメントが生成するので、サザンブロット分析では、このフラグメントに対応するバンドが現れるはずである。一方、rAAV-PLSのDNAがMCF-7細胞染色体へランダムに組み込まれるのであれば、EcoRI又はBamHIで消化した後、様々な(不定の)長さの(rAAV-PLSのDNAを含む)DNAフラグメントが生成するので、サザンブロット分析では、バンドとしては現れず、スミアになるはずである。前記の実験結果では、MCF-7細胞が固有に有するp21遺伝子プロモーター領域を含むフラグメント

に対応するバンドのみが観察された。したがって、rAAV-PLSのDNAは、MCF-7細胞染色体ヘランダムに組み込まれたと考えられる。

(実施例4)

組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクター

本実施例では、2型アデノ随伴ウイルスをベースとし、p53標的遺伝子プロモーター配列としてp21遺伝子プロモーター配列を有し、治療遺伝子配列としてヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子配列を有する低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PtkSを構築した。rAAV-PtkSは、AAV Helper Free System (Stratagene) を用いた三重トランスフェクション法 (Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J Virol 1998; 72: 2224-2232. 及び Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y, Colosi P. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. Gene Ther 1998; 5: 938-945.) により構築した。

はじめに、プラスミドpORF-HSVtk (InvivoGen) から、NcoIとNheIを用いて、HSV-tkコード配列を含む断片：

```
CCATGGCCTCGTACCCCGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGGTTCTCGCGCCATAGCA
ACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCGGAGCAGAAAATGCCCA
CGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCC
TGGGTTGCGCGGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGCTGGGGGCTTCCGAGA
CAATCGCGAACATCTACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGGCGGTGG
TAATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCGTTCTGGCTCCTCATATCG
```

GGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCG
 CCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGGTACCTTATGGGAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGG
 CCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTCCGGAGGACAGACACATCGACC
 GCCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTCCGCCGTTTACG
 GGCTACTTGCCAATACGGTGCAGTATCTGCAGTGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGG
 GGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGGCCCACGACCCCATATCGGGGACACGT
 TATTTACCCTGTTTCGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCT
 TGGACGTCTTGCCAAACGCCTCCGTTCCATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCT
 GCCGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGA
 CGATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAGAATTCGCTAGC (配列
 番号 29)

を切り出した。

一方、以下の配列：

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGACCTTTG
 GTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCG
 GCCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCAGGAACATGCTTGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCT
 TTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGCCTT
 GGGCTGCCTGTTTTAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAAACCTT
 AGCCTGTTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGT
 GTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTT
 CAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTA
 AAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTACTTAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 AGTTATAAAAAAATTTTCCAAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTATTGTGAAGCTCAGTACCACAA
 AAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTC
 TAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGAC

ATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGT
GGGGTCCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAG
GCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAG
CCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCT
GAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTATGTTGGGATTTCTGTTCA
GATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAA
GGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCT
GTCAGAAGAACCAGTAGACACTTCCAGAATTGTCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGA
GGGTTATTTGGCATTTTTGTCAATTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGA
GGCAAAAGTCTGTGTTCCAACCTATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCT
GAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCA
AATCTCCCCTCCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTG
TAGGGAGATTGGTCAATGTCCAATTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTC
CAATTCCTCCTTCCCAGCATGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTC
CTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCT
CCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTG
GAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTT
TCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCCCTGCCAGAGTGGGTGAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAAC
AGTGCTGTGTCTCCTGGAGAGTGCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGT
GGGGAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGGGCAGGGACTGGGGGAGGAGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGC
GAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCCTGGGCAGCCAGGAGC
CTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCCCAGGGCGCGGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCC
CGGGCGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAG
TTCCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA
GGCCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATAC

GCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTC
GAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGC
AGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCG
AACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCC
AAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGAT
TCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAAGTGCATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAAT
GAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCT
ACTGGTCTGCCTAAAGGTGTGCTCTGCCTCATAGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCT
ATTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATG
TTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTT
CTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTCGCCAAA
AGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAG
GAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACT
ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACGGGCGCGGTCCGTAAGTTGTTCCATTTTTT
GAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATAACGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGA
GGTCCTATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGG
CTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTG
ATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTC
GACGCAGGTGTGCGAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCCGCTTGTGTTTTGGAGCAC
GGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCCAGTCAAGTAACAACCGGAAAAAGTTGCGC
GGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAG
ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATCTAGAGTCGGGGCGCCGGCCGCTTCGA
GCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATT
TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAAT
TGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAA

TGTGGTAAAATCGATAAGGATCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT
CGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCGCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGC
GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
CACCGCATAAGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTA
CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCG
CCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCATCGCCCTGATAGACGGTTT
TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACC
CTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGA
TTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCCTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT
GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTAC
CGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA
TAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCT
AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGA
AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTG
CTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC
TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA
AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
TATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG

GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG
 GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
 AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCT
 AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
 ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
 AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGT
 GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT
 CTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGT
 GTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGT
 GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
 CCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTCC
 TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT (配列番号 30)

を有する pAAV-PLS から、NcoI と XbaI を用いて Left-ITR、
 p21 遺伝子の 5' フランキング領域、SV40 由来ポリアデニル化シグナル、
 Right-ITR を含む断片を切り出し、上記の HSV-tk コード配列を含
 む断片を連結した。これにより Left-ITR、p21 遺伝子の 5' フランキ
 ング領域、HSV-tk コード配列、SV40 由来ポリアデニル化シグナル、R
 ight-ITR がこの順で連結されて含まれる pAAV-PtkS を得た。
 pAAV-PtkS の塩基配列を以下に示す。

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCAGGCGTCGGGCGACCTTTG
 GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCG
 GCCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCT
 TTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTT

GGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCCAGGTAAACCTT
AGCCTGTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGT
GTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTT
CAGGGCAGAAGTCCCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTA
AAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTAATAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGAGCTAGA
AGTTATAAAAAAATTCTTTCCCAAAAACAACAACAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAA
AAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTC
TAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCCTCTGCTGGAC
ATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGT
GGGGTCCCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAG
GCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCACAGCAGAGGAGAAAAGAAG
CCTGTCTCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCT
GAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTCA
GATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAA
GGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCT
GTCAGAAGAACCAGTAGACACTTCCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGA
GGGTTATTTGGCATTTTTGTCAATTTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGA
GGCAAAAGTCCCTGTGTTCCAACATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCT
GAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACTCACTCGTCA
AATCCTCCCTTCCCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTCAGGTGAGTGTAGGGTG
TAGGGAGATTGGTTCAATGTCCAATTTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTC
CAATTCCTCCTTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGACCTCAATTC
CTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCT
CCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTG
GAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTT

TCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCCCTGCCAGAGTGGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAAC
AGTGCTGTGTCTCCTGGAGAGTGCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGT
GGGAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGC
GAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGC
CTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCCCGGGCGGCGGGTGGGCCGAGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCC
CGGGCGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAG
TTCCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGCCTCGTACCCCGGCCATCAACAC
GCGTCTGCGTTGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGGCCATAGCAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGG
CAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCC
CACGGGATGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTGCGCGACGATATCGTCTACGTA
CCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGCTTCCGAGACAATCGCGAACATCTACACCACACAACAC
CGCCTCGACCAGGTTGAGATATCGGCCGGGACCGGGCGGTGGTAATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGC
ATGCCTTATGCCGTGACCGACCGGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCG
CCCCGGCCCTCACCTCATCTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTAC
CTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCTGGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACC
AACATCGTGCTTGGGGCCCTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCGCGGTTTACGGGCTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTG
CAGTGCGGCGGGTCGTGGCGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAG
CCCCAGAGCAACGCGGGCCACGACCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGCCCCGAGTTG
CTGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGACGCTTTGGCCAAACGCCTCCGTTCC
ATGCACGTCTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCGCGGGCTGCCGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCC
GGGATGGTCCAGACCCACGTACCAACCCCCGGCTCCATACCGACGATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCC
CGGGAGATGGGGAGGCTAACTGAGAATTCGCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAA
GATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG
ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTA

TGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG
ATAAGGATCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACTGTC
AAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGG
CTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTA
TTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGC
CGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGC
ATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAA
ACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTA
GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAA
TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
TCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAAC
GCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG
TGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC
TGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
CGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGA
ACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT

GCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
 CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
 TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCT
 TTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
 GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCT
 ACCAGCGGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGC
 GCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCC
 TACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTT
 GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAG
 CTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
 AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGG
 GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
 CTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTG
 GCCTTTTGCTCACATGT (配列番号 3 1)

当該塩基配列中、L e f t - I T R は以下の配列：

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTG
 GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGTTCTT

(配列番号 3 2)

で表される領域であり、

p 2 1 遺伝子の 5' フランキング領域は以下の配列：

AAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC
 CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTTGGGCTGCCTGTTTTCAGGTGAGG
 AAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTA
 TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGGCAGAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG

GAGTCAGATTCTGTGTGACTTTTAAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTTCAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGA
GTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGGTACTIONAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGAGCTAGAAGTTATAAAAAAATTCTTTCCC
AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT
TGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTGAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTCTTGTGTCAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGAGGCAAAGTCTGTGTTCCAAC
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACTCACTCGTCAAATCCTCCCCTTCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCTCCTTCCCAGGAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT
TTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGTGTGCTCCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA

ACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT
 GCTGGAAC TCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCGGGGAGGGCGGTCC
 CGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCGGGCGGGCGGTGTATATCAG
 GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
 番号 3 3)

で表される領域であり、

H S V - t k コード配列は以下の配列 :

ATGGCCTCGTACCCCGGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGGTTCTCGCGGCCATAGCAAC
 CGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCGGAGCAGAAAATGCCACG
 CTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTG
 GGTTGCGCGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTCCGAGACA
 ATCGCGAACATCTACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGGCGGTGGTA
 ATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCGTTCTGGCTCCTCATATCGGG
 GGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCC
 CTCCTGTGCTACCCGGCCGCGGGTACCTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCC
 CTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTTCGGGAGGACAGACACATCGACCGC
 CTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCGCGGTTTACGGG
 CTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGG
 ACGGCCGTGCCGCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGGCCCACGACCCCATATCGGGGACACGTTA
 TTTACCCTGTTTCGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTG
 GACGTCTTGGCCAAACGCTCCGTTCCATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGC
 CGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACG
 ATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGA (配列番号 3 4)

で表される領域であり、

S V 4 0 由来ポリアデニル化シグナルは以下の配列 :

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
 GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
 GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
 GTGGTA (配列番号 35)

で表される領域であり、

Right-ITRは以下の配列:

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
 AGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

(配列番号 36)

で表される領域である。

ウイルス複製及びウイルス粒子形成に必要な遺伝子 (rep及びcap) を含むヘルパープラスミドとして、実施例1と同様のアデノ随伴ウイルス由来rep及びcap遺伝子をコードするpAAV-RC (STRATAGENE社 AAV Helper-Free System Cat#240071) を使用した。

アデノ随伴ウイルスベクター産生に必要なアデノウイルス遺伝子 (E2A、E4及びVA) を含むアデノウイルス遺伝子発現プラスミドとして、実施例1と同様のアデノウイルス由来VA、E2A及びE4遺伝子をコードするpHelper (STRATAGENE社 AAV Helper-Free System Cat#240071) を使用した。

構築又は入手した3種のプラスミド: pAAV-PtkS、pAAV-RC及びpHelperを、ProFection Mammalian Transfection System (Promega) を用いたリン酸カルシウム法により、 7×10^6 の293細胞 (アデノウイルスE1遺伝子を安定して発現するHEK293ヒト胚性腎細胞に由来する) (STRATAGENE社 AAV Helper-Free System Cat#240071) へコトランスフェクトした。

インキュベーション（10%ウシ胎児血清を含む10mlのDMEM中、5%炭酸ガスを含む37°C雰囲気中で培養）3日後、293細胞内で産生した低線量放射線誘導性ウイルスベクターrAAV-PtkSを、4回の凍解サイクル（ドライアイスで冷やしたエタノール中で10分間凍らせた後、37°C湯浴で融解）により回収し、続いて、10000gで10分間遠心分離して濃縮した。得られたrAAV-PtkSのゲノム構造を図5に示す。rAAV-PtkSの塩基配列を以下に示す。

```
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCAGGCGTCCGGCGACCTTTG
GTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCG
GCCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCT
TTCTGGCCGTCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCTT
GGGCTGCCTGTTTTTCAGGTGAGGAAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCCAGGTAAACCTT
AGCCTGTTACTCTGAACAGGGTATGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGT
GTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGGGAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAACAGCCTGCTCCCTTGCCTTTTT
CAGGGCAGAAGTCCTCCCTTAGAGTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTA
AAGCACTGAATAGTACTAGACACTTAGTAGGTAATAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGAGCTAGA
AGTTATAAAAAAATCTTTCCAAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAA
AAATTTAAATAATTCATTACAAGCCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTC
TAGTCTATTTGAAATGCCTGAAAGCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGAC
ATTTGACAACCAGCCCTTTGGATGGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGT
GGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGGCCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAG
GCCAAGGGGGTCTGCTACTGTGTCTCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAG
CCTGTCTCCCGAGGTCAGCTGCGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCT
GAGCAGCCTGAGATGTCAGTAATTGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTCA
GATGAACAATCCATCCTCTGCAATTTTTTAAAGCAAACCTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAA
```

GGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGGGGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCT
GTCAGAAGAACCAGTAGACTTCCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGA
GGGTTATTTGGCATTFTTTGTCAFTTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGGCAGGA
GGCAAAAGTCCTGTGTTCCAACATATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCT
GAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTGTATACGGGCTATGTGGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCA
AATCCTCCCCTTCCCTGGCCAACAAAGCTGCTGCAACCACAGGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGGTAGGGTG
TAGGGAGATTGGTCAATGTCCAATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTC
CAATCCCCTCCTCCCGGAAGCATGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTC
CTCATCTGTGAAATAAACGGGACTGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCT
CCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGACCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTG
GAAATTGCAGAGAGGTGCATCGTTTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTT
TCAGCTGCATTGGGTAAATCCTTGCCCTGCCAGAGTGGGTGAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAAC
AGTGCTGTGTCTCCTGGAGAGTGCCAACCTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGT
GGGGAAATGTGTCCAGCGCACCAACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGC
GAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCTGCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCCTGGGCAGCCAGGAGC
CTGGGCCCCGGGAGGGCGGTCCCCGGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGTCCCGCCTCCTGAGGGGGGCC
CGGGCGGGGCGGTTGTATATCAGGGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAG
TTCCTTGTGGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGCCTCGTACCCCGGCCATCAACAC
GCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGGCCATAGCAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGG
CAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCC
CACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTGCGCGGACGATATCGTCTACGTA
CCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGCTTCCGAGACAATCGGAACATCTACACCACACAACAC
CGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGACGCGCGGTGGTAATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGC
ATGCCATTATGCCGTGACCGACCGGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCG
CCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTAC

CTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACC
AACATCGTGCTTGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCCCGCGTTTACGGGCTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTG
CAGTGCGGGGGTTCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAG
CCCCAGAGCAACGCGGGCCACGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGGCCCCGAGTTG
CTGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGACGTCTTGGCCAAACGCCTCCGTTCC
ATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCC
GGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACGATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCC
CGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAGAATTCGCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAA
GATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG
ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTA
TGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG
ATAAGGATCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GCTGCCTGCAGG (配列番号 37)

当該塩基配列中、Left-ITRは以下の配列：

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT

(配列番号 38)

で表される領域であり、

p21 遺伝子の 5' フランキング領域は以下の配列：

AAGCTTCCCAGGAACATGCTTGGGCAGCAGGCTGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCGTCAGGAACATGTCC
CAACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCTGGTGGCTATTTTGTCCCTGGGCTGCCTGTTTTCAGGTGAGG
AAGGGGATGGTAGGAGACAGGAGACCTCTAAAGACCCAGGTAACCTTAGCCTGTTACTCTGAACAGGGTA
TGTGATCTGCCAGCAGATCCTTGCACAGGGCTGGGATCTGATGCATGTGTGCTTGTGTGAGTGTGTGCTGG

GAGTCAGATTCTGTGTGTGACTTTTAAACAGCCTGCTCCCTTGCCCTTTTTCAGGGCAGAAGTCTCCCTTAGA
GTGTGTCTGGGTACACATTCAAGTGCATGGTTGCAAACCTTTTTTTTTTAAAGCACTGAATAGTACTAGACAC
TTAGTAGGTACTIONAAGAAATATTGAATGTCGTGGTGGTGGTGGAGCTAGAAGTTATAAAAAAATTCTTTCCC
AAAAACAACAACAAAAAGAATTATTTTCATTGTGAAGCTCAGTACCACAAAAATTTAAATAATTCATTACAAG
CCTTTATTAATAAAAAATTTTCTCCCAAAGTAAACAGACAGACAATGTCTAGTCTATTTGAAATGCCTGAAA
GCAGAGGGGCTTCAAGGCAGTGGGAGAAGGTGCCTGTCTCTGCTGGACATTTGACAACCAGCCCTTTGGAT
GGTTTGGATGTATAGGAGCGAAGGTGCAGACAGCAGTGGGGCTTAGAGTGGGGTCTGAGGCTGTGCCGTGG
CCTTTCTGGGGTTTAGCCACAATCCTGGCCTGACTCCAGGGCGAGGCAGGCCAAGGGGTCTGCTACTGTGT
CCTCCCACCCCTACCTGGGCTCCCATCCCCACAGCAGAGGAGAAAGAAGCCTGTCTCCCCGAGGTCAGCTG
CGTTAGAGGAAGAAGACTGGGCATGTCTGGGCAGAGATTTCCAGACTCTGAGCAGCCTGAGATGTCAGTAAT
TGTAGCTGCTCCAAGCCTGGGTTCTGTTTTTTAGTGGGATTTCTGTTTCAGATGAACAATCCATCCTCTGCAA
TTTTTTAAAAGCAAACTGCAAATGTTTCAGGCACAGAAAGGAGGCAAAGGTGAAGTCCAGGGGAGGTCAGG
GGTGTGAGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATCACTCATTCTGTGTCTGTCAGAAGAACCAGTAGACACTT
CCAGAATTGTCCTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCTGCAAATGAGGGTTATTTGGCATTTTTGTGAT
TTTGGAGCCACAGAAATAAAGGATGACAAGCAGAGAGCCCCGGCAGGAGGCAAAGTCTGTGTTCCAAC
ATAGTCATTTCTTTGCTGCATGATCTGAGTTAGGTCACCAGACTTCTCTGAGCCCCAGTTTCCCAGCAGTG
TATACGGGCTATGTGGGAGTATTCAGGAGACAGACAACCTCACTCGTCAAATCCTCCCCTTCTGGCCAACA
AAGCTGCTGCAACCACAGGATTTCTTCTGTTTCAGGTGAGTGTAGGGTGTAGGGAGATTGGTTCAATGTCCA
ATTCTTCTGTTTCCCTGGAGATCAGGTTGCCCTTTTTTGGTAGTCTCTCCAATTCCTCCTTCCCAGGAGCA
TGTGACAATCAACAACCTTTGTATACTTAAGTTCAGTGGACCTCAATTTCTCATCTGTGAAATAAACGGGAC
TGAAAAATCATTCTGGCCTCAAGATGCTTTGTTGGGGTGTCTAGGTGCTCCAGGTGCTTCTGGGAGAGGTGA
CCTAGTGAGGGATCAGTGGGAATAGAGGTGATATTGTGGGGCTTTTCTGGAAATTGCAGAGAGGTGCATCGT
TTTTATAATTTATGAATTTTTATGTATTAATGTCATCCTCCTGATCTTTTTCAGCTGCATTGGGTAAATCCTT
GCCTGCCAGAGTGGGTCAGCGGTGAGCCAGAAAGGGGGCTCATTCTAACAGTGTGTCTCCTGGAGAGT
GCCAACTCATTCTCCAAGTAAAAAAGCCAGATTTGTGGCTCACTTCGTGGGGAAATGTGTCCAGCGCACCA

