(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2004-135657
(P2004-135657A)
(43)公開日　平成16年5月13日(2004.5.13)

(51)Int.Cl.[7]	FI			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	A01K	67/027		4B063
C12N 5/10	C12Q	1/02		4B065
C12Q 1/02	G01N	33/15	Z	
G01N 33/15	C12N	5/00	B	

審査請求 未請求　請求項の数 28　ＯＬ　（全 92 頁）

(21)出願番号　特願2003-208251(P2003-208251)
(22)出願日　平成15年8月21日(2003.8.21)
(31)優先権主張番号　特願2002-241025(P2002-241025)
(32)優先日　平成14年8月21日(2002.8.21)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000001029
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(72)発明者　山野　和也
東京都町田市旭町三丁目６番６号　協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(72)発明者　井上　美保
東京都町田市旭町三丁目６番６号　協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(72)発明者　佐藤　光男
東京都町田市旭町三丁目６番６号　協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(72)発明者　市村　通朗
東京都町田市旭町三丁目６番６号　協和醗酵工業株式会社東京研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物

(57)【要約】
【課題】ヒトＡ３アデノシン受容体に特異的に作用する物質の薬理評価を行なうことのできる非ヒト哺乳動物を提供する。
【解決手段】ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有し、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物。該非ヒト哺乳動物および、該非ヒト哺乳動物に由来する細胞は、従来の非ヒト哺乳動物では薬理評価ができなかった、ヒトＡ３アデノシン受容体に特異的に作用する物質の薬理評価に有用である。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有し、該受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項２】
両方の相同染色体において、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されている、請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項３】
非ヒト哺乳動物が、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシおよびサルからなる群から選ばれる非ヒト哺乳動物である、請求項１または２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項４】
以下の（ａ）～（ｄ）の工程を含む請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを非ヒト哺乳動物の受精卵に導入する工程
（ｃ）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
（ｄ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
【請求項５】
以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞に導入する工程
（ｃ）該胚性幹細胞を非ヒト哺乳動物の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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを有するゲノム中に個体を選択する工程
【請求項６】
以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを精子に取り込ませる工程
（ｃ）該精子により非ヒト哺乳動物の未受精卵を受精させる工程
（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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
【請求項７】
以下の（ａ）～（ｆ）の工程を含む請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むレトロウイルスベクターを構築する工程
（ｂ）該レトロウイルスベクターを用いて組換えレトロウイルスを作製する工程
（ｃ）該組換えレトロウイルスを非ヒト哺乳動物の未受精卵に感染させる工程
（ｄ）該未受精卵を体外受精させる工程
（ｅ）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
（ｆ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
【請求項８】

以下の（ａ）～（ｈ）の工程を含む請求項２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクターを構築する工程
（ｂ）該ターゲットベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞に導入する工程
（ｃ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する胚性幹細胞を選択する工程
（ｄ）選択した胚性幹細胞を受精卵に導入する工程
（ｅ）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
（ｆ）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
（ｇ）該生殖系列キメラを交配させ、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する個体を選択する工程
（ｈ）（ｇ）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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されたホモ接合体を選択する工程
【請求項９】
以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む請求項１に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）構築した発現ベクターを非ヒト哺乳動物の細胞に導入する工程
（ｃ）（ｂ）で得られた細胞の核を脱核した非ヒト哺乳動物の未受精卵に導入し、発生を開始させる工程
（ｄ）発生を開始した該未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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
【請求項１０】
以下の（ａ）～（ｇ）の工程を含む請求項２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクターを構築する工程
（ｂ）構築したターゲットベクターを非ヒト哺乳動物の細胞に導入する工程
（ｃ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する細胞を選択する工程
（ｄ）選択した細胞の核を脱核した非ヒト哺乳動物の未受精卵に導入し、発生を開始させる工程
（ｅ）発生を開始した該未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
（ｆ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されているホモ接合体を選択する工程
【請求項１１】
請求項１または２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来する細胞。
【請求項１２】
細胞が、卵、精子または胚性幹細胞である請求項１１に記載の細胞。
【請求項１３】

請求項１１または１２に記載の細胞に、さらに外来の遺伝子を導入することを特徴とする、トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
【請求項１４】
請求項１３に記載の方法で作製されるトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項１５】
請求項１１または１２に記載の細胞に、さらに外来の遺伝子を導入して特定の遺伝子を欠損させることを特徴とする、ノックアウト非ヒト哺乳動物の作製方法。
【請求項１６】
請求項１５に記載の方法で作製されるノックアウト非ヒト哺乳動物。
【請求項１７】
請求項１または２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と同種他系統の病態モデル動物とを交配させることを特徴とする、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物の作製方法。
【請求項１８】
請求項１７に記載の方法により作製される、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物。
【請求項１９】
請求項１または２に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に、疾患を誘発させることを特徴とする、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物の作製方法。
【請求項２０】
請求項１９に記載の方法により作製される、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物。
【請求項２１】
以下の（ａ）および（ｂ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。
（ａ）請求項１、２、１４、１６、１８および２０のいずれか１項に記載の非ヒト哺乳動物に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程
（ｂ）該非ヒト哺乳動物に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、該試験物質が該非ヒト哺乳動物に与えた薬理効果を調べる工程
【請求項２２】
以下（ａ）および（ｂ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。
（ａ）請求項１１に記載の細胞に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程
（ｂ）該細胞に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、試験物質が該細胞に与えた薬理効果を調べる工程
【請求項２３】
以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。
（ａ）請求項１２に記載の胚性幹細胞を分化誘導し、分化した細胞を取得する工程
（ｂ）（ａ）で得られた分化した細胞に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程
（ｃ）（ａ）で得られた分化した細胞に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、試験物質が該細胞に与えた薬理効果を調べる工程
【請求項２４】
試験物質が、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項２１～２３のいずれか１項に記載の薬理評価方法。
【請求項２５】
ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニストが、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニスト活性が非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体に対するアゴニスト活性の１０倍以上であるヒト選択的なアゴニストである請求項２４に記載の薬理評価方法。

【請求項２６】
ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニストが、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニスト活性が非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニスト活性の１０倍以上であるヒト選択的なアンタゴニストである請求項２４に記載の薬理評価方法。
【請求項２７】
ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクター。
【請求項２８】
配列番号１１に示される塩基配列の１～６３７番目の配列の連続する５００塩基以上の配列からなるＤＮＡおよび配列番号１１に示される塩基配列の３７３５～５２７０番目の配列の連続する５００塩基以上の配列からなるＤＮＡを含む請求項２７に記載のターゲットベクター。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。本発明はまた、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物を利用した試験物質の薬理評価方法、ならびに該トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製に使用するターゲットベクターに関する。
【０００２】
【従来の技術】
Ａ３アデノシン受容体は、アデノシン受容体のサブタイプとして発見された受容体である（非特許文献１、２および３参照）。Ａ３アデノシン受容体のアゴニスト又は拮抗薬のアッセイ系が構築され（特許文献１参照）、多くの化合物が探索されてきた。その結果、多くのＡ３アデノシン受容体アンタゴニストが既に取得されている（特許文献１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６および１７参照）。
【０００３】
しかし、マウスやラットなど薬理評価に用いられるモデル動物のＡ３アデノシン受容体に対してもヒトＡ３アデノシン受容体と同等に強い拮抗作用を有する化合物が見出されていないため、Ａ３アデノシン受容体の種差による薬物反応性の違いを克服し、ヒト疾患モデルでその有効性を適切に評価することができていない。すなわち、取得された医薬開発候補化合物の疾患に対する薬効および副作用の実質的な評価ができないことがＡ３アデノシン受容体拮抗剤の開発を行う上で大きな障害となっている。
【０００４】
このような種差の問題を解決する一つの手段として、ヒトの遺伝子を動物で発現させる等の、モデル動物のヒト化が注目されている。ヒトの遺伝子を動物に発現させることは、トランスジェニックの技術を用いて行うことが可能である。例えば、ヒトアドレナリンβ２受容体を発現するトランスジェニックマウス（非特許文献４参照）やヒトブラジキニンＢ２受容体を発現するトランスジェニックマウス（非特許文献５参照）等が報告されている。これらの動物では、ヒトの遺伝子とともに、元からあるトランスジェニック動物の対応する遺伝子（オーソログ遺伝子）も発現している。これに対し、ポジティブ選択とネガティブ選択を組み合わせた方法を用いて、ヒト遺伝子をそれに対応する非ヒト哺乳動物のオーソログ遺伝子の位置に導入するノックインと呼ばれる遺伝子改変により、自己のオーソログ遺伝子の代わりに導入したヒト遺伝子を発現する動物を作製することができる（特許文献１８ならびに特許文献６、７および８参照）。しかしながら、ヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子を発現するトランスジェニック非ヒト動物は、報告されていない。
【０００５】
【特許文献１】
英国特許出願公開第２２６４９４８号明細書

【０００６】
【特許文献２】
国際公開第９８／１５５５５号パンフレット
【０００７】
【特許文献３】
国際公開第００／６４８９４号パンフレット
【０００８】
【特許文献４】
国際公開第００／０２８６１号パンフレット
【０００９】
【特許文献５】
国際公開第００／１０３９１号パンフレット
【００１０】
【特許文献６】
国際公開第００／１５２３１号パンフレット
【００１１】
【特許文献７】
国際公開第９９／６５９１２号パンフレット
【００１２】
【特許文献８】
国際公開第９９／６４４１８号パンフレット
【００１３】
【特許文献９】
国際公開第９９／５１６０６号パンフレット
【００１４】
【特許文献１０】
国際公開第９７／３３８７９号パンフレット
【００１５】
【特許文献１１】
国際公開第９７／２７１７７号パンフレット
【００１６】
【特許文献１２】
特開平１１－１９３２８１号公報
【００１７】
【特許文献１３】
特開平９－２９１０８９号公報
【００１８】
【特許文献１４】
米国特許第５４４１８８３号明細書
【００１９】
【特許文献１５】
米国特許第５６４６１５６号明細書
【００２０】
【特許文献１６】
米国特許第５５７３７７２
【００２１】
【特許文献１７】
英国特許出願公開第２３２０４３０号明細書
【００２２】
【特許文献１８】

国際公開第９９／１８１９１号パンフレット
【００２３】
【非特許文献１】
フェブス・レターズ（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ），（オランダ），１９９１年，第２８４巻、第２号，ｐ．１５５－１６０
【００２４】
【非特許文献２】
プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ），（米国），１９９２年，第８９巻，第１６号，ｐ．７４３２－７４３６
【００２５】
【非特許文献３】
プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ（Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ），（米国），１９９３年，第９０巻，第２１号，ｐ．１０３６５－１０３６９
【００２６】
【非特許文献４】
ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），（ドイツ），１９９６年，第２４１巻，第２号，ｐ．４１７－４２４
【００２７】
【非特許文献５】
ハイパーテンション（Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ），（米国），１９９７年，第２９巻，第１号，ｐ．４８８－４９３
【００２８】
【非特許文献６】
ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），（米国），１９９７年，第２７２巻，第２９号，ｐ．１７９７２－１７９８０
【００２９】
【非特許文献７】
ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス（Ｈｕｍａｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ），（イギリス），１９９７年，第６巻，第７号，ｐ．１１５３－１１６２
【００３０】
【非特許文献８】
セル（Ｃｅｌｌ），（米国），１９９６年，第８７巻，第４号，ｐ．６８７－６９６
【００３１】
【発明が解決しようとする課題】
ヒトＡ３アデノシン受容体に特異的に作用する物質の薬理評価を行なうことのできる非ヒト哺乳動物が求められている。
【００３２】
【課題を解決するための手段】
本発明は、以下の（１）～（２８）を提供する。
（１）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有し、該受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
（２）両方の相同染色体において、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自

己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されている、（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
（３）非ヒト哺乳動物が、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシおよびサルからなる群から選ばれる非ヒト哺乳動物である、（１）または（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
（４）以下の（ａ）～（ｄ）の工程を含む（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを非ヒト哺乳動物の受精卵に導入する工程
（ｃ）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
（ｄ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
（５）以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞に導入する工程
（ｃ）該胚性幹細胞を非ヒト哺乳動物の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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを有するゲノム中に個体を選択する工程
【００３３】
（６）以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）該発現ベクターを精子に取り込ませる工程
（ｃ）該精子により非ヒト哺乳動物の未受精卵を受精させる工程
（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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
（７）以下の（ａ）～（ｆ）の工程を含む（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むレトロウイルスベクターを構築する工程
（ｂ）該レトロウイルスベクターを用いて組換えレトロウイルスを作製する工程
（ｃ）該組換えレトロウイルスを非ヒト哺乳動物の未受精卵に感染させる工程
（ｄ）該未受精卵を体外受精させる工程
（ｅ）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
（ｆ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
（８）以下の（ａ）～（ｈ）の工程を含む（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクターを構築する工程
（ｂ）該ターゲットベクターを非ヒト哺乳動物の胚性幹細胞に導入する工程
（ｃ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する胚性幹細胞を選択する工程
（ｄ）選択した胚性幹細胞を受精卵に導入する工程
（ｅ）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（ｆ）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
（ｇ）該生殖系列キメラを交配させ、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコー

ドするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する個体を選択する工程
（ｈ）（ｇ）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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されたホモ接合体を選択する工程
（９）以下の（ａ）～（ｅ）の工程を含む（１）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む発現ベクターを構築する工程
（ｂ）構築した発現ベクターを非ヒト哺乳動物の細胞に導入する工程
（ｃ）（ｂ）で得られた細胞の核を脱核した非ヒト哺乳動物の未受精卵に導入し、発生を開始させる工程
（ｄ）発生を開始した該未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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡをゲノム中に有する個体を選択する工程
（１０）以下の（ａ）～（ｇ）の工程を含む（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（ａ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクターを構築する工程
（ｂ）構築したターゲットベクターを非ヒト哺乳動物の細胞に導入する工程
（ｃ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入された染色体を有する細胞を選択する工程
（ｄ）選択した細胞の核を脱核した非ヒト哺乳動物の未受精卵に導入し、発生を開始させる工程
（ｅ）発生を開始した該未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
（ｆ）該非ヒト哺乳動物を飼育し、産まれた仔から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して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、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが、自己のＡ３アデノシン受容体をコードする領域と置換して挿入されているホモ接合体を選択する工程
【００３４】
（１１）（１）または（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来する細胞。
（１２）細胞が、卵、精子または胚性幹細胞である（１１）に記載の細胞。
（１３）（１１）または（１２）に記載の細胞に、さらに外来の遺伝子を導入することを特徴とする、トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。
（１４）（１３）に記載の方法で作製されるトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
（１５）（１１）または（１２）に記載の細胞に、さらに外来の遺伝子を導入して特定の遺伝子を欠損させることを特徴とする、ノックアウト非ヒト哺乳動物の作製方法。
（１６）（１５）に記載の方法で作製されるノックアウト非ヒト哺乳動物。
（１７）（１）または（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と同種他系統の病態モデル動物とを交配させることを特徴とする、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物の作製方法。
（１８）（１７）に記載の方法により作製される、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物。
（１９）（１）または（２）に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に、疾患を誘発させることを特徴とする、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物の作製方法。

（２０）（１９）に記載の方法により作製される、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現する病態モデル非ヒト哺乳動物。

【００３５】

（２１）以下の（ａ）および（ｂ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。

（ａ）（１）、（２）、（１４）、（１６）、（１８）または（２０）のいずれか１項に記載の非ヒト哺乳動物に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程

（ｂ）該非ヒト哺乳動物に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、試験物質が該非ヒト哺乳動物に与えた薬理効果を調べる工程

（２２）以下（ａ）および（ｂ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。

（ａ）（１１）に記載の細胞に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程

（ｂ）該細胞に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、試験物質が該細胞に与えた薬理効果を調べる工程

（２３）以下の（ａ）～（ｃ）の工程を含む、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する試験物質の薬理評価方法。

（ａ）（１２）に記載の胚性幹細胞を分化誘導し、分化した細胞を取得する工程（ｂ）（ａ）で得られた分化した細胞に試験物質を投与して薬理効果を調べる工程

（ｃ）（ａ）で得られた分化した細胞に試験物質を投与しなかった場合の薬理効果と比較し、試験物質が該細胞に与えた薬理効果を調べる工程

（２４）試験物質が、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストである、（２１）～（２３）のいずれか１項に記載の薬理評価方法。

（２５）ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニストが、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニスト活性が非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体に対するアゴニスト活性の１０倍以上であるヒト選択的なアゴニストである（２４）に記載の薬理評価方法。

（２６）ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニストが、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニスト活性が非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体に対するアンタゴニスト活性の１０倍以上であるヒト選択的なアンタゴニストである（２４）に記載の薬理評価方法。

（２７）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含むターゲットベクター。

（２８）配列番号１１に示される塩基配列の１～６３７番目の配列の連続する５００塩基以上の配列からなるＤＮＡおよび配列番号１１に示される塩基配列の３７３５～５２７０番目の配列の連続する５００塩基以上の配列からなるＤＮＡを含む（２７）に記載のターゲットベクター。

【００３６】

【発明の実施の形態】

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現しており、ヒトＡ３アデノシン受容体に選択的に作用する薬物を評価するために用いることができる。

非ヒト哺乳動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはサルなどがあげられ、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、サルなどがあげられる。

【００３７】

以下、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作出方法と利用方法について詳細に説明する。

本発明の、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、１）目的とする遺伝子を動物個体に導入するトランスジェニック動物の作製方法、２）標的遺伝子と目的とする導入遺伝子とを入れ換えた遺伝子置換動物の作製方法、３）目的とした遺伝子改変を施した細胞の核を用いたクローン個体の作製方法等を用いることにより、作製することができる。以下にそれぞれ具体的に説明する。

【００３８】
１．目的とする遺伝子を動物個体に導入するトランスジェニック動物の作製方法を用いた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製
（１）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの取得
ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡとしては、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡをあげることができる。ゲノムＤＮＡはイントロンを含んでいてもよい。また、コード領域のコドンは、ｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡにおけるコドンに限られるものでなく、ヒトＡ３アデノシン受容体のアミノ酸配列をコードするコドンであれば、いかなるコドンの組み合わせでもよい。ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの例としては、配列番号１４に示す塩基配列からなるヒトＡ３アデノシン受容体のｃＤＮＡをあげることができる。
【００３９】
塩基配列データベースより、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列、またはヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列を検索し、その塩基配列情報を取得する。塩基配列データベースから取得できるヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列としては、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｌ７７７２９、Ｌ７７７３０およびＡＨ００３５９７で登録されている塩基配列、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列としては、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｌ２０４６３、Ｌ２２６０７およびＮＭ＿０００６７７で登録されている塩基配列をあげることができる。
【００４０】
得られたヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの塩基配列情報に基づいて、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードする領域を含むｃＤＮＡの配列またはゲノム配列の領域を適当に選択し、この領域の５’端２０～４０ｂｐの配列を３’端に含むＤＮＡおよび、この領域の３’端２０～４０ｂｐの配列と相補的な配列を３’端に含むＤＮＡを作製する。これらのＤＮＡをプライマーとして用い、ヒトｃＤＮＡを鋳型としたＰＣＲにより、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするｃＤＮＡを、ヒトゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲにより、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするゲノムＤＮＡを単離することができる。
【００４１】
ヒトｃＤＮＡは、ヒトの組織または細胞から調製したＲＮＡから作製できる。組織または細胞から全ＲＮＡを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１５４，３，１９８７）、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１６２，１５６，１９８７；実験医学，９，１９３７，１９９１）などがあげられる。また、アブソリュートリーＲＮＡ ＲＴ－ＰＣＲミニプレップ・キット（Ａｂｓｏｌｕｔｅｌｙ ＲＮＡ ＲＴ－ＰＣＲ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔ、ストラタジーン社製）、ＲＮイージー・ミニ・キット（ＲＮｅａｓｙ ＭＩｎｉ Ｋｉｔ、キアゲン社製）等のキットを用いることによっても調製することができる。全ＲＮＡからポリ（Ａ）$^{+}$ ＲＮＡとしてｍＲＮＡを調製する方法としては、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法〔Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２００１（以下、モレキュラー・クローニング第３版と略す）〕等があげられる。さらに、ファーストトラック２．０ｍＲＮＡ分離キット（ＦａｓｔＴｒａｃｋ ２．０ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ、インビトロジェン社製）、クィックプレップｍＲＮＡ精製キット（ＱｕｉｃｋＰｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ、アマシャム・バイオサイエンス社製）等のキットを用いることによりヒト組織や細胞からｍＲＮＡを調製することができる。全ＲＮＡまたはｍＲＮＡからｃＤＮＡを合成する方法としてはモレキュラー・クローニング第３版、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＪｏｈｎＷｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９８７－２００１（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）等に記載された方法

、あるいは市販のキット、例えばＲＴ－ＰＣＲ用スーパースクリプト第一鎖合成システム（ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ Ｆｉｒｓｔ－ＳｔｒａｎｄＳｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ＲＴ－ＰＣＲ、インビトロジェン社製）、プロスター第一鎖ＲＴ－ＰＣＲキット（ＰｒｏＳＴＡＲ Ｆｉｒｓｔ Ｓｔｒａｎｄ ＲＴ－ＰＣＲ Ｋｉｔ、ストラタジーン社製）、ＰＣＲ－セレクトｃＤＮＡサブトラクション・キット（ＰＣＲ－Ｓｅｌｅｃｔ ｃＤＮＡ Ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ、クロンテック社製）を用いる方法などがあげられる。クロンテック社等から市販されているヒトの各種組織のｃＤＮＡを用いることもできる。このようにして得られたヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの例として、配列番号１４に示す塩基配列を有するＤＮＡをあげることができる。

【００４２】

ヒトゲノムＤＮＡは、ヒトの組織または細胞から、モレキュラー・クローニング第３版に記載の方法により調製することができる。または、イージーＤＮＡキット（Ｅａｓｙ－ＤＮＡ Ｋｉｔ、インビトロジェン社製）、ＤＮＡ抽出キット（ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ、ストラタジーン社製）等のキットを用いることにより、調製できる。クロンテック社等から市販されているヒトのゲノムＤＮＡを用いることもできる。

【００４３】

（２）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む導入遺伝子の作製

（１）で得られたヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを非ヒト哺乳動物に導入する際には、適当なプロモーターの下流に該ＤＮＡを連結した発現ベクターを導入遺伝子として用いるのが好ましい。

【００４４】

発現ベクターに用いられるプロモーターとしては、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを導入する非ヒト哺乳動物の細胞内で転写を開始できるプロモーターであればいずれも用いることができる。たとえばウイルス（サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、ＪＣウイルス、乳癌ウイルス、シミアンウイルス、レトロウイルスなど）由来遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来遺伝子〔例えば、アルブミン、インスリンＩＩ、エリスロポエチン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンＫ１、Ｋ１０およびＫ１４、コラーゲンＩ型およびＩＩ型、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミンβ－水酸化酵素、内皮レセプターチロシンキナーゼ（Ｔｉｅ２）、ナトリウムカリウムアデノシン３リン酸化酵素（Ｎａ，Ｋ－ＡＴＰａｓｅ）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインＩおよびＩＩＡ、メタロプロテイナーゼ１組織インヒビター（ＴＩＭＰ１）、ＭＨＣクラスＩ抗原（Ｈ－２Ｌ）、平滑筋αアクチン、ポリペプチド鎖延長因子１α（ＥＦ－１α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖１および２、ミエリン塩基性タンパク、血清アミロイドＰコンポーネント、ミオグロビン、レニン、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）等の解糖系酵素、ヒートショック蛋白質などの遺伝子〕のプロモーター、上記遺伝子のエンハンサー配列やプロモーター配列を融合させたプロモーター〔例えば、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）の初期遺伝子のプロモーターとヒトＴ細胞白血病ウイルス１のロング・ターミナル・リピートの一部の配列からなるＳＲαプロモーター、サイトメガロウイルスの前初期（ＩＥ）遺伝子エンハンサーとニワトリβ－アクチンプロモーターからなるＣＡＧプロモーターなど〕などがあげられるが、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のプロモーターを用いることが好ましく、特にヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子のプロモーターを用いることが好ましい。組織特異的な発現を示す遺伝子のプロモーターを使用することにより、該受容体をコードするＤＮＡを導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物の特定の組織に発現させることも可能である。また、Ｃｒｅ－ｌｏｘＰ系との組合せにより、以下のようにして導入した外来遺伝子の発現時期や発現量等を制御することも可能である。

【００４５】

発現ベクター中のヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを２つのｌｏｘＰ配列の間に挿入し、該発現ベクターを用いて（３）に後述する方法でトランスジェニック非ヒト

哺乳動物を作製する。該トランスジェニック非ヒト哺乳動物に、アデノウイルスベクターを利用してＣｒｅリコンビナーゼを発現させれば、Ｃｒｅリコンビナーゼ発現用のアデノウイルスを感染させた部位または時期に特異的にヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡが欠失し、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現を抑制することができる。また、（３）に後述する方法でヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターに加えて、例えば組織特異的な発現を示すプロモーターを利用したＣｒｅリコンビナーゼ発現ベクターを導入してトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することにより、Ｃｒｅリコンビナーゼが発現する組織でのみ、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現が抑制されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することができる。

【００４６】

発現ベクターは、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの下流に、ｍＲＮＡの３’末端のポリアデニル化に必要なポリアデニル化シグナルを有していることが好ましい。ポリアデニル化シグナルとしては、上記のウィルス由来、各種哺乳動物および鳥類由来の各遺伝子に含まれるポリアデニル化シグナル、例えば、ＳＶ４０の後期遺伝子または初期遺伝子、ウサギβグロビン遺伝子、ウシ成長ホルモン遺伝子、ヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子等のポリアデニル化シグナルをあげることができる。その他ヒトＡ３アデノシン受容体をさらに高発現させるために、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、イントロンの一部をプロモーター領域の５’上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の３’下流に連結してもよい。以下、プロモーター、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡおよびポリアデニル化シグナルからなるＤＮＡ構築物をヒトＡ３アデノシン受容体発現ユニットと呼ぶ。

【００４７】

さらに発現ベクターには、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、以下Ｅ．　ｃｏｌｉと略す）を用いてベクターを調製するため、Ｅ．　ｃｏｌｉで複製可能な複製開始点およびＥ．　ｃｏｌｉの形質転換体の選択マーカーとなる内因性プロモーターを含む薬剤耐性遺伝子が必要である。薬剤耐性遺伝子としては、Ｅ．　ｃｏｌｉ由来のアンピシリン耐性遺伝子（β－ラクタマーゼ遺伝子）、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等があげられる。Ｅ．　ｃｏｌｉでの複製可能な複製開始点としては、ｐＢＲ３２２の複製開始点、ｃｏｌＥ１の複製開始点等があげられる。

【００４８】

レトロウイルスを遺伝子の導入に用いる場合は、レトロウイルスベクターにヒトＡ３アデノシン受容体発現ユニットを挿入した組換えレトロウイルスベクターを作製する。該組換えレトロウイルスベクターを、適切なパッケージング細胞に導入することにより、組換えレトロウイルスを生産させることができる。得られた組換えレトロウイルスを受精卵等に感染させることにより、組換えレトロウイルスベクターを導入することができる。パッケージング細胞への組換えレトロウイルスベクターの導入には、公知の遺伝子導入の手法（例えば、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、ＤＥＡＥ－デキストラン法等）を用いることができる。

【００４９】

（３）受精卵等への発現ベクターの導入とトランスジェニック非ヒト動物の選択本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、（２）で作製したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を対象となる非ヒト哺乳動物に導入することによって作製できる。具体的には、該遺伝子を対象となる非ヒト哺乳動物の受精卵、胚性幹細胞（以下、ＥＳ細胞と略す）、精子または未受精卵へ導入し、これらの細胞を用いて発生させた個体から、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子が胚芽細胞を含むすべての細胞の染色体上に組み込まれた個体を選択することにより、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作出できる。作出したトランスジェニック非ヒト哺乳動物の胚芽細胞において該導入遺伝子が存在することは、作出動物の子孫がその胚芽細胞および体細胞の全てに該導入遺伝子を有することで確認することができる。個体の選択は、個体を構成

する組織、例えば、血液組織、上皮組織、結合組織、軟骨組織、骨組織、筋組織、口腔内組織または骨格系組織の一部から調製したゲノムＤＮＡ上に該導入遺伝子が存在することをＤＮＡレベルで確認することによって行われる。このようにして選択された個体は通常、相同染色体の片方に導入遺伝子を有するヘテロ接合体なので、ヘテロ接合体の個体同士を交配することにより、子孫の中から導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモ接合体動物を取得することができる。このホモ接合体の雌雄の動物を交配することにより、すべての子孫が該遺伝子を安定に保持するホモ接合体となるので、通常の飼育環境で、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を繁殖継代することができる。

【００５０】

（ｉ）受精卵への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

受精卵への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製は、Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ, Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ （１９９４）（以下、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版と略す）、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ, Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ, ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ （１９９３）、バイオマニュアルシリーズ８ ジーンターゲッティング, ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 （１９９５）、発生工学実験マニュアル, トランスジェニック・マウスの作り方, 講談社 （１９８７）等に記載された方法により行うことができる。

【００５１】

ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を導入する受精卵は、同種の雄非ヒト哺乳動物と雌非ヒト哺乳動物を交配させることによって得られる。例えば、雄マウスと雌マウス、好ましくは近交系の雄マウスと雌マウスを交配することによりマウスの受精卵が得られ、雄ラットと雌ラット、好ましくはＷｉｓｔａｒ系統の雄ラットとＷｉｓｔａｒ系統の雌ラットを交配することによりラットの受精卵が得られる。受精卵は自然交配によっても得られるが、雌非ヒト哺乳動物の性周期を人工的に調節した後、雄非ヒト哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌非ヒト哺乳動物の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば初めに卵胞刺激ホルモン、次いで黄体形成ホルモンを例えば腹腔注射などにより投与する方法が好ましいが、好ましいホルモンの投与量、投与間隔は非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。非ヒト哺乳動物がマウスの場合は、雌マウスに卵胞刺激ホルモン投与後、約４８時間後に黄体形成ホルモンを投与し、雄マウスと交配させることにより受精卵を得る方法が好ましく、卵胞刺激ホルモンの投与量は２～２０ ＩＵ／個体、好ましくは約５ＩＵ／個体、黄体形成ホルモンの投与量は０～１０ ＩＵ／個体、好ましくは約５ＩＵ／個体である。非ヒト哺乳動物がラットの場合は、雌ラットに卵胞刺激ホルモン投与後、約４８時間後に黄体形成ホルモンを投与し、雄ラットと交配させることにより受精卵を得る方法が好ましく、卵胞刺激ホルモンの投与量は２０～５０ ＩＵ／個体、好ましくは約３０ＩＵ／個体、黄体形成ホルモンの投与量は０～１０ ＩＵ／個体、好ましくは約５ＩＵ／個体である。また、近交系のマウスやＷｉｓｔｅｒ系統のラットを用いる場合は、約１２時間明期条件（例えば７：００－１９：００）で約１週間飼育した８週齢以上のものを用いるのが好ましい。

【００５２】

得られた受精卵にマイクロインジェクション法（Ｗ. Ｊ. Ｇｏｒｄｏｎら; Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ, ７７, ７３８０, １９８０、Ｊ. Ｊ. Ｍｕｌｌｉｎｓら; Ｎａｔｕｒｅ, ３４４, ５４１, １９９０、Ｒ. Ｅ. Ｈａｍｍｅｒら; Ｎａｔｕｒｅ, ３１５, ６８０, １９８５、Ｖ. Ｇ. Ｐｕｒｓｅｌら; Ｉｍｍｕｎｏｌ. Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ., １７, ３０３, １９８７）やレトロウイルスを用いた方法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）等によりヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を導入した後、該受精卵を雌非ヒト哺乳動物に人工的に移植および着床させることによっ

て、導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を組み込んだ染色体ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物が得られる。

【００５３】

マイクロインジェクション法により遺伝子を導入する場合には、受精後約１２～約２４時間の雄性前核が出現している受精卵を用いることが好ましい。マイクロインジェクション法で導入されるヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子は、環状化状態、直線化状態いずれでも用いることができるが、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードする領域およびプロモーター等の発現調節領域を破壊しない形で直線化し導入することが好ましい。レトロウイルスを用いた方法により遺伝子を導入する場合には、桑実胚以前（一般には、８細胞期以前）の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。

【００５４】

雌非ヒト哺乳動物へ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌非ヒト哺乳動物に得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましい。偽妊娠雌非ヒト哺乳動物は自然交配によっても得られるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（以下、ＬＨＲＨと略する）あるいはその類縁体を投与後、雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌非ヒト哺乳動物を得ることもできる。ＬＨＲＨの類縁体としては、例えば［３，５－ジヨード－Ｔｙｒ^{5}］－ＬＨＲＨ、［Ｇｌｎ^{8}］－ＬＨＲＨ、［Ｄ－Ａｌａ^{6}］－ＬＨＲＨ、ｄｅｓ－Ｇｌｙ^{10}－［Ｄ－Ｈｉｓ（Ｂｚｌ）^{6}］－ＬＨＲＨエチルアミド等があげられる。ＬＨＲＨあるいはその類縁体の投与量ならびにその投与後に雄非ヒト哺乳動物と交配させる時期は非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。非ヒト哺乳動物が雌ラットの場合は、通常、ＬＨＲＨあるいはその類縁体を投与後、約４日目に雄ラットと交配させることが好ましく、ＬＨＲＨあるいはその類縁体の投与量は、通常、１０～６０μｇ／個体、好ましくは約４０μｇ／個体である。

【００５５】

（ｉｉ）ＥＳ細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

ＥＳ細胞への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製は、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版 、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ ＰｒａｃｔｉｃａｌＡｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ （１９９３）、バイオマニュアルシリーズ８ ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製，羊土社 （１９９５）、発生工学実験マニュアル，トランスジェニック・マウスの作り方，講談社 （１９８７）等に記載された方法により行うことができる。

【００５６】

非ヒト哺乳動物のＥＳ細胞にヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を導入後、得られたＥＳ細胞を集合キメラ法または注入キメラ法を用いて、非ヒト哺乳動物の受精卵に取り込ませ、該受精卵を雌非ヒト哺乳動物に人工的に移植および着床させることによって導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を組み込んだ染色体ＤＮＡを有する細胞を部分的に有する非ヒト哺乳キメラ動物が得られる。

【００５７】

非ヒト哺乳動物のＥＳ細胞は、マウスのＥＳ細胞（Ｍ．Ｊ．Ｅｖａｎｓら；Ｎａｔｕｒｅ，２９２，１５４，１９８１；Ｇ．Ｒ．Ｍａｒｔｉｎ；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７８，７６３４，１９８１）、ラットのＥＳ細胞（Ｐ．Ｍ．Ｉａｎｎａｃｃｏｎｅら；Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．，１６３，２８８，１９９４）ブタのＥＳ細胞（Ｍ．Ｂ．Ｗｈｅｅｌｅｒ；Ｒｅｐｒｏｄ．Ｆｅｒｔｉｌ．Ｄｅｖ．，６，５６３，１９９４）、サルのＥＳ細胞（Ｊ．Ａ．Ｔｈｏｍｓｏｎら；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９２，７８４４，１９９６）の各樹立方法、ＵＳ５４５３３５７またはＵＳ５６７０３７２に記載のＥＳ細胞の樹立方法に準じて、樹立することができる。マウスのＥＳ細胞として、ＡＢ２．２〔レキシコン・ジェネティックス（Ｌｅｘｉｃｏｎ Ｇ

ｅｎｅｔｉｃｓ）社製〕等を用いることができる。

【００５８】

ＥＳ細胞への外来性遺伝子の導入には、公知の遺伝子導入の手法（例えば、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、ウイルスベクター法等）を用いることができる。導入されるヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子は、環状化状態、直線化状態いずれでも用いることができるが、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードする領域およびプロモーター等の発現調節領域を破壊しない形で直線化し導入することが好ましい。

【００５９】

受精卵は（ｉ）に記載した方法により取得できる。

ＥＳ細胞を集合キメラ法を用いて非ヒト哺乳動物の受精卵に取り込ませる場合には、一般に８細胞期以前の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。ＥＳ細胞を注入キメラ法を用いて非ヒト哺乳動物の受精卵に取り込ませる場合には、一般に８細胞期から胚盤胞の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。

【００６０】

雌非ヒト哺乳動物へ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌非ヒト哺乳動物に得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましく、偽妊娠雌非ヒト哺乳動物は、（ｉ）に記載した方法を用いることで得られる。

ＥＳ細胞の非ヒト哺乳動物と受精卵の非ヒト哺乳動物を、同じ種であるが体毛の色等の外見的な表現型が異なる系統にしておけば、非ヒト哺乳キメラ動物である個体、およびキメラ率（ＥＳ細胞に由来する細胞、すなわち導入した外来性遺伝子組み込んだ染色体ＤＮＡを有する細胞の割合）の高い個体を容易に選択することができる。

【００６１】

ヒトＡ３アデノシンをコードするＤＮＡを含む遺伝子を組み込んだ染色体ＤＮＡを有する細胞を部分的に有する非ヒト哺乳キメラ動物のうちキメラ率の高い個体（好ましくは、雄）と非ヒト哺乳動物の個体（好ましくは、雌）を交配する。生まれた仔の組織、例えば、血液組織、上皮組織、結合組織、軟骨組織、骨組織、筋組織、口腔内組織または骨格系組織の一部から調製したゲノムＤＮＡ上に導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子が存在するかどうかをサザンハイブリダイゼーション、ＰＣＲ等により調べ、生まれた全ての仔のゲノムＤＮＡ上に導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子が存在する場合、親の非ヒト哺乳キメラ動物を生殖系列キメラとして選択する。生殖系列キメラと非ヒト哺乳動物の個体を交配することによって、全身の細胞の染色体上に導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を有する個体を仔として得ることができる。この個体は通常、相同染色体の片方にのみ、導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を有するヘテロ接合体である。さらにその個体の雄雌どうしを交配することにより相同染色体の双方に導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子が入ったホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。

【００６２】

（ｉｉｉ）精子への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

精子への遺伝子導入によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製は、Ｐｅｒｒｙら（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８４，１１８０，１９９９）やＷａｋａｙａｍａら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１６，６３９，１９９８）によって報告された方法を用いて行なうことができる。

【００６３】

非ヒト哺乳動物の精子に（４）で作製したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を取り込ませた後、得られた精子を顕微受精の方法を用いて未受精卵に受精させ、発生を開始した卵を雌非ヒト哺乳動物に人工的に移植および着床させることによっ

て、精子に取り込ませたヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を染色体上に組み込んだ非ヒト哺乳動物が得られる。

【００６４】

精子に外来性遺伝子を取り込ませる場合には、細胞膜を破壊した精子を、約０．５～約１００ｎｇ／ｍＬ（好ましくは、５～１０ｎｇ／ｍＬ）の濃度の外来性遺伝子を含む培地（例えば、ＣＺＢ培地やＮＩＭ培地など）中で数分間（好ましくは、１分間程度）インキュベーションする方法を用いることが好ましい。精子の細胞膜を破壊する方法としては、低濃度（例えば、０．０５％）の界面活性剤（例えば、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００など）で処理する方法、１０％の仔ウシ胎児血清（以下、ＦＣＳと略す）を含みＥＤＴＡを含まない培地（例えば、ＣＺＢ培地など）中に懸濁した精子を凍結乾燥する方法　、該精子懸濁液を凍結融解する方法のいずれかが好ましい。このような処理をして細胞膜を破壊した精子は、もはや自発的に受精する能力を失っているが、マイクロマニュピレーター等を用いた顕微受精の方法を用いて受精させることで胚の発生を促すことができる。顕微受精を行う場合には、外来性遺伝子を取り込ませた精子の頭部を減数第二分裂中期にある同種の雌非ヒト哺乳動物未受精卵の細胞質に注入する方法が好ましい。

【００６５】

（ｉｖ）未受精卵への遺伝子導入と体外受精によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

未受精卵への遺伝子導入と体外受精によるトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製は、Ｃｈａｎらによって報告された方法（Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，　９５，　１４０２８，　１９９８）を用いて行なうことができる。

【００６６】

非ヒト哺乳動物（好ましくは、マウス、ラット、ウシなど）の未受精卵に、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させることで該遺伝子を導入し、得られた卵を体外受精の方法を用いて発生を開始させ、発生を開始した受精卵を雌非ヒト哺乳動物に人工的に移植および着床させることによって、導入したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を染色体上に組み込んだ非ヒト哺乳動物が得られる。

【００６７】

ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を組み込んだレトロウイルスは、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版等に記載の方法により調製できる。組換えレトロウイルスを未受精卵に感染させる場合には、透明帯を除いた未受精卵を用いることが好ましい。未受精卵の透明帯を除去する方法としては、マイクロマニュピレーター等を用いて物理的に膜を除く方法、化学物質（例えば、酸性タイロードなど）を用いて化学的に膜を溶解して除く方法のいずれかが好ましい。

【００６８】

２．標的遺伝子と目的とする導入遺伝子とを入れ換えた遺伝子置換動物の作製方法を用いた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

（１）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの取得

１．（１）に記載の方法で、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの取得する。後述するように、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードする領域の５’および３’に非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子の非コード領域を付加するために、開始コドンおよび終止コドンの近傍のコード領域中に適当な制限酵素サイトが必要であるため、このような制限酵素サイトがない場合は、ＰＣＲのプライマーの配列を、コードするアミノ酸配列は変えずに制限酵素サイトができるようにコドンを選択して設計し、ヒトＡ３アデノシン受容体のコード領域中の開始コドンおよび終止コドンの近傍に適当な制限酵素サイトができるようにする。

【００６９】

（２）非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡの取得

非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡを取得する。該ゲノム

ＤＮＡには、Ａ３アデノシン受容体をコードする領域およびイントロンの他に、Ａ３アデノシン受容体をコードする領域よりも５’側および３’側の領域も含む必要がある。Ａ３アデノシン受容体をコードする領域よりも５’側および３’側の領域は、５００ｂｐ以上であり、１ｋｂｐ以上が好ましく、３ｋｂｐ以上がより好ましい。

【００７０】

Ａ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡを調製する方法としては、該非ヒト哺乳動物のゲノムＤＮＡライブラリーを作製し、プラークハイブリダイゼーションあるいはコロニーハイブリダイゼーションにより、該遺伝子を含むゲノムＤＮＡクローンを単離する方法があげられる。

ゲノムＤＮＡライブラリーは、該非ヒト哺乳動物の細胞や組織からゲノムＤＮＡを抽出し、制限酵素で部分的に切断した後、適当なベクターに挿入し、ベクターに応じたＥ．ｃｏｌｉ等の適当な宿主に導入することにより作製することができる。ゲノムＤＮＡの調製およびゲノムＤＮＡライブラリーは、モレキュラー・クローニング第３版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法により作製することができる。ベクターとしては、λ　ＥＭＢＬ３（ストラタジーン社製）、λ　ＤＡＳＨ　ＩＩ（ストラタジーン社製）、λ　ＦＩＸ　ＩＩ（ストラタジーン社製）等のλファージベクター、ＢｅｌｏＢＡＣＩＩ等の細菌人工染色体（ＢＡＣ）ベクター、ｐＡｄ１０ｓａｃＢＩＩ等のバクテリオファージＰ１ベクター、ｐＣＹＰＡＣ１等のＰ１人工染色体（ＰＡＣ）ベクター、ＳｕｐｅｒＣｏｓ　Ｉ（ストラタジーン社製）等のコスミドベクター等があげられる。

【００７１】

プラークハイブリダイゼーションあるいはコロニーハイブリダイゼーションに用いるプローブとしては、該非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体のゲノム遺伝子の部分断片、Ａ３アデノシン受容体のｃＤＮＡの部分断片を標識したものを用いることができる。これらの部分断片は、該非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列またはｃＤＮＡの配列を塩基配列データベースから検索し、この塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたＰＣＲにより取得することができる。

【００７２】

プラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションおよびプローブの標識と調製は、モレキュラー・クローニング第３版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法により行なうことができる。

また、該非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列が塩基配列データベースの検索により得られる場合は、増幅するゲノム配列の領域を適当に選択し、この領域の５’端２０～４０ｂｐの配列を３’端に含むＤＮＡおよび、この領域の３’端２０～４０ｂｐの配列と相補的な配列を３’端に含むＤＮＡを作製し、このＤＮＡをプライマーとし、該非ヒト哺乳動物のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲにより、該非ヒト哺乳動物の該受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡを単離することができる。

【００７３】

また、ゲノムＤＮＡライブラリースクリーニングシステム（Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）やユニバーサル・ゲノムウォーカー・キット（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　ＧｅｎｏｍｅＷａｌｋｅｒ™　Ｋｉｔ、クロンテック社製）などのキットを用いることによって、該非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡを単離することもできる。

上記の方法で得られる非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡとして、配列番号１０で示される塩基配列を含む、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むマウスゲノムＤＮＡをあげることができる。

【００７４】

（３）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの両末端に、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の５’非コード領域および３’非コード領域を付加したＤＮＡの作製

相同組換えに必要な、（１）で調製したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの該受容体をコードする領域（開始コドン～終止コドンの領域）の５’端に、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の開始コドンより５’側の適当な長さの非コード領域を付加し、３’端に該ゲノム配列の終止コドンより３’側の適当な長さの非コード領域を付加したＤＮＡは、以下のようにして取得できる。付加する非コード領域の長さは、３’側、５’側とも５００ｂｐ以上、より好ましくは１ｋｂｐ以上、さらに好ましくは３ｋｂｐ以上が好ましい

【００７５】

（ａ）非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の、開始コドンより５’側にある適当な制限酵素サイトＸよりもさらに５’側の非コード領域２０～４０ｂｐの配列を有するＤＮＡ、（ｂ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの開始コドンから開始コドン近傍の制限酵素サイトＡまでの配列と相補的な配列の３’端に、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の開始コドン直前までの非コード領域２０～４０ｂｐの配列と相補的な配列を付加したＤＮＡ、（ｃ）ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの終止コドン近傍の制限酵素サイトＢから終止コドンまでの配列の３’端に、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の終止コドン直後の非コード領域２０～４０ｂｐの配列を付加したＤＮＡ、（ｄ）非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列の、終止コドンより３’側にある適当な制限酵素サイトＹよりもさらに３’側の非コード領域２０～４０ｂｐの配列と相補的な配列を有するＤＮＡを作製する。（ａ）と（ｂ）を１組のプライマー、（ｃ）と（ｄ）を１組のプライマーとして、それぞれ（２）で取得した非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行なう。（ａ）と（ｂ）のプライマーを用いたＰＣＲにより得られたＤＮＡを、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの開始コドンの近傍にある制限酵素サイトＡおよび５’側非コード領域中の制限酵素サイトＸで切断し、（ｃ）と（ｄ）のプライマーを用いたＰＣＲにより得られたＤＮＡを、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの終止コドンの近傍にある制限酵素サイトＢおよび３’側非コード領域中の制限酵素サイトＹで切断する。これらの断片と、（１）で得られたヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを開始コドンおよび終止コドンの近傍にある制限酵素サイトＡおよびＢで切断した断片、（２）で得られた非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列を５’側非コード領域中の制限酵素サイトＸおよびＸよりさらに５’側にある適当な制限酵素サイトＷで切断した断片、および非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子のゲノム配列を３’側非コード領域中の制限酵素サイトＹおよびＹよりさらに３’側にある適当な制限酵素サイトＺで切断した断片とを連結する。

【００７６】

（４）ターゲットベクターの作製とＥＳ細胞への導入

非ヒト哺乳動物オーソログ遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ ＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙＰｒｅｓｓ（１９９３）、バイオマニュアルシリーズ８ ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製（羊土社）（１９９５）等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサーション型いずれでも用いることができる。ターゲットベクターは、（３）で作製した、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡの両末端に、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノム配列の５’非コード領域および３’非コード領域を付加したＤＮＡ（以下、相同組換え用ＤＮＡとも称する）、相同組換え体の選別に必要な遺伝子、およびＥ．ｃｏｌｉを用いたベクターの調製に必要なＥ．ｃｏｌｉで自律複製可能な複製開始点および薬剤耐性遺伝子を有する。相同組換え体の選別に必要な遺伝子としては、ポジティブ選択（選別に用いた遺伝子を含む組換え体を選別する方法）に用いる、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｈｐｒｔ）遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子、ネガティブ選択（選別に用いた遺伝子を含まない組換え体を選別する方法）に用いるジフテリアトキシン

（ＤＴ）遺伝子等をあげることができる。ポジティブ選択に用いる遺伝子は相同組換え用ＤＮＡの非コード領域内に挿入し、ネガティブ選択に用いる遺伝子は相同組換え用ＤＮＡとは別の位置に挿入する。ポジティブ選択に用いる遺伝子は、該遺伝子の発現に必要なプロモーターに連結してもよいし、プロモーターに連結せず、相同組換えが起きた場合に、ＥＳ細胞の染色体上のＡ３アデノシン受容体遺伝子のプロモーターにより発現させるようにしてもよい。ポジティブ選択に用いる遺伝子の両端に２つのｌｏｘＰ配列を付加して挿入すると、相同組換え体の選別を行なった後に、相同組換え体にＣｒｅリコンビナーゼ発現ベクターを導入することにより、相同組換え体の染色体からポジティブ選択に用いる遺伝子を除去することができる。

【００７７】

具体的なターゲットベクターとしては、ｐｌｏｘｐＨＰＲＴ２（ＷＯ　０１／３３９５７）に、相同組換え用ＤＮＡおよびＤＴ遺伝子の発現ユニットを挿入したベクター、例えば、ｐｌｏｘｐＨＰＲＴ２にマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むゲノムＤＮＡの非コード領域とヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡからなる相同組換え用ＤＮＡおよびＤＴ遺伝子の発現ユニットを挿入したｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２をあげることができる。

【００７８】

ＥＳ細胞へのターゲットベクターの導入には、公知の遺伝子導入の手法、例えば、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、ウイルスベクター法等を用いることができる。導入されるターゲットベクターは、環状、直鎖状いずれの形状でも用いることができるが、相同組換え用ＤＮＡおよび相同組換え体の選別に必要な遺伝子を破壊しない形で直線化し導入することが好ましい。

【００７９】

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Ｇｅｎｅ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ　ａｔ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、バイオマニュアルシリーズ８　ジーンターゲッティング，ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製（羊土社）（１９９５）等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリＡ選択などの方法を用いることができる。例えば、ｈｐｒｔ遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ｈｐｒｔ遺伝子を欠損したＥＳ細胞に導入後、ＥＳ細胞をアミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、ｈｐｒｔ遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入したＥＳ細胞をＧ４１８を含む培地で培養し、Ｇ４１８耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ＤＴ遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入したＥＳ細胞を培養し、生育してきた株を選別する（相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、ＤＴ遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、ＤＴの毒性により生育できない）ことにより、ＤＴ遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムＤＮＡに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第３版）やＰＣＲ等があげられる。

【００８０】

（５）受精卵へのＥＳ細胞の取り込みと非ヒトトランスジェニック動物の作製

受精卵へのＥＳ細胞の取り込みと、受精卵の非ヒト哺乳動物への移植は、１．（３）（ｉｉ）に記載の方法により行なうことができる。

【００８１】

得られた仔から１．（３）（ｉｉ）に記載の方法により、全身の細胞の相同染色体の片方に相同組換えによる遺伝子置換を有するヘテロ接合体を得ることができる。さらにその個

体の雄雌どうしを交配することにより相同染色体の双方に相同組換えによる遺伝子置換を有するホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。

【００８２】

このようにして得られたホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、導入した遺伝子がコードするヒトＡ３アデノシン受容体を発現し、自己が持っていたＡ３アデノシン受容体は発現しないトランスジェニック非ヒト哺乳動物である。このホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、１．の方法で得られるトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、４．および５．に後述する試験物質の薬理評価に用いる非ヒト哺乳動物として、（ａ）非ヒト哺乳動物が本来発現しているＡ３アデノシン受容体を発現していないので、薬理評価に用いる場合に該Ａ３アデノシン受容体を介した薬理効果を考慮する必要がない、（ｂ）導入遺伝子の導入部位に存在する遺伝子の破壊あるいは導入遺伝子による導入部位周辺の遺伝子の活性化等の副次的な表現形の変化がおきる可能性がほとんどない、等の点で好ましい。

【００８３】

３．目的とした遺伝子改変を施した細胞の核を用いたクローン個体の作製方法を用いた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、文献に記載されたクローンヒツジ（Ｉ．Ｗｉｌｍｕｔら；Ｎａｔｕｒｅ，３８５，８１０，１９９７）、クローンウシ（Ｊ．Ｂ．Ｃｉｂｅｌｌｉら；Ｓｃｉｅｎｃｅ，２８０，１２５６，１９９８、入谷明；蛋白核酸酵素，４４，８９２，１９９９）、クローンヤギ（Ａ．Ｂａｇｕｉｓｉら；Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１７，４５６，１９９９）、クローンマウス（Ｔ．Ｗａｋａｙａｍａら；Ｎａｔｕｒｅ，３９４，３６９，１９９８、Ｔ．Ｗａｋａｙａｍａら；Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２２，１２７，１９９９）の作製方法を用い、例えば以下のように作製することができる。

【００８４】

上記１．あるいは２．に記載した方法を用い、非ヒト哺乳動物（好ましくは、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウシなど）の任意の細胞の染色体上に、ヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子を導入する。得られた細胞の核を初期化（核を再び発生を繰り返すことができるような状態に戻す操作）する。

初期化した細胞の核を除核した非ヒト哺乳動物の未受精卵に注入することによって発生を開始させる。

【００８５】

発生を開始した卵を雌非ヒト哺乳動物に人工的に移植および着床させることによって導入した遺伝子を発現する、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物が得られる。また、２．に記載の方法で、遺伝子置換を行なった細胞の核を用いて得られたトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、通常相同染色体の片方にヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡを含む遺伝子が導入されたヘテロ接合体なので、得られたヘテロ接合体同士を交配することにより、自己のもつＡ３アデノシン受容体は発現せず、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。このホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物も、２．に記載の方法で得られるホモ接合体のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と同様の点で、薬理評価に用いる非ヒト哺乳動物として、１．に記載した方法で得られるトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも好ましい。

【００８６】

細胞の核を初期化する方法は、非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。非ヒト哺乳動物がヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合は、外来性遺伝子を導入した細胞を５～３０％、好ましくは１０％のＦＣＳを含む培地（例えば、Ｍ２培地）から３～１０日、好ましくは５日間、０～１％、好ましくは０．５％のＦＣＳを含む貧栄養培地で培養することで細胞周期を休止期状態（Ｇ０期もしくはＧ１期）に誘導し初期化することが好ましい。非ヒト哺乳動物がマウスなどの場合は、同種の非ヒト哺乳動物の除核した未受精卵に、外来性遺伝

子を導入した細胞の核を注入し数時間、好ましくは約１～６時間培養することで初期化することが好ましい。

【００８７】

初期化された核を除核された未受精卵中で発生を開始させる方法は、非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。非ヒト哺乳動物がヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合は、細胞周期を休止期状態（Ｇ０期もしくはＧ１期）に誘導し初期化した核を、電気融合法などによって同種の非ヒト哺乳動物の除核した未受精卵に移植することで卵子を活性化し発生を開始させることが好ましい。非ヒト哺乳動物がマウスなどの場合は、外来性遺伝子を導入した細胞の核を注入した未受精卵を、卵子活性化物質（例えば、ストロンチウムなど）で刺激し細胞分裂の阻害物質（例えば、サイトカラシンＢなど）で処理し第二極体の放出を抑制することで発生を開始させることが好ましい。

【００８８】

４．本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いた試験物質の薬理評価方法

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に試験物質、例えば、ヒトＡ３アデノシン受容体に選択的に作用するアゴニストまたはアンタゴニスト等を投与し、試験物質を投与しない該動物と比較して、該動物の血圧、呼吸数、体重等の種々の身体的パラメーターの測定、外見や行動の観察、病理組織学的検討等の薬理作用を調べることにより、該試験物質の薬理評価を行なうことができる。

【００８９】

また、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に各種の疾患を誘発させた病態モデル動物を作製し、該病態モデル動物に試験物質、例えば、ヒトＡ３アデノシン受容体に選択的に作用するアゴニストまたはアンタゴニスト等を投与し、該病態モデル動物の血圧、呼吸数、体重等の種々の身体的パラメーターの測定、病態や、外見、行動の観察、病理組織学的検討等を、試験物質を投与しない該病態モデル動物と比較して行なうことにより、該試験物質の該疾患に対する有効性および副作用等の薬理評価を行なうことができる。また、この評価に基づき、該疾患の治療薬として好ましい物質を選択することができる。特に、ヒトＡ３アデノシン受容体に対する結合量やアゴニストまたはアンタゴニストとしての活性が、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体と比較して高いヒト受容体に特異的な薬物では、通常の病態モデル動物を用いた薬理評価は困難であったが、本発明のトランスジェニック動物を用いることにより、薬理評価を行なうことが可能となる。本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に誘発させる疾患としては、心疾患（例えば、急性心不全、慢性心不全、心筋炎など）、呼吸器系疾患、関節疾患（例えば、関節リュウマチ、変形性関節症など）、腎疾患（例えば、腎不全、糸球体腎炎、ＩｇＡ腎症など）、動脈硬化症、乾癬症、高脂血症、アレルギー疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎など）、骨疾患（例えば、骨粗鬆症、くる病、骨軟化症、低カルシュウム血症など）、血液疾患、脳血管性傷害、外傷性脳障害、感染症、痴呆症、癌、糖尿病、肝疾患、皮膚疾患、神経変性疾患および慢性炎症性疾患などがあげられる。病態モデル動物の作製は、「マニュアル疾患モデルマウス」〔Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，３１ 臨時増刊号，中山書店 （１９９４）〕、「図説・薬理学のための病態動物モデル」〔西村書店 （１９８４）〕、「関節炎モデル動物」〔医歯薬出版 （１９８５）〕、「神経・筋疾患モデル動物」〔医歯薬出版 （１９８２）〕、「活性酸素と病態 疾患モデルからベッドサイドへ」〔学会出版センター （１９９２）〕等に記載の方法を用いることができる。

【００９０】

本薬理評価方法および５．および８．に後述する薬理評価方法に供する試験物質としては、Ａ３アデノシン受容体に対するアンタゴニスト（ＷＯ９８／１５５５５；ＷＯ００／６４８９４；ＷＯ００／０２８６１；ＷＯ００／１０３９１；ＷＯ００／１５２３１；ＷＯ９９／６５９１２；ＷＯ９９／６４４１８；ＷＯ９９／５１６０６；ＷＯ９７／３３８７９；ＷＯ９７／２７１７７；特開平１１－１９３２８１；特開平９－２９１０８９；ＵＳ５４４１８８３；ＵＳ５６４６１５６；ＵＳ５５７３７

２；　ＧＢ２３２０４３０）等をあげることができる。

【００９１】

５．本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られる細胞を用いた試験物質の薬理評価方法

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られる種々の細胞と、試験物質とを接触させ、試験物質非存在下での細胞と比較して、細胞内のCa^{2+}濃度の上昇等の種々の細胞の応答や細胞の形態の変化等の薬理作用を調べることにより、試験物質の該細胞に対する試験物質の薬理評価を行なうことができる。

【００９２】

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られるＥＳ細胞を分化誘導することにより、さまざまな種類の細胞を得ることができる。分化の誘導方法としては、ＥＳ細胞を同種同系統の動物の皮下に移植することにより、様々な組織が混じりあった奇形腫瘍（テラトーマ）を誘導する方法（マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版）、適当な条件でインビトロ培養することにより、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトに分化誘導する方法（Ｒｅｐｒｏｄ．　Ｆｅｒｔｉｌ．　Ｄｅｖ．，　１０，　３１，　１９９８）をあげることができる。この分化後の細胞と、試験物質とを接触させ、試験物質非存在下での細胞と比較して、細胞内のCa^{2+}濃度の上昇等の種々の細胞の応答や細胞の形態の変化等の薬理作用を調べることにより、試験物質の該細胞に対する薬理評価を行なうことができる。これらの方法によって、ヒトの生体から摘出しにくい細胞や少数しか存在しない細胞などに対する薬理評価を行うことができる。

【００９３】

６．本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物のＥＳ細胞、卵、精子または核を用いた遺伝子改変動物の作製

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られるＥＳ細胞、卵、精子または核を用いて、１．～３．に記載の方法によりヒトＡ３アデノシン受容体を発現し、かつさらなる染色体上の遺伝子の改変を行った遺伝子改変非ヒト哺乳動物を得ることができる。特に、その遺伝子の機能を破壊することである病態が惹起されることが公知になっている遺伝子を２．に記載した相同組換えの手法を利用して欠損させたノックアウト動物や、該遺伝子の機能を阻害するドミナントネガティブ体の遺伝子を１．または３．に記載の方法で導入し発現させたトランスジェニック動物は、病態モデル動物として有用である。

【００９４】

７．本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と同種他系統の動物との交配による遺伝子改変動物の作製と作製された該遺伝子改変動物の利用

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と同種他系統の動物（例えば、ヒト疾患モデル動物）とを交配させることにより、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現し、かつある表現系（例えば、ヒト病態と類似の症状）を示す遺伝子改変哺乳動物を得ることができる。交配する動物が、ヒト疾患モデル動物であれば、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現し、かつヒト病態と類似の症状を表現系として示す病態モデル動物が得られる。交配の方法としては、自然交配以外に体外受精の方法があげられる。疾患モデル動物としては、先天性および後天性を疾患を問わずいかなる疾患モデル動物も用いることができる。例えば後天性の病態モデル動物は、「マニュアル疾患モデルマウス」〔Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，　３１　臨時増刊号，　中山書店　（１９９４）〕、「図説・薬理学のための病態動物モデル」〔西村書店　（１９８４）〕、「関節炎モデル動物」〔医歯薬出版　（１９８５）〕、「神経・筋疾患モデル動物」〔医歯薬出版　（１９８２）〕、「活性酸素と病態　疾患モデルからベッドサイドへ」〔学会出版センター　（１９９２）〕等に記載の方法により作製することができる。

【００９５】

８．遺伝子改変動物を用いた試験物質の薬理評価方法

６および７に記載の方法で得られた遺伝子改変病態モデル動物に試験物質、例えば、Ａ３アデノシン受容体に作用するアゴニストまたはアンタゴニスト等を投与し、該病態モデル動物の血圧、呼吸数、体重等の種々の身体的パラメーターの測定、病態や、外見、行動の観察、病理組織学的検討等を、試験物質を投与しない該病態モデル動物と比較して行なうことにより、該試験物質の該疾患に対する有効性および副作用等の薬理評価を行なうことができる。また、この評価に基づき、該病態の治療薬として好ましい物質を選択することができる。特に、ヒトＡ３アデノシン受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストとしての活性が、非ヒト哺乳動物のＡ３アデノシン受容体と比較して高い、ヒト受容体に選択的な薬物では、通常の病態モデル動物を用いた薬理評価は困難であったが、上記の遺伝子改変病態モデル動物を用いることにより、薬理評価を行なうことが可能となる。

以下に、本発明の実施例を示す。

【００９６】

【実施例】

実施例１　ヒトＡ３アデノシン受容体のｃＤＮＡの単離

（１）ヒト肝臓由来ｃＤＮＡの合成

クロンテック社より購入したヒト肝臓ポリＡ$^{+}$　ＲＮＡ４μｇを鋳型とし、第一鎖ｃＤＮＡ合成用スーパースクリプト・プレアンプリフィケーション・システム（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　ｆｉｒｓｔ　ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、インビトロジェン社製）を用い、添付マニュアルに従ってｃＤＮＡを取得した。

【００９７】

（２）ＰＣＲによるヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの単離

続いて、取得したヒト肝臓由来ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行なった。すなわち、Ｍ．Ｒ．Ａｔｋｉｎｓｏｎらの報告（Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．，２９，１，１９９７）に記載されているヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むヒトゲノムＤＮＡの塩基配列（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号：Ｌ７７７２９およびＬ７７７３０）に基いて、配列番号１で示される塩基配列を有する２４ｍｅｒのプライマー、および配列番号２で示される塩基配列を有する２５ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、ヒト肝臓由来ｃＤＮＡを鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、６８℃で２分間のサイクルを３０サイクル反復した。このＰＣＲ反応液を２μＬ用いて、上記と同方法で再度ＰＣＲを行なった後、このＰＣＲ反応液をアガロースゲル電気泳動し、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを含む約１ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキット（ＧＥＮＥＣＬＥＡＮ　ＩＩ　Ｋｉｔ、ＢＩＯ１０１社製）を用い、添付マニュアルに従って回収した。

【００９８】

（３）ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを有するプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒの構築

次に、回収したヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを含むＤＮＡ断片（約１ｋｂｐ）２５０ｎｇとプラスミドｐＴ７Ｂｌｕｅ　Ｔ－Ｖｅｃｔｏｒ（ノバジェン社製）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ＤＮＡライゲーション・キットＶｅｒ．２（宝酒造社製）のＩ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

【００９９】

該反応液を用いてＥ．ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、アンピシリン耐性（Ａｍｐ^{r}）株を得た。この形質転換株からバーンボイム（Ｂｉｒｎｂｏｉｍ）らの方法（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，７，１５１３，１９７９）に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７（アプライド・バイオシステムズ社製）を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれるヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列を確認した結果、公知のヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列と同じであった。配列番号３に得られたヒトＡ３アデノシン受容体のｃＤＮＡの塩基配列を、配列番号４に該ｃＤＮＡがコードするヒトＡ３アデノシン受容体のアミノ酸配列を示した。以下、このプ

ラスミドをｐＢＳ－ｈＡ３Ｒと称す。ｐＢＳ－ｈＡ３Ｒの構築工程を図１に示した。

【０１００】

実施例２　マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むマウスゲノムＤＮＡの単離および解析

（１）マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むマウスゲノムＤＮＡのスクリーニング

マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の配列を有するクローンをＰＣＲで判定するためのＰＣＲプライマーを作製した。すなわち、Ｚ．　Ｚｈａｏらの報告（Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，５７，　１，１９９９）に記載されているマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の塩基配列（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号：　ＡＦ０６９７７８）より、エクソン１の一部を含む領域を増幅する、配列番号５で示される塩基配列を有する２３ｍｅｒのプライマーと配列番号６で示される塩基配列を有する２３ｍｅｒのプライマーの組み合わせ（マウスゲノムＤＮＡを鋳型とした場合、配列番号１１の配列の６３５～９９３番目に相当する約３６０ｂｐの増幅バンドが検出される）、および配列番号７で示される塩基配列を有する２０ｍｅｒのプライマーと配列番号８で示される塩基配列を有する２０ｍｅｒのプライマーの組み合わせ（マウスゲノムＤＮＡを鋳型とした場合、配列番号１１の配列の５２７～１０８８番目に相当する約５６０ｂｐの増幅バンドが検出される）を選択して作製した。各プライマーを倉敷紡績社のゲノムＤＮＡライブラリーＰＣＲスクリーニングサービスへ送付し、これらのプライマーを用いたＰＣＲによるマウスゲノムＤＮＡライブラリー（ベクターｐＢｅｌｏＢＡＣＩＩ）からのマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のスクリーニングを依頼した。その結果、Ａ３アデノシン受容体遺伝子の配列を含むマウスゲノムＤＮＡが導入されているｐＢｅｌｏＢＡＣＩＩプラスミドを含むＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ１０Ｂ株の形質転換体のクローンを得ることができた。

【０１０１】

（２）マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むマウスゲノムＤＮＡの単離

上記のＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ１０Ｂ株クローンより、バーンボイムらの方法に従ってプラスミドを単離した。該プラスミドをｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩと名づけた。次に以下のようにして、得られたプラスミドを各制限酵素で処理し、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子配列を含むラジオアイソトープ標識ＤＮＡプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。

【０１０２】

まず、上記で単離したｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩプラスミド１００ｎｇをＳａｃＩ、ＳａｃＩＩ、ＮｏｔＩ、ＸｂａＩ、ＳｐｅＩ、ＢａｍＨＩ、ＳｍａＩ、ＰｓｔＩ、ＥｃｏＲＩ、ＥｃｏＲＶ、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＣｌａＩ、ＨｉｎｃＩＩ、ＡｃｃＩ、ＳａｌＩ、ＸｈｏＩ、ＡｐａＩ、ＫｐｎＩの各制限酵素（宝酒造社製）を１２単位ずつ用い、添付マニュアルに従って３７℃で６時間消化反応を行なうことにより完全に切断したのち、パルスフィールド装置〔バイオ・ラッド（ＢＩＯ－ＲＡＤ）社製〕を用いたアガロースゲル電気泳動を行ない（分離断片サイズ：５－１５０ｋｂｐ用プログラムを使用）、さらにＳｏｕｔｈｅｒｎの方法（Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　９８，　５０３，　１９７５）でナイロンフィルター〔ハイボンド（Ｈｙｂｏｎｄ^{TM}）－Ｎ＋；アマシャム・バイオサイエンス社製〕へ移した。次に、サザンハイブリダイゼーションに用いるプローブを作製するため、マウスゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行なった。すなわち、エクソン１中のマウスＡ３アデノシン受容体をコードする領域を含むＤＮＡを増幅する配列番号７で示される塩基配列を有する２０ｍｅｒのプライマーと配列番号８で示される塩基配列を有する２０ｍｅｒのプライマー、エクソン２中のマウスＡ３アデノシン受容体をコードする領域を含むＤＮＡを増幅する配列番号９で示される塩基配列を有する２３ｍｅｒのプライマーと配列番号１０で示される塩基配列を有する２３ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、上記のｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩプラスミドを鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で３０秒間、６０℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを１０サイクル反復した後、さらに９４℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを２０サイクル反復し、４℃で一晩保

存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をアガロースゲル電気泳動し、エクソン１中のマウスＡ３アデノシン受容体をコードする領域を含む約５６０ｂｐのＤＮＡ断片、およびエクソン２中のマウスＡ３アデノシン受容体をコードする領域を含む約６００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。これらＤＮＡ断片は、市販のＴ７クイックプライム・キット（Ｔ７　ＱｕｉｃｋＰｒｉｍｅ　Ｋｉｔ、アマシャム・バイオサイエンス社製）を用いて［α－^{32}Ｐ］ｄＣＴＰ（ＮＥＮ社製）で標識した。

【０１０３】

この標識した各プローブと上記で作製したフィルターを一晩ハイブリダイズさせ、０．１％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を含有する２×ＳＳＰＥ（３００ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、２０ｍｍｏｌ／Ｌ　NaH_2PO_4、２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）を用いて６５℃で１５分間の洗浄を３回、０．１％ＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＰＥ（３０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、２ｍｍｏｌ／Ｌ　NaH_2PO_4、０．２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）を用いて６５℃で１５分間の洗浄を２回行ない、Ｘ線フィルム〔コダック・サイエンティフィック・イメージング・フィルム（Ｋｏｄａｋ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｆｉｌｍ）Ｘ－ＯＭＡＴ^{TM}　ＡＲ、コダック社製〕と重ね合わせて－８０℃で一晩感光させ、翌日現像した。

【０１０４】

このハイブリダイゼーションの結果、ｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩプラスミドをＥｃｏＲＩで切断処理することにより、エクソン１を含む約９ｋｂｐのＤＮＡ断片とエクソン２を含む約６．５ｋｂｐのＤＮＡ断片が生じることが示された。

続いて、上記のｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩプラスミド５μｇを１００μＬのユニバーサルバッファーＨ（宝酒造社製）に溶解し、６０単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動した後、エクソン１を含む約９ｋｂｐのＤＮＡ断片と、エクソン２を含む約６．５ｋｂｐのＤＮＡ断片を切り出し、ジーンクリーンＩＩキットを用いて、添付マニュアルに従ってＤＮＡ断片を回収した。

【０１０５】

プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）１μｇを５０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡを５０μＬのアルカリホスファターゼ用バッファーに溶解し、４０単位のウシ小腸由来のアルカリホスファターゼを加えて５０℃で３時間反応を行なった。フェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により脱リン酸化された約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。

【０１０６】

ｐｍＡ３Ｒ／ＢｅｌｏＢａｃＩＩプラスミド由来のＥｃｏＲＩ断片であるマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１を含むマウスゲノムＤＮＡ断片（約９ｋｂｐ）１０ｎｇおよびマウスＡ３アデノシン受容体のエクソン２を含むマウスゲノムＤＮＡ断片（約６．５ｋｂｐ）１０ｎｇを、各々ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＥｃｏＲＩ断片（約３ｋｂｐ）４０ｎｇと一緒に１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で３時間結合反応を行なった。

【０１０７】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。以下、このプラスミドをｐＢＳ－ｅｘ１及びｐＢＳ－ｅｘ２と称す。

【０１０８】

（３）マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子を含むマウスゲノムＤＮＡの解析

ｐＢＳ－ｅｘ１およびｐＢＳ－ｅｘ２各１μｇをＳａｃＩ、ＳａｃＩＩ、ＮｏｔＩ、ＸｂａＩ、ＳｐｅＩ、ＢａｍＨＩ、ＳｍａＩ、ＰｓｔＩ、ＥｃｏＲＩ、ＥｃｏＲＶ、Ｈｉｎｄ

ＩＩＩ、ＣｌａＩ、ＨｉｎｃＩＩ、ＡｃｃＩ、ＳａｌＩ、ＸｈｏＩ、ＡｐａＩ、ＫｐｎＩの各制限酵素（宝酒造社製）を１２単位ずつ用い、添付マニュアルに従って３７℃で１６時間消化反応を行なうことにより完全に切断したのち、アガロースゲル電気泳動を行なった。その結果から、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１およびエクソン２を含む約１５．５ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡに存在する、各制限酵素に対する認識配列の位置を決定した。図２にエクソン１、図３にエクソン２の各制限酵素マップを示した。
次に、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、エクソン１より上流約３００ｂｐの領域から、エクソン２より下流約１．１ｋｂｐの領域までの塩基配列を決定した（図４、配列番号１１）。

【０１０９】

実施例３　マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換するためのターゲットベクターの構築
マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１より約５ｋｂｐ上流のＳｍａＩサイトからエクソン２より下流のＨｉｎｃＩＩサイトまでの領域において、マウスＡ３アデノシン受容体をコードする領域およびイントロンを、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのヒトＡ３アデノシン受容体をコードする領域に置換したＤＮＡ、およびマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２のＢａｍＨＩサイトからエクソン２より下流のＡｐａＩサイトまでの領域のＤＮＡを含むターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を以下に示す（１）～（１５）の工程で構築した。

【０１１０】

（１）プラスミドｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築
２つのｌｏｘＰ配列の間に、ＰＧＫプロモーターの下流につながったｈｐｒｔ遺伝子が存在するプラスミドｐｌｏｘｐＨＰＲＴ２のＳｍａＩ／ＢａｍＨＩサイト間に、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエキソン２の非翻訳領域中のＢａｍＨＩサイトからエキソン２の下流のＡｐａＩサイトまでの約２．８ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡを挿入したプラスミドｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を、以下のようにして構築した（図５参照）。

【０１１１】

３μｇの実施例２（２）で作製したプラスミドｐＢＳ－ｅｘ２を、０．０１％ウシ血清アルブミン（以下、ＢＳＡと略す）を含む１００μＬのユニバーサルバッファーＭ（宝酒造社製）に溶解し、７５単位のＸｂａＩを加えて３７℃で１２時間消化反応を行なった。この反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＬ（宝酒造社製）に溶解し、７５単位のＡｐａＩを加えて３７℃で１２時間消化反応を行なった。この反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１０μＬの蒸留水に溶解し、アガロースゲル電気泳動後、約４ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。続いて、ＤＮＡ平滑化キット（宝酒造社製）を用いて、回収したＤＮＡ断片の両末端を添付マニュアルに従って平滑化処理した。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を１５μＬのユニバーサルバッファーＫ（宝酒造社製）に溶解し、７．５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１０時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約２．８ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。この断片は、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２の非翻訳領域中のＢａｍＨＩサイトから下流のＡｐａＩサイトまで約２．８ｋｂｐに相当するゲノムＤＮＡであり、エクソン２の非翻訳領域中のポリアデニル化シグナルを含む。

【０１１２】

プラスミドｐｌｏｘｐＨＰＲＴ２（ＷＯ　０１／３３９５７）２．８μｇを０．０１％ＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＴ（宝酒造社製）に溶解し、７５単位のＳｍａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロ

ホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、７５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１２時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収し、２０μＬの蒸留水に溶解した。

【０１１３】

上記で得た、Ａ３アデノシン受容体のエクソン２を含むマウスゲノムＤＮＡ断片（約２．８ｋｂｐ）９０ｎｇとプラスミドｐｌｏｘｐＨＰＲＴ２由来のＳｍａＩ－ＢａｍＨＩ断片（約５．７ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１６時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２と称す。

【０１１４】

（２）プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築

（１）で構築したｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２にＥｃｏＲＩとＳａｃＩＩの認識配列を付加したプラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を以下のようにして構築した（図６参照）。

【０１１５】

２μｇのプラスミドｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、４０単位のＨｐａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、５０単位のＫｐｎＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を蒸留水１５μＬに溶解した後、アガロースゲル電気泳動し、約９ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１１６】

続いて、配列番号１２で示される３８ｍｅｒの合成オリゴＤＮＡ、および配列番号１３で示される３４ｍｅｒの合成オリゴＤＮＡを作製し、各１０ｐｍｏｌずつを蒸留水１００μＬに加え、９０℃で１０分間熱したのち室温に戻すことによりアニーリングさせた。

上記で得た、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２由来のＨｐａＩ－ＫｐｎＩ断片（約９ｋｂｐ）３０ｎｇとアニーリング済み合成オリゴＤＮＡ　０．２ｐｍｏｌを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１時間結合反応を行なった。

【０１１７】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２と称す。

【０１１８】

（３）プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１の構築

マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２に存在するポリアデニル化シグナルを含む約１．８ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡを有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１を以下のようにして構築した（図７参照）。

【０１１９】

５μｇのプラスミドｐＢＳ－ｅｘ２を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、３０単位のＰｓｔＩと３０単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なっ

たのち、該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を蒸留水２０μＬに溶解し、アガロースゲル電気泳動後、約１．８ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１２０】

２．８μｇのｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、３０単位のＰｓｔＩと３０単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で２４時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。

上記で得た、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２に存在するポリアデニル化シグナルを含むマウスゲノムＤＮＡ断片（約１．８ｋｂｐ）１００ｎｇとｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＰｓｔＩ－ＢａｍＨＩ断片（約３ｋｂｐ）３０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

【０１２１】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｃ１と称す。

【０１２２】

（４）プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ２の構築

プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１からポリアデニル化シグナルより下流の配列を約１．６ｋｂｐ除き、かつその下流にＳａｃＩＩ認識配列を付加したプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ２を以下のようにして構築した（図８参照）。

【０１２３】

２μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１を１００μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、５０単位のＨｉｎｃＩＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なったのち、該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、５０単位のＫｐｎＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を蒸留水２０μＬに溶解したのちアガロースゲル電気泳動を行ない、約３．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１２４】

続いて、配列番号１４で示される１７ｍｅｒの合成オリゴＤＮＡ、および配列番号１５で示される１３ｍｅｒの合成オリゴＤＮＡを作製し、各１０ｐｍｏｌずつを蒸留水１００μＬに加え、９０℃で１０分間熱したのち室温に戻すことにより各合成オリゴＤＮＡをアニーリングさせた。

上記で得た、マウスゲノムＤＮＡの配列約１．６ｋｂｐを取り除いたプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１由来のＨｉｎｃＩＩ－ＫｐｎＩ断片（約３．２ｋｂｐ）３０ｎｇとアニーリング済み合成オリゴＤＮＡ　０．２ｐｍｏｌを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１時間結合反応を行なった。

【０１２５】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｃ２と称す。

【０１２６】

（５）プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３の構築

ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのＡ３アデノシン受容体をコードする領域（停止コドンを含む）の３’端１３ｂｐの下流に、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子エクソン２の停止コドンより下流３８０ｂｐを付加した配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３を、以下のようにして構築した（図９参照）。

【０１２７】

ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのＡ３アデノシン受容体をコードする領域（停止コドンを含む）の３’端１３ｂｐをマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子エクソン２の停止コドンより下流３８０ｂｐの５’側に付加するため、マウスゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行なった。すなわち、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのＡ３アデノシン受容体をコードする領域（停止コドンを含む）の３’端１３ｂｐの配列を含む配列番号１６で示される塩基配列を有する２７ｍｅｒのプライマー、およびマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子エクソン２の配列に基いた配列番号１７で示される塩基配列を有する２４ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、ｐＢＳ－ｅｘ２を鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、５８℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを８サイクル反復した後、さらに９４℃で１分間、６８℃で２分間のサイクルを２２サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３８０ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。５０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、３７．５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。続いて該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動して、約３８０ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１２８】

２．８μｇのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を５０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、３０単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。

【０１２９】

上記で得た、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのＡ３アデノシン受容体をコードする領域（停止コドンを含む）の３’端１３ｂｐの下流に、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子エクソン２の停止コドンより下流３８０ｂｐを付加した配列を有するＤＮＡ断片（約３８０ｂｐ）２５ｎｇと、プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩ断片（約３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１時間結合反応を行なった。

【０１３０】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｃ３と称す。

【０１３１】

（６）プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４の構築

プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３のマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子エクソン２に由来する配列の下流に、ポリアデニル化シグナルを含むマウスゲノムＤＮＡ配列を付加したプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４を以下のようにして構築した（図１０参照）。

【０１３２】

１μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ２を、０．０１％ＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、２０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、１５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約１５０ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１３３】

２μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３を、０．０１％ＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、２０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、１５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３．４ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１３４】

上記で得た、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ２由来の、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２に存在するポリアデニル化シグナルを含むマウスゲノムＤＮＡ断片（約１５０ｂｐ）１０ｎｇとプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３由来のＳａｃＩＩ－ＢａｍＨＩ断片（約３．４ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

【０１３５】

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｃ４と称す。

【０１３６】

（７）プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築

プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２のｈｐｒｔ遺伝子の上流に、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４由来のＤＮＡ断片（ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡのＡ３アデノシン受容体をコードする領域の３’端１３ｂｐの下流に、ポリアデニル化シグナルを含む、マウスゲノムＤＮＡのＡ３アデノシン受容体遺伝子の停止コドンより下流のＨｉｎｃＩＩサイトまでの領域を付加したＤＮＡ）を導入した、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を以下のようにして構築した（図１１参照）。

【０１３７】

３μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４を、０．０１％のＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、５０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約５００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１３８】

３．２μｇのプラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を、０．０１％のＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、５０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約８．５ｋｂｐのＤＮＡ断片を、

ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１３９】

上記で得たプラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４由来のＳａｃＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約５００ｂｐ）５０ｎｇとプラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２由来のＳａｃＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約８．５ｋｂｐ）２００ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２と称す。

【０１４０】

（８）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１の構築

マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンより上流約３５０ｂｐのマウスゲノムＤＮＡ配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１を以下のようにして構築した（図１２参照）。

【０１４１】

マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンより上流３５０ｂｐのマウスゲノムＤＮＡ断片を得るため、プラスミドｐＢＳ－ｅｘ１を鋳型としてＰＣＲを行なった。すなわち、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の塩基配列に基いて配列番号１８で示される塩基配列を有する２７ｍｅｒのプライマー、および配列番号１９で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、ｐＢＳ－ｅｘ１を鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、５２℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを８サイクル反復した後、さらに９４℃で１分間、６８℃で２分間のサイクルを２２サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３５０ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、７５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。続いて該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、６０単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動して、約３５０ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１４２】

２．８μｇのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を５０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し３０単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。

【０１４３】

上記で得た、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンより上流約３５０ｂｐのＤＮＡ断片５０ｎｇとプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシー

クエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ１と称す。

【０１４４】

（９）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２の構築

ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの開始コドンより下流約２００ｂｐの塩基配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２を以下のようにして構築した（図１３参照）。

【０１４５】

ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ配列の開始コドンより下流約２００ｂｐのＤＮＡ断片を得るため、プラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒを鋳型としてＰＣＲを行なった。すなわち、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列に基いて配列番号２０で示される塩基配列を有する２８ｍｅｒのプライマー、および配列番号２１で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、ｐＢＳ－ｈＡ３Ｒを鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、５２℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを８サイクル反復した後、さらに９４℃で１分間、６８℃で２分間のサイクルを２２サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。

【０１４６】

このＰＣＲ反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３５０ｂｐのＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、７５単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。続いて該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、６０単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動して、約２００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１４７】

２．８μｇのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を５０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し３０単位のＢａｍＨＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。

【０１４８】

上記で得た、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの開始コドンより下流約２００ｂｐのＤＮＡ断片５０ｎｇとプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ２と称す。

【０１４９】

（１０）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ３の構築

プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１のマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンより５’側の配列の下流に、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２由来のＤＮＡ断片（ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの開始コドンより下流約２００ｂｐのＤＮＡ断片）を導入した、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ３を以下のようにして構築した（図１４参照）。

【０１５０】
２．３μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２を、４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩと１０単位のＳｐｈＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約２００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
１．６μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１を、４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩと１０単位のＳｐｈＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３．３５ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１５１】
上記で得た、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２由来のＥｃｏＲＩ－ＳｐｈＩ断片（約２００ｂｐ）１０ｎｇとプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１由来のＥｃｏＲＩ－ＳｐｈＩ断片（約３．３５ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ３と称す。
【０１５２】
（１１）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４の構築
マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンより上流約３５０ｂｐの塩基配列の下流にヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ（開始コドン以降の領域）をつなげた配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４を以下のようにして構築した。（図１５参照）。
【０１５３】
０．７μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ３を、０．０１％のＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、５０単位のＮｃｏＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、このＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、１０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動して、約４００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１５４】
さらに、２．２μｇのプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒを、０．０１％のＢＳＡを含む１００μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、５０単位のＮｃｏＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ断片を１００μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、５０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動し、約４ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１５５】
上記で得た、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４由来のＮｃｏＩ－ＳａｃＩ断片（約４００ｂｐ）２０ｎｇとプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒ由来のＮｃｏＩ－ＳａｃＩ断片（約４ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。

以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ４と称す。
【０１５６】
（１２）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ５の構築
マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１よりも上流５ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡの配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ５を以下のようにして構築した（図１６参照）。
【０１５７】
３．３μｇのプラスミドｐＢＳ－ｅｘ１を、０．０１％のＢＳＡを含む２０μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、４単位のＳｍａＩと５単位のＳａｃＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なったのち、該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約５ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
１．１μｇのプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒを、５０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２０単位のＮｄｅＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ平滑化キット（宝酒造社製）を用い、回収したＤＮＡ断片の両末端を添付マニュアルに従って平滑化処理した。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片を４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なったのち、該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１５８】
上記で得た、プラスミドｐＢＳ－ｅｘ１由来のＤＮＡ断片（約５ｋｂｐ）１μｇとプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒ由来のＮｄｅＩ（平滑末端処理済み）－ＳａｃＩ断片（約３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１６時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。
以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ５と称す。
【０１５９】
（１３）プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ６の構築
マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンよりも上流約５．４ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡの配列の下流にヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ（開始コドン以降）をつないだ配列を有するプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ６を以下のようにして構築した（図１７参照）。
【０１６０】
３μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４を、５０μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、２０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１６１】
３．４μｇのプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ５を、５０μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、２０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約９ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１６２】
上記で得た、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４由来のＳａｃＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約１．２ｋｂｐ）６０ｎｇとプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ５由来のＳａｃＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約９ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１６時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。以下、このプラスミドをＡ３Ｒ－Ｎ６と称す。
【０１６３】
（１４）ｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築
マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンよりも５’側約５．４ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡの配列の下流にヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ（コード領域）およびマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の停止コドンより３’側にあるＨｉｎｃＩＩサイトまでのマウスゲノムＤＮＡの配列をつなげた配列を、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２のｈｐｒｔ遺伝子の上流に挿入したプラスミドｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を以下のようにして構築した（図１８参照）。
【０１６４】
１．５μｇの（１３）で作製したプラスミドＡ３Ｒ－Ｎ６を、５０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、５０単位のＳｐｅＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約７ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１６５】
２μｇの（７）で作製したプラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を、１００μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、５０単位のＮｈｅＩを加えて３７℃で２０時間消化反応を行なった。該反応液をエタノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いてＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約９ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１６６】
上記で得た、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ６由来のＳｐｅＩ－ＥｃｏＲＩＤＮＡ断片（約７ｋｂｐ）１０ｎｇとプラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２由来のＮｈｅＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約９ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２０時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２と称す。
【０１６７】
（１５）プラスミドｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築
プラスミドｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２のマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の開始コドンよりも上流約５．４ｋｂｐの配列の上流にジフテリア毒素（ＤＴ）発現ユニット（ＲＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅＩＩプロモーターの下流にＤＴ遺伝子とＳＶ４０由来のポリアデニル化シグナルをつなげた配列）を挿入した、プラスミドｐ

ｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を以下のようにして構築した（図１９参照）。

【０１６８】

３．５５μｇのプラスミドｐＫＯ　ＳｅｌｅｃｔＤＴ（レキシコン・ジェネティックス社製）を、４０μＬのＮＥバッファー４〔ニュー・イングランド・バイオラブズ（ＮｅｗＥｎｇｌａｎｄＢｉｏｌａｂｓ）社製〕に溶解し、２単位のＲｓｒＩＩ（ニュー・イングランド・バイオラブズ社製）を加えて３７℃で２４時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、ＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動し、約１．３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１６９】

３μｇの（１４）で構築したプラスミドｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２を、１００μＬのＮＥバッファー４に溶解し、５単位のＲｓｒＩＩを加えて３７℃で２４時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。続いて、ＤＮＡ断片をアガロースゲル電気泳動し、約１６ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１７０】

上記で得た、プラスミドｐＫＯ　ＳｅｌｅｃｔＤＴ由来のＲｓｒＩＩ断片（約１．３ｋｂｐ）５０ｎｇとプラスミドｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２由来のＲｓｒＩＩ断片（約１６ｋｂｐ）１００ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で１６時間結合反応を行なった。該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２と称す。

【０１７１】

実施例４　ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターの構築

（１）プラスミドｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳの構築

ＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含むプラスミドｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳを以下のようにして構築した（図２０参照）。

【０１７２】

プラスミドｐＣＡＧ－ＧＦＰ－ｐＨＰＲＴｐ（ＷＯ　０１／３３９５７）のＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含む配列番号２２で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマー、および配列番号２３で示される塩基配列を有する３５ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、プラスミドｐＣＡＧ－ＧＦＰ－ｐＨＰＲＴｐを鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で３０秒間、６０℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを３０サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を０．０１％ＢＳＡを含む４０μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、１５単位のＸｂａＩおよび１０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、ＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含む約３００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１７３】

３μｇのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を０．０１％ＢＳＡを含む４０μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、１５単位のＸｂａＩおよび１０単位のＳａｃＩＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気

泳動し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
上記で得た、ＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含むＤＮＡ断片（約３００ｂｐ）１００ｎｇとプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＸｂａＩ－ＳａｃＩＩ断片（約３ｋｂｐ）１００ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２のＩ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。
【０１７４】
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれるＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを確認した。以下、このプラスミドをｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳと称す。
【０１７５】
（２）ｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＢＳの構築
Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を有するプラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＢＳを以下のようにして構築した（図２１参照）。
【０１７６】
ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡの配列に基づいて、ＦＬＡＧタグをコードする配列を含む配列番号２４で示される塩基配列を有する５５ｍｅｒのプライマー、および配列番号２５で示される塩基配列を有する３０ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、プラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒを鋳型として、ＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で３０秒間、６０℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを３０サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を０．０１％ＢＳＡを含む５０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、３７．５単位のＸｂａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２４単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を含む約１ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１７７】
３μｇのプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を０．０１％ＢＳＡを含む４０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、３０単位のＸｂａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。このＤＮＡ断片４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２４単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１７８】
上記で得た、Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を含むＤＮＡ断片（約１ｋｂｐ）１００ｎｇとプラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＸｂａＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれるＮ末端にＦＬＡＧ

タグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を確認した。以下、このプラスミドをｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＢＳと称す。

【０１７９】

（３）プラスミドｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳの構築

Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列の下流にＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを付加したプラスミドｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳを以下のようにして構築した（図２２参照）。

【０１８０】

１．２５μｇの上記（２）で作製したプラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＢＳを０．０１％ＢＳＡを含む４０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、３０単位のＸｂａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。この反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を含む約１ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１８１】

２．５μｇの上記（１）で作製したプラスミドｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳを０．０１％ＢＳＡを含む５０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、３０単位のＸｂａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。この反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。回収したＤＮＡ断片を４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２４単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約３．３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１８２】

上記で得た、Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列を含むＤＮＡ断片（約１ｋｂｐ）４０ｎｇとプラスミドｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳ由来のＸｂａＩ－ＥｃｏＲＩ断片（約３．３ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２　Ｉ液１０μＬを加え、１６℃で３時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳと称す。

【０１８３】

（４）ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築

ＣＡＧプロモーターを含む、Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧを、以下のようにして構築した（図２３参照）。

【０１８４】

３μｇの上記（３）で作製したプラスミドｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳを４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩと１５単位のＥｃｏＲＶを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約１．５ｋｂｐのＤＮＡ断片（Ｎ末端にＦＬＡＧタグが付加されたヒトＡ３アデノシン受容体をコードする配列の下流にＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含むＤＮＡ断片）を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１８５】

４μｇのプラスミドｐＣＡＧ－ＧＦＰ－ｐＨＰＲＴｐを、５０μＬのユニバーサルバッファーＫに溶解し、２０単位のＨｐａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。こ

の反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。４０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、２４単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約８ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

【０１８６】

上記で得た、プラスミドｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ ｉｎ ｐＢＳ由来のＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＶ断片（約１．５ｋｂｐ）１００ｎｇとｐＣＡＧ－ＧＦＰ－ｐＨＰＲＴｐ由来のＥｃｏＲＩ－ＨｐａＩ断片（約８ｋｂｐ）５０ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２のＩ液１０μＬを加え、１６℃で３時間結合反応を行なった。該反応液を用いてＥ．ｃｏｌｉ ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれる配列を確認した。以下、このプラスミドをｈＡ３Ｒ ｉｎ ｐＣＡＧと称す。

【０１８７】

実施例５ ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターの哺乳類細胞への導入と特異的薬物の反応性の評価

（１）一過性発現による薬物反応性の評価

宿主細胞マウスミエローマ細胞Ｐ３．Ｘ６３／Ａｇ８．Ｕ１（以下、Ｐ３Ｕ１と略す）に、アポエクオリンの発現プラスミドｐＣＡＧ－ＡＥＱ－ｐＨＰＲＴｐを導入した安定形質転換細胞株であるクローン２１△ｈｐｒｔ株（ＷＯ ０１／３３９５７）に、実施例４（４）で構築したヒトＡ３アデノシン受容体発現プラスミドｈＡ３Ｒ ｉｎ ｐＣＡＧを導入し、ヒトＡ３アデノシン受容体の一過的発現細胞株を作製した。クローン２１△ｈｐｒｔ株が発現するアポエクオリンは発光基質セレンテラジンおよび分子状酸素と蛋白質複合体エクオリンを形成し、エクオリンはCa^{2+}との結合により発光する。

【０１８８】

クローン２１△ｈｐｒｔ細胞株へのプラスミドｈＡ３Ｒ ｉｎ ｐＣＡＧの導入は、エレクトロポレーション法により以下のようにして行なった。

該細胞株を8×10^{6}個／ｍＬになるようにＫ－ＰＢＳ緩衝液（１３７ｍｍｏｌ／Ｌ ＫＣｌ、２．７ｍｍｏｌ／ＬＮａＣｌ、８．１ｍｍｏｌ／Ｌ Na_2HPO_4、１．５ｍｍｏｌ／Ｌ KH_2PO_4、４ｍｍｏｌ／Ｌ $MgCl_2$）に懸濁し、この細胞懸濁液２００μＬと４μｇのプラスミドｈＡ３Ｒ ｉｎ ｐＣＡＧをエレクトロポレーション用キュベット〔ジーン・パルサー・キュベット（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ Ｃｕｖｅｔｔｅ）、電極間距離２ｍｍ、バイオラッド（ＢＩＯＲＡＤ）社製〕に入れ、パルス電圧０．２５ＫＶ、電気容量１２５μＦの条件で遺伝子導入し、１０ｍＬのＦＣＳを含むＲＰＭＩ １６４０培地（インビトロジェン社製）に懸濁後、３７℃、５％CO_2条件下で２４時間培養した。

【０１８９】

この一過性発現細胞株を用いて、ヒトＡ３アデノシン受容体がマウス細胞内において正常に機能することができるかを検証するため、Ａ３アデノシン受容体に特異的なアゴニストであるクロロ－N^{6}－（３－ヨードベンジル）－アデノシン－５’－Ｎ－メチルウロンアミド〔ｃｈｌｏｒｏ－N^{6}－（３－ｉｏｄｏｂｅｎｚｙｌ）－ａｄｅｎｏｓｉｎｅ－５’－Ｎ－ｍｅｔｈｙｌｕｒｏｎａｍｉｄｅ、以下Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡと略す〕（Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． Ｓｃｉ．， １９， ５， １９９８）に対する応答性（細胞内Ca^{2+}上昇量）を以下のようにしてエクオリンの発光量で評価した。コントロール細胞として、ヒトＡ３アデノシン受容体発現プラスミドを導入していないクローン２１△ｈｐｒｔ株についても、Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する応答性を調べた。

【０１９０】

培養後、各細胞株を1×10^{6}個／ｍｌになるように１０μｍｏｌ／Ｌのセレンテラジン〔モレキュラー・プローブズ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）社製〕を含むＲＰＭ

Ｉ　１６４０培地に懸濁し、培養用ガラスチューブ（岩城硝子社製）へ懸濁液を１００μＬずつ分注して４時間培養した。
培養後、各細胞株の発光量を１秒間毎に５秒間、ルミノメーターＡｕｔｏ　Ｌｕｍａｔ　ＬＢ９５３〔ＥＧ＆Ｇベルトールド（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ）社製〕で測定したのち、２μｍｏｌ／ＬのＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ溶液（１０ｍｍｏｌ／Ｌになるようにに懸濁した溶液をＲＰＭＩ　１６４０培地で希釈した溶液）を各培養用ガラスチューブへ１００μＬずつ添加し、添加直後からの発光量を１秒間毎に６０秒間測定した。また、コントロールとして、Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡが含まれていないＤＭＳＯを用いて同様の測定を行なった。

【０１９１】

本測定の結果を図２４に示す。Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを最終濃度１μｍｏｌ／Ｌで加えた結果、ヒトＡ３アデノシン受容体発現プラスミドを導入していないコントロール細胞株と比較して、ヒトＡ３アデノシン受容体を一過性発現させた細胞株では約２倍のエクオリン発光量の上昇がみられた。
以上の結果より、マウス細胞で一過性発現させたヒトＡ３アデノシン受容体が、Ａ３アデノシン受容体特異的なアゴニストに対して正常な応答性（Ca^{2+}上昇）を有することが示された。

【０１９２】

（２）安定発現株を用いた薬物反応性の評価
クローン２１△ｈｐｒｔ株に、実施例４（４）で構築したヒトＡ３アデノシン受容体発現プラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧを導入し、ヒトＡ３アデノシン受容体の安定発現細胞株を作製した。この安定発現細胞株を用いて、ヒトＡ３アデノシン受容体がマウス細胞内において正常に機能することができるかを検証するため、Ａ３アデノシン受容体に特異的なアゴニストであるＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する応答性（細胞内Ca^{2+}上昇量）をエクオリンの発光量で評価した。

【０１９３】

クローン２１△ｈｐｒｔ細胞株へのプラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの導入は、（１）に記載したエレクトロポレーション法に準じて行なった。遺伝子導入し、１０ｍＬのＦＣＳを含むＲＰＭＩ　１６４０培地に懸濁後、３７℃、５％CO_2条件下で２４時間培養した。培養後、ＨＡＴ培地添加物〔ＨＡＴ－Ｍｅｄｉａ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（５０×）、ベーリンガー・マンハイム・バイオケミカ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ）社製、アミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む〕を２００μＬ添加し、さらに６日間培養することでアミノプテリン耐性株を取得した。取得した薬剤耐性株の生細胞数を計測し、５個／ｍＬになるように、２％ＨＴ培地添加物（ＨＴ－Ｍｅｄｉａ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（５０×）、ベーリンガー・マンハイム・バイオケミカ社製、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む）および１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ　１６４０培地を用いて希釈し、１００μＬ／穴で９６穴プレートに播種した。１週間後、単一コロニーを形成した穴の細胞を回収することにより、プラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧを導入した細胞群から４クローンの細胞株を得ることができた。各クローンは１０％ＦＣＳを含むＲＰＭＩ　１６４０培地を用いて拡大培養を行なった。

【０１９４】

培養後、各細胞株のＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する応答性を（１）に記載した方法に準じて測定した。各プラスミドを導入していないコントロール細胞株（クローン△ｈｐｒｔ細胞株）と比較して、ヒトＡ３アデノシン受容体を発現させた細胞株では、４クローン株中３クローン株で有意な発光量の上昇がみられた（図２５参照）。特にクローン４は、コントロール細胞株と比べて６倍以上の上昇がみられた。

【０１９５】

以上の結果より、マウス細胞で安定発現させたヒトＡ３アデノシン受容体がＡ３アデノシン受容体特異的なアゴニストに対して正常な応答性（Ca^{2+}上昇）を有することが示された。

【０１９６】
実施例６　相同組換え体を検出するためのサザンハイブリダイゼーションに用いる５’側および３’側プローブの作製
（１）５’側プローブの作製
実施例３で作製したターゲットベクターによって相同組換えが正確に行われたかどうかは、サザンハイブリダイゼーションにより解析するが、そのサザンハイブリダイゼーションで用いる５’側プローブとする、ターゲットベクターに含まれるマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１の上流のマウスゲノム配列よりもさらに５’側のゲノム配列を含むＤＮＡを以下のようにして作製した（図２６参照）。
【０１９７】
３μｇのプラスミドｐＢＳ－ｅｘ１を０．０１％のＢＳＡを含む２０μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、８単位のＳｍａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を２０μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、１０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１９８】
５μｇのｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を０．０１％ＢＳＡを含む５０μＬのユニバーサルバッファーＴに溶解し、２４単位のＳｍａＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をフェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法によりＤＮＡ断片を回収した。ＤＮＡ断片を４０μＬのユニバーサルバッファーＬに溶解し、２０単位のＳａｃＩを加えて３７℃で６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。
【０１９９】
上記で得た、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１よりも上流のマウスゲノムＤＮＡ断片（約１．２ｋｂｐ）１００ｎｇとｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＳｍａＩ－ＳａｃＩ断片（約３ｋｂｐ）１００ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２のＩ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。
該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれるマウスゲノム配列を確認した。配列番号２６にその塩基配列を示す。以下、このプラスミドをｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ５’と称す。
【０２００】
サザンハイブリダイゼーションで用いる５’側プローブは、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ５’を鋳型としたＰＣＲにより作製した。すなわち、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ５’に含まれるマウスゲノム配列に基づいて、配列番号２７で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマー、および配列番号２８で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーおよび、鋳型としてｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ５’を用いてＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、６０℃で３０秒間、７２℃で１分間のサイクルを３０サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をアガロースゲル電気泳動して約３００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。以下、このＤＮＡ断片を５’側プローブとして用いる。
【０２０１】
（２）３’側プローブの作製

サザンハイブリダイゼーションで用いる３’側プローブとする、ターゲットベクターに含まれるマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２よりも下流のマウスゲノム配列よりもさらに３’側のマウスゲノム配列を含むＤＮＡを以下のようにして作製した（図２７参照）。

【０２０２】

３μｇのプラスミドｐＢＳ－ｅｘ２を２０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、１０単位のＮｈｅＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約６００ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。

３μｇのｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）を４０μＬのユニバーサルバッファーＭに溶解し、２０単位のＳｐｅＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なったのち、該反応液をアガロースゲル電気泳動し、約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。次に、回収したＤＮＡを５０μＬのアルカリホスファターゼ用バッファーに溶解し、４０単位のウシ小腸由来のアルカリホスファターゼを加えて５０℃で３０分間反応を行ない、フェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿法により末端が脱リン酸化された約３ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収した。

【０２０３】

上記で得た、マウスＡ３アデノシン受容体のエクソン２よりも下流のマウスゲノムＤＮＡ断片（約６００ｂｐ）１００ｎｇとｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）由来のＳｐｅＩ断片（約３ｋｂｐ）１００ｎｇを１０μＬの蒸留水に溶解し、ライゲーション・キットＶｅｒ．２のＩ液１０μＬを加え、１６℃で２時間結合反応を行なった。

該反応液を用いてＥ．　ｃｏｌｉ　ＤＨ５αをコーエンらの方法によって形質転換し、Ａｍｐ^{r}株を得た。この形質転換株からバーンボイムらの方法に従ってプラスミドＤＮＡを単離した。得られたプラスミドの構造は制限酵素消化により確認した。また、ＤＮＡシークエンサー３７７を用い、塩基配列を決定し、該プラスミドに含まれるマウスゲノム配列を確認した。配列番号２９にその塩基配列を示す。以下、このプラスミドをｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ３’と称す。

【０２０４】

サザンハイブリダイゼーションで用いる３’側プローブを作製するため、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ３’を鋳型としてＰＣＲを行なった。すなわち、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ３’に含まれるマウスゲノムＤＮＡ配列に基づいて、配列番号３０で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマー、および配列番号３１で示される塩基配列を有する２６ｍｅｒのプライマーを作製した。これらのプライマーおよび、鋳型としてｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ３’を用いてＰＣＲの反応液を調製し、９４℃で５分間反応させ、続いて９４℃で１分間、６８℃で２分間のサイクルを３０サイクル反復し、４℃で一晩保存する条件でＰＣＲを行なった。このＰＣＲ反応液をアガロースゲル電気泳動して、約２４０ｂｐのＤＮＡ断片を、ジーンクリーンＩＩキットを用い、添付マニュアルに従って回収した。以下、このＤＮＡ断片を３’側プローブとして用いる。

【０２０５】

実施例７　ヒトＡ３アデノシン受容体を発現するトランスジェニックマウスの作出（１）ＥＳ細胞へのターゲットベクターの導入

マウスＥＳ細胞ＡＢ２．２（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｃ１００、以下ＡＢ２．２細胞と称す）の培養は、Ｍ１５培地〔１５％ＦＣＳ（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｂ１００）、10^{-4}ｍｏｌ／Ｌのβメルカプトエタノール（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｍ２６０）、２ｍｍｏｌ／ＬのＬ－グルタミン（レキシコン・ジェネティクス社製）、５０単位／ｍＬのペニシリンおよび５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｍ２５０）を含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｍ２０５）〕を用いて、フィーダープレート上で３７℃、５％CO_2条件下で行なった。

【０２０６】
フィーダープレートは、以下のようにゼラチンコート処理を施した細胞培養用ディッシュにマイトマイシンＣ処理したマウス胚線維芽細胞（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｃ２００、以下、ＳＴＯ細胞と称す）を培養して作製した。まず、０．１％ゼラチン溶液（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｍ２１０）で２時間以上、細胞培養用ディッシュ（９６穴プレート、２４穴プレート、３ｃｍディッシュ、６ｃｍディッシュ、８．５ｃｍディッシュ）の培養面を覆うことによりゼラチンコート処理を行なった。続いて、購入したＳＴＯ細胞を融解後、ＳＴＯ培地（７％のＦＣＳ、２ｍｍｏｌ／ＬのＬ－グルタミン、５０単位／ｍＬのペニシリンおよび５０μｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含むＤＭＥＭ）に４．４×10^5個／ｍＬになるよう懸濁し、ゼラチンコート処理を施した細胞培養用ディッシュに、９６穴プレートには０．０７ｍＬ／穴、２４穴プレートには０．５ｍＬ／穴、３ｃｍディッシュには２ｍＬ／枚、６ｃｍディッシュには４ｍＬ／枚、８．５ｃｍディッシュには１２ｍＬ／枚を播種し、３７℃、５％CO_2条件下で４８時間以上培養したものをフィーダープレートとした。

【０２０７】
ＡＢ２．２細胞はＭ１５培地に懸濁した後、フィーダープレートに播種して培養を開始した。Ｍ１５培地は９６穴プレートには０．１ｍＬ／穴、３ｃｍディッシュには２ｍＬ／枚、６ｃｍディッシュには４ｍＬ／枚、８．５ｃｍディッシュには１０ｍＬ／枚、マルチディッシュおよび２４穴プレートには０．５ｍＬ／穴を使用した。細胞がコンフルエントに到達する前に以下のようにして継代を行なった。まず、継代に先駆け、２時間前にＭ１５培地を交換した。細胞をＰＢＳ（レキシコン・ジェネティクス社製）で２回洗浄した後、９６穴プレートには０．０２５ｍＬ／穴、２４穴プレートには０．２５ｍＬ／穴、３ｃｍディッシュには１ｍＬ／枚、６ｃｍディッシュには２ｍＬ／枚、８．５ｃｍディッシュには２ｍＬ／枚の０．０４％ＥＤＴＡを含む０．２５％トリプシン溶液（レキシコン・ジェネティクス社製、カタログ番号Ｍ２２０、以下、トリプシン溶液と略す）を添加し、３７℃、５％CO_2条件下で１５分間放置した。等量のＭ１５培地を添加し、３ｍＬトランスファーピペット（ファルコン社製、カタログ番号７５７５）を用いて４０回激しくピペッティングし細胞を分散させた。細胞を含む溶液から、遠心分離により細胞を沈殿させて回収した。回収した細胞をＭ１５培地に再び懸濁し、新しいフィーダープレート上に播種することで継代を行なった。

【０２０８】
ＡＢ２．２細胞へのターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の導入は、以下のようにして、エレクトロポレーション法により行なった。実施例３（１５）で得られたターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２は、制限酵素ＳａｌＩで切断して直鎖状にし、フェノール／クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行ない、０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡを含む１ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ８．０）に溶解したものを用いた。購入したＡＢ２．２細胞３．０×10^6個を６ｃｍディッシュに播種し、４８時間培養した後、８．５ｃｍディッシュへ継代し、さらに２４時間培養した。２４時間後、７ｍＬのＰＢＳで２回洗浄し、上記の継代方法に準じて細胞を回収した。回収した細胞１．０×10^7個を０．９ｍＬのＰＢＳに懸濁し、２５μｇの直鎖状ｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２をエレクトロポレーション用キュベット（ジーン・パルサー・キュベット、電極間距離４ｍｍ、バイオ・ラッド社製、カタログ番号１６５－２０８８）内で混合した。エレクトロポレーション装置ジーンパルサー（バイオ・ラッド社製）を用いて、パルス電圧０．２３ｋＶ、電気容量５００μＦの条件で遺伝子導入し、７０ｍＬのＭ１５培地に懸濁後、７枚の８．５ｃｍフィーダープレートに１０ｍＬずつ播種し、２４時間培養した。

【０２０９】
２４時間後、１００×ＨＡＴ添加物（ＨＡＴ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　（１００×）、インビトロジェン社製、カタログ番号３９９２、アミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチ

ミジンを含む）を１×濃度で含むＭ１５培地で５日間培養した後、１００×ＨＴ添加物（ＨＴ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　（１００×）、インビトロジェン社製、カタログ番号１１０６７－０３０、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む）を１×濃度で含むＭ１５培地でさらに３日間培養することでアミノプテリン耐性コロニーを出現させた。各コロニーを、以下のようにして単離し、培養を継続した。まず、出現したコロニーをＰＢＳで２回洗浄した後、プラスチック製の滅菌チップを用いて計２０５コロニーを直接拾いあげて、３０μＬのトリプシン溶液を添加した丸底９６穴プレート（ファルコン社製、カタログ番号３０７７）へ１コロニー／穴になるように移した。３７℃、５％CO_2条件下で１５分間以上放置した後、７０μＬ／穴のＭ１５培地を添加し、プラスチック製の滅菌チップで４０回激しくピペッティングを行ない細胞を分散させた。細胞懸濁液を、各穴に１００μＬのＭ１５培地を添加した９６穴フィーダープレートに播種して３日間培養を行なった。

【０２１０】

３日後、以下のようにしてレプリカプレートを作製し、さらに５日間培養した。まず、上記の９６穴フィーダープレートで培養した細胞を１００μＬ／穴のＰＢＳで２回洗浄した後、２５μＬのトリプシン溶液を添加し、３７℃、５％CO_2条件下で１５分間以上放置した。２５μＬのＭ１５培地を添加し、プラスチック製の滅菌チップで４０回激しくピペッティングを行ない分散させた。続いて２０％ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ、シグマ・アルドリッチ社製、カタログ番号Ｄ２６５０）、４０％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ（以下、２×フリージング培地と称す）を５０μＬ添加して混合した細胞懸濁液から５０μＬを分取し、あらかじめゼラチンコート処理し、１００μＬ／穴のＭ１５培地を添加しておいた９６穴プレートに移すことにより、レプリカプレートを作製した。残りの細胞懸濁液を含むプレートはマスタープレートとして－８０℃で凍結保存した。

【０２１１】

（２）サザンハイブリダイゼーションによる相同組換え体の選択

（１）で作製したレプリカプレートを５日間培養後、培地を除いて１００μＬ／穴のＰＢＳで２回洗浄した後、細胞溶解液〔１０ｍｍｏｌ／ＬのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ７．５）、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、０．５％サルコシル、１ｍｇ／ｍＬプロテイナーゼＫ（インビトロジェン社製、カタログ番号２５５３０－０４９）〕を５０μＬ／穴ずつ加え、密封容器の中へ十分水を含ませた紙と共に入れたのち、６０℃で２４時間保温し、細胞を溶解させた。細胞の溶解液に、７５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌを含むエタノールを１００μＬ／穴ずつ加えて室温で３０分間以上放置し、ゲノムＤＮＡを沈殿させた後、９６穴プレートを逆さにすることにより溶液を廃棄した。続いて１５０μＬ／穴の７０％エタノールで３回洗浄した後、室温で２０分間放置することにより残ったエタノールを揮発させた。

【０２１２】

１２単位のＥｃｏＲＩと５μｇのリボヌクレアーゼＡ（シグマ社製；カタログＮｏ．Ｒ５１２５）を含むユニバーサルバッファーＨ　３０μＬ／穴を添加して、激しくピペッティングを行ないゲノムＤＮＡをよく溶解させてから、３７℃で２０時間消化反応を行なった。反応後、該反応液をアガロースゲル電気泳動し、Ｓｏｕｔｈｅｒｎの方法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，９８，５０３，１９７５）でナイロンフィルター（Ｈｙｂｏｎｄ^{TM}－Ｎ＋、アマシャム・バイオサイエンス社製）へ移した。実施例９で作製した５’側プローブおよび３’側プローブを、Ｔ７クイックプライム・キット（アマシャム・バイオサイエンス社製）を用いて［α－^{32}Ｐ］　ｄＣＴＰ（ＮＥＮ社製）で標識した。この標識した各プローブと上記で作製したフィルターを一晩ハイブリダイズさせ、０．１％ＳＤＳを含む２×ＳＳＰＥを用いて６５℃で１５分間の洗浄を３回、０．１％ＳＤＳを含む０．２×ＳＳＰＥを用いて６５℃で１５分間の洗浄を２回行ない、Ｘ線フィルム（コダック・サイエンティフィック・イメージング・フィルムＸ－ＯＭＡＴ^{TM}　ＡＲ、コダック社製）と重ね合わせて－８０℃で一晩感光させ、翌日現像した。

【０２１３】

上記のサザンハイブリダイゼーションでは、野生型のマウスゲノムＤＮＡをＥｃｏＲＩで

切断した場合、５’側プローブを用いることにより約９ｋｂｐのＤＮＡ断片、３’側プローブを用いることにより約６．５ｋｂｐのＤＮＡ断片が検出される。一方、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２によって正常に相同組換えが引き起こされ、マウスゲノムＤＮＡ中のマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡに置換されている場合には、５’側プローブを用いることにより約８．５ｋｂｐのＤＮＡ断片が、３’側プローブを用いることにより約８．８ｋｂｐのＤＮＡ断片が検出される（図２８参照）。

【０２１４】

以上のサザンハイブリダイゼーションの結果、（１）で得られたＥＳ細胞のアミノプテリン耐性株２０５コロニーのうち、１６コロニー（１Ｂ７、１Ｃ３、１Ｃ６、１Ｄ１、１Ｄ７、１Ｄ１２、１Ｆ９、１Ｆ１１、１Ｇ２、１Ｇ１１、１Ｈ１１、２Ａ４、２Ｂ３、２Ｂ１２、２Ｄ９、２Ｅ３）が片方の染色体においてマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡに置換された相同組換え体であることが判明した。

【０２１５】

相同組換え体である１６コロニーのＥＳ細胞について、以下のようにして凍結保存用ストックを作製した。

１６コロニーの凍結保存したマスタープレートを融解し、各相同組換え体を含む細胞懸濁液を、２ｍＬ／穴のＭ１５培地を添加した２４穴フィーダープレートの各穴に播種し、２４時間培養した。培地を交換し、２日間培養を行なった後、３ｃｍディッシュのフィーダープレートに継代しさらに３日間培養した。（１）に記載した継代方法に準じて、ディッシュより剥離後、回収した細胞を０．５ｍＬのＭ１５培地に懸濁した。さらに０．５ｍＬの２×フリージング培地を加えて混合した懸濁液を、０．１ｍＬずつ細胞凍結用チューブに分注し、－８０℃で凍結保存し、ストックとして保管した。

【０２１６】

（３）相同組換え体からの薬剤耐性遺伝子の除去

（２）で得た相同組換え体より、形態と増殖能が良い４クローン（１Ｃ６、１Ｄ１、１Ｆ１１、２Ａ４）を選び、Ｃｒｅ発現ベクターを導入することにより、ｌｏｘＰ配列間に存在する薬剤耐性遺伝子（ｈｐｒｔ遺伝子）の除去を行なった。上記４クローンの凍結保存ストックを各クローン１本ずつ融解し、それぞれ２ｍＬ／穴のＭ１５培地の入った２４穴フィーダープレートに播種して２日間培養した。３ｃｍディッシュフィーダープレートへ継代し、２４時間後に培地交換を行なった。さらにその２４時間後、１ｍＬのＰＢＳで２回洗浄し、１ｍＬのトリプシン溶液を添加した。３７℃、５％CO_2条件下で１５分間放置した後、１ｍＬのＭ１５培地を添加し、３ｍＬトランスファーピペットを用いて４０回激しくピペッティングすることにより細胞を剥離させた。遠心分離により細胞を沈殿させて回収し、０．９ｍＬのＰＢＳに懸濁させた。該細胞懸濁液とＣｒｅ発現ベクターｐＢＳ１８５（インビトロジェン社製）２５μｇを０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡを含む１ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ８．０）に溶解させたものを用いて、（１）に記載したエレクトロポレーション法に準じて細胞に遺伝子導入し、１０ｍＬのＭ１５培地に懸濁後、８．５ｃｍディッシュのフィーダープレートに播種し、２４時間培養した。２４時間後、培地交換を行ない、さらに３日間培養した。

【０２１７】

培養した細胞を７ｍｌのＰＢＳで２回洗浄した後、（１）に記載した継代方法に準じて、ディッシュより剥離して回収し、１０ｍＬのＭ１５培地に懸濁し、細胞数を測定した。続いて、１０００×の６－チオグアニン（シグマ・アルドリッチ社製）を１×濃度で含むＭ１５培地を用いて、５００個／ｍＬ、５０個／ｍＬ、５個／ｍＬに細胞を希釈し、各１０ｍＬずつ８．５ｃｍディッシュのフィーダープレートに播種して７日間培養することでｈｐｒｔ遺伝子欠損コロニーを出現させた。これら各コロニーを（１）に記載した方法に準じて、単離し、９６穴フィーダープレートに播種して３日間培養を行なった。形態の良いクローンを、各コロニーについて１２クローンずつそれぞれ２４穴フィーダープレートへ継代し、２日間培養を行なった。さらに形態の良い６クローンずつをそれぞれ３ｃｍディ

ッシュのフィーダープレートに継代して３日間培養を行なった。細胞を（１）に記載した継代方法に準じてディッシュより剥離して、回収し、０．５ｍＬのＭ１５培地に懸濁した。該細胞懸濁液に、さらに０．５ｍＬの２×フリージング培地を加えて混合した懸濁液を０．１ｍｌずつ細胞凍結用チューブに分注し、計２４クローン（１Ｃ６－１～－６、１Ｄ１－１～－６、１Ｆ１１－１～－６、２Ａ４－１～－６）を－１６０℃で凍結保存用ストックとして保管した。

【０２１８】

（４）サザンハイブリダイゼーションによるｈｐｒｔ遺伝子の除去の確認

上記、２４クローンの凍結保存用ストックを各１本ずつ融解し、２ｍＬのＭ１５培地の入ったゼラチンコート処理済み３ｃｍディッシュに播種して３日間培養を行なった。３日後、培地を除いて１ｍＬのＰＢＳ緩衝液で２回洗浄した後、（２）に記載の細胞溶解液を１．７５ｍＬずつ加え、密封容器の中へ十分水を含ませた紙と共に入れたのち、６０℃で２４時間保温し、細胞を溶解させた。細胞の溶解液に７５ｍｍｏｌ／ＬのＮａＣｌを含むエタノールを３ｍＬずつ加えて室温で３０分間以上放置した後、滅菌チップの先にひっかけるようにしてゲノムＤＮＡを回収した。このゲノムＤＮＡを７０％エタノールで３回洗浄した後、室温で２０分間放置することによりエタノールを揮発させた。ゲノムＤＮＡを２００μｇ／ｍＬのリボヌクレアーゼＡおよび０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡを含む１ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ８．０）１００μＬに溶解した。得られた各ゲノムＤＮＡを１２μｇずつ１２０μＬのユニバーサルバッファーＨに溶解し、１２単位のＥｃｏＲＩを加えて３７℃で１６時間消化反応を行なった。該反応液を滅菌チップで３回ピペッティングすることにより未消化のゲノムＤＮＡを切断した。さらに０．５ｍｏｌ／ＬのＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を１．２μＬおよびエタノール３００μＬを加えたのち、１５００ｒｐｍで１０分間遠心分離を行ないゲノムＤＮＡの沈殿を得た。

【０２１９】

ゲノムＤＮＡの沈殿を０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡを含む１ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ８．０）２０μＬに溶解したのち、全量をアガロースゲル電気泳動し、（２）に記載の方法に準じて、ナイロンフィルターに移し、^{32}Ｐで標識した３’側プローブとサザンハイブリダイゼーションを行なった。上記のサザンハイブリダイゼーションにより、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡに置換されているマウスゲノムＤＮＡをＥｃｏＲＩで切断した場合には、（２）で示す通り、３’側プローブを用いることにより約８．８ｋｂｐのＤＮＡ断片が検出されるが、Ｃｒｅ蛋白質によってｌｏｘＰ配列の間に存在するＰＧＫプロモーターおよびｈｐｒｔ遺伝子（約３．８ｋｂｐ）が除去されていると約５ｋｂｐと短いＤＮＡ断片が検出される（図２９参照）。

【０２２０】

サザンハイブリダイゼーションの結果より、解析した２４クローン全てにおいてヒトＡ３アデノシン受容体遺伝子の下流に存在していたｌｏｘＰ配列の間に挟まれていたＰＧＫプロモーターおよびｈｐｒｔ遺伝子（約３．８ｋｂｐ）がマウスゲノム上より除去されていることが確認された。

【０２２１】

（５）ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを有するＥＳ細胞を用いたキメラマウスの作製

（４）で樹立した、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子の片方のアリルをヒトのＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡに置換したＥＳ細胞のうち、形態と増殖性の良い３クローン（１Ｃ６－１、１Ｆ１１－４、２Ａ４－５）をマウス胚盤胞へ注入するため、フィーダープレート上で培養を行なった。各クローンの凍結保存用ストック１本を融解後、１０ｍＬのＭ１５培地に懸濁し、遠心分離して沈殿させ細胞を回収した。細胞をＭ１５培地を０．５ｍＬ／穴添加した２４穴フィーダープレートに播種し培養を開始した。２日後、３ｃｍディッシュのフィーダープレートに継代した。さらに２日後、ＰＢＳ１ｍＬで２回洗浄した後、０．５ｍＬのトリプシン溶液を加えて、３７℃、５％　CO_2条件下で１５分間放置した。０．５ｍｌのＭ１５培地を添加し、３ｍＬトランスファーピペットを用いて４０回激し

くピペッティングして懸濁したところに、ＦＣＳを加えて混合し、該細胞懸濁液をマウス胚盤胞への注入に用いた。

【０２２２】

マウス胚盤胞は、過排卵処理を施した雌のＣ５７Ｂｌ／６Ｊマウスを同系の雄マウスと自然交配させ、４日後に摘出した子宮の内部をＭ１５培地で潅流することにより取得した。取得したマウス胚盤胞を３７℃、５％ CO_2 条件下で胚盤胞腔が十分に膨らむまで放置した後、約４℃に冷却した２０ｍｍｏｌ／ＬのＨＥＰＥＳを含むＭ１５培地中に移し、マイクロインジェクター（成茂科学社製）およびマイクロマニピュレーター（成茂科学社製）を装備した倒立顕微鏡（ニコン社製）下で観察しながら、注入針を操作し、各ＥＳ細胞クローン（１Ｃ６－１、１Ｆ１１－４、２Ａ４－５）１０～１５個ずつをそれぞれ胚盤胞腔内へ顕微注入した。該胚盤胞を３７℃、５％CO_2条件下で胚盤胞腔が膨らむまで放置した後、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版に記載された方法に従い、偽妊娠の雌ＭＣＨ系統マウスの卵管側子宮部分に移植後、着床させた。偽妊娠の雌ＭＣＨ系統マウス（１０週齢以降）は、発情期前期から発情期にある雌ＭＣＨ系統マウスを精管結紮雄マウスＭＣＨ系統マウス１０週以降の個体と移植３日前の１７：００に１：１で同居、交配させ、翌朝９：００に膣栓確認を行ない、２日後に上記の目的で使用した。

【０２２３】

注入したＥＳ細胞（１Ｃ６－１、１Ｆ１１－４、２Ａ４－５）の寄与により、黒色の被毛の中に茶褐色の被毛が現れたキメラ個体のうちキメラ率が４０％を超える雄の個体が、１Ｆ１１－４より１１匹、２Ａ４－５より１１匹得られた。

【０２２４】

（６）キメラ個体の交配によるヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを有するヘテロ接合体マウスの取得

（５）で得られたキメラ個体を８週齢まで飼育した後、雌のＣ５７Ｂｌ／６Ｊ系統８週齢以降の個体と１：１で交配させ産仔を得た。該産仔のうち、茶褐色の被毛を有する個体の尾よりゲノムＤＮＡを調製し、相同組換えの有無を試験した。ゲノムＤＮＡの調製は、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第２版に記載された方法により、尾の約０．５ｃｍ断片から抽出した。得られたゲノムＤＮＡは７０％エタノールで洗浄した後に乾燥させ、２００μｇ／ｍｌのリボヌクレアーゼＡおよび０．１ｍｍｏｌ／ｌのＥＤＴＡを含む１０ｍｍｏｌ／ｌのトリス（ｐＨ８．０）溶液３００μＬに溶解して用いた。各ゲノムＤＮＡ１２μｇを制限酵素ＥｃｏＲＩで切断し、（４）に記載の方法に準じてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、１Ｆ１１－４と２Ａ４－５から産まれた産仔において、実施例８に示すように、６．５ｋｂｐと５．０ｋｂｐの２本のバンドが見られ、Ａ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換されたヘテロ接合体マウスが含まれていた。以上の結果から、キメラ率が４０％を超えていたキメラ個体は生殖系列キメラマウスであると同定した。このヘテロ接合体マウスは、自己のＡ３アデノシン受容体と共にヒトＡ３アデノシン受容体を発現するマウスである。

【０２２５】

（７）ヒトＡ３アデノシン受容体のみを発現するマウスの取得

上記（６）で得られたヘテロ接合体マウスを８週齢まで飼育した後、雄と雌を交配させ産仔を得た。該産仔の個体の尾より（４）に記載の方法に準じてゲノムＤＮＡを調製し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、実施例８に示すように、５．０ｋｂｐのバンドのみが見られ、両方の染色体においてＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡに置換しているホモ接合体マウスが、産仔に含まれていた。このホモ接合体マウスは、マウスＡ３アデノシン受容体の代わりにヒトＡ３アデノシン受容体を発現するマウスである。

【０２２６】

実施例８　Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウスのゲノム構造解析

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア）、実施例７の（６）に記載したＡ３アデノシン受

容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したヘテロ接合体マウス、および実施例７の（７）に記載したＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウスより尻尾を採取し、実施例９（４）と同様にしてゲノムＤＮＡを調製した。該ゲノムＤＮＡをＴＥバッファー（インビトロジェン社製）に溶解した後、１０μｇのゲノムＤＮＡを１６時間ＥｃｏＲＩ（タカラバイオ社製）で切断し、実施例７の（２）に記した方法でサザンハイブリダイゼーションを行なった。

【０２２７】

実施例６の（１）記載の５’側プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスでは約９ｋｂｐのバンド、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したヘテロ接合体マウスでは約９ｋｂｐと約８．５ｋｂｐのバンド、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウスでは約８．５ｋｂｐのバンドが検出された（図３０）。続いて、実施例６の（２）記載の３’側プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスでは約６．５ｋｂｐのバンド、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したヘテロ接合体マウスでは約６．５ｋｂｐと約５．０ｋｂｐのバンド、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合型マウスでは約５．０ｋｂｐのバンドが検出された（図３１）。以上の結果は図２８および図２９にて模式的に示したゲノム構造と合致しており、該ヘテロ接合体マウスでは、片方の染色体上のＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換されていることが、該ホモ接合体マウスは両染色体上のＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換されていることが確認された。

【０２２８】

実施例９　Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウス由来マスト細胞を用いた、ヒトＡ３アデノシン受容体特異的アンタゴニストの評価

（１）骨髄細胞由来マスト細胞（ＢＭＭＣ）の作製

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスおよび実施例７の（７）で作製したＡ３アデノシン受容体遺伝子をキメラＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウスより取得した骨髄細胞より、以下に記すＳｕｐａｊａｔｕｒａらの方法［ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．），　１６７，　４　（２００１）　］に準じた方法により、骨髄細胞由来マスト細胞（以下、ＢＭＭＣとよぶ）を作製した。

【０２２９】

オスＢＡＬＢ／ｃＡマウス（日本クレア）２０匹より脾臓を摘出後ホモジナイズにより単離した脾臓細胞を、脾臓細胞培養培地〔１０％ＦＣＳ（ハイクローン社製）、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ緩衝液（インビトロジェン社製）、０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　２メルカプトエタノール（インビトロジェン社製）、５０ｍｇ／Ｌのゲンタマイシン（ナカライテスク社製）、３．４ｍｇ／ＬのＰｈｙｔｏｌａｃｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａ（ヨウシュヤマゴボウ）由来レクチン（シグマ－アルドリッチ社製）含むＲＰＭＩ　１６４０培地（インビトロジェン社製）〕にて２×１０^{6}細胞／ｍＬに懸濁し、３７℃、５％CO_2条件下で５日間培養した。培養後、培養上清を回収した。以下、該培養上清をＰＷＭ－ＳＣＭ（ヨウシュヤマゴボウ・マイトジェンで刺激した脾臓細胞の培養上清の略）と呼ぶ。

【０２３０】

続いて、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスおよび実施例７の（７）で作製したＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウスの大腿骨よりそれぞれ骨髄細胞を回収し、ＢＭＭＣ培地〔１０％ＦＣＳ、０．１ｍｍｏｌ／Ｌピルビン酸ナトリウム（インビトロジェン社製）、０．１ｍｍｏｌ／Ｌ非必須アミノ酸（インビトロジェン社製）、５０μｍｏｌ／Ｌの２メルカプトエタノール、５０ｍｇ／Ｌのゲンタマイシン、１０％のＰＷＭ－ＳＣＭを含むＲＰＭＩ　１６４０培地〕にて３７℃

、５％　CO_2条件下で培養を行なった。４日おきに新鮮な培地に交換し、培養開始後２８日目に以下に示した抗体染色を行なった。

【０２３１】

2×10^5細胞をダルベッコのリン酸緩衝液（以下、ＰＢＳと表す）（インビトロジェン社製）で洗浄後、０．２μｇのフルオレセインイソチオシアネート（以下、ＦＩＴＣと略す）で標識したトリニトロフェノール（以下ＴＮＰと略す）特異的ＩｇＥ〔ＫＭ３９３細胞（ＡＴＣＣ番号：ＴＩＢ１４２）より取得〕および０．２μｇのフィコエリスリン（以下、ＰＥと略す）で標識した抗マウスｃ－ｋｉｔ抗体（ファーミンジェン社製）を含むＰＢＳにて、氷上で１時間反応した。反応後、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ベクトン・ディッキンソン）にてＦＩＴＣおよびＰＥの蛍光強度を測定した。マスト細胞細胞膜上にはＩｇＥ　Ｆｃ受容体およびｃ－ｋｉｔが存在し、ＩｇＥと抗マウスｃ－ｋｉｔ抗体の両抗体が結合することが報告されているが（Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，１６，　４４１，　２００２）、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来細胞（図３２）およびＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したホモ接合体マウス由来細胞（図３３）の９５％以上が両抗体で染色され、これら細胞群がＢＭＭＣに分化していることが確認された。

【０２３２】

（２）細胞内Ca^{2+}量測定によるヒトＡ３アデノシン受容体特異的アンタゴニストの評価

Ａ３アデノシン受容体アゴニストならびにアンタゴニストによるＢＭＭＣの細胞内Ca^{2+}量の変動を以下に示す方法により測定した。

【０２３３】

ＴＮＰ特異的ＩｇＥを１００ｎｇ／ｍＬで添加したＢＭＭＣ培地にて、上記（１）で作製したＢＭＭＣを1×10^6細胞／ｍＬ、３７℃、５％　CO_2条件下で１６時間培養した。培養後、ＢＭＭＣをカルシウム測定緩衝液〔２０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ（ナカライテスク社製）、１１５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ（純正化学社製）、５．４ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ（ナカライテスク社製）、０．８ｍｍｏｌ／Ｌ　$MgCl_2$（ナカライテスク社製）、１．８ｍｍｏｌ／Ｌ　$CaCl_2$（ナカライテスク社製）、１３．８ｍｍｏｌ／Ｌグルコース（ナカライテスク社製）、０．２％　ＢＳＡ（シグマ－アルドリッチ社製）、２．５ｍＭ　プロベネシド（ｐｒｏｂｅｎｅｃｉｄ、シグマ－アルドリッチ社製）〕で２回洗浄したのち、最終濃度５μｍｏｌ／ＬのＦｌｕｏ－３　ＡＭ（モレキュラープローブズ社製）と最終濃度０．５％のプルロニック（Ｐｌｕｒｏｎｉｃ）Ｆ－１２７（シグマ－アルドリッチ社製）を加えたカルシウム測定緩衝液に懸濁して３７℃、５％　CO_2条件下で１時間培養した。培養後、カルシウム測定緩衝液で２回洗浄した後、2.5×10^5細胞／ｍＬになるようにカルシウム測定緩衝液で懸濁後、１００μｌずつ９６穴プレートに分注して３７℃、５％　CO_2条件下で３０分培養した。培養後、（ａ）カルシウム測定緩衝液のみ添加、（ｂ）最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＡ３アデノシン受容体アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加、（ｃ）最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加する１０分前に最終濃度１μｍｏｌ／ＬのヒトＡ３アデノシン受容体特異的アンタゴニストＫＦ２６７７７を添加、もしくは（ｄ）最終濃度１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＰ－ＢＳＡ（コスモバイオ社製）を添加した。（ａ）～（ｄ）それぞれの細胞について、細胞内Ca^{2+}量の指標として、ＦＤＳＳ　６０００（浜松ホトニクス社製）を用いて、励起波長４８０ｎｍによって生じる波長５３０ｎｍの蛍光を、ブルーダイクロイックミラーに透過させた後、吸光５２０～５６０ｎＭフィルターで１分間測定した。

【０２３４】

図３４に示すように、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来ＢＭＭＣではＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ添加による細胞内Ca^{2+}量の増加が観察されたが、その増加はＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ添加の１０分前に最終濃度１μｍｏｌ／ＬのヒトＡ３アデノシン受容体アンタゴニストＫＦ２６７７７を添加した場合においても同様に観察され、アンタゴニストによる抑制は見られなかった。一方、図３５に示すように、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシ

ン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウス由来ＢＭＭＣではＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ添加による細胞内$Ｃａ^{2+}$量の増加が観察され、さらにその増加はＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ添加の１０分前に最終濃度１μｍｏｌ／Ｌのヒト３アデノシン受容体アンタゴニストＫＦ２６７７７を添加することにより完全に抑制された。したがって、ヒトＡ３アデノシン受容体特異的アンタゴニストは、ＢＭＭＣにおいてＡ３アデノシン受容体を介した細胞内$Ｃａ^{2+}$の増加を抑制することが確認された。このことは通常のマウスのＢＭＭＣでは確認できなかったのに対し、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をキメラＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウス由来ＢＭＭＣを用いることにより初めて確認することができた。なお、両ＢＭＭＣにおいて細胞に結合しているＴＮＰ特異的ＩｇＥの抗原であるＴＮＰ－ＢＳＡ添加により、細胞内$Ｃａ^{2+}$量の増加が観察され（図３４および３５）、抗原によるＩｇＥの架橋を介したマスト細胞の活性化が正常に起きていることを確認した。

【０２３５】

以上の結果より、従来のマウスでは不可能であったヒトＡ３アデノシン受容体特異的アンタゴニストの薬理評価が、本発明のＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウスを用いることによって可能であることが明らかとなり、本マウスはヒトＡ３アデノシン受容体に対する特異的薬物の薬理評価に有用であることが示された。

【０２３６】

【発明の効果】

本発明により、ヒトＡ３アデノシン受容体に特異的に作用する物質の薬理評価を行なうことのできる非ヒト哺乳動物が提供される。

【０２３７】

「配列表フリーテキスト」

配列番号１－ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号２－ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号５－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号６－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号７－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号８－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号９－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号１０－マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子増幅用プライマー
配列番号１２－ｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２構築用オリゴＤＮＡ
配列番号１３－ｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２構築用オリゴＤＮＡ
配列番号１４－Ａ３Ｒ－Ｃ２構築用オリゴＤＮＡ
配列番号１５－Ａ３Ｒ－Ｃ２構築用オリゴＤＮＡ
配列番号１６－Ａ３Ｒ－Ｃ３構築用プライマー
配列番号１７－Ａ３Ｒ－Ｃ３構築用プライマー
配列番号１８－マウスゲノムＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号１９－マウスゲノムＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号２０－ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ断片増幅用プライマー
配列番号２１－ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡ断片増幅用プライマー
配列番号２２－ＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含むＤＮＡ断片増幅用プライマー
配列番号２３－ＳＶ４０のポリアデニル化シグナルを含むＤＮＡ断片増幅用プライマー
配列番号２４－ＦＬＡＧタグを付加したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号２５－ＦＬＡＧタグを付加したヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡ増幅用プライマー
配列番号２７－マウスＡ３受容体遺伝子５’側プローブ増幅用プライマー
配列番号２８－マウスＡ３受容体遺伝子５’側プローブ増幅用プライマー

配列番号３０－マウスＡ３受容体遺伝子３’側プローブ増幅用プライマー
配列番号３１－マウスＡ３受容体遺伝子３’側プローブ増幅用プライマー
【０２３８】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

〈120〉 Transgenic non-human mammal expressing human A3 adenosine recepto
r

〈130〉 H15-1651S3

〈150〉 JP 2002-241025
〈151〉 2002-08-21

〈160〉 31

〈170〉 PatentIn version 3.1

〈210〉 1
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 Inventor: Yamano, Kazuya; Inoue, Miho; Satoh, Mitsuo
Inventor: Michio, Ichimura; Masaki, Shigehiro

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of human A3 adenosine receptor cDNA

〈400〉 1

tacagacgga tcttgctggc tcac 24

〈210〉 2
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of human A3 adenosine receptor cDNA

〈400〉 2
caggccctca agtgtttgtt gatgg 25

〈210〉 3
〈211〉 1082
〈212〉 DNA
〈213〉 Homo sapiens

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (58)..(1014)

〈400〉 3
tacagacgga tcttgctggc tcacctgtcc ctgtggaggt tcccctggga aggcaag 57

atg ccc aac aac agc act gct ctg tca ttg gcc aat gtt acc tac atc 105
Met Pro Asn Asn Ser Thr Ala Leu Ser Leu Ala Asn Val Thr Tyr Ile

```
1               5                  10                  15

acc atg gaa att ttc att gga ctc tgc gcc ata gtg ggc aac gtg ctg      153
Thr Met Glu Ile Phe Ile Gly Leu Cys Ala Ile Val Gly Asn Val Leu
            20                  25                  30

gtc atc tgc gtg gtc aag ctg aac ccc agc ctg cag acc acc acc ttc      201
Val Ile Cys Val Val Lys Leu Asn Pro Ser Leu Gln Thr Thr Thr Phe
        35                  40                  45

tat ttc att gtc tct cta gcc ctg gct gac att gct gtt ggg gtg ctg      249
Tyr Phe Ile Val Ser Leu Ala Leu Ala Asp Ile Ala Val Gly Val Leu
    50                  55                  60

gtc atg cct ttg gcc att gtt gtc agc ctg ggc atc aca atc cac ttc      297
Val Met Pro Leu Ala Ile Val Val Ser Leu Gly Ile Thr Ile His Phe
65                  70                  75                  80

tac agc tgc ctt ttt atg act tgc cta ctg ctt atc ttt acc cac gcc      345
Tyr Ser Cys Leu Phe Met Thr Cys Leu Leu Leu Ile Phe Thr His Ala
                85                  90                  95

tcc atc atg tcc ttg ctg gcc atc gct gtg gac cga tac ttg cgg gtc      393
Ser Ile Met Ser Leu Leu Ala Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Arg Val
            100                 105                 110

aag ctt acc gtc aga tac aag agg gtc acc act cac aga aga ata tgg      441
Lys Leu Thr Val Arg Tyr Lys Arg Val Thr Thr His Arg Arg Ile Trp
        115                 120                 125
```

```
ctg gcc ctg ggc ctt tgc tgg ctg gtg tca ttc ctg gtg gga ttg acc      489
Leu Ala Leu Gly Leu Cys Trp Leu Val Ser Phe Leu Val Gly Leu Thr
    130                 135                 140

ccc atg ttt ggc tgg aac atg aaa ctg acc tca gag tac cac aga aat      537
Pro Met Phe Gly Trp Asn Met Lys Leu Thr Ser Glu Tyr His Arg Asn
145                 150                 155                 160

gtc acc ttc ctt tca tgc caa ttt gtt tcc gtc atg aga atg gac tac      585
Val Thr Phe Leu Ser Cys Gln Phe Val Ser Val Met Arg Met Asp Tyr
                165                 170                 175

atg gta tac ttc agc ttc ctc acc tgg att ttc atc ccc ctg gtt gtc      633
Met Val Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Trp Ile Phe Ile Pro Leu Val Val
            180                 185                 190

atg tgc gcc atc tat ctt gac atc ttt tac atc att cgg aac aaa ctc      681
Met Cys Ala Ile Tyr Leu Asp Ile Phe Tyr Ile Ile Arg Asn Lys Leu
        195                 200                 205

agt ctg aac tta tct aac tcc aaa gag aca ggt gca ttt tat gga cgg      729
Ser Leu Asn Leu Ser Asn Ser Lys Glu Thr Gly Ala Phe Tyr Gly Arg
    210                 215                 220

gag ttc aag acg gct aag tcc ttg ttt ctg gtt ctt ttc ttg ttt gct      777
Glu Phe Lys Thr Ala Lys Ser Leu Phe Leu Val Leu Phe Leu Phe Ala
225                 230                 235                 240
```

ctg tca tgg ctg cct tta tct atc atc aac tgc atc atc tac ttt aat 825
Leu Ser Trp Leu Pro Leu Ser Ile Ile Asn Cys Ile Ile Tyr Phe Asn
245 250 255

ggt gag gta cca cag ctt gtg ctg tac atg ggc atc ctg ctg tcc cat 873
Gly Glu Val Pro Gln Leu Val Leu Tyr Met Gly Ile Leu Leu Ser His
260 265 270

gcc aac tcc atg atg aac cct atc gtc tat gcc tat aaa ata aag aag 921
Ala Asn Ser Met Met Asn Pro Ile Val Tyr Ala Tyr Lys Ile Lys Lys
275 280 285

ttc aag gaa acc tac ctt ttg atc ctc aaa gcc tgt gtg gtc tgc cat 969
Phe Lys Glu Thr Tyr Leu Leu Ile Leu Lys Ala Cys Val Val Cys His
290 295 300

ccc tct gat tct ttg gac aca agc att gag aag aat tct gag tag 1014
Pro Ser Asp Ser Leu Asp Thr Ser Ile Glu Lys Asn Ser Glu
305 310 315

ttatccatca gagatgactc tgtctcattg accttcagat tccccatcaa caaacacttg 1074

agggcctg 1082

〈210〉 4
〈211〉 318
〈212〉 PRT
〈213〉 Homo sapiens

〈400〉 4

Met Pro Asn Asn Ser Thr Ala Leu Ser Leu Ala Asn Val Thr Tyr Ile
1 5 10 15

Thr Met Glu Ile Phe Ile Gly Leu Cys Ala Ile Val Gly Asn Val Leu
20 25 30

Val Ile Cys Val Val Lys Leu Asn Pro Ser Leu Gln Thr Thr Thr Phe
35 40 45

Tyr Phe Ile Val Ser Leu Ala Leu Ala Asp Ile Ala Val Gly Val Leu
50 55 60

Val Met Pro Leu Ala Ile Val Val Ser Leu Gly Ile Thr Ile His Phe
65 70 75 80

Tyr Ser Cys Leu Phe Met Thr Cys Leu Leu Leu Ile Phe Thr His Ala
85 90 95

Ser Ile Met Ser Leu Leu Ala Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Arg Val
100 105 110

Lys Leu Thr Val Arg Tyr Lys Arg Val Thr Thr His Arg Arg Ile Trp
115 120 125

Leu Ala Leu Gly Leu Cys Trp Leu Val Ser Phe Leu Val Gly Leu Thr
130 135 140

Pro Met Phe Gly Trp Asn Met Lys Leu Thr Ser Glu Tyr His Arg Asn
145 150 155 160

Val Thr Phe Leu Ser Cys Gln Phe Val Ser Val Met Arg Met Asp Tyr
165 170 175

Met Val Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Trp Ile Phe Ile Pro Leu Val Val
180 185 190

Met Cys Ala Ile Tyr Leu Asp Ile Phe Tyr Ile Ile Arg Asn Lys Leu
195 200 205

Ser Leu Asn Leu Ser Asn Ser Lys Glu Thr Gly Ala Phe Tyr Gly Arg
210 215 220

Glu Phe Lys Thr Ala Lys Ser Leu Phe Leu Val Leu Phe Leu Phe Ala
225 230 235 240

Leu Ser Trp Leu Pro Leu Ser Ile Ile Asn Cys Ile Ile Tyr Phe Asn
245 250 255

Gly Glu Val Pro Gln Leu Val Leu Tyr Met Gly Ile Leu Leu Ser His
260 265 270

Ala Asn Ser Met Met Asn Pro Ile Val Tyr Ala Tyr Lys Ile Lys Lys
275 280 285

Phe Lys Glu Thr Tyr Leu Leu Ile Leu Lys Ala Cys Val Val Cys His
290 295 300

Pro Ser Asp Ser Leu Asp Thr Ser Ile Glu Lys Asn Ser Glu
305 310 315

〈210〉 5
〈211〉 23
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 5

agcatggaag ccgacaacac cac 23

〈210〉 6

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 6

tacctgactg tcagcttgac ccg 23

〈210〉 7

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 7

tgtgacattc taacttctgg 20

〈210〉 8
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 8
cagtttgact catttctacg 20

〈210〉 9
〈211〉 23
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 9
cagatataga acggttacca ctc 23

〈210〉 10
〈211〉 23

〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine receptor gene

〈400〉 10
actactcagt agtctgttcc atg 23

〈210〉 11
〈211〉 5270
〈212〉 DNA
〈213〉 Mus musculus

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (638)..(990)

〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (3128)..(3734)

〈220〉
〈221〉 exon
〈222〉 (324)..(990)

〈220〉
〈221〉 exon

〈222〉 (3128)..(4193)

〈220〉
〈221〉 intron
〈222〉 (991)..(3127)

〈220〉
〈221〉 polyA_signal
〈222〉 (4176)..(4181)

〈400〉 11

ttgtttttg agacactggg ttacttaggc tggccttaac acagtaacca aggcagggct 60

tgaacctgta atcccactgc cttagccttc cctgtagctg aaactgtcag ctgtcactaa 120

cagaccctgt ctctaatctc ctcttggagc tgcctccatg tgactcaggc cagcctcctg 180

tgctctttcc atccttttt ttcttcttct tcttcagagg gttcctgtac ttcctcttgg 240

actatctcac ttcttgaaac actctaaaga ggagtgctta tcttgatgga gctcgaaagt 300

tctctggggc ccaggggaca gcagaagccc tgactctgtt tgcctgggga agtaagaacg 360

gtggccctct cggatttggc tgcagagacc tgcatcctcc aggttaatgg gaaggcaggg 420

ataagcggct gaggttgatg gtcctgtaac aggccctttc tgagaagagt ctctaagaga 480

gagtcatacc ggaaggaatg agcaagttgt gagttctctg gactgttgtg acattctaac 540

ttctgggcag aagtctgaca agagctgggt ccactggccc atacacaacc tgctgaagag 600

ccacggaagc ttccgcctga agcttttctg agacagc atg gaa gcc gac aac acc 655
Met Glu Ala Asp Asn Thr
1 5

acg gag acg gac tgg ctg aac atc acc tac atc acc atg gag gct gcc 703
Thr Glu Thr Asp Trp Leu Asn Ile Thr Tyr Ile Thr Met Glu Ala Ala
10 15 20

atc ggg ctc tgt gcc gtt gtg ggc aac atg ctg gtc atc tgg gtg gtc 751
Ile Gly Leu Cys Ala Val Val Gly Asn Met Leu Val Ile Trp Val Val
25 30 35

aag ctg aac ccc act ctg agg acc acc acg ttc tat ttc att gtc tcc 799
Lys Leu Asn Pro Thr Leu Arg Thr Thr Thr Phe Tyr Phe Ile Val Ser
40 45 50

cta gca ctg gct gac att gcc gtt ggg gtg ctg gtc aca cct ttg gcc 847
Leu Ala Leu Ala Asp Ile Ala Val Gly Val Leu Val Thr Pro Leu Ala
55 60 65 70

att gct gtc agc ctg caa gtc aag atg cac ttc tat gcc tgc ctt ttc 895
Ile Ala Val Ser Leu Gln Val Lys Met His Phe Tyr Ala Cys Leu Phe
75 80 85

atg tcc tgt gtg ctg ctg atc ttc acc cat gct tcc atc atg tcc ttg 943
Met Ser Cys Val Leu Leu Ile Phe Thr His Ala Ser Ile Met Ser Leu
90 95 100

ctg gcc att gct gta gac cga tac ctg cgg gtc aag ctg aca gtc ag 990
Leu Ala Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Arg Val Lys Leu Thr Val Arg
105 110 115

gtaacagggt tgacgaaggg gtggattaga gagaaggctg gagagtagag ctaccaagtt 1050

tggctcccag acccctttcg tagaaatgag tcaaactgac ccttgaaatt tacaaagggc 1110

agtgaatatc tttgcaccac atggtttgtg aagacattag acatgaagag ctgagacagg 1170

aataggaaac gagggtgctc tgtgcccttc tccattgaac atgggcatct gctttctggc 1230

cagggtagcc aaagatgatg aaaatgtgat gtatctttta gttaaaaaaa gaatctgatc 1290

tcaagttttc aaagtgacat tgacctacta gataggatat cttgttttag gagaagggga 1350

agacaggcat aagagataag tagatggggg tgtggctttg aagatgtagg gtagatctta 1410

acatggcttc tgtcttagtc tgttgaaaac ggattcttag gatgcagttt gttctcttaa 1470

tgaaatgtaa aacccccttg agacaaggat gttcttgttt gcaaaatggt agtatcattt 1530

tctgtgcaaa gaggacagtc caatgagaaa ctacattccc aggtttcttc tggtttctct 1590

tgggggaaga atatagcata gaaactacag acaagctctg gaggaaaaca agtctggatt 1650

cctctccctg atcttttgat ctgacactgg gcacattctt tctcggcttc actctccacc 1710

tctcagagtg gttctgaaca tctgaaccag gctcacctcc gttcaattgt agcactatca 1770

cttctggctt ctgtgcagta cctgatgctg ttttacctga tccataaaat gaagataata 1830

atttcacctt tataaggtta aataaataaa gctaataaat gtaaagttct cagaaaagcc 1890

ctgcctagag cctgtgttta gtaaatggta gctatgccac tgccatcagt aaaatggaga 1950

ttgtcatgaa atatctctaa ggctggagag atggctcaga ggttaagagc actgactgct 2010

cttccgaagg tcctgaattc aaatcccagc aaccatatgg tggctcacaa ctatcagtaa 2070

tgagatctga tgccctcttc tggggtgtct gaagacagct acagtgtact tacattaaaa 2130

aaaaaaaaaa aagacaggaa gaaagaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aaggaacaaa 2190

caaaggaaga aagaaaaagg aagaaagaaa aaggaaaaga aaaaggaaag agaaaaaaat 2250

atctctagtt agctatgagg tttagttgag ataagcctta gttttgttct tttgtagtct 2310

gttttaggct atttaggaag gtttgtttaa gcagaaatga tgatgggttc tgaaacactt 2370

caattaaact taacaaaact ctgattggtt aactcaaaca ccagaataga tgcccaggta 2430

gaaaggggac agggacagat agaagtgcag ggctatcttt cagcttgtga gctcctgtac 2490

aatagccaac agagacaatg cagagcacag cacaccagca ggcttcgagg agattctcat 2550

cagcctagga ctcccaagac tcagggtaac tcttacacca cagcacaggg aagggctgga 2610

gaggtggctc agtaaataaa agtatctgtt atttttgcag aggactcagg ttccattccc 2670

agcacccaga accgtcctgt ccataactcc agttccagga catcccgtgt tttcttctga 2730

ccttcctggg caccaggcac acacatagta tacaaacata catgcaaaca acacattcat 2790

atgcataaaa taaaatacat aagtctaaaa aaaataatta ttggagctaa ggttgagtgg 2850

aggcctatag gaacctgatt cctggaaact tatgactgat aattctcagt tgttgtgttc 2910

ttaagcagat actccagagg agtttctgga ttttcctctg ataatgctag tcttattttg 2970

tcttcatatc tagagggatt tagtcagagt gacattaggc catggctatt tcacctcagc 3030

agattagggg attgggagag ctgactttgt ctttcttgtt ttctcccagg gagtcatttc 3090

ttgttgtgaa ctcaccattt ttcccccatt caaacag a tat aga acg gtt acc 3143
Tyr Arg Thr Val Thr
120

act caa aga aga ata tgg cta ttc ttg ggc ctt tgc tgg cta gtt tcc 3191
Thr Gln Arg Arg Ile Trp Leu Phe Leu Gly Leu Cys Trp Leu Val Ser
125 130 135

ttt ctg gtg ggg ctg acc ccc atg ttt ggc tgg aat aga aaa gca acc 3239
Phe Leu Val Gly Leu Thr Pro Met Phe Gly Trp Asn Arg Lys Ala Thr
140 145 150 155

```
tta gcg agc tct caa aat agc agc act ctt ttg tgc cac ttc cgt tcc     3287
Leu Ala Ser Ser Gln Asn Ser Ser Thr Leu Leu Cys His Phe Arg Ser
                160                 165                 170

gtg gtc agt ttg gat tac atg gtc ttc ttc agc ttc gtc acc tgg atc     3335
Val Val Ser Leu Asp Tyr Met Val Phe Phe Ser Phe Val Thr Trp Ile
            175                 180                 185

ctc gtc ccc ctg gtt gtc atg tgt gtc atc tac cta gac atc ttc tac     3383
Leu Val Pro Leu Val Val Met Cys Val Ile Tyr Leu Asp Ile Phe Tyr
        190                 195                 200

atc atc cga aat aag ctc agt caa aac ctg tct ggc ttc aga gag acg     3431
Ile Ile Arg Asn Lys Leu Ser Gln Asn Leu Ser Gly Phe Arg Glu Thr
    205                 210                 215

cgt gca ttt tat gga cgg gag ttc aag aca gct aag tcc ctg ttt ctg     3479
Arg Ala Phe Tyr Gly Arg Glu Phe Lys Thr Ala Lys Ser Leu Phe Leu
220                 225                 230                 235

gtt ctc ttc ttg ttt gcg ctg tgc tgg ctg cct ttg tcc atc atc aat     3527
Val Leu Phe Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu Ser Ile Ile Asn
                240                 245                 250

ttt gtt tcc tat ttt gat gta aag ata cca gat gtc gca atg tgc ctg     3575
Phe Val Ser Tyr Phe Asp Val Lys Ile Pro Asp Val Ala Met Cys Leu
            255                 260                 265

ggg atc ctg ttg tcc cac gcg aac tcc atg atg aac cct att gtc tac     3623
```

```
Gly Ile Leu Leu Ser His Ala Asn Ser Met Met Asn Pro Ile Val Tyr
        270                 275                 280

gcc tgc aaa ata aaa aag ttc aaa gag acc tac ttt ctg atc ctc aga     3671
Ala Cys Lys Ile Lys Lys Phe Lys Glu Thr Tyr Phe Leu Ile Leu Arg
    285                 290                 295

gct ctc agg ctc tgt cag acc tca gat tct ttg gac tca aac atg gaa     3719
Ala Leu Arg Leu Cys Gln Thr Ser Asp Ser Leu Asp Ser Asn Met Glu
300                 305                 310                 315

cag act act gag taa ttaccttgac agatacagag ccagctcgtc tgccttcgca     3774
Gln Thr Thr Glu

tgtggtatca gtaaacacta taaggactta tcagacattc ttgcttcctt cactgcattg   3834

ggatcatcgg gctggttgcc acagagttcc actccttccc cccaacgccc ccccccactc   3894

ctccctcctt ctgcttcagt tattttcttg agcttctcta attcaattct gtggaagcct   3954

gacgtgaagg caatgcatcc ctgattacca cggactctgc ccttccttcc cagacaaaga   4014

agtaatggaa tgtggaggga gtctcgtctt atcaaaggaa aactctagtg gggctggacg   4074

tacagaacct gctccgaagg atccctggaa tgtggggaac agaaggagcg aattgaattt   4134

aaaaagaggg ctaaatccac ctgtgtgggt gcatttgagc aaataaaaga tgatgcccaa   4194
```

ctgatgtgta gctctttgct aggattgctt gggggttgca ggcacagttg actgctcttg 4254

gcattccttc tgcttgcttc tgggacacaa tcacttctgt tccaaggggc agcttcacca 4314

ttgcagatgg ctgtcctctg ggggtcgggg gcaggatgtc tgttatgcaa ggttctgatg 4374

ttcttgaaat cctaggcaac ttcagcttca ggacaactgg agatttgttt gttgttgttt 4434

gtttggagac agggtttctc tgtgtagccc tggctgtcct ggaacttgct gtgtagacca 4494

ggctgacctc aaattcagag atctgcctgc ctctgcctcc taagtactgg gattaagggt 4554

aggcagcacc accatctggc tacagctgga gatctttagg agtgctttgt aagtctggaa 4614

caggacattt gagaacactg acactaagac acacacattt gtggcttcag ccaggatgga 4674

ggaatgaaat aagttaggta tcacaagatt ttatacagat actctgtatt tgttacttttt 4734

cagttgctat taaaaaaata tttcatgacc aagacaactt gtagaagaac gaatttattt 4794

gggtttctct ttccagaggg ataagaggcc atgatggtag ggagtgggca tggcgtcaag 4854

aggcaggcat ggcagccgga cccagaagct gagtgatcac atcaccacca gaagcaggaa 4914

gcagagagtg aacagaaagc agcgacaagg ctttaacctc tccaagtcta acctcactca 4974

gtgctgcata tccttccaca catccttctg caaggctaca tctgcccgca atgcccaaaa 5034

cagtgccacc aactgaggga ccagcctgag ggtggtggca tttctaatcc aaaccaccac 5094

atagtccttg agtagctcac atgcccatat gcaggtaaat agattgccca aaggatacag 5154

atggaaaatg aagacaggga tgccaggctt ttgctggctc ctagttactc tgtgaaccca 5214

gatgaggagt cagtgctatt taataaaagc gatctttgag tgcctgataa attctg 5270

〈210〉 12
〈211〉 38
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 an oligo DNA for construction of ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2

〈400〉 12
ctagctagct accggaattc ctccccgcgg ggaggtac 38

〈210〉 13
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 an oligo DNA for construction of ploxP-RE-HPRT-hA3R-arm2

〈400〉 13

ctccccgcgg ggaggaattc cggtagctag ctag 34

〈210〉 14
〈211〉 17
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 an oligo DNA for construction of A3R-C2

〈400〉 14
tttccgcggt ttggtac 17

〈210〉 15
〈211〉 13
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 an oligo DNA for construction of A3R-C2

〈400〉 15
caaaccgcgg aaa 13

〈210〉 16
〈211〉 27

〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for construction of A3R-C3

〈400〉 16
cggaattctg agtagttacc ttgacag 27

〈210〉 17
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for construction of A3R-C3

〈400〉 17
cgggatcctt cggagcaggt tctg 24

〈210〉 18
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse genomic DNA

〈400〉 18
cgggatccat ggagctcgaa agttctc 27

〈210〉 19
〈211〉 28
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse genomic DNA

〈400〉 19
cggaattcgg catgctgtct cagaaaag 28

〈210〉 20
〈211〉 28
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of human A3 adenosine receptor cDNA fragment

〈400〉 20
cgggatccag catgcccaac aacagcac 28

〈210〉 21
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of human A3 adenosine receptor cDNA fragment

〈400〉 21
cggaattcca tgaccagcac cccaac 26

〈210〉 22
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of a DNA fragment comprising SV40 polyadenylation signal

〈400〉 22
gctctagata actcgactag agtcgg 26

〈210〉 23
〈211〉 35

〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of a DNA fragment comprising SV40 poly adenylation signal

〈400〉 23
tccccgcgga tatcttatcg attttaccac atttg 35

〈210〉 24
〈211〉 55
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of DNA encoding FLAG tag added human A 3 adenosine receptor

〈400〉 24
cggaattcat ggactacaaa gacgatgacg acaagatgcc caacaacagc actgc 55

〈210〉 25
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of DNA encoding FLAG tag added human A 3 adenosine receptor

〈400〉 25

gctctagact actcagaatt tttctcaatg 30

〈210〉 26

〈211〉 1079

〈212〉 DNA

〈213〉 Mus musculus

〈400〉 26

gagctcctgg ctgcccagga caacctacgc caccaagcta atgaacagag caggagaggt 60

attagaagag caaaagagca acatccttcc tagaacctcc tcggggaaat aggtctctta 120

aaccttcagt ataagcaata acaatgtagt atctttaacc gtgatgaaat gctgagacag 180

actctgtata acaatagctt taatgaaaag ccgagggaaa taaagttatt gggggaaccc 240

ttcagcggga agtaaagtaa tgtggtttcc tgatgctgtc tgcccatgga ctagatgcag 300

gggtgtgggg tggagaaggt tgagggagga ttggcaggct gccctccatt actccacagc 360

ctaagaggag gaaccagaaa ccagaaaact ggcaaaaaag aaagaaaaaa aaaatcctgt 420

tctcagtagt tctcagtagc tggcccaacc catggatcat gcacaccctt ccacactgaa 480

gagcttctgc ccagtcacag tttatgtttg gtataattgg tgttggccta ttcttgtgtg 540

attcactgga aagggctaag atagttgact cagattctgg ctttacccat cgtagttgac 600

tgtaactgtc ctccctccct ccctccctcc ctccctccct cccttcttta agttaccttt 660

gttcaagatt ttgtcaaaga aatctgagaa gtaactaatg caggttcaga tcccagctcc 720

gccacttgct ccctgaaagc cacctcgcac caggctgtgg tctcctcacc agtgaaatga 780

gttagcagca cttacgatta agtttggcac acgattataa gtgacaggta taaaacgcca 840

agcaaggagc ctgggctgtg tcacttagca ccctgtcaat ggcagggttc acacactcgt 900

gatagaagga ccttgtagag taagagaaga cgtgtcatcg aaggggtaga ggttgctggt 960

ttcttgctct ctccaggaga atgtgctcaa ttcatctaag ggtagggtgg gttgagaaga 1020

agcaggccaa ggcacagccc cactatacac atctaggact ggcggtgctc tatcccggg 1079

〈210〉 27
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine gene 5' probe

〈400〉 27

atagagcacc gccagtccta gatgtg 26

〈210〉 28

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine gene 5' probe

〈400〉 28

tagcagcact tacgattaag tttggc 26

〈210〉 29

〈211〉 516

〈212〉 DNA

〈213〉 Mus musculus

〈400〉 29

gctagcttgt ggtttggttt cccactgcac tgtgggggat aaagaggctg tgcaaaataa 60

acttgggggc tgctttggta ttcactaaca gccctcccaa atccatctct tgtctctgca 120

tctttttttct acctttcctа tagtcatcct cacttccccc tcagagatgg ttgaaactca 180

tgccagcggg ctccgacact caggcgtgag tgataaggtg atattggcaa gtgtttcctc 240

ttcacatgag gctcagcatt gcctgcttga gtcctcataa aatgatgacc aacttctgcg 300

aggtagcagc acaaaagact ggggtgggag tttgtactac ctttgaaaga cacacatcac 360

actgccaaat tttgcttatc atgcagactg tcttagttag ggttttcatt gctgtaagga 420

gacaccatga ccaaggcaac tcttataaag gataaccctt tcctcacccc agttcctttt 480

ggtcagtgtt ttgaccagag caacagagag gctagc 516

〈210〉 30
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉
〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine gene 3' probe

〈400〉 30
cctttcctat agtcatcctc acttcc 26

〈210〉 31
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial

〈220〉

〈223〉 a primer for amplification of mouse A3 adenosine gene 3' probe

〈400〉 31

atttggcagt gtgatgtgtg tctttc 26

【図面の簡単な説明】

【図１】図１は、ヒトＡ３アデノシン受容体ｃＤＮＡを含むプラスミドｐＢＳ－ｈＡ３Ｒの構築を示す。

【図２】図２は、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン１を含む約９ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡ配列に存在する、各制限酵素に対する認識配列を示す。

【図３】図３は、Ａ３アデノシン受容体遺伝子のエクソン２を含む約６．５ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡ配列に存在する、各制限酵素に対する認識配列を示す。

【図４】図４は、本発明で決定したＡ３アデノシン受容体遺伝子を含む約５．２ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡ配列、および公知であるＡ３アデノシン受容体遺伝子を含む約６ｋｂｐのマウスゲノムＤＮＡ配列の領域を示す。

【図５】図５は、マウスＡ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡで置換するためのターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１工程、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築を示す。

【図６】図６は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第２工程、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築を示す。

【図７】図７は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第３工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ１の構築を示す。

【図８】図８は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第４工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ２の構築を示す。

【図９】図９は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第５工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ３の構築を示す。

【図１０】図１０は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第６工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｃ４の構築を示す。

【図１１】図１１は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第７工程、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＲＥ－Ｃ－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築を示す。

【図１２】図１２は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第８工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ１の構築を示す。

【図１３】図１３は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第９工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ２の構築を示す。

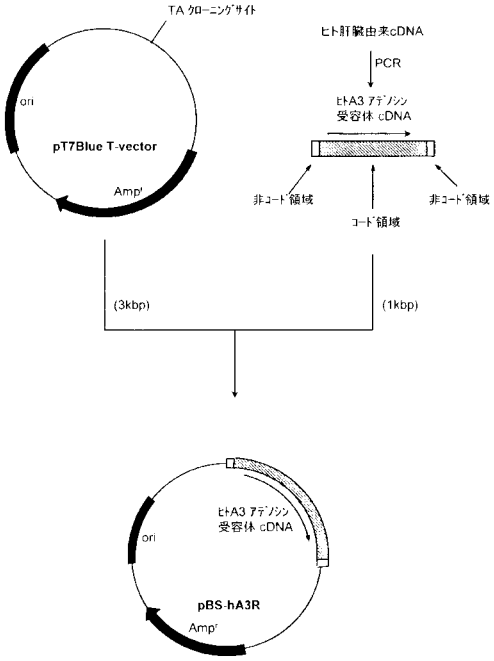
【図１４】図１４は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１０工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ３の構築を示す。

【図１５】図１５は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１１工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ４の構築を示

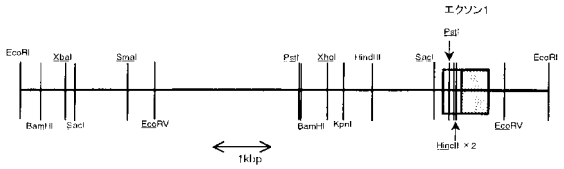
す。
【図１６】図１６は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１２工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ５の構築を示す。
【図１７】図１７は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１３工程、プラスミドＡ３Ｒ－Ｎ６の構築を示す。
【図１８】図１８は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１４工程、プラスミドｐｌｏｘＰ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築を示す。
【図１９】図１９は、ターゲットベクターｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築（全１５工程）の第１５工程、プラスミドｐｌｏｘＰ－ＤＴ－ａｒｍ１－ＨＰＲＴ－ｈＡ３Ｒ－ａｒｍ２の構築を示す。
【図２０】図２０は、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築（全４工程）の第１工程、プラスミドｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳの構築を示す。
【図２１】図２１は、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築（全４工程）の第２工程、プラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＢＳの構築を示す。
【図２２】図２２は、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築（全４工程）の第３工程、プラスミドｈＡ３Ｒ－ｐｏｌｙＡ　ｉｎ　ｐＢＳの構築を示す。
【図２３】図２３は、ヒトＡ３アデノシン受容体の発現ベクターｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築（全４工程）の第３工程、プラスミドｈＡ３Ｒ　ｉｎ　ｐＣＡＧの構築を示す。
【図２４】図２４は、ヒトＡ３アデノシン受容体を一過的に発現させたマウスミエローマ細胞Ｐ３Ｕ１の、Ａ３アデノシン受容体に特異的なアゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する反応性（細胞内Ca^{2+}の上昇量）を測定した結果を示す。横軸は時間（秒）で、矢印の時点でＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを細胞に添加した。縦軸はエクオリンの発光量で、細胞内Ca^{2+}の上昇量を表す。●はヒトＡ３アデノシン受容体を発現させたＰ３Ｕ１細胞、△はコントロールのＰ３Ｕ１細胞、□はＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加しなかったコントロールのＰ３Ｕ１細胞の測定結果である。
【図２５】図２５は、ヒトＡ３アデノシン受容体を安定発現させたマウスミエローマ細胞株（計４株）のＡ３アデノシン受容体に特異的なアゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡに対する反応性（細胞内Ca^{2+}の上昇量）を測定した結果を示す。横軸は時間（秒）で、矢印の時点でＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを細胞に添加した。縦軸はエクオリンの発光量で、細胞内Ca^{2+}の上昇量を表す。●、▲、黒い四角および◆はヒトＡ３アデノシン受容体を安定発現させたＰ３Ｕ１細胞、□はコントロールのＰ３Ｕ１細胞の測定結果である。
【図２６】図２６は、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ５’が含むマウスゲノムＤＮＡのＳａｃＩ－ＳｍａＩ断片の位置を模式的に示す。
【図２７】図２７は、プラスミドｐＢＳ－ｐｒｏｂｅ３’が含むマウスゲノムＤＮＡのＮｈｅＩ断片の位置を模式的に示す。
【図２８】図２８は、Ａ３アデノシン受容体遺伝子周辺のマウスゲノム構造および、相同組換えによりマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換された時の同マウスゲノム構造を示す。
【図２９】図２９は、相同組換えによりマウスＡ３アデノシン受容体遺伝子がヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換された時のマウスゲノム構造および、Ｃｒｅタンパク質によりｌｏｘＰ配列とｌｏｘＰ配列の間に存在する薬剤耐性マーカー（ＰＧＫプロモーター及びｈｐｒｔ遺伝子）が除去された時の同マウスゲノム構造を示す。
【図３０】図３０は、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したヘテロ接合体マウスおよびホモ接合体マウスのゲノムＤＮＡに対する５’側プローブを使用したサザンハイブリダイゼーションの解析結果を示す。レーン１はＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス、レーン２はヘテロ接合体マウス、

レーン３はホモ接合体マウスの結果を示す。
【図３１】図３１は、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したヘテロ接合体マウスおよびホモ接合体マウスのゲノムＤＮＡに対する３’側プローブを使用したサザンハイブリダイゼーションの解析結果を示す。レーン１はＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス、レーン２はヘテロ接合体マウス、レーン３はホモ接合体マウスの結果を示す。
【図３２】図３２は、ＴＮＰ特異的ＩｇＥおよび抗ｃ－ｋｉｔ抗体を用いたＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来ＢＭＭＣのＦＡＣＳによる解析を示す。ａ）は未染色のＢＭＭＣ、ｂ）は抗体によって染色したＢＭＭＣのＦＡＣＳ解析結果を示す。縦軸はＰＥ標識した抗ｃ－ｋｉｔ抗体により染色された細胞の蛍光強度、横軸はＦＩＴＣ標識したＴＮＰ特異的ＩｇＥにより染色された細胞の蛍光強度を示す。
【図３３】図３３は、ＴＮＰ特異的ＩｇＥおよび抗ｃ－ｋｉｔ抗体に対するＡ３アデノシン受容体をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウス由来ＢＭＭＣのＦＡＣＳによる解析を示す。ａ）は未染色のＢＭＭＣ、ｂ）は抗体によって染色したＢＭＭＣのＦＡＣＳ解析結果を示す。縦軸はＰＥ標識した抗ｃ－ｋｉｔ抗体により染色された細胞の蛍光強度、横軸はＦＩＴＣ標識したＴＮＰ特異的ＩｇＥにより染色された細胞の蛍光強度を示す。
【図３４】図３４は、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス由来ＢＭＭＣの細胞内Ca^{2+}量の変動を示す。ａ）はカルシウム測定緩衝液のみを添加した結果、ｂ）は最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＡ３アデノシン受容体アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加した結果、ｃ）は最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＡ３アデノシン受容体アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを加える１０分前にヒトＡ３アデノシン受容体アンタゴニストＫＦ２６７７７を添加した結果、ｄ）は最終濃度１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＰ－ＢＳＡを添加した結果を示す。縦軸はCa^{2+}により励起されるＦｌｕｏ－３の波長５３０ｎｍの蛍光量を、薬物添加前の値を１．０とした相対値で示す。横軸は薬物添加後の時間を秒で示す。
【図３５】図３５は、Ａ３アデノシン受容体遺伝子をヒトＡ３アデノシン受容体をコードするＤＮＡに置換したマウス由来ＢＭＭＣの細胞内Ca^{2+}量の変動を示す。ａ）はカルシウム測定緩衝液のみを添加した結果、ｂ）は最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＡ３アデノシン受容体アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを添加した結果、ｃ）は最終濃度１μｍｏｌ／ＬのＡ３アデノシン受容体アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡを加える１０分前にヒトＡ３アデノシン受容体アンタゴニストＫＦ２６７７７を添加した結果、ｄ）は最終濃度１０ｎｇ／ｍＬのＴＮＰ－ＢＳＡを添加した結果を示す。縦軸はCa^{2+}により励起されるＦｌｕｏ－３の波長５３０ｎｍの蛍光量を、薬物添加前の値を１．０とした相対値で示す。横軸は薬物添加後の時間を秒で示す。

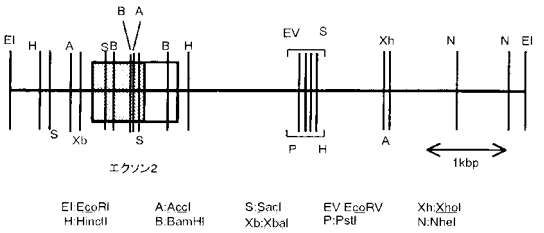
【図１】



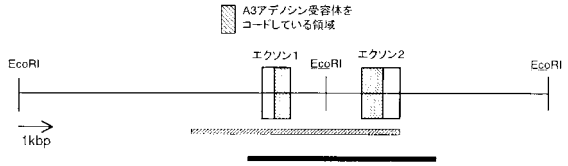
【図２】



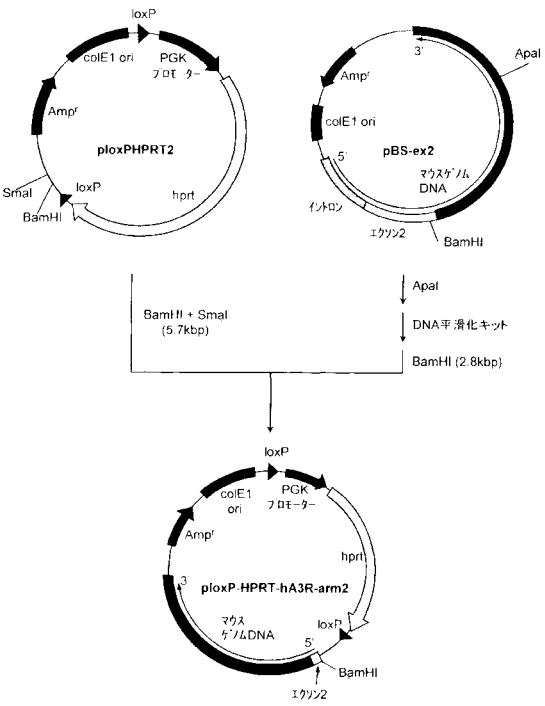
【図３】



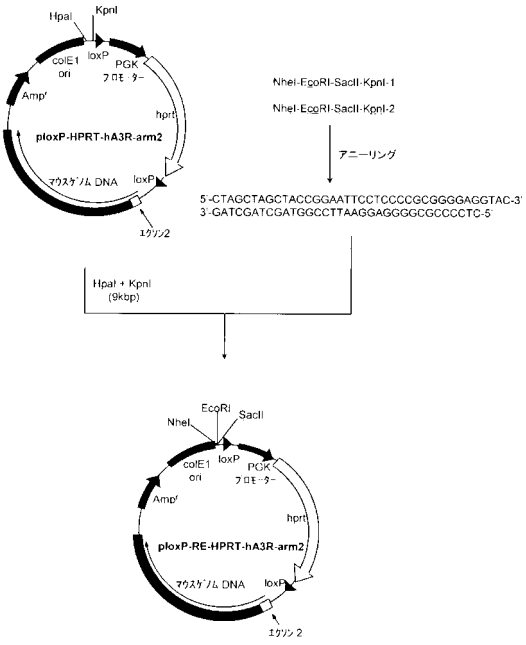
【図４】



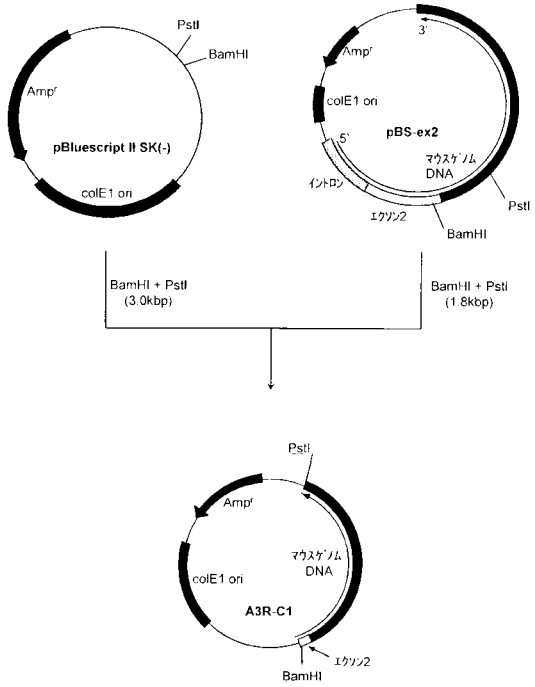
【図５】



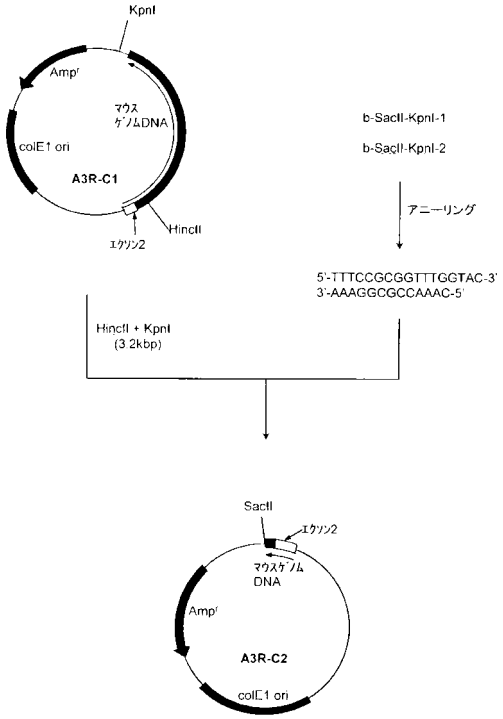
【図６】



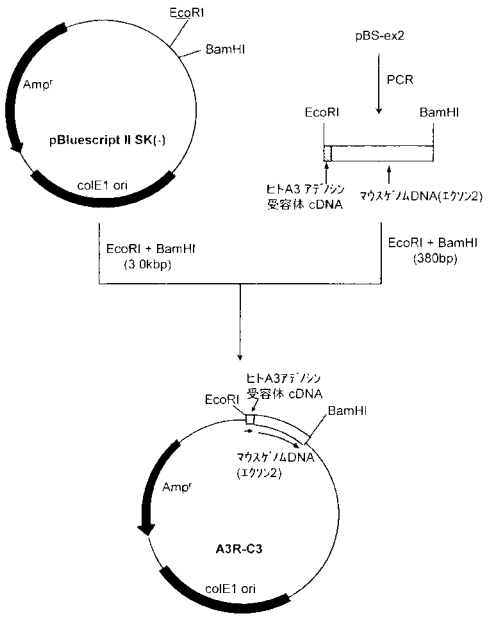
【図７】


PstI
BamHI
Ampr
pBluescript II SK(-)
colE1 ori
Ampr
3'
colE1 ori
pBS-ex2
5'
イントロン
マウスゲノムDNA
エクソン2
PstI
BamHI
BamHI + PstI
(3.0kbp)
BamHI + PstI
(1.8kbp)
PstI
Ampr
マウスゲノムDNA
colE1 ori
A3R-C1
エクソン2
BamHI

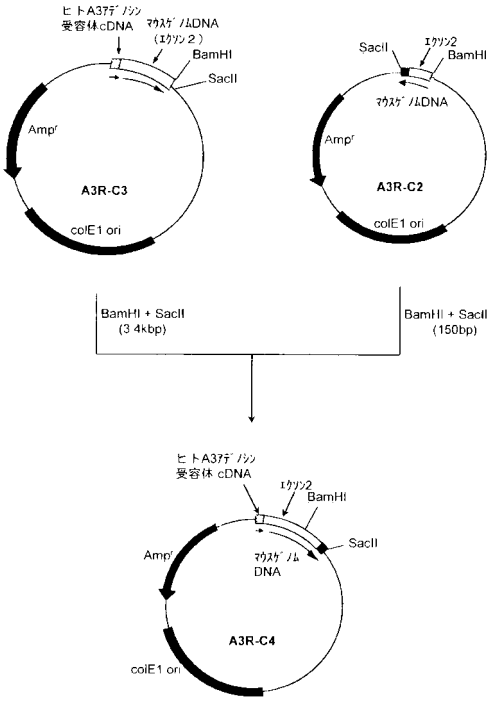
【図８】


KpnI
Ampr
マウスゲノムDNA
colE1 ori
A3R-C1
エクソン2
HincII
b-SacII-KpnI-1
b-SacII-KpnI-2
アニーリング
5'-TTTCCGCGGTTTGGTAC-3'
3'-AAAGGCGCCAAAC-5'
HincII + KpnI
(3.2kbp)
SacII
エクソン2
マウスゲノムDNA
Ampr
A3R-C2
colE1 ori

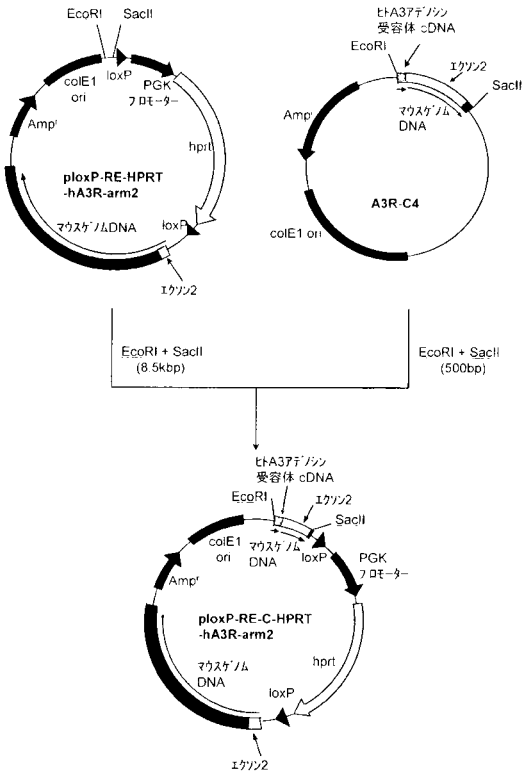
【図９】


EcoRI
BamHI
Ampr
pBluescript II SK(-)
colE1 ori
pBS-ex2
PCR
EcoRI
BamHI
ヒトA3アデノシン
受容体 cDNA
マウスゲノムDNA(エクソン2)
EcoRI + BamHI
(3.0kbp)
EcoRI + BamHI
(380bp)
ヒトA3アデノシン
受容体 cDNA
EcoRI
BamHI
マウスゲノムDNA
(エクソン2)
Ampr
A3R-C3
colE1 ori

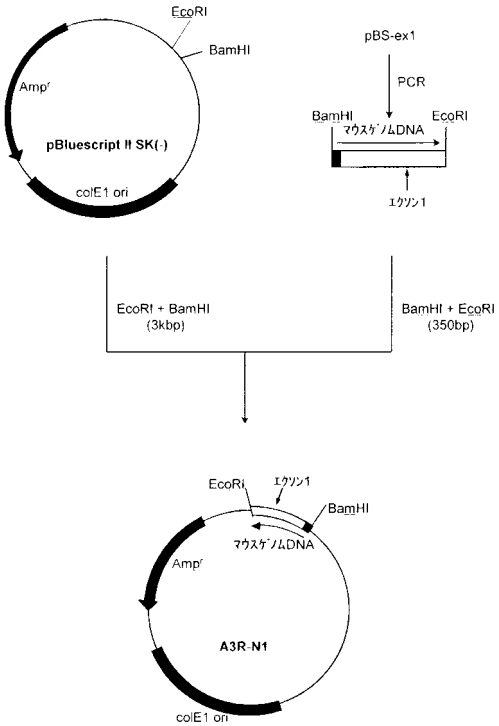
【図１０】


ヒトA3アデノシン
受容体cDNA
マウスゲノムDNA
(エクソン2)
BamHI
SacII
Ampr
A3R-C3
colE1 ori
SacII
エクソン2
BamHI
マウスゲノムDNA
Ampr
A3R-C2
colE1 ori
BamHI + SacII
(3.4kbp)
BamHI + SacII
(150bp)
ヒトA3アデノシン
受容体 cDNA
エクソン2
BamHI
SacII
Ampr
マウスゲノム
DNA
A3R-C4
colE1 ori

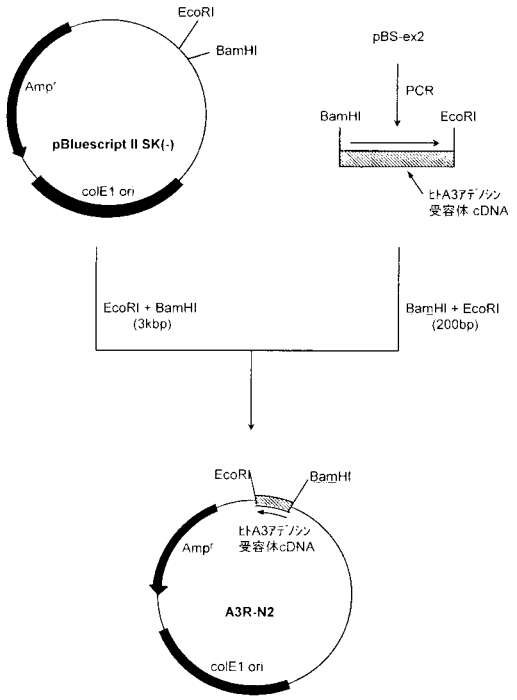
【図１１】



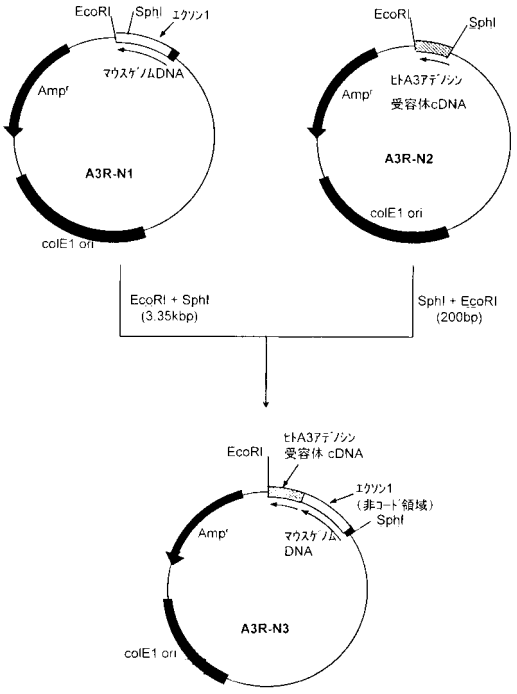
【図１２】



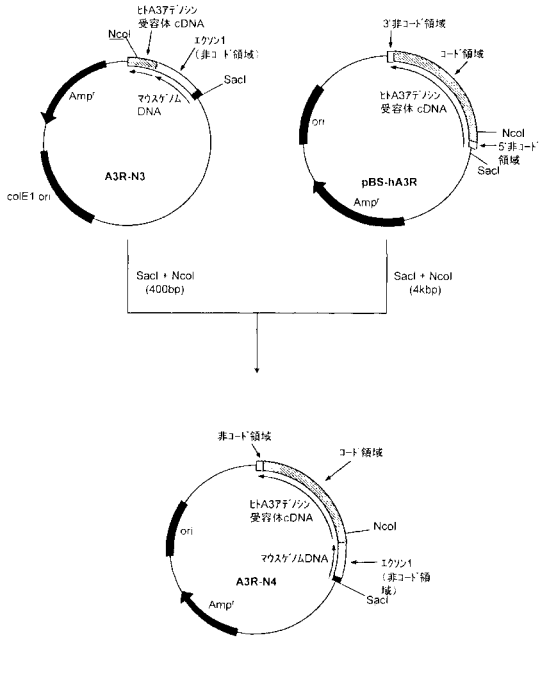
【図１３】



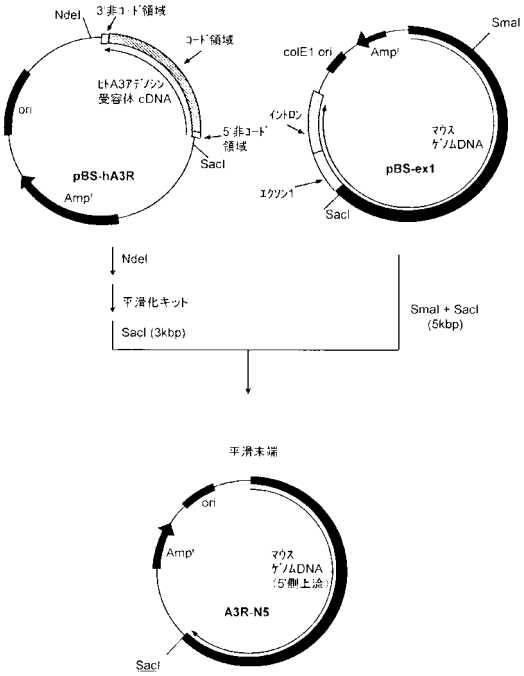
【図１４】



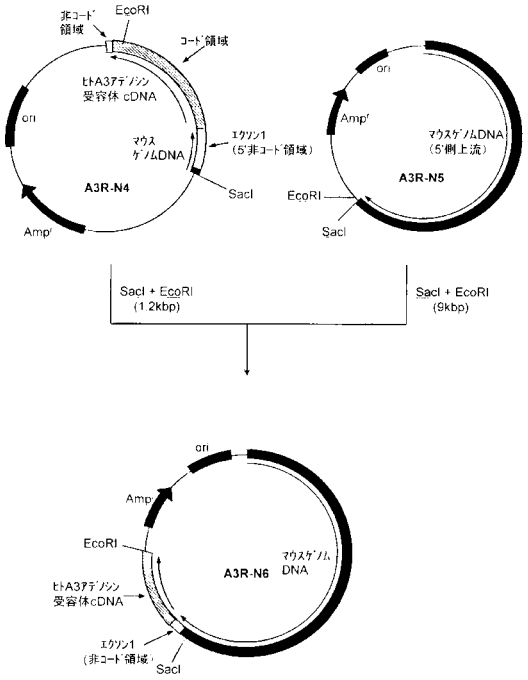
【図１５】



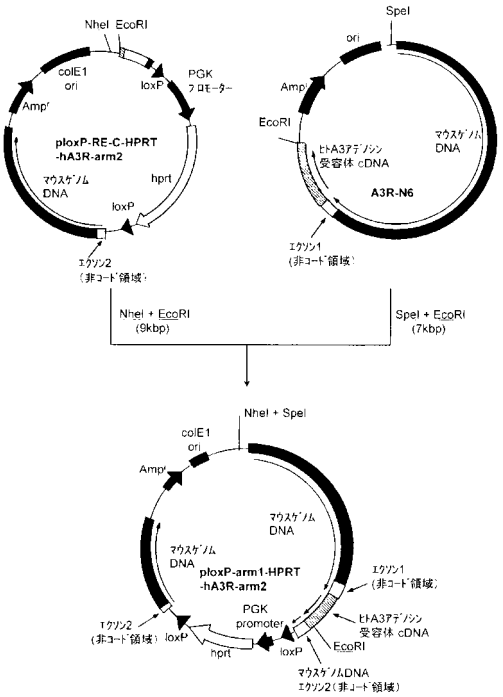
【図１６】



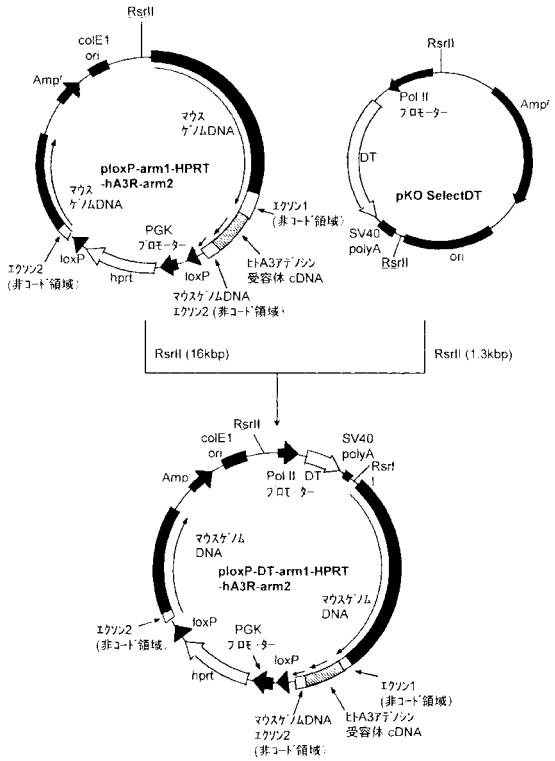
【図１７】



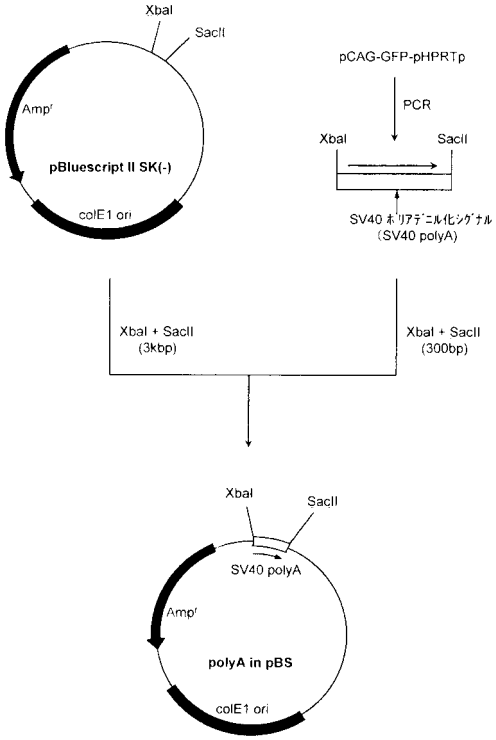
【図１８】



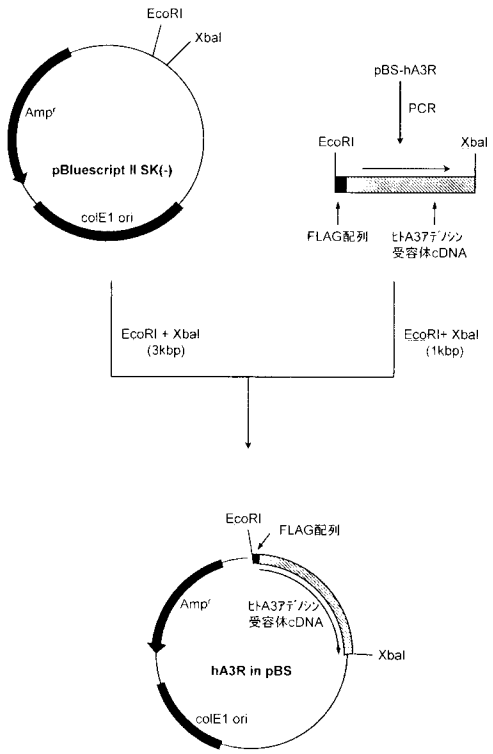
【図１９】



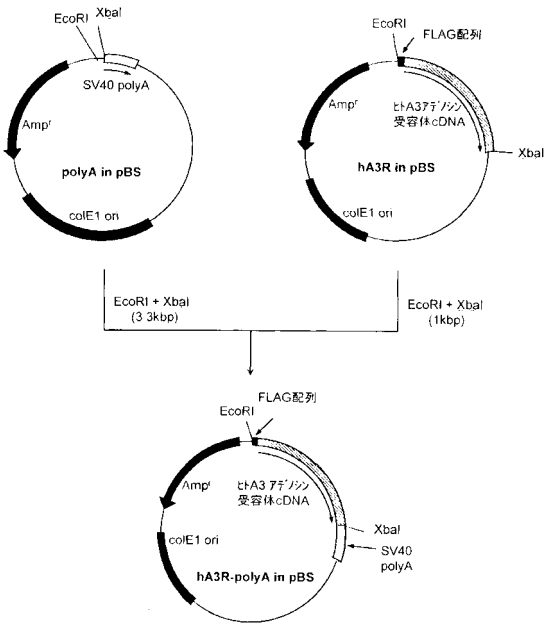
【図２０】



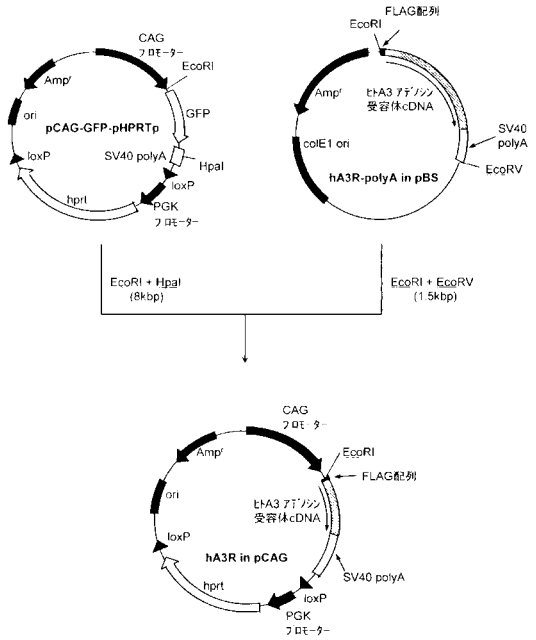
【図２１】



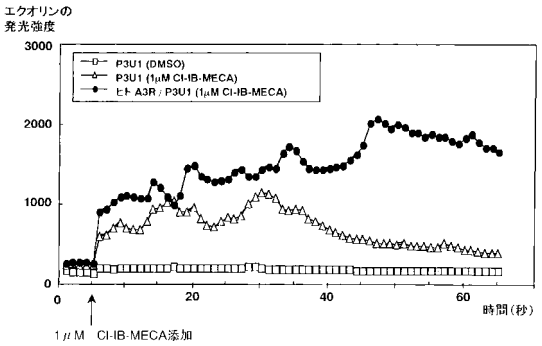
【図２２】



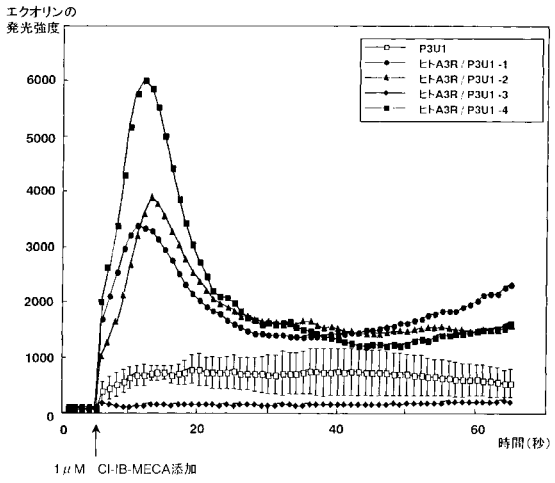
【図２３】



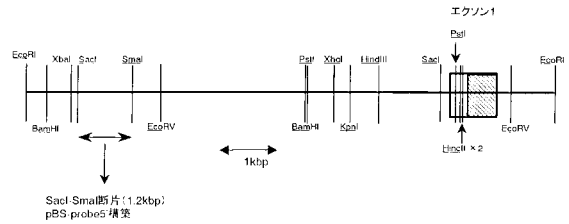
【図２４】



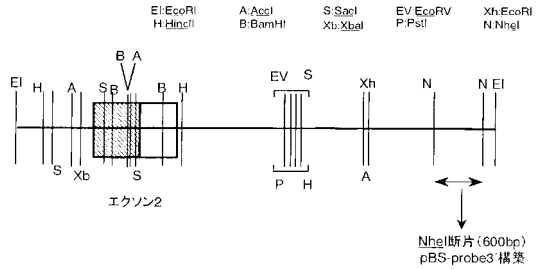
【図２５】



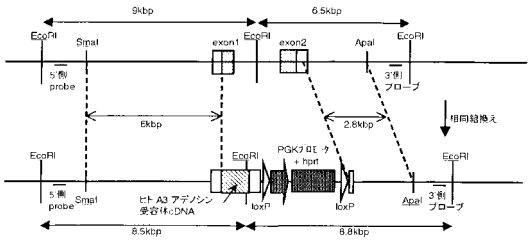
【図２６】



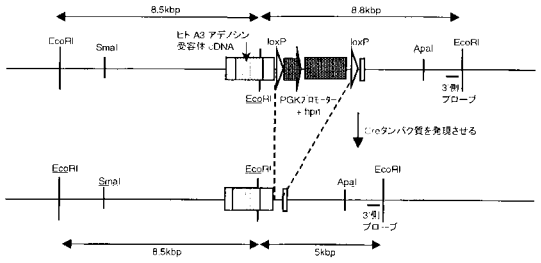
【図２７】



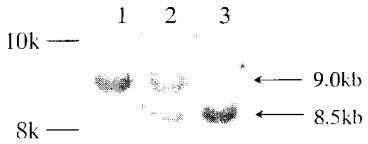
【図２８】



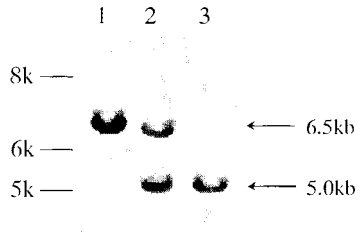
【図２９】



【図３０】

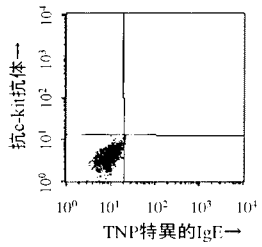


【図３１】



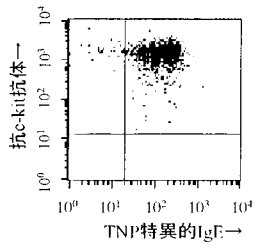
【図３２】

a)



C57BL/6Jマウス由来BMMC（未染色）

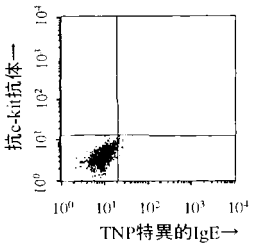
b)



C57BL/6Jマウス由来BMMC
（抗c-kit抗体およびIgE抗体により染色）

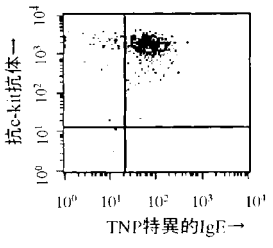
【図３３】

a)



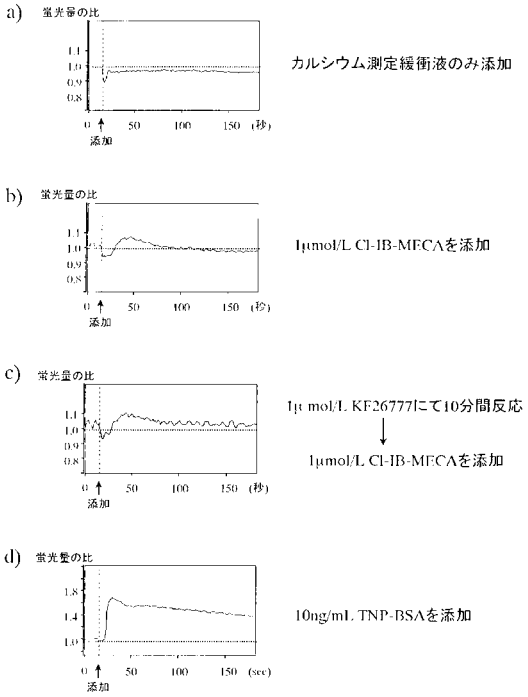
A3アデノシン受容体遺伝子をヒトA3アデノシン受容体をコードするDNAに置換したホモ接合体マウス由来BMMC（未染色）

b)

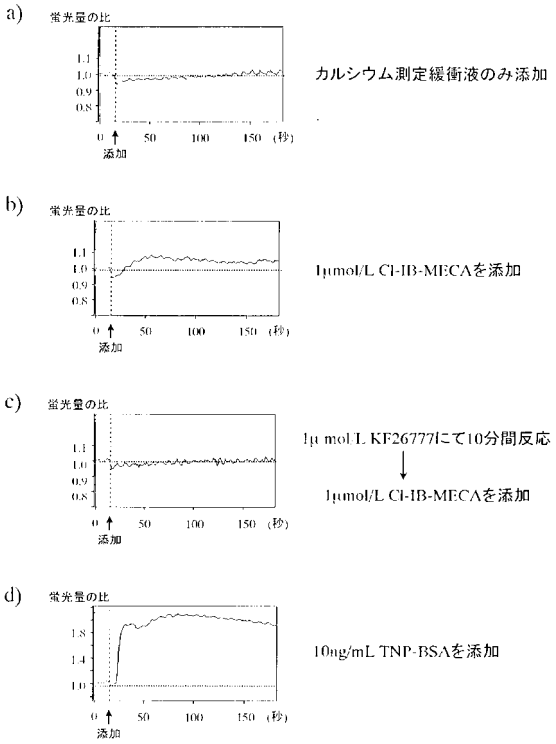


A3アデノシン受容体遺伝子をヒトA3アデノシン受容体をコードするDNAに置換したホモ接合体マウス由来BMMC（抗c-kit抗体およびTNP特異的IgEにより染色）

【図３４】


a)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
カルシウム測定緩衝液のみ添加
b)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
1μmol/L Cl-IB-MECAを添加
c)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
1μ mol/L KF26777にて10分間反応
1μmol/L Cl-IB-MECAを添加
d)
蛍光量の比
1.8
1.4
1.0
0
50
100
150
(sec)
添加
10ng/mL TNP-BSAを添加

【図３５】


a)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
カルシウム測定緩衝液のみ添加
b)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
1μmol/L Cl-IB-MECAを添加
c)
蛍光量の比
1.1
1.0
0.9
0.8
0
50
100
150
(秒)
添加
1μ mol/L KF26777にて10分間反応
1μmol/L Cl-IB-MECAを添加
d)
蛍光量の比
1.8
1.4
1.0
0
50
100
150
(秒)
添加
10ng/mL TNP-BSAを添加

フロントページの続き

(72)発明者　政木　茂浩
静岡県駿東郡長泉町下土狩１１８８　協和醗酵工業株式会社医薬総合研究所内

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 BA63 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ20 QQ89 QR77 QR80 QS01
QS24 QS36 QS38 QX02
4B065 AA92X AA93Y AA97X AB01 AC14 BA02 BD50 CA24 CA46