

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3711367号

(P3711367)

(45) 発行日 平成17年11月2日(2005.11.2)

(24) 登録日 平成17年8月26日(2005.8.26)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 K 67/027

A O 1 K 67/027

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 6 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2001-157567 (P2001-157567)  
 (22) 出願日 平成13年5月25日(2001.5.25)  
 (65) 公開番号 特開2002-345477 (P2002-345477A)  
 (43) 公開日 平成14年12月3日(2002.12.3)  
 審査請求日 平成13年7月5日(2001.7.5)

特許法第30条第1項適用 平成12年11月25日  
 第23回日本分子生物学会年会組織委員会発行の「第2  
 3回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に  
 発表

微生物の受託番号 FERM P-18341

(73) 特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (73) 特許権者 598081621  
 株式会社トランスジェニック  
 熊本県上益城郡益城町田原1155-5  
 (73) 特許権者 504159235  
 国立大学法人 熊本大学  
 熊本市黒髪二丁目39番1号  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (72) 発明者 井出 博之  
 福岡県福岡市中央区平尾4-10-11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ノックアウト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号7に示すTubedown-1遺伝子が破壊されたノックアウトマウス。

【請求項2】

前記遺伝子の破壊が、

SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV

(ここで、SAはプライスアクセプターを、IRESは分子内リボゾームエンター部位を、M  
 はマーカー遺伝子を、pAはポリA配列を、PVはプラスミドベクターをそれぞれ表す。)  
 を含むトラップベクターの導入によって行われる、請求項1記載のノックアウトマウス。

【請求項3】

前記lox71配列が配列番号1に示されるものである、請求項2記載のノックアウトマウス。

【請求項4】

配列番号7に示すTubedown-1遺伝子が破壊されたノックアウトマウスの作製方法であって、

SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV

(ここで、SAはプライスアクセプターを、IRESは分子内リボゾームエンター部位を、M  
 はマーカー遺伝子を、pAはポリA配列を、PVはプラスミドベクターをそれぞれ表す。)  
 を含むトラップベクターをマウス胚幹細胞に導入して前記遺伝子が破壊された胚幹細胞を  
 選別し、

10

20

前記遺伝子が破壊された胚幹細胞からキメラ胚を作製し、  
前記キメラ胚を仮親マウスの子宮に移植し、出産により仔マウスを得て、前記遺伝子が  
破壊されたキメラマウスを選別し、  
前記キメラマウスの雌と雄の交配によって前記ノックアウトマウスを得る、  
工程を含む方法。

【請求項 5】

前記 lox71 配列が配列番号 1 に示されるものである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記選別された胚幹細胞が寄託クローン FERM P-18341 である、請求項 4 又は 5 記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子トラップ法によるランダム変異 ES クローン技術により得られた胚幹細胞及びノックアウト動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析は 2003 年又はそれ以前に終了すると言われている。したがって、個々に遺伝子を単離し、構造解析を行なう時代ではなく、ゲノムの「機能解析」の時代に入ったといえる。

20

【0003】

しかし、ゲノムの塩基配列のみでは、機能に関する情報は十分でないため、機能解析のための新しい解析系が必要である。さらに、ヒトゲノム解析の一つの大きな目標はヒト疾患の原因遺伝子の解明であるが、原因遺伝子の構造だけでは病気を説明することはできない。また、ヒト患者を用いて実験することはできず、発症機構を解析することはできない。したがって、原因遺伝子の同定後の発症過程の解析と新たな治療法の開発のためには、モデル個体の作製が必須課題となっている。

【0004】

一方、ゲノムを、その構造から遺伝子部分とそれ以外の部分に分けるとすれば、それぞれ別個の機能を有すると考えられ、両者の機能を解析することが必要である(図1)。ゲノム全体から見れば、個々の遺伝子は一部の機能しか果たしておらず、ゲノムは単に遺伝子の集合体ではなく、まだ知られていない機能を有しているとも考えられる。事実、position effect mutation という新しい概念が成立したことから、ゲノムには機能が未知の領域を有するものと推察される。

30

【0005】

遺伝子部分については、調節領域とコード領域があるが、現在ゲノム機能解析の標的となっているのは、コード領域である。ヒトとマウスを比べてみても、遺伝子の種類はほぼ同じであるため、調節領域の機能解析は重要である。但し、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子との間には、種の相違がある。この違いは、タンパク質の違いではなく、遺伝子発現の調節の違いによるものと思われる。

40

【0006】

発現調節にあずかる転写因子等の機能は、遺伝子のコード領域の配列から解明することができる。その転写因子が結合するエレメントの解析は、一つの遺伝子の調節領域内に多数存在するので、機能の解明は現在のところ極めて困難である。但し、機能解析の一手法として、細菌人工染色体を用いる方法等が考え得る。

【0007】

コード領域の機能解析のレベル(対象)は、mRNA レベル、蛋白レベル、細胞レベル、組織・臓器レベル、個体レベルが考えられる。mRNA レベルは、DNA チップで対応できると考えられる。他方、mRNA 以外のレベルの解析を考えると、胚幹細胞(ES細胞)を利用するのが最も良い方法と思われる。なぜなら、ES細胞から直接 in vitro で、各種細胞や組織の誘

50

導糸が開発されているものもあるし、今後開発され得る可能性のあるものも多いからである。また、個体レベルの解析系が樹立できる利点もあるためである。

【0008】

上記から、ゲノムの機能解析を考える上でも、ES細胞レベルでの遺伝子破壊とそのマウスの作製は極めて重要であることがわかる。

これまでは、ES細胞を用いた相同遺伝子組換え法が、遺伝子破壊マウス作製において主役を演じていたが、これを個々の遺伝子破壊マウスを作製するという戦術としてではなく、網羅的に作製するという戦略的な立場から見たとき、大きな問題点がある。

【0009】

第1は、時間がかかりすぎることである。遺伝子破壊マウス作製において、ES細胞を用いた相同組換えによるノックアウトESクローンを単離することが律速段階となっている。1人の熟練した研究者でも、ノックアウトESクローンを単離するには最低3ヵ月かかるので、年間4遺伝子を破壊できるにすぎない。従って、10万個の遺伝子にそれぞれ一つの変異を導入する場合は、1年あたり25,000人が必要とされる。現在世界中で、1年間に約1000系統の遺伝子破壊マウスが作製されていると見積もられている。そうすると、ノックアウトESクローンを10万種類作製するのに100年かかることになる。これでは、2003年に終了するといわれているヒトゲノムの構造解析の進展と比較しても、現実的ではない。

10

【0010】

第2は、コストがかかりすぎることである。1系統の遺伝子破壊マウス作製のため、人件費及び減価償却費を除いても、最低200~400万円必要である。したがって、10万個の単純な遺伝子破壊マウス作製だけで2,000~4,000億円必要となる。以上のように、従来のES細胞を用いた相同遺伝子組換えには問題点があり、また、ゲノムは巨大ではあるが、数は決まっている。従って、この中から重要な機能を持つ遺伝子を単離することが必要となる。遺伝子の機能については、遺伝子破壊マウスを作製して初めて明らかになることが多いことから、遺伝子破壊マウスは将来画期的な薬剤の開発等にも直結し、極めて付加価値が高い。従って、「ランダム」かつ「大規模」にマウスの変異体作製を行なうのが世界の「戦略」となっており、現在のところ、以下に述べる3つの方法が、ランダム変異マウス作製において、もっとも妥当であると考えられている。

20

【0011】

第1は、変異原物質であるエチルニトロソウレア(ethylnitrosourea:ENU)を用いる方法である。ENUを用いた方法による大規模な突然変異体作製のプロジェクトがヨーロッパで開始されている。ドイツではヒトゲノムプロジェクトの一貫として哺乳類遺伝学研究所のパリング博士を中心として1997年度に開始した。英国においてもスミスクライン社が資金を提供し、Harwe11にあるMRCのマウスゲノムセンターにおいてブラウン博士を中心として主に脳・神経系の突然変異マウスを樹立することを目的として開始している。現在までに、両者併せて、優性遺伝を示す変異マウスが約200系統樹立され、予想よりもよい効率でプロジェクトが進行している。米国においてもケースウエスタンリザーブ大学やオークリッジ国立研究所を中心として、膨大な予算(年間60億円)でマウスゲノムの構造解析やENU法による変異体作製が始まることとなった。

30

【0012】

ENUを成熟雄マウスに投与すると、減数分裂前の精原細胞に作用し、1細胞当たり約50-100カ所に点突然変異をランダムに引き起こす。そして、1つの遺伝子座につきおよそ1/1,000/配偶子の頻度で突然変異が起こる。したがって、1匹の処理マウスを雌マウスと交配することにより、F1世代で多種類の変異マウスを作製できる。また、ENUを用いる方法は、特定の遺伝子座について1,000匹をスクリーニングすれば、1匹はその遺伝子に変異が生じている確率となるため、極めて効率がよいと考えられている。

40

【0013】

第2は、やはり変異原物質であるクロラムブシルを用いる方法である。この方法によれば、ENU法と同じ頻度で精原細胞に突然変異を引き起こす。ただし、この場合は時に1メガベースに及ぶ欠失変異が生じる。

50

第3は遺伝子トラップ法によるものである。遺伝子トラップ法とは、マーカー遺伝子を含むトラップベクターをES細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標として未知遺伝子の探索を行なうことを目的として開発された方法である。トラップベクターの組み込みはランダムであり、その組み込みにより、殆どの場合内在性遺伝子（本来、その細胞や組織に存在する遺伝子）は破壊される。したがって、そのES細胞を用いてキメラマウスを作製することにより、種々の遺伝子破壊マウスを作製できる。

しかしながら、これら変異原物質を用いる方法及び遺伝子トラップ法は、それぞれ利点と欠点を有する(表1)。

【0014】

【表1】

	ENU法	クロラムブシル法	遺伝子トラップ法
変異の性質	点変異	欠失変異	自在の変異
変異マウス作製	容易	容易	困難
変異遺伝子同定	困難	中程度	容易
その他の特徴			ESトラップクローンの利用が可能

10

【0015】

ENU法は、変異マウスの作製は容易であるが、個々の変異系統の樹立は、交配により分離を行わなければならない。また、変異した遺伝子の同定には、まず多型DNAマーカーを用いた連鎖解析により遺伝子座を同定し、その後ポジショナルクローニング法により遺伝子を単離しなければならない。従って、ENU法は操作が煩雑である。

20

【0016】

クロラムブシル法は、変異マウスの作製は容易であるが、欠失部位を同定しなければならず、そのためには多数の多型DNAマーカーを用いて解析する必要がある。また、一般的に、クロラムブシル法などの変異原物質法では、大規模の飼育室を必要とするため、費用及び労力がかかる。

