

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3713513号
(P3713513)

(45) 発行日 平成17年11月9日(2005.11.9)

(24) 登録日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A O 1 K 67/027
C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027
C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 8 (全 38 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-157568 (P2001-157568)</p> <p>(22) 出願日 平成13年5月25日(2001.5.25)</p> <p>(65) 公開番号 特開2002-369689 (P2002-369689A)</p> <p>(43) 公開日 平成14年12月24日(2002.12.24)</p> <p>審査請求日 平成13年7月5日(2001.7.5)</p> <p>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23回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表</p> <p>微生物の受託番号 FERM P-18340</p>	<p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔</p> <p>(72) 発明者 井出 博之 福岡県福岡市中央区平尾4-10-11</p>
---	---

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に示す遺伝子が破壊されたマウス胚幹細胞。

【請求項2】

前記遺伝子の破壊が、

loxP-SA-loxP-IRES-M-pA-loxP-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リー部位を、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記載のマウス胚幹細胞。

【請求項3】

前記loxP配列が配列番号3に示されるものである、請求項2記載のマウス胚幹細胞。

【請求項4】

配列番号7に示す遺伝子が破壊されたノックアウトマウス。

【請求項5】

前記遺伝子の破壊が、

loxP-SA-loxP-IRES-M-pA-loxP-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リー部位を、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4記載のノックアウトマウス。

【請求項6】

前記 loxP 配列が配列番号 3 に示されるものである、請求項 5 記載のノックアウトマウス

【請求項 7】

配列番号 7 に示す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、

loxP-SA-loxP-IRES-M-pA-loxP-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、

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。

10

【請求項 8】

前記 loxP 配列が配列番号 3 に示されるものである、請求項 7 記載の方法。

【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。

20

【0002】

【従来技術】

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。

【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。

30

【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。

40

【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。

【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

50

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導系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。 10

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。 20

【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。 30

【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。 40

【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、 50

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。

【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。

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

【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。

【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。

【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が進められている。

【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ァ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、又は該loxP配列のうち逆反復配列1及び逆反復配列2の双方若しくはいずれか一方の一部の配列に変異が導入された変異型loxP配列を含むトラップベクターを導入してなる胚幹細胞又はノックアウト動物であって、配列番号7に示す遺伝子が破壊された胚幹細胞又はノックアウト動物。

【0022】

loxP配列としては配列番号3に示されるものが挙げられ、変異型loxP配列としては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。

【0023】

- (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。)

上記ノックアウト動物としては、ノ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。

【0024】

【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ノ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)。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明においてトラップされた遺伝子（Ayu6003遺伝子という）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により得られたものである。そして、Ayu6003遺伝子は、配列番号7に示す配列を有することが分かった。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。配列番号7に示す遺伝子は、大腸菌Ftsj遺伝子のマウスホモログであると考えられ、ゲノムDNAの解析により、この遺伝子はマウスMTH1遺伝子の上流にMTH1の転写の方向とは逆向きに存在することが判明した。

【0026】

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るの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。すなわち、プラスミドレスキューにより得られた3'フランキングゲノム断片の配列とAyu6003 cDNA 全長の配列とを比較した結果、ベクター挿入位置から約1kb下流に、5' RACE 産物に続く配列が現れた。従って、トラップベクターは Ayu6003 遺伝子のイントロン内に挿入され、挿入時のゲノムDNAの欠失も大きくないことが確認された。以下、本発明をさらに詳しく説明する。

【0027】

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。

【0028】

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み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。

【0029】

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。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

1oxP (locus of crossing (X-ring) over, P1) は34塩基(5'-ataacttcgtata gcatacat ta tacgaagttat-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。

10

【 0 0 3 1 】

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)。

20

【 0 0 3 2 】

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 3 】

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)。

30

【 0 0 3 4 】

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)。

【 0 0 3 5 】

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:TACCGT TCGTATA GCATACAT TATACGAACGGTA:配列番号6)が、右側には野生型の1oxP(ATAACTTCGTATA 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。

40

【 0 0 3 6 】

50

実際に、ES細胞にあらかじめlox71などの変異型loxP（以下「変異型lox」ともいう）を組込んでおき、そこに他の変異型loxP（例えばlox66）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lox71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lox66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。

【0037】

この変異型lox(lox71又はlox66)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loxとしてlox71を例示するが、これに限定されるものではなく、lox71の代わりにlox66を用いたものも、本発明のトラップ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6B)。

10

【0038】

- (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

20

【0039】

上記ベクターの構成要素において、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は分子内リボソ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(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。

【0040】

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6A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6B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γ-グロビン遺伝子の一部等が挙げられる。

30

40

【0041】

スプライスアクセプターは、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。

スプライスドナーは、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。

【0042】

IRESは、分子内リボソームエントリー部位(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。

【0043】

50

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 β -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 (β -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、プラストサイジンS耐性遺伝子等が挙げられる。

【0044】

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、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で連結しておくことができる。

