

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年7月23日(23.07.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/108102 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/050932
- (22) 国際出願日: 2015年1月15日(15.01.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-005429 2014年1月15日(15.01.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 群馬大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 Gunma (JP).
- (72) 発明者: 山本 正道(YAMAMOTO, Masamichi); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4

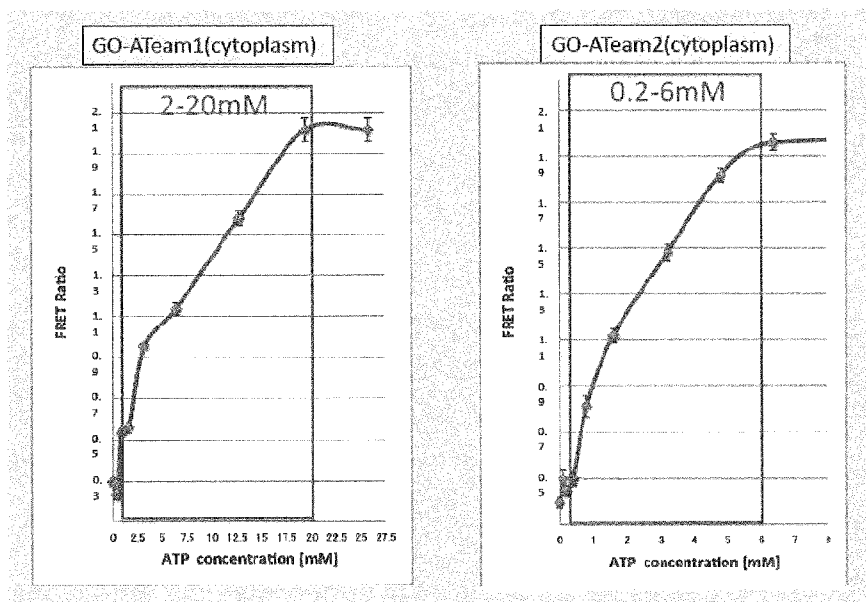
番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: ATP-VISUALIZING ANIMAL AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: ATP可視化動物およびその用途



(57) Abstract: A non-human mammal capable of expressing a fusion protein in which two fluorescent proteins are bound respectively on an amino terminal side and a carboxy terminal side of an ϵ -subunit of an ATP synthetase, wherein the two fluorescent proteins can respectively serve as a donor and an acceptor in fluorescence resonance energy transfer; and a method for screening for a medicinal agent, such as a prophylactic/therapeutic agent for various diseases, using the non-human mammal.

(57) 要約: ATP合成酵素の ϵ サブユニットのアミノ末端側およびカルボキシ末端側に、蛍光共鳴エネルギー移動におけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させてなる融合タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物、及びそれを用いた各種疾患の予防・治療剤などの薬剤のスクリーニング方法。

WO 2015/108102 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称： A T P 可視化動物およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、哺乳類生体内の A T P 分布と変動を観察することが可能な A T P 可視化動物とその用途に関する。

背景技術

[0002] アデノシン三リン酸（以下単に「A T P」という。）は、生体内におけるエネルギー通貨と呼ばれ、様々な生体反応に利用される。そのため、A T P 濃度をモニタリングすることは生体の状況を把握する上で重要である。これまで最も一般的に用いられている A T P の測定方法は、細胞を取得後、重さを量るまたは細胞数を数えた後に細胞を破碎して、その抽出物にルシフェラーゼを主成分とした試薬を混ぜることにより、発光量にて ATP 量を測定するルシフェラーゼ法である。しかし、この方法では、細胞数が正確に測れない、感度は高いが誤差値が大きい、試薬混合後の時間に依存して発光量が変わるため正確に測定できない、抽出方法により結果にムラがある、ルシフェラーゼの発光を主原理とするため、酸素濃度・pHなどに大きく依存する、細胞内の詳細な区分（細胞質・ミトコンドリアなどの細胞小器官）ができない、定点測定のみ可能で、経時的な変化は測定不可能である、といった問題がある。

[0003] 別の方法として、細胞・組織の前処理をおこなった後に質量分析装置にて測定する質量分析法がある。しかし、この方法も、多くの細胞数が必要、細胞内の詳細な区分（細胞質・ミトコンドリアなどの細胞小器官）ができない、定点測定のみ可能で、経時的な変化は測定不可能、前処理の方法で誤差値が大きい、1細胞での量は測定不可能である、といった問題がある。

[0004] 新たな測定方法として、A T P、A D P 及び A M P などのアデノシン核酸に反応しうるタンパク質であるイノシンモノホスフェート脱水素酵素 2 (inosine monophosphate dehydrogenase 2:IMPDH2) の C B S ドメインに、シアンフ

ルオレセントプロテイン（CFP）及びイエローフルオレセントプロテイン（YFP）を結合させた蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer:FRET）の手法を用いた測定方法が報告されている（非特許文献1）。さらに、特許文献1ではBacillus subtilis由来のATP合成酵素F₀F₁ ATPaseのATP感受ペプチドであるεタンパク質に、FRETにおけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光物質をそれぞれ結合させた蛍光標識融合タンパク質を用いたATP測定方法が開示されている。しかしながら、生体内の1細胞内におけるATP量やその分布・経時的な変化を定量的に測定することは難しかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W02008/117792

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Nat Biotechnol. 2007; 25(2):170-172.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、非ヒト哺乳類生体内の1細胞内におけるATP量とその分布や経時的な変化を定量的に測定する手段とこれを用いて生体特性を計測することで各種疾患の定量化や予防・治療する物質のスクリーニング方法に有用な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

[0008] 本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、ATP合成酵素のεサブユニットのアミノ末端側およびカルボキシ末端側に、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）におけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させてなる融合タンパク質を発現するマウスを作製することに成功し、このマウスを用いれば細胞や組織内のATPの分布や経時変化を定量的に測定できることを見出した。さらに、各種

疾患の予防・治療する物質のスクリーニング方法にも有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) A T P 合成酵素の ϵ サブユニットのアミノ末端側およびカルボキシ末端側に、蛍光共鳴エネルギー移動におけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させてなる融合タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物。

(2) A T P 合成酵素の ϵ タンパク質サブユニットが配列番号1または2に記載のアミノ酸配列を含む、(1)に記載の非ヒト哺乳動物。

(3) ドナー及びアクセプターとなりうる蛍光タンパク質の組み合わせが、シアンフルオレセントプロテイン (C F P)、イエローフルオレセントプロテイン (Y F P)、ブルーフルオレセントプロテイン (B F P)、グリーンフルオレセントプロテイン (G F P)、レッドフルオレセントプロテイン (R F P) 及びクサビラオレンジプロテイン (K0) などFRETを生じることのできる組み合わせである、(1)または(2)の非ヒト哺乳動物。

(4) 前記融合タンパク質をコードするD N Aが染色体上のR O S A 2 6 遺伝子座に挿入された、(1)～(3)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

(5) 前記融合タンパク質をコードするD N Aはlox系配列を有し、Cre recombinaseがlox系配列で挟まれた領域を除去することにより、前記融合タンパク質が発現する、(1)～(4)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

(6) 前記融合タンパク質をコードするD N AはCAGプロモーターの制御下におかれた、(1)～(5)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物と、疾患モデル動物との掛け合わせによって得られる、非ヒト哺乳動物。

(8) 疾患モデル動物が、自閉症モデル動物または心疾患モデル動物である、(7)に記載の非ヒト哺乳動物。

(9) マウスである、(1)～(8)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物。

(10) (1)～(9)のいずれかに記載の非ヒト哺乳動物又は該非ヒト哺乳

乳動物から得られる細胞、組織もしくは器官に被験物質を投与し、蛍光強度に基づいてATP濃度を測定することを特徴とする、ATPの測定方法。

(11)(10)に記載の方法によってATPを測定し、該測定結果に基づいて被験物質の薬効を評価することを特徴とする、薬剤のスクリーニングまたは薬効評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明により、非ヒト哺乳動物生体内の1細胞内におけるATP量とその分布や経時的な変化を定量的に測定できるようになった。細胞は破碎せずに生細胞のままATP量を測定でき、誤差値4%以内でATP量を正確に測定できる。さらに、測定は酸素濃度には無関係である。また、細胞内小器官内のATP量を定量的に測定することもできる。また、発生期間中の非ヒト哺乳動物胚などでのATPの分布も詳細に調べることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]G0-ATeam発現用コンストラクトの模式図。

[図2]ATP濃度とFRET比をプロットしたグラフ。

[図3]各G0-ATeam マウス胚（1細胞、2細胞および4細胞期）のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図4]各G0-ATeam マウス胚（8細胞期、16細胞期および桑実胚）のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図5]各G0-ATeam マウス胚（胚盤胞、E4.5およびE5.5）のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図6]各G0-ATeam マウス胚（E6.5およびE7.5）のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図7]各G0-ATeam マウス（新生仔）臓器のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図8]各G0-ATeam マウス（12ヶ月）臓器のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図9]各G0-ATeam マウス（12ヶ月）脳のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真（右）。左は2D massイメージングを参照として示す。

[図10]G0-ATeam 2マウスと自閉症モデルマウス(Caps2 Δ exon3)の掛け合わせ

で得られたマウス及び野生型マウスの小脳のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図11]G0-A_{Team} 1マウスまたは2マウスと自閉症モデルマウス(Caps2 Δ exon3)の掛け合わせで得られたマウス及び野生型マウスの海馬のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図12]G0-A_{Team} 2マウスの通常状態における心臓の経時変化のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図13]G0-A_{Team} 2マウスの低酸素状態における心臓の経時変化のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図14]G0-A_{Team} 2マウスの慢性心筋梗塞状態における心臓の経時変化のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図15]G0-A_{Team} 2可視化マウスに薬剤(β ブロッカー)を投与して心拍数を低下させたときの心臓の蛍光実体顕微鏡写真と各心室・心房におけるATP量の経時変化を示すグラフ。グラフの縦軸はATP量の相対値を示している。

[図16]G0-A_{Team} 2可視化マウスの正常時と低酸素処理時の各臓器のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図17]G0-A_{Team} 2可視化マウスに心筋梗塞を起こさせた時(赤)と、疑似手術した時(コントロール:青)とで各臓器におけるATP量の経時変化を比較したグラフ。グラフの縦軸はATP量の相対値を示しており、横軸の時間は10秒単位であり、100は1000秒である。中央は、コントロール(0秒)のG0-A_{Team} 2可視化マウスの内臓のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図18]成体のG0-A_{Team} 2可視化マウスから単離された心筋細胞に電気刺激を与えたときに起こる筋収縮-弛緩サイクルにおけるATP量の経時変化を示すグラフ。グラフの縦軸はATP量の相対値を示している。横軸は時間を示す。

[図19]G0-A_{Team} 2可視化マウスから単離された心筋細胞において、電気刺激をかける事により収縮運動を起こした時の細胞面積(点線)とATP量(実線)の変化を示すグラフ。グラフの縦軸は実線に対してはATP量の相対値を示しており、点線に対しては細胞面積を示している。また、横軸は時間を示す。時間は30ミリ秒単位であり、13は390ミリ秒である。1ppsは1パルス/秒の電気刺

激を示す。上は単離心筋細胞のATP分布を示す蛍光顕微鏡写真。

[図20]G0-ATeam 2可視化マウスの坐骨神経を電気刺激して筋収縮を起こさせた時の前頸骨筋におけるATP動態を調べた結果を示すグラフ。グラフの縦軸はATP量の相対値を示しており、横軸は時間（秒）を示す。2つの矢印の間、30秒間電気刺激を加えた。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に本発明を詳しく説明する。

[0013] 本発明の非ヒト哺乳動物は、*Bacillus subtilis*由来のATP合成酵素F₀F₁ ATPaseのATP感受ペプチドである ϵ サブユニットのアミノ末端側およびカルボキシ末端側に、FRETにおけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させてなる融合タンパク質（以下、蛍光融合タンパク質ということがある）を発現する非ヒト哺乳動物である。

本発明の非ヒト哺乳動物は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ヒツジ、ウシ、マーモセットなどの任意の非ヒト哺乳動物であり得る。

[0014] ATP合成酵素は、F型及びV型に分類され、F型はさらにF₁部位とF₀部位に分類される。F₁部位は、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ などのサブユニットから構成される。ATP合成酵素の ϵ サブユニットはATPに親和性が高く、ATP以外のヌクレオチド、例えばADP、dATP、GTPなどへの親和性がない、また、ATPに結合すると構造変化を起すことから、ATPの測定に有効である。

[0015] 本発明において使用される ϵ サブユニットは、いずれの生物種由来のものであってもよいが、取扱いの簡便さを考えると、微生物由来、例えば*Bacillus* sp. PS3由来(GenBank accession No. AB044942 (配列番号1))や*Bacillus subtilis*由来(GenBank accession No. Z28592 (配列番号2))に示す ϵ サブユニットを好適に使用することができる。また、これらの菌種以外の菌種から得られた ϵ サブユニットを用いることもできる。由来する生物種が異なれば、ATPへのアフィニティーが異なる(J. Biological Chemistry 2003; 278,

36013-36016., FEBS Letters 2005; 579, 6875-6878)。そのため、低濃度の A T P に応答するものから、細胞内部の A T P のように高濃度の A T P に応答するものまで、異なる ϵ サブユニットを使い分けることで、様々な濃度領域に感受性を有する A T P 測定用試薬の創出が可能と考えられる。

[0016] ϵ サブユニットは、N末端ドメインとC末端ドメインの2つのドメインを含む。N末端ドメインは、 ϵ サブユニットのN末端側から85番目くらいまでのアミノ酸で構成され、10本程度の β ストランドからなる。C末端ドメインは、 ϵ サブユニットのC末端側から45番目くらいまでのアミノ酸で構成され、2本の α ヘリックスからなる。C末端ドメインは、 ϵ サブユニット単独の場合は折りたたまれた結晶構造を示し、該 ϵ サブユニットがA T P 合成酵素の他のサブユニットである γ サブユニットと複合体を構成する場合は、伸びた構造を示す。また生化学的な実験結果から、 γ サブユニット等との複合体中では、 ϵ サブユニットのC末端ドメインはA T P の有無により構造変化を起こし、A T P がなければ伸びた状態であり、A T P が存在すると折りたたまれた構造になることが示される。これらにより、 ϵ サブユニットはA T P が存在しない場合ではC末端ドメインが伸びた、又は動きやすい状態にあり、A T P が結合すると折りたたまれたコンパクトな状態になるものと考えられる。

[0017] 本発明において、 ϵ サブユニットは全長である必要はなく、部分断片でもよい。部分断片は、 ϵ タンパク質において、少なくともA T P 特異的に構造変化を生じうる部位を構成するアミノ酸配列の部分であればよく、特に限定されない。例えば、上述のN末端ドメインとC末端ドメインの2つのドメインを含み、それらがA T P の存在により構造変化を生じるうる構成であればよい。

ϵ サブユニットは、上記A T P 特異的に構造変化を生じうる部位を構成するアミノ酸配列を含むのであれば、天然型サブユニットであってもよいし、該天然型 ϵ サブユニットのアミノ酸配列において、1または数個、例えば、1～5個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入又は付加されていてもよい。例え

ば、 ϵ サブユニットとATPとの反応による ϵ タンパク質の構造変化を阻害しうる物質が ϵ サブユニットに結合するのを防ぐために、アミノ酸の配列を一部置換してもよい。例えば、 ϵ サブユニットにおいて、他のサブユニットである γ サブユニットとの相互作用に必要な疎水的なアミノ酸残基（配列番号1ではVal20/Val42/Phe67/Leu78、配列番号2ではVal42/Phe67/Leu78）を、親水的なアミノ酸残基に置換することができる。また、配列番号3で示すように、野生型においてR122K/R126Kの変異を導入してもよい。

[0018] 本発明における蛍光融合タンパク質は、2種類の蛍光タンパク質と ϵ サブユニットとの融合タンパク質である。

結合される2種類の蛍光タンパク質は、FRETにおけるドナー及びアクセプターとなりうる組み合わせからなる蛍光タンパク質であればよく、特に限定されない。ここにFRETとは、ドナーとアクセプターと呼ばれる2種類の蛍光物質が一定の距離以内に近づいた時に、ドナーが吸収した光エネルギーがアクセプターに移動することをいう。FRETの検出は、通常ドナーの励起波長を照射し、ドナー又はアクセプターの蛍光強度を測定することにより行う。ドナーの蛍光強度を測定する場合、2種類の蛍光タンパク質が近い位置にあるとアクセプターに光が吸収されるためにドナーの蛍光強度は低くなり、距離が離れると蛍光強度が高くなる。アクセプターの蛍光強度を測定する場合はその逆で、距離が近いと蛍光強度が強くなり、離れると強度が低くなる。

蛍光タンパク質は、一般的に使用されているものを用いることができる。具体的には、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質に代表されるグリーンフルオレセントプロテイン（GFP）、GFPに種々の変異を導入し、蛍光の色を変化させたイエローフルオレセントプロテイン（YFP）やシアンフルオレセントプロテイン（CFP）、ブルーフルオレセントプロテイン（BFP）、あるいは珊瑚由来の赤色蛍光タンパク質であるレッドフルオレセントプロテイン（RFP）、クサビラオレンジプロテイン（K0）等が挙げられる。他にも、Nature Methods vol. 9, No. 10, 1005-1012 (2012)のTable 1

に記載された蛍光タンパク質も使用できる。

蛍光タンパク質がFRETの機能を発揮するために、ドナー及びアクセプターの組み合わせとして、例えば、CFP及びYFP、BFP及びGFP、あるいはGFP及びRFPにより使用することができる。いずれがεサブユニットのアミノ末端側、カルボキシ末端側でもよい。これらの蛍光タンパク質は、市販のものを使用することができる。例えば、CFPとしてはInvitrogen社のCFPが、YFPとしてはInvitrogen社のYFPの他にEvrogen社のPhi-Yellowが、GFPとしてはClontech社のEGFPの他にEvrogen社のTag-GFPが、RFPとしてはClontech社のDsRed2-monomer、Evrogen社のHcRed-Tandemが使用可能である。

[0019] 本発明の非ヒト哺乳動物は、前記蛍光融合タンパク質をコードするDNAを非ヒト哺乳動物の染色体上に組み込んで、前記蛍光融合タンパク質を発現させることで得ることができる。

前記蛍光融合タンパク質をコードするDNAは非ヒト哺乳動物の細胞で機能し得るプロモーターの制御下で発現されることが好ましい。プロモーターとしては、β-アクチンプロモーター、CMVプロモーター、CAG (CAGGS) プロモーター等が例示されるが、発現効率の点ではCAG (CAGGS) プロモーターが特に好ましい。なお、プロモーターは時期特異的プロモーターや、組織特異的プロモーターであってもよい。

[0020] 蛍光融合タンパク質をコードするDNA構築物は、選択マーカを含んでもよい。「選択マーカ」とは、選択マーカが導入された細胞に選択可能な表現型を提供する遺伝エレメントをいい、一般には、遺伝子産物が細胞の増殖を阻害するかまたは細胞を殺傷する薬剤に対する耐性を与える遺伝子である。具体的には、例えば、Neo遺伝子、Hyg遺伝子、hisD遺伝子、Gpt遺伝子およびBle遺伝子が挙げられる。選択マーカの存在を選択するために有用な薬物としては、例えば、Neo遺伝子に対してはG418、Hyg遺伝子に対してはハイグロマイシン、hisD遺伝子に対してはヒスチジノール、Gpt遺伝子に対しては6-チオキサンチン、そしてBle

e 遺伝子に対してはブレオマイシンが挙げられる。

- [0021] 蛍光融合タンパク質をコードするDNA構築物はさらに、相同組換えによって染色体上の内因性遺伝子を置き換える場合には、染色体上の目的部位と相同な配列をさらに含むことが好ましい。ここで、染色体上の目的部位としては、Rosa26遺伝子座が好ましい。
- [0022] マウスROSA26遺伝子座は、Friedrich及びSorianoにより1991年に、レトロウイルスを感染させた胚性幹(ES)細胞を用いるジーントラップ実験により発見された(Friedrich, G. 及びP. Soriano, *Genes & Development*, 1991, 5, 1513~1523)。ROSA26遺伝子座をマウスES細胞でターゲティングすることは、トランスジェニックマウスモデルを構築するために広く用いられている(Kisseberthら, *Developmental Biology*, 1999, 214, 128~138; Mao X. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 5037~5042; Soriano, 1999, 上記; Awatramaniら, *Nature Genetics*, 2001, 29, 257~259; Mao X. ら, *Blood*, 2001, 97, 324~326; Possematoら., *Genesis*, 2002, 32, 184~186; Mao, J. ら, *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33, e155; Yuら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 8615~8620; 国際出願WO 99/53017、WO 02/098217、WO 03/020743、WO 2004/063381及びWO 2005/116070)。
- [0023] 蛍光融合タンパク質をコードするDNA構築物は、さらに、Cre recombinaseやFlp recombinaseなどの遺伝子組み換えタンパク質によって認識されるlox系配列を代表とする認識配列を含んでもよい。例えば、プロモーターと融合タンパク質をコードするDNAの間にストップコドンや薬剤耐性遺伝子を配置し、Cre recombinaseが発現したときに、該プロモーターと融合タンパク質をコードするDNAが直接連結し、該プロモーターによる転写が開始するようにしてもよい。lox系配列としては、例えば、loxP, lox71, lox66, lox511, lox2272, Vlox (VCre), Slox (SCre)などが例示される。また、FLPにより認識されるFRT配列を使用することもできる。
- [0024] 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、例えば、以下の(a)~(g)の工程を含む方法により得ることができる。

- (a) 蛍光融合タンパク質をコードするDNA構築物を含むターゲッティングベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹(ES)細胞に導入する工程
- (b) 蛍光融合タンパク質をコードするDNAが挿入された染色体を有するES細胞を選択する工程
- (c) 選択したES細胞を受精卵に導入する工程
- (d) 該受精卵を偽妊娠雌性非ヒト哺乳動物の卵管あるいは子宮に移植する工程
- (e) 該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、生殖系列キメラを選択する工程
- (f) 該生殖系列キメラを交配させ、産まれた仔から、蛍光融合タンパク質をコードするDNAが挿入された染色体を有する個体を選択する工程
- (g) (f) で得られた個体同士を交配させ、産まれた仔から、両方の相同染色体において、蛍光融合タンパク質をコードするDNAが挿入されたホモ接合体を選択する工程

[0025] このような方法は、例えば、Hoganら、*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1986) や、米国特許第5,616,491号および5,750,826号などに記載されている。

[0026] 以下、作製方法についてより詳しく説明する。

ES細胞は、適切な条件下において、インビトロで移植前の胚を培養することによって得られる(Nature 292: 154-156 (1981) ; Nature 309: 255-258 (1984) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065-9069 (1986) ; およびNature 322: 445-448 (1986))。

[0027] ターゲッティングベクターは、当該分野で公知の種々の方法(エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈、プロトプラストまたはスフェロプラストの融合、リポフェクションおよびDEAEデキストラン媒介性トランスフェクションを含む)を使用するDNAトランスフェクションによって、ES細胞中に効率的に導入され得る。

[0028] ターゲッティングベクターとしてウイルスベクターを使用する場合、アデ

ノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなどのウイルス感染もまた、非ヒト動物中に遺伝子を導入するために使用できる。発達中の非ヒト胚を、胚盤胞段階までインビトロで培養する。この間に、割球にウイルスを感染させる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 1260-1264 (1976))。トランスフェクションは、ウイルスを産生する細胞の単層上において割球を培養することによって、簡単かつ効率的に達成される (EMBO J. 6 : 383-388 (1987))。あるいは、より後期の段階で、感染させてもよい。ウイルスまたはウイルスを産生する細胞を胞胚腔内に注入してもよい (Nature 298 : 623-628 (1982))。

[0029] さらに、妊娠中期の胚の子宮内ウイルス感染によって、生殖細胞系列中に導入遺伝子を導入することもまた可能である。受精卵または初期胚の卵黄周囲腔にウイルス粒子またはウイルスを産生するマイトマイシンC処理細胞を微量注入することも可能である。

[0030] 核微量注入 (米国特許第4, 873, 191号) ; 胚性幹細胞における遺伝子標的化 (Cell 56 : 313-321 (1989)) ; 胚のエレクトロポレーション (Mol Cell. Biol. 3 : 1803-1814 (1983)) ; および精子媒介性遺伝子移入 (Cell 57 : 717-723 (1989)) などの方法を採用してもよい。

[0031] このようにして目的遺伝子が導入されたES細胞は、その後、胚盤胞段階の胚の胞胚腔内に導入された後に胚に組み込まれ、キメラ動物の生殖細胞系列に組み込まれる。導入遺伝子が、選択されるための手段を提供する場合には、トランスフェクトされたES細胞を胞胚腔内に導入する前に、トランスフェクトされたES細胞を種々の選択プロトコールに供して、導入遺伝子を組み込んだES細胞を濃縮することができる。あるいは、PCRを使用して、導入遺伝子を組み込んだES細胞をスクリーニングし得る。これにより、導入効率を上げることができる。

[0032] 注入された胚を、偽妊娠の雌の卵管／子宮に移植し、そして最終的にトランスジェニック動物を得る。一旦、創始動物が作製されると、この創始動物を交配、同系交配、異系交配または交雑して、特定の動物の個体群を生じさ

せることができる。例えば、疾患モデル非ヒト哺乳動物と掛け合わせると、疾患の評価や治療薬スクリーニングに有用である。

[0033] 疾患モデル非ヒト哺乳動物としては、自閉症モデル動物(例えば、Caps2 Δ exon3, Sadakata, T. et al. PNAS 2012: www.pnas.org/content/early/2012/11/28/1210055109.full.pdf) や心疾患モデル動物が例示される。心疾患モデル動物としては、低酸素状態や心筋梗塞状態を惹起したモデル動物が例示される。

また、db/dbマウスなどの糖尿病モデル動物や、p53/k-ras変異マウスなどの癌モデル動物や感染症モデル動物が例示されるが、これらには限定されない。

[0034] 本発明の蛍光融合タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物および該動物から得られる組織や細胞は、生体内でのATPの濃度やその分布、さらには、時間変化などを測定するために使用できる。生体内に存在するATPによって、ATP合成酵素の ϵ サブユニットの構造が変化し、それによって、FRET反応が生じて蛍光が発せられるため、蛍光顕微鏡などを用いてATPの存在をモニターすることができる。

[0035] 本発明の非ヒト哺乳動物および該動物から得られる組織や細胞は、がん医薬品候補のスクリーニングに使用可能である。例えば、本発明の非ヒト哺乳動物またはそれから得られる組織や細胞に医薬候補物質を投与し、がん細胞特異的に死滅させる医薬品候補・濃度のスクリーニングをATP濃度の正確な変化・計測により行うことが可能になる。また、薬物の安全性試験にも使用可能である。例えば、毒性や肝臓への負担など、薬物が肝臓に与える影響を、肝臓の細胞を使用して、ATP量の変化を観察する事により正確に調べることができる。

[0036] 本発明の非ヒト哺乳動物および該動物から得られる組織や細胞は、様々な病態の解析や評価、薬剤の評価やスクリーニングに使用できる。例えば、各細胞のエネルギー代謝状態を変化させる疾患の治療薬のスクリーニングや薬効評価にも使用可能である。また、心臓の組織や細胞を用いることで、心臓

疾患の治療薬のスクリーニングや薬効評価にも使用可能である。また、自閉症を呈するように施した本発明の非ヒト哺乳動物に薬剤候補物質を投与し、該物質がATP濃度を低下させる作用を有するかを評価することで、ATP濃度が過剰になって代謝異常をきたすような疾患の治療薬の候補物質のスクリーニングを行うことができる。逆に、物質がATP濃度を上昇させる作用を有するかを評価することで、ATP濃度が低下して代謝異常をきたすような疾患の治療薬の候補物質のスクリーニングを行うことができる。

[0037] 評価またはスクリーニングに使用する治療剤候補物質としての化合物は、例えば、合成又は天然の低分子又は高分子化合物、金属含有化合物、糖質、ペプチド、タンパク質、ペプチド模倣物、糖タンパク質、リポタンパク質、核酸、抗体などが使用可能である。多数の天然化合物および合成化合物を含むライブラリーもまた、使用可能である。

[0038] また、心臓などの運動などによるエネルギー代謝が経時的に変化する細胞・臓器では、その運動・機能の異常をATP量と分布の経時的变化の異常として捉えることができるため、本発明の非ヒト哺乳動物またはそれから得られる組織や細胞を用いることで、新規の診断法や治療法の開発も可能である。そのATP量の分布と変化の情報から臓器などの動き（例えば歩行時の足の筋肉のATP分布と変化から歩行を再現）を機械などで再現することも可能である。

また、筋肉の細胞や組織を用いて運動からの回復能を調べることができるので、筋疾患への応用だけでなく、運動・スポーツ器機開発や食品・筋肉増強剤開発などにも利用可能である。

[0039] 本発明の非ヒト哺乳動物から得られる細胞などを用いてATPの定量を行うことが可能である。

測定条件として、以下が考えられる。被験物質としては、ATPを含むものであれば良く、例えばATPを含む溶液、細胞などの生体試料、生体試料からATPを抽出したものなどが挙げられる。溶解緩衝液としては特に限定されないが、例えば蛍光物質の蛍光を最適な条件で発しうるpHのものを選

択することができる。具体的には、YFPを蛍光物質として用いる場合は、YFPの蛍光は酸性側では減少するため、pH 7以上の緩衝液を用いることが好ましい。反応温度は、蛍光タンパク質プローブが構造変化を起こしうる温度であればよく、例えば $37 \pm 1^\circ\text{C}$ や、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ において測定することができる。反応時間についても適宜決定することができるが、好ましくは1分以上であり、タンパク質が失活しない程度の時間反応させることができる。反応には、適宜添加物を加えることができる。例えば0.05%の界面活性剤(TritonX100)もしくは1mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)などを安定化の目的で加えることができる。被験試料に混在するマグネシウムの影響を避けるためには、例えばEDTAやEGTAなどのキレート剤を添加してもよい。

[0040] 反応終了後の被験物質についての蛍光スペクトルは、蛍光光度計を用いて、ドナーの励起光を照射し、それぞれの蛍光物質の蛍光強度が単独でピークとなる波長で蛍光強度をそれぞれ測定して、その比を計算することにより測定することができる。一方濃度既知のATP溶液を調製し、同様に蛍光強度の比をとり、検量線を作成しておく。この検量線を用いれば検体のATP濃度を求めることができる。

実施例

[0041] 以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0042] ATP可視化マウスは各G0-ATeam cDNA (G0-ATeam1及びG0-ATeam2)をマウスROSA26領域へ挿入するようにターゲティングベクターを作製した(図1)。これらのG0-ATeamはCAGGSプロモーターで制御できるように、更にCreが発現する部位・時期以降から発現するようにLoxPで挟んだSTOP配列を挿入する形で作製した。

[0043] <コンストラクトの作製方法>

マウスROSA26 5' arm 1080bp (Ch6 113076036-113077116)にSplice acceptor, bgh pAの後にCAGGS, LoxP, pA, Neo (逆方向), MC1 (逆方向), STOP配列

(SV40pA含む), LoxP, bgh pAを結合し、その後にROSA26 3' arm 4267bp (ch 6 114900586-114904926)を結合し、その後にPGK promoter, DT-A, bgh pAをつなげた配列を持つpBlueScript (星野克明博士より供与) を利用した(以下ROSA26-CAG-STOPベクター)。

[0044] pBlueScriptのMCSの両端にMCS側からAscI, PmeI, SwaI配列を挿入したpBS-APSベクターをPmeIで消化した後、T4 DNA polymerase処理を行い、そこへ、ROSA26-CAG-STOPベクターのSTOP配列 149bp, LoxPの後にpEF-BOSベクター (Nucleic Acids Res. 1990 Sep 11;18(17):5322.) のstuffer配列, G-CSF pAを結合し、さらに、ROSA26 3' arm 49bp (ch6 114904549-114904597)を挿入したベクターを利用した(以下IiMOG-GA_pBS-APSベクター)。

[0045] cDNAはGO-Ateam1及びGO-Ateam2それぞれがpcDNAベクターに入ったもの(今村博臣博士より供与)をNheI-HindIIIで切り出し、HindIIIサイトはT4 DNA polymerase処理を行った。

IiMOG-GA_pBS-APSベクターをNheI-XbaIで消化し、XbaIサイトはT4 DNA polymerase処理を行った。

これらを結合し、GO-Ateam1_ IiMOG-GAおよびGO-Ateam2_ IiMOG-GAを得た。

このGO-Ateam1_ IiMOG-GAおよびGO-Ateam2_ IiMOG-GAをSwaI消化した後、cDNAを含む断片を得て、AscI-NruI消化した後に、T4 DNA polymerase処理を行ったROSA26-CAG-STOPベクターとGeneArt(Invitrogen社)にて結合させてターゲティングベクターを得た。

[0046] なお、GO-Ateam 1及びGO-Ateam 2は以下の通り。

Ateam (Adenosine 5'-Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurement)

GO-Ateam (GFP- and OFP-based ATeam)

GO-Ateam 1: Bacillus subtilis F0F1-ATP synthaseの ϵ サブユニット(配列番号2)のN末側にGFP(cp173-mEGFP)を、C末側にOFP(mKO κ)を挿入したコンストラクト: シグナルを有さないで細胞質で発現する。

G0-Ateam 2: G0-Ateam 1の ϵ subunitにおいてR122K/R126Kとしたmutant（配列番号3）：

シグナルを有さないので細胞質で発現する。

参考文献

Imamura et al., *Pro N.A.S.* 2009, 106, 15651-15656

Nakano et al., *ACS Chem. Biol.* 2011, 6, 709-715

Waldeck-Weiermair et al., *PLoS ONE* 7(9): e45917 2012

W02008/117792

[0047] <マウスの作製>

上記ターゲティングベクターをAsiSIで直線化した後、定法によりES細胞(C57/BL6×129hybrid)へ導入した後、遺伝子組換えが正確に起こったES細胞だけをネオマイシン耐性遺伝子、PCR法、Southern Blotting法により選択して、Creが発現した細胞のみでG0-ATeamが発現するようにしたES細胞を得た。常時G0-ATeamが発現するES細胞は上記ES細胞へCMV-Creベクターを導入することにより得た。

[0048] キメラマウスはICRマウスから得た桑実胚と上記より得たES細胞をアグリゲーション法にて融合させた後に偽妊娠処理を施したICR♀マウスの子宮へ移植することにより得た。

以上により、G0-ATeam1, G0-ATeam2が細胞質で発現するマウスを作出した。

[0049] <ATPの測定>

上記で得られたG0-ATeam1及びG0-ATeam2可視化マウスの胎生13日胚からMEF細胞を取得し、培養した。

継代4代目を用いてglass coat dishへ播種した。MEF細胞をPermilization buffer (140mM KCl, 6mM NaCl, 0.1mM EGTA, 10mM HEPES pH7.4)でwashした後、 α -Hemolysin(Sigma cat#H9395)をPermilization bufferで希釈して終濃度50 μ g/mlの中で37℃ 30分処理を行った。その後、MgATPを0mMから30mMの間で希釈したCalibration buffer (140mM KCl, 6mMNaCl, 0.5mM MgCl₂, 10mM HE

PES pH7.4)に馴染ませて、各ATP濃度時のG0-Ateam1及びG0-Ateam2が発する蛍光画像を共焦点顕微鏡にて取得した。共焦点顕微鏡は488nmのレーザーをexcitation DMとしてDM405/488を使用し、ダイクロイックミラーLM01-552で分光した後にBA505-540とBA575-675のフィルターにてGFP蛍光とKusabiraOrange蛍光を得た。得られた蛍光画像はMetamorphにてFRET Ratio値を計算することでFRET ratio値を得た。各ATP濃度と、その時に取るFRET ratio値をプロットすることでグラフを作成した。結果を図2に示す。

[0050] G0-Ateam1はATP濃度2-20mMの間でATP濃度とFRET ratio値が直線状に変化し、G0-Ateam2はATP濃度0.2-6mMの間でATP濃度とFRET ratio値が直線状に変化した。またその誤差値は約4.5%以下であった。これよりG0-Ateam1及びG0-Ateam2可視化マウスではATP濃度2-20mMと0.2-6mMの間でATP量を定量できることがわかった。

[0051] <ATP濃度のインビボイメージング>

G0-Ateam1及びG0-Ateam2可視化マウス（メス）と野生型マウスを交配して受精卵を得た。受精卵はDMEM(Sigma)/10%FCS内にて回収し、受精後3日目まではM2 medium (sigma)内で37℃ 5%CO₂にて培養した。観察は共焦点顕微鏡にてM2 medium (フェノールレッドなし)内で37℃ 5%CO₂の条件下で上記と同じ方法にて画像を取得した。受精後4日目以降はM2 mediumの代わりにDMEM(sigma)/rat serum 50%を使用した。FRET ratio値も上記と同様に得た。

結果を図3～6に示す。

各時期でのATP量を計測できた。またcytosol内でATP濃度分布に違いが見られた。1細胞期において核周囲でのATP量は他の部位と比較して低い。4細胞期においては、割球の接合部付近でのATP量は他の部位と比較して低い。また、5.5日胚と比較して、6.5日胚から胚性外胚葉でのATP量が上昇している事が分かる。また、7.5日胚ではnodeにおけるATP量が亢進している。

マウス胚で計測したATP量とルシフェラーゼ法を用いて計測したATP量に相関性があった。

[0052] <マウス成体での分布>

マウス新生児・成体を気化麻酔下で開胸し、蛍光写真を得た。マウス脳は脱頭後に急性スライスを用いて約200nmのスライスを作成後に蛍光写真を得た。撮影は実体蛍光顕微鏡（ライカ社 M165 FC）を用いて、フィルターGFP3(励起波長ST470/40nm, 吸収波長 ET525/50nm), GFP/0FP(励起波長ET470/40, 吸収波長ET585/40)を利用して蛍光写真を得た。得られた蛍光画像はMetamorphにてFRET Ratio値を計算することでFRET ratio値を得た。結果を図7, 8に示す。マウス成体内の臓器でATP量を測定するとルシフェラーゼ法での測定でATP量が高いと報告されている筋肉や心臓でATP値が高い事が分かった。

さらに、マウス成体（12ヶ月）脳の蛍光写真も得た（図9）。マウス脳内のATP量の計測を質量イメージングとG0-Ateam knock-in mouseとで比較したところ、G0-Ateam knock-in mouseを用いた方法は質量イメージング法よりも高解像度に経時的な変化を観察可能であることがわかった。

以上より、各臓器や脳の各部位でのATP量を計測できた。これまでLuciferase法やイメージ質量分析法で測定された値に近い値が得られた。また解像度は数百個の細胞毎で観察・計測されていたものが1細胞・subcellularレベルでの解析が可能となった。

[0053] 次に、小脳での形態的異常及びBDNFの局在の異常が報告されている自閉症モデルマウス(Caps2 Δ exon3, Sadakata, T. et al PNAS 2012)とG0-ATeam1またはG0-ATeam 2可視化マウスを掛け合わせ、ATP可視化自閉症モデルマウスを作製し、これを用いて、自閉症モデルマウスにおいてATPの量を観察した。小脳における蛍光像を野生型マウスと比較して図10に示す。その結果、自閉症モデルマウスでは小脳でのATP量が亢進している事がわかる。また、海馬における蛍光像を野生型マウスと比較して図11に示す。海馬ではCA1のMolecular layerにおいて、神経の細胞体ではATPが低く、その突起ではATPが高い事がわかってきたが、自閉症モデルマウスではこのATPの分布が消失している。

[0054] 次に、G0-ATeam 2可視化マウスの心臓において、通常状態、低酸素状態、及び心筋梗塞状態におけるATPの経時変化を調べた。通常状態の心臓（図12）では、拍動（約5回/秒）と共に心房・心室でのATP増減・分布の変動が観察さ

れる。様々な心疾患(心筋梗塞や心奇形など)を生理的な機能面から評価・定量できる可能性がある。

図13の低酸素処理(人工呼吸器にて呼吸させている時に人工呼吸器を停める事により実施)時には通常と比較して心房でのATP量の増減が消失する。また心室では増減が低下することがわかった。

図14の心筋梗塞(冠状動脈を結紮した後、5日後)を起こした心臓では梗塞部位の心室でのATPの低下が観察される。同時に梗塞部位以外での心室ではATP量が亢進している部位、通常より低下している部位が観察される。

[0055] 次に、G0-ATeam 2可視化マウスに麻酔をかけ、人工呼吸器を取り付けた状態で、 β ブロッカーであるプロプラノロールを頸静脈から $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ で注入して心拍数を低下させたときに、心臓の左右心室・左心房におけるATP量の経時変化を調べた。結果を図15に示す。この結果から、心拍低下薬剤である β ブロッカーの効果を心拍低下前および低下後に心室、心房とに分けて効果を計測する事が可能であった。

[0056] また、G0-ATeam 2可視化マウスの各臓器を、95% 窒素と5% 二酸化炭素の混合液内に入れる事により低酸素状態を作り出して低酸素処理し、各臓器において、ATPの経時変化を調べ、正常状態と比較した。結果を図16に示す。この結果から、全臓器の細胞活動の質をATP量の変化として計測する事が可能であることがわかった。

[0057] また、麻酔をかけ、人工呼吸器を取り付けたG0-ATeam 2可視化マウスの左前下行枝を結紮する事で急性虚血(心筋梗塞)を起こすよう処理し、各臓器において、ATPの経時変化を調べ、コントロール(疑似手術されたG0-ATeam 2可視化マウス)と比較した。結果を図17に示す。0秒の矢印のタイミングで心筋梗塞を起こさせたところ、肝臓では24分後、脾臓では31分後、腎臓では20分後、白色脂肪では直後にATP量の異常が見られた。この結果から、各臓器で心筋梗塞によるATP異常の起こるタイミングが異なることが分かり、心筋梗塞時に起こる各臓器のATP動態を計測する事により、各臓器・細胞の異常を計測する事が可能であることが分かった。つまり、全身で薬理・毒性

評価などが可能である事を示している。

[0058] 次に、G0-ATeam 2可視化マウスの心臓から心筋細胞を単離し、単離心筋細胞を用いて、電気パルスをかける事により収縮運動を起こした時のATPの経時変化を調べた。結果を図18に示す。この結果から、成熟心筋細胞内のATP動態が測定できることが明らかになった。収縮期の最後にATP量が急増するが、これはミオシンからADPが細胞質へ放出され、クレアチンリン酸からADPにリン酸が渡された事を意味しており、その後、収縮と共に徐々に細胞質のATP量は低下するが、これはATPがミオシンに結合しはじめた事を示している。

また、図19では、1秒間に1回から3回までの異なる電気刺激（1pps(pulse/second), 2pps, 3pps) をかける事により筋収縮運動を起こした時の単離心筋細胞の面積（点線）とATP量（実線）の変化を示す。1pps, 2ppsでは電気パルスに併せて変化するが、3ppsでは電気パルスについていけずにいる。このように、パルスの強さによって単離心筋細胞の面積とATP量は異なった変化を示し、単離心筋細胞を用いてATP動態を測定することで心エネルギーに対するドラッグスクリーニングなどにも応用可能であることがわかった。

[0059] 図20ではG0-ATeam 2可視化マウスの坐骨神経を電気刺激して筋収縮を起こさせた時の前頸骨筋におけるATP動態を調べた結果を示す。マウスを麻酔後に坐骨神経を剖出して電極を付け、毛皮を取り除く事で前頸骨筋を観察できるようにして蛍光実体顕微鏡システムにて観察した。電気刺激は30秒間で、その後、ATPの回復が観察された。この結果から、運動負荷に対するATP量の回復度と回復時間を詳細に調べる事ができ、ATP可視化マウスは運動・スポーツ器機開発や食品・筋肉増強剤開発などにも利用可能であることがわかった。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明のマウスは、医療や医薬開発、運動科学、基礎研究などの分野で有用である。

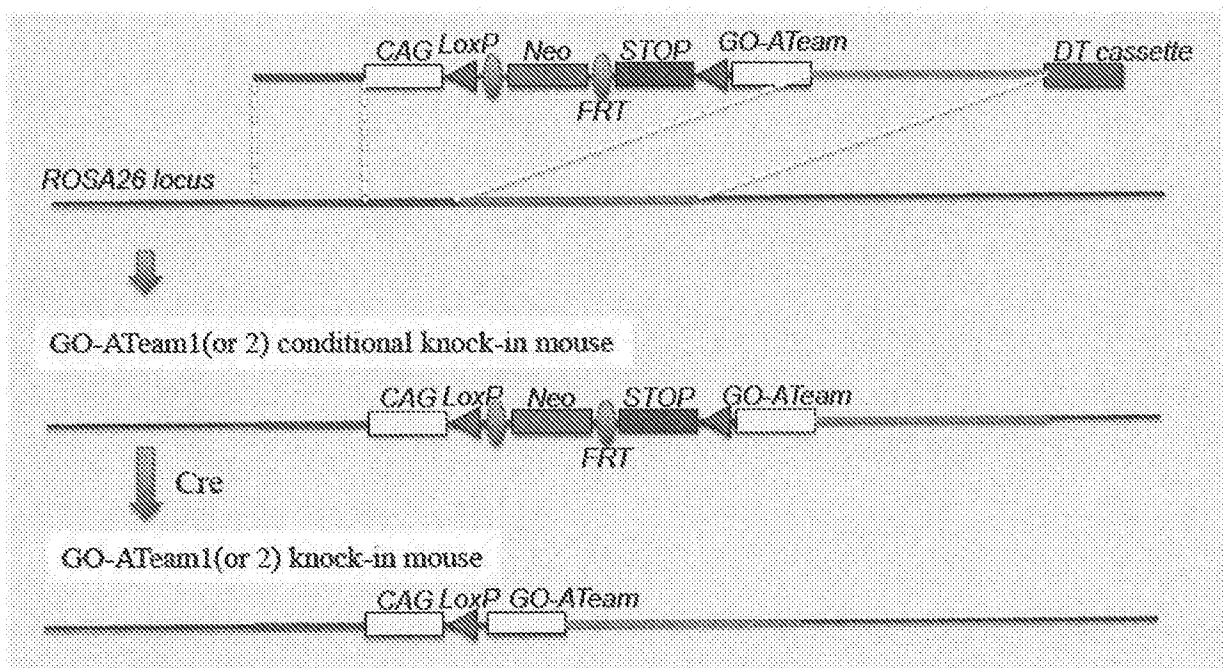
請求の範囲

- [請求項1] A T P 合成酵素の ϵ サブユニットのアミノ末端側およびカルボキシ末端側に、蛍光共鳴エネルギー移動におけるドナー及びアクセプターとなりうる2種類の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させてなる融合タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物。
- [請求項2] A T P 合成酵素の ϵ タンパク質サブユニットが配列番号1、2または3に記載のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項3] ドナー及びアクセプターとなりうる蛍光タンパク質の組み合わせが、シアンフルオレセントプロテイン (C F P)、イエローフルオレセントプロテイン (Y F P)、ブルーフルオレセントプロテイン (B F P)、グリーンフルオレセントプロテイン (G F P)、レッドフルオレセントプロテイン (R F P) 及びクサビラオレンジプロテイン (K0) から選ばれる組み合わせである、請求項1または2に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項4] 前記融合タンパク質をコードするDNAが染色体上のR O S A 2 6 遺伝子座に挿入された、請求項1～3のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項5] 前記融合タンパク質をコードするDNAはlox系配列を有し、Cre recombinaseがlox系配列で挟まれた領域を除去することにより、前記融合タンパク質が発現する、請求項1～4のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項6] 前記融合タンパク質をコードするDNAはCAGプロモーターの制御下におかれた、請求項1～5のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物と、疾患モデル動物との掛け合わせによって得られる、非ヒト哺乳動物。
- [請求項8] 疾患モデル動物が、自閉症モデル動物または心疾患モデル動物である、請求項7に記載の非ヒト哺乳動物。
- [請求項9] マウスである、請求項1～8のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物

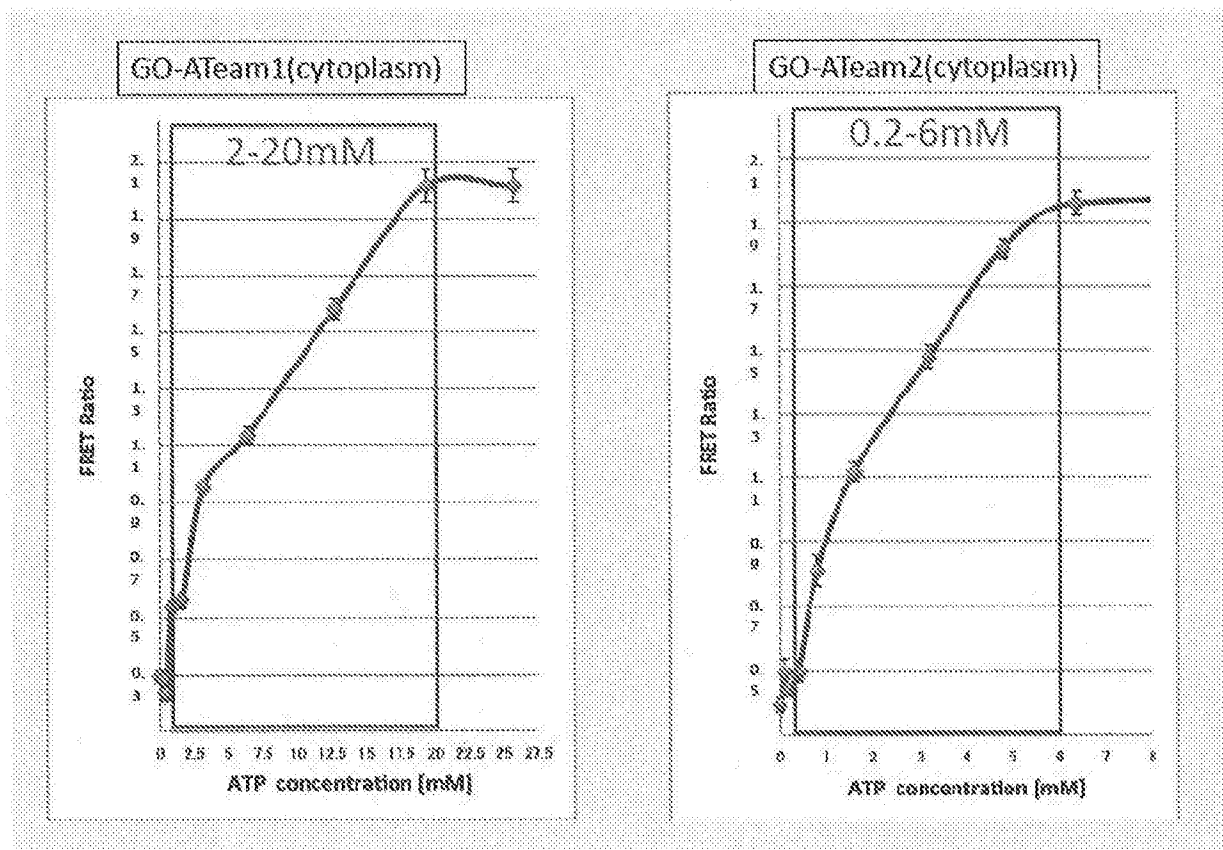
。

- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物又は該非ヒト哺乳動物から得られる細胞、組織もしくは器官に被験物質を投与し、蛍光強度に基づいてATP濃度を測定することを特徴とする、ATPの測定方法。
- [請求項11] 請求項10に記載の方法によってATPを測定し、該測定結果に基づいて被験物質の薬効を評価することを特徴とする、薬剤のスクリーニングまたは薬効評価方法。

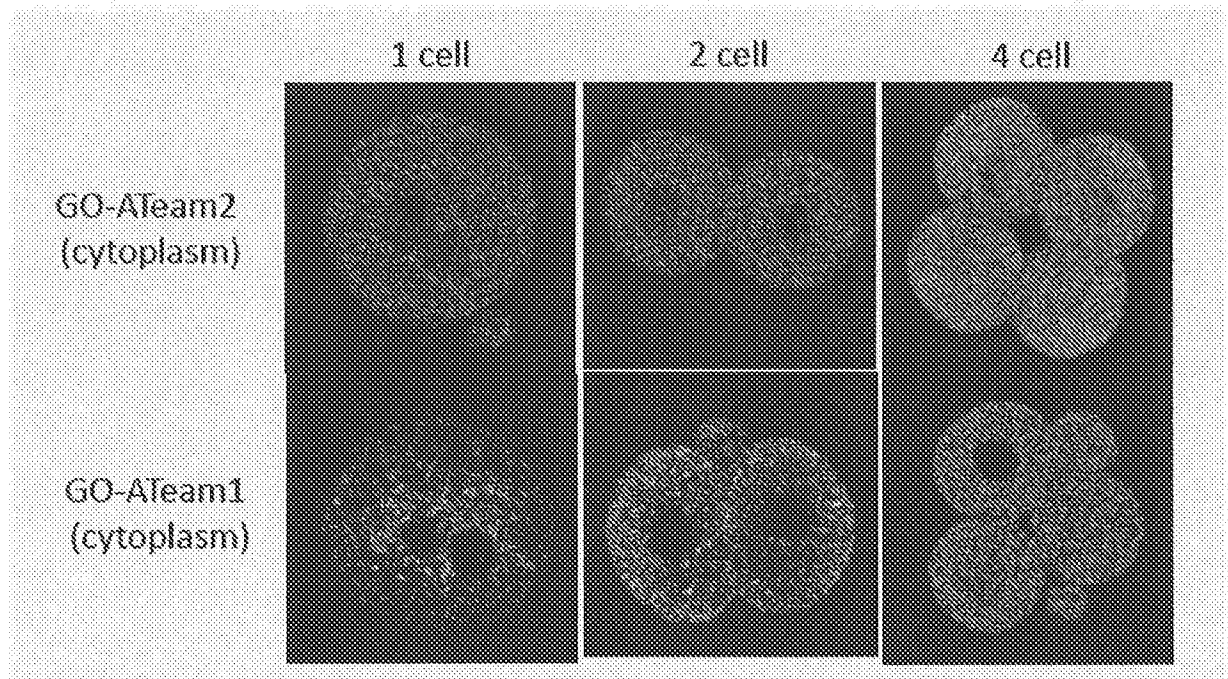
[図1]



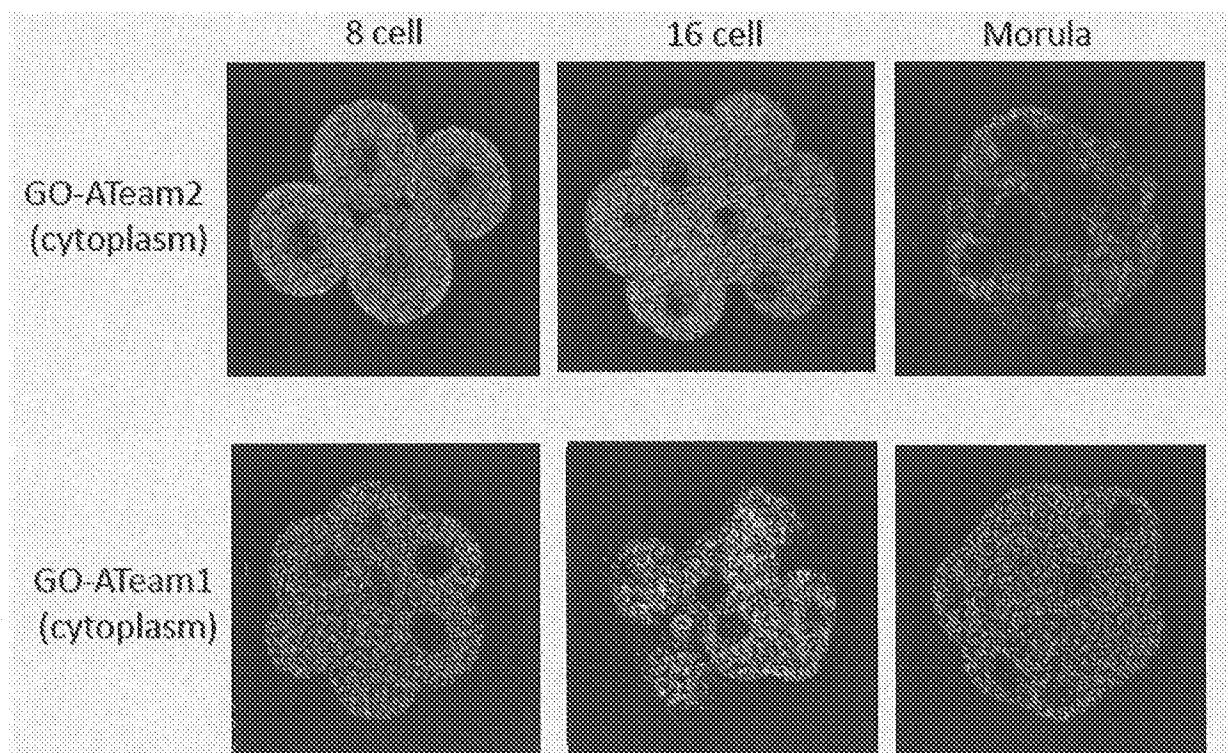
[図2]



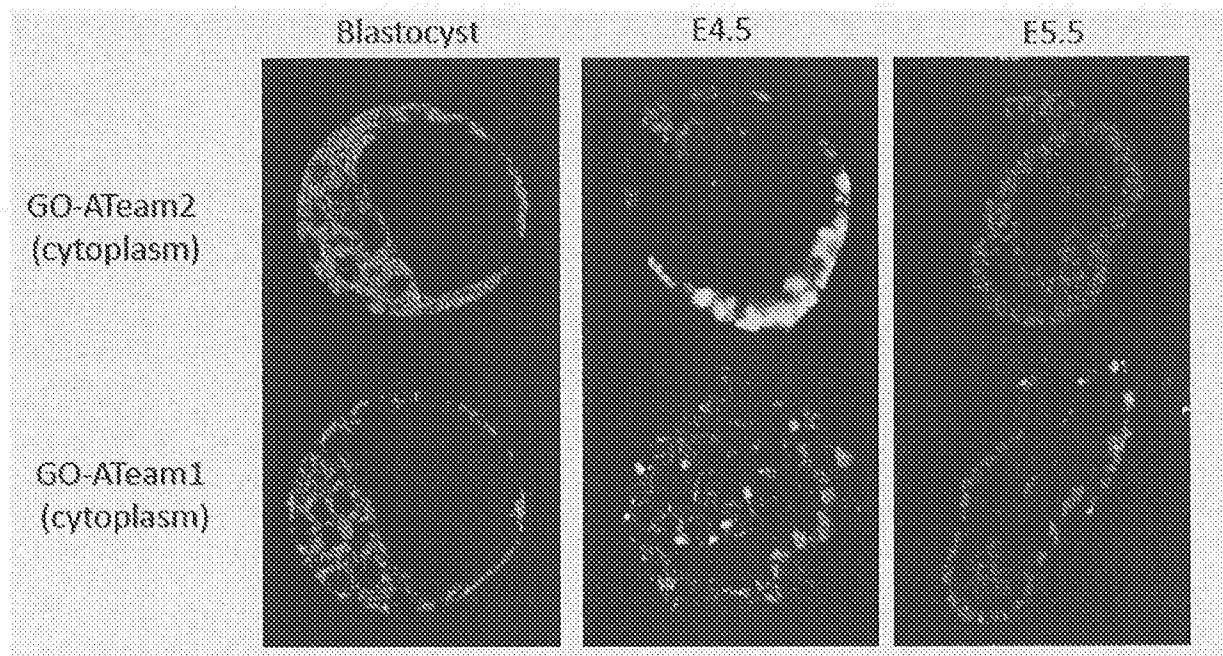
[図3]



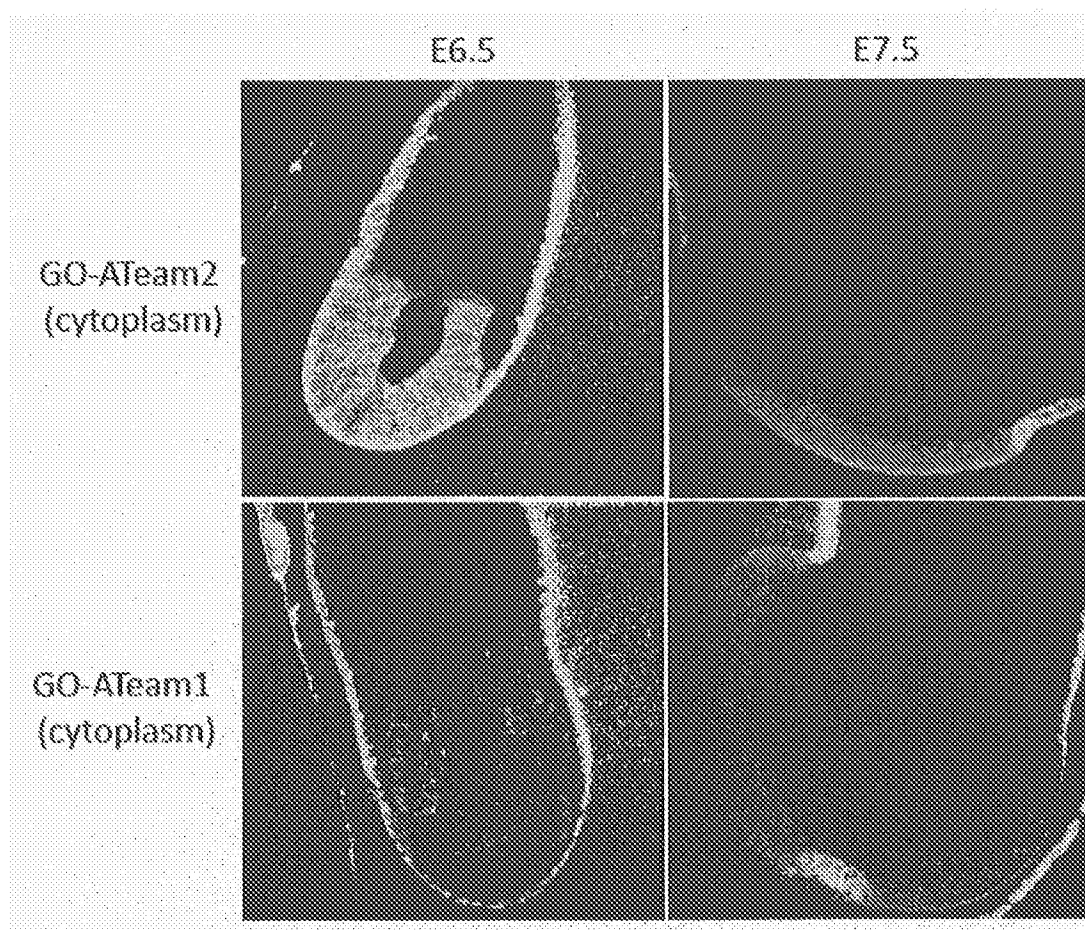
[図4]



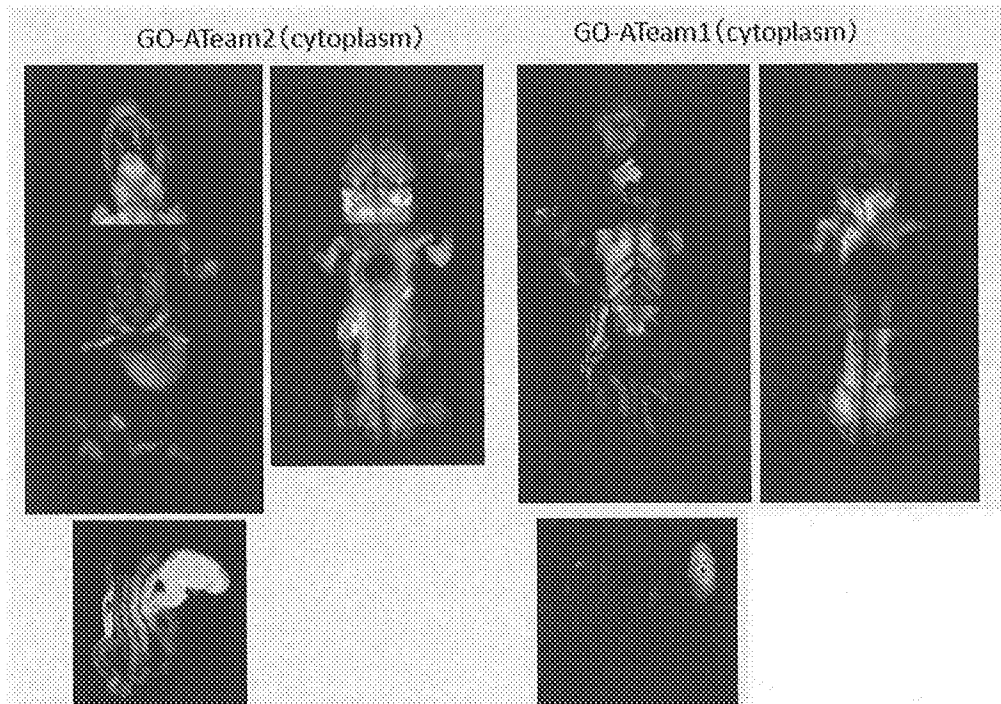
[図5]



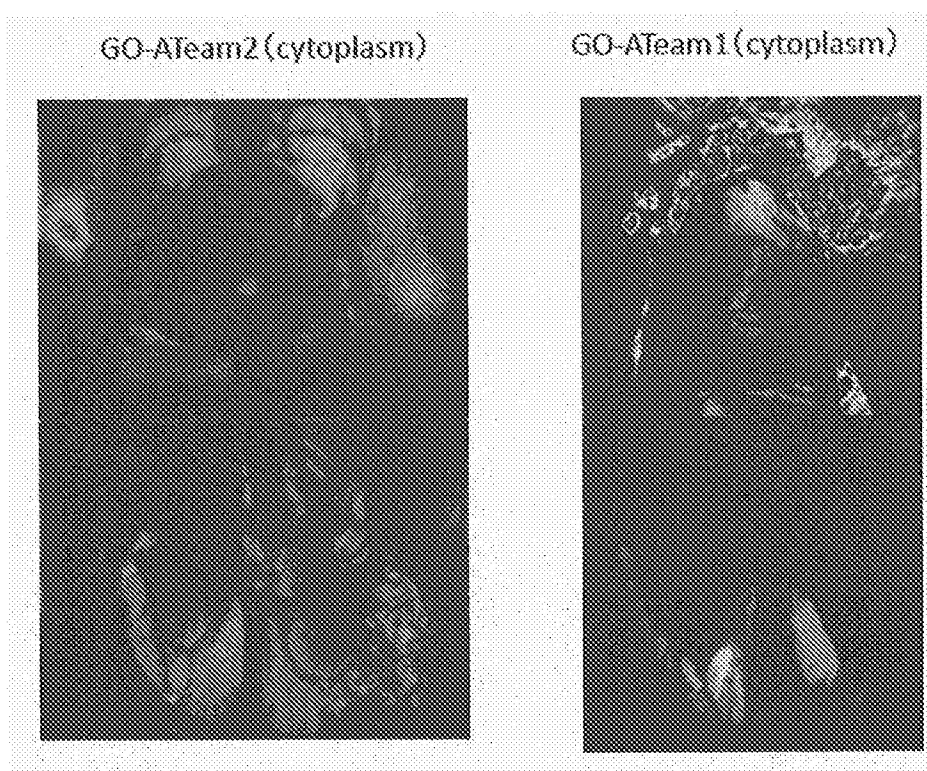
[図6]



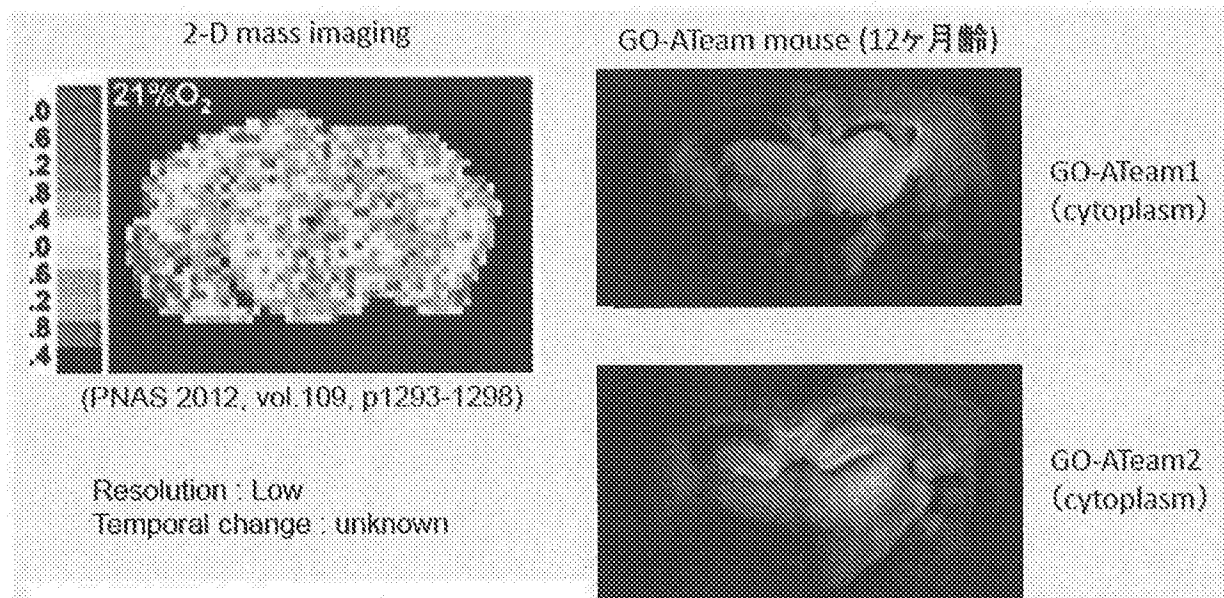
[図7]



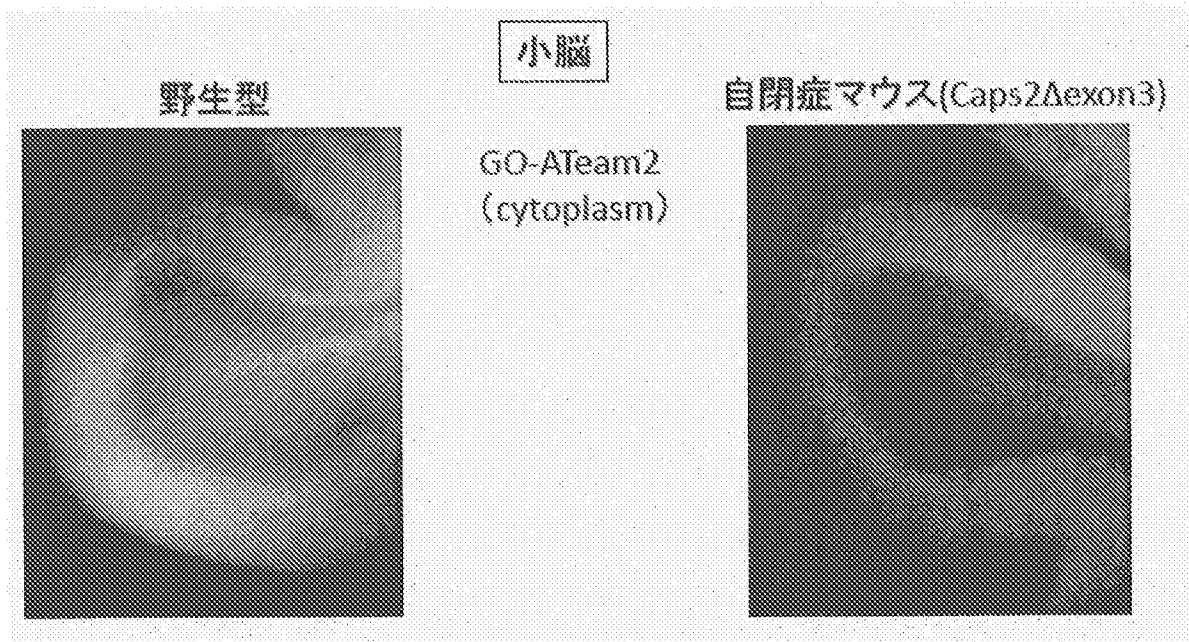
[図8]



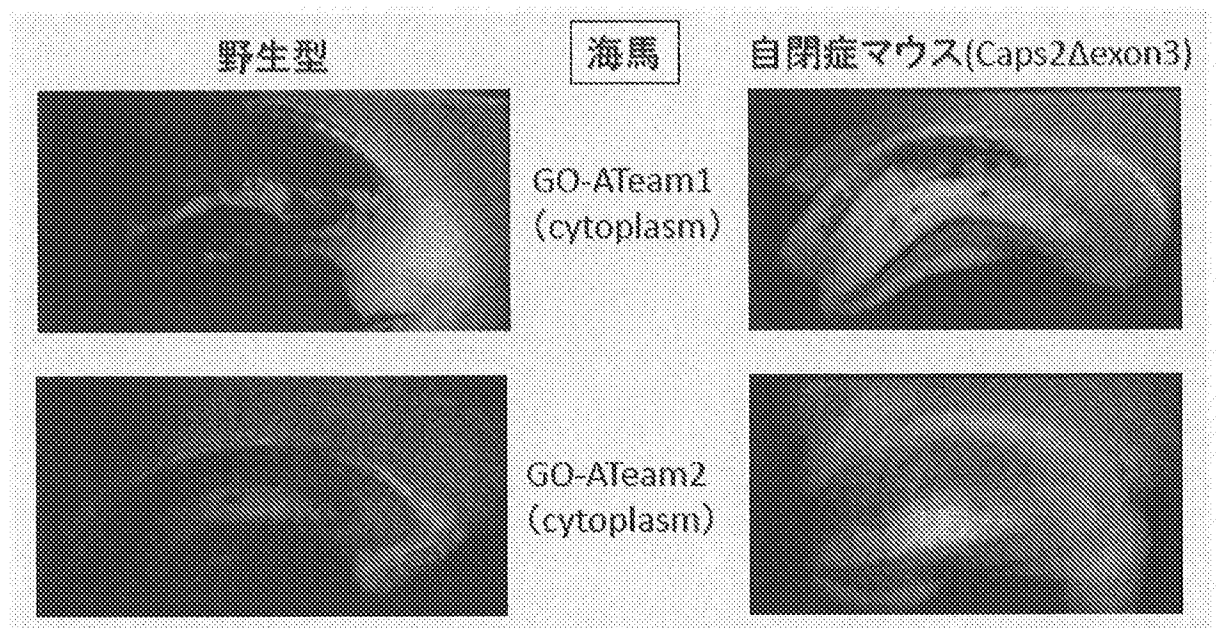
[図9]



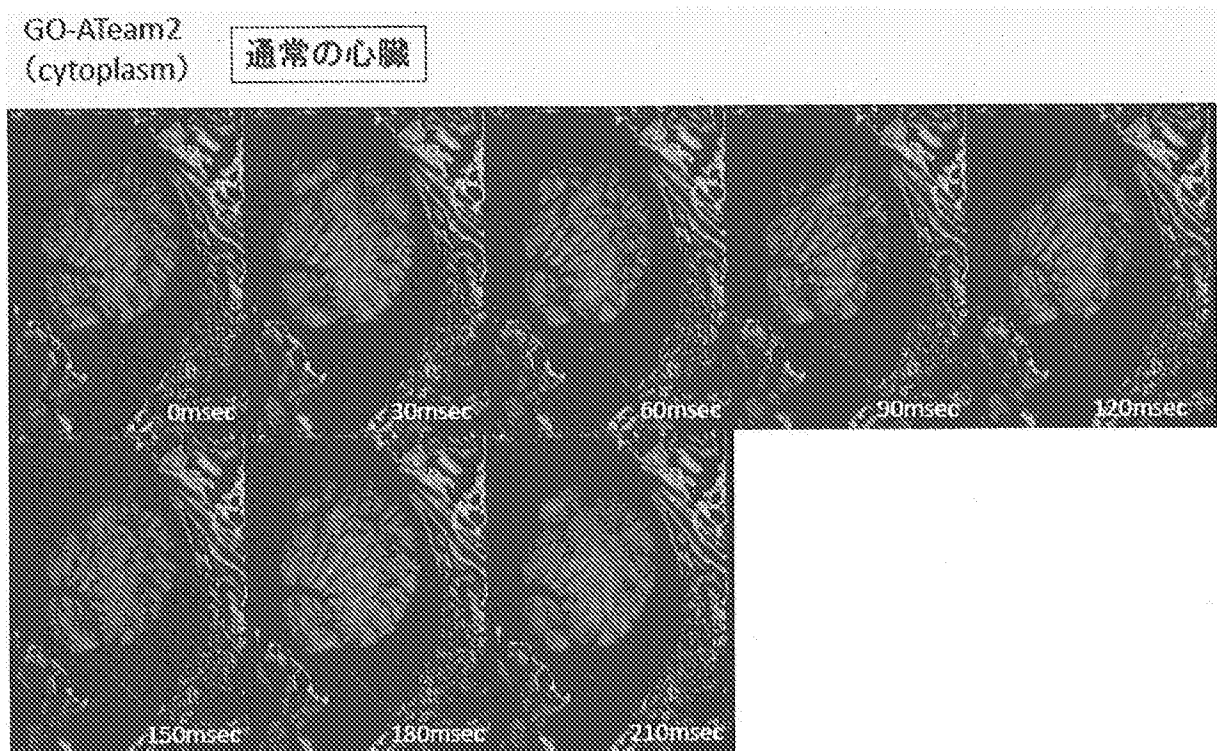
[図10]



[図11]



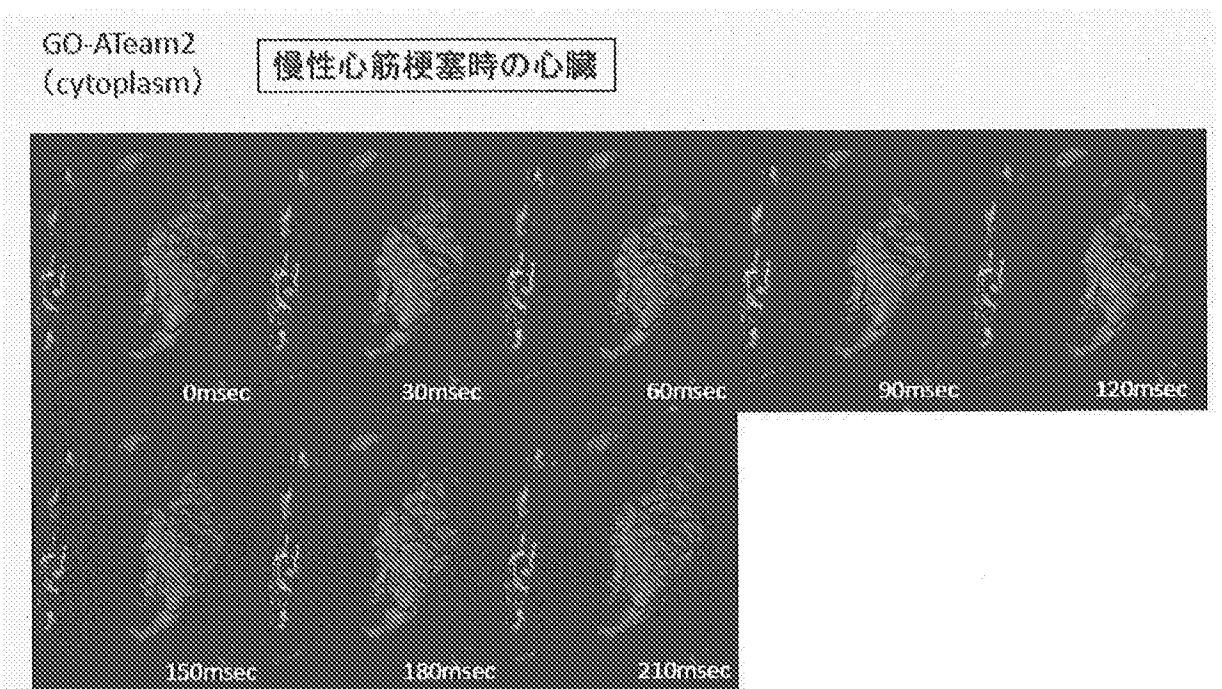
[図12]



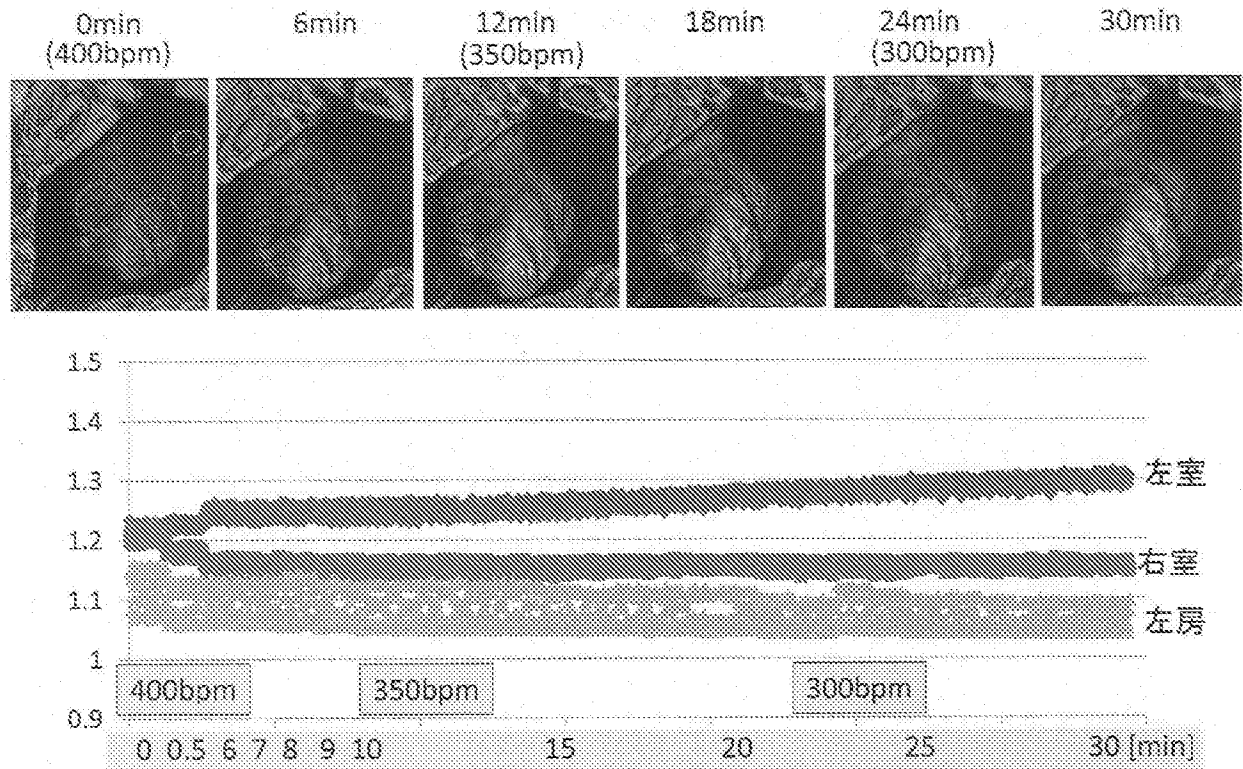
[図13]



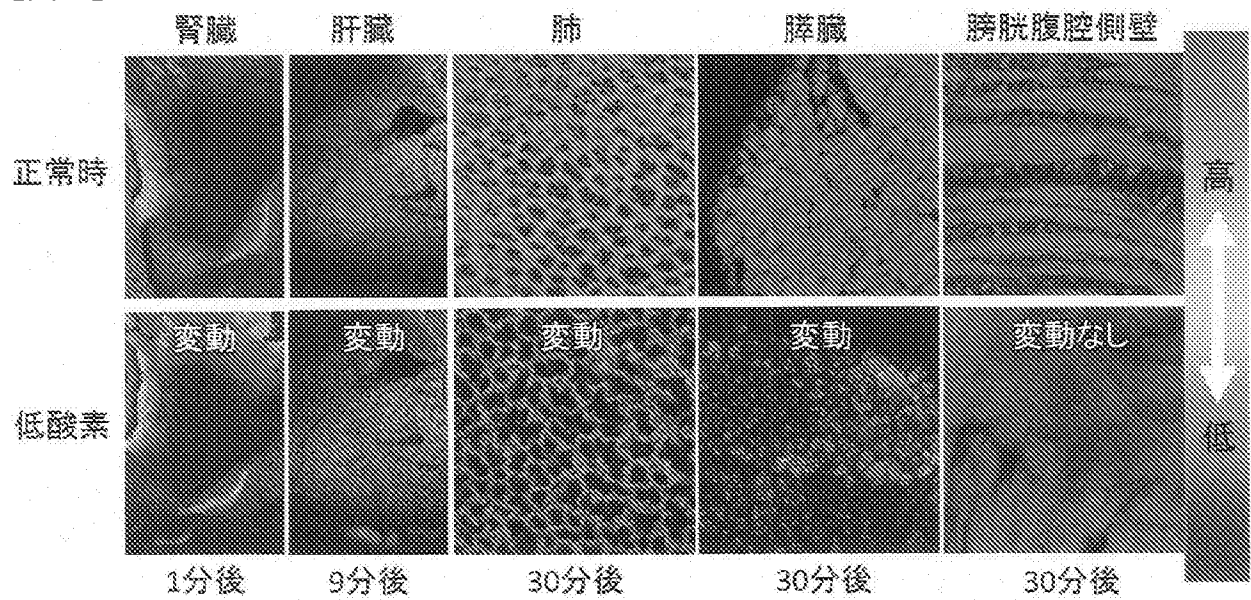
[図14]



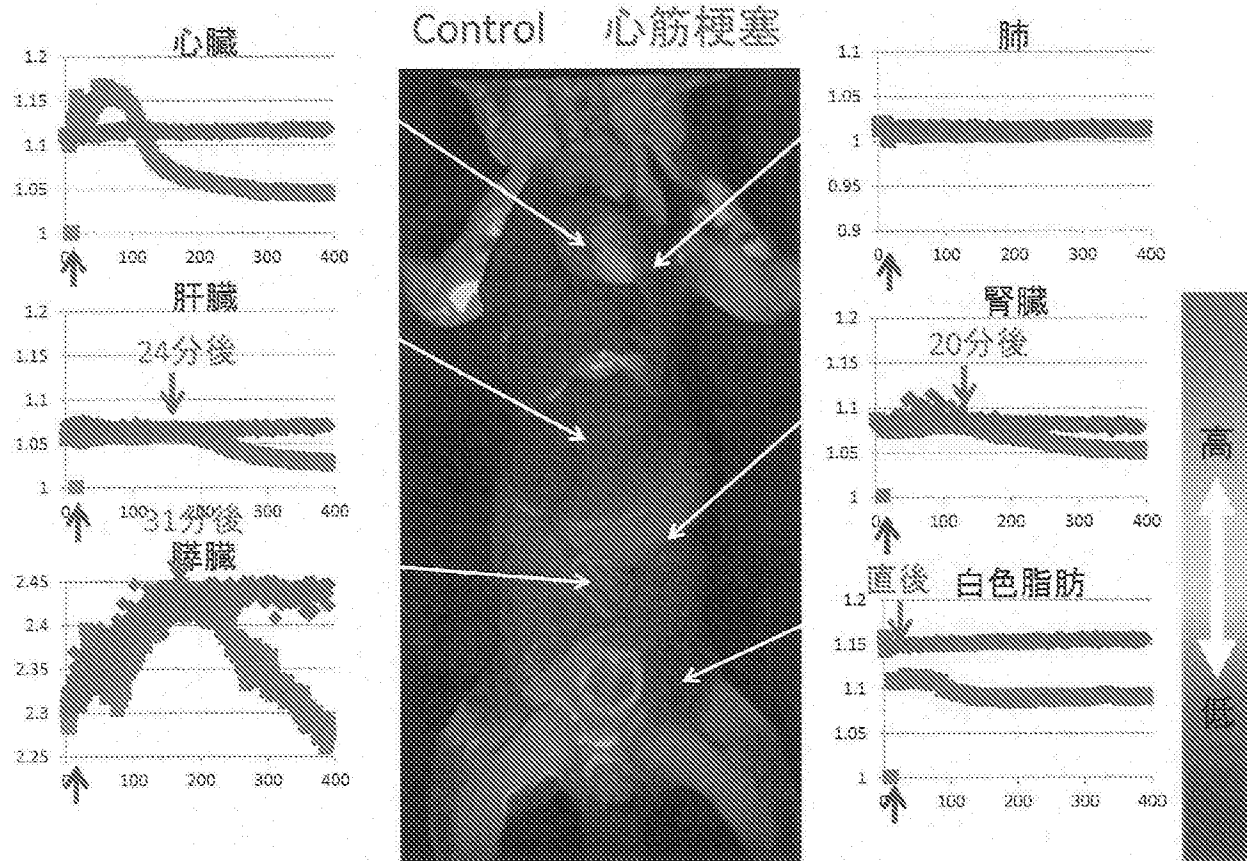
[図15]



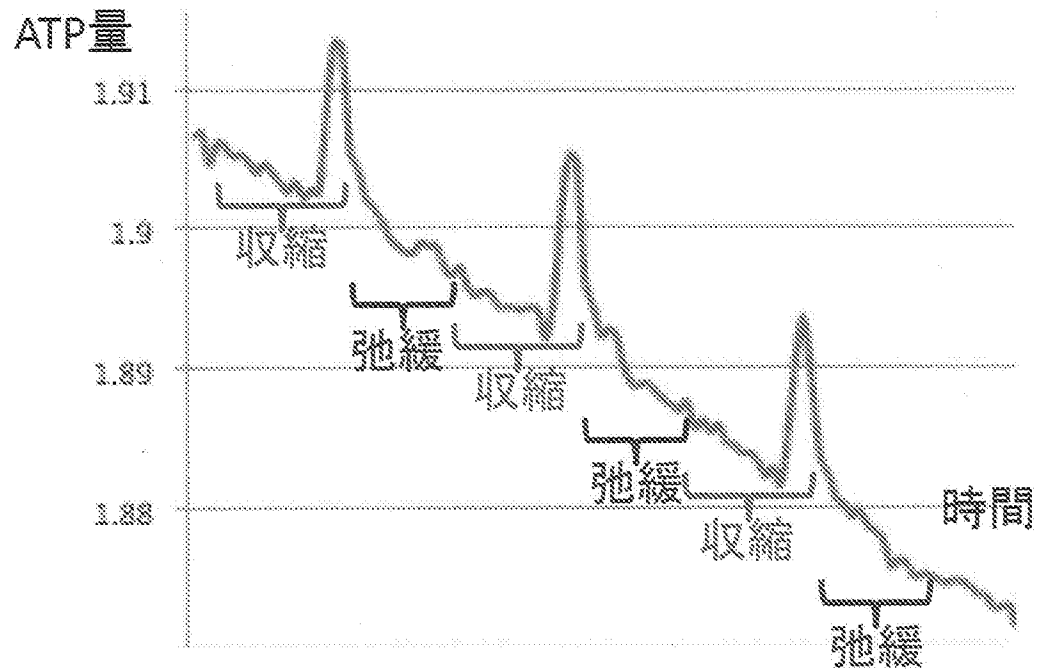
[図16]



[図17]

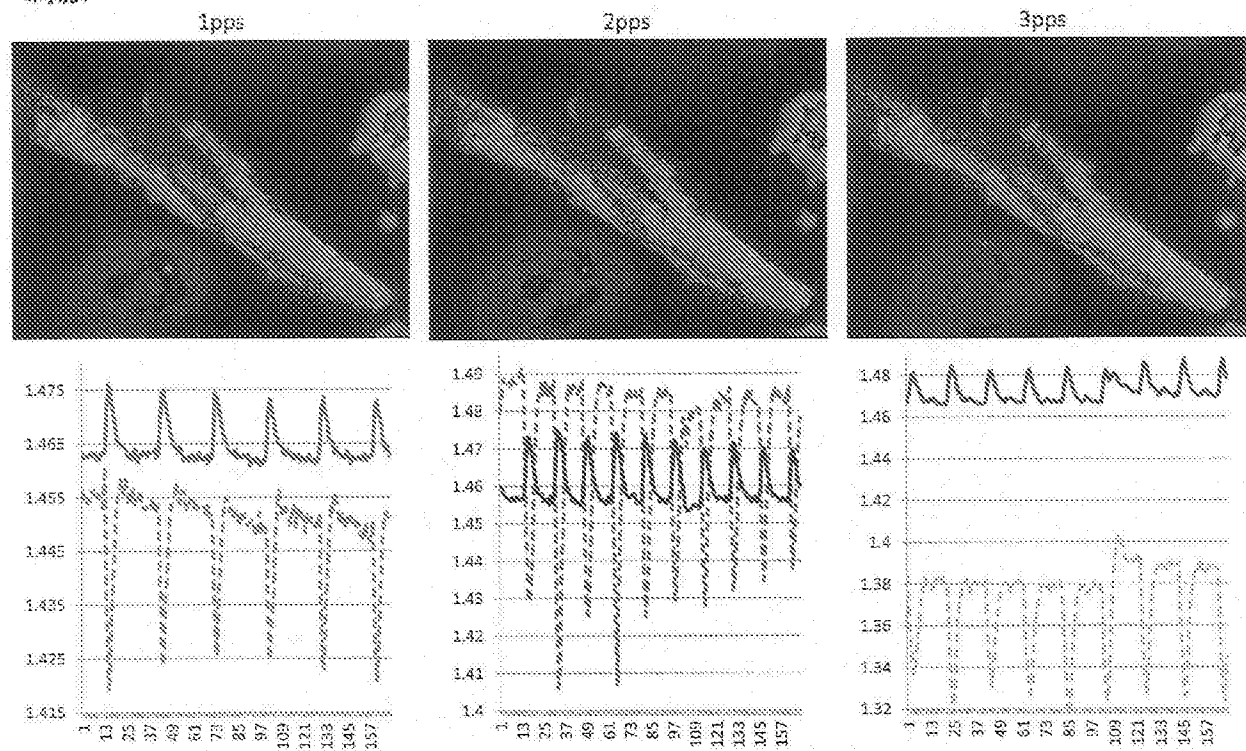


[図18]

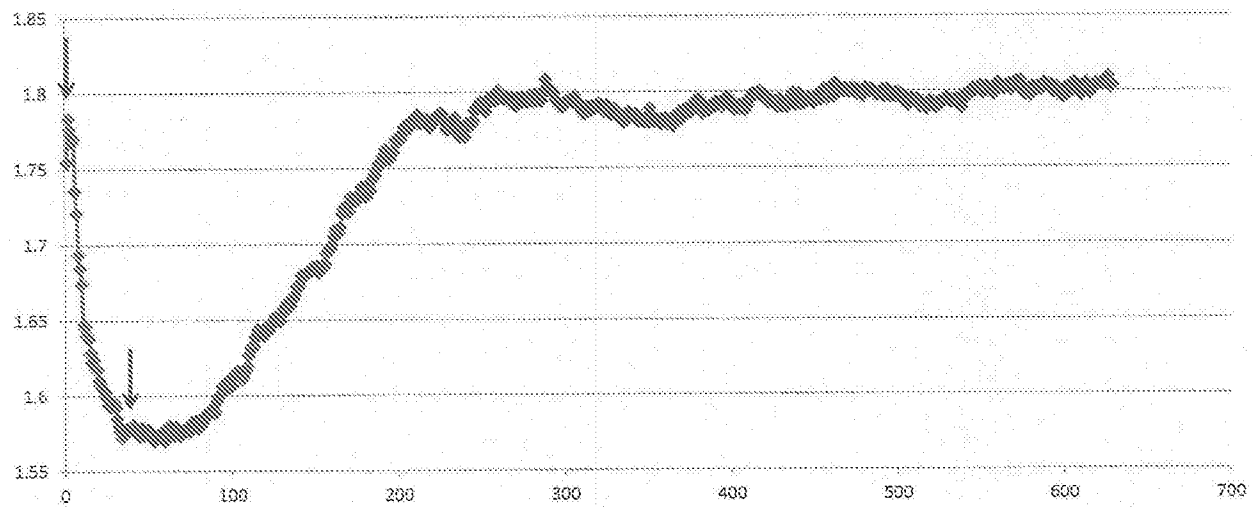


[図19]

刺激



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K67/027, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/00, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THUNEMANN, M. et al., Transgenic mice for cGMP imaging., Circ. Res., 2013, Vol.113 No.4, pages 365-371, summary, page 366, left column, 2nd paragraph to page 367, left column, 1st paragraph, page 368, right column, 2nd paragraph to page 370, right column, 1st paragraph, SUPPLEMENTARY MATERIALS, "Methods"	1-11
Y	ZHANG, J. et al., In vivo assessment of artery smooth muscle [Ca ²⁺] _i and MLCK activation in FRET-based biosensor mice., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2010, Vol.299 No.3, pages H946-H956, summary, page 947, left column, 3rd paragraph to page 948, left column, 1st paragraph, page 948, left column, 4th paragraph, page 948, right column, 4th paragraph to page 950, right column, 1st paragraph	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 March 2015 (24.03.15)

Date of mailing of the international search report
07 April 2015 (07.04.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050932

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AOKI, K. et al., Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from <i>in vitro</i> to <i>in vivo</i> : basis of biosensor construction, live imaging, and image processing., Dev. Growth Differ., 2013, Vol.55 No.4, pages 515-522, summary, page 518, right column, 1st paragraph to page 520, left column, 1st paragraph	1-11
Y	WO 2008/117792 A1 (The New Industry Research Organization et al.), 02 October 2008 (02.10.2008), claims; paragraphs [0007] to [0012], [0015] to [0026]; examples & US 2010/0233692 A1 & EP 2141230 A1	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A01K67/027, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	THUNEMANN, M. et al., Transgenic mice for cGMP imaging., Circ. Res., 2013, Vol.113 No.4, pages 365-371, 要旨、第 366 頁左欄第 2 段落—第 367 頁左欄第 1 段落、第 368 頁右欄第 2 段落—第 370 頁右欄第 1 段落及び SUPPLEMENTARY MATERIALS の"Methods"	1-11

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 4 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

鶴 剛史

4 B

4 6 7 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ZHANG, J. et al., In vivo assessment of artery smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ and MLCK activation in FRET-based biosensor mice., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2010, Vol.299 No.3, pages H946-H956, 要旨、第 947 頁左欄第 3 段落—第 948 頁左欄第 1 段落、第 948 頁左欄第 4 段落、第 948 頁右欄第 4 段落—第 950 頁右欄第 1 段落	1-11
Y	AOKI, K. et al., Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from <i>in vitro</i> to <i>in vivo</i> : basis of biosensor construction, live imaging, and image processing., Dev. Growth Differ., 2013, Vol.55 No.4, pages 515-522, 要旨、第 518 頁右欄第 1 段落—第 520 頁左欄第 1 段落	1-11
Y	WO 2008/117792 A1 (財団法人新産業創造研究機構 他) 2008.10.02, 請求の範囲、[0007]-[0012]、[0015]-[0026]、実施例 & US 2010/0233692 A1 & EP 2141230 A1	1-11