

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4217782号  
(P4217782)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月21日(2008.11.21)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**A O 1 K 67/027 (2006.01)** A O 1 K 67/027

請求項の数 7 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2003-185409 (P2003-185409)	(73) 特許権者	301032942
(22) 出願日	平成15年6月27日 (2003.6.27)		独立行政法人放射線医学総合研究所
(65) 公開番号	特開2005-13151 (P2005-13151A)		千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(43) 公開日	平成17年1月20日 (2005.1.20)	(74) 代理人	100059959
審査請求日	平成17年9月16日 (2005.9.16)		弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

RECQL4遺伝子のエキソン13に変異をホモで有し、  
 RECQL4遺伝子のエキソン14～22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14～22に対応するアミノ酸配列をコードしており、

RECQL4がヘリカーゼ活性を喪失しており、かつ、  
 ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す、マウス。

【請求項2】

RECQL4遺伝子のエキソン13全体が欠失している、請求項1に記載のマウス。

【請求項3】

RECQL4遺伝子のエキソン13が配列番号3に記載の配列を有する、請求項2に記載のマウス。

【請求項4】

RECQL4遺伝子のエキソン13へ変異をホモで導入することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のマウスの作製方法。

【請求項5】

作製されたマウスのRECQL4遺伝子のエキソン13全体が欠失している、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

RECQL4遺伝子のエキソン13が配列番号3に記載の配列を有する、請求項5に記載の方

法。

【請求項 7】

RECQL4遺伝子のエキソン 1 3 への変異導入をジーンターゲティングによって行う、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物、特にマウス及びその作製方法に関する。より具体的には、RECQL4遺伝子のエキソン 1 3 に変異を有し、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法に関する。

10

【0002】

【従来の技術】

ロスモンドは、多形皮膚萎縮症(ポイキロデルマ、poikiloderma)と若年性の白内障を特徴とする疾患を、トムソンは多形皮膚萎縮症と遺伝性の骨形成異常を特徴とする疾患を報告したが(Rothmund, A. (1868) *Über cataracten in verbindung mit einer eigenthumlichen hautdegeneration.* Arch. Klin. Exp. Ophthalm., 4, 159-182.、Thomson, M.S. (1936) *Poikiloderma congenitale.* Br. J. Dermatol., 48, 221-234)、後に、ロスモンド・トムソン症候群として病名が統一された。即ち、ロスモンド・トムソン症候群(以下RTSと略記)は、成長障害、多形皮膚萎縮症、脱毛、白内障、骨形成異常、骨肉腫の発がん頻度が高いという徴候を示す常染色体劣性遺伝病である(Ichikawa, K., Noda, T. and Furuichi, Y. (2002) *Preparation of the gene targeted knockout mice for human premature aging diseases, Werner syndrome, and Rothmund-Thomson syndrome caused by the mutation of DNA helicases.* Nippon Yakurigaku Zasshi., 119, 219-226.、Vennos, E.M. and James, W.D. (1995) *Rothmund-Thomson syndrome.* Dermatol. Clin., 13, 143-150.、Vennos, E.M., Collins, M. and James, W.D. (1992) *Rothmund-Thomson syndrome: review of the world literature.* J. Am. Acad. Dermatol., 27, 750-762)。

20

【0003】

これらの症状はまたRTSが早期老化症候群であることを示唆する。代表的な早期老化症候群として、ウェルナー症候群とブルーム症候群が知られ、それぞれ、WRN遺伝子とBLM遺伝子の突然変異が原因であることが知られている(Mohaghegh, P. and Hickson, I.D. (2001) *DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders.* Hum. Mol. Genet., 10, 741-746.)。

30

これらの遺伝子はRecQヘリケース遺伝子(RecQ helicase)ファミリーに属している。この同じファミリーに属しているRECQL4遺伝子については、多くのRTS患者で突然変異が見つかっている。突然変異は、RECQL4タンパク質分子の中でとくにヘリケース活性をもつ部分に集中している(図1の矢印部分)。そこで、RECQL4遺伝子のヘリケース活性部分の変異がRTSの原因なのかを確認し、RTS患者のマウスモデルを作る目的で、RECQL4遺伝子を破壊したマウス個体の作製が試みられていた。しかし、RECQL4遺伝子の22個のエキソンの中でエキソン5~8をノックアウトしたマウスは胎生3.5~6.5日に死亡し、作製には成功していなかった(Ichikawa, K., Noda, T. and Furuichi, Y. (2002) *Preparation of the gene targeted knockout mice for human premature aging diseases, Werner syndrome, and Rothmund-Thomson syndrome caused by the mutation of DNA helicases.* Nippon Yakurigaku Zasshi., 119, 219-226)。

40

【非特許文献 1】

Ichikawa, K., Noda, T. and Furuichi, Y. (2002) *Preparation of the gene targeted knockout mice for human premature aging diseases, Werner syndrome, and Rothmund-Thomson syndrome caused by the mutation of DNA helicases.* Nippon Yakurigaku Zasshi., 119, 219-226

【0004】

50

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物、特にマウス及びその作製方法を提供することである。より具体的には、RECQL4遺伝子のエキソン13に変異を有し、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法に関する。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、マウスRECQL4遺伝子(単にRecql4とも記載する)のエクソン13のみを改変することによって、RECQL4遺伝子欠損マウスを作製し得ること、及び、作製された遺伝子欠損マウスが、ヒトのロスモンド・トムソン症候群の特徴の少なくともいくつかを示すことを見いだした。本発明はこれらの知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、

- (1) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物；
  - (2) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すげっ歯類動物；
  - (3) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス；
  - (4) RECQL4遺伝子のエキソン13に変異を有し、かつ、RECQL4遺伝子のエキソン14～22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14～22に対応するアミノ酸配列をコードする、前記(3)に記載のマウス；
  - (5) RECQL4遺伝子のエキソン13に変異を有し、かつ、RECQL4遺伝子のエキソン14～22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14～22に対応するアミノ酸配列をコードする、RECQL4遺伝子欠損マウス；
  - (6) RECQL4遺伝子のエキソン13が配列番号3に記載の配列を有する、前記(4)又は(5)に記載のマウス；
  - (7) RECQL4がヘリカーゼ活性を喪失している、前記(3)～(6)のいずれか1つに記載のマウス；
  - (8) RECQL4遺伝子のエキソン13に変異を導入することを特徴とする、前記(3)～(7)のいずれか1つに記載のマウスの作製方法；
  - (9) 作製されたマウスのRECQL4遺伝子のエキソン13全体が欠失している、前記(8)に記載の方法；
  - (10) 作製されたマウスのRECQL4遺伝子のエキソン14～22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14～22に対応するアミノ酸配列をコードする、前記(8)又は(9)に記載の方法；
  - (11) RECQL4遺伝子のエキソン13が配列番号3に記載の配列を有する、請求項(8)～(10)のいずれか1つに記載の方法；及び
  - (12) RECQL4遺伝子のエキソン13への変異導入をジーンターゲティングによって行う、前記(8)～(11)のいずれか1項に記載の方法
- である。

【発明の実施の形態】

本明細書において、「ロスモンド・トムソン症候群(RTS)の特徴を示す」とは、皮膚の異常(多形皮膚萎縮症、無色毛及び脱毛等)、低身長(体長)、骨形成障害、白内障、免疫異常、不稔及び悪性腫瘍といったヒトRTSの特徴のうち1以上の特徴を示すことをいう(後述の表1を参照)。

本明細書において、「RECQL4遺伝子欠損マウス」とは、RECQL4遺伝子に変異を有し、その結果、RECQL4タンパク質が正常な機能を有しないマウス、特にRECQL4のヘリカーゼ活性が失われているマウスをいう。本発明の「RECQL4遺伝子欠損マウス」は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す。

本発明においては、RECQL4遺伝子のエキソン13に変異が導入され、それによってRECQL4タンパク質の機能、特にヘリカーゼ活性が失われている。

マウスRECQL4のcDNA配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に示した。本発明の一実施態様においては、エキソン13は配列番号3に記載の配列を有する。配列番号3に記載のエキソン13は、配列番号1中のヌクレオチドNo.1945-2124に相当する。