ACGCAGGCGAGGGACTGGGGGAGGAGGGAAGTGCCCTCCTGCAGCACGCGAGGTTCCGGGACCGGCTGGCCT
 GCTGGAACCTCGGCCAGGCTCAGCTGGCTCGGCGCTGGGCAGCCAGGAGCCTGGGCCCCGGGGAGGGCGGTCC
 CGGGCGGCGCGGTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGGCGGGCCCCGGGGGGGGTGTATATCAG
 GGCCGCGCTGAGCTGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCAGCTGCCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAAGCTT (配列
 番号 39)

で表される領域であり、

HSV-tkコード配列は以下の配列：

ATGGCCTCGTACCCCGGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGGGCCATAGCAAC
 CGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCGGAGCAGAAAATGCCACG
 CTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTG
 GGTTCGCGCGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTCCGAGACA
 ATCGCAACATCTACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGTTGAGATATCGGCCGGGGACGCGGCGGTGGTA
 ATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCGTTCTGGCTCCTCATATCGGG
 GGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCGCCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCC
 CTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACCTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCC
 CTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACCAACATCGTGTGTTGGGGCCCTCCGGAGGACAGACACATCGACCGC
 CTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCGCGGTTTACGGG
 CTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCGGCGGGTCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGG
 ACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGGCCCACGACCCCATATCGGGGACACGTTA
 TTTACCCTGTTTCGGGCCCCCCGAGTTGCTGGCCCCAACGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTG
 GACGTCTTGGCCAAACGCCTCCGTTCCATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCGGCTGC
 CGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCCGGCTCCATAACGACG
 ATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTCCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGA (配列番号 40)

で表される領域であり、

SV40由来ポリアデニル化シグナルは以下の配列：

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT
 GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT
 GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
 GTGGTA (配列番号 4 1)

で表される領域であり、

R i g h t - I T R は以下の配列：

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
 AGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

(配列番号 4 2)

で表される領域である。したがって、r A A V - P t k S は、(a) L e f t -
 I T R、(b) p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列、(c) 治療遺伝子配列 (H S
 V - t k 遺伝子)、(d) ポリアデニル化シグナル配列、(e) R i g h t - I T
 R、を 5' 末端側から 3' 末端側に向かって (a)、(d)、(c)、(b)、(e) の順
 で含む D N A 配列を含んでいた。

(実施例 5)

組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物

2 9 3 細胞内で産生した低線量放射線誘導性ウイルスベクター r A A V - P t
 k S を、4 回の凍解サイクルにより回収し、続いて、1 0 0 0 0 g で 1 0 分間遠
 心分離して濃縮した。得られた濃縮物は、低線量放射線誘導性ウイルスベクター
 r A A V - P t k S 及び緩衝液を含んでいた。

(実施例 6)

組込型ウイルスベクターを用いた形質導入

(1) 形質導入

宿主細胞として、p53を発現するヒト乳癌細胞であるMCF-7細胞を使用した。

実施例5で作製した医薬組成物（ウイルス接種物）（ 5.5×10^8 個のrAAV-PtkSウイルス粒子を含有）0.25mlと、 10^5 個のMCF-7細胞とを、12ウェルマイクロプレート中で混合し、24時間インキュベート（10%ウシ胎児血清を含む2mlのRPMI1640中、5%炭酸ガスを含む37°C雰囲気中で培養）して、ウイルスベクターをMCF-7細胞に形質導入した（感染多重度： 5.5×10^3 ）。次いで、細胞をPBSで洗浄してウイルス接種物を除去し、10%FBS（JRH）、100ユニット/mlペニシリン及び100 μ g/mlストレプトマイシン（Life Technologies）を補充したRPMI1640培地（Life Technologies）中、37°C、加湿雰囲気中の5%CO₂下で培養した。

（2）HSV-tk遺伝子のmRNA発現量を指標とした、X線照射によるHSV-tk遺伝子の発現誘導の評価

本実施例では、X線照射によるHSV-tk遺伝子の発現誘導を、HSV-tk遺伝子のmRNA発現量を指標としたRT-PCRにより評価した。

実施例6にしたがい形質導入後、約3ヶ月間培養（70～80日間の培養+培養後の凍結保存+溶解後の10～20日間の培養）したMCF-7細胞に、線量5GyのX線を照射した。5Gyという線量は、X線照射によるHSV-tk遺伝子発現量の変化を明瞭に観察するために採用した。X線は、0.5mm銅フィルター及び0.5mmアルミニウムフィルターを備え、200kVp及び20mAで作動するPantakユニットから生成した。また、照射は、約1Gy/分の線量率で行った。

X線を照射しなかった（0Gy）サンプルを対照とした。

X線照射後、形質導入MCF-7細胞のHSV-tk遺伝子及びアクチン遺伝子のmRNA発現量をRT-PCRにより測定した。アクチン遺伝子は、MCF-7細胞の内在性遺伝子であり、形質導入したHSV-tk遺伝子の対照として使用した。RT-PCRは、下記の手順に従って行った。

形質導入MCF-7細胞からTRIzol (Invitrogen) を用いて全RNAを単離した後、オリゴデックス-dT30 (日本ロシユ) を用いてpoly(A)⁺RNAを単離した。これを鋳型としてcDNA合成キット (Life Sciences, Inc.) を用いてcDNAを合成した。次にそのcDNAを鋳型としてHSV-tkコード配列あるいはアクチン遺伝子に特異的なPCRプライマー、LA Taqポリメラーゼ (宝酒造)、およびGCバッファー (宝酒造) を用いてPCR増幅 (反応条件: 95°C 1分、60°C 30秒、72°C 1分) を行った。

使用したPCRプライマーの配列は下記の通りである。

HSV-tk:

CGGAGCAGAAAATGCCACG (配列番号43)

TGCTGCCATAAGGTACCGC (配列番号44)

アクチン:

GTAGCCATCCAGGCTGTGTT (配列番号45)

CAGTGAGGCCAGGATAGAGC (配列番号46)

上述の手順に従った実験を2回行った。結果を図6に示す。図6中、1回目の試験結果を(A) PtkS-1として示し、2回目の試験結果を(B) PtkS-2として示す。

図6(A)及び(B)において、HSV-tk遺伝子についての26~29の数字及びアクチン遺伝子についての18~21の数字は、それぞれRT-PCRのサイクル数を示す。

HSV-tk遺伝子について行ったRT-PCRのサイクル数(26~29)が、アクチン遺伝子について行ったRT-PCRのサイクル数(18~21)よりも多かったのは、外来性遺伝子であるHSV-tk遺伝子の発現量が内在性遺伝子であるアクチン遺伝子の発現量(mRNA量)と比較して非常に少なかったため、X線照射によるHSV-tk遺伝子発現誘導の評価を行うためにより多くのサイクル数を必要としたからである。

図6(A)においては、X線照射によっては発現量が増加しないことが知られているアクチン遺伝子と比較して、HSV-tk遺伝子では、X線照射による発現量の増加が認められた。

図6(B)も図6(A)と同様の傾向を示した。したがって、X線照射によるHSV-tk遺伝子発現量の増加について再現性のある結果が得られた。

これらの結果は、本発明のベクターrAAV-PtkSによりHSV-tk遺伝子を形質導入したMCF-7細胞において、当該細胞内におけるHSV-tk遺伝子の発現が、X線照射により誘導されたことを示している。

(3) 形質導入細胞の生残率を指標とした、低線量X線照射によるHSV-tk遺伝子の発現誘導の評価

形質導入したHSV-tk遺伝子の発現産物であるヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)は、ガンシクロビルを活性化してDNA合成阻害作用を発揮させて、形質導入細胞を死滅させることができる。そこで、本実施例では、低線量X線照射によるHSV-tk遺伝子の発現誘導を、ガンシクロビル存在下の形質導入細胞へ低線量X線を照射したときの生残率を指標として評価した。

サンプルとして、実施例6にしたがい形質導入後、約3ヶ月間培養(70~80日間の培養+培養後の凍結保存+溶解後の10~20日間の培養)したHSV

— t k 遺伝子導入 MCF-7 細胞サンプル 2 つ (PtkS-1 及び PtkS-2) 並びに実施例 3 にしたがひ形質導入後、約 3 ヶ月間培養 (66 日間の培養 + 培養後の凍結保存 + 溶解後の 10 ~ 20 日間の培養) したルシフェラーゼ遺伝子導入 MCF-7 細胞サンプル (PLS) を用いた。

各細胞サンプルへ、1 mg/ml のガンシクロビル (InvivoGen) 存在下、1 Gy の低線量 X 線を 1 日 2 回 (但し、ガンシクロビル投与日は 1 日 1 回照射)、計 5 日間 (合計 9 Gy) 照射した。X 線は、0.5 mm 銅フィルター及び 0.5 mm アルミニウムフィルターを備え、200 kVp 及び 20 mA で作動する Pantak ユニットから生成した。また、照射は、約 1 Gy/分の線量率で行った。対照として、各細胞サンプルへ、ガンシクロビル非存在下で前記と同様の X 線照射を行った。

X 線照射 2 日後、Promega 社のキット「CellTiter96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay」を用いた MTT 法により生細胞の数を測定した。結果を図 7 に示す。図 7 の縦軸は、ガンシクロビル非存在下での生細胞数に対するガンシクロビル存在下での生細胞数の比 (相対細胞数) を示す。

2 つの HSV-tk 遺伝子導入細胞サンプル (PtkS-1 及び PtkS-2) は、ガンシクロビル存在下での低線量 X 線照射により生細胞数の有意な低下を示した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子導入細胞サンプル (PLS) は、生細胞数の低下を示さなかった。この結果は、本発明のベクター rAAV-PtkS により HSV-tk 遺伝子を形質導入した MCF-7 細胞 (ヒト乳癌細胞) へ、ガンシクロビルの存在下、低線量 X 線を照射したときに、当該細胞内で HSV-tk 遺伝子の発現が誘導されて HSV-tk が産生し、この産生した HSV-tk によってガンシクロビルが細胞毒性 (DNA 合成阻害作用) を発揮し、その結果、MCF-7 細胞細胞が死滅したことを示していると考えられる。

以上より、本発明の組込型ウイルスベクターは、宿主へ導入されたときに、低

線量放射線の照射により治療効果を発揮できることが理解される。

産業上の利用可能性

上述する実施例で示されるように、本発明の組込型ウイルスベクターは、低線量放射線の照射によって宿主細胞における治療遺伝子発現を高度に誘導することを可能にする。したがって、本発明は、遺伝子治療に利用可能である。

請求の範囲

1. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターであって、

p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列を含むことを特徴とするベクター。

2. (a) Left-ITR、

(b) p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列、

(c) 治療遺伝子配列、

(d) ポリアデニル化シグナル配列、

(e) Right-ITR、

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(b)、(c)、(d)、(e)の順で含むDNA配列を含む、請求項1に記載のベクター。

3. (a) Left-ITR、

(d) ポリアデニル化シグナル配列の相補的配列、

(c) 治療遺伝子配列の相補的配列、

(b) p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列の相補的配列、

(e) Right-ITR

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含むDNA配列を含む、請求項1に記載のベクター。

4. アデノ随伴ウイルスに由来するベクターである、請求項1～3のいずれかに記載のベクター。

5. p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列がp 2 1 遺伝子プロモーター配列である、請求項1～4のいずれかに記載のベクター。

6. 治療遺伝子配列として、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ (HSV-

- t k) 遺伝子配列を有する、請求項 1～5 のいずれかにより記載のベクター。
7. 遺伝子治療用ベクターである、請求項 1～6 のいずれかにより記載のウイルスベクター。
8. 遺伝子治療により治療可能な疾患を治療するための医薬組成物であって、請求項 1～7 のいずれかにより記載の組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含むことを特徴とする遺伝子治療用医薬組成物。
9. 遺伝子治療により治療可能な疾患が癌である、請求項 8 に記載の医薬組成物。
10. 遺伝子治療により治療可能な疾患の遺伝子治療方法であって、下記の工程：
- (1) p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含む DNA 配列を含む組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程
 - (2) 該医薬組成物を、遺伝子治療により治療可能な疾患を有する患者へ投与する工程、及び
 - (3) 該患者の治療遺伝子の発現が必要とされる部位に、該患者の染色体に組み込まれたベクターの DNA 配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程
- を含むことを特徴とする方法。
11. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、
- (a) Left-ITR、
 - (b) p 5 3 標的遺伝子プロモーター配列、
 - (c) 治療遺伝子配列、
 - (d) ポリアデニル化シグナル配列、
 - (e) Right-ITR、
- を 5' 末端側から 3' 末端側に向かって (a)、(d)、(c)、(b)、(e) の順で

含むDNA配列を含む、請求項10に記載の方法。

12. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、

- (a) Left-ITR、
- (d) ポリアデニル化シグナル配列の相補的配列、
- (c) 治療遺伝子配列の相補的配列、
- (b) p53標的遺伝子プロモーター配列の相補的配列、
- (e) Right-ITR

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含むDNA配列を含む、請求項10に記載の方法。

13. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、治療遺伝子配列として、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子配列を有する、請求項10~12のいずれかに記載の方法。

14. 癌の遺伝子治療方法であって、下記の工程：

(1) p53標的遺伝子プロモーター配列及び治療遺伝子配列を含むDNA配列を含む組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する工程

(2) 該医薬組成物を、癌患者へ投与する工程、

(3) 該患者の癌病巣部位に、該患者の染色体に組み込まれたベクターのDNA配列を発現させるのに十分な線量の放射線を照射する工程、及び

(4) 該治療遺伝子が発現している部位に、癌を治療するのに十分な線量の放射線を照射する工程

を含むことを特徴とする方法。

15. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、

- (a) Left-ITR、
- (b) p53標的遺伝子プロモーター配列、

- (c) 治療遺伝子配列、
- (d) ポリアデニル化シグナル配列、
- (e) Right-ITR、

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含むDNA配列を含む、請求項14に記載の方法。

16. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、

- (a) Left-ITR、
- (d) ポリアデニル化シグナル配列の相補的配列、
- (c) 治療遺伝子配列の相補的配列、
- (b) p53標的遺伝子プロモーター配列の相補的配列、
- (e) Right-ITR

を5'末端側から3'末端側に向かって(a)、(d)、(c)、(b)、(e)の順で含むDNA配列を含む、請求項14に記載の方法。

17. 組込型の低線量放射線誘導性ウイルスベクターが、治療遺伝子配列として、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子配列を有する、請求項14~16のいずれかに記載の方法。

