

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-13151

(P2005-13151A)

(43) 公開日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

A O 1 K 67/027

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 K 67/027

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 45 頁)

(21) 出願番号

特願2003-185409 (P2003-185409)

(22) 出願日

平成15年6月27日 (2003. 6. 27)

(71) 出願人

301032942

独立行政法人放射線医学総合研究所

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号

(74) 代理人

100059959

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) 【要約】

【課題】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。

【解決手段】 R E C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を導入する。

【特許請求の範囲】

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 3】

ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス。

【請求項 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、請求項 3 に記載のマウス。 10

【請求項 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。

【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 4 又は 5 に記載のマウス。

【請求項 7】

RECQL4 がヘリカーゼ活性を喪失している、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のマウス。 20

【請求項 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、請求項 3 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のマウスの作製方法。

【請求項 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、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 8 又は 9 に記載の方法。 30

【請求項 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 項に記載の方法。

【請求項 12】

RECQL4 遺伝子のエキソン 13 への変異導入をジーンターゲッティングによって行う、請求項 8 ~ 11 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】 40

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 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。

【0002】

【従来技術】

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) *Uber cataracten in verbindung mit einer eigenthumlichen hautdegeneration. Arch. Klin. Exp.* 50

. Ophthalmol., 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)。

【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.)。

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いている。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)。

【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】

【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、RE C Q L 4 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。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、マウス RE C Q L 4 遺伝子（単に R e c q l 4 と記載する）のエキソン 1 3 のみを改変することによって、RE C Q L 4 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。

10

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) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を有し、かつ、RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 が、野生型 RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 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) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を有し、かつ、RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 が、野生型 RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、RE C Q L 4 遺伝子欠損マウス；
- (6) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 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) RE C Q L 4 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) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 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 RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 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 RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 が、野生型 RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 4 ~ 2 2 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) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 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) RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 への変異導入をジーンターゲットイングによって行う、前記(8)~(11)のいずれか 1 項に記載の方法

20

30

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(R T S)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 R T S 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)。

40

本明細書において、「RE C Q L 4 遺伝子欠損マウス」とは、RE C Q L 4 遺伝子に変異を有し、その結果、RE C Q L 4 タンパク質が正常な機能を有しないマウス、特に RE C Q L 4 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「RE C Q L 4 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、RE C Q L 4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異が導入され、それによって RE C Q L 4 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 RE C Q L 4 の c D N A 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 1 3 は配列番号 3 に記載の配列を有する。配

50

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。

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、マウスイF4a(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。

20

30

40

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。

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、

50

(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(ES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、リポフェクションなどが利用できる。

ターゲティングベクターを導入したES細胞は、適切な条件下で培養することができる。例えば、ES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。ES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ES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、ES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。

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。ES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。

【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

10

20

30

40

50

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。

本発明の R E C Q L 4 遺伝子欠損動物 (R e c q l 4 - / -)、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 R E C Q L 4 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 R E C Q L 4 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 R E C Q L 4 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 R E C Q L 4 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 R T S の症状を比較した結果である。このことは、本発明の R E C Q L 4 遺伝子欠損動物、特にマ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。

【 0 0 1 0 】

【表 1】

表 1 . 本発明の R E C Q L 4 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	Recql4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	+	- ^b
免疫異常	希	+ ^c
不稔	+	+ ^d
悪性腫瘍	+	- ^b
X-線高感受性	? ^a	- ^e
UV高感受性	? ^a	- ^e

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 = 2 3) 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 R e c q l 4 遺伝子欠損マウスの精子形成は正常であったが、R e c q l 4 遺伝子欠損マウスを C 5 7 B L / 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 : M E F についてのデータ。

