

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
A01K 67/027		A01K 67/027	2G045
A61K 38/00		A61K 45/00	4B024
45/00		A61P 3/12	4B064
A61P 3/12		25/00	4B065
25/00		C07K 14/47	4C084

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全40頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 222263(P 2001 - 222263)

(22)出願日 平成13年 7 月23日(2001.7.23)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 237320(P2000 - 237320)

(32)優先日 平成12年 8 月 4 日(2000.8.4)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 241637(P2000 - 241637)

(32)優先日 平成12年 8 月 9 日(2000.8.9)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 391012718

岡崎国立共同研究機構長

愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地

(72)発明者 野田 昌晴

愛知県岡崎市竜美台 2 丁目 7 番地 9

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 N a V 2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物

(57)【要約】

【課題】 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 N a v 2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 ラット N a G c D N A をプローブとして、マウスのゲノム D N A ライブラリーをスクリーニングし、ゲノム D N A の N a v 2 遺伝子を単離し、 N a v 2 のエキソン部分に、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 E S 細胞に導入し、相同的組換えを起こした E S 細胞を選択し、この E S 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同士を交配させることによって N a v 2 ノックアウトマウスを作製する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 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ことを特徴とするヌル変異非ヒト動物。

【請求項 2】 Nav2 遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項 1 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 3】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 2 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 4】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 3 記載のヌル変異非ヒト動物。

【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をコードする遺伝子。

【請求項 6】 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るタンパク質、又は配列番号 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である請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 7】 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または全部を含む DNA からなる請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 8】 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または全部を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA からなる請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 9】 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。

【請求項 10】 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなる請求項 9 記載のタンパク質。

【請求項 11】 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請求項 9 記載のタンパク質。

【請求項 12】 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。

【請求項 13】 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が、請求項 10 又は 11 記載のタンパク質である請求項 12 記載の融合タンパク質。

【請求項 14】 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。

【請求項 15】 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が、請求項 10 又は 11 記載

のタンパク質である請求項 14 記載の抗体。

【請求項 16】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 14 又は 15 記載の抗体。

【請求項 17】 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。

10 【請求項 18】 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が、請求項 10 又は 11 記載のタンパク質である請求項 17 記載の宿主細胞。

【請求項 19】 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過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物。

20 【請求項 20】 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が、請求項 10 又は 11 記載のタンパク質である請求項 19 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 21】 非ヒト動物が、マウス又はラットである請求項 19 又は 20 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

30 【請求項 22】 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ことを特徴とす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 23】 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が、請求項 17 又は 18 記載の宿主細胞である請求項 22 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。

40 【請求項 24】 請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の非ヒト動物又は請求項 19 ~ 21 のいずれか記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とす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。

50 【請求項 25】 請求項 22 ~ 24 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とす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。

【請求項 26】 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を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ~ 11 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 25 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若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物。

【請求項 27】 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られる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ~ 11 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 25 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若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物。

【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、 $Na_v 2$ 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。

【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、270kDa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 ~ -90mV)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、1ms程度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。

【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、ノーザンブ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 、 $NaCH 6$ 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。

【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 $Na G$ 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 $Na_v 2.1$ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4893-4897(1992))、マウスの動脈腫瘍細胞株からの $Na_v 2.3$ (J. Biol. Chem. 269, 30125-30131) 及び $Na G$ 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 $SC L 11$ 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 $2 NaCh (Na_v 2)$ 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、 $Na_v 2$ 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 $Na_v 2$ チャンネルをアフリカツメガエル卵母細胞、CHO 細胞、HEK 293 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 $Na_v 2$ チャンネルの機能については全くわかっていなかった。

【0005】 $Na G / SC L 11$ 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ンネル ($NaCh$) 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 $Na_v 2$ 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))。 $Na G$ 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、NaGのmRNAが中枢神経系に存在することがRNAse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、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。NaGチャネルがこのように幅広い組織、電気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、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Nav2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Nav2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、Nav2チャネルノックアウトマウスを作製し、Nav2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Nav2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ことを特徴とするヌル変異非ヒト動物(請求項1)や、Nav2遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項1記載のヌル変異非ヒト動物(請求項2)や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項2記載のヌル変異非ヒト動物(請求項3)や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項3記載のヌル

変異非ヒト動物(請求項4)に関する。

【0009】また本発明は、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(請求項5)や、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るタンパク質、又は配列番号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である請求項5記載の遺伝子(請求項6)や、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または全部を含むDNAからなる請求項5記載の遺伝子(請求項7)や、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または全部を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなる請求項5記載の遺伝子(請求項8)に関する。

【0010】また本発明は、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(請求項9)や、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなる請求項9記載のタンパク質(請求項10)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請求項9記載のタンパク質(請求項11)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(請求項12)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が、請求項10又は11記載のタンパク質である請求項12記載の融合タンパク質(請求項13)に関する。

【0011】また本発明は、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に特異的に結合する抗体(請求項14)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が、請求項10又は11記載のタンパク質である請求項14記載の抗体(請求項15)や、抗体がモノクローナル抗体である請求項14又は15記載の抗体(請求項16)に関する。

【0012】また本発明は、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発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞(請求項17)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が、請求項10又は11記載のタンパク質である請求項17記載の宿主細胞(請求項18)に関する。

【0013】また本発明は、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過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物（請求項19）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が、請求項10又は11記載のタンパク質である請求項19記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項20）や、非ヒト動物が、マウス又はラットである請求項19又は20記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項21）に関する。

【0014】また本発明は、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発現している細胞と、被検物質とを用いることを特徴とす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22）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している細胞が、請求項17又は18記載の宿主細胞である請求項22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23）や、請求項1～4のいずれか記載の非ヒト動物又は請求項19～21のいずれか記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とす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24）に関する。

【0015】また本発明は、請求項22～24のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とす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（請求項25）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又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項9～11のいずれか記載のタンパク質又は請求項25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若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物（請求項26）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られる医薬組成物であって、有効成分として請求項9～11のいずれか記載のタンパク質又は請求項25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若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物（請求項27）に関する。

【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、Nav2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、Nav2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、Nav2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、Nav2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】Nav2ノックアウトマウスの作製法としては、Nav2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Nav2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Nav2遺伝子を単離し、Nav2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Nav2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Nav2（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事ができる。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Nav2をコードする遺伝子、例えば、配列番号2に示されるNav2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とストリンジェ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ェ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、Nav2遺伝子と同効な目的とするヒトNav2.1 (GenBankアクセッション番号：M91556)やラットNaG/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度のハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42度の洗浄処理を挙げる事ができ、65度のハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65度の洗浄処理をより好ましく挙げる事ができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェ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ェンシーと同等のストリンジェン

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、Nav2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、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータ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事ができ、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事ができ、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、その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Nav2の変異又は欠失に起因する疾病の診断や、Nav2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。

【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 E B V - ハイブリドーマ法 (MO NOCLONAL 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 N a v 2 を例に挙げてマウス由来の N a v 2 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 N a v 2 モノクローナル抗体の作製方法を説明する。

【 0 0 2 4 】上記抗 m N a v 2 モノクローナル抗体は、抗 m N a v 2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインピボ又はインピ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、インピボ系においては、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、またインピトロ系においては、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。インピ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 R P M I 1 6 4 0 又は M E M 等の細胞培養培地を例示することができる。

【 0 0 2 5 】抗 m N a v 2 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 N a v 2 を用いて B A L B / 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 N S - 1 細胞 (A T C C T I B - 1 8) 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 N a v 2 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。

【 0 0 2 6 】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、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。

【 0 0 2 7 】また上記抗 m N a v 2 モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、F I T C (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、¹²⁵I、³²P、¹⁴C、³⁵S 又は ³H 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、 α -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 (G F P) 等の蛍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、R I A 法、E L I S A 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。

【 0 0 2 8 】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、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション (transfection)、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 S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、C H O 細胞、C O S 細胞、H e L a 細胞、C 1 2 7 細胞、B A L B / c 3 T 3 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)、B H K 2 1 細胞、H E K 2 9 3 細胞、B o w e s 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。

【 0 0 2 9 】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_v2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_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。

【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。

【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り以下説明する。

【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_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

バク質及びノ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。

【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を挙げることができる。

【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。

【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ピトロで接触せしめ、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ことができる。

【0038】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。

【0039】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。

【0040】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/SC L 11プロープ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NaG cDNA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pBluescript IISK(-)(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Nav2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(同ヌクレオチド残基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Nav2.3cDNA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 I II)についてのサザンブロットの結果、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Nav2.3はラットのNaGの種対応物であることが明らかになった。したがって、Nav2.3、N

aG及びSC L 11をNav2と命名した。

【0041】ターゲッティングベクターを構築するために、lacZ遺伝子をマウスNav2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Nav2のN末端の20アミノ酸配列が - 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12.5kb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、lacZ-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Nav2タンパクの最初の20アミノ酸を - 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Nav2遺伝子の代わりにlacZ遺伝子を確実に発現させるために、lacZ-neoカセットを挿入したこと以外は、元のマウスNav2遺伝子のゲノム構造そのままとした。サザンブ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、lacZ-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Nav2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】[Nav2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、エレクトロポレーション法によって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プ1(図1a参照; エクソン1のXho Iから約8kb上流に位置している0.3kbのEcoR I-Xba I断片)によりEcoR I消化を用いるサザンブロット法で確認した。また、選択されたクローンをプロープ2(neo遺伝子由来の0.6kb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、lacZの5末端領域にあるAAC CAGGCAAAGCGCCATTC: 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CATCTTCCAAGGGCTCTGACA: 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Nav2欠損マウスを作製した。

【0044】このヌル変異体動物(マウスNav2^{-/-})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Nav2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、Nav2^{-/-}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Nav2の欠損はマウスNav2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。

【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ルゲノムDNAを採取し、EcoRIで消化したゲノムDNAをブ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。

【0046】[Nav2ノックアウトマウスにおけるNav2不発現の確認]変異体マウスのマウスNav2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Nav2.3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、Nav2タンパク(220kDa)の位置が示されている。Nav2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(Nav2^{+/-})マウスでは野生型の約半量のマウスNav2タンパクが肺膜から検出され、ホモ接合体(Nav2^{-/-})マウスではマウスNav2タンパクは検出されなかった。マウスNav2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。

【0047】[X-Gal染色によるNav2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Nav2^{+/-}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Nav2^{+/-}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、胸部における育成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。また、lacZ発現は心臓自律神経及び舌神経でも観察された。lacZ発現のこれらのパターンは、ラットNav2及びマウスNav2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lacZ遺伝子発現はマウスNav2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50µmを表している。

【0048】[Nav2の生理学的な役割]マウスNav2の生理学的な役割を調べるため、Nav2^{+/-}マウスとNav2^{-/-}マウスの脳を用いて中枢神経系におけるlacZ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でついで固定剤で灌流

した。固定された脳を冠状に又は矢方向に 2 mm の厚さにかみそりで切った。PBS で 2 回洗浄し、1 mg / ml の X - Ga l、5 mM の $K_3Fe(CN)_6$ 、5 mM の $K_4Fe(CN)_6$ 、2 mM の $MgCl_2$ 、0.2% の NP - 40 を含む PBS 中で 37 °C において一晩インキュベートした。免疫染色のため、X - Ga l 染色された切片を冠状の 14 μ 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 Nav_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 3 a - e は $Nav_2^{+/+}$ マウスの、図 3 f は $Nav_2^{-/-}$ マウスの中枢神経系における lacZ 発現を示している。また、図 3 a、b、d、e 及び f は固定された成長個体の脳を冠状に、図 3 c は正中矢状面でそれぞれ 2 mm に切断し、X - Ga l で染色したものである。なお、図 3 c においては脳の下の頭蓋は除去しなかった。図 3 e 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 3 c 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 μ 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 3 g 及び h)、抗 GFAP ポリクローナル抗体 (図 3 i)、又はクレシルバイオレット (cresyl violet) (図 3 j) 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 3 g)、SFO (図 3 h 及び i) 及び ME (図 3 j) である。矢頭はダブルポジティブニューロンを示す。図 3 j 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 3 g - h のスケールバーは 30 μ m であり、図 3 j のスケールバーは 100 μ m である。

【0050】図 3 からわかるように、lacZ 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 3 a - 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透を促進する (FASEB J, 7, 678-686 (1993))。 $Nav_2^{+/+}$ マウスでは比較的弱い lacZ の発現が CX 及び BLA に見られたのに対し、 $Nav_2^{-/-}$ マウスにおけるこれらの部位での lacZ の発現はより顕著であった (図 3 f)。lacZ を発現している細胞種を調べるため、脳を X - Ga 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 (GFAP) 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、lacZ 発現細胞の大部分は MPO、AH (図 3 g)、IPDM、MMR、MH 及び MeV 中のニューロフィラメントに対して陽性であった。また、GFAP 陽性細胞は lacZ 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 Nav_2 に対し陰性であることを示している。

【0051】CVO における lacZ 発現細胞の分布は特に重要であり、ME における lacZ 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 (CSF)、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 CSF 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。lacZ 陽性細胞は SFO 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)、GFAP に対し陰性であった (図 3 i)。lacZ 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。NHP には、X - Ga 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。

【0052】[Fos - イムノ組織化学] lacZ 発現の解析によって、マウス Nav_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 Nav_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、 Nav_2 チャネルの機能、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. 877, 258-280 (1999))、マウス Nav_2 チャ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

チャンネルの活性と遺伝子発現はマウスNav2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Fos核タンパクの中枢性発現に対して、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。

【0053】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(MnPO)、終板器官(OVLT)、脳弓下器官(SFO)、室旁核(PVN)及び視索上核(SON)の5つの領域におけるFos-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Nav2^{+/+}につきn=4、マウスNav2^{-/-}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日一夜浸漬した後、脳をビプラトーム(Leica, VT1000S)上で50µmの厚さの冠状切片とした。抗Fosヤギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biochemistry, sc-52-G)のPBS100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、Fos-イムノ陽性核を数えた。各領域はイメージ分析システム(KS400が付属したAxio phot 2)を用いて測定した。上記脳の5つの領域1mm²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)。

【0054】図4a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(OVLT)含有組織切片の典型的な像であり、スケールバーは200µmを示している。また図4bは、水分飢餓状態における脳弓下器官(SFO)、視索上核(SON)、室旁核(PVN)、終板器官(OVLT)及び中央視索前核(MnPO)1mm²当たり中のFos-イムノポジティブ細胞の数(平均)をプロットしたものであり、図中の縦棒はS.E.を示し、星印はNav2^{-/-}マウスとNav2^{+/+}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、Nav2^{-/-}マウスでもNav2^{+/+}マウスでも顕著に増加した。しかし、SFO及びOVLTにおけるNav2^{-/-}マウスにおけるFos-イムノポジティブ核は、Nav2^{+/+}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Nav2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NH₄Cl、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CH₃COONa(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±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NH₄Cl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 6 b に示す。

【0058】0.02 M のキニン塩酸塩及び 0.1 M の酢酸ナトリウムに対する神経生理学的反応は、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 7 a)と総摂取量(図 7 b)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 $Na_v 2^{+/+}$ マウスと $Na_v 2^{+/-}$ 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 7 a)。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 7 b)。

【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 ± 0.6 及び 153.0 ± 1.2 、 K^+ 濃度(mM)はそれぞれ 4.6 ± 0.1 及び 4.7 ± 0.1 、 Cl^- 濃度(mM)はそれぞれ 118.5 ± 0.6 及び 118.3 ± 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 ± 0.8 及び $150 \pm$

0.3、 K^+ 濃度(mM)はそれぞれ 6.5 ± 0.2 及び 6.7 ± 0.2 、 Cl^- 濃度(mM)はそれぞれ 116.0 ± 1.0 及び 116.4 ± 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 $Na_v 2^{+/+}$ マウスと $Na_v 2^{+/-}$ 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)。

【0063】 $[Na_v 2]$ チャネルはナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネル、 $[Na_v 2]$ チャネルがナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネルであることを以下の実験により確認した。まず、抗 $Na_v 2$ 抗体を次のようにして作製した。ラット $Na_v 2$ 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(SVSETV

PIASGESDIK ; 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 Nav 2 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 Nav 2 抗体を得た。この抗 Nav 2 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 Nav 2 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。

【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 週令の野性型マウス及び Nav 2 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。野性型マウス由来の脊髄後根神経節の神経細胞を、上記抗 Nav 2 抗体を用いて染色することにより、すべての神経細胞が Nav 2 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 2.5 ミクロン以下 : 約 50%)、中型 (直径 2.5 から 4.0 ミクロン : 約 40%)、大型 (直径 4.0 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、野性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と違いはなかった。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。

【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 週令の野性型マウス及び Nav 2 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。野性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 Nav 2 抗体を用いて染色したところ、Nav 2 陽性神経細胞は 20 ~ 30% であった。なお、野性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。

【0066】上記野性型マウス及び Nav 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

-binding 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付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 CaCl₂、1 mM の MgCl₂、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。

【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 9 a 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 9 c)。これは Nav 2 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。

【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、メタンサルフォ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 10 a)。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 10 b)。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、Nav 2 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。

【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 Nav2 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ネルの各ブロッカーの効果調べた。その結果、TTX 感受性の電位依存性ナトリウムチャネル(図10c)、アミロライド感受性ナトリウムチャネル(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)。

【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オン濃度検出器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、Nav

2 免疫陽性細胞であり、これら Nav2 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、Nav2 免疫陰性細胞では、Nav2 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 Nav2 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ネルであることが証明できた。すなわち、Nav2 はナトリウム濃度依存性ナトリウムチャネルという新規ナトリウムチャネルであることがわかった。

【0071】

【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 Nav2 チャ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 Nav2 チャネル遺伝子欠損マウスを用いることにより、Nav2 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や、Nav2 チャ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關与する脳室周囲器官で発現することや、Nav2 チャ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】

【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

<130> U2001P059

<140>

<141>

<150> JP 2000/237320

<151> 2000-08-04

<150> JP 2000/241637

<151> 2000-08-09

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 446

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

```
atgttgactt cccagagcc gaaggcctt gtccattca cggcagagtc acttgaactt 60
ataaaaaatc acattgctaa aaaatgcaac gaagagcatg aagaagaaga tttaaaacca 120
agccgggata tagaagcagg caaaaaactt ccatttgcct atggaaccct tctcaagga 180
```

31
accgtgtcag agcccttggga agatgtggat ccatactact atgttaagag aaatactttc 240
atggctcttaa acagaaacag agtcatcttc aggttcaatg cggtttccat cctctgcacg 300
ttgtctcctt taagctctct cagaagagct gttatcaagg ttttggtgca cccccctttg 360
cgctgtctga ttttaattag tgttctcacc gacagcatac ttatgtgcat gagtaaccta 420
ccggaatgga tattggcagt agagaa 446
<210> 2
<211> 5482
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> CDS
<222> (252)..(5297)
<400> 2
cacgcgtcga ctagtacggg ggggggggag gggttgtct gtagggtgct tctgggtctg 60
tggagctagc ctgggtgctg agtgtttagc tggaaagcagc agtggaccgc aaccacattg 120
caacaacctc cgtagtagag atctgagaag acaagcccag gagagcaaag ggctctcgtg 180
agccttgcac ctggggttct tgctggagtt ttagtgaaga 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
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
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
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
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
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

33	34		
Phe Glu Ile Leu Val Lys Val Ile Ala Arg Gly Ile Trp Ala Gly Ser			
160	170		
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	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	200	205	
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			
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			
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		
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	
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	
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	
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	
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	

37	38
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	
690	695
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
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	
720	725
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
gcc atg gca agg ata aag tcg gga ata aac tcc atg ctt ctt aaa tta	2546
Ala Met Ala Arg Ile Lys Ser Gly Ile Asn Ser Met Leu Leu Lys Leu	
750	755
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
ctg gtc act ctg ctc tgc aca ggc act ctg gct ctt gaa gac ata tat	3122

39	40
Leu Val Thr Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr	
945	950
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	
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	
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
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	
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	
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
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	
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	

41	42
1200	1205
cag aaa aaa cag tac cgg gcc ctg aag aag ctc ttg tat gca gac gtc	1210
Gln Lys Lys Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val	3938
1215	1220
cag aaa cca aca ccc cgc ccc aga aac aaa ttc caa ggc ttc ctt ttt	1225
Gln Lys Pro Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe	3986
1230	1235
gac cta gta aca cac cgt gtc ttt aat gtt atc atc ata ctt ctt atc	1240
Asp Leu Val Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile	1245
1250	1255
tgt ttc caa gca aca acc att atg ata caa aag gat gag cag agt cca	1260
Cys Phe Gln Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro	4034
1265	1270
caa atg gaa act gcc atc ttc tgg atg aac tcc att ttt gtc atg ctg	1275
Gln Met Glu Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu	4082
1280	1285
ttc act ctg gaa tgc ata ctg aag ctc act gcc ttc cgt tgc cac tac	1290
Phe Thr Leu Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr	4130
1295	1300
ttc acc agt gca tgg aat gtt cat gac ttt atg gtg gtc att ttc tcc	1305
Phe Thr Ser Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser	4178
1310	1315
att aca ggg ctg ctg cta ccc ttg aca ata gga caa tac ttt gtg cct	1320
Ile Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro	1325
1330	1335
cct tcc ctg gtg cag ctg att ctt ctc tct cga gtc atc cac atc ctg	1340
Pro Ser Leu Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu	4226
1345	1350
cgt cct ggg aaa gga ccg aag gtg ttc cat gac ctg atg ctt ccc ttg	1355
Arg Pro Gly Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu	4274
1360	1365
att ctg gcg ctc cca gca ttg ctg aac att agt ctt ctc atc ttc ctg	1370
Ile Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu	4322
1375	1380
gtc atg ttc atc tac gcc atc ttt gga atg tac aac ttt gcc tat gta	1385
Val Met Phe Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val	4370
1390	1395
aag aaa gaa gcc gga att aat gat gtg tcc aac ttt gag acc ttt gga	1400
Lys Lys Glu Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly	1405
1410	1415
agc agt atg ctc tgt ctc ttc caa gtt aca acg ttt tct ggt tgg gac	1420
Ser Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp	4418
1425	1430
ggg atg ctg gat gca att ttc aac agt cag tgg tct gac tgc gat cct	1435
Gly Met Leu Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro	4466
1440	1445
gat aaa att aat cca ggg act cag gtc aag gga gat tgt ggg agc cct	1450
Asp Lys Ile Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro	4514
1455	1460
	1465

43	44
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	
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	
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
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	
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	
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	
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	
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 cacttctact ttctttacat atgtcccca	5337
Gln Thr Gln Ile	
1680	
gcactaaatg ttaactgatc ttaagctgga gatcagaaac tagagataat gataacatct	5397
gtgtgcccag acatctccat gacaagctca gctttagggt cagtcttctg atgcatcaga	5457
aagacagcag ctcagcgttg ctg	5482
<210> 3	
<211> 1681	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	

45

46

<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
 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
 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
 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
 Tyr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Thr Tyr Glu Lys

47 48
 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
 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
 545 550 555 560
 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
 610 615 620
 Met Ala Leu Lys Asp Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Phe Val Tyr Phe
 625 630 635 640
 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
 Trp Ile Glu Thr Leu Trp Glu Cys Met Glu Val Ala Gly Gln Ala Trp
 690 695 700
 Cys Ile Pro Phe Tyr Met Met Val Ile Leu Ile Gly Asn Leu Leu Ile
 705 710 715 720
 Leu Tyr Leu Phe Val Thr Leu Val Ser Ser Phe Ser Tyr Tyr Asp Ala
 725 730 735
 Thr Ser Glu Val Asn Lys Glu Ala Lys Asn Leu Gln Leu Ala Met Ala
 740 745 750
 Arg Ile Lys Ser Gly Ile Asn Ser Met Leu Leu Lys Leu Met Cys Thr
 755 760 765
 Glu Arg Ser Val Pro Thr Glu Ala Thr Asp Gln Ile Cys Asp Pro Ser
 770 775 780
 Val Lys Glu Asn Ile Ser Gly His Thr Leu Ser Glu Leu Ser Asn Thr

49		50
785	790	795
Gln Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Asp Gln Ser Ser Ser Thr Glu Lys Thr		800
	805	810
Pro Val Thr Glu Ser Glu Ser Gln Ser Leu Ile Ala Ser Pro Ser Ala		815
	820	825
Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile Glu Asn Leu		830
	835	840
Asp Asn Lys Glu Thr Arg Ser Lys Ser Gly Asn Gly Gly Ser Lys Glu		845
	850	855
Lys Met Lys Gln Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val Asp Ile Ala		860
865	870	875
Ile Ser Glu Glu Glu Glu Met Val Tyr Glu His Glu Lys Ser Lys Leu		880
	885	890
His Lys Asn Gly Tyr Glu Arg Lys Ser Ser Thr Gly Gln Ile Ser Arg		895
	900	905
Glu Ser Arg Asn Gly Lys Ile Trp Lys Asn Ile Arg Lys Thr Cys Cys		910
	915	920
Lys Ile Val Glu Asn Ser Trp Phe Glu Cys Phe Ile Gly Leu Val Thr		925
	930	935
Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr Ile Asp Gln		940
945	950	955
Arg Lys Thr Thr Lys Ile Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Met Ile Phe Ala		960
	965	970
Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe		975
	980	985
Lys Ala Phe Phe Ser Asn Asn Trp Tyr Lys Leu Asp Phe Met Val Val		990
	995	1000
Ile Val Phe Cys Leu Ser Leu Ile Gly Lys Thr Arg Glu Asp Leu Asn		1005
	1010	1015
Pro Leu Thr Ser Ile Lys Phe Leu Arg Ala Leu Arg Val Leu Ser Gln		1020
1025	1030	1035
Phe Glu Arg Met Lys Val Val Leu Arg Ala Leu Ile Lys Thr Thr Leu		1040
	1045	1050
Pro Thr Val Ser Val Phe Leu Val Cys Leu Met Ile Trp Leu Leu Phe		1055
	1060	1065
Ser Val Ile Gly Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile		1070
	1075	1080
Asp Pro Thr Lys Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val Met Asn Lys		1085
	1090	1095
Ser Gln Cys Glu Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro Trp Glu Asn		1100
1105	1110	1115
Ala Lys Leu Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Leu		1120
	1125	1130
Gln Val Ala Thr Phe Asn Gly Trp Ile Ser Ile Met Asn Ser Ala Ile		1135
	1140	1145
Asp Ser Val Gly Val Asn Met Gln Pro Ser Phe Glu Tyr Asn Leu Tyr		1150
	1155	1160
Met Tyr Ser Tyr Phe Ile Ile Phe Val Ile Phe Gly Leu Phe Leu Pro		1165
	1170	1175
Leu Cys Met Leu Ile Gly Val Ile Ile Arg Asn Phe Asn Lys Gln Lys		1180

51		52
1185	1190	1195
Ile Lys Gln Gly Gly Ser Asn Ile Phe Ile Thr Val Lys Gln Lys Lys		1200
	1205	1210
Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val Gln Lys Pro		1215
	1220	1225
Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe Asp Leu Val		1230
	1235	1240
Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile Cys Phe Gln		1245
	1250	1255
Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro Gln Met Glu		1260
1265	1270	1275
Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu Phe Thr Leu		1280
	1285	1290
Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr Phe Thr Ser		1295
	1300	1305
Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser Ile Thr Gly		1310
	1315	1320
Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro Pro Ser Leu		1325
	1330	1335
Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu Arg Pro Gly		1340
1345	1350	1355
Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu Ile Leu Ala		1360
	1365	1370
Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu Val Met Phe		1375
	1380	1385
Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val Lys Lys Glu		1390
	1395	1400
Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly Ser Ser Met		1405
	1410	1415
Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp Gly Met Leu		1420
1425	1430	1435
Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro Asp Lys Ile		1440
	1445	1450
Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro Ser Val Gly		1455
	1460	1465
Ile Ser Tyr Phe Val Ser Tyr Ile Leu Ile Ser Trp Leu Ile Ile Val		1470
	1475	1480
Asn Met Tyr Ile Val Leu Ile Met Glu Phe Leu Ser Ile Pro Ser Gln		1485
	1490	1495
Lys Lys Ser Arg Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Arg Arg Phe Phe Arg		1500
1505	1510	1515
Val Trp Asn Arg Phe Asp Pro Asp Arg Thr Gln Tyr Ile Asp Ser Ser		1520
	1525	1530
Lys Leu Ser Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Met Ala		1535
	1540	1545
Lys Pro Asn Lys Gly Gln Leu Val Ala Met Asp Leu Pro Met Ala Ala		1550
	1555	1560
Gly Asp Arg Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Leu Ala Phe Thr Lys Arg		1565
	1570	1575
Val Met Gly Lys Asp Glu Arg Val Glu Lys Ile Leu Ser Glu Ile Glu		1580

53 54

1585 1590 1595 1600
 Ser Gly Phe Met Leu Ala Asn Pro Phe Lys Ile Thr Tyr Glu Pro Ile
 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

<210> 4

<211> 6927

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

aagctttact ctcacagaga aaagtcttct gagtgatcaa ttgccaacga tacaacctca 60
 ccttagtfta ccctgacctg tgaagatgg ccttcaacag tggagaataa ggagttctag 120
 ctgagatggt tcattaagcg acatattcat ggatcagctt ttgatggcag attttcaggc 180
 tccttttctc cactgccaat aattttaca aacacaattt taaaattgta gtctttatgg 240
 gaacaattc atcctataga tgttgtaag gacaaaacat tttcactcct gggcagtttt 300
 gttgttcct tccctcactg tcatggcgct aaagcggtag ctcatcccca gattaggggc 360
 ccagggtgaa ttgttcttaa gtctgaaatt gtaggggaga gttctttgaa ctcatctctt 420
 catgagtca aagaacatat gacaacttat tgatagaatg actttacaca tggccatatt 480
 ttacacattt actatfttac aggtataaaa ccgaaaatgt tgacttcccc agagccgaag 540
 ggccctgtcc catttacaac agagtcactt gaacttatag aaaatcacat tgctaaaaaa 600
 tgcaatgaag accccgaaga agaagaaggt ttaaaccaca gtcgtaatct agaagctggc 660
 aaaagacttc caattcccata tggaaacctc cctcgaggaa ccgtgtcaga gcccttggaa 720
 gatgtggatc catactacta tgttaagaga aatgtaagta ttaactgtta tcatggaagc 780
 tatatfttac ttcgcttata ttcagccact tgaatgtaa ttgagataag acttaagaa 840
 aattaataga gaaggcattc tttcataatc tattctttgt gggggtaaac atgctcaaga 900
 tagttaaac tgataaaata tctgagtaat atattatggt taatgacct agtatatata 960
 ctgctattcc ttaatataag tggctattgt gaaaatagc taattacat tttctgatta 1020
 gcaatftta aacaatcatg aaatatfttag aatatggaca gaaatftca atacctgat 1080
 aacttactag tcaaacagct acattfttt ttaatcatat ataatccac aaattcaaac 1140
 ctccctcatt tccaggaaga ctttagagac ctagaatta tgtatacaca aacacacaca 1200
 cacacataca cacacacaca cgcacacgca aatgcacacc ctacctcac aaacacaaaa 1260
 taagtacaag aatgatttct gttagaaaat tcagacatgt ggattgatga agatagatga 1320
 gtctgtttc aaaagcatgg tttggggcct ggagaaatgt ctcagtttct aatagcactg 1380
 gctgttcttc tggacgtcat aagattgatt gcagtcctg tacagtaggt cacagccttt 1440
 tgaactcta gttccagaag atftgacctt cttttggcca ctatgggcac tgggaatgca 1500
 aataatftcat atatgcacac agtgaagaca tctatatact tgaatgaga taaaatftta 1560
 ggtacagctt gcagaatact tggaaatftta ataaagccaa ggtagaacag tftaaggaca 1620
 aatggaatgg caacagccaa gattgattct acaagagggc atagaaaggc ctgtgctatt 1680
 actgaaaaat cagftatgtt gttgactgtg gcaaacatga gagagtggag gtgtcatcat 1740
 ggaattactg tagtggaaca ggtcattftg ggtgaatgtg gcagatgaat aaaaccaagc 1800
 taataccttt cftaattaaa agaaaagtga tcaatacaga aaataaaata gaacataaaa 1860
 gacagggaga aatataaggt agagaagagg aggagagaaa gagaftaggg agaagagaag 1920
 gggtgagaat gggagagga agagaagaga gataggtaga aatgaagaga ggggaggaag 1980

55

56

ggacttgtat attacagtta atttacctag tgtacaaact gatagttctt agtataaatg 2040
 gcttttatgt aaatatgatg attactgtct tctaattatc tattttttaa taatcataaa 2100
 atatttacac tataaaagaa aaagagagaa ggaggagaga aagaacaaga aggaaatagg 2160
 gtagagggaa ccctgagatt cagtgtctat gtcaggaaaa gaaacagtaa aatatgactg 2220
 atgaaaaatg ccaatgtctg tagcttgaaa gagtgaagtt acattgacag aaagtgaaat 2280
 aaagtttatt tactagcatc ttgatattca tgtatcatat tcaactgatgt tataatctaat 2340
 gaggagatga gactgaacga aaatactgc agaaaaatac attcattgca taactgttcc 2400
 tataataatg tcatgggtgc atttgaata ttttaaggac attttagtta aaatgcaagt 2460
 tcagtcctca tttgtattgt tctggcactc actttgtggt gtgcttgagt tgataatggc 2520
 cagtaacctt aggattgctt gtcaatattg cagccatctt aatactgagt aaggatgca 2580
 ggcatgctag acatgggaat actgccattg aagataaaat caaagctctt aagaacaaaa 2640
 acaaaactt tatgacaggc cccatgtcca gcagtagttg gccaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700
 ttgtgatfff gattcttttg tcagggtggc atgtttggag acagggattc cctgagtagc 2760
 cctggctgtc ctggaactca ctctgcagtc caggctggcc tcgaactcag agatctgctt 2820
 gcttctgtct tctgagttct aggat tacgg gtataagttt ttattaaaag tataaggctt 2880
 tgctttttgt tgttttttt tttgtttgt ttgtttgttt tgttttttg ttggtttgtt 2940
 ttgttgttgt tgggtggtgt ggtggtagt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3000
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtggagg agagagagag tgtgctgttt ctgttggaa 3060
 tttttgcat tttctttaa ctgtttatgt tttggtttct ttgagaaaga atgaaggaa 3120
 ctgaagtgg ttggatcagg gtgtggggag gatcttggaa tgagttgaga aaggacaaag 3180
 aatataatca aagcttacta tatgaaaaat taataaaaat gtgaaataac tacaataatc 3240
 tcaaaacaac attttgatg atttaggatc ctacagccta tgaggcccat gggttgaaat 3300
 ttgccagtga cttcatgcac tctaaagcct gcaaatgtga cttcatgaac tctgaagcct 3360
 gccagggtga cctcatgctc tttgaagcct gactgggtga ctttatgcac tcagtgtctc 3420
 tctcagtaac atcacactgt tcaagtatct gggttgtatt tggcttactc tcttacacat 3480
 agcacagaga caaataatca taaaattaag actatgtatg aaatcaggag aaaacctgaa 3540
 agtacgcatc ccttacaat gacacacaca tatattgaac tccacatgga gcttgcaatt 3600
 gttttggaag ctactatgga aagtagaatt tacacaacca ggtatattat ttgtttctac 3660
 ctgttttatt taagtggaga tgggagaata ggtacaatag ttaaacaag cctcatagca 3720
 gtatataat gaactacact tatctgagaa ttgagacca gagtagattc cagttagagc 3780
 agacatgcat ggagaagtgt tggcagtgt atattcttat aatttcttt tcatatgctt 3840
 ctgtcaacat aggaagcaat aagtcatacc tctatatca ttatcagaat atatggtaga 3900
 ctgtatagtc tattctattg catataagat taatttttaa gccaggcctt ctggcagggc 3960
 tataattctc aaacaacaaa gtattgcaga ttcaagtctt ctgtgttcta aactgtgagt 4020
 tcaaggtcag ccttaacaat ttaatgaaat ctattttcaa gagaaaaaga atataaagat 4080
 cctcaggaga aataatggaa gagagtgtgc ccagcacaca tgaggcccct gtcacagagg 4140
 aagaaaatat tacatatatt ttattataa aaatatagtt atcttattat ataactgctt 4200
 atgttatgtt atgttttatg ttataacaca tgacatttaa tctcatagtt ttcagaatta 4260
 actggatfff cagtgttagc tggatcaaac tcagggcctg ctgaagggtg aacaaacact 4320
 gttcttcaag ttacattacc agacagtaca tgttaatgca cccctacatt aatactttct 4380
 ctgaagggtg atatatagta aacacacaca cacacacaca cacacatata tatatatata 4440
 catatacaca cacacatata tatatacact ttcaattacc atatataata tataccatat 4500
 acattatagt aatgttcatt tatatgaaca aatgtaaaaa tgagcacaca tatgtatgaa 4560
 tgtacataag cccacatgta catatgtata aataagccca tccacctacc tatatatgaa 4620
 acaatgtctg ttttagaata tttatgtttc ttactatatt tattaagact tagtacttta 4680
 glatccacaa tccttgtgtt tatattacat aaattactat ttttagatag gttcatatca 4740
 ataatatata ataagttagg ttttgaataa acattaattt ttaggattta ccttgttaatt 4800
 gttttatfff tttattcgat attttcttta ttacatttc aaatgctttc ccgaaagtcc 4860
 cctataacct cccacctccc tgctccccta ctcccact cccatttctt gggcctgggtg 4920
 tcccctgta ttggggcata taaagttgtc aagaccaagg ggtctctatt cccaatgatg 4980

57

58

gccgactagg ccatcttctg ctacatattc agctagagac acgagctctg gggatactgg 5040
 ttaataattg tttttttttt aatatatttt atttaaaata gaattacata aattatcctc 5100
 ttattttctc ccctacagtg tctccctcat aaataatata aacaattgat gtgagatttg 5160
 accattgctt ttataacact tcattgactt tttttctgat ataaaattaa aatttttaca 5220
 ttcattaagt tatgagataa aggccctctg atgctttgaa tgcaaatcca cacaccatct 5280
 gaagagtffc tttttcatta gttcaagggt tgattgcacc ataatgactt tcttaagtac 5340
 aaaccagcaa aaaataaata aattaattaa ttattaaat aaaaataagt gtgagctatc 5400
 aggcaagtcc aatataagt gaaaactact ccctttgctt taaaacaaa tgtcaagcc 5460
 aatgaaaata tgaataaatt tcaactggt gagcattggt aatatgttg ttcagttctc 5520
 cattctgttt gttaatgtct ttctgtggt tccttacaga ctttcatggt cttaaacaga 5580
 agcagagtca tcttcagggt caatgcggt tccatcttct gcacattgtc tctctaaac 5640
 tccctcagaa gagcagctat caaggcttg gtgcatccat atcctttcaa agtgtgatgg 5700
 gttgtgcat cggcatacta aaaataagtc ctgatgttct gtcatccaac ccctgttgta 5760
 gtaatattha acaaatatca attcttattc ttcaaataga atgacatgta ttttcaatat 5820
 ttacaaaaga atctgcccc ttatatctac agatgcaatt tactggtctt ttgtaattgt 5880
 atttcttctc cattattctt fgaccctggc ttaccctttt tgcctgctg attttaatca 5940
 gcgttctcac tgacagcata ctatgtgca tgagtaact accagaatgg atattggcaa 6000
 tagagtaagt tacttagttt tgctatata aataaagct gtaattatat ttgggttta 6060
 acatthtaat atttattgta ttccattaaa ttacaaaac atgttatgaa atgaaacatg 6120
 atactattha aatthttaa tgtthaaaa agttataaag acaagagggt tgtttcactc 6180
 acagcttga aggttcaaga gcacctatgc tgttcagctt cagggacaat taggtcctct 6240
 cacctaatta acctgtggcc tgtggaaca ggagaagctc tttcagaagc agccattcat 6300
 gtcttgatgc tgtaagccca tgactggat gaagcctgcc acaactttc tcttactctt 6360
 ctgtgggtc ttgtgcaaac aagcaggcat gcgctccagt gccacaagga ccttcaagt 6420
 caccacacgt ctagtgtcc gtaaactctt gcctcaccat gatcgggatc aagtctaaa 6480
 tatgtagaat attgtagaca tctgaaaaca aacctatct tcatatttct tttctgtata 6540
 tactcgtatg tttgtggggc atagcaatat gaacaccatg actaaatttt ctaaataaaa 6600
 caaacatgta tatgcacata cacatatata tagatgata ttcatcaatt tggggttta 6660
 ttttgccctt tcattcttct tacttaattc ctgttggtgt tattttattt gattcatgtt 6720
 ctttatacca cttgcctttg actcctgttc cagactcttg aatcctggaa ttacatcttc 6780
 ttatcacgac tttacatata tacagttcta tatagactga aggtttaatt atattaatta 6840
 attatgttca ttggaatatt taggtccttt gctaaatgta tataccatgt ttcacctcat 6900
 gcttgttttc ttccttattt aaagctt 6927

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer1

<400> 5

atgttgactt cccagagcc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer2

<400> 6

59
aaccaggcaa agcgccattc
<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer3
<400> 7
catcttccaa gggctctgac a
<210> 8
<211> 16
<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

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の Nav 2 ノックアウトマウスの遺伝子地図(a)、ゲノムDNAのサザンブロットの結果(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 Nav 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 lac Z 発現部位を示す図である。

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

【図 4】本発明の Nav 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。

【図 5】本発明におけるマウス Nav 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 Nav 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 Nav 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。

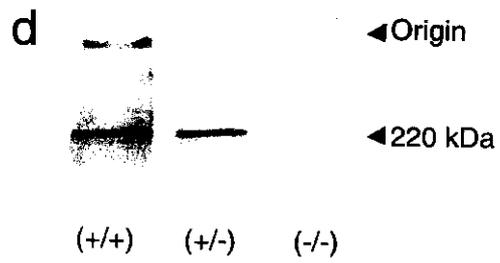
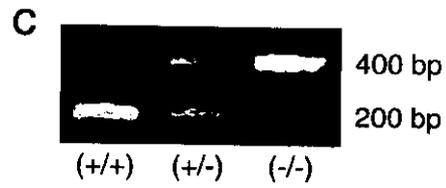
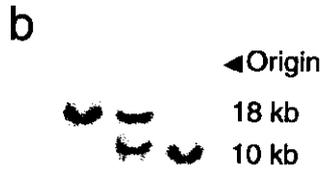
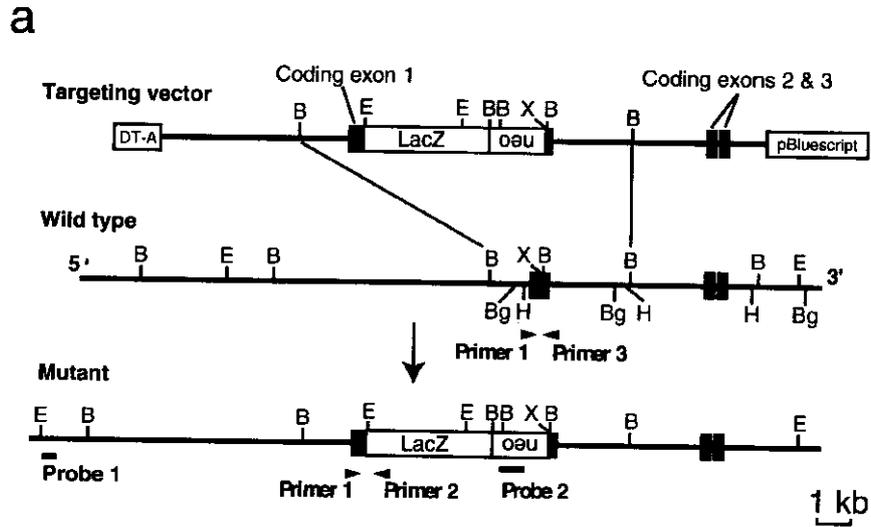
20 【図 8】本発明の Nav 2 ノックアウトマウスにおけるナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験の結果を示す図である。

【図 9】野性型マウス及び Nav 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 Nav 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。

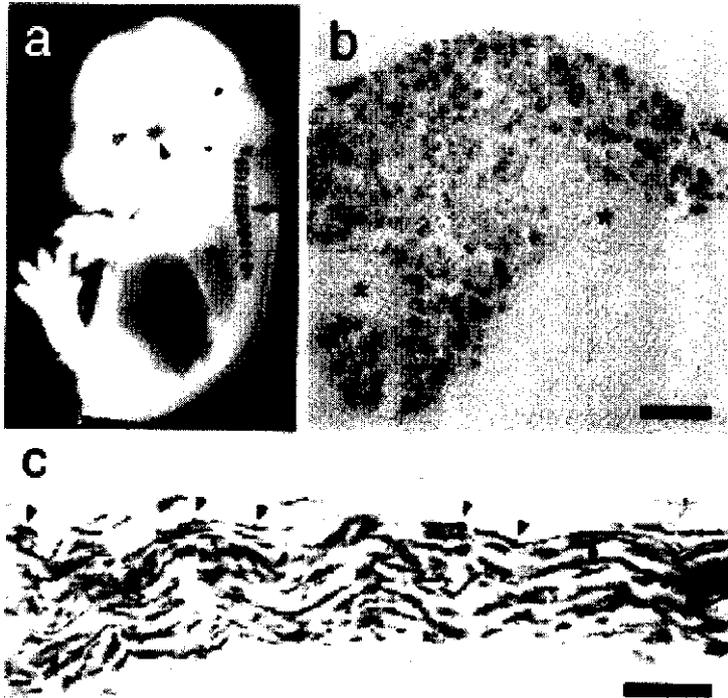
【図 11】野性型マウス及び Nav 2 遺伝子欠損型マウスから調製した脳弓下器官の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比(F340/F380)の蛍光イメージング結果を示す図である。

【 図 1 】

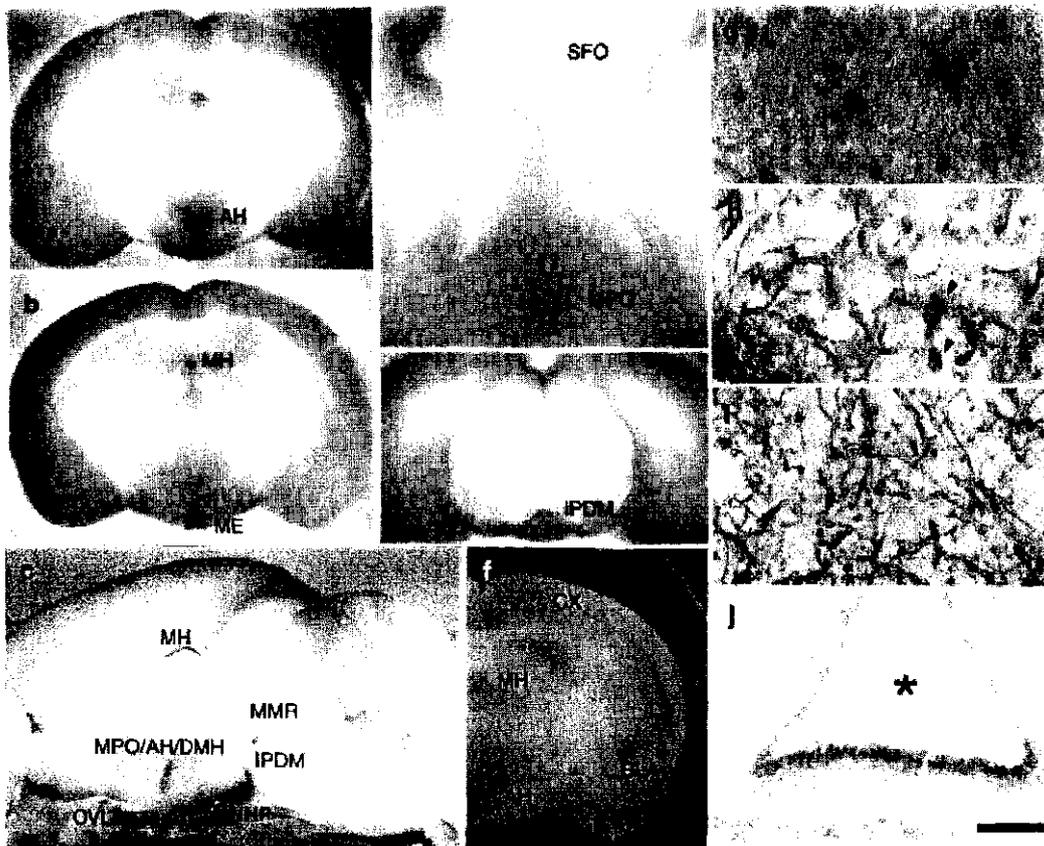


(+/+)(+/-) (-/-)

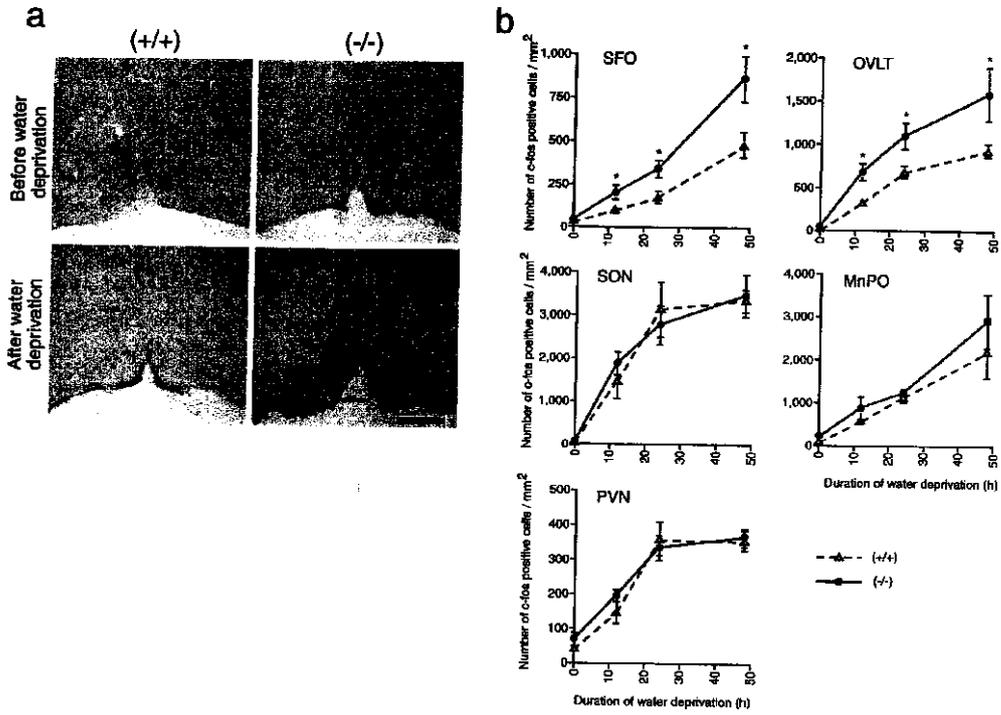
【 図 2 】



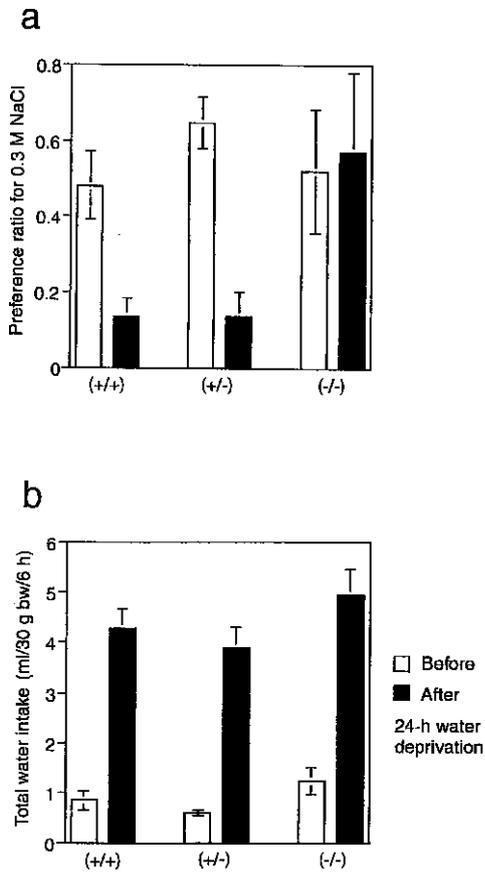
【 図 3 】



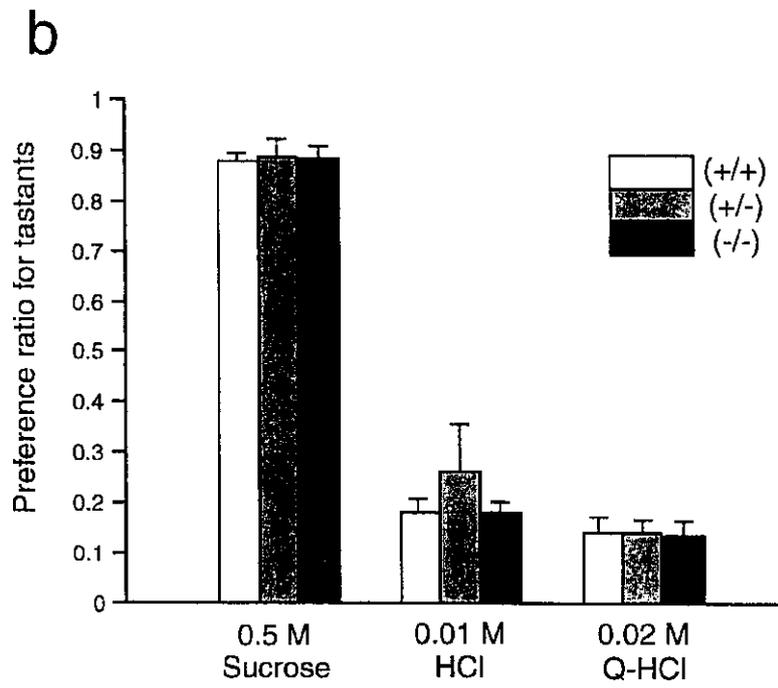
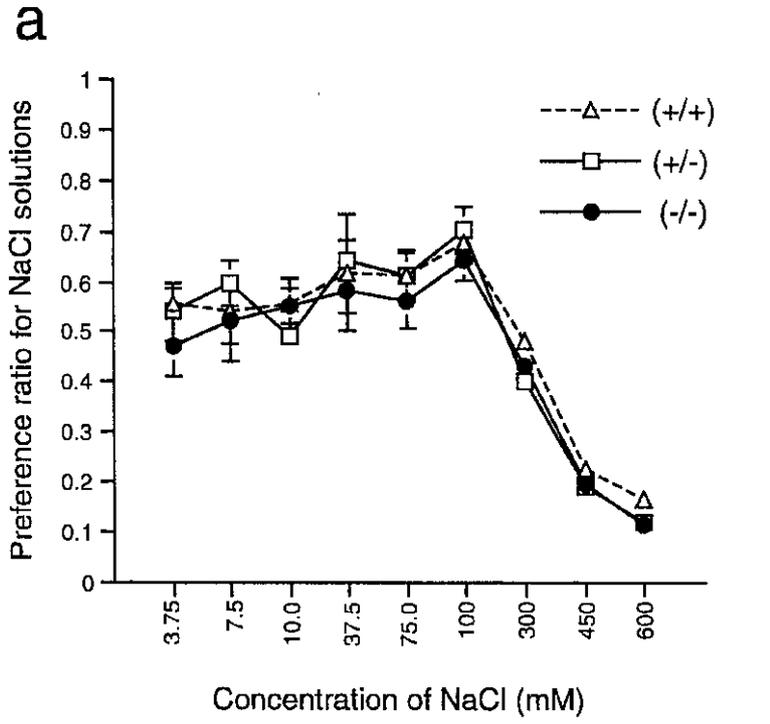
【 図 4 】



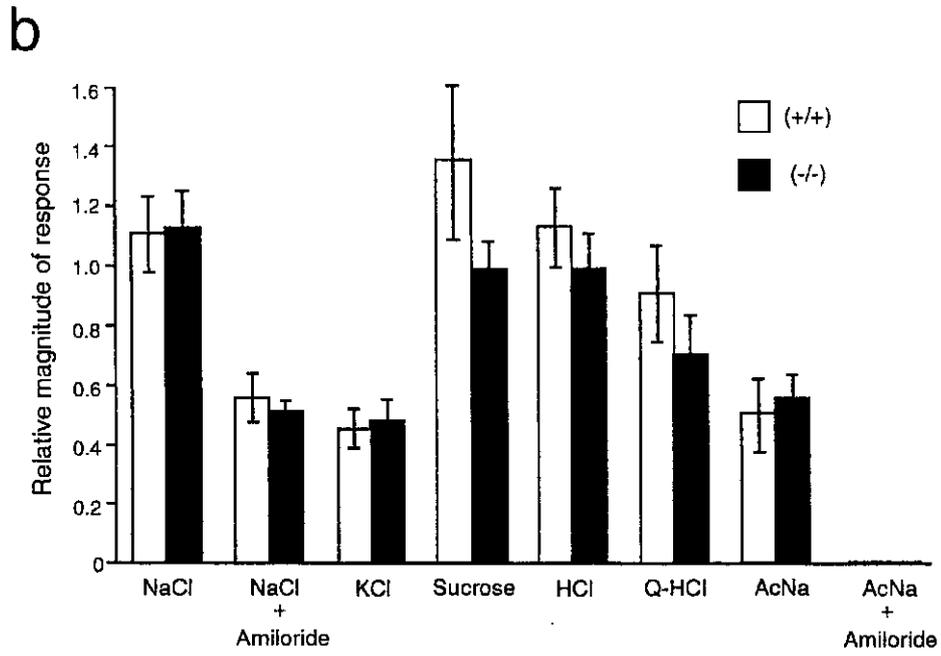
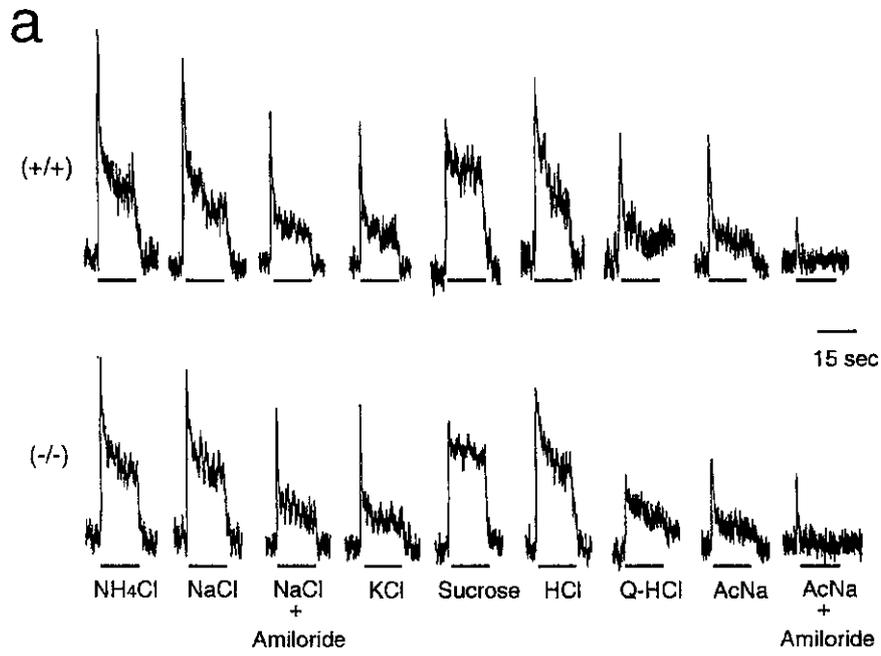
【 図 7 】



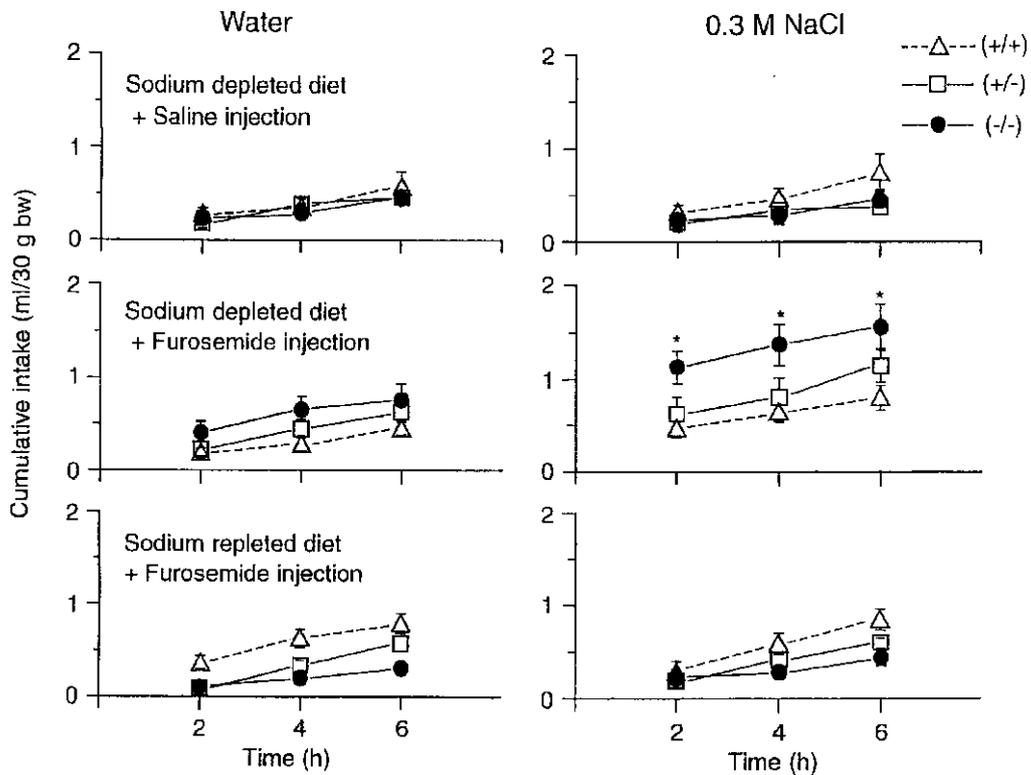
【図5】



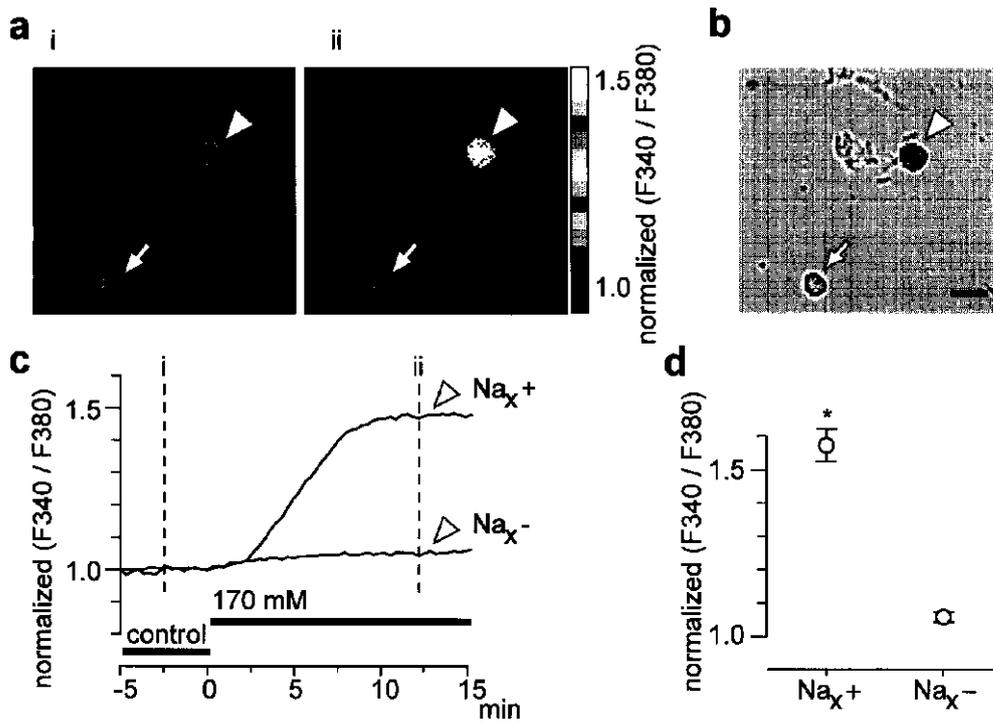
【 図 6 】



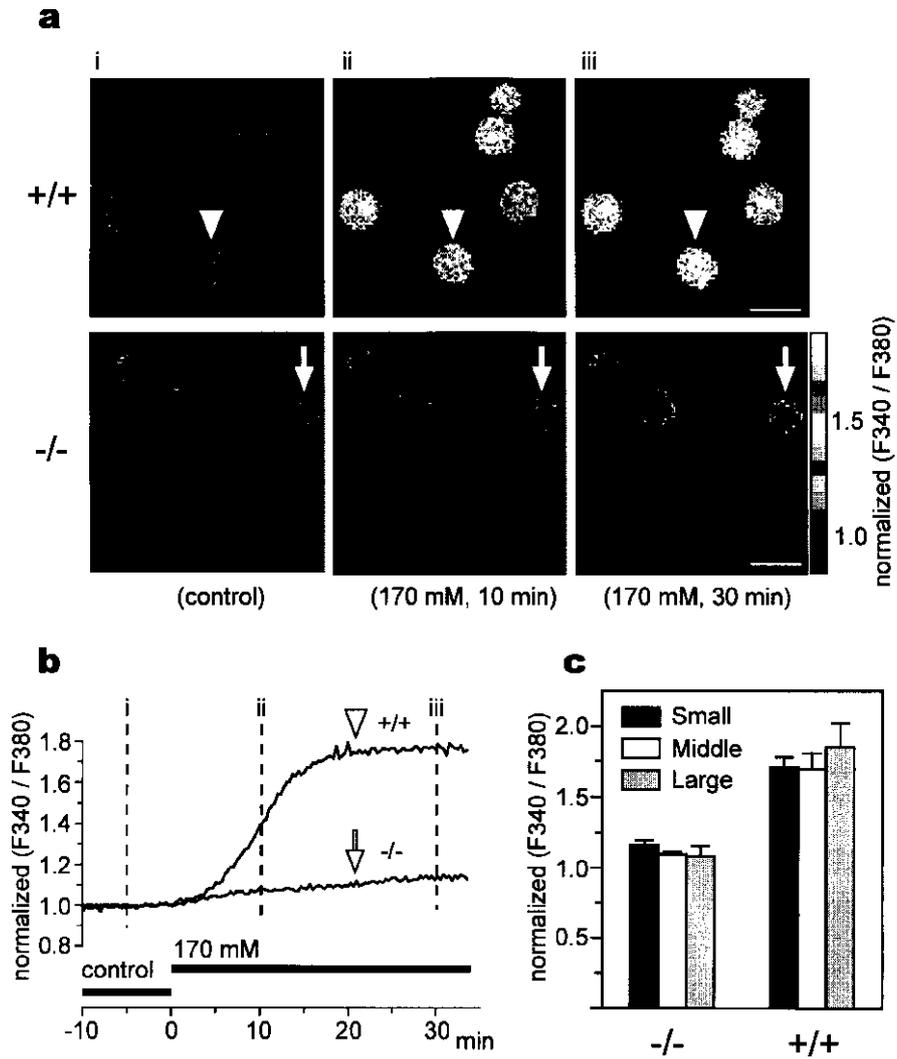
【 図 8 】



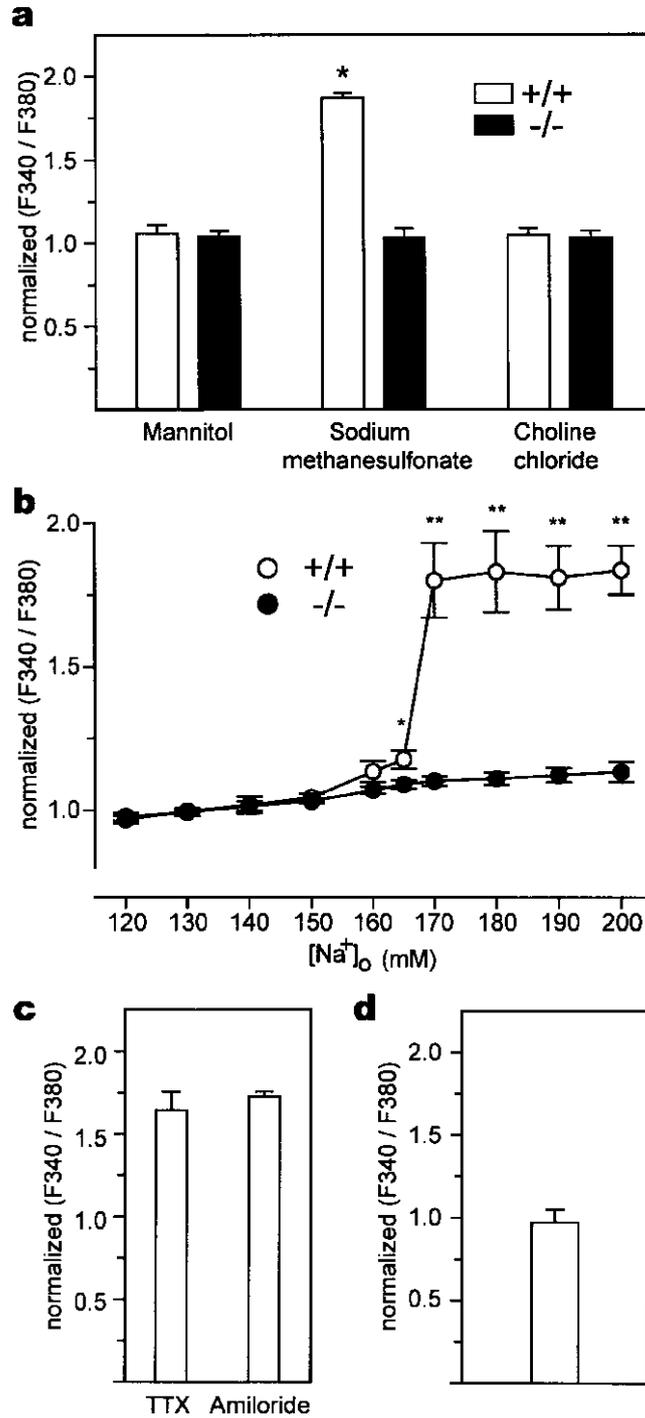
【 図 11 】



【 図 9 】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷
 C 0 7 K 14/47
 16/18
 19/00

識別記号

F I
 C 0 7 K 16/18
 19/00
 C 1 2 N 1/15

テームド (参考)
 4 H 0 4 5

C 1 2 N	1/15		1/19	
	1/19		1/21	
	1/21		G 0 1 N	33/15
	5/10			33/50
	15/09	Z N A		33/53
G 0 1 N	33/15			33/566
	33/50		C 1 2 P	21/08
	33/53		C 1 2 N	15/00
	33/566			5/00
// C 1 2 P	21/08		A 6 1 K	37/02

(72)発明者 渡邊 栄治
 愛知県岡崎市竜美南 2 丁目 2 番地 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA13 DA14
 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02
 DA05 DA12 EA04 GA14 HA12
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA90Y AA91X AB01 BA02
 CA24 CA46
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA16 BA01
 BA02 BA08 BA22 CA23 DC50
 NA14 ZA022 ZC212
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA40 DA75 DA76 EA23 EA50
 FA72 FA74