

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5639890号
(P5639890)

(45) 発行日 平成26年12月10日(2014.12.10)

(24) 登録日 平成26年10月31日(2014.10.31)

(51) Int. Cl.	F 1		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	S	
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577	B	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z	

請求項の数 11 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-526634 (P2010-526634)	(73) 特許権者	504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
(86) (22) 出願日	平成21年7月31日(2009.7.31)	(73) 特許権者	000001959 株式会社 資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/063696	(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(87) 国際公開番号	W02010/024091	(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(87) 国際公開日	平成22年3月4日(2010.3.4)	(74) 代理人	100125081 弁理士 小合 宗一
審査請求日	平成24年7月2日(2012.7.2)	(72) 発明者	浜瀬 健司 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人 九州大学内 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2008-217239 (P2008-217239)		
(32) 優先日	平成20年8月26日(2008.8.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 D a o 1 - / - マウスを活用したD-アミノ酸関連疾患の評価・スクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) D a o 1 + / + の遺伝子型を有するマウスと、D a o 1 - / - の遺伝子型を有するマウスとを用意するステップと、

(2) 前記 D a o 1 + / + の遺伝子型を有するマウスと、前記 D a o 1 - / - の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を試験条件に曝露するステップと、

(3) 前記 D a o 1 + / + の遺伝子型を有するマウスと、前記 D a o 1 - / - の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露したことによる影響を分析するステップとを含み、

前記 D a o 1 + / + の遺伝子型を有するマウスと、D a o 1 - / - の遺伝子型を有するマウスとは、他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一であり、該他の遺伝子の対立遺伝子の組合せは H r - / - を含むことを特徴とする、マウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法。

【請求項2】

前記ステップ(1)は、D a o 1 + / + 、 + / - 及び / 又は - / - の遺伝子型のマウスを個体識別するステップと、前記個体識別されたマウス個体のそれぞれから染色体DNAを抽出するステップと、前記抽出された染色体DNAのうち D a o 1 遺伝子の第7エクソンを含む領域を増幅して増幅DNA断片を得るステップと、前記増幅DNA断片を H p a I I 制限酵素で消化するステップと、前記増幅DNA断片の制限酵素消化産物を分析する

ステップとを含む、 $Da o 1^{+ / +}$ 、 $^{+ / -}$ 及び $^{- / -}$ 又は $^{- / -}$ 遺伝子型の判定方法によって、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとを選別することを含むことを特徴とする、請求項1に記載の評価方法。

【請求項3】

前記増幅DNA断片を得るステップは、配列番号1及び2に列挙されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することを含むことを特徴とする、請求項2に記載の評価方法。

【請求項4】

前記ステップ(3)は、前記ステップ(2)の前に、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD-アミノ酸含有量を測定すること、前記ステップ(2)の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD-アミノ酸含有量を測定すること、及び、前記ステップ(2)の前に測定されたD-アミノ酸含有量と、前記ステップ(2)の後に測定されたD-アミノ酸含有量とを比較することを含む、請求項1ないし3のいずれかに記載の評価方法。

10

【請求項5】

前記D-アミノ酸含有量は、光学分割カラム系を用いるカラムクロマトグラフィーによって測定されることを特徴とする、請求項4に記載の評価方法。

【請求項6】

前記D-アミノ酸含有量は、光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって測定されることを特徴とする、請求項4に記載の評価方法。

20

【請求項7】

前記D-アミノ酸はD-プロリンであることを特徴とする、請求項4ないし6のいずれかに記載の評価方法。

【請求項8】

前記D-アミノ酸含有量を測定する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞は、真皮、表皮、腎臓、膵臓、精巣、副腎、小脳、下垂体及び血清からなるグループから選択される1種または2種以上の生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞であることを特徴とする、請求項4ないし7のいずれかに記載の評価方法。

30

【請求項9】

前記D-アミノ酸はD-プロリンであり、該D-プロリンは光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定され、前記生体組織は真皮又は表皮であることを特徴とする、請求項8に記載の評価方法。

【請求項10】

$Da o 1^{+ / +}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、配列番号1及び2に列挙するヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、プロリンの光学異性体を識別する光学分割カラム系とを含むことを特徴とする、請求項9に記載の評価方法を実施するための評価システム。

40

【請求項11】

医薬品及び $^{- / -}$ 又は化粧料の候補物質を請求項10に記載の評価システムによって評価することを特徴とする、医薬品及び $^{- / -}$ 又は化粧料の候補物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法と、該評価スクリーニング方法を実施するための評価システムと、該評価システムを用いる医薬品及び $^{- / -}$ 又は化粧料候補物質に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

グリシン以外の全てのアミノ酸にはD型とL型という2種類の光学異性体が存在する。L - アミノ酸は生物のタンパク質合成に用いられており、タンパク質に含まれるアミノ酸はほとんどL - アミノ酸である。これに対してD - アミノ酸は下等生物の一部の生理活性ペプチドに含まれるが、その多くは翻訳後修飾のプロセスを経て生合成される。そこで、タンパク質又はペプチドを構成するアミノ酸は主にL - アミノ酸であり、D - アミノ酸は例外的な存在である。

【 0 0 0 3 】

D - アミノ酸は細菌の細胞壁のペプチドグリカンの構成成分である。また、ペプチドを構成しない遊離のD - アミノ酸については、水棲動物や昆虫などの下等な動物において存在することは以前から報告されていた。しかし、高等動物に存在するアミノ酸はL型であって、D型は微量しか存在しないと信じられていた時代があった(非特許文献1)。

【非特許文献1】Corrigan J.J., Science 164:142-149 (1969)

【 0 0 0 4 】

しかし、ヒトを含む哺乳類におけるD - アミノ酸の存在とその役割については、近年の光学分割法をはじめとする分析法の進歩によってようやく明らかになってきた(非特許文献2)。D - アスパラギン酸は抗D - アスパラギン酸抗体を用いた二重染色法などにより、ラット下垂体においてプロラクチン産生細胞に局在することが明らかになった。また、ラット下垂体由来の細胞株でプロラクチンを合成、分泌する細胞にD - アスパラギン酸を与えることによりプロラクチン分泌が用量依存的に増加した。以上のことからプロラクチン産生細胞においてD - アスパラギン酸がプロラクチンの分泌を制御していると考えられている(非特許文献3)。

【非特許文献2】Hamase K, Morikawa A, and Zaitso K., J Chromatogr B 781: 73-91 (2002)

【非特許文献3】D'Aniello Aら、FASEB J 14: 699-714 (2000)

【 0 0 0 5 】

一方、ラット精巣の静脈では他の静脈血よりも常に高濃度のD - アスパラギン酸が検出されていることに加え、ラット精巣から単離、精製したLeydig細胞にD - アスパラギン酸を加えることによりテストステロンの合成及び分泌が用量依存的に促進されることが報告されている(非特許文献4)。

【非特許文献4】Nagata Yら、FEBS Lett. 444:160-164 (1999)

【 0 0 0 6 】

D - セリンは統合失調症に関連すると推察されているNMDA受容体のグリシン結合部位を選択的に刺激し、グルタミン酸の本受容体を介する作用を増強することで神経伝達を促進することが報告されている(非特許文献5)。実際にD - セリンの投与により統合失調症が改善することや、統合失調症患者では血清中のD - セリン濃度が健常者よりも低いことが報告されている。

【非特許文献5】Nishikawa T, Biol. Pharm. Bull. 28: 1561-1565 (2005)

【 0 0 0 7 】

皮膚科学との関連のある知見として、D - アスパラギン酸が水晶体のようなタンパク質のターンオーバーが起こりにくい組織に存在するとの報告がある(非特許文献6)。また、D - アスパラギン酸は皮膚では老齢の被検者の日焼けした皮膚の弾性繊維には含まれるが、日焼けしていない皮膚の弾性繊維には含まれないことから、皮膚の弾性繊維におけるD - アスパラギン酸形成にUV曝露が強い関連があることを示唆する報告がある(非特許文献7)。

【非特許文献6】Fujii N, Biol. Pharm. Bull. 28: 1585-1589 (2005)

【非特許文献7】Fujii N.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, 1047-1051 (2002)

【 0 0 0 8 】

しかしながらヒトを含む哺乳類におけるD - アミノ酸の存在及び役割を探るうえで大きい障害は、D - アミノ酸が速やかに分解されてしまうことである。D - アミノ酸の分解で

10

20

30

40

50

は、まず、D - アミノ酸がD - アミノ酸オキシダーゼ (E C 1 . 4 . 3 . 3、以下では「D A O酵素」という。)によって酸化脱アミノ化されて、対応する α -ケト酸に変換される。その後 α -ケト酸はトランスアミナーゼによって対応するL - アミノ酸に変換される。D A O酵素はD - アミノ酸だけを特異的に酸化する酵素で、腎臓その他の臓器で発現する (非特許文献 8)。

【非特許文献 8】Hamase K., Konno R., Morikawa A. and Zaitu K., Biol. Pharm. Bull. 28: 1578-1584 (2005)

【0009】

D A O酵素はマウスでは第5染色体上のD a o 1 遺伝子にコード化されるが、この遺伝子のミスセンス突然変異体はd d Yマウスで報告された (非特許文献 9)。この突然変異遺伝子 (D a o ^c 又はD a o ^{G 1 8 1 R}) では、第181番目のG l y 残基がA r g 残基に置換されており、酵素活性を失ったタンパク質が産生される。したがってD A O酵素活性を失活した表現型は劣性遺伝する。劣性ホモ接合体の個体 (以下、「D A O酵素欠損マウス」という。) ではD - アラニン及びD - セリンの血中濃度が5ないし8倍に上昇し、運動失調 (a t a x i a) 及び常套行動 (s t e r e o t y p i c b e h a v i o r) を示す (非特許文献 1 0)。D A O酵素欠損マウスと他の疾患モデルマウスとの交配実験については報告がない。

【非特許文献 9】Konno R. and Yasumura Y., Genetics 103: 277-285 (1983)

【非特許文献 1 0】Hashimoto A., Yoshikawa M., Niwa A. and Konno R., Brain Res. 1033:210-215 (2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

D A O酵素欠損マウスと他の疾患モデルマウスとの交配実験で生産される多数の動物からD a o ^{G 1 8 1 R} / D a o ^{G 1 8 1 R} のホモ接合体を迅速に選別する必要がある。またD - アミノ酸の存在量はL - アミノ酸の存在量の約1%以下しかない場合があるため、微量のD - アミノ酸を大量のL - アミノ酸から分離して検出する必要がある。さらに、多数のマウス個体由来のサンプルや、多数の異なる組織由来のサンプルや、多数の試験条件に曝露されたサンプルに含まれるD - アミノ酸を迅速に定量測定する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明はマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法を提供する。前記評価スクリーニング方法は、(1) D a o 1 ⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、D a o 1 ⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとを用意するステップと、(2) 前記D a o 1 ⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、前記D a o 1 ⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露するステップと、(3) 前記D a o 1 ⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、前記D a o 1 ⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露したことによる影響を分析するステップとを含む。

【0012】

本発明の評価方法において前記ステップ (1) は、D a o 1 ⁺ / ⁺、⁺ / ⁻ 及び / 又は ⁻ / ⁻ の遺伝子型の判定方法によって、前記D a o 1 ⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、前記D a o 1 ⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとを選別する場合がある。前記判定方法は、D a o 1 ⁺ / ⁺、⁺ / ⁻ 及び / 又は ⁻ / ⁻ の遺伝子型のマウスを個体識別するステップと、前記個体識別されたマウス個体のそれぞれから染色体D N A を抽出するステップと、前記抽出された染色体D N A のうち第7エクソンを含む領域を増幅して増幅D N A 断片を得るステップと、前記増幅D N A 断片をH p a I I 制限酵素で消化するステップと、前記増幅D N A 断片の制限酵素消化産物を分析するステップとを含む場合がある。

【0013】

本発明の評価方法において前記増幅D N A 断片を得るステップは、配列番号1及び2に

10

20

30

40

50

列挙されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することを含む場合がある。

【0014】

本発明の評価方法において、前記 $D a o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $D a o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとは、他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一である場合がある。

【0015】

本発明の評価方法において、前記他の遺伝子の対立遺伝子の組合せは $H r^{- / -}$ を含む場合がある。

【0016】

前記ステップ(3)は、前記ステップ(2)の前に、前記 $D a o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $D a o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD-アミノ酸含有量を測定すること、前記ステップ(2)の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記 $D a o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $D a o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD-アミノ酸含有量を測定すること、及び、前記ステップ(2)の前に測定されたD-アミノ酸含有量と、前記ステップ(2)の後に測定されたD-アミノ酸含有量とを比較することを含む場合がある。

【0017】

本発明の評価方法において、前記D-アミノ酸含有量は、光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定される場合がある。

【0018】

本発明の評価方法において、前記D-アミノ酸含有量は、光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって測定される場合がある。

【0019】

本発明の評価方法によってマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響が評価されるD-アミノ酸はD-プロリンの場合がある。

【0020】

前記D-アミノ酸含有量を測定する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞は、真皮、表皮、腎臓、膵臓、精巣、副腎、小脳、下垂体及び血清からなるグループから選択される1種または2種以上の生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞の場合がある。

【0021】

本発明の評価方法によってマウスの生体組織又は該生体組織に対する試験条件による影響が評価されるD-アミノ酸はD-プロリンであり、該D-プロリンは光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定され、前記生体組織は真皮又は表皮である場合がある。

【0022】

本発明は、本発明の評価方法を実施するための評価システムを提供する。前記評価システムは、 $D a o 1^{+ / +}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $D a o 1^{- / -}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、配列番号1及び2に列挙するヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、プロリンの光学異性体を識別する光学分割カラムとを含む。

【0023】

本発明は、医薬品及び/又は化粧料の候補物質を本発明の評価システムによって評価することを特徴とする、医薬品及び/又は化粧料の候補物質のスクリーニング方法を提供する。

【0024】

本明細書において $D a o 1$ と表記される遺伝子は、D-アミノ酸オキシダーゼ1というマウスの遺伝子であって、米国ジャクソン研究所の Mouse Genome Informatics プロジェクトのホームページ (<http://www.informatics.jax.org/javawi2>

10

20

30

40

50

/servlet/WIFetch?page=markerDetail&key=7803) に詳細な説明が公開されている。D a o 1 遺伝子の突然変異としてはD a o 1^{G 1 8 1 R}が知られている (http://www.informatics.jax.org/searches/allele_report.cgi?Marker_key=7803&int:_Set_key=847160)。本発明におけるD a o 1⁻の遺伝子型は、D a o 1^{G 1 8 1 R}を含むが、これに限定されない、いずれかのD - アミノ酸デオキシダーゼ1の酵素活性欠失突然変異アレルの遺伝子型を意味する。本発明におけるD a o 1⁺の遺伝子型は、D - アミノ酸デオキシダーゼ1酵素について野生型、すなわち、D a o 1 遺伝子がコード化するタンパク質の第181番目のアミノ酸残基がグリシンである酵素と同じか、あるいは、実質的に同じであって、D - アミノ酸の分解が野生型と同じか、あるいは、実質的に同じ程度に進行するアレルの遺伝子型を意味する。

10

【0025】

本発明におけるD a o 1⁺及び⁻の遺伝子型を有するマウスは、他のいずれかの遺伝子のアレルを有する場合がある。前記他の遺伝子は、ホモ接合体が特異的な表現型を有する場合もあれば、ヘテロ接合体が特異的な表現型を有する場合もある。したがって、本発明において、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一であるような条件下で、D a o 1^{+/+}の遺伝子型を有するマウスと、D a o 1^{-/-}の遺伝子型を有するマウスとでマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD - アミノ酸含有量に対する試験条件による影響の評価を行う場合がある。前記試験条件による影響は、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個についての対立遺伝子の第1の組合せの表現形質と、該対立遺伝子の第2の組合せの表現形質とに対するD a o 1 遺伝子型の作用の相違に対する前記試験条件による影響の場合がある。

20

【0026】

前記他の遺伝子は、疾患モデルの表現型を示す場合の他、D - アミノ酸の合成又は分解の代謝経路に関与する遺伝子や、老化、免疫、ストレス反応、栄養、運動、感覚、記憶、行動、血液循環、消化、排泄、生殖その他のマウスの各臓器又は全身の健康に関係するいかなる遺伝子でも構わない。前記他の遺伝子は、例えば、肥満マウス(Lep^{ob}/Lep^{ob})、胸腺依存性免疫不全マウス(Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu})、老化促進マウス(Senescence Accelerated Mouse、SAMP1/Tas1c、SAMP6/Tas1c、SAMP8/Tas1c及び/又はSAMP10/Tas1c)関節炎自然発症マウス(Laq1^{MR L}/Laq1^{MR L})及びヘアレスマウス(Hr^{hr}/Hr^{hr})を含むがこれらに限定されない疾患モデルマウスの原因遺伝子の場合がある。Hr 遺伝子の産物は、ジョンス・ホプキンス大学のOnline Inheritance of Manというホームページによれば、体毛形成に関与する転写因子であると考えられている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=602302>)。前記Mouse Genome Informaticsプロジェクトのホームページによれば、マウスでは、Hr^{hr}のようなMLVプロウイルスの挿入による自然発生突然変異体の他、トランスジーン挿入その他による偶発的に作成された突然変異体やノックアウトマウスなど、いくつかのアレルが報告されている (<http://www.informatics.jax.org/imsr/fetch?page=imsrSummary&op:gsymname=%3D&gsymname=Hr&gsymnameBreadth=C>)。本発明におけるHr⁻の遺伝子型は、Hr^{hr}を含むが、これに限定されない、いずれかのHr 遺伝子産物の機能欠損により、Hr^{hr}のホモ接合体の成体には体毛がない遺伝子型を意味する。

30

40

【0027】

本発明において、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一であるような条件下でD - アミノ酸含有量に対する試験条件による影響の評価を行う場合には、本発明の評価方法におけるステップ(1)では、D a o 1^{+/+}、^{+/ -}及び/又は^{-/-}遺伝子型の判定方法に加えて、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について遺伝子型を判定することを含む場合がある。

【0028】

本発明の評価方法におけるステップ(1)がD a o 1^{+/+}、^{+/ -}及び/又は^{-/-}

50

遺伝子型の判定方法によって選別される場合において、マウスの個体識別は、マウスの飼育ケージ及び/又はマウスの身体を標識することによって行われる。マウスの身体の標識は、耳のパンチング、高周波その他の標識用チップの体内への埋め込みその他当業者に周知のいかなる方法を用いても構わない。

【0029】

本発明の評価方法のステップ(1)における $Dao1^{+/+}$ 、 $^{+/-}$ 及び/又は $^{-/-}$ 遺伝子型の判定は、いかなる手順で行っても構わない。 $Dao1$ 遺伝子型の判定は、少量の生体組織その他の生物学的材料を各マウス個体から回収して、これに含まれる $Dao1$ 遺伝子又はその遺伝子産物を解析することによって行われる。好ましい $Dao1$ 遺伝子型の判定方法は、 $Dao1$ 遺伝子産物の第181番目のアミノ酸残基をコード化する $Dao1$ 遺伝子配列を弁別することができる方法である。マウス個体からの染色体DNA回収と、 $Dao1$ 遺伝子型の解析とは当業者に周知ないかなる方法を用いても構わない。 $Dao1$ 遺伝子型の解析には、PCR法、SMAF法、LAMF法等の遺伝子増幅法を用いる場合がある。 $Dao1$ 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、染色体DNA又は増幅されたDNAに対する特定の制限酵素の切断の有無の他、オリゴヌクレオチドプライマーの違いによる増幅の有無によって行われる場合がある。前記特定の制限酵素の切断の有無及び/又は増幅の有無は、増幅されたDNAを分離したり、制限酵素消化後の染色体DNAを分離した後、前記特定の制限酵素の切断部位の切断の有無を検出可能なプローブを用いたザンブロット法により該プローブと反応する電気泳動バンドパターンを得ることによっておこなっても構わない。好ましい $Dao1$ 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、以下に説明する遺伝子増幅法である。

【0030】

本発明の評価方法における遺伝子増幅法による $Dao1$ 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、 $Dao1$ 遺伝子の突然変異部位を制限酵素 $HpaI$ が認識することを利用する。図1は本発明の $Dao1$ 遺伝子型の判定方法に関するヌクレオチド配列のアライメント図である。図1は、 $Dao1$ 遺伝子の染色体DNA配列 ($Dao1_{genomic}$) のうち $Dao1$ 遺伝子の転写開始点から15111番目の塩基と15460番目の塩基との間の野生型配列(配列表の配列番号4)と、 $Dao1^{G181R}$ 突然変異体における点突然変異(転写開始点から15223番目のグアニンがアデニンに置換される。)を含む第7エクソン部分のcDNAの野生型配列(配列表の配列番号3の625番目ないし726番目の塩基)と、本発明の実施例で用いる遺伝子増幅用プライマー(Forward primer(配列番号1)及びReverse primer(配列番号2))と、制限酵素 $HpaI$ の認識配列とのアライメント結果を示す。なお、リバース・プライマー配列の逆相補体配列(Reverse primer*)を配列表に配列番号5として列挙した。図2は本発明の $Dao1$ 遺伝子型の判定方法に用いるDNA領域の $HpaI$ 制限酵素地図である。野生型染色体DNAの第7エクソンには3カ所 $HpaI$ 切断部位(下向き矢印)が存在する。このうち最も5'末端側の $HpaI$ 認識配列(CCGG)は、 $Dao1^{G181R}$ 突然変異型マウス染色体DNAではCCAGとなり、 $HpaI$ によって認識されない(*)。第7エクソン領域は、第6イントロンに位置するフォワード・プライマー(Forward)と、第7イントロンに位置するリバース・プライマー(Reverse)とによって増幅される。野生型マウスゲノムDNA由来の増幅産物(Wild type)と、前記突然変異型マウスゲノムDNA由来の増幅産物($Dao1^{G181R}$)とを $HpaI$ で消化すると、それぞれ、3カ所及び2カ所で切断される。

【0031】

本発明の評価方法におけるD-アミノ酸含量の測定は、当業者に周知ないかなる方法を用いて実施しても構わない。例えば、予めo-フタルアルデヒド(OPA)、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-システイン(Boc-L-Cys)その他の修飾試薬で立体異性特異的にD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS-80TsQAのような分析カラムを用いて100mMの酢酸塩緩衝液(pH6.0)とアセトニトリルの混液をグラジエント溶離して分離する方法が、アスパラギン酸、セリン及びアラニンのD型及びL型の同時測定に用いることができる。また、予め4-フルオロ-7-ニトロ-

10

20

30

40

50

2, 1, 3 - ベンゾキサジアゾール (NBD - F) のような蛍光試薬で D - 及び L - アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS - 80TsQA、Mightysil RP - 18GP 等のような分析カラムを用いて立体異性非特異的に各アミノ酸を分離した後、Pirkle 型キラル固定相カラム (例えば Sumichiral OA - 2500S 又は R) を用いて光学分割して立体異性特異的に分離する方法が、プロリン、ロイシンその他のアミノ酸の微量測定に用いることができる (浜瀬健司及び財津潔、分析化学、53 巻、677 - 690 (2004))。本明細書における光学分割カラム系とは、少なくとも光学分割カラムを用いる分離分析系をいい、光学分割カラム以外の分析カラムによる分離分析を含む場合がある。代替的には、アミノ酸の光学異性体を識別するモノクローナル抗体、例えば D - ロイシン、D - アスパラギン酸等に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって D - アミノ酸を定量することができる (特願 2008 - 27650 明細書)。

10

【0032】

本発明における試験条件とは、被験動物に全身的又は局部的に物理的、化学的及び/又は生物学的な処理条件をいう。前記物理的な処理には、紫外線及び赤外線を含む光線や電磁波、音響、振動及び無重力を含む加速度、温度、温水又は冷水による水浴、乾燥又は湿潤等を含むがこれらに限定されない。化学的な処理には、水素イオン、無機物質及び/又は有機物質の適用を含むがこれらに限定されない。生物学的な処理には、食餌、水等の摂取、明暗周期、ケージ面積、ケージの種類、同一ケージに飼育する動物個体数その他の飼育環境、薬物の投与等を含むがこれらに限定されない。本発明における試験条件は、前記のいずれかの処理又はその組合せの場合があり、それぞれの処理を連続的及び/又は断続的に施す場合がある。

20

【0033】

本発明の評価方法における D - アミノ酸含量の測定において、「前記ステップ (2) の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記 Da o 1⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、前記 Da o 1⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること」は、前記試験条件への曝露が終了した後 D - アミノ酸含有量を測定する場合と、前記試験条件への曝露の途中で D - アミノ酸含有量を測定する場合とを含む。

30

【0034】

本発明の評価方法によると、Da o 1⁺ / ⁺ の遺伝子型を有するマウスと、Da o 1⁻ / ⁻ の遺伝子型を有するマウスとに由来する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞のさまざまな特性に対する前記試験条件による影響を評価することができる。かかる特性は、D - アミノ酸含有量の変動と、D - アミノ酸と代謝経路で関連する他の物質、例えば、L - アミノ酸、ケト酸等の含有量の変動と、これらの物質の代謝、消化吸収、分解排泄に係る消化器、肝臓、腎臓、循環器等の生理的及び/又は病理的特性との他、花粉、ハウスダストその他に対するアレルギー、アトピー、皮膚その他の臓器の移植免疫を含むがこれらに限定されない免疫に関連する特性の変動と、微生物の感染又は微生物との共生に関連する特性の変動と、行動、記憶、感覚その他の神経生物学的な特性の変動と、癌及び/又は細胞増殖の亢進及び/又は抑制に関連する特性の変動と、皮膚その他の臓器における加齢に関する特性、例えば、シワ、脱毛等に関する特性と、保湿性、バリア特性、その他の皮膚の健康及び/又は美容に関連する特性とに対する前記試験条件による影響を評価することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】本発明の Da o 1 遺伝子型の判定方法に関するヌクレオチド配列のアライメント図。

【図 2】本発明の Da o 1 遺伝子型の判定方法に用いる DNA 領域の Hpa I I 制限酵素地図。

【図 3 - 1】Da o 1 酵素活性から確認済みの Da o 1⁺ / ⁺ ホモ接合体マウス (第 1 レ

50

ーン)、 $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$ ホモ接合体マウス(第4レーン)及び $Da o 1^{+ / G 1 8 1 R}$ F1世代ヘテロ接合体マウス(第2及び3レーン)の染色体DNA由来の増幅産物のHpaII分解断片の電気泳動パターン。

【図3-2】ヘアレスマウス($H r^{h r} / H r^{h r}$ 、 $Da o 1^{+ / +}$)と、 $Da o 1$ 酵素欠損マウス($H r^{+ / +}$ 、 $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$)の交配のF2世代でヘアレス表現型を有するF2世代のマウス個体12匹の染色体DNA由来の増幅産物のHpaII分解断片の電気泳動パターン。

【図4-1】プロリン及び4-ヒドロキシプロリンの光学異性体。

【図4-2】プロリン及び4-ヒドロキシプロリンの光学異性体を同時に分析するシステムのカラム流路図。

【図5】プロリン及び4-ヒドロキシプロリンの光学異性体を同時に分析するシステムの第1及び第2カラムの溶出パターンの波形図(D1及びD2)。

【図6-1】 $Da o 1$ 遺伝子の野生型ホモ接合体マウス($Da o 1^{+ / +}$)血清中のL-型及びD-型プロリンの光学分割カラムの溶出パターン。

【図6-2】 $Da o 1$ 酵素活性欠損型ホモ接合体マウス($Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$)血清中のL-型及びD-型プロリンの光学分割カラムの溶出パターン。

【図7-1】遺伝子型が $Da o 1^{+ / +}$ 及び $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$ と判定された個体のさまざまな臓器でのD-プロリン存在量を示す棒グラフ。

【図7-2】真皮におけるD-プロリン存在量を比較した棒グラフ。

【図8】 $Da o 1$ 酵素欠損マウスにおける腫瘍細胞の増殖を検討した棒グラフ。

【発明を実施するための形態】

【0036】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の技術的範囲は請求の範囲の記載によって限定されるものであって、本発明の実施例は例示にすぎない。

【実施例1】

【0037】

$Da o 1^{+ / +}$ 、 $+ / -$ 及び $- / -$ 遺伝子型の判定方法の開発

$Da o 1^{G 1 8 1 R}$ は、配列番号3に列挙する $Da o 1$ 遺伝子のcDNAのヌクレオチド配列のうち第661番目のグアニンがアデニンに置換される突然変異である。そのため、野生型では制限酵素HpaIIの切断配列(CCGG)になるのに対し、 $Da o 1^{G 1 8 1 R}$ 突然変異体ではCCAGとなり切断されない。ここで突然変異部位を含む第625-726番目のヌクレオチドは第7エクソンに含まれるから(GenBankエントリー番号NM_010018.2)、染色体DNAでもHpaII切断部位の有無によって野生型か突然変異型かを識別することができる。

【0038】

離乳後のマウスを個体識別したうえ、各マウス個体の尾から市販の哺乳類ゲノムDNAミニプレップキット(シグマ、G1N70-1KT)を用いて染色体DNAを抽出・精製した。フォワード・プライマーとして第6イントロンに位置する配列番号1のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、リバース・プライマーとして第7イントロンに位置する配列番号2のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。市販の反応混合液(プロメガ、M7122)を用いて、(1)94°C、4分間、1回、(2)94°C、30秒間、55°C、30秒間、72°C30秒間、40回、(3)72°C、10分間、1回(4)4°C、保存という熱サイクル設定でマウス染色体DNAを増幅した。PCR反応産物は、市販のキット(キアゲン、28104)を用いて精製され、HpaII(トヨボ、HPA201)存在下で37°C、3時間インキュベーションして制限酵素処理された。70°C、5分間の加熱により制限酵素を不活性化させた後、市販の電気泳動マイクロチップ(アジレント、2100バイオアナライザ)によりDNA断片の長さを分析した。

【0039】

図3-1は、 $Da o 1$ 酵素活性から確認済みの $Da o 1^{+ / +}$ ホモ接合体マウス(第1

10

20

30

40

50

レーン)、 $Dao1^{G181R/G181R}$ ホモ接合体マウス(第4レーン)及び $Dao1^{+/G181R}$ F1世代ヘテロ接合体マウス(第2及び3レーン)の染色体DNA由来の増幅産物のHpaII分解断片の電気泳動パターンである。図3-1からわかるとおり、 $Dao1^{+}$ 遺伝子の染色体DNAからは95bpのDNA断片が得られ、 $Dao1^{G181R}$ 遺伝子の染色体DNAからは107bpのDNA断片が得られるので、野生型ホモ接合体、突然変異型ホモ接合体及びヘテロ接合体は明瞭に判別できた。図3-2は、ヘアレスマウス($Hr^{h/r}/Hr^{h/r}$ 、 $Dao1^{+}/+$)と、 $Dao1$ 酵素欠損マウス($Hr^{+}/+$ 、 $Dao1^{G181R/G181R}$)の交配のF2世代でヘアレス表現型を有するF2世代のマウス個体12匹について $Dao1$ 遺伝子判定を行った結果である。表1はヘアレス表現型を有するF2世代のマウス個体138匹についての $Dao1$ 遺伝子型及び性別を整理した表である。

10

【0040】

【表1】

F2世代ヘアレスマウス($Hr^{-/-}$)					
Dao1 ^{+/+}		Dao1 ^{+/-}		Dao1 ^{-/-}	
39		55		44	
F	M	F	M	F	M
18	21	31	24	22	22

20

Fはメス、Mはオスである。

【0041】

以上のとおり、本判定方法により、多数のマウス個体の $Dao1$ 遺伝子型を速やかに判定することが可能になった。

【実施例2】

【0042】

プロリン及び4-ヒドロキシプロリンの光学異性体の定量分析方法の開発

プロリン及び4-ヒドロキシプロリンは皮膚コラーゲンに多く含まれる。そこでプロリン及び4-ヒドロキシプロリンの両方について同時に全ての光学異性体を分離して定量的に分析することができる方法を開発した。

【0043】

図4-1は、プロリン及び4-ヒドロキシプロリンの光学異性体を示す。プロリンの光学異性体はL-型かD-型かの2種類だけだが、4-ヒドロキシプロリンの光学異性体は、L-型かD-型かの違いに加えて、トランス型かシス型かの違いにより合計4種類ある。まず、蛍光試薬NBD-Fでアミノ酸を誘導体化して蛍光標識した。その後、図4-2に示すように第1カラムで逆相分離クロマトグラフィを行い、トランス-4-ヒドロキシプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン及びプロリンの各ピークを検出した。そして、前記各ピークの分画をカラムスイッチングバルブを用いて分取して第2カラムに導いて光学分割クロマトグラフィを行った。

40

【0044】

図5の1Dの波形図は流速40 μ L/分の溶媒を用いたモノリシックODSカラムの溶出パターンを470nmの励起光を照射して530nmの蛍光発光で検出したものである。2Dの波形図は、1Dの溶出パターンのトランス-4-ヒドロキシプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン及びプロリンの各ピークを自動的に検出してバルブ切り替えを行って各ピークの分画だけをQN-2-AXカラムに導いて光学分割クロマトグラフィを行った結果である。

50

【 0 0 4 5 】

図 6 - 1 の波形図は、D a o 1 遺伝子の野生型ホモ接合体マウス (D a o 1 ⁺ / ⁺) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターンであり、図 6 - 2 の波形図は、D a o 1 酵素活性欠損型ホモ接合体マウス (D a o 1 ^{G 1 8 1 R} / ^{G 1 8 1 R}) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターンである。D - プロリンは D a o 1 野生型ホモ接合体マウスではほとんど検出できなかったが、D a o 1 酵素活性欠損型ホモ接合体マウスでは明確に検出することができた。

【 0 0 4 6 】

図 7 - 1 は実施例 1 で判別されたヘアレスマウスと D a o 1 酵素活性欠損マウスの交配の F 2 世代のヘアレスマウスのうち、遺伝子型が D a o 1 ⁺ / ⁺ 及び D a o 1 ^{G 1 8 1 R} / ^{G 1 8 1 R} と判定された個体のさまざまな臓器での D - プロリン存在量を比較した結果であり、図 7 - 2 は真皮における D - プロリン存在量を比較した結果である。図 7 - 1 のグラフの縦軸の単位は、血清については p m o l / μ L、その他の組織では p m o l / m g であった。図 7 - 2 のグラフの縦軸の単位は n m o l / μ g D N A であった。ともに、それぞれ 5 匹のマウスの臓器の測定値の平均と標準誤差 (S E) を表す。血清の他、下垂体、副腎、膵臓及び真皮においても D a o 1 酵素活性欠損マウスでは野生型マウスより数倍以上多くの D - プロリンが存在した。また、D a o 1 酵素活性野生型マウスの小脳、腎臓及び肝臓では D - プロリンはほぼ検出されなかったが D a o 1 酵素活性欠損マウスでは D - プロリンが明確に検出された。D a o 1 酵素活性欠損マウスの精巣における D - プロリン量は野生型マウスに比べて少し多いだけで顕著な差がみられなかった。皮膚においても D a o 1 酵素活性欠損マウスでは D - アミノ酸含量が野生型より多いことは今回初めて明らかになった。今後皮膚における D - アミノ酸含量への紫外線照射や加齢による影響が明らかになる。なお、今回の分析では、D - 4 - ヒドロキシプロリンの含有量についてはシス - 異性体及びトランス - 異性体のいずれも全組織において検出限界以下であった。

【 実施例 3 】

【 0 0 4 7 】

D a o 1 酵素欠損マウスにおける腫瘍増殖

Swiss Webster Sarcoma 180 株の肉腫細胞は 10 % ウシ胎児血清 (Irvine Scientific、ロット # 300A80601) 添加 D M E M (Sigma) 培地を用いて 5 % C O ₂、37 ° C の加湿条件下で培養した。1 x 10⁷ 個 / m L の懸濁液を調製し、D a o 1 酵素欠損マウス又は野生型マウスの右後肢フットパットの 0 . 0 5 m L ずつ皮内注射により移植した。移植後 1 週間ごとに腫瘍の長径、短径及び厚みをノギスで計測し、以下の式により腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (m m }^3\text{)} = \text{長径 (m m)} \times \text{短径 (m m)} \times (\text{厚み (m m)} - 3)$$

ここで厚みはもともとの足の厚みを 3 m m としてその差を腫瘍の厚みとした。

【 0 0 4 8 】

結果は図 8 に示す。図 8 は、D a o 1 酵素欠損マウスと対照マウスとについて、移植後 1、2 及び 3 週間経過時の腫瘍体積の変化を比較した棒グラフである。対照マウスでは移植後 1 週間ですでに 60 m m³ の腫瘍体積が 3 週間で 2 倍に増加していたのに対し、D a o 1 酵素欠損マウスでは、移植後 1 週間では腫瘍体積が約 20 m m³ しかなく、2 週間では 5 m m³ 程度まで減少し、3 週間では完全に消失した。この結果から、D a o 1 酵素欠損マウスでは移植された腫瘍の増殖を抑制し腫瘍を消失させる活性があることが明らかになった。

【 0 0 4 9 】

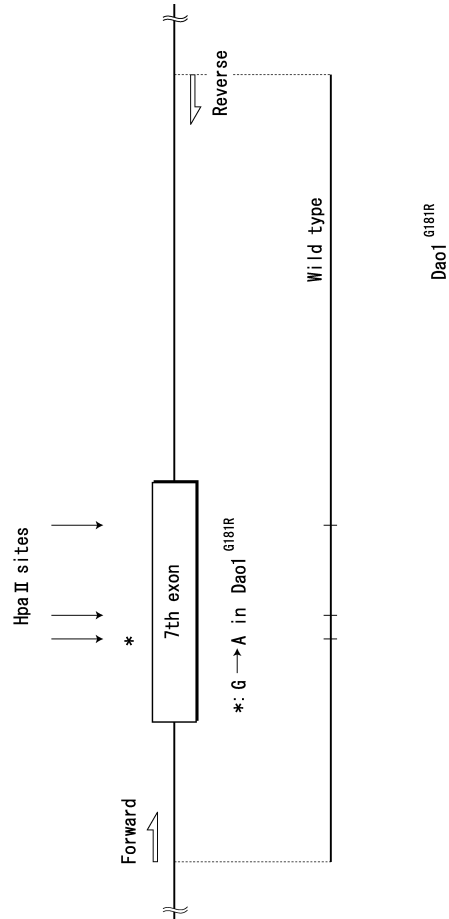
今回確立されたヘアレスマウスと D a o 1 酵素欠損マウスとの交配実験系は、エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、結節性多発動脈炎、ベーチェット病、関節リウマチ等の膠原病又は膠原病類縁疾患と、糖尿病と、光線皮膚炎と、接触皮膚炎と、じょく瘡と、しみ、くすみ、しわ、たるみ等のその他の皮膚所見とについて D - アミノ酸の果たす役割を解明するために今後大いに利用されることが期待される。

【 1 】

15111	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		-----	-----	-----	-----
Dao1_genomic		GAAGCTGGAG	GACAGAGGGG	AGAGGGCCACA	GCACAGTCCT
Forward primer		-----	-----	-----	TGCCCTTCC
Reverse primer*		-----	GGG	AGAGGGCCACA	GCACAGTC-----
15161	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		-----	-----	-----	-----
Dao1_genomic		TGTCCTGAC	TTGTTCTTGC	TGCCAGGTGG	CAAGAGGAGT
Forward primer		-----	-----	-----	GGATGTGATT
Reverse primer*		-----	-----	-----	GGATGTGATT
15211	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		ATCAACTGCA	CCGGGGTGTG	GGCCGGGGCC	CTGCAAGCAG
Dao1_genomic		ATCAACTGCA	CCGGGGTGTG	GGCCGGGGCC	CTGCAAGCAG
Forward primer		-----	-----	-----	ATGCTCCCT
Reverse primer*		-----	-----	-----	ATGCTCCCT
15261	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		GCAGCCAGGC	CGGGGCCAGA	TCATCCAG-----	-----
Dao1_genomic		GCAGCCAGGC	CGGGGCCAGA	TCATCCAGGT	GAGGAGACTC
Forward primer		-----	-----	-----	TGTGTCCAT
Reverse primer*		-----	-----	-----	-----
15311	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		-----	-----	-----	-----
Dao1_genomic		GAAGAGCTTG	CCCTGTCTGC	TTGCCCTGTG	CCACTCCAAA
Forward primer		-----	-----	-----	GCTGTGCCA
Reverse primer*		-----	-----	-----	-----
15361	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		-----	-----	-----	-----
Dao1_genomic		CTACAGGGTC	CATGTTGATG	GAGTGACTGC	AGACTTAGAG
Forward primer		-----	-----	-----	GAAGGGACTT
Reverse primer*		-----	-----	-----	-----
15411	HpaII	-----	-----	-----	-----
Dao1_cDNA		-----	-----	-----	-----
Dao1_genomic		ACTGAAGAAA	TAAAGACCAG	CCTACTCCCT	GGCCTGGTGT
Forward primer		-----	-----	-----	TCTGGGATTT
Reverse primer*		-----	-----	G	CCTACTCCCT

Dao1_cDNA: 7th exon of mouse Dao1 mRNA
 Dao1_genomic: chromosomal DNA near the Dao1^{G181R} mutation
 Reverse primer*: corresponding reverse complement
 G: A in Dao1^{G181R} mutant
 ↓: unable to digest in Dao1^{G181R} mutant

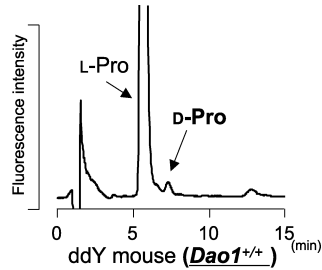
【 2 】



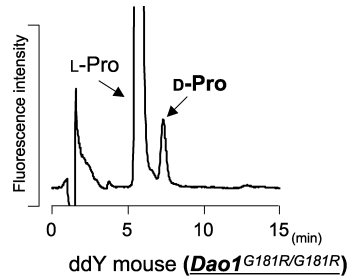
【 4 - 1 】

4-hydroxyproline (Hyp)	<i>cis</i> - form		<i>cis</i> -L-Hyp		<i>cis</i> -D-Hyp
	<i>trans</i> - form		<i>trans</i> -L-Hyp		<i>trans</i> -D-Hyp
proline (Pro)			L-Pro		D-Pro
			L-enantiomer		D-enantiomer

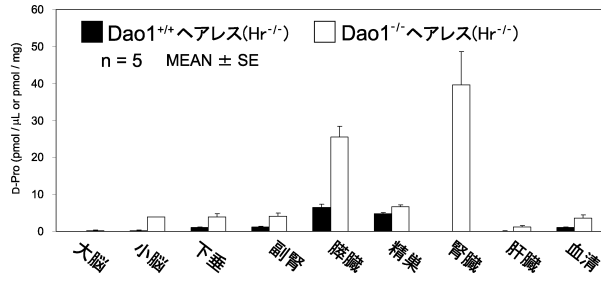
【 6 - 1 】



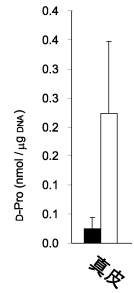
【 6 - 2 】



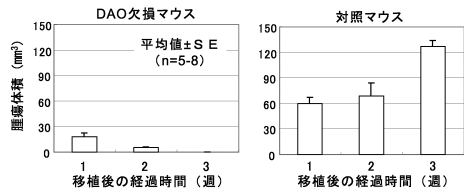
【図 7 - 1】



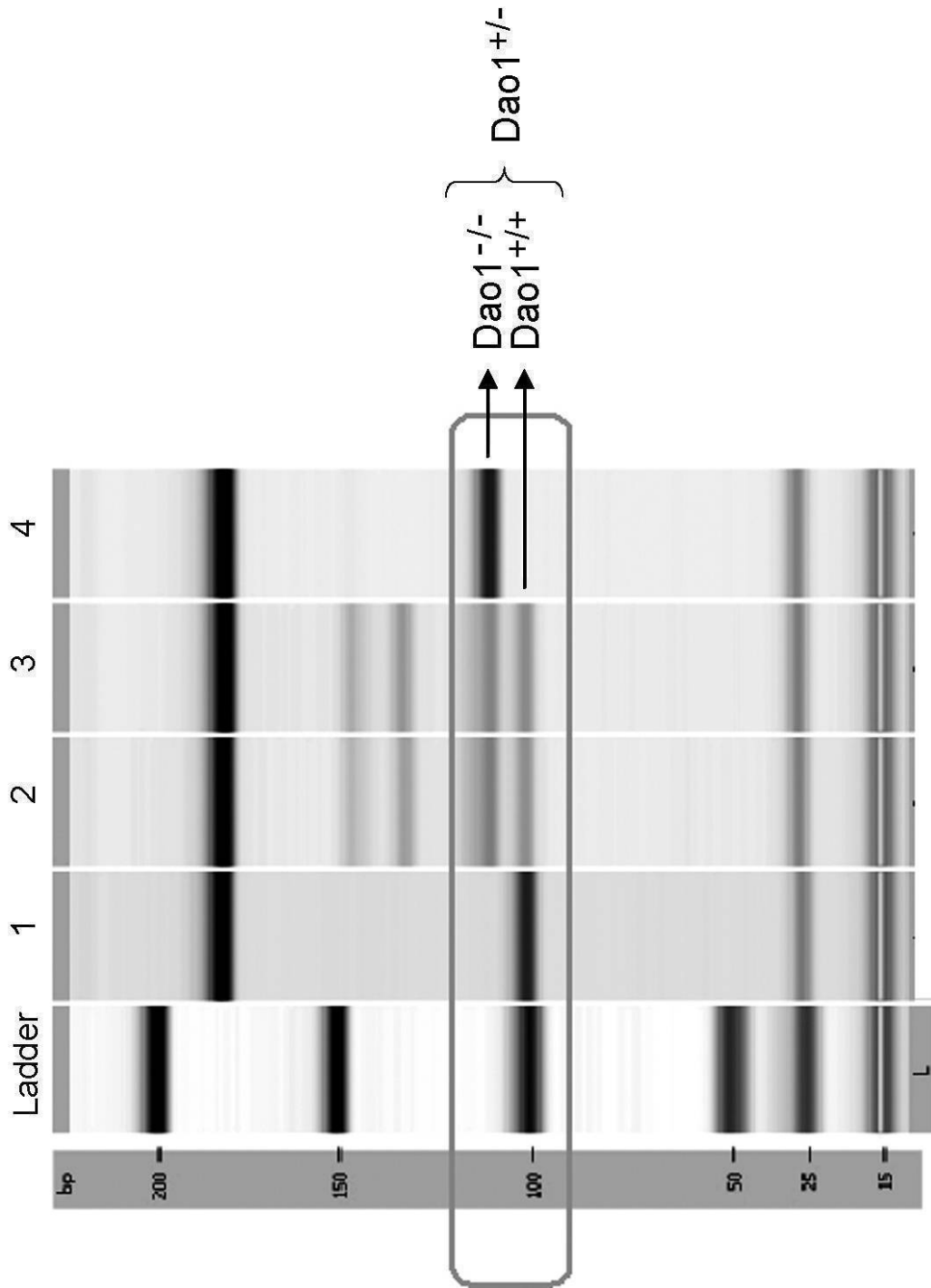
【図 7 - 2】



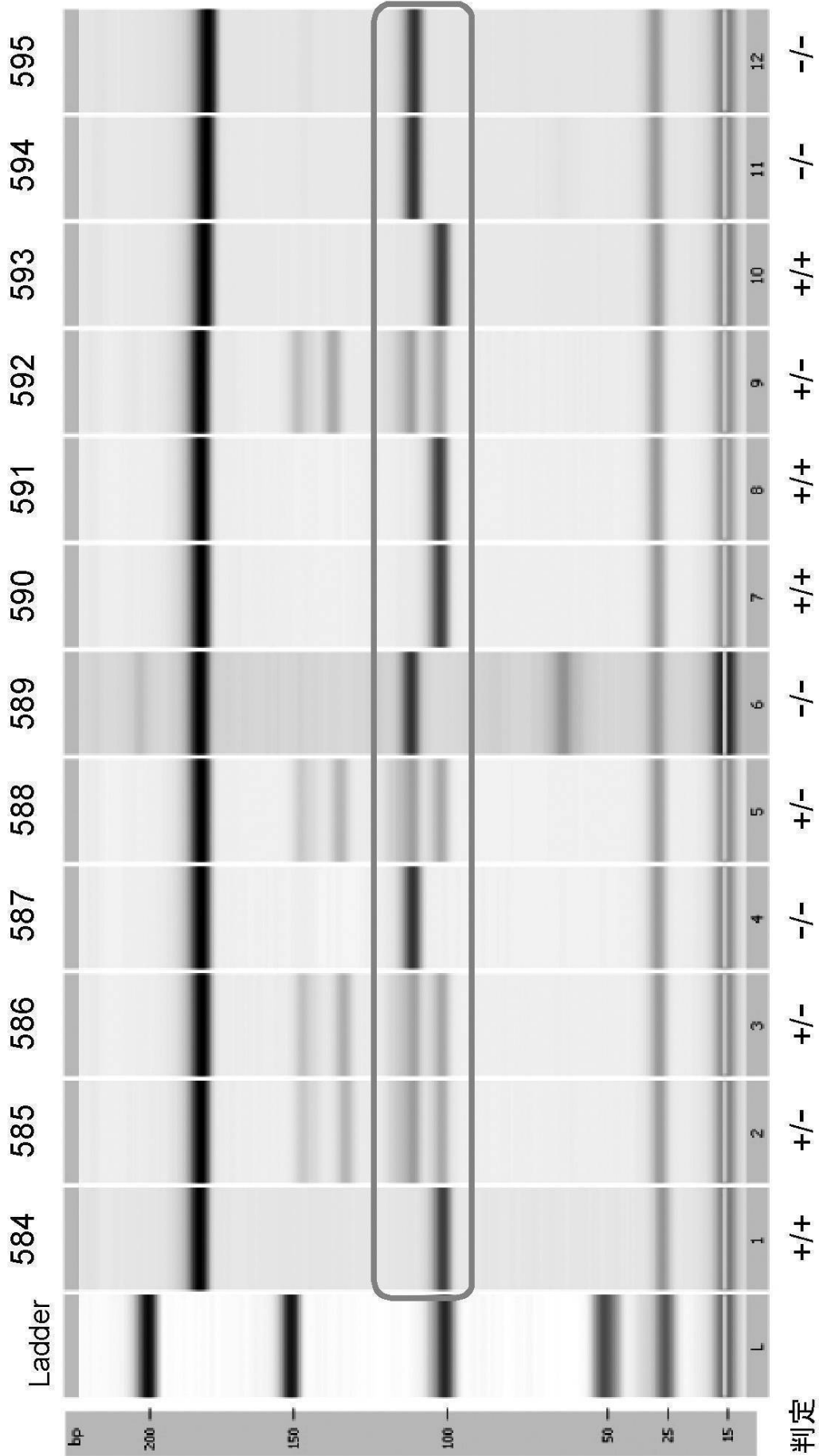
【図 8】



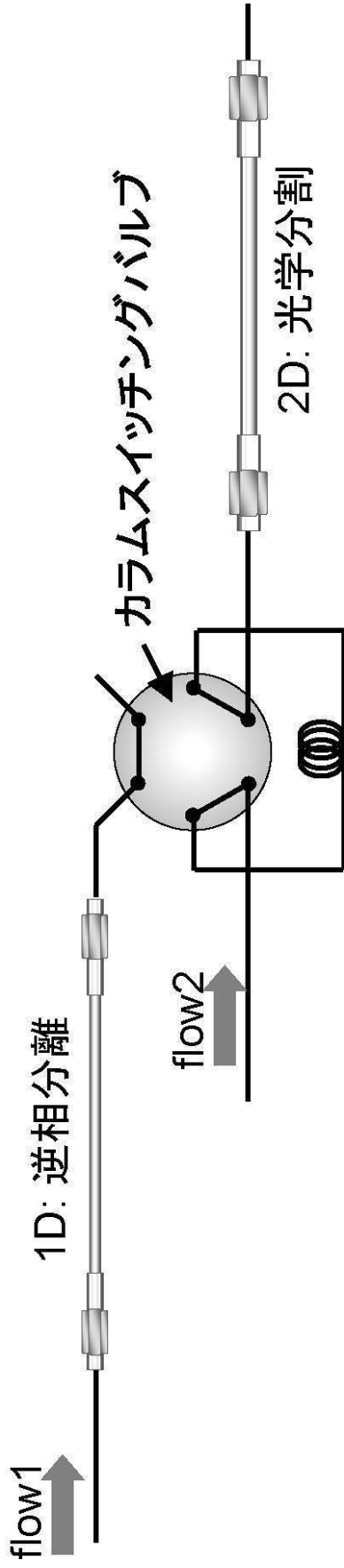
【 3 - 1 】



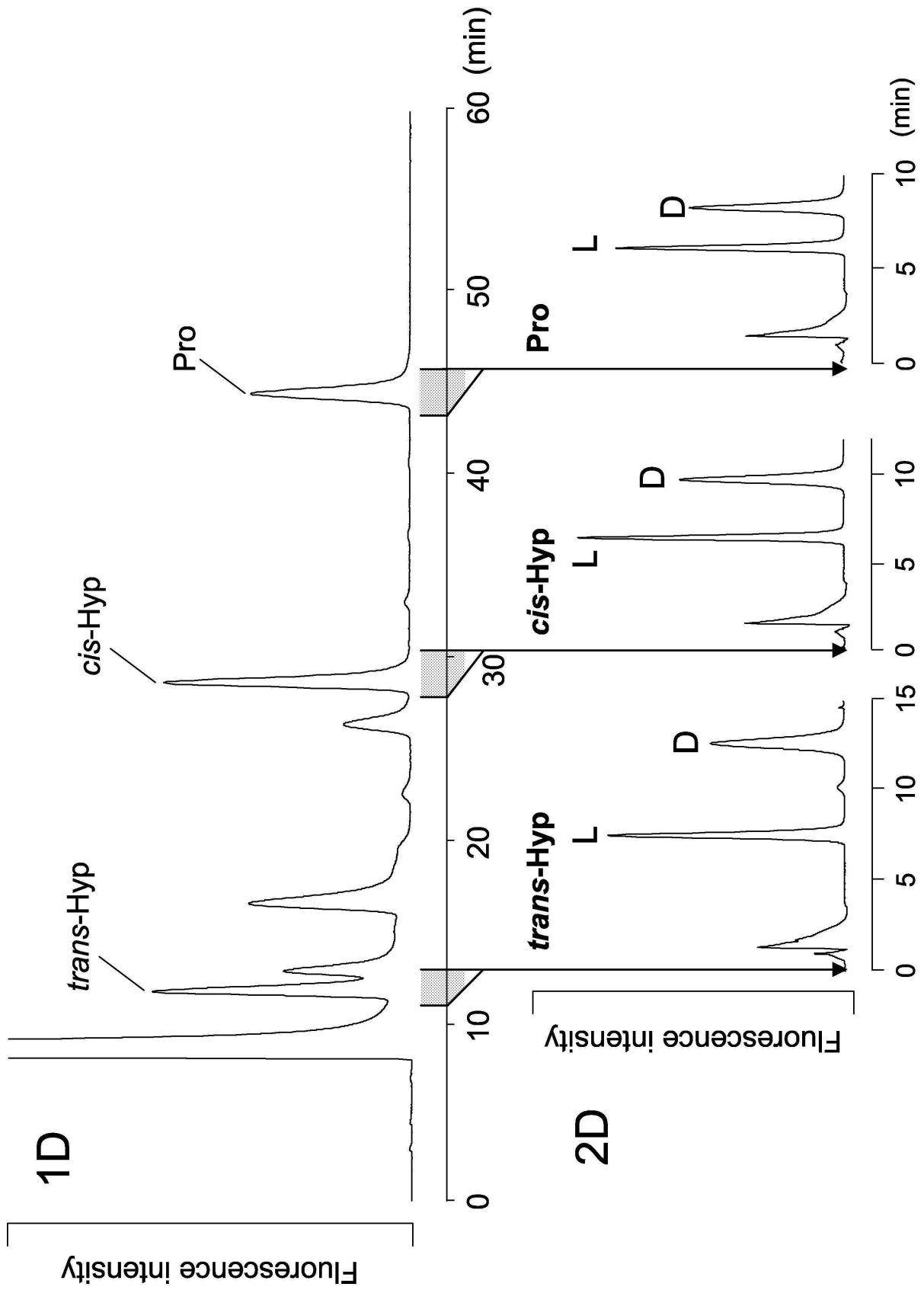
【 3 - 2 】



【 図 4 - 2 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0005639890000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 30/88	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	2 0 1 W
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 30/88	F
		C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 財津 潔
福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人 九州大学内
- (72)発明者 三田 真史
東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内
- (72)発明者 芦田 豊
神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内
- (72)発明者 東條 洋介
神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 MORIKAWA, A. et al., "Alterations in D-amino acid levels in the brains of mice and rats after the administration of D-amino acids.", AMINO ACIDS, 2007年, Vol.32, P.13-20
- HASHIMOTO, A. et al., "Mice lacking D-amino acid oxidase activity exhibit marked reduction of methamphetamine-induced stereotypy.", EUR. J. PHARMACOL., 2008年 5月, Vol.586, P.221-225
- TOJO, Y. et al., "Simple and rapid genotyping of D-amino acid oxidase gene using micro chip electrophoresis.", AMINO ACIDS, 2007年 9月, Vol.33, No.3, P.VII-VIII, 10th International Congress on Amino Acids and Proteins (ICAAP)
- OHGUSU, T. et al., "High-throughput determination of free D-aspartic acid in mammals by enzyme immunoassay using specific monoclonal antibody.", ANAL. BIOCHEM., 2006年, Vol.357, P.15-20
- HAMASE, K., "Sensitive two-dimensional determination of small amounts of D-amino acids in mammals and the study on their functions.", Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007年, Vol.55, No.4, P.503-510
- 金野柳一, 「D-アミノ酸酸化酵素活性欠損マウス」, 生化学, 2008年 4月25日, Vol.80, No.4, P.337-343
- NAGATA, Y. et al., "Amino acid levels in D-alanine-administered mutant mice lacking D-amino acid oxidase.", METABOLISM, 1994年 9月, Vol.43, No.9, P.1153-1157
- TOJO, Y. et al., "Automated and simultaneous two-dimensional micro-high-performance liquid chromatographic determination of proline and hydroxyproline enantiomers in mammals.", J. CHROMATOGR. B, 2008年11月 1日, Vol.875, No.1, P.174-179

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 6
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 S c i e n c e D i r e c t

C i N i i

专利名称(译)	Dao 1 - / - 小鼠对D-氨基酸相关疾病的评价和筛选方法		
公开(公告)号	JP5639890B2	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	JP2010526634	申请日	2009-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学 株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学 资生堂公司, 有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学 资生堂公司, 有限公司		
[标]发明人	浜瀬健司 財津潔 三田真史 芦田豊 東條洋介		
发明人	浜瀬 健司 財津 潔 三田 真史 芦田 豊 東條 洋介		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/50 G01N33/15 G01N30/88 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5088 A01K67/0276 A01K2217/03 A01K2217/075 A01K2217/15 A01K2227/105 A01K2267/0331 A01K2267/0356 C07K14/4702 C12N9/0024 C12N15/8509 C12Q1/26 G01N2333/90644 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/68.ZNAA C12Q1/02 G01N33/53.S G01N33/577.B G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N30/88.201.W G01N30/88.F C12N15/00.A		
代理人(译)	佐久间刚		
审查员(译)	野村 英雄		
优先权	2008217239 2008-08-26 JP		
其他公开文献	JPWO2010024091A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在与DAO酶缺陷小鼠和其他疾病模型小鼠的交配实验中快速选择来自大量动物的Dao - / - 纯合子, 并快速测定大量样品中含有的D-氨基酸开发可以完成的评估方法。本发明是一种评价试验条件对小鼠或来自活组织的培养组织细胞的活组织的影响的方法, 包括制备Dao 1 - / - 小鼠等的步骤;提供一种评估方法, 包括以下步骤: 将组织等暴露于测试条件;以及分析将诸如道1 - / - 小鼠的活组织等暴露于测试条件的效果。

F2世代ヘアレスマウス(Hr ^{-/-})					
Dao1 ^{+/+}		Dao1 ^{+/-}		Dao1 ^{-/-}	
39		55		44	
F	M	F	M	F	M
18	21	31	24	22	22