【0045】

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- β -geo-pA: 図7)は、pGT1.8IRESbetageoに由来している。このpGT1.8IRESbetageoは、マウスEn-2遺伝子由来のスーパープライスアクセプター、脳心筋炎ウイルス由来のIRES、 β -geoを含んでいる。このpGT1.8IRESbetageoのBglIII部位にlox71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、loxP、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-lox71- β -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、スーパープライスアクセプター、lox71、IRES、 β -geo、pA、loxP、pA、pUC19、任意配列である (図7)。

【0046】

上記(b)に示すベクターをpU8deltaという。pU8deltaは、pU-8のスーパープライスアクセプターを削除したベクターである。このベクターは、lox71がレポーターである β -geoの前に、loxPが β -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 β -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。

【0047】

上記(c)に示すベクターを「pU-12」という。このベクターは、SA-lox71-IRES-M-pA-loxP-puro-pA-lox511-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BglIII部位にlox511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-lox71- β -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。

【0048】

上記(d)に示すベクターを「pU-15」という。このベクターは、lox71-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されている。ここで、「lox2272」は、loxPのスペーサー領域 (gcatacat)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、「lox511」は、loxP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。lox511及びlox2272は、loxP配列のスペーサー部分に変異があるため、それ自身 (lox511同士、lox2272同士) とは組換え

10

20

30

40

50

を起こすが、loxPやlox71とは組換えを起こさない変異lox配列である。なお、lox2272及びlox511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)。

【0049】

上記(e)に示すベクターを「pU-16」という。このベクターは、lox71-IRES-M-loxP-pA-lox2272-PV-lox511で構成されており、pU-15のlox71とマーカ(-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、lox71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、lox511、loxP、PGK poly(A)シグナル、lox2272を挿入してプラスミドを構築し、次に、pU-8のSA内にlox71配列を挿入し、続いて -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連結することにより、pU-17を得ることができる。

【0050】

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。

【0051】

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。

【0052】

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。

【0053】

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(例えばロックアウトマウス)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。

【0054】

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、「

10

20

30

40

50

(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。

【0055】

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。

10

【0056】

(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 μ gを電気穿孔法(バイオラッドGenePulserを用い、800V、3 μ 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 μ 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。

20

【0057】

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、発現するという事は、ある遺伝子の下流に組み込まれたことを意味する。

【0058】

(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、サザンブロット法等により組み込みパターンを解析する。サザンブ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。

30

【0059】

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。

40

【0060】

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。これらを不妊雄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。

50

【 0 0 6 1 】

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。

【 0 0 6 2 】

(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、行動や記憶、血液を用いて行う。

10

【 0 0 6 3 】

(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、一致するかどうかも調べておく。

20

【 0 0 6 4 】

(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。

【 0 0 6 5 】

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。

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。

30

【 0 0 6 6 】

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。

40

【 0 0 6 7 】

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

50

ザンプ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。

【0068】

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。

【0069】

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、あるいはパッチ法によりポリ(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。

【0070】

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、MarathonTM cDNA Amplification Kit; CLONETECH社、その他)。

【0071】

本発明において解析されたクローンAyu6003のcDNAの塩基配列を配列番号7に、該塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号8に示す。Ayu6003のcDNAは、配列番号9に示す塩基配列のうち、エクソン1(2580~2608番目の29bpの配列)、エクソン2(3193~3482番目の290bpの配列)及びエクソン3(5689~6774番目の1086bpの配列)から構成され、コード領域は738bpであることが分かった。

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。

【0072】

(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。

【0073】

(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。

【0074】

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

10

20

30

40

50

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 10, 69: 2110-2114 (1972))、エレクトロポレーション法(Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194: 182-187 (1990))等が挙げられる。

【0075】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビスエ(*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gal11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。 20

【0076】

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。 30

【0077】

【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BglIII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-8を得た。 40

【0078】

(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BglIII部位 50

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 SaI 部位に pU-Hachi から SA-IRES-lox71-geo の SaI 断片を挿入することにより、pU-12 を得た。

【 0 0 7 9 】

(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 SaI 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。

【 0 0 8 0 】

(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 8 1 】

〔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-Rok 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 3×10^7 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 2 】

(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 3 】

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 1.5×10^7 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 4 】

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、 1×10^3 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。

PBS 中、 1×10^7 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-ブロモ-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-Rok を直鎖状にして TT2 ES 細胞に導入し、クローン (Ayu-6003 クローン) を単離した。Ayu-6003 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-18340)。

【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-6003) 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。なお、ヘテロ接合体は 9.5 日胚より成体まで心臓に *-geo* の発現を認めた。

【0088】

(2) トラップした遺伝子の解析

(i) RNA の抽出

5' RACE を行うため、材料として正常 B6 マウスの心臓から RNA を抽出した。

(ii) トラップされた遺伝子の cDNA の解析

20

上記 RNA サンプルを元に、cDNA 合成用プライマー (5'-TGCTCTGTCAGGTACCTGTTG-3' (配列番号 10)) を合成し、1st strand 合成を行った。PCR は、キットに付属のプライマーと以下のプライマー: 5'-CTTTGTTAGGGTTCTTCTTC-3' (配列番号 11) を用い、PCR を行った。

