

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-151552

(P2007-151552A)

(43) 公開日 平成19年6月21日(2007.6.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2GO45
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027	4BO24
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4BO63
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4BO65
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	
審査請求 有 請求項の数 25 O L (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-327832 (P2006-327832)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成18年12月5日 (2006.12.5)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	05111699.4		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成17年12月5日 (2005.12.5)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	ホーナー マリウス
			スイス国 バーゼル アレマネンガッセ
			103
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TAAR1トランスジェニック動物

(57) 【要約】

【課題】本発明は、TAAR1トランスジェニック動物を提供することを課題とする。

【解決手段】本発明は、TAAR1をコードするDNAを含む遺伝子構築物、およびTAAR1についてトランスジェニックである動物を作製するためのその使用、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック動物、その使用、およびこれらの動物を作製する方法に関する。

【選択図】なし

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
プロモーターに機能的に連結されたTAAR1をコードするDNA配列を含む遺伝子構築物。
- 【請求項 2】
コード配列がヒト配列である、請求項1記載の遺伝子構築物。
- 【請求項 3】
プロモーターが組織特異的プロモーターである、請求項1または2記載の遺伝子構築物。
- 【請求項 4】
プロモーターが脳特異的プロモーターである、請求項1～3のいずれか一項記載の遺伝子構築物。 10
- 【請求項 5】
プロモーターが制御可能なプロモーターである、請求項1～3のいずれか一項記載の遺伝子構築物。
- 【請求項 6】
以下の段階を含む、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する方法：
a) 請求項1～5のいずれか一項記載の遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、
b) 該接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、 20
c) TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。
- 【請求項 7】
以下の段階を含む、トランスジェニックTAAR1を発現する非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法：
a) 請求項1～5のいずれか一項記載の遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、
b) 該接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、
c) トランスジェニックTAAR1を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。 30
- 【請求項 8】
請求項6～7のいずれか一項記載の方法により作製されたトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 9】
請求項1～5のいずれか一項記載の遺伝子構築物をゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 10】
齧歯動物である、請求項8または9記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 11】
マウスである、請求項8または9記載のトランスジェニック非ヒト動物。 40
- 【請求項 12】
C57BL/6である、請求項8または9記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 13】
TAAR1タンパク質を過剰発現する、請求項8～12のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 14】
TAAR1タンパク質を組織特異的様式で過剰発現する、請求項8～12のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 【請求項 15】
請求項8～14のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物の子孫。 50

【請求項 16】

請求項8～15のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する細胞株または初代細胞培養物。

【請求項 17】

請求項8～15のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または器官型脳切片培養物。

【請求項 18】

請求項8～15のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物。

【請求項 19】

請求項8～15のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織抽出物または細胞抽出物。

【請求項 20】

鬱病、不安障害、双極性障害、注意欠陥多動性障害、ストレス関連障害、統合失調症のような精神病性障害、パーキンソン病のような神経疾患、アルツハイマー病のような神経変性障害、癲癇、片頭痛、高血圧症、薬物乱用、ならびに摂食障害、糖尿病、糖尿病性合併症、肥満症、異脂肪血症のような代謝性障害、エネルギー消費および同化の障害、体温恒常性の障害および機能不全、睡眠および概日リズムの障害、ならびに心血管障害を含む障害における、請求項8～15のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物、または請求項16記載の細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項17記載の組織もしくは器官型脳切片培養物、または請求項18記載の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または請求項19記載の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、該障害における化合物の治療効果を同定および試験するためのモデルとしての使用。

【請求項 21】

請求項8～15のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物、または請求項16記載の細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項17記載の組織もしくは器官型脳切片培養物、または請求項18記載の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または請求項19記載の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1機能を評価するためのツールとしての使用。

【請求項 22】

請求項8～15のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物、または請求項16記載の細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項17記載の組織もしくは器官型脳切片培養物、または請求項18記載の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または請求項19記載の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1の未知のリガンドを同定するためのツールとしての使用。

【請求項 23】

請求項8～15のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物、または請求項16記載の細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項17記載の組織もしくは器官型脳切片培養物、または請求項18記載の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または請求項19記載の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1に作用する化合物の特異性を測定するためのツールとしての使用。

【請求項 24】

請求項8～15のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物、または請求項16記載の細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項17記載の組織もしくは器官型脳切片培養物、または請求項18記載の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または請求項19記載の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAARの細胞内輸送またはTAARに連結した他の細胞成分の細胞内輸送を研究するための使用。

【請求項 25】

特に本明細書中の例に関連して、実質的に本明細書に記載するような、遺伝子構築物、方法、トランスジェニック動物、試験系、および使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TAAR1をコードするDNAを含む遺伝子構築物を提供し、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノム内に含む非ヒトトランスジェニック動物を作製するための方法を提供する。さらに、本発明は、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノム内に含む非ヒトトランスジェニック動物を提供する。さらに、TAAR1を過剰発現するトランスジェニック動物、およびそれらの作製方法もまた提供する。本発明はまた、TAAR1機能を評価するための、既知のTAAR1リガンドのさらなる特徴付けのための、およびまだ未知のTAAR1リガンドを同定するための、TAAR1シグナル伝達機構を分析するための、TAAR1の生理学的機能をインビボで分析するための、ならびにTAAR1のアゴニスト、アンタゴニスト、またはモジュレーターを特徴付けるためのツールとしてのこれらの動物の使用に関する。さらに、本発明は、TAAR1の機能を研究するためのTAAR1トランスジェニック動物の使用、ならびに神経障害、精神障害、および代謝性障害に関する化合物の治療効果を同定および試験するためのモデルとしてのこれらの動物の使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

微量アミン(TA)は、哺乳動物の神経系に微量に存在する生体アミン神経伝達物質に関する内因性化合物である。微量アミンの研究は、鬱病、統合失調症、不安障害、双極性障害、注意欠陥多動性障害、パーキンソン病のような神経疾患、癲癇、片頭痛、高血圧症、薬物乱用、ならびに摂食障害、糖尿病、肥満症、および異脂肪血症のような代謝性障害等、非常に一般的な様々な状態と微量アミンとの密接な結びつきに端を発し、その薬理学および代謝についての研究取り組みがここ数十年間高まっている(非特許文献1~4に概説される)。しかしながら、微量アミンの生理学に関する詳細な理解は、分子レベルでは微量アミン関連受容体(Trace Amine Associated Receptor)(TAAR; 非特許文献5~7参照)と名付けられたGタンパク質共役型受容体の新規ファミリーの最近の同定をもって可能となるのみである。これらの受容体のいくつかは微量アミンに対する感受性を示し、その固有の薬理学および発現パターンから、これらの受容体は、既に微量アミンと結びつけられている疾患を含む数種の疾患に関連した薬物開発における標的としての有力候補とされている。系レベルでのTAARとそのリガンドとの生理学的な関連性に関して、その理解の進展は、決定的に、それらの発現パターン、それらの薬理学、およびシグナル伝達様式に関する詳細な知識にかかっている。この関連において、TAARに対してアゴニスト、アンタゴニスト、または正もしくは負のモジュレーターとして働く化合物、ならびにTAAR1受容体を過剰発現するトランスジェニック動物モデルは、この受容体ファミリーの分子機能を分析するための、および薬物開発における標的としてそれらの可能性のある関連性を完全に理解するための、必須のツールである。

20

30

【0003】

【非特許文献1】LindemannおよびHoner、2005年

【非特許文献2】Branchek, T.A.およびBlackburn, T.P., *curr. Opin. Pharmacol.*、2003年、3、p.90-97

40

【非特許文献3】Premont, R.T., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*、2001年、98、p.9474-9475

【非特許文献4】Davenport, A.P., *Curr. Opin. Pharmacol.*、2003年、3、p.127-134

【非特許文献5】Lindemann, L., Ebeling, M., Kratochwil, N.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Hoener, M.C., *Genomics*、2005年、85、p.372-385

【非特許文献6】Bunzowら、*Mol. Pharmacol.*、2001年、60、p.1181-1188

【非特許文献7】Borowsky, B.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*、2001年、98、p.896-8971

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 4 】

本発明は、TAAR1トランスジェニック動物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明(1)は、プロモーターに機能的に連結されたTAAR1をコードするDNA配列を含む遺伝子構築物である。

本発明(2)は、コード配列がヒト配列である、本発明(1)の遺伝子構築物である。

本発明(3)は、プロモーターが組織特異的プロモーターである、本発明(1)または(2)の遺伝子構築物である。

本発明(4)は、プロモーターが脳特異的プロモーターである、本発明(1)~(3)のいずれか一発明の遺伝子構築物である。 10

本発明(5)は、プロモーターが制御可能なプロモーターである、本発明(1)~(3)のいずれか一発明の遺伝子構築物である。

本発明(6)は、以下の段階を含む、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する方法である：

a)本発明(1)~(5)のいずれか一発明の遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、

b)該接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、

c)TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。 20

本発明(7)は、以下の段階を含む、トランスジェニックTAAR1を発現する非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法である：

a)本発明(1)~(5)のいずれか一発明の遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、

b)該接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、

c)トランスジェニックTAAR1を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。

本発明(8)は、本発明(6)~(7)のいずれか一発明の方法により作製されたトランスジェニック非ヒト動物である。 30

本発明(9)は、本発明(1)~(5)のいずれか一発明の遺伝子構築物をゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明(10)は、トランスジェニック動物が齧歯動物である、本発明(8)または(9)のトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明(11)は、トランスジェニック動物がマウスである、本発明(8)または(9)のトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明(12)は、トランスジェニック動物がC57BL/6である、本発明(8)または(9)のトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明(13)は、TAAR1タンパク質を過剰発現する本発明(8)~(12)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物である。 40

本発明(14)は、TAAR1タンパク質を組織特異的様式で過剰発現する、本発明(8)~(12)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明(15)は、本発明(8)~(14)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物の子孫である。

本発明(16)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する細胞株または初代細胞培養物である。

本発明(17)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または器官型脳切片培養物である。

本発明(18)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物である。 50

本発明(19)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明のトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織抽出物または細胞抽出物である。

本発明(20)は、鬱病、不安障害、双極性障害、注意欠陥多動性障害、ストレス関連障害、統合失調症のような精神病性障害、パーキンソン病のような神経疾患、アルツハイマー病のような神経変性障害、癲癇、片頭痛、高血圧症、薬物乱用、ならびに摂食障害、糖尿病、糖尿病性合併症、肥満症、異脂肪血症のような代謝性障害、エネルギー消費および同化の障害、体温恒常性の障害および機能不全、睡眠および概日リズムの障害、ならびに心血管障害を含む障害における、本発明(8)~(15)のいずれか一発明の非ヒトトランスジェニック動物、または本発明(16)の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明(17)の組織もしくは器官型脳切片培養物、または本発明(18)の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または本発明(19)の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、該障害における化合物の治療効果を同定および試験するためのモデルとしての使用である。 10

本発明(21)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明の非ヒトトランスジェニック動物、または本発明(16)の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明(17)の組織もしくは器官型脳切片培養物、または本発明(18)の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または本発明(19)の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1機能を評価するためのツールとしての使用である。

本発明(22)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明の非ヒトトランスジェニック動物、または本発明(16)の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明(17)の組織もしくは器官型脳切片培養物、または本発明(18)の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または本発明(19)の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1の未知のリガンドを同定するためのツールとしての使用である。 20

本発明(23)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明の非ヒトトランスジェニック動物、または本発明(16)の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明(17)の組織もしくは器官型脳切片培養物、または本発明(18)の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または本発明(19)の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAAR1に作用する化合物の特異性を測定するためのツールとしての使用である。

本発明(24)は、本発明(8)~(15)のいずれか一発明の非ヒトトランスジェニック動物、または本発明(16)の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明(17)の組織もしくは器官型脳切片培養物、または本発明(18)の組織移植片もしくは器官移植片もしくはその培養物、または本発明(19)の組織抽出物もしくは細胞抽出物の、TAARの細胞内輸送またはTAARに連結した他の細胞成分の細胞内輸送を研究するための使用である。 30

本発明(25)は、特に本明細書中の例に関連して、実質的に本明細書に記載するような、遺伝子構築物、方法、トランスジェニック動物、試験系、および使用である。

【発明の効果】

【0006】

本発明により、TAAR1トランスジェニック動物が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明は、プロモーターに機能的に連結されたTAAR1をコードするDNA配列を含む遺伝子構築物を提供する。 40

【0008】

TAAR1遺伝子の配列は、いかなる動物由来であってもよい。好ましくは、taar1の配列は哺乳動物に由来し、より好ましくは、taar1の配列はヒトの配列(NM_138327, SEQ ID NO:1)またはマウスの配列(NM_053205, SEQ ID NO:2)である。

【0009】

プロモーターは神経細胞プロモーター(neuronal promoter)でありうる。好ましい態様において、プロモーターは組織特異的プロモーターである。組織特異的プロモーターは、例えば、脳組織において(脳特異的)、筋肉組織において、肝臓組織において、腎臓組織においてなど、組織特異的様式で遺伝子の発現を制御および指揮する、いかなるプロモータ 50

ーであってもよい。好ましくは、プロモーターは、中枢神経系(CNS)における特異的発現を提供する。最も好ましくは、プロモーターはマウスThy1プロモーターである(Ingraham, H.A., Lawless, G.M., Evans, G.A. (1986) The mouse Thy-1.2 glycoprotein gene: complete sequence and identification of an unusual promoter. *J Immunol.* 136, 1482-1489)。

【0010】

プロモーターはまた、制御可能なプロモーターでありうる。制御可能なプロモーターは、特定の誘導物質または抑制物質の添加により、調節可能および/または誘導可能な様式で導入遺伝子の発現を制御する、いかなるプロモーターであってもよい。いくつかの誘導性細菌プロモーターは、当技術分野において公知である(Schultze N, Burki Y, Lang Y, Certa U, Bluethmann H; *Nat Biotechnol* 1996; 14(4):490-503; va der Neut R; Targeted gene disruption: applications in neurobiology; *J Neurosci Methods* 1997; 71(1):19-27; Liu HS, Lee CH, Lee CF, Su Ij, Chang TY; Lac/Tet dual-inducible system functions in mammalian cell lines. *Biotechniques.* 1998; 24(4):624-8, 630-2)。

10

【0011】

本明細書において用いられる「プロモーター」という用語は、コード配列の発現を制御するDNA領域を指す。

【0012】

本明細書において用いられる「トランスジェニックDNA」という用語は、生物体へ人工的に導入かつ組み入れられたDNAを表す。

20

【0013】

本明細書において用いられる「taar1遺伝子の配列」という用語は、TAAR1をコードするDNA配列を表す。

【0014】

遺伝子構築物は、追加として、コザック(Kozak)配列を含んでいてもよい。好ましくは、遺伝子構築物は、例えば、配列：tccaccのような最適化されたコザック配列を含む。コザック配列は、mRNAの翻訳のためのATG開始シグナルを取り囲むDNA配列である(Kozak, M., An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(1989) 8125-8148)。

【0015】

好ましい態様において、遺伝子構築物は、追加として、N末端インフルエンザ赤血球凝集素ウイルスリーダー配列を含む。別の好ましい態様において、遺伝子構築物は、追加として、例えば、M1-FLAGエピトープのようなエピトープマーカを含む。別の好ましい態様において、遺伝子構築物は、追加として、Met-Glyリンカーを含む。よりいっそう好ましい態様において、遺伝子構築物は、N末端インフルエンザ赤血球凝集素ウイルスリーダー配列、M1-FLAGエピトープ、およびMet-Glyリンカーを含む(Bunzow, et al. (2001) *Mol. Pharmacol.* 60, 1181-1188; X.M. Guan, T.S. Kobilka, B.K. Kobilka (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J. Biol. Chem.* 267, 21995-21998)。

30

【0016】

好ましくは、遺伝子構築物は、図1または図2に示すとおりである。

40

【0017】

より好ましくは、遺伝子構築物は、アクセッション番号DSM 17761として寄託されたプラスミドpThy1-hsTAAR1(2005年11月30日の発効寄託日でthe Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)においてブダペスト条約に基づいて寄託された)に組み入れられたThy1-hsTAAR1である、または遺伝子構築物は、アクセッション番号DSM 17760として寄託されたプラスミドpThy1-mmTaar1(2005年11月30日の発効寄託日でthe Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)においてブダペスト条約に基づいて寄託された)に組み入れられたThy1-mmTAAR1である。

【0018】

50

本発明はさらに、以下の段階を含む、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する方法を提供する：

- a)上記のような遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、
- b)その接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、
- c)TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。

【0019】

本発明のさらなる態様は、以下の段階を含む、トランスジェニックTAAR1を発現する非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法を提供する：

- a)上記のような遺伝子構築物を非ヒト接合体または非ヒト胚幹細胞へ導入する段階、
- b)その接合体または胚幹細胞からトランスジェニック非ヒト動物を発生させる段階、およびそれにより、
- c)トランスジェニックTAAR1を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製する段階。

【0020】

接合体または胚幹細胞は、いかなる非ヒト動物に由来していてもよい。好ましくは、接合体または胚幹細胞は齧歯動物に由来する。より好ましくは、接合体または胚幹細胞はマウスに由来する。

【0021】

好ましくは、上記の方法に用いる接合体は、C57BL/6J接合体である。本発明の方法にも用いることのできる、当技術分野において用いられる接合体としては、限定されるわけではないが、CBA/接合体、BALB/c接合体、DBA/2接合体、およびSV129接合体が挙げられる。

【0022】

本発明の方法にも用いることのできる、当技術分野において用いられる胚幹細胞としては、限定されるわけではないが、C57BL/6、CBA/、BALB/c、DBA/2、およびSV129のようなマウス系統由来の胚幹細胞が挙げられる。好ましくは、C57BL/6マウス由来の胚幹細胞が用いられる(Seong, E. et al. (2004) Trends Genet. 20, 59-62; Wolfer, D.P. et al., Trends Neurosci. 25(2002):336-340)。

【0023】

本発明はさらに、上記の方法のいずれかにより作製されたトランスジェニック非ヒト動物を提供する。

【0024】

本明細書において用いられる「トランスジェニックTAAR1」という用語は、生物体へ人工的に導入かつ組み入れられたDNAから生じるTAAR1タンパク質を表す。

【0025】

本明細書において用いられる「トランスジェニック動物」という用語は、ゲノムにトランスジェニックDNAを含む動物を表す。このトランスジェニックDNAは、ゲノムのどこかに組み入れられうる。

【0026】

例えば、トランスジェニック動物は、上記のDNA構築物を接合体の前核へ注入し、注入を受けた接合体を偽妊娠の仮親雌へ移し、その卵母細胞から生じた創始動物を野生型動物と交配し、これらの交配から生じた子孫を合成DNA導入遺伝子構築物の存在について検査することにより作製でき、任意でヘミ接合型の動物を交配することによりホモ接合型のトランスジェニック動物を発生させることができる。

【0027】

または、トランスジェニック動物は、上記のような遺伝子構築物を胚幹細胞へ導入し、その後、ゲノムにおける導入遺伝子の存在について胚幹細胞クローンを選択し、形質転換した胚幹細胞クローンにおいて導入遺伝子の存在を検証し、検証した組換え胚幹細胞を野生型動物の胚盤胞へ注入し、注入を受けた胚盤胞を偽妊娠の仮親雌へ移し、その胚盤胞から生じたキメラを野生型動物へ交配し、これらの交配から生じた子孫を導入遺伝子の存在

10

20

30

40

50

について検査することにより作製でき、任意でヘミ接合型の動物を交配することによりホモ接合型のトランスジェニック動物を発生させることができる。

【0028】

本発明の一つの態様において、TAAR1をコードするトランスジェニックDNAをゲノムに含むトランスジェニック非ヒト動物が提供される。好ましい態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、図1に示すような遺伝子構築物、または図2に示すような遺伝子構築物を含む。

【0029】

別の好ましい態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、アクセッション番号DSM 17761として寄託されたプラスミドpThy1-hsTAAR1(2005年11月30日の発効寄託日でthe D 10
eutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)においてブダペスト条約に基づいて寄託された)に組み入れられた遺伝子構築物Thy1-hsTAAR1を含むか、または遺伝子構築物は、アクセッション番号DSM 17760として寄託されたプラスミドpThy1-mmTaaR1(2005年11月30日の発効寄託日でthe Deutsche Sammlung von Microorganismen u
nd Zellkulturen GmbH (DSMZ)においてブダペスト条約に基づいて寄託された)に組み入れられたThy1-mmTaaR1である。

【0030】

別の態様において、トランスジェニックTAAR1を発現するトランスジェニック非ヒト動物が提供される。好ましい態様において、トランスジェニックTAAR1は、組織特異的様式 20
で、すなわち、脳において発現される。別の態様において、トランスジェニックTAAR1の発現は、例えば、特定の誘導物質または抑制物質の添加により、時間的に制御されうる。好ましい態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニックTAAR1タンパク質を過剰発現する。より好ましい態様において、トランスジェニックTAAR1は組織特異的様式で過剰発現される。

【0031】

トランスジェニック非ヒト動物は、本発明の方法に用いることのできる、当技術分野において公知のいかなる非ヒト動物であってもよい。好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物は哺乳動物であり、より好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物は齧歯動物である。最も好ましくは、本発明のトランスジェニック動物はマウスである。

【0032】

上記のトランスジェニック非ヒト動物は、遺伝学的に、分子的に、および行動的に分析されうる。 30

【0033】

本発明はまた、本発明により提供され、同じ遺伝子型とまたは別の遺伝子型と交配することにより得られるような、トランスジェニック非ヒト動物の子孫に関する。本明細書において、子孫は後代の同義語として用いられる。

【0034】

トランスジェニック動物は、初代細胞培養物を調製するために、およびこれらの動物またはその子孫の初代細胞調製物由来の二次細胞株を調製するために用いられうる。さらに、トランスジェニック動物は、組織または器官型脳切片培養物を調製するために用いられ 40
うる。さらに、トランスジェニック動物は、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物の調製のために用いられうる。加えて、トランスジェニック動物は、膜調製物もしくはシナプトソーム調製物のような組織抽出物または細胞抽出物を調製するために用いられうる。

【0035】

本発明はさらに、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する細胞株または初代細胞培養物を提供する。

【0036】

さらに、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織または器官型脳切片培養物を提供する。 50

【0037】

加えて、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物を提供する。

【0038】

さらになお、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する組織抽出物または細胞抽出物を提供する。

【0039】

モデルに基づいた細胞培養物は2つの方法により調製することができる。細胞培養物は、非ヒトトランスジェニック動物から単離してもよく、または標準的細胞トランスフェクション技術で上記と同じ遺伝子構築物を用いて樹立した細胞培養物から調製してもよい。

10

【0040】

TAAR1をコードするトランスジェニックDNAを含む遺伝子構築物の組込みは、動物の組織生検から単離したDNAを用いてゲノムサザンプロットおよびPCR分析を含む様々な方法により検出することができる。

【0041】

逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による、またはノーザンプロット、インサイチュハイブリダイゼーションによるmRNA定量を含むRNAレベルでの方法と、組織化学法、免疫プロット分析、および結合研究を含むタンパク質レベルでの方法とを含む、トランスジェニックDNAの発現を検出するために用いられうる多数の分析的手順があることは、当業者に明らかであると思われる。導入遺伝子の発現レベルの定量は、当業者にとって一般的なELISA技術によりさらに測定することができる。

20

【0042】

定量的測定は、多くの標準的アッセイ法を用いて達成されうる。例えば、転写レベルは、RT-PCR、ならびにリボヌクレアーゼプロテクション、ノーザンプロット分析、およびRNAドットプロット分析を含むハイブリダイゼーション方法を用いて測定することができる。タンパク質レベルは、ELISA、ウェスタンプロット分析により、および免疫組織化学的または組織化学的に染色した組織切片の比較により、アッセイすることができる。免疫組織化学的染色、酵素的組織化学的染色、加えて免疫電子顕微鏡法もまた、内因性および過剰発現させたTAAR1タンパク質の組織分布を評価するために用いられうる。

【0043】

本発明のトランスジェニック動物はさらに、免疫組織化学法、電子顕微鏡法、磁気共鳴映像法(MRI)、陽電子放出型断層撮影法(PET)を含む当技術分野における公知の方法により、ならびに、神経機能、感覚機能、および認知機能を扱う行動的および生理学的研究、加えて生理学的(例えば、代謝性)パラメーターにより特徴付けることができる。行動試験および生理学的検査の例は以下のとおりである：自発性行動、認知機能に関連した行動、薬理的に乱された行動、握力試験、水平細線試験、強制水泳試験、ロータロッド試験、歩行活動試験、前パルス阻害試験、モリス水迷路試験、Y迷路試験、明暗嗜好性試験、受動的および能動的回避試験、ガラス玉覆い隠し試験(marble burying test)、十字迷路試験、学習性無力感試験、ストレスにより引き起こされた高体温、長い期間をかけての食物消費および体重の上昇の測定、静止および基礎状態下ならびに熱および寒冷曝露中の体温およびエネルギー消費の測定、温熱中間帯の測定、食物同化係数の測定(例えば、ボンベ熱量測定法による)、エネルギー同化および糞のエネルギー含量の測定、(例えば、炭水化物および脂質代謝の分析のための)呼吸係数の測定、食事制限中の基質利用およびエネルギー消費の測定、酸素消費、CO₂発生、および(例えば間接的熱量測定法による)熱発生量の測定、静止、基礎、およびストレス状態下での心拍数および血圧の測定(例えば、遠隔測定法による)、身体組成の測定(例えば、水分含有量、脂肪量、および除脂肪量に関する)。

30

40

【0044】

本発明のさらなる目的は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養

50

物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、鬱病、不安障害、双極性障害、注意欠陥多動性障害、心的外傷後ストレス障害のようなストレス関連障害、統合失調症のような精神病性障害、パーキンソン病のような神経疾患、アルツハイマー病のような神経変性障害、癲癇、片頭痛、高血圧症、薬物乱用、ならびに摂食障害、糖尿病、糖尿病性合併症、肥満症、異脂肪血症のような代謝性障害、エネルギー消費および同化の障害、体温恒常性の障害および機能不全、睡眠および概日リズムの障害、ならびに心血管障害を含む障害における化合物の治療効果を同定および試験するためのモデルとしての使用である。

【0045】

さらになお、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、鬱病、不安障害、双極性障害、注意欠陥多動性障害、心的外傷後ストレス障害のようなストレス関連障害、統合失調症のような精神病性障害、パーキンソン病のような神経疾患、癲癇、片頭痛、高血圧症、薬物乱用、ならびに摂食障害、糖尿病、糖尿病性合併症、肥満症、異脂肪血症のような代謝性障害、エネルギー消費および同化の障害、体温恒常性の障害および機能不全、睡眠および概日リズムの障害、ならびに心血管障害を含む障害を引き起こす化合物に対する感受性を研究するためのモデルとしての使用を提供する。

【0046】

本発明のさらなる目的は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、TAAR1機能を評価するためのツールとしての使用である。

【0047】

さらに、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、未知のTAAR1リガンドの同定およびその特徴付けのためのツールとしての使用を提供する。

【0048】

さらになお、本発明は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、TAAR1に作用する化合物の特異性を測定するためのツールとしての使用を提供する。

【0049】

本発明のさらなる目的は、本発明により提供されるようなトランスジェニック非ヒト動物またはその子孫に由来する非ヒトトランスジェニック動物、細胞株または初代細胞培養物、組織または器官型脳切片培養物、組織外植片もしくは器官外植片またはその培養物、組織抽出物または細胞抽出物の、TAARの細胞内輸送またはTAARに連結した他の細胞成分の細胞内輸送を研究するための使用である。

【0050】

本発明はさらに、特に本明細書中の例に関連して、実質的に本明細書に記載するような、遺伝子構築物、方法、トランスジェニック動物、試験系、および使用を提供する。

【0051】

ここで、本発明を一般的に記載してきたが、同じことは、添付の図と共に特定の例を参照することによりさらに良く理解されるようになると思われる。特定の例は例証のみを目的として本明細書に含まれており、他に特定がない限り、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0052】

実施例で参照する市販の試薬は、他に規定がない限り製造会社の使用説明書に従って用いた。

【0053】

実施例1：pThy1-hsTAAR1およびpThy1-mmTaar1プラスミド構築物の構築

cDNA配列のPCR増幅

オリゴヌクレオチドは、公開されているマウスTAAR1コード配列(Genbankアクセッション番号NM_053205、SEQ ID NO:2)もしくはヒトTAAR1コード配列(Genbankアクセッション番号NM_138327、SEQ ID NO:1)、またはpThy1-hsTAAR1およびpThy1-mmTaar1プラスミドの他のエレメントに基づいて設計し、Microsynth AG(Balgach, Switzerland)から入手した。すべての分子クローニング技術は、本質的にSmbrook et al. (Molecular Cloning: A laboratory manual. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)ならびにキットおよび酵素の供給業者の使用説明書に従って行った。

10

【0054】

ヒト(hsTAAR1)およびマウス(mmTaar1)のコード配列は、ゲノムC57BL/6 DNA(mmTaar1)またはクローン化したコード配列pcDNA3.1-humTar01(hsTAAR1)からPCRにより増幅した。

【0055】

5'-オリゴヌクレオチド、hTar1-tg-3c(SEQ ID NO:21)、およびmTar1-tg-1c(SEQ ID NO:27)は、XhoI部位、コザック配列、インフルエンザ赤血球凝集素ウイルスのシグナル配列をコードする配列、FLAGエピトープタグ、およびMet-Glyリンカー(図1C、図2C)を含むように設計した。3'-オリゴヌクレオチド、hTar1-tg-4nc(SEQ ID NO:22)、およびmTar1-tg-2nc(SEQ ID NO:28)は終止コドンのすぐ下流にXhoI部位を導入している。

20

【0056】

・hsTAAR1-PCR増幅

全容量20 μ l中、0.5 ng/ μ l鑄型DNA(pcDNA3.1-humTar01)、300 μ M dNTP(PCRヌクレオチドミックス, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1 μ MオリゴヌクレオチドhuTar1-tg-3c、1 μ MオリゴヌクレオチドhuTar1-tg-4nc、1 \times PCRバッファ-3(Expand High Fidelity PCR Systemの一部;Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、0.075 U/ μ l Expand Polymerase Mix(Expand High Fidelity PCR Systemの一部;Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を以下のプロトコールでインキュベートした：PCR Thermocycler MJ Research PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, USA)において、94 $^{\circ}$ C, 2分間；10 \times (94 $^{\circ}$ C, 10秒間、60 $^{\circ}$ C, 30秒間、68 $^{\circ}$ C, 2分間)；20 \times (94 $^{\circ}$ C, 10秒間、60 $^{\circ}$ C, 30秒間、68 $^{\circ}$ C, 2分間 + 15秒間/サイクル)；68 $^{\circ}$ C, 7分間；12 $^{\circ}$ C。

30

【0057】

・mmTaar1-PCR増幅

全容量20 μ l中、0.5 ng/ μ l鑄型DNA(ゲノムC57BL/6 DNA)、300 μ M dNTP(PCRヌクレオチドミックス, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1 μ MオリゴヌクレオチドmTar1-tg-1c、1 μ MオリゴヌクレオチドmTar1-tg-2nc、1 \times PCRバッファ-3(Expand High Fidelity PCR Systemの一部;Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、0.075 U/ μ l Expand Polymerase Mix(Expand High Fidelity PCR Systemの一部;Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を以下のプロトコールでインキュベートした：PCR Thermocycler MJ Research PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, USA)において、94 $^{\circ}$ C, 2分間；10 \times (94 $^{\circ}$ C, 10秒間、60 $^{\circ}$ C, 30秒間、68 $^{\circ}$ C, 2分間)；20 \times (94 $^{\circ}$ C, 10秒間、60 $^{\circ}$ C, 30秒間、68 $^{\circ}$ C, 2分間 + 15秒間/サイクル)；68 $^{\circ}$ C, 7分間；12 $^{\circ}$ C。

40

【0058】

クローニングベクター-pCMVへのクローニング

結果として生じた1.1kb PCR増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により分離し、続いてStrataPrep PCR Purification Kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA)により精製した。精製後のPCR産物は、次いでpCMV PCR Cloning Kit(Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, U

50

SA)においてpCMVScriptベクターのSrfI部位へキット使用説明書に従いサブクローニングした。結果として生じたベクターは、pCMV-mmTaar1およびpCMV-hsTAAR1である。

【0059】

配向および配列は、表1に示すオリゴヌクレオチドを用い、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)およびABIPrism 310 Genetic Analyzerによりシーケンシングして確認した。

【0060】

(表1) pCMV-mmTaar1およびpCMV-hsTAAR1のシーケンシング反応

ベクター	シーケンシングに用いたオリゴヌクレオチド		結果として生じた配列:
	名称	SEQ. ID NO:	
pCMV-hsTAAR1	T3フォワード	29	SEQ. ID NO: 5
pCMV-hsTAAR1	T7リバーズ	30	SEQ. ID NO: 6
pCMV-hsTAAR1	hu-Tar 303c	17	SEQ. ID NO: 7
pCMV-hsTAAR1	hu-Tar 408nc	18	SEQ. ID NO: 8
pCMV-hsTAAR1	hu-Tar 695 c	19	SEQ. ID NO: 9
pCMV-hsTAAR1	hu-Tar 757 nc	20	SEQ. ID NO: 10
pCMV-mmTaar1	T3フォワード	29	SEQ. ID NO: 11
pCMV-mmTaar1	T7リバーズ	30	SEQ. ID NO: 12
pCMV-mmTaar1	mTar-293c	23	SEQ. ID NO: 13
pCMV-mmTaar1	mTar-345nc	24	SEQ. ID NO: 14
pCMV-mmTaar1	mTar-663c	25	SEQ. ID NO: 15
pCMV-mmTaar1	mTar-755nc	26	SEQ. ID NO: 16

10

20

【0061】

SEQ ID NO:5~10の配列については手作業で編集を行い、pCMVのベクター配列については省略した。これらの配列を組み合わせて、pCMV-hsTAAR1ベクター(SEQ ID NO:3)の正しい配列を確認することができる。

30

【0062】

SEQ ID NO:11~16の配列については手作業で編集を行い、pCMVのベクター配列については省略した。これらの配列を組み合わせて、pCMV-mmTaar1ベクター(SEQ ID NO:4)の正しい配列を確認することができる。

【0063】

pThyベクターへのクローニング

ベクターpCMV-mmTaar1およびpCMV-hsTAAR1をそれぞれ用いて、ベクターpThy1-mmTaar1およびpThy1-hsTAAR1を作製した。そのために、pCMV-mmTaar1およびpCMV-hsTAAR1をXhoIで消化し、結果として生じたTaar1コード配列を含む1.1kb断片をアガロースゲルから精製した。その後、断片を、制限酵素XhoIで開裂したベクターpThy1(図1A; 図2A; Richards, J.G., Higgins, G.A., Ouagazzal, A.M., Ozmen, L., Kew, J.N., Bohrmann, B., Malherbe, P., Brockhaus, M., Loetscher, H., Czech, C., Huber, G., Bluethmann, H., Jacobsen, H. and Kemp, J.A. (2003) J. Neurosci. 23(26), 8989-9003)にライゲーションした。

40

【0064】

結果として生じたベクターpThy1-mmTaar1およびpThy1-hsTAAR1を、Thy1-2c(SEQ ID NO:31)でのシーケンシングおよび制限酵素消化により確認した。

【0065】

50

寄託データ：

遺伝子構築物pThy1-mmTaar1を含むプラスミドは、アクセッション番号DSM17760として、2005年11月30日の発効寄託日で、the Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Germanyにおいてブダペスト条約に基づいて寄託された。

【0066】

遺伝子構築物pThy1-hsTAAR1を含むプラスミドは、アクセッション番号DSM17761として、2005年11月30日の発効寄託日で、the Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Germanyにおいてブダペスト条約に基づいて寄託された。

10

【0067】

実施例2：トランスジェニックマウス系統B6Tg(TAAR1)1およびB6-Tg(Taar1)2の作製

動物のすべての取扱いは、動物研究におけるスイス連邦および州の法律に従って行い、変異体マウスの作製および取扱いについての許可は、Tierversuchgenehmigung No. 192を以てバーゼル市のKantonale Veterinaramtから明確に与えられた。

【0068】

プラスミドpThy1-mmTaar1およびpThy1-hsTAAR1を、NotIおよびPvuIで消化し、続いて、Thy1プロモーターおよびTaar1配列を含む7.6kb断片をゲル精製した。pThy1-mmTaar1およびpThy1-hsTAAR1のこれらの断片は、受精したC57BL/6卵母細胞の前核へ注入し、その後、(Gene Targeting. 1999, Second Edition, The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York)およびHogan, B., Beddington, R., Costantini, F., und Lacy, E.(Manipulating the mouse embryo. 1994, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor)に本質的に記載されているように、偽妊娠の仮親雌の卵管へ移した。仮親雌が出産した子孫を創始動物とみなし、ゲノムにおける個々の導入遺伝子の存在について分析した。

20

【0069】

そのために、核酸精製用のMagNApure LCシステム(Roche Applied Science, Rotkreuz, Switzerland)を製造会社の使用説明書に従って用い、成体動物の尾生検からゲノムDNAを単離し、PCRの手段によりTAAR1導入遺伝子の存在について分析した。

【0070】

遺伝子構築物「Thy1-hsTAAR1」をゲノムに含むトランスジェニック動物をB6-Tg(TAAR1)と称し、遺伝子構築物「Thy1-mmTaar1」をゲノムに含むトランスジェニック動物をB6-Tg(Taar1)2と称する。

30

【0071】

・B6-Tg(TAAR1)の遺伝子型判定

全容量20 μ l中、0.5 ng/ μ l尾生検DNA、200 μ M dNTP(PCRヌクレオチドミックス, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1 μ MオリゴヌクレオチドThy1-2c(SEQ ID NO:31)、1 μ MオリゴヌクレオチドhuTar1-757-n(SEQ ID NO:20)、1 \times PCR反応バッファー(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、0.05 U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を以下のプロトコールでインキュベートした：PCR Thermocycler MJ Research PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, USA)において、94 $^{\circ}$ C, 2分間；30 \times (94 $^{\circ}$ C, 20秒間、60 $^{\circ}$ C, 30秒間、72 $^{\circ}$ C, 50秒間)；72 $^{\circ}$ C, 7分間；12 $^{\circ}$ C。

40

【0072】

・B6-Tg(Taar1)2の遺伝子型判定

全容量20 μ l中、0.5 ng/ μ l尾生検DNA、200 μ M dNTP(PCRヌクレオチドミックス, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1 μ MオリゴヌクレオチドmTar1-293-c、1 μ MオリゴヌクレオチドThy1-5-nc(SEQ ID NO:32)、1 \times PCR反応バッファー(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、0.05 U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を以下のプロトコールでインキュベートした：PCR Thermocycler MJ Research PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, USA)において94 $^{\circ}$ C, 2分間；30 \times (94 $^{\circ}$ C, 20秒間、64 $^{\circ}$ C, 30秒間、72 $^{\circ}$ C, 50秒間)；72 $^{\circ}$ C, 7分間；12 $^{\circ}$ C。

50

30秒間、72℃,50秒間); 72℃,7分間; 12℃。

【0073】

Sambrookら(1989)に記載されているように、標準アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分析した。遺伝子型判定の例としては、図3を参照のこと。

【0074】

3匹の創始動物は、ヒトTAAR1構築物の挿入ありと同定され、B6-Tg(TAAR1)1.6、B6-Tg(TAAR1)1.7、およびB6-Tg(TAAR1)1.29と称された。

【0075】

3匹の創始動物は、マウスTaar1構築物の挿入ありと同定され、B6-Tg(Taar1)2.15、B6-Tg(Taar1)2.19、およびB6-Tg(Taar1)2.27と称された。

10

【0076】

トランスジェニックマウス系統B6-Tg(TAAR1)1およびB6-Tg(Taar1)2の脳領域における、ヒトTAAR1発現およびマウスTAAR1発現それぞれの半定量的分析

同定した創始動物B6-Tg(TAAR1)1.6、B6-Tg(TAAR1)1.7、およびB6-Tg(TAAR1)1.29の子孫を、構築物Thy1-hsTAAR1によりコードされるmRNAの発現について試験した。同定した創始動物B6-Tg(Taar1)2.15、B6-Tg(Taar1)2.19、およびB6-Tg(Taar1)2.27の子孫を、構築物Thy1-mm(Taar1)によりコードされるmRNAの発現について試験した。

【0077】

構築物Thy1-mm(Taar1)およびThy1-hsTAAR1の発現について試験するために、リアルタイムPCRアッセイ法を用いた。このために、マウス脳の全RNAを単離し、cDNAへ転写し、両構築物に共通する合成N末端タグ(図1C、図2C)に特異的なプライマーおよびプローブの組み合わせを用いてリアルタイムPCRにより検出した。

20

【0078】

ChomczynskiおよびSacchi(Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem. 162(1987) 156-159)に本質的に従って、RNAを組織試料から調製した。簡単に述べると、6~8週齢のマウスを屠殺して全脳を取り出し、Fast Prep FP120組織ホモジナイザー(Savant Instruments, Inc., Holbrook, N.Y.)を設定6で20秒間用いて、Lysing Matrix Dチューブ中、10×容量のTrizol試薬(Invitrogen, Paisley, UK)にホモジナイズした。ホモジネートを1/5容量のクロロホルムで抽出し、その後、2容量のイソプロパノールを用いて沈澱させた。沈澱した全RNAを80%エタノールで洗浄し、DEPC-H₂Oに溶解した。さらに、RNase-Free DNase Set(Qiagen, Hilden, Germany)を用いたカラム上でのデオキシリボヌクレアーゼ消化を含むRNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)のRNeasy MiniのRNAクリーンアップ用プロトコールを用いて全RNA 100 μgを精製した。

30

【0079】

cDNA合成については、Omniscript Reverse Transcription Kit(Qiagen, Hilden, Germany)を製造会社の使用説明書に従って用いた。簡単に述べると、全RNA 2 μgを、1 μMオリゴ(dT)15(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、0.5 mMの各dNTP(PCRヌクレオチドミックス, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1×バッファ-RT(Qiagen, Hilden, Germany)、10 U リボヌクレアーゼインヒビター(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、1 μl Omniscript逆転写酵素(Qiagen, Hilden, Germany)の全容量20 μlに混合した。この反応混合物を37℃で1時間インキュベートした。

40

【0080】

リアルタイムPCRは、Quantitect Gene Expression Assay Handbook (Qiagen, Hilden, Germany)によるCustom designed Quantitect Gene Expression Assayを用いて行った。導入遺伝子特異的Quantitectカスタムアッセイは、合成N末端タグを検出するように設計し、フォワードプライマー(SEQ ID NO:33)、リバースプライマー(SEQ ID NO:34)、およびFAM標識プローブ(SEQ ID NO:35)からなる。対照として、ハウスキーピング遺伝子マウスArbp(酸性リボソームリントンパク質P0(Acidic ribosomal phosphoprotein P0))に対するヤキマイエロー(Yakima Yellow)標識Quantitect Endogenous Control Assay(Mm Arbp 1 YY

50

Quantitect Gene Expression Assay, Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。QuantitectプロブPCRマスターミックス10 μ l、Quantitectアッセイミックス2 μ lおよびcDNA 2 μ lを、DNA Engine Opticon 2(MJ Research Inc., Watertown, USA)における白色反応プレートにセットし、以下の温度プロトコールでリアルタイムPCRを実施した：95 $^{\circ}$ C, 15分間、45 \times (94 $^{\circ}$ C, 15秒間、56 $^{\circ}$ C, 30秒間、76 $^{\circ}$ C, 30秒間)。C(T)値は、Opticon monitor Software(MJ Research Inc., Watertown, USA)を用いて計算した。

【0081】

1つの実験の結果を表2にまとめている。この実験において、B6-Tg(TAAR1)1.6、B6-Tg(TAAR1)1.7、B6-Tg(TAAR1)1.29、B6-Tg(Taar1)2.15、B6-Tg(Taar1)2.19、およびB6-Tg(Taar1)2.27の各系統2匹のマウス、加えて野生型マウス2匹を屠殺し、cDNAを上記のように生成し、導入遺伝子特異的Quantitectアッセイ(Qiagen, Hilden, Germany)では各マウスに対して2つのPCR反応を行い、対照として、Arbp特異的Quantitectアッセイでは各マウスに対して1つのPCR反応を行った(表2参照)。

10

【0082】

野生型マウス、逆転写酵素を加えていない対照反応、および水の対照からのC(T)値は、検出の閾値近くかまたは閾値未満で得たC(T)値である(表2)。一方、B6-Tg(TAAR1)1.7、B6-Tg(TAAR1)1.29、B6-Tg(Taar1)2.19、およびB6-Tg(Taar1)2.27系統は、C(T)値がプラスミドの陽性対照の範囲内であり(表2)、トランスジェニック構築物が発現している。

【0083】

(表2) mRNA転写産物の存在についての、B6-Tg(TAAR1)1およびB6-Tg(Taar1)2マウス脳に由来するcDNAのリアルタイムPCR分析の結果

20

試料：	導入遺伝子特異的 プローブ： C(T) \pm 標準偏差	ハウスキーピング 遺伝子(Arbp) プローブ： C(T) \pm 標準偏差
B6-Tg(TAAR1)1.6	36.4 \pm 4.2	30.7 \pm 0.6
B6-Tg(TAAR1)1.7	24.6 \pm 0.8	28.5 \pm 2.4
B6-Tg(TAAR1)1.29	27.2 \pm 1.6	31.6 \pm 2.2
B6-Tg(Taar1)2.15	36.2 \pm 3.4	29.6 \pm 0.1
B6-Tg(Taar1)2.19	23.7 \pm 0.4	30.0 \pm 1.8
B6-Tg(Taar1)2.27	24.9 \pm 0.6	28.0 \pm 1.3
野生型	39.6 \pm 3.5	28.1 \pm 1.1
ブランク(H ₂ O)	閾値未満	nd
B6-Tg(Taar1)2.19、逆転写なし	閾値未満	nd
B6-Tg(TAAR1)1.7、逆転写なし	閾値未満	nd
pThy1-mmTaarl (10 ³ コピー)	33.6	nd
pThy1-mmTaarl (10 ⁴ コピー)	29.1	nd
pThy1-mmTaarl (10 ⁵ コピー)	25.4	nd
pThy1-mmTaarl (10 ⁶ コピー)	22.2	nd
pThy1-mmTaarl (10 ⁷ コピー)	19.1	nd

30

40

(C(T)：PCRサイクルの数；nd：測定せず)。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】プラスミドpThy1-hsTAAR1(図示せず)に組み入れられた遺伝子構築物huTAAR-TGの

50

概略を示す図である。脳におけるヒトTAAR1 cDNAの発現を制御するために、Thy1遺伝子の制御領域を用いた。図1A：エクソン2およびエクソン4に位置する1.5kbp BanI-XhoI断片がXhoIクローニング部位で置換され、それによりエクソン3を欠失しているThy1遺伝子の6.8kb制御領域。Thy1遺伝子の存在するエクソン(エクソン1、エクソン2、エクソン4)を黒色で示す。図1B：ヒトTAAR1 cDNA(hsTAAR1、白色)を含むXhoI断片を挿入するために、Thy1遺伝子におけるXhoI部位を用いた。ヒトTAAR1 cDNAはN末端タグと融合させた(FLAG、斜線)。図1C：N末端タグをヌクレオチド配列としておよび一文字アミノ酸コードにしたその翻訳物として示す。コザック配列(小文字)の後に、インフルエンザ赤血球凝集素ウイルスのシグナル配列(大文字)、FLAGエピトープタグ(大文字、下線)、およびMet-Glyリンカー(大文字、イタリック体)が続く。

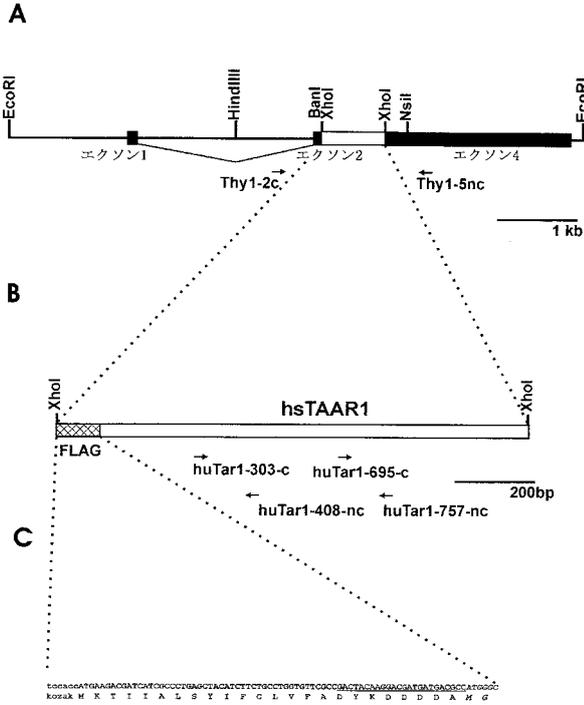
10

【図2】プラスミドpThy1-mmTaar1(図示せず)に組み入れられたmmTAAR-TG構築物の概略を示す図である。脳におけるマウスTaar1 cDNAの発現を制御するために、Thy1遺伝子の制御領域を用いた。図2A：エクソン2およびエクソン4に位置する1.5kbp BanI-XhoI断片がXhoIクローニング部位で置換され、それによりエクソン3を欠失しているThy1遺伝子の6.8kb制御領域。Thy1遺伝子の存在するエクソン(エクソン1、エクソン2、エクソン4)を黒色で示す。図2B：マウスTaar1 cDNA(mmTaar1、白色)を含むXhoI断片を挿入するために、Thy1遺伝子におけるXhoI部位を用いた。マウスTaar1 cDNAはN末端タグと融合させた(FLAG、斜線)。図2C：N末端タグをヌクレオチド配列としておよび一文字アミノ酸コードにしたその翻訳物として示す。コザック配列(小文字)の後に、インフルエンザ赤血球凝集素ウイルスのシグナル配列(大文字)、FLAGエピトープタグ(大文字、下線)、およびMet-Glyリンカー(大文字、イタリック体)が続く。

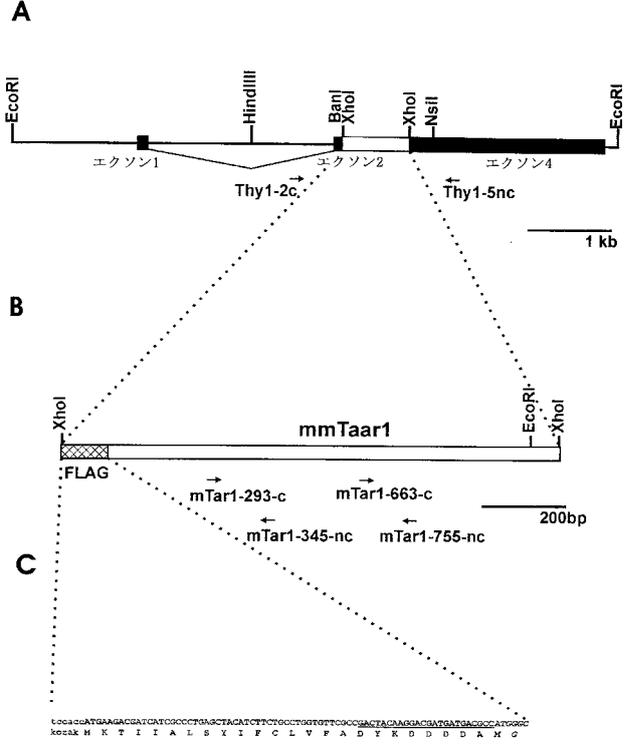
20

【図3】トランスジェニック系統ならびにB6-Tg(TAAR1)1およびB6-Tg(Taar1)2のPCRの手段による遺伝子型判定を示す図である。導入遺伝子の存在についてDNAを分析し、動物のそれぞれの遺伝子型を示す。分子量標準としてマーカーXIV(Roche)を用いた。図3A：B6-Tg(Taar1)2：マウス尾生検におけるThy1-mmTaar1配列の存在を検出するためのPCR反応の臭化エチジウム染色アガロースゲル。M：マーカーXIV、1：マウス生検9、2：マウス生検10、3：陽性対照、4：陰性対照。図3B：B6-Tg(TAAR1)1：マウス尾生検におけるThy1-hsTaar1配列の存在を検出するためのPCR反応の臭化エチジウム染色アガロースゲル。M：マーカーXIV、1：マウス生検34、2：マウス生検35、3：陽性対照、4：陰性対照。

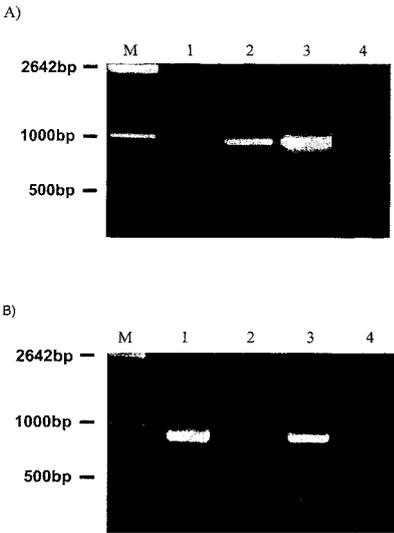
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

2007151552000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z

(72)発明者 リンデマン ロサー

スイス国 バーゼル ユングストラッセ 4 4

(72)発明者 メイヤー クラース アイコ

スイス国 バーゼル ロスリングルストラッセ 3 7

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB01 BB14 BB16 BB50 CB01 CB17 DA13 DA14

FB05

4B024 AA11 BA63 CA02 CA04 EA04 FA02 GA11

4B063 QA18 QQ79 QR72 QR77 QR80 QS24 QS28

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46