

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 529331

(P2003 - 529331A)

(43)公表日 平成15年10月7日 (2003.10.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		C 1 2 Q 1/42	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/42		1/68	A 4 B 0 6 4
1/68		G 0 1 N 33/15	Z 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 82数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 527686(P2001 - 527686)

(86)(22)出願日 平成12年8月9日(2000.8.9)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月12日(2002.2.12)

(86)国際出願番号 PCT/US00/21660

(87)国際公開番号 W001/024681

(87)国際公開日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(31)優先権主張番号 60/147,488

(32)優先日 平成11年8月9日(1999.8.9)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/190,057

(32)優先日 平成12年3月17日(2000.3.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・
ファウンデーション

アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・レイク
・シティ、アラピーン・ドライブ615番、ス
ウィート110

(72)発明者 マーク・ティ・キーティング
アメリカ合衆国84103ユタ州ソルト・レイク
・シティ、ローレル・ストリート78番

(72)発明者 イゴール・スプロースキー
アメリカ合衆国84124ユタ州ソルト・レイク
・シティ、イースト・ストリート900番、ア
パートメント140

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 QT延長症候群遺伝子KVLQT1およびSCN5Aの改変ならびにその検出方法

(57)【要約】

QT延長症候群(LQTS)は、心電図のQT間隔の延長、失神、発作、および突然死によって特徴づけられる心血管障害である。ロマノ-ウォード症候群に5つの遺伝子(LQTSの常染色体優性形態)が関与している。これらの遺伝子は、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2である。KVLQT1およびKCNE1の突然変異によって、ジェルヴェル-ランゲ-ニールセン症候群(常染色体劣性様式で遺伝する表現型異常で、難聴に関連するLQTSの形態)を発症する。突然変異分析を使用して、5つの限定した遺伝子の突然変異についてLQTSを罹患した262人の関連のない個体をスクリーニングした。観察した全134突然変異のうち80突然変異が新規であった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 A332G、G478A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択される1以上の突然変異によって改変された、配列番号1の配列を含む単離DNA。

【請求項2】 前記突然変異KVLQT1がA332G、G478A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択される配列番号1の突然変異を含む、ヒト突然変異KVLQT1に特異的にハイブリダイズできるが、野生型DNAにはハイブリダイズできない、核酸プローブ。

【請求項3】 前記突然変異がA332G、G478A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択され、ヒト・サンプル由来の前記遺伝子またはRNA配列を分析するか前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNA配列を分析する工程を包含する、KVLQT1中の突然変異の検出方法。

【請求項4】 前記突然変異を、

- a) 前記ヒト・サンプルから単離したRNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、前記ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、
- b) 前記サンプルから単離したRNAから作製したcDNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

- c) 前記サンプルから単離したゲノムDNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、
- d) プライマーセットを使用して前記サンプル中の前記遺伝子の全てまたは一部を増幅し、増幅核酸を配列決定し、
- e) 前記突然変異の1つに特異的なプライマーを使用して前記サンプル中の前記遺伝子の一部を増幅し、増幅産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、
- f) 前記サンプル中の前記遺伝子の全てまたは一部を分子クローニングしてクローン化核酸を産生し、前記クローン化核酸を配列決定し、
- g) 前記遺伝子を増幅して増幅核酸を産生し、前記突然変異の1つに特異的なDNAプローブに前記増幅核酸をハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、
- h) 前記ヒト・サンプル由来の遺伝子の遺伝子フラグメント由来の一本鎖DNAおよび野生型遺伝子の対応するフラグメント由来の一本鎖DNAを形成させ、前記一本鎖DNAを未変性ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、前記ゲル上で前記一本鎖DNAの移動度を比較して、前記野生型と比較してサンプル由来の一本鎖DNAがシフトしているかどうかを同定し、前記移動度がシフトした一本鎖DNAを配列決定し、
- i) 前記サンプルから単離したゲノムDNAフラグメント、前記サンプルから単離したRNAフラグメント、および前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNAフラグメントからなる群から選択される第1のストランドならびに対応するヒト野生型遺伝子フラグメントからなる第2の核酸ストランドからなるヘテロデュプレックスを形成し、前記ヘテロデュプレックスのミスマッチの存在を分析し、ミスマッチを有する前記第1の核酸ストランドを配列決定し、
- j) 前記ヒト・サンプルの遺伝子および前記突然変異の1つに特異的な対立遺伝子の対応するフラグメントから一本鎖DNAを形成し、未変性ポリアクリルアミドゲル上で前記一本鎖DNAを電気泳動し、前記ゲル上で前記一本鎖DNAの移