【0089】

その結果、340 bp の産物を得た。この 5' RACE 産物の塩基配列を決定し、データベースホモロジー検索を行ったところ、AA277699 EST クローンに該当した (図 10)。次にこの AA277699 の配列を用いてデータベースホモロジー検索を行った結果、W48287 EST クローンが当り (図 10)、この 3 個の配列をつなぎあわせたところ、AK00956 の配列に当たった。

【0090】

Ayu6003 の cDNA は、配列番号 9 に示す塩基配列のうち、エクソン 1 (2580 ~ 2608 番目の 29bp の配列)、エクソン 2 (3193 ~ 3482 番目の 290bp の配列) 及びエクソン 3 (5689 ~ 6774 番目の 1086bp の配列) から構成され、コード領域は 738bp であることが分かった。また、レスキューされた 3' フランキングゲノム断片の配列と Ayu6003 cDNA 全長の配列 (配列番号 7) とを比較した結果、ベクター挿入位置から約 1kb 下流に、5' RACE 産物に続く配列が現れた。従って、トラップベクターは Ayu6003 遺伝子のイントロン内に挿入され、挿入時のゲノム DNA の欠失も大きくないことが確認された。また、本発明のノックアウトマウスは、配列番号 7 に示す遺伝子が破壊されたものであることが判明した。

30

【0091】

【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。

40

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
 IDE, HIROYUKI

<120> KNOCKOUT ANIMAL

<130> P01-0415

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

taccgttcgt atagcataca ttatacgaag ttat

34

<210> 2

10

20

30

40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

10

<400> 2

ataacttcgt atagcataca ttatacgaac ggta

34

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat

34

30

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

⟨400⟩ 4

ataacttcgt ata

13

⟨210⟩ 5

10

⟨211⟩ 13

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

20

⟨400⟩ 5

tatacgaagt tat

13

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 34

⟨212⟩ DNA

30

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

⟨400⟩ 6

taccgttcgt atagcataca ttatacgaac ggta

34

40

<210> 7

<211> 1405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(759)

<400> 7

20

ggaaaccacc agcaagcagc a atg gcc ggg cat ctg aag ctg gta ggc gtt 51

Met Ala Gly His Leu Lys Leu Val Gly Val

1 5 10

ccc ctt aag gtt cgg agg tta cac aca gca gtg tgt cac tac agg ggc 99

Pro Leu Lys Val Arg Arg Leu His Thr Ala Val Cys His Tyr Arg Gly

15 20 25

30

cgg gcc gtc gct gag cac ctg tgg ctc acg cgg cat cta aag gat ccg 147

Arg Ala Val Ala Glu His Leu Trp Leu Thr Arg His Leu Lys Asp Pro

30 35 40

ttt gtg aag gcc gca aag gtg gag agt tac cgc tgc cgc agt gcc tac 195

Phe Val Lys Ala Ala Lys Val Glu Ser Tyr Arg Cys Arg Ser Ala Tyr

45 50 55

40

aaa ctc ctg gag atg aat gag aag cat cag atc ctg agg ccc ggt ctc	243	
Lys Leu Leu Glu Met Asn Glu Lys His Gln Ile Leu Arg Pro Gly Leu		
60 65 70		
cgg gtg ctg gac tgc ggc gca gct ccg gga gcc tgg agt cag gtg gca	291	
Arg Val Leu Asp Cys Gly Ala Ala Pro Gly Ala Trp Ser Gln Val Ala		10
75 80 85 90		
gtg cag cgc gtc aat gcc aca ggc gca gat tcc agc tct cct gtg ggc	339	
Val Gln Arg Val Asn Ala Thr Gly Ala Asp Ser Ser Ser Pro Val Gly		
95 100 105		
ttt gtg ctt ggc gtc gat ctt ctt cac ata ttc cct ttg gcg gga gca	387	20
Phe Val Leu Gly Val Asp Leu Leu His Ile Phe Pro Leu Ala Gly Ala		
110 115 120		
act ttt cta tgc cct gct gat gtg act gac ccc aga act ttc cag aag	435	
Thr Phe Leu Cys Pro Ala Asp Val Thr Asp Pro Arg Thr Phe Gln Lys		
125 130 135		30
att cta gaa ctg ctt ccc agc agg aga gca gat gtg att ctg agt gac	483	
Ile Leu Glu Leu Leu Pro Ser Arg Arg Ala Asp Val Ile Leu Ser Asp		
140 145 150		
atg gca ccg aat gcc act ggg atc aga gac ctc gat cac gat aag ctc	531	
Met Ala Pro Asn Ala Thr Gly Ile Arg Asp Leu Asp His Asp Lys Leu		40
155 160 165 170		

atc agc ttg tgc ctt acc ctt gtg gac atg gct gtg gac atc ctg cat 579
 Ile Ser Leu Cys Leu Thr Leu Val Asp Met Ala Val Asp Ile Leu His
 175 180 185

ccc gga ggg aca ctg ctg tgt aaa acc tgg gcc gga agt aaa agc cac 627
 Pro Gly Gly Thr Leu Leu Cys Lys Thr Trp Ala Gly Ser Lys Ser His
 190 195 200