【0017】

遺伝子トラップ法は、変異マウスの作製に手間と技術を要するが、変異遺伝子の同定は容易であり、飼育室の規模に応じて実験可能である。遺伝子トラップESクローンはそれ自体ゲノム機能解析のための貴重なリソースとなり、この点も他の方法と際立って異なる点である。

30

【0018】

遺伝子トラップ法についても、世界のいくつかの研究室で変異体作製が始まっている。米国では、民間のレキシコンジェネティクス社がレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップによるランダム破壊を行なっている。しかし、遺伝子をトラップできていても、内在性遺伝子を破壊できているかどうか定かでないこと、生殖キメラマウスが作製できるかどうか不明であること、キメラマウス作製は別料金を要求されること、利用するに当たって相当な金額を要求していることなどから、一般の研究者にとっては殆ど利用できない状況である。また、ドイツではENUプロジェクトの一貫としても12,000クローンを目標として遺伝子トラップが行なわれている。いずれにしても、マウス系統の樹立よりも、トラップした遺伝子の解析を先行させる方法で進められている。

40

【0019】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、トラップベクターを用いた遺伝子トラップ法によりトラップされた遺伝子が導入されたノックアウト動物を提供することを目的とする。

【0020】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究の結果、遺伝子トラップ法にバクテリオフ

50

アージ由来の組換えシステムである、Cre-loxPを利用することを思いつき、本発明を完成するに至ったものである。ここでCreは組換え酵素であり、loxP配列を認識して、この部位で組換えを起こすものである。

【0021】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) 逆反復配列1、スペーサー配列及び逆反復配列2の順で構成されるloxP配列のうち逆反復配列1及び/又は逆反復配列2の一部の配列に変異が導入された変異型loxPを含むトラップベクターを導入してなる胚幹細胞又はロックアウト動物であって、Tubedown-1遺伝子が破壊された胚幹細胞又はロックアウト動物。

変異型loxPとしてはlox71(例えば配列番号1に示されるもの)又はlox66(例えば配列番号2に示されるもの)が挙げられる。また、トラップベクターとしては、以下の(a)~(j)に示すものから選ばれるいずれかのものが挙げられる。

【0022】

(a) SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV

(b) lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV

(c) SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-puro-pA-lox511-PV

(d) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(e) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(f) (lox71が組み込まれたSA)-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(g) (lox71が組み込まれたSA)-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511

(h) (lox71が組み込まれたSA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD

(i) loxP-SA-IRES-M-pA-loxP-PV

(j) loxP-SA-loxP-IRES-M-pA-loxP-PV

(SAはスプライスアクセプターを、SDはスプライスドナーを、IRESは分子内リボゾームエントリー部位を、Mはマーカー遺伝子を、puroはピューロマイシン耐性遺伝子を、pAはポリA配列を、PVはプラスミドベクターを表す。)

上記ロックアウト動物としては、ロックアウトマウスが挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0023】

【発明の実施の形態】

1. 概要

本発明は、遺伝子トラップ法によりトラップされた遺伝子が導入された胚幹細胞及びロックアウト動物に関するものである。遺伝子トラップ法の概要を図2に示す。まず、本発明の目的を達成するためトラップベクターを構築し、これを胚幹細胞(ES細胞)に導入してトラップクローンを単離及び選択する(図2A~C)。図2ではpU-8(pU-Hachiともいう)トラップベクターを例示する。その後、キメラ動物(例えばキメラマウス)を作製してトラップクローン由来のマウスを作製する(図2F~G)。一方、単離及び選択されたトラップクローンを用いて、トラップされた遺伝子の単離及び配列決定、並びにプラスミドレスキューによるゲノムの回収を行う(図2C~E)。さらに、クローンを電気穿孔法及びピューロマイシン等の薬剤選択を行い、トラップされた遺伝子を発現させ、ESクローンのマウス系列の作製を行う(図2H~I)。

【0024】

本発明においてトラップされた遺伝子は、胚様体形成によるスクリーニング法により、発生や細胞増殖に関連する遺伝子を効率よくトラップしているかどうかを、遺伝子の種類を調べることで検討した。その結果、Tubedown-1遺伝子がトラップされていることが分かった。このことは、胚様体形成によるスクリーニング系が、よく機能していることを示している。Tubedown-1遺伝子は、アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であると考えられており、in vitroにおいては血管形成や血球の発達に関与すると考えられる。

【0025】

本発明において、遺伝子トラップにより実際に内在性遺伝子が破壊されるかどうかを調べ

10

20

30

40

50

ることが重要なポイントの一つであるので、上記遺伝子について、トラップ部位の構造を解析した。その結果、トラップベクターは、上記Tubedown-1遺伝子のエクソン内にされており、遺伝子が部分的に破壊されていた。したがって、本発明の遺伝子トラップ法により、効率よく内在性遺伝子を破壊できることが明らかとなった。

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0026】

##### 2. トラップベクターの構築

遺伝子トラップ法とは、トラップベクターをES細胞に導入すると、偶然及びランダムにマウス内在性遺伝子に組込まれることを利用して、未知遺伝子をゲノム上でトラップするというものである。「遺伝子トラップ」とは、トラップベクターがゲノム上の特定の遺伝子に入り込んで、当該特定の遺伝子を捕まえることを意味し、遺伝子を捕らえるためのベクターを「トラップベクター」という。遺伝子にはエンハンサー、プロモーター、エクソン、ポリAなどが存在し、それぞれを捕獲することができるが、そのためには、目的に応じた構造を持つトラップベクターを使用することができる。

#### 【0027】

一般に、エクソントラップベクターは、スプライスアクセプターのみを有するレポーター遺伝子、薬剤選択マーカージェン型遺伝子、及びプラスミド部分から構成されており、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときにのみ、レポーター遺伝子が発現する。換言すれば、トラップベクター中のレポーター遺伝子の発現をモニターすることで、内在性遺伝子への組込みを知ることができる。また、pUC19などのプラスミドをトラップベクターに連結しておく、いわゆるプラスミドレスキュー法と呼ばれる手法により、トラップした内在性遺伝子を単離することができる。「プラスミドレスキュー法」とは、エレクトロポレーション法等により形質転換された細胞をアンピシリン選別等にかけて目的の遺伝子を回収する方法である(図2E)。しかも、トラップ時にその遺伝子を破壊するので直ちに遺伝子破壊マウスを作製することができる。さらに、レポーター遺伝子はマウス内在性遺伝子の発現調節領域に支配されて発現するので、内在性遺伝子の発現の組織特異性、時期特異性を簡単に解析することができる。

#### 【0028】

従来の遺伝子トラップ法では、遺伝子を完全に破壊できても、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば1アミノ酸置換といった変異を導入することができず、またヒト遺伝子と置換することもできないという問題点があった。そこで、本発明は、これらの問題点を解消するため、バクテリオファージ由来の組換えシステムである、Cre-loxPを改変し、それを遺伝子トラップ法に利用することにより、一旦遺伝子トラップベクターを組み込ませてマウス遺伝子を破壊した後、トラップベクター内の変異lox部位に、任意の遺伝子を挿入できることとしたものである。これによって、ヒト遺伝病で見られるような小さな変異、例えば1アミノ酸置換といった変異を導入することが可能となり、またヒト遺伝子と置換することも可能となる。本発明のトラップベクターは、種々の遺伝子をトラップするために使用することができるが、エクソントラップ又はプロモータートラップ用として好ましく使用することができる。

#### 【0029】

loxP (locus of crossing (X-ring) over, P1) は34塩基(5'-ataacttcgtata gcatacat tacgaagtat-3')からなる配列であり(配列番号3)、5'末端から13塩基(逆反復配列1という)、及び3'末端から13塩基の配列(逆反復配列2という)が、それぞれ逆反復配列を構成し、「gcatacat」により示される8塩基のスペーサーと呼ばれる配列が上記逆反復配列1及び2に挟まれている(図3)。「逆反復配列」とは、スペーサーを境界として一方の側の配列が、他方の側の配列と、互いに向き合う方向に相補的であるような配列を意味する。換言すれば、一方の側の配列のうちセンス鎖の配列が、他方の側の配列のアンチセンス鎖と、互いに向き合う方向に相同であることを意味する。方向が互いに向き合っており、二本鎖を形成したときの配列自体は同一で繰り返されているため、逆反復配列と呼ばれる。図3に示す通り、二本鎖のうち一方の鎖(例えばセンス鎖)において、紙面左側の逆

10

20

30

40

50

反復配列 1 (5'-ataacttcgtata-3' : 配列番号 4) の 5' 3' 方向の配列が、紙面右側の逆反復配列 2 (5'-tatacgaagttat-3' : 配列番号 5) の 5' 3' 方向の配列に対し、相補的という関係になっている。

【 0 0 3 0 】

1oxPは、通常の配列と異なり方向性を有する。従って、本発明において、上記5' 3'の向きで1oxPの配列を表示するときは、その表示中に紙面左向きの矢印(例えば図3の矢印1)を含めることとする。

Cre (causes recombination) とは、遺伝子組換えを起こさせる組換え酵素(リコンビナーゼともいう)を意味し、上記反復配列を認識し、スペーサー部の「cataca」を粘着末端とする切断様式で切断する(図3)。

10

【 0 0 3 1 】

ところで、バクテリアの中では、2カ所の1oxP間で組換えが起こり、挿入または削除反応が起こる。哺乳類細胞で挿入反応を起こすことができれば、後に任意の遺伝子を挿入できるので、応用性は格段に広がる。哺乳類細胞では核が大きいため、一旦削除された1oxPを持つ環状DNAは拡散してしまい、挿入反応は殆ど観察されない。

【 0 0 3 2 】

そこで、本発明者は、挿入反応を起こすために1oxP配列に変異を導入し、一旦遺伝子がゲノムに挿入されると挿入された遺伝子は削除できない(ゲノムから脱離しない)ようにすることを考え、このため2種類の変異型1oxPを準備した(図4)。

【 0 0 3 3 】

1つは、1oxPの反復配列(センス鎖側)のうち紙面左側の反復配列(ATAACTTCGTATA)の左から5塩基までを、「TACCGTTCGTATA」となるように置換変異(下線部が変異させた部分)を導入したものであり、これを「1ox71」と名付けた(配列番号1; 図4b)。もう1つは、1oxPの紙面右側の反復配列(TATACGAAGTTAT)を、右から5塩基まで「TATACGAACGGTA」(下線部が変異させた部分)となるように置換変異を導入したもので、これを「1ox66」と名付けた(配列番号2; 図4b)。

