

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年8月20日(20.08.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/101939 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A01K 67/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/052230
- (22) 国際出願日: 2009年2月10日(10.02.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-031002 2008年2月12日(12.02.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人福岡大学 (Fukuoka University) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目1番1号 Fukuoka (JP). 国立大学法人弘前大学 (Hirotsaki University) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 Aomori (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 廣瀬 伸一 (HIROSE, Shinichi) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目1番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 兼子 直 (KANEKO, Sunao) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP).
- (74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒1020073 東京都千代田区九段北4丁目3番14号 九段堀江ビル6F Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: NON-HUMAN MAMMAL MODEL OF EPILEPSY

(54) 発明の名称: てんかんモデル非ヒト哺乳動物

(57) Abstract: Provided is a genuine model animal of epilepsy, since most of the existing model animals are so-called seizure model animals showing forcibly-induced seizure. Also provided is a method whereby a recombinant can be easily distinguished. A non-human mammal model of epilepsy which is an epilepsy model of a non-human animal such as rat having the same genetic defect as human genetic defect causing epilepsy, which carries a genetic mutation that is the genetic defect having been transferred into the non-human mammal DNA of neuron nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit (CHRNA4) gene or $\beta 2$ subunit (CHRN-B2) gene relating to human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and which also carries a mutated gene obtained by transferring a specific probe thereinto. A recombinant of this non-human mammal model of epilepsy can be easily distinguished.

(57) 要約: 【課題】従来のモデル動物が主に強制的にけいれん発作を誘導させるいわゆるけいれんモデル動物であるところから、てんかんの真のモデル動物を提供することと、組換え体の識別が容易に可能である方法を提供すること。【解決手段】この発明に係るてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、ヒトのてんかんの遺伝子異常と同じ遺伝子異常を有するラットなどのてんかんモデル非ヒト哺乳動物であって、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニット (CHRNA4) 遺伝子もしくは $\beta 2$ サブユニット (CHRN2) 遺伝子の非ヒト哺乳動物の DNA に遺伝子異常である遺伝子変異を変異導入し、かつ、特定のプローブを導入して得られる変異遺伝子を有している。また、この発明のてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、その組換え体を容易に識別することができる。

WO 2009/101939 A1

明 細 書

てんかんモデル非ヒト哺乳動物

技術分野

[0001] この発明は、てんかんモデル非ヒト哺乳動物に関するものである。更に詳細には、この発明は、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連する遺伝子と相同の遺伝子異常を有し、てんかん発作を自然発症するてんかんモデル非ヒト哺乳動物に関するものである。また、この発明は、遺伝子組換え個体の識別を容易に可能とする変異遺伝子、その構築方法ならびにその識別方法に関するものである。

背景技術

[0002] てんかんは、日本国民の約2%が罹患する比較的多い神経疾患であるが、その分子生物学的成因は長い間不明であった。その原因はてんかんが多くの多彩な疾患の総称であるためである。しかしながら、最近になって、家族性てんかんを中心に少しずつその遺伝異常が分かってきた。

[0003] そのうちの常染色体優性夜間前頭葉てんかんは、家族性てんかんの1つで、夜間にてんかん発作を特徴とするが、その原因遺伝子異常としてニューロンアセチルコリン受容体の $\alpha 4$ ならびに $\beta 2$ サブユニットの遺伝子である CHRNA4 ならびに CHRN B2 の遺伝子の変異が報告されている(非特許文献1)。CHRNA4の遺伝子異常としては、S284L、S280Fならびに291-292insL の3種類が報告されている(非特許文献2、3、4、5)。またCHRN B2 の遺伝子異常としては、V287L、V287MならびにI312Mの3種類の遺伝子異常が報告されている(非特許文献6、7、8)。

[0004] てんかんの診断法や処理方法の開発ならびに発展のための手段としていわゆる「てんかんモデル動物」が使用されている。従来のてんかんモデル動物は、電気刺激やペンチレンテトラゾールなどのけいれん誘発物質を用いた「けいれんモデル動物」である。また、糖鎖抗体遺伝子を導入することによりてんかん様痙攣を起こすトランスジェニック非ヒト哺乳動物が開示されている(特許文献1)。また、体位転換に反応して強直間代痙攣またはてんかん症状を呈する、 $\mu 3B$ 遺伝子機能を染色体上で欠損させた非ヒト動物も作出されている(特許文献2)。しかしながら、これらの従来のモデ

ル動物は、けいれん発作のモデル動物とはなり得たが、分子生物学的にヒトてんかんの真のモデル動物とはなり得なかった。

[0005] 発明者らは、ヒト染色体優性夜間前頭葉てんかんがニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット(CHRNA4)遺伝子の第284のSerがLeuに置換していることであることを見出した(非特許文献9)。

[0006] そこで、本発明者らは、ラットニューロンアセチルコリン受容体遺伝子CHRNA4の遺伝子変異を遺伝子組換えで導入した遺伝子組換えてんかんモデル動物を作出した(特許文献3)。

[0007] しかしながら、従来技術では、かかる遺伝子組換えモデル動物を作出するに当たっては、相同組換えが起こる確率が高くないので、数多くの組換え体をスクリーニングする必要があった。また、組換え体のスクリーニングにはその遺伝子の一部をシーケンスする必要があり、そのためには相当の時間と費用が掛かっていた。そこで、遺伝子をシーケンスするなしに組換え体を判別する方法が開発できれば、大幅な時間と費用の節約ができることから、かかる組換え体の判別方法の開発も要望されていた。

非特許文献1:Hirose, S., et al., Neurology 53:1749-1753, 1999

非特許文献2:Steinlein, O.K., et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet 11, 201-203 (1995).

非特許文献3:Hirose, S., et al. A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Neurology 53, 1749-1753 (1999).

非特許文献4:Steinlein, O.K., et al. Independent occurrence of the CHRNA4 Ser248Phe mutation in a Norwegian family with nocturnal frontal lobe epilepsy. Epilepsia 41, 529-535 (2000).

非特許文献5:Steinlein, O.K., et al. An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Hum Mol Genet 6, 943-947 (1997).

非特許文献6:De Fusco, M., et al. The nicotinic receptor b2 subunit is mutant in n

octurnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 26, 275-276 (2000).

非特許文献7:Phillips, H.A., et al. CHRN2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet* 68, 225-231 (2001).

非特許文献8:Bertrand, D., et al. The CHRN2 mutation I312M is associated with epilepsy and distinct memory deficits. *Neurobiol Dis* 20, 799-804 (2005).

非特許文献9:Hirose, S., et al. A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology* 53, 1749-1753 (1999).

特許文献1:特開2006-141217号公報

特許文献2:特許第3853136号公報

特許文献3:特開2005-245361号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記要望に応えるべく、本発明者は、鋭意研究の結果、ヒトCHRNA4またはCHRN2の遺伝子異常に関連する遺伝子変異を非ヒト動物の相同遺伝子Chrna4またはChrn2のcDNAにそれぞれ変異導入し、かつ、その変異cDNAの塩基配列の一部を、その塩基配列とは異なる塩基配列を有するが、アミノ酸配列が同一になるように工夫したプローブを導入することによって作出した非ヒト哺乳動物がてんかんのモデル動物となり得ることと同時に、このようにして作出した非ヒト哺乳動物はその組換え個体の識別が容易にできるばかりではなく、組換え遺伝子から発現するmRNAをその本来の相同遺伝子のmRNAと区別して容易に検出できることを見出した。さらに、本発明者は、ヒトCHRNA4またはCHRN2の遺伝子異常に関連する遺伝子変異を非ヒト動物の相同遺伝子Chrna4またはChrn2のcDNAにそれぞれ導入するに際して、変異導入部位とその変異を工夫して制限酵素切断部位を出現させるように変異を導入することにより、組換え個体の識別を容易にすることができることを見出して、この発明を完成した。

[0009] したがって、この発明は、ヒトのてんかんの遺伝子異常と同じ遺伝子異常を有するラットなどのてんかんモデル非ヒト哺乳動物であって、ヒト常染色体優性夜間前頭葉て

んかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット (CHRNA4) 遺伝子もしくは β 2サブユニット (CHRNA2) 遺伝子の非ヒト哺乳動物のDNAに遺伝子異常である遺伝子変異を変異導入し、かつ、特定のプローブを導入して得られる変異遺伝子を持つてんかんモデル非ヒト哺乳動物およびその作出方法を提供することを目的としている。

[0010] また、この発明は、上記遺伝子変異をcDNAに変異導入するとともに、該cDNAの塩基配列の一部を、該塩基配列部分と塩基配列は異なるが、アミノ酸配列が同一になる上記プローブと置換した変異遺伝子とその作成方法を提供することを目的としている。

[0011] この発明の好ましい態様として、上記遺伝子変異をcDNAに変異導入して新たに制限酵素切断部位が出現している変異遺伝子ならびにその変異導入方法を提供することも目的としている。

[0012] さらに、この発明は、上記制限酵素切断部位に対する制限酵素または上記プローブを作成するときに使用した制限酵素を用いることによって、組換え体個体を容易に識別することができる組換え体の識別方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] これらの目的を達成するために、この発明は、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット (CHRNA4) 遺伝子または β 2サブユニット (CHRNA2) 遺伝子の非ヒト動物の相同遺伝子Chrna4またはChrna2 に、遺伝子異常に関連する遺伝子変異をそれぞれ変異導入すると共に、該遺伝子の塩基配列の一部を、その塩基配列部分とは異なる塩基配列を有するが、アミノ酸配列が同じになるように工夫したプローブを導入した変異遺伝子を有するように作出したてんかんモデル非ヒト哺乳動物を提供する。

[0014] また、この発明の好ましい態様として、該変異導入により制限酵素切断部位を出現させるてんかんモデル非ヒト哺乳動物が提供される。

[0015] この発明の別の目的は、上記てんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法であって、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4または β 2サブユニットCHRNA2の非ヒト動物の相

同遺伝子Chrna4またはChrb2 のcDNAに、遺伝子異常に関連する遺伝子変異を変異導入するとともに、該cDNAの塩基配列の1部を、その塩基配列部分とは塩基配列が異なるが、アミノ配列が同じになるプローブで置換することによって変異遺伝子を作成し、該変異遺伝子を発現ベクターに移行し、制限酵素で切断して単離した単離DNAを受精卵に注入して受精卵を得、該受精卵を受胎雌動物に移植することによって組換え体を作成することからなるてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法を提供する。

[0016] また、この発明は、遺伝子の塩基配列に1個または複数個の変異が変異導入されているとともに、該遺伝子のcDNAの塩基配列の1部が、その塩基配列部分とは塩基配列は異なるが、アミノ配列が同じになるプローブで置換されている変異遺伝子ならびにその作成方法を提供する。この発明の好ましい態様として、該変異導入にともなって制限酵素切断部位が出現している変異遺伝子およびその作成方法が提供される。

[0017] さらに、この発明は、上記てんかんモデル非ヒト哺乳動物において、上記変異遺伝子である外来遺伝子が宿主動物の本来の遺伝子との間に相同組換えの存否を、上記プローブまたは上記制限酵素部位の制限酵素を用いて識別する組換え体の識別方法を提供する。

発明の効果

[0018] この発明に係るてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、外部刺激やけいれん誘発物質を用いて強制的にけいれん発作を誘導させるいわゆる「けいれんモデル動物」ではなく、てんかん発作を自然に誘発するてんかんの真のモデル動物となり得るという大きな効果を有している。

[0019] つまり、この発明のてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、ヒトのてんかん遺伝子異常と同じ遺伝子異常を有していることから、ヒトのけいれん発作と同様のてんかん発作を自然に誘発するてんかんの真のモデル動物となり得るという大きな効果を有している。

[0020] また、この発明に係るてんかんモデル非ヒト哺乳動物においては、該変異導入により出現した制限酵素切断部位の制限酵素または変異遺伝子に導入したプローブの

制限酵素を用いることにより、組換え体をシーケンスすることなしに、組換え個体の識別が容易にできるとともに、組換え遺伝子から発現するmRNAをラットなどのそれ本来のChrna4 もしくはChrb2のmRNAと区別してPCR 法やin situ hybridization法などにより容易に検出できるという効果がある。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、CHRNA4のSma I/Bpu1102 I 部位におけるエンザイムサイトを示す図。(A)は野生型CHRNA4のエンザイムサイトを示し、(B)はプローブのエンザイムサイトを示す図。

[図2]図2は、実施例1で構築した発現ベクターを示す概略図。

[図3]図3は、SnaB I/NaeI部位におけるPDGFプロモーターとラットChrna4の構成を示す概略図。

[図4]図4は、CHRN2のHinc II/Sma I 部位におけるエンザイムサイトを示す図。(A)は野生型CHRN2のエンザイムサイトを示し、(B)はプローブのエンザイムサイトを示す図。

[図5]図5は、実施例4で構築した発現ベクターを示す概略図。

[図6]図6は、SnaB I/Dra III部位におけるPDGFプロモーターとラットChrb2の構成を示す概略図。

[図7]図7は、トランスジェニックラット(Chrb2 V287L)の脳波(EEG)を測定した結果を示す図。

[図8]図8は、図6の記号A部分の拡大図。

[図9]図9は、図6の記号B部分の拡大図。

発明を実施するための最良の形態

[0022] この発明に係るてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、家族性てんかんの1つで、夜間のてんかん発作を特徴とするヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット(CHRNA4) 遺伝子もしくは β 2サブユニット(CHRN2) 遺伝子の遺伝子変異を遺伝子組換えし、該遺伝子の塩基配列の1部が、その塩基配列とは異なるが、アミノ酸配列が同一になるプローブを導入した変異遺伝子を有し、ニューロンニコチン性アセチルコリン受容体の α 4サブ

ユニット CHRNA4 遺伝子もしくは β 2サブユニット CHRNB2 遺伝子の機能を欠失もしくは欠損している遺伝子組換えてんかんモデル非ヒト哺乳動物である。

[0023] ここで、用語「非ヒト哺乳動物」とは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシなどのヒト以外の哺乳動物を意味しているが、ラットが抗てんかん薬の開発に永年使用されているという観点からしてより好ましいといえる。また、本明細書においては、説明を簡潔にするために、ラットを例にして説明するが、特にラットに限定されるものではない。

[0024] 現在では、一般的に、遺伝子異常を有する疾患モデル動物は当該技術分野で慣用されている組換え動物作出法で作出することができる。この発明においては、家族性てんかんの1つである夜間のてんかん発作を特徴とするヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに対するてんかんモデル動物を当該技術分野で従来から使用されている組換え動物作出法で作出することができる。

[0025] そのためには、まず、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット (CHRNA4) 遺伝子もしくは β 2サブユニット (CHRNB2) 遺伝子の相同遺伝子がラットなどからPCRクローニングなどの常法に従って単離される。なお、ラットChrna4のcDNAの塩基配列情報は、L31620ヒトCHRNA4 cDNAの塩基配列情報のNM_000744 (NCBI)として、またラットChrn2のcDNAの塩基配列情報はNM_019297 (NCBI)として登録されている。

[0026] ラットのニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット (Chrna4) 遺伝子のcDNA(野生型)の塩基配列は下記の通りである。なお、下線部分は、この発明においてプローブと置換される部分を示している。また、対応するアミノ酸配列は配列番号30に示すとおりである。

(配列番号1)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCCCATGCGGAGGAGCGGCTCCTGAAGAGACTCTTCTCCGGTTACAA
CAAGTGGTCTCGGCCAGTAGCCAATATCTCAGATGTGGTCCTCGTCCGCTT
TGGCTTGTCATTGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT

GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT
CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTTCTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCATCCC
GCTCATCGGGCAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTCACCCTCTCCAT
CGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCACACA
CACGATGCCCCGCCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCGCCT
CCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACTTAT
TGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCCTGT
GGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTACCTGC
CCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTACGTG
CAGGTCACCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGAGAA
GGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAGCAG
TGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGTGCC
CAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGAGTAT
CCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCAAGCC
CACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCGTGTC
AGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTGTGTC
CCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAACACCT

GCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACATTGC
AGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACTGGAA
ATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCATTGTC
TGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGCTTGC
TGA

ラットのニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 β 2サブユニット (Chrn2) 遺伝子のcDNA(野生型)の塩基配列は下記の通りである。なお、下線部分は、この発明においてプローブと置換される部分を示している。また、対応するアミノ酸配列は配列番号31に示すとおりである。

(配列番号2)

ATGGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGCGCTGTTTCAGCTTCAGCCTTCTTTGG
CTGTGCTCAGGGGTTTTGGGAACTGACACAGAGGAGCGGCTAGTGGAGCAT
CTCTTAGATCCCTCCCGCTATAACAAGCTGATTCGTCCAGCTACTAACGGC
TCTGAGCTGGTGACTGTACAGCTCATGGTATCATTGGCTCAGCTCATTAGTG
TGCACGAGCGGGAGCAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGACCCAGGAGT
GGGAAGATTACCGCCTCACATGGAAGCCTGAGGACTTCGACAATATGAAGA
AAGTCCGGCTCCCTTCCAAACACATCTGGCTCCCAGATGTGGTTCTATAACA
ACAATGCTGACGGCATGTACGAAGTCTCCTTCTATTCCAATGCTGTGGTCTC
CTATGATGGCAGCATCTTTTGGCTACCACCTGCCATCTACAAGAGTGCATG
CAAGATTGAGGTGAAGCACTTCCCATTTGACCAGCAGAATTGCACCATGAA
GTTTCGCTCATGGACCTACGACCGTACTGAGATTGACCTGGTGCTCAAAAG
TGATGTGGCCAGTCTGGATGACTTCACACCCAGCGGGGAGTGGGACATCAT
CGCACTGCCAGGCCGACGCAACGAGAACCCAGACGACTCCACCTATGTGGA
CATCACCTATGACTTCATCATTCTGTCGCAAACCACTCTTCTACACTATCAAC
CTCATCATCCCCTGCGTACTCATCACCTCGCTGGCCATCCTGGTCTTCTAC
CTGCCCTCAGACTGTGGTGAAAAGATGACACTTTGTATTTCTGTGCTGCTAG
CACTCACGGTGTTCTGCTGCTCATCTCCAAGATTGTGCCTCCACCTCCC
TCGATGTACCGCTGGTGGGCAAGTACCTCATGTTTACCATGGTGCTAGTCA

CCTTCTCCATCGTCACCAGCGTGTGTGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGC
CTACCACGCACACCATGGCCCCCTGGGTCAAGGTGGTCTTCCTGGAGAAGC
TGCCCACCCTGCTCTTCCTGCAGCAGCCACGCCACCGCTGTGCACGTCAGC
GTCTGCGCTTGAGGAGGCGCCAGCGAGAGCGTGAGGGCGCAGGCGCGCTT
TTCTTCCGTGAAGGTCCTGCGGCTGACCCATGTACCTGCTTTGTCAAACCCT
GCATCAGTGCAGGGCTTGGCTGGGGCTTCCGAGCTGAGCCCCTGCAGCC
GGCCCCGGGGCGCTCTGTGGGGCCATGCAGCTGTGGCCTCCGGGAAGCAGT
GGATGGCGTACGCTTCATTGCGGACCACATGCGAAGTGAGGATGATGACCA
GAGTGTGAGGGAGGACTGGAAATACGTTGCCATGGTGATCGACCGCCTGTT
CCTGTGGATCTTTGTCTTTGTCTGTGTCTTTGGGACCGTCGGCATGTTCTTG
CAGCCTCTCTCCAGAACTACACTGCCACTACCTTCCTCCACCCTGACCAC
TCAGCTCCCAGCTCCAAGTGA

このようにして得られたcDNAクローンは既知の変異導入法により変異を導入することができる。この発明に使用できる変異導入法としては、当該技術分野で従来から汎用されている部位特異的突然変異導入法などの従来法を使用するのがよい。この部位特異的突然変異導入法は、cDNAに任意の変異を部位特異的に任意の部位に導入することができる。かかるcDNAの部位に部位特異的に導入できる変異としては、特に限定されるものではなく、その変異が欠失、欠損、置換または付加などの改変であってもよい。

[0027] したがって、この発明においても、部位特異的突然変異導入法を利用して単離ラットChrna4またはChrn2に所定の変異を導入することができ、その結果変異が導入されたラットの相同遺伝子Chrna4またはChrn2は、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんの発作に関連する機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を保持している。

[0028] なお、本明細書で使用する「相同遺伝子」またはこれに関連する用語は、遺伝学的用語ではある遺伝子の塩基配列において、祖先を同じくすると考えられる異種の動物での遺伝子で類似の塩基配列をもち、コードされる蛋白も類似した機能を有するものをいう。

この発明において、ラットのニューロンニコチン性アセチルコリン受容体サブユニット遺伝子のcDNAは次のようにして調整することができる。

[0029] 具体的には、ラットのcDNAクローンをテンプレートとして既存のラットChrna4 または Chrnb2 の cDNA 配列を基に2種類のプライマー、例えば、下記塩基配列を有するフォワードプライマーとリバースプライマーを設計・作成する。

[0030] ラットChrna4 の cDNA 配列を基にして作成されるフォワードプライマー(40mer)(配列番号3)とリバースプライマー(38mer)(配列番号4)は次の塩基配列を有する。

[0031] 配列番号3:AGATCTCGCGAAGCTTCACCATGGCCAATTCGGGCACCGG

配列番号4:AGATCTAGATCAGCAAGCAGCCAGCCAGGGAGGCAGGA

ラットChrnb2の cDNA 配列を基にして作成されるフォワードプライマー(41mer)(配列番号5)とリバースプライマー(40mer)(配列番号6)は次の塩基配列を有する。

[0032] 配列番号5:AGATCTCGCGACATGGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGGCGCT

配列番号6:ATCGATGGATCCTCACTTGGAGCTGGGAGCTGAGTGGTCA

これらのプライマーを用いてPCRを行って、得られたPCR産物を適切なベクターにサブクローニングする。得られるクローンをシーケンスし、Chrna4および Chrnb2 の cDNA の塩基配列を確認する。

[0033] つぎに、上記のようにして得られたcDNAクローンの任意の部位に変異を導入する。変異導入法としては種々の方法が知られていて、そのいずれもこの発明に適用することができる。特に、部位特異的突然変異導入法などの変異導入法を使用することによって任意の部位に任意の変異を導入することができる。

[0034] 前述したように、CHRNA4 遺伝子の遺伝子異常としては、S280F、S284Lならびに、291-292insLが報告されている。また、CHRN2 遺伝子の遺伝子変異としては、V287L、V287MおよびI312Mが報告されている。

[0035] そこで、この発明においては、上記のようにしてPCRクローニングで単離したラットChrna4(野生型)(配列番号1)およびラットChrnb2(野生型)(配列番号2)に対して、例えば、CHRNA4 遺伝子の遺伝子異常である、S280F、S284L、もしくは291-292insLまたはCHRN2 の遺伝子変異であるV287LもしくはV287Mに相当する種特異的な相同遺伝子の変異を上記変異導入法によって変異導入することができる。

[0036] つまり、変異導入は、適切なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて、市販のキットによって所定の変異を所定の変異導入部位に変異を導入することができる。この変異導入に使用することができるセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、一般的には20mer~40mer、好ましくは25mer~35merであるのがよい。この場合、制限酵素切断部位が変異導入部位に新たに出現してくるように、プライマー、変異導入部位などを工夫して変異導入を行うのがよい。

[0037] 具体的には、例えば、野生型ラットChrna4にS282F(ヒトではS280F)の変異導入するには、下記のセンスプライマー(29mer)とアンチセンスプライマー(29mer)を用いて、cDNAの塩基配列845番の C を T (c.845C>T) に、また846番の G を C (c.846G>C) に変異導入することができる。この変異導入によって、CHRNA4の p.282 番と相同のアミノ酸残基SerがPheに置換される。

[0038] 使用できるセンスプライマー(配列番号7)およびアンチセンスプライマー(配列番号8)の塩基配列は次の通りである。

[0039] 配列番号7:CACACTGTGCATCTTCGTGCTGCTTTCTC

配列番号8:GAGAAAGCAGCACGAAGATGCACAGTGTG

上記変異導入により生成された変異導入ラットcDNAの塩基配列は下記の通りである。

(配列番号9)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGCCCATGCGGAGGAGCGGCTCCTGAAGAGACTCTTCTCCGGTTACAAC
AAGTGGTCTCGGCCAGTAGCCAATATCTCAGATGTGGTCCTCGTCCGCTTT
GGCTTGTCCATTGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGATG
ACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTGG
GACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACTC
ATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGCA
GTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTGG
ACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTTC

CCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGAC
AAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGAC
TTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAAC
ACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGCC
TTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCCG
TGCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGAGT
GTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTTCGTGCTGCTTTCTCTCACCGTCT
TCCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCATCCCGC
TCATCGGCGAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTACCCCTCTCCATCG
TCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCACACACA
CGATGCCCCGCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCGCCTCC
TCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACTGCCGGAGACTTATTG
AGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCCTGTGG
GCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACCTGCCC
CAACTTTCTGCAACCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTACGTGCA
GGTCACCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGAGAAGG
CCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCCTCCACCCAAGAGCAGCAGTG
GGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGTGCCCA
GCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGAGTATCC
AGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCAAGCCCA
CCAGTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCGTGTGAG
ACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTGTGTCCC
CAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAACACCTGC
CCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACATTGCAG
ACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACTGGAAT
ACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCATTGTCTG
CCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGCTTGCTG

A

同様に、野生型ラットChrna4にS286L(ヒトではS284L)の変異導入をするには、下記のセンスプライマー(29mer)とアンチセンスプライマー(29mer)を用いて、cDNAの塩基配列856番の T を C (c.856T>C) に、また857番の C を T (c.857C>T) に変異導入することができる。この変異導入によって、CHRNA4の p.286 番と相同のアミノ酸残基 SerがLeuに置換される。

[0040] 使用できるセンスプライマー(配列番号10)およびアンチセンスプライマー(配列番号11)の塩基配列は次の通りである。

[0041] 配列番号10:CGGTGCTGCTTCTTCTCACCGTCTTCCTG

配列番号11:CAGGAAGACGGTGAGAAGAAGCAGCACCG

上記変異導入により生成された変異導入cDNAの塩基配列は下記の通りである。

(配列番号12)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCCCATGCGGAGGAGCGGCTCCTGAAGAGACTCTTCTCCGGTTACAA
CAAGTGGTCTCGGCCAGTAGCCAATATCTCAGATGTGGTCCTCGTCCGCTT
TGGCTTGTCATTGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT
CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTCTTCTCACCGT

CTTCCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCATCCC
GCTCATCGGGCAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTCACCCTCTCCAT
CGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCACACA
CACGATGCCCCGCCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCGCCT
CCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACTTAT
TGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCCTGT
GGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTACCTGC
CCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTACGTG
CAGGTCACCCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGAGAA
GGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAGCAG
TGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGTGCC
CAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGAGTAT
CCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCAAGCC
CACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCGTGTC
AGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTGTGTC
CCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAACACCT
GCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACATTGC
AGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACTGGAA
ATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCATTGTC
TGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGCTTGC
TGA

同様に、野生型ラットChrna4のcDNAの塩基配列878番と879番の間にGCT (c.878-879insGCT) を挿入することによって、下記センスプライマー(30mer)とアンチセンスプライマー(30mer)を用いて、CHRNA4のp.293番(ヒトでは291番)と相同のアミノ酸残基Leuとp.294番(ヒトでは292番)と相同のアミノ酸残基Ileの間にLeuが挿入される。

[0042] 使用できるセンスプライマー(配列番号13)およびアンチセンスプライマー(配列番号14)の塩基配列は次の通りである。

[0043] 配列番号13:GTCTTCCTGCTGCTGCTCATCACCGAGATC

配列番号14:GATCTCGGTGATGAGCAGCAGCAGGAAGAC

上記変異導入により生成された変異導入cDNAの塩基配列は下記の通りである。

(配列番号15)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCCCATGCGGAGGAGCGGCTCCTGAAGAGACTCTTCTCCGGTTACAA
CAAGTGGTCTCGGCCAGTAGCCAATATCTCAGATGTGGTCCTCGTCCGCTT
TGGCTTGTCCATTGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT
CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTTCTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTGCTAATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCAT
CCCGCTCATCGGCAGTACCTCCTCTTACCATGATCTTCGTCACCCTCTC
CATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCAC
ACACACGATGCCCGCCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCG
CCTCCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACT
TATTGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCC
TGTGGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACC
TGCCCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTAC

GTGCAGGTCACCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGA
GAAGGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAG
CAGTGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGT
GCCCAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGA
GTATCCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCA
AGCCCACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCG
TGTCAGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTG
TGTCCCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAAC
ACCTGCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACA
TTGCAGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACT
GGAAATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCAT
TGTCTGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGC
TTGCTGA

上記c.878-879insGCTの場合と同様にして、野生型ラットChrna4のcDNAの塩基配列879番と880番の間に TTA (c.879-880insTTA) を挿入することによって、CHRNA4のp.293番(ヒトでは291番)と相同のアミノ酸残基Leuとp.294番(ヒトでは292番)と相同のアミノ酸残基Ileの間にLeuが挿入される。

(配列番号16)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCCCATGCGGAGGAGCGGCTCCTGAAGAGACTCTTCTCCGGTTACAA
CAAGTGGTCTCGGCCAGTAGCCAATATCTCAGATGTGGTCCTCGTCCGCTT
TGGCTTGTCATTGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT

CCCCTTTGACCAGCAGA AACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTTCTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTCTTAATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCAT
CCCGCTCATCGGCAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTCACCCTCTC
CATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCAC
ACACACGATGCCCGCCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCG
CCTCCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACA AACTGCCGGAGACT
TATTGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCC
TGTGGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACC
TGCCCCAACTTTCTGCAACCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTAC
GTGCAGGTCACCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGA
GAAGGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCCTCCACCCAAGAGCAG
CAGTGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGT
GCCCAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGA
GTATCCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCA
AGCCCACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCG
TGTCAGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTG
TGTCCCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAAC
ACCTGCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACA
TTGCAGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACT
GGAAATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCAT
TGTCTGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGC
TTGCTGA

同様に、例えば、野生型ラットChrn2にV287Lの変異導入をすることによって、ラット相同遺伝子Chrn2のcDNAには、配列番号16で表される塩基配列からなるフォワードプライマーおよび配列番号17で表される塩基配列からなるリバースプライマーを用いて、c.856番目のGがCに(c.856G>C)置換され、ヒトのニューロンアセチルコリン受容体 β 2サブユニットCHRN2と相同のアミノ酸残基p.286番のValがLeuに置換される。

[0044] 使用できるセンスプライマー(30mer)(配列番号17)およびアンチセンスプライマー(30mer)(配列番号18)の塩基配列は次の通りである。

[0045] 配列番号17:CTCATCTCCAAGATTATGCCTCCCACCTCC

配列番号18:GGAGGTGGGAGGCATAATCTTGGAGATGAG

上記変異導入により生成された変異導入cDNAの塩基配列は下記の通りである。

(配列番号19)

GGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGCGCTGTTTCAGCTTCAGCCTTCTTTGGCT
GTGCTCAGGGGTTTTGGGAAGTACACAGAGGAGCGGCTAGTGGAGCATCT
CTTAGATCCCTCCCGCTATAACAAGCTGATTCGTCCAGCTACTAACGGCTC
TGAGCTGGTGACTGTACAGCTCATGGTATCATTGGCTCAGCTCATTAGTGTG
CACGAGCGGGAGCAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGACCCAGGAGTGG
GAAGATTACCGCCTCACATGGAAGCCTGAGGACTTCGACAATATGAAGAAA
GTCCGGCTCCCTTCCAAACACATCTGGCTCCCAGATGTGGTTCTATAACAAC
AATGCTGACGGCATGTACGAAGTCTCCTTCTATTCCAATGCTGTGGTCTCCT
ATGATGGCAGCATCTTTTGGCTACCACCTGCCATCTACAAGAGTGCATGCA
AGATTGAGGTGAAGCACTTCCCATTGACCAGCAGAATTGCACCATGAAGTT
TCGCTCATGGACCTACGACCGTACTGAGATTGACCTGGTGCTCAAAAGTGA
TGTGGCCAGTCTGGATGACTTCACACCCAGCGGGGAGTGGGACATCATCGC
ACTGCCAGGCCGACGCAACGAGAACCCAGACGACTCCACCTATGTGGACAT
CACCTATGACTTCATCATTTCGTGCGAAACCACTCTTCTACACTATCAACCTC
ATCATCCCCTGCGTACTCATCACCTCGCTGGCCATCCTGGTCTTCTACCTG
CCCTCAGACTGTGGTGAAAAGATGACACTTTGTATTTCTGTGCTGCTAGCAC

TCACGGTGTTCCTGCTGCTCATCTCCAAGATTCTGCCTCCCACCTCCCTCG
 ATGTACCGCTGGTGGGCAAGTACCTCATGTTTACCATGGTGCTAGTCACCTT
 CTCCATCGTCACCAGCGTGTGTGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCTAC
 CACGCACACCATGGCCCCCTGGGTCAAGGTGGTCTTCCTGGAGAAGCTGCC
 CACCCTGCTCTTCCTGCAGCAGCCACGCCACCGCTGTGCACGTCAGCGTCT
 GCGCTTGAGGAGGCGCCAGCGAGAGCGTGAGGGCGCAGGCGCGCTTTTCT
 TCCGTGAAGGTCCTGCGGCTGACCCATGTACCTGCTTTGTCAAACCCTGCAT
CAGTGCAGGGCTTGGCTGGGGCTTTCCGAGCTGAGCCCACTGCAGCCGGC
CCGGGGCGCTCTGTGGGGCCATGCAGCTGTGGCCTCCGGGAAGCAGTGGA
 TGCGGTACGCTTCATTGCGGACCACATGCGAAGTGAGGATGATGACCAGAG
 TGTGAGGGAGGACTGGAAATACGTTGCCATGGTGATCGACCGCCTGTTCT
 GTGGATCTTTGTCTTTGTCTGTGTCTTTGGGACCGTCGGCATGTTCTCTGCAG
 CCTCTCTTCCAGAACTACACTGCCACTACCTTCCTCCACCCTGACCACTCA
 GCTCCCAGCTCCAAGTGA

同様にして、野生型ラットChrb2にV287Mの変異導入をすることによって、ラット相
 同遺伝子Chrb2のcDNAには、配列番号20で表される塩基配列からなるフォワード
 プライマーおよび配列番号21で表される塩基配列からなるリバースプライマーを用い
 て、c.856番目のGがAに(c.856G>A)置換され、ヒトのニューロンアセチルコリン受容
 体β2サブユニットCHRN2と相同のアミノ酸残基p.286番のValがMetに置換される。

[0046] 使用できるセンスプライマー(30mer)(配列番号20)およびアンチセンスプライマー(3
 0mer)(配列番号21)の塩基配列は次の通りである。

[0047] 配列番号20:CTCATCTCCAAGATTCTGCCTCCCACCTCC

配列番号21:GGAGGTGGGAGGCAGAATCTTGGAGATGAG

上記変異導入により生成された変異導入cDNAの塩基配列は下記の通りである。
 (配列番号22)

TGGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGCGCTGTTTCAGCTTCAGCCTTCTTTGGC
 TGTGCTCAGGGGTTTTGGGAACTGACACAGAGGAGCGGCTAGTGGAGCATC
 TCTTAGATCCCTCCCGCTATAACAAGCTGATTCGTCCAGCTACTAACGGCT

CTGAGCTGGTGACTGTACAGCTCATGGTATCATTGGCTCAGCTCATTAGTGT
GCACGAGCGGGAGCAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGACCCAGGAGTG
GGAAGATTACCGCCTCACATGGAAGCCTGAGGACTTCGACAATATGAAGAA
AGTCCGGCTCCCTTCCAAACACATCTGGCTCCCAGATGTGGTTCTATACAA
CAATGCTGACGGCATGTACGAAGTCTCCTTCTATTCCAATGCTGTGGTCTCC
TATGATGGCAGCATCTTTTGGCTACCACCTGCCATCTACAAGAGTGCATGC
AAGATTGAGGTGAAGCACTTCCCATTTGACCAGCAGAATTGCACCATGAAG
TTTCGCTCATGGACCTACGACCGTACTGAGATTGACCTGGTGCTCAAAGT
GATGTGGCCAGTCTGGATGACTTCACACCCAGCGGGGAGTGGGACATCATC
GCACTGCCAGGCCGACGCAACGAGAACCCAGACGACTCCACCTATGTGGAC
ATCACCTATGACTTCATCATTTCGTCGCAAACCACTCTTCTACACTATCAACC
TCATCATCCCCTGCGTACTCATCACCTCGCTGGCCATCCTGGTCTTCTACC
TGCCCTCAGACTGTGGTGAAAAGATGACACTTTGTATTTCTGTGCTGCTAGC
ACTCACGGTGTTCCCTGCTGCTCATCTCCAAGATTATGCCTCCCACCTCCCT
CGATGTACCGCTGGTGGGCAAGTACCTCATGTTTACCATGGTGCTAGTCAC
CTTCTCCATCGTCACCAGCGTGTGTGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCC
TACCACGCACACCATGGCCCCCTGGGTCAAGGTGGTCTTCCCTGGAGAAGCT
GCCACCCCTGCTCTTCCCTGCAGCAGCCACGCCACCGCTGTGCACGTCAGCG
TCTGCGCTTGAGGAGGCGCCAGCGAGAGCGTGAGGGCGCAGGCGCGCTTT
TCTTCCGTGAAGGTCCTGCGGCTGACCCATGTACCTGCTTTGTCAAACCCTG
CATCAGTGCAGGGCTTGGCTGGGGCTTTCCGAGCTGAGCCCACTGCAGCCG
GCCCGGGGCGCTCTGTGGGGCCATGCAGCTGTGGCCTCCGGGAAGCAGTG
GATGGCGTACGCTTCATTGCGGACCACATGCGAAGTGAGGATGATGACCAG
AGTGTGAGGGAGGACTGGAATAACGTTGCCATGGTGATCGACCGCCTGTTC
CTGTGGATCTTTGTCTTTGTCTGTGTCTTTGGGACCGTCGGCATGTTCCCTGC
AGCCTCTCTTCCAGAACTACACTGCCACTACCTTCCCTCCACCCTGACCACT
CAGCTCCCAGCTCCAAGTGA

この発明において、上記のように変異導入する変異の種類を、その変異導入部位

に位置するコドンの塩基配列に対応するように工夫することによって、その変異導入部位に新たに酵素部位を出現させることができる。

[0048] 例えば、Chrna4については、879-880insTTAを変異導入することにより、制限酵素 Tru9 I (MseI) による切断部位 (T ↓ TAA) が出現する。また、Chrb2については、V287LもしくはV287Mを導入することにより、制限酵素 Hinf If による切断部位 (G ↓ ANT G) が出現する。なお、矢印(↓)は切断箇所を示している。ただし、制限酵素の種類や切断部位などはこれらに限定されるものではなく、変異導入を変えることにより適宜選択することができる。

[0049] この発明において、上記のcDNAに所定の塩基配列からなるヌクレオチドがプローブとして導入される。導入するプローブは、元の塩基配列とは塩基配列は全くもしくはほぼ全て異なるが、元のアミノ酸配列が同一になるように工夫したヌクレオチドであって、その塩基の数は、一般的には、約30bp～200bp、好ましくは約50bp～150bp、より好ましくは約60bp～120bpであるのがよい。これらヌクレオチドは、DNA合成法などの当該技術分野で慣用されている常法に従って調製することができる。

[0050] 具体的には、例えば、Chrna4 遺伝子の変異導入cDNAに対しては、そのcDNAのc.104 番目から第 c.221 番目までの塩基配列と、その塩基配列は異なるが、アミノ酸配列が同一になるように、下記塩基配列 (118 bp) を有するヌクレオチドをプローブとして作成することができる。

[0051] (配列番号23)

```
GGGCTCACGCCGAAGAACGCCTGCTCAAAGGCTGTTTTCTGGCTATAATA  
AATGGTCCCGCCCCGTGGCTAACATTTCCGACGTCGTGCTGGTGCGGTTTCG  
GATTATCTATCGCTCA
```

同様にして、例えば、Chrb2 の変異導入cDNAに対しては、そのcDNAのc.1171 番目から第 c.1232 番目までの塩基配列と、その塩基配列は異なるが、アミノ酸配列が同一になるように、下記塩基配列 (62 bp) を有するヌクレオチドをプローブとして作成することができる。

(配列番号24)

```
AACCCCGCCTCCGTCCAAGGACTCGCCGGCGCCTTTAGGGCCGAACCTACC
```

GCCGCTGGCCC

次に、上記のように作成したヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションした後、プローブを制限酵素部位を用いて常法に従って導入する。例えば、配列番号22で表されるプローブを上記塩基配列を有するChrna4の変異導入 cDNA の所定の部位に、pCRII-TOPO ベクター等の適当なベクターのSma IとBpu1102 I (別名Esp I または Cel II) 部位に当該技術分野において慣用されているプローブ導入法によって挿入することができる。また、例えば、配列番号22で表されるプローブを、上記塩基配列を有するChrn2の変異導入 cDNA の所定の部位に、pCRII-TOPO ベクター等の適当なベクターの制限酵素部位の Hinc I とSma Iに当該技術分野において慣用されているプローブ導入法によって挿入することができる。各ステップでシーケンスを行い、塩基配列の確認を行った。

[0052] ラットChrna4 の変異cDNA (S282F)(なお、ヒトではS280Fである。)に配列番号23で表されるプローブを導入したプローブ導入変異遺伝子cDNA (S282FPB) の塩基配列(配列番号25)は下記の通りである。なお、c.845C>T と c.846G>Cの変異により、四角(□)で囲ったように844番目から846番目のTCG が TTC に変異され、またプローブ部分は、下線で示すように、その塩基数が118 bpで、104番目から221番目に位置している。

(配列番号25)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCGCTGCTGCTACTGCCGCT
 GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
 CCGGGCTCACGCCGAAGAACGCCTGCTCAAAAGGCTGTTTTCTGGCTATAA
TAAATGGTCCCGCCCCGTGGCTAACATTTCCGACGTCGTGCTGGTGC GGTT
CGGATTATCTATCGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
 GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
 GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
 CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
 AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
 GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT

CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTTCGTGCTGCTTTCTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCATCCC
GCTCATCGGGCAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTACCCCTCTCCAT
CGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCACACA
CACGATGCCCCGCCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCGCCT
CCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACTTAT
TGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCCTGT
GGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACCTGC
CCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTACGTG
CAGGTCACCCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGAGAA
GGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAGCAG
TGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGTGCC
CAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGAGTAT
CCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCAAGCC
CACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCGTGTC
AGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTGTGTC
CCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAACACCT
GCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACATTGC
AGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACTGGAA
ATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCATTGTC
TGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGCTTGC
TGA

ラットChrna4の変異cDNA (S286L)(なお、ヒトではS284Lである。)に配列番号23で表されるプローブを導入したプローブ導入変異遺伝子cDNA (S284LPB) の塩基配列(配列番号26)は下記の通りである。なお、c.856T>C と c.857C>Tの変異により、四角(□)で囲ったように856番目から858番目のTCT が CTT に変異され、またプローブ部分は、下線で示すように、塩基数が118 bpで、104番目から221番目に位置している。

(配列番号26)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCTCACGCCGAAGAACGCCTGCTCAAAAGGCTGTTTTCTGGCTATAA
TAAATGGTCCCGCCCCGTGGCTAACATTTCCGACGTCGTGCTGGTGCGGTT
CGGATTATCTATCGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT
CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTCTTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTCATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCATCCC
GCTCATCGGCGAGTACCTCCTCTTACCATGATCTTCGTCACCCTCTCCAT
CGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCACACA
CACGATGCCCCGCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCGCCT

CCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACTTAT
TGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCCTGT
GGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACCTGC
CCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTACGTG
CAGGTCACCCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGAGAA
GGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAGCAG
TGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGTGCC
CAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGAGTAT
CCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCAAGCC
CACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCGTGTC
AGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTGTGTC
CCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAACACCT
GCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACATTGC
AGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACTGGAA
ATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCATTGTC
TGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGCTTGC
TGA

ラットChrana4 の変異cDNA (879-880insL)に配列番号23で表されるプローブを導入したプローブ導入変異遺伝子cDNA (S282FPB) の塩基配列(配列番号27)は下記の通りである。なお、c.845C>T と c.846G>Cの変異により、四角(□)で囲ったように844番目から846番目のTCG が TTC に変異され、またプローブ部分は、下線で示すように、118 bpで、104番目から221番目に位置している。ただし、ヒトではS280Fである。

(配列番号27)

ATGGCCAATTCGGGCACCGGGGCGCCGCCGCGCTGCTGCTACTGCCGCT
GCTGCTGCTCCTAGGGACCGGCCTCTTGCCTGCTAGCAGCCACATAGAGAC
CCGGGCTCACGCCGAAGAACGCCTGCTCAAAAGGCTGTTTTCTGGCTATAA
TAAATGGTCCCGCCCCGTGGCTAACATTTCCGACGTCGTGCTGGTGC GGTT

CGGATTATCTATCGCTCAGCTCATTGACGTGGACGAGAAGAACCAGATGAT
GACAACCAACGTGTGGGTGAAGCAGGAGTGGCACGACTACAAGCTGCGCTG
GGACCCTGGTGACTACGAGAATGTCACCTCCATCCGCATCCCCTCTGAACT
CATCTGGAGGCCTGACATCGTCCTCTACAACAATGCGGATGGAGACTTTGC
AGTCACCCACCTGACCAAGGCCACCTGTTCTATGACGGAAGGGTGCAGTG
GACACCCCCAGCCATCTATAAGAGCTCCTGCAGCATCGACGTCACCTTCTT
CCCCTTTGACCAGCAGAACTGTACCATGAAGTTTGGATCCTGGACCTACGA
CAAGGCCAAGATTGACTTAGTGAGCATGCATAGCCGTGTGGACCAACTGGA
CTTCTGGGAAAGTGGGGAGTGGGTCATCGTGGATGCTGTGGGCACCTACAA
CACCAGGAAGTACGAGTGCTGTGCCGAGATCTATCCTGACATCACCTATGC
CTTCATCATCCGACGGCTGCCGCTATTCTACACCATCAACCTCATCATCCC
GTGCCTGCTCATCTCCTGTCTCACCGTGCTGGTCTTCTATCTGCCTTCAGA
GTGTGGCGAGAAGGTCACACTGTGCATCTCGGTGCTGCTTTCTCTCACCGT
CTTCCTGCTGCTGCTAATCACCGAGATCATCCCGTCCACCTCGCTGGTCAT
CCCGCTCATCGGCAGTACCTCCTCTTCACCATGATCTTCGTCACCCTCTC
CATCGTCATCACGGTCTTCGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCACGCAC
ACACACGATGCCCCGCTGGGTGCGTAGAGTCTTCCTGGACATCGTGCCTCG
CCTCCTCTTCATGAAGCGCCCCTCTGTGGTCAAAGACAACCTGCCGGAGACT
TATTGAGTCCATGCACAAGATGGCCAACGCCCCCGCTTCTGGCCAGAGCC
TGTGGGCGAGCCCGGCATCTTGAGTGACATCTGCAACCAAGGTCTGTCACC
TGCCCCAACTTTCTGCAACCCCACGGACACAGCAGTCGAGACCCAGCCTAC
GTGCAGGTCACCCCCCTTGAGGTCCCTGACTTGAAGACATCAGAGGTTGA
GAAGGCCAGTCCCTGTCCATCGCCTGGCTCCTGTCCTCCACCCAAGAGCAG
CAGTGGGGCTCCAATGCTCATCAAAGCCAGGTCCCTGAGTGTCCAGCATGT
GCCAGCTCCCAAGAAGCAGCAGAAGATGGCATCCGCTGCCGGTCTCGGA
GTATCCAGTACTGTGTTTCCCAAGATGGAGCTGCCTCCCTGGCTGACAGCA
AGCCCACCAGCTCCCCGACCTCCCTGAAGGCCCGTCCATCCCAGCTTCCCG
TGTCAGACCAGGCCTCTCCATGCAAATGCACATGCAAGGAACCATCTCCTG

TGTCCCCAGTCACTGTGCTCAAGGCGGGAGGCACCAAAGCACCTCCCCAAC
ACCTGCCCCCTGTCACCAGCCCTGACACGGGCAGTAGAAGGCGTCCAGTACA
TTGCAGACCACCTCAAGGCAGAAGACACTGACTTCTCGGTGAAGGAGGACT
GGAAATACGTGGCCATGGTCATTGACCGAATCTTCCTCTGGATGTTTCATCAT
TGTCTGCCTTCTGGGCACTGTGGGACTCTTCCTGCCTCCCTGGCTGGCTGC
TTGCTGA

ラットChrnb2 の変異cDNA に配列番号24で表されるプローブを導入したプローブ
導入変異遺伝子cDNA (V286L) の塩基配列(配列番号28)は下記の通りである。

(配列番号28)

GGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGCGCTGTTTCAGCTTCAGCCTTCTTTGGCT
GTGCTCAGGGGTTTTGGGAACTGACACAGAGGAGCGGCTAGTGGAGCATCT
CTTAGATCCCTCCCGCTATAACAAGCTGATTCGTCCAGCTACTAACGGCTC
TGAGCTGGTGACTGTACAGCTCATGGTATCATTGGCTCAGCTCATTAGTGTG
CACGAGCGGGAGCAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGACCCAGGAGTGG
GAAGATTACCGCCTCACATGGAAGCCTGAGGACTTCGACAATATGAAGAAA
GTCCGGCTCCCTTCCAAACACATCTGGCTCCCAGATGTGGTTCTATAACAAC
AATGCTGACGGCATGTACGAAGTCTCCTTCTATTCCAATGCTGTGGTCTCCT
ATGATGGCAGCATCTTTTGGCTACCACCTGCCATCTACAAGAGTGCATGCA
AGATTGAGGTGAAGCACTTCCCATTTGACCAGCAGAATTGCACCATGAAGTT
TCGCTCATGGACCTACGACCGTACTGAGATTGACCTGGTGCTCAAAAGTGA
TGTGGCCAGTCTGGATGACTTCACACCCAGCGGGGAGTGGGACATCATCGC
ACTGCCAGGCCGACGCAACGAGAACCCAGACGACTCCACCTATGTGGACAT
CACCTATGACTTCATCATTCGTGCGAAACCACTCTTCTACACTATCAACCTC
ATCATCCCCTGCGTACTCATCACCTCGCTGGCCATCCTGGTCTTCTACCTG
CCCTCAGACTGTGGTGAAAAGATGACACTTTGTATTTCTGTGCTGCTAGCAC
TCACGGTGTTCTGCTGCTCATCTCCAAGATTCTGCCTCCCACCTCCCTCG
ATGTACCGCTGGTGGGCAAGTACCTCATGTTTACCATGGTGCTAGTCACCTT
CTCCATCGTCACCAGCGTGTGTGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCCTAC

CACGCACACCATGGCCCCCTGGGTCAAGGTGGTCTTCCTGGAGAAGCTGCC
CACCCCTGCTCTTCCTGCAGCAGCCACGCCACCGCTGTGCACGTCAGCGTCT
GCGCTTGAGGAGGCGCCAGCGAGAGCGTGAGGGCGCAGGCGCGCTTTTCT
TCCGTGAAGGTCCTGCGGCTGACCCATGTACCTGCTTTGTCAAACCCCGCCT
CCGTCCAAGGACTCGCCGGCGCCTTTAGGGCCGAACCTACCGCCGCTGGC
CCGGGGCGCTCTGTGGGGCCATGCAGCTGTGGCCTCCGGGAAGCAGTGGA
TGCGGTACGCTTCATTGCGGACCACATGCGAAGTGAGGATGATGACCAGAG
TGTGAGGGAGGACTGGAAATACGTTGCCATGGTGATCGACCGCCTGTTCT
GTGGATCTTTGTCTTTGTCTGTGTCTTTGGGACCGTCGGCATGTTCTCTGCAG
CCTCTCTTCCAGAACTACACTGCCACTACCTTCCTCCACCCTGACCACTCA
GCTCCCAGCTCCAAGTGA

ラットChrn2の変異cDNA に配列番号24で表されるプローブを導入したプローブ
導入変異遺伝子cDNA (V286M) の塩基配列(配列番号29)は下記の通りである。

(配列番号29)

TGGCCGGGCACTCCAACCTCAATGGCGCTGTTTCAGCTTCAGCCTTCTTTGGC
TGTGCTCAGGGGTTTTGGGAACTGACACAGAGGAGCGGCTAGTGGAGCATC
TCTTAGATCCCTCCCGCTATAACAAGCTGATTCGTCCAGCTACTAACGGCT
CTGAGCTGGTGACTGTACAGCTCATGGTATCATTGGCTCAGCTCATTAGTGT
GCACGAGCGGGAGCAGATCATGACCACCAATGTCTGGCTGACCCAGGAGTG
GGAAGATTACCGCCTCACATGGAAGCCTGAGGACTTCGACAATATGAAGAA
AGTCCGGCTCCCTTCCAAACACATCTGGCTCCCAGATGTGGTTCTATACAA
CAATGCTGACGGCATGTACGAAGTCTCCTTCTATTCCAATGCTGTGGTCTCC
TATGATGGCAGCATCTTTTGGCTACCACCTGCCATCTACAAGAGTGCATGC
AAGATTGAGGTGAAGCACTTCCCATTTGACCAGCAGAATTGCACCATGAAG
TTTCGCTCATGGACCTACGACCGTACTGAGATTGACCTGGTGCTCAAAGT
GATGTGGCCAGTCTGGATGACTTCACACCCAGCGGGGAGTGGGACATCATC
GCACTGCCAGGCCGACGCAACGAGAACCCAGACGACTCCACCTATGTGGAC
ATCACCTATGACTTCATCATTTCGTCGCAAACCACTCTTCTACACTATCAACC

TCATCATCCCCTGCGTACTCATCACCTCGCTGGCCATCCTGGTCTTCTACC
TGCCCTCAGACTGTGGTGAAAAGATGACACTTTGTATTTCTGTGCTGCTAGC
ACTCACGGTGTTCCCTGCTGCTCATCTCCAAGATTATGCCTCCCACCTCCCT
CGATGTACCGCTGGTGGGCAAGTACCTCATGTTTACCATGGTGCTAGTCAC
CTTCTCCATCGTCACCAGCGTGTGTGTGCTCAATGTGCACCACCGCTCGCC
TACCACGCACACCATGGCCCCCTGGGTCAAGGTGGTCTTCCTGGAGAAGCT
GCCACCCCTGCTCTTCCTGCAGCAGCCACGCCACCGCTGTGCACGTCAGCG
TCTGCGCTTGAGGAGGCGCCAGCGAGAGCGTGAGGGCGCAGGCGCGCTTT
TCTTCCGTGAAGGTCCTGCGGCTGACCCATGTACCTGCTTTGTCAAACCCCG
CCTCCGTCCAAGGACTCGCCGGCGCCTTTAGGGCCGAACCTACCGCCGCT
GGCCCCGGGGCGCTCTGTGGGGCCATGCAGCTGTGGCCTCCGGGAAGCAGT
GGATGGCGTACGCTTCATTGCGGACCACATGCGAAGTGAGGATGATGACCA
GAGTGTGAGGGAGGACTGGAAATACGTTGCCATGGTGATCGACCGCCTGTT
CCTGTGGATCTTTGTCTTTGTCTGTGTCTTTGGGACCGTCGGCATGTTCTCG
CAGCCTCTCTTCCAGAACTACACTGCCACTACCTTCCTCCACCCTGACCAC
TCAGCTCCCAGCTCCAAGTGA

上記のようにして作製したラット上記変異とプローブを導入したラットChrna4またはChrb2のcDNAを用いて、この発明に係るてんかん非ヒト哺乳動物はそれ自体公知の非ヒト哺乳動物作出方法によって常法に従って作出することができる。かかる非ヒト哺乳動物の作出方法としては、目的遺伝子を動物個体に導入するトランスジェニック動物の作出方法、標的遺伝子と目的導入遺伝子とを組換えた遺伝子置換動物の作出方法、目的遺伝子を改変した細胞の核を用いたクローン個体の作製方法などが挙げられる。

[0053] 本明細書では、目的遺伝子である上記変異遺伝子のcDNAを、例としてラットなどの動物個体の受精卵に導入するトランスジェニック動物の作出方法を挙げて説明する。

[0054] 先ず、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンニコチン性アセチルコリン受容体の α 4サブユニット(CHRNA4)遺伝子もしくは β 2サブユニット(CH

RNB2) 遺伝子の相同遺伝子に該変異を持った変異遺伝子をコードするDNAを有する発現ベクターを作製する。

- [0055] つまり、非ヒト哺乳動物のニューロンニコチン性アセチルコリン受容体 α 4サブユニット (Chrna4) 遺伝子もしくは β 2サブユニット (Chrn2) 遺伝子を含むDNAを単離し、このDNA断片に外来遺伝子などを挿入することによって発現ベクターを構築することができる。かかる外来遺伝子としては、マーカー遺伝子が好ましく、特に、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには発現ベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくこともできる。これにより、非相同組換えを起こした細胞株を排除することができる。また、発現ベクターにジフテリアトキシンAフラグメント (DT-A) 遺伝子などを結合させると、非相同的な組換えを起こした細胞株を排除することができる。発現ベクターとしては、例えば、pCI-neo、pMCIneo、pXT1、pSG5、pcDNA3.neo、pLITMUS28、pcDNA1amp、pcDNA3などが使用される。
- [0056] 上記DNAは、そのDNAを適当なプロモーターの下流に連結した発現ベクターを導入遺伝子として非ヒト哺乳動物に導入するのが好ましい。またプロモーターとしては、上記受容体サブユニットをコードするDNAを導入する非ヒト哺乳動物の細胞内で転写を開始することができるプロモーターであればいずれも用いることができ、例えば、シミアンウイルス40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、ヒトサイトメガロウイルス、レトロウイルス等のウイルス由来遺伝子などのプロモーターが挙げられる。
- [0057] また、この発明で使用する発現ベクターは、非ヒト動物のニューロンニコチン性アセチルコリン受容体の α 4サブユニット (Chrna2) 遺伝子もしくは β 2サブユニット (Chrn2) の変異遺伝子をコードするDNAの下流に、mRNAの3'末端のポリアデニル化に必要なポリアデニル化シグナルを有していることが好ましい。ポリアデニル化シグナルとしては、例えば、上記のウイルス由来等の各遺伝子に含まれるSV40の後期遺伝子または初期遺伝子等のポリアデニル化シグナルなどが挙げられる。その他、発現ベクターには、目的遺伝子をさらに高発現させるために、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、イントロンの一部をプロモーター領域の5'上流、プロモ-

ター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結してもよい。

- [0058] この発明においては、例えば、上記変異とプローブを導入したラット変異Chrna4またはChrb2のcDNAを発現ベクターに制限酵素部位XhoIとNotIを用いて移行させた後、制限酵素SnaBIとNaeIで切断することができる。例えば、ラット変異Chrna4のcDNAをpCI-neoベクター由来のPDGFプロモーターを持つ発現ベクターに移行する場合には、制限酵素部位XhoIとNotIを用いて移行させ、制限酵素SnaBIとNaeIで切断することができる。また、ラットChrb2のcDNAを移行する場合には、制限酵素部位XhoIとSalIを用いて移行させ、制限酵素SnaBIとDraIIIで切断することができる。これによって、PDGFプロモーター、ラット変異Chrna4またはChrb2のcDNAならびにpoly A部分からなる断片をDNA構築物としてゲル切り出しにより単離・精製することができる。
- [0059] この発明においては、例えば、上記のようにして単離・精製したDNA構築物などを非ヒト哺乳動物の分化全能性細胞に導入することによって非ヒト哺乳動物を作出することができる。使用できる分化全能性細胞としては、例えば、受精卵、初期胚、胚性幹細胞などが使用できる。DNA構築物を導入する受精卵は、例えば、性腺刺激ホルモン(PMS)などの排卵誘発剤を腹腔内投与し、雌動物に過剰排卵を誘発させてDNA構築物の導入可能な受精卵を回収し、精管結紮などにより去勢した雄マウスと交配させた偽妊娠雌動物の卵管を摘出して、顕微鏡下で採取することによって得ることができる。
- [0060] 次に、得られた受精卵にDNA構築物を導入する。構築物を受精卵に導入する手段としては、種々の方法が知られているが、トランスジェニック動物個体の作出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、マイクロインジェクション法が好ましい。このように変異遺伝子を注入した受精卵は、仮親の卵管に移植し、個体まで発生させ、体の一部(例えば、尾部先端等)の体細胞からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入した遺伝子の存在を確認する。このように体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。
- [0061] 上記によって導入遺伝子の存在が確認された個体(ヘテロ接合体)を初代(Founder:F0)とすれば、導入遺伝子はその子(F1)の50%に伝達される。さらに、このF1個体

の雌雄を交配させることにより、2倍体染色体の両方に導入遺伝子を有する個体(F2)を作出することができる。

[0062] これに対して、この発明においててんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出に用いるトランスジェニック方法は、内在性遺伝子(Chrna4遺伝子またはChrn2遺伝子)は正常のままの状態、新たにその染色体DNAの任意の位置に変異型Chrna4またはChrn2をコードする変異遺伝子を導入する。このため、この発明のてんかんモデル動物では、正常なChrna4またはChrn2と変異型Chrna4またはChrn2とがそれぞれ共に産生されている。ニューロンニコチン性アセチルコリン受容体は、イオンチャンネル(α サブユニット2個、 β サブユニット3個)として機能するタンパク質であるが、このようなイオンチャンネルはいずれかのサブユニットが変異していればチャンネル機能が変更される。従って、この発明のように、正常サブユニットと変異サブユニットを同時に発現させることがヒト型てんかん発作を呈するモデル動物として適切であると考えられる。

[0063] この発明のてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、後記の実施例に示すように、ヒト染色体優性夜間前頭葉てんかんと同様に、睡眠中にてんかん発作を自然発症するという優れた特性を有している。

[0064] なお、目的遺伝子が全ての細胞の染色体上に組み込まれた個体の選択は、通常は、個体を構成する血液組織、上皮組織などの組織の一部からDNAを調製し、そのDNAをシーケンスして、その導入遺伝子が存在することをDNAレベルで確認することによって行われる。しかし、このようにDNAをシーケンスしてかかる組換え個体の選択をするには、手間も時間も、また費用も掛かる複雑な仕事を行う必要がある。

[0065] つまり、遺伝子異常を有する疾患モデル動物を作出する場合、相同組換え体を正確に判別する必要がある。従来の疾患モデル動物の作出法では、組換え体を判別するために、その個体の遺伝子の1部をシーケンスする必要があり、かつその導入遺伝子のmRNAを発現する必要があった。しかしながら、その導入遺伝子のmRNAをRT-PCRやin situ hybridizationなどで発現させるのは容易ではない。

[0066] そこで、この発明においては、上記のように変異遺伝子を変異導入するとともに、その変異遺伝子の1部をプローブと置換することによって組換え体の識別を容易に行うことができるように工夫をしている。また、上記変異導入によって新たな制限酵素切断

部位を出現させる場合にも、組換え体の識別を容易に行うことができる。なお、このアプローチは、下記に説明する具体的態様に限定的に適用されるばかりではなく、遺伝子変異や制限酵素などの種類に関係なくあらゆる変異導入に包括的に適用できるものと理解されるべきである。また、この発明においては、このcDNAクローンの部位に部位特異的に導入する変異の種類は特に限定されるものではない。

[0067] つまり、この発明では、かかる組換え個体の選択を容易に行えるように、前述したように、非ヒト動物のニューロンニコチン性アセチルコリン受容体の α 4サブユニット(Chrna4) 遺伝子もしくは β 2サブユニット(Chrn2) 遺伝子をコードするDNAに、例えば、S280L、S284L、S291-292L、V287L、V287M などの変異を導入して新しく制限酵素切断部位を出現させている。このように新しい制限酵素切断部位を出現させることによって、組換え体の作出に際して、組換え体の識別を容易にすることができる。

[0068] この発明においては、作成した変異導入 cDNA の1部の塩基配列を、その塩基配列とは実質的には全く異なるが、アミノ酸配列が同一になる塩基配列からなるプローブで置換して元の塩基配列と同一の部位に導入しているので、その導入したプローブの制限酵素を用いることによって、組換え個体を容易に識別することができるばかりではなく、組換え遺伝子から発現する mRNA をラット本来の Chrna4 mRNA または Chrn2 mRNA と区別して、RT-PCR や in situ hybridization などによって容易に検出することができる。

[0069] また、例えば、ニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4の相同遺伝子Chrn2に対して変異(c.856G>C)または(c.856G>A) 導入することによって、制限酵素切断部位Hinf Iが出現することから、この切断部位を含む領域を制限酵素Hinf Iを用いてPCR-RFLP(制限酵素断片長多型)法などにより判別することができる。つまり、目的とする相同組換えが起こっていない個体は、Hinf I部位を有していないことになるから、制限酵素Hinf Iでは切断が起こらないのに対して、目的とする相同組換えが起こっている個体は、Hinf I部位を有しているから、制限酵素Hinf Iで切断されることになる。したがって、この発明において、ニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4の相同遺伝子Chrna4または β 4サブユニットCHRNA4の相同遺伝子Chrn2に対して制限酵素切断部位を出現させるように変異

導入することにより、組換え体を容易に識別することができる。

[0070] なお、ここで使用されるPCR-RFLP法は、それ自体周知の手法であって、この方法によって、対象となる部位をPCRにより増幅し、増幅産物を所定の制限酵素、例えば、True9IやHinf Iなどの制限酵素で消化し、消化後のDNA断片のサイズを電気泳動等により、その制限酵素の切断部位の存否を調べることができる。

[0071] 次に、この発明を実施例により更に詳細に説明するが、この発明は下記実施例によって一切限定されるものではなく、また下記実施例はこの発明を具体的に説明するためにだけ例示的に記載するものであって、この発明をいかなる意味においても限定する意図で記載するものではないと理解されるべきである。

実施例 1

[0072] まず、Rat Brain QUICK-Clone cDNA (CLONTECH; Mountain View, CA) をテンプレートとして既存のラット Chrna4 の cDNA 配列を元に設計した2つのプライマー、つまり、フォワードプライマー (BN-Rat CHRNA4 cDNA-F):

AGATCTCGCGAAGCTTCACCATGGCCAATTCGGGCACCGG (40mer)(配列番号3)

と、リバースプライマー (Rat CHRNA4 cDNA-BX-R):

AGATCTAGATCAGCAAGCAGCCAGCCAGGGAGGCAGGA (38mer) (配列番号4)

とによりPCRを行った。得られたPCR産物を精製し、pCRII-TOPOベクター(Invitrogen; Carlsbad, CA) にサブクローニングした。得られたクローンをシーケンスし、Chrna4 の cDNA の塩基配列を確認した。なお、ラット塩基配列情報はアクセッション番号L31620 (NCBI) として登録されている。

[0073] 得られたクローンに QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE; La Jolla, CA) を用いて変異の導入を行った。まず、r845T846C-sen: CACACTGTG CATCTTCGTGCTGCTTTCTC (29mer) (配列番号7) と r845T846C-ant: GAGAA GCAGCACGAAGATGCACAGTGTG (29mer) (配列番号8) を用いて、cDNA 塩基配列845番のCをTに、また846番のGをCに変異させた。得られた変異cDNAの塩基配列は配列番号9に表されるとおりである。これによりヒトニューロンアセチルコリン受

容体 α 4サブユニットと相同のアミノ酸残基p.282番のSerがPheに変異した。

- [0074] このように作成した変異導入のcDNAの c.104からc.221に、この部位と同じアミノ酸配列となるが、元の塩基配列とは全く異なる下記塩基配列を有する118bpのヌクレオチドからなるプローブ(配列番号23)を作成し導入した。

(配列番号23)GGGCTCACGCCGAAGAACGCCTGCTCAAAAGGCTGTTTTCTG
GCTATAATAAATGGTCCCGCCCCGTGGCTAACATTTCCGACGTCGTGCTGG
TGCGGTTCCGATTATCTATCGCTCA

上記のようにしてプローブを導入した変異導入cDNAをハイブリダイゼーションの後、pCRII-TOPO ベクターに挿入中の Chrna4 の cDNA を制限酵素部位のSmaIとBpu1102Iを用いて挿入を行った。各ステップでシーケンスを行い、塩基配列の確認をおこなった。

- [0075] さらに、該当変異(S286L)を有したラット Chrna4 のcDNAを、pCI-neo ベクター由来のPDGF プロモーターを持つ発現ベクターに制限酵素部位XhoIとNotIを用いて移行させたのち、制限酵素SnaBIとNaeIで切断した。PDGF プロモーターとラット Chrna4 のcDNAならびにpoly A部分を有す断端をゲル切り出しにより単離、精製した。この単離・精製したDNAを受精卵に顕微注入し、状態の良好な200個以上の卵を受胎雌動物の卵管に移植し、自然分娩する方法によって組換え体を作成した。

実施例 2

- [0076] 実施例1と同様にして、r856C857T-sen:CGGTGCTGCTTCTTCTCACCGTCTTCCTG (29mer) (配列番号10)とr856C857T-ant:CAGGAAGACGGTGAGAAGAAGCAGCACCG (29mer) (配列番号11)を用いて、cDNA塩基配列856番のTをCに、857番のCをTに変異させた。得られた変異cDNAの塩基配列は配列番号12に表されたとおりである。これによりヒトニューロンアセチルコリン受容体 α 4サブユニットと相同のアミノ酸残基p.286番のSerがLeuに変異した。

このように作成した変異導入の cDNA の c.104からc.221に、実施例1と同様に、配列番号23で表される118bpのヌクレオチドからなるプローブを作成し導入した。

- [0077] 上記のようにしてプローブを導入した変異導入cDNAを使用して、実施例1と同様にして組換え体を作成した。

実施例 3

[0078] 実施例1と同様にして、センスプライマーとしてのrCHRNA-878insGCT-sen:GTCTTCCTGCTGCTGCTCATCACCGAGATC (30mer) (配列番号13)とアンチセンスプライマーとしてのrCHRNA-878insGCT -ant:GATCTCGGTGATGAGCAGCAGCAGGAAGAC (30mer) (配列番号14)を用いて、cDNA塩基配列878番と879番目の間にGCTを挿入した。得られた変異cDNAの塩基配列は配列番号15に表されるとおりである。これによりヒトニューロンアセチルコリン受容体 α 4サブユニットと相同のアミノ酸残基p.293番のLeuとp.294番のIleの間にLeuが挿入された。

[0079] このようにして作成した変異導入の cDNAを使用して、実施例1と同様にして、組換え体を作成した。

実施例 4

[0080] PCRクローニングで単離したラットChrn2に、変異導入法により、c.856G>Cとc.856G>Aを導入した。つまり、Rat Brain QUICK-Clone cDNA (CLONTECH Mountain View, CA) をテンプレートとして既存のラットChrn2のcDNA配列を元に設計した二つのプライマー(BN-Rat CHRNB2 cDNA-F:AGATCTCGCGACATGGCCGGGCACTC CAACTCAATGGCGCT (41mer)(配列番号5)とRat CHRNB2 cDNA-CB-R:ATC GATGGATCCTCACTTGGAGCTGGGAGCTGAGTGGTCA (40mer) (配列番号6))によりPCRを行った。得られたPCR産物を生成しpCRII-TOPO ベクター(Invitrogen Carlsbad , CA) にサブクローニングした。得られたクローンをシーケンシングし、Chrn2のcDNAの塩基配列を確認した。このラット塩基配列情報はアクセッション番号NM_019297 (NCBI)として登録されている。

[0081] 得られたクローンにQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE, La Jolla, CA)を用いて変異の導入を行った。まず、Rat CHRNB2 m286V/M-F:CTC ATCTCCAAGATTATGCCTCCCACCTCC (30mer)(配列番号17)とRat CHRNB2 m286V/M-R:GGAGGTGGGAGGCATAATCTTGGAGATGAG (30mer)(配列番号18)を用いて、cDNA塩基配列856番のGをCに変異させた。これによりヒトのニューロンアセチルコリン受容体 β 2サブユニットと相同のアミノ酸残基p.286番のValがLeuに変異した (β にしたのは特許庁のオンライン出願での規則によります)。

[0082] この変異導入の際に、c.856G>Cの導入により、制限酵素切断部位がHinf Iが出現し、組換え体作出時、組換え体の識別を容易にできるよう考案した。

[0083] 作成した変異導入のcDNAのc.1171からc.1232に、この部位とおなじアミノ酸配列となるが、基の塩基配列とは全く異なるプローブ(配列番号24)を導入した。

(配列番号24)

```
AACCCCGCCTCCGTCCAAGGACTCGCCGGCGCCTTTAGGGCCGAACCTACC
GCCGCTGGCCC
```

なお、この62 bpのヌクレオチドを作成し、ハイブリダイゼーションののち、pCRII-TOP Oベクターに挿入中のChrn2のcDNAを制限酵素部位のHinc IIとSma Iを用いて挿入を行った。各ステップでシーケンスを行い、塩基配列の確認をおこなった。

[0084] さらに、該当変異とプローブを有したラットChrn2のcDNA二種類を、pCI-neo ベクター由来のPDGFプロモーターを持つ発現ベクターに制限酵素部位Xho IとSal Iを用いて移行させたのち、制限酵素SnaBIとDraIIIで切断した。PDGFプロモーターとラットChrn2のcDNA並びにpoly A部分を有す断端をゲル切り出しにより単離、精製した。この単離したDNAを受精卵に顕微注入し、状態の良好な200個以上の卵を受胎雌動物の卵管に移植し、自然分娩する方法によって組換え体を作成した。

実施例 5

[0085] 実施例4と同様に、Rat CHRNB2 m286V/L-F:CTCATCTCCAAGATTCTGCCTCCACCTCC (30mer)(配列番号20)とRat CHRNB2 m286V/L-R:GGAGGTGGGAGGCAGAATCTTGGAGATGAG (30mer)(配列番号21)を用いて、cDNA塩基配列856番のGをAに変異させた。これによりヒトのニューロンアセチルコリン受容体β2サブユニットと相同のアミノ酸残基p.286番のValがMetに変異した。このようにして得られた変異導入cDNAを用いて、実施例4と同様にして組換え体を作成した。

実施例 6

[0086] てんかんモデルラットの脳波(electroencephalogram: EEG) 測定

8-10週齢のトランスジェニックラット(Chrn2 V287L)に対して脳波(EEG)を測定した。ラットをnembutal(大日本住友製薬株式会社)で麻酔し、脳定位固定装置(SR-5、成重)に固定し、電極をラットの頭蓋骨のbregma からArterial: 2.5 mm, Lateral: 1.5 m

mとArterial: -2.5 mm, Lateral: 2.5 mmに、不関電極はラット鼻骨付近の骨の厚い部分に装着し、歯科用セメントで固定した。脳波測定用のテフロン（登録商標）被覆ステンレス電極を左右大脳半球の前頭葉（ブレグマよりA= 3. mm、L= 0.8 mm）に装着し、歯科用セメントで固定した。不関電極は、小脳部位の上部に埋め込んだ。脳波（EEG）はVideoOption（キッセイコムテック）を用いて、数日間ラットをチャンバー内に入れて自由運動条件下で測定を行い、脳波解析はSleepSign（キッセイコムテック）を用いて行った。

[0087] 脳波測定結果を図5に示す。図中、異常脳波部分を記号Aおよび記号Bで示し、その記号Aで示した異常脳波部分の拡大図を図6、また記号Bで示した異常脳波部分を図7に示す。この結果から、この発明に係るラットはてんかんモデルラットとして利用できることが確認された。

産業上の利用可能性

[0088] この発明に係るてんかんモデル非ヒト哺乳動物は、ヒトのてんかん遺伝子異常と同じ遺伝子異常を有するてんかんモデル非ヒト哺乳動物であるから、このモデル動物を使用することによりヒトのてんかん発作と同等のけいれん発作を誘発させて調べることができるので、てんかんの治療薬の研究・開発に利用することができる。

請求の範囲

- [1] ヒトのてんかん遺伝子異常と同じ遺伝子異常を有するてんかんモデル非ヒト哺乳動物であって、該てんかんモデル非ヒト哺乳動物が、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の $\alpha 4$ サブユニットCHRNA4または $\beta 2$ サブユニットCHRN2の非ヒト哺乳動物のChrna4またはChrn2に遺伝子変異が変異導入されているとともに、元来の塩基配列とは異なる塩基配列を有するが、アミノ酸配列が同一になる塩基配列を有するプローブが導入された変異遺伝子を有することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [2] 請求項1に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記変異遺伝子が前記変異導入により新たな制限酵素切断部位が出現していることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [3] 請求項1または2に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記 Chrna4 が、変異導入によってその cDNA の845番のC(シトシン)をT(チミン) (c.845 C>T) および846番のG(グアニン)をC(シトシン) (c.846G>C) に変異導入した配列番号9で表される塩基配列を有することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [4] 請求項1、2または3に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記変異導入によって前記 Chrna4 の cDNA にc.845T>C および/または c.846G>A の変異導入して、前記 $\alpha 4$ サブユニットCHRNA4の p.282 番と相同のアミノ酸残基 Ser が Phe に置換されていることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [5] 請求項1または2に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記 Chrna4 が、変異導入によってそのcDNA の856番の T(チミン)を C(シトシン)(c.856T>C) および/または857番のC(シトシン)をT(チミン) (c.857C>T) に変異導入した配列番号12で表される塩基配列を有することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [6] 請求項1、2または5に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記変異導入によって非ヒト動物のChrna4にc.856T>Cおよびc.857C>Tを変異導入して、前記 $\alpha 4$ サブユニットCHRNA4のp.286番と相同のアミノ酸残基SerがLeuに置換されていることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [7] 請求項1または2に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記遺伝子が、

変異導入によってそのChrna4にc.878-879insGCTまたはc.879-880insTTAが変異導入された配列番号15または16でそれぞれ表されることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。

- [8] 請求項1、2または7に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記変異導入によって前記Chrna4にc.878-879insGCTまたはc.879-880insTTAが変異導入されて、前記 α 4サブユニットCHRNA4のp.293番と相同のアミノ酸残基Leuとp.294番と相同のアミノ酸残基Ileの間にLeuが挿入されていることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [9] 請求項1または2に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記Chrnb2が、変異導入によってそのcDNAの856番のG(グアニン)がC(シトシン)(c.856G>C)またはA(アデニン)(c.856G>A)に変異導入した配列番号19または22でそれぞれ表される塩基配列を有することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [10] 請求項1、2または9に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記変異導入によって前記Chrnb2にc.856G>Cまたはc.856G>Aが変異導入されて、前記 β 2サブユニットCHRN2のp.286番と相同のアミノ酸残基Valがそれぞれ、LeuまたはMetに置換されていることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [11] 請求項1ないし10のいずれか1項に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物において、前記特定のプローブが配列番号23または24で表される塩基配列からなることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物。
- [12] 請求項1ないし11のいずれか1項に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法であって、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4または β 2サブユニットCHRN2の遺伝子異常に関連する遺伝子変異を非ヒト動物のChrna4またはChrnb2のcDNAに変異導入し、かつ、前記cDNAの塩基配列の一部を、その配列部分とはアミノ配列が同一になるが、塩基配列が異なるプローブで置換して変異遺伝子を作成し、該変異遺伝子を発現ベクターに移行し、該発現ベクターに含まれる該変異遺伝子を受精卵を受胎雌動物に移植することによって組換え非ヒト動物を作出することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。

- [13] 請求項12に記載のとするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法において、前記変異遺伝子に前記変異導入により新たな制限酵素切断部位を出現させることを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。
- [14] 請求項12または13に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法において、前記変異導入によってChrna4のcDNAの845番のC(シトシン)をT(チミン)(c.845 C>T)ならびに/もしくは846番のG(グアニン)をC(シトシン)(c.846G>C)または856番のT(チミン)をC(シトシン)(c.856T>C)ならびに857番のC(シトシン)をT(チミン)(c.857 C>T)に置換または878番と879番との間にコドンGCT(c.879-880insGCT)もしくは879番と880番との間にコドンTTA(c.879-880insTTA)を挿入して変異導入することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。
- [15] 請求項12、13または14に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法において、前記Chrna4のcDNAに c.845 C>T ならびにc.846G>C または c.856T>C ならびにc.857C>T または c.878-879insGCT もしくはc.879-880insTTAをそれぞれ変異導入することによって、前記 α 4サブユニットCHRNA4と相同のアミノ酸残基p.282番のSerをPheまたはアミノ酸残基p.284番のSerをLeuに置換することまたはアミノ酸残基p.293番のLeuとp.294番のIleの間にLeuを挿入して変異導入することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。
- [16] 請求項12または13に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法において、前記変異導入によってChrnb2のcDNAの856番のG(グアニン)をC(シトシン)(c.856 G>C)またはA(アデニン)(c.856G>A)に置換することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。
- [17] 請求項12、13または16に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法において、前記Chrnb2にc.856G>Cまたはc.856G>Aを導入することによって、前記 β 2サブユニットCHRN2と相同のアミノ酸残基p.286番のValをLeuまたはMetにそれぞれ置換することを特徴とするてんかんモデル非ヒト哺乳動物の作出方法。
- [18] 遺伝子の塩基配列に1個または複数個の変異導入がされ、かつ、該遺伝子の塩基配列の1部が、該塩基配列の1部とは、塩基配列は異なるが、同一のアミノ酸配列になるプローブで置換されていることを特徴とする変異遺伝子。

- [19] 請求項18に記載の変異遺伝子において、前記変異導入により出現した新規制限酵素切断部位を有していることを特徴とする変異遺伝子。
- [20] 請求項18または19に記載の変異遺伝子において、前記遺伝子がヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4または β 2サブユニットCHRN2にそれぞれ相同する非ヒト哺乳動物の相同遺伝子Chrna4 またはChrn2であることを特徴とする変異遺伝子。
- [21] 請求項18、19または20に記載の変異遺伝子において、前記Chrna4のcDNAの845番のC(シトシン)がT(チミン)(c.845 C>T)ならびには846番のG(グアニン)がC(シトシン)(c.846G>C)、または856番のT(チミン)がC(シトシン)(c.856T>C)ならびには857番のC(シトシン)がT(チミン)(c.857C>T)、または878番と879番との間にコドンGCT(c.878-879insGCT)もしくは879番と880番との間にコドンTTA(879-880insTTA)が変異導入されていることを特徴とする変異遺伝子。
- [22] 請求項18ないし21のいずれか1項に記載の変異遺伝子において、前記Chrna4のcDNAにc.845 C>Tならびにc.846G>Cまたはc.856T>Cならびにc.857C>Tまたはc.879-880insGCTをそれぞれ変異導入することによって、前記 α 4サブユニットCHRNA4と相同のアミノ酸残基p.280番のSerをPheまたはアミノ酸残基p.284番のSerがLeuに置換されていること、またはc.878-879insGCTもしくはc.879-880insTTAを挿入して変異導入することによって前記 α 4サブユニットCHRNA4と相同のアミノ酸残基p.293番のLeuとp.294番のIleの間にLeuが挿入されていることを特徴とする変異遺伝子。
- [23] 請求項18または19に記載の変異遺伝子において、前記Chrn2のcDNAの856番のG(グアニン)をC(シトシン)(c.856G>C)またはA(アデニン)(c.856G>A)に変異導入されていることを特徴とする変異遺伝子。
- [24] 請求項18、19または23に記載の変異遺伝子において、前記Chrn2にc.856G>Cまたはc.856G>Aを導入することによって、前記 β 2サブユニットCHRN2と相同のアミノ酸残基p.286番のValがLeuまたはMetにそれぞれ変異導入されていることを特徴とする変異遺伝子。
- [25] 請求項18ないし25のいずれか1項に記載の変異遺伝子を、該遺伝子の塩基配列に1個または複数個の変異を導入し、かつ、該塩基配列の1部を、該遺伝子の1部の塩

基配列とは塩基配列が異なるが、同一のアミノ酸配列になるプローブで置換して挿入することを特徴とする変異遺伝子の作成方法。

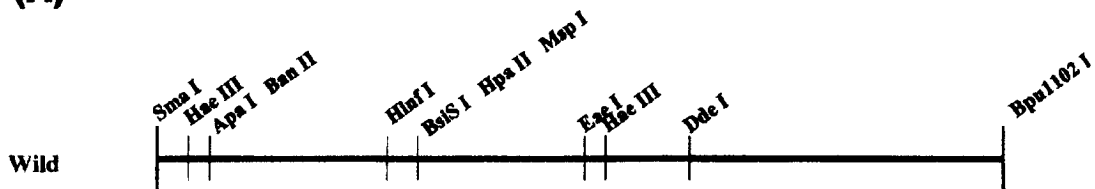
- [26] 請求項25に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記変異導入により新規制限酵素切断部位を出現させることを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [27] 請求項25または26に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記遺伝子がヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんに関連するニューロンアセチルコリン受容体遺伝子の α 4サブユニットCHRNA4または β 2サブユニットCHRN2にそれぞれ相同する非ヒト哺乳動物の相同遺伝子Chrna4 またはChrn2であることを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [28] 請求項25、26または27に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記Chrna4 のcDNAに c.845C>T ならびにc.846G>C または c.856T>C ならびにc.857C>Tまたは c.878-879insGCT もしくはc.879-880insTTAをそれぞれ変異導入することを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [29] 請求項25ないし28のいずれか1項に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記Chrna4のcDNAにc.845C>T ならびにc.846G>C または c.856T>C ならびには c.857C>T または c.879-880insGCT をそれぞれ導入することによって、前記 α 4サブユニットCHRNA4と相同のアミノ酸残基p.282番のSerをPheまたはアミノ酸残基p.284番のSerをLeuに置換することまたはアミノ酸残基p.293番のLeuとp.294番のIleの間にLeuを変異導入することすることを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [30] 請求項25または26に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記Chrn2のcDNAにc.856G>Cまたはc.856G>Aを変異導入することを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [31] 請求項25、26または30に記載の変異遺伝子の作成方法において、前記Chrn2にc.856G>Cまたはc.856G>Aを導入することによって、前記 β 2サブユニットCHRN2と相同のアミノ酸残基p.286番のValがLeuまたはMetにそれぞれ変異導入されていることを特徴とする変異遺伝子の作成方法。
- [32] 請求項1ないし11に記載のてんかんモデル非ヒト哺乳動物の相同組換え体を識別する識別方法であって、ヒトニューロンアセチルコリン受容体の α 4サブユニットCHR

NA4または β 2サブユニットCHRNA4にそれぞれ相同する非ヒト哺乳動物の相同遺伝子Chrna4 またはChrnb2の塩基配列の一部と、その塩基配列は異なるが、アミノ酸配列が同一になるプローブの制限酵素を用いて、該相同組換え体に該プローブが、請求項18ないし24のいずれか1項に記載の変異遺伝子に導入されているかどうかを検出することによって該てんかんモデル非ヒト哺乳動物の相同組換え体を識別することを特徴とする識別方法。

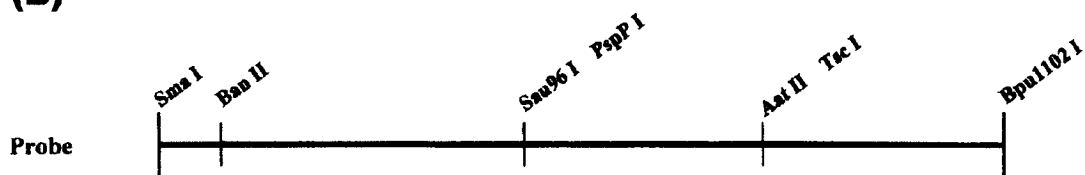
- [33] 請求項32に記載の識別方法において、前記変異遺伝子に制限酵素切断部位が出現している場合には、該制限酵素切断部位の制限酵素を用いて該てんかんモデル非ヒト哺乳動物の相同組換え体を識別することを特徴とする識別方法。

[図1]

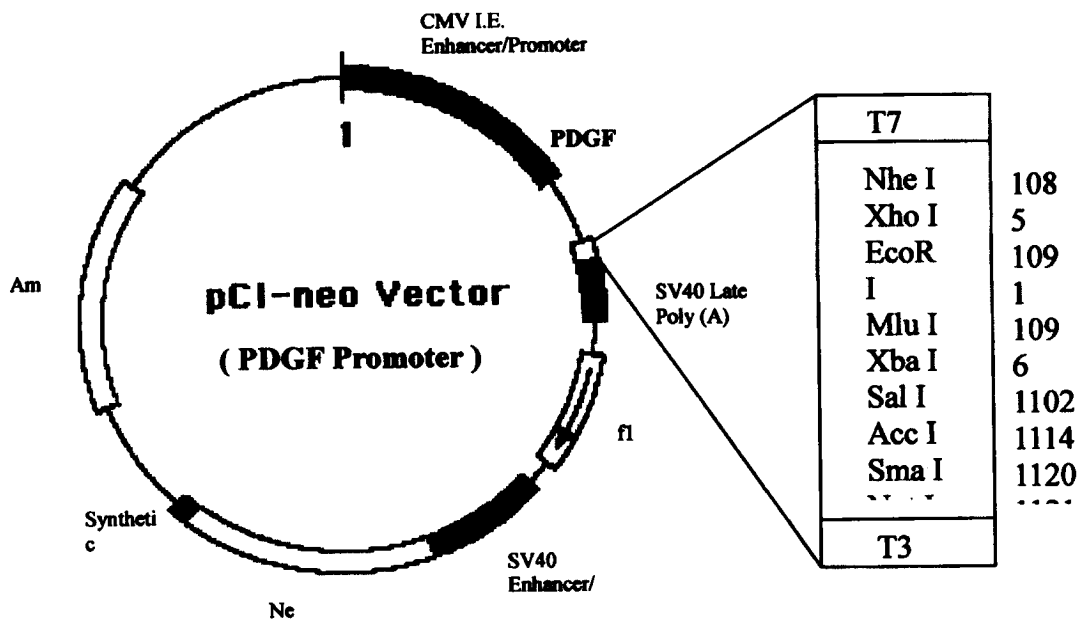
(A)



(B)



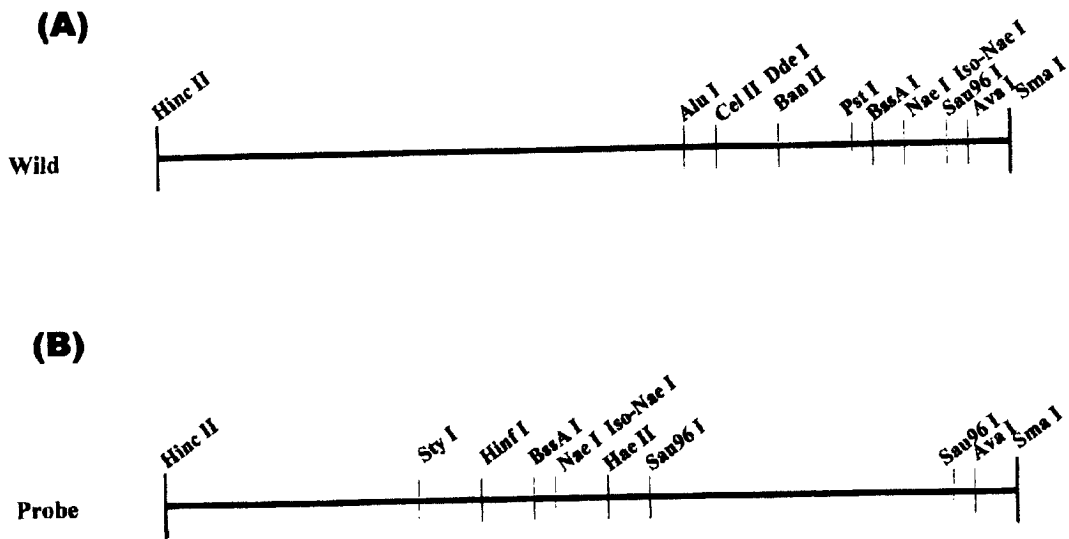
[図2]



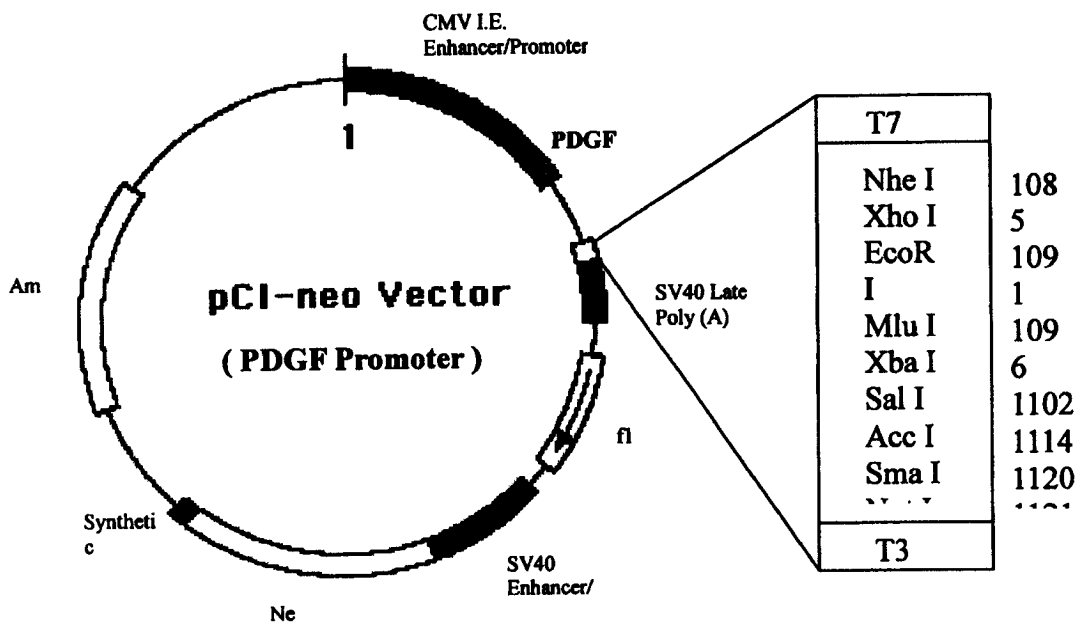
[図3]



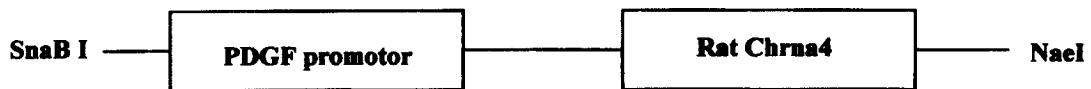
[図4]



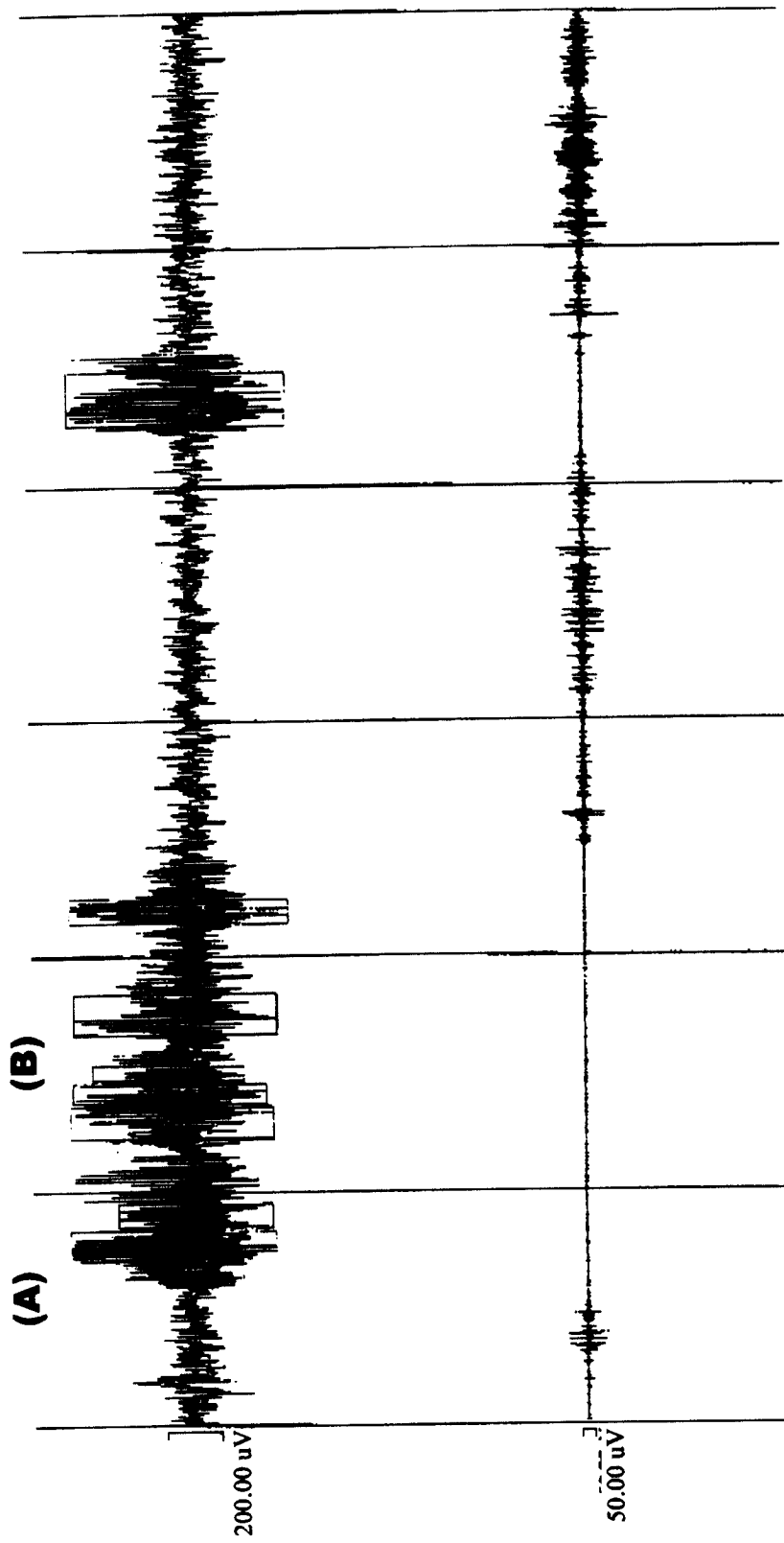
[図5]



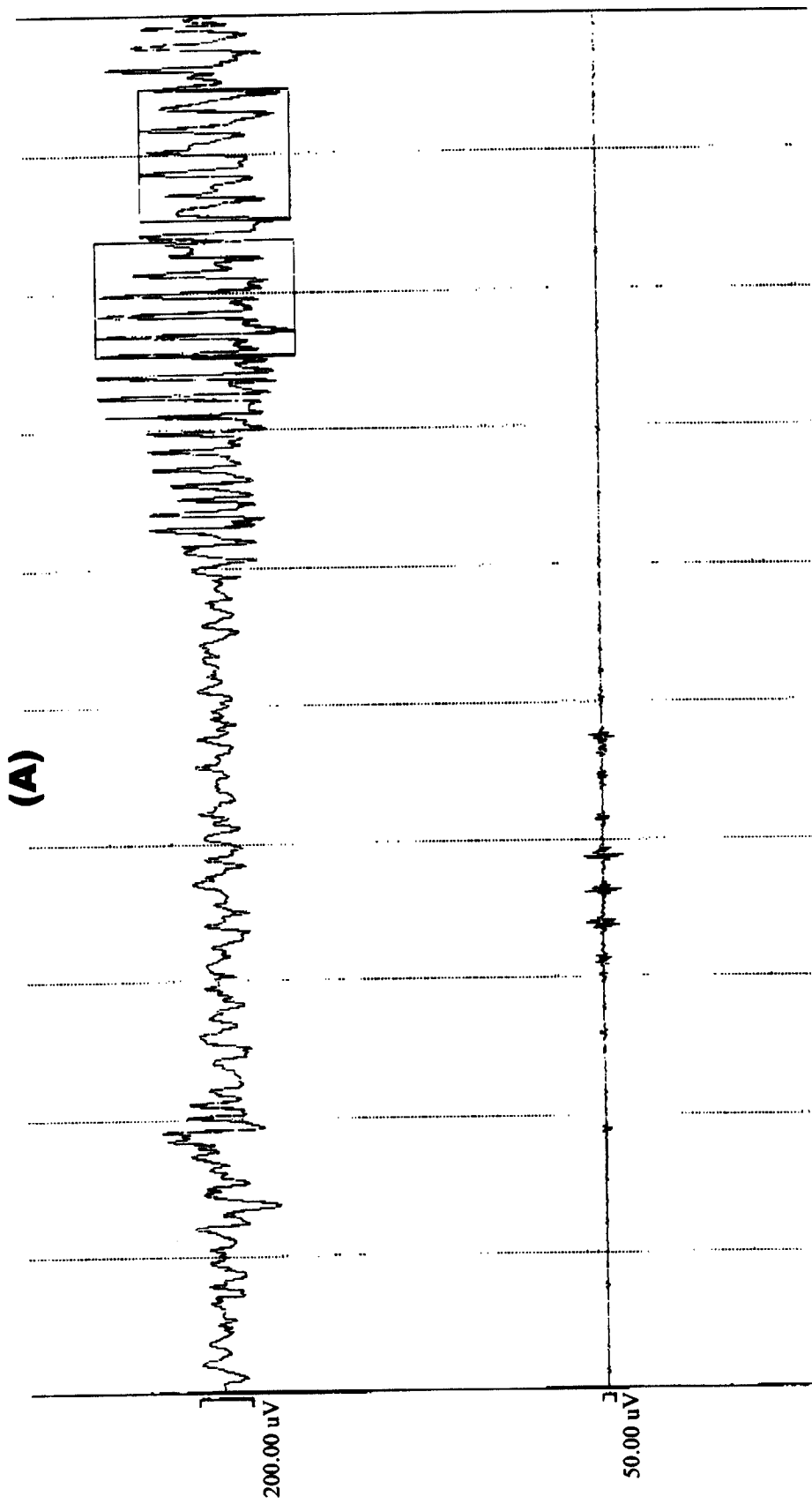
[図6]



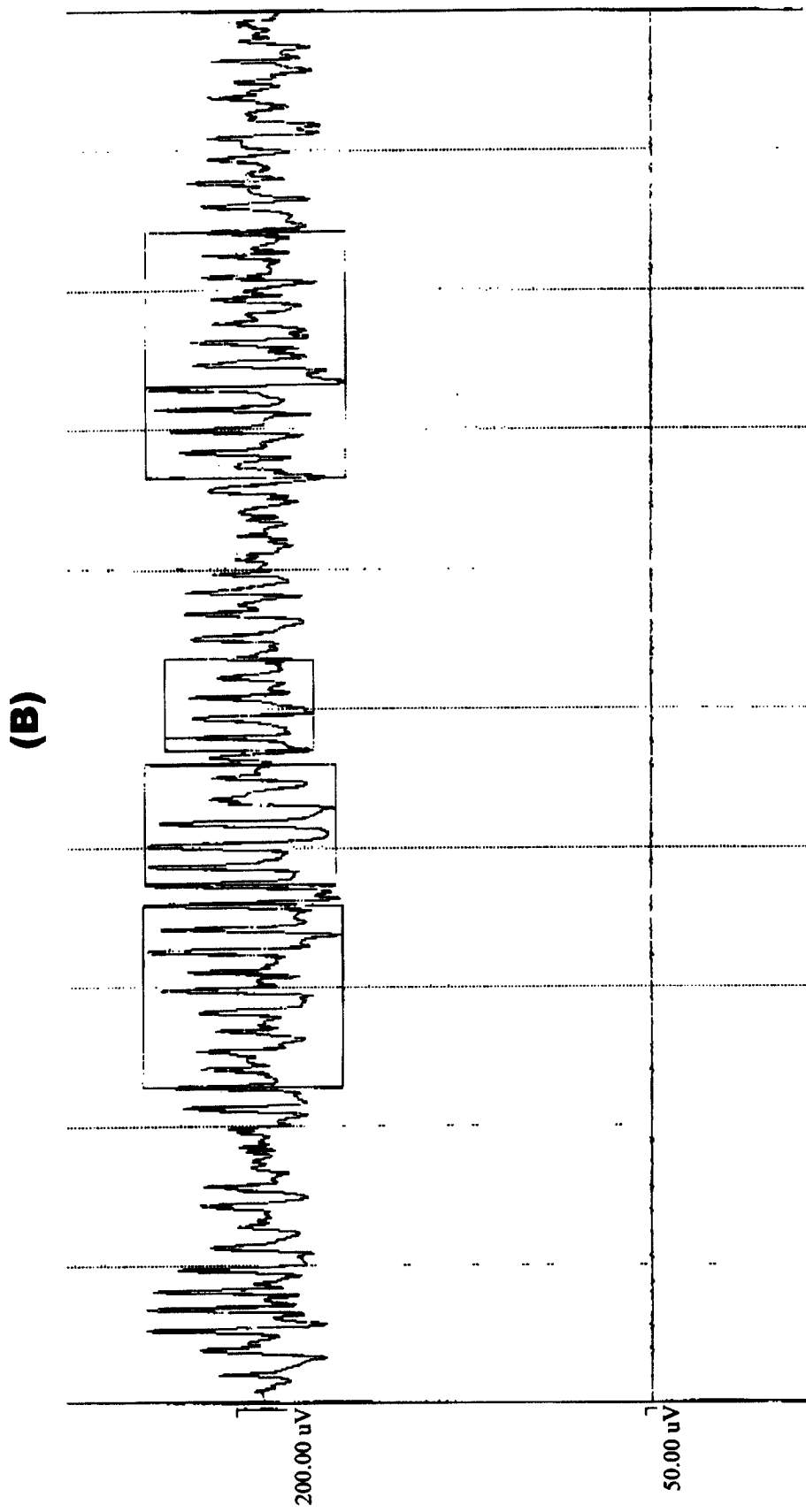
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/052230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01) i, A01K67/02(2006.01) i, A01K67/027(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A01K67/02, A01K67/027, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	ZHU, Gang et al., Rats harboring S284L Chrna4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. J Neurosci. 2008 Nov 19, vol.28(47), pp.12465-12476	1-33
Y/A	JP 2005-245361 A (Japan Science and Technology Agency), 15 September, 2005 (15.09.05), & US 2008/0148417 A1 & WO 2005/084428 A1	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
Y/A	MARINI, Carla et al., The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy. Biochem Pharmacol. 2007 Oct 15, vol.74(8), PP.1308-1314	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 23 April, 2009 (23.04.09)	Date of mailing of the international search report 12 May, 2009 (12.05.09)
--	---

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/052230

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	STEINLEIN, Ortrud K. et al., An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Hum Mol Genet. 1997 Jun, vol.6(6), pp.943-947	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
Y/A	STEINLEIN, Ortrud K. et al., Independent occurrence of the CHRNA4 Ser248Phe mutation in a Norwegian family with nocturnal frontal lobe epilepsy. Epilepsia. 2000 May, vol.41(5), pp.529-535	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
X/Y	WO 2005/118641 A1 (Applied Research Systems ARS Holding N.V.), 15 December, 2005 (15.12.05), & JP 2008-509655 A & US 2008/0038255 A1 & EP 1751188 A1	18, 25/19-24, 26-31
X/Y	WO 2005/108617 A2 (Rheogene, Inc.), 17 November, 2005 (17.11.05), & JP 2008-505616 A & US 2005/0266457 A1 & US 2008/0145935 A1 & US 2008/0216184 A1 & EP 1744619 A1	18, 25/19-24, 26-31

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/02(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, A01K67/02, A01K67/027, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年
 日本国登録実用新案公報 1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
PA	ZHU, Gang et al., Rats harboring S284L Chrna4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. J Neurosci. 2008 Nov 19, vol.28(47), pp.12465-12476	1-33
Y/ A	JP 2005-245361 A(独立行政法人技術振興機構)2005.09.15 & US 2008/0148417 A1 & WO 2005/084428 A1	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33

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

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

国際調査を完了した日 23.04.2009	国際調査報告の発送日 12.05.2009
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B 9 1 2 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	MARINI, Carla et al., The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy. <i>Biochem Pharmacol.</i> 2007 Oct 15, vol. 74(8), PP. 1308-1314	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
Y/ A	STEINLEIN, Ortrud K. et al., An insertion mutation of the CHRNA4 gene in a family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. <i>Hum Mol Genet.</i> 1997 Jun, vol. 6(6), pp. 943-947	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
Y/ A	STEINLEIN, Ortrud K. et al., Independent occurrence of the CHRNA4 Ser248Phe mutation in a Norwegian family with nocturnal frontal lobe epilepsy. <i>Epilepsia.</i> 2000 May, vol. 41(5), pp. 529-535	19-24, 26-31/ 1-17, 32, 33
X/ Y	WO 2005/118641 A1 (Applied Research Systems ARS Holding N. V.) 2005. 12. 15 & JP 2008-509655 A & US 2008/0038255 A1 & EP 1751188 A1	18, 25/ 19-24, 26-31
X/ Y	WO 2005/108617 A2 (Rheogene, Inc.) 2005. 11. 17 & JP 2008-505616 A & US 2005/0266457 A1 & US 2008/0145935 A1 & US 2008/0216184 A1 & EP 1744619 A1	18, 25/ 19-24, 26-31