10

ctg ctg cag aag aga ctg acc cag gaa ttc cag agc aca agg gtg gtg 675
 Leu Leu Gln Lys Arg Leu Thr Gln Glu Phe Gln Ser Thr Arg Val Val
 205 210 215

aaa ccg gag gcc agc agg aaa gag tct tcg gag gtg tac ctg tta gcc 723
 Lys Pro Glu Ala Ser Arg Lys Glu Ser Ser Glu Val Tyr Leu Leu Ala
 220 225 230

20

acc cag tac cgt ggg ggg aag ggc acc agg agg ccg tgagtctgcc 769
 Thr Gln Tyr Arg Gly Gly Lys Gly Thr Arg Arg Pro
 235 240 245

ctgccattct ggggtgctt ccggaggagc gtggattcaa gctgccttgt ggatatgacc 829

30

agcaccceaa ggcaccctcg cttttaaaga gataagcaaa tattttcaag ggccgtgaaa 889

aagtgctaag aatgggcagc gccatggcgc agtgaggaaa gggggattgc tgctaagcct 949

gacagtciga gtgcagcadc cgggacccca gagcagcgag agcgcgtgca cgcacacgca 1009

40

ggctgcacac aatatgaaca gatatatgg tactgttagt ttttggcaat ttgtctggga 1069

agaaagaatc tgactgtgga attctctcat cggctcacag gctgagccag ggagacattg 1129

atgagtgact gacgtggcag ggcccagccc tggcgggtg ctgccatccc tggcaggta 1189

gctgagttg tatgagaaag cggggtagc aggactgagg aacaagccag tcatccatac 1249

10

cccactcccc gctccagtt gctgctgctt ccaggttccc accccgagaa cccactttga 1309

ttctctcag tgaiggactg tggttgggat gagtgaggca aagaaacct ttccttccaa 1369

ggctttttaa tgcigaaaac aaagcagttc tcctca 1405

20

<210> 8

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Met Ala Gly His Leu Lys Leu Val Gly Val Pro Leu Lys Val Arg Arg

30

1 5 10 15

Leu His Thr Ala Val Cys His Tyr Arg Gly Arg Ala Val Ala Glu His

20 25 30

Leu Trp Leu Thr Arg His Leu Lys Asp Pro Phe Val Lys Ala Ala Lys

35 40 45

40

Val Glu Ser Tyr Arg Cys Arg Ser Ala Tyr Lys Leu Leu Glu Met Asn
 50 55 60

Glu Lys His Gln Ile Leu Arg Pro Gly Leu Arg Val Leu Asp Cys Gly
 65 70 75 80

Ala Ala Pro Gly Ala Trp Ser Gln Val Ala Val Gln Arg Val Asn Ala
 85 90 95

10

Thr Gly Ala Asp Ser Ser Ser Pro Val Gly Phe Val Leu Gly Val Asp
 100 105 110

Leu Leu His Ile Phe Pro Leu Ala Gly Ala Thr Phe Leu Cys Pro Ala
 115 120 125

20

Asp Val Thr Asp Pro Arg Thr Phe Gln Lys Ile Leu Glu Leu Leu Pro
 130 135 140

Ser Arg Arg Ala Asp Val Ile Leu Ser Asp Met Ala Pro Asn Ala Thr
 145 150 155 160

30

Gly Ile Arg Asp Leu Asp His Asp Lys Leu Ile Ser Leu Cys Leu Thr
 165 170 175

Leu Val Asp Met Ala Val Asp Ile Leu His Pro Gly Gly Thr Leu Leu
 180 185 190

Cys Lys Thr Trp Ala Gly Ser Lys Ser His Leu Leu Gln Lys Arg Leu
 195 200 205

40

Thr Gln Glu Phe Gln Ser Thr Arg Val Val Lys Pro Glu Ala Ser Arg
 210 215 220

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

Lys Gly Thr Arg Arg Pro
 245

10

<210> 9

<211> 6863

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gccagcacca aagccccctct tcttcatgcc caggagaact cgctgaggct gtagcactag 60