20

【 0 0 3 4 】

ゲノム上の1ox71とプラスミド上の1ox66との間で組換えが起こると、挿入されたDNAの5'側(紙面左側)には1oxPの両側の反復配列が変異したもの(「1ox71/66」という:TACCGTTCGTATA GCATACAT TATACGAACGGTA: 配列番号6)が、右側には野生型の1oxP(ATAACTTCGTA TA GCATACAT TATACGAAGTTAT: 配列番号3)が配置される(図4a)。その結果、Creはもはや1ox71/66を見分けることができず、1oxPとの間で組換えを起こせず、ゲノムに遺伝子は挿入されたままとなる。すなわち、1oxP同士の相同組換えの場合は、切り出された1oxPを含む環状DNAが物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側に1ox71を、及び環状DNA側に1ox66を用いると、組み込まれたときに生ずる1ox71/66をCreリコンビナーゼは認識できにくくなり、削除反応より挿入反応に傾くため、挿入状態が維持される(図5)。ここで、本発明においては、染色体側に1ox66を、環状DNA側に1ox71を用いることもできる。

30

【 0 0 3 5 】

実際に、ES細胞にあらかじめ1ox71などの変異型1oxP(以下「変異型1ox」ともいう)を組込んでおき、そこに他の変異型1oxP(例えば1ox66)を含むプラスミドを導入すると、プラスミドがゲノムに組込まれる。したがって、例えばこの1ox71をあらかじめ遺伝子トラップベクターに組込んでおけば、あとでいかなる遺伝子でも1ox66を用いて挿入することが可能となる。つまり、小さな変異を導入した遺伝子やヒトの遺伝子で置換することも可能となった。

40

【 0 0 3 6 】

この変異型1ox(1ox71又は1ox66)を利用した遺伝子トラップベクターは、以下の通り構築することができる(図6A)。但し、以下のトラップベクターは例示であって、限定されるものではない。従って、以下のベクターにおいて、変異型1oxとして1ox71を例示するが、これに限定されるものではなく、1ox71の代わりに1ox66を用いたものも、本発明のトラッ

50

ブベクターに含まれる。また、変異型 loxP とはせずに、通常の loxP を用いたトラップベクターを構築することもできる (図 6 B)。

【 0 0 3 7 】

- (a) SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV
- (b) lox71-IRES-M-pA-loxP-pA-PV
- (c) SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-puro-pA-lox511-PV
- (d) lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (e) lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (f) (lox71が組み込まれたSA)-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (g) (lox71が組み込まれたSA)-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511
- (h) (lox71が組み込まれたSA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SD
- (i) loxP-SA-IRES-M-pA-loxP-PV
- (j) loxP-SA-loxP-IRES-M-pA-loxP-PV

10

【 0 0 3 8 】

上記ベクターの構成要素において、SAはスプライサクセプターを、SDはスプライドナーを、IRESは分子内リボソームエンタリー部位を、Mはマーカー遺伝子を、puroはピューロマイシン (puromycin) 耐性遺伝子を、pAはポリA配列を、PVはプラスミドベクターを表す。

【 0 0 3 9 】

ところで、トラップベクターがゲノムDNAに組み込まれる際に、ほとんどのケースでベクターの一部が欠失し、その結果、ベクターの重要な部分が欠失する場合がある。本発明では、そのような欠失を防ぐためのダミーとして任意配列を付加することが好ましい。このような任意配列をSP配列という。SP配列は、上記ベクターの先頭部、最後尾部又はそれらの両方に付加することができる。図 6 Aにおいて、pU-8及びpU-12にはSP配列 (「Sp」と表示) を最後尾に付加した態様を示し、図 6 Bにおいて、pU-San及びpU-Rokには先頭部及び最後尾の両方に付加した態様を示した。また、SP配列自体は自由に決定することができる。SPの配列の長さは100~1000塩基、好ましくは300~400塩基である。また、公知の任意配列をSPに使用することができる。公知配列としては、例えばウサギ  $\beta$ -グロビン遺伝子の一部等が挙げられる。

20

【 0 0 4 0 】

スプライサクセプターは、スプライシングの際にエキソンの3'末端側に連結することができる配列を意味する。  
スプライドナーは、スプライシングの際にエキソンの5'末端側に連結することができる配列を意味する。

30

【 0 0 4 1 】

IRESは、分子内リボソームエンタリー部位 (internal ribosomal entry site) と呼ばれ、タンパク質合成の際にアミノアシル-t-RNAが結合するリボソーム上の部位 (A部位) であり、CAP非依存的に翻訳を開始できるようにするための配列である。

【 0 0 4 2 】

マーカー遺伝子は、本発明のベクターが標的遺伝子をトラップできたか否かを示すマーカーとなる遺伝子であり、大腸菌由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ遺伝子)、又はlacZ遺伝子とネオマイシン (G418) 耐性遺伝子との融合遺伝子 ( $\beta$ -geo遺伝子)、CAT遺伝子、GFP遺伝子、SV40ラージT遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジンS耐性遺伝子等が挙げられる。

40

【 0 0 4 3 】

プラスミドベクターは、遺伝子トラップ後に内在性遺伝子をプラスミドレスキュー法により単離するために使用されるものである。従って、トラップベクター内のプラスミド (大腸菌で増やせるもの) の一部を利用して当該プラスミド部分の近接領域を回収することができる。例えば、プラスミドにゲノムDNAが連結された場合において、制限酵素処理によりプラスミドとゲノムDNAとが連結した断片を切り出し、切り出した断片を環状にした後

50



、大腸菌に導入して増殖させると、プラスミドに近接したゲノムDNAを回収することができる。プラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC(pUC18、pUC19、pUC118、pUC119等)、pSP(pSP64、pSP65等)、pGEM(pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z等)等が挙げられる。なお、プラスミドベクターには、supF、アンピシリン耐性遺伝子、複製開始点、及びクローニングのための制限酵素部位(例えばマルチクローニング部位)を単独で又は適宜組み合わせさせて連結しておくことができる。

#### 【0044】

上記(a)に示すベクターをpU-8という。pU-8の基本部分(SA-IRES- $\lambda$ -geo-pA:図7)は、pGT1.8IRESbetageoに由来している。このpGT1.8IRESbetageoは、マウスEn-2遺伝子由来のスプライサクセプター、脳心筋炎ウイルス由来のIRES、 $\lambda$ -geoを含んでいる。このpGT1.8 IRESbetageoのBglII部位に1ox71を組み込んだ後、SalIで処理し、SalI断片を用意しておく。一方、pUC19などのベクターに180塩基対のSP配列、1oxP、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1(PGK)由来のpoly A付加シグナルを、ベクターのLacZ配列が除去された改変型ベクターに挿入することによりプラスミドpEBN-SE7tiを作製する。このプラスミドの制限酵素SalI部位にSA-IRES-1ox71- $\lambda$ -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-8を作製する。したがって、この構造は、5'側から順に任意配列、スプライサクセプター、1ox71、IRES、 $\lambda$ -geo、pA、1oxP、pA、pUC19、任意配列である(図7)。

#### 【0045】

上記(b)に示すベクターをpU8deltaという。pU8deltaは、pU-8のスプライサクセプターを削除したベクターである。このベクターは、1ox71がレポーターである $\lambda$ -geoの前に、1oxPが $\lambda$ -geoの後ろに接続された構成となっている。このような構成としたのは、ベクターが組込まれたのちに、Creを一過性に発現させることで、中間のIRESと $\lambda$ -geo部分を完全に除去できるからである。その結果、プラスミドpUC19が上流に存在するマウス内在性遺伝子の近傍に位置することになり、マウス内在性遺伝子を容易に単離することができる。

#### 【0046】

上記(c)に示すベクターを「pU-12」という。このベクターは、SA-1ox71-IRES-M-pA-1oxP-puro-pA-1ox511-PVで構成されている。pU12トラップベクターを構築するために、まずpE3NSE7のPGK poly(A)シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly(A)シグナルに置き換え、さらにその下流のBglII部位に1ox511を挿入する。得られるプラスミドの制限酵素部位にpU-HachiからのSA-IRES-1ox71- $\lambda$ -geoのSalI断片を挿入することにより、pU-12を得ることができる。

#### 【0047】

上記(d)に示すベクターを「pU-15」という。このベクターは、1ox71-M-1oxP-pA-1ox2272-PV-1ox511で構成されている。ここで、「1ox2272」は、1oxPのスペーサー領域(gcatact)のうち、第2番目のcをgに、第7番目のaをtに置換した配列(ggatactt)を有するものをいう。また、「1ox511」は、1oxPのスペーサー領域(gcatacat)のうち、第2番目のcをtに置換した配列(gtatacat)を有するものをいう。1ox511及び1ox2272は、1oxP配列のスペーサー部分に変異があるため、それ自身(1ox511同士、1ox2272同士)とは組換えを起こすが、1oxPや1ox71とは組換えを起こさない変異1ox配列である。なお、1ox2272及び1ox511の配列順序はどちらを前方又は後方にしてもよく、任意に選択することができる(以下同様)。

#### 【0048】

上記(e)に示すベクターを「pU-16」という。このベクターは、1ox71-IRES-M-1oxP-pA-1ox2272-PV-1ox511で構成されており、pU-15の1ox71とマーカ( $\lambda$ -geo)との間にIRESを挿入することにより作製することができる。

上記(f)に示すベクターを「pU-17」という。このベクターにおいて、1ox71はSAの一部の領域に挿入されている。例えば、pSPプラスミドに、1ox511、1oxP、PGK poly(A)シグナル、1ox2272を挿入してプラスミドを構築し、次に、pU-HachiのSA内に1ox71配列を挿入し、続いて $\lambda$ -geoをこの順に挿入する。このプラスミドを、先に構築しておいたプラスミドと

10

20

30

40

50

連結することにより、pU-17を得ることができる。

【0049】

上記(g)に示すベクターを「pU-18」という。このベクターも、pU-17と同様、SAの中にlox71が挿入されている。pU-18は、pU-17のSAと -geoとの間にIRESを挿入することにより得ることができる。

上記(h)に示すベクターは、(lox71が組み込まれたSA)-M-loxP-pA-lox2272-プロモーター-M-lox511-SDで構成される。このベクターは、pU-17内のPVの代わりにプロモーター及びMをこの順で挿入し、lox511の後方にSDを連結することにより得ることができる。このベクターには、プロモーターが付加されている。プロモーターとしては、特に限定されるものではなく、任意のものを使用することができる。例えば、後述の形質転換体作製の項に記載の細菌由来プロモーター、酵母由来プロモーターなどのほか、SP6 RNAポリメラーゼプロモーター、T7RNAポリメラーゼプロモーター、T3RNAポリメラーゼプロモーターなどのRNAポリメラーゼプロモーター、あるいは、EF1(伸長因子1)プロモーター、PGK(グリセロリン酸キナーゼ)プロモーター、MC1(ポリオーマエンハンサー/単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ)プロモーターなどの哺乳動物由来プロモーターを例示することができる。