FIG. 1

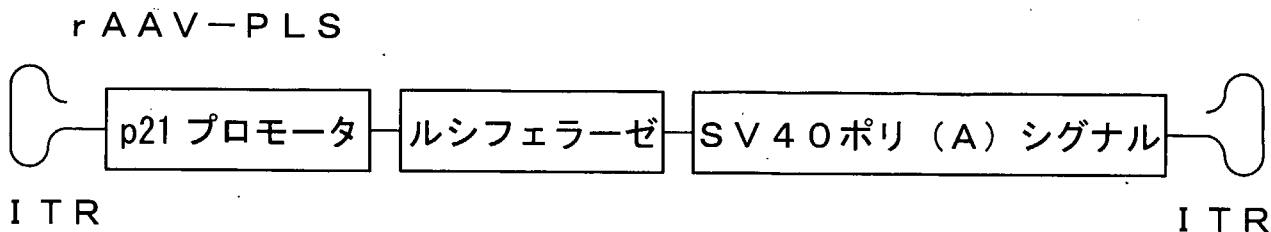


FIG. 2

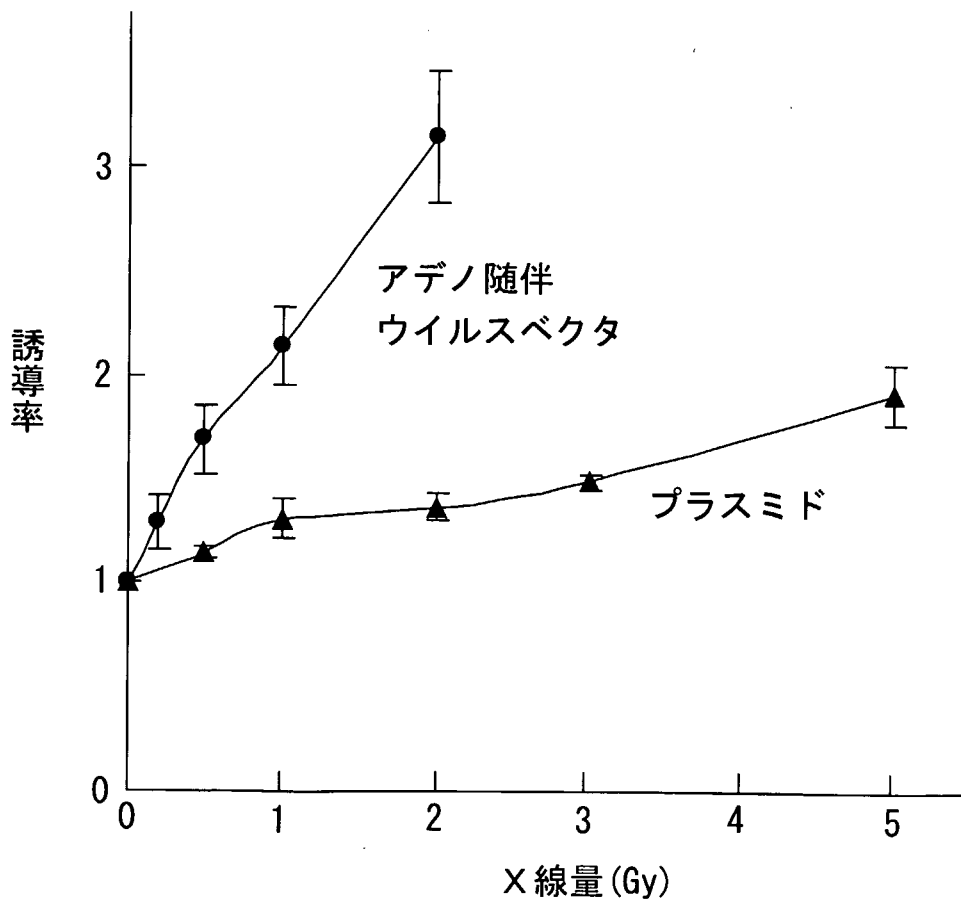


FIG. 3

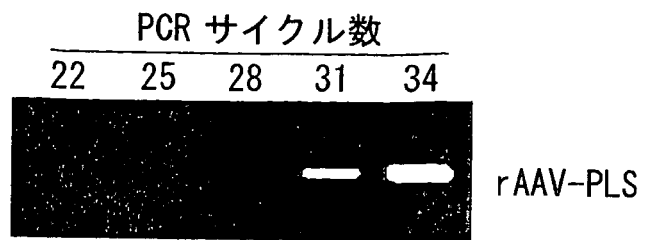


FIG. 4

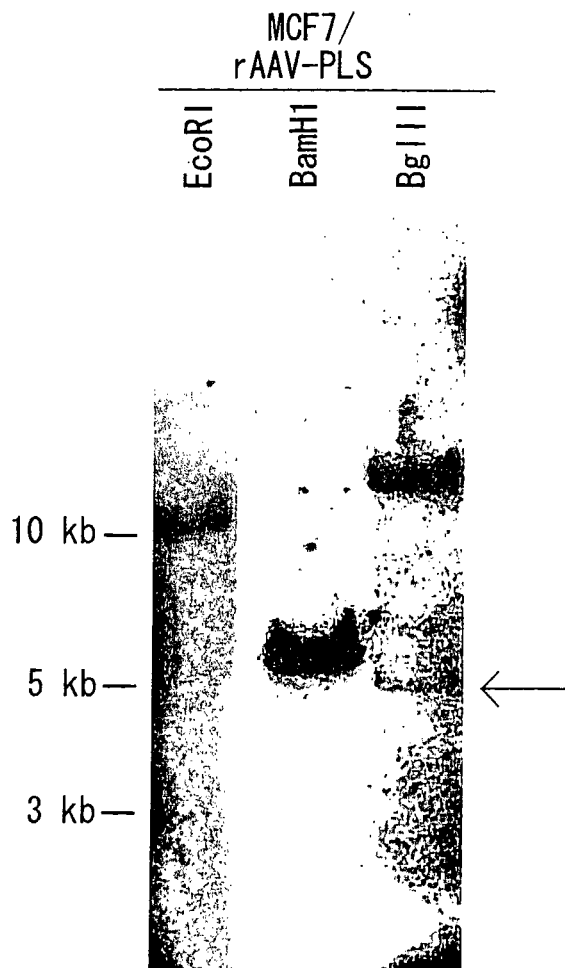


FIG. 5

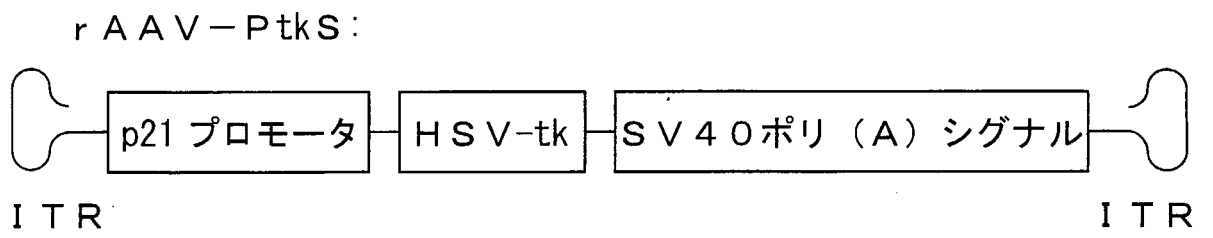
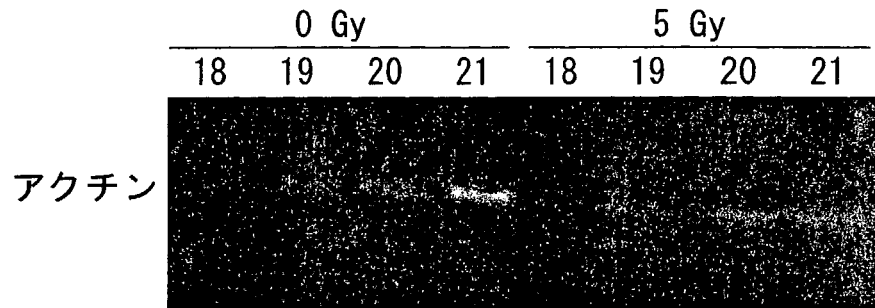
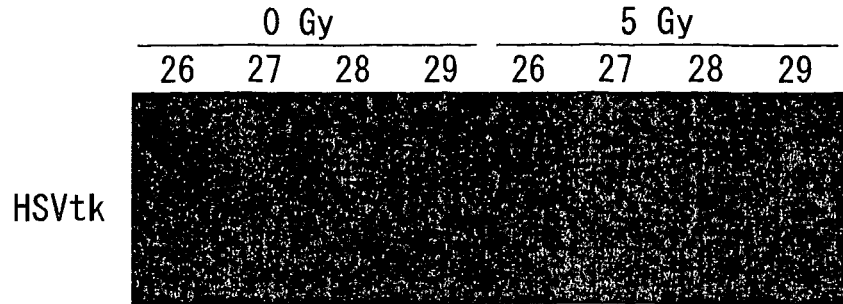


FIG. 6

(A) PtkS-1



(B) PtkS-2

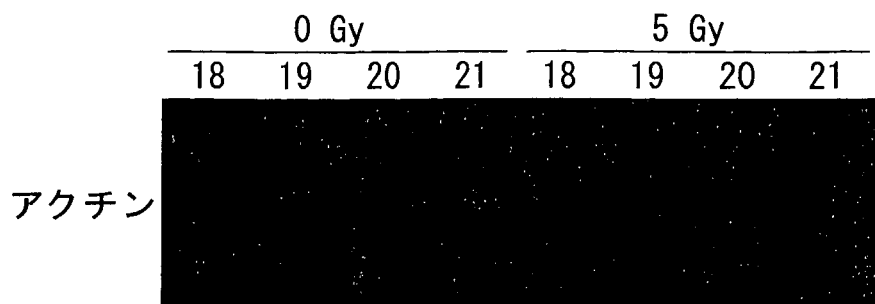
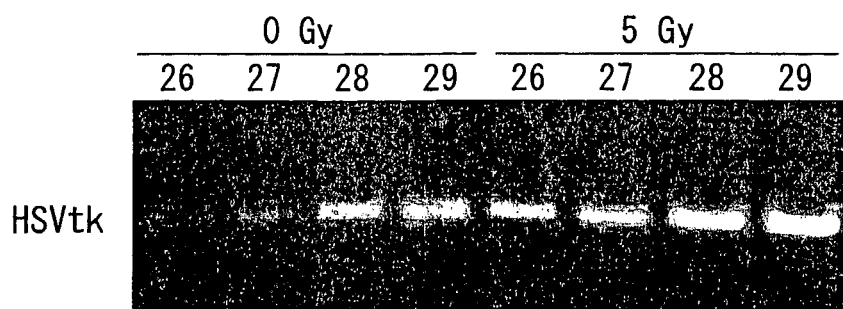
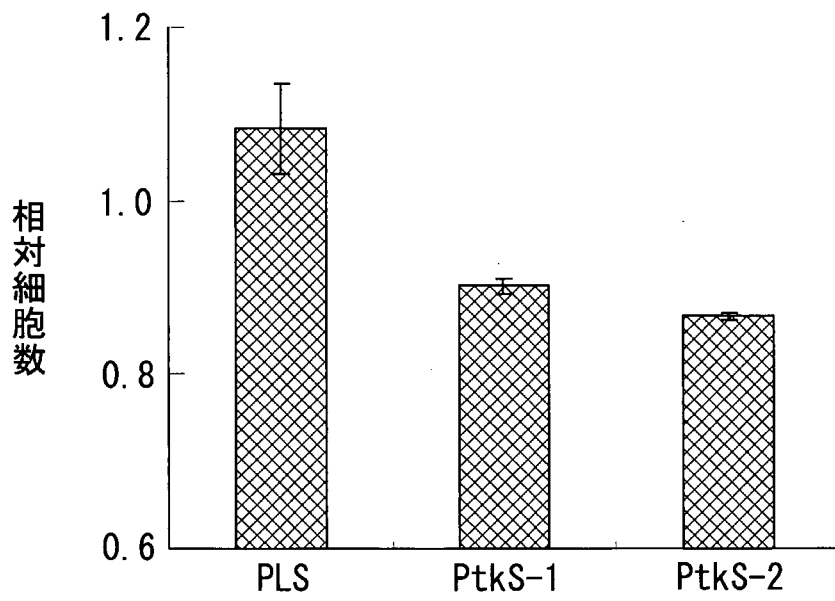


FIG. 7



SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Radiological Sciences

<120> A low-dose radiation-inducible integration vector

<130> Y1M-0415

<150> JP 2004-305870

<151> 2004-10-20

<160> 46

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Activated p53 recognition sequence in p53-target gene promoter

<400> 1

rrrcwwgyyy

10

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> p53-target gene promoter

<400> 2

gaacatgtcc caacatgttg 20

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> p53-target gene promoter

<400> 3

gggcatgtct 10

<210> 4

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Left-ITR

<400> 4

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgetca ctgaggccgc cgggcaaag cccgggcgct 60

gggcgacctt tggcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 5

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Right-ITR

<400> 5

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccggcgacc aaaggtgcc cgacgcccg gctttgccg ggccgctca gtgagcagc 120

gagcgcag ctgcctgag g 141

<210> 6

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Polyadenylated sequence

<400> 6

aataaa 6

<210> 7

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene

<400> 7

aagcttccca ggaacatgt tgggcagcag gctgtggctc tgattgctt tctggcgc 60

aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctggtgctt atttgtcct 120

tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atggtaggag acaggagacc tctaaagacc 180
ccaggtaaac cttagcctgt tactctgaac agggatgtg atctgccage agatccttgc 240
gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgtgtgagtg tgtgctggga gtcagattct 300
gtgtgtgact ttaacagcc tgctccctg ctttttcag ggcagaagtc ctcccttaga 360
gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt ttttttttaa agcactgaat 420
agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 480
aagttataaa aaaaattctt tcccataaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540
ctcagtacca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaaaaaa aattttctcc 600
ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660
caaggcagtg ggagaagggt cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720
ggtttggatg tataggagcg aagggtcaga cagcagtggg gcttagagtg gggctcctgag 780
gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840
ggccaagggg gtctgctact gtgtcctccc accctacct ggctcccat ccccacagca 900
gaggagaaag aagcctgtcc tccccgaggt cagctgcgtt agaggaagaa gactgggcat 960
gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtctc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080
tttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 1140
ggggaggtca ggggtgtgag gtagatggga gcggatagac acatcactca tttctgtgtc 1200

tgtcagaaga accagtagac acttccagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga ctctctgag cccagtttc cccagcagtg 1440
tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500
tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggattttctt tgttcaggtg agtgtagggt 1560
gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
ttgtagtct ctccaattcc ctcttcccg gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
cttaagttca gtggacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
ctggcctcaa gatgctttgt tggggtgtct aggtgctcca ggtgcttctg ggagaggtga 1800
cctagtgagg gatcagtggg aatagagggt atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
gaggtgcatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgtcatcc tctgatctt 1920
ttcagctgca ttgggtaaat ccttgctgc cagagtgggt cagcggtag ccagaaaggg 1980
ggctcattct aacagtgtg tgctctctg gagagtgcca actcattctc caagtaaaaa 2040
aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca ggcaccaac gcaggcgagg 2100
gactggggga ggagggaagt gccctcctgc agcacgag gttccgggac cggtggcct 2160
gctggaactc ggccaggctc agctggctcg gcctgggca gccaggagcc tgggccccgg 2220
ggagggcggg cccgggcggc gcggtgggcc gagcgcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280

ccggcgggg cggttgata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340

ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 8

<211> 7181

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid PLS

<400> 8

ggtaccgagc tcttacgcgt gctagcccgg gctcgagatc tgcgatctaa gtaagcttcc 60

caggaacatg cttgggcagc aggctgtggc tctgattggc tttctggccg tcaggaacat 120

gtccaacat gttgagctct ggcatagaag aggctggtgg ctatcttctc cttgggctgc 180

ctgttttcag gtgaggaagg gtaggtagg agacaggaga cctctaaaga ccccaggtaa 240

accttagcct gttactctga acagggtatg tgatctgcca gcagatcctt gcgacagggc 300

tgggatctga tgcattgtgt cttgtgtgag tgtgtgctgg gagtcagatt ctgtgtgtga 360

ctttaacag cctgctcctt tgcctttttc agggcagaag tcctccctta gtagtgtctt 420

gggtacacat tcaagtgcgt ggttgcaaac tttttttttt aaagcactga atagtactag 480

acacttagta ggtacttaag aatattgaa tgcctgtgtg gtggtgagct agaagttata 540

aaaaaaattc tttcccaaaa acaacaacaa aaagaattat ttcattgtga agctcagtac 600

cacaaaaatt taaataattc attacaagcc tttattaaaa aaaattttct ccccaaagta 660

aacagacaga caatgtctag tctattttaa atgcctgaaa gcagaggggc ttcaaggcag 720

tgggagaagg tgcctgtcct ctgctggaca ttgacaacc agccctttgg atggtttgga 780

tgtataggag cgaaggtgca gacagcagtg gggcttagag tggggtcctg aggctgtgcc 840

gtggcctttc tggggtttag ccacaatcct ggctgactc cagggcgagg caggccaagg 900

gggtctgcta ctgtgtcctc ccaccctac ctgggtccc atccccacag cagaggagaa 960

agaagcctgt cctccccgag gtcagctgcg ttagaggaag aagactgggc atgtctgggc 1020

agagatttcc agactctgag cagcctgaga tgcagtaat ttagctgct ccaagcctgg 1080

gttctgtttt ttagtgggat ttctgttcag atgaacaatc catcctctgc aattttttaa 1140

aagcaaaact gcaaatgttt caggcacaga aaggaggcaa aggtgaagtc caggggaggt 1200

caggggtgtg aggtagatgg gagcggatag acacatcact catttctgtg tctgtcagaa 1260

gaaccagtag acacttccag aattgtcctt tatttatgtc atctccataa accatctgca 1320

aatgagggtt atttggcatt tttgtcattt tggagccaca gaaataaagg atgacaagca 1380

gagagccccg ggcaggaggc aaaagtcctg tgttccaact atagtcattt ctttctgca 1440

tgatctgagt taggtcacca gacttctctg agccccagtt tccccagcag tgtatacggg 1500

ctatgtgggg agtattcagg agacagacaa ctcaactgctc aaatcctccc cttctggcc 1560

aacaaagctg ctgcaaccac agggatttct tctgttcagg tgagtgtagg gtgtaggag 1620

attggttcaa tgtccaatc ttctgtttcc ctggagatca ggttgccctt ttttgtagt 1680

cttccaatt cctccttcc cggaagcatg tgacaatcaa caactttgta tacttaagtt 1740

cagtggacct caatttcctc atctgtgaaa taaacgggac tgaaaaatca ttctggcctc 1800
aagatgcttt gttgggtgt ctaggtgctc caggtgcttc tgggagaggt gacctagtga 1860
gggatcagtg ggaatagagg tgatattgtg gggcttttct gaaattgca gagaggtgca 1920
tcgtttttat aatttatgaa tttttatgta ttaatgcat cctcctgac ttttcagctg 1980
cattgggtaa atccttgctt gccagagtgg gtcagcggg agccagaaag ggggctcatt 2040
ctaacagtgc tgtgtcctcc tggagagtgc caactcattc tccaagtaa aaaagccaga 2100
tttgggctc acttcgtggg gaaatgtgtc cagcgcacca acgcaggcga gggactgggg 2160
gaggaggaa gtccctcct gcagcacgcg aggttcggg accggctggc ctgctggaac 2220
tcggccaggc tcagctggct cggcgtggg cagccaggag cctgggccc gggaggcgc 2280
gtcccggcg gcgcgtggg ccgagcgcg gtcccctc cttgaggcg gcccgggcg 2340
ggcggttga taccaggcc gcgctgagc gcgccagct aggtgtgagc agctgccga 2400
gtcagttcct tgtggaagct tggcattccg gtactgttg taaagccacc atggaagacg 2460
ccaaaaacat aaagaaaggc ccgcgccat tctatccgt ggaagatgga accgctggag 2520
agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt gcttttacag 2580
atgcacatat cgaggtggac atcacttacg ctgagtactt cgaatgtcc gttcgttg 2640
cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caatcacag aatcgtcgta tgcagtgaaa 2700
actctctca attctttatg ccggtgttg gcgcgttatt tatcggagtt gcagttgcg 2760
ccggaacga catttataat gaactgaaat tgctcaacag tatgggcatt tcgcagccta 2820

ccgtgggtgtt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatfff gaacgtgcaa aaaaagctcc 2880
caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga tttcagtcga 2940
tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc cggttttta tgaatacga tttgtgccag 3000
agtccttcga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctctctgga tctactggtc 3060
tgcctaaagg tgcgctctg cctcatagaa ctgcctgcgt gagattctcg catgccagag 3120
atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg aactgcgat ttttaagtgtt gttccattcc 3180
atcacggfff tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt cgagtcgtct 3240
taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac aagattcaaa 3300
gtgcgctgct ggtgccaacc ctattctcct tcttcgcaa aagcactctg attgacaaat 3360
acgattatc taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct aaggaagtcg 3420
gggaagcgggt tgccaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat gggctcactg 3480
agactacatc agctattctg attacaccg aggggatga taaaccgggc gggctcggtg 3540
aagttgttcc atfffftgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa acgctggcgc 3600
ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcctatgat tatgtccggt tatgtaaaca 3660
atccggaagc gaccaacgce ttgattgaca aggatggatg gctacattct ggagacatag 3720
cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct ctgattaagt 3780
acaaaggcta tcaggtgget cccgctgaat tggaatccat cttgctcaa caccccaaca 3840
tcttcgacgc aggtgtcga ggtcttccc acgatgacgc cggatgaactt cccgcccgc 3900

ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat tacgtcgcca 3960
gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gtttgtggac gaagtaccga 4020
aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata aaggccaaga 4080
agggcggaag gatcgccgtg taattctaga gtcggggcgg ccggccgctt cgagcagaca 4140
tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct 4200
ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgaac cattataagc tgcaataaac 4260
aagtaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg 4320
tttttaag caagtaaac ctctacaaat gtgtaaaat cgataaggat ccgtcgaccg 4380
atgcccttga gagccttcaa ccagtcagc tccttcoggt gggcgcgggg catgactatc 4440
gtcgcgcac ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg 4500
ctcttcogct tcctcgctca ctgactcgtc gcgctcgctc gttcggctgc ggcgagcggc 4560
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 4620
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctgc 4680
gtttttccat aggctccgc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 4740
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctcctcgt 4800
gcgctctct gttccgacc tgccgcttac cggatactg tccgccttc tccctcggg 4860
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 4920
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgag ccttatccgg 4980

taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 5040
tgtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggg 5100
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 5160
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg 5220
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5280
ttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5340
ggcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt 5400
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5460
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgctt gactcccgtt 5520
cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 5580
gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5640
cgagcgcaga agtggctctg caactttatc gcctccatc cagtctatta attggtgccg 5700
ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 5760
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 5820
atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 5880
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 5940
gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 6000
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 6060

acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcacattg gaaaacgttc 6120
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 6180
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6240
aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact 6300
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gttattgtc tcatgagcgg 6360
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6420
aaaagtgcc aactgacgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtgttac 6480
ggcagcgtg accgctacac ttgccagcgc ctagcgcgcc gctcctttcg ctttcttccc 6540
ttcctttctc gccacgttcg ccggtttcc cgtcaagct ctaaactcggg ggctcccttt 6600
agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggatgatg 6660
ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac gttttttcgc ctttgacgt tggagtccac 6720
gttctttaat agtggactct tgttccaaac tgaacaaca ctcaacccta tctcgttcta 6780
ttctttgat ttataagga ttttccgat ttcggcctat tggtaaaaa atgagctgat 6840
ttaacaaaaa ttaacgcga attttaacaa aatattaacg cttacaattt gccattcgc 6900
attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcgc atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca 6960
gccaagcta ccatgataag taagtaatat taaggtagc gaggtacttg gagcgccgc 7020
aataaaatat ctttatttc attacatctg tgtgttggtt ttttgtgta atcgatagta 7080
ctaacatag ctctccatca aaacaaaacg aaacaaaaca aactagcaaa ataggctgtc 7140

cccagtgcaa gtcaggtgc cagaacattt ctctatogat a 7181

<210> 9

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene in plasmid PLS

<400> 9

aagcttccca ggaacatgct tgggcagcag gctgtggctc tgattggctt tctggccgtc 60

aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctggtggct attttgcct 120

tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atggtaggag acaggagacc tctaaagacc 180

ccaggtaac cttagcctgt tactctgaac agggtatgtg atctgccagc agatccttgc 240

gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgtgtgagtg tgtgctggga gtcagattct 300

gtgtgtgact tttaacagcc tgctcccttg ctttttcag ggcagaagtc ctcccttaga 360

gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt ttttttttaa agcactgaat 420

agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 480

aagttataaa aaaaattcct tcccaaaaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540

ctcagtagca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaataaaa aattttctcc 600

ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660

caaggcagtg ggagaagtg cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720

ggtttgatg tataggagcg aaggtgcaga cagcagtggg gcttagagtg gggctctgag 780
gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840
ggccaagggg gtctgtact gtgtcctccc acccctacct gggtcccat cccacagca 900
gaggagaaag aagcctgtcc tccccaggt cagctgcgtt agaggaagaa gactgggcat 960
gtctgggcag agatttcag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtctc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080
tttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 1140
ggggaggcca ggggtgtgag gtagatggga gcgatagac acatcactca tttctgtctc 1200
gtcagaaga accagtagac acttcagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtcctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga cttctctgag cccagtttc ccagcagtg 1440
tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500
tctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcaggtg agttagggt 1560
gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
ttgtagtct ctccaattcc ctcttcccga gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
cttaagttca gtggacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
ctggcctcaa gatgctttgt tgggtgtct aggtgctcca ggtgcttctg ggagaggtga 1800

cctagtgagg gatcagtggg aatagaggtg atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
 gagtgcatc gtttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgtcatcc tcctgatctt 1920
 ttcagctgca ttgggtaaat ccttgccctgc cagagtgggt cagcggtag ccagaaaggg 1980
 ggctcattct aacagtgctg tgtcctcctg gagagtcca actcattctc caagtaaaaa 2040
 aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca gcgcaccaac gcaggcgagg 2100
 gactggggga ggagggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggctggcct 2160
 gctggaactc gccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tgggccccgg 2220
 ggaggcggt cccgggcggc gcggtgggcc gagcgcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280
 ccgggcgggg cggttgtata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340
 ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 10

<211> 1653

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Luciferase-coding sequence in plasmid PLS

<400> 10

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgct ggaagatgga 60
 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120
 gcttttacag atgcacatat cgaggtggac atcacttacg ctgagtactt cgaaatgtcc 180

gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcagtga aa actctcttca attctttatg ccggtggttg gcgcgttatt tatcggagtt 300
gcagttgcgc ccgcaacga catttataat gaactgaat tgctcaacag tatgggcatt 360
tcgcagccta ccgtggtggt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaactgcaa 420
aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
ttcagtcga tgtacagtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatagat 540
tttgccag agtccttca tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctctctgga 600
tctactggtc tgctaaagg tgcgctctg cctcatagaa ctgcctgcgt gagattctcg 660
catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcat ttttaagtgt 720
gttcattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggatt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac 840
aagattcaaa gtgcgctgct ggtccaacc ctattctct tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct 960
aaggaagtcg gggaagcgtg tgccaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat 1020
gggtcactg agactacatc agctattctg attacacccg aggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgtgggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcctatgat tatgtccggt 1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatgatg gctacattct 1260

ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct 1320
 ctgattaagt acaaaggcta tcaggtggct cccgctgaat tggaatccat cttgctccaa 1380
 cacccaaca tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt 1440
 cccgcccgcg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtt gtttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taa 1653

<210> 11

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40-derived polyadenylation signal in plasmid PLS

<400> 11

cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc atttatggtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
 gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg ta 222