10

20

30

40

50

本発明の一態様では、マウスRECQL4遺伝子のエキソン13全体が欠失している。エキソン13(180bp)は、ヘリケース活性に不可欠なアミノ酸配列をコードするエキソンである。エキソン13は、その構成塩基数が3の倍数(180bp)である。したがって、エキソン13全体が通常のスプライシングから除外されると、次のエキソン14~22においてフレーム(アミノ酸配列の読み枠)が保たれて野生型Recql4と相同なタンパク質を発現するようなエキソンとなる。エキソン14~22のいずれのエキソンも構成塩基数が単独では3の倍数ではないので、このようなエキソンを構成しうるエキソンとしては、エキソン1~22の中でエキソン13が最もC末端のエキソンとなる。したがって、本発明のRECQL4遺伝子欠損マウスでは、そのRECQL4遺伝子のエキソン14~22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14~22に対応するアミノ酸配列をコードしていることが好ましい

10

#### 【0005】

RECQL4タンパク質は、ヘリケーススーパーファミリーII型(SFII)に属し、7つの保存領域を有するタンパク質である。その中で、エキソン13はモチーフIIIをコードする。モチーフIIIのTAT(SAT)配列は、ATPの加水分解を必要とするヘリケース活性とDNAへの結合にとって重要であることが仮想的RNAヘリケースのX線構造解析により示されている(Story, R.M., Li, H. and Abelson, J.N. (2001) Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 1465-1470)。また、マウスeIF4a(SFIIの一つ)のSAT配列の突然変異(Pause, A. and Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. EMBO J., 11, 2643-2654。)及びマウスBlmのモチーフIIIの突然変異(Bahr, A., De Graeve, F., Keding, C. and Chatton, B. (1998) Point mutations causing Bloom's syndrome abolish ATPase and DNA helicase activities of the BLM protein. Oncogene, 17, 2565-2571。)によって、ヘリケース活性が欠損することが示されている。更に、E.coliのRecGヘリケースのTAT配列の突然変異がブランチ・マイグレーション(branch migration)を抑制することが示されている。これらの報告は、モチーフIIIの存在がヘリケース活性にとって不可欠であることを示している。したがって、本発明の一つの実施態様においては、エキソン13のモチーフIIIを破壊する変異が導入されていてもよい。この場合でも、本発明のRECQL4遺伝子欠損マウスは、そのRECQL4遺伝子のエキソン14~22が、野生型RECQL4遺伝子のエキソン14~22に対応するアミノ酸配列をコードしていることが好ましい。マウス以外の非ヒト哺乳動物、特にげっ歯類動物を標的とする場合も、モチーフIIIが含まれるエキソンを変異導入の標的とし、かつ上述した性質を有する変異を導入することができる。

20

30

マウスとしては、一般的にモデルマウスの作製に用いられる129/SVを使用することができる。

#### 【0006】

本発明において、RECQL4遺伝子への変異の導入は、いわゆる遺伝子ターゲティングによって行うことができる。

本発明のマウスを作製するためのターゲティングベクターとしては、例えば、

40

(1) ポジティブ選択マーカー、

(2) ポジティブ選択マーカーの5'側領域に存在し、RECQL4遺伝子のエキソン1~12又はその一部に相同な配列(Long arm)、及び、

(3) ポジティブ選択マーカーの3'側領域に存在し、RECQL4遺伝子のエキソン14~20又はその一部に相同な配列(Short arm)

を有するベクターを利用することができる(図2、中段)。

Long arm及びShort armは、一般には長い方が好ましいと考えられており、例えば、5'側領域はRECQL4遺伝子のエキソン1~12を含み長さが4kb以上あることがより好ましいが、3'側及び5'側のいずれについても長さは本発明に本質的ではなく、このような遺伝子ターゲティングに通常利用される長さを有していればよい。また、相同組換えを生じ

50

させる領域は、標的領域と完全に同一である必要はなく、相同組換えが生じる程度の配列類似性を有していればよい。

ポジティブ選択マーカーとしては、一般に薬剤耐性遺伝子を用いることができ、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いることができる。

ターゲティングベクターは、相同組換えが起きたことを確認するためのネガティブ選択マーカーを更に含んでいてもよい。そのようなマーカーとしては、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素A遺伝子を利用することができる。

#### 【0007】

次に、このようなターゲティングベクターを胚性幹細胞(E S細胞)へ導入する。導入方法は特に限定されず、このような場合に用いられる当業者に知られた一般的な方法及び条件を利用することができる。例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション法などが利用できる。

10

ターゲティングベクターを導入したE S細胞は、適切な条件下で培養することができる。例えば、E S細胞の培養に適し、かつ、ポジティブ選択用マーカー及びネガティブ選択用マーカーに対応した薬剤を含む培地中で培養することができる。E S細胞の培養条件及び培養方法は当業者にはよく知られたものである。必要であれば、更にPCR等により導入された遺伝子及びその位置、方向を確認することもできる。

#### 【0008】

得られたRECQL4遺伝子欠損ヘテロE S細胞(Recql4 +/-)を、当業者によく知られた方法に従って、胚盤胞へマイクロインジェクションする。その後、偽妊娠動物への導入等により目的とする遺伝子が導入されたキメラ動物を得ることができる。得られたキメラ動物は、E S細胞由来の性質、例えば毛皮の色等を指標として導入遺伝子について選抜することができる。

20

選抜された動物と遺伝子導入していない動物とを交配して子孫動物(F1動物)を得る。E S細胞由来の性質、例えば毛皮の色を指標にして生殖細胞に導入遺伝子を有する動物を更に選抜することができる。必要であれば、更に得られた動物の一部、例えば尾部からDNAを取得し、PCRによって導入遺伝子の有無を確認することもできる。このようにして得られたRECQL4遺伝子欠損ヘテロ動物(Recql4 +/-)同士を交配してRECQL4遺伝子欠損ホモ動物(Recql4 -/-)、例えばRECQL4遺伝子のエキソン13全体が欠失している変異動物を得ることができる。

30

#### 【0009】

得られた本発明のRECQL4遺伝子欠損動物(Recql4 -/-)を、野生型動物(Recql4 +/+)を対照として、その性質を調べることができる。例えば、動物の外観観察、皮膚の状態観察、悪性腫瘍の発生頻度の計測、Recql4の転写産物量の測定、組織標本観察、細胞学解析等を行うことができる。転写産物量は、例えばトータルRNA又はポリ(A)RNAをRT-PCRによって定量することができる。組織標本観察は、常法に従って、ホルマリン等で固定し、パラフィン包埋した切片を用いて行うことができる。細胞学的解析は、組織から細胞を単離し、例えば、種々の刺激、特に放射線、又は紫外線に対する感受性を測定することによって行うことができる。更に、一定期間後の動物の体重、体長、体高等を指標に動物の成育能を測定することもできる。

40

本発明のRECQL4遺伝子欠損動物(Recql4 -/-)、特にマウスでは、顕著な脱毛、びらん性の出血を伴う病変が見られる。また、上皮、真皮、皮下組織の形成が不良となる。本発明のRECQL4遺伝子欠損動物、特にマウスでは、骨組織の形成、特に、骨梁形成が不良となる。また、本発明のRECQL4遺伝子欠損動物、特にマウスでは生長も遅延し、生後10週において正常固体の約1/3程の大きさしかない。また、このようなマウスから採種した細胞は増殖速度が野生型の2/3程度に低下する。さらに、本発明のRECQL4遺伝子欠損動物、特にマウスは小腸上皮の絨毛の大きさ及び数が正常固体に比べて減少する。

表1は、本発明のRECQL4遺伝子欠損マウスのこれらの特徴、及びその他の特徴とヒトのRTSの症状を比較した結果である。このことは、本発明のRECQL4遺伝子欠損動物、特にマ

50

ウスがヒトのロスモンド・トムソン症候群（R T S）のモデルとして利用し得ることを示す。本明細書において、「ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す」とは、下記の表においてR T Sの特徴として示される1以上の特徴を示すことをいう。

【0010】

【表1】

表1．本発明のRECQL4欠損動物の特徴とヒトのR T Sの症状の比較

特徴/症状	R T S	Recq14遺伝子欠損マウス
皮膚の異常		
多形皮膚萎縮症	+	-
無色毛	+	+
脱毛	+	+
低身長（体長）	+	+
骨形成障害	+	+
白内障	+	- <sup>b</sup>
免疫異常	希	+ <sup>c</sup>
不稔	+	+ <sup>d</sup>
悪性腫瘍	+	- <sup>b</sup>
X線高感受性	? <sup>a</sup>	- <sup>e</sup>
UV高感受性	? <sup>a</sup>	- <sup>e</sup>

10

20

30

a：一部のR T S患者の細胞はX線及び紫外線に感受性だが、そうでない患者もいる。

b：2～8週齢のマウス（n=23）について得られたデータ。

c：T細胞が僅かしか見られない。

d：組織学的検査によればRecq14遺伝子欠損マウスの精子形成は正常であったが、Recq14遺伝子欠損マウスをC57BL/6マウス又は同腹仔と交配した場合には新生仔は生まれなかった（オスn=5、メスn=4）。

e：MEFについてのデータ。

【0011】

【実施例】

#### 実施例1

##### ターゲッティングベクターの構築

ターゲッティングベクターは、ポジティブ選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子及びネガティブ選択マーカーとしてのチミジンカイネース遺伝子（相同組換えが起こらなかった場合、そのままゲノムに取り込まれて、細胞をガンアシクロビルに対して致死感受性にする遺伝子）を含むNTBluntベクターへ、Long arm及びShort armを挿入することにより構築した。

NTBluntベクターは、ネオマイシン耐性遺伝子（PGKNeo）を有するpKJ1ベクター（NAR, vol 119, no. 20 5755-5761, 1991. McBurney MW et. al.）を制限酵素EcoRI, BglIIで切り出

40

50

し、得られたPGKNeopAを、制限酵素EcoRI及びBamHIで切断したpBluescriptIIへ挿入し、更にチミジンカイネース遺伝子(HSV-TK)を常法に従い挿入することにより作製した。Long arm(ポジティブ選択マーカーの5'側領域)は、マウスES細胞のRecq14遺伝子のエキソン1からエキソン12を含む4.3kbのゲノムDNA(ES細胞株R1から通常のフェノールクロロホルム抽出により調製)を鋳型に、次のプライマーを用いたPCRにより作製した。

mQ4-1(+)<sub>30</sub> 5'-CTTTTGCACGGCTGCACGGGCGACGGCCAG-3' (配列番号4)

mQ4-Co1(-)<sub>30</sub> 5'-CAGCTATGCCAAGGTGCTGAGCCACATCTC-3' (配列番号5)

Short arm(ポジティブ選択マーカーの3'側領域)は、マウスES細胞のRecq14遺伝子のエキソン14からエキソン20を含む1.9kbのゲノムDNA(ES細胞株R1から通常のフェノールクロロホルム抽出により調製)を鋳型に、次のプライマーを用いたPCRにより作製した。

mQ4-6(+)<sub>30</sub> 5'-TTGAGCTCAGCGGGTCAGCCAACATCCCTG-3' (配列番号6)

mQ4-9(-)<sub>30</sub> 5'-TGCTCTAAACAGGGTCCACAACCTGGGAAAG-3' (配列番号7)

ポリメラーゼとしてKODplus(TOYOBO)を用い、添付のプロトコールに従いPCRを行った。

NTBluntベクターへの制限酵素HpaIの認識部位にShort armを、制限酵素SwaIの認識部位にLong armを常法により挿入した。ターゲティングベクターの作製の基礎になったベクターNTBluntを図3に示す。

【0012】

#### Recq14遺伝子のジーンターゲティング

ターゲティングベクターに用いたマウスES細胞は、マウスES細胞R1株(Nagy, A博士より入手。連絡先: Division of Molecular and Developmental Biology, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada)(Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8424-8428.)であった。

ターゲティングベクター30μgを、R1細胞2×10<sup>7</sup>個と共にキュベット(電極間4mm)(BioRad)に加え、GenePulserII(BioRad)を用いたエレクトロポレーション(電圧: 250V、容量: 950μF)によりマウスES細胞へ導入した。

得られたターゲティングベクター導入ES細胞を、Nagyらの文献(Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep 15;90(18):8424-8. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.; Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Division of Molecular and Developmental Biology, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada.)にしたがい、選択薬剤G418(ポジティブ選択用; ネオマイシン誘導体)及びガンアシクロピル(ネガティブ選択用)を含む培地中で培養した。

双方の選択薬剤に耐性を示す細胞のクローンを培養し、常法によりゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを、制限酵素XbaIで消化し、アガロースゲル電気泳動に付し、ナイロンメンブレンへ転写した。次いで、Recq14遺伝子のエキソン21と22を含むゲノム領域0.6kbのDNA断片からなるプローブ

【0013】

5'-GGACACTCAGGGTCCAAAACCTGGGCAGACTCAGGTAAGTGCCACACCTCTGAGGATAGTTCTTAAAGCTTGGGACAGTGACATGGCCCCATTCAACCCTGACCCACAGTTCAATCCCTGCTTGGCTCAAGGTTTCCTTGGCTGCTCCGGGTGTGATTTTACATGACAGATGCTATGGTAGCTCAGATGAGGTTACATGCTATCCTCCCACAGCTTCAGGACTGGGAGGACCAAATACGCCGGATGTCCGACGCTCCTGTCCCTGAGGCCAGAAGAAAGTTTTTCAGGAAGGGCTGTGGCCCGCATCTTCCATGGCATTGGTGAGGGCCACGGGGTTGCCTGGTGCCAGCGGGGGATGGGTATTAGAGCCAGCTGAGTCCTCAGGCCTGTGTTTCTGCTCCACCCTAGCGAGTCCATGCTACCCAGCCAGGTGTATGGGCTGGACCGGCGTTCTGGAGGAAGTACCTACACCTGGACTTTCATGCCCTGATGCACCTAGCTACAGAAGAGCTCCTGCTGAGAGGCCGATGACCACCTTACATGGGAGGGTGCACATGATTGAGGCATGAGGCAAGCC-3' (584 bp) (配列番号8)

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

を蛍光ラベルしたもの(図2の「3'プローブ」)を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った(Wurst, W. and Joyner, A.L. (1993) Gene targeting: A Practical Approach. IRL press, Oxford.)。結果を図4に示す。

野生型マウス(Recql4+/+) (すなわち、2本の染色体のいずれにおいてもRECQL4のエキソン13が欠損していない遺伝子)のES細胞クローンは8kbのバンドを与えた。一方、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4+/-)、すなわちターゲティングにより1本の染色体のRECQL4のエキソン13が欠損したマウスのES細胞クローンは6kb及び8kbのバンドを与えた。RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)、すなわち2本の染色体のいずれにおいてもRECQL4のエキソン13が欠損したマウスのES細胞クローンは6kbのバンドのみを与えた。RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4+/-)のES細胞クローンを更なる工程に用いた。

10

## 【 0 0 1 5 】

RECQL4遺伝子のエキソン13欠損マウスの作製

Recql4+/-のES細胞クローンを、C57BL/6JNrs妊娠マウス(黒眼、黒色毛、独立法人放射線医学総合研究所で維持されているストレイン)の卵管切除によって得たプラストシスト(桑実胚)へ、マイクロインジェクター(ナリシゲ)およびピエゾマイクロマニピュレーター(プライムテック)を用いて注入した。この胚を精管結紮した雄と交配させた偽妊娠の代理母マウスの胎内に導入しキメラマウスを作製した。

作製したキメラマウスの中から、Recql4+/-のES細胞が示す毛皮の色(アグチ)が80%以上含まれるオスのマウスを選択した。

20

選択したオスのマウスとC57BL/6のメスのマウスとを交配して、エキソン13が欠損したRECQL4アレル遺伝子(Recql4-)が生殖系列へ導入されたF1マウスを作製した。

F1マウス個体の遺伝子型の識別は、尾の一部を切除してDNAを抽出し、Recql4遺伝子に対するプライマーを用いたPCRにより行った。使用したプライマーは以下の通りである。

mQ4-5 (+) 30 5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACATG-3' (配列番号9)

mQ4-6 (-) 30 5'-GCCACCATGGACAGGCAGGTGCGGAGGAG-3' (配列番号10)

pgkNeo5'-1(-)30 5'-CTTGGGAAAAGCGCCTCCCTACCCGGTAG-3' (配列番号11)

遺伝子型を確認したRECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4 +/-)同士、あるいは、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4 +/-)とC57BL/6との交配により、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)を作製した。

30

## 【 0 0 1 6 】

Recql4遺伝子転写産物の配列決定による欠失部位の確認

野生型マウス(Recql4+/+)及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)のそれぞれについて、14.5日胎児からはプライマリーの胎生線維芽細胞(MEF)、成熟個体からは脳、心臓、胸腺、腎臓及び精巣から常法にしたがいトータルRNAを調製した。調製したトータルRNAに対し、下記のプライマー(図2の矢頭)を用い、Recql4遺伝子転写産物についてのRT-PCRを行った。

mQ4-5(+)-30 5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACATG-3' (配列番号12)

mQ4-8(-)-30 5'-CAGCTGGGCACTGCCGCAAGGCAATGCAG-3' (配列番号13)

40

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)のMEF及び精巣から得られた変異PCR増幅産物(転写産物)は、対応する野生型マウス(Recql4+/+)のPCR増幅産物(転写産物)と比較して短かった。

変異PCR増幅産物を、pGEM-T Eazy(プロメガ)へ常法によりクローニングし、下記のプライマーを用いて塩基配列を決定した。

5'-CTGCCTCTCTCAGTGGTCAC-3' (配列番号14)

5'-GACAGGCAGGTGCGGAGGAG-3' (配列番号15)

配列決定したRECQL4遺伝子ホモ欠損マウスのPCR増幅産物の配列と野生型マウスのPCR増幅産物の配列とを比較したところ、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)のP

50

C R 増幅産物では、エキソン 13 を構成する配列 ( 180 塩基 ) が完全に欠失していることが明らかになった ( 図 5 )。このことは、上述のターゲティング方法により得られたマウスにおいて、

- ( 1 ) RECQL4 遺伝子のエキソン 13 全体が欠失していること、及び
  - ( 2 ) スプライシングの結果、エキソン 12 の 3' 末端とエキソン 14 の 5' 末端とが正常に結合していること ( すなわち、エキソン 14 以降に対応するアミノ酸配列は野生型の対応するアミノ酸配列と同じである )
- を示している。

【 0017 】

#### 試験例 1

##### RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) におけるエキソン 13 欠失転写産物の発現量の評価

RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) における変異 Recql4 転写産物 ( エキソン 13 欠失転写産物 ) の量と、野生型マウス ( Recql4<sup>+/+</sup> ) における正常 Recql4 転写産物の量とを定量的 PCR により比較した。

RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスのトータル RNA 1 μg より合成された cDNA を基準として、野生型マウスの精巢のトータル RNA より合成された cDNA の希釈系列を作製した ( RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスを 1 として野生型マウス 0 ~ 0.1 )。作製した野生型マウスの cDNA の各希釈系列と RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスの cDNA との混合物を鋳型として、RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスで欠失しているエキソン 13 を挟む下記のプライマーのセット

5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACATG-3' ( 配列番号 16 )

5'-CAGCTGGGCACTGCCGCAAGGCAATGCAG-3' ( 配列番号 17 )

で PCR を行った。結果を図 6 に示す。尚、示されている各混合物の混合比は、それぞれ同一の cDNA サンプルを鋳型として Gapdh 遺伝子に特異的なプライマーセットによる RT-PCR を行ったデータをもとに補正された値である。図 6 より、RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスにおける変異転写産物の発現量は野生型マウスの野生型転写産物の発現量の 1 ~ 2 % であることが明らかになった。

【 0018 】

#### 試験例 2

##### 成長遅延

- ( 1 ) 生存率による評価

作製した\_\_頭の RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) うち、約 40 % は生まれた直後に死亡した。生存した個体のうち、80 % は生後 2 日以内に死亡し、95 % の個体は生後 2 週間以内に死亡した。しかし、残りの 5 % は生後 2 週間以降も生存していた。

RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) の胎生致死率を観察するため、帝王切開によって得られた胎児の遺伝子型を調べた。その結果、野生型マウス ( Recql4<sup>+/+</sup> ) : RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス ( Recql4<sup>+/-</sup> ) : RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) = 19 : 43 : 14 であり、メンデルの法則にほぼ従った分布を示した。したがって、胎生期の死亡は Recql4 遺伝子の変異によるものではないと考えられる。

- ( 2 ) 体重による評価

野生型マウス ( Recql4<sup>+/+</sup> )、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス ( Recql4<sup>+/-</sup> ) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) の 19 日目の胎児における体重はそれぞれ、1.48 ± 0.17 g、1.51 ± 0.21 g 及び 0.86 ± 0.12 g であった。したがって、RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスの体重は野生型マウスの約 60 % であった ( 図 7 )。

RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスの成長遅延はその後も持続し、生後 10 週間後では、RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウスの体重は野生型マウスの体重の約 1/3 であった ( 図 8 )。

- ( 3 ) 細胞増殖による評価

野生型マウス ( Recql4<sup>+/+</sup> )、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス ( Recql4<sup>+/-</sup> ) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス ( Recql4<sup>-/-</sup> ) の各個体から MEF を単離し、その細胞増殖を調べた

10

20

30

40

50

。 M E F の単離は、14.5日胚の頭部と内臓を除去し、組織を細かく破碎し、トリプシン処理により行った。培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium (シグマ) に10%胎児牛血清、50  $\mu$ U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン及び58  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを添加したものをを用いた。培養は10mmのシャーレ中、37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%に管理したインキュベーターにて行った。細胞培養は、10<sup>5</sup>個の細胞を60mmのシャーレ2枚ずつに播種し、毎日培地を代えて行った。細胞の計数は、24時間毎にコールターカウンター(ベックマン=コールター)によって行った。結果を図9に示す。野生型マウス(Recql4+/+)及びRECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4+/-)由来のM E Fと比較して、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)由来のM E Fは有意に低い増殖能力を示した。

10

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)は、野生型マウス(Recql4+/+)と比較して成長遅延を示すことが明らかになった。成長遅延は、ヒトRTSの症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒトRTSのモデル動物として利用可能である。

【0019】

### 試験例3

#### 皮膚の異常

##### (1) 外観による評価

ほとんどのRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)が何らかの皮膚の異常を示した。生後は目立たなかったが、生後6週までに頸部、背部、前足の付け根から側腹部にかけて脱毛があった。更に尻や腹部に毛の脱色を示した個体もあった。脱毛部位が個体表面の20%に達する個体も存在した。

20

生後2~3月後には、脱毛部位にびらん性の出血をともなう病変が観察された。これらの病変はかさぶたを作って治癒に向かったが、再び発毛を見るには至らなかった。本病変は、皮膚が脆弱でありかつ物理的接触の機会が多い部分(例えばオスでは陰茎)で多く観察された。

皮膚の乾燥は尾部において最も顕著であり、生後3~4ヶ月の個体の60%で観察された。

##### (2) 組織学的評価

組織学的評価を行うために、マウス組織を、10%の緩衝ホルマリンによって固定し、パラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。顕微鏡写真は、ECLIPS TE300(ニコン)により倍率40x、100x及び400xで撮影した。

30

野生型マウスと比較して、変異マウスの皮膚は、上皮、真皮、および皮下組織の低形成を示した。

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)は、野生型マウス(Recql4+/+)と比較して、皮膚の異常を示すことが明らかになった。皮膚の異常は、ヒトRTSの症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒトRTSのモデル動物として利用可能である。

【0020】

40

### 試験例4

#### 他組織の低形成

骨組織、小腸上皮及びリンパ組織の顕微鏡写真を試験例3と同様の方法により撮影した。野生型マウスと比較して、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)では骨形成層における骨梁形成の減少が見られた。

更に、小腸上皮の絨毛の大きさと数の減少も明らかであった。クリプト及び結合組織における細胞分裂像も少なかった。これは、RECQL4遺伝子のエキソン13の欠損が、増殖の盛んな腸上皮に特に影響を及ぼすことを示唆している。

リンパ系の組織を観察したところ、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)の胸腺は、野生型マウスと比較して顕著に小さかった。

50

更に胸腺細胞の数も、野生型マウスと比較して有意に小さかった（新生仔マウスについて野生型マウスは  $1 \times 10^7$  (n = 1)、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスは  $0.6 \sim 5 \times 10^5$  (n = 2)；成体マウスについて野生型マウスは  $2.0 \times 10^7$  (n = 1)、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスは  $1.3 \times 10^7$  (n = 1)）。

また、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4<sup>-/-</sup>) の胸腺ではリンパ濾胞の皮質と髄質の区別が不明瞭であった。更に、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4<sup>-/-</sup>) では、白質層 (white pulp) の大きさと数が野生型マウスと比較して顕著に少なかった。

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4<sup>-/-</sup>) は、骨形成障害、小腸上皮の異常及びリンパ組織の異常を示すことが明らかになった。骨形成障害は、ヒト R T S の症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒト R T S のモデル動物として利用可能である。

10

#### 【発明の効果】

本発明により、従来、致死性が高いと考えられていた、RECQL4遺伝子欠損ホモ動物 (Recql4<sup>-/-</sup>)、特にRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4<sup>-/-</sup>) 及びその作製方法が提供される。本発明のマウスは、生長遅延、皮膚の異常、骨形成不良を含む、ヒト R T S の特徴を多く示し、ヒト R T S のモデル動物として利用可能である。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Radiological Sciences

<120> Targeted knockout mouse for human Rothmund-Thomson syndrome and p  
reparation method thereof

10

<130> Y1K-0559

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20

<211> 3651

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3648)

30

<223>

<400> 1

atg gag cgg ctc gcg acc gtt cgc gcg cgg cta cag gag tgg gaa cgc 48

Met Glu Arg Leu Ala Thr Val Arg Ala Arg Leu Gln Glu Trp Glu Arg

1 5 10 15

40

gct ttt gca cgg ctg cac ggg cga cgg cca gcg aag ggg gat gtg gag 96

Ala Phe Ala Arg Leu His Gly Arg Arg Pro Ala Lys Gly Asp Val Glu		
20	25	30
gcg gca cct gaa gag acc cgc gcg ctc tac cgt gag tac cgt aac cta	144	
Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu Tyr Arg Glu Tyr Arg Asn Leu		
35	40	45
		10
aag cag gcg gtg cgt cag gct gac gac aga cat cgt gtc cta gag caa	192	
Lys Gln Ala Val Arg Gln Ala Asp Asp Arg His Arg Val Leu Glu Gln		
50	55	60
tca ctt gcc gag gca gct gag gag gca cag gag cca agc tgc tgg ggt	240	
Ser Leu Ala Glu Ala Ala Glu Glu Ala Gln Glu Pro Ser Cys Trp Gly		
65	70	75
		20
ccc cac ctg agt cga gct gca acg cag aat acg cag tct atg cca aaa	288	
Pro His Leu Ser Arg Ala Ala Thr Gln Asn Thr Gln Ser Met Pro Lys		
85	90	95
cag agc cta ctg agt tct gta caa gac tat ggg aag agg ctc aaa gcc	336	
Gln Ser Leu Leu Ser Ser Val Gln Asp Tyr Gly Lys Arg Leu Lys Ala		
100	105	110
		30
aat ctg aaa aac aca aca cag act gga cca acc cag agc aga aaa ctc	384	
Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Thr Gly Pro Thr Gln Ser Arg Lys Leu		
115	120	125
cag ctt cag aag aga tcc ttg tcc aca gtt cct gcc cca agg cca cca	432	
Gln Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ser Thr Val Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
		40

130	135	140		
ggc tca aag act gaa tcc ccc tgt cca gac gaa gct gac gat gca ctt			480	
Gly Ser Lys Thr Glu Ser Pro Cys Pro Asp Glu Ala Asp Asp Ala Leu				
145	150	155	160	
cct cgg gtt cct gag ccc cgg ccg agg ctg ggc cag ctc cag cag ctc			528	10
Pro Arg Val Pro Glu Pro Arg Pro Arg Leu Gly Gln Leu Gln Gln Leu				
	165	170	175	
cga tca tcc ctc agc cgg agg ttg act tcc cta gac cct ggt tgg tta			576	
Arg Ser Ser Leu Ser Arg Arg Leu Thr Ser Leu Asp Pro Gly Trp Leu				
	180	185	190	
				20
gag agg tgt cac aac aga gtt tca gat ctt cta gag gtt ccg ggt gct			624	
Glu Arg Cys His Asn Arg Val Ser Asp Leu Leu Glu Val Pro Gly Ala				
	195	200	205	
tgt ggg ctt gac ctg agt gca gag gag tca cag cct cag atg tca ggc			672	
Cys Gly Leu Asp Leu Ser Ala Glu Glu Ser Gln Pro Gln Met Ser Gly				
	210	215	220	30
aag gtg aac atc gct gat cct gac atc cag tca gaa gta tct gta cag			720	
Lys Val Asn Ile Ala Asp Pro Asp Ile Gln Ser Glu Val Ser Val Gln				
	225	230	235	240
agc cca gag gcc ata gcc caa cag cca gcc cag gtt ttg tca cag agc			768	
Ser Pro Glu Ala Ile Ala Gln Gln Pro Ala Gln Val Leu Ser Gln Ser				
	245	250	255	40

ccc aaa tcc atc aac agt aaa ggc agg aag cgg aag tgg aat gag aag	816	
Pro Lys Ser Ile Asn Ser Lys Gly Arg Lys Arg Lys Trp Asn Glu Lys		
260                                  265                                  270		
ggg gag gac ttt gca caa gac cag ccc agc agc gga gca gga ccc ctg	864	
Gly Glu Asp Phe Ala Gln Asp Gln Pro Ser Ser Gly Ala Gly Pro Leu		10
275                                  280                                  285		
tct gag gga gcc agg gct aca gta cat ggg caa gac cct cca gga gaa	912	
Ser Glu Gly Ala Arg Ala Thr Val His Gly Gln Asp Pro Pro Gly Glu		
290                                  295                                  300		
ccc aca caa gtg aat gtc cct cag cca tgc aat tcc tca aac cag gcc	960	20
Pro Thr Gln Val Asn Val Pro Gln Pro Cys Asn Ser Ser Asn Gln Ala		
305  310  315  320		
agg aca gag aag gct aag ggc aca acc cac ctc cat gcc tct cct cga	1008	
Arg Thr Glu Lys Ala Lys Gly Thr Thr His Leu His Ala Ser Pro Arg		
325  330  335		30
cca gct tcc cta gac aga ggg aac tat att cga ctc aac atg aaa aac	1056	
Pro Ala Ser Leu Asp Arg Gly Asn Tyr Ile Arg Leu Asn Met Lys Asn		
340                                  345                                  350		
aaa cgc ttt gta cga gtt ggg gcc aat cgg ggc agg ctt ctc cgt aag	1104	
Lys Arg Phe Val Arg Val Gly Ala Asn Arg Gly Arg Leu Leu Arg Lys		40
355                                  360                                  365		

cag gta tgg aag caa aag tgg aag aag aaa caa gct gcg ttt ggg gga	1152	
Gln Val Trp Lys Gln Lys Trp Lys Lys Lys Gln Ala Ala Phe Gly Gly		
370 375 380		
agt gga ccc agg gcc aca gac aag gac act tgt ttc cgg tgt ggg cag	1200	
Ser Gly Pro Arg Ala Thr Asp Lys Asp Thr Cys Phe Arg Cys Gly Gln		
385 390 395 400		10
ttt ggt cac tgg gca tcc cag tgt tcc caa cca ggc ccc acc ctg acc	1248	
Phe Gly His Trp Ala Ser Gln Cys Ser Gln Pro Gly Pro Thr Leu Thr		
405 410 415		
gtc caa gag gaa ggt gac agg gat gac aaa cag ccc att tcc acc ttg	1296	
Val Gln Glu Glu Gly Asp Arg Asp Asp Lys Gln Pro Ile Ser Thr Leu		20
420 425 430		
gaa gaa gta gca cag agg aca ggc act gct tcc tgt cac cac tct ggt	1344	
Glu Glu Val Ala Gln Arg Thr Gly Thr Ala Ser Cys His His Ser Gly		
435 440 445		
gag gaa aca cag cct gct gcg cca gag cta cag gtg cct cat tgc ccc	1392	
Glu Glu Thr Gln Pro Ala Ala Pro Glu Leu Gln Val Pro His Cys Pro		30
450 455 460		
acc cca atg tca ccc ctg tac cca ccg gga cct ttg gga caa gta gca	1440	
Thr Pro Met Ser Pro Leu Tyr Pro Pro Gly Pro Leu Gly Gln Val Ala		
465 470 475 480		40
gaa acc cct gct gaa gta ttc cag gcc cta gag cgg cta ggg tac cga	1488	

Glu Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu Glu Arg Leu Gly Tyr Arg		
485	490	495
gcc ttc cgc cct ggg caa gag cgt gca atc atg cgg att ctt tct ggc	1536	
Ala Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Ile Met Arg Ile Leu Ser Gly		
500	505	510
atc tct act ctg tta gtg ttg ccc acg ggt gct gga aag tct ctg tgc	1584	10
Ile Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly Ala Gly Lys Ser Leu Cys		
515	520	525
tac cag ctt cct gca ctg ctc tat gcc cag cga agc ccc tgc ctc aca	1632	
Tyr Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Ser Pro Cys Leu Thr		
530	535	540
ctc gtg gtc tgc cct ctc ctg tca ctc atg gat gac cag gtg tcc gat	1680	
Leu Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met Asp Asp Gln Val Ser Asp		
545	550	555
ctg cct tca tgt ctg aag gca gcc tgc ctc cac tca gga atg acc aag	1728	
Leu Pro Ser Cys Leu Lys Ala Ala Cys Leu His Ser Gly Met Thr Lys		30
565	570	575
aaa caa cga gag tct gtc ttg aag aag gta cgg gca gcc cag gtg cac	1776	
Lys Gln Arg Glu Ser Val Leu Lys Lys Val Arg Ala Ala Gln Val His		
580	585	590
gtg ctg atc gtg tcc cca gag gcc ttg gtg ggg tgc ggg gct agg ggt	1824	40
Val Leu Ile Val Ser Pro Glu Ala Leu Val Gly Cys Gly Ala Arg Gly		

595	600	605		
ccc ggc agc ctc ccc cag gcc gct cag ctg cct cca att gcc ttc gcc			1872	
Pro Gly Ser Leu Pro Gln Ala Ala Gln Leu Pro Pro Ile Ala Phe Ala				
610	615	620		
10				
tgc att gat gag gtc cac tgc ctc tct cag tgg tca cat aac ttc cgg			1920	10
Cys Ile Asp Glu Val His Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe Arg				
625	630	635	640	
ccc tgc tac cta cgt gtt tgc aaa gtt ctc cgg gag cat atg ggg gtg			1968	
Pro Cys Tyr Leu Arg Val Cys Lys Val Leu Arg Glu His Met Gly Val				
	645	650	655	
				20
cgc tgc ttc ttg ggt ctc aca gcc aca gcc aca cga agc act gct cga			2016	
Arg Cys Phe Leu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr Arg Ser Thr Ala Arg				
	660	665	670	
gat gtg gct cag cac ctt ggc ata gct ggc gag ttt gag ctc agc ggg			2064	
Asp Val Ala Gln His Leu Gly Ile Ala Gly Glu Phe Glu Leu Ser Gly				
	675	680	685	30
tca gcc aac atc cct gcc aat ctg cac ctc tcc gtg tcc atg gat aga			2112	
Ser Ala Asn Ile Pro Ala Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp Arg				
	690	695	700	
gac tca gac cag gct ctg gtg aca ttg ctg caa ggg gac cgt ttt cgt			2160	
Asp Ser Asp Gln Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Gly Asp Arg Phe Arg				
	705	710	715	720
				40

acc ctg gat tca gtt atc att tac tgc act cgc gaa agg ata cag aac	2208	
Thr Leu Asp Ser Val Ile Ile Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ile Gln Asn		
725 730 735		
ggg tgg ctt gca ctc ctc cgc acc tgc ctg tcc atg gtg ggc gac tca	2256	
Gly Trp Leu Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ser Met Val Gly Asp Ser		10
740 745 750		
agg cca aga ggc tgt ggc ccc gag gct ata gct gaa gcc tac cat gct	2304	
Arg Pro Arg Gly Cys Gly Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Tyr His Ala		
755 760 765		
ggc atg agc agc cag gaa cgg cga cga gta caa cag gcc ttc atg cgg	2352	20
Gly Met Ser Ser Gln Glu Arg Arg Arg Val Gln Gln Ala Phe Met Arg		
770 775 780		
ggc cac ctg cgc atg gta gtg gcc acg gta gca ttt ggg atg gga ctg	2400	
Gly His Leu Arg Met Val Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly Leu		
785 790 795 800		30
gac cgt cca gat gtt cgg gct gtg ctg cac ctg gga ctg cct cca agc	2448	
Asp Arg Pro Asp Val Arg Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro Ser		
805 810 815		
ttc gag agc tac gtg caa gct atc ggc cgt gca ggg cgt gat ggg aag	2496	
Phe Glu Ser Tyr Val Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly Lys		40
820 825 830		

cct gcc cat tgc cac cta ttc atg cac ccc cag ggt gaa gac ctt tgg 2544  
 Pro Ala His Cys His Leu Phe Met His Pro Gln Gly Glu Asp Leu Trp  
           835                          840                          845

gaa ctg cgc aga cat gcc cac gct gac agc act gac ttc cta gct gtg 2592  
 Glu Leu Arg Arg His Ala His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val  
           850                          855                          860

10

aag agg ctg gtg cag cgt gtg ttc cca ccc tgc acc tgc agc cag aga 2640  
 Lys Arg Leu Val Gln Arg Val Phe Pro Pro Cys Thr Cys Ser Gln Arg  
           865                          870                          875                          880

cct gtt tcc aag tcc tca cct gag gaa gtc aaa gag cac agt ggc caa 2688  
 Pro Val Ser Lys Ser Ser Pro Glu Glu Val Lys Glu His Ser Gly Gln  
                                   885                          890                          895

20

caa aca tac cct gta ctg ggc cag gcc tgc ctg ggc cat gag cgg gca 2736  
 Gln Thr Tyr Pro Val Leu Gly Gln Ala Cys Leu Gly His Glu Arg Ala  
                           900                          905                          910

ctc cca gtg cag tct aca gta cag gct ctg gac atg aca gag gag gct 2784  
 Leu Pro Val Gln Ser Thr Val Gln Ala Leu Asp Met Thr Glu Glu Ala  
           915                          920                          925

30

att gag act ctg ctg tgc tat ttg gaa cta cac cct cgg cac tgg ttg 2832  
 Ile Glu Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu Leu His Pro Arg His Trp Leu  
           930                          935                          940

40

gag ctg ctg ccc tgg acc tac gcc cag tgc cat ctg cat tgc ctt ggc 2880

Glu Leu Leu Pro Trp Thr Tyr Ala Gln Cys His Leu His Cys Leu Gly		
945	950	955 960
ggc agt gcc cag ctg caa gct ctg gcc cac agg tgt ccc cct ttg gct		2928
Gly Ser Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala His Arg Cys Pro Pro Leu Ala		
	965	970 975
		10
gca tgc cag gcc aag tgg cca cct aaa gac aca agt cag ggc agg agc		2976
Ala Cys Gln Ala Lys Trp Pro Pro Lys Asp Thr Ser Gln Gly Arg Ser		
	980	985 990
tcc tta gag ttt ggt gtg gtg gaa ctg gca gac tcg atg ggc tgg aag		3024
Ser Leu Glu Phe Gly Val Val Glu Leu Ala Asp Ser Met Gly Trp Lys		
	995	1000 1005
		20
ttg gcc tct gta cgg cag gct ctc cac cag ctg aag tgg gac cca		3069
Leu Ala Ser Val Arg Gln Ala Leu His Gln Leu Lys Trp Asp Pro		
	1010	1015 1020
gag cca aag aaa ggc gca gca cag ggc acc gga gtg ctt gtg aag		3114
Glu Pro Lys Lys Gly Ala Ala Gln Gly Thr Gly Val Leu Val Lys		
	1025	1030 1035
		30
ttc agc gag ttg gcc ttt cac ctg cac agt cgc ggg gac ctg aca		3159
Phe Ser Glu Leu Ala Phe His Leu His Ser Arg Gly Asp Leu Thr		
	1040	1045 1050
gat gag gaa aag gac cag atc tgt gac ttt ctg tac aac cgt gtg		3204
Asp Glu Glu Lys Asp Gln Ile Cys Asp Phe Leu Tyr Asn Arg Val		
		40

1055	1060	1065		
cag gct cgt gaa cac aag gcc	ctg gcc cac cta cac	caa atg tcc	3249	
Gln Ala Arg Glu His Lys Ala	Leu Ala His Leu His	Gln Met Ser		
1070	1075	1080		
aag gcc ttt cga agt gtg gcc	ttt ccc agt tgt gga	ccc tgt tta	3294	10
Lys Ala Phe Arg Ser Val Ala	Phe Pro Ser Cys Gly	Pro Cys Leu		
1085	1090	1095		
gag cag tct aat gag gag cac	agc aat cag gtg aag	acc ctg gtc	3339	
Glu Gln Ser Asn Glu Glu His	Ser Asn Gln Val Lys	Thr Leu Val		
1100	1105	1110		20
agc tac tac ttt gag gaa gag	gag gag gag gaa gaa	act atg acg	3384	
Ser Tyr Tyr Phe Glu Glu Glu	Glu Glu Glu Glu Glu	Thr Met Thr		
1115	1120	1125		
gac act cag ggt cca aaa cct	ggg cag act cag ctt	cag gac tgg	3429	
Asp Thr Gln Gly Pro Lys Pro	Gly Gln Thr Gln Leu	Gln Asp Trp		30
1130	1135	1140		
gag gac caa ata cgc cgg gat	gtc cgc cag ctc ctg	tcc ctg agg	3474	
Glu Asp Gln Ile Arg Arg Asp	Val Arg Gln Leu Leu	Ser Leu Arg		
1145	1150	1155		
cca gaa gaa agg ttt tca gga	agg gct gtg gcc cgc	atc ttc cat	3519	
Pro Glu Glu Arg Phe Ser Gly	Arg Ala Val Ala Arg	Ile Phe His		40
1160	1165	1170		

ggc att gcg agt cca tgc tac cca gcc cag gtg tat ggg ctg gac 3564  
 Gly Ile Ala Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Leu Asp  
 1175 1180 1185

cgg cgc ttc tgg agg aag tac cta cac ctg gac ttt cat gcc ctg 3609  
 Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Asp Phe His Ala Leu 10  
 1190 1195 1200

atg cac cta gct aca gaa gag ctc ctg ctg aga ggc cga tga 3651  
 Met His Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Leu Arg Gly Arg  
 1205 1210 1215

<210> 2

<211> 1216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Arg Leu Ala Thr Val Arg Ala Arg Leu Gln Glu Trp Glu Arg  
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Arg Leu His Gly Arg Arg Pro Ala Lys Gly Asp Val Glu  
 20 25 30

10

20

30

40

Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu Tyr Arg Glu Tyr Arg Asn Leu  
 35 40 45

Lys Gln Ala Val Arg Gln Ala Asp Asp Arg His Arg Val Leu Glu Gln  
 50 55 60

10

Ser Leu Ala Glu Ala Ala Glu Glu Ala Gln Glu Pro Ser Cys Trp Gly  
 65 70 75 80

Pro His Leu Ser Arg Ala Ala Thr Gln Asn Thr Gln Ser Met Pro Lys  
 85 90 95

20

Gln Ser Leu Leu Ser Ser Val Gln Asp Tyr Gly Lys Arg Leu Lys Ala  
 100 105 110

Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Thr Gly Pro Thr Gln Ser Arg Lys Leu  
 115 120 125

30

Gln Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ser Thr Val Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 130 135 140

40

Gly Ser Lys Thr Glu Ser Pro Cys Pro Asp Glu Ala Asp Asp Ala Leu



Gly Glu Asp Phe Ala Gln Asp Gln Pro Ser Ser Gly Ala Gly Pro Leu  
 275 280 285

Ser Glu Gly Ala Arg Ala Thr Val His Gly Gln Asp Pro Pro Gly Glu  
 290 295 300

10

Pro Thr Gln Val Asn Val Pro Gln Pro Cys Asn Ser Ser Asn Gln Ala  
 305 310 315 320

20

Arg Thr Glu Lys Ala Lys Gly Thr Thr His Leu His Ala Ser Pro Arg  
 325 330 335

Pro Ala Ser Leu Asp Arg Gly Asn Tyr Ile Arg Leu Asn Met Lys Asn  
 340 345 350

30

Lys Arg Phe Val Arg Val Gly Ala Asn Arg Gly Arg Leu Leu Arg Lys  
 355 360 365

Gln Val Trp Lys Gln Lys Trp Lys Lys Lys Gln Ala Ala Phe Gly Gly  
 370 375 380

40



Ala Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Ile Met Arg Ile Leu Ser Gly  
 500 505 510

Ile Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly Ala Gly Lys Ser Leu Cys  
 515 520 525

10

Tyr Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Ser Pro Cys Leu Thr  
 530 535 540

Leu Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met Asp Asp Gln Val Ser Asp  
 545 550 555 560

20

Leu Pro Ser Cys Leu Lys Ala Ala Cys Leu His Ser Gly Met Thr Lys  
 565 570 575

Lys Gln Arg Glu Ser Val Leu Lys Lys Val Arg Ala Ala Gln Val His  
 580 585 590

30

Val Leu Ile Val Ser Pro Glu Ala Leu Val Gly Cys Gly Ala Arg Gly  
 595 600 605

40

Pro Gly Ser Leu Pro Gln Ala Ala Gln Leu Pro Pro Ile Ala Phe Ala

610	615	620	
Cys Ile Asp Glu Val His Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe Arg			
625	630	635	640
			10
Pro Cys Tyr Leu Arg Val Cys Lys Val Leu Arg Glu His Met Gly Val			
	645	650	655
Arg Cys Phe Leu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr Arg Ser Thr Ala Arg			
	660	665	670
			20
Asp Val Ala Gln His Leu Gly Ile Ala Gly Glu Phe Glu Leu Ser Gly			
	675	680	685
Ser Ala Asn Ile Pro Ala Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp Arg			
	690	695	700
			30
Asp Ser Asp Gln Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Gly Asp Arg Phe Arg			
	705	710	715
			720
Thr Leu Asp Ser Val Ile Ile Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ile Gln Asn			
	725	730	735
			40

Gly Trp Leu Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ser Met Val Gly Asp Ser  
 740 745 750

Arg Pro Arg Gly Cys Gly Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Tyr His Ala  
 755 760 765

10

Gly Met Ser Ser Gln Glu Arg Arg Arg Val Gln Gln Ala Phe Met Arg  
 770 775 780

20

Gly His Leu Arg Met Val Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly Leu  
 785 790 795 800

Asp Arg Pro Asp Val Arg Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro Ser  
 805 810 815

30

Phe Glu Ser Tyr Val Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly Lys  
 820 825 830

Pro Ala His Cys His Leu Phe Met His Pro Gln Gly Glu Asp Leu Trp  
 835 840 845

40

Glu Leu Arg Arg His Ala His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val  
 850 855 860

Lys Arg Leu Val Gln Arg Val Phe Pro Pro Cys Thr Cys Ser Gln Arg  
 865 870 875 880

10

Pro Val Ser Lys Ser Ser Pro Glu Glu Val Lys Glu His Ser Gly Gln  
 885 890 895

Gln Thr Tyr Pro Val Leu Gly Gln Ala Cys Leu Gly His Glu Arg Ala  
 900 905 910

20

Leu Pro Val Gln Ser Thr Val Gln Ala Leu Asp Met Thr Glu Glu Ala  
 915 920 925

30

Ile Glu Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu Leu His Pro Arg His Trp Leu  
 930 935 940

Glu Leu Leu Pro Trp Thr Tyr Ala Gln Cys His Leu His Cys Leu Gly  
 945 950 955 960

40



1070		1075		1080	
Lys Ala Phe Arg Ser Val Ala Phe Pro Ser Cys Gly Pro Cys Leu					
1085		1090		1095	
					10
Glu Gln Ser Asn Glu Glu His Ser Asn Gln Val Lys Thr Leu Val					
1100		1105		1110	
Ser Tyr Tyr Phe Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Met Thr					
1115		1120		1125	
					20
Asp Thr Gln Gly Pro Lys Pro Gly Gln Thr Gln Leu Gln Asp Trp					
1130		1135		1140	
Glu Asp Gln Ile Arg Arg Asp Val Arg Gln Leu Leu Ser Leu Arg					
1145		1150		1155	
					30
Pro Glu Glu Arg Phe Ser Gly Arg Ala Val Ala Arg Ile Phe His					
1160		1165		1170	
Gly Ile Ala Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Leu Asp					
1175		1180		1185	
					40

Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Asp Phe His Ala Leu  
 1190 1195 1200

Met His Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Leu Arg Gly Arg 10  
 1205 1210 1215

<210> 3

<211> 180

<212> DNA

<213> Mus musculus 20

<400> 3

gttctccggg agcataatggg ggtagcctgc tcttgggctc tcacagccac agccacacga 60

agcacctctc gagatgtggc tcagcacctt ggcatagctg gcgagttaga gctcagcggg 120

tcagccaaca tccctgcca tctgcacctc tccgigtcca tggatagaga ctacagaccag 180 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

cttttgcacg gctgcacggg cgacggccag 30

<210> 5

10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

20

<400> 5

cagctatgcc aaggctgctga gccacatctc 30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

30

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

ttgagctcag cgggtcagcc aacatccctg 30

40

<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	10
<223> PCR primer	
<400> 7	
tgctcctaac agggctccaca actgggaaag	30
<210> 8	20
<211> 583	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> PCR primer	30
<400> 8	
ggacactcag ggicccaaaac cigggcagac tcaggtaagi gccacaccic tgaggatagt	60
tcctaaagct igggacagig acatggcccc atccaacctt gacccacag tccaatccct	120
gcttggcica aggtttcctt ggcigctccg ggigigattt tacatgacag atgctatggt	180
agctcagaatg aggttacaatg ctatcciccc acagcttcag gactgggagg accaaatagc	240

ccgggatgtc cgccagctcc tgcctcagag gccagaagaa aggttttcag gaagggctgt 300  
 ggccccgcatc ttccatggca ttggtagagg ccacgggggtt gccctggigcc agcgggggat 360  
 gggattataga gccagctgag tcttcaggcc tgigtittctg ctccacccta gcgagtcctat 420  
 gctaccacgc ccagggtgat gggctggacc ggcgcttctg gaggaagiac ctacacctgg 480  
 actttcaigc cctgatgcac ctagctacag aagagctctt gctgagaggc cgatgaccac 540  
 ctacatggg agggigccac atgattgagg catgaggcaa gcc 583

10

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> PCR primer

30

<400> 9  
 ctcgtggctc cgctctctct gtcactcatg 30

<210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA

40

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

gcccaccatg gacaggcagg tgcggaggag

30

10

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cttgggaaaa gcgcctcccc taccggtag

30

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

40

<400> 12			
ctcgtgggtct cgcctctcct gtcactcatg		30	
<210> 13			
<211> 30			
<212> DNA			10
<213> Artificial			
<220>			
<223> PCR primer			
<400> 13			
cagctgggca ctgccgcca ggcaatgcag		30	20
<210> 14			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial			30
<220>			
<223> PCR primer			
<400> 14			
ctgcctctct cagtggtcac		20	
			40
<210> 15			

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> PCR primer

10

<400> 15

**gacaggcagg tgcggaggag**

20

<210> 16  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> PCR primer

<400> 16

**ctcgtggict cgctctcct gtcactcatg**

30

30

<210> 17  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

40

<220>  
 <223> PCR primer

<400> 17

**cagctgggca ctgccgcaa ggcaatgcag**

30

50

**【図面の簡単な説明】**

【図1】図1は、ヒトRTS患者で報告されているRECQL4遺伝子の突然変異の位置を示す図である。図中の矢印が突然変異の位置を示す。矩形は一つのエキソンに相当する。影付きの矩形はRecQヘリケースドメインを示す。

【図2】図2は、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)の作製スキームを示す。上段は野生型マウスのRECQL4遺伝子の構造を示す。中断は、遺伝子ターゲティングベクターの構造を示す。下段は遺伝子ターゲティングによる相同組み換え後のRECQL4遺伝子の構造を示す。TKはチミジンカイネース遺伝子を示し、Neorはネオマイシン耐性遺伝子を示す。矢印は転写の方向を示す。

X印は制限酵素XbaIの認識配列の部位を示す。

「3'プローブ」は、サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブの領域を示す。矢頭はRT-PCRに用いたプライマーを示す。

【図3】図3は、RECQL4遺伝子のエキソン13を破壊させるための、遺伝子ターゲティングベクターの作製の基礎になったベクター-NTBluntを示す。

【図4】図4は、野生型マウス(Recql4<sup>+/+</sup>)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4<sup>+/-</sup>)及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)の個体の尾の一部から抽出したDNAの、Recql4遺伝子の3'プローブによるサザンプロットの結果を示す。

【図5】図5は、遺伝子ターゲティング前後の、マウスのRECQL4遺伝子の転写産物より作製したcDNAの塩基配列を示す。

【図6】図6は、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)におけるエキソン13欠失転写産物についての定量的PCRの結果を示す。

【図7】図7は、野生型マウス(Recql4<sup>+/+</sup>)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4<sup>+/-</sup>)及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)の19日目における外観を示す。

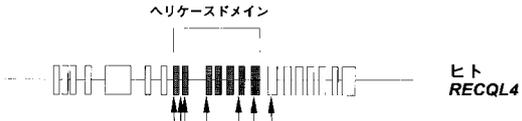
【図8】図8は、野生型マウス(Recql4<sup>+/+</sup>)及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)の生後10週間後における外観を示す。

【図9】図9は、野生型マウス(Recql4<sup>+/+</sup>)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4<sup>+/-</sup>)及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4<sup>-/-</sup>)の各個体に由来するMEFの細胞増殖を示す。

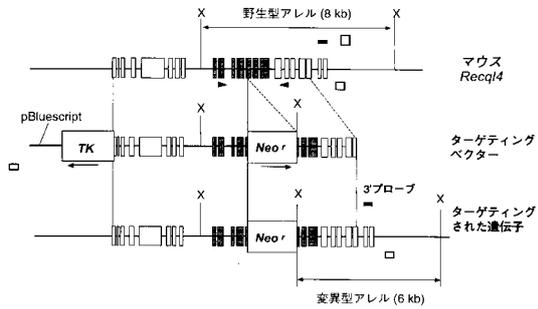
10

20

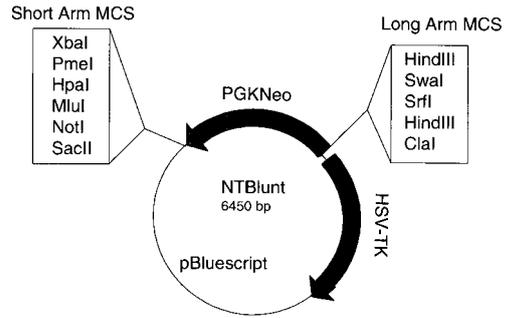
【図1】



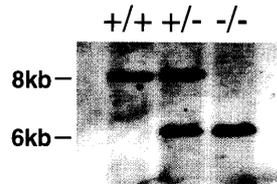
【図2】



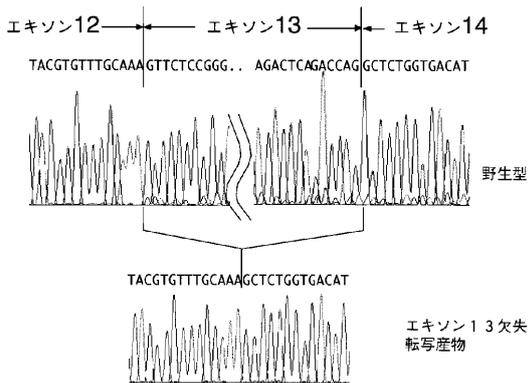
【図3】



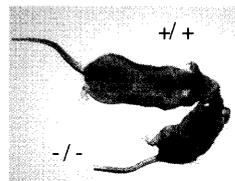
【図4】



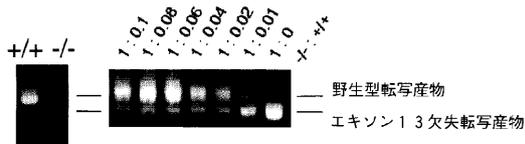
【図5】



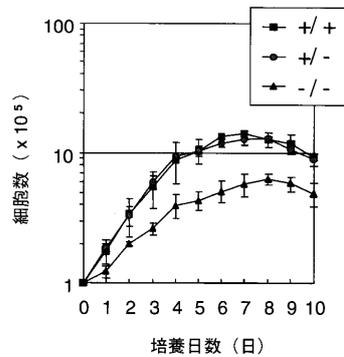
【図8】



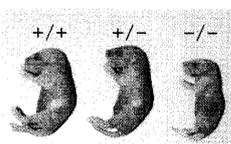
【図6】



【図9】



【図7】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 安倍 真澄

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 日薬理誌, vol.119, pp.219-226 (2002)

Genomics, vol.61, pp.268-276 (1999)

Nature Genetics, vol.22, pp.82-84 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00

A01K 67/027

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)