【0050】

上記(i)に示すベクターを「pU-San」といい、上記(j)に示すベクターを「pU-Rok」という。pU-Sanは、pU-8に使用されているlox71がloxPとなっていることを除き、その構成はpU-8と同じである。換言すれば、pU-SanのloxPをlox71で置換すると、pU-8となる。pU-Rokは、pU-SanのSAとIRESとの間にloxPを挿入することにより得ることができる。

【0051】

3. 遺伝子トラップ

前記の通り作製されたベクターを用い、2段階の遺伝子トラップを行う。

第1段階は通常の遺伝子トラップ法である。「通常の遺伝子トラップ」とは、ES細胞に前記トラップベクターを導入し、ES細胞内に本来的に存在する内在性遺伝子をトラップすることを意味する。これにより、ES細胞中の内在性遺伝子は破壊される。なお、このES細胞を用いて、後述の遺伝子破壊動物(例えばノックアウトマウス)を作製することができる。そして、トラップされた内在性遺伝子(図8、遺伝子X)を単離した後に、大腸菌の中で部位特異的変異導入法等の方法でこの遺伝子に微細な変異を導入し(図8、遺伝子X')、これをプラスミド上でlox66の下流につなぎ、第2段階の遺伝子トラップを行う(図8)。なお、遺伝子Xに変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutan-K又はMutan-G(宝酒造))などを用いて、あるいは、LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット(宝酒造)を用いて変異の導入が行われる。

【0052】

第2段階の遺伝子トラップは、lox66の下流に連結された内在性遺伝子の変異型(遺伝子X')をES細胞に導入することを意味する。これにより、第1段階で導入されたトラップベクターのlox71部位が、第2段階で導入したベクターのlox66との間で組換えを起こし、「(lox71/66)-(遺伝子X')-(loxP)」で構成されるカセットを含む改変した遺伝子を導入できる(図8)。

この方法によれば、改変した内在性遺伝子のみならず、ヒト遺伝子で置換することも可能であり、あらゆる遺伝子を導入することができる。これを本発明において可変型遺伝子トラップ法と名付ける。

【0053】

4. トラップベクターが組み込まれたクローン(ES細胞)のスクリーニング

遺伝子トラップベクターをES細胞に導入しネオ耐性クローンを選別すれば、これらはマウス内在性遺伝子の下流にトラップベクターが組み込まれているクローンであるとみなされる。これらのクローンからDNAを抽出し、サザンブロット法等により解析し、トラップベクターが1コピーのみ組み込まれているクローンを選択する。この選択方法を用いることにより、効率良くマウス遺伝子をトラップしているクローンを選択できることがわかった

ので、これをスクリーニング系として用いる。

【0054】

(1)ネオ耐性クローンの単離

本発明において、トラップベクターをES細胞に導入するには、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等が採用される。例えば、トラップベクター100 $\mu$ gを電気穿孔法(バイオラッドGenePulserを用い、800V、3 $\mu$ Fの条件下)にて0.8mlのリン酸緩衝液中に浮遊させた3000万個のTT2 ES細胞に導入し、200 $\mu$ g/mlの濃度のG418存在下で培養する。1週間後に、ネオ耐性クローンを単離する。

【0055】

遺伝子トラップベクターはES細胞のゲノム上にランダムに組み込まれる。したがって、単にトラップベクターをES細胞に導入しただけでは、必ずしも遺伝子の中に組み込まれるわけではなく、遺伝子とは関係のない場所にも組み込まれる。しかし、トラップベクター内には薬剤耐性遺伝子であるネオ耐性遺伝子がまれているので、それが発現している細胞は、ネオマイシン(G418ともいう)耐性となる。逆に言えば、ネオマイシン存在下で生存する細胞は、ネオ耐性遺伝子を発現していることになる。トラップベクター内のネオ耐性遺伝子は、ES細胞で発現しているマウスの遺伝子の下流に組み込まれないと発現しない。したがって、発現するということは、ある遺伝子の下流に組み込まれたことを意味する。

【0056】

(2)組み込みパターンによるESクローンの選別

ESクローンから常法にしたがってDNAを抽出し、サザンプロット法等により組み込みパターンを解析する。サザンプロットのパターンが単一バンドとして現れた場合は、1コピーのみが組み込まれていると判断できるため、そのパターンを表したDNAを選別する。これは、プラスミドによるマウス内在性遺伝子の単離を容易に行なえるクローンを選別するためであり、また、1コピーでネオ耐性となるクローンでは、実際にマウス遺伝子をトラップしている確率が極めて高いからである。

【0057】

5.キメラ動物作製によるトラップ系統(トランスジェニック動物)の樹立

キメラ動物の作製は標準的な方法で行う(図9)。本発明において作製されるキメラ動物の種類は特に限定されるものではない。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

【0058】

ネオマイシンで選別したES細胞を動物由来の桑実胚と凝集させ(ES細胞と桑実胚との集合体を形成させること)、キメラ動物胚(例えば胚盤胞まで発生したもの)を作製する。これらを不妊雌と交尾し偽妊娠状態となった仮親の子宮に移植する。例えばマウスの場合は約17日後に子が生まれるので、仮親から生まれた子のうちキメラ動物を選ぶ。キメラの寄与率が高い動物は、生殖系列の可能性が高いが、キメラ動物を正常動物と交配することにより、生殖系列のキメラ動物であることの確認が可能である。

【0059】

その後正常な雌と交配し、F1を得て変異動物系統を樹立する。系統(トランスジェニック動物)樹立ができたもののみについて以下の解析を行なう。なお、F1からの精子、及び該精子を用いて体外受精を行なって得られる2細胞期胚は、超急速凍結法にて凍結保存しておくことができる。

【0060】

(1)発現パターンの解析

F1動物を交配し、胚(例えばマウスの場合9.5日目のもの)と成体における発現パターンを解析する。

(2)表現型の解析

樹立した動物系統について、ヘテロ及びホモ動物の表現型を解析する。表現型の解析は、肉眼的観察、解剖による内部の観察、各臓器の組織切片、X線撮影による骨格系、行動や

10

20

30

40

50

記憶、血液を用いて行う。

【0061】

(3) トラップした遺伝子の単離と構造解析、染色体地図の作成

トラップクローンからDNAの単離と塩基配列の決定を行ない(後述)、ホモロジーサーチを行なう。その結果、得られた配列情報が既知遺伝子、EST、未知遺伝子及びリピートのいずれに属するのか、区別しておく。ESTと未知遺伝子については、染色体地図を作成することもできる。染色体地図は、蛍光in situ hybridization(FISH)法、またはマイクロサテライトプローブ等を用いた連関解析若しくは放射線照射による雑種細胞を用いた解析によって行なう。染色体上の位置が明らかになれば、既存の変異マウスの位置と対比し、一致するかどうかを調べておく。

10

【0062】

(4) データベース構築

樹立した各系統について、マーカー遺伝子の胚(例えばマウスの場合10日目の胚)と成体における発現パターン、F1およびF2動物における表現型、トラップした動物内在性DNAの塩基配列、ESTと未知遺伝子についてはその染色体上の位置について、データベースを作成する。

【0063】

6. ノックアウト動物

本発明のノックアウト動物は、遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。その処理方法について説明する。

20

本発明において使用し得る動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ等が挙げられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすいマウスが好ましい。

【0064】

未知遺伝子を含むゲノムDNAを、動物ES細胞から調製したゲノムDNAからPCRにより、又はゲノムライブラリーから得、これに本発明のトラップベクターに組み込む。この操作により、このエクソンの機能は破壊される。これと同時にベクターの中にネガティブ選別用のチミジンキナーゼ(tk)遺伝子又はジフテリア(DT)毒素遺伝子を繋げておく。エレクトロポレーション等によりトラップベクターをES細胞に導入し、この細胞をポジティブ選別用のネオマイシン及びネガティブ選別用の核酸類似体 FIAU (fluoroiodoadenosyluracil)、又はジフテリア毒素の存在下で培養する。この選別によりトラップベクターが挿入されたES細胞のみが残る。このESクローンでは、破壊されたエクソンを含む遺伝子がノックアウトされる。得られた細胞を仮親の子宮に移植し、その後生まれるキメラ動物を選ぶ。キメラ動物と正常動物との交配により、ヘテロ接合体動物が得られ、ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体を得ることができる。

30

【0065】

なお、ノックアウトマウスが得られたことの確認は、外見上の異常の有無及び解剖を行った際の諸組織・臓器の異常を観察することもできる。さらに、組織からRNAを抽出し、ノーザンブロット解析により遺伝子の発現パターンを解析し、必要に応じて血液を採取し、血液検査や血清生化学検査を実施してもよい。

40

【0066】

7. 遺伝子の単離、組換えベクターの構築及び形質転換体の作製

(1) 遺伝子の単離

本発明においては、前記の通りトラップされた遺伝子のクローニングを行い、構造解析を行うことができる。

【0067】

トラップクローンからDNAの単離は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、トラップクローンのmRNAからクローニングする場合は、まず、トラップクローンをグアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全RNAを得た後、オリゴdT-セルロース又はセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、あるいは

50

はバッチ法によりポリ(A+)RNA(mRNA)を得る。得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。このようにして得られた二本鎖cDNAを適当な発現ベクター(例えば gt11等)に組み込むことによって、cDNAライブラリーを得る。

#### 【0068】

上記の通り得られた遺伝子について塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又はDNAポリメラーゼを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができる。通常は、自動塩基配列決定装置等により塩基配列を決定することができる。また、cDNAの5'領域又は3'領域の塩基配列が未決定の場合は、5'-RACE法、3'-RACE等を用いて全塩基配列の決定を行う。RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)法は、当該技術分野において周知であり(Frohman, M.A. et al., Methods Enzymol. Vol. 218, pp340-358 (1993))、RACEを行うためのキットも市販されている(例えば、Marathon™ cDNA Amplification Kit; CLONETECH社、その他)。

10

#### 【0069】

本発明においてノックアウトされたTubedown-1遺伝子の塩基配列を配列番号7に、該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を配列番号8に示す。塩基配列解析の結果、トラップベクターは配列番号7に示す塩基配列の413番目と414番目との間に挿入されていた。なお、Tubedown-1遺伝子の翻訳領域は、配列番号7に示す塩基配列の355番目から2949番目であることから、トラップベクターはゲノムのエクソン領域に挿入されたものと考えられる。

20

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いたPCRによって、本発明の遺伝子を得ることができる。

#### 【0070】

##### (2) 組換えベクターの構築

目的とする遺伝子断片を精製し、ベクターDNAと連結する。ベクターとしては、ファージベクター、プラスミドベクター等の任意のものを用いることができる。DNAとベクターとの連結手法は、当該分野で周知である(J. Sambrook, et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。

30

#### 【0071】

##### (3) 形質転換体

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主は、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられる。

#### 【0072】

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシュェリヒア・コリ(Escherichia coli)K12、DH1などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)などが挙げられる。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法(Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110-2114 (1972))、エレクトロポレーション法(Becker, D.M. et al.: Methods.