30

cacaagggtta taaagcctgg aggagctcat gctctcctgg gtctctgtaa gaggatggga 120

aaatgtgggtt tgattgggtc ttgtagtctg tttagagtat gcatcatatg agttcigtig 180

tggccagggtg ggaggagat acatctggag aggaaataag aatgtatgta tgtatgtaat 240

40

nacaagtgct ggggaaagaa ctccaaagcc ttgagcatga taggctaatag tctcccatt 300

gagccatacc ccagccccc acigggggat tciaggcagg ggcctiacta cigagccata 360
ctcccagiac tgagttatct ciccagcccc cagacaaagc gtcttatttt atgttttctt 420
aggcccaac tggctaaggc agtatacaga aactiggacc ctccaaagag gctgcagigt 480
ataagaaaag gaactigaac aagggcigga gagatggcag tggtaggag gactagctgc 540
tcttcagag gacigtggtt ccatttctag catccacatg gttgctcag actgtctaac 600
tctgttciga tgcctcttc tggcgtcttt gggaccagg cacacatata gtataatagt 660
taacaaaact ccgtattcc agciggagag atggctgctc agtggtaag agcactggct 720
gtctctccag gggaccaag tccaattccc agcaaccaca tggiggcttg caattgtctg 780
taattctagc tcciggggat atggccccct acacaaacat acatggaggc aaagcatcaa 840
tgaacataaa aaataaatal ttttttaaag ctatacacca cctciggatg gtttttaaa 900
atatttattt gttgtttgtt ttgtttatta tatacacigt agcgtcttc agacactcca 960
gaagagggca tcagatctca ttacggatgg ttgtgagcca ccatgtggtt gctgggatit 1020
gaactcagga cctttggaag agcagtcagc gctcctaacc gctgagccaa ttaccagcc 1080
ccccaaaata aatattttta aaacctata cgttctcgaa taaaaaatc caacaacctt 1140

10

20

30

40

atatgtgcac aatataagtt aaaattiaaa aacagaataa gaagaaaggg aaagaaaagg 1200
gacccggaag citaggccig gtcigaggt aagtcaggag aagaagtggg citagcatig 1260
gcctgtgttc tgacttgcc tggcctgagc ctctggcttc ctgactcagc aaagtcagcc 1320
atctcttatt aagcaccggc tgtatacagc tgccttccat agccacagga tatccacagg 1380
atatcttica tatccacaga taccaggata ccttaccctt ccatggatac tgggattaaa 1440
gtatgatgaa atcacttctt tgaatggcg tatttgccig taacttacag acatccctcg 1500
gccacttta catgcaaact atgtaaattg tttcatgta gggagtgatg acaaatgtcc 1560
tcacattcca tacagatgag tgatttgttt tgcaaggatt ttaaacgaga cagagtgggt 1620
gccatgttct ccattctgga cttaaaccca caatcttccc gccccaacc acctgagigt 1680
agaatgacag gcgtgcacca gcgtgctcag ctcttgtct cagtgaatg agcagtgagg 1740
acatagattg gaatcaggta gaatgggtgt ggctatggct ctgttgattg gcattgcttc 1800
aaacacagag tcccatact gtttcccttt gcaatggaaa tgggagtggg tgggtagggg 1860
agtggggggg agggtatgag ggacttttgg gatagcattg gaaatgtaa tgaggaaaat 1920
acctaatataaaa aaaagtataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agactaagaa cagagtataa 1980
gacttacitt ctctgtttct gaggcgaata ctagtgtccc gaggatcaat ggcagagcct 2040

10

20

30

40

agaagcaaac aagggtgtcc tggtagctgt gatagggtgt aaatcggatg tgtgtcaggg 2100
aacttggac aaccttgggt ctgaattgag gtaaggtgt gcagggtgt gagacaatgc 2160
acaaggagtg cagagcccag aacctgctg cagggggcac tcgcaaatg ccgtcccta 2220
gcctccctc ccaggggcta tggccgttac agacaggctg caaacigccc atgcatcagc 2280
ttaccgcca ggctccctct cctctcatt tcgtctctt actctctgta gtttccctgg 2340
cttcccgac ctacggctg cccagtacc cagtctctt gggtgggttg aagctctct 2400
ctagctctc taccctctt ctcccagat ttccctggc accccactcc cgacctccag 2460
cgtctctcc gcacctcagat ctattctcc cgggaccatc cataacctcg cgtcccagcc 2520
aaagtctcc ggggcggagc ctctctgtg aagcagggc gggacttccg gcggcgggag 2580
gaaaccacca gcaagcagca atggccgggt gagtgagta cggctctgc ctgctctaaa 2640
aggactctt tgcatacagg aacggagttg atgacagtat tagggagctc agtgaattgt 2700
gttgcagagg ggtgtctggc acctccctc cggggagcgg gacacgggtg tacgatgttt 2760
attcatgtac agactgagt gagtgaggct tgcacatag aaatagggtt atgggtctcc 2820
tggataaagc tgtctctc ggaggattgg ggtctggatc cccagagctt acaaaatact 2880

