

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4701374号  
(P4701374)

(45) 発行日 平成23年6月15日(2011.6.15)

(24) 登録日 平成23年3月18日(2011.3.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 56 頁)

(21) 出願番号	特願2001-222263 (P2001-222263)	(73) 特許権者	504261077
(22) 出願日	平成13年7月23日(2001.7.23)		大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(65) 公開番号	特開2002-360116 (P2002-360116A)		東京都三鷹市大沢二丁目2番1号
(43) 公開日	平成14年12月17日(2002.12.17)	(74) 代理人	100107984
審査請求日	平成19年5月15日(2007.5.15)		弁理士 廣田 雅紀
(31) 優先権主張番号	特願2000-237320 (P2000-237320)	(72) 発明者	野田 昌晴
(32) 優先日	平成12年8月4日(2000.8.4)		愛知県岡崎市電美台2丁目7番地9
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	渡辺 英治
(31) 優先権主張番号	特願2000-241637 (P2000-241637)		愛知県岡崎市電美南2丁目2番地1
(32) 優先日	平成12年8月9日(2000.8.9)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	審査官	長井 啓子
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NaV2チャンネル遺伝子欠損非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(X)及び(Y)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(X) 前記タンパク質を発現しているマウス細胞と、被検物質とを接触させる工程：及び、

(Y) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程。

【請求項2】

前記タンパク質を発現している細胞が、前記のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞である、請求項1記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項3】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x1)及び(y1)の工程を含み、及び、前

記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x1) マウスから得られる神経細胞と被検物質とをインピトロで接触させる工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y1) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程。

10

【請求項4】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x2)及び(y2)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x2) マウスにあらかじめ食塩水を投与した後、該マウスから得られる神経細胞を被検物質の存在下で培養する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

20

(y2) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程。

【請求項5】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x3)及び(y3)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

30

(x3) マウスにあらかじめ被検物質と食塩水を投与する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y3) 該マウスから得られる神経細胞における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程。

【請求項6】

40

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x4)及び(y4)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x4) マウスにあらかじめ被検物質と食塩水を投与する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異

50

マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y 4) 該マウスにおける前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す、 $Na_v2$ チャンネル遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $Na$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、それをコードする遺伝子等に関する。

10

【0002】

【従来の技術】

電位依存性ナトリウムチャンネルは、電位依存性カリウムチャンネルとともに、神経細胞、筋肉細胞等の興奮性細胞において活動電位の発生と伝播に中心的役割を担うイオンチャンネルとして知られている。ナトリウムチャンネルタンパク質は、電位検出系をもつイオン選択的チャンネルを構成し、 $270\text{ kDa}$ の糖タンパク質からなる - サブユニットと、1つ又は2つのより小さい - サブユニットから構成されている。電位依存性ナトリウムチャンネルは、細胞膜が静止電位(通常 -  $70 \sim -90\text{ mV}$ )にある時は閉じているが、細胞膜が脱分極するとチャンネルが開き、 $1\text{ msec}$ 程度の後にチャンネルが閉じることから、ナトリウムチャンネルタンパク質分子は、膜電位を感受する電位センサーとそれに連動して動く活性化依存性、ナトリウムイオンを選択的に透過するための選択性フィルター、及び不活性化依存性を構成しているといわれている。

20

【0003】

本発明者等による脳のナトリウムチャンネルタンパク質 - サブユニットcDNAタイプI、II及びIIIの同定(Nature 320,188-192(1986)、FEBS Lett.228,187-194(1988))以来、多くの構造的に関連する - サブユニットのアイソフォームが各種の組織からクローニングされており、これらは多重遺伝子族を形成している。最近になって興奮性細胞のほかにも、グリア細胞もまた電位感受性ナトリウム電流を発現することが見出され(Trends Neurosci.19,325-332(1996))、in situハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンプロット及び免疫細胞化学などの手法によって、グリア細胞における脳 - タイプI、II、III、H1、 $Na_s$ 、 $NaCH6$ 等の存在が報告されている(Glia 26,92-96(1999))。しかし、いわゆる電氣的に非興奮性の細胞における電位依存性ナトリウムチャンネルの機能は解明されていない。

30

【0004】

数年前、電位依存性ナトリウムチャンネル - サブユニットと相同性のある部分cDNAがラット星状膠細胞に由来するcDNAライブラリーからクローニングされ $NaG$ と命名された(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,7272-7276(1992))。これに引き続き同様な - サブユニットアイソフォームが各種の動物種から独立にクローニングされている。例えば、ヒトの心臓からの $Na_v2.1$ (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,4893-4897(1992))、マウスの動脈腫瘍細胞株からの $Na_v2.3$ (J.Biol.Chem.269,30125-30131)及び $NaG$ のスプライシングヴァリエントに相当するラットの脊髄神経節由来の $SC_L11$ が報告されている(FEBS Lett.400,183-187(1997))。これらは配列の相同性から、異なる種における対応する遺伝子(species orthologues)とも考えられ、電位依存性ナトリウムチャンネル( $NaCh$ ) - サブユニットファミリーの中で異なるサブファミリーすなわちサブファミリー- $2NaCh(Na_v2)$ に分類することができる。それらの全アミノ酸配列は、先にクローニングされた電位依存性ナトリウムチャンネル群に比べ相同性が50%以下と低く、イオン選択性や電位依存性の活性化・不活性化に関連する領域においてすらもその配列は特異的である。それらの領域は他の全てのサブファミリーメンバーにおいては完全に保存されていることから、 $Na_v2$ は特別なチャンネル特性をもっていると考えられるが、機能的

40

50

$\text{Na}_v2$  チャネルをアフリカツメガエル卵母細胞、CHO細胞、HEK293細胞などを用いる異種発現系で発現させる試みはこれまで成功しておらず、生体内における $\text{Na}_v2$  チャネルの機能については全くわかっていなかった。

【0005】

$\text{NaG}/\text{SCL}11$  は、星状膠細胞からクローニングされたので、星状膠細胞で発現される電位依存性ナトリウムチャネル( $\text{NaCh}$ )の1つと考えられてきたが、その後のin situハイブリダイゼーションにより $\text{Na}_v2$  は生体内では星状膠細胞に発現しておらずシュワン(Schwann)細胞及び脊髄感覚ニューロンにおいて発現していることが明らかにされた(Glia 21,269-276(1997))。 $\text{NaG}$ のmRNAは神経系以外、特に肺や心臓に比較的高レベルで検出され、さらに、 $\text{NaG}$ のmRNAが中枢神経系に存在することがRNA 10  
 s eプロテクション及びノーザンブロット法で示されたが、非同位体プローブを用いるin situハイブリダイゼーションによっては $\text{NaG}$ のmRNAは中脳核V(mesencephalic nucleus V)以外において検出できないことが報告されている(Mol. Brain Res. 45, 71-82(1997))。このことから、 $\text{NaG}$ のmRNAは中枢神経系全体に低レベルで発現するか又は中枢神経系の特定の領域で限定的に発現しているであろうと考えられる。 $\text{NaG}$ チャネルがこのように幅広い組織、電氣的に非興奮性の細胞を含む幅広い細胞種に分布していることから、 $\text{NaG}$ チャネルは活動電位の発生と伝播以外の機能があると考えられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

現在まで、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ異常な高張塩分の摂取挙動を示す、塩分過剰摂取実験モデル動物は知られていない。また、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質やそれをコードする遺伝子は知られていない。本発明の課題は、かかる塩分過剰摂取実験モデル動物として有用な、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば $\text{Na}_v2$  チャネル遺伝子欠損非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質やそれをコードする遺伝子を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生体内における機能が不明であった $\text{Na}_v2$  チャネルの機能や役割を明らかにするために鋭意研究し、 $\text{Na}_v2$  チャネルノックアウトマウスを作製し、 $\text{Na}_v2$  チャネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることを確認し、この $\text{Na}_v2$  チャネルノックアウトマウスが水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ高張塩分を多量に摂取するという異常な挙動を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、

(1) 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(X)及び(Y)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法： 40

(X) 前記タンパク質を発現しているマウス細胞と、被検物質とを接触させる工程：及び、

(Y) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程：に関する。

【0009】

また本発明は、

(2) 前記タンパク質を発現している細胞が、前記のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞である、上記(1)記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法に関する。

【0010】

また本発明は、

(3) 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x1)及び(y1)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x1) マウスから得られる神経細胞と被検物質とをインピット口で接触させる工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y1) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程に関する。

【0011】

また本発明は、

(4) 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x2)及び(y2)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x2) マウスにあらかじめ食塩水を投与した後、該マウスから得られる神経細胞を被検物質の存在下で培養する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y2) 前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程に関する。

【0012】

また本発明は、

(5) 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x3)及び(y3)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x3) マウスにあらかじめ被検物質と食塩水を投与する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異

10

20

30

40

50

マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y 3) 該マウスから得られる神経細胞における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程：

に関する。

【0013】

また本発明は、

(6) 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法であって、以下の(x 4)及び(y 4)の工程を含み、及び、前記タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなり、かつ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質である、方法：

(x 4) マウスにあらかじめ被検物質と食塩水を投与する工程であって、該マウスが、前記のタンパク質をコードする、マウスの内在性遺伝子が破壊・欠損・置換により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異マウスであるか、又は、前記のタンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスである、工程：

(y 4) 該マウスにおける前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する工程：

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明のヌル変異非ヒト動物としては、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す非ヒト動物であれば特に制限されるものではないが、かかる非ヒト動物として、Na<sub>v</sub>2遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物を具体的に例示することができる。ここで、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動とは、例えばマウスにおいては24時間水分飢餓条件下で0.3Mの食塩水の摂取量が野生型、好ましくは同腹の野生型に比べ1.5倍以上、より好ましくは2倍以上摂取する挙動をいい、また、Na<sub>v</sub>2遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物とは、Na<sub>v</sub>2をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子が破壊・欠損・置換等により不活性化され、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失った非ヒト動物をいい、また非ヒト動物とは、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。以下、非ヒト動物がマウスの場合を例にとって説明する。

【0017】

Na<sub>v</sub>2ノックアウトマウスの作製法としては、Na<sub>v</sub>2を発現する機能を失ったノックアウトマウスを作製することができる方法であればどのような作製法でもよいが、例えば、マウスNa<sub>v</sub>2の種対応物であるラットNaGをコードするcDNAをプローブとして、マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ゲノムDNAのNa<sub>v</sub>2遺伝子を単離し、Na<sub>v</sub>2のエキソン部分に、例えばネオ遺伝子等マーカー遺伝子を挿入してターゲットベクターを作製し、作製されたターゲットベクターをエレクトロポレーション法によってES細胞に導入し、相同的組換えを起こしたES細胞を選択し、このES細胞系を用いて生殖系列のキメラマウスを作製し、野生型マウスと交配させることによって得られるヘテロ接合体マウス(F1：雑種第一代)同士を交配させることによって、メンデルの法則に従い産生するNa<sub>v</sub>2ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを作製することができる。

【0018】

本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質としては、脳内神経細胞においてNaイオンレベ

10

20

30

40

50

ルのセンサーとして作用するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、配列番号3に示される $\text{Na}_v2$  (GenBankのアクセッション番号: L36179)や、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、これらの組換えタンパク質を具体的に挙げるができる。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質は、そのDNA配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。

**【0019】**

また、本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子としては、配列表の配列番号3に示される $\text{Na}_v2$ をコードする遺伝子、例えば、配列番号2に示される $\text{Na}_v2$ 遺伝子や、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子DNAや、これら遺伝子DNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするDNAも包含され、これらはそのDNA配列情報等に基づき、例えば細胞株R1から作られたマウスのゲノムライブラリーや、129/SvJマウス遺伝子ライブラリー等から公知の方法により調製することができる。

**【0020】**

また、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、マウス由来のDNAライブラリーに対してストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、 $\text{Na}_v2$ 遺伝子と同効な目的とするヒト $\text{Na}_v2.1$  (GenBankアクセッション番号: M91556)やラット $\text{Na}_G/SC11$  (GenBankアクセッション番号: Y09164)等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42°Cでのハイブリダイゼーション、及び $1 \times \text{SSC}$ 、0.1%のSDSを含む緩衝液による42°Cでの洗浄処理を挙げることができ、65°Cでのハイブリダイゼーション、及び $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1%のSDSを含む緩衝液による65°Cでの洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

**【0021】**

本発明の融合タンパク質とは、 $\text{Na}_v2$ 等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に、マーカートンパク質及び/又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の精製や、かかるタンパク質の検出や、かかるタンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

**【0022】**

本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において $\text{Na}$ イオンレベ

10

20

30

40

50

ルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を抗原として用いて常法により作製することができるが、中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、ヒトの塩分過剰摂取による慢性疾患などの $Na_v2$ の変異又は欠失に起因する疾病の診断や、 $Na_v2$ 等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

10

## 【0023】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、抗原ペプチドを免疫原としてウサギ等を免疫し、常法により抗血清を作製し、作製した抗血清を、免疫原に用いたペプチドが固定化されたカラムによって精製することにより調製することができる。また、モノクローナル抗体は、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法により調製することができる。以下に脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質として、マウス由来の $Na_v2$ を例に挙げてマウス由来の $Na_v2$ に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、すなわち抗m $Na_v2$ モノクローナル抗体の作製方法を説明する。

20

## 【0024】

上記抗m $Na_v2$ モノクローナル抗体は、抗m $Na_v2$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインビボ又はインビトロで常法により培養することにより生産することができる。例えば、インビボ系においては、齧歯動物、好ましくはマウス又はラットの腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むRPMI 1640又はMEM等の細胞培養培地を例示することができる。

30

## 【0025】

抗m $Na_v2$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、マウス等から得られた $Na_v2$ を用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスNS-1細胞（ATCC TIB-18）とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗m $Na_v2$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出することができる。また、かかるモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、アフィニティークロマトグラフィー等の液体クロマトグラフィーを具体的に例示することができる。

40

## 【0026】

また、本発明の前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり

50



、上記抗体を用いて、その脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

【0027】

また上記抗mNa<sub>v</sub>2モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC（フルオレセインイソシアネート）又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S又は<sup>3</sup>H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

【0028】

本発明はまた、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができる。

【0029】

また、発現系としては、上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0030】

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用

10

20

30

40

50

いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997)らの方法などを用いることができ、また、かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗Na<sub>v</sub>2モノクローナル抗体等の抗脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質抗体を結合させたカラムや、上記Na<sub>v</sub>2等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に通常のペプチドタグを付加した場合には、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらの脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を得ることができる。

10

【0031】

本発明において、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいう。本発明における非ヒト動物としては、ウサギや、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げるができるが、これらに限定されるものではない。

20

【0032】

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質のトランスジェニックマウスを例にとつて以下説明する。

30

【0033】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質のトランスジェニックマウスは、Na<sub>v</sub>2等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするcDNAにチキン - アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビット - グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサー

40

50

として作用するタンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0034】

そしてまた、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、かかるタンパク質をコードする遺伝子や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物や、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現する細胞等を用いると、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることができる。これらのスクリーニングにより得られたものは、ヒトの塩分過剰摂取による慢性疾患の抑制剤、予防剤又は治療薬や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質である可能性がある。

10

20

【0035】

上記スクリーニング方法としては、例えば、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いる方法や、本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物と、被検物質とを用いる方法等を挙げることができる。

30

【0036】

上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いたスクリーニング方法としては、例えば、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と被検物質とを接触せしめ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法を挙げることができる。

40

【0037】

本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物と、被検物質とを用いたスクリーニング方法としては、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物から得られる神経細胞と被検物質とをインビトロで接触せし

50

め、前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ食塩水を投与した後、該非ヒト動物から得られる神経細胞を被検物質の存在下で培養し、前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質と食塩水を投与した後、該非ヒト動物から得られる神経細胞における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質と食塩水を投与した後、該非ヒト動物における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法などを具体的に挙げるができる。

【 0 0 3 8 】

また、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価するに際し、対照として野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。なお、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能とは、生体中の浸透圧調節機能、すなわち脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターしている脳内神経細胞において、Naイオンレベルのセンサーとして作用する機能をいい、かかる機能の変化としては、体液オスモル濃度の感覚経路における機能の変化や、水分及び食塩の摂取に対する嗜好・嫌悪応答の変化などを具体的に例示することができるがこれらに限定されるものではない。

【 0 0 3 9 】

また、本発明の医薬組成物は、有効成分として前記本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の発現促進若しくは抑制物質を含んでもものであれば特に制限されるものではなく、これら医薬組成物は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進又は発現増強を必要としている患者や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いることができる。

【 0 0 4 0 】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[ ターゲッティングベクターの構築 ]

ターゲッティングベクターを構築するため、タンパクコーディングエクソン1, 2及び3を含むマウスのゲノム断片を、ラットのNaG/SC11プローブによってクローニングした。まず、細胞株R1から作られたマウスのゲノムライブラリー(大阪大学の森博士から供与)から、ラットのNaGcDNAの446bp断片(最初の3つのコーディングエクソンを含むヌクレオチド残基11-456: GenBankアクセッション番号Y09164: 配列番号1)でハイブリダイズさせて9個の独立のゲノムクローンを分離した。数種の制限酵素を用いるサザンブロット分析により、これら全てのオーバーラップクローンが単一のゲノム遺伝子座に由来することを確認した。ハイブリダイゼーションポジティブな3.2kb及び3.7kbのHind III断片をpBluescriptISK(-)(Stratagene社製)にサブクローンした後、DNA配列を決定した(配列はGenBankのアクセッション番号AF190472: 配列番号4)。3.2kb断片は、タンパクコーディングエクソン1(5非翻訳領域の13塩基とマウスNa<sub>v</sub>2タンパクコーディング配列の最初の238塩基: GenBankアクセッション番号L36179のヌクレオチド残基238-490)を含み、3.7kb断片はエクソン2(同ヌクレオチド残基491-609)及びエクソン3(同又

10

20

30

40

50

クレオチド残基 610 - 701) を含んでいた。この3つのエクソンをコードしている DNA 配列は Tamkun 等 (J. Biol. Chem. 269, 30125-30131 (1994)) によってクローニングされたマウスの  $N a_v 2.3$  cDNA と同じであった。クローニングされたゲノム断片は4つの制限酵素 (BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III) についてのサザンプロットの結果、マウスのゲノム DNA と同じ制限酵素地図を示した。この知見から、マウスの  $N a_v 2.3$  はラットの  $N a G$  の種対応物であることが明らかになった。したがって、 $N a_v 2.3$ 、 $N a G$  及び  $S C L 1 1$  を  $N a_v 2$  と命名した。

#### 【0041】

ターゲティングベクターを構築するために、 $l a c Z$  遺伝子をマウス  $N a_v 2$  遺伝子のタンパクコーディングエクソン1に挿入し、マウス  $N a_v 2$  のN末端の20アミノ酸配列が  $\beta$ -ガラクトシダーゼと融合するようにデザインした。すなわち、3つのエクソンを含む12.5 kbのSal I断片をpDT-A (Anal. Biochem. 214, 77-86 (1993)) のXho Iサイトに挿入し、次いで、 $l a c Z$ -neoカセットのSal I-Xho I断片をエクソン1の内因性のXho Iサイトに導入した(図1a参照)。これによってマウス  $N a_v 2$  タンパクの最初の20アミノ酸を  $\beta$ -ガラクトシダーゼのN末端に融合した蛋白が発現する。また、ターゲットマウスにおいてマウス  $N a_v 2$  遺伝子の代わりに  $l a c Z$  遺伝子を確実に発現させるために、 $l a c Z$ -neoカセットを挿入したこと以外は、元のマウス  $N a_v 2$  遺伝子のゲノム構造そのままとした。サザンプロットスクリーニングにおいて外因的制限サイトとして利用することができるように、 $l a c Z$ -neoカセットの5'末端にEcoR Iリンカーを予め挿入した。なお、図1a中、上段はターゲットベクターの制限酵素地図を、中段は野生型のマウス  $N a_v 2$  遺伝子座を、下段は組換え体の遺伝子座をそれぞれ示し、図中の制限サイトBはBamH I、BgはBgl II、EはEcoR I、HはHind III、XはXho Iをそれぞれ意味する。

#### 【0042】

##### [ $N a_v 2$ ノックアウトマウスの作製]

線状化した上記ターゲットベクターを、電穿孔法によってES細胞(129/SVマウス由来のR1セルライン)に導入した。文献(Neurosci. Lett. 247, 135-138 (1998)) 記載の方法に準じて、ネオマイシン耐性ESクローンをG418によって選択し、ターゲットクローンのスクリーニングを行った。相同組換え体をプローブ1(図1a参照; エクソン1のXho Iから約8 kb上流に位置している0.3 kbのEcoR I-Xba I断片)によりEcoR I消化を用いるサザンプロット法で確認した。また、選択されたクローンをプローブ2(neo遺伝子由来の0.6 kbのPst I断片)でチェックした。1つのセンスプライマー(プライマー1、エクソン1の5'末端領域にあるATGTTGACTTCCCCAGAGCC: 配列番号5)及び2つのアンチセンスプライマー(プライマー2、 $l a c Z$ の5'末端領域にあるAACCAAGCAAGCGCCATTTC: 配列番号6、プライマー3、エクソン1の3'末端領域にあるCATCTTCCAAAGGGCTCTTGACA: 配列番号7)を用いるゲノムPCRにより標的とされる遺伝子座を確認した。PCR増幅は、EX-Taqポリメラーゼ(Takara社製)によりその製造者のプロトコールに従いプログラム可能なサーマルサイクラーを用いて2段階で実行した(第1段階; 95 5分間、60 1分間、72 1分間。第2段階; 95 30秒、60 30秒、72 1分間)。

#### 【0043】

98個のESクローンから得られた、相同組換えが起こったアレルをもっていることが確認された2個のESクローンを、8細胞期のC57BL/6Jマウス胚に導入した。導入された胚はM16培地中で1夜胚盤胞まで培養し、7~10個の胚盤胞をICRマウスの子宮に移植した。このようにして得られた雄キメラマウスをC57BL/6J雌マウスと交配させ、同腹子からヘテロ接合体マウス(F1: 雑種第一代)を作出し、次いで、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせ、メンデルの法則に従い産生する  $N a_v 2$  欠損マウスを作製した。

#### 【0044】

このヌル変異体動物(マウス  $Na_v2^{-/-}$ )は健康で、繁殖可能で見た目に正常であった。ヘテロ接合体動物の繁殖から得られた458匹の4週令のマウスの遺伝子型解析の結果、野生型は29.5%( $n=135$ )、ヘテロ接合体は48.2%( $n=221$ )、ホモ接合体は22.3%( $n=102$ )であり、メンデル比率に近かった。これらのことは、ヘテロ接合体及びホモ接合体における胚の発育及び身体機能が大きく傷害されないことを示している。マウス  $Na_v2$  は周生期に一過性に子宮平滑筋に発現が誘導されることが報告されている(J.Biol.Chem.269,30125-30131(1994)及びAm.J.Physiol.270,C688-696(1996))が、 $Na_v2^{-/-}$ マウスにおいては子は正常に生まれたことは注目に値する。また、ヌル変異体におけるlacZ発現パターンは発現の強さに差があるもののヘテロ接合体のそれと同じであったことは、マウス  $Na_v2$  の欠損はマウス  $Na_v2$  発現細胞の分化又は生存能力に影響しないことを示している。

10

## 【0045】

野生型(+/+),ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの尾からサンプリングしたゲノムDNAを採取し、EcoRIで消化したゲノムDNAをプロットした膜をターゲットベクターの5'側にある前記プローブ1とハイブリダイズさせたサザンブロット分析の結果を図1bに示す。図1bの右側には、野生型(18kb)及び組換型(10kb)の遺伝子型のサイズが示されている。また、野生型(+/+),ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスのゲノムPCR分析の結果を図1cに示す。図1cの右側には、野生型(200bp)と組換型(400bp)の遺伝子型のサイズが示されている。

20

## 【0046】

[ $Na_v2$ ノックアウトマウスにおける $Na_v2$ 不発現の確認]

変異体マウスのマウス  $Na_v2$  タンパク発現をウエスタンブロットで試験した。野生型(+/+),ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの肺組織サンプルをKnittle等の方法(Am.J.Physiol.270,C688-696(1996))により調製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロットングを文献(Neurosci.Lett.247,135-138(1998))記載の方法で行った。抗マウス  $Na_v2.3$  抗血清(コロラド州立大学Tumkun博士から供与)をPBSで1:500に希釈して使用した。イムノブロットは数種の非免疫血清とインキュベートし、非特異的な結合でないことを確認した。結果を図1dに示す。図1dの右側には、 $Na_v2$ タンパク(220kDa)の位置が示されている。 $Na_v2$ タンパクは高度にグリコシル化されておりSDS-含有緩衝液においてすら容易に凝集するため、ナトリウムチャンネルは広いバンドとなっているが、ヘテロ接合体( $Na_v2^{+/-}$ )マウスでは野生型の約半量のマウス  $Na_v2$  タンパクが肺膜から検出され、ホモ接合体( $Na_v2^{-/-}$ )マウスではマウス  $Na_v2$  タンパクは検出されなかった。マウス  $Na_v2$  タンパクが発現していないことから、このアレルがヌル変異体であることがわかる。

30

## 【0047】

[X-Gal染色による $Na_v2$ ノックアウトマウスにおけるlacZ発現の確認]

胚を3.5%のホルムアルデヒドPBS溶液中に室温にて1時間浸漬して固定し、正中線に沿って矢状面にかみそりでカットした。図2aは胚令15日(E15)のマウス  $Na_v2^{+/-}$ の胚全体のX-Gal染色を示しており、強いβ-ガラクトシダーゼ活性が三叉神経節(図2a中の矢頭)及び脊髄神経節(同矢印)において観察された(参考写真1参照)。また、lacZはこのE15マウスの肺(同星印)においても発現していた。これらの器官におけるlacZの発現は成長しても持続し、脊髄神経節をX-Gal染色後に薄い切片とした時、β-ガラクトシダーゼ活性が種々の大きさの脊髄感覚ニューロンで検出された。図2bには、生後2日目の $Na_v2^{+/-}$ マウスの脊髄神経節をX-Galで染色したクリオスタット組織切片が示されている(参考写真1参照)。lacZ発現は脊髄神経節のニューロン細胞体(図2b中、神経路が星印で示されている。)に限定されており、軸索からは検出されなかった。また、同じようなlacZ発現のパターンが三叉神経節の組織切片でも観察することができた。図2cには、胸部における成育した交感神経幹のクリオスタット切片が示されている(参考写真1参照)。強く染色された多くの細胞は、細胞体の出現、分布、サイズからして、シュワン(Schwann)細胞であると考えられる。ま

40

50

た、 $1\alpha c Z$ 発現は心臓自律神経及び舌神経でも観察された。 $1\alpha c Z$ 発現のこれらのパターンは、ラット $Na_v 2$ 及びマウス $Na_v 2$ 発現に関する結果(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89,7272-7276(1992)、FEBS Lett.400,183-187(1997)、Glia、21,269-276(1997))とよく一致する。このことから $1\alpha c Z$ 遺伝子発現はマウス $Na_v 2$ 遺伝子の制御領域によって制御されていることがわかる。なお、図2c中、矢頭はシュワン細胞の細胞体を示し、スケールバーは $50\mu m$ を表している。

#### 【0048】

##### [ $Na_v 2$ の生理学的な役割]

マウス $Na_v 2$ の生理学的な役割を調べるため、 $Na_v 2^{+/-}$ マウスと $Na_v 2^{-/-}$ マウスの脳を用いて中枢神経系における $1\alpha c Z$ 発現を調べた。生後間のない動物をペントバルビタール麻酔下において最初にPBSについて固定剤で灌流した。固定された脳を冠状に又は矢方向に2mmの厚さにかみそりで切った。PBSで2回洗浄し、 $1mg/ml$ のX-Gal、 $5mM$ の $K_3Fe(CN)_6$ 、 $5mM$ の $K_4Fe(CN)_6$ 、 $2mM$ の $MgCl_2$ 、 $0.2\%$ のNP-40を含むPBS中で37℃において一晩インキュベートした。免疫染色のため、X-Gal染色された切片を冠状の $14\mu m$ の切片にクリオスタットマイクロトームで切り、ゼラチンで被覆されたスライド上に載置した。抗ニューロフィラメント200ウサギポリクローナル抗体(Sigma、N-4142)又は抗グリア原繊維酸性タンパク(GFAP)ウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biochemistry、sc-6170)を用いて免疫染色した(Neurosci.Lett.247,135-138(1998))。マウス $Na_v 2$ が成長個体の中枢神経系における特定のニューロン及び上衣細胞で発現していることを図3は示す(参考写真2参照)。

#### 【0049】

図3a-eは $Na_v 2^{+/-}$ マウスの、図3fは $Na_v 2^{-/-}$ マウスの中枢神経系における $1\alpha c Z$ 発現を示している。また、図3a、b、d、e及びfは固定された成長個体の脳を冠状に、図3cは正中矢状面でそれぞれ2mmに切断し、X-Galで染色したものである。なお、図3cにおいては脳の下頭蓋は除去しなかった。図3eにおいて、ホモ接合変異体マウスが低レベル発現部位を検出する分析に用いられた。図3において、AH:前方視床下部領域(anterior hypothalamic area)、MH:中央手綱核(medial habenular nucleus)、ME:正中隆起(median eminence)、OVL T:終板器官(organum vasculosum laminae terminalis)、MPO:中央視索前領域(medial preoptic area)、DMH:背中視床下部(dorsomedial hypothalamus)、IPDM:背中部位の脚間核(interpeduncular nucleus of the dorsomedial part)、MMR:正中縫線の中央部(medial part of the median raphe)、NHP:神経下垂体(neurohypophysis)、SFO:脳弓下器官(subfornical organ)、CX:大脳皮質(cerebral cortex)、BLA:扁桃体側低(basolateral amygdala)をそれぞれ意味する。図3cにおいて、OVL Tは中枢神経系から除去され頭蓋に付けられた。冠状の半全量脳は $50\mu m$ の厚さにクリオスタットマイクロトームで切り、抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体(図3g及びh)、抗GFAPポリクローナル抗体(図3i)、又はクレシルバイオレット(cresyl violet)(図3j)により染色された。茶色のシグナルは、抗体と反応した部位である。サンプルはAH(図3g)、SFO(図3h及びi)及びME(図3j)である。矢頭はダブルポジティブニューロンを示す。図3jの星印は、第三脳室を示す。背面はパネルの上方を向いている。図3g-hのスケールバーは $30\mu m$ であり、図3jのスケールバーは $100\mu m$ である。

#### 【0050】

図3からわかるように、 $1\alpha c Z$ 発現は中枢神経系の次の特定部位に限られていることが判明した(図3a-f)。すなわち、MPO、AH、DMH、IPDM、MMR、MeV、MH、ME、SFO、OVL T及びNHPである。ME、SFO、OVL T及びNHPは脳室周囲器官(CVO)として知られ、高密度、高透過性の毛細血管ネットワークをもち、血中への物質の分泌や中枢組織への物質浸入を促進する(FASEB J,7,678-686(1993))。  $Na_v 2^{+/-}$ マウスでは比較的弱い $1\alpha c Z$ の発現がCX及びBLAに見られたのに対し、 $Na_v 2^{-/-}$ マウスにおけるこれらの部位での $1\alpha c Z$ の発現はより顕著であった(図3

10

20

30

40

50

f)。I a c Zを発現している細胞種を調べるため、脳をX - G a lで染色しクリオスタットマイクロトームで組織切片に切り、ついで抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体又は抗グリア原繊維酸性タンパク ( G F A P ) ポリクローナル抗体で免疫染色するか、クレシルバイオレット染色を行ったところ、I a c Z発現細胞の大部分はM P O、A H ( 図3 g )、I P D M、M M R、M H及びM e V中のニューロフィラメントに対して陽性であった。また、G F A P陽性細胞はI a c Z発現に対して陰性であり、このことは星状膠細胞がマウスN a<sub>v</sub>2に対し陰性であることを示している。

#### 【 0 0 5 1 】

C V OにおけるI a c Z発現細胞の分布は特に重要であり、M EにおけるI a c Z発現細胞は第3脳室の床に並んでいた ( 図3 j )。この分布は線毛を持たない上衣細胞の位置と対応している。この細胞は脳脊髄液 ( C S F )、神経細胞及び血管の間を結合している特殊な細胞であるタニサイトと考えられる ( Neuroscience 3, 277-283 ( 1978 ) )。これらはC S Fと毛細管周縁空間の間の物質交換に関与していると考えられている。I a c Z陽性細胞はS F O全体に亘ってまばらに分布し、その大部分はニューロフィラメントと共在し ( 図3 h )、G F A Pに対し陰性であった ( 図3 i )。I a c Z陽性細胞は第3脳室の全体に並んで集中的に存在し、これが上衣細胞であることを示唆している。N H Pには、X - G a lで密に染色された。これらはいわゆる下垂体細胞 ( J. Exp. Biol. 139, 67-79 ( 1988 ) ) に対応すると思われる。

#### 【 0 0 5 2 】

##### [ F o s - イムノ組織化学 ]

I a c Z発現の解析によって、マウスN a<sub>v</sub>2は4つの脳周囲器官及び中枢神経系のいくつかの神経核において発現することや、マウスN a<sub>v</sub>2発現細胞は組織分布のみならず細胞タイプにおいても多様性があることが判明したことから、N a<sub>v</sub>2チャンネルの機能、特性の決定が困難となったが、4つの脳周囲組織が体液ホメオスタシスに関与していると考えられていることから ( FASEB J 7, 678-686 ( 1993 )、Annu. Rev. Physiol. 59, 601-619 ( 1997 )、Physiol. Rev. 78, 583-686 ( 1997 )、Physiol. Rev. 58, 582-603 ( 1978 )、Ann. NY Acad. Sci. 87, 258-280 ( 1999 ) )、マウスN a<sub>v</sub>2チャンネルが体液容量オスモル濃度の感覚経路において機能していると仮定すれば、これらの器官におけるそのチャンネルの活性と遺伝子発現はマウスN a<sub>v</sub>2変異体マウスにおいて影響を受けると想定された。そこで、マウス及びラットにおける細胞外液バランスに応じた神経活動の変化のマーカーであるF o s核タンパクの中樞性発現に対して、水分飢餓がどのように影響するかを以下のように調べた。

#### 【 0 0 5 3 】

水分充足状態及び水分飢餓状態におかれた、脳の中央視索前核 ( M n P O )、終板器官 ( O V L T )、脳弓下器官 ( S F O )、室旁核 ( P V N ) 及び視索上核 ( S O N ) の5つの領域におけるF o s - イムノポジティブ細胞の密度変化 ( 時間に対する ) について、水欠乏時間がゼロのマウス ( マウスN a<sub>v</sub>2<sup>+/+</sup>につきn = 4、マウスN a<sub>v</sub>2<sup>-/-</sup>につきn = 4 )、水欠乏12時間のマウス ( n = 5及び5 )、同24時間のマウス ( n = 6及び7 )、同48時間のマウス ( n = 6及び5 ) を用いて調べた。前記固定液で灌流したマウスの脳を同じ固定液に4で一夜浸漬した後、脳をビプラトーム ( L e i c a , V T 1 0 0 0 S ) 上で50 µ mの厚さの冠状切片とした。抗F o sヤギポリクローナル抗体 ( Santa Cruz Biochemistry、s c - 5 2 - G ) のP B S 1 0 0 0倍希釈液を用いてイムノ染色した。関連する領域を含む切片を選び、F o s - イムノ陽性核を数えた。各領域はイメージ分析システム ( K S 4 0 0 が付属したA x i o p h o t o 2 ) を用いて測定した。上記脳の5つの領域1 m m<sup>2</sup>当たりの核の数を測定した。結果を図4に示す ( 参考写真3参照 )。

#### 【 0 0 5 4 】

図4 aは、水分充足状態又は24時間水分飢餓状態の野生型 (+/+) マウス及びヌル変異体 (-/-) マウスの終板器官 ( O V L T ) 含有組織切片の典型的な像であり、スケールバーは200 µ mを示している。また図4 bは、水分飢餓状態における脳弓下器官 ( S F O )、視索上核 ( S O N )、室旁核 ( P V N )、終板器官 ( O V L T ) 及び中央視索前核 ( M n P O ) 1 m m<sup>2</sup>当たり中のF o s - イムノポジティブ細胞の数 ( 平均 ) をプロットしたもの

10

20

30

40

50



であり、図中の縦棒はS.E.を示し、星印は $Na_v2^{-/-}$ マウスと $Na_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差( $p < 0.05$ )が認められることを示している。水分充足条件下においては、Fos-イムノポジティブ細胞はテストしたどの領域においても検出されなかった。水分飢餓12、24及び48時間条件下においてFos-イムノポジティブ核を有する細胞数は、 $Na_v2^{-/-}$ マウスでも $Na_v2^{+/+}$ マウスでも顕著に増加した。しかし、SFO及びOVLTにおける $Na_v2^{-/-}$ マウスにおけるFos-イムノポジティブ核は、 $Na_v2^{+/+}$ マウスに比べ2倍増加することが観察された。MnPO、PVN、及びSONにおいてはグループ間に差はなかった。

【0055】

[行動解析]

次いでマウス $Na_v2$ チャンネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響を調べた。行動解析を行うにあたって変異体マウスを雄のC57BL/6Jと戻し交配させた。その結果、F1マウスとN4マウスで同様の結果を得た。ホモ接合型、ヘテロ接合型、野生型の同腹子における嗜好-嫌悪行動を、48時間2瓶嗜好性試験によって測定した。マウスは蒸留水と味溶液の選択を48時間自己のケージで行った。全ての行動解析には12-24週令の雄のマウスが使われた。マウスは一定の室温、湿度及び12/12時間明-暗サイクルにおいて各別にケージに入れられた。2つの瓶の位置は24時間毎に代えてサイド嗜好性の影響を回避した。動物毎の総摂取量を測定し、式；嗜好率 = 味溶液の量(ml) / 味溶液及び水の総摂取量(ml)により嗜好性を計算した。結果を図5に示す。図5aは段階的濃度の食塩水、図5bは濃度固定の3種類の基本的な味物質についての結果を示し、ホモ接合型(-/-)、ヘテロ接合型(+/-)、野生型(+/+)とも5匹のマウスを用いた。図5aから、水分及び食塩充足条件下では食塩に対する濃度感受性は3つのグループにおいて変わらず、全てのグループにおいて0.1MのNaClを最も好み、0.3M又はそれ以上の濃度に対し嫌悪を示し、ヌル変異体が水分及び食塩が充足した条件下では各種の味物質に対して正常な嗜好を示すことがわかった。また図5bから、甘味(0.5Mの蔗糖)、酸味(0.01MのHCl)、苦味(0.02Mのキニン塩酸塩)に対する嗜好性に差が無いことがわかる。

【0056】

[電気生理学]

ヌル変異体の味反応の正常性を調べるため、NaCl味をつかさどる鼓索神経に関する電気生理学的分析を行った。12-24週令の雄マウス(正常条件のために野生型4匹とホモ接合型マウス5匹；急性食塩欲求条件のための上記マウス3匹及び5匹)にペントバルビタールナトリウム(60mg/kg)を腹腔内投与して深く麻酔した後に各マウスを気管切開し、頭保持具で固定した。鼓索神経を露出させて周囲の器官から隔離させ、ブラ(bulla)の入口部位で切断した。神経の全束を切断し白金ワイヤー記録電極上(0.1mm直径)に持ち上げた。中性電極を近傍の組織に付けた。神経活動は増幅され、オシロスコープに表示され、オーディオアンプリファイアーでモニターされた。増幅された信号は時間定数0.3秒で積分機に通され、スリップチャート記録計上に表示された。

【0057】

味溶液としては0.1Mの $NH_4Cl$ 、0.1MのNaCl、0.5Mの蔗糖、0.01MのHCl、0.02Mのキニン塩酸塩(Q-HCl)、0.1MのKCl及び0.1Mの $CH_3COONa$ (AcNa)を用いた。これらの溶液は蒸留水及び0.1mMのアミロライド溶液を用いて作られた。各溶液及び洗浄水は室温( $25 \pm 2$ )において舌の前面に適用された。舌は連続刺激の間に少なくとも45秒洗浄された。全神経反応は刺激開始10秒後における基線からの総和反応の高さとして測定された。各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の記録結果を図6aに示す。また、0.1Mの $NH_4Cl$ に対する鼓索神経における反応を1とした場合の各種の味刺激に対する反応の強さを図6bに示す。

【0058】

0.02Mのキニン塩酸塩及び0.1Mの酢酸ナトリウムに対する神経生理学的反応は、

10

20

30

40

50

ヌル変異体マウスと野生型マウスの間で同じ強さであった。0.1 MのNaCl及び0.1 Mの酢酸ナトリウムに対する反応はアミロライドによって両グループとも同じように減少したので、変異体マウスの味蕾におけるアミロライド感受性チャネルは正常に機能していると判断される。急性食塩欲求条件下でヌル変異体及び野生型マウスは同じような結果を示した。これらの知見を、水及び食塩充足条件下における各種味物質に対する正常な反応(図5)と併せ考えれば、ヌル変異体の味覚受容体は障害を受けていないことがわかる。

#### 【0059】

水分飢餓条件下では高張状態を脱するために、動物は大量の水分を摂取し高張食塩水の摂取を避ける。次に24時間水分飢餓の前後における高張食塩水(0.3 MのNaCl)に対する嗜好を調べた。試験に先立ちマウスは2つの瓶から水を飲むように1週間訓練された。水分欠乏の1日前の10時に水と0.3 MのNaClの選択を与え、16時に液摂取量を測定した。翌日10時に両方の瓶を除き、水分飢餓期間中乾燥飼料が与えられた。24時間水分飢餓の後、両方の瓶を戻し液摂取量を16時に測定した。結果を図7に示す。ヌル変異体は水分不足状態で高張食塩水の異常摂取を示した。24時間水分飢餓の前後において0.3 MのNaClに対する嗜好率(図7a)と総摂取量(図7b)を測定した。この実験におけるn数(匹)は、6(+/+), 6(+/-), 6(-/-)であり、図中の縦棒はS.E.を示し、\*印は $N_{av}2^{-/-}$ マウスと $N_{av}2^{+/+}$ マウスの間で有意差( $p < 0.05$ )が認められることを表している。水分飢餓の後には高張食塩水に明らかに低下した嗜好を示した野生型及びヘテロ接合型マウスと異なり、ヌル変異体マウスは嗜好率において変化がなかった(図7a)。総水分摂取量(水と0.3 MのNaClの合計)は24時間水分飢餓の前後で変わらなかった。総水分摂取量は全てのグループが水分飢餓後には4倍以上となっていた(図7b)。

#### 【0060】

また、水分飢餓処理の前後における血液を断頭術により回収し、血漿電解質の濃度を電解質分析器(9180, AVL Scientific, GA)によって測定した。水分飢餓の前後における血清中の電解質濃度は、野生型及びホモ接合型マウス(各 $n = 6$ )の両方で正常であった。野生型及びホモ接合型マウスにおける水分飢餓処理前の $Na^+$ 濃度(mM)はそれぞれ $153.6 \pm 0.6$ 及び $153.0 \pm 1.2$ 、 $K^+$ 濃度(mM)はそれぞれ $4.6 \pm 0.1$ 及び $4.7 \pm 0.1$ 、 $Cl^-$ 濃度(mM)はそれぞれ $118.5 \pm 0.6$ 及び $118.3 \pm 0.9$ であった。また、水分飢餓処理後の $Na^+$ 濃度(mM)はそれぞれ $151.6 \pm 0.8$ 及び $150.0 \pm 0.3$ 、 $K^+$ 濃度(mM)はそれぞれ $6.5 \pm 0.2$ 及び $6.7 \pm 0.2$ 、 $Cl^-$ 濃度(mM)はそれぞれ $116.0 \pm 1.0$ 及び $116.4 \pm 0.8$ であった。これらのデータは、ヌル変異体は過剰量のナトリウムを直ちに尿中に排泄し、腎臓機能が正常であることを示している。

#### 【0061】

更に利尿剤であるフロセミドを腹腔内注射する方法及び食塩欠乏食を与える方法で食塩欲求を誘導し、ナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験を次の方法で行った。試験の前に水及び0.3 MのNaCl摂取の対照測定を数日間にわたり行った。10時に0.12 mlの通常食塩水(0.9%のNaCl)をマウス腹腔内に注射した。0.3 MのNaClの瓶を取り除き、ナトリウム欠乏食を通常食の代わりに与えた。16時に通常食塩水の2回目の注射をした。その次の日の10時に水及び0.3 MのNaClを与え12時、14時、16時に水及び0.3 MのNaClの摂取量を測定した。その後同様なプロトコールで、同じマウスにより、フロセミド注射(0.12 mlの通常食塩水中に0.6 mg含有)、ナトリウム欠乏食でテストした(急性食塩欲求状態)。最後に通常のナトリウム含有食を与える点のみを変更したプロトコールによりナトリウム欠乏食の効果を評価した。結果を図8に示す。

#### 【0062】

図8には、摂取された水及び0.3 MのNaCl量が2時間毎の蓄積量として示されている。図8の上段にはナトリウムの無い食餌を通常食塩水注射と組み合わせた結果が、中

10

20

30

40

50

段にはナトリウムの無い食餌をフロセミド注射と組み合わせた結果が、下段にはナトリウムを含む食餌をフロセミド注射と組合せた結果が、実験処理直後から2時間毎の0.3 MのNaCl（右側）及び水（左側）の蓄積合計摂取量の平均値プロットとして示されている。この実験のn数（匹）は10(+/+）、10(+/-）、10(-/-)であり、図8中の縦棒はS.E.を示し、\*印は $Na_v2^{-/-}$ マウスと $Na_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差（ $p < 0.05$ ）が認められたことを表している。図8からもわかるように、フロセミドの代わりに等張食塩水を腹腔内注射した場合（対照試験）に摂取した水及び0.3 MのNaClの量はどのグループも同じであった（上段のグラフ）。フロセミド注射とナトリウム欠乏食によって誘導した急性食塩欲求条件下ではヌル変異体は野生型及びヘテロ接合型と比べて0.3 MのNaCl摂取量の増加は約2倍であった（中段右のグラフ）。この異常な高張食塩水の摂取はナトリウム含有食を与えた場合には止まった（下段のグラフ）。

10

#### 【0063】

[ $Na_v2$ チャネルはナトリウム濃度依存性ナトリウムチャネル]

$Na_v2$ チャネルがナトリウム濃度依存性ナトリウムチャネルであることを以下の実験により確認した。

まず、抗 $Na_v2$ 抗体を次のようにして作製した。ラット $Na_v2$ チャネルのインタードメイン2-3に存在するアミノ酸配列（SVSETVPIASGESDIK；配列番号8）からなるペプチドにヘモシアニンを結合させ、このヘモシアニン結合ペプチドを免疫原として白色ウサギを免疫し、常法により抗ラット $Na_v2$ ウサギ抗血清を作製した。作製した抗血清を、免疫原に用いたペプチドが固定化されたカラムによって精製し、抗 $Na_v2$ 抗体を得た。この抗 $Na_v2$ 抗体の特異性はウエスタンブロットと免疫組織化学的解析によって確認した。精製した抗 $Na_v2$ 抗体を使用すると、遺伝子欠損マウスから作製した脳、肺、脊髄後根神経節、舌の切片には非特異的な陽性シグナルは認められなかった。

20

#### 【0064】

次に、脊髄後根神経節の神経細胞を単離した。脊髄後根神経節を8~16週令の野生型マウス及び $Na_v2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した。Renganathanらの方法（J Neurophysiol 84, 710-718, 2000）に従って、脊髄後根神経節から神経細胞を分散単離した。イオンイメージング実験に用いる前に、分散単離した神経細胞は、湿度100%、温度37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養し、培養皿のガラスに接着させた。野生型マウス由来の脊髄後根神経節の神経細胞を、上記抗 $Na_v2$ 抗体を用いて染色することにより、すべての神経細胞が $Na_v2$ 陽性であることを確認した。また、分散単離した神経細胞の大きさは、小型（直径25ミクロン以下：約50%）、中型（直径25から40ミクロン：約40%）、大型（直径40ミクロン以上：約10%）から構成されていたが、これら三つの細胞種の大きさ、形状、生存率は、野生型マウスから単離したものと遺伝子欠損型マウスから単離したものも違いはなかった。なお、生存率については、トリパンブルーの染色によって検証した。

30

#### 【0065】

また、脳弓下器官の神経細胞についても単離した。脳弓下器官を8~16週令の野生型マウス及び $Na_v2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した。脳弓下器官を可視化するためにエバンスブルーを前もって腹腔内に注入した。脳弓下器官の分散は、Jurzakらの方法（Brain Res 662, 198-208, 1994）に従って行った。分散単離した神経細胞は、脊髄後根神経節の神経細胞の場合と同様に、湿度100%、温度37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養し、培養皿のガラスに接着させ、実験に用いた。野生型マウス由来のいくつかの脳弓下器官の神経細胞を、上記抗 $Na_v2$ 抗体を用いて染色したところ、 $Na_v2$ 陽性神経細胞は20~30%であった。なお、野生型マウスから単離した神経細胞と遺伝子欠損マウスから単離した神経細胞とは、大きさや生存率においても違いはなかった。

40

#### 【0066】

上記野生型マウス及び $Na_v2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した、脊髄後根神経節の神経細胞や脳弓下器官の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの測定を実施した。細胞内ナトリウムイオンの測定には、SBFI/AM（sodium-b

50

inding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester) を用い、細胞内カルシウムイオンの測定には、Fura-2/AM を用いた。これらの指示薬をロードした培養細胞を附着させた培養皿を顕微鏡のステージに固定した。蛍光比 (F340/F380) は蛍光イメージングシステムによってモニターした。データ測定のため、脊髄後根神経節の神経細胞については10秒毎に、また脳弓下器官の神経細胞については20秒毎に、それぞれサンプリングした。測定する前に、神経細胞は生理的な等張液 (145 mM の細胞外ナトリウム濃度) で30~60分間インキュベートし、測定中、神経細胞は一定の環流液 (5 mM の KCl、2.5 mM の  $CaCl_2$ 、1 mM の  $MgCl_2$ 、10 mM の HEPES、10 mM の NaOH、所定濃度の NaCl、pH 7.4 (HCl による中和) に暴露し、環流液 (細胞外液) は室温下一定流速 (1 ml/min) で環流した。

10

**【0067】**

脊髄後根神経節の神経細胞における蛍光比 (F340/F380) の蛍光イメージング結果を図9 (参考写真4参照) 及び図10に示す。図9からわかるように、細胞外 NaCl 濃度を145~170 mM に上昇させると、野性型マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞の細胞内ナトリウムイオン濃度は急激に上昇し、そのまま定常状態に達したが、これに対し、遺伝子欠損マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞では、野性型マウスにおけるような細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は全く観察されなかった (図9aとb)。また、野性型マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞内ナトリウムの上昇は、すべての大きさの神経細胞で観察された (図9c)。これは  $Na_v2$  が全ての野性型マウスの脊髄後根神経節の神経細胞に発現することと一致する。

20

**【0068】**

また図10からわかるように、細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は、マンニトールを用いた浸透圧刺激や塩化コリンを用いた塩素イオン単独の刺激ではおこらず、メタンスルホン酸ナトリウムを用いたナトリウムイオン単独の刺激によって引き起こされた (図10a)。よってこの現象はナトリウムイオン濃度の上昇によってのみ引き起こされることがわかった。また、塩化ナトリウムを用いて、細胞外ナトリウム濃度を120、130、140、150、160、165、170、180、190、200 mM の10段階に調整し、細胞内ナトリウムイオン濃度の変化を解析したところ120~150 mMの間では全く反応が無く、160と165 mMの細胞外ナトリウムイオン濃度で上昇が観察され、170 mM以上の細胞外ナトリウムイオン濃度では、非常に大きな上昇が観察された (図10b)。このとき、細胞外ナトリウムを元の145 mMに戻すと、徐々に細胞内ナトリウム濃度は元に戻っていく様子が観察された。細胞内のナトリウムストアは存在しないことから、この細胞内ナトリウム濃度の上昇は、 $Na_v2$  チャネルを介した細胞外からの流入であると結論した。また、そのチャネル開口の閾値は160~170 mMの間にあると推察できる。

30

**【0069】**

この細胞外ナトリウムイオン濃度の上昇に伴う細胞内へのナトリウムの流入に  $Na_v2$  チャネル以外の分子が関与している可能性を検討するために、各種ナトリウムイオンポンプ、ナトリウムイオントランスポーター、ナトリウムイオンチャンネルの各ブロッカーの効果を調べた。その結果、TTX感受性の電位依存性ナトリウムチャンネル (図10c)、アミロライド感受性ナトリウムチャンネル (図10c)、ナトリウムグルコースコトランスポーター、ナトリウムカルシウムアンチポーター、ナトリウムカリウムクロライドトランスポーター、ナトリウムカリウムポンプの影響はないことがわかった。また、TTX非感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルは、小型の脊髄後根神経節の神経細胞に特異的に発現しているため、全ての大きさの細胞種に反応が見られるこの現象には関与していないと結論した。ナトリウムカルシウムアンチポーターに関しては、カルシウムイメージングによっても関与が無いことを確かめた (図10d)。

40

**【0070】**

脳弓下器官の神経細胞における蛍光比 (F340/F380) の蛍光イメージング結果を図11 (参考写真5参照) に示す。図11からわかるように、中枢神経系のナトリウムイ

50

オン濃度検出器官である脳弓下器官の神経細胞においても、脊髄後根神経節の神経細胞と基本的に同様の結果が得られた。ただし、脳弓下器官の神経細胞のうち約20から30%の細胞が、 $Na_v2$ 免疫陽性細胞であり、これら $Na_v2$ 免疫陽性細胞は細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇が観察されたが、 $Na_v2$ 免疫陰性細胞では、 $Na_v2$ 遺伝子欠損型マウスと同様に、細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は観察されなかった。これらのことから、脳弓下器官においても $Na_v2$ は、細胞外ナトリウムイオン濃度に依存して細胞内にナトリウムイオンを流入させるナトリウムチャンネルであることが証明できた。すなわち、 $Na_v2$ はナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネルという新規ナトリウムチャンネルであることがわかった。

【0071】

10

【発明の効果】

本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば $Na_v2$ チャンネル遺伝子欠損マウスは、塩分過剰摂取実験モデル動物として有用である。またこの $Na_v2$ チャンネル遺伝子欠損マウスを用いることにより、 $Na_v2$ チャンネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることや、 $Na_v2$ チャンネルが中枢神経系の限られた部位におけるニューロンや上皮細胞、特に体液ホメオスタシスに参与する脳室周囲器官で発現することや、 $Na_v2$ チャンネルが体液オスモル濃度知覚と食塩摂取行動の制御に重要な役割を果していることが明らかとなった。

【0072】

20

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by Director General of Okazaki National Research

Institutes

<120> Nav2 channel gene-deficient non-human animals

10

<130> U2001P059

<140>

<141>

<150> JP 2000/237320

20

<151> 2000-08-04

<150> JP 2000/241637

<151> 2000-08-09

<160> 8

30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 446

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

40

<400> 1

atgttgactt cccagagcc gaagggcctt gtccattca cggcagagtc acttgaactt 60  
 ataaaaaatc acattgctaa aaaatgcaac gaagagcatg aagaagaaga tttaaaacca 120  
 agccgggata tagaagcagg caaaaaactt ccatttgcct atggaacctt tctcaagga 180  
 accgtgtcag agcccttggga agatgtggat ccatactact atgttaagag aaatactttc 240  
 atggctctaa acagaaacag agtcatcttc aggttcaatg cggtttccat cctctgcacg 300  
 ttgtctcctt taagctctct cagaagagct gttatcaagg ttttgggtgca cccccctttg 360  
 cgctgtciga ttttaattag tgttctcacc gacagcatac ttatgtgcat gagtaacctt 420  
 ccggaatgga tattggcagt agagaa 446

<210> 2

<211> 5482

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(5297)

<400> 2

cacgcgtcga ctagiaccggg ggggggggag gggttggctt gtaggggttc tctgggtctg 60  
 tggagcttagc ctgggtggctg agtgttttagc tggaaagcagc agtggaccgc aaccacattg 120  
 caacaacctc cgtagiagag atctigagaag acaagcccag gagagcaaag ggcctctcgtg 180  
 agccttgcct ctgggggttct tgcctggagt tttagigaaga ctagcatttg acagcaacta 240  
 taaaaccgaa a atg ttg act tcc cca gag ccg aag ggc ctt gtc cca ttt 290

Met Leu Thr Ser Pro Glu Pro Lys Gly Leu Val Pro Phe

1

5

10

aca aca gag tca ctt gaa ctt ata gaa aat cac att gct aaa aaa tgc 338

Thr Thr Glu Ser Leu Glu Leu Ile Glu Asn His Ile Ala Lys Lys Cys

15

20

25

10

aat gaa gac ccc gaa gaa gaa gaa ggt tta aaa cca agt cgt aat cta 386

Asn Glu Asp Pro Glu Glu Glu Glu Gly Leu Lys Pro Ser Arg Asn Leu

30

35

40

45

gaa gct ggc aaa aga ctt cca att ccc tat gga acc ctc cct cga gga 434

Glu Ala Gly Lys Arg Leu Pro Ile Pro Tyr Gly Thr Leu Pro Arg Gly

50

55

60

20

acc gtg tca gag ccc ttg gaa gat gtg gat cca tac tac tat gtt aag 482

Thr Val Ser Glu Pro Leu Glu Asp Val Asp Pro Tyr Tyr Tyr Val Lys

65

70

75

aga aat act ttc atg gtc tta aac aga agc aga gtc atc ttc agg ttc 530

Arg Asn Thr Phe Met Val Leu Asn Arg Ser Arg Val Ile Phe Arg Phe

80

85

90

30

aat gcg gtt tcc atc ttc tgc aca ttg tct cct cta aac tcc ctc aga 578

Asn Ala Val Ser Ile Phe Cys Thr Leu Ser Pro Leu Asn Ser Leu Arg

95

100

105

aga gca gct atc aag gct ttg gtg cat ccc ctt ttt cgc ctg ctg att 626

Arg Ala Ala Ile Lys Ala Leu Val His Pro Leu Phe Arg Leu Leu Ile

40



110	115	120	125		
tta atc agc gtt ctc act gac agc ata ctt atg tgc atg agt aat cta				674	
Leu Ile Ser Val Leu Thr Asp Ser Ile Leu Met Cys Met Ser Asn Leu					
	130	135	140		
cca gaa tgg ata ttg gca ata gag aat act ttg ctt ggg att tac gca				722	10
Pro Glu Trp Ile Leu Ala Ile Glu Asn Thr Leu Leu Gly Ile Tyr Ala					
	145	150	155		
ttt gaa ata ctt gta aaa gtc att gca aga ggt atc tgg gca ggt tca				770	
Phe Glu Ile Leu Val Lys Val Ile Ala Arg Gly Ile Trp Ala Gly Ser					
	160	165	170		20
ttt tcc ttc ctt ggg gat ctt tgg aac tgg ctt gat ttc agt gta act				818	
Phe Ser Phe Leu Gly Asp Leu Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Thr					
	175	180	185		
ttg ttc gag cta atc aca agg ttt tca cct cta agc tcc ttt tta atg				866	
Leu Phe Glu Leu Ile Thr Arg Phe Ser Pro Leu Ser Ser Phe Leu Met					
	190	195	200	205	30
ctt aaa act atc aga act ttc cga att ttg aag att atc cct ttg aac				914	
Leu Lys Thr Ile Arg Thr Phe Arg Ile Leu Lys Ile Ile Pro Leu Asn					
	210	215	220		
cac ggc ctg cag tct att gtg atg aca ctg gcc cag tgt ttg aag aaa				962	
His Gly Leu Gln Ser Ile Val Met Thr Leu Ala Gln Cys Leu Lys Lys					40
	225	230	235		

cta ttt ggt gcc att gcc cta gct ctg ttt ttt ctg gct gtg ttt tca	1010	
Leu Phe Gly Ala Ile Ala Leu Ala Leu Phe Phe Leu Ala Val Phe Ser		
240 245 250		
cta ctt gga atg ggc ctc ttc atg ggc aac ctg aag cac aaa tgt ctg	1058	
Leu Leu Gly Met Gly Leu Phe Met Gly Asn Leu Lys His Lys Cys Leu		10
255 260 265		
cgg tgg cca gaa gaa aat gaa aat gaa acg ctg cac aac aga act gga	1106	
Arg Trp Pro Glu Glu Asn Glu Asn Glu Thr Leu His Asn Arg Thr Gly		
270 275 280 285		
agc ctt aac tat agt cca gaa aga ata aac ttc tac tac atg gaa gga	1154	20
Ser Leu Asn Tyr Ser Pro Glu Arg Ile Asn Phe Tyr Tyr Met Glu Gly		
290 295 300		
gcg aaa tat gct ctc ctt tgc ggc aac agg aca gat gct ggc cag tgt	1202	
Ala Lys Tyr Ala Leu Leu Cys Gly Asn Arg Thr Asp Ala Gly Gln Cys		
305 310 315		30
ccg gaa ggt tat gtg tgt gta aaa gaa ggc aca aat cct gac aat ggc	1250	
Pro Glu Gly Tyr Val Cys Val Lys Glu Gly Thr Asn Pro Asp Asn Gly		
320 325 330		
ttc aca agt ttt gac aac ttt ggc tgg tcc ctt ctt gct atg ttt cga	1298	
Phe Thr Ser Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Leu Leu Ala Met Phe Arg		
335 340 345		40

ttg atg aca cag gat tac cct gaa tta ctt tat cac cag atc ctt tat 1346  
 Leu Met Thr Gln Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Tyr His Gln Ile Leu Tyr  
 350 355 360 365

gct tca gga aag gtc tac atg ata ttt ttt gtt atg atc agt ttc tgg 1394  
 Ala Ser Gly Lys Val Tyr Met Ile Phe Phe Val Met Ile Ser Phe Trp  
 370 375 380

10

ttt gcc ttc tat ttg aca agt ttg ttc ttg ggc ata ctc act atg acc 1442  
 Phe Ala Phe Tyr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Thr  
 385 390 395

tat gaa aag gaa aag cag aga gcc tgt gag gaa tct gga ggc ctt gat 1490  
 Tyr Glu Lys Glu Lys Gln Arg Ala Cys Glu Glu Ser Gly Gly Leu Asp  
 400 405 410

20

ccc aaa tgt caa cag aca gtg aaa gaa ctc gac gaa gaa aat gac gca 1538  
 Pro Lys Cys Gln Gln Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Glu Asn Asp Ala  
 415 420 425

gct gag atg gaa act aca caa ata gaa atg aag aaa aga tcc cca act 1586  
 Ala Glu Met Glu Thr Thr Gln Ile Glu Met Lys Lys Arg Ser Pro Thr  
 430 435 440 445

30

tct ata aac acc aca ctg gat ata ctg gaa gac act acc ctc gga cac 1634  
 Ser Ile Asn Thr Thr Leu Asp Ile Leu Glu Asp Thr Thr Leu Gly His  
 450 455 460

40

aga gaa gaa cca gaa aca tcc agg aag aaa tgc cca ata tgt tgg cat 1682

Arg Glu Glu Pro Glu Thr Ser Arg Lys Lys Cys Pro Ile Cys Trp His		
465	470	475
aag ttt att aaa acc tgc ttc atc tgg aaa tgc tct ccc tgt tgg gta	1730	
Lys Phe Ile Lys Thr Cys Phe Ile Trp Lys Cys Ser Pro Cys Trp Val		
480	485	490
aaa ctg aac gag ttt gct gat aga gtt ata aca cac cca ttg gct gat	1778	
Lys Leu Asn Glu Phe Ala Asp Arg Val Ile Thr His Pro Leu Ala Asp		
495	500	505
ctt ttt ctt gtc atc tgc atc gtt tta aac ata tgc ttc ctc gcc cta	1826	
Leu Phe Leu Val Ile Cys Ile Val Leu Asn Ile Cys Phe Leu Ala Leu		
510	515	520
gaa cat ttt cca atg agc gag gag ctc agg tct ctc ctt cac gtt gga	1874	
Glu His Phe Pro Met Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Leu His Val Gly		
530	535	540
aat ttg gtt ttt att gga att tac aca ata gaa ctg att ttg aag ata	1922	
Asn Leu Val Phe Ile Gly Ile Tyr Thr Ile Glu Leu Ile Leu Lys Ile		
545	550	555
atc gct atg cat cca tat ggg tat ttt caa ata agc tgg aat att ttt	1970	
Ile Ala Met His Pro Tyr Gly Tyr Phe Gln Ile Ser Trp Asn Ile Phe		
560	565	570
gac agt ata ctt gtg gtt ttg gag tta aca gaa att tta cta gca gat	2018	
Asp Ser Ile Leu Val Val Leu Glu Leu Thr Glu Ile Leu Leu Ala Asp		

10

20

30

40

575	580	585		
gtt gaa gga cta gct gtt tta ata aca gtc cca ttg ata ttt ata aaa	2066			
Val Glu Gly Leu Ala Val Leu Ile Thr Val Pro Leu Ile Phe Ile Lys				
590	595	600	605	
ctg ggg aag tac gga cca cca ttt aag agt ttg atg cgc atc ctt ggt	2114			10
Leu Gly Lys Tyr Gly Pro Pro Phe Lys Ser Leu Met Arg Ile Leu Gly				
	610	615	620	
agc tca ttg atg gcc ctg aaa gat ttg gtc ctg ttg ctc tgc ata ttc	2162			
Ser Ser Leu Met Ala Leu Lys Asp Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Phe				
	625	630	635	20
gtt tac ttc tct gct gtg ttc ggc atg aag ctg ttt ggt cga agt tac	2210			
Val Tyr Phe Ser Ala Val Phe Gly Met Lys Leu Phe Gly Arg Ser Tyr				
	640	645	650	
aag gat tgt gtc tgc cac ata aag gaa gac tgc caa ccc caa cgc tgg	2258			
Lys Asp Cys Val Cys His Ile Lys Glu Asp Cys Gln Pro Gln Arg Trp				
	655	660	665	30
cac atg agt gac ttc ctt cat gcc tac atg acc gtg ttc cga atc ctc	2306			
His Met Ser Asp Phe Leu His Ala Tyr Met Thr Val Phe Arg Ile Leu				
	670	675	680	685
tgt gga gag tgg ata gag aca tta tgg gag tgt atg gag gtt gca ggc	2354			
Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Leu Trp Glu Cys Met Glu Val Ala Gly				40
	690	695	700	

cag gcc tgg tgt att cct ttt tac atg atg gtc att tta att gga aac	2402	
Gln Ala Trp Cys Ile Pro Phe Tyr Met Met Val Ile Leu Ile Gly Asn		
705	710	715
tta ttg ata ctt tac ctc ttt gtg aca ttg gtg agc tct ttc agt tac	2450	
Leu Leu Ile Leu Tyr Leu Phe Val Thr Leu Val Ser Ser Phe Ser Tyr		10
720	725	730
tat gat gct aca tcg gaa gtg aac aaa gaa gcc aaa aac ctt cag ctt	2498	
Tyr Asp Ala Thr Ser Glu Val Asn Lys Glu Ala Lys Asn Leu Gln Leu		
735	740	745
gcc atg gca agg ata aag tcg gga ata aac tcc atg ctt ctt aaa tta	2546	20
Ala Met Ala Arg Ile Lys Ser Gly Ile Asn Ser Met Leu Leu Lys Leu		
750	755	760
765		
atg tgc aca gaa aga agt gtt cct aca gaa gca aca gac caa ata tgt	2594	
Met Cys Thr Glu Arg Ser Val Pro Thr Glu Ala Thr Asp Gln Ile Cys		
770	775	780
gat cca agt gtt aaa gag aat att tct ggc cat act ctt tct gaa ctg	2642	
Asp Pro Ser Val Lys Glu Asn Ile Ser Gly His Thr Leu Ser Glu Leu		
785	790	795
agc aac acc caa act ttc ctc aga tat aag gac cag agc agc agc act	2690	
Ser Asn Thr Gln Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Asp Gln Ser Ser Ser Thr		
800	805	810
		40

gag aaa act cca gtg act gaa tct gag agt caa tct ctg att gct agt	2738	
Glu Lys Thr Pro Val Thr Glu Ser Glu Ser Gln Ser Leu Ile Ala Ser		
815	820	825
ccc agt gcc tct gaa act gtg ccg att gct tca gga gaa tct gat ata	2786	
Pro Ser Ala Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile		
830	835	840
845		845
		10
gaa aat ctg gat aac aag gag act cgg agc aag tct ggg aat gga ggc	2834	
Glu Asn Leu Asp Asn Lys Glu Thr Arg Ser Lys Ser Gly Asn Gly Gly		
850	855	860
agt aaa gag aaa atg aag cag tct agc tca tct gag tgc agc aca gtt	2882	
Ser Lys Glu Lys Met Lys Gln Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val		
865	870	875
		20
gat atc gct att tct gaa gaa gaa gaa atg gtc tat gaa cat gaa aag	2930	
Asp Ile Ala Ile Ser Glu Glu Glu Glu Met Val Tyr Glu His Glu Lys		
880	885	890
tca aag ctt cat aaa aat ggt tat gaa cgc aaa tct tca act ggt caa	2978	
Ser Lys Leu His Lys Asn Gly Tyr Glu Arg Lys Ser Ser Thr Gly Gln		
895	900	905
		30
atc agt aga gaa tct agg aat gga aag att tgg aaa aac atc agg aaa	3026	
Ile Ser Arg Glu Ser Arg Asn Gly Lys Ile Trp Lys Asn Ile Arg Lys		
910	915	920
925		925
		40
act tgc tgc aag ata gta gag aac agc tgg ttt gag tgt ttc att ggc	3074	

Thr Cys Cys Lys Ile Val Glu Asn Ser Trp Phe Glu Cys Phe Ile Gly			
	930	935	940
ctg gtc act ctg ctc tgc aca ggc act ctg gct ctt gaa gac ata tat			3122
Leu Val Thr Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr			
	945	950	955
			10
att gat cag aga aaa acc act aaa atc tta ctg gaa tat gcg gac atg			3170
Ile Asp Gln Arg Lys Thr Thr Lys Ile Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Met			
	960	965	970
ata ttt gca tac atc ttc att ctg gag atg ctt ctc aag tgg gtg gct			3218
Ile Phe Ala Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala			
	975	980	985
			20
tat ggc ttt aaa gcc ttt ttc tcc aac aac tgg tac aaa ctg gac ttt			3266
Tyr Gly Phe Lys Ala Phe Phe Ser Asn Asn Trp Tyr Lys Leu Asp Phe			
	990	995	1000
			1005
atg gtt gtt atc gtg ttt tgt ctt agc tta ata ggc aaa act cga gaa			3314
Met Val Val Ile Val Phe Cys Leu Ser Leu Ile Gly Lys Thr Arg Glu			
	1010	1015	1020
gat ctg aac cct ctg aca tca ata aag ttc ctt cga gca cta aga gtt			3362
Asp Leu Asn Pro Leu Thr Ser Ile Lys Phe Leu Arg Ala Leu Arg Val			
	1025	1030	1035
ctg tcg cag ttt gaa aga atg aag gtg gtc ctg aga gct ttg ata aaa			3410
Leu Ser Gln Phe Glu Arg Met Lys Val Val Leu Arg Ala Leu Ile Lys			
			40



1040	1045	1050		
aca acc tta ccc act gtg agc gtg ttt cta gtc tgc cta atg atc tgg	3458			
Thr Thr Leu Pro Thr Val Ser Val Phe Leu Val Cys Leu Met Ile Trp				
1055	1060	1065		
ctg ctt ttc agt gtt att gga gtg cag tta ttt gct ggc aag ttc tat	3506		10	
Leu Leu Phe Ser Val Ile Gly Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr				
1070	1075	1080	1085	
gaa tgc att gac cca aca aag gga gaa aga ttc cct gta ttt gaa gtt	3554			
Glu Cys Ile Asp Pro Thr Lys Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val				
	1090	1095	1100	20
atg aat aaa agt cag tgt gaa aaa ctg tta ttc aat gaa tca atg ccg	3602			
Met Asn Lys Ser Gln Cys Glu Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro				
	1105	1110	1115	
tgg gag aat gca aaa ctg aac ttt gat aat gtt gga aat ggt ttt ctt	3650			
Trp Glu Asn Ala Lys Leu Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu				
	1120	1125	1130	30
tct tta ctc caa gtg gca aca ttt aat gga tgg atc agt att atg aat	3698			
Ser Leu Leu Gln Val Ala Thr Phe Asn Gly Trp Ile Ser Ile Met Asn				
	1135	1140	1145	
tca gca att gat tct gtt ggt gta aac atg cag ccc agc ttt gag tac	3746			
Ser Ala Ile Asp Ser Val Gly Val Asn Met Gln Pro Ser Phe Glu Tyr				
1150	1155	1160	1165	40

aac ctc tac atg tat agt tac ttt atc atc ttt gtt atc ttt gga tta	3794	
Asn Leu Tyr Met Tyr Ser Tyr Phe Ile Ile Phe Val Ile Phe Gly Leu		
1170 1175 1180		
ttt ctt cct ctc tgt atg ctg att ggt gtt att att cgc aat ttc aac	3842	
Phe Leu Pro Leu Cys Met Leu Ile Gly Val Ile Ile Arg Asn Phe Asn		10
1185 1190 1195		
aag cag aaa att aag cag gga gga tca aac atc ttt ata aca gta aaa	3890	
Lys Gln Lys Ile Lys Gln Gly Gly Ser Asn Ile Phe Ile Thr Val Lys		
1200 1205 1210		
cag aaa aaa cag tac cgg gcc ctg aag aag ctc ttg tat gca gac gtc	3938	20
Gln Lys Lys Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val		
1215 1220 1225		
cag aaa cca aca ccc cgc ccc aga aac aaa ttc caa ggc ttc ctt ttt	3986	
Gln Lys Pro Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe		
1230 1235 1240 1245		30
gac cta gta aca cac cgt gtc ttt aat gtt atc atc ata ctt ctt atc	4034	
Asp Leu Val Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile		
1250 1255 1260		
tgt ttc caa gca aca acc att atg ata caa aag gat gag cag agt cca	4082	
Cys Phe Gln Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro		
1265 1270 1275		40

caa atg gaa act gcc atc ttc tgg atg aac tcc att ttt gtc atg ctg 4130  
 Gln Met Glu Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu  
 1280 1285 1290

ttc act ctg gaa tgc ata ctg aag ctc act gcc ttc cgt tgc cac tac 4178  
 Phe Thr Leu Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr  
 1295 1300 1305

10

ttc acc agt gca tgg aat gtt cat gac ttt atg gtg gtc att ttc tcc 4226  
 Phe Thr Ser Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser  
 1310 1315 1320 1325

att aca ggg ctg ctg cta ccc ttg aca ata gga caa tac ttt gtg cct 4274  
 Ile Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro  
 1330 1335 1340

20

cct tcc ctg gtg cag ctg att ctt ctc tct cga gtc atc cac atc ctg 4322  
 Pro Ser Leu Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu  
 1345 1350 1355

cgt cct ggg aaa gga ccg aag gtg ttc cat gac ctg atg ctt ccc ttg 4370  
 Arg Pro Gly Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu  
 1360 1365 1370

30

att ctg gcg ctc cca gca ttg ctg aac att agt ctt ctc atc ttc ctg 4418  
 Ile Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu  
 1375 1380 1385

40

gtc atg ttc atc tac gcc atc ttt gga atg tac aac ttt gcc tat gta 4466

Val Met Phe Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val				
1390	1395	1400	1405	
aag aaa gaa gcc gga att aat gat gtg tcc aac ttt gag acc ttt gga	4514			
Lys Lys Glu Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly				
1410	1415	1420		
				10
agc agt atg ctc tgt ctc ttc caa gtt aca acg ttt tct ggt tgg gac	4562			
Ser Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp				
1425	1430	1435		
ggg atg ctg gat gca att ttc aac agt cag tgg tct gac tgc gat cct	4610			
Gly Met Leu Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro				
1440	1445	1450		20
gat aaa att aat cca ggg act cag gtc aag gga gat tgt ggg agc cct	4658			
Asp Lys Ile Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro				
1455	1460	1465		
tct gtt ggg att tct tat ttt gtc agt tac atc ctc ata tca tgg ttg	4706			
Ser Val Gly Ile Ser Tyr Phe Val Ser Tyr Ile Leu Ile Ser Trp Leu				
1470	1475	1480	1485	30
atc att gtt aac atg tac att gtg ttg atc atg gag ttc tta agt att	4754			
Ile Ile Val Asn Met Tyr Ile Val Leu Ile Met Glu Phe Leu Ser Ile				
1490	1495	1500		
cct tct cag aaa aaa agc agg acc ttg agt gaa gat gac ttt agg aga	4802			
Pro Ser Gln Lys Lys Ser Arg Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Arg Arg				40

1505	1510	1515		
ttc ttc cgg gtg tgg aac agg ttt gac cct gat agg acc cag tac ata			4850	
Phe Phe Arg Val Trp Asn Arg Phe Asp Pro Asp Arg Thr Gln Tyr Ile				
1520	1525	1530		
gac tct agc aag ctt tct gat ttt gca gct gct ctg gat cct cct ctt			4898	10
Asp Ser Ser Lys Leu Ser Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu				
1535	1540	1545		
ttc atg gca aaa cca aac aag ggc cag ctt gtg gcc atg gat ctc ccc			4946	
Phe Met Ala Lys Pro Asn Lys Gly Gln Leu Val Ala Met Asp Leu Pro				
1550	1555	1560	1565	20
atg gct gcg gga gac aga atc cac tgc ctc gac att tta ctt gcc ttt			4994	
Met Ala Ala Gly Asp Arg Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Leu Ala Phe				
1570	1575	1580		
acg aaa aga gtg atg gga aag gat gag agg gtg gag aaa atc ctt tca			5042	
Thr Lys Arg Val Met Gly Lys Asp Glu Arg Val Glu Lys Ile Leu Ser				
1585	1590	1595		30
gag ata gaa tcc ggg ttc atg tta gcg aac cct ttc aaa atc act tat			5090	
Glu Ile Glu Ser Gly Phe Met Leu Ala Asn Pro Phe Lys Ile Thr Tyr				
1600	1605	1610		
gag ccg att aca act act ttg aaa cgc aaa caa gag gca gtt tca gca			5138	
Glu Pro Ile Thr Thr Thr Leu Lys Arg Lys Gln Glu Ala Val Ser Ala				40
1615	1620	1625		

acc atc atc cag cgt gca tat aaa agc tac cgc tta agg caa aat gac 5186  
 Thr Ile Ile Gln Arg Ala Tyr Lys Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Asp  
 1630 1635 1640 1645

aag aat gta tca gat act cct gct ata gat gac cgc aga gat gat ctt 5234  
 Lys Asn Val Ser Asp Thr Pro Ala Ile Asp Asp Arg Arg Asp Asp Leu 10  
 1650 1655 1660

act tct aaa ggt gct cac tct ggc aaa atc gag gag aag gca tct att 5282  
 Thr Ser Lys Gly Ala His Ser Gly Lys Ile Glu Glu Lys Ala Ser Ile  
 1665 1670 1675

cag acc cag att taa tgacacttcc cactttctact ttctttacat atgtccccaa 5337 20  
 Gln Thr Gln Ile  
 1680

gcactaaatg ttaactgac ttaagctgga gatcagaaac tagagataat gataacatct 5397

gtgtgcccag acatctccat gacaagctca gctttagggt cagtcttctg atgcatcaga 5457 30

aagacagcag ctcagcgttg ctgcg 5482

<210> 3

<211> 1681

<212> PRT

<213> Mus musculus 40

<400> 3

Met	Leu	Thr	Ser	Pro	Glu	Pro	Lys	Gly	Leu	Val	Pro	Phe	Thr	Thr	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Asn	His	Ile	Ala	Lys	Lys	Cys	Asn	Glu	Asp
			20					25					30		
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Lys	Pro	Ser	Arg	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly
		35					40					45			
Lys	Arg	Leu	Pro	Ile	Pro	Tyr	Gly	Thr	Leu	Pro	Arg	Gly	Thr	Val	Ser
	50					55					60				
Glu	Pro	Leu	Glu	Asp	Val	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Lys	Arg	Asn	Thr
	65				70					75					80
Phe	Met	Val	Leu	Asn	Arg	Ser	Arg	Val	Ile	Phe	Arg	Phe	Asn	Ala	Val
				85					90					95	
Ser	Ile	Phe	Cys	Thr	Leu	Ser	Pro	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Arg	Ala	Ala
			100					105						110	
Ile	Lys	Ala	Leu	Val	His	Pro	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser
		115					120					125			
Val	Leu	Thr	Asp	Ser	Ile	Leu	Met	Cys	Met	Ser	Asn	Leu	Pro	Glu	Trp
		130					135					140			
Ile	Leu	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Phe	Glu	Ile
	145				150					155					160
Leu	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	Ile	Trp	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Phe
				165					170					175	
Leu	Gly	Asp	Leu	Trp	Asn	Trp	Leu	Asp	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Glu
			180					185						190	
Leu	Ile	Thr	Arg	Phe	Ser	Pro	Leu	Ser	Ser	Phe	Leu	Met	Leu	Lys	Thr
			195				200						205		
Ile	Arg	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Lys	Ile	Ile	Pro	Leu	Asn	His	Gly	Leu
					210			215							220

10

20

30

40

Gln Ser Ile Val Met Thr Leu Ala Gln Cys Leu Lys Lys Leu Phe Gly	
225	230 235 240
Ala Ile Ala Leu Ala Leu Phe Phe Leu Ala Val Phe Ser Leu Leu Gly	
	245 250 255
Met Gly Leu Phe Met Gly Asn Leu Lys His Lys Cys Leu Arg Trp Pro	
	260 265 270
Glu Glu Asn Glu Asn Glu Thr Leu His Asn Arg Thr Gly Ser Leu Asn	10
	275 280 285
Tyr Ser Pro Glu Arg Ile Asn Phe Tyr Tyr Met Glu Gly Ala Lys Tyr	
	290 295 300
Ala Leu Leu Cys Gly Asn Arg Thr Asp Ala Gly Gln Cys Pro Glu Gly	
305	310 315 320
Tyr Val Cys Val Lys Glu Gly Thr Asn Pro Asp Asn Gly Phe Thr Ser	
	325 330 335
	20
Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Leu Leu Ala Met Phe Arg Leu Met Thr	
	340 345 350
Gln Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Tyr His Gln Ile Leu Tyr Ala Ser Gly	
	355 360 365
Lys Val Tyr Met Ile Phe Phe Val Met Ile Ser Phe Trp Phe Ala Phe	
	370 375 380
	30
Tyr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Thr Tyr Glu Lys	
385	390 395 400
Glu Lys Gln Arg Ala Cys Glu Glu Ser Gly Gly Leu Asp Pro Lys Cys	
	405 410 415
Gln Gln Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Glu Asn Asp Ala Ala Glu Met	
	420 425 430
Glu Thr Thr Gln Ile Glu Met Lys Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ile Asn	
	435 440 445
	40
Thr Thr Leu Asp Ile Leu Glu Asp Thr Thr Leu Gly His Arg Glu Glu	



450		455		460											
Pro	Glu	Thr	Ser	Arg	Lys	Lys	Cys	Pro	Ile	Cys	Trp	His	Lys	Phe	Ile
465				470						475					480
Lys	Thr	Cys	Phe	Ile	Trp	Lys	Cys	Ser	Pro	Cys	Trp	Val	Lys	Leu	Asn
				485						490					495
Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Val	Ile	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Asp	Leu	Phe	Leu
				500						505					510
Val	Ile	Cys	Ile	Val	Leu	Asn	Ile	Cys	Phe	Leu	Ala	Leu	Glu	His	Phe
				515						520					525
Pro	Met	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	His	Val	Gly	Asn	Leu	Val
				530						535					540
Phe	Ile	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Glu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ile	Ile	Ala	Met
545															
His	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Gln	Ile	Ser	Trp	Asn	Ile	Phe	Asp	Ser	Ile
				565						570					575
Leu	Val	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	Val	Glu	Gly
				580						585					590
Leu	Ala	Val	Leu	Ile	Thr	Val	Pro	Leu	Ile	Phe	Ile	Lys	Leu	Gly	Lys
				595						600					605
Tyr	Gly	Pro	Pro	Phe	Lys	Ser	Leu	Met	Arg	Ile	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu
				610											
Met	Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Ile	Phe	Val	Tyr	Phe
625															
Ser	Ala	Val	Phe	Gly	Met	Lys	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Asp	Cys
				645						650					655
Val	Cys	His	Ile	Lys	Glu	Asp	Cys	Gln	Pro	Gln	Arg	Trp	His	Met	Ser
				660						665					670
Asp	Phe	Leu	His	Ala	Tyr	Met	Thr	Val	Phe	Arg	Ile	Leu	Cys	Gly	Glu
				675						680					685



915	920	925	
Lys Ile Val Glu Asn Ser Trp Phe Glu Cys Phe Ile Gly Leu Val Thr			
930	935	940	
Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr Ile Asp Gln			
945	950	955	960
Arg Lys Thr Thr Lys Ile Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Met Ile Phe Ala			
	965	970	975
Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe			10
	980	985	990
Lys Ala Phe Phe Ser Asn Asn Trp Tyr Lys Leu Asp Phe Met Val Val			
	995	1000	1005
Ile Val Phe Cys Leu Ser Leu Ile Gly Lys Thr Arg Glu Asp Leu Asn			
1010	1015	1020	
Pro Leu Thr Ser Ile Lys Phe Leu Arg Ala Leu Arg Val Leu Ser Gln			20
1025	1030	1035	1040
Phe Glu Arg Met Lys Val Val Leu Arg Ala Leu Ile Lys Thr Thr Leu			
	1045	1050	1055
Pro Thr Val Ser Val Phe Leu Val Cys Leu Met Ile Trp Leu Leu Phe			
	1060	1065	1070
Ser Val Ile Gly Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile			
1075	1080	1085	30
Asp Pro Thr Lys Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val Met Asn Lys			
1090	1095	1100	
Ser Gln Cys Glu Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro Trp Glu Asn			
1105	1110	1115	1120
Ala Lys Leu Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Leu			
	1125	1130	1135
Gln Val Ala Thr Phe Asn Gly Trp Ile Ser Ile Met Asn Ser Ala Ile			40
	1140	1145	1150

Asp Ser Val Gly Val Asn Met Gln Pro Ser Phe Glu Tyr Asn Leu Tyr	
1155	1160 1165
Met Tyr Ser Tyr Phe Ile Ile Phe Val Ile Phe Gly Leu Phe Leu Pro	
1170	1175 1180
Leu Cys Met Leu Ile Gly Val Ile Ile Arg Asn Phe Asn Lys Gln Lys	
1185	1190 1195 1200
Ile Lys Gln Gly Gly Ser Asn Ile Phe Ile Thr Val Lys Gln Lys Lys	10
1205	1210 1215
Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val Gln Lys Pro	
1220	1225 1230
Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe Asp Leu Val	
1235	1240 1245
Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile Cys Phe Gln	
1250	1255 1260
Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro Gln Met Glu	
1265	1270 1275 1280
Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu Phe Thr Leu	
1285	1290 1295
Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr Phe Thr Ser	
1300	1305 1310
Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser Ile Thr Gly	30
1315	1320 1325
Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro Pro Ser Leu	
1330	1335 1340
Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu Arg Pro Gly	
1345	1350 1355 1360
Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu Ile Leu Ala	
1365	1370 1375
Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu Val Met Phe	40

1380	1385	1390	
Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val Lys Lys Glu			
1395	1400	1405	
Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly Ser Ser Met			
1410	1415	1420	
Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp Gly Met Leu			
1425	1430	1435	10
Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro Asp Lys Ile			
1445	1450	1455	
Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro Ser Val Gly			
1460	1465	1470	
Ile Ser Tyr Phe Val Ser Tyr Ile Leu Ile Ser Trp Leu Ile Ile Val			
1475	1480	1485	
Asn Met Tyr Ile Val Leu Ile Met Glu Phe Leu Ser Ile Pro Ser Gln			20
1490	1495	1500	
Lys Lys Ser Arg Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Arg Arg Phe Phe Arg			
1505	1510	1515	
Val Trp Asn Arg Phe Asp Pro Asp Arg Thr Gln Tyr Ile Asp Ser Ser			
1525	1530	1535	
Lys Leu Ser Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Met Ala			
1540	1545	1550	30
Lys Pro Asn Lys Gly Gln Leu Val Ala Met Asp Leu Pro Met Ala Ala			
1555	1560	1565	
Gly Asp Arg Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Leu Ala Phe Thr Lys Arg			
1570	1575	1580	
Val Met Gly Lys Asp Glu Arg Val Glu Lys Ile Leu Ser Glu Ile Glu			
1585	1590	1595	
Ser Gly Phe Met Leu Ala Asn Pro Phe Lys Ile Thr Tyr Glu Pro Ile			40
1605	1610	1615	

Thr Thr Thr Leu Lys Arg Lys Gln Glu Ala Val Ser Ala Thr Ile Ile  
                   1620                                  1625                                  1630  
 Gln Arg Ala Tyr Lys Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Asp Lys Asn Val  
                   1635                                  1640                                  1645  
 Ser Asp Thr Pro Ala Ile Asp Asp Arg Arg Asp Asp Leu Thr Ser Lys  
                   1650                                  1655                                  1660  
 Gly Ala His Ser Gly Lys Ile Glu Glu Lys Ala Ser Ile Gln Thr Gln  
 1665                                  1670                                  1675                                  1680  
 Ile

10

<210> 4

<211> 6927

20

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 4

aagctttact ctcacagaga aaagctttct gagtgatcaa ttgccaacga tacaacctca 60  
 ccttagtita cctgacctg tgaagatgg ccttcaacag tggagaataa ggagttctag 120  
 ctgagatgtt tcattaagcg acatattcat ggatcagctt ttgatggcag attttcaggc 180  
 tcctttctc cactgccaat aattttacaa aacacaattt taaaattgta gtccttatgg 240  
 gaaacaattc atcctataga tttgttcaag gacaaaacat tttcactcct gggcagtttt 300  
 gtgttccct tcctcactg tcatggcgct aaagcggtag ctcacccca gattaggggc 360  
 ccaggigtiaa ttgttcttaa gtcigaaatt gtaggggaga gttctttgaa ctcactcctt 420  
 catgagtica aagaacatat gacaacttat tgatagaatg actttacaca tggccatatt 480  
 ttacacattt actatittac aggtataaaa ccgaaaatgt tgacttcccc agagccgaag 540  
 ggcttgtcc catttacaac agagtcactt gaacttatag aaaatcacat tgctaaaaaa 600  
 tgcaatgaag accccgaaga agaagaaggi ttaaaaccaa gtcgtaatct agaagctggc 660

30

40

aaaagacitc caaticccta tggAACcctc cctcGaggaa cCGtGtcaga gCccTtggaa 720  
 gatgtggatc catactacta tGttaagaga aatGtaagta ttaactgita tcattgaagc 780  
 tatatititac ttcGcttata ttcagccact tGaaatgtaa ttgagataag acttaaagaa 840  
 aattaataga gaaggcattc tttcataatc tattctttgt gggggtcAAC atgctcaaga 900  
 tagttaaacC tgataaaata tctgagtaat atattatggt taatgaccgt agtatatata 960  
 ctgctattcc ttaatataag tggctattgt gaaaatatgc taattaccat tttctgatta 1020  
 gcaattitaa aacaatcatg aatatittag aatatggaca gaaatttcaa ataccttgat 1080  
 aacttactag tcaaacagct acattitatt ttaatcatal ataaatccac aaattcaaac 1140  
 ctccctcatt tccaggaaga ctttagagac ctagaaatta tGtatacaca aacacacaca 1200  
 cacacataca cacacacaca cgcacacgca aatgcacacc ctaccatcac aaacacaaaa 1260  
 taagtacaag aatgatttct gttagaaaat tcagacatgt ggattgatga agatagatga 1320  
 gtcttgtttc aaaagcatgg tttgggggct ggagaaatgt ctCagtttct aatagcactg 1380  
 gctgttcttc tggacgtcat aagattgatt gcagtcctg tacagtaggt cacagccttt 1440  
 tGtaactcta gtccagaag atttgacctt cttttggcca ctatgggcac tgggaatgca 1500  
 aataattcat atatgcacac agtgaagaca tctatatact tGaaatgaga taaaatttta 1560  
 ggtacagctt gcagaatact tggaaattta ataaagccaa ggtagaacag ttttaaggaca 1620  
 aatggaaagg caacagccaa gattgatctt acaagagggc atagaaaggg ctgtgctatt 1680  
 actggaaaat cagttatgtt gttgactgtg gcaaacatga gagagtggag gtgtcatcat 1740  
 ggaattactg tagtggacaa ggtcatttgg ggtgaatgtg gcagatgaat aaaaccaagc 1800  
 taataccttt cttaattaaa agaaaagtga tcaatacaga aaataaaata gaacataaaa 1860  
 gacagggaga aatataaggt agagaagagg aggagagaaa gagatgaggg agaagagaag 1920  
 gggtgagaat gggaaagagga agagaagaga gataggtaga aatgaagaga ggggaggaag 1980  
 ggacttgiat attacagtta atttacctag tGtacaaact gatagtictt agtataaatg 2040  
 gcttttatgt aaatatgatg attactgtct tctaattatc tatttttaa taatcataaa 2100  
 atatttacac tataaaagaa aaagagagaa ggaggagaga aagaacaaga aggaaatagg 2160  
 gtagagggaa ccttgagatt cagtgtctat gtcaggaaaa gaaacagtaa aatatgactg 2220  
 atgaaaaatg ccaatgtctg tagcttGaaa gagtgaagtt acattgacag aaagtGaaat 2280  
 aaagtttatt tacttagcatc ttgatattca tGtatcatal tCactgatgt tatatctaata 2340  
 gaggagaiga gactgaacga aaatactcgc agaaaaatac attcattgca taactgttcc 2400

10

20

30

40

tataataatg tcatgggtgc atttgaata ttttaaggac attttagtta aaatgcaagt 2460  
tcagtcctca tttgtattgt tctggcactc accttgggtt gtgcttgagt tgataatggc 2520  
cagtaacctt aggattgctt gtcaatatg cagccatctt aatactgagt aaggtatgca 2580  
ggcatgctag acatgggaat actgccattg aagataaaat caaagctctt aagaaacaaa 2640  
acaaatactt tatgacaggc cccatgtcca gcagtagttg gccaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700  
ttgtgatfff gattcttttg tcaggggtggc atgtttggag acagggattc cctgagtagc 2760  
cctggctgtc ctggaactca ctctgcagtc caggctggcc tcgaactcag agatctgctt 2820  
gcttcgtctt tctgagttct aggattacgg gtataagttt ttattaaaag tataaggctt 2880  
tgctttttgt tgttttttt tttgtttgt ttgtttgtt ttgtttttgg ttggtttgtt 2940  
ttgtttgtt tgggtgggtt ggtggtagtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3000  
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtggaggg agagagagag tgtgctgitt ctgttggaa 3060  
ttttgtcat tttcttttaa ctgtttatgt ttggtttct ttgagaaaga atgaaggaac 3120  
ctgaagtigg ttggatacgg gtgtggggag gatcttggaa tgagttgaga aaggacaaag 3180  
aatataatca aagcttacta tatgaaaaat taaataaaat gtgaaataac tacaaaaatc 3240  
tcaaaacaac attttagagt atttaggata ctagcagcta tgaggcccat gggttgaaat 3300  
ttgccagiga ctctatgcac tctaaagcct gcaaatgtga ctctatgaac tctgaagcct 3360  
gccagggiga ctctatgctc ttggaagcct gactgggtga ctttatgcac tcagtgtctc 3420  
tctcagtaac atcacactgt tcaagtatct gggttgtatt tggettactc tcttacacat 3480  
agcacagaga caaataatca taaaattaa actatgtatg aaatcaggag aaaacctgaa 3540  
agtacgcata ccttcacaat gacacacaca tatattgaac tccacatgga gtcigcaatt 3600  
gttttgggaag ctactatgga aagtagaatt tacacaacca ggtatattat ttgtttctac 3660  
ctgttttatt taagtggaga tgggagaata ggtacaatag ttaaacaag cctcatagca 3720  
gttatatatt gaactacact tatctgagaa ttgagaccca gtagtagatt cagttagagc 3780  
agacatgcat ggagaagtgt tggcagttgt atattcttat aatttctttt tcatatgctt 3840  
ctgtcaacat aggaagcaat aagtcatacc tccatataca ttatcagaat atatggtaga 3900  
ctgtatagtc tattctattg catataagat taatitttaa gccaggcctt ctggcagggc 3960  
tataattctc aaacaacaaa gtattgcaga ttcaagtcct ctgtggctca aacigtgagt 4020  
tcaaggtcag ccttaacaat ttaatgaaat ctattttcaa gagaaaaaga atataaagat 4080  
cctcaggaga aataatggaa gagagtttgc ccagcacaca tgaggccctt gtcacagagg 4140

10

20

30

40



aagaaaat tacatattt ttattataa aaatatagtt atcttattat ataacatgct 4200  
atgttatgtt atgttttatg ttataacaca tgacatttaa tctcatagtt ttcagaatta 4260  
actggatitt cagtgtagc tggatcaaac tcagggcctg ctgaagggg acaaaacact 4320  
gttcttcaag ttacattacc agacagtaca tgtaaatgca cccctacatt aatactttct 4380  
ctgaagggac atatatagta aacacacaca cacacacaca cacacatata tatatatata 4440  
catatacaca cacacatata tatatacact ttcaattacc atatataata tataccatat 4500  
acattatagt aatgttcatt tataatgaaca aatgtaaaaa tgagcacaca tatgtatgaa 4560  
tgtacataag cccacatgta catatgtata aataagccca tccacctacc tatatatgta 4620  
acaatgtctg ttttgaata tttatgtttc ttactatatt tattaagact tagtacttta 4680  
gtatccaaa tcttgtgtt tatattacat aaattactat ttttagatag gtccatatca 4740  
ataatattaa ataagttagg ttttgtaaaa acattaatth ttaggattta ccttgtaatt 4800  
gttttatttt tttattgat attttcttta tttacatttc aaatgctttc ccgaaagtc 4860  
cctataccct cccacctccc tgcctcccta ctaccctact cccatttctt ggccctgggtg 4920  
ttccctgta ttggggcata taaagtttgc aagaccaagg ggtctctatt cccaatgatg 4980  
gccgactagg ccacttctg ctacatattc agctagagac acgagctctg gggatactgg 5040  
ttaataattg ttttattttt aatataattt atttaaaata gaattacata aattatectc 5100  
ttattttctc ccttacagtg tctccctcat aaataatata aacaattgat gtgagatttg 5160  
accattgctt ttataacact tcattgactt ttttctgat ataaaattaa aatttttaca 5220  
ttcattaagt tatgagataa aggccctctg atgctttgaa tgcaaatcca cacaccatct 5280  
gaagagtttc ttttctatta gtccaagggtg tgattgcacc ataatgactt tcttaagtac 5340  
aaaccagcaa aaaataaata aattaaattaa ttattaaaaat aaaataagtg gtgagctatc 5400  
aggcaagtc aaatataagt gaaaactact cctttgctt taaaaacaaa tgcataagcc 5460  
aatgaaaata tgaataaatt tcaaacttgg gagcatttgg aatatgttgc ttcagttctc 5520  
cattctgttt gttaatgtct tctctgttgg tcttacaga ctttcatgggt cttaaacaga 5580  
agcagagica tcttcagggt caatgcgggt tccatcttct gcacattgtc tccctaac 5640  
tccctcagaa gagcagctat caaggctttg gtgcatccat atcctttcaa agtgtgatgg 5700  
gttgtgtcat cggcatacta aaaataagtc ctgatttcti gctattcaac cctgtttgta 5760  
gtaatattha acaaatatca attcttattc ttcaaataga atgacatgta ttttcaatat 5820  
ttacaaaaga atctgcccc ttatacttac agatgcaatt tactggctt ttgtaattgtg 5880

10

20

30

40

atttttttc cattattcct tgaccttggc ttacctttt tgccttctg attttaatca 5940  
 gcgtttcac tgacagcata cttatgtgca tgagtaatct accagaatgg atattggcaa 6000  
 tagagtaagt tacttagttt tgctatatat aataaagtct gtaattatat ttgggtttta 6060  
 acattttaat atttattgta ttccattaaa ttacaaaaac atgttatgaa atgaaacatg 6120  
 atactatita aatttttaaa tgtttaaaaa agttataaag acaagaggtt tgtttcactc 6180  
 acagcttga aggttcaaga gcacctatgc tgttcagctt cagggacaat taggtcctct 6240  
 cacctaatta accigtggcc tgttgaaaca ggagaagctc tttcagaagc agccattcat 6300  
 gtcttgaigc tgtaagccca tgactgggat gaagcctgcc acaactttc tcttactctt 6360  
 ctigtgggtc ttgtgcaaac aagcaggcat gcgctccagt gccacaagga ccttcaagtg 6420  
 caceccagct ctagtctcc gtaaactctt gcctcaccat gatcgggatc aagttctaaa 6480  
 tatgtagaat atgttagaca tctgaaaaca aacctcatct tcatattct tttctgtata 6540  
 tactcgtatg ttigtggggc atagcaatat gaacaccatg actaaatitt ctaaataaaa 6600  
 caaacatgta tatgcacata cacatatata tagatgtata ttcataaatt tggggtttta 6660  
 ttttgcctt tcattctctt tacttaattc ctgttgggtg tattttattt gattcatggt 6720  
 cttatacca ctigcctttg actcctgttc cagactcttg aatccctggaa ttacatcttc 6780  
 ttatcagac ttacatate tacagttcta tatagactga aggtttaatt atattaatta 6840  
 attatgtica ttggaatatt taggtccttt gctaaatgta tataccaatg ttaccctcat 6900  
 gcttgtttc ttccttattt aaagctt 6927

10

20

<210> 5

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer1

40

<400> 5

atgttgactt ccccagagcc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer2

<400> 6

aaccaggcaa agcgccattc

20

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer3

30

<400> 7

catcttccaa gggctctgac a

21

<210> 8

<211> 16

40

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Ser Val Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile Lys

1

5

10

15

10

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスの遺伝子地図(a)、ゲノムDNAのサザンプロットの結果(b)、ゲノムPCRの結果(c)及びウエスタンブロットの結果(d)を示す図である。

【図2】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスの胚、脊髄神経節及び胸部における lacZ 発現部位を示す図である。

【図3】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスの脳における lacZ 発現部位を示す図である。

【図4】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスにおける Fos 核タンパクの発現に対する水分飢餓の及ぼす影響に関する結果を示す図である。

20

【図5】本発明におけるマウス  $N a_v 2$  チャネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響に関する結果を示す図である。

【図6】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスにおける各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の結果を示す図である。

【図7】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスにおける24時間水分飢餓の前後において0.3MのNaClに対する嗜好率と総摂取量の測定結果を示す図である。

【図8】本発明の  $N a_v 2$  ノックアウトマウスにおけるナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験の結果を示す図である。

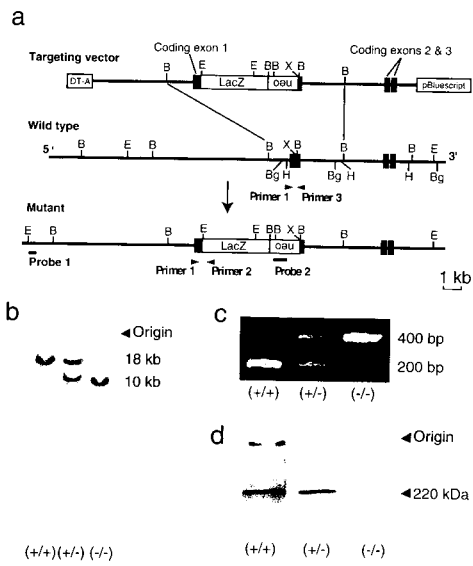
【図9】野性型マウス及び  $N a_v 2$  遺伝子欠損型マウスから調製した脊髄後根神経節の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比(F340/F380)の蛍光イメージング結果を示す図である。

30

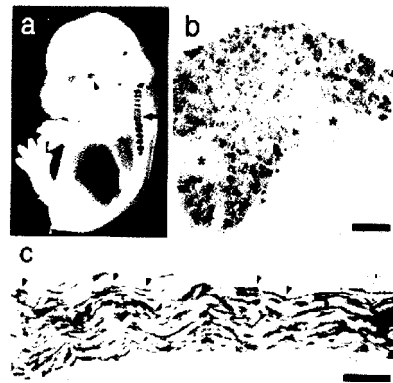
【図10】野性型マウス及び  $N a_v 2$  遺伝子欠損型マウスから調製した脊髄後根神経節の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比(F340/F380)の蛍光イメージング結果を示す図である。

【図11】野性型マウス及び  $N a_v 2$  遺伝子欠損型マウスから調製した脳弓下器官の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比(F340/F380)の蛍光イメージング結果を示す図である。

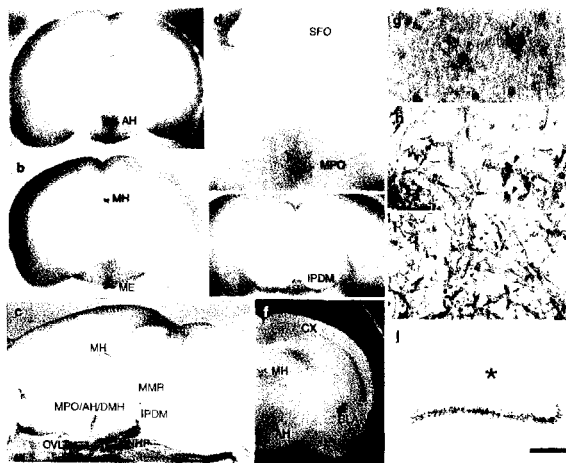
【 図 1 】



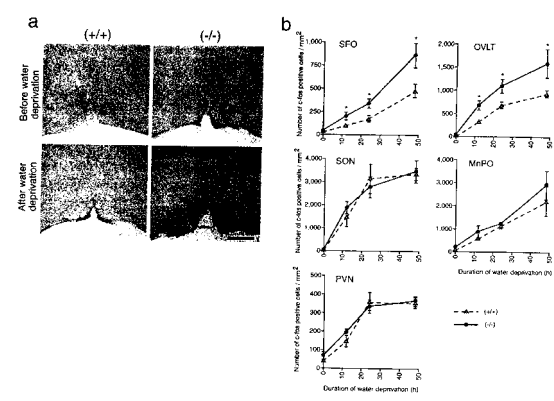
【 図 2 】



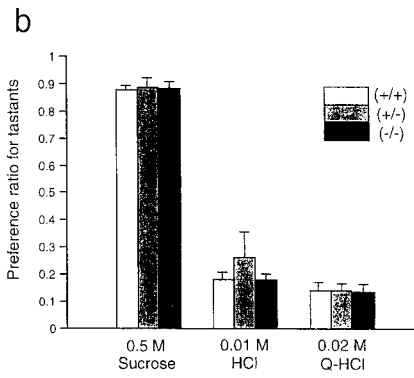
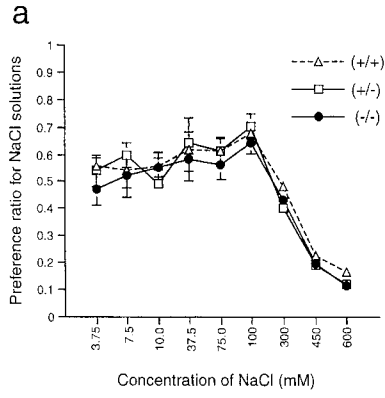
【 図 3 】



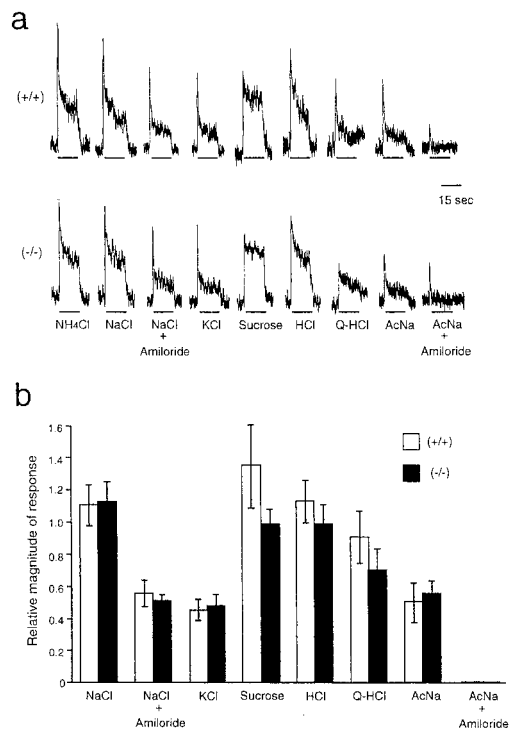
【 図 4 】



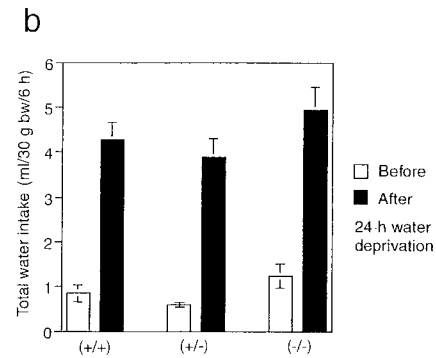
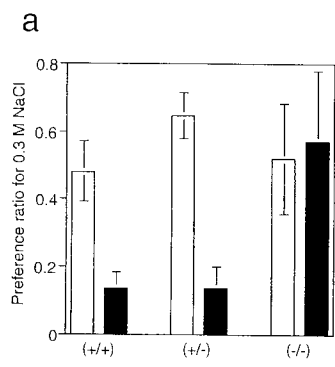
【 5 】



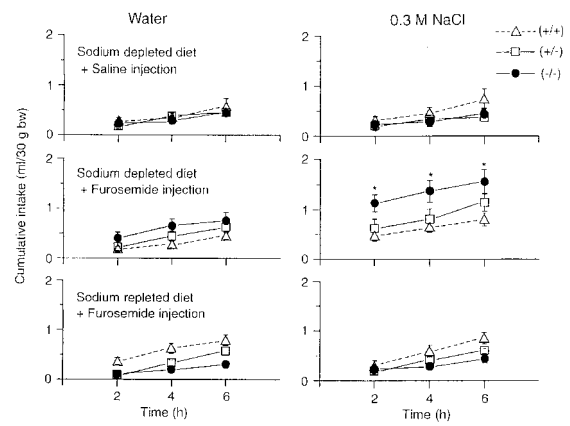
【 6 】



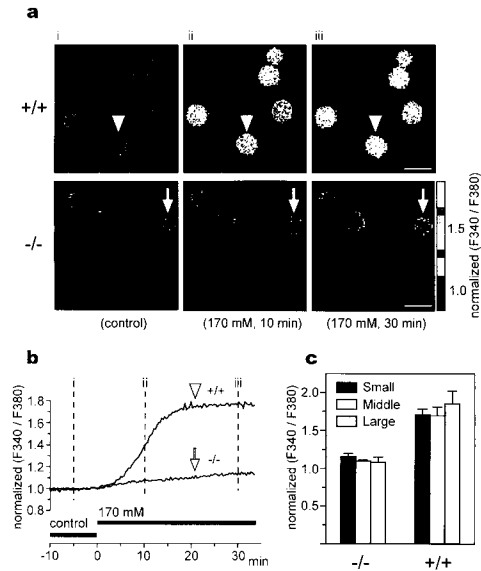
【 7 】



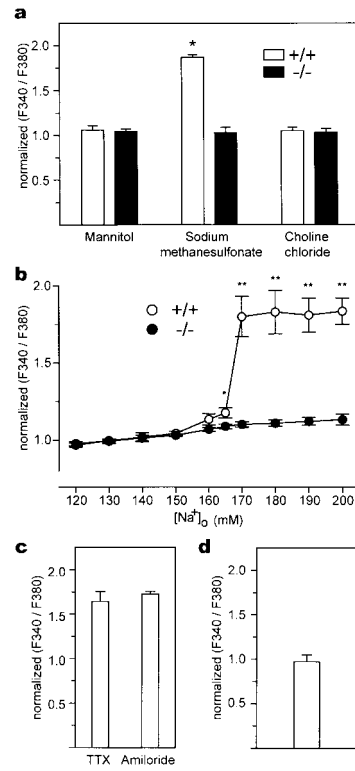
【 8 】



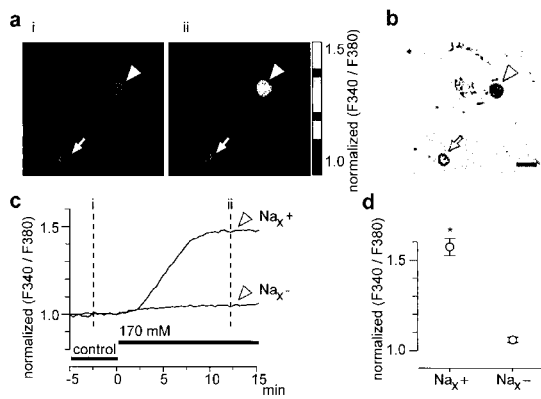
【 9 】



【 10 】



【 11 】



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第99/046393(WO,A1)  
特開平09-009964(JP,A)  
国際公開第00/014266(WO,A1)  
J.Biol.Chem., vol.269(48), pp.30125-30131 (1994)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00  
A01K 67/027  
C12N 15/00  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)