

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/014131 A1

- (51) 国際特許分類: **A01K 67/027**, C12N 15/53 (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒173-0004 東京都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010118
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 8 日 (08.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (30) 優先権データ:
特願 2002-232625 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 白澤 卓二 (SHIRASAWA, Takuji) [JP/JP]; 〒177-0043 東京都練馬区上石神井南町 6-1 Tokyo (JP). 古関 明彦 (KOSEKI, Haruhiko) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学宿舎 303 号 Chiba (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: KNOCKIN NONHUMAN ANIMAL AND TISSUE-SPECIFIC MnSOD-KNOCKOUT NONHUMAN ANIMAL

(54) 発明の名称: ノックイン非ヒト動物及び組織特異的 MnSOD ノックアウト非ヒト動物

(57) Abstract: It is intended to disclose a knockin nonhuman animal having a DNA wherein a region containing at least one exon of MnSOD gene is sandwiched between two recombinase-recognition sequences. It is also intended to disclose a knockout nonhuman animal suffering from the regulation or deletion of the expression of manganese superoxide dismutase in a specific tissue which is obtained by mating the knockin nonhuman animal as described above with a transgenic nonhuman animal expressing recombinase in the specific tissue; and a nonhuman animal with the deletion of manganese superoxide dismutase specifically to the above tissue which is obtained by further mating the knockout nonhuman animal as described above.

(57) 要約: MnSOD 遺伝子の少なくとも 1 つのエクソンを含む領域を、2 つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだ DNA を有するノックイン非ヒト動物を開示する。また、前記ノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配して得られる、前記特定組織におけるマンガンスーパーオキシドジスムターゼの発現が抑制又は欠損したノックアウト非ヒト動物、及び前記ノックアウト非ヒト動物を更に交配して得られる、前記特定組織に特異的にマンガンスーパーオキシドジスムターゼが欠損した非ヒト動物を開示する。

WO 2004/014131 A1

明 細 書

ノックイン非ヒト動物及び組織特異的MnSODノックアウト非ヒト動物

技術分野

この発明は、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Manganese superoxide dismutase; 以下、「MnSOD」と称する) 遺伝子の1つのエクソンをリコンビナーゼ認識配列 (例えば、*loxP*配列) で挟んだDNAを有するノックイン非ヒト動物 (例えば、ノックインマウス) に関し、更に、このノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼ (例えば、*Cre*リコンビナーゼ) を発現するトランスジェニック非ヒト動物 (例えば、トランスジェニックマウス) とを交配して得られる組織特異的ノックアウト非ヒト動物 (特には、その特定の組織に特異的にMnSODが欠損したマウス) に関する。

背景技術

生物は年齢が進むにつれ老化が進行するが、この老化の原因として活性酸素説が提唱されている。活性酸素蓄積の疾患の例である、脳若しくは心臓の虚血後再灌流における組織の損傷、パーキンソン病、神経変性疾患、又は動脈硬化などでは、活性酸素の関与が報告されている。

活性酸素は、ミトコンドリアにおける内呼吸の副産物である。このミトコンドリアの活性酸素であるスーパーオキシドを、MnSODが過酸化水素に変換する。この酵素の生体内における役割、活性酸素の影響、又は疾患の原因究明を目的として、組織特異的MnSOD遺伝子欠損による活性酸素蓄積モデルマウスを作製して、活性酸素蓄積による疾患の発症のメカニズムの解明が試みられてきた。

例えば、MnSODのエクソン3を欠損させたマウスが、拡張性心筋症、神経変性、又はミトコンドリア呼吸鎖酵素の活性低下を示すことが明らかにされたが、このマウスは新生児期に死亡した [Nat. Genet., 11, 376-381 (1995)]。また、MnSODノックアウトマウスが顕著な貧血症や大脳基底核のニューロンの変性を示し、7日以上生きたマウスがミトコンドリアの損傷を示すことが明ら

かにされたが、最長で10日しか生きなかった [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9782-9787 (1996)]。

発明の開示

現在遺伝子組み換えマウスの常法の一つである遺伝子ターゲティング法を用いたモデルマウスの作製は広く一般的に行われている [Nature, 1988 Nov 24; 336 (6197)]。具体的にはターゲティングベクターを作成後、胚性幹細胞 (ES細胞) において相同組み換えをおこさせることにより、遺伝子組み換えマウスを作製する。

バクテリオファージP1由来のリコンビナーゼであるCreタンパク質は、34塩基対のloxP配列を認識し、loxP配列の間にはさまれた配列を切り取る。この性質を用いて、本発明においては、例えば、MnSOD遺伝子のエクソン3の上流及び下流にloxP配列を挿入したflox動物を遺伝子ターゲティング法にて作製することができる。このマウスを臓器特異的にCreタンパク質を過剰に発現するトランスジェニックマウスと交配することにより臓器特異的にMnSOD遺伝子が欠損するようなコンディショナルノックアウトマウスを作製することができる。

従来、活性酸素の臓器別の影響をモデル化することは困難であった。全身性にMnSODを欠損したモデルマウスは報告されていたが、新生児期に死亡するために長期的な活性酸素の影響を評価することは不可能であった。更に各々の臓器の活性酸素の感受性や発生量を評価することは困難であり、臓器によっては活性酸素の感受性が低いにもかかわらず、全身性の変化の結果として変性が起こる可能性が既存のモデルマウスでは否定することができない。このことより既存のモデルマウスを用いて、各臓器の加齢現象を評価することはかなり困難であり、老化により罹患率が上昇し、臓器で特異的な変化を起こす罹患 (例えば、パーキンソン病又は動脈硬化等) の解析は不可能であった。

従って、本発明の課題は、長期に生存して組織特異的にMnSOD遺伝子が抑制又は欠損 (特には欠損) するノックアウト非ヒト動物 (例えば、ノックアウトマウス)、及びその作成に利用可能なノックイン非ヒト動物 (好ましくはノック

インマウス)を提供することにある。前記ノックアウトマウスは、成体組織又は正常老化過程におけるMnSOD遺伝子欠損による活性酸素の影響を調べることを可能とするモデルマウスである。

本発明において、Cre-loxPシステムを利用することにより、組織特異的なMnSOD欠損マウス、及びその作成に利用可能なノックインマウスを提供することに成功した。このノックインマウスは、通常はMnSODの発現量が野生型と変わらない表現型であるが、Creリコンビナーゼを発現させると遺伝子がノックアウトされるモデルマウスである。Creリコンビナーゼの発現はCreリコンビナーゼ過剰発現トランスジェニックマウスと交配させることにより可能となる。更に組織特異的にCreリコンビナーゼを過剰発現するようなトランスジェニックマウスと交配することにより、MnSOD遺伝子が組織特異的にノックアウトされるようなコンディショナルノックアウトマウスを用いることにより、全身性のノックアウトマウスでは困難であった成体組織での解析が可能となる。

従って、本発明は、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNAを有するノックイン非ヒト動物に関する。

本発明の好適態様によれば、前記エクソンがエクソン3である。また、本発明の別の好適態様によれば、前記の2つのリコンビナーゼ認識配列の間に、更にマーカ遺伝子（より好ましくはneo耐性遺伝子）を含む。本発明の更に別の好適態様によれば、前記リコンビナーゼ認識配列がloxP配列である。本発明の更に別の好適態様によれば、前記非ヒト動物がマウスである。

また、本発明は、前記ノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配して得られる、前記特定組織におけるマンガンスーパーオキシドジスムターゼの発現が抑制又は欠損したノックアウト非ヒト動物に関する。

更に、本発明は、前記ノックアウト非ヒト動物を、前記ノックイン非ヒト動物又は前記ノックアウト非ヒト動物と交配して得られる、前記特定組織に特異的にマンガンスーパーオキシドジスムターゼが欠損したノックアウト非ヒト動物に関

する。

本発明の好適態様によれば、前記リコンビナーゼがC r eリコンビナーゼである。

更に、本発明は、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNAに関する。

図面の簡単な説明

図1は、MnSOD遺伝子のエクソン3を2つのl o x p配列で挟んだノックインマウスを作製する様子を示す図である。1段目は5個のエクソンを含むMnSOD遺伝子を表し、2段目はターゲティングコンストラクトを示し、3段目は相同組み換えをおこさせたアリルを示す。黒い四角はエクソンを示し、E x 3はMnSOD遺伝子のエクソン3を示す。白い四角はそれぞれ、ネオマイシン耐性遺伝子(N e o)とチミジンカイネース遺伝子(H S V-T K)を示し、白い三角はl o x p配列を示す。黒い矢印は各P C Rで用いたプライマーを示す。制限酵素は下記略号で表す: E, EcoRI; X, XbaI; RV, EcoRV; H, HindIII; N, NdeI

図2は、実施例1の相同組み換えを起こした細胞のサザンブロットを示す図である。左図は、MnSOD f l o xマウスから産まれてきた産仔のDNAのサザンブロットを示し、右図は、P C R法による遺伝子型の区別を示す。「w t」及び「w i l d」は野生型アリルを意味し、「l o x」はl o x pアリルを意味する。また、「3' p r o b e」及び「N e o' p r o b e」は、それぞれ、図3に示す「3' p r o b e」及び「N e o' p r o b e」を用いた結果であることを示す。

図3は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスの作製を示す図である(実施例2)。上段は相同組み換えをおこさせたアリルを表し(l o x pアリル)、下段はC r eリコンビナーゼによる組み換えを表し(d e lアリル)、エクソン3が消失している。黒色の四角はサザンブロット法で用いたプローブである。

図4は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスのサザンブロットを示す図である。「e x o n 4 p r o b e」及び「N e o' p r o b e」は、それぞれ、図3

に示す「exon 4 probe」及び「Neor probe」を用いた結果であることを示す。

図5は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスのウエスタンブロット解析を示す図である。

図6は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスのSOD活性の測定を示す図である。

図7は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスの組織（HE染色）を示す図である。del/delは肝臓特異的MnSOD欠損マウスを示し、lox/loxはコントロールを示す。

図8は、肝臓特異的MnSOD欠損マウスの過酸化脂質（MDA及び4-HA E）量を示す図である。del/delは肝臓特異的MnSOD欠損マウスを示し、lox/loxはコントロールを示す。

発明を実施するための最良の形態

（1）本発明のノックイン非ヒト動物

本発明のノックイン非ヒト動物は、MnSOD遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNAを有する。

前記非ヒト動物としては、例えば、ヒトを除く哺乳動物（例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はイルカ）、鳥類（例えば、ニワトリ又はウズラ）、両生類（例えば、カエル）、又は爬虫類などを挙げることができる。

MnSOD遺伝子の塩基配列は、種々の非ヒト動物において既に公知である。例えば、マウスでは、図1に示すように、5つのエクソン（エクソン1～5）からなることが知られている。本発明のノックイン非ヒト動物は、MnSOD遺伝子の少なくとも1つのエクソン（好ましくは1つのエクソン）を、所望によりその隣接するイントロンと共に、含むことができる。本発明において用いることのできるエクソンは、そのエクソンが欠損することによりMnSODとしての機能が欠損するエクソンである限り、特に限定されるものではないが、例えば、マウスでは、エクソン3が好ましい。

本発明においては、リコンビナーゼ及びその認識配列の組み合わせを利用する。

リコンビナーゼは、DNA分子内に存在する2つの特異的な短い相同領域（すなわち、リコンビナーゼ認識配列）を認識してDNAの組み換え（部位特異的組み換え）を行う酵素である。このようなリコンビナーゼ及びその認識配列の組み合わせとしては、例えば、Cre-loxPシステム又はFLP-FRTシステム等を挙げることができる。従って、本発明のノックイン非ヒト動物におけるリコンビナーゼ認識配列としては、例えば、loxP配列又はFRT配列等を用いることができる。

本発明のノックイン非ヒト動物は、2つのリコンビナーゼ認識配列の間に、更にマーカー遺伝子（好ましくは薬剤耐性遺伝子）を含むことができる。前記マーカー遺伝子としては、所望のDNAをノックイン非ヒト動物に導入する際に薬剤耐性として機能することのできるタンパク質をコードする遺伝子である限り、特に限定されるものではなく、例えば、ネオマイシン（neo）耐性遺伝子又はHPRT（hypoxanthine phosphoribosyl transferase）遺伝子などを挙げることができる。

本発明のノックイン非ヒト動物は、以下の製造方法に限定されるものではないが、例えば、MnSOD遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNA（好ましくは、MnSOD遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域とマーカー遺伝子とを、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNA）を適当なベクター上で構築することによりターゲッティングベクターを作製した後、そのターゲッティングベクターを用いて胚性幹細胞（ES細胞）において相同組み換えをおこさせることにより、取得することができる。得られた非ヒト動物が所望のDNAを有しているか否かは、例えば、サザンブロット法により確認することができる。

本発明のノックイン非ヒト動物には、MnSOD遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNAを、相同染色体のいずれ一方のみに有するヘテロ接合体と、相同染色体の両方に有するホモ接合体とが含まれる。

（2）本発明のノックアウト非ヒト動物

本発明のノックアウト非ヒト動物には、特定組織に特異的にMnSODが欠損

したノックアウト非ヒト動物と、特定組織におけるMnSODの発現が抑制されたノックアウト非ヒト動物とが含まれる。なお、本明細書における「欠損」とは、実質的にMnSODが存在しないことを意味し、「抑制」とは、MnSODの発現量が野生型よりも低い（好ましくは野生型の50%以下であり、より好ましくは野生型の30%以下であり、更に好ましくは20%以下である）ことを意味する。

本発明のノックアウト非ヒト動物は、例えば、本発明のノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配することにより得ることができる。

前記リコンビナーゼとしては、例えば、Creリコンビナーゼ又はFLPリコンビナーゼ等を挙げることができる。

例えば、特定の組織でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとしては、例えば、Syn-Cre（シナプシンプロモーターにより中枢神経細胞で発現する）、Nes-Cre（ネスチンプロモーターにより中枢及び末梢神経で発現する）、Tek-Cre（Tie2プロモーターにより血管内皮細胞で発現する）、MMTV-Cre（マウス乳腺腫瘍ウイルスLTRプロモーターにより乳腺細胞で発現する）、PRM-Cre（プロタミンプロモーターにより雄性性腺で発現する）、GZMB-Cre（グランザイムプロモーターによりT細胞で発現する）、Alb-Cre（アルブミンプロモーターにより肝臓で発現する）、Ins2-Cre（インスリン2プロモーターにより膵臓で発現する）、Coll1-Cre（2型コラーゲンプロモーターにより軟骨細胞で発現する）（以上、The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USAより入手可能）、PB-Cre（プロバシンプロモーターにより前立腺で発現する）、MyHC-Cre（ミオシン重鎖プロモーターにより心筋で発現する）（以上、Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USAより入手可能）、TH-Cre（チロシンヒドロキシレースプロモーターによりドーパミン作動ニューロンで発現する。福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 生体機能部門より入手可能）、又はK14-Cre（ケラチン14プロモーターにより表皮で発現する。Strasbourg University, I. G. B. M. C.

CNRS-INSERM-UPL, BP 163, 67404 ILLKIRCH CEDEX C. U. STRASBOURG, Franceより入手可能)等を挙げることができる。

本発明のノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配すると、リコンビナーゼが発現する組織では、図3に示すように、2つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれた領域(すなわち、MnSOD遺伝子のエクソンを含む領域)がリコンビナーゼにより切り出されるが、リコンビナーゼが発現しない組織では、前記切り出しは起こらない。従って、前記交配により得られる本発明のノックアウト非ヒト動物では、リコンビナーゼが発現する組織でのみ特異的にMnSODの欠損又は発現抑制が起こり、それ以外の組織では野生型と変わらないMnSOD発現を示す。

ここで、リコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物として、MnSOD遺伝子に関して野生型である非ヒト動物を使用すると、特定組織におけるMnSODの発現が抑制された本発明のノックアウト非ヒト動物(ヘテロ接合体)を得ることができる。一方、リコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物として、MnSOD遺伝子欠損のトランスジェニック非ヒト動物を使用すると、特定組織に特異的にMnSODが欠損した本発明のノックアウト非ヒト動物を得ることができる。

次に、本発明のノックイン非ヒト動物と特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配して得られた本発明のノックアウト非ヒト動物を、本発明のノックイン非ヒト動物と交配することにより、特定組織に特異的にMnSODが欠損した本発明のノックアウト非ヒト動物(ホモ接合体)を得ることができる。あるいは、本発明のノックイン非ヒト動物と特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配して得られた本発明のノックアウト非ヒト動物を、同様にして得られた本発明のノックアウト非ヒト動物と交配することによっても、特定組織に特異的にMnSODが欠損した本発明のノックアウト非ヒト動物(ホモ接合体)を得ることができる。

交配により得られた非ヒト動物が、MnSOD遺伝子のエクソンを欠損しているか否かは、例えば、サザンブロット法により確認することができる。また、特定組織においてMnSODが欠損しているか否かは、例えば、ウエスタンブロッ

ト法により確認することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

本実施例では、MnSOD遺伝子のエクソン3を2つのloxP配列で挟んだノックインマウスを作製した。その様子を図1に示す。

MnSODのマウスcDNAをプローブとして、129/Sv系統マウスの染色体ライブラリー（λFIXII；Stratagene社製）からMnSODの5個のエクソンを含む約14kbの染色体遺伝子をpBSKIIベクター（Stratagene社製）にクローニングした。

単離したMnSODゲノム遺伝子を鋳型にして、NotI認識配列を含むセンスプライマー（NotI anchored sense primer；配列番号1）及びSalI認識配列を含むアンチセンスプライマー（SalI anchored antisense primer；配列番号2）のプライマーセットを用いて、5'側の1.3kbのゲノム遺伝子断片をPCR法にて増幅させ、pMC1DT-A（B）プラスミド（オリエンタル酵母社製）にクローニングした。

単離したMnSODゲノム遺伝子を鋳型にして、XhoI認識配列を含むセンスプライマー（XhoI anchored sense primer；配列番号3）及びSalI認識配列を含むアンチセンスプライマー（SalI anchored antisense primer；配列番号4）のプライマーセットを用いて、3'側の約6kbのゲノム遺伝子断片を増幅させた。SalI部位とXhoI部位において、先に得られた5'側のゲノム遺伝子を含むpMC1DT-A（B）プラスミドにクローニングした。

一方、loxP配列を両脇に配置したネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpMCneo-loxPベクター [大阪大学の八木教授より供与；Nucleic Acids Res., 26 (1998) 679-680] を用いて、pBSKIIベクターへloxP配列を両脇に配置したネオマイシン耐性遺伝子をXhoI/SalI部位に挿入し、Neo^r/BSKベクターを作製した。更にNeo^r/BSKベクターに3番目の

LoxP配列を挿入したNeo^r-LoxP/BSKベクターを作製した。

単離したMnSODゲノム遺伝子を鋳型にして、SalI認識配列を含むセンスプライマー (SalI anchored sense primer; 配列番号5) 及びSalI認識配列を含むアンチセンスプライマー (SalI anchored antisense primer; 配列番号6) のプライマーセットを用いて、エクソン3を取り囲むゲノム遺伝子断片を増幅させ、この断片をNeo^r-LoxP/BSKベクターのSalI部位に挿入した。制限酵素KpnI及びSmaIを用いてエクソン3とネオマイシン耐性遺伝子を含む断片を取り出し、平滑末端にしてから、先に得られた5'側及び3'側のゲノム遺伝子を含むpMC1DT-A (B) ベクターにクローニングした。作製したベクターから制限酵素NotI及びBamHIを用いてターゲティングコンストラクトを取り出し、PIC19R/MCI-TKベクター [ユタ大学のCapecchi博士より供与; Nature, 336 (1988) 348-352又はScience, 301 (2003) 363-367] にクローニングし、ノックインコンストラクトを作製した (図1、ターゲティングベクター)。

制限酵素NotIで切断し、直線化したターゲティングコンストラクトをエレクトロポレーション法でES細胞に導入した。

G418を含む培地中から、相同組み換えを起こしている細胞を、以下のようにして、サザンブロット法で確認した。

出生直後の産仔から得られた各DNAを制限酵素EcoRIで消化し、3'プローブ (3' probe) を用いると、野生型マウス (wt/wt) は24 kbの断片が、MnSOD floxマウスホモ接合体マウス (lox/lox) は8.1 kbの断片が検出された (図2左上)。また、Neo^rプローブ (Neo^r probe) を用い、制限酵素XbaIによる消化では、ホモ接合体マウス (lox/lox) とヘテロ接合体マウス (wt/lox又はlox/wt) は6.3 kbの断片が検出され、野生型 (wt/wt) は検出されなかった (図2左下)。

更にキメラマウスを作製し、生殖系列に入ったかどうかサザンブロット法にて確認した。図1に示すプライマーP1 (配列番号7)、P2 (配列番号8)、及びP4 (配列番号9) を用いて子の尾から抽出したDNAを用い、PCRを実

施した。野生型アリル (w t / w t) は500bp、変異アリル (w t / l o x、l o x / w t、又はl o x / l o x) は358bpのバンドを検出した (図2右)。

実施例2

本実施例では、肝細胞で特異的にMnSODが欠損するモデルマウスを作製し、その解析を行った。

肝細胞でC r eリコンビナーゼを発現するラットアルブミンプロモーター (A l b) - C r e [rat albumin promoter (Alb)-Cre] トランスジェニックマウス (The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USAより入手) と、実施例1で得られたMnSOD f l o xマウスとを交配した。その様子を図3に示す。

その結果、肝臓特異的MnSOD欠損マウスに致死性は認められず、外見上も野生型と比較して差異は認められなかった。

肝臓から得られたDNAを用い、組み換えの効率を調べるため、サザンブロット法を実施した (図4)。

制限酵素H i n d I I I消化においては、エクソン4プローブ (e x o n 4 p r o b e) により、MnSOD f l o xアリル (l o x / l o x) では6.0kbのDNA断片を、MnSOD欠損アリル (d e l / d e l) では4.0kbのDNA断片を検出した。

制限酵素E c o R V消化においては、エクソン4プローブにより、MnSOD f l o xアリルでは8.8kbのDNA断片を、MnSOD欠損アリルは6.8kbのDNA断片を検出した。それぞれ一部C r eによる組み換えが行われていないDNA断片が少量検出されている。N e o^rプローブを用いると、MnSOD f l o xアリルのホモ及びヘテロマウスから得られたDNAでは、制限酵素H i n d I I I又はE c o R Vでそれぞれ6.1kb又は6.8kbの断片が検出され、野生型はまったく検出されなかった。MnSOD欠損アリルについては、エクソン4プローブと同様に、一部検出された。

これらの結果から、大部分のMnSOD遺伝子のエクソン3が期待通りに欠損するような遺伝子組み換えが行われたことが確認された。

一方、肝臓特異的MnSOD欠損マウスの脳、心臓、肝臓、又は腎臓から抽出したサンプルに対してウエスタンブロット法を実施した。その結果、肝臓のみMnSODが欠損しており、他の臓器では差が無いことが確認された（図5）。

次に、肝臓特異的MnSOD欠損マウスとコントロールマウスの肝臓をサンプルにSODの活性を測定した（図6）。Cu/ZnSOD活性に明らかな差はなかった（図6左）が、MnSODについてはコントロールと比較して活性は70%減少していた（図6右）。

実施例3

MnSOD欠損マウスはMnSOD欠損の影響により肝臓に脂肪やグリコーゲンが蓄積しているという報告がある。そのため、本実施例では、実施例2で作製した肝臓特異的MnSOD欠損マウスについて、同様にHE（hematoxylin-eosin）染色、PAS（periodic acid-Schiff）染色、及びオイルレッドO（Oil Red O）染色を行った。その結果、グリコーゲンの蓄積の程度に明らかな差異は認められなかった（図7）。

また、野生型より臓器に対する活性酸素の暴露が多いのではないかと予想し、過酸化脂質〔マロンジアルデヒド（MDA）及び4-ヒドロキシアルケナール類（4-hydroxy-alkenals；4-HAE）〕の量を測定したが、これもコントロールのマウスと明らかな差は認められなかった（図8）。

以上の結果より、既存のMnSOD欠損マウスに認められた肝臓での変化は、肝臓自体でなく、全身の欠損によるものであることが示唆された。

産業上の利用可能性

遺伝子操作により各臓器別に活性酸素の防御機構の破綻を観察し、活性酸素の生体に対する影響を観察することが可能なモデルマウスの作成に成功した。本発明により得られる組織特異的MnSOD欠損マウスは、既存のMnSOD欠損マウスと異なり、組織特異的にMnSODの活性が欠損するため、新生児期の致死性を回避することが可能となる。このモデルマウスを用いることにより、既存のマウスでは不可能であった臓器別に老化、加齢現象を観察することが可能になった。また各臓器における活性酸素の感受性の程度が解析可能となり、臓器別に老

化に対する感受性が評価できるようになった。

このモデルマウスは、老化により罹患率が上昇する臓器で特異的な変化を起こす罹患（パーキンソン病、動脈硬化等）の解析には不可欠のモデルである。更にその疾患の臓器特異的な薬剤、例えば、脳の老化を予防するような薬剤を開発するためにこれらのモデルマウスが必須である。更に開発された薬剤の効果を検定する際にも貴重なアッセイシステムを提供するものである。

配列表フリーテキスト

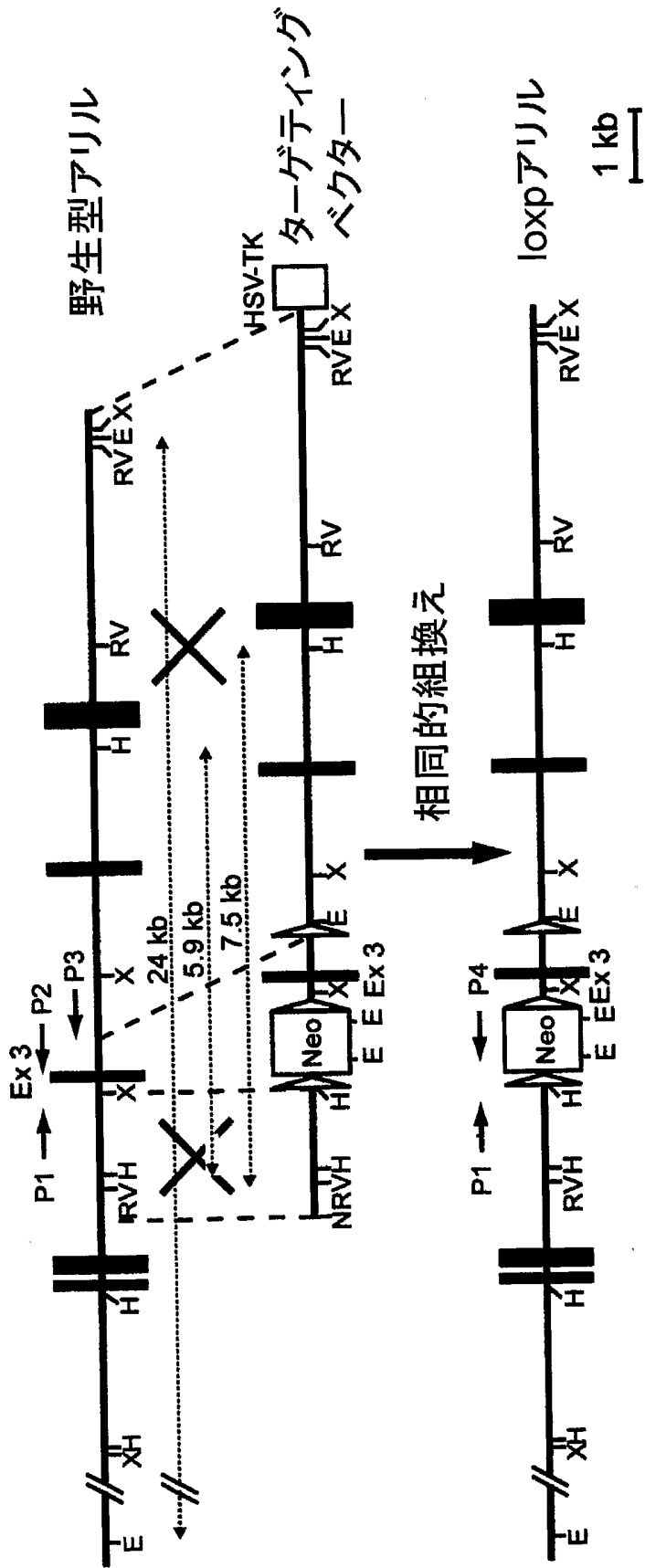
以下の配列表の数字見出し<2 2 3>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号1～6の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. マンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNAを有する、ノックイン非ヒト動物。
2. エクソンがエクソン3である、請求項1に記載のノックイン非ヒト動物。
3. 2つのリコンビナーゼ認識配列の間に、更にマーカー遺伝子を含む、請求項1又は2に記載のノックイン非ヒト動物。
4. マーカー遺伝子がneo耐性遺伝子である、請求項3に記載のノックイン非ヒト動物。
5. リコンビナーゼ認識配列がloxP配列である、請求項1～4のいずれか一項に記載のノックイン非ヒト動物。
6. 非ヒト動物がマウスである、請求項1～5のいずれか一項に記載のノックイン非ヒト動物。
7. 請求項1～6のいずれか一項に記載のノックイン非ヒト動物と、特定の組織でリコンビナーゼを発現するトランスジェニック非ヒト動物とを交配して得られる、前記特定組織におけるマンガンスーパーオキシドジスムターゼの発現が抑制又は欠損したノックアウト非ヒト動物。
8. 請求項7に記載のノックアウト非ヒト動物を、請求項1～6のいずれか一項に記載のノックイン非ヒト動物又は請求項7に記載のノックアウト非ヒト動物と交配して得られる、前記特定組織に特異的にマンガンスーパーオキシドジスムターゼが欠損したノックアウト非ヒト動物。
9. リコンビナーゼがCreリコンビナーゼである、請求項7又は8に記載のノックアウト非ヒト動物。
10. マンガンスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子の少なくとも1つのエクソンを含む領域を、2つのリコンビナーゼ認識配列で挟んだDNA。

FIG. 1



2/6

FIG. 2

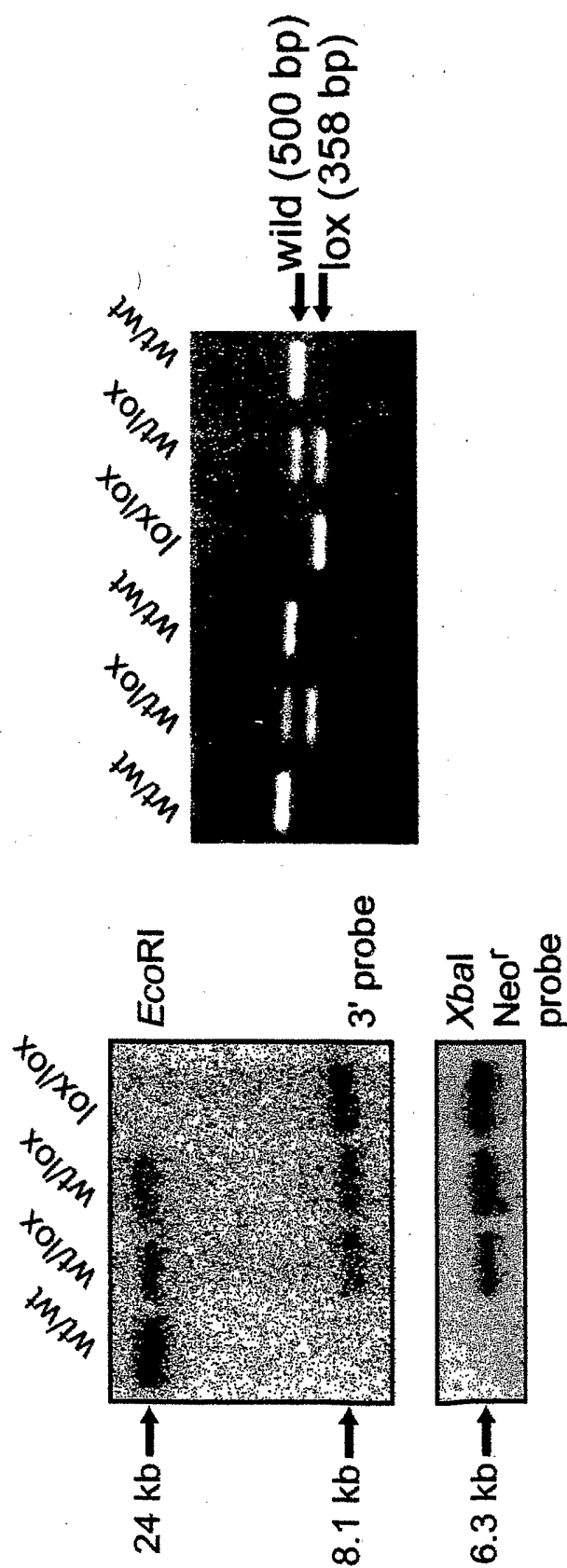
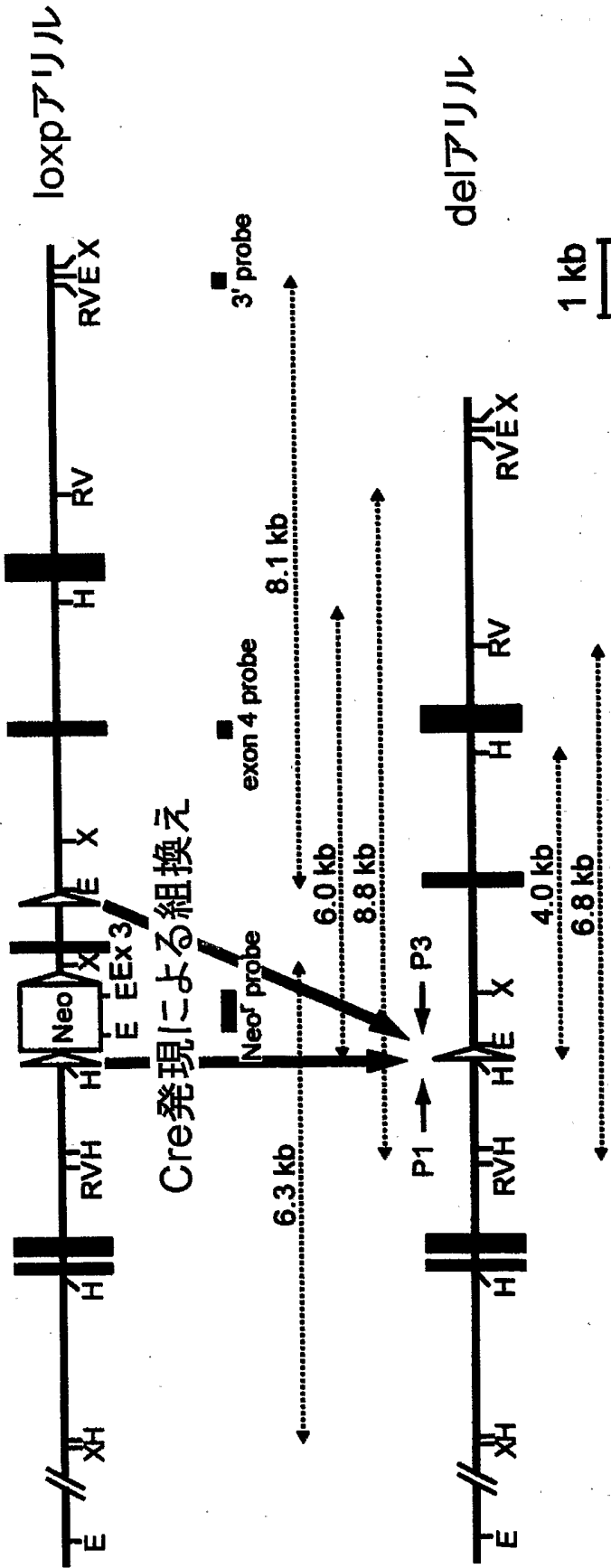


FIG. 3



4/6

FIG. 4

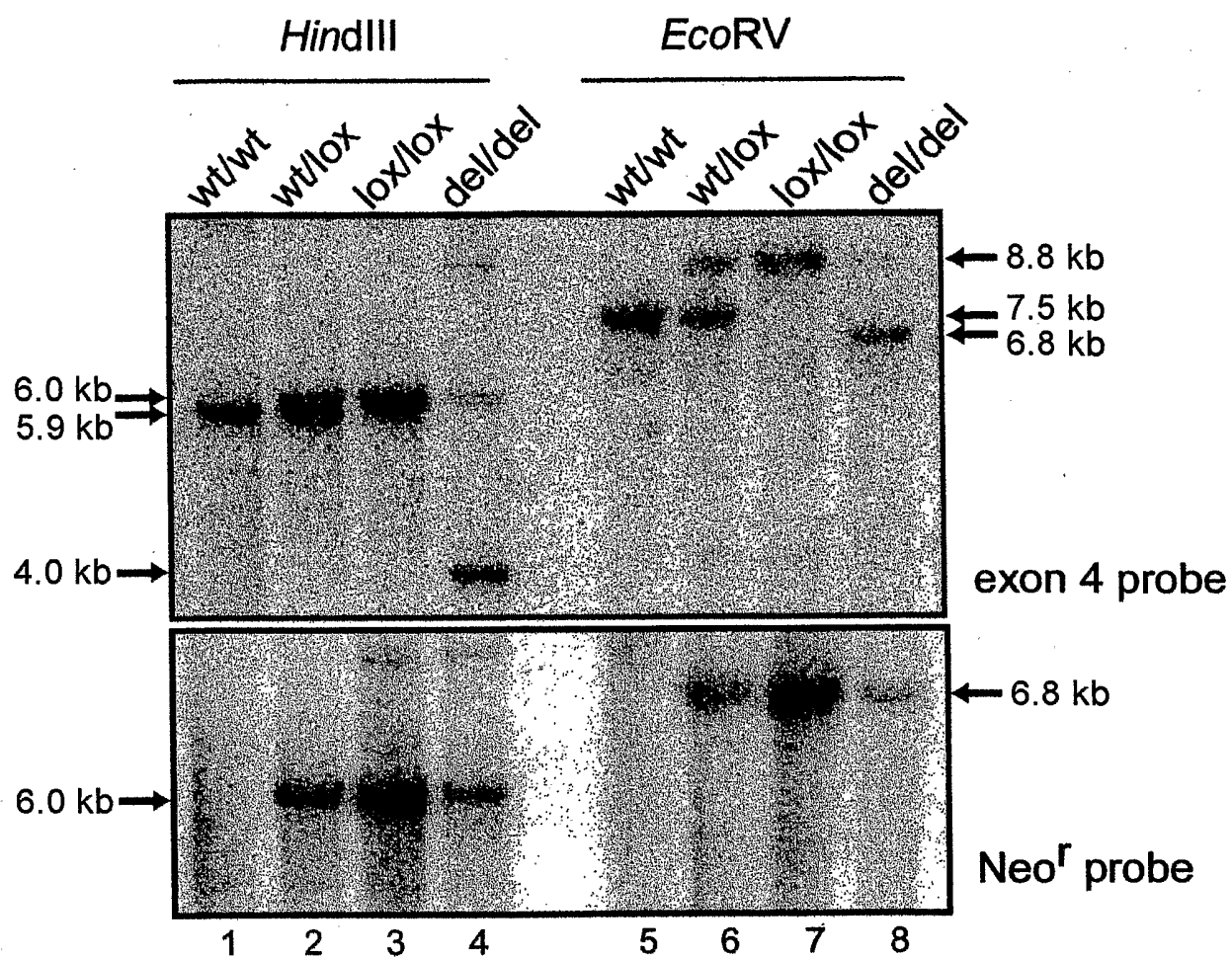
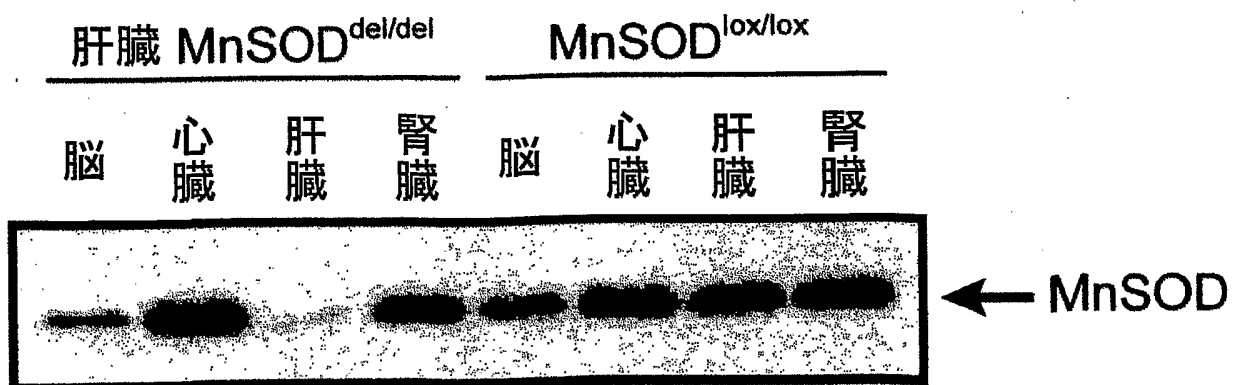


FIG. 5



5/6

FIG. 6

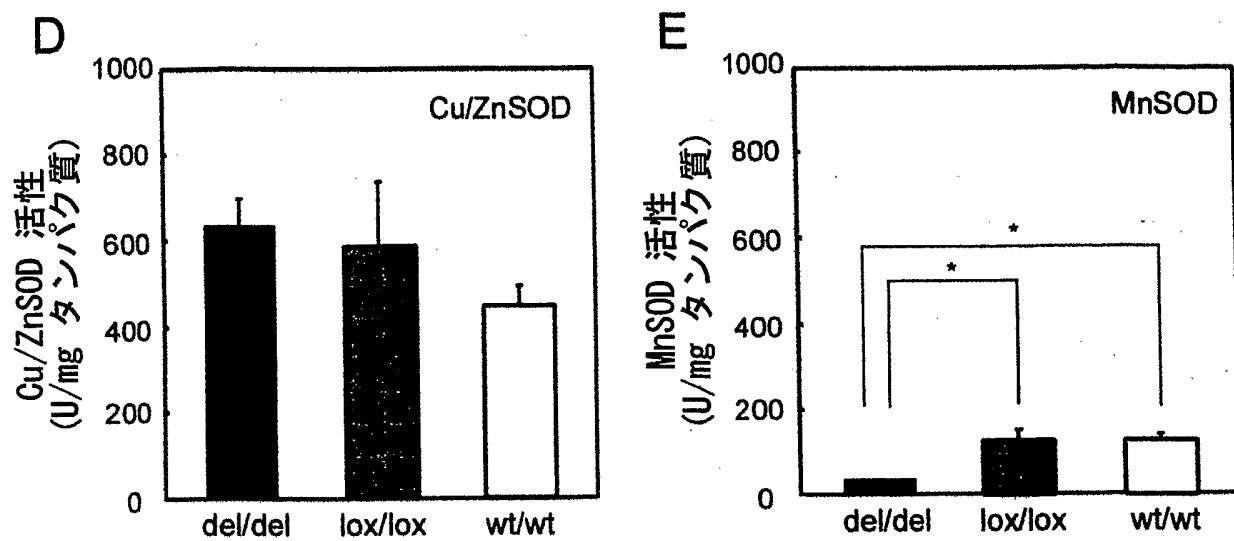
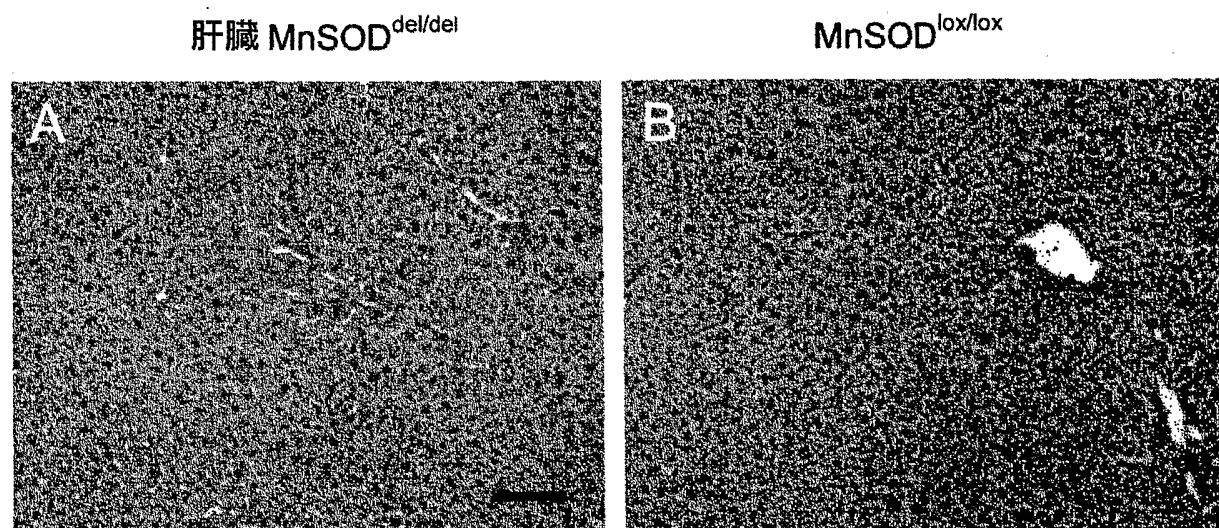
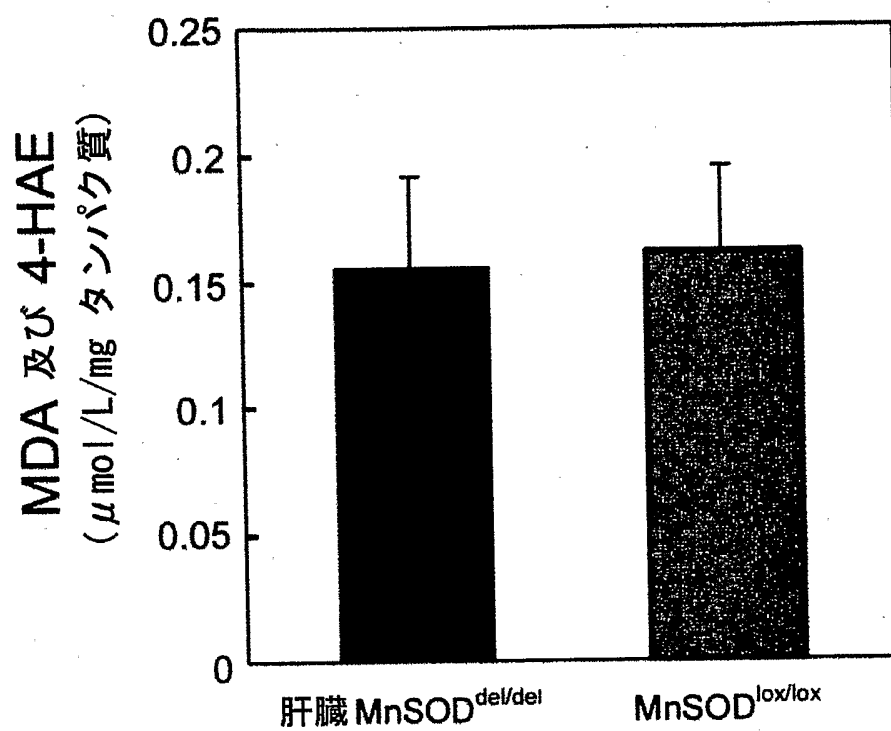


FIG. 7



6/6

FIG. 8



SEQUENCE LISTING

<110> SHIRASAWA, Takuji

<110> KOSEKI, Akihiko

<120> Knockin non-human animal and tissue-specific MnSOD knockout non-human animal

<130> TMI-694

<150> JP 2002-232625

<151> 2002-08-09

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 1

ataagaatgc ggccgctgac ggacottact gtt

33

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

acgcgtcgac agatgccaga tgtcacct

28

<210> 3

- <211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence
- <400> 3
ccgctccagc tgagccatct cactagcc 28
- <210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence
- <400> 4
acgcgtcgac agctacattg cactca 26
- <210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
- <220>
<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence
- <400> 5
acgcgtcgac tgttgtccag acatctt 27
- <210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence
- <220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

acgcgtcgac cagcaacaca tggtggct

28

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 7

cgaggggcat ctagtgga ag

22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 8

ttagggctca ggttgtcca gaa

23

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 9

agcttgctg gacgtaa

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N15/53

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N15/53

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

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

WPI/BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yakar S. et al., Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, June 1999, Vol.96, pages 7324 to 7329	1-10
Y	Postic C. et al., Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase., J.Biol.Chem., January, 1999, Vol.274, No.1, pages 305 to 315	1-10
Y	Sakai K. et al., A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission., Biochem.Biophys.Res.Comm., August, 1997, Vol.237, pages 318 to 324	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2003 (29.08.03)Date of mailing of the international search report
09 September, 2003 (09.09.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10118

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lebovitz R.M. et al., Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice., Proc.Natl. Acad.Sci.USA, September, 1996, Vol.93, pages 9782 to 9787	1-10
P,X	Ikegami T. et al., Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene., Biochem.Biophys.Res.Comm., 23 August, 2002 (23.08.02), Vol.296, pages 729 to 736	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N15/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N15/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

WPI/BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yakar S., et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Jun. 1999, Vol.96, p.7324-7329	1-10
Y	Postic C., et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. J. Biol. Chem. Jan. 1999, Vol.274, No.1, p.305-315	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

29.08.03

国際調査報告の発送日

09.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sakai K., et al. A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the <i>cre</i> transgene transmission. Biochem. Biophys. Res. Commun. Aug. 1997, Vol.237, p.318-324	1-10
Y	Lebovitz R.M., et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Sep. 1996, Vol.93, p.9782-9787	1-10
P, X	Ikegami T., et al. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 Aug. 2002, Vol.296, p.729-736	1-10