10

20

30

40

ggacatgigt gctgaccaa igtaaccca gigtggga ggcagagaaa aggggtccct 2940
ggagaaagct ggcgagatag actggcaggt tggcgacctt acatcaatac ataaggtaga 3000
gagcaagcga aggggacgtc cttctctac ttggccccc catacacagg cagacacaig 3060
tgcacataca tgciaataca catgctgca tgcatactgc acatacatat gcagaaacaa 3120 10
aaaggttggg accaagactt cttggctct ctgtgtaatg cccaccgct aactctttt 3180
tcgtcttcc aggcactcga agctggtagg cgttccctt aaggttcggg ggttacacac 3240
agcagtgigt cactacaggg gccgggccgt cgtgagcac ctgtggctca cgcggcatct 3300
aaaggatccg ttgtgaagg ccgcaaaggt ggagagttac cgtgccgca ggcctacaa 3360 20
actctggag atgaatgaga agcatcagat cctgaggccc ggtctccggg tgcaggactg 3420
cggcgcagct ccgggagcct ggagtcaggt ggcagtgtag cgcgtcaatg ccacaggcgc 3480
aggitggacc tgcaggactc ccagctctc tgactactgc tagtgagcag cttttacct 3540 30
agagacattg ttgaggctc ttcttaagta ggtttagaga tgagagttac agaaatagc 3600
cacaggcigg gtacaggaca cagctgctaa gtaaagtcag gctcccgcag gcctacgagg 3660
tggaggcagg attagaagtt cagggtcctc ccagctacat ggtatgtctg tactagagaa 3720 40
aaaaaaaagg gcagaggtag ggggttggga agggagcaca ggggtgtgtg gatgctatga 3780

agatgggita gtcagcagtg gttctcactc tgggctgiga cccactggct tggtggtiga 3840
 atggtgcatg cggtaaggc tgacaagctt gagttctcgc cccaggattt acactgigga 3900
 cggggagaat tgacaccaga aagtigctgt gggactcca caaatgigcc ctggcgtgtg 3960
 ctcaattgct tatataccct ctacataca tgattaaata agcaaaatgt ttaaaaaaga 4020
 acaaagaaga aaaccacagg agtiggcgga cagcctgggt ttgcactatg tccctttctc 4080
 taacaaaaac aaaaagcccc agaaaactaa acaataaigg ctccctttgc ttctgtttgc 4140
 tgcataagc accataacca gacagtgiga giaggaaaag gttccacct gggctggggg 4200
 tctgggcect gtaagaaagc aggcctttcg agccaggggg aacaggcagg ctgtgcgagc 4260
 cgggggagcg ggccagtcag cagcaccctc caiggccgtg gcatcagcag ctccgtccctc 4320
 caggctccag cctigattga gttccgttc tggcttcttt cagtacagt gatattgata 4380
 tgaagtcac gtaacccctt tctctccaa ctigattttt ggttatggtg ttcatcaca 4440
 gcagtagaaa cgccaagaca gcagggtttg gggacaggac tactaatgtg tccctgaagc 4500
 ctaggagctc ttggaggctc cactggggcc actggattcc ttactctggg aatgtgatag 4560
 gctgtgtact gtgtgtgtat gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgaaa 4620

10

20

30

40

tggtgcccaa ataggaaaga gaaaaatcga aaaaacagct gcatctgtga cattgcccag 4680
ctgtggtagc tataacctgtg accttagccc tciggaggta gagacaggag aaccaggaat 4740
cccaggcctg agtcacacag ttctcaaaga accaagagcc aaaaatgaag ggcttggctc 4800
tcagagagga ctcaagtcca gtcccagca cccacatcag gcagccccta gccctccgtga 4860 10
ttcacatcc aggccctgaa ctgggcaggt acctgcactt gagtgcacat tcacacgata 4920
tgtaaataaa taatacatct ggaagacaaa acagttaggc atggctcac atgcccttia 4980
gaggcagagg catcagttct ctgaatttga ggctagccctg ggctatatag tgagattgtc 5040 20
tcaaggaata aaaagcaaac aaacattaaa aaccaaaaag gattgttggg agctgggtat 5100
ggtaggtccc acctgtaacc tcgggtactc actgggttaa gtcaggaact tattatgttt 5160
tgggctagcc tgggctacct actaagattc ccattttaga accaacgcat actaaataaa 5220
ataaaaaatc atttgggaaga agagtccttc ctgtgggagg ggagccctggg gtagtgaact 5280 30
gacagtgaag tgggattcag caccttggct gcggttcacc tcggcttgtc actctccacg 5340
atggcaaggc catttcttt ctaggctcca acttccccag ctatgccagg gggagtagag 5400
gacaccttac actctactac gtgtctttat ttatttactt attttcaac ttgagagac 5460 40
gagatctcac ttggtagctc aaactagcct tgaacttgtg acagtcctcc cgcctcaggc 5520

tcctaaagtg ctgaggttat agcctgigcc attattacat ctaactcatg tgccttcata 5580
ccaaaggict ttigcgcaca tacatgcatg ggigcctgac tgcctttigt gacttgtttt 5640
ttggtagga gattcatggt ttaataacac atigtgttac ttccttagat tccagctctc 5700
ctgtgggctt tgtgcttggc gtcgatcttc ttcacatatt cctttggcg ggagcaactt 5760
ttctaigccc tgcigatgig actgacceca gaactttcca gaagattcta gaactgcttc 5820
ccagcaggag agcagatgig attctgagig acatggcacc gaatgccact gggatcagag 5880
acctgaica cgataagctc atcagcttgt gccttacctt tgtggacatg gctgtggaca 5940
tctgcatcc cggagggaca ctgctgigta aaacctgggc cggaaagtaa agccacctgc 6000
tgcagaagag actgaccag gaattccaga gcacaaggtt ggigaaaccg gaggccagca 6060
ggaaagagtc ttccgaggig taccigttag ccaccagta ccgtgggggg aagggcacca 6120
ggaggccgig agtctgccct gccattctgg gggctgcttc ggaggagcgt ggattcaagc 6180
tgccttgggg atatgaccag caccccaagg cactctgctt tttaaagaga taagcaaata 6240
ttttcaaggg ccgigaaaaa gigttaagaa tgggcagcgc catggcgcag tgaggaaagg 6300
gggatigctg ctaagcctga cagtctgagt gcagcatccg ggaccccaaga gcagcgagag 6360