40

50

Enzymol., 194: 182-187 (1990))等が挙げられる。

【0073】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163-168 (1983))等が挙げられる。

10

【0074】

動物細胞を宿主とする場合は、COS細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウス骨髄腫細胞などが用いられる。プロモーターとしてSRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、EF1プロモーター、PGKプロモーター、MC1プロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞などが挙げられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

20

【0075】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 遺伝子トラップベクター変異体の作製

(1) pU-8トラップベクターの構築

pU-8ベクターはpGT1.8IRES-geoに由来し、マウスEn-2遺伝子からのSA配列と、脳心筋炎ウイルス由来のIRES配列に連結した-geo配列とを含有する。まず、lox71のBamHI断片をpGT1.8IRES-geoのBglII部位に挿入した。次いで、ウサギ-グロビン遺伝子の一部である180bpの配列、loxP配列、及びマウスホスホグリセレートキナーゼ-1 (PGK)由来のpoly A付加シグナルを、ベクターpUC19のLacZ配列が除去された改変型ベクターに挿入することにより、プラスミドpEBN-SE7tiを構築した。SP配列は、トラップベクターの3'側を保護するために使用した。プラスミドpEBN-SE7tiのSalI部位にSA-IRES-lox71-geoのSalI断片を挿入することにより、pU-Hachiを得た。

30

【0076】

(2) pU-12トラップベクターの構築

pU-12トラップベクターを構築するために、まずpE3NSE7のPGK poly(A)シグナルをピューロマイシン耐性遺伝子+PGK poly(A)シグナルに置き換え、さらにその下流のBglII部位にlox511を挿入したプラスミドを作製した。そのプラスミドのSalI部位にpU-HachiからのSA-IRES-lox71-geoのSalI断片を挿入することにより、pU-12を得た。

40

【0077】

(3) pU-17トラップベクターの構築

まず、pSP73 (Promega)に、lox511、loxP、PGK poly(A)シグナル、lox2272をこの順で挿入し、プラスミドpSP5PP2を構築した。次に、pU-HachiのSA内に2箇所あるBamHIのうち上流のBamHI部位で切断し、pBluescriptII KS+プラスミドに、SA前半のBamHIまでのDNA断片、lox71配列、SA後半BamHIからKpnIまでのDNA断片、-geoのNcoIからSalI部位までをこの順に挿入し、プラスミドpKS+S71A-geoを構築した。このpKS+S71A-geoからlox71を含むSA-geoのXbaI断片を切り出し、これをpSP5PP2のSpeI部位に挿入することによりpU-17を得た。

50

## 【 0 0 7 8 】

## (4) pU-San及びpU-Rokトラップベクターの構築

pU-Sanベクターは、pU-8を作製する際に使用したlox71の代わりにloxPを使用した点以外は、pU-8と同様にして構築した。pU-Rokベクターは、pU-SanのSA(En2)とIRESとの間にloxPを挿入することにより構築した。

## 【 0 0 7 9 】

## 〔実施例2〕 ES細胞クローンの選別

ネオマイシン耐性初代マウス線維芽細胞をPEF培地でコンフルエントに培養した後、100 µg/mlマイトマイシンCで3時間処理し、0.25%トリプシンで処理した。トリプシン処理した細胞を、0.01%ゼラチンコート培養ディッシュに播種し、ES細胞用フィーダー細胞とした。pU-8トラップベクターを用いたエレクトロポレーションにおいては、100 µgのSpeIで消化したDNA及び $3 \times 10^7$ 個のES細胞を用いた。ES細胞を0.8mlのPBSに懸濁し、Bio-Rad Gene Pulserを用いて、以下のいずれかの条件でエレクトロポレーションを行った。

## 【 0 0 8 0 】

(i) 電極間距離：0.4 cm、電圧：0.2 kV、キャパシタンス：960 µF、抵抗：無し

(ii) 電極間距離：0.4 cm、電圧：0.8 kV、キャパシタンス：3 µF、抵抗：無し

48時間後、200 µg/mlのG418の存在下で培養した。選別を7日間維持し、コロニーを24ウェルプレートにまいて増殖させ、凍結保存した。トラップクローンをサザンブロッティングにより解析し、単一コピーの組み込みパターンを示す細胞株を選別した。

## 【 0 0 8 1 】

トラップクローンから -geo配列を除去するため、pCAGGS-Cre (Araki, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:160-164, 1995; Araki, K. et al., Nucl. Acids Res., 25: 68-872, 1997; Araki, K. et al., J. Biochem. Tokyo, 122: 977-982, 1997) を環状の形態でエレクトロポレーションにより導入した。細胞数が $1.5 \times 10^7$ 個、PBS容量が0.4mlであることを除き上記と同一の条件でエレクトロポレーションを行った。

## 【 0 0 8 2 】

処理された細胞の半分を1枚の100mmプレートにまき、48時間増殖させた。次に、 $1 \times 10^3$ 個/プレートの濃度で100mmのプレートに再度まき、コロニーを形成させた。1週間後、コロニーを取り上げ、DNA調製のために増殖させた。

トラップベクターのlox71部位に組み込みが行われるよう設計した共エレクトロポレーションを行うため、20 µgの各プラスミド (p66<sup>2</sup> IEGPPac, p66<sup>2</sup> INZPPac又はp66PGKPac-5) 及びpCAGGS-Creを環状形態で使用した。

## 【 0 0 8 3 】

なお、プラスミドp66PGKPac-5は、lox66断片及びPGKプロモーター-ピューロマイシン耐性遺伝子コード配列を、pSP73ベクター (Promega) に挿入することにより構築した。プラスミドp66<sup>2</sup> IEGPPacは、pSP73ベクター (Promega)、IRES配列、EGFP遺伝子 (Clontech)、PGKプロモーター、Pca遺伝子及びlox66配列から構築した。プラスミドp66<sup>2</sup> INZPPacは、p66<sup>2</sup> IEGPPacのEGFP遺伝子を、SV40ラージT遺伝子由来の核局在シグナルと融合したlacZ遺伝子で置換することにより構築した。

## 【 0 0 8 4 】

PBS中、 $1 \times 10^7$ 個/0.8mlの細胞をエレクトロポレーションにかけた (200V, 950 µF)。48時間後、2 µg/mlのピューロマイシンを用いて3日間選別をかけ、その後通常の培地に細胞を移した。エレクトロポレーション後9日目にコロニーを取り上げ、増殖させた。

## 【 0 0 8 5 】

公知方法 (Abe, K., Niwa, H. et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34, 1996) に従って胚様体 (EB) の生産を行った。ES細胞中の -ガラクトシダーゼ活性及びEBは、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル -D-ガラクトピラノシド (X-gal) で染色することにより測定した (Gossler, A. and Zachgo, J., Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, A. (ed.), Oxford University Press, Oxford, 1993, pp.181-227)。

## 【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

トラップベクターpU-8を直鎖状にしてTT2 ES細胞に導入し、クローン (Ayu-8030クローン) を単離した。Ayu-8030クローンは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1) に、平成13年 (2001年) 5月23日付で寄託されている (受託番号: FERM P-18341)。

【0087】

〔実施例3〕 キメラマウスの作製及び遺伝子解析

(1) マウスへのクローン導入

トラップしたESクローン (Ayu-8030) をICRマウス由来の8細胞期胚と凝集させ、1晩培養した。翌日、ES細胞と8細胞期胚とが凝集しあい、1つの胚盤胞へと発生したものを選別した。これらのキメラ胚約20個を不妊雄と交尾した雌 (仮親) の子宮の中へ移植した。約17日後に出生し、性成熟する生後8週以降にキメラマウスを雌のマウスと交配し、ESクローン由来のF1マウス (ヘテロ接合体) 個体を得た。

10

F1個体同士を交配したが、ホモ接合体は8.5日胚より前に致死であるが、ヘテロ接合体は正常に生まれ、外観上特に目立った表現型は見られなかった。

【0088】

(2) トラップした遺伝子の解析

(i) RNAの抽出

トラップしたES細胞 (Ayu-8030) からのサンプルにTRIzol reagent (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) を加え、ポリトロンホモジナイザーで細胞を破壊した。0.2倍量のクロロホルムを加え激しく振とう後、4 で15分間遠心し、上層を注意深く取った。等量のプロパノールを加え、攪拌し沈殿させた。遠心後上清を捨て沈殿したRNAを75%エタノールでリンスし、風乾した。0.5 ml TEに溶解し、-80 で保存した。

20

【0089】

(ii) トラップされた遺伝子のcDNAの解析

上記RNAサンプルを元に、5'-RACE法を用いてトラップされた遺伝子の一部 (約380bp) を得た。使用したプライマーは5'-TCCTCTTTGTTAGGGTTCTTCTTC-3' (配列番号9) であった。インターネット上に登録されている遺伝子 (ESTを含む) のデータベースを検索したところ、数種のマウスESTとホモロジーが高いことがわかった。トラップベクターは開始コドンのすぐ近くの下流に挿入されていた。

また、RT-PCRにより、開始コドンから終始コドンまでの配列を含む約3KbのcDNAフラグメントを得、正確な塩基配列を決定した。

30

RT-PCRに使用したプライマーは以下の通りである。

5'-AGTTACCACGTGAACCGCC-3' (配列番号10)

5'-CAAAGTCATTCCATTTGCTTGT-3' (配列番号11)

【0090】

(iii) 結果

上記の通り得られた遺伝子の塩基配列決定を行った結果、配列番号7に示す配列が得られた。これは、公知のTubedown-1遺伝子に相当することが判明した。従って、本発明のノックアウトマウスは、Tubedown-1遺伝子が破壊されたものであることが判明した。

【0091】

40

【発明の効果】

本発明により、ノックアウトマウスが提供される。本発明のノックアウトマウスは、血管形成や血球の発達のプロセス、あるいはこれらをターゲットとした新薬の開発のためのモデル動物として利用できる。

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

IDE, HIROYUKI

<120> KNOCKOUT ANIMAL

50



<130> P01-0333  
 <140>  
 <141>  
 <160> 11  
 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 10  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 1  
 taccgttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34  
 <210> 2  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 2 20  
 ataacttcgt atagcataca ttatacgaac ggta 34  
 <210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 3 34  
 ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34  
 <210> 4 30  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 4 13  
 ataacttcgt ata 13  
 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> DNA 40  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 5  
 tatacgaagt tat 13  
 <210> 6  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220> 50

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

taccgttcgt atagcataca ttatacgaac ggta

34

<210> 7

<211> 3000

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (355)..(2949)

10

<400> 7

tgaccgggt gggaaagccc tccgagtcg ccatttggc tgcctctgtc ggtctttca 60

gttaccacgt gaaccgccga cggagaccgc ggagggggga ggiggcggcg gcgitaagtg 120

agaaaggggg aaaaggagga gagagagaga gagagagaaa aaaaagaaaa gaaaaaaaaa 180

aagaggcgaa gggagigtca ggacagggcg ggcgcggcga ccccggaggc ctagtggcgg 240

10

cggagtgaag gcttcaaggc tgaagtgagc tcgggaacgg cagtggcggc ggcgggcgga 300

caaacggact gagcagccg ggcggtggcg ggagccgcgg gaggagccgg aacc atg 357

Met

1

20

ccg gcc gtg agc ctc ccg ccc aag gag aac gcg ctc ttc aag cgg atc 405

Pro Ala Val Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asn Ala Leu Phe Lys Arg Ile

5

10

15

ttg aga tgt tat gaa cat aaa cag tat aga aat gga ttg aag ttc tgt 453

Leu Arg Cys Tyr Glu His Lys Gln Tyr Arg Asn Gly Leu Lys Phe Cys

20

25

30

30

aaa caa atc ctt tcc aat ccc aaa ttt gca gag cat gga gaa acc ctg 501

Lys Gln Ile Leu Ser Asn Pro Lys Phe Ala Glu His Gly Glu Thr Leu

35

40

45

gct atg aaa gga tta acg ttg aac tgt ttg gga aaa aag gaa gaa gct 549

Ala Met Lys Gly Leu Thr Leu Asn Cys Leu Gly Lys Lys Glu Glu Ala

50

55

60

65

40

tat gaa ttg gtt cgc aga ggt ttg aga aat gac tta aag agt cat gtg	597	
Tyr Glu Leu Val Arg Arg Gly Leu Arg Asn Asp Leu Lys Ser His Val		
70 75 80		
tgt tgg cat gtt tat ggc ctt ctt caa agg tca gac aag aag tat gat	645	
Cys Trp His Val Tyr Gly Leu Leu Gln Arg Ser Asp Lys Lys Tyr Asp		10
85 90 95		
gaa gcc att aag tgc tac aga aat gca ctg aaa tgg gat aaa gac aat	693	
Glu Ala Ile Lys Cys Tyr Arg Asn Ala Leu Lys Trp Asp Lys Asp Asn		
100 105 110		
ctt cag atc tta aga gat ctt tcc tta ctg cag att caa atg cga gat	741	20
Leu Gln Ile Leu Arg Asp Leu Ser Leu Leu Gln Ile Gln Met Arg Asp		
115 120 125		
ctt gag ggc tat agg gaa aca aga tac cag ttg ctt cag ctt cgg cct	789	
Leu Glu Gly Tyr Arg Glu Thr Arg Tyr Gln Leu Leu Gln Leu Arg Pro		
130 135 140 145		30
gca cag aga gca tca tgg att ggt tat gct att gct tac cat tta tta	837	
Ala Gln Arg Ala Ser Trp Ile Gly Tyr Ala Ile Ala Tyr His Leu Leu		
150 155 160		
gaa gac tat gaa atg gca gca aaa att tta gaa gag ttt agg aaa aca	885	
Glu Asp Tyr Glu Met Ala Ala Lys Ile Leu Glu Glu Phe Arg Lys Thr		
165 170 175		40

cag cag aca tct cct gat aaa gtg gat tat gaa tat agt gaa ctc ctc	933	
Gln Gln Thr Ser Pro Asp Lys Val Asp Tyr Glu Tyr Ser Glu Leu Leu		
180	185	190
tta tat cag aat caa gtt ctt cgg gaa gca ggt ctt tat aga gaa gcc	981	
Leu Tyr Gln Asn Gln Val Leu Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Arg Glu Ala		
195	200	205
		10
ctg gaa cat ctt tgt acc tat gaa aag cag att tgt gat aaa ctt gct	1029	
Leu Glu His Leu Cys Thr Tyr Glu Lys Gln Ile Cys Asp Lys Leu Ala		
210	215	220 225
gtt gaa gaa acc aaa ggg gaa ctt ctg ttg cag ttg tgt cgt ttg gaa	1077	
Val Glu Glu Thr Lys Gly Glu Leu Leu Leu Gln Leu Cys Arg Leu Glu		20
230	235	240
gat gct gct gac gtt tat aga gga tta caa gag agg aat cct gaa aat	1125	
Asp Ala Ala Asp Val Tyr Arg Gly Leu Gln Glu Arg Asn Pro Glu Asn		
245	250	255
tgg gcc tat tac aaa ggc tta gaa aaa gca ctg aag cca gct aat atg	1173	30
Trp Ala Tyr Tyr Lys Gly Leu Glu Lys Ala Leu Lys Pro Ala Asn Met		
260	265	270
tta gaa cgg cta aaa ata tat gag gaa gcc tgg act aaa tac ccc agg	1221	
Leu Glu Arg Leu Lys Ile Tyr Glu Glu Ala Trp Thr Lys Tyr Pro Arg		
275	280	285
		40
gga ctc gtg cca aga agg ctg ccc tta aac ttt tta tct gga gag aag	1269	

Gly Leu Val Pro Arg Arg Leu Pro Leu Asn Phe Leu Ser Gly Glu Lys		
290	295	300
305		
ttt aag gag tgt ttg gat agg ttc cta agg atg aat ttc agc aag ggc	1317	
Phe Lys Glu Cys Leu Asp Arg Phe Leu Arg Met Asn Phe Ser Lys Gly		
310	315	320
10		
tgt cca cct gtc ttc aat acc ttg agg tct tta tac aga gat aaa gag	1365	
Cys Pro Pro Val Phe Asn Thr Leu Arg Ser Leu Tyr Arg Asp Lys Glu		
325	330	335
20		
aag gtg gca atc gta gaa gaa cta gta gtt ggt tat gaa act tct cta	1413	
Lys Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Val Val Gly Tyr Glu Thr Ser Leu		
340	345	350
20		
aaa agt tgt cgc cta ttt aac ccc aat gat gat gga aag gag gaa cct	1461	
Lys Ser Cys Arg Leu Phe Asn Pro Asn Asp Asp Gly Lys Glu Glu Pro		
355	360	365
30		
cca acc aca tta ctt tgg gtc cag tac tat ttg gca cag cat tat gat	1509	
Pro Thr Thr Leu Leu Trp Val Gln Tyr Tyr Leu Ala Gln His Tyr Asp		
370	375	380
30		
aaa att ggt cag cca tcc att gct ctg gaa tac ata aat act gca att	1557	
Lys Ile Gly Gln Pro Ser Ile Ala Leu Glu Tyr Ile Asn Thr Ala Ile		
390	395	400
40		
gaa agt aca cca aca ttg ata gaa ctc ttt ctt gta aaa gct aaa atc	1605	
Glu Ser Thr Pro Thr Leu Ile Glu Leu Phe Leu Val Lys Ala Lys Ile		

405	410	415	
tat aag cat gct ggg aat att aaa gaa gct gcc agg tgg atg gat gaa			1653
Tyr Lys His Ala Gly Asn Ile Lys Glu Ala Ala Arg Trp Met Asp Glu			
420	425	430	
gcc cag gcc ctg gac aca gca gac aga ttt att aat tcc aag tgt gca			1701
Ala Gln Ala Leu Asp Thr Ala Asp Arg Phe Ile Asn Ser Lys Cys Ala			10
435	440	445	
aaa tac atg tta aaa gcc aac ctg att aaa gag gct gaa gaa atg tgt			1749
Lys Tyr Met Leu Lys Ala Asn Leu Ile Lys Glu Ala Glu Glu Met Cys			
450	455	460	465
			20
tcc aag ttt acg agg gaa gga act tca gcg gta gag aac ctg aat gaa			1797
Ser Lys Phe Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ala Val Glu Asn Leu Asn Glu			
470	475	480	
atg cag tgt atg tgg ttc cag aca gag tgt gct cag gca tac aaa gca			1845
Met Gln Cys Met Trp Phe Gln Thr Glu Cys Ala Gln Ala Tyr Lys Ala			
485	490	495	30
atg aac aaa ttt ggt gaa gca ctt aag aaa tgt cat gaa att gag aga			1893
Met Asn Lys Phe Gly Glu Ala Leu Lys Lys Cys His Glu Ile Glu Arg			
500	505	510	
cat ttt ata gaa atc acc gat gac cag ttt gac ttt cat aca tac tgt			1941
His Phe Ile Glu Ile Thr Asp Asp Gln Phe Asp Phe His Thr Tyr Cys			40
515	520	525	

atg agg aag atc acc ctt aga tca tat gtg gac tta tta aaa cta gaa 1989  
 Met Arg Lys Ile Thr Leu Arg Ser Tyr Val Asp Leu Leu Lys Leu Glu  
 530 535 540 545

gat gta ctt cga cag cat cca ttt tac ttc aaa gca gcg agg att gct 2037  
 Asp Val Leu Arg Gln His Pro Phe Tyr Phe Lys Ala Ala Arg Ile Ala 10  
 550 555 560

att gag atc tat ttg aag ctt cat gac aac cct ctg aca gat gag aac 2085  
 Ile Glu Ile Tyr Leu Lys Leu His Asp Asn Pro Leu Thr Asp Glu Asn  
 565 570 575

aaa gaa cac gag gct gat aca gca aac atg tct gac aaa gag cta aag 2133 20  
 Lys Glu His Glu Ala Asp Thr Ala Asn Met Ser Asp Lys Glu Leu Lys  
 580 585 590

aaa ctg cgt aat aaa caa aga aga gct caa aag aaa gcc cag ata gaa 2181  
 Lys Leu Arg Asn Lys Gln Arg Arg Ala Gln Lys Lys Ala Gln Ile Glu  
 595 600 605  
 30

gaa gag aaa aaa aat gca gaa aaa gaa aag cag caa cgg aat cag aaa 2229  
 Glu Glu Lys Lys Asn Ala Glu Lys Glu Lys Gln Gln Arg Asn Gln Lys  
 610 615 620 625

aag aaa aag gat gat gat gac gaa gaa att gga ggc ccc aaa gaa gag 2277  
 Lys Lys Lys Asp Asp Asp Asp Glu Glu Ile Gly Gly Pro Lys Glu Glu 40  
 630 635 640



ctt atc cct gag aaa ctg gcc aag gtt gaa act cca ttg gaa gaa gct	2325	
Leu Ile Pro Glu Lys Leu Ala Lys Val Glu Thr Pro Leu Glu Glu Ala		
645 650 655		
att aag ttt tta aca cca ttg aag aac ttg gtg aag aac aag ata gaa	2373	
Ile Lys Phe Leu Thr Pro Leu Lys Asn Leu Val Lys Asn Lys Ile Glu		
660 665 670		10
act cat ctt ttt gcc ttt gag atc tac ttt agg aaa gaa aag ttt ctt	2421	
Thr His Leu Phe Ala Phe Glu Ile Tyr Phe Arg Lys Glu Lys Phe Leu		
675 680 685		
ttg atg cta caa tca gta aag cgg gca ttt gct att gat tct agt cat	2469	
Leu Met Leu Gln Ser Val Lys Arg Ala Phe Ala Ile Asp Ser Ser His		20
690 695 700 705		
ccc tgg ctt cat gag tgc atg att cga ctc ttt cat tct gtg tgt gaa	2517	
Pro Trp Leu His Glu Cys Met Ile Arg Leu Phe His Ser Val Cys Glu		
710 715 720		
agt aaa gac tta ccc gaa aca gtt aga aca gta tta aaa caa gaa atg	2565	30
Ser Lys Asp Leu Pro Glu Thr Val Arg Thr Val Leu Lys Gln Glu Met		
725 730 735		
aat cgt ctt ttt gga gca aca aat cca aag aat ttt aat gaa acc ttt	2613	
Asn Arg Leu Phe Gly Ala Thr Asn Pro Lys Asn Phe Asn Glu Thr Phe		
740 745 750		40
ctg aaa agg aat tct gat tca ttg cca cat aga tta tca gct gcc aaa	2661	

Leu Lys Arg Asn Ser Asp Ser Leu Pro His Arg Leu Ser Ala Ala Lys		
755	760	765
atg gta tat tat tta gat tct tct agt caa aaa cga gca ata gag ctg	2709	
Met Val Tyr Tyr Leu Asp Ser Ser Ser Gln Lys Arg Ala Ile Glu Leu		
770	775	780 785
gcg aca aca ctt gat gga tcc ctc acc aac aga aac ctt cag act tgc	2757	10
Ala Thr Thr Leu Asp Gly Ser Leu Thr Asn Arg Asn Leu Gln Thr Cys		
	790	795 800
atg gag gtg ttg gaa gcc ttg tgt gat ggt agc cta gga gac tgt aaa	2805	
Met Glu Val Leu Glu Ala Leu Cys Asp Gly Ser Leu Gly Asp Cys Lys		
	805	810 815
gaa gct gcc gaa gcc tac aga gca agt tgt cat aag ctt ttc cct tat	2853	
Glu Ala Ala Glu Ala Tyr Arg Ala Ser Cys His Lys Leu Phe Pro Tyr		
	820	825 830
gct ttg gct ttc atg cct cct gga tac gaa gag gat atg aag atc aca	2901	
Ala Leu Ala Phe Met Pro Pro Gly Tyr Glu Glu Asp Met Lys Ile Thr		30
	835	840 845
gtg aac gga gat agt tct gca gaa acg gaa gaa ctg gcc aat gaa atc	2949	
Val Asn Gly Asp Ser Ser Ala Glu Thr Glu Glu Leu Ala Asn Glu Ile		
850	855	860 865
tga acatcattaa acaagcaaat ggaatgactt tggaccataa aaaaaaaaa	3000	40

<210> 8

<211> 865

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Met	Pro	Ala	Val	Ser	Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Phe	Lys	Arg
1				5				10						15	

Ile	Leu	Arg	Cys	Tyr	Glu	His	Lys	Gln	Tyr	Arg	Asn	Gly	Leu	Lys	Phe
			20					25					30		

Cys	Lys	Gln	Ile	Leu	Ser	Asn	Pro	Lys	Phe	Ala	Glu	His	Gly	Glu	Thr
		35					40						45		

Leu	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Thr	Leu	Asn	Cys	Leu	Gly	Lys	Lys	Glu	Glu
		50					55					60			

Ala	Tyr	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	His
		65				70					75				80

Val	Cys	Trp	His	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Ser	Asp	Lys	Lys	Tyr
				85						90					95

Asp	Glu	Ala	Ile	Lys	Cys	Tyr	Arg	Asn	Ala	Leu	Lys	Trp	Asp	Lys	Asp
				100						105					110

10

20

30

40

Asn Leu Gln Ile Leu Arg Asp Leu Ser Leu Leu Gln Ile Gln Met Arg  
 115 120 125

Asp Leu Glu Gly Tyr Arg Glu Thr Arg Tyr Gln Leu Leu Gln Leu Arg  
 130 135 140

Pro Ala Gln Arg Ala Ser Trp Ile Gly Tyr Ala Ile Ala Tyr His Leu  
 145 150 155 160

10

Leu Glu Asp Tyr Glu Met Ala Ala Lys Ile Leu Glu Glu Phe Arg Lys  
 165 170 175

Thr Gln Gln Thr Ser Pro Asp Lys Val Asp Tyr Glu Tyr Ser Glu Leu  
 180 185 190

20

Leu Leu Tyr Gln Asn Gln Val Leu Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Arg Glu  
 195 200 205

Ala Leu Glu His Leu Cys Thr Tyr Glu Lys Gln Ile Cys Asp Lys Leu  
 210 215 220

30

Ala Val Glu Glu Thr Lys Gly Glu Leu Leu Leu Gln Leu Cys Arg Leu  
 225 230 235 240

Glu Asp Ala Ala Asp Val Tyr Arg Gly Leu Gln Glu Arg Asn Pro Glu  
 245 250 255

Asn Trp Ala Tyr Tyr Lys Gly Leu Glu Lys Ala Leu Lys Pro Ala Asn  
 260 265 270

40

Met Leu Glu Arg Leu Lys Ile Tyr Glu Glu Ala Trp Thr Lys Tyr Pro  
 275 280 285

Arg Gly Leu Val Pro Arg Arg Leu Pro Leu Asn Phe Leu Ser Gly Glu  
 290 295 300

Lys Phe Lys Glu Cys Leu Asp Arg Phe Leu Arg Met Asn Phe Ser Lys  
 305 310 315 320

Gly Cys Pro Pro Val Phe Asn Thr Leu Arg Ser Leu Tyr Arg Asp Lys  
 325 330 335

Glu Lys Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Val Val Gly Tyr Glu Thr Ser  
 340 345 350

Leu Lys Ser Cys Arg Leu Phe Asn Pro Asn Asp Asp Gly Lys Glu Glu  
 355 360 365

Pro Pro Thr Thr Leu Leu Trp Val Gln Tyr Tyr Leu Ala Gln His Tyr  
 370 375 380

Asp Lys Ile Gly Gln Pro Ser Ile Ala Leu Glu Tyr Ile Asn Thr Ala  
 385 390 395 400

Ile Glu Ser Thr Pro Thr Leu Ile Glu Leu Phe Leu Val Lys Ala Lys  
 405 410 415

Ile Tyr Lys His Ala Gly Asn Ile Lys Glu Ala Ala Arg Trp Met Asp

10

20

30

40

	420		425		430	
Glu Ala Gln Ala Leu Asp Thr Ala Asp Arg Phe Ile Asn Ser Lys Cys						
	435		440		445	
Ala Lys Tyr Met Leu Lys Ala Asn Leu Ile Lys Glu Ala Glu Glu Met						
	450		455		460	10
Cys Ser Lys Phe Thr Arg Glu Gly Thr Ser Ala Val Glu Asn Leu Asn						
	465		470		475	480
Glu Met Gln Cys Met Trp Phe Gln Thr Glu Cys Ala Gln Ala Tyr Lys						
		485		490		495
						20
Ala Met Asn Lys Phe Gly Glu Ala Leu Lys Lys Cys His Glu Ile Glu						
	500		505		510	
Arg His Phe Ile Glu Ile Thr Asp Asp Gln Phe Asp Phe His Thr Tyr						
	515		520		525	
Cys Met Arg Lys Ile Thr Leu Arg Ser Tyr Val Asp Leu Leu Lys Leu						
	530		535		540	30
Glu Asp Val Leu Arg Gln His Pro Phe Tyr Phe Lys Ala Ala Arg Ile						
	545		550		555	560
Ala Ile Glu Ile Tyr Leu Lys Leu His Asp Asn Pro Leu Thr Asp Glu						
		565		570		575
						40

Asn Lys Glu His Glu Ala Asp Thr Ala Asn Met Ser Asp Lys Glu Leu  
 580 585 590

Lys Lys Leu Arg Asn Lys Gln Arg Arg Ala Gln Lys Lys Ala Gln Ile  
 595 600 605

Glu Glu Glu Lys Lys Asn Ala Glu Lys Glu Lys Gln Gln Arg Asn Gln  
 610 615 620

10

Lys Lys Lys Lys Asp Asp Asp Asp Glu Glu Ile Gly Gly Pro Lys Glu  
 625 630 635 640

Glu Leu Ile Pro Glu Lys Leu Ala Lys Val Glu Thr Pro Leu Glu Glu  
 645 650 655

20

Ala Ile Lys Phe Leu Thr Pro Leu Lys Asn Leu Val Lys Asn Lys Ile  
 660 665 670

Glu Thr His Leu Phe Ala Phe Glu Ile Tyr Phe Arg Lys Glu Lys Phe  
 675 680 685

30

Leu Leu Met Leu Gln Ser Val Lys Arg Ala Phe Ala Ile Asp Ser Ser  
 690 695 700

His Pro Trp Leu His Glu Cys Met Ile Arg Leu Phe His Ser Val Cys  
 705 710 715 720

Glu Ser Lys Asp Leu Pro Glu Thr Val Arg Thr Val Leu Lys Gln Glu  
 725 730 735

40

Met Asn Arg Leu Phe Gly Ala Thr Asn Pro Lys Asn Phe Asn Glu Thr  
 740 745 750

Phe Leu Lys Arg Asn Ser Asp Ser Leu Pro His Arg Leu Ser Ala Ala  
 755 760 765

Lys Met Val Tyr Tyr Leu Asp Ser Ser Ser Gln Lys Arg Ala Ile Glu  
 770 775 780

Leu Ala Thr Thr Leu Asp Gly Ser Leu Thr Asn Arg Asn Leu Gln Thr  
 785 790 795 800

Cys Met Glu Val Leu Glu Ala Leu Cys Asp Gly Ser Leu Gly Asp Cys  
 805 810 815

Lys Glu Ala Ala Glu Ala Tyr Arg Ala Ser Cys His Lys Leu Phe Pro  
 820 825 830

Tyr Ala Leu Ala Phe Met Pro Pro Gly Tyr Glu Glu Asp Met Lys Ile  
 835 840 845

Thr Val Asn Gly Asp Ser Ser Ala Glu Thr Glu Glu Leu Ala Asn Glu  
 850 855 860

Ile  
 865

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

tcctctttgt tagggttctt cttc

24

<210> 10

<211> 19

10

20

30

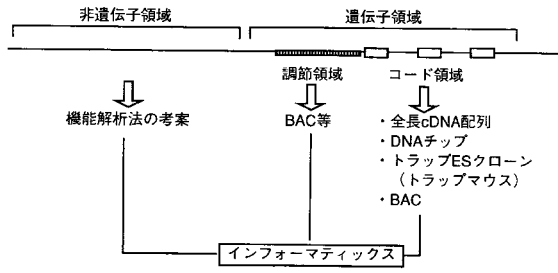
40

50

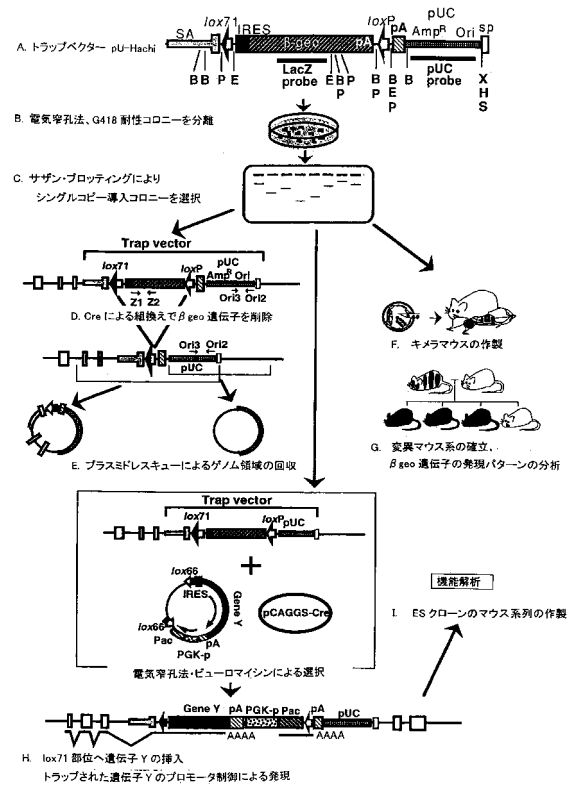


<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 10  
 agttaccacg tgaaccgcc 19  
 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 10  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA  
 <400> 11  
 caaagtcatt ccatttgctt gt 22  
**【 0 0 9 3 】**  
**【 配列表フリーテキスト 】**  
 配列番号 1 : 合成DNA  
 配列番号 2 : 合成DNA  
 配列番号 3 : 合成DNA  
 配列番号 4 : 合成DNA 20  
 配列番号 5 : 合成DNA  
 配列番号 6 : 合成DNA  
 配列番号 9 : 合成DNA  
 配列番号 10 : 合成DNA  
 配列番号 11 : 合成DNA  
**【 図面の簡単な説明 】**  
**【 図 1 】** 遺伝子部分とそれ以外の部分における両者の機能解析の概念を示す図である。  
**【 図 2 】** 本発明のトラップベクターの構築法及び遺伝子のトラップ法の概要を示す図である。  
**【 図 3 】** loxPの構造を示す図である。 30  
**【 図 4 】** lox71とlox66との組換えを示す図である。  
**【 図 5 】** 変異型 loxPによるDNA断片の挿入を示す図である。  
**【 図 6 A 】** 本発明のトラップベクターを示す図である。  
**【 図 6 B 】** 本発明のトラップベクターを示す図である。  
**【 図 7 】** トラップベクター-pU-Hachiの構築図である。  
**【 図 8 】** 2段階の変異型遺伝子トラップ法を示す図である。  
**【 図 9 】** キメラ動物作製によるトラップ系統の樹立の概要を示す図である。  
**【 符号の説明 】**  
 1 : 矢印

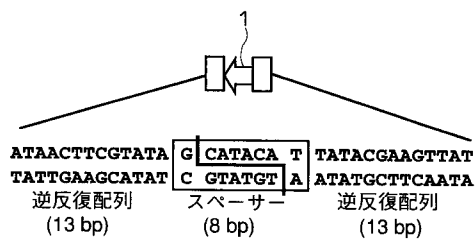
【 図 1 】



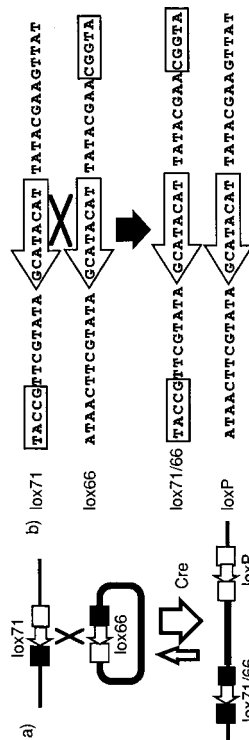
【 図 2 】



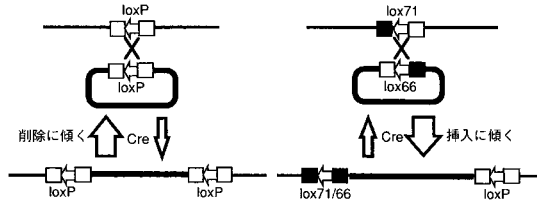
【 図 3 】



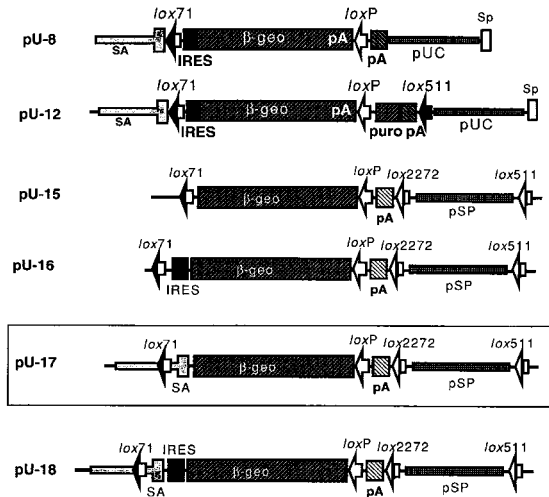
【 図 4 】



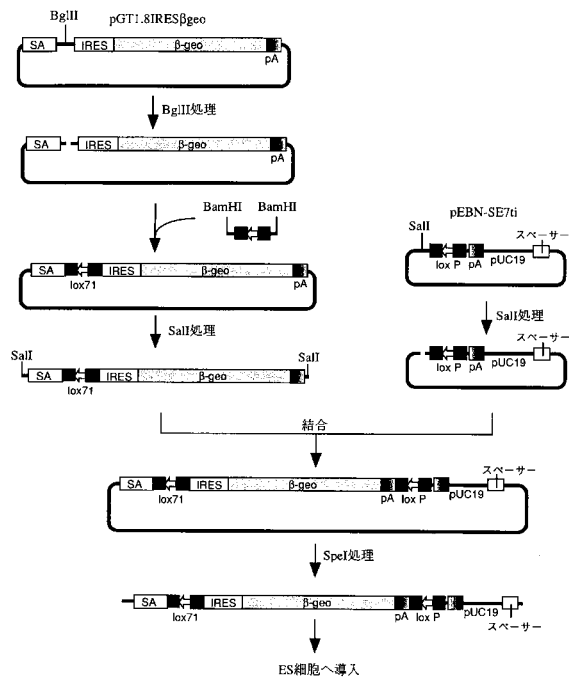
【 図 5 】



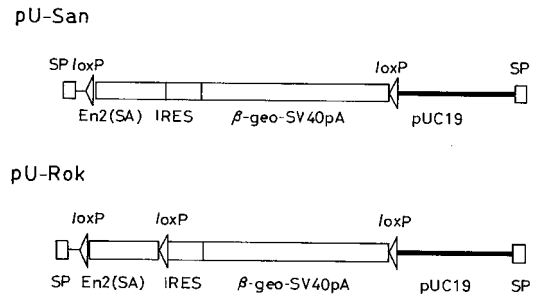
【 図 6 A 】



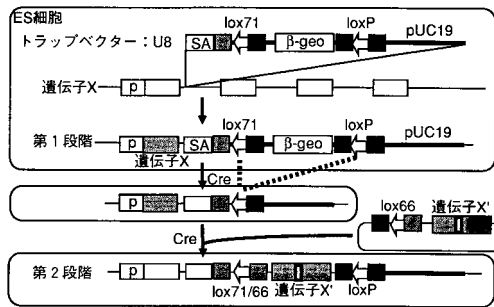
【 図 7 】



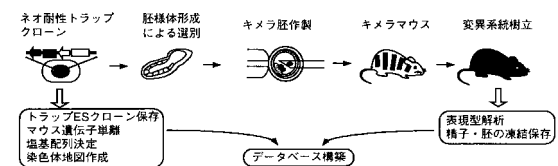
【 図 6 B 】



【 図 8 】



【 図 9 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 山村 研一  
熊本県熊本市九品寺4 - 2 4 - 1 熊本大学 発生医学研究センター内
- (72)発明者 荒木 喜美  
熊本県熊本市九品寺4 - 2 4 - 1 熊本大学 発生医学研究センター内

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 Cellular and Molecular Biology, Vol.45, No.5, pp.737-750 (1999)  
分子細胞治療、Vol.2, No.2, pp.162-168 (2001.4.1)  
遺伝子医学、Vol.2, No.4, pp.612-617 (1998)  
Developmental Dynamics, Vol.218, No.2, pp.300-315 (2000)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B名)

C12N 15/00  
BIOSIS/WPI (DIALOG)  
PubMed  
JSTPlus(JOIS)  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq