

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4934397号  
(P4934397)

(45) 発行日 平成24年5月16日(2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>AO1K 67/027</b>	<b>(2006.01)</b>	AO1K 67/027	ZNA	
<b>C12N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N 15/00	A	
GO1N 33/50	(2006.01)	GO1N 33/50	Z	
GO1N 33/15	(2006.01)	GO1N 33/15	Z	

請求項の数 3 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2006-284568 (P2006-284568)	(73) 特許権者	502285457
(22) 出願日	平成18年10月19日(2006.10.19)		学校法人順天堂
(65) 公開番号	特開2008-99600 (P2008-99600A)		東京都文京区本郷2-1-1
(43) 公開日	平成20年5月1日(2008.5.1)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成21年6月17日(2009.6.17)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

LC3のアミノ末端にポリヒスチジンタグ及びFlagタグが結合した修飾LC3を全身に発現しているトランスジェニックマウス又はその子孫。

【請求項2】

修飾LC3が、LC3のアミノ末端にMGGSHHHHHHG及びDYKDDDDKに結合したものである請求項1記載のトランスジェニックマウス又はその子孫。

【請求項3】

オートファジーが関与する疾患モデルマウスである請求項1又は2記載のトランスジェニックマウス又はその子孫。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オートファジーの実行部隊の一員と認識されているLC3の修飾体を発現しているトランスジェニック非ヒト動物又はその子孫に関する。

【背景技術】

【0002】

オートファジーは、隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体がリソソームと融合し、その内容物をリソソーム内の消化酵素が分解する細胞内大規模分解経路である。このオートファジーの因子が全身で欠損したマウスは新生児致死

性である（非特許文献1）。脳において欠損すると、神経変性疾患になり、肝臓において欠損すると、肝肥大を伴う肝炎になる（非特許文献1, 2）。また、ガン細胞においては、オートファジーに関する遺伝子のいくつかが増加しているとの報告がある（非特許文献3）。

【0003】

LC3 (microtubule associated protein 1A light chain3) は微小管関連タンパク質の1つとして、脳から単離されてきた（非特許文献4, 5）。その後の研究でLC3は、オートファジーの際のモディファイヤーとしてAp g 7とAp g 3によってスベキチン様修飾をうけて細胞質型LC3 (LC3 - I) から膜結合型LC3 (LC3 - II) になり、オートファゴソーム膜上に局在することがわかってきた（非特許文献6 ~ 9）。かかる点から、LC3は、オートファジーの実行部隊の一員と認識されるに至っている。

【非特許文献1】J Cell Biol. 2005 May 9;169(3):425-434.

【非特許文献2】Nature 2006 Jun 15;441(7095)880-884

【非特許文献3】Nature. 1999 Dec 9;402(6762):672-676.

【非特許文献4】J. Biol. Chem., 269 : 11492-11497, 1994

【非特許文献5】J. Neurosci. Res., 43 : 535-544, 1996

【非特許文献6】EMBO J., 19 : 5720-5728, 2000

【非特許文献7】J. Cell Biol., 152 : 657-668, 2001

【非特許文献8】J. Biol. Chem., 276 : 1701-1706, 2001

【非特許文献9】J. Biol. Chem., 277 : 13739-13744, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

このようにオートファジーは、種々の生理機能や疾患に関与していることが判明しており、注目されているが、これまでオートファジーに着目した医薬の開発はなされていない。

従って、本発明の目的は、オートファジーの研究及びオートファジーに関与する疾患の治療薬のスクリーニングに用いることのできるモデル動物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

そこで本発明は、LC3に着目して研究してきたところ、LC3のアミノ末端にポリヒスチジンタグとF1a gタグを結合した修飾LC3を発現する遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物の作製に成功し、このトランスジェニック動物が全身に修飾LC3を発現しており、オートファジーが関与する疾患の研究モデルとして、又は医薬のスクリーニングモデルとして有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、LC3のアミノ末端にポリヒスチジンタグ及びF1a gタグが結合した修飾LC3を全身に発現しているトランスジェニック非ヒト動物又はその子孫を提供するものである。

また、本発明は上記トランスジェニック非ヒト動物又はその子孫に被験物質を投与し、LC3が関与する疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0007】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物を用いれば、オートファジーが関与する疾患の研究、各種疾患におけるオートファジーの役割の研究、さらにはオートファジーが関与する疾患の治療薬の検索が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、アミノ末端にポリヒスチジンタグ及びF1a gタグが結合した修飾LC3を全身に発現しているものである。ここでLC3遺伝子は

、すでにクローニングされている (Tanida et al, J. Biol. Chem. 2001 ; 296(3) : 1701-1706, Tanida et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, Sep 6 ; 296(5) : 1164-1170, Gene Bank accession No. AF087871)。ポリヒスチジンタグとしては、ヒスチジンが6個連続して結合しているペプチドであればよいが、好ましくはM G G S H H H H H Gである。また、F l a g t a gとしては、D Y K D D D D K等が挙げられる。

**【 0 0 0 9 】**

本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、例えば前記修飾 L C 3 遺伝子を組み込んだ D N A (組み換え D N A) 常法に従い非ヒト動物に導入することにより作製できる。修飾 L C 3 遺伝子は、ヒスチジンタグをコードするオリゴヌクレオチド及び F l a g タグをコードするオリゴヌクレオチドを L C 3 c D N A のセンス方向の上流に導入することにより得られる。ここで、組み換え D N A には、非ヒト動物において当該修飾 L C 3 を発現させるための適切なプロモータを用いることができる。このようなプロモータとしては、サイトメガロウィルス ( C M V ) プロモータ、SV40プロモータ、EF1- プロモータ等が挙げられる。

10

**【 0 0 1 0 】**

かくして得られる組み換え D N A を導入するための非ヒト哺乳動物としては、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等が挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス又はラットであり、なかでもモルモット、ハムスター、マウス、ラット等の齧歯目 ( Rodentia ) が好ましく、とりわけマウスが好ましい。

20

**【 0 0 1 1 】**

本発明のトランスジェニック動物は、例えば非ヒト哺乳動物の受精卵に、前記組み換え D N A を導入し、当該受精卵を当該動物の雌に着床させることにより作製される。ここで、受精卵としては、雄精前核時期 (受精後約 1 2 時間位) のものが好ましい。また組み換え D N A の導入方法としては、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、D E A E - デキストラン法等が挙げられるが、マイクロインジェクション法が特に好ましい。

**【 0 0 1 2 】**

組み換え D N A を導入した受精卵は、当該受精卵と同種の動物の雌に着床させる。着床の手段は、偽妊娠雌性動物の卵管に人工的に移植、着床させる手段が好ましい。かくして、受精卵を着床させた動物から生まれた仔の中から、目的とする遺伝子を発現している個体を選別し、当該個体を継代すればよい。

30

**【 0 0 1 3 】**

得られたトランスジェニック動物に目的遺伝子が含まれているか否かの確認は、D N A を採取し、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 及びサザンブロットティング法による導入遺伝子の解析によって行うことができる。

**【 0 0 1 4 】**

また得られたトランスジェニック動物における修飾 L C 3 の発現は、臓器ごとに細胞破碎液を調製し、抗 L C 3 抗体及び抗 F l a g 抗体を用いてウェスタンブロット法により確認できる。

40

**【 0 0 1 5 】**

本発明のトランスジェニック動物は、全身に修飾 L C 3 が発現していることから、L C 3 をコントロールする因子をスクリーニングでき、オートファジーに關与する疾患の研究、例えば神経変性疾患、肝臓疾患、ガン化等に關与する因子のスクリーニングに用いることができる。

**【 0 0 1 6 】**

また、本発明のトランスジェニック動物に被験物質を投与し、L C 3 の増域を評価すれば、L C 3 が關与する疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。L C 3 が關与する疾患としては、神経変性疾患 (例えばアルツハイマー症、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病)、肝炎 (急性肝炎、慢性肝炎)、肝硬変、ガン等が挙げられる。

50

## 【実施例】

## 【0017】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

## 【0018】

## 実施例 1

(1) HisFlag-tag の導入：合成オリゴヌクレオチドと PCR 法を用いて、LC3 cDNA のセンス方向の上流（タンパク質のアミノ酸末端の上流）に、以下のアミノ酸を含むペプチドをコードする塩基配列を導入した。

His-tag : MGGSHHHHHHG (配列番号 1)

Flag-tag : DYKDDDDK (配列番号 2)

10

## 【0019】

(2) 得られた HisFlag-LC3 をコードする DNA 断片を CMV (サイトメガロウイルス) プロモータの下流に導入した。(図 1 参照)。

作成した [CMV プロモータ-HisFlag-LC3 DNA] 断片を用いて、定法に従い、HisFlag-LC3 トランスジェニックマウスを作成した。その後、遺伝的に安定させるために、野生型 B6J マウスと交配を続け、世代間を安定的に HisFlag-LC3 の発現 DNA 断片が遺伝していくのを PCR 法を用いた genotyping により確認した。具体的には、まずマウス尾部より定法に従い、ゲノム DNA を抽出し、その DNA を鋳型に CAGSF プライマー (5'-GGCTTCTGGCGTGTGACC-3' ; 配列番号 3) と LC3 Rv プライマー (5'-TTAGAACGTCTCCTGGGAGGCGTAGACC-3' ; 配列番号 4) を用いて、KOD-plus-DNA polymerase 酵素により、目的の断片約 400bp を増幅していることで、遺伝子型を判定した。

20

## 【0020】

(3) 臓器における HisFlag-LC3 タンパク質の発現は、定法に従って臓器ごとにダウンス型ホモジナイザーで組織を破壊後、1% SDS 存在下でタンパク質を抽出し、遠心により不溶物質を取り除くことで、細胞破砕液を調製し、12.5% SDS-PAGE によりタンパク質を分子量ごとに分離後、抗 LC3 抗体及び抗 Flag 抗体を用いてウエスタンブロット法により確認できた(図 2)。

## 【0021】

30

(4) アフィニティ精製が可能であるかどうかについては、このトランスジェニックマウスより、脳を取り出し、定法に従って、脳細胞破砕液より抗 Flag M2 アガロースを用いて HisFlag-LC3 タンパク質及び相互作用するタンパク質の精製が可能であった(図 3)。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

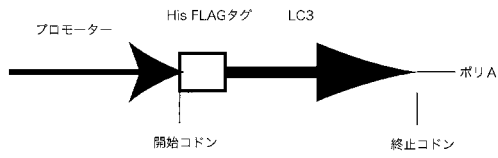
【図 1】 HisFLAG-LC3 タンパク質発現のために導入した DNA 断片の模式図を示す。

【図 2】 各臓器における HisFLAG-LC3 タンパク質の発現を示す図である。

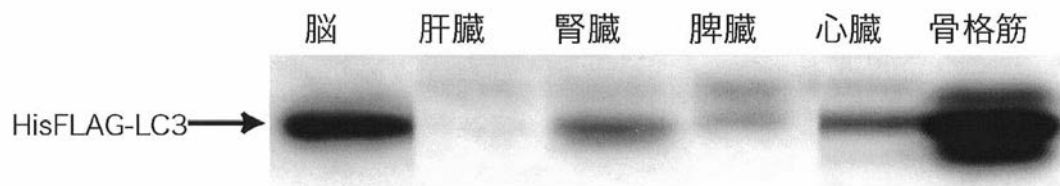
【図 3】 アフィニティ精製の結果を示す図である。

40

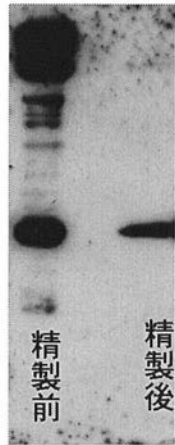
【図1】



【図2】



【図3】



【配列表】

0004934397000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100101317  
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100121153  
弁理士 守屋 嘉高
- (74)代理人 100134935  
弁理士 大野 詩木
- (74)代理人 100130683  
弁理士 松田 政広
- (74)代理人 100140497  
弁理士 野中 信宏
- (72)発明者 谷田 以誠  
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学医学部内
- (72)発明者 多田 昇弘  
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学医学部内
- (72)発明者 木南 英紀  
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学医学部内

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 特開2005 - 145839 (JP, A)  
国際公開第2004 / 113531 (WO, A1)  
特開2000 - 060574 (JP, A)  
特表2001 - 525664 (JP, A)  
特表2003 - 511388 (JP, A)  
国際公開第2002 / 052007 (WO, A1)  
日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2000年, Vol.23, p.794

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A01K 67/027  
C12N 15/12  
JSTPlus (JDreamII)  
PubMed