10

20

30

40

cgctgcacg cacacgcagg ctgcacacaa taigaacaga tatatiggta cgttagtitt 6420
 ttggcaattt gtciggggaag aaagaatctg actigiggaat tcttccatcg gctcacaggc 6480
 tgagccaggg agacattgat gagtgactga ctgggcaggg cccagccctg tgcgggtgct 6540
 gccatccctt ggcaggtagc ctgagtigta tgagaaagcg gggtagcag gactgaggaa 6600 10
 caagccagtc atccataacc cactcccgt cctcagttgc tgcigccctc aggttcccac 6660
 cccgagaacc cactttgatt tcttcagtg atggactgtg gttgggatga gigaggcaaa 6720
 gaaacccttt ccttccaagg cttttaaatg ctgaaaacaa agcagcttc tetatcatga 6780 20
 tttattttt ctggcttttg ttacttgc tgtttgtgag gttgagtgc actataacc 6840
 aggttgcta tgcagcccac agt 6863

<210> 10

<211> 21 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10 40

tgctctgtca ggtacctgtt g

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

ctttgtagg gttctcttc

20

【 0 0 9 3 】

【 配列表フリーテキスト 】

20

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

配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 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。

30

【 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 】 1oxPの構造を示す図である。

【 図 4 】 1ox71と1ox66との組換えを示す図である。

【 図 5 】 変異型1oxP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-8の構築図である。