10

20

30

40

50

【0011】

【実施例】

実施例 1ターゲティングベクターの構築

ターゲティングベクターは、ポジティブ選択マーカール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ル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 19, no. 20 5755-5761, 1991. McBurney MW et. al.）を制限酵素EcoRI, BglIIで切り出し、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ルの5'側領域）は、マウスES細胞のRecql4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(+)30 5'-CTTTTGCAACGGCTGCACGGGCG
ACGGCCAG-3' (配列番号4) 20

mQ4-Co1(-)30 5'-CAGCTATGCCAAGGTGCTGAGC
CACATCTC-3' (配列番号5)

Short arm（ポジティブ選択マーカールの3'側領域）は、マウスES細胞のRecql4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(+)30 5'-TTGAGCTCAGCGGGTTCAGCCACA
TCCCTG-3' (配列番号6)

mQ4-9(-)30 5'-TGCTCTAAACAGGGTCCACAACCTG
GGAAG-3' (配列番号7) 30

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】

Recql4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 2×10^7 個と共にキュベット（電極間 50

4 mm) (BioRad)に加え、GenePulserII (BioRad)を用いたエレクトロポレーション(電圧: 250 V、容量: 950 μ F)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 Lumenfeld 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)及びガンアシクロビル(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、Recql4遺伝子のエキソン21と22を含むゲノム領域0.6 kbのDNA断片からなるプローブ

【0013】

5' - GGACACTCAGGGTCCAAAACCTGGGCAGACTCAGGTA
AGTGCCACACCTCTGAGGATAGTTCTTAAAGCTTGGGACA
GTGACATGGCCCCATTC AACCCCTGACCCACAGTTCAATC
CCTGCTTGGCTCAAGGTTTCTTGGCTGCTCCGGGTGTGA
TTTTACATGACAGATGCTATGGTAGCTCAGATGAGGTTAC
ATGCTATCCTCCACAGCTTCAGGACTGGGAGGACCAAAAT
ACGCCGGGATGTCCGCCAGCTCCTGTCCCTGAGGCCAGAA
GAAAGGTTTTCAGGAAGGGCTGTGGCCCGCATCTTCCATG
GCATTTGGTGAGGGCCACGGGGTTGCCCTGGTGCCAGCGGGG
GATGGGTATTAGAGCCAGCTGAGTCTCAGGCCTGTGTTTT
CTGCTCCACCCTAGCGAGTCCATGCTACCCAGCCAGGTG
TATGGGCTGGACC GGCGCTTCTGGAGGAAGTACCTACACC
TGGACTTTCATGCCCTGATGCACCTAGCTACAGAAGAGCT
CCTGCTGAGAGGCCGATGACCACTTACATGGGAGGGGTGC
CACATGATTGAGGCATGAGGCCAAGCC - 3' (584 bp) (配
列番号8)

【0014】

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8 kb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6 kb及び8 kb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6 kb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。

【0015】

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。

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' - CTCGTGGTCTCGCCTCTCCT
GTCACCTCATG - 3' (配列番号 9)

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

pgkNeo5' - 1 (-) 30 5' - CTTGGGAAAAGCGCCTCCCC
TACCCGGTAG - 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。

【0016】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' - CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACT
CATG - 3' (配列番号 12)

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

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 Easy (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' - CTGCCTCTCTCAGTGGTCACT - 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 PCR 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、上述のターゲットイ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

10

20

30

40

50

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^{-/-}) 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^{-/-}) 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^{+/+}) 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' - CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACCTCATG - 3' (配列番号 16)

5' - CAGCTGGGCACCTGCCGCCAAAGGC AATGCAG - 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^{-/-}) 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^{-/-}) 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^{+/+}) : RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4^{+/-}) : RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) = 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^{+/+})、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4^{+/-}) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) 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^{+/+})、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4^{+/-}) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) の各個体が

らMEFを単離し、その細胞増殖を調べた。

MEF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 μ U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン及び58 μ 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℃、CO₂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、10⁵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MEFと比較して、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4-/-)由来のMEF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

20

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。

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。

30

(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。

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。

40

【0020】

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。

50

リンパ系の組織を観察したところ、R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウス (R e c q l 4 - / -) の胸腺は、野生型マウスと比較して顕著に小さかった。

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 1×10^7 (n = 1)、R E C Q L 4 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 2.0×10^7 (n = 1)、R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウスは 1.3×10^7 (n = 1))。

また、R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウス (R e c q l 4 - / -) 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、R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウス (R e c q l 4 - / -) では、白質層 (w h i t e p u l p) 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。

10

以上の結果より、本発明の R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウス (R e c q l 4 - / -) 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。

【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、R E C Q L 4 遺伝子欠損ホモ動物 (R e c q l 4 - / -)、特に R E C Q L 4 遺伝子ホモ欠損マウス (R e c q l 4 - / -) 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。

20

【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		
ica 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		20
65 70 75 80		
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		30
100 105 110		
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		40
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		
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		30
210	215	220
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	40
Ser Pro Glu Ala Ile Ala Gln Gln Pro Ala Gln Val Leu Ser Gln Ser		

245	250	255		
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	10
Gly Glu Asp Phe Ala Gln Asp Gln Pro Ser Ser Gly Ala Gly Pro Leu				
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		20
ccc aca caa gtg aat gtc cct cag cca tgc aat tcc tca aac cag gcc			960	
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		
420 425 430		20
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		
450 455 460		30
acc cca atg tca ccc ctc tac cca ccg gga cct itg 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		10
atc tct act ctg tta gtg ttg ccc acg ggt gct gga aag tct ctg tgc	1584	
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		20
530 535 540		
ctc gig gtc tcg 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		
545 550 555 560		
ctg cct tca tgt ctg aag gca gcc tgc ctc cac tca gga atg acc aag	1728	30
Leu Pro Ser Cys Leu Lys Ala Ala Cys Leu His Ser Gly Met Thr Lys		
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		40
gtg ctg atc gtg tcc cca gag gcc ttg gtg ggg tgc ggg gct agg ggt	1824	

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
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		30
675	680	685
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	40
Asp Ser Asp Gln Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Gly Asp Arg Phe Arg		

705	710	715	720		
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	10
Gly Trp Leu Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ser Met Val Gly Asp Ser					
	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		20
ggc atg agc agc cag gaa cgg cga cga gta caa cag gcc ttc atg cgg				2352	
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					
	820	825	830		40

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

icc 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

tig 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

40

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		
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		20
1100			1105			1110				
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	40
Pro Glu	Glu Arg	Phe Ser	Gly	Arg Ala	Val Ala	Arg	Ile Phe	His		

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

1190

1195

1200

10

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

20

<210> 2

<211> 1216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

30

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

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

260

265

270

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

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

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

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

10

20

30

40

Ser Gly Pro Arg Ala Thr Asp Lys Asp Thr Cys Phe Arg Cys Gly Gln
 385 390 395 400

Phe Gly His Trp Ala Ser Gln Cys Ser Gln Pro Gly Pro Thr Leu Thr
 405 410 415

10

Val Gln Glu Glu Gly Asp Arg Asp Asp Lys Gln Pro Ile Ser Thr Leu
 420 425 430

Glu Glu Val Ala Gln Arg Thr Gly Thr Ala Ser Cys His His Ser Gly
 435 440 445

20

Glu Glu Thr Gln Pro Ala Ala Pro Glu Leu Gln Val Pro His Cys Pro
 450 455 460

Thr Pro Met Ser Pro Leu Tyr Pro Pro Gly Pro Leu Gly Gln Val Ala
 465 470 475 480

30

Glu Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu Glu Arg Leu Gly Tyr Arg
 485 490 495

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

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

40

Thr Leu Asp Ser Val Ile Ile Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ile Gln Asn

725

730

735

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

Gly Ser Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala His Arg Cys Pro Pro Leu Ala
 965 970 975

Ala Cys Gln Ala Lys Trp Pro Pro Lys Asp Thr Ser Gln Gly Arg Ser
 980 985 990

10

Ser Leu Glu Phe Gly Val Val Glu Leu Ala Asp Ser Met Gly Trp Lys
 995 1000 1005

Leu Ala Ser Val Arg Gln Ala Leu His Gln Leu Lys Trp Asp Pro
 1010 1015 1020

20

Glu Pro Lys Lys Gly Ala Ala Gln Gly Thr Gly Val Leu Val Lys
 1025 1030 1035

Phe Ser Glu Leu Ala Phe His Leu His Ser Arg Gly Asp Leu Thr
 1040 1045 1050

30

Asp Glu Glu Lys Asp Gln Ile Cys Asp Phe Leu Tyr Asn Arg Val
 1055 1060 1065

Gln Ala Arg Glu His Lys Ala Leu Ala His Leu His Gln Met Ser
 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 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

40

Gly Ile Ala Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Leu Asp

1175

1180

1185

Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Asp Phe His Ala Leu

1190

1195

1200

10

Met His Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Leu Arg Gly Arg

1205

1210

1215

<210> 3

<211> 180

<212> DNA

<213> Mus musculus

20

<400> 3

gttctccggg agcatatggg ggtgcgctgc tcttgggtc tcacagccac agccacacga 60

agcactgctc gagaatggc tcagcacctt ggcatagctg gcgagttiga gctcagcggg 120

tcagccaaca tccctgcaa 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

10

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

20

<400> 5

cagctaigcc aaggigctga gccacatctc 30

<210> 6

<211> 30

30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

40

ttgagctcag cgggtcagcc aacatccctg 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

10

<400> 7

tgctctaaac aggtccaca actgggaaag 30

<210> 8

<211> 583

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

20

<400> 8

ggacactcag ggtccaaaac ctgggcagac tcaggtaagt gccacacctc tgaggatagt 60

tcttaaagct tgggacagtg acatggcccc attcaacctt gaccccacag ttcaatccct 120

gcttggcica aggtttcctt ggctgctccg ggtagattt tacatgacag atgctatggt 180

30

agctcagaig aggttacatg ctatcctccc acagcttcag gactgggagg accaaatagc	240	
ccgggaigtc cgccagctcc tgcctctgag gccagaagaa aggttttcag gaagggtgt	300	
ggccccgcatc ttccatggca ttggtgaggg ccacgggggtt gcctgggtgcc agcgggggat	360	
gggtattaga gccagctgag tcctcaggcc tgtgtttctg ctccacccta gcgagtccat	420	10
gctaccacgc ccagggtgat gggctggacc ggcgcttctg gaggaagtac ctacacctgg	480	
actttcaigc ccgatgcac ctagctacag aagagctcct gctgagaggc cgaigaccac	540	
cttacaiggg agggigccac atgattgagg catgaggcaa gcc	583	20
<210> 9		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		30
<223> PCR primer		
<400> 9		
ctcgtggict cgctctcct gtcactcatg	30	
<210> 10		40
<211> 30		

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> PCR primer

<400> 10 10
 gccaccatg gacaggcagg tgcggaggag 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

<220>
 <223> PCR primer

<400> 11
 ctgggaaaa gcgcctcccc taccggtag 30
 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220> 40
 <223> PCR primer

<400> 12

ctcgtggctcgcctctcctgtcactcatg

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

cagctgggcactgcccctcaaggcaatgcag

30

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

ctgccctcctcagtggtcac

20

<210> 15		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> PCR primer		10
<400> 15		
gacaggcagg tgcggaggag	20	
<210> 16		
<211> 30		20
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> PCR primer		
<400> 16		30
ctcgtggctt cgcctctcct gtcactcatg	30	
<210> 17		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial		40
<220>		
<223> PCR primer		
<400> 17		
cagctgggca ctgccgcca ggcaatgcag	30	

【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。矩形は一つのエクソンに相当する。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^{-/-})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。

10

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遺伝子のエクソン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NTB1untを示す。

【図4】図4は、野生型マウス(Recql4^{+/+})、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4^{+/-})及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4^{-/-})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。

20

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

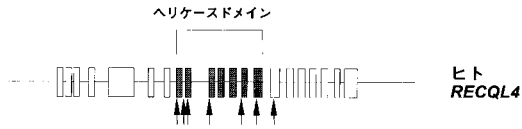
【図7】図7は、野生型マウス(Recql4^{+/+})、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4^{+/-})及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4^{-/-})の19日目における外観を示す。

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

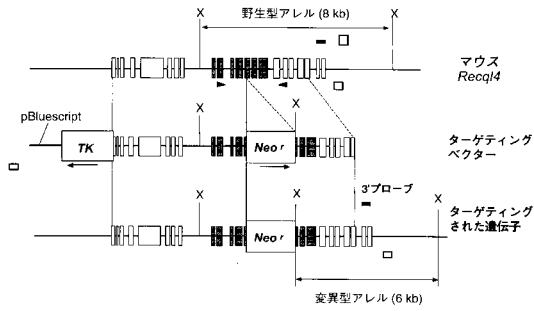
【図9】図9は、野生型マウス(Recql4^{+/+})、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス(Recql4^{+/-})及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス(Recql4^{-/-})の各個体に由来するMEFの細胞増殖を示す。

30

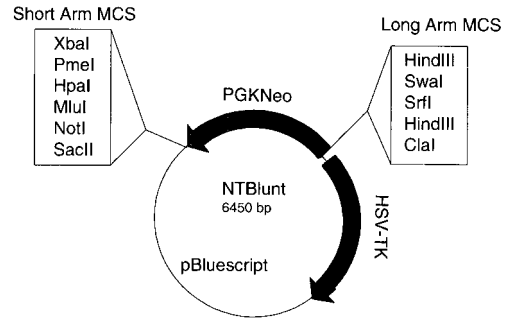
【 図 1 】



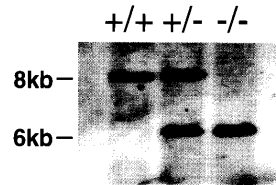
【 図 2 】



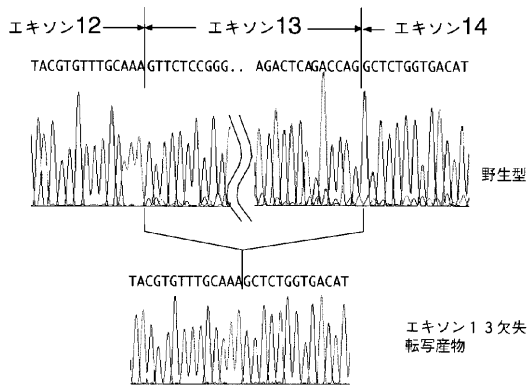
【 図 3 】



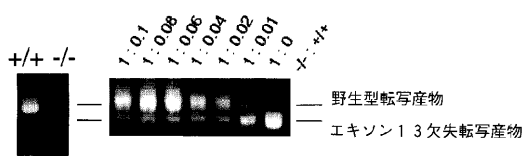
【 図 4 】



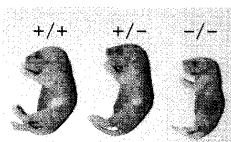
【 図 5 】



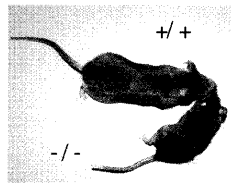
【 図 6 】



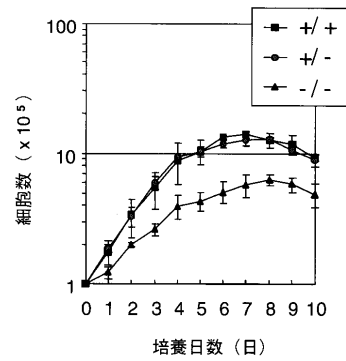
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



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

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 DA02