<210> 12

<211> 7230

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pAAV-PLS

<400> 12

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct   60
ggcgcacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca   120
actccatcac taggggttcc tgcggcctcg agatctgca tctaagtaag cttcccagga   180
acatgcttgg gcagcaggct gtggctctga ttggctttct ggccgtcagg aacatgtccc   240
aacatgttga gctctggcat agaagaggct ggtggctatt ttgtccttgg gctgcctgtt   300
ttcaggtgag gaaggggatg gtaggagaca ggagacctct aaagacccca ggtaaactt   360
agcctgttac tctgaacagg gtatgtgatc tgccagcaga tccttgcgac agggctggga   420
tctgatgcat gtgtgcttgt gtgagtgtgt gctgggagtc agattctgtg tgtgactttt   480
aacagcctgc tccttgcct ttttcaggc agaagtctc ccttagagtg tgtctgggta   540
cacattcaag tcatggttg caaacTTTT ttttaaagc actgaatagt actagacact   600
tagtaggtac ttaagaaata ttgaatgtcg tggtggtgt gagctagaag ttataaaaaa   660
aattctttcc caaaaacaac aacaaaaaga attatttcat tgtgaagctc agtaccacaa   720
aaatttaaat aattcattac aagcctttat taaaaaaaa tttctccca aagtaaacag   780
acagacaatg tctagtctat ttgaaatgcc tgaagcaga ggggcttcaa ggcagtggga   840
gaaggtgcct gtctctgct ggacatttga caaccagccc tttgatggt ttgatgtat   900

```

aggagcgaag gtcgacacag cagtggggct tagagtgggg tcctgaggct gtgccgtggc 960
ctttctgggg ttagccaca atcctggcct gactccaggc cgaggcaggc caagggggtc 1020
tgctactgtg tcctcccacc cctacctggg ctcccatccc cacagcagag gagaaagaag 1080
cctgtcctcc ccgaggtcag ctgcgtaga ggaagaagac tgggcatgtc tgggcagaga 1140
ttccagact ctgagcagcc tgagatgtca gtaattgtag ctgctccaag cctgggttct 1200
gttttttagt gggatttctg ttcagatgaa caatccatcc tctgcaattt tttaaaagca 1260
aaactcaaaa tgtttcaggc acagaaagga ggcaaagggtg aagtccaggg gaggtcaggg 1320
gtgtgaggta gatgggagcg gatagacaca tcaactcattt ctgtgtctgt cagaagaacc 1380
agtagacact tccagaattg tcctttattt atgtcatctc cataaacat ctgcaaatga 1440
gggttatttg gcatttttctg cattttggag ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 1500
ccccggcag gaggcaaaag tcctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgatc 1560
tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 1620
tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tcgtcaaatac ctccccttcc tggccaacaa 1680
agctgctgca accacagga tttcttctgt tcaggtgagt gtagggtgta gggagattgg 1740
ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg cccttttttg gtagtctctc 1800
caattccctc ctcccggaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtatactt aagttcagtg 1860
gacctcaatt tcctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 1920
gctttgttgg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgagggat 1980

cagtgggaat agaggtgata ttgtgggct tttctggaaa ttgcagagag gtgcatcggt 2040
tttataatth atgaatthtt atgtattaat gtcatcctcc tgatcttttc agctgcattg 2100
ggtaaatcct tgccctccag agtgggtcag cggtagacca gaaagggggc tcattctaac 2160
agtgtgtgt cctcctggag agtgccaact cattctcaa gtaaaaaag ccagattgt 2220
ggctcacttc gtggggaat gtgtccagcg caccaacgca ggcgaggac tgggggagga 2280
gggaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt cgggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 2340
caggctcagc tggctcggcg ctgggcagcc aggagcctgg gccccggga gggcgtccc 2400
ggcggcgcg gtggccgag cgcgggtccc gcctcctga ggcgggccc ggcgggccc 2460
ttgtatatca gggccgct gagctgcgc agctgagtg tgagcagct cgaagtcag 2520
ttccttggtg aagcttgca ttccgtact gttgtaaag ccaccatga agacccaaa 2580
aacataaaga aaggcccgc gccattctat ccgtggaag atggaaccg tggagagcaa 2640
ctgcataagg ctatgaagag atacgcctg gttcctgaa caattgctt tacagatgca 2700
catatcagg tggacatcac ttacgtgag tacttcgaaa tgccttcg gttggcagaa 2760
gctatgaaac gatatgggt gaatacaaat cacagaatcg tcgtatgag tgaaaactct 2820
cttcaattct ttatgccgt gttggcgcg ttattatcg gagttgcagt tgcgcccg 2880
aacgacattt ataatgaac tgaattgctc aacagtatg gcatttcgca gcctaccgtg 2940
gtttcgttt ccaaaaagg gttgcaaaaa atttgaacg tgcaaaaaa gctccaatc 3000
atcaaaaaa ttattatcat ggattctaaa acggattacc agggatttca gtcgatgtac 3060

acgttcgtca catctcatct acctcccgtt tttaatgaat acgattttgt gccagagtcc 3120
ttcgataggg acaagacaat tgcactgate atgaactcct ctggatctac tggctctgcct 3180
aaagtggtcg ctctgcctca tagaactgcc tgcgtgagat tctcgcctgc cagagatcct 3240
atthttggca atcaaatcat tccggatact gcgattttaa gtgttggtcc attccatcac 3300
ggthttggaa tgtttactac actcggatat ttgatatgtg gatttcgagt cgtcttaatg 3360
tatagatttg aagaagagct gthttctgagg agccttcagg attacaagat tcaaagtgcg 3420
ctgctgggtc caaccctatt ctctctcttc gccaaaagca ctctgattga caaatatgat 3480
ttatctaatt tacacgaaat tgcttctggt ggcgctcccc tctctaagga agtcggggaa 3540
gcggttgcca agaggttcca tctgccaggt atcaggcaag gatatgggct cactgagact 3600
acatcagcta tcttgattac acccgagggg gatgataaac cggcgcggtc cggtaaagtt 3660
gttccatttt ttgaagcgaa gthttgtgat ctggataccg ggaaaacgct ggcgthtaat 3720
caaagaggcg aactgtgtgt gagaggtcct atgattatgt ccgthtatgt aaacaatccg 3780
gaagcgacca acgccttgat tgacaaggat ggatggctac attctggaga catagcttac 3840
tgggacgaag acgaacactt ctctatcgtt gaccgcctga agtctctgat taagtacaaa 3900
ggctatcagg tggctcccgc tgaattggaa tccatcttgc tccaacaccc caacatcttc 3960
gacgcaggtg tgcaggtct tcccagcat gacgccgtg aacttcccgc cgcgthttgt 4020
gthttggagc acggaaagac gatgacggaa aaagagatcg tggattacgt cgcagtcaa 4080
gtaacaaccg cgaaaaagtt gcgaggagga gthttgtttg tggacgaagt accgaaaggt 4140

cttaccggaa aactcgacgc aagaaaaatc agagagatcc tcataaaggc caagaagggc 4200
ggaaagatcg ccgtgtaatt ctagagtcgg ggccggccggc cgcttcgagc agacatgata 4260
agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 4320
tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 4380
aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt 4440
taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt aaaatcgata aggatcggcc gcaggaacc 4500
ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgtc cgctcactga ggccggcgca 4560
ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 4620
agctgcctgc agggcgccct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg cgttatttca 4680
caccgcatag gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 4740
gtgtggtggt tacgocgagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 4800
tcgctttctt ccttccttt ctcgccacgt tcgccggtt tccccgtaa gctctaaatc 4860
ggggctccc ttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 4920
atttgggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga 4980
cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgtcca aactggaaca aactcaacc 5040
ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa 5100
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa 5160
ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac 5220

accgccaac acccgctgac ggcacctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca 5280
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga 5340
aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcataataa 5400
taatgTTTT ttagacgtca ggtggcactt ttcgggaaa tgtgcgcgga acccctattt 5460
gtttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa 5520
tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta 5580
ttccTTTTt tgcggcattt tgccttctg ttttTctca ccagaaacg ctggtgaaag 5640
taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gaggTggtta catcgaactg gatctcaaca 5700
gcgtaagat ccttgagagt tttgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactTTta 5760
aagtTctgt atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc 5820
gccgataca ctattctcag aatgactTgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc 5880
ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtTctgc cataaccatg agtgataaca 5940
ctgcggccaa ctactTctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctTTTTTgc 6000
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgtTggga accggagctg aatgaagcca 6060
taccaaaca cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaac ttgcgcaaac 6120
tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg 6180
cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg 6240
ataaatctgg agccggTgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg 6300

gtaagcctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac 6360
gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc 6420
aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct 6480
aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc 6540
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 6600
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg 6660
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 6720
atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 6780
ctacatacct cgtctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 6840
gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa 6900
cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 6960
tacagcgtga gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 7020
cggtaagcgg caggtcggga acaggagagc gcacgagga gttccaggg gaaacgcct 7080
ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 7140
gctcgtcagg gggcgggagc ctatgaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 7200
tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 7230

<210> 13

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Left-ITR in plasmid pAAV-PLS

<400> 13

cctgcaggca gctgcgctcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 14

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene in plasmid pAAV-PLS

<400> 14

aagcttccca ggaacatgct tgggcagcag gctgtggctc tgattggctt tctggccgctc 60

aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctgggtggct attttgcct 120

tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atggtaggag acaggagacc tctaaagacc 180

ccaggtaaac cttagcctgt tactctgaac agggtagtg atctgccagc agatccttgc 240

gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgtgtgagtg tgtgctggga gtcagattct 300

gtgtgtgact tttaacagcc tgctcccttg ctttttcag ggcagaagtc ctccttaga 360

gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt ttttttttaa agcactgaat 420

agtagtagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 480
aagttataaa aaaaattctt tcccaaaaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540
ctcagtacca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaaaaaa aattttctcc 600
ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660
caaggcagtg ggagaagggt cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720
ggtttgatg tataggagcg aaggtgcaga cagcagtggg gcttagagtg gggctctgag 780
gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840
ggccaagggg gtctgctact gtgtcctccc acccctacct gggtcccat cccacagca 900
gaggagaaag aagcctgtcc tccccgaggt cagctgcgtt agaggaagaa gactgggcat 960
gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtccc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080
tttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaaag gtgaagtcca 1140
ggggaggtca ggggtgtgag gtagatggga gcggatagac acatcactca tttctgtgtc 1200
tgtcagaaga accagtagac acttccagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtcctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga ctctctgag cccagtttc cccagcagtg 1440
tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500

tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcagggtg agtgtagggt 1560
 gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
 ttgtagtct ctccaattcc ctcttcccga gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
 cttaagttca gtggacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
 ctggcctcaa gatgctttgt tgggggtctt aggtgtcca ggtgcttctg ggagagggtga 1800
 cctagtgagg gatcagtggg aatagagggtg atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
 gaggtgcatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgcatcc tctgatctt 1920
 ttcagctgca ttgggtaaat ccttgcctgc cagagtgggt cagcgggtgag ccagaaaggg 1980
 ggctcattct aacagtgctg tgtcctcctg gagagtgcca actcattctc caagtaaaaa 2040
 aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca ggcaccaac gcaggcgagg 2100
 gactggggga ggagggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggttggcct 2160
 gctggaactc ggccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tggcccccgg 2220
 ggaggcggt cccgggcggc gcggtgggcc gagcgcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280
 ccgggcgggg cggttgata tcagggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340
 ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 15

<211> 1653

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Luciferase-coding sequence in plasmid pAAV-PLS

<400> 15

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgct ggaagatgga 60
 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatagc ccctggttcc tggaacaatt 120
 gcttttacag atgcacatat cgaggtggac atcacttagc ctgagtactt cgaaatgtcc 180
 gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt 300
 gcagttgcgc ccggaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgggcatt 360
 tgcagccta ccgtggtggt cgtttccaaa aagggttgc aaaaaatfff gaacgtgcaa 420
 aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
 tttcagtcga tgtacagtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatagat 540
 tttgtccag agtccttcga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctcctctgga 600
 tctactggtc tgcctaaagg tgctgctctg cctcatagaa ctgcctgcgt gagattctcg 660
 catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttttaagtgtt 720
 gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac 840
 aagattcaaa gtgcgctgct ggtgccaacc ctattctcct tcttcgccaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttalc taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct 960

aaggaagtcg gggaagcggg tgccaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg aggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggtg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgtgggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcctatgat tatgtccggt 1200
 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct 1320
 ctgattaagt acaaaggcta tcaggtggct cccgctgaat tggaatccat cttgctccaa 1380
 cacccaaca tcttcgacgc aggtgtcga ggtcttcccg acgatgacgc cgggtaactt 1440
 cccgccgccc ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gtttgggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcgaaa gatcgccgtg taa 1653

<210> 16

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40-derived polyadenylation signal in plasmid pAAV-PLS

<400> 16

cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60

aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120

ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt 180

gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaagtgg ta 222

<210> 17

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Right-ITR in plasmid pAAV-PLS

<400> 17

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccggcgacc aaaggtgcc cgacgcccg gcttgcccg ggcgccctca gtgagcgagc 120

gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 18

<211> 7327

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pAAV-RC

<400> 18

gcgcgccgat atcgттаacg ccccgcccg gccgctctag aactagtgga tccccggaa 60

gatcagaagt tcctattcag aagttcctat tcctagaaa gtataggaac ttctgatctg 120

cgcagccgcc atgccgggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga 180
gcátctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 240
gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga cegtggccga 300
gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggcct 360
tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 420
caccggggtg aatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 480
tcagagaatt taccgcgga tcgagccgac tttgccaac tggttcgcgg tcacaaagac 540
cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 600
gctcccaaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 660
cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 720
gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc cggatgatcag 780
atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtg ctcgtggaca aggggattac 840
ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc 900
caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 960
taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 1020
gattataaa attttggac taaacggta cgatcccaa tatgcggtt cgtctttct 1080
gggatggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac 1140
taccggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1200

aaactggacc aatgagaact ttccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1260
ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1320
caagtgccg gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccga ctcccgtgat 1380
cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgctg gattgacggg aactcaacga cttcgaaca 1440
ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1500
ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cggtagggcaa aggatcacgt 1560
ggttaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaaggtgga gccaagaaaa gaccgcccc 1620
cagtacgca gatataagtg agcccaaagc ggtgcgagag tcagttgctc agccatcgac 1680
gtcagacgcg gaagcttca tcaactacgc agacaggtac caaaacaat gttctcgtca 1740
cgtggcatg aatctgatc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1800
aaatatctgc ttcactcagc gacagaaaga ctgttagag tgctttccg tgcagaatc 1860
tcaaccggtt tctgtctca aaaaggcgtc tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1920
gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1980
catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt 2040
ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtggg gaagctcaaa cctggccac 2100
caccacaaa gccgcagag cggcataagg acgacagcag ggtcttctg cttctgggt 2160
acaagtacct cggaccctc aacggactcg acaagggaga gccggtcaac gaggcagac 2220
ccgcgccct cgagcacgac aaagcctac accggcagct cgacagcga gacaaccgt 2280

acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaaagaa gatacgtctt 2340
ttggggcaa cctcggacga gcagtcttcc aggcgaaaaa gagggttctt gaacctctgg 2400
gcctggttga ggaacctggt aagacggctc cgggaaaaaa gaggccgta gagcactctc 2460
ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct gcaagaaaaa 2520
gattgaattt tggcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag cctctcggac 2580
agccaccagc agccccctct ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc agtggcgcac 2640
caatggcaga caataacgag ggcgccgacg gagtgggtaa ttcctcggga aattggcatt 2700
gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag caccogaacc tgggccctgc 2760
ccacctaaa caaccacctc tacaacaaa tttccagcca atcaggagcc tcgaacgaca 2820
atcactactt tggctacagc accccttggg ggtattttga cttcaacaga ttccactgcc 2880
acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggattc cgaccaaga 2940
gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat gacggtacga 3000
cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcagggtt tactgactcg gattaccagc 3060
tcccgtacgt cctcggctcg gcgcatcaag gatgcctccc gccgttccca gcagacgtct 3120
tcatggtgcc acagtatgga tacctcacc tgaacaacgg gattcaggca gtaggacgct 3180
cttcatttta ctgcctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga aacaacttta 3240
ccttcagcta cacttttgag gacgttctt tccacagcag ctacgctcac agccagagtc 3300
tggaccgtct catgaatcct ctcacgacc agtacctgta ttacttgagc agaacaacaa 3360

ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaagc ttcagtttcc tcaggccgga gcgagtgaca 3420
ttcgggacca gtctaggaac tggcttcctg gaccctgtta ccgccagcag cgagtatcaa 3480
agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc aagtaccacc 3540
tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccgccat ggcaagccac aaggacgatg 3600
aagaaaagtt ttttcctcag agcggggttc tcctctttgg gaagcaaggc tcagagaaaa 3660
caaatgtgga cattgaaaag gtcattgatta cagacgaaga ggaaatcagg acaaccaatc 3720
ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc aacagacaag 3780
cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttcaggc catggtctgg caggacagag 3840
atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga cattttcacc 3900
cctctcccct catgggtgga ttcggactta aacaccctcc tccacagatt ctcatcaaga 3960
acaccccggt acctgcaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt gcttccttca 4020
tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg cagaaggaaa 4080
acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt acacttcaa ctacaacaag tctgttaatg 4140
tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt ggcaccagat 4200
acctgactcg taatctgtaa ttgcttgta atcaataaac cgtttaatte gtttcagttg 4260
aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta gataagtagc 4320
atggcgggtt aatcattaac tacagcccg gcgtttaaac agcgggcgga ggggtggagt 4380
cgtgacgtga attacgtcat agggttaggg aggtcctgta ttagaggcca cgtgagtgtt 4440

ttgcgacatt ttgcgacacc atgtggtctc gctggggggg gggcccgag tgagcacgca 4500
gggtctccat tttgaagcgg gaggtttgaa cgagcgtgg cgcgctcact ggccgtcgtt 4560
ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttaccaaac ttaatgcct tgcagcacat 4620
ccccctttcg ccagctggcg taatagcga gagcccgca cggatcgccc ttccaacag 4680
ttgcgagcc tgaatggcga atggaaattg taagcgttaa tttttgtta aaattcgcgt 4740
taaatttttg ttaaatacgc tcattttttt aaccaatagg cggaaatcg caaaatccct 4800
tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgtg ttccagttg gaacaagagt 4860
ccactattaa gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat caggcgcgat 4920
gccactacg tgaacatca ccctaatcaa gtttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac 4980
taaatacgaa ccctaaagg agccccgat ttagagcttg acgggaaag ccggcgaacg 5040
tggcgagaaa ggaaggaag aaagcgaag gagcggcgc tagggcgtg gcaagtgtag 5100
cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccg ccgcgctta tgcgccgcta caggcgcgt 5160
caggtggcac ttttcggga aatgtgcgc gaaccctat ttgtttatt ttctaaatac 5220
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa 5280
aaaggaagag tatgagtatt caacatttc gtgtgccct tattccctt tttgcggcat 5340
tttccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 5400
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 5460
gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactt taaagttctg ctatgtggcg 5520

cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc 5580
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 5640
taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc 5700
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 5760
taactgcct tgatcgttg gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg 5820
acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcaactac 5880
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 5940
cacttctgcg ctggccctt ccggctggct gttttattgc tgataaatct ggagccggtg 6000
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tgtaagccc tcccgtatcg 6060
tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg 6120
agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 6180
tttagattga tttaaaactt ctttttaaat ttaaaggat ctaggtgaag atcctttttg 6240
ataatctcat gacaaaatc ccttaacgtg agttttcggt cactgagcg tcagaccccg 6300
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaate tgctgcttgc 6360
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 6420
ttttccgaa gtaactgac ttacagagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt 6480
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 6540
taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 6600

caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac 6660
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 6720
aaagcggcac gttccccgaa gggagaaagg cggacaggta tccgtaagc ggcagggtcg 6780
gaacaggaga ggcacagagg gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 6840
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga 6900
gcctatggaa aaagccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgetggcctt 6960
ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt 7020
ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga ggcagcagc tcagtgagcg 7080
aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 7140
aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 7200
atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta 7260
tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagc aaacagctat gaccatgatt 7320
acgccaa 7327

<210> 19

<211> 11635

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pHelper

<400> 19

ggtacccaac tccatgctta acagtcccca ggtacagccc accctgcgtc gcaaccagga 60
acagctctac agcttcctgg agcgccactc gccctacttc cgcagccaca gtgcgcat 120
taggagcgcc acttcttttt gtcacttgaa aaacatgtaa aaataatgta ctaggagaca 180
ctttcaataa aggcaaatgt ttttatttgt aactctcgg gtgattattt acccccacc 240
cttgccgtct gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgtc atgcccact 300
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgtccact taaactcagg cacaaccatc 360
cgcgcagct cggatgaagt ttactccac aggtcgcga ccatcacaa cgcgttagc 420
agtcgggcg ccgatatctt gaagtcgag ttgggcctc gccctgcgc gcgcgagttg 480
cgatacacag gttgcagca ctggaact atcagcgccg gttggtgcac gctggccagc 540
acgtcttgt cggagatcag atccgctcc aggtcctccg cgttgctcag ggccaacgga 600
gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggtcatgcc caggcttga gttgactcg 660
caccgtagtg gcatcagaag gtgacctgc ccggtctggg cgtaggata cagcgctgc 720
atgaaagcct tgatctgctt aaaagccacc tgagccttg cgccttcaga gaagaacatg 780
ccgaagact tgccgaaaa ctgattggcc ggacaggccg cgtcatgcac gcagcacctt 840
gcgtcggtgt tggagatctg caccacattt cggccccacc gttcttcac gatcttgcc 900
ttgctagact gtccttcag cgcgcgtgc ccgtttcgc tegtacatc catttcaatc 960
acgtgctct tatttateat aatgctccc ttagacact taagctgcc ttcgatctca 1020
gcgcagcgt gcagccaaa cgcgcagccc gtggctcgt ggtgcttga gttacctct 1080

gcaaacgact gcaggtacgc ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg 1140
ctggtgaagg tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttta gccaggtctt gcatacggcc 1200
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagc ttgaagtttg cctttagatc gttatccacg 1260
tggtacttgt ccatcaacgc ggcgcagcc tccatgcctt tctcccacgc agacacgacg 1320
ggcaggtca ggggtttat caccgtgctt tcactttccg cttcactgga ctcttcctt 1380
tcctcttgcg tcgcatacc ccgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcaccgtg 1440
cgcttacctc ccttgccgtg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt 1500
agcggccat ctctctttc ttctcgtg tccacgatca cctctgggga tggcgggcgc 1560
tcggccttgg gagaggggcg cttcttttc ttttggacg caatggcaa atccgccgtc 1620
gaggtgatg gccgcgggt ggtgtgcgc ggcaccagcg catcttgtga cgagtcttct 1680
tcgtcctcgg actcgagacg ccgcctcagc cgctttttg gggcgcgcg gggaggcgcg 1740
ggcgacggcg acggggacga cacgtcctcc atggttggtg gacgtcgcgc cgcaccgct 1800
ccgcctcgg ggttggttc gcgctgctcc tcttccgac tggcatttc cttctctat 1860
aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aaggaggaca gcctaaccgc cccctttgag 1920
ttgccacca ccgcctccac cgatgccgc aacgcgcta ccaccttccc cgtcaggca 1980
ccccgcttg aggaggagga agtgattatc gacgaggacc caggttttgt aagcgaagac 2040
gacgagatc gtcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacga cgcagaggca 2100
aacgaggaac aagtccggcg gggggaccaa aggcattggcg actacctaga tgtgggagac 2160

gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta tctgcgacgc gttgcaagag 2220
cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat gtcagccttg cctacgaacg ccacctgttc 2280
tcaccgcgcg tacccccmaa acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc 2340
aacttctacc cgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa 2400
aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa gcagctggcc 2460
ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgtcgc acgaagtgcc aaaaatcttt 2520
gaggtcttg gacgcgacga gaaacgcgcg gcaaacgctc tgcaacaaga aaacagcgaa 2580
aatgaaagtc actgtggagt gctggtgaa cttgagggtg acaacgcgcg cctagccgtg 2640
ctgaaacgca gcatcgaggt caccacttt gcctaccgg cacttaacct acccccgaag 2700
gttatgagca cagtcagag cgagctgac gtgcgccgtg cacgacctt ggagaggat 2760
gcaaacttgc aagaacaaac cgaggaggc ctaccgcag ttggcgatga gcagctggcg 2820
cgctggcttg agacgcgca gcctgccgac ttggaggagc gacgcaagct aatgatggcc 2880
gcagtgcttg ttaccgtgga gcttgagtgc atgcagcgg tctttgctga cccggagatg 2940
cagcgcaagc tagaggaaac gttgcactac acctttgcc agggctacgt gcgccaggcc 3000
tgcaaaattt ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctct accttgaat tttgcaagaa 3060
aaccgcctcg ggcaaacgt gcttcattcc acgctcaagg gcgaggcgcg ccgcgactac 3120
gtccgcgact gcgtttactt atttctgtgc tacacctggc aaacggccat gggcgtgtgg 3180
cagcaatgcc tggaggagcg caacctaaag gagctgcaga agctgctaaa gcaaaacttg 3240

aaggacctat ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacattatc 3300
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac cagtcaaagc 3360
atggtgcaaa actttaggaa ctttatccta gagcgttcag gaattctgcc cgccacctgc 3420
tgtgccttc ctagegactt tgtgccatt aagtaccgtg aatgcctcc gccgcttgg 3480
ggtcactgct accttctgca gctagccaac tacctgcct accactccga catcatggaa 3540
gacgtgagcg gtgacggcct actggagtgt cactgtcgt gcaacctatg caccccgac 3600
cgctccctgg tctgcaattc gcaactgctt agcgaagtc aaattatcgg tacctttgag 3660
ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtc gccgctccgg ggttgaaact cactccgggg 3720
ctgtggacgt cgcttacct tcgcaaattt gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt 3780
aggttctacg aagaccaatc ccgcccga aatgcggagc ttaccgctg cgtcattacc 3840
cagggccaca tccttgcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta 3900
cgaaagggac ggggggttta cctggacccc cagtccggcg aggagctcaa cccaatcccc 3960
ccgcccgc agccctatca gcagccgcg gcccttgctt ccagatgg cacccaaaaa 4020
gaagctgcag ctgcccccgc cgccaccac ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc 4080
agaggaggtt ttggacgagg aggaggagat gatggaagac tgggacagcc tagacgaagc 4140
ttccgaggcc gaagaggtgt cagacgaaac accgtcacc tcggtcgcac tcccctgcc 4200
ggcggcccag aaattggcaa ccgttcccag catectaca acctccgctc ctcaggcgc 4260
gccggcactg cctgttcgcc gaccaaccg tagatgggac accactggaa ccaggccgg 4320

taagtctaag cagccgccgc cgtagccca agagcaaca cagcgccaag gctaccgctc 4380
gtggcgcggg cacaagaacg ccatagttgc ttgcttgcaa gactgtgggg gcaacatctc 4440
cttcgcccgc cgctttcttc tctaccatca cggcgtggcc ttccccgta acatcctgca 4500
ttactaccgt catctctaca gccctactg caccggcggc agcggcagcg gcagcaacag 4560
cagcggtcac acagaagcaa aggcgaccgg atagcaagac tctgacaaag cccaagaaat 4620
ccacagcggc ggcagcagca ggaggaggag cgctcgtctt ggcgccaac gaaccctgat 4680
cgaccgcga gcttagaaat aggatttttc cactctgta tgetatattt caacaaagca 4740
gggccaaga acaagagctg aaaataaaaa acaggtctct gcgctccctc acccgagct 4800
gcctgtatca caaaagcgaa gatcagcttc ggcgcacgct ggaagacgcg gaggctctct 4860
tcagcaaata ctgcgcgctg actcttaagg actagtttcg cgcctttctt caaatttaag 4920
cgcgaaaact acgtcatctc cagcggccac acccggcgcc agcacctgtc gtcagcgcca 4980
ttatgagcaa gaaattccc acgcctaca tgtggagtta ccagccaca atgggacttg 5040
cggctggagc tgccaagac tactcaacc gaataaacta catgagcgcg ggaccccaca 5100
tgatatcccg ggtcaacgga atccgcgcc accgaaaccg aattctctc gaacaggcgg 5160
ctattaccac cacacctgt aataacctta atccccgtag ttggcccgt gcctggtgt 5220
accaggaaag tccgctccc accactgtgg tacttcccag agacgccag gccgaagttc 5280
agatgactaa ctacggggcg cagcttgccg gcggctttcg tcacagggtg cggtcgcccg 5340
ggcgttttag ggcggagtaa cttgcatgta ttgggaattg tagttttttt aaaatgggaa 5400

gtgacgtatc gtgggaaaac ggaagtgaag atttgaggaa gttgtgggtt ttttggcttt 5460
cgtttctggg cgtaggttcg cgtgcggttt tctgggtggt ttttgtggac ttaaccgtt 5520
acgtcatttt ttagtcctat atatactcgc tctgtacttg gcccttttta cactgtgact 5580
gattgagctg gtgccgtgc gagtgggtt ttttaatagg ttttttact ggtaaggctg 5640
actgttatgg ctgccgtgt ggaagcgtg tatgtgttc tggagcggga ggggtctatt 5700
ttgcctaggc aggagggtt ttcaggtgtt tatgtgttt tctctcctat taattttgtt 5760
atacctccta tggggctgt aatgtgtct ctacgcctgc gggatgtat tccccgggc 5820
tattcggtc gctttttagc actgaccgat gtaaccaac ctgatgtgtt taccgagtct 5880
tacattatga ctccggacat gaccgaggaa ctgtcgggtg tgctttttaa tcacgtgac 5940
cagtttttt acggtcacgc oggcatggcc gtagtccgtc ttatgcttat aagggttgtt 6000
tttctgttg taagacaggc ttctaagtgt taaatgttt tttttttgtt attttatttt 6060
gtgtttaatg caggaaccg cagacatgtt tgagagaaaa atggtgtctt tttctgtgtt 6120
ggtccggaa cttacctgc tttatctgca tgagcatgac tacgatgtgc ttgctttttt 6180
gcgcgaggct ttgcctgatt ttttgagcag caccttgcac tttatategc cgcccatgca 6240
acaagcttac ataggggcta cgctggtag catagctccg agtatgcgtg tcataatcag 6300
tgtgggttct tttgtcatgg ttctggcgg ggaagtggcc gcgctggtec gtgcagacct 6360
gcacgattat gttcagctgg ccctgcgaag ggacctacgg gatcgcggta tttttgttaa 6420
tgttccgctt ttgaatctta tacaggtctg tgaggaaacct gaatttttgc aatcatgatt 6480

cgctgcttga ggctgaaggt ggagggcgct ctggagcaga tttttacaat ggccggactt 6540
aatattcggg atttgcttag agacatattg ataaggtggc gagatgaaaa ttatttgggc 6600
atggttgaag gtgctggaat gtttatagag gagattcacc ctgaagggtt tagcctttac 6660
gtccacttgg acgtgagggc agtttgcctt ttggaagcca ttgtgcaaca tcttacaat 6720
gccattatct gttctttggc tgtagagttt gaccacgcca cggagggga gcgcgttcac 6780
ttaatagatc ttcattttga gtttttgat aatcttttg aataaaaaaa aaaaaacatg 6840
gttcttccag ctcttcccgc tctcccgtg tgtgactcgc agaacgaatg tgtaggttg 6900
ctgggtgtgg ctattctgc ggtggtgat gttatcaggg cagcggcgca tgaaggagt 6960
tacatagaac ccgaagccag ggggcgcctg gatgctttga gagagtggat atactacaac 7020
tactacacag agcgagctaa gcgacgagac cggagacgca gatctgtttg tcacgcccgc 7080
acctggtttt gcttcaggaa atatgactac gtccggcgtt ccatttggca tgacactacg 7140
accaacacga tctoggttgt ctcggcgcac tccgtacagt aggatcgcc tacctccttt 7200
tgagacagag acccgcgcta ccatactgga ggatcatccg ctgctgcccg aatgtaacac 7260
ttgacaatg cacaacgtga gttacgtgcg aggtcttccc tgcagtgtgg gatttacgct 7320
gattcaggaa tgggttgctt cctgggatat gttctgacg cgggaggagc ttgtaatcct 7380
gaggaagtgt atgcacgtgt gcctgtgttg tgccaacatt gatatcatga cgagcatgat 7440
gatccatggt tacgagtcct gggctctcca ctgtcattgt tccagtcccg gttccctgca 7500
gtgcatagcc ggcgggcagg ttttgccag ctggttagg atggtggtg atggcgccat 7560

gtttaatcag aggtttatat ggtaccggga ggtggtgaat tacaacatgc caaaagaggt 7620
aatgtttatg tccagcgtgt ttatgagggg tcgccactta atctacctgc gcttgtggta 7680
tgatggccac gtgggttctg tggccccgc catgagcttt ggatacagcg ccttgcactg 7740
tgggattttg aacaatattg tgggtctgtg ctgcagttac tgtgctgatt taagtgagat 7800
caggtgctgc tctgtgccc ggaggacaag gcgtctcatg ctgcgggctg tgcgaatcat 7860
cgctgaggag accactgcca tgttgattc ctgcaggacg gagcggcggc ggcagcagtt 7920
tattcgcgcg ctctgcagc accaccgcc tctctgatg cagcattatg actctacccc 7980
catgtaggcg tggacttccc cttcgccccc cgttgagcaa ccgcaagttg gacagcagcc 8040
tgtgctcag cagctggaca gcgacatgaa cttaaagcag ctgcccgggg agtttattaa 8100
tatcactgat gagcgtttgg ctgcacagga aaccgtgtgg aatataacac ctaagaatat 8160
gtctgttacc catgatatga tgctttttaa ggccagcccg ggagaaagga ctgtgtactc 8220
tgtgtgttg gagggagtg gcaggtgaa tactagggtt ctgtgagttt gattaaggtg 8280
cgggatcaa tataagctat gtggtgtgg ggctatacta ctgaatgaaa aatgacttga 8340
aattttctgc aattgaaaa taaacagtt gaaacataac atgcaacagg ttcacgattc 8400
tttattcctg ggcaatgtag gagaaggtgt aagagttggt agcaaaagtt tcagtgtgt 8460
attttccact ttcccaggac catgtaaaag acatagagta agtgcttacc tcgctagttt 8520
ctgtggattc actagaatcg atgtaggatg ttgccctcc tgacgcgta ggagaagggg 8580
aggtgcctt gcatgtctgc cgctgtctt gctcttgccg ctgctgagga gggggcgca 8640

tctgccgcag caccggatgc atctgggaaa agcaaaaaag ggctcgtcc ctgtttccgg 8700
aggaatttgc aagcggggtc ttgcatgacg gggaggcaaa cccccgttcg ccgcagtccg 8760
gccggcccga gactcgaacc gggggtcctg cgactcaacc ctgggaaaat aaccctccgg 8820
ctacagggag cgagccactt aatgctttcg cttccagcc taaccgctta cgccgcgcgc 8880
ggccagtggc caaaaaagct agcgcagcag ccgccgcgcc tggaaaggaag ccaaaaggag 8940
cgctcccccg ttgtctgacg tcgcacacct gggttcgaca cgcgggcggt aaccgcatgg 9000
atcacggcgg acggccggat ccggggttcg aaccocggtc gtccgcatg atacccttgc 9060
gaatttatcc accagaccac ggaagagtgc ccgcttacag gctctccttt tgcacggtct 9120
agagcgtcaa cgactgcgca cgcctcaccg gccagagcgt ccgacatg gagcactttt 9180
tgccgctgcg caacatctgg aaccgctcc gcgactttcc gcgcgcctcc accaccgccg 9240
ccggcatcac ctggatgtcc aggtacatct acggattacg tcgacgttta aaccatatga 9300
tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag 9360
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 9420
ttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaanaa atcgacgctc aagtcagagg 9480
tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 9540
cgctctctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 9600
agcgtggcgc tttctcatag ctacacgtgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc 9660
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt 9720

aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagacttat cgccactggc agcagccact 9780
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtagg 9840
cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 9900
acctcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 9960
ggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcaaaaaa aaggatctca agaagatcct 10020
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg 10080
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt 10140
aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt 10200
gaggcaccta tctcagcagat ctgtctatth cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc 10260
gtgtagataa ctacgatac ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg 10320
cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggcc 10380
gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccg 10440
gaagctagag taagtagtgc gccagtaat agtttgca acgttggtgc cattgtaca 10500
ggcatcgttg tgcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccg ttccaacga 10560
tcaaggcag ttacatgat cccatgttg tgcaaaaaag cgttagctc cttcgtcct 10620
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggcgcga gtgtatcac tcatggttat ggcagactg 10680
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 10740
accaagtcat tctgagaata gtgtatcgg cgaccgagtt gctcttccc ggcgtcaata 10800

cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 10860
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact 10920
cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 10980
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataaggcgca cacggaatg ttgaatactc 11040
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 11100
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 11160
aaagtccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgta aatTTTTgtt 11220
aatcagctc atTTTTaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat aatcaaaaag 11280
aatagaccga gatagggttg agtgttgttc cagtttgaa caagagtcca ctattaaaga 11340
acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 11400
aaccatcacc ctaatcaagt tttttgggtt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 11460
ctaaaggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg 11520
aaggaagaa agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtctc 11580
gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgatg gatcc 11635

<210> 20

<211> 4633

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid rAAV-PLS

<400> 20

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
ggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc tgcggcctcg agatctgca tctaagtaag cttcccagga 180
acatgcttg gacgaggct gtggctctga ttgctttct ggccgtcagg aacatgtccc 240
aacatgttga gctctggcat agaaggct ggtggctatt ttgtccttgg gctgcctgtt 300
ttcaggtgag gaaggggatg gtaggagaca ggagacctt aaagaccca ggtaaacctt 360
agcctgttac tctgaacagg gtagtgatc tgccagcaga tccttgagc agggctggga 420
tctgatgcat gtgtgcttgt gtgagtgtgt gctgggagtc agattctgtg tgtgactttt 480
aacagcctgc tccttgctt ttttcaggc agaagtctc ccttagagtg tgtctgggta 540
cacattcaag tgcattgtt caaactttt ttttaaagc actgaatagt actagacact 600
tagtaggtac ttaagaaata ttgaatgctg tgggtggtg gagctagaag ttataaaaaa 660
aattctttcc caaaaacaac acaaaaaga attatttcat tgtgaagtc agtaccacaa 720
aaatttaaat aattcattac aagcctttat taaaaaaat tttctccca aagtaaacag 780
acagacaatg tctagtctat ttgaaatgcc tgaagcaga ggggcttcaa ggcagtggga 840
gaaggtgcct gtctctgct ggacatttga caaccagccc tttgatggt ttgatgtat 900
aggagcgaag gtgcagacag cagtgggct tagagtggg tcctgaggct gtccgtggc 960
ctttctggg tttagccaca atcctggcct gactccaggc cgaggcagc caaggggctc 1020

tgctactgtg tctcccacc cctacctggg ctcccatccc cacagcagag gagaaagaag 1080
cctgtcctcc ccgaggtcag ctgcgttaga ggaagaagac tgggcatgtc tgggcagaga 1140
tttccagact ctgagcagcc tgagatgtca gtaattgtag ctgctccaag cctgggttct 1200
gttttttagt gggatttctg ttcagatgaa caatccatcc tctgcaattt tttaaaagca 1260
aaactgcaaa tgtttcaggc acagaaagga ggcaaaggtg aagtccaggg gaggtcaggg 1320
gtgtgaggta gatgggagcg gatagacaca tcactcattt ctgtgtctgt cagaagaacc 1380
agtagacact tccagaattg tcctttatit atgtcatctc cataaacat ctgcaaatga 1440
gggttatttg gcatttttgt cattttggag ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 1500
ccccgggcag gaggcaaaag tcctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgac 1560
tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 1620
tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tcgtcaaate ctccccttc tggccaacaa 1680
agctgctgca accacagga tttcttctgt tcaggtgagt gtagggtgta gggagattgg 1740
ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg cccttttttg gtagtctctc 1800
caattccctc cttcccggaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtatactt aagttcagtg 1860
gacctcaatt tcctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 1920
gctttgttgg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgaggat 1980
cagtgggaat agaggtgata ttgtgggct tttctggaaa ttgcagagag gtgcatcggt 2040
tttataattt atgaattttt atgtattaat gtcacctcc tgatcttttc agctgcattg 2100

ggtaaatcct tgctgccag agtgggtcag cggtagcca gaaagggggc tcattctaac 2160
agtgtgtgt cctcctggag agtgccaact cattctccaa gtaaaaaaag ccagatttgt 2220
ggctcacttc gtggggaaat gtgtccagcg caccaacgca ggcgaggac tgggggagga 2280
gggaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt cgggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 2340
caggctcagc tggctcggcg ctgggcagcc aggagcctgg gccccgggga ggcggtccc 2400
ggcggcgcg gtggccgag cgcgggtccc gcctccttga ggcgggcccg ggcgggagg 2460
ttgtatatca gggccgct gagctgcc agctgagtg tgagcagct cgaagtcag 2520
ttcctgtgg aagcttgga ttccgtact gttgtaaag ccaccatgga agacgcaaa 2580
aacataaaga aaggcccgc gccattctat ccgctggaag atggaaccgc tggagagcaa 2640
ctgcataagg ctatgaagag atacccctg gttcctgaa caattgctt tacagatgca 2700
catatcgagg tggacatcac ttacgtgag tacttcgaaa gtccgttcg gttggcagaa 2760
gctatgaaac gatatgggt gaatacaaat cacagaatcg tcgatgcag tgaaaactct 2820
cttcaattct ttatgccgt gttggcgcg ttattatcg gagttgcagt tgcgcccg 2880
aacgacattt ataatgaac tgaattgctc aacagtatgg gcatttcgca gcctaccgtg 2940
gtgttcgtt ccaaaaagg gttgcaaaa atttgaacg tgcaaaaaa gtcaccaatc 3000
atccaaaaa ttattatcat ggattctaaa acggattacc agggatttca gtcgatgtac 3060
acgttcgca catctcatct acctccggt ttaaatgaat acgatttgt gccagatcc 3120
ttcgatagg acaagacaat tgcactgatc atgaaactct ctgatctac tggctgcct 3180

aaagtgctg ctctgcctca tagaactgcc tgcgtgagat tctcgcatgc cagagatcct 3240
atTTTTggca atcaaatcat tccgatact gcgattttaa gtgttgttcc attccatcac 3300
ggttttgaa tgtttactac actcggatat ttgatatgtg gatttcgagt cgtcttaatg 3360
tatagattg aagaagagct gtttctgagg agccttcagg attacaagat tcaaagtgcg 3420
ctgctggtgc caaccctatt ctcttcttc gccaaaagca ctctgattga caaatagat. 3480
ttatctaatt tacacgaaat tgcttctggt ggcgtcccc tctctaagga agtcggggaa 3540
gcggttgcca agaggttcca tctgccaggt atcaggcaag gatatgggct cactgagact 3600
acatcagcta ttctgattac acccgagggg gatgataaac cgggcgcggt cggtaaagtt 3660
gttccatttt ttgaagcgaa gtttgtggat ctggataccg ggaaaacgct gggcgtaat 3720
caaagaggcg aactgtgtgt gagagtcct atgattatgt cggttatgt aaacaatccg 3780
gaagcgacca acgccttgat tgacaaggat ggatggctac attctggaga catagcttac 3840
tgggacgaag acgaacactt cttcatcgtt gaccgcctga agtctctgat taagtacaaa 3900
ggctatcagg tggctcccgc tgaattggaa tccatcttgc tccaacacc caacatcttc 3960
gacgcaggtg tgcaggctt tcccagcat gacgccgtg aacttcccgc cgccgttgtt 4020
gttttgagc acggaaagac gatgacggaa aaagatcgc tggattacgt cgccagtcaa 4080
gtaacaaccg cgaaaaagt gcgcggagga gttgtgtttg tggacgaagt accgaaaggt 4140
cttaccggaa aactcgacgc aagaaaaatc agagatcgc tcataaagc caagaaggc 4200
ggaaagatcg ccgtgtaatt ctagatcgg ggcggccggc cgcttcgac agacatgata 4260

agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 4320
 tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth gtaaccatta taagctgcaa taaacaagth 4380
 aacaacaaca attgcattca ttttatgtht caggttcagg gggaggtgtg ggaggtthtth 4440
 taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt aaaatcgata aggatcggcc gcaggaaccc 4500
 ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcctcgtc ctctcactga ggccgggcca 4560
 ccaaaggtcg cccgacgcc gggctthgcc cggggcgctc cagtgagcca gcgagcgcgc 4620
 agctgcctgc agg 4633

<210> 21

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Left-ITR in plasmid rAAV-PLS

<400> 21

cctgcaggca gctgcgcgt ctctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc t 141

<210> 22

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene in plasmid rAAV-PLS

<400> 22

aagcttccca ggaacatgct tgggcagcag gctgtggctc tgattggctt tctggccgtc 60

:aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctggtggct attttgcct 120

tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atgtaggag acaggagacc tctaaagacc 180

ccaggtaac cttagcctgt tactctgaac agggatgtg atctgccagc agatccttgc 240

gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgtgtgagtg tgtgctggga gtcagattct 300

gtgtgtgact ttaacagcc tgctcccttg ctttttcag ggcagaagtc ctcccttaga 360

gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt ttttttttaa agcactgaat 420

agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 480

aagttataaa aaaaattctt tcccataaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540

ctcagtacca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaataaa aattttctcc 600

.ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660

caaggcagtg ggagaaggcg cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720

ggtttggatg tataggagcg aaggcgaga cagcagtggt gcttagagtg gggctcctgag 780

gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840

ggccaagggg gtctgctact gtgtcctccc acccctacct gggctccat cccacagca 900

gaggagaaag aagcctgtcc tccccaggt cagctgcgtt agaggaagaa gactgggcat 960

gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgctcc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080
tttttaaaa gcaaaactgc aatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 1140
ggggaggta ggggtgtgag gtagatggga gcggatagac acatcactca tttctgtgtc 1200
tgtcagaaga accagtagac acttccagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtcctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga cttctctgag cccagtttc cccagcagtg 1440
tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500
tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcaggtg agtgtagggt 1560
gtagggagat tggttcaatg tocaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
ttgtagtct ctccaattcc ctccttcccg gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
cttaagtca gttgacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
ctggcctcaa gatgctttgt tggggtgtct aggtgctcca ggtgcttctg ggagaggtga 1800
cctagtgagg gatcagtggg aatagaggtg atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
gagtgcatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgtcatcc tcctgatctt 1920
ttcagctgca ttgggtaaat ccttgctgc cagagtgggt cagcgggtgag ccagaaaggg 1980
ggctcattct aacagtgtg tgtcctcctg gagagtgccca actcattctc caagtaaaaa 2040

aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca gcgcaccaac gcaggcgagg 2100
gactggggga ggaggggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggctggcct 2160
gctggaactc gccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tgggccccgg 2220
ggaggcgggt cccgggcggc gcggtgggcc gagcgcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280
ccgggcgggg cggttgata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340
ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 23

<211> 1653

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Luciferase-coding sequence in plasmid rAAV-PLS

<400> 23

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaagc ccggcgcctat tctatccgct ggaagatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgaggtggac atcaacttac ctgagtactt cgaaatgtcc 180
gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt 300
gcagttgcgc ccgcaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgggcatt 360
tcgcagccta ccgtggtgtt cgtttccaaa aagggttgc aaaaaatfff gaacgtgcaa 420

aaaaagctcc caatcatcca aaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccaggga 480
tttcagtoga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc cggttttta tgaatacga 540
tttgtccag agtccttga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctctctgga 600
tctactggtc tgcctaaagg tgtcgctctg cctcatagaa ctgcctcgt gagattctcg 660
catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactcgaat ttaagtgtt 720
gttcattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac 840
aagattcaaa gtgcgctgct ggtgccaacc ctattctcct tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgatttata taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct 960
aaggaagtcg gggaagcggg tgccaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat 1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccgg aggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcggta aagtgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgtgggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcctatgat tatgtccggt 1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
ggagacatag ettactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct 1320
ctgattaagt acaaaggcta tcaggtggct cccgctgaat tggaatccat ettgctccaa 1380
caccacaaca tcttcgacgc aggtgtcga ggtcttccc acgatgacgc cggatgaactt 1440
cccgcgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500

tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagttgt gtttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taa 1653

<210> 24

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40-derived polyadenylation signal in plasmid rAAV-PLS

<400> 24

cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt 180
 gggaggtttt ttaaagcaag taaacctct acaaattgtg ta 222

<210> 25

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Right-ITR in plasmid rAAV-PLS

<400> 25

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgtcg ctcaactgagg 60

ccggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> rAAV-PLS-specific primer

<400> 26

tcctggagag tgccaactca ttctc 25

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> rAAV-PLS-specific primer

<400> 27

ttccaggaac cagggcgat ctcttc 26

<210> 28

<211> 2147

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe for rAAV-PLS

<400> 28

agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 60
 aagttataaa aaaaattcct tcccaaaaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 120
 ctcagtacca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaaaaaa aattttctcc 180
 ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 240
 caaggcagtg ggagaaggcg cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 300
 ggtttggatg tataggagcg aagggtcaga cagcagtggg gcttagagtg gggtcctgag 360
 gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 420
 ggccaagggg gtctgctact gtgtcctccc acccctacct gggtcccat cccacagca 480
 gaggagaaag aagcctgtcc tccccgaggt cagctgcggt agaggaagaa gactgggcat 540
 gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtccc 600
 aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 660
 ttttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 720
 ggggagggtca ggggtgtgag gtagatggga gcggatagac acatcactca tttctgtgtc 780
 tgtcagaaga accagtagac acttccagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 840
 catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 900
 gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtccctgtg ttccaactat agtcatttct 960
 ttgctgcatg atctgagtta ggtcaccaga cttctctgag cccagtttc cccagcagtg 1020

tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1080
tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcagggt agtgtagggt 1140
gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1200
ttgtagtct ctccaattcc ctccttcccg gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1260
cttaagttca gtggacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1320
ctggcctcaa gatgctttgt tggggtgtct aggtgctcca ggtgcttctg ggagagggtga 1380
cctagtgagg gatcagtggg aatagagggt atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1440
gaggtgatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgtcatcc tcctgatctt 1500
ttcagctgca ttgggtaaat ccttgctgc cagagtgggt cagcgggtgag ccagaaaggg 1560
ggctcattct aacagtgctg tgtcctcctg gagagtcca actcattctc caagtaaaaa 1620
aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca gcgcaccaac gcaggcgagg 1680
gactggggga ggaggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggctggcct 1740
gctggaactc ggccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tgggccccgg 1800
ggaggcggt cccggcggc gcggtggcc gagcgggt cccgcctct ttaggcgggc 1860
ccggcgggg cgttgtata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 1920
ctccgaagt cagttcttg tggaagcttg gcattccggt actgttgta aagccaccat 1980
ggaagacgcc aaaaacataa agaaagccc ggcgccattc tatccgctgg aagatggaac 2040
cgctggagag caactgcata aggctatgaa gagatacgc ctggttctg gaacaattgc 2100

ttttacagat gcacatatcg aggtggacat cacttacgct gactact 2147

<210> 29

<211> 1145

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Fragment containing HSV-tk-coding sequence in plasmid pORF-HSVtk

<400> 29

ccatggcctc gtaccccggc catcaacacg cgtctcgctt cgaccaggct ggcggttctc 60

gggccatag caaccgacgt acggcgttgc gccctcgccg gcagcaagaa gccacggaag 120

tcccccgga gcagaaaatg cccacgctac tgcgggttta tatagacggt cccacgga 180

tgggaaaac caccaccacg caactgctgg tggcctggg ttgcgcgac gatatcgtct 240

acgtaccga gccgatgact tactggcggg tgctgggggc ttccgagaca atcggaaca 300

tctacaccac acaacaccgc ctgaccagg gtgagatata ggccggggac ggcgcggtgg 360

taatgacaag gcccagata acaatgggca tgccttatgc cgtgaccgac gccgttctgg 420

ctctcatat cgggggggag gctgggagct cacatgccc gccccggcc ctcacctca 480

tcttgaccg ccatccatc gccgcctcc tgtctacc ggccgcgcg taccttatgg 540

gcagcatgac ccccaggcc gtgctggcgt tcgtggcct catcccgcg accttggccc 600

gcaccaacat cgtgcttggg gcccttccgg aggacagaca catgaccgc ctggccaaac 660

gccagcggcc cggcgagcgg ctggacctgg ctatgctggc tgcgattcgc cgcgtttacg 720

ggctacttgc caatacgggtg cggatatctgc agtgcggcgg gtcgtggcgg gaggactggg 780
 gacagctttc ggggacggcc gtgccgcccc agggtgccga gccccagagc aacgcgggcc 840
 cacgacccca tatcggggac acgttattta cctgttttcg ggccccgagc ttgctggccc 900
 ccaacggcga cctgtataac gtgtttgcct gggccttgga cgtcttgccc aaacgcctcc 960
 gttccatgca cgtctttatc ctggattacg accaatcgcc cgccggctgc cgggacgccc 1020
 tgctgcaact tacctccggg atgggtccaga cccacgtcac cacccccggc tccataccga 1080
 cgatatgcca cctggcgcgc acgtttgccc gggagatggg ggaggctaac tgagaattcg 1140
 ctagc 1145

<210> 30

<211> 7230

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pAAV-PLS

<400> 30

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc tgcggcctcg agatctgcca tctaagtaag cttcccagga 180
 acatgcttgg gcagcaggct gtggctctga ttggctttct ggccgtcagg aacatgtccc 240
 aacatgttga gctctggcat agaagaggct ggtggctatt ttgtccttgg gctgcctgtt 300

ttcaggtgag gaaggggatg gtaggagaca ggagacctct aaagaccca ggtaaacctt 360
agcctgttac tctgaacagg gtatgtgatc tgccagcaga tccttgcgac agggctggga 420
tctgatgcat gtgtgcttgt gtgagtgtgt gctgggagtc agattctgtg tgtgactttt 480
aacagcctgc tccttgctt ttttcaggc agaagtctc ccttagagtg tgtctgggta 540
cacattcaag tgcattgttg caaacTTTT ttttaaagc actgaatagt actagacact 600
tagtaggtac ttaagaaata ttgaatgtcg tggTggTggT gagctagaag ttataaaaa 660
aattctttcc caaaaacaac aacaaaaaga attatttcat tgtgaagctc agtaccacaa 720
aaatttaaat aattcattac aagcctttat taaaaaaat tttctccca aagtaaacag 780
acagacaatg tctagtctat ttgaaatgcc tgaagcaga ggggcttcaa ggcagtggga 840
gaagtgccct gtccctgtct ggacatttga caaccagccc tttggatggt ttggatgtat 900
aggagcgaag gtgcagacag cagtggggct tagagtgggg tcctgaggct gtgccgtggc 960
ctttctgggg ttagccaca atcctggcct gactccaggg cgaggcaggc caagggggtc 1020
tgctactgtg tcctcccacc octacctggg ctccatccc cacagcagag gagaaagaag 1080
cctgtcctcc ccgaggtcag ctgcgttaga ggaagaagac tgggcatgtc tgggcagaga 1140
ttccagact ctgagcagcc tgagatgtca gtaattgtag ctgctccaag cctgggttct 1200
gttttttagt gggatttctg ttcagatgaa caatccatcc tctgcaattt tttaaaagca 1260
aaactgcaaa tgtttcaggc acagaaagga ggcaaagtg aagtccaggg gaggtcaggg 1320
gtgtgaggta gatgggagcg gatagacaca tcaactcattt ctgtgtctgt cagaagaacc 1380

agtagacact tccagaattg tcctttatth atgtcatctc cataaacat ctgcaaatga 1440
gggttatttg gcatttttgt cattttggag ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 1500
ccccgggcag gaggcaaaag tcctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgac 1560
tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 1620
tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tcgtcaaate ctccccttcc tggccaacaa 1680
agctgctgca accacagga tttcttctgt tcaggtgagt gtagggtgta gggagattgg 1740
ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg cccttttttg gtagtctctc 1800
caatccctc ctccccgaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtataact aagttcagtg 1860
gacctcaatt tctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 1920
gctttgttgg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgaggat 1980
cagtgggaat agaggtgata ttgtgggct tttctgaaa ttgcagagag gtgcatcgtt 2040
tttataatth atgaattht atgtattaat gtcatcctcc tgatcttttc agctgcattg 2100
ggtaaatcct tgctgccag agtgggtcag cgtgagcca gaaagggggc tcattctaac 2160
agtgtgtgt cctcctggag agtgccaact cattctcaa gtaaaaaag ccagatttgt 2220
ggctcacttc gtggggaat gtgtccagc caccaacgca ggcgaggac tgggggagga 2280
gggaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt cgggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 2340
caggctcagc tggtcggcg ctgggcagcc aggagcctgg gccccgggga gggcggctcc 2400
ggcggcgcg gtgggccgag cgcgggtccc gcctccttga ggcgggccc ggcggggcgg 2460

ttgtatatca gggccgcgct gagctgcgcc agctgaggtg tgagcagctg ccgaagtca 2520
ttccttgtgg aagcttggca ttccggtact gttggtaaag ccacatgga agacgccaaa 2580
aacataaaga aaggccccgc gccattctat ccgctggaag atggaaccgc tggagagcaa 2640
ctgcataagg ctatgaagag atacgcctg gttcctggaa caattgcttt tacagatgca 2700
catatcgagg tggacatcac ttacgctgag tacttcgaaa tgcctgctg gttggcagaa 2760
gctatgaaac gatatgggct gaatacaaat cacagaatcg tcgtatgcag tgaaaactct 2820
cttcaattct ttatgccggt gttgggcgcg ttatttatcg gagttgcagt tgcgcccgcg 2880
aacgacattt ataatgaacg tgaattgctc aacagtatgg gcatttcgca gcctaccgtg 2940
gtgttcgttt ccaaaaaggg gttgcaaaaa attttgaacg tgcaaaaaaa gctcccaatc 3000
atcaaaaaaa ttattatcat ggattctaaa acggattacc agggatttca gtcgatgtac 3060
acgttcgca catctcatct acctcccgtt ttaaatgaat acgattttgt gccagagtcc 3120
ttcgataggg acaagacaat tgcactgatc atgaactcct ctggatctac tggctgcct 3180
aaagtgctc cctcgcctca tagaactgcc tgcgtgagat tctcgcacgc cagagatcct 3240
attttggca atcaaatcat tccgatact gcgattttaa gtgttgttcc attccatcac 3300
ggttttggaa tgtttactac actcggatat ttgatatgtg gatttcgagt cgtcttaatg 3360
tatagatttg aagaagagct gtttctgagg agccttcagg attacaagat tcaaagtgcg 3420
ctgctggtgc caaccctatt ctcttcttc gccaaaagca ctctgattga caaatacgat 3480
ttatctaatt tacacgaaat tgcttctggt ggcctcccc tctctaagga agtcggggaa 3540

gcggttgcca agaggttcca tctgccaggt atcaggcaag gatatgggct cactgagact 3600
acatcagcta ttctgattac acccgagggg gatgataaac cgggcgcggt cggtaaagtt 3660
gttccatttt ttgaagcgaa gtttgtggat ctggataccg ggaaaacgct gggcgttaat 3720
caaagaggcg aactgtgtgt gagaggtcct atgattatgt cggttatgt aaacaatccg 3780
gaagcgacca acgccttgat tgacaaggat ggatggctac attctggaga catagcttac 3840
tggacgaag acgaacactt cttcatcgtt gaccgcctga agtctctgat taagtacaaa 3900
ggctatcagg tggctcccgc tgaattggaa tccatcttgc tccaacaccc caacatcttc 3960
gacgcaggtg tcgcaggtct tcccagacat gacgcggtg aacttcccgc cgccgttgtt 4020
gttttggagc acggaagac gatgacggaa aaagagatcg tggattacgt cgccagtcaa 4080
gtaacaaccg cgaaaaagtt gcgcggagga gttgtgtttg tggacgaagt accgaaaggt 4140
cttaccgaa aactcgacgc aagaaaaatc agagagatcc tcataaaggc caagaagggc 4200
ggaaagatcg ccgtgtaatt ctagagtcgg ggcggccggc cgcttcgagc agacatgata 4260
agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 4320
tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 4380
aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt 4440
taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt aaaatcgata aggatcggcc gcaggaaccc 4500
ctagtatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga 4560
ccaaaggtcg cccgacgcc gggctttgcc cgggcgcgct cagtgagcga gcgagcgcgc 4620

agctgcctgc aggggcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg cggattttca 4680
caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 4740
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 4800
tcgctttctt cccttccttt ctgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc 4860
ggggctccc ttagggctc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 4920
atttgggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcctttga 4980
cgttggagtc cacgttcttt aatagtgac tcttgtcca aactggaaca aactcaacc 5040
ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa 5100
aaaatgagct gatttaaca aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttaca 5160
tttatgggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccg atagttaagc cagccccgac 5220
accgccaac acccgctgac ggcctgac gggctgtct gctcccggca tccgcttaca 5280
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga 5340
aacgcgcgag acgaaagggc ctctgtgata gcctatttt ataggttaat gtcataata 5400
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcgggaaa tgtgcgcgga acccctattt 5460
gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa 5520
tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta 5580
ttccctttt tgcggcattt tgccttctg ttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag 5640
taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg gatctcaaca 5700

gcgtaagat ccttgagagt tttgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta 5760
aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc 5820
gccgataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc 5880
ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca 5940
ctcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc 6000
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca 6060
taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaac ttgcgcaaac 6120
tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg 6180
cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg 6240
ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg 6300
gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac 6360
gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc 6420
aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct 6480
agtggaagat cttttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc 6540
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 6600
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg 6660
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 6720
atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 6780

ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtct 6840
gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa 6900
cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 6960
tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 7020
cgtaagcgg cagggctcga acaggagagc gcacgagga gcttccaggg ggaaacgcct 7080
ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgat 7140
gctcgtcagg gggcgggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggtcc 7200
tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 7230

<210> 31

<211> 6713

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pAAV-PtkS

<400> 31

cctgcaggca gctgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
ggcgacctt tggcgcggc gcctcagtga gcgagcagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc tgcggcctcg agatctcga tctaagtaag cttcccagga 180
acatgcttg gcagcaggct gtggctctga ttggcttct ggccgtcagg aacatgtccc 240
aacatgttga gctctggcat agaagaggct gttggctatt ttgtccttgg gctgcctgtt 300

ttcaggtgag gaaggggatg gtaggagaca ggagacctct aaagaccca ggtaacctt 360
agcctgttac tctgaacagg gtagtgatc tgccagcaga tccttgcgac agggctggga 420
tctgatgcat gtgtgcttgt gtgagtgtg gctgggagtc agattctgtg tgtgactttt 480
aacagcctgc tccttgctt ttttcagggc agaagtctc ccttagagtg tgtctgggta 540
cacattcaag tgcattggtg caaactttt ttttaaagc actgaatagt actagacact 600
tagtaggtac ttaagaaata ttgaatgtcg tgggggtgt gagctagaag ttataaaaa 660
aattctttcc caaaaacaac acaaaaaga attatttcat tgtgaagctc agtaccacaa 720
aaatttaaat aattcattac aagccttat taaaaaaat tttctccca aagtaaacag 780
acagacaatg tctagtctat ttgaaatgcc tgaagcaga ggggcttcaa ggcagtggga 840
gaagtgctc gtcctctgct ggacattga caaccagccc tttggatggt ttggatgtat 900
aggagogaag gtgcagacag cagtggggct tagagtgggg tcttgaggct gtgccgtggc 960
ctttctgggg ttagccaca atcctggcct gactccaggg cgaggcaggc caagggggtc 1020
tgctactgtg tctcccacc octacctggg ctccatccc cacagcagag gagaaagaag 1080
cctgtcctcc ccgaggtcag ctgcgttaga ggaagaagac tgggcatgtc tgggcagaga 1140
ttccagact ctgagcagcc tgagatgtca gtaattgtag ctgctccaag cctgggttct 1200
gttttttagt gggatttctg ttcagatgaa caatccatcc tctgcaattt tttaaaagca 1260
aaactgcaaa tgtttcaggc acagaaagga ggcaaagggt aagtccaggg gaggtcaggg 1320
gtgtgaggta gatgggagcg gatagacaca tcaactcattt ctgtgtctgt cagaagaacc 1380

agtagacact tccagaattg tcctttatatt atgtcatctc cataaacat ctgcaaatga 1440
gggttatttg gcatttttgt cattttggag ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 1500
ccccggcag gaggcaaaag tcctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgac 1560
tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 1620
tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tcgtcaaata cttccccttc tggccaacaa 1680
agctgctgca accacagga tttcttctgt tcaggtgagt gtaggggtga gggagattgg 1740
ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg ccttttttg gtagtctctc 1800
caattccctc ctcccggaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtatactt aagttcagtg 1860
gacctcaatt tcctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 1920
gctttgttg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgaggat 1980
cagtggaat agaggtgata ttgtgggct tttctgaaa ttgcagagag gtgcatcgtt 2040
tttataatatt atgaatattt atgtattaat gtcacctcc tgatcttttc agctgcattg 2100
ggtaaactct tgctgccag agtgggtcag cggtagacca gaaagggggc tcattctaac 2160
agtgtgtgt cctcctggag agtgccaact cattctcaa gtaaaaaaag ccagatttgt 2220
ggctcacttc gtgggaaat gtgtccagcg caccaacgca ggcgaggac tgggggagga 2280
gggaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt ccgggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 2340
caggctcagc tggctcggcg ctgggcagcc aggagcctgg gccccggga gggcggctcc 2400
ggcggcgcg gtggccgag cgcgggtccc gcctccttga ggcgggccc ggcggggcg 2460

ttgtatatca gggccgcgct gagctgcgcc agctgaggtg tgagcagctg ccgaagtcag 2520
ttccttgtgg aagcttgga ttccgtact gttgtaaag ccaccatggc ctcgtacccc 2580
ggccatcaac acgcgtctgc gttcgaccag gctgcgcggt ctcgcggcca tagcaaccga 2640
cgtacggcgt tgcgccctcg ccggcagcaa gaagccacgg aagtccgcc ggagcagaaa 2700
atgccacgc tactgcgggt ttatatagac ggtcccacg ggatggggaa aaccaccacc 2760
acgcaactgc tggtgccct gggttcgcg gacgatctg tctacgtacc cgagccgatg 2820
acttactggc gggtgctggg ggcttcgag acaatcgga acatctacac cacacaacac 2880
cgctcgacc agggtagat atcgccggg gacgcggcg tggtaatgac aagcggccag 2940
ataacaatgg gcatgcctta tgccgtgacc gacgccgttc tggtcctca tatcgggggg 3000
gaggctggga gtcacatgc cccgccccg gccctcacc tcattctga ccgcatccc 3060
atcgccgcc tctgtgcta cccggccgg cggtacctta tgggcagcat gacccccag 3120
gccgtgctgg cgttcgtgg cctcatccg ccgacctgc ccggcacaa catcgtgctt 3180
ggggcccttc cggaggacag acacatcgac cgctggcca aacgccagc cccggcgag 3240
cggctggacc tggtatgct ggctgcgatt cgccgcttt acgggctact tgccaatac 3300
gtgcggtatc tgcagtgcgg cgggtcgtg cgggaggact ggggacagct ttcggggac 3360
gccgtgccg cccaggtgc cgagccccag agcaacgcgg gccacgacc ccatatcgg 3420
gacacgttat ttaccctgt tcgggcccc gagttgctg ccccaacgg cgacctgat 3480
aacgtgttg cctgggcctt ggacgtctt gccaaacgc tccgttccat gcacgtctt 3540

atcctggatt acgaccaatc gcccgccggc tgccgggacg ccctgctgca acttacctcc 3600
gggatgggcc agaccacagt caccaccccc ggctccatac cgacgatatg cgacctggcg 3660
cgcacgtttg cccgggagat gggggaggct aactgagaat tcgctagagt cggggcggcc 3720
ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa 3780
tgcagtghaa aaaatgcttt atttgtghaa tttgtgatgc tattgcttta tttghaacca 3840
ttataagctg caataaacia gttacaacia acaattgcat tcattttatg tttcaggttc 3900
agggggaggt gtgggaggtt ttttaagca agtaaacct ctacaaatgt gghaaaatcg 3960
ataagatcg gccgcaggaa ccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc 4020
gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg 4080
cctcagttag cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagggcg cctgatgagg tattttctcc 4140
ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccga tacgtcaaag caacatagt acgcgcctg 4200
tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt gttacgcgc agcgtgaccg ctacacttc 4260
cagcgccta gcgccgctc ctttcgcttt cttcccttc tttctcgca cgttcgccg 4320
cttccccgt caagctctaa atcggggct cccttaggg ttccgattta gtgctttacg 4380
gcacctgac ccaaaaaac ttgatttggg tgatggttca cgtagtggc catcgccctg 4440
atagacggtt tttgcctt tgacgttga gtccagttc ttaaatagt gactcttgtt 4500
ccaaactgga acaaacctca accctatctc gggtattct tttgatttat aaggatttt 4560
gccgatttcg gcctattggt taaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcaattt 4620

taacaaaata ttaacgttta caatittatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 4680
cgcatagtta agccagcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct gacggccttg 4740
tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 4800
gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcg cagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt 4860
tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg 4920
aaatgtgcgc ggaacccta ttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct 4980
catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 5040
tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgccgca ttttgccttc ctgtttttgc 5100
tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg caccagtggtg 5160
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 5220
ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc goggtattat cccgtattga 5280
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat aactattct cagaatgact tggttgagta 5340
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 5400
tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 5460
gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 5520
ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc 5580
aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggogaacta ctactctag cttccggca 5640
acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 5700

tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat 5760
cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg 5820
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat 5880
taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 5940
tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaact 6000
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 6060
ttcttgagat ccttttttct tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 6120
accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 6180
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca 6240
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 6300
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 6360
taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 6420
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga 6480
agggagaaag gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 6540
ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttct gccacctctg 6600
acttgacgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggcgag agcctatgga aaaacgccag 6660
caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgt 6713

<210> 32

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Left-ITR in plasmid pAAV-PtkS

<400> 32

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc 60

ggcgcacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 33

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene in plasmid pAAV-PtkS

<400> 33

aagcttccca ggaacatgct tgggcagcag gctgtggctc tgattggctt tctggcctc 60

aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctggtggct atttgtcct 120

tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atgtaggag acaggagacc tctaaagacc 180

ccaggtaaac cttagcctgt tactctgaac aggtatgtg atctgccagc agatccttgc 240

gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgttgagtg tgtgctggga gtcagattct 300

gtgtgtgact ttaacagcc tgctcccttg cctttttcag ggcagaagtc ctcccttaga 360

gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt ttttttttaa agcactgaat 420
agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtggtggt ggtgagctag 480
aagttataaa aaaaattctt tcccataaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540
ctcagtacca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaaaaaa aattttctcc 600
ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660
caaggcagtg ggagaagggt cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720
ggtttggatg tataggagcg aagggtcaga cagcagtggg gcttagagtg gggctctgag 780
gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840
ggccaagggg gtctgtact gtgtcctccc acccctacct gggtcccat cccacagca 900
gaggagaaag aagcctgtcc tccccaggt cagctgcggt agaggaagaa gactgggcat 960
gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtctc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080
tttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 1140
ggggaggta ggggtgtgag gtagatgga gcggatagac acatcactca tttctgtgtc 1200
tgtcagaaga accagtagac acttccagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtcctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga cttctctgag cccagtttc cccagcagtg 1440

tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500
tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcagggt agttagggt 1560
gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
ttgtagtct ctccaattcc ctcttcccg gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
cttaagtcca gtggacctca atttctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
ctggcctcaa gatgctttgt tggggtgtct aggtgtcca ggtgcttctg ggagaggta 1800
cctagtgagg gatcagtggg aatagagggt atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
gaggtgcatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgcatcc tctgatctt 1920
ttcagctgca ttgggtaaat ccttgccctgc cagagtgggt cagcggtgag ccagaaaggg 1980
ggctcattct aacagtgctg tgtcctcctg gagagtgcca actcattctc caagtaaaaa 2040
aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca ggcaccaac gcaggcgagg 2100
gactggggga ggagggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggtggcct 2160
gctggaactc ggccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tggccccgg 2220
ggaggcggt cccggcggc gcggtggcc gagcgcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280
ccggcgggg cggttgata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340
ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 34

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HSV-tk-coding sequence in plasmid pAAV-PtkS

<400> 34

```

atggcctcgt accccggcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc   60
ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcgcggc agcaagaagc cacggaagtc   120
cgcccggagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc ccacgggatg   180
gggaaaacca ccaccagca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac   240
gtacccgagc cgatgactta ctggcgggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc   300
tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtgta   360
atgacaagcg cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct   420
cctcatatcg ggggggagcg tgggagctca catgcccgc ccccgccct caccctcatc   480
ttcgaccgcc atcccatcgc cgccctctg tgctaccgg ccgcgcgta cttatgggc   540
agcatgacc cccaggccgt gctggcgtc gtggccctca tcccggcag cttgcccggc   600
accaacatcg tgcttggggc cttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc   660
cagcgcctcg gcgagcggct ggacctggct atgctggctg cgattcgccg cgtttacggg   720
ctacttgcca atacggtgcg gtatctgcag tgcggcgggt cgtggcggga ggactgggga   780
cagctttcgg ggacggccgt gccgcccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc   840
cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg ccccagatt gctggcccc   900

```

aacggcgacc tgtataacgt gtttgccctgg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt 960
 tccatgcacg tctttatcct ggattacgac caatcgcccg cggctgccg ggacgccctg 1020
 ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccccggctc cataccgacg 1080
 atatgcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 35

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40-derived polyadenylation signal in plasmid pAAV-PtkS

<400> 35

cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc atttatggtt tcaggttcag ggggaggtgt 180
 gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg ta 222

<210> 36

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Right-ITR in plasmid pAAV-PtkS

<400> 36

aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccg -ggcggcctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 37

<211> 4116

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid rAAV-PtkS

<400> 37

cctgcaggca gctgcgct cgctcgctca ctgaggccg ccgggcaaag cccgggcgtc 60
 gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttc tgcggcctcg agatctcga tctaagtaag cttcccagga 180
 acatgcttg gcagcaggct gtggctctga ttggctttct ggccgtcagg aacatgtccc 240
 aacatgttga gctctggcat agaagaggct gttggctatt ttgtccttgg gctgcctgtt 300
 ttcaggtgag gaaggggatg gtaggagaca ggagacctct aaagacceca ggtaaacctt 360
 agcctgttac tctgaacagg gtatgtgatc tgccagcaga tccttgcgac agggctggga 420
 tctgatgcat gtgtgcttgt gtgagtgtgt gctgggagtc agattctgtg tgtgactttt 480
 aacagcctgc tcccttgct ttttcagggc agaagtctc ccttagagtg tgtctgggta 540
 cacattcaag tgcattgtt caaactttt tttttaagc actgaatagt actagacact 600

tagtaggtac ttaagaaata ttgaatgtcg tgggtggtggt gagctagaag ttataaaaaa 660
aattctttcc caaaaacaac aacaaaaaga attatttcat tgtgaagctc agtaccacaa 720
aaattttaat aattcattac aagcctttat taaaaaaat tttctccca aagtaaacag 780
acagacaatg tctagtctat ttgaaatgcc tgaagcaga ggggcttcaa ggcagtggga 840
gaaggtgcct gtcctctgct ggacatttga caaccagccc tttgatggt ttgatgtat 900
aggagcgaag gtgcagacag cagtgggct tagagtgggg tcttgaggct gtgccgtggc 960
ctttctgggg ttagccaca atcctggcct gactccaggg cgaggcaggc caaggggctc 1020
tgctactgtg tctcccacc cctacctggg ctccatccc cacagcagag gagaaagaag 1080
cctgtcctcc cagaggtcag ctgcgttaga ggaagaagac tgggcatgtc tgggcagaga 1140
ttccagact ctgagcagcc tgagatgtca gtaattgtag ctgctccaag cctgggttct 1200
gttttttagt gggatttctg ttcagatgaa caatccatcc tctgcaattt tttaaaagca 1260
aaactgcaaa tgtttcaggc acagaaagga ggcaaagtg aagtcaggg gaggtcaggg 1320
gtgtgaggta gatgggagcg gatagacaca tcaactcatt ctgtgtctgt cagaagaacc 1380
agtagacact tccagaattg tcctttattt atgtcatctc cataaacat ctgcaaatga 1440
gggttatttg gcatttttgt cattttggag ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 1500
ccccgggcag gaggcaaaag tctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgac 1560
tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 1620
tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tegtcaaatc ctccccttcc tggccaacaa 1680

agctgctgca accacagga tttcttctgt tcaggtgagt gtagggtgta gggagattgg 1740
ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg cccttttttg gtagtctctc 1800
caattccctc cttcccggaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtatactt aagttcagtg 1860
gacctcaatt tctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 1920
gctttgttgg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgaggat 1980
cagtgggaat agaggtgata ttgtgggct tttctggaaa ttgcagagag gtgcatcgtt 2040
tttataattt atgaattttt atgtattaat gtcacctcc tgatcttttc agctgattg 2100
ggtaaatcct tgcctgccag agtgggtcag cgtgagcca gaaagggggc tcattctaac 2160
agtgctgtgt cctcctggag agtgccaact cattctcaa gtaaaaaag ccagattgt 2220
ggctcacttc gtggggaat gtgtccagcg caccaacgca ggcgaggac tgggggagga 2280
gggaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt cgggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 2340
caggctcagc tggctcggcg ctgggcagcc aggagcctgg gccccggga gggcgtccc 2400
ggcggcgcg gtgggccgag cgcgggtccc gcctccttga ggcgggccc ggcggggcgg 2460
ttgtatatca gggccgcgt gagctgcgcc agctgaggtg tgagcagctg ccgaagtcag 2520
ttccttggg aagcttgca ttccgtact gttgtaaag ccaccatggc ctcgtacccc 2580
ggccatcaac acgcgtctgc gttcgaccag gctgcgcgtt ctgcggcca tagcaaccga 2640
cgtacggcgt tgcgcctcg ccggcagcaa gaagccacgg aagtccgcc ggagcagaaa 2700
atgccacgc tactgcggtt ttatatagac gttcccacg gtaggggaa aaccaccacc 2760

acgcaactgc tgggtggcct gggttcgcgc gacgatatcg tctacgtacc cgagccgatg 2820
acttactggc ggggtgctggg ggcttccgag acaatcgca acatctacac cacacaacac 2880
cgctcgcacc aggggtgagat atcggccggg gacggcgcg tggtaatgac aagcggccag 2940
ataacaatgg gcatgcctta tgccgtgacc gacggcgttc tggtcctca tatcgggggg 3000
gaggctggga gctcacatgc cccgccccg gccctcacc tcattcttga ccgcatccc 3060
atcggcccc tctgtgcta cccggccgg cggtacctta tgggcagcat gacccccag 3120
gccgtgctgg cgttcgtggc cctcatccg ccgaccttc cggcaccaa catcgtgctt 3180
ggggcccttc cggaggacag acacatcgac cgctggcca aacgccagcg ccccgcgag 3240
cggctggacc tggctatgct ggctgcgatt cgcccggtt acgggctact tgccaatacg 3300
gtcgggtatc tgcagtgcgg cgggtcgtg cgggaggact ggggacagct ttcggggacg 3360
gccgtgccg cccagggtgc cgagccccag agcaacgcgg gccacgacc ccatatcggg 3420
gacacgttat ttaccctgt tcgggcccc gattgctgg ccccaacgg cgacctgat 3480
aacgtgttg cctgggcctt ggacgtctt gccaaacgcc tccgttccat gcacgtcttt 3540
atcctggatt acgaccaatc gccgcccgc tgccgggacg cctgctgca attacctcc 3600
gggatgtcc agaccacgt caccacccc ggtccatac cgacgatatg cgacctggcg 3660
cgcacgtttg cccgggagat gggggaggct aactgagaat tcgctagagt cggggcggcc 3720
ggccgcttc agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa 3780
tgcagtgaat aaaatgcttt atttgtaaa tttgatgac tattgcttta tttgtaacca 3840

ttataagctg caataaaca gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggtc 3900
 agggggaggt gtgggaggt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcg 3960
 ataaggatcg gccgcaggaa ccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcgctc 4020
 gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccagc ccgggcttt gcccgggcgg 4080
 cctcagtgag cgagcgagc gcagctgcc tgcagg 4116

<210> 38

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Left-ITR in plasmid rAAV-PtkS

<400> 38

cctgcaggca gctgcgct cgctcgtca ctgaggccg ccgggcaaag cccgggcgctc 60

ggcgacctt tggcgcgg gcctcagtga gcgagcagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttc t 141

<210> 39

<211> 2369

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' flanking region of p21 gene in plasmid rAAV-PtkS

<400> 39

aagcttccca ggaacatgct tgggcagcag gctgtggctc tgattggctt tctggccgtc 60
aggaacatgt cccaacatgt tgagctctgg catagaagag gctgggtggct attttgcct 120
tgggctgcct gttttcaggt gaggaagggg atggtaggag acaggagacc tctaaagacc 180
ccaggtaac ctagcctgt tactctgaac agggtatgtg atctgccagc agatccttgc 240
gacagggctg ggatctgatg catgtgtgct tgtgtgagtg tgtgctggga gtcagattct 300
gtgtgtgact ttaacagcc tgctcccttg ctttttcag gcagaagtc ctccttaga 360
gtgtgtctgg gtacacattc aagtgcattg ttgcaaactt tttttttaa agcactgaat 420
agtactagac acttagtagg tacttaagaa atattgaatg tcgtgggtgt ggtgagctag 480
aagttataaa aaaaattctt tcccaaaaac aacaacaaaa agaattattt cattgtgaag 540
ctcagtagca caaaaattta aataattcat tacaagcctt tattaaaaaa aattttctcc 600
ccaaagtaaa cagacagaca atgtctagtc tatttgaat gcctgaaagc agaggggctt 660
caaggcagtg ggagaagggt cctgtcctct gctggacatt tgacaaccag ccctttggat 720
ggtttggatg tataggagcg aagggtcaga cagcagtggg gcttagagtg gggctctgag 780
gctgtgccgt ggcctttctg gggtttagcc acaatcctgg cctgactcca gggcgaggca 840
ggccaagggg gctgctact gtgtcctccc accctacct gggctccat cccacagca 900
gaggagaaag aagcctgtcc tccccaggt cagctcggtt agaggaagaa gactgggcat 960
gtctgggcag agatttccag actctgagca gcctgagatg tcagtaattg tagctgtccc 1020
aagcctgggt tctgtttttt agtgggattt ctgttcagat gaacaatcca tcctctgcaa 1080

ttttttaaaa gcaaaactgc aaatgtttca ggcacagaaa ggaggcaaag gtgaagtcca 1140
ggggagggtca ggggtgtgag gtagatggga gcgatagac acatcactca tttctgtgc 1200
gtcagaaga accagtagac acttcagaa ttgtccttta tttatgtcat ctccataaac 1260
catctgcaaa tgagggttat ttggcatttt tgtcattttg gagccacaga aataaaggat 1320
gacaagcaga gagccccggg caggaggcaa aagtctgtg ttccaactat agtcatttct 1380
ttgtgcatg atctgagtta ggtcaccaga cttctctgag cccagtttc cccagcagtg 1440
tatacgggct atgtggggag tattcaggag acagacaact cactcgtcaa atcctcccct 1500
tcctggccaa caaagctgct gcaaccacag ggatttcttc tgttcaggtg agtgtagggt 1560
gtagggagat tggttcaatg tccaattctt ctgtttccct ggagatcagg ttgccctttt 1620
ttggtagtct ctccaattcc ctccttcccg gaagcatgtg acaatcaaca actttgtata 1680
cttaagttca gtggacctca atttcctcat ctgtgaaata aacgggactg aaaaatcatt 1740
ctggcctcaa gatgctttgt tgggtgtct aggtgctcca ggtgcttctg ggagaggtga 1800
cctagtgagg gatcagtggg aatagaggtg atattgtggg gcttttctgg aaattgcaga 1860
gaggtgcatc gttttataa tttatgaatt tttatgtatt aatgtcatcc tctgatctt 1920
ttcagctgca ttgggtaaat cttgcctgc cagagtgggt cagcgggtgag ccagaaaggg 1980
ggctcattct aacagtgtg tgctctctg gagagtgcca actcattctc caagtaaaaa 2040
aagccagatt tgtggctcac ttcgtgggga aatgtgtcca gcgaccaac gcaggcgagg 2100
gactggggga ggagggaagt gccctcctgc agcacgcgag gttccgggac cggctggcct 2160

gctggaactc ggccaggctc agctggctcg gcgctgggca gccaggagcc tgggccccgg 2220
 ggaggcggt cccgggcggc gcggtggcc gagcgggt cccgcctcct tgaggcgggc 2280
 ccggcgggg cggttgata tcaggccgc gctgagctgc gccagctgag gtgtgagcag 2340
 ctgccgaagt cagttccttg tggaagctt 2369

<210> 40

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HSV-tk-coding sequence in plasmid rAAV-PtkS

<400> 40

atggcctcgt accccggcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc 60
 ggccatagca accgacgtac ggcgttgccg cctcggcggc agcaagaagc cacggaagtc 120
 cgccccgagc agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc ccacgggatg 180
 gggaaaacca ccaccacgca actgctggtg gcctggggtt cgcgcgacga tatcgtctac 240
 gtaccgagc cgatgactta ctggcgggtg ctgggggctt ccgagacaat cggaacatc 300
 tacaccacac aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtgta 360
 atgacaagcg cccagataac aatgggcatg cttatgccg tgaccgacgc cgttctggct 420
 cctcatatcg ggggggagc tgggagctca catgccccgc ccccgccct caccctcatc 480
 ttcgaccgcc atccatcgc cgcctcctg tgctaccgg ccgcgcgta cttatggc 540

agcatgacct cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgcggac cttgcccggc 600
 accaacatcg tgcttggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc 660
 cagcgcctcg gcgagcggct ggacctggct atgctggctg cgattcgccg cgtttacggg 720
 ctacttgcca atacggtgcg gtatctgcag tgcggcgggt cgtggcggga ggactgggga 780
 cagctttcgg ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggcccc 840
 cgaccccata tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggcccc 900
 aacggcgacc tgtataactg gtttgccctg gccttgagc tcttgccaa acgcctccgt 960
 tccatgcacg tttttatcct ggattacgac caatcggccg ccggtgccg ggacgccctg 1020
 ctgcaactta cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca cccccggctc cataccgacg 1080
 atatcgacc tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaactg a 1131

<210> 41

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40-derived polyadenylation signal in plasmid rAAV-PtkS

<400> 41

cagacatgat aagatacatt gatgagttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt 180

gggaggtttt ttaaagcaag taaacctct acaaatgtg ta 222

<210> 42

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Right-ITR in plasmid rAAV-PtkS

<400> 42

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgcccg ggccgctca gtgagcgagc 120

gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HSV-tk-specific primer

<400> 43

cggagcagaa aatgcccacg 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HSV-tk-specific primer

<400> 44

tgctgccat aaggtaccgc

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Actin-specific primer

<400> 45

gtagccatcc aggctgtgtt

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Actin-specific primer

<400> 46

cagtgaggcc aggatagagc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/011088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/864, A61K35/76, 48/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/864, A61K35/76, 48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mitsuru NEI et al., "Teisenryo Hoshasen Otosei Vector no Kochiku", The Japan Radiation Research Society Koen Yoshishu, 46th, 2003, page 130	1-9
Y	Daino K. et al., Comprehensive search for X-ray-responsive elements and binding factors in the regulatory region of the GADD45a gene, J.Radiat.Res., 2003, Vol.44, pages 311 to 318	1-9
Y	US 2003/0004125 A1 (David G. Hirst), 02 January, 2003 (02.01.03), Full text (Family: none)	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 04 July, 2005 (04.07.05)	Date of mailing of the international search report 19 July, 2005 (19.07.05)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/011088

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ponnazhagan S. et al., Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor, <i>Cancer Res.</i> , 2004 Mar, Vol.64, pages 1781 to 1787	1-9
Y	Davidoff A.M. et al., rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice, <i>Cancer Res.</i> , 2002, Vol.62, page 3077 to 3083	1-9
Y	Ogata T. et al., Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA, <i>J.Virol.</i> , 2003, Vol.77, pages 9000 to 9007	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/011088

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.: 10-17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 to 17 pertain to [methods for treatment of the human body by therapy] and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ C12N15/864, A61K35/76, 48/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/864, A61K35/76, 48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	根井充ら, 低線量放射線応答性ベクターの構築, 日本放射線影響学会講演要旨集, 46th, 2003, p.130	1-9
Y	Daino K. et al., Comprehensive search for X-ray-responsive elements and binding factors in the regulatory region of the GADD45a gene, J. Radiat. Res., 2003, vol.44, p.311-318	1-9
Y	US 2003/0004125 A1 (David G. Hirst) 2003.01.02, 全文 ファミリーなし	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
04.07.2005

国際調査報告の発送日
19.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 高堀 栄二
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ponnazhagan S. et al., Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor, <i>Cancer Res.</i> , 2004 Mar, vol.64, p.1781-1787	1-9
Y	Davidoff A.M. et al., rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice, <i>Cancer Res.</i> , 2002, vol.62, p.3077-3083	1-9
Y	Ogata T. et al., Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA, <i>J. Virol.</i> , 2003, vol.77, p.9000-9007.	1-9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 10-17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲10-17は [治療による人体の処置方法に関するもの] であって、PCT規則 39.1(iv) の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。