【 図 8 】 2段階の可変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。

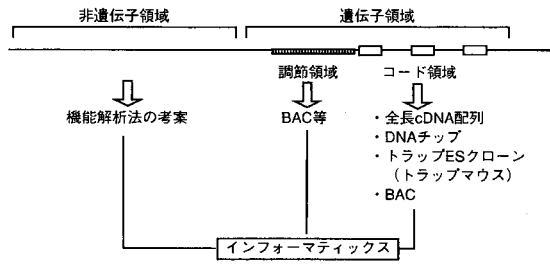
40

【 図 10 】 5' RACE 産物のデータベースホモロジー検索結果を示す模式図である。

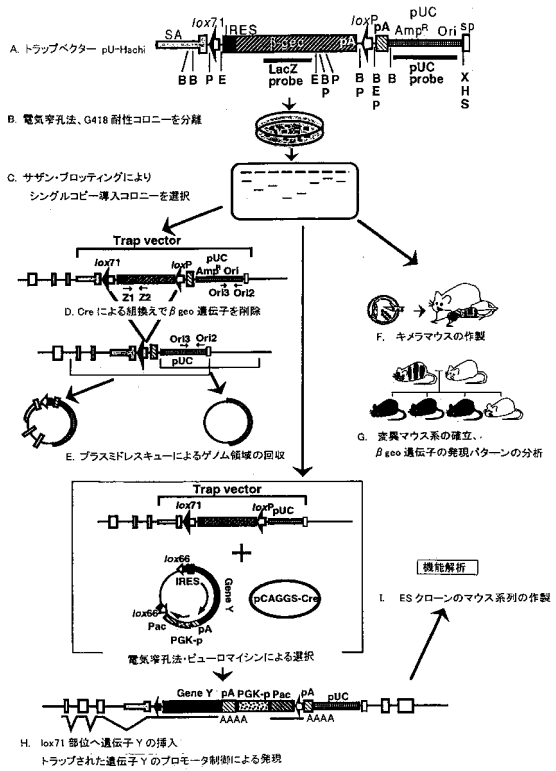
【 符号の説明 】

1 : 矢印

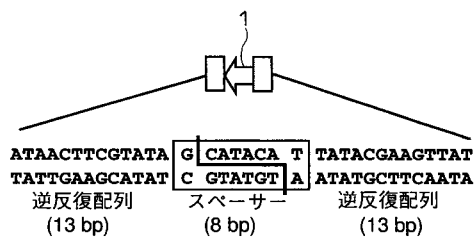
【 図 1 】



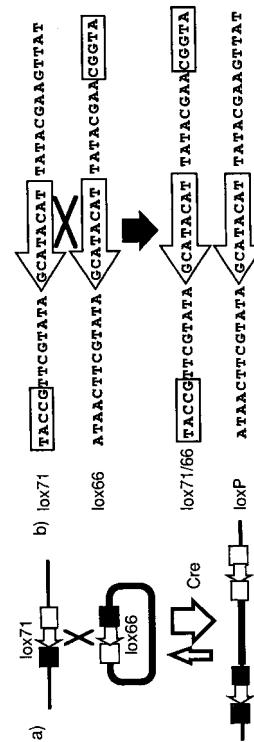
【 図 2 】



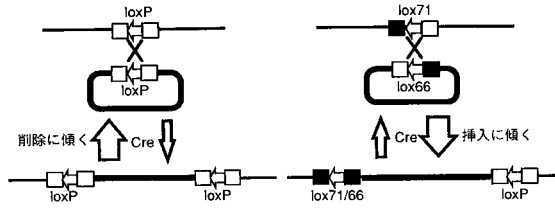
【 図 3 】



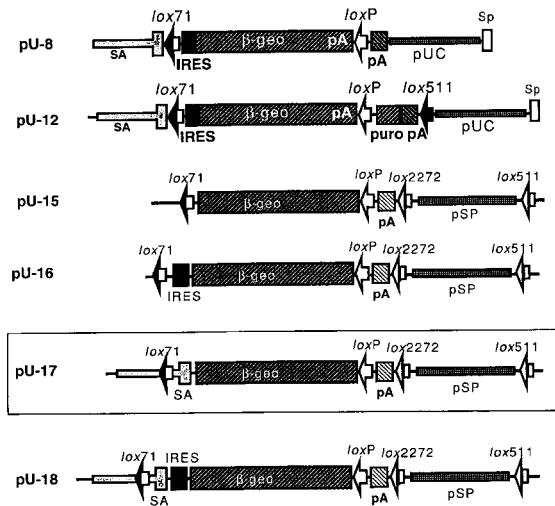
【 図 4 】



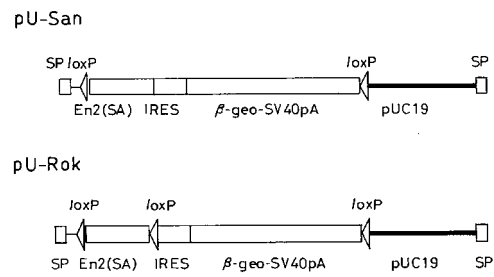
【 図 5 】



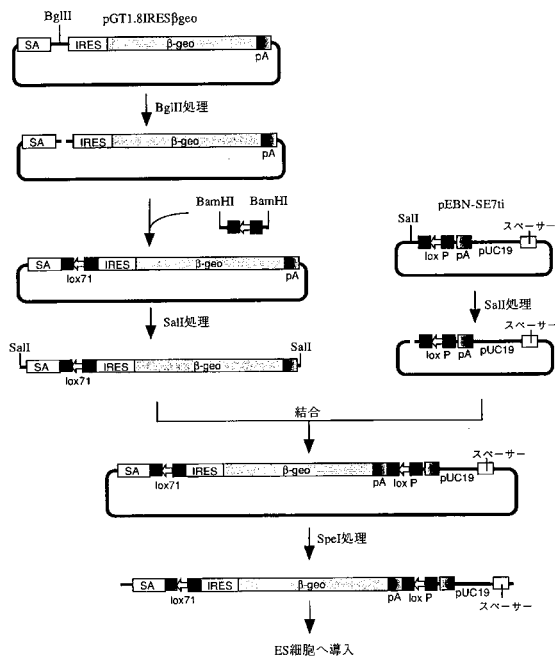
【 図 6 A 】



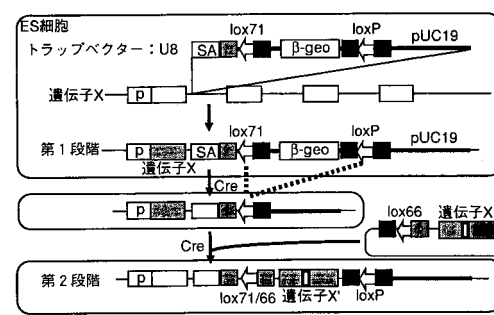
【 図 6 B 】



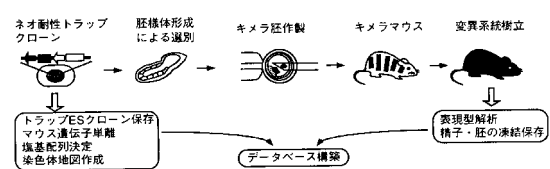
【 図 7 】



【 図 8 】

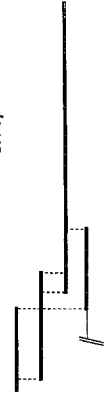


【 図 9 】



【 1 0 】

100 bp



5'RACE産物
AA27699 EST クローン
W48287 EST クローン
レスキューされた3'フランキンゲンゲノム断片

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 分子細胞治療、Vol.2,No.2,pp.162-168 (2001.4.1)
Cellular and Molecular Biology, Vol.45,No.5,pp.737-750 (1999)
遺伝子医学、Vol.2,No.4,pp.612-617 (1998)
J.Biol.Chem., Vol.272,No.6,pp.3766-3772 (1997)
Am.J.Hum.Genet., Vol.75,pp.305-309 (2004)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)
C12N 15/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq