

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 18944

(P2003 - 18944A)

(43)公開日 平成15年1月21日 (2003.1.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/715		C 0 7 K 14/715	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15		33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 33 O L (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 184136(P2001 - 184136)

(22)出願日 平成13年6月18日(2001.6.18)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 菅村 和夫

宮城県仙台市青葉区旭ヶ丘1 - 27 - 8

(72)発明者 石井 直人

宮城県仙台市青葉区柏木2 - 14 - 16 205

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞死誘導モデル非ヒト動物

(57)【要約】

【課題】 神経系細胞や免疫系細胞において特異的に細胞死を誘導し、サイトカイン情報伝達のメカニズムを研究・解析することができる細胞死誘導モデル非ヒト動物、及び該細胞死誘導モデル非ヒト動物を用いた、細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】 A M S H 遺伝子の全部又は一部を含むフラグメントを、ネオマイシン耐性カセットに置換して、その側面に L o x P を挿入し、また、ネガティブ選択マ-カーとして、ポリ A 領域を有さないジフテリアトキシン A 鎖遺伝子カセットを挿入することによりターゲットベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを胚幹細胞に導入し、リコンビナーゼ C r e 発現ベクターにより A M S H 遺伝子機能を欠損した E S クローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に戻すことによって細胞死誘導モデル非ヒト動物を作製する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 AM SH遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項2】 AM SH - LP遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項3】 AM SH及びAM SH - LPの遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項4】 AM SH - LP遺伝子が、配列番号3又は5に示される塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする請求項2又は3記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項5】 細胞死が、神経系細胞死及び/又は免疫系細胞死であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項6】 神経系細胞が、海馬ニューロン細胞又は大脳皮質ニューロン細胞であることを特徴とする請求項5記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項7】 免疫系細胞が、リンパ球系細胞であることを特徴とする請求項5記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項8】 リンパ球系細胞が、T細胞であることを特徴とする請求項7記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項9】 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物に被検物質を投与すること、又は該動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させることを特徴とする細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項11】 請求項1～9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物と野生型非ヒト動物の場合とを比較・評価することを特徴とする請求項10記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項12】 野生型非ヒト動物が、請求項1～9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物と同腹の野生型非ヒト動物であることを特徴とする請求項11記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項13】 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項10～12のいずれか記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項14】 請求項10～13のいずれか記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる細胞死促進又は抑制物質。

【請求項15】 請求項14記載の細胞死抑制物質を有効成分とすることを特徴とするAM SH及び/又はAM SH - LPの欠損に起因する疾患に対する治療薬。

【請求項16】 検体からAM SH及び/又はAM SH - LPの遺伝子を抽出し、その遺伝子異常の有無を調べることと特徴とするAM SH及び/又はAM SH - LPの欠損に起因する疾患の診断法。

【請求項17】 AM SH及び/又はAM SH - LPのタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるAM SH及び/又はAM SH - LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブ。

【請求項18】 請求項17記載のAM SH及び/又はAM SH - LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブを含むことを特徴とするAM SH及び/又はAM SH - LPの欠損に起因する疾患の診断用キット。

【請求項19】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAM SH - LP活性を有するタンパク質

【請求項20】 配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

【請求項21】 請求項20記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAM SH - LP活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項22】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAM SH - LP活性を有するタンパク質

【請求項23】 配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

【請求項24】 請求項23記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAM SH - LP活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項25】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAM SH - LP活性を有するタンパク質

【請求項26】 配列番号5に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部

を含む配列からなるDNA。

【請求項27】 請求項26記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項28】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項29】 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質。

【請求項30】 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項31】 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質。

【請求項32】 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項33】 配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞死誘導モデル非ヒト動物、及び該細胞死誘導モデル非ヒト動物を用いた、細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法や、AMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断法等に関する。

【0002】

【従来の技術】サイトカインは、多くの生物学的事象において、細胞の活性化、分化、生存、及び細胞死に不可欠な因子である。標的細胞に対するサイトカインの効果は、サイトカインと、標的細胞内のシグナルを変換する特異的受容体との相互作用によって得られる。多くのサイトカインのうちインターロイキン2(IL-2)は、免疫反応においてT細胞を活性化する重要な可溶性リガンドとして知られている(Nature 268, 154-156, 1977, Adv. Immunol. 59, 225-277, 1995, Annu. Rev. Immunol. 14, 179-205, 1996)。IL-2を介するシグナル伝達経路において関与するシグナル分子として、本発明者らは、STAM1及びSTAM2というSTAMファミリーを同定し、これらSTAMがJak3のみならずJak2チロシンキナーゼに直接会合し、これらチロシンキナーゼが結合するIL-2受容体やGM-CSF受容体等のサイトカイン受容体からの情報伝達に重要な役割を担っているアダプター分子であることを報告している(FEBS Lett. 477, 55-61, 2000, Biochem. Biophys. 50

Res. Commun. 225, 1035-1039, 1996, Immunity 6, 449-457, 1997)。

【0003】また、本発明者らは、STAM1-SH3領域に会合する分子として新規アダプター分子AMSH (associated molecule with the SH3 domain of STAM)をヒトT細胞から単離し(特開2000-139469号公報、J. Biol. Chem. 274, 19129-19135, 1999)、STAM1とSTAM2との両方のSH3ドメインに相互作用する、AMSHのSH3結合モチーフ(SBM)を同定している(J. Biol. Chem. 275, 37481-37487, 2000, J. Biol. Chem. 274, 19129-19135, 1999)。上記AMSHは、STAMのSH3ドメインの結合部位に加え、核移行シグナル様配列と、c-Jun活性化ドメイン結合タンパク質1(JAB1)のサブドメインと類似した領域とを含んでいることが知られている。

【0004】上記STAMは、IL-2や顆粒状マクロファージ刺激因子(GM-CSF)によるc-mycの誘導を促進させるのに対して、STAMのSH3欠損変異体は、細胞増殖を誘導するシグナル伝達においてドミナントネガティブフォームとして作用することが知られている(Immunity 6, 449-457, 1997)。また、C末端の半分が欠損したAMSH変異体が、STAM1に結合することにより、DNA合成及びc-mycの転写を誘導するIL-2又はGM-CSFによるシグナル伝達経路にドミナントネガティブ効果を与えることを報告している(J. Biol. Chem. 274, 19129-19135, 1999)。これらのことから、AMSHがサイトカインのシグナル伝達に、特に、Jak又はSTAMなどの下流で生ずるシグナル伝達に関与することが示唆されている。

【0005】一方、本発明者らはSTAM1欠損マウスを作製し、そのマウスにおいて海馬CA3錐体ニューロンが欠失していることを見出ししている。このことはSTAM1がインビボにおいて、ニューロン細胞の生存に非常に深く関与していることを示している。インビトロでのサイトカインのシグナル伝達においては、STAM1が機能的に重要であるのに対して、インビボにおいてSTAM1の欠損は、リンパ球の発達、あるいはIL-2やGM-CSFに対する増殖反応において、ほとんど影響を及ぼさないことが知られている。STAM1のインビトロとインビボとの機能的役割の差異は、STAM2の補う効果によるものと考えられる。また、STAM1欠損マウスに認められるニューロン異常は、AMSHがニューロン細胞の生存にも関与していることを示唆している。

【0006】さらに、本発明者らは、新規Grb2ファミリー分子であるGads/Grf40をAMSHに会合する分子として同定している(J. Exp. Med. 189, 1383-1390, 1999)。GadsはSLP76やLATと相互作用し、T細胞受容体(TCR)のシグナル伝達に関

与している (J. Exp. Med. 189, 1383-1390, 1999、J. Exp. Med. 189, 1243-1253, 1999)。Gads のノックアウトマウス及びSH2ドメインが欠失したGads変異体のトランスジェニックマウスでは、プレT細胞の発達において障害を示すことが報告されている (International Immunology, 13, 777-783, 2001)。これは、Gads がT細胞の発達に不可欠であることを示している。Gads とAMSHとの相互作用についての生物学的重要性はまだ解明されていないが、AMSHがプレTCR及びTCRシグナル伝達によりT細胞の発達に貢献しているのではないかと考えられている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】サイトカイン情報伝達系の解析は1990年代から非常に急速に研究が進み、免疫学分野でも日本が最先端の研究を担っている分野の一つである。しかし情報伝達分子の中には未だに機能の不明なものも多く、本発明者らが単離同定したAMSHやAMSH-LPに関しても未だ明らかにされていない。また、AMSHやAMSH-LPの遺伝子が染色体上で欠損することにより特異的な細胞に対して細胞死を誘導することは知られていなかった。本発明の課題は、海馬ニューロン細胞、大脳皮質ニューロン細胞等の神経系細胞や、T細胞、B細胞、造血細胞等の免疫系細胞において特異的に細胞死を誘導し、サイトカイン情報伝達のメカニズムを研究・解析することができる、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞死誘導モデル非ヒト動物、及び該細胞死誘導モデル非ヒト動物を用いた、細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法や、AMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断法等を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、AMSH及びAMSH-LPの生理的機能の解明について鋭意研究を進め、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損したマウスを作製し、AMSHホモ欠損マウスにおいて生後10日以降より、成長遅延、末梢神経反射の異常、眼瞼下垂等の異状を呈し、生後3週で100%死亡することや、生後7日頃からリンパ球系細胞などその他の主要組織には明らかな異常を示さないが、大脳皮質、顔面神経核、海馬等の脳神経組織において特異的に広範な細胞死を誘導することを見出した。また、かかる細胞死に、従来知られている、インビボ及びインビトロにおいてニューロン細胞の生存と分化に重要な役割を果たしているサイトカインを用いても、効果がないことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、AMSH遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項1) や、AMSH-LP遺伝子機

能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項2) や、AMSH及びAMSH-LPの遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項3) や、AMSH-LP遺伝子が、配列番号3又は5に示される塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする請求項2又は3記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項4) や、細胞死が、神経系細胞死及び/又は免疫系細胞死であることを特徴とする請求項1~4のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項5) や、神経系細胞が、海馬ニューロン細胞又は大脳皮質ニューロン細胞であることを特徴とする請求項5記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項6) や、免疫系細胞が、リンパ球系細胞であることを特徴とする請求項5記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項7) や、リンパ球系細胞が、T細胞であることを特徴とする請求項7記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項8) や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1~8のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物 (請求項9) に関する。

【0010】また本発明は、請求項1~9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物に被検物質を投与すること、又は該動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させることを特徴とする細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項10) や、請求項1~9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物と野生型非ヒト動物の場合とを比較・評価することを特徴とする請求項10記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項11) や、野生型非ヒト動物が、請求項1~9のいずれか記載の細胞死誘導モデル非ヒト動物と同腹の野生型非ヒト動物であることを特徴とする請求項11記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項12) や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項10~12のいずれか記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法 (請求項13) や、請求項10~13のいずれか記載の細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる細胞死促進又は抑制物質 (請求項14) や、請求項14記載の細胞死抑制物質を有効成分とすることを特徴とするAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患に対する治療薬 (請求項15) や、検体からAMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子を抽出し、その遺伝子異常の有無を調べることを特徴とするAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断法 (請求項16) や、AMSH及び/又はAMSH-LPのタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブ (請求項17) や、請求項17記載のAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブを

含むことを特徴とするAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用キット(請求項18)に関する。

【0011】さらに本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項19)や、配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA(請求項20)や、請求項20記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項21)や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項22)や、配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA(請求項23)や、請求項23記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項24)や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項25)や、配列番号5に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA(請求項26)や、請求項26記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項27)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(請求項28)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項29)や、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(請求項30)や、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項31)や、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(請求項32)や、配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個の

アミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質(請求項33)に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の細胞死誘導モデル非ヒト動物とは、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損することにより、出生後又は加齢に伴い、海馬ニューロン細胞、大脳皮質ニューロン細胞、グリア細胞等の神経系細胞や、T細胞又はB細胞などのリンパ球系細胞、単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、マスト細胞、好中球、巨核球、赤血球などの造血性前駆細胞等の免疫系細胞において特異的に細胞死を誘導する非ヒト動物をいう。また、上記AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、AMSH及び/又はAMSH-LPをコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、AMSH及び/又はAMSH-LPを発現する機能を失った非ヒト動物をいう。また本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。なお、AMSHの遺伝子配列及びアミノ酸配列は特開2000-139469号公報に開示されており、AMSH-LPのDNA配列としては、配列番号4又は6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、配列番号4又6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNA、配列番号3又は5に示される塩基配列(GenBank Accession number AB010121)若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA、配列番号3又は5に示される塩基配列(GenBank Accession number AB010122)若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNAを例示することができる。これらはそのDNA配列情報等に基づき、例えばマウス遺伝子ライブラリーやマウスcDNAライブラリー、ヒト遺伝子ライブラリーやヒトcDNAライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。

【0013】本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができる。メンデルの法則に従い出生してくる、これらのホモ接合体非ヒト動物におけるAMSH欠損型、AMSH-LP欠損型、又はAMSH・AMSH-LP二重欠損型と、それらの同腹の野生型は、個体レベルで正確な比較実験を行うことができる点で同時に用いることが好ましい。そして本発明の細胞死誘導モデル非ヒト動物の好適例としては、AMS

Hノックアウトマウスや、AMSH-LPノックアウトマウスや、AMSH・AMSH-LPダブルノックアウトマウスを、野生型非ヒト動物としてはかかるノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを、それぞれ具体的に挙げる事ができる。以下、非ヒト動物がマウスの場合を例にとって説明する。

【0014】上記AMSHノックアウトマウスの作製法としては、AMSHを発現する機能を失ったノックアウトマウスを作製することができる方法であればどのような作製法でもよいが、所望の時期にAMSH発現機能を失わせることができるスイッチング発現システムを用いた作製法がより好ましく、かかるスイッチング発現システムとしては、Cre/LoxP発現システム(J. Molecular Biology 150,467-486, 1981, J. Molecular Biology 150, 487-507, 1981, 「マウスラボマニュアル 遺伝子の導入と解析を中心に」P245-250)や酵母サッカロミセス・セレピシエのFLP/FRT組換えシステム(J. Mol. Biol. 284,363-384,1998)などを具体的に挙げる事ができるがこれらに限定されるものではない。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、AMSH遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたAMSH遺伝子を組換えDNA技術により、AMSH遺伝子の全部又は一部を、例えばネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子で置換し、5'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入してターゲティングベクターを作製し、この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質に抵抗性を示すES細胞を選択する。この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

【0015】上記組換えES細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスと交配させると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウス(AMSH^{+/-})を交配させることによって、AMSHノックアウトマウス(AMSH^{-/-})を得ることができる。そして、かかるAMSHノックアウトマウスにおけるAMSH遺伝子が染色体上で欠損していることを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの尾からDNAを単離してサザンブロット等により調べる方法などを挙げる事ができる。また、本発明のAMSH-LPノックアウトマウス(AMSH-LP^{-/-})は、上記AMSHノックアウトマウスの作製法と同様な方法等によって作製することができる。

【0016】本発明のAMSH及びAMSH-LPの遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、すなわちAMSH・AMSH-LPダブルノックアウトマウスの作製法としては、AMSH及びAMSH-LPを発現する機能を失ったダブルノックアウトマウスを作製することができる方法であればどのような作製法でもよく、例えば、前記AMSHヘテロ接合体マウス(AMSH^{+/-})を、AMSH-LPヘテロ接合体マウス(AMSH-LP^{+/-})又はAMSH-LPホモ接合体マウス(AMSH-LP^{-/-})と交配させ、得られたAMSH^{+/-}・AMSH-LP^{+/-}マウス又はAMSH^{+/-}・AMSH-LP^{-/-}マウスを用いて交配させることによりAMSH・AMSH-LPダブルノックアウトマウス(AMSH^{-/-}・AMSH-LP^{-/-})を作製する方法等を挙げる事ができるが、前記のようにCre/LoxP発現システムや酵母サッカロミセス・セレピシエのFLP/FRT組換えシステム等のスイッチング発現システムを導入した作製方法であってもよい。

【0017】本発明の細胞死誘導モデル非ヒト動物は、海馬ニューロン細胞、大脳皮質ニューロン細胞、グリア細胞等の神経系細胞や、T細胞又はB細胞等のリンパ球系細胞、単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、マスト細胞、好中球、巨核球、赤血球等の造血性前駆細胞などの免疫系細胞において特異的に細胞死を誘導するモデルや、サイトカイン情報伝達を研究・解析するモデルや、T細胞分化増殖におけるメカニズムを研究するモデルや、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能の欠損に起因する疾患、例えば脳神経系における疾患の発症過程、解析、治療等を研究するモデルなどに有用である。また、これら遺伝子機能欠損マウスが摂食能力を欠除していることから、摂食に関わる中枢神経系の異常を伴う疾患に対する治療方法の開発等において有用であり、かかる知見は本発明によりはじめて明らかにされたものである。かかる細胞死誘導モデル非ヒト動物を用いると、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能の欠損に起因する疾患、例えば、成長遅延、末梢神経反射の異常、眼瞼下垂等の異常や、大脳皮質、顔面神経核、海馬等の脳神経組織に特異的な細胞の細胞死など脳神経系における疾患に対する治療に有用な薬剤、すなわち細胞死促進又は抑制物質などをスクリーニングすることができる。

【0018】本発明における、細胞死促進又は抑制物質のスクリーニング方法としては、本発明の細胞死誘導モデル非ヒト動物に被検物質を投与する方法や、細胞死誘導モデル非ヒト動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させる方法を挙げる事ができる。細胞死誘導モデル非ヒト動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させる方法としては、細胞死誘導モデル非ヒト動物、例えば、前記AMSHノックアウトマウス由来の組織、器官、又は細胞を被検物質と接触さ

せ、該細胞における細胞生存率の測定・評価する方法を具体的に例示することができ、また、細胞死誘導モデル非ヒト動物に被検物質を投与する方法としては、例えば、前記AMSHノックアウトマウスに被検物質を投与し、該非ヒト動物由来の組織、器官、又は細胞における細胞生存率を測定・評価する方法や、前記AMSHノックアウトマウスに被検物質を投与し、該非ヒト動物における寿命の変化、成長の変化、組織の形態変化、末梢神経反射の変化の程度を測定・評価する方法などを具体的に挙げるができるが、これらに制限されるものではない。なお、上記スクリーニングに際して、細胞死誘導モデル非ヒト動物と同腹の野生型マウスと比較評価することが好ましい。

【0019】本発明の細胞死促進又は抑制物質などのスクリーニング方法により得られる、細胞死促進又は抑制物質としては、神経細胞栄養因子様物質、グリア細胞様由来神経栄養因子(GDNF)ファミリー分子、TNFファミリー分子等のアポトーシス誘導分子等を挙げることができる。また、本発明のAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患に対する治療薬としては、上記細胞死抑制物質などを有効成分とする治療薬であれば特に制限されるものではなく、かかる治療薬を哺乳動物等に適宜量及び方法で投与することにより、上記AMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患を治療することができる。

【0020】さらに本発明のAMSH及び/又はAMSH-LPのタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部をAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブとすることができ、また、このAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用プローブを含むAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患の診断用キットを用いることにより、例えば、成長遅延、末梢神経反射の異常、眼瞼下垂等の異常や、大脳皮質、顔面神経核、海馬等の脳神経組織に特異的な細胞の細胞死など脳神経系における疾患等のAMSH及び/又はAMSH-LPの欠損に起因する疾患を診断することができる。上記診断用プローブとしては、AMSH及び/又はAMSH-LPをコードするDNA(cDNA)又はRNA(cRNA)のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ(少なくとも20ベース以上)を有するものが好ましい。上記AMSH-LPとしては、配列番号2、4又は6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(それぞれGenBank Accession number AB010120、AB010121、AB010122)を具体的に挙げることができ、また、AMSH-LPをコードするDNAとしては、配列番号1、3又は5に示される塩基配列からなるDNA(GenBank Accession number AB010120、AB010121、AB010122)を具体的に挙げる

験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いてもよい。

【0021】本発明のタンパク質としては、配列番号2で示されるヒトAMSH-LPや、配列番号4又は6で示されるマウスAMSH-LPや、配列番号2、4又は6で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質等のAMSH-LP活性を有するタンパク質を挙げることができる。そして、上記本発明の対象となるタンパク質はそのDNA配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。その由来は特に制限されるものではない。

【0022】本発明の対象となるDNAとしては、上記タンパク質をコードするものであればどのようなものでもよく、例えば、配列番号2に示されるヒトAMSH-LPをコードするDNAや、配列番号4又は6に示されるマウスAMSH-LPをコードするDNAや、配列番号2、4又は6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列番号1、3若しくは5に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部を含むDNAを具体的に挙げるができる。これらはそのDNA配列情報等に基づき、例えばヒト、マウス等の遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。

【0023】また、配列番号1、3若しくは5に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種DNAライブラリーに対してストリンジентな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、ヒトAMSH-LP、マウスAMSH-LP等と同効な目的とするAMSH-LP活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることができる。こうして得られるDNAも本発明の範囲である。かかる本発明のDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42度のハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42度の洗浄処理を挙げることができる。65度のハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65度の洗浄処理をより好ましく挙げるができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ

せて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0024】

【実施例】以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 (AMSH欠損マウスの作製)

ヒトAMSH cDNAをプローブとして、129/Svマウス遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって、AMSH遺伝子のゲノムDNAクローンを単離した。単離した3つのクローンのゲノム配列は一部重複しており、AMSHの5'-非コードエクソンを含む少なくとも6個のエクソンを有していた。ターゲティングベクターは、129/Svマウス遺伝子ライブラリー由来の4.1kb (Sma I-Sca I) 及び4.8kb (BamH I-BamH I) の遺伝子配列の間に位置する、第4イントロンの0.6kbのHind III-BamH I遺伝子断片をネオマイシン耐性 (PGK-neo) カセットに置換し (図1B)、また、エクソン5の上流のエクソン3及び4を含んだネオマイシン耐性カセットの側面にloxPを挿入し、さらに、ネガティブ選択マーカーとして、ポリA領域を有さないジフテリアトキシンA鎖遺伝子カセットを挿入することによってマウスAMSH遺伝子のターゲティングベクターを作製した (図1A及び1B)。

【0025】上記ターゲティングベクターを線状化した後、エレクトロポレーション法により129/Sv由来のJ1ES細胞に導入し、G418耐性ESクローンを選択し (Mol. Cell. Biol. 20, 9346-9355, 2000、J. Exp. Med. 191, 365-374, 2000、Blood 87, 956-967, 1996)、サザンブロットハイブリダイゼーション法によって相長的組換え体を確認した。得られた3つの変異体アレルを有するG418耐性ESクローンに、-アクチンプロモーターによって誘導されるリコンビナーゼCre発現ベクターpCXN2-Creを一過性にトランスフェクションした後、ネオマイシン耐性カセットが除去されたG418感受性ESクローンを選択し、サザンブロットハイブリダイゼーション法とPCR法によって、2つのloxP配列間のPGK-neoカセット3.7kb断片が除去されていることを確認した。得られた2つのG418感受性ESクローンをC57BL/6胚盤胞に注入し、仮親に移植することによってキメラマウスを作製した。かかる雄のキメラマウスを雌のC57BL/6マウスと交配させ、AMSHの変異を有するF1ヘテロ接合体マウスをサザンブロットハイブリダイゼーション法により同定し、また、F1ヘテロ接合体マウスを交配させることによってF2ホモ接合体を作製した。

【0026】上記作製したF2マウス [F1ヘテロ接合体マウスの交配により得られた、野生型マウス (+/+)、ホモ接合体マウス (-/-) 及びヘテロ接合体マ

ウス (-/-)] の遺伝子型の決定は、上記F2マウスの尾から得た生検標本を用いてサザンブロットハイブリダイゼーション法及びPCR法により行った。なお、上記PCRのオリゴヌクレオチドプライマーとしては、5AM (5'-TCCACCTCCTCTTGTATTTCATACCC-3' ; 配列番号7) 及び3L (5'-ACTTGACAGACTTTAGAATCACCCAGAA-3' ; 配列番号8) を用いた (図1B)。その結果を図1Cに示す。なお、図1C中の8.0kb及び13.0kbのバンドはそれぞれ変異型アレルと野生型アレルを示す。このことから、上記2つのG418感受性ESクローンの1つから作製したキメラマウスが、変異体アレルを子孫に遺伝しているのが確認できた。

【0027】次に野生型マウス (+/+) とホモ接合体マウス (-/-) におけるAMSHの発現を調べるため、各マウスの脳由来の全RNAを用いてノーザンブロット分析を行った。各マウスの脳由来の全RNAをTRIzol (Life Technologies, Inc.社製) を用いて抽出し、得られた20µgのRNAを電気泳動にかけ、Hybond-N Nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech社製) にブロットした。その後、あらかじめRandom primer DNA labeling kit Ver.2 (Takara Biomedicals社製) によって、[³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) で標識されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブとしては図1Bに示されるAMSH cDNAの1.6kbp断片と、文献 (J. Biol. Chem. 274, 19129-19135, 1999) 記載の-アクチンプローブを用いた。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液 [50%のホルムアミド、5×Denhardt溶液、5×SSC、0.1%のSDS、20mMのTris-HCl (pH7.5)、及び超音波処理及び変性させた200µg/mlのサケ精子DNA] 中で20時間42°Cで行い、ハイブリダイズしたメンブレンを洗浄溶液 [0.2×SSC及び0.1%のSDS] にて65°Cで3回洗浄した。洗浄後、バイオイメージアナライザーMacBAS1500 (富士フイルム社製) により放射能を検出した。その結果を図1Dに示す。この結果、ホモ接合体マウスにおいてAMSHの発現がみられなかったことから、AMSH mRNAが変異したことによりAMSHの発現が不安定になったと考えられる (図1D)。以上のことから、AMSH遺伝子の相長的変異がマウスにおけるAMSHの欠損を引き起こすことが明らかとなった。

【0028】実施例2 (AMSH欠損マウスの遺伝子型)

新生児AMSH欠損マウスを同腹子の野生型マウスと比較しても形態的異常は見られなかった。AMSH^{+/-}の交配により生まれた新生児マウス (n=237) の遺伝子型を分析したところ、メンデル比はAMSH^{+/+}マウス (24.0%)、AMSH^{+/-}マウス (52.3%)、AMSH^{-/-}マウス (23.6%) と予想どおり

であった。これは、AMSHが胚発生には重要でないことを示している。しかし、AMSH^{-/-}マウス(-/-)は生後日数(P)19からP23の間に全て死亡した(20.8 ± 1.1)(図2A)。かかるマウスを解剖してみると胃の中身が空だったことから、餓死したと考えられた。また、AMSH^{-/-}マウスは、P7にはかなりの成長遅滞を示し、P16以降において体重が減少し始めているのが確認できた(図2B)。P15におけるAMSH^{-/-}マウスは、尾を使って体をつり下げる際に、後肢が胴体方向に収縮するという神経異常を示していた。P16では1/3のAMSH^{-/-}マウスにおいて上まぶたの垂下(眼瞼下垂)が見られた。組織病理学的に12日齢のAMSH^{-/-}マウスを解析したところ、テストした組織のうち、脳以外の組織(胸腺、脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓、腸管、結腸、及び胃)においては何ら異常が見られなかった。なお、AMSH^{+/-}マウス(+/-)の生存率及び成長率は、その同腹子の野生型マウス(+/+)のものとはっきりとした違いは確認できなかった(図2A及び2B)。

【0029】従来、AMSHはIL-2やGM-CSFなどのサイトカイン受容体における下流のシグナル伝達分子であるとしてクローニングされた(J. Biol. Chem. 274, 19129-19135, 1999)。このことから、AMSHの欠損が、Tリンパ球及びBリンパ球の発達や、サイトカイン又は抗CD3抗体の刺激に対するT細胞の増殖反応に影響あるかどうかを調べてみた。15日齢のAMSH^{-/-}マウス又は野生型マウス由来の胸腺細胞又は脾臓細胞を、3%のFCSを添加したPBSに懸濁させ、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)又はフィコエリトリン(PE)で標識したモノクローナル抗体(抗CD4モノクローナル抗体、抗CD8モノクローナル抗体、抗B220モノクローナル抗体、抗CD3モノクローナル抗体)がかかる細胞表面で非特異的に結合するのを防ぐために、正常マウスの血清中であらかじめインキュベートし、胸腺細胞に対しては抗CD4モノクローナル抗体及び抗CD8モノクローナル抗体(共にPharmingen社製)を、脾臓細胞に対しては抗B220モノクローナル抗体及び抗CD3モノクローナル抗体(共にPharmingen社製)を用いて4で30分間二重染色した。染色後mAbsにより染色した細胞表面を、CellQuest Softwareを用いて2, 3色のモードにし、FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc.社製)で分析した。その結果を図3Aに示す。この結果、AMSH^{-/-}マウス(AMSH^{-/-})由来の胸腺細胞又は脾臓細胞において、野生型マウス(AMSH^{+/+})のものと同様にCD4、CD8、B220、及びCD3が発現していることから、AMSH^{-/-}マウスと野生型マウスとの間において胸腺のT細胞部分母集団や脾臓B細胞母集団には相違がないことがわかった(図3A)。

【0030】次にサイトカイン又は抗CD3抗体などの刺激に対するT細胞の増殖反応を調べてみた。12日齢のAMSH^{-/-}マウス又は野生型マウス由来の脾臓細胞(2 × 10⁵細胞; 図3B)、脾臓T細胞(2 × 10⁵細胞; 図3C)又は胸腺細胞(5 × 10⁵細胞; 図3D)を、1ウェルあたり200 µlの培地(10%のFCS、50 µMの2-メルカプトメタノール、50 µMのペニシリン、及び50 µMのストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地)が入った96ウエルプレートに播き、rhIL-2(味の素社製)、組換えネズミIL-4(PeproTech社製)、抗CD3抗体(145.2C11)、又はコンカナバリンA(ConA)の存在下で42時間培養した。培養後、かかる細胞を[³H]-チミジンで標識して6時間後に回収し、[³H]-チミジンの摂取量をMicroBeta liquidscintillation counter (Amersham Pharmacia Biotech社製)で計測した。その結果をそれぞれ図3B~Dに示す。これらのことから、AMSH^{-/-}マウス由来の脾臓細胞、脾臓T細胞、又は胸腺細胞は、野生型マウス由来の細胞と同様に、ConA、IL-4、IL-2、抗CD3抗体、又はこれらを組み合わせた刺激物に対する増殖反応が確認できた。以上のことから、T細胞とB細胞の発達や、サイトカイン又は抗CD3抗体などの刺激に対するT細胞増殖反応において、AMSHが重要でないことが明らかとなった。

【0031】実施例3 (AMSH^{-/-}脳の組織病理学的異常)

次に、AMSH^{-/-}マウスの脳標本を組織病理学的に分析し、AMSH^{+/+}マウスのもものと比較するため、市販のキット(TACS2 TdT-Blue Label In Situ Apoptosis Detection Kit; Trevigen Instructions)に添付されたプロトコルに従い、TUNEL染色を行った。胚齢19.5日、6日齢、及び16日齢の上記各マウスからそれぞれ脳切片を作製し、各脳切片を脱パラフィン処理及び再水化した後、かかる脳切片をプロテナーゼKを含むPBS溶液中で15分間分解反応を行い、水道水(tap H₂O)を加えることによって反応を終了させた。かかる脳切片を1 × TdT(ターミナルトランスフェラーゼ)標識緩衝液で5分間処理し、続いてTdT、ピオチン化dUTP、及び塩化マンガンを含む1 × TdT標識緩衝液中にて37の加湿室中で1時間インキュベーションした。1 × TdTストップバッファーで反応を終了させた後、かかる切片をストレプトアビジン結合西洋ワサビペルオキシダーゼ及びTACS Blue Label (Trevigen社製)で処理することにより、AMSHのDNAを視覚化した。また、上記切片をNuclear Fast Red (Sigma社製)により対比染色した。その結果を図4(参考写真1参照)に示す。

【0032】胚齢19.5日(E19.5)のAMSH^{-/-}マウス胚由来の海馬及び大脳皮質を含む脳切片にお

いては、野生型マウス (AMSH^{+/+}) のものと違いは確認できなかった (図4A及び4B)。しかし、P6のAMSH^{-/-}マウスでは、大脳皮質が正常であるにもかかわらず、海馬CA1ニューロンがかなり消失していた (図4C~4F)。P16のAMSH^{-/-}マウスでは、海馬CA1の一部が完全に失われており、大脳皮質のニューロン数が激減していた (図4G~4J)。これに対して、P16の小脳皮質 (図4K及び4L) や嗅球を含む脳切片では、AMSHが多量に発現していたが、組織病理学的異常は全く認められなかった。

【0033】P6の野生型マウス及びAMSH^{-/-}マウスの海馬CA1の一部を高倍率で拡大し比較した結果、AMSH^{-/-}マウスにおいて数個の核が萎縮したニューロンがはっきりと認められた (図5上段: 参考写真2参照)。また、ニューロン消失における機構を調べるため、上記各マウスの海馬CA1の一部をTUNEL染色した。TUNEL陽性細胞は、AMSH^{-/-}マウス海馬CA1部分体中には認められたが、野生型マウスでは認められなかった (図5中段及び下段: 参考写真2参照)。このことは、AMSH^{-/-}マウスにおけるニュー

ロンの退化及び亡失が細胞死によるものであることを示唆している。

【0034】実施例4 (野生型マウス脳におけるAMSH mRNAの発現)
脳におけるAMSH mRNAの発現を調べるため、図6Aに示される胚齢18.5日 (E18.5) から生後日数56日 (P56) の各C57BL/6マウスの全脳を採取し、ノーザンブロット分析を実施例1と同様に行った (図6A: 参考写真3参照)。その結果、AMSH mRNAの発現レベルは、E18.5においても

とも高く、それからP15までは徐々に減少し、以後P56まで一定のレベルでAMSH mRNAの発現が保たれていた。このことから、AMSHが胚発生段階と生後直後で機能しているのがわかった。
【0035】次に、脳内におけるAMSHの転写による発現と局在性を調べるために、文献 (Brain Res. Mol. Brain Res. 25, 364-368, 1994, Brain Res. Mol. Brain Res. 54, 311-315, 1998) 記載の方法に変更を加え、マウスAMSHのin siteハイブリダイゼーションを行った。さまざまな発生段階の野生型マウス胚の全凍結体、又は出生後のさまざまな時期における野生型マウス由来の脳組織を、クリオスタット上で30µmの厚さに切り分け、各切片を4%のパラホルムアルデヒド/0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (PB; pH7.2) で固定した後、0.25%の無水酢酸を含む0.1Mのトリエタノールアミン (pH 8.0) でアセチル化し、プレハイブリダイゼーション溶液 [50%の脱イオンホルムアミド、4×SSC、0.02%のフィコール、1%のサルコシル (N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム)、0.1MのPB、及び100µg/mlのt-R

NAを含んだ緩衝液] 中で1時間反応させたインキュベートした。その後、10%の硫酸デキストラン、100mMのジチオトレイトール、及び³⁵S標識AMSHオリゴヌクレオチドプローブを添加したプレハイブリダイゼーション緩衝液中で、ハイブリダイゼーションを42で一晩行い、かかる切片を0.1×SSC/0.1%のサルコシルにより50で30分間、4回洗浄した。室温で2週間、Hyperfilm-max (Amersham Pharmacia Biotech社製) に露光し、NTB2 nuclear track emulsion (Kodak社製) を用いて4で3週間オートラジオグラフィを行った。その結果を図6B (参考写真3参照) に示す。この結果から、胚齢14日 (E14) の野生型マウス胚の脳における大脳皮質や脳室の広範囲にわたって、AMSH mRNAの発現が認められた。P10の野生型マウスでは、嗅球、大脳皮質、海馬及び小脳においてもその発現が認められた。P56の野生型マウスにおけるAMSHの転写は、P10のマウス脳と同様の場所で確認できたが、発現レベルは著しく低下していた。また、AMSH転写の局在は、AMSH欠損マウスの脳で見られたニューロン亡失の局在と一致していた。これらのことは、海馬と大脳における新生ニューロンの生存にAMSHが関与していることを示唆している。

【0036】実施例5 (AMSH欠損マウス由来一次ニューロンの生存機能障害)

海馬CA1ニューロンは、低血糖、無酸素又は代謝などのストレスによって細胞死が誘導されることが知られている (Exp. Brain Res. 88, 91-105, 1992, Exp. Neuro. 162, 1-12, 2000, Neuroscience 90, 1325-1338, 1999, J. Neurosci. 18, 5151-5159, 1998, Brain Res. 671, 305-308, 1995, J. Neurosci. 15, 1001-1011, 1995)。そこで、AMSH欠損マウスにおける海馬ニューロンの亡失が、上記ストレスによって引き起こされた可能性を否定するために、胚齢18.5日の野生型マウス胚又はAMSH^{-/-}マウス胚から単離した海馬ニューロンの初代培養を、以下の方法で実施した。胚齢18.5日の野生型マウス (AMSH^{+/+}) 又はAMSH^{-/-}マウス (AMSH^{-/-}) 胚由来の海馬を切開してはさみで細かく切り刻み、カルシウム及びマグネシウム不含の Hank's 平衡塩溶液中で9-in siliconized Pasteur pipetを用いて粉砕することにより、初代海馬ニューロンを単離した。ポリ-D-リジンでコーティングされたプレート (Falcon社製) に、0.5mMのL-グルタミン及びB27サプリメント (Life Technologies, Inc社製) を含むNEUROBASAL MEDIUM (Life Technologies, Inc社製) を入れ、上記細胞を、細胞密度が600~800個/mm²となるように播き、5%のCO₂と95%の室内空気との加湿環境条件下にて37で培養した。その結果、インピットロで培養直後、AMSH欠損マウス胚由来の海馬ニューロンは死滅したが、野生型マウス胚由来の海馬ニューロンは死滅せず、少なくとも8日間はニュー

ロン細胞へと分化していた(図7:参考写真4参照)。これらのことから、AMSHがニューロン細胞の生存において重要な役割を果たしていることがわかった。

【0037】神経成長因子(NGF)(Neurobiol. 10, 381-391, 2000, Brain Res. Mol. Brain Res. Rev. 30, 176-188, 1999, Cell 77, 627-638, 1994)、形質転換成長因子(TGF)(J. Neurochem. 75, 2227-2240, 2000, Nat. Neurosci. 3, 1085-1090, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12599-12603, 1994)、腫瘍壊死因子(TNF)(Neuron 12, 139-153, 1994, J. Biol. Chem. 274, 8531-8538, 1999, Eur. J. Neurosci. 12, 3863-3870, 2000)、及び脳由来神経栄養因子(BDNF)(Cell 77, 627-638, 1994)等のサイトカインは、インビボ及びインビトロにおいてニューロン細胞の生存と分化に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、AMSHの機能に関するニューロン細胞の生存における機構を解明するために、上記サイトカインがインビトロにおいてAMSH欠損マウスにおけるニューロンの細胞死に効果があるかどうかを調べてみた。上記胚齢18.5日の野生型マウス(AMSH^{+/+})又はAMSH^{-/-}マウス(AMSH^{-/-})胚由来の海馬ニューロンの初代培養細胞を、ネズミ由来のNGF(Life Technologies, Inc社製)、組換えヒト脳由来神経栄養因子(BDNF, PeproTech, Inc社製)、組換えヒトTGF-1(PeproTech, Inc社製)、又は組換えネズミTNF(PeproTech, Inc社製)の存在下で上記と同様に培養した。その後、Fluoroskan Ascent(Labsystems社製)のプロトコルマニュアルに従って、図8に示される時期に各培養ウェルに最終濃度が10%となるようにAlamar blue fluorescent dye(Alamar Biosciences社製)を添加し、各種細胞を暗所下において37で120分間インキュベートした後、細胞の生存率及びミトコンドリア活性を測定した。なお、生存能力指数(実験ウェルの平均強度-ブランクの平均強度)は、544nmの光により励起された各ウェルの蛍光強度(590nm)をFluoroskan Ascent(Labsystems社製)により測定し、生存指数を次式により求めた。

【0038】

【数1】

$$\frac{\text{各時期における生存能力指数}}{\text{0日目における生存能力指数}} \times 100 (\%)$$

【0039】上記の結果を図8に示す。これらの結果から、TGF、TNF、NGF及びBDNFを用いてAMSH^{+/+}マウス由来の海馬ニューロンを刺激すると、生存指数が上昇するのが確認できた。しかし、AMSH^{-/-}マウス由来の海馬ニューロンでは、上記いずれのサイトカインを用いても、生存指数は上昇しなかった。以上のことから、AMSH^{-/-}マウスにおける海馬ニューロンの細胞死には上記サイトカインでは効果がな

【0040】実施例6(AMSH-LP欠損マウスの作製)

データベース上の検索からAMSHと相同性の高いもう一つの分子AMSH-LP(AMSH-like protein)を同定し、全長のcDNAをマウスcDNAライブラリーから単離した。なお、同定したヒト由来のAMSH-LP遺伝子のDNA配列を配列番号1に、マウス由来のAMSH-LP遺伝子のDNA配列を配列番号3及び5に、これら遺伝子がコードするAMSH-LPのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2、4及び6に示す。かかるAMSH cDNAは分子量約55kDの蛋白を発現し、AMSHと同様に核移行シグナル様配列と、STAM-SH3との結合配列とを持っている。このことから、本発明者らは、AMSH-LPがAMSHと重複した機能を持ち、AMSHの機能を代償しAMSH欠損マウスで神経系以外の異常を認めなかったのではないかと考え、実施例1に記載の方法と同様にAMSH-LP欠損マウスを作製した。まず、AMSH-LPのcDNAをプローブにAMSH-LP遺伝子を129/Svマウス遺伝子ライブラリーから単離し、得られたAMSH-LP遺伝子を用いてターゲティングベクターを作製し、ES細胞に導入した後スクリーニングすることによってAMSH-LPヘテロES細胞を得た。得られたヘテロES細胞を用いてキメラマウスを作製し、かかる雄のキメラマウスを雌のC57BL/6マウスと交配させ、AMSH-LPの変異を有するF1ヘテロ接合体マウスをサザンブロットハイブリダイゼーション法により同定し、また、F1ヘテロ接合体マウス(AMSH-LP^{+/-})を交配させることによってF2ホモ接合体(AMSH-LP^{-/-})を作製した。

【0041】実施例7(AMSH・AMSH-LP二重欠損マウスの作製)

AMSHホモ欠損マウスは正常に生まれるが、生後3週で死亡するため子孫を残すことはできない。従ってAMSHヘテロ接合体マウス(AMSH^{+/-})とAMSH-LPヘテロ接合体マウス(AMSH-LP^{+/-})を交配させることによってAMSH^{+/-}・AMSH-LP^{+/-}マウスを作製し、かかるマウスをインタークロスさせることによってAMSH・AMSH-LP二重欠損マウス(AMSH^{-/-}・AMSH-LP^{-/-})を作製した。

【0042】

【発明の効果】本発明の細胞死誘導モデル非ヒト動物は、海馬ニューロン細胞、大脳皮質ニューロン細胞、グリア細胞等の神経系細胞や、T細胞又はB細胞などのリンパ球系細胞、単球、マクロファージ、好塩基球、好酸球、マスト細胞、好中球、巨核球、赤血球などの造血性前駆細胞等の免疫系細胞において特異的に細胞死を誘導するモデルや、サイトカイン情報伝達を研究・解析するモデルや、T細胞分化増殖におけるメカニズムを研究するモデルや、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝

子機能の欠損に起因する疾患、例えば脳神経系における疾患の発症過程、解析、治療等を研究するモデルなどに有用であり、またかかる細胞死誘導モデル非ヒト動物を用いると、AMSH及び/又はAMSH-LPの遺伝子機能の欠損に起因する疾患、例えば、成長遅延、末梢神経反射の異常、眼瞼下垂等の異常や、大脳皮質、顔面神

経核、海馬等の脳神経組織に特異的な細胞の細胞死など脳神経系における疾患に対する治療に有用な薬剤、すなわち細胞死促進又は抑制物質などをスクリーニングすることができる。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOL
OGY CORPORATION
<120> Apoptosis-induced model n
on-human animals
<130> A031P74
<140>
<141>
<160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1621
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (34)..(1341)
<400> 1
cagtgaacat cctcatttca cagataagac aac
atg gat cag cct ttt act gtg 54
Met Asp Gln Pro Phe
Thr Val
1 5
aat tct ctg aaa aag tta gct gct atg cct
gac cat aca gat gtt tcc 102
Asn Ser Leu Lys Lys Leu Ala Ala Met Pro
Asp His Thr Asp Val Ser
10 15 20
cta agc cca gaa gag cga gtc cgt gcc cta
agc aag ctt ggt tgt aat 150
Leu Ser Pro Glu Glu Arg Val Arg Ala Leu
Ser Lys Leu Gly Cys Asn
25 30 35
atc acc atc agt gaa gac atc act cca cga
cgt tac ttt agg tct gga 198
Ile Thr Ile Ser Glu Asp Ile Thr Pro Arg
Arg Tyr Phe Arg Ser Gly
40 45 50 55
gta gag atg gag agg atg gcg tct gtg tat
ttg gaa gaa gga aat ttg 246
Val Glu Met Glu Arg Met Ala Ser Val Tyr
Leu Glu Glu Gly Asn Leu
60 65 70
gaa aat gcc ttt gtt ctt tat aat aaa ttt

```

tat ttg caa agc aaa aac aaa tat aaa gct
 gaa att ctc aaa aaa ttg 486
 Tyr Leu Gln Ser Lys Asn Lys Tyr Lys Ala
 Glu Ile Leu Lys Lys Leu
 140 145 150
 gag cat cag aga ttg ata gag gca gaa agg
 aag cgg att gct cag atg 534
 Glu His Gln Arg Leu Ile Glu Ala Glu Arg
 Lys Arg Ile Ala Gln Met
 155 160 165
 cgc cag cag cag cta gaa tcg gag cag ttt
 ctg ttt ttc gaa gat caa 582
 Arg Gln Gln Gln Leu Glu Ser Glu Gln Phe
 Leu Phe Phe Glu Asp Gln
 170 175 180
 ctc aag aag caa gag tta gcc cga ggt caa
 atg cga agt cag caa acc 630
 Leu Lys Lys Gln Glu Leu Ala Arg Gly Gln
 Met Arg Ser Gln Gln Thr
 185 190 195
 tca ggg ctg tca gag cag att gat ggg agc
 gct ttg tcc tgc ttt tcc 678
 Ser Gly Leu Ser Glu Gln Ile Asp Gly Ser
 Ala Leu Ser Cys Phe Ser
 200 205 210 2
 15
 aca cac cag aac aat tcc ttg ctg aat gta
 ttt gca gat caa cct aat 726
 Thr His Gln Asn Asn Ser Leu Leu Asn Val
 Phe Ala Asp Gln Pro Asn
 220 225 230
 aaa agt gat gca acc aat tat gct agc cac
 tct cct cct gta aac agg 774
 Lys Ser Asp Ala Thr Asn Tyr Ala Ser His
 Ser Pro Pro Val Asn Arg
 235 240 245
 gcc tta acg cca gct gct act cta agt gct
 gtt cag aat tta gtg gtt 822
 Ala Leu Thr Pro Ala Ala Thr Leu Ser Ala
 Val Gln Asn Leu Val Val
 250 255 260
 gaa gga ctg cga tgt gta gtt ttg cca gaa
 gat ctt tgc cac aaa ttt 870
 Glu Gly Leu Arg Cys Val Val Leu Pro Glu
 Asp Leu Cys His Lys Phe
 265 270 275
 ctg caa ctg gca gaa tct aat aca gtg aga
 gga ata gaa acc tgt gga 918
 Leu Gln Leu Ala Glu Ser Asn Thr Val Arg
 Gly Ile Glu Thr Cys Gly
 280 285 290 2
 95

acc aat gct ggc atg ctt gag gtt tct gct
 tgt aaa aaa aag ggc ttt 1254
 Thr Asn Ala Gly Met Leu Glu Val Ser Ala
 Cys Lys Lys Lys Gly Phe
 395 400 405
 cat cca cac acc aag gag ccc agg ctg ttc
 agt ata tgc aaa cat gtg 1302
 His Pro His Thr Lys Glu Pro Arg Leu Phe
 Ser Ile Cys Lys His Val
 410 415 420
 ttg gta aaa gac ata aaa ata att gtg ttg
 gat ctg agg tgatatttc 1351
 Leu Val Lys Asp Ile Lys Ile Ile Val Leu
 Asp Leu Arg
 425 430 435
 tgaatgtaag caccgtcaac atcagacacc tact
 catgga catgtggtg ccggattttc 1411
 ttaagatggt tccagaaatg actgatattt tata
 ttata cattttagat gacaaagctt 1471
 gatatttatt gctgtcgcac attttaaagt tttc
 tttttg ggttgctctg tgtcaagaga 1531
 ggttacatgg tgttaaatcg gtacctgata atgt
 acccaa atactatggc cagataataa 1591
 attgtgctgc aaacaaaaaa aaaaaaaaaa
 1621

 <210> 2
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Asp Gln Pro Phe Thr Val Asn Ser Leu
 Lys Lys Leu Ala Ala Met
 1 5 10 15
 Pro Asp His Thr Asp Val Ser Leu Ser Pro
 Glu Glu Arg Val Arg Ala
 20 25 30
 Leu Ser Lys Leu Gly Cys Asn Ile Thr Ile
 Ser Glu Asp Ile Thr Pro
 35 40 45
 Arg Arg Tyr Phe Arg Ser Gly Val Glu Met
 Glu Arg Met Ala Ser Val
 50 55 60
 Tyr Leu Glu Glu Gly Asn Leu Glu Asn Ala
 Phe Val Leu Tyr Asn Lys
 65 70 75 80

 Phe Ile Thr Leu Phe Val Glu Lys Leu Pro
 Asn His Arg Asp Tyr Gln
 85 90 95
 Gln Cys Ala Val Pro Glu Lys Gln Asp Ile
 Met Lys Lys Leu Lys Glu
 100 105 110

225 230 235 2
 40
 His Ser Pro Pro Val Asn Arg Ala Leu Thr
 Pro Ala Ala Thr Leu Ser
 245 250 255
 Ala Val Gln Asn Leu Val Val Glu Gly Leu
 Arg Cys Val Val Leu Pro
 260 265 270

 Glu Asp Leu Cys His Lys Phe Leu Gln Leu
 Ala Glu Ser Asn Thr Val
 275 280 285
 Arg Gly Ile Glu Thr Cys Gly Ile Leu Cys
 Gly Lys Leu Thr His Asn
 290 295 300
 Glu Phe Thr Ile Thr His Val Ile Val Pro
 Lys Gln Ser Ala Gly Pro
 305 310 315 3
 20
 Asp Tyr Cys Asp Met Glu Asn Val Glu Glu
 Leu Phe Asn Val Gln Asp
 325 330 335
 Gln His Asp Leu Leu Thr Leu Gly Trp Ile
 His Thr His Pro Thr Gln
 340 345 350
 Thr Ala Phe Leu Ser Ser Val Asp Leu His
 Thr His Cys Ser Tyr Gln
 355 360 365
 Leu Met Leu Pro Glu Ala Ile Ala Ile Val
 Cys Ser Pro Lys His Lys
 370 375 380
 Asp Thr Gly Ile Phe Arg Leu Thr Asn Ala
 Gly Met Leu Glu Val Ser
 385 390 395 4
 00
 Ala Cys Lys Lys Lys Gly Phe His Pro His
 Thr Lys Glu Pro Arg Leu
 405 410 415
 Phe Ser Ile Cys Lys His Val Leu Val Lys
 Asp Ile Lys Ile Ile Val
 420 425 430
 Leu Asp Leu Arg
 435

<210> 3

<211> 1428

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (108)..(1415)

<400> 3

tccggacgcg cagcactgct ggtgagtggc ccca
 cacgtg tgcccgctgg ccccgatg 60

Phe Arg Ser Gly Val Glu Met Glu Arg Met
 Ala Ser Val Tyr Leu Glu
 55 60 65
 gaa gga aac ctg gaa aat gcc ttt gtt ctt
 tat aac aaa ttt ata acg 356
 Glu Gly Asn Leu Glu Asn Ala Phe Val Leu
 Tyr Asn Lys Phe Ile Thr
 70 75 80
 tta ttt gta gaa aaa ctt ccc agc cac cga
 gat tac cag cag tgt gca 404
 Leu Phe Val Glu Lys Leu Pro Ser His Arg
 Asp Tyr Gln Gln Cys Ala
 85 90 95
 gtt cca gag aag cag gat att atg aag aaa
 ctg aag gag att gcg ttc 452
 Val Pro Glu Lys Gln Asp Ile Met Lys Lys
 Leu Lys Glu Ile Ala Phe
 100 105 110 1
 15
 cca agg aca gac gaa ttg aaa acg gac ctg
 cta agg aaa tat aac ata 500
 Pro Arg Thr Asp Glu Leu Lys Thr Asp Leu
 Leu Arg Lys Tyr Asn Ile
 120 125 130
 gaa tac caa gag tat ttg caa agt aaa aac
 aaa tat aaa gcc gaa att 548
 Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Gln Ser Lys Asn
 Lys Tyr Lys Ala Glu Ile
 135 140 145

 ctc aaa aag ttg gaa cat cag aga ctg ata
 gag gca gag cgc cag cgg 596
 Leu Lys Lys Leu Glu His Gln Arg Leu Ile
 Glu Ala Glu Arg Gln Arg
 150 155 160
 ata gct cag atg cgc cag cag caa cta gag
 tct gaa cag ttc ctg ttt 644
 Ile Ala Gln Met Arg Gln Gln Gln Leu Glu
 Ser Glu Gln Phe Leu Phe
 165 170 175
 ttt gaa gac caa ctc aag aag cag gag ttg
 gct cga ggc cag att cga 692
 Phe Glu Asp Gln Leu Lys Lys Gln Glu Leu
 Ala Arg Gly Gln Ile Arg
 180 185 190 1
 95
 ggt cag gac tct ccg gtg ttg tct gag cag
 act gac gga agt gcg ctg 740
 Gly Gln Asp Ser Pro Val Leu Ser Glu Gln
 Thr Asp Gly Ser Ala Leu
 200 205 210
 tcc tgc ttt tcc acc cac cag agc aac tct
 ctg agg aac gca ttt gca 788

Ile Thr His Val Val Val Pro Lys Gln Ser
 Ala Gly Pro Asp Tyr Cys
 310 315 320
 gat gtg gag aac gtc gaa gaa tta ttc aat
 gtt cag gat caa cat ggt 1124
 Asp Val Glu Asn Val Glu Leu Phe Asn
 Val Gln Asp Gln His Gly
 325 330 335
 ctc ctc aca ctg gga tgg atc cat aca cac
 ccc acg caa acg gca ttc 1172
 Leu Leu Thr Leu Gly Trp Ile His Thr His
 Pro Thr Gln Thr Ala Phe
 340 345 350 3
 55
 ctg tcc agt gtg gat ctc cac act cac tgc
 tcc tac cag ctt atg ttg 1220
 Leu Ser Ser Val Asp Leu His Thr His Cys
 Ser Tyr Gln Leu Met Leu
 360 365 370
 cca gag gcc att gcc att gtg tgt tcc cca
 aag cat aaa gac acc ggc 1268
 Pro Glu Ala Ile Ala Ile Val Cys Ser Pro
 Lys His Lys Asp Thr Gly
 375 380 385
 att ttc agg ctc acc aac gct ggc atg ctt
 gag gtt tct act tgt aaa 1316
 Ile Phe Arg Leu Thr Asn Ala Gly Met Leu
 Glu Val Ser Thr Cys Lys
 390 395 400
 aag aag ggc ttc cat cct cac acc aag gac
 ccc aag ctg ttc agt ata 1364
 Lys Lys Gly Phe His Pro His Thr Lys Asp
 Pro Lys Leu Phe Ser Ile
 405 410 415
 tgc agc cat gtg tta gta aag gac ata aaa
 aca act gtg ttg gat ctg 1412
 Cys Ser His Val Leu Val Lys Asp Ile Lys
 Thr Thr Val Leu Asp Leu
 420 425 430 4
 35
 agg tgacatgccc taa
 1428
 Arg
 <210> 4
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 Met Glu Gln Pro Phe Thr Val Asn Ser Leu
 Lys Lys Leu Ala Ala Met
 1 5 10 15
 Pro Asp His Thr Asp Val Ser Leu Ser Pro
 Glu Glu Arg Val Arg Ala

Arg Gln Arg Ile Ala Gln Met Arg Gln Gln Gln Leu Glu Ser Glu Gln	165	170	175
Phe Leu Phe Phe Glu Asp Gln Leu Lys Lys Gln Glu Leu Ala Arg Gly	180	185	190
Gln Ile Arg Gly Gln Asp Ser Pro Val Leu Ser Glu Gln Thr Asp Gly	195	200	205
Ser Ala Leu Ser Cys Phe Ser Thr His Gln Ser Asn Ser Leu Arg Asn	210	215	220
Ala Phe Ala Asp His Pro His Lys Ser Asp Gly Ser Asn Phe Ala Asn	225	230	235
40			2
Tyr Ser Pro Pro Val Asn Arg Ala Leu Lys Pro Ala Ala Thr Leu Ser	245	250	255
Ala Val Gln Asn Leu Val Val Glu Gly Leu Arg Cys Val Val Leu Ser	260	265	270
Arg Asp Leu Cys His Lys Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ser Asn Thr Val	275	280	285
Arg Gly Ile Glu Thr Cys Gly Ile Leu Cys Gly Lys Leu Thr His Asn	290	295	300
Glu Phe Thr Ile Thr His Val Val Val Pro Lys Gln Ser Ala Gly Pro	305	310	315
20			3
Asp Tyr Cys Asp Val Glu Asn Val Glu Glu Leu Phe Asn Val Gln Asp	325	330	335
Gln His Gly Leu Leu Thr Leu Gly Trp Ile His Thr His Pro Thr Gln	340	345	350
Thr Ala Phe Leu Ser Ser Val Asp Leu His Thr His Cys Ser Tyr Gln	355	360	365
Leu Met Leu Pro Glu Ala Ile Ala Ile Val Cys Ser Pro Lys His Lys	370	375	380
Asp Thr Gly Ile Phe Arg Leu Thr Asn Ala Gly Met Leu Glu Val Ser	385	390	395
00			4
Thr Cys Lys Lys Lys Gly Phe His Pro His Thr Lys Asp Pro Lys Leu	405	410	415

	1	5	10	
	gct gct atg cct gac cat aca gat gtt tct			
	cta agt cca gag gag cgg 158			
	Ala Ala Met Pro Asp His Thr Asp Val Ser			
	Leu Ser Pro Glu Glu Arg			
	15	20	25	
	gtc cgc gcc cta agc aaa ctt ggt tgt aat			
	atc tcc att aat gaa gat 206			
	Val Arg Ala Leu Ser Lys Leu Gly Cys Asn			
	Ile Ser Ile Asn Glu Asp			
	30	35	40	45
	atc acc cca cgc cgt tac ttc agg tcc gga			
	gtg gaa atg gaa agg atg 254			
	Ile Thr Pro Arg Arg Tyr Phe Arg Ser Gly			
	Val Glu Met Glu Arg Met			
	50	55	60	
	gca tct gtg tat ttg gaa gaa gga aac ctg			
	gaa aat gcc ttt gtt ctt 302			
	Ala Ser Val Tyr Leu Glu Glu Gly Asn Leu			
	Glu Asn Ala Phe Val Leu			
	65	70	75	
	tat aac aaa ttt ata acg tta ttt gta gaa			
	aaa ctt ccc agc cac cga 350			
	Tyr Asn Lys Phe Ile Thr Leu Phe Val Glu			
	Lys Leu Pro Ser His Arg			
	80	85	90	
	gat tac cag cag tgt gca gtt cca gag aag			
	cag gat att atg aag aaa 398			
	Asp Tyr Gln Gln Cys Ala Val Pro Glu Lys			
	Gln Asp Ile Met Lys Lys			
	95	100	105	
	ctg aag gag att gcg ttc cca agg aca gac			
	gaa ttg aaa acg gac ctg 446			
	Leu Lys Glu Ile Ala Phe Pro Arg Thr Asp			
	Glu Leu Lys Thr Asp Leu			
	110	115	120	1
	25			
	cta agg aaa tat aac ata gaa tac caa gag			
	tat ttg caa agt aaa aac 494			
	Leu Arg Lys Tyr Asn Ile Glu Tyr Gln Glu			
	Tyr Leu Gln Ser Lys Asn			
	130	135	140	
	aaa tat aaa gcc gaa att ctc aaa aag ttg			
	gaa cat cag aga ctg ata 542			
	Lys Tyr Lys Ala Glu Ile Leu Lys Lys Leu			
	Glu His Gln Arg Leu Ile			
	145	150	155	
	gag gca gag cgc cag cgg ata gct cag atg			
	cgc cag cag caa cta gag 590			
	Glu Ala Glu Arg Gln Arg Ile Ala Gln Met			
	Arg Gln Gln Gln Leu Glu			
	160	165	170	

gtt tta tca aga gat ctt tgc cat aaa ttt
 ctg ctg ctg gct gac tct 926
 Val Leu Ser Arg Asp Leu Cys His Lys Phe
 Leu Leu Leu Ala Asp Ser
 270 275 280 2
 85
 aac aca gtg aga gga ata gag acc tgt ggg
 atc ctc tgt gga aaa ctg 974
 Asn Thr Val Arg Gly Ile Glu Thr Cys Gly
 Ile Leu Cys Gly Lys Leu
 290 295 300
 aca cac aat gaa ttc acc att act cat gtg
 gtt gtg cca aag cag tct 1022
 Thr His Asn Glu Phe Thr Ile Thr His Val
 Val Val Pro Lys Gln Ser
 305 310 315

 gct ggc cca gac tat tgc gat gtg gag aac
 gtc gaa gaa tta ttc aat 1070
 Ala Gly Pro Asp Tyr Cys Asp Val Glu Asn
 Val Glu Glu Leu Phe Asn
 320 325 330
 gtt cag gat caa cat ggt ctc ctc aca ctg
 gga tgg atc cat aca cac 1118
 Val Gln Asp Gln His Gly Leu Leu Thr Leu
 Gly Trp Ile His Thr His
 335 340 345
 ccc acg caa acg gca ttc ctg tcc agt gtg
 gat ctc cac act cac tgc 1166
 Pro Thr Gln Thr Ala Phe Leu Ser Ser Val
 Asp Leu His Thr His Cys
 350 355 360 3
 65
 tcc tac cag ctt atg ttg cca gag gcc att
 gcc att gtg tgt tcc cca 1214
 Ser Tyr Gln Leu Met Leu Pro Glu Ala Ile
 Ala Ile Val Cys Ser Pro
 370 375 380
 aag cat aaa gac acc ggc att ttc agg ctc
 acc aac gct ggc atg ctt 1262
 Lys His Lys Asp Thr Gly Ile Phe Arg Leu
 Thr Asn Ala Gly Met Leu
 385 390 395
 gag gtt tct act tgt aaa aag aag ggc ttc
 cat cct cac acc aag gac 1310
 Glu Val Ser Thr Cys Lys Lys Lys Gly Phe
 His Pro His Thr Lys Asp
 400 405 410
 ccc aag ctg ttc agt ata tgc agc cat gtg
 tta gta aag gac ata aaa 1358
 Pro Lys Leu Phe Ser Ile Cys Ser His Val
 Leu Val Lys Asp Ile Lys
 415 420 425

	85	90	95
Gln Cys Ala Val Pro Glu Lys Gln Asp Ile			
Met Lys Lys Leu Lys Glu			
	100	105	110
Ile Ala Phe Pro Arg Thr Asp Glu Leu Lys			
Thr Asp Leu Leu Arg Lys			
	115	120	125
Tyr Asn Ile Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Gln			
Ser Lys Asn Lys Tyr Lys			
	130	135	140
Ala Glu Ile Leu Lys Lys Leu Glu His Gln			
Arg Leu Ile Glu Ala Glu			
145	150	155	1
60			
Arg Gln Arg Ile Ala Gln Met Arg Gln Gln			
Gln Leu Glu Ser Glu Gln			
	165	170	175
Phe Leu Phe Phe Glu Asp Gln Leu Lys Lys			
Gln Glu Leu Ala Arg Gly			
	180	185	190
Gln Ile Arg Gly Gln Asp Ser Pro Val Leu			
Ser Glu Gln Thr Asp Gly			
	195	200	205
Ser Ala Leu Ser Cys Phe Ser Thr His Gln			
Ser Asn Ser Leu Arg Asn			
	210	215	220
Ala Phe Ala Asp His Pro His Lys Ser Asp			
Gly Ser Asn Phe Ala Asn			
225	230	235	2
40			
Tyr Ser Pro Pro Val Asn Arg Ala Leu Lys			
Pro Ala Ala Thr Leu Ser			
	245	250	255
Ala Val Gln Asn Leu Val Val Glu Gly Leu			
Arg Cys Val Val Leu Ser			
	260	265	270
Arg Asp Leu Cys His Lys Phe Leu Leu Leu			
Ala Asp Ser Asn Thr Val			
	275	280	285
Arg Gly Ile Glu Thr Cys Gly Ile Leu Cys			
Gly Lys Leu Thr His Asn			
	290	295	300
Glu Phe Thr Ile Thr His Val Val Val Pro			
Lys Gln Ser Ala Gly Pro			
305	310	315	3
20			
Asp Tyr Cys Asp Val Glu Asn Val Glu Glu			
Leu Phe Asn Val Gln Asp			
	325	330	335
Gln His Gly Leu Leu Thr Leu Gly Trp Ile			
His Thr His Pro Thr Gln			
	340	345	350

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:5AM
 <400> 7
 tcccacctcc tcttgctatt tcataccc
 28

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:3L
 23

24

【図面の簡単な説明】400> 8

【図1】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスの遺伝子地図と、各マウスにおけるPCR法及びサザンプロット法と、各マウスにおけるノーザンプロット分析の結果を示す図である。

【図2】本発明のAMSHノックアウトマウス、ヘテロ接合体マウス、及び野生型マウスの生存曲線と、各マウスの平均体重の結果を示す図である。

【図3】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスのT細胞発達及びサイトカインによる細胞増殖反応の結果を示す図である。

【図4】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスの脳における組織分析の結果を示す図である。

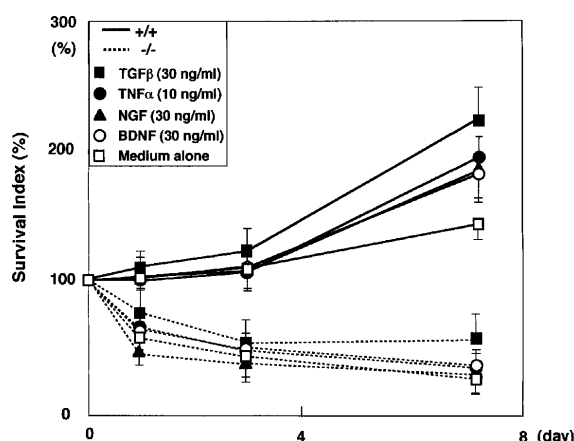
【図5】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスの後部海馬冠状切片におけるニューロンの細胞死の結果を示す図である。

【図6】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスの脳におけるAMSH mRNAの発現結果を示す図である。

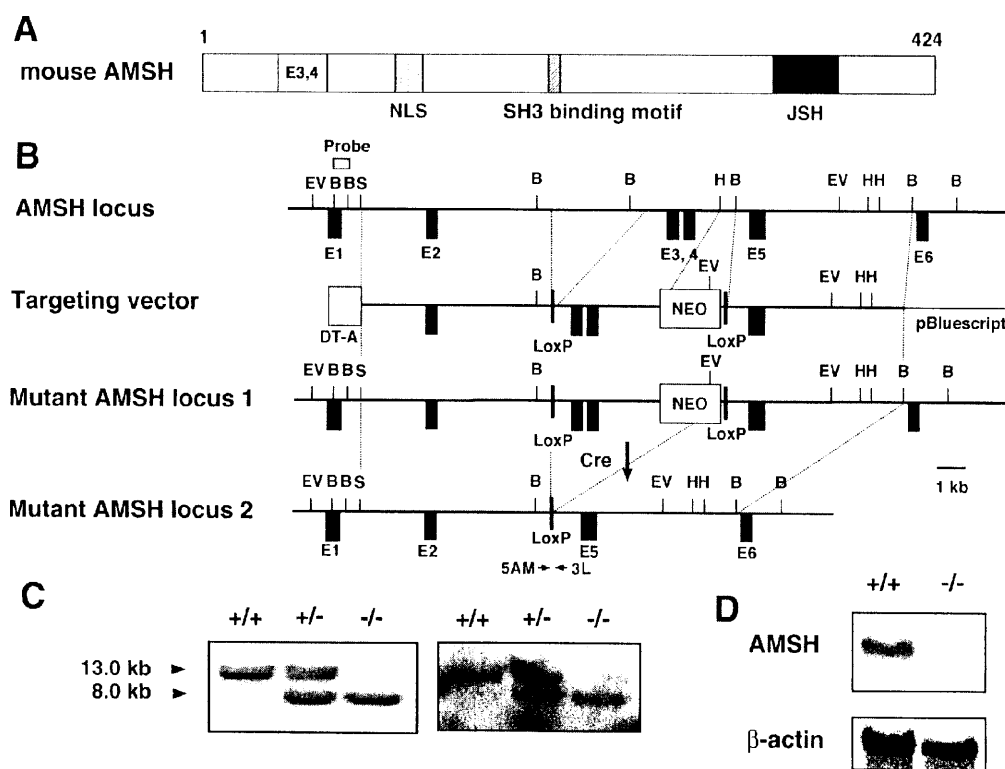
【図7】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウスの海馬ニューロンをインビトロで初期培養した時の細胞生存率の結果を示す図である。

【図8】本発明のAMSHノックアウトマウス及び野生型マウス由来のニューロンを各種サイトカインの存在下で刺激した時の細胞生存率の結果を示す図である。

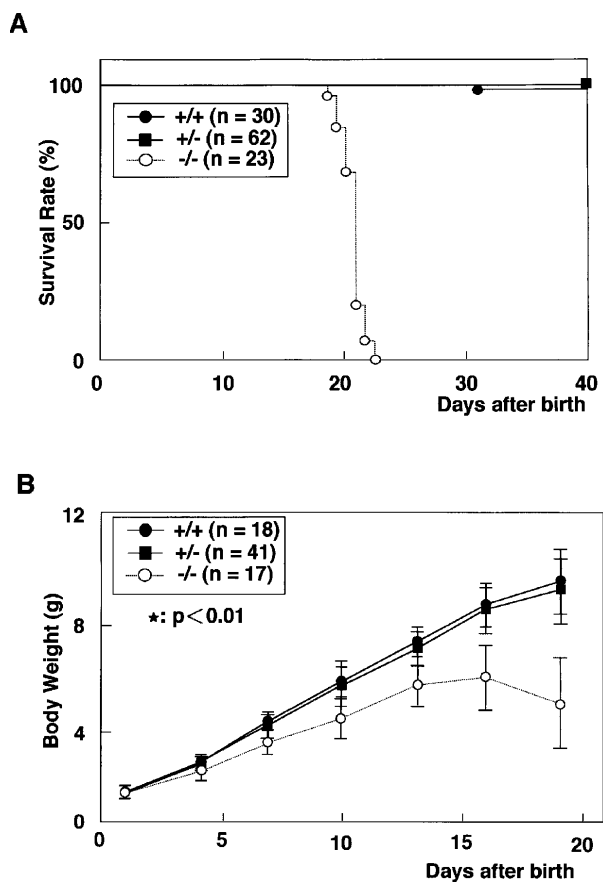
【図8】



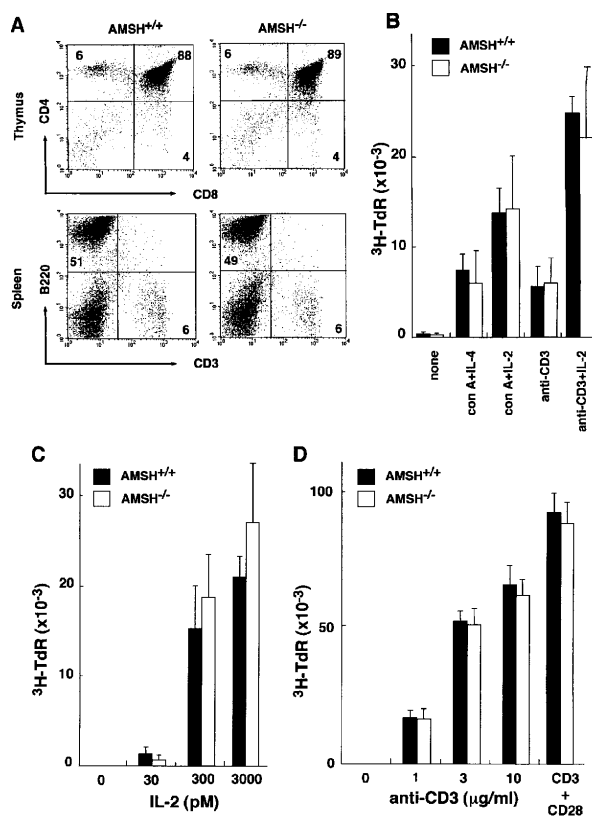
【図 1】



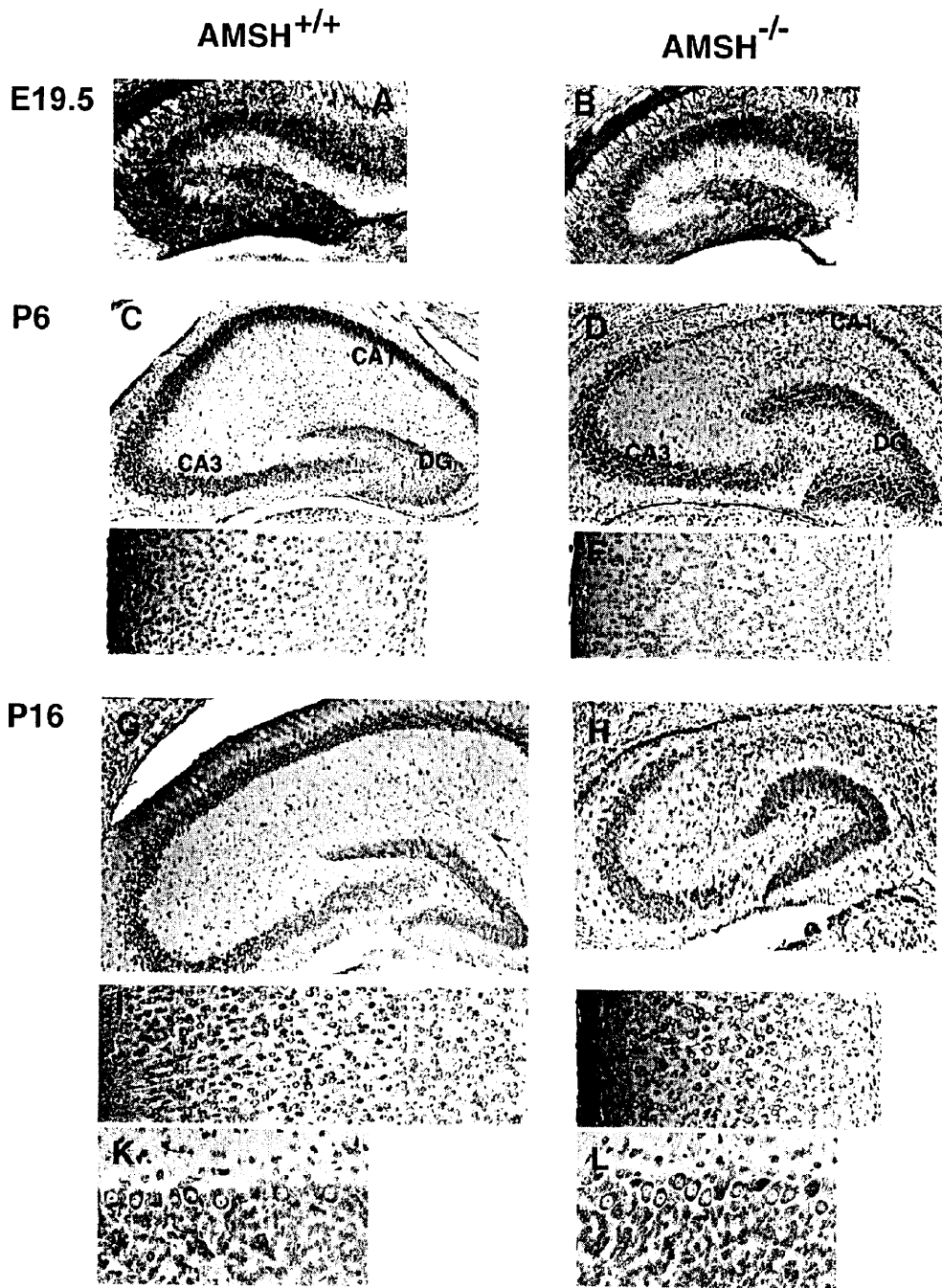
【図 2】



【図 3】



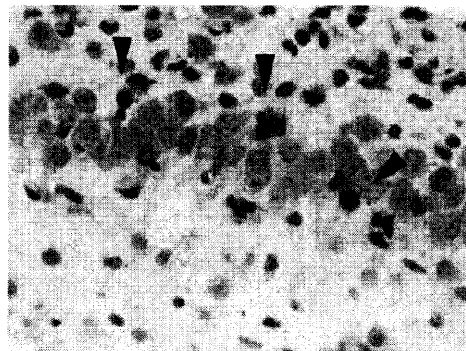
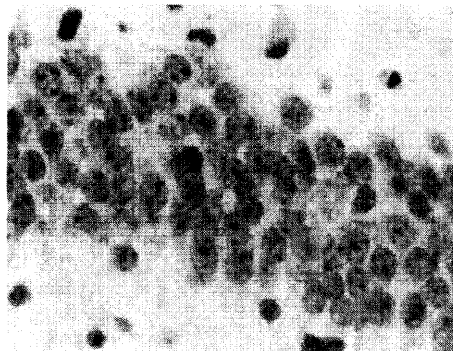
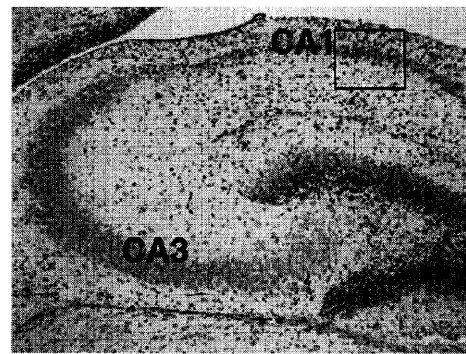
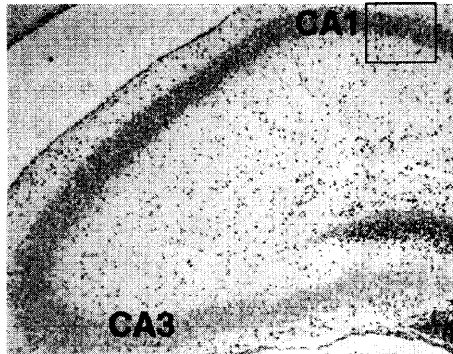
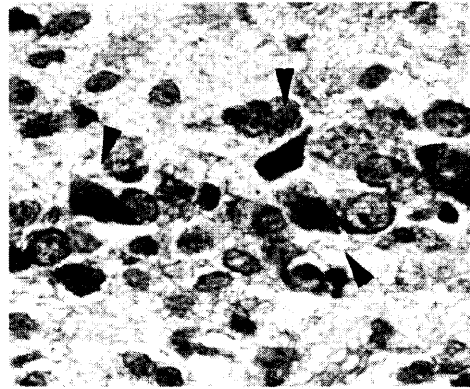
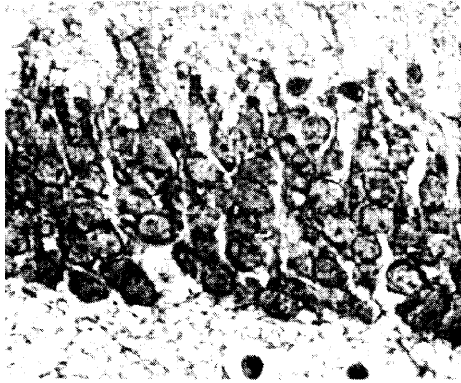
【図4】



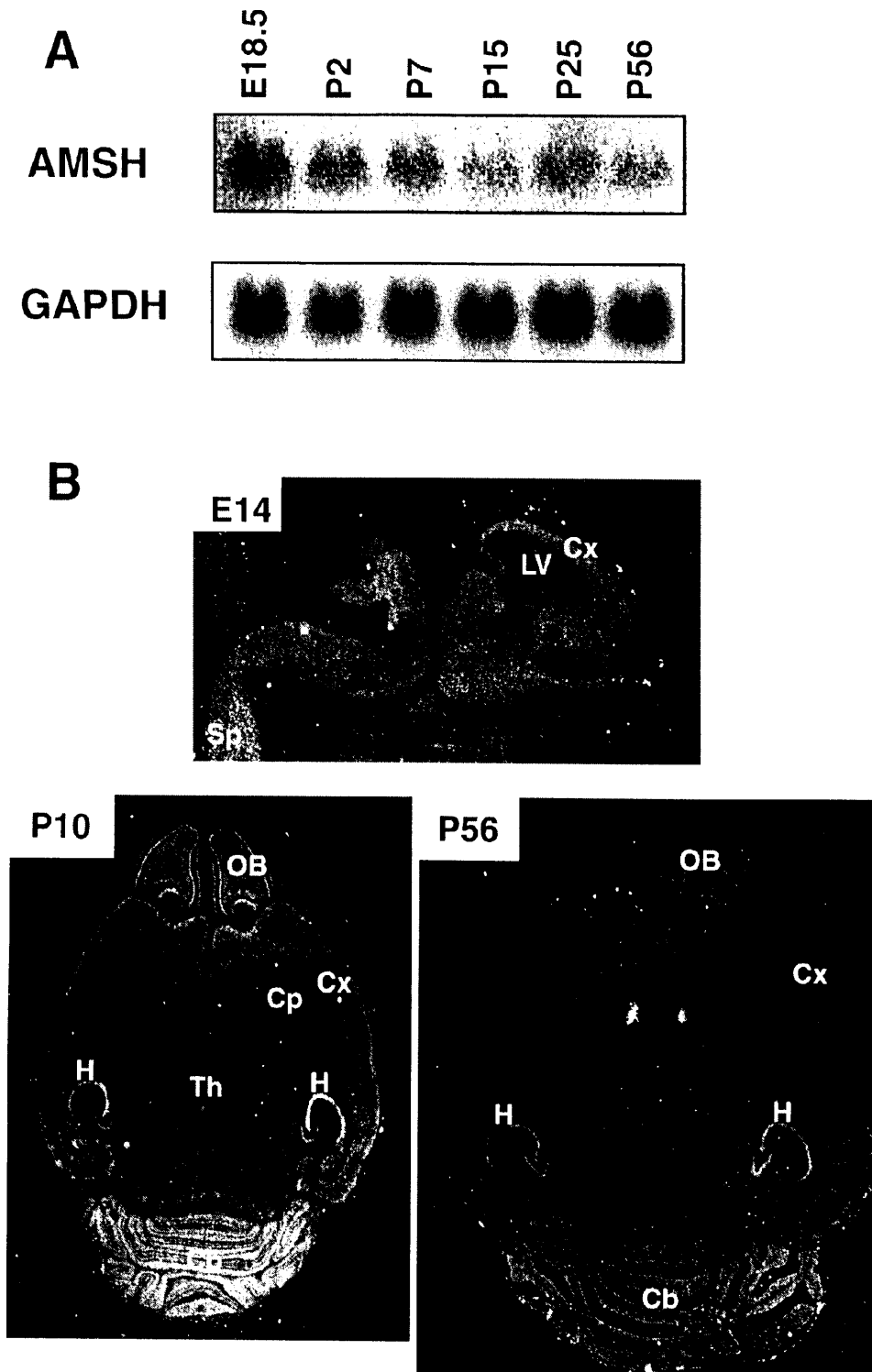
【図5】

AMSH^{+/+}

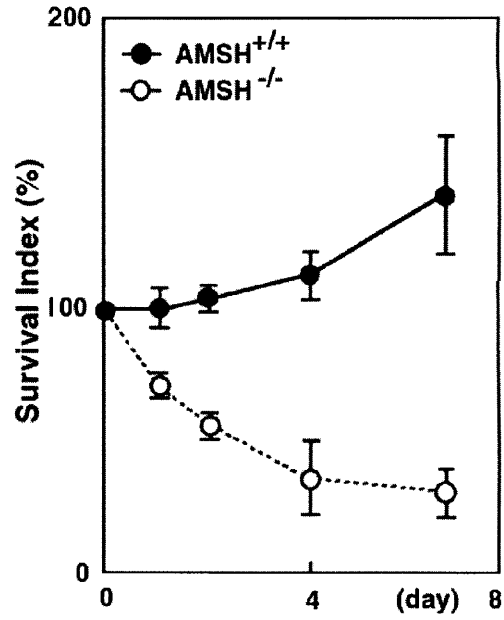
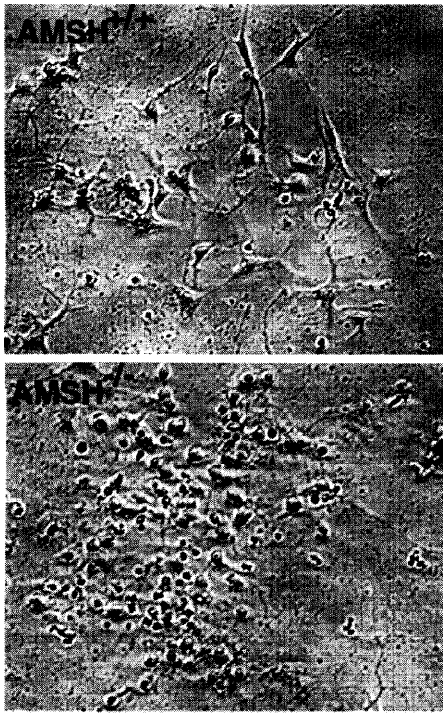
AMSH^{-/-}



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

G 0 1 N 33/50
33/53

G 0 1 N 33/53

33/566

D
M

33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A A

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 CA09
GA16 HA11
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ02 QQ43
QR32 QR55 QS34 QX01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA51
EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	细胞死亡诱导模型非人类动物		
公开(公告)号	JP2003018944A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2001184136	申请日	2001-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	菅村和夫 石井直人		
发明人	菅村 和夫 石井 直人		
IPC分类号	A01K67/027 A61P43/00 C07K14/34 C07K14/685 C07K14/715 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2267/03 A01K2267/0306 C07K14/34 C07K14/685 C12N2800/30 G01N33/5088		
FI分类号	A01K67/027 C07K14/715 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.202.C C12N5/0735		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/GA16 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4B065/AA90		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种能够特异性地诱导神经细胞或免疫系统细胞死亡并研究和分析细胞因子信号转导机制的细胞死亡诱导模型非人类动物，以及一种细胞死亡诱导模型非人类动物 提供用于筛选促进或抑制细胞死亡等的物质的方法。通过用新霉素抗性盒替换包含AMSH基因全部或部分的片段，并在其一侧插入loxP，将不具有poly A区的白喉毒素A链用作阴性选择标记。通过插入基因盒构建靶标载体，将靶标载体引入胚胎干细胞，并将重组酶Cre表达载体将AMSH基因功能缺陷的ES克隆显微注射到小鼠胚胎中，通过返回子宫来制备细胞死亡诱导模型非人类动物。

【图 8】