動度を比較して、前記対立遺伝子と比較して前記サンプル由来の一本鎖DNAがシフトしているかどうかを同定し、ここに、前記対立遺伝子と比較して前記一本鎖DNAの電気泳動移動度がシフトしないことは、前記サンプルに突然変異が存在することを示し、

k) 前記サンプルから単離した遺伝子のゲノムDNAフラグメント、前記サンプルから単離したRNAフラグメント、および前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNAフラグメントからなる群から選択される第1の核酸ストランドならびに前記突然変異の1つに特異的な対応する対立遺伝子フラグメントからなる第2の核酸ストランドからなるヘテロデュプレックスを形成し、前記ヘテロデュプレックスのミスマッチの存在を分析し、ここに、ミスマッチが存在しないことは、前記突然変異の存在を示す、ことからなる群から選択される方法によって検出する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 ハイブリダイゼーションを*in situ*で行う、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 Y111C、E160K、R174H、G179S、A194P、R243C、W248R、L266P、V307sp、V310I、S349W、Q356X、R366Q、T391I、P448R、Q530X、S566F、R583C、およびR594Qからなる群から選択される配列番号2の突然変異を含むKVLQT1によってコードされる単離ヒト・ポリペプチド。

【請求項7】 請求項6に記載のポリペプチドに結合することができるが、野生型ポリペプチドには結合することができない、抗体。

【請求項8】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項7に記載の抗体。

【請求項9】 KVLQT1配列または被験体の組織サンプルから単離したその発現産物とKVLQT1の野生型配列またはその発現産物との比較によってKVLQT1中の突然変異について被験体をスクリーニングし、ここに、前記被験体の配列中に変異が存在することは、QT延長症候群のリスクを示すことを特徴とする、ヒト被験体のQT延長症候群のリスクの評価方法。

【請求項10】 前記発現産物が前記遺伝子のmRNAまたは前記遺伝子に

よってコードされるポリペプチドから選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 1以上の以下の手順：

- (a) 未変性ポリアクリルアミドゲル上の前記サンプル由来の一本鎖DNAの電気泳動移動度のシフトを観察し、
- (b) 遺伝子へのプローブのハイブリダイゼーションに適切な条件下で、前記サンプルから単離したゲノムDNAにプローブをハイブリダイズさせ、
- (c) 前記サンプル由来のゲノムDNAへの対立遺伝子特異的プローブのハイブリダイゼーションを同定し、
- (d) 前記サンプル由来の遺伝子の全てまたは一部を増幅して増幅配列を産生させ、前記増幅配列を配列決定し、
- (e) 核酸増幅によって前記サンプル中の特異的対立遺伝子の存在を同定し、
- (f) 前記サンプル由来の遺伝子の全部または一部を分子クローニングしてクローン化配列を産生させ、前記クローン化配列を配列決定し、
- (g) 分子(1)前記サンプルから単離した遺伝子ゲノムDNAまたはmRNAおよび(2)ヒト野生型遺伝子DNAに相補的な核酸プローブが互いにハイブリダイズしてデュプレックスを形成する場合に分子(1)および(2)の間にミスマッチが存在するかどうかを同定し、
- (h) 前記サンプル中の前記遺伝子配列を増幅し、野生型遺伝子配列を含む核酸プローブに前記増幅配列をハイブリダイズさせ、
- (i) 前記組織中の前記遺伝子配列を増幅し、突然変異遺伝子配列を含む核酸プローブに前記増幅配列をハイブリダイズさせ、
- (j) 欠失突然変異をスクリーニングし、
- (k) 点突然変異をスクリーニングし、
- (l) 挿入突然変異をスクリーニングし、
- (m) 前記遺伝子配列または前記遺伝子の突然変異配列を含む1以上の核酸プローブと、前記サンプル中の遺伝子との*in situ*ハイブリダイゼーションを同定し、
- (n) 免疫プロットングを行い、
- (o) 免疫細胞化学を行い、

(p) 前記組織から単離した遺伝子タンパク質と突然変異体対立遺伝子のポリペプチド発現産物に特異的に結合することができる結合パートナーおよび/または前記ポリペプチドの結合パートナーとの間の結合相互作用をアッセイし、

(q) 前記結合パートナーの生化学的活性の阻害をアッセイする、ことを行う、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 野生型DNAにハイブリダイズしない条件下で、請求項1に記載の単離DNAにハイブリダイズする核酸プローブ。

【請求項13】 患者のDNAまたはRNAサンプルに請求項12に記載のプローブをハイブリダイズさせることを含み、ここに、ハイブリダイゼーションシグナルの存在がQT延長症候群を示すことを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項14】 前記患者のDNAまたはRNAを増幅して、前記増幅DNAまたはRNAを請求項12に記載のプローブとハイブリダイズさせる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 ハイブリダイゼーションを*in situ*で行う、請求項13に記載の方法。

【請求項16】 核酸マイクロチップ技術を使用して前記アッセイを行う、請求項13に記載の方法。

【請求項17】 KVLQT1の遺伝子またはRNAの領域を増幅し、前記増幅遺伝子またはRNAを配列決定することを含み、ここに、QT延長症候群がA332G、G478A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択されるいずれか1以上の突然変異によって示されることを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項18】 患者のDNAまたはRNAと野生型DNAまたはRNAプローブとの間のミスマッチを同定することを含み、ここに、前記プローブがDNAまたはRNA領域とハイブリダイズし、ここに、前記領域がA332G、G4

78A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択される配列番号1の突然変異を含むことを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項19】 前記ミスマッチをRNアーゼアッセイによって同定する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記方法が、患者のサンプルと請求項7に記載の抗体との反応によって患者の突然変異KVLQT1ポリペプチドの存在をアッセイすることからなり、ここに、陽性反応の存在がQT延長症候群を示すことを特徴とする、QT延長症候群の診断方法。

【請求項21】 前記アッセイが免疫ブロッティングを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 前記アッセイが免疫細胞化学技術を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 前記方法が、KVLQT1ポリペプチドを分析することを含み、ここに、前記ポリペプチドの突然変異がQT延長症候群を示し、ここに、前記突然変異がY111C、E160K、R174H、G179S、A194P、R243C、W248R、L266P、V307sp、V310I、S349W、Q356X、R366Q、T391I、P448R、Q530X、S566F、R583C、およびR594Qからなる群から選択される突然変異である、QT延長症候群の診断方法。

【請求項24】 KVLQT1中の突然変異を持つ患者の治療に有用であり、前記突然変異がA332G、G478A、G521A、G535A、G580C、C727T、T724C、T797C、G921+1T、A922-2C、G928A、C1046G、C1066T、G1097A、C1172T、C1343G、C1588T、C1697T、C1747T、およびG1781Aからなる群から選択され、当該方法は、

- a) 突然変異を有するKVLQT1を発現する細胞の第1のセットをプール溶液に入れ、ここに、前記突然変異はY111C、E160K、R174H、G179S、A194P、R243C、W248R、L266P、V307sp、V310I、S349W、Q356X、R366Q、T391I、P448R、Q530X、S566F、R583C、およびR594Qから選択され、
- b) 工程(a)の細胞中の第1の誘導K⁺電流を誘導し、
- c) 前記第1のK⁺電流を測定し、
- d) 野生型KVLQT1を発現する細胞の第2のセットをプール溶液に入れ、
- e) 工程(d)の細胞中の第2の誘導K⁺電流を誘導し、
- f) 前記第2の誘導K⁺電流を測定し、
- g) 工程(a)のプール溶液に薬物を添加し、
- h) 工程(g)の細胞中の第3の誘導K⁺電流を誘導し、
- i) 前記第3の誘導K⁺電流を測定し、
- j) 前記第3のK⁺誘導電流が、前記第1のK⁺誘導電流よりも第2のK⁺誘導電流に類似するかどうかを決定し、ここに、第1の誘導K⁺電流よりも第2の誘導K⁺電流に類似の第3の誘導K⁺電流が得られる薬物が前記患者の治療に有用であることを特徴とする薬物スクリーニング法。

【請求項25】 Y111C、E160K、R174H、G179S、A194P、R243C、W248R、L266P、V307sp、V310I、S349W、Q356X、R366Q、T391I、P448R、Q530X、S566F、R583C、およびR594Qからなる群から選択される突然変異を有する配列番号2のKVLQT1ポリペプチドをコードする単離DNA。

【請求項26】 G3340A、C4501G、de14850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択される1以上の突然変異によって改変された、配列番号3の配列を含む単離DNA。

【請求項27】 ヒト突然変異SCN5Aに特異的にハイブリダイズすることができるが野生型DNAにハイブリダイズできない核酸プローブであって、前記突然変異SCN5AがG3340A、C4501G、de14850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択され

る配列番号3の突然変異を含む、核酸プローブ。

【請求項28】 前記突然変異がG3340A、C4501G、del4850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択され、ヒトサンプル由来の遺伝子またはRNAの配列を分析するか、前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNA配列を分析することを特徴とする、SCN5A中の突然変異の検出方法。

【請求項29】 前記突然変異を、

a) 前記ヒト・サンプルから単離したRNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、前記ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

b) 前記サンプルから単離したRNAから作製したcDNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出して、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

c) 前記サンプルから単離したゲノムDNAに前記突然変異の1つに特異的なプローブをハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

d) プライマーセットを使用して前記サンプル中の前記遺伝子の全てまたは一部を増幅し、増幅核酸を配列決定し、

e) 前記突然変異の1つに特異的なプライマーを使用して前記サンプル中の前記遺伝子の一部を増幅し、増幅産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

f) 前記サンプル中の前記遺伝子の全てまたは一部を分子クローニングしてクローン化核酸を産生し、前記クローン化核酸を配列決定し、

g) 前記遺伝子を増幅して増幅核酸を産生し、前記突然変異の1つに特異的なDNAプローブに前記増幅核酸をハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション産物の存在を検出し、ここに、前記産物の存在はサンプル中の前記突然変異の存在を示し、

h) 前記ヒト・サンプル由来の遺伝子の遺伝子フラグメント由来の一本鎖DNA

および野生型遺伝子の対応するフラグメント由来の一本鎖DNAを形成させ、前記一本鎖DNAを未変性ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、前記ゲル上で前記一本鎖DNAの移動度を比較して、前記野生型と比較してサンプル由来の一本鎖DNAがシフトしているかどうかを同定し、前記移動度がシフトした一本鎖DNAを配列決定し、

i) 前記サンプルから単離したゲノムDNAフラグメント、前記サンプルから単離したRNAフラグメント、および前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNAフラグメントからなる群から選択される第1の核酸ストランドならびに対応するヒト野生型遺伝子フラグメントからなる第2の核酸ストランドからなるヘテロデュプレックスを形成し、前記ヘテロデュプレックスのミスマッチの存在を分析し、ミスマッチを有する前記第1の核酸ストランドを配列決定し、

j) 前記ヒト・サンプルの遺伝子および前記突然変異の1つに特異的な対立遺伝子の対応するフラグメントから一本鎖DNAを形成し、未変性ポリアクリルアミドゲル上で前記一本鎖DNAを電気泳動し、前記ゲル上で前記一本鎖DNAの移動度を比較して、前記対立遺伝子と比較して前記サンプル由来の一本鎖DNAがシフトしているかどうかを同定し、ここに、前記対立遺伝子と比較して前記一本鎖DNAの電気泳動移動度がシフトしない場合は、前記サンプルに突然変異が存在することを示し、

k) 前記サンプルから単離した遺伝子のゲノムDNAフラグメント、前記サンプルから単離したRNAフラグメント、および前記サンプル由来のmRNAから作製したcDNAフラグメントからなる群から選択される第1の核酸ストランドならびに前記突然変異の1つに特異的な対応する対立遺伝子フラグメントからなる第2の核酸ストランドからなるヘテロデュプレックスを形成し、前記ヘテロデュプレックスのミスマッチの存在を分析し、ミスマッチが存在しないことは前記突然変異の存在を示すことからなる群から選択される方法によって検出する、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 ハイブリダイゼーションを *in situ*で行う、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 D1114N、L1501V、delF1617、R16

23L、E1784K、およびS1787Nからなる群から選択される配列番号4の突然変異を含むSCN5Aによってコードされる単離ヒトポリペプチド。

【請求項32】 請求項31に記載のポリペプチドに結合することができるが、野生型ポリペプチドには結合することができない、抗体。

【請求項33】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項32に記載の抗体。

【請求項34】 SCN5A配列または被験体の組織サンプルから単離したその発現産物とSCN5Aの野生型配列またはその発現産物との比較によってSCN5A中の突然変異について被験体をスクリーニングし、ここに、前記被験体の配列中に突然変異が存在することは、QT延長症候群のリスクを示すことを特徴とする、ヒト被験体のQT延長症候群のリスクの評価方法。

【請求項35】 前記発現産物が前記遺伝子のmRNAまたは前記遺伝子によってコードされるポリペプチドから選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 1以上の以下の手順：

(a) 未変性ポリアクリルアミドゲル上の前記サンプル由来の一本鎖DNAの電気泳動移動度のシフトを観察し、

(b) 遺伝子へのプローブのハイブリダイゼーションに適切な条件下で、前記サンプルから単離したゲノムDNAにプローブをハイブリダイズさせ、

(c) 前記サンプル由来のゲノムDNAへの対立遺伝子特異的プローブのハイブリダイゼーションを同定し、

(d) 前記サンプル由来の遺伝子の全てまたは一部を増幅して増幅配列を産生させ、前記増幅配列を配列決定し、

(e) 核酸増幅によって前記サンプル中の特異的対立遺伝子の存在を同定し、

(f) 前記サンプル由来の遺伝子の全部または一部を分子クローニングしてクローン化配列を産生させ、前記クローン化配列を配列決定し、

(g) 分子(1)前記サンプルから単離した遺伝子ゲノムDNAまたはmRNAおよび(2)ヒト野生型遺伝子DNAに相補的な核酸プローブが互いにハイブリダイズしてデュプレックスを形成する場合に分子(1)および(2)の間にミスマッチが存在するかどうかを決定し、

- (h) 前記サンプル中の前記遺伝子配列を増幅し、野生型遺伝子配列を含む核酸プローブに前記増幅配列をハイブリダイズさせ、
- (i) 前記組織中の前記遺伝子配列を増幅し、突然変異遺伝子配列を含む核酸プローブに前記増幅配列をハイブリダイズさせ、
- (j) 欠失突然変異をスクリーニングし、
- (k) 点突然変異をスクリーニングし、
- (l) 挿入突然変異をスクリーニングし、
- (m) 前記遺伝子配列または前記遺伝子の突然変異配列を含む1つ以上の核酸プローブを使用して前記サンプル中の遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを決定し、
- (n) 免疫プロットングを行い、
- (o) 免疫細胞化学を行い、
- (p) 前記組織から単離した遺伝子タンパク質と突然変異対立遺伝子のポリペプチド発現産物に特異的に結合することができる結合パートナーおよび/または前記ポリペプチドの結合パートナーとの間の結合相互作用をアッセイし、
- (q) 前記結合パートナーの生化学的活性の阻害をアッセイする、ことを行う、請求項34に記載の方法。

【請求項37】 野生型DNAにハイブリダイズしない条件下で、請求項26に記載の単離DNAにハイブリダイズする核酸プローブ。

【請求項38】 患者のDNAまたはRNAサンプルに請求項37に記載のプローブをハイブリダイズさせることを含み、ここに、ハイブリダイゼーションシグナルの存在がQT延長症候群を示すことを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項39】 前記患者のDNAまたはRNAを増幅し、前記増幅DNAまたはRNAを請求項37に記載のプローブとハイブリダイズさせる、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 ハイブリダイゼーションを *in situ* で行う、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 核酸マイクロチップ技術を使用して前記アッセイを行う、

請求項38に記載の方法。

【請求項42】 SCN5Aの遺伝子またはRNAの領域を増幅し、前記増幅遺伝子またはRNAを配列決定することを含み、ここに、QT延長症候群がG3340A、C4501G、del4850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択されるいずれか1以上の突然変異によって示されることを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項43】 患者のDNAまたはRNAと野生型DNAまたはRNAプローブとの間のミスマッチを同定することを含み、ここに、前記プローブがDNAまたはRNA領域とハイブリダイズし、ここに、前記領域がG3340A、C4501G、del4850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択される配列番号3の突然変異を含むことを特徴とする、QT延長症候群を引き起こす突然変異の診断方法。

【請求項44】 前記ミスマッチをRNアーゼアッセイによって同定する、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記方法が、患者のサンプルと請求項32に記載の抗体との反応によって患者の突然変異SCN5Aポリペプチドの存在をアッセイすることからなり、ここに、陽性反応の存在がQT延長症候群を示すことを特徴とする、QT延長症候群の診断方法。

【請求項46】 前記アッセイが免疫プロットングすることを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記アッセイが免疫細胞化学技術を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項48】 当該方法が、SCN5Aポリペプチドを分析することを含み、ここに、前記ポリペプチドの突然変異がQT延長症候群を示し、ここに、前記突然変異がD1114N、L1501V、delF1617、R1623L、E1784K、およびS1787Nからなる群から選択される突然変異であることを特徴とする、QT延長症候群の診断方法。

