

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年1月6日 (06.01.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/001085 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, A01K 67/027
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/009380
- (22) 国際出願日: 2004年6月25日 (25.06.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-185409 2003年6月27日 (27.06.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人放射線医学総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安倍 真澄 (ABE, Masumi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 熊倉 禎男, 外 (KUMAKURA, Yoshio et al.); 〒1008355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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。



WO 2005/001085 A1

(54) Title: MOUSE EXHIBITING CHARACTERISTICS OF ROSMOND THOMSON SYNDROME AND METHOD OF PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法

(57) Abstract: A non-human mammal, especially a mouse exhibiting the characteristics of Rosmond Thomson syndrome as a result of introduction of a variation in exon 13 of RECQL4-gene; and a method of preparation thereof.

(57) 要約: RECQL4遺伝子のエキソン13に変異を導入して、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物、特にマウス及びその作製方法を提供する。

明細書

ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法

技術分野

本発明は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物、特にマウス及びその作製方法に関する。より具体的には、RECQL4 遺伝子のエクソン 13 に変異を有し、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス及びその作製方法に関する。

背景技術

ロスモンドは、多形皮膚萎縮症(ポイキロデルマ、poikiloderma)と若年性の白内障を特徴とする疾患を、トムソンは多形皮膚萎縮症と遺伝性の骨形成異常を特徴とする疾患を報告したが (Rothmund, A. (1868) *Über cataracten in verbindung mit einer eigenthumlichen hautdegeneration. Arch. Klin. Exp. Opht hal.*, 4, 159-182.、Thomson, M.S. (1936) *Poikiloderma congenitale. Br. J. Dermatol.*, 48, 221-234)、後に、ロスモンド・トムソン症候群として病名が統一された。即ち、ロスモンド・トムソン症候群 (以下 R T S と略記) は、成長障害、多形皮膚萎縮症、脱毛、白内障、骨形成異常、骨肉腫の発がん頻度が高いという徴候を示す常染色体劣性遺伝病である (Ichikawa, K., Noda, T. and Furuichi, Y. (2002) *Preparation of the gene targeted knockout mice for human premature aging diseases, Werner syndrome, and Rothmund-Thomson syndrome caused by the mutation of DNA helicases. Nippon Yakurigaku Zasshi.*, 119, 219-226.、Vennos, E.M. and James, W.D. (1995) *Rothmund-Thomson syndrome. Dermatol. Clin.*, 13, 143-150.、Vennos, E.M., Collins, M. and James, W.D. (1992) *Rothmund-Thomson syndrome: review of the wor*

ld literature. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 27, 750-762)。

これらの症状はまた R T S が早期老化症候群であることを示唆する。代表的な早期老化症候群として、ウェルナー症候群とブルーム症候群が知られ、それぞれ、WRN 遺伝子と BLM 遺伝子の突然変異が原因であることが知られている (Mohagheh, P. and Hickson, I.D. (2001) DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 741-746.)。

これらの遺伝子は RecQ ヘリケース遺伝子 (RecQ helicase) ファミリーに属している。この同じファミリーに属している RECQL4 遺伝子については、多くの R T S 患者で突然変異が見つかった。突然変異は、RECQL4 タンパク質分子の中でとくにヘリケース活性をもつ部分に集中している (図 1 の矢印部分)。そこで、RECQL4 遺伝子のヘリケース活性部分の変異が R T S の原因なのかを確認し、R T S 患者のマウスモデルを作る目的で、RECQL4 遺伝子を破壊したマウス個体の作製が試みられていた。しかし、RECQL4 遺伝子の 22 個のエキソンの中でエキソン 5~8 をノックアウトしたマウスは胎生 3.5~6.5 日に死亡し、作製には成功していなかった (Ichikawa, K., Noda, T. and Furuichi, Y. (2002) Preparation of the gene targeted knockout mice for human premature aging diseases, Werner syndrome, and Rothmund-Thomson syndrome caused by the mutation of DNA helicases. *Nippon Yakurigaku Zasshi.*, 119, 219-226)。

発明の開示

本発明の目的は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物、特にマウス及びその作製方法を提供することである。より具体的には、RECQL4 遺伝子のエキソン 13 に変異を有し、ロスモンド・トムソン症候群の

特徴を示すマウス及びその作製方法に関する。

本発明者らは、マウス RECQL4 遺伝子(単に Recql4 と記載する)のエクソン 1 3 のみを改変することによって、RECQL4 遺伝子欠損マウスを作製し得ること、及び、作製された遺伝子欠損マウスが、ヒトのロスモンド・トムソン症候群の特徴の少なくともいくつかを示すことを見いだした。本発明はこれらの知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、

- (1) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物；
- (2) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すげっ歯類動物；
- (3) ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス；
- (4) RECQL4 遺伝子のエクソン 1 3 に変異を有し、かつ、RECQL4 遺伝子のエクソン 1 4～2 2 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエクソン 1 4～2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、前記 (3) に記載のマウス；
- (5) RECQL4 遺伝子のエクソン 1 3 に変異を有し、かつ、RECQL4 遺伝子のエクソン 1 4～2 2 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエクソン 1 4～2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、RECQL4 遺伝子欠損マウス；
- (6) RECQL4 遺伝子のエクソン 1 3 が配列番号 3 に記載の配列を有する、前記 (4) 又は (5) に記載のマウス；
- (7) RECQL4 がヘリカーゼ活性を喪失している、前記 (3) ～ (6) のいずれか 1 つに記載のマウス；
- (8) RECQL4 遺伝子のエクソン 1 3 に変異を導入することを特徴とする、前記 (3) ～ (7) のいずれか 1 つに記載のマウスの作製方法；
- (9) 作製されたマウスの RECQL4 遺伝子のエクソン 1 3 全体が欠失している、前記 (8) に記載の方法；
- (10) 作製されたマウスの RECQL4 遺伝子のエクソン 1 4～2 2 が、野生型

RECQL4 遺伝子のエキソン 14～22 に対応するアミノ酸配列をコードする、前記 (8) 又は (9) に記載の方法；

(11) RECQL4 遺伝子のエキソン 13 が配列番号 3 に記載の配列を有する、請求項 (8)～(10) のいずれか 1 つに記載の方法；及び

(12) RECQL4 遺伝子のエキソン 13 への変異導入をジーンターゲッティングによって行う、前記 (8)～(11) のいずれか 1 項に記載の方法である。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト R T S 患者で報告されている RECQL4 遺伝子の突然変異の位置を示す図である。図中の矢印が突然変異の位置を示す。矩形は一つのエキソンに相当する。影付きの矩形は RecQ ヘリケースドメインを示す。

図 2 は、本発明の RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) の作製スキームを示す。上段は野生型マウスの RECQL4 遺伝子の構造を示す。中断は、遺伝子ターゲティングベクターの構造を示す。下段は遺伝子ターゲティングによる相同組み換え後の RECQL4 遺伝子の構造を示す。

T K はチミジンカイネース遺伝子を示し、Neor はネオマイシン耐性遺伝子を示す。矢印は転写の方向を示す。

X印は制限酵素 XbaI の認識配列の部位を示す。

「3' プローブ」は、サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブの領域を示す。

矢頭は R T - P C R に用いたプライマーを示す。

図 3 は、RECQL4 遺伝子のエキソン 13 を破壊させるための、遺伝子ターゲティングベクターの作製の基礎になったベクター NTBlunt を示す。

図 4 は、野生型マウス (Recql4^{+/+})、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス

(Recql4+/-) 及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-) の個体の尾の一部から抽出したDNAの、Recql4遺伝子の3'プロンプによるサザンブロットの結果を示す。

図5は、遺伝子ターゲティング前後の、マウスの RECQL4 遺伝子の転写産物より作製した cDNA の塩基配列を示す。

図6は、RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-) におけるエクソン13欠失転写産物についての定量的PCRの結果を示す。

図7は、野生型マウス (Recql4+/+)、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4+/-) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-) の19日目における外観を示す。

図8は、野生型マウス (Recql4+/+) 及び RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-) の生後10週間後における外観を示す。

図9は、野生型マウス (Recql4+/+)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4+/-) 及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-) の各個体に由来するMEFの細胞増殖を示す。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「ロスモンド・トムソン症候群 (RTS) の特徴を示す」とは、皮膚の異常 (多形皮膚萎縮症、無色毛及び脱毛等)、低身長 (体長)、骨形成障害、白内障、免疫異常、不稔及び悪性腫瘍といったヒトRTSの特徴のうち1以上の特徴を示すことをいう (後述の表1を参照)。

本明細書において、「RECQL4 遺伝子欠損マウス」とは、RECQL4 遺伝子に変異を有し、その結果、RECQL4 タンパク質が正常な機能を有しないマウス、特に RECQL4 のヘリカーゼ活性が失われているマウスをいう。本発明の「RECQL4 遺伝子欠損マウス」は、ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す。

本発明においては、RECQL4 遺伝子のエクソン 13 に変異が導入され、それによって RECQL4 タンパク質の機能、特にヘリカーゼ活性が失われている。

マウス RECQL4 の cDNA 配列を配列番号 1 に、アミノ酸配列を配列番号 2 に示した。本発明の一実施態様においては、エクソン 13 は配列番号 3 に記載の配列を有する。配列番号 3 に記載のエクソン 13 は、配列番号 1 中のヌクレオチド No.1945-2124 に相当する。

本発明の一態様では、マウス RECQL4 遺伝子のエクソン 13 全体が欠失している。エクソン 13 (180 bp) は、ヘリケース活性に不可欠なアミノ酸配列をコードするエクソンである。エクソン 13 は、その構成塩基数が 3 の倍数 (180 bp) である。したがって、エクソン 13 全体が通常のスプライシングから除外されると、次のエクソン 14~22 においてフレーム (アミノ酸配列の読み枠) が保たれて野生型 Recql4 と相同なタンパク質を発現するようなエクソンとなる。エクソン 14~22 のいずれのエクソンも構成塩基数が単独では 3 の倍数ではないので、このようなエクソンを構成しうるエクソンとしては、エクソン 1~22 の中でエクソン 13 が最も C 末端のエクソンとなる。したがって、本発明の RECQL4 遺伝子欠損マウスでは、その RECQL4 遺伝子のエクソン 14~22 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエクソン 14~22 に対応するアミノ酸配列をコードしていることが好ましい。

RECQL4 タンパク質は、ヘリケーススーパーファミリー II 型 (SFII) に属し、7 つの保存領域を有するタンパク質である。その中で、エクソン 13 はモチーフ III をコードする。モチーフ III の TAT(SAT)配列は、ATP の加水分解を必要とするヘリケース活性と DNA への結合にとって重要であることが仮想的 RNA ヘリケースの X 線構造解析により示されている (Story, R.M., Li, H. and Abelson, J.N. (2001) Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 1

465-1470)。また、マウス eIF4a (SFII の一つ) の SAT 配列の突然変異 (Paus e, A. and Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. EMBO J., 11, 2643-2654.) 及びマウス Blm のモチーフ III の突然変異 (Bahr, A., De Graeve, F., Kedinger, C. and Chatton, B. (1998) Point mutations causing Bloom's syndrome abolish ATPase and DNA helicase activities of the BLM protein. Oncogene, 17, 2565-2571.) によって、ヘリケース活性が欠損することが示されている。更に、E.coli の RecG ヘリケースの TAT 配列の突然変異がブランチ・マイグレーション (branch migration) を抑制することが示されている。これらの報告は、モチーフ III の存在がヘリケース活性にとって不可欠であることを示している。したがって、本発明の一つの実施態様においては、エキソン 13 のモチーフ III を破壊する変異が導入されていてもよい。この場合でも、本発明の RECQL4 遺伝子欠損マウスは、その RECQL4 遺伝子のエキソン 14 ~ 22 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエキソン 14 ~ 22 に対応するアミノ酸配列をコードしていることが好ましい。

マウス以外の非ヒト哺乳動物、特にげっ歯類動物を標的とする場合も、モチーフ III が含まれるエキソンを変異導入の標的とし、かつ上述した性質を有する変異を導入することができる。

マウスとしては、一般的にモデルマウスの作製に用いられる 129/SV を使用することができる。

本発明において、RECQL4 遺伝子への変異の導入は、いわゆる遺伝子ターゲティングによって行うことができる。

本発明のマウスを作製するためのターゲティングベクターとしては、例えば、
(1) ポジティブ選択マーカー、
(2) ポジティブ選択マーカーの 5' 側領域に存在し、RECQL4 遺伝子のエキ

ソン 1～12 又はその一部に相同な配列 (Long arm)、及び、

(3) ポジティブ選択マーカの 3' 側領域に存在し、RECQL4 遺伝子のエキソン 14～20 又はその一部に相同な配列 (Short arm)

を有するベクターを利用することができる (図 2、中段)。

Long arm 及び Short arm は、一般には長い方が好ましいと考えられており、例えば、5' 側領域は RECQL4 遺伝子のエキソン 1～12 を含み長さが 4kb 以上あることがより好ましいが、3' 側及び 5' 側のいずれについても長さは本発明に本質的ではなく、このような遺伝子ターゲティングに通常利用される長さを有していればよい。また、相同組換えを生じさせる領域は、標的領域と完全に同一である必要はなく、相同組換えが生じる程度の配列類似性を有していればよい。

ポジティブ選択マーカとしては、一般に薬剤耐性遺伝子を用いることができ、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いることができる。

ターゲティングベクターは、相同組換えが起きたことを確認するためのネガティブ選択マーカを更に含んでいてもよい。そのようなマーカとしては、チミンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素 A 遺伝子を利用することができる。

次に、このようなターゲティングベクターを胚性幹細胞 (ES 細胞) へ導入する。導入方法は特に限定されず、このような場合に用いられる当業者に知られた一般的な方法及び条件を利用することができる。例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション法などが利用できる。

ターゲティングベクターを導入した ES 細胞は、適切な条件下で培養することができる。例えば、ES 細胞の培養に適し、かつ、ポジティブ選択用マーカ及びネガティブ選択用マーカに対応した薬剤を含む培地中で培養することができる。ES 細胞の培養条件及び培養方法は当業者にはよく知られたものである。必要であれば、更に PCR 等により導入された遺伝子及びその位置、方向を確認す

することもできる。

得られた RECQL4 遺伝子欠損ヘテロ ES 細胞 (Recql4 +/-) を、当業者によく知られた方法に従って、胚盤胞へマイクロインジェクションする。その後、偽妊娠動物への導入等により目的とする遺伝子が導入されたキメラ動物を得ることができる。得られたキメラ動物は、ES 細胞由来の性質、例えば毛皮の色等を指標として導入遺伝子について選抜することができる。

選抜された動物と遺伝子導入していない動物とを交配して子孫動物 (F1 動物) を得る。ES 細胞由来の性質、例えば毛皮の色を指標にして生殖細胞に導入遺伝子を有する動物を更に選抜することができる。必要であれば、更に得られた動物の一部、例えば尾部から DNA を取得し、PCR によって導入遺伝子の有無を確認することもできる。このようにして得られた RECQL4 遺伝子欠損ヘテロ動物 (Recql4 +/-) 同士を交配して RECQL4 遺伝子欠損ホモ動物 (Recql4 -/-)、例えば RECQL4 遺伝子のエキソン 13 全体が欠失している変異動物を得ることができる。

得られた本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物 (Recql4 -/-) を、野生型動物 (Recql4 +/+) を対照として、その性質を調べることができる。例えば、動物の外観観察、皮膚の状態観察、悪性腫瘍の発生頻度の計測、Recql4 の転写産物量の測定、組織標本観察、細胞学解析等を行うことができる。転写産物量は、例えばトータル RNA 又はポリ (A) RNA を RT-PCR によって定量することができる。組織標本観察は、常法に従って、ホルマリン等で固定し、パラフィン包埋した切片を用いて行うことができる。細胞学的解析は、組織から細胞を単離し、例えば、種々の刺激、特に放射線、又は紫外線に対する感受性を測定することによって行うことができる。更に、一定期間後の動物の体重、体長、体高等を指標に動物の成育能を測定することもできる。

本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物 (Recql4 -/-)、特にマウスでは、顕著な脱

毛、びらん性の出血を伴う病変が見られる。また、上皮、真皮、皮下組織の形成が不良となる。本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物、特にマウスでは、骨組織の形成、特に、骨梁形成が不良となる。また、本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物、特にマウスでは生長も遅延し、生後 10 週において正常固体の約 1/3 程の大きさしかない。また、このようなマウスから採種した細胞は増殖速度が野生型の 2/3 程度に低下する。さらに、本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物、特にマウスは小腸上皮の絨毛の大きさ及び数が正常固体に比べて減少する。

表 1 は、本発明の RECQL4 遺伝子欠損マウスのこれらの特徴、及びその他の特徴とヒトの R T S の症状を比較した結果である。このことは、本発明の RECQL4 遺伝子欠損動物、特にマウスがヒトのロスモンド・トムソン症候群 (R T S) のモデルとして利用し得ることを示す。本明細書において、「ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す」とは、下記の表において R T S の特徴として示される 1 以上の特徴を示すことをいう。

表 1. 本発明の RECQL4 欠損動物の特徴とヒトの R T S の症状の比較

| 特徴/症状 | R T S | Recql4 遺伝子欠損マウス |
|----------|----------------|-----------------|
| 皮膚の異常 | | |
| 多形皮膚萎縮症 | + | - |
| 無色毛 | + | + |
| 脱毛 | + | + |
| 低身長 (体長) | + | + |
| 骨形成障害 | + | + |
| 白内障 | + | - ^b |
| 免疫異常 | 希 | + ^c |
| 不稔 | + | + ^d |
| 悪性腫瘍 | + | - ^b |
| X-線高感受性 | ? ^a | - ^e |
| UV 高感受性 | ? ^a | - ^e |

a: 一部の R T S 患者の細胞は X 線及び紫外線に感受性だが、そうでない患者もいる。

b : 2 ~ 8 週齡のマウス (n=23) について得られたデータ。

c : T 細胞が僅かしか見られない。

d : 組織学的検査によれば Recql4 遺伝子欠損マウスの精子形成は正常であったが、Recql4 遺伝子欠損マウスを C57BL/6 マウス又は同腹仔と交配した場合には新生仔は生まれなかった (オス n=5、メス n=4)。

e : MEF についてのデータ。

実施例 1

ターゲッティングベクターの構築

ターゲッティングベクターは、ポジティブ選択マーカとしてのネオマイシン耐性遺伝子及びネガティブ選択マーカとしてのチミジンカイネース遺伝子 (相同組換えが起こらなかった場合、そのままゲノムに取り込まれて、細胞をガンアシクロビルに対して致死感受性にする遺伝子) を含む NTBlunt ベクターへ、Long arm 及び Short arm を挿入することにより構築した。

NTBlunt ベクターは、ネオマイシン耐性遺伝子 (PGKNeo) を有する pKJ1 ベクター (NAR, vol19, no. 20 5755-5761, 1991. McBurney MW et. al.) を制限酵素 EcoRI, BglII で切り出し、得られた PGKNeopA を、制限酵素 EcoRI 及び BamHI で切断した pBluescriptII へ挿入し、更にチミジンカイネース遺伝子 (HSV-TK) を常法に従い挿入することにより作製した。

Long arm (ポジティブ選択マーカの 5' 側領域) は、マウス ES 細胞の Recql4 遺伝子のエキソン 1 からエキソン 12 を含む 4.3 kb のゲノム DNA (ES 細胞株 R1 から通常のフェノールクロロホルム抽出により調製) を鋳型に、次のプライマーを用いた PCR により作製した。

mQ4-1(+)₃₀ 5' -CTTTTGCACGGCTGCACGGGCGACGGCCAG-3'

(配列番号 4)

mQ4-Co1(-)30 5' -CAGCTATGCCAAGGTGCTGAGCCACATCTC-3'
(配列番号5)

Short arm (ポジティブ選択マーカークの3'側領域)は、マウスES細胞のRecql4遺伝子のエクソン14からエクソン20を含む1.9kbのゲノムDNA (ES細胞株R1から通常のフェノールクロロホルム抽出により調製)を鋳型に、次のプライマーを用いたPCRにより作製した。

mQ4-6(+)-30 5' -TTGAGCTCAGCGGGTCAGCCAACATCCCTG-3' (配列番号6)

mQ4-9(-)30 5' -TGCTCTAAACAGGGTCCACAACACTGGGAAAG-3' (配列番号7)

ポリメラーゼとしてKODplus (TOYOBO)を用い、添付のプロトコールに従いPCRを行った。

NTBluntベクターへの制限酵素HpaIの認識部位にShort armを、制限酵素SwaIの認識部位にLong armを常法により挿入した。ターゲティングベクターの作製の基礎になったベクターNTBluntを図3に示す。

Recql4遺伝子のジーンターゲティング

ターゲティングベクターに用いたマウスES細胞は、マウスES細胞R1株 (Nagy, A博士より入手。連絡先: Division of Molecular and Developmental Biology, Samuel Lumenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada) (Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8424-8428.)であった。

ターゲティングベクター30 μ gを、R1細胞 2×10^7 個と共にキュベッ

ト（電極間4 mm）（BioRad）に加え、GenePulserII（BioRad）を用いたエレクトロポレーション（電圧：250 V、容量：950 μ F）によりマウスES細胞へ導入した。

得られたターゲティングベクター導入ES細胞を、Nagyらの文献（Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep 15;90(18):8424-8. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.; Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Division of Molecular and Developmental Biology, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada.）にしたがい、選択薬剤G418（ポジティブ選択用；ネオマイシン誘導体）及びガンアシクロビル（ネガティブ選択用）を含む培地中で培養した。

双方の選択薬剤に耐性を示す細胞のクローンを培養し、常法によりゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAを、制限酵素XbaIで消化し、アガロースゲル電気泳動に付し、ナイロンメンブレンへ転写した。次いで、Recq14遺伝子のエクソン21と22を含むゲノム領域0.6 kbのDNA断片からなるプローブ

5'-

```
GGACACTCAGGGTCCAAAACCTGGGCAGACTCAGGTAAGTGCCACACCT
CTGAGGATAGTTCTTAAAGCTTGGGACAGTGACATGGCCCCATTCAACC
CTGACCCCACAGTTCAATCCCTGCTTGGCTCAAGGTTTCCTTGGCTGCT
CCGGGTGTGATTTTACATGACAGATGCTATGGTAGCTCAGATGAGGTTA
CATGCTATCCTCCACAGCTTCAGGACTGGGAGGACCAAATACGCCGGG
ATGTCCGCCAGCTCCTGTCCCTGAGGCCAGAAGAAAGGTTTTTCAGGAAG
GGCTGTGGCCCGCATCTTCCATGGCATTGGTGAGGGCCACGGGGTTGC
CTGGTGCCAGCGGGGGATGGGTATTAGAGCCAGCTGAGTCCTCAGGCC
```

TGTGTTTCTGCTCCACCCTAGCGAGTCCATGCTACCCAGCCCAGGTGTA
TGGGCTGGACCGGCGCTTCTGGAGGAAGTACCTACACCTGGACTTTCAT
GCCCTGATGCACCTAGCTACAGAAGAGCTCCTGCTGAGAGGCCGATGAC
CACCTTACATGGGAGGGTGCCACATGATTGAGGCATGAGGCAAGCC-3'
(584 bp) (配列番号 8)

を蛍光ラベルしたもの (図 2 の「3' プローブ」) を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った (Wurst, W. and Joyner, A.L. (1993) Gene targeting: A Practical Approach. IRL press, Oxford.)。結果を図 4 に示す。

野生型マウス (Recql4+/+) (すなわち、2 本の染色体のいずれにおいても RecQL4 のエキソン 1 3 が欠損していない遺伝子) の E S 細胞クローンは 8 k b のバンドを与えた。一方、RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4+/-)、すなわちターゲッティングにより 1 本の染色体の RecQL4 のエキソン 1 3 が欠損したマウスの E S 細胞クローンは 6 k b 及び 8 k b のバンドを与えた。RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4-/-)、すなわち 2 本の染色体のいずれにおいても RecQL4 のエキソン 1 3 が欠損したマウスの E S 細胞クローンは 6 k b のバンドのみを与えた。RECQL4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Recql4+/-) の E S 細胞クローンを更なる工程に用いた。

RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 欠損マウスの作製

Recql4+/- の E S 細胞クローンを、C57BL/6JNrs 妊娠マウス (黒眼、黒色毛、独立法人放射線医学総合研究所で維持されているストレイン) の卵管切除によって得たプラストシスト (桑実胚) へ、マイクロインジェクター (ナリシゲ) およびピエゾマイクロマニピュレーター (プライムテック) を用いて注入した。この胚を精管結紮した雄と交配させた偽妊娠の代理母マウスの胎内に導入しキメラマ

ウスを作製した。

作製したキメラマウスの中から、*Recql4*^{+/-}のES細胞が示す毛皮の色（アグチ）が80%以上含まれるオスのマウスを選択した。

選択したオスのマウスとC57BL/6のメスのマウスとを交配して、エキソン13が欠損した*RecQL4*アレル遺伝子（*Recql4*⁻）が生殖系列へ導入されたF1マウスを作製した。

F1マウス個体の遺伝子型の識別は、尾の一部を切除してDNAを抽出し、*Recql4*遺伝子に対するプライマーを用いたPCRにより行った。使用したプライマーは以下の通りである。

mQ4-5 (+) 30 5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACATG-3' (配列番号9)

mQ4-6(-)30 5'-GCCACCATGGACAGGCAGGTGCGGAGGAG-3' (配列番号10)

pgkNeo5'-1(-)30 5'-CTTGGGAAAAGCGCCTCCCCTACCCGGTAG-3' (配列番号11)

遺伝子型を確認した*RECQL4*遺伝子ヘテロ欠損マウス（*Recql4*^{+/-}）同士、あるいは、*RECQL4*遺伝子ヘテロ欠損マウス（*Recql4*^{+/-}）とC57BL/6との交配により、*RECQL4*遺伝子ホモ欠損マウス（*Recql4*^{-/-}）を作製した。

*Recql4*遺伝子転写産物の配列決定による欠失部位の確認

野生型マウス（*Recql4*^{+/+}）及び*RECQL4*遺伝子ホモ欠損マウス（*Recql4*^{-/-}）のそれぞれについて、14.5日胎児からはプライマリーの胎生線維芽細胞（MEF）、成熟個体からは脳、心臓、胸腺、腎臓及び精巣から常法にしたがいトータルRNAを調製した。調製したトータルRNAに対し、下記のプライマー（図2の矢頭）を用い、*Recql4*遺伝子転写産物についてのRT-PCRを行った。

mQ4-5(+)₃₀ 5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACATG-3' (配列番号12)

mQ4-8(-)₃₀ 5'-CAGCTGGGCACTGCCGCAAGGCAATGCAG-3' (配列番号13)

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) のMEF及び精巣から得られた変異PCR増幅産物(転写産物)は、対応する野生型マウス (Recql4^{+/+}) のPCR増幅産物(転写産物)と比較して短かった。

変異PCR増幅産物を、pGEM-T Easy (プロメガ)へ常法によりクローニングし、下記のプライマーを用いて塩基配列を決定した。

5'-CTGCCTCTCTCAGTGGTCAC-3' (配列番号14)

5'-GACAGGCAGGTGCGGAGGAG-3' (配列番号15)

配列決定したRECQL4遺伝子ホモ欠損マウスのPCR増幅産物の配列と野生型マウスのPCR増幅産物の配列とを比較したところ、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) のPCR増幅産物では、エクソン13を構成する配列(180塩基)が完全に欠失していることが明らかになった(図5)。このことは、上述のターゲティング方法により得られたマウスにおいて、

- (1) RECQL4遺伝子のエクソン13全体が欠失していること、及び
 - (2) スプライシングの結果、エクソン12の3'末端とエクソン14の5'末端とが正常に結合していること(すなわち、エクソン14以降に対応するアミノ酸配列は野生型の対応するアミノ酸配列と同じである)
- を示している。

試験例1

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) におけるエクソン13欠失転写産物の発現量の評価

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) における変異Recql4転写産物 (エキソン13欠失転写産物) の量と、野生型マウス (Recql4^{+/+}) における正常Recql4転写産物の量とを定量的PCRにより比較した。

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスのトータルRNA 1 μ gより合成されたcDNAを基準として、野生型マウスの精巢のトータルRNAより合成されたcDNAの希釈系列を作製した (RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスを1として野生型マウス0~0.1)。作製した野生型マウスのcDNAの各希釈系列とRECQL4遺伝子ホモ欠損マウスのcDNAとの混合物を鋳型として、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスで欠失しているエキソン13を挟む下記のプライマーのセット

5'-CTCGTGGTCTCGCCTCTCCTGTCACTCATG-3' (配列番号16)

5'-CAGCTGGGCACTGCCGCCAAGGCAATGCAG-3' (配列番号17)

でPCRを行った。結果を図6に示す。尚、示されている各混合物の混合比は、それぞれ同一のcDNAサンプルを鋳型としてGapdh遺伝子に特異的なプライマーセットによるRT-PCRを行ったデータをもとに補正された値である。図6より、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスにおける変異転写産物の発現量は野生型マウスの野生型転写産物の発現量の1~2%であることが明らかになった。

試験例2

成長遅延

(1) 生存率による評価

作製した__頭のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) うち、約40%は生まれた直後に死亡した。生存した個体のうち、80%は生後2日以内に死亡し、95%の個体は生後2週間以内に死亡した。しかし、残りの5%は生後2週間以降も生存していた。

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) の胎生致死率を観察するため、

帝王切開によって得られた胎児の遺伝子型を調べた。その結果、野生型マウス ($Recql4^{+/+}$) : RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス ($Recql4^{+/-}$) : RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス ($Recql4^{-/-}$) = 19 : 43 : 14であり、メンデルの法則にほぼ従った分布を示した。したがって、胎生期の死亡は $Recql4$ 遺伝子の変異によるものではないと考えられる。

(2) 体重による評価

野生型マウス ($Recql4^{+/+}$)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス ($Recql4^{+/-}$) 及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス ($Recql4^{-/-}$) の19日目の胎児における体重はそれぞれ、 1.48 ± 0.17 g、 1.51 ± 0.21 g及び 0.86 ± 0.12 gであった。したがって、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスの体重は野生型マウスの約60%であった (図7)。

RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスの成長遅延はその後も持続し、生後10週間後では、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスの体重は野生型マウスの体重の約1/3であった (図8)。

(3) 細胞増殖による評価

野生型マウス ($Recql4^{+/+}$)、RECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス ($Recql4^{+/-}$) 及びRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス ($Recql4^{-/-}$) の各個体からMEFを単離し、その細胞増殖を調べた。

MEFの単離は、14.5日胚の頭部と内臓を除去し、組織を細かく破碎し、トリプシン処理により行った。培地は、Dulbecco's modified Eagle's medium (シグマ) に10%胎児牛血清、 $50 \mu\text{U}/\text{ml}$ ペニシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン及び $58 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを添加したものをを用いた。培養は10mmのシャーレ中、 37°C 、 CO_2 濃度5%に管理したインキュベーターにて行った。細胞培養は、 10^5 個の細胞を60mmのシャーレ2枚ずつに播種し、毎日培地を代えて行った。細胞の計数は、24時間毎にコール

ターカウンター（ベックマン＝コールター）によって行った。結果を図9に示す。
野生型マウス（*Recql4*^{+/+}）及びRECQL4遺伝子ヘテロ欠損マウス

（*Recql4*^{+/-}）由来のMEFと比較して、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス
（*Recql4*^{-/-}）由来のMEFは有意に低い増殖能力を示した。

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス（*Recql4*^{-/-}）は、
野生型マウス（*Recql4*^{+/+}）と比較して成長遅延を示すことが明らかになった。
成長遅延は、ヒトRTSの症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒト
RTSのモデル動物として利用可能である。

試験例3

皮膚の異常

（1）外観による評価

ほとんどのRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス（*Recql4*^{-/-}）が何らかの皮膚の異常を示した。生後は目立たなかったが、生後6週までに頸部、背部、前足の付け根から側腹部にかけて脱毛があった。更に尻や腹部に毛の脱色を示した個体もあった。脱毛部位が個体表面の20%に達する個体も存在した。

生後2～3月後には、脱毛部位にびらん性の出血をともなう病変が観察された。これらの病変はかさぶたを作って治癒に向かったが、再び発毛を見るには至らなかった。本病変は、皮膚が脆弱でありかつ物理的接触の機会が多い部分（例えばオスでは陰茎）で多く観察された。

皮膚の乾燥は尾部において最も顕著であり、生後3～4ヶ月の個体の60%で観察された。

（2）組織学的評価

組織学的評価を行うために、マウス組織を、10%の緩衝ホルマリンによって固定し、パラフィン包埋して切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を

行った。顕微鏡写真は、ECLIPS TE300（ニコン）により倍率40×、100×及び400×で撮影した。

野生型マウスと比較して、変異マウスの皮膚は、上皮、真皮、および皮下組織の低形成を示した。

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス（Recql4^{-/-}）は、野生型マウス（Recql4^{+/+}）と比較して、皮膚の異常を示すことが明らかになった。皮膚の異常は、ヒトRTSの症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒトRTSのモデル動物として利用可能である。

試験例 4

他組織の低形成

骨組織、小腸上皮及びリンパ組織の顕微鏡写真を試験例3と同様の方法により撮影した。

野生型マウスと比較して、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス（Recql4^{-/-}）では骨形成層における骨梁形成の減少が見られた。

更に、小腸上皮の絨毛の大きさや数の減少も明らかであった。クリプト及び結合組織における細胞分裂像も少なかった。これは、RECQL4遺伝子のエクソン13の欠損が、増殖の盛んな腸上皮に特に影響を及ぼすことを示唆している。

リンパ系の組織を観察したところ、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス（Recql4^{-/-}）の胸腺は、野生型マウスと比較して顕著に小さかった。

更に胸腺細胞の数も、野生型マウスと比較して有意に小さかった（新生仔マウスについて野生型マウスは 1×10^7 （n=1）、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスは $0.6 \sim 5 \times 10^5$ （n=2）；成体マウスについて野生型マウスは 2.0×10^7 （n=1）、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウスは 1.3×10^7 （n=1））。

また、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) の胸腺ではリンパ濾胞の皮質と髄質の区別が不明瞭であった。更に、RECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) では、白質層 (white pulp) の大きさと数が野生型マウスと比較して顕著に少なかった。

以上の結果より、本発明のRECQL4遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) は、骨形成障害、小腸上皮の異常及びリンパ組織の異常を示すことが明らかになった。骨形成障害は、ヒトR T Sの症状の一つであるので、本発明の変異型マウスはヒトR T Sのモデル動物として利用可能である。

産業上の利用可能性

本発明により、従来、致死性が高いと考えられていた、RECQL4 遺伝子欠損ホモ動物 (Recql4^{-/-})、特に RECQL4 遺伝子ホモ欠損マウス (Recql4^{-/-}) 及びその作製方法が提供される。本発明のマウスは、生長遅延、皮膚の異常、骨形成不良を含む、ヒトR T Sの特徴を多く示し、ヒトR T Sのモデル動物として利用可能である。

請求の範囲

1. ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示す非ヒト哺乳動物。
2. ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すげっ歯類動物。
3. ロスモンド・トムソン症候群の特徴を示すマウス。
4. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を有し、かつ、RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、請求項 3 に記載のマウス。
5. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を有し、かつ、RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、RECQL4 遺伝子欠損マウス。
6. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 が配列番号 3 に記載の配列を有する、請求項 4 又は 5 に記載のマウス。
7. RECQL4 がヘリカーゼ活性を喪失している、請求項 3～6 のいずれか 1 項に記載のマウス。
8. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 に変異を導入することを特徴とする、請求項 3～7 のいずれか 1 項に記載のマウスの作製方法。
9. 作製されたマウスの RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 全体が欠失している、請求項 8 に記載の方法。
10. 作製されたマウスの RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 が、野生型 RECQL4 遺伝子のエキソン 1 4～2 2 に対応するアミノ酸配列をコードする、請求項 8 又は 9 に記載の方法。
11. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 が配列番号 3 に記載の配列を有する、請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載の方法。
12. RECQL4 遺伝子のエキソン 1 3 への変異導入をジーンターゲットイング

によって行う、請求項 8～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

FIG. 1

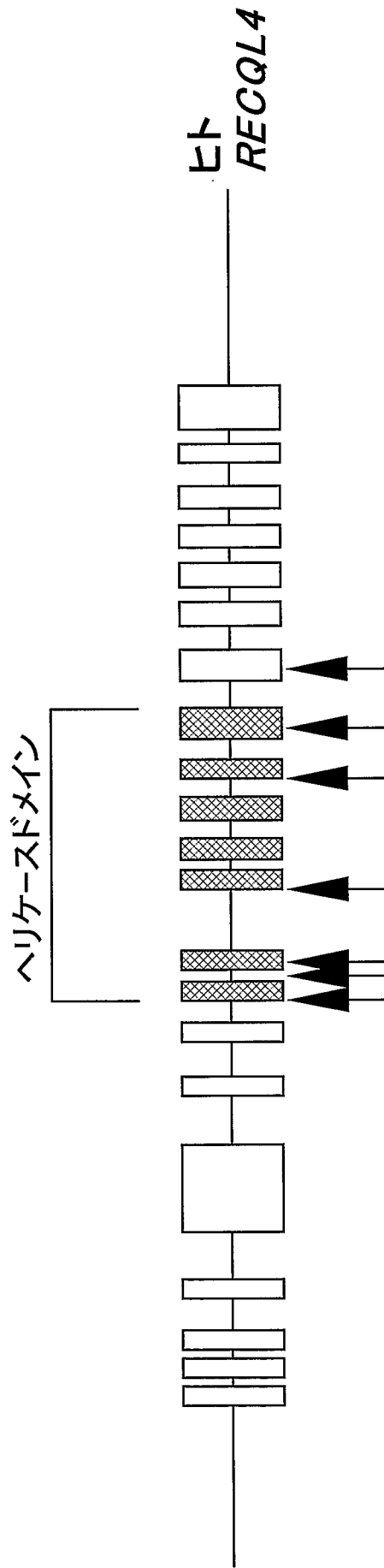


FIG. 2

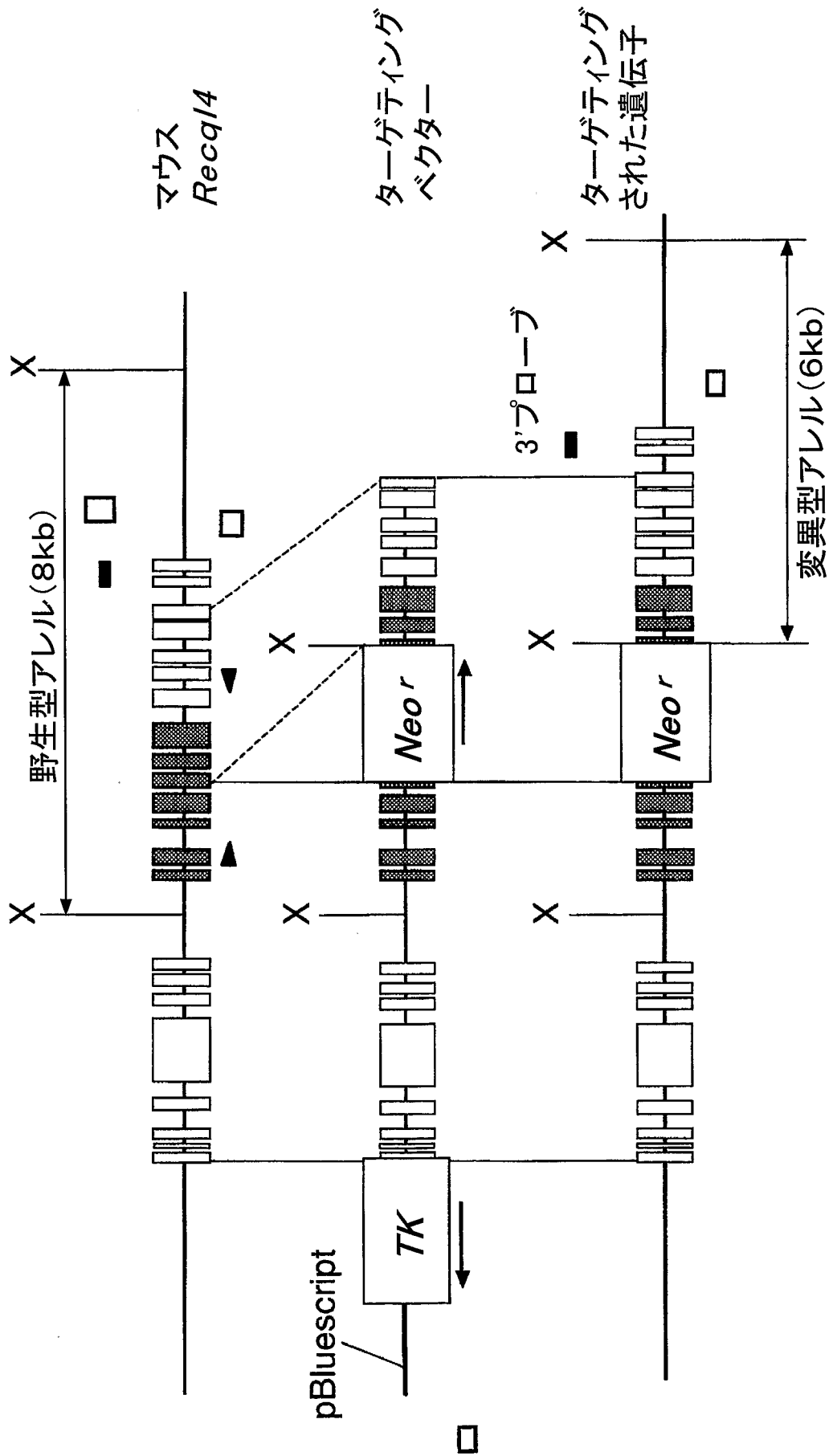


FIG. 3

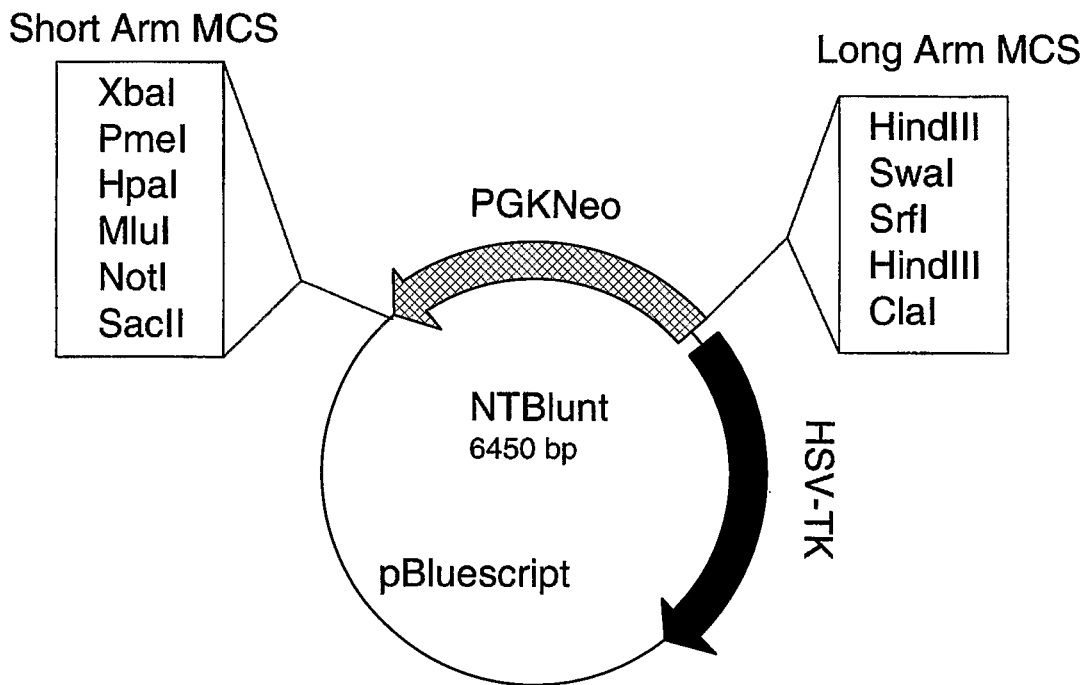


FIG. 4

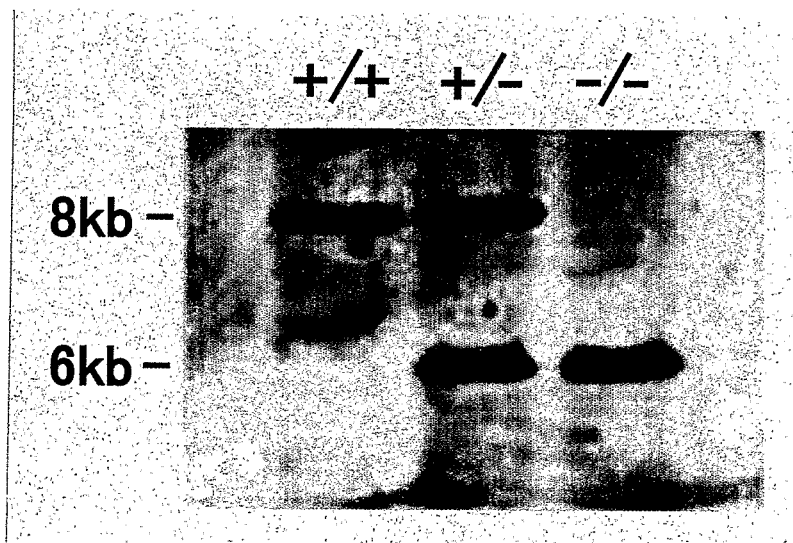


FIG. 5

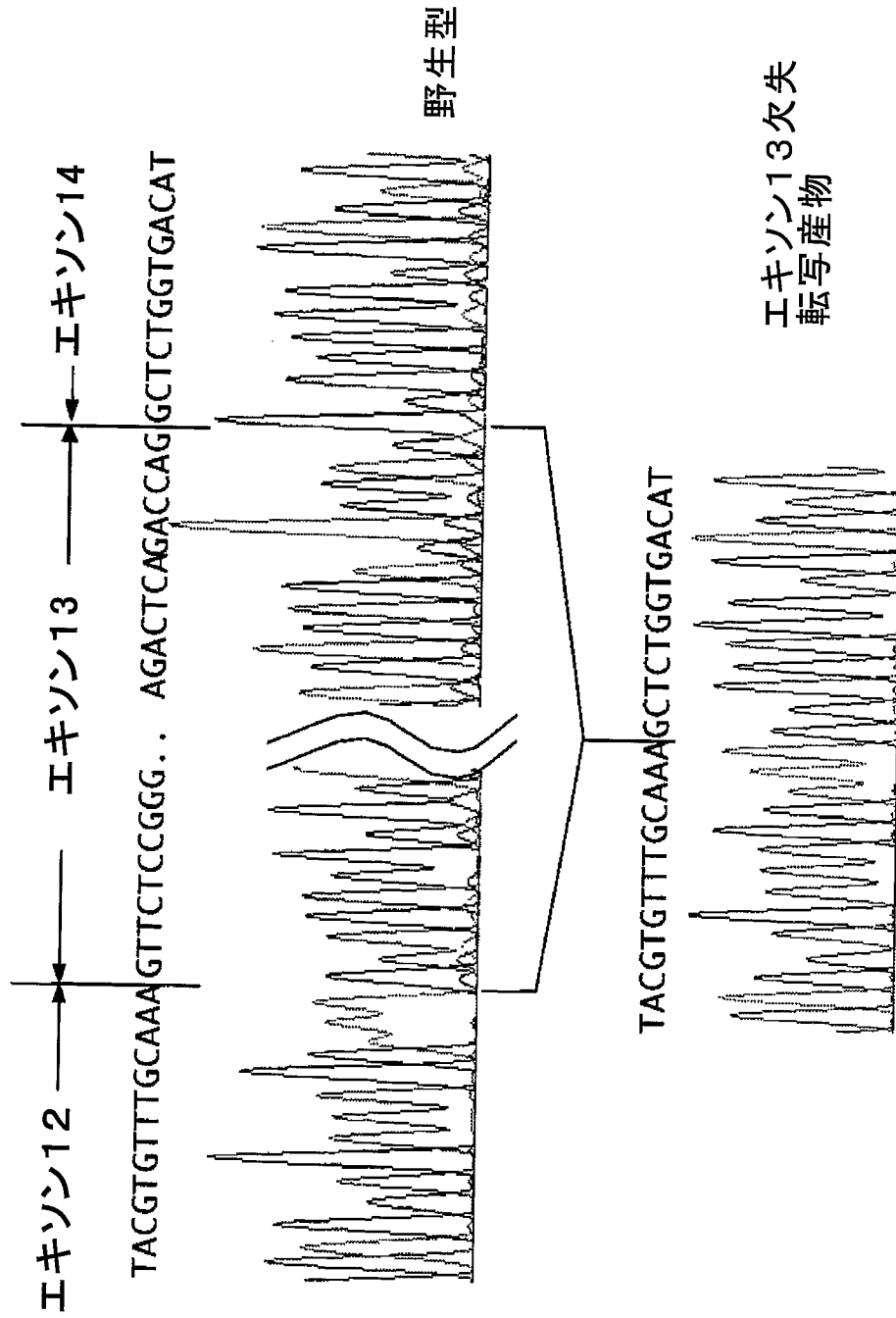


FIG. 6

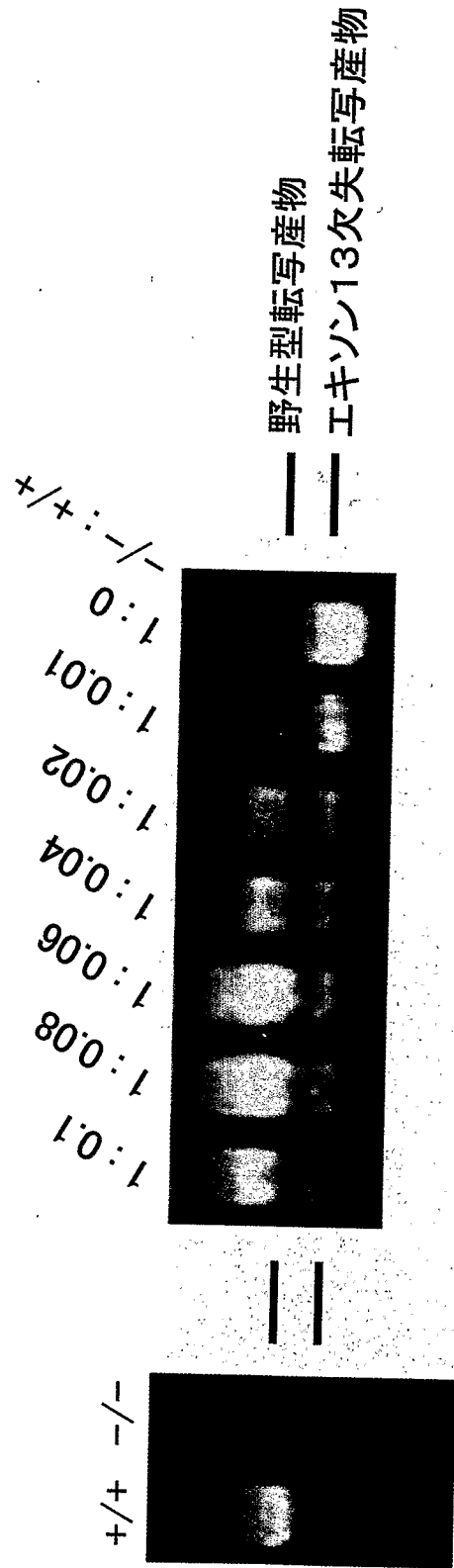


FIG. 7

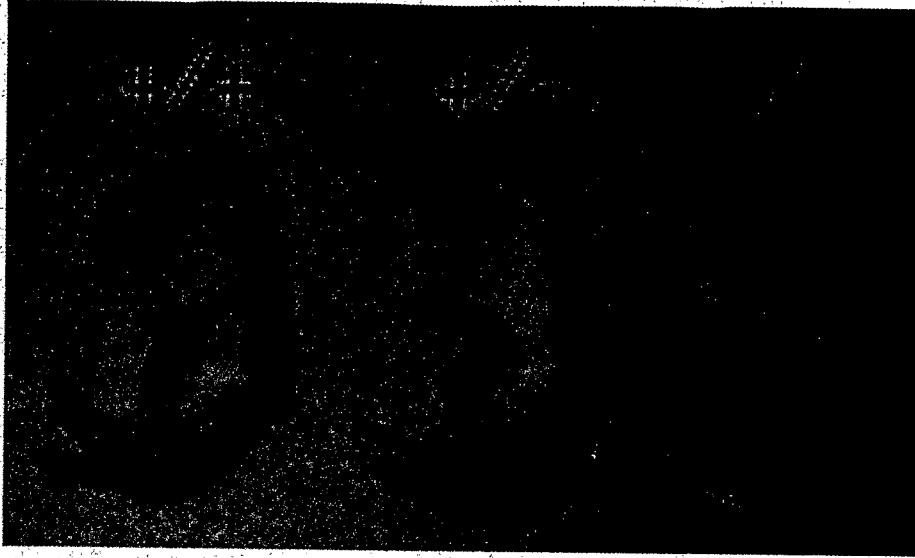
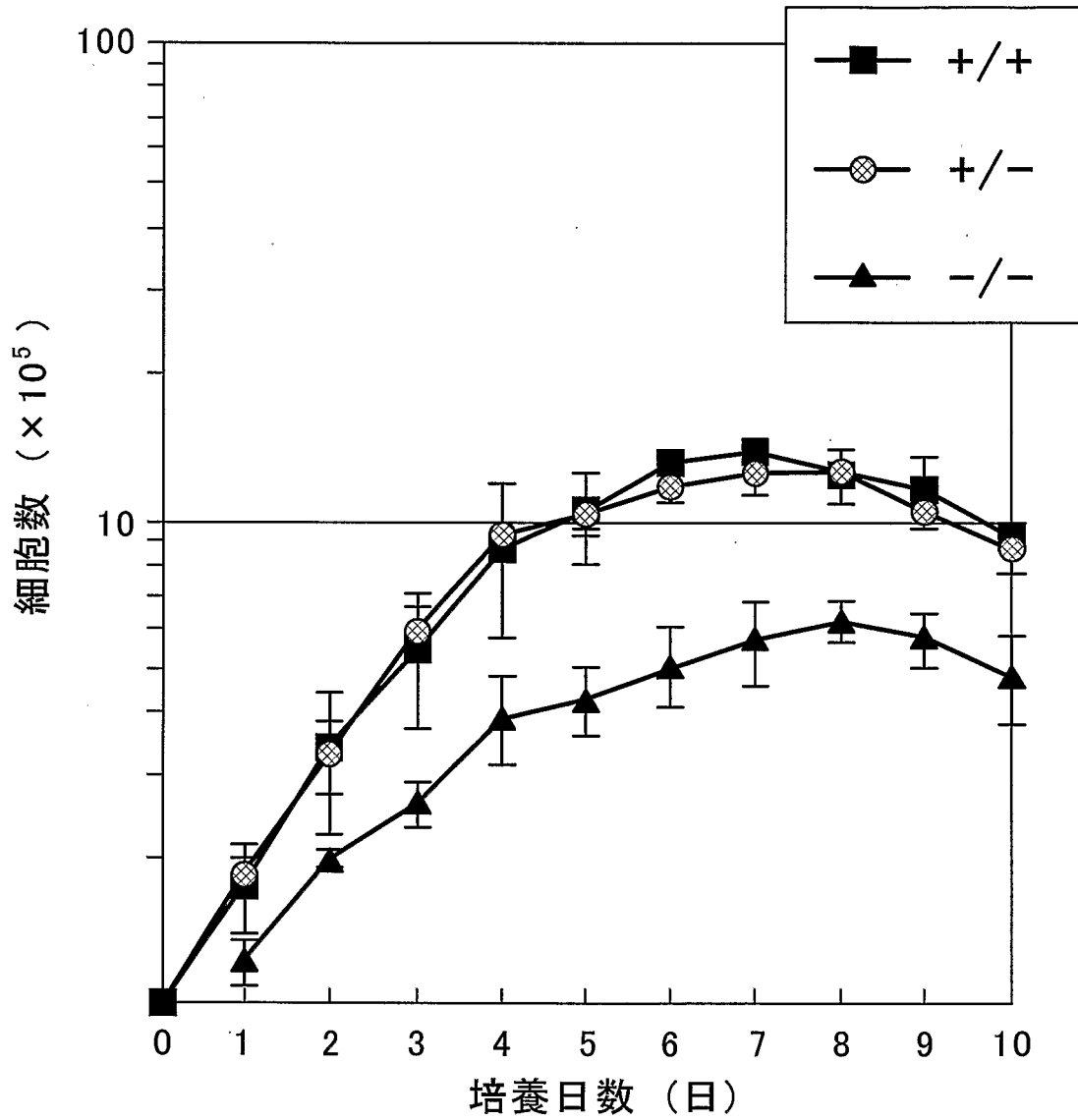


FIG. 8



FIG. 9



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Radiological Sciences

<120> Targeted knockout mouse for human Rothmund-Thomson syndrome and preparation method thereof

<130> Y1L-0610

<150> JP 2003-185409

<151> 2003-06-27

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3651

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3648)

<223>

<400> 1

atg gag cgg ctc gcg acc gtt cgc gcg cgg cta cag gag tgg gaa cgc 48

Met Glu Arg Leu Ala Thr Val Arg Ala Arg Leu Gln Glu Trp Glu Arg

1 5 10 15

gct ttt gca cgg ctg cac ggg cga cgg cca gcg aag ggg gat gtg gag 96

Ala Phe Ala Arg Leu His Gly Arg Arg Pro Ala Lys Gly Asp Val Glu

20 25 30

gcg gca cct gaa gag acc cgc gcg ctc tac cgt gag tac cgt aac cta 144

Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu Tyr Arg Glu Tyr Arg Asn Leu

35 40 45

aag cag gcg gtg cgt cag gct gac gac aga cat cgt gtc cta gag caa 192

Lys Gln Ala Val Arg Gln Ala Asp Asp Arg His Arg Val Leu Glu Gln

50 55 60

tca ctt gcc gag gca gct gag gag gca cag gag cca agc tgc tgg ggt 240

Ser Leu Ala Glu Ala Ala Glu Glu Ala Gln Glu Pro Ser Cys Trp Gly

65 70 75 80

ccc cac ctg agt cga gct gca acg cag aat acg cag tct atg cca aaa 288

Pro His Leu Ser Arg Ala Ala Thr Gln Asn Thr Gln Ser Met Pro Lys

85 90 95

cag agc cta ctg agt tct gta caa gac tat ggg aag agg ctc aaa gcc 336
 Gln Ser Leu Leu Ser Ser Val Gln Asp Tyr Gly Lys Arg Leu Lys Ala
 100 105 110

aat ctg aaa aac aca aca cag act gga cca acc cag agc aga aaa ctc 384
 Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Thr Gly Pro Thr Gln Ser Arg Lys Leu
 115 120 125

cag ctt cag aag aga tcc ttg tcc aca gtt cct gcc cca agg cca cca 432
 Gln Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ser Thr Val Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 130 135 140

ggc tca aag act gaa tcc ccc tgt cca gac gaa gct gac gat gca ctt 480
 Gly Ser Lys Thr Glu Ser Pro Cys Pro Asp Glu Ala Asp Asp Ala Leu
 145 150 155 160

cct cgg gtt cct gag ccc cgg ccg agg ctg ggc cag ctc cag cag ctc 528
 Pro Arg Val Pro Glu Pro Arg Pro Arg Leu Gly Gln Leu Gln Gln Leu
 165 170 175

cga tca tcc ctc agc cgg agg ttg act tcc cta gac cct ggt tgg tta 576
 Arg Ser Ser Leu Ser Arg Arg Leu Thr Ser Leu Asp Pro Gly Trp Leu
 180 185 190

gag agg tgt cac aac aga gtt tca gat ctt cta gag gtt ccg ggt gct 624
 Glu Arg Cys His Asn Arg Val Ser Asp Leu Leu Glu Val Pro Gly Ala

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 | |
| tgt ggg ctt gac ctg agt gca gag gag tca cag cct cag atg tca ggc | | | 672 |
| Cys Gly Leu Asp Leu Ser Ala Glu Glu Ser Gln Pro Gln Met Ser Gly | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| aag gtg aac atc gct gat cct gac atc cag tca gaa gta tct gta cag | | | 720 |
| Lys Val Asn Ile Ala Asp Pro Asp Ile Gln Ser Glu Val Ser Val Gln | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| agc cca gag gcc ata gcc caa cag cca gcc cag gtt ttg tca cag agc | | | 768 |
| Ser Pro Glu Ala Ile Ala Gln Gln Pro Ala Gln Val Leu Ser Gln Ser | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| ccc aaa tcc atc aac agt aaa ggc agg aag cgg aag tgg aat gag aag | | | 816 |
| Pro Lys Ser Ile Asn Ser Lys Gly Arg Lys Arg Lys Trp Asn Glu Lys | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| ggg gag gac ttt gca caa gac cag ccc agc agc gga gca gga ccc ctg | | | 864 |
| Gly Glu Asp Phe Ala Gln Asp Gln Pro Ser Ser Gly Ala Gly Pro Leu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| tct gag gga gcc agg gct aca gta cat ggg caa gac cct cca gga gaa | | | 912 |
| Ser Glu Gly Ala Arg Ala Thr Val His Gly Gln Asp Pro Pro Gly Glu | | | |
| 290 | 295 | 300 | |

ccc aca caa gtg aat gtc cct cag cca tgc aat tcc tca aac cag gcc 960
 Pro Thr Gln Val Asn Val Pro Gln Pro Cys Asn Ser Ser Asn Gln Ala
 305 310 315 320

agg aca gag aag gct aag ggc aca acc cac ctc cat gcc tct cct cga 1008
 Arg Thr Glu Lys Ala Lys Gly Thr Thr His Leu His Ala Ser Pro Arg
 325 330 335

cca gct tcc cta gac aga ggg aac tat att cga ctc aac atg aaa aac 1056
 Pro Ala Ser Leu Asp Arg Gly Asn Tyr Ile Arg Leu Asn Met Lys Asn
 340 345 350

aaa cgc ttt gta cga gtt ggg gcc aat cgg ggc agg ctt ctc cgt aag 1104
 Lys Arg Phe Val Arg Val Gly Ala Asn Arg Gly Arg Leu Leu Arg Lys
 355 360 365

cag gta tgg aag caa aag tgg aag aag aaa caa gct gcg ttt ggg gga 1152
 Gln Val Trp Lys Gln Lys Trp Lys Lys Lys Gln Ala Ala Phe Gly Gly
 370 375 380

agt gga ccc agg gcc aca gac aag gac act tgt ttc cgg tgt ggg cag 1200
 Ser Gly Pro Arg Ala Thr Asp Lys Asp Thr Cys Phe Arg Cys Gly Gln
 385 390 395 400

ttt ggt cac tgg gca tcc cag tgt tcc caa cca ggc ccc acc ctg acc 1248
 Phe Gly His Trp Ala Ser Gln Cys Ser Gln Pro Gly Pro Thr Leu Thr

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 405 | 410 | 415 | |
| gtc caa gag gaa ggt gac agg gat gac aaa cag ccc att tcc acc ttg | | | 1296 |
| Val Gln Glu Glu Gly Asp Arg Asp Asp Lys Gln Pro Ile Ser Thr Leu | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| gaa gaa gta gca cag agg aca ggc act gct tcc tgt cac cac tct ggt | | | 1344 |
| Glu Glu Val Ala Gln Arg Thr Gly Thr Ala Ser Cys His His Ser Gly | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| gag gaa aca cag cct gct gcg cca gag cta cag gtg cct cat tgc ccc | | | 1392 |
| Glu Glu Thr Gln Pro Ala Ala Pro Glu Leu Gln Val Pro His Cys Pro | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| acc cca atg tca ccc ctc tac cca ccg gga cct ttg gga caa gta gca | | | 1440 |
| Thr Pro Met Ser Pro Leu Tyr Pro Pro Gly Pro Leu Gly Gln Val Ala | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| gaa acc cct gct gaa gta ttc cag gcc cta gag cgg cta ggg tac cga | | | 1488 |
| Glu Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu Glu Arg Leu Gly Tyr Arg | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| gcc ttc cgc cct ggg caa gag cgt gca atc atg cgg att ctt tct ggc | | | 1536 |
| Ala Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Ile Met Arg Ile Leu Ser Gly | | | |
| 500 | 505 | 510 | |

atc tct act ctg tta gtg ttg ccc acg ggt gct gga aag tct ctg tgc 1584
 Ile Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly Ala Gly Lys Ser Leu Cys
 515 520 525

tac cag ctt cct gca ctg ctc tat gcc cag cga agc ccc tgc ctc aca 1632
 Tyr Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Ser Pro Cys Leu Thr
 530 535 540

ctc gtg gtc tcg cct ctc ctg tca ctc atg gat gac cag gtg tcc gat 1680
 Leu Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met Asp Asp Gln Val Ser Asp
 545 550 555 560

ctg cct tca tgt ctg aag gca gcc tgc ctc cac tca gga atg acc aag 1728
 Leu Pro Ser Cys Leu Lys Ala Ala Cys Leu His Ser Gly Met Thr Lys
 565 570 575

aaa caa cga gag tct gtc ttg aag aag gta cgg gca gcc cag gtg cac 1776
 Lys Gln Arg Glu Ser Val Leu Lys Lys Val Arg Ala Ala Gln Val His
 580 585 590

gtg ctg atc gtg tcc cca gag gcc ttg gtg ggg tgc ggg gct agg ggt 1824
 Val Leu Ile Val Ser Pro Glu Ala Leu Val Gly Cys Gly Ala Arg Gly
 595 600 605

ccc ggc agc ctc ccc cag gcc gct cag ctg cct cca att gcc ttc gcc 1872
 Pro Gly Ser Leu Pro Gln Ala Ala Gln Leu Pro Pro Ile Ala Phe Ala

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 610 | 615 | 620 | |
| tgc att gat gag gtc cac tgc ctc tct cag tgg tca cat aac ttc cgg | | | 1920 |
| Cys Ile Asp Glu Val His Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe Arg | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| ccc tgc tac cta cgt gtt tgc aaa gtt ctc cgg gag cat atg ggg gtg | | | 1968 |
| Pro Cys Tyr Leu Arg Val Cys Lys Val Leu Arg Glu His Met Gly Val | | | |
| 645 | 650 | 655 | |
| cgc tgc ttc ttg ggt ctc aca gcc aca gcc aca cga agc act gct cga | | | 2016 |
| Arg Cys Phe Leu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr Arg Ser Thr Ala Arg | | | |
| 660 | 665 | 670 | |
| gat gtg gct cag cac ctt ggc ata gct ggc gag ttt gag ctc agc ggg | | | 2064 |
| Asp Val Ala Gln His Leu Gly Ile Ala Gly Glu Phe Glu Leu Ser Gly | | | |
| 675 | 680 | 685 | |
| tca gcc aac atc cct gcc aat ctg cac ctc tcc gtg tcc atg gat aga | | | 2112 |
| Ser Ala Asn Ile Pro Ala Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp Arg | | | |
| 690 | 695 | 700 | |
| gac tca gac cag gct ctg gtg aca ttg ctg caa ggg gac cgt ttt cgt | | | 2160 |
| Asp Ser Asp Gln Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Gly Asp Arg Phe Arg | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |

acc ctg gat tca gtt atc att tac tgc act cgc gaa agg ata cag aac 2208
 Thr Leu Asp Ser Val Ile Ile Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ile Gln Asn
 725 730 735

ggg tgg ctt gca ctc ctc cgc acc tgc ctg tcc atg gtg ggc gac tca 2256
 Gly Trp Leu Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ser Met Val Gly Asp Ser
 740 745 750

agg cca aga ggc tgt ggc ccc gag gct ata gct gaa gcc tac cat gct 2304
 Arg Pro Arg Gly Cys Gly Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Tyr His Ala
 755 760 765

ggc atg agc agc cag gaa cgg cga cga gta caa cag gcc ttc atg cgg 2352
 Gly Met Ser Ser Gln Glu Arg Arg Arg Val Gln Gln Ala Phe Met Arg
 770 775 780

ggc cac ctg cgc atg gta gtg gcc acg gta gca ttt ggg atg gga ctg 2400
 Gly His Leu Arg Met Val Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly Leu
 785 790 795 800

gac cgt cca gat gtt cgg gct gtg ctg cac ctg gga ctg cct cca agc 2448
 Asp Arg Pro Asp Val Arg Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro Ser
 805 810 815

ttc gag agc tac gtg caa gct atc ggc cgt gca ggg cgt gat ggg aag 2496
 Phe Glu Ser Tyr Val Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly Lys

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 820 | 825 | 830 | |
| cct gcc cat tgc cac cta ttc atg cac ccc cag ggt gaa gac ctt tgg | | | 2544 |
| Pro Ala His Cys His Leu Phe Met His Pro Gln Gly Glu Asp Leu Trp | | | |
| 835 | 840 | 845 | |
| gaa ctg cgc aga cat gcc cac gct gac agc act gac ttc cta gct gtg | | | 2592 |
| Glu Leu Arg Arg His Ala His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val | | | |
| 850 | 855 | 860 | |
| aag agg ctg gtg cag cgt gtg ttc cca ccc tgc acc tgc agc cag aga | | | 2640 |
| Lys Arg Leu Val Gln Arg Val Phe Pro Pro Cys Thr Cys Ser Gln Arg | | | |
| 865 | 870 | 875 | 880 |
| cct gtt tcc aag tcc tca cct gag gaa gtc aaa gag cac agt ggc caa | | | 2688 |
| Pro Val Ser Lys Ser Ser Pro Glu Glu Val Lys Glu His Ser Gly Gln | | | |
| 885 | 890 | 895 | |
| caa aca tac cct gta ctg ggc cag gcc tgc ctg ggc cat gag cgg gca | | | 2736 |
| Gln Thr Tyr Pro Val Leu Gly Gln Ala Cys Leu Gly His Glu Arg Ala | | | |
| 900 | 905 | 910 | |
| ctc cca gtg cag tct aca gta cag gct ctg gac atg aca gag gag gct | | | 2784 |
| Leu Pro Val Gln Ser Thr Val Gln Ala Leu Asp Met Thr Glu Glu Ala | | | |
| 915 | 920 | 925 | |

att gag act ctg ctg tgc tat ttg gaa cta cac cct cgg cac tgg ttg 2832
 Ile Glu Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu Leu His Pro Arg His Trp Leu
 930 935 940

gag ctg ctg ccc tgg acc tac gcc cag tgc cat ctg cat tgc ctt ggc 2880
 Glu Leu Leu Pro Trp Thr Tyr Ala Gln Cys His Leu His Cys Leu Gly
 945 950 955 960

ggc agt gcc cag ctg caa gct ctg gcc cac agg tgt ccc cct ttg gct 2928
 Gly Ser Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala His Arg Cys Pro Pro Leu Ala
 965 970 975

gca tgc cag gcc aag tgg cca cct aaa gac aca agt cag ggc agg agc 2976
 Ala Cys Gln Ala Lys Trp Pro Pro Lys Asp Thr Ser Gln Gly Arg Ser
 980 985 990

tcc tta gag ttt ggt gtg gtg gaa ctg gca gac tcg atg ggc tgg aag 3024
 Ser Leu Glu Phe Gly Val Val Glu Leu Ala Asp Ser Met Gly Trp Lys
 995 1000 1005

ttg gcc tct gta cgg cag gct ctc cac cag ctg aag tgg gac cca 3069
 Leu Ala Ser Val Arg Gln Ala Leu His Gln Leu Lys Trp Asp Pro
 1010 1015 1020

gag cca aag aaa ggc gca gca cag ggc acc gga gtg ctt gtg aag 3114
 Glu Pro Lys Lys Gly Ala Ala Gln Gly Thr Gly Val Leu Val Lys

| | | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|------|
| 1025 | 1030 | 1035 | |
| ttc agc gag ttg gcc ttt cac | ctg cac agt cgc ggg | gac ctg aca | 3159 |
| Phe Ser Glu Leu Ala Phe His | Leu His Ser Arg Gly | Asp Leu Thr | |
| 1040 | 1045 | 1050 | |
| gat gag gaa aag gac cag atc | tgt gac ttt ctg tac | aac cgt gtg | 3204 |
| Asp Glu Glu Lys Asp Gln Ile | Cys Asp Phe Leu Tyr | Asn Arg Val | |
| 1055 | 1060 | 1065 | |
| cag gct cgt gaa cac aag gcc | ctg gcc cac cta cac | caa atg tcc | 3249 |
| Gln Ala Arg Glu His Lys Ala | Leu Ala His Leu His | Gln Met Ser | |
| 1070 | 1075 | 1080 | |
| aag gcc ttt cga agt gtg gcc | ttt ccc agt tgt gga | ccc tgt tta | 3294 |
| Lys Ala Phe Arg Ser Val Ala | Phe Pro Ser Cys Gly | Pro Cys Leu | |
| 1085 | 1090 | 1095 | |
| gag cag tct aat gag gag cac | agc aat cag gtg aag | acc ctg gtc | 3339 |
| Glu Gln Ser Asn Glu Glu His | Ser Asn Gln Val Lys | Thr Leu Val | |
| 1100 | 1105 | 1110 | |
| agc tac tac ttt gag gaa gag | gag gag gag gaa gaa | act atg acg | 3384 |
| Ser Tyr Tyr Phe Glu Glu Glu | Glu Glu Glu Glu Glu | Thr Met Thr | |
| 1115 | 1120 | 1125 | |

gac act cag ggt cca aaa cct ggg cag act cag ctt cag gac tgg 3429
 Asp Thr Gln Gly Pro Lys Pro Gly Gln Thr Gln Leu Gln Asp Trp
 1130 1135 1140

gag gac caa ata cgc cgg gat gtc cgc cag ctc ctg tcc ctg agg 3474
 Glu Asp Gln Ile Arg Arg Asp Val Arg Gln Leu Leu Ser Leu Arg
 1145 1150 1155

cca gaa gaa agg ttt tca gga agg gct gtg gcc cgc atc ttc cat 3519
 Pro Glu Glu Arg Phe Ser Gly Arg Ala Val Ala Arg Ile Phe His
 1160 1165 1170

ggc att gcg agt cca tgc tac cca gcc cag gtg tat ggg ctg gac 3564
 Gly Ile Ala Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Leu Asp
 1175 1180 1185

cgg cgc ttc tgg agg aag tac cta cac ctg gac ttt cat gcc ctg 3609
 Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Asp Phe His Ala Leu
 1190 1195 1200

atg cac cta gct aca gaa gag ctc ctg ctg aga ggc cga tga 3651
 Met His Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Leu Arg Gly Arg
 1205 1210 1215

<211> 1216

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Arg Leu Ala Thr Val Arg Ala Arg Leu Gln Glu Trp Glu Arg

1 5 10 15

Ala Phe Ala Arg Leu His Gly Arg Arg Pro Ala Lys Gly Asp Val Glu

 20 25 30

Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu Tyr Arg Glu Tyr Arg Asn Leu

 35 40 45

Lys Gln Ala Val Arg Gln Ala Asp Asp Arg His Arg Val Leu Glu Gln

 50 55 60

Ser Leu Ala Glu Ala Ala Glu Glu Ala Gln Glu Pro Ser Cys Trp Gly

65 70 75 80

Pro His Leu Ser Arg Ala Ala Thr Gln Asn Thr Gln Ser Met Pro Lys

85 90 95

Gln Ser Leu Leu Ser Ser Val Gln Asp Tyr Gly Lys Arg Leu Lys Ala

100 105 110

Asn Leu Lys Asn Thr Thr Gln Thr Gly Pro Thr Gln Ser Arg Lys Leu

115 120 125

Gln Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ser Thr Val Pro Ala Pro Arg Pro Pro

130 135 140

Gly Ser Lys Thr Glu Ser Pro Cys Pro Asp Glu Ala Asp Asp Ala Leu

145 150 155 160

Pro Arg Val Pro Glu Pro Arg Pro Arg Leu Gly Gln Leu Gln Gln Leu

165 170 175

Arg Ser Ser Leu Ser Arg Arg Leu Thr Ser Leu Asp Pro Gly Trp Leu

180 185 190

Glu Arg Cys His Asn Arg Val Ser Asp Leu Leu Glu Val Pro Gly Ala

195 200 205

Cys Gly Leu Asp Leu Ser Ala Glu Glu Ser Gln Pro Gln Met Ser Gly

210 215 220

Lys Val Asn Ile Ala Asp Pro Asp Ile Gln Ser Glu Val Ser Val Gln

225 230 235 240

Ser Pro Glu Ala Ile Ala Gln Gln Pro Ala Gln Val Leu Ser Gln Ser

245 250 255

Pro Lys Ser Ile Asn Ser Lys Gly Arg Lys Arg Lys Trp Asn Glu Lys

260 265 270

Gly Glu Asp Phe Ala Gln Asp Gln Pro Ser Ser Gly Ala Gly Pro Leu

275 280 285

Ser Glu Gly Ala Arg Ala Thr Val His Gly Gln Asp Pro Pro Gly Glu
 290 295 300

Pro Thr Gln Val Asn Val Pro Gln Pro Cys Asn Ser Ser Asn Gln Ala
 305 310 315 320

Arg Thr Glu Lys Ala Lys Gly Thr Thr His Leu His Ala Ser Pro Arg
 325 330 335

Pro Ala Ser Leu Asp Arg Gly Asn Tyr Ile Arg Leu Asn Met Lys Asn
 340 345 350

Lys Arg Phe Val Arg Val Gly Ala Asn Arg Gly Arg Leu Leu Arg Lys
 355 360 365

Gln Val Trp Lys Gln Lys Trp Lys Lys Lys Gln Ala Ala Phe Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Pro Arg Ala Thr Asp Lys Asp Thr Cys Phe Arg Cys Gly Gln
 385 390 395 400

Phe Gly His Trp Ala Ser Gln Cys Ser Gln Pro Gly Pro Thr Leu Thr

405 410 415

Val Gln Glu Glu Gly Asp Arg Asp Asp Lys Gln Pro Ile Ser Thr Leu

420 425 430

Glu Glu Val Ala Gln Arg Thr Gly Thr Ala Ser Cys His His Ser Gly

435 440 445

Glu Glu Thr Gln Pro Ala Ala Pro Glu Leu Gln Val Pro His Cys Pro

450 455 460

Thr Pro Met Ser Pro Leu Tyr Pro Pro Gly Pro Leu Gly Gln Val Ala

465 470 475 480

Glu Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu Glu Arg Leu Gly Tyr Arg

485 490 495

Ala Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Ile Met Arg Ile Leu Ser Gly

500 505 510

Ile Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly Ala Gly Lys Ser Leu Cys

515 520 525

Tyr Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ala Gln Arg Ser Pro Cys Leu Thr

530 535 540

Leu Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met Asp Asp Gln Val Ser Asp

545 550 555 560

Leu Pro Ser Cys Leu Lys Ala Ala Cys Leu His Ser Gly Met Thr Lys

565 570 575

Lys Gln Arg Glu Ser Val Leu Lys Lys Val Arg Ala Ala Gln Val His

580 585 590

Val Leu Ile Val Ser Pro Glu Ala Leu Val Gly Cys Gly Ala Arg Gly

595 600 605

Pro Gly Ser Leu Pro Gln Ala Ala Gln Leu Pro Pro Ile Ala Phe Ala

610

615

620

Cys Ile Asp Glu Val His Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe Arg

625

630

635

640

Pro Cys Tyr Leu Arg Val Cys Lys Val Leu Arg Glu His Met Gly Val

645

650

655

Arg Cys Phe Leu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr Arg Ser Thr Ala Arg

660

665

670

Asp Val Ala Gln His Leu Gly Ile Ala Gly Glu Phe Glu Leu Ser Gly

675

680

685

Ser Ala Asn Ile Pro Ala Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp Arg

690

695

700

Asp Ser Asp Gln Ala Leu Val Thr Leu Leu Gln Gly Asp Arg Phe Arg
705 710 715 720

Thr Leu Asp Ser Val Ile Ile Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ile Gln Asn
 725 730 735

Gly Trp Leu Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ser Met Val Gly Asp Ser
 740 745 750

Arg Pro Arg Gly Cys Gly Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Tyr His Ala
 755 760 765

Gly Met Ser Ser Gln Glu Arg Arg Arg Val Gln Gln Ala Phe Met Arg
 770 775 780

Gly His Leu Arg Met Val Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly Leu
785 790 795 800

Asp Arg Pro Asp Val Arg Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro Ser
 805 810 815

Phe Glu Ser Tyr Val Gln Ala Ile Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly Lys

820

825

830

Pro Ala His Cys His Leu Phe Met His Pro Gln Gly Glu Asp Leu Trp

835

840

845

Glu Leu Arg Arg His Ala His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val

850

855

860

Lys Arg Leu Val Gln Arg Val Phe Pro Pro Cys Thr Cys Ser Gln Arg

865

870

875

880

Pro Val Ser Lys Ser Ser Pro Glu Glu Val Lys Glu His Ser Gly Gln

885

890

895

Gln Thr Tyr Pro Val Leu Gly Gln Ala Cys Leu Gly His Glu Arg Ala

900

905

910

Leu Pro Val Gln Ser Thr Val Gln Ala Leu Asp Met Thr Glu Glu Ala

915 920 925

Ile Glu Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu Leu His Pro Arg His Trp Leu

930 935 940

Glu Leu Leu Pro Trp Thr Tyr Ala Gln Cys His Leu His Cys Leu Gly

945 950 955 960

Gly Ser Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala His Arg Cys Pro Pro Leu Ala

965 970 975

Ala Cys Gln Ala Lys Trp Pro Pro Lys Asp Thr Ser Gln Gly Arg Ser

980 985 990

Ser Leu Glu Phe Gly Val Val Glu Leu Ala Asp Ser Met Gly Trp Lys

995 1000 1005

Leu Ala Ser Val Arg Gln Ala Leu His Gln Leu Lys Trp Asp Pro

1010 1015 1020

Glu Pro Lys Lys Gly Ala Ala Gln Gly Thr Gly Val Leu Val Lys

1025 1030 1035

Phe Ser Glu Leu Ala Phe His Leu His Ser Arg Gly Asp Leu Thr

1040 1045 1050

Asp Glu Glu Lys Asp Gln Ile Cys Asp Phe Leu Tyr Asn Arg Val

1055 1060 1065

Gln Ala Arg Glu His Lys Ala Leu Ala His Leu His Gln Met Ser

1070 1075 1080

Lys Ala Phe Arg Ser Val Ala Phe Pro Ser Cys Gly Pro Cys Leu

1085 1090 1095

Glu Gln Ser Asn Glu Glu His Ser Asn Gln Val Lys Thr Leu Val

1100 1105 1110

Ser Tyr Tyr Phe Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Met Thr
 1115 1120 1125

Asp Thr Gln Gly Pro Lys Pro Gly Gln Thr Gln Leu Gln Asp Trp
 1130 1135 1140

Glu Asp Gln Ile Arg Arg Asp Val Arg Gln Leu Leu Ser Leu Arg
 1145 1150 1155

Pro Glu Glu Arg Phe Ser Gly Arg Ala Val Ala Arg Ile Phe His
 1160 1165 1170

Gly Ile Ala Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Leu Asp
 1175 1180 1185

Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Asp Phe His Ala Leu
 1190 1195 1200

Met His Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Leu Arg Gly Arg
 1205 1210 1215

<210> 3

<211> 180

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 3

gttctccggg agcatatggg ggtgcgctgc ttcttgggtc tcacagccac agccacacga 60

agcactgctc gagatgtggc tcagcacctt ggcatagctg gcgagtttga gctcagcggg 120

tcagccaaca tccctgcaa tctgcacctc tccgtgtcca tggatagaga ctcagaccag 180

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

cttttgacg gctgcacggg cgacggccag 30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

cagctatgcc aagtgctga gccacatctc

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

ttgagctcag cgggtcagcc aacatccctg

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

tgctctaac aggtccaca actgggaaag

30

<210> 8

<211> 583

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

ggacactcag ggtccaaaac ctgggcagac tcaggtaat gccacacctc tgaggatagt 60

tcttaaagct tgggacagtg acatggcccc attcaaccct gacccacag ttcaatcct 120

gcttggctca aggtttcctt ggctgctccg ggtgtgattt tacatgacag atgctatggt 180

agctcagatg aggttacatg ctatcctccc acagcttcag gactgggagg accaaatag 240

ccgggatgtc cgccagctcc tgtccctgag gccagaagaa aggttttcag gaagggtgt 300

ggcccccatc ttccatggca ttggtgaggg ccacggggtt gcctgggtgcc agcgggggat 360

gggtattaga gccagctgag tcctcaggcc tgtgtttctg ctccacccta gcgagtccat 420

gctaccacgc ccaggtgtat gggctggacc ggcgcttctg gaggaagtac ctacacctgg 480

actttcatgc cctgatgcac ctagctacag aagagctcct gctgagaggc cgatgaccac 540

cttcatggg agggtgccac atgattgagg catgaggcaa gcc 583

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

ctcgtgtct cgcctctcct gtcactcatg 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

gcccaccatg gacaggcagg tgcggaggag

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cttgggaaaa ggcctcccc taccggtag

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

ctcgtggtct cgcctctcct gtcactcatg

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

cagctgggca ctgccgcaa ggcaatgcag

30

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

ctgcctctct cagtggcac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gacaggcagg tgcggaggag

20

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

ctcgtggtct cgcctctcct gtcactcatg

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

cagctgggca ctgccgcaa ggcaatgcag

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, A01K67/027

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 C12N15/00, A01K67/027

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)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P,X | HOKI, T. et al., Growth retardation and skin abnormalities of the Recql4-deficient mouse. Hum Mol Genet. 15 September, 2003 (15.09.03), Vol.12(18), pages 2293 to 2299 | 1-12 |
| A | Koji ICHIKAWA et al., Idenshi Kaihen ni yoru Soro Shokogun Jikken Dobutsu Sakusei no Kokoromi, Folia Pharmacologica Japonica, Vol.119, pages 219 to 226 (2002) | 1-12 |
| A | OHATA, T. et al., Cloning, genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding mouse DNA helicase RECQL5beta. Gene. 12 December, 2001 (12.12.01), Vol.280(1-2), pages 59 to 66 | 1-12 |

 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 application or patent 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
15 June, 2004 (15.06.04)Date of mailing of the international search report
03 August, 2004 (03.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009380

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | KITAO, S. et al., Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. Nat Genet. 1999 May, Vol.22(1), pages 82 to 84 | 1-12 |
| A | KITAO, S. et al., Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. Genomics. 01 November, 1999 (01.11.99), Vol.61(3), pages 268 to 276 | 1-12 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 15/00, A01K 67/027

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. Cl. ⁷ C12N 15/00, A01K 67/027

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)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

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 |
|-----------------|--|------------------|
| PX | HOKI, Y et al., Growth retardation and skin abnormalities of the Recq14-deficient mouse. Hum Mol Genet. 2003 Sep 15, vol. 12(18), pp. 2293-2299 | 1-12 |
| A | 市川幸司ら, 遺伝子改変による早老症候群実験動物作製の試み. 日本薬理学会誌. vol. 119, pp. 219-226 (2002) | 1-12 |
| A | OHHATA, T et al., Cloning, genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding mouse DNA helicase RECQL5b et al. Gene. 2001 Dec 12, vol. 280(1-2), pp. 59-66 | 1-12 |

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 15. 06. 2004

国際調査報告の発送日 03. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)
 長井 啓子
 4N 9123
 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 |
| A | KITAO, S et al., Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. Nat Genet. 1999 May, vol. 22(1) pp. 82-84 | 1-12 |
| A | KITAO, S et al., Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. Genomics. 1999 Nov 1 vol. 61(3), pp. 268-276 | 1-12 |