【請求項49】 SCN5A中の突然変異を持つ患者の治療に有用であり、

前記突然変異がG3340A、C4501G、del4850-4852、G4868T、G5349A、およびG5360Aからなる群から選択され、当該方法は、

- a) 突然変異を有するSCN5Aを発現する細胞の第1のセットをプール溶液に入れ、ここに、前記突然変異はD1114N、L1501V、delF1617、R1623L、E1784K、およびS1787Nから選択され、
- b) 工程(a)の細胞中の第1の誘導Na⁺電流を誘導し、
- c) 前記第1のNa⁺電流を測定し、
- d) 野生型SCN5Aを発現する細胞の第2のセットをプール溶液に入れ、
- e) 工程(d)の細胞中の第2の誘導Na⁺電流を誘導し、
- f) 前記第2の誘導Na⁺電流を測定し、
- g) 工程(a)のプール溶液に薬物を添加し、
- h) 工程(g)の細胞中の第3の誘導Na⁺電流を誘導し、
- i) 前記第3の誘導Na⁺電流を測定し、
- j) 前記第3の誘導Na⁺電流が、前記第1の誘導Na⁺電流よりも第2の誘導Na⁺電流に類似するかどうかを決定し、ここに、第1の誘導Na⁺電流よりも第2の誘導Na⁺電流に類似の第3の誘導Na⁺電流が得られる薬物が前記患者の治療に有用であることを特徴とする、薬物スクリーニング法。

【請求項50】 D1114N、L1501V、delF1617、R1623L、E1784K、およびS1787Nからなる群から選択される突然変異を有する配列番号4のSCN5Aポリペプチドをコードする単離DNA。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

助成金番号RO1-HL46401、RO1-HL33843、RO1-HL51618、P50-HL52338、およびMO1-RR000064のNH LBIからの政府援助によって本出願を行った。連邦政府は本発明に一定の権利を有し得る。

【0002】**(発明の背景)**

QT延長症候群(LQTS)は、通常若年であるか健常な個体における心電図のQT間隔の延長、失神、発作、および突然死によって特徴付けられる心血管障害である(Jervell and Lange-Nielsen、1957; Romano et al.、1963; Ward、1964)。LQTSの臨床徴候は、偶発性心室頻脈性不整脈(torsade de pointesおよび心室細動など)に起因する(Schwartz et al.、1975; Moss et al.、1991)。LQTSの2つの遺伝形態が存在する。より一般的な形態であるロマノ-ウォード症候群(RW)は、他の表現型異常に関連せず、表現率がシフトする常染色体優性形質として遺伝する(Roman et al.、1963; Ward、1964)。ジェルヴェル-ランゲ・ニールセン症候群(JLN)は、難聴、(常染色体劣性形質として異常に遺伝する表現型)によって特徴付けられる(Jervell and Lange-Nielsen、1957)。LQTSは、通常、薬理学的治療の結果として獲得され得る。

【0003】

以前の研究では、本発明者らは、染色体11p15.5(LQT1)(Keating et al.、1991)にLQTS遺伝子座、7q35-36(LQT2)(Jiang et al.、1994)、および3q21-24にLQT3(Jiang et al.、1994)をマッピングした。第4の遺伝子座(LQT4)を、4q25-27にマッピングした(Schott et al.、1995)。ロマノ-ウォード症候群に5つの遺伝子(LQTSの常染

色体優性形態)が関与している。これらの遺伝子は、KVLQT1(LQT1)(Wang Q. et al., 1996a)、HERG(LQT2)(Curran et al., 1995)、SCN5A(LQT3)(Wang et al., 1995a)、21q22に存在する2つの遺伝子(KCNE1(LQT5)(Splawski et al., 1997a)およびKCNE2(LQT6)(Abbott et al., 1999))である。KVLQT1およびKCNE1の突然変異もまた、ジェルヴェル-ランゲ・ニールセン症候群(難聴に関連するLQTSの形態で、常染色体劣性様式で遺伝する表現型異常)を発症する。

【0004】

KVLQT1、HERG、KCNE1、およびKCNE2は、カリウムチャネルサブユニットをコードする。4つのKVLQT1サブユニットはminK(KCNE1によってコードされるサブユニット、化学量論は未知)で組み立てられて、心臓中の遅延整流カリウム電流をゆっくりと活性化させる I_{Ks} チャネルを形成する(Sanguinetti et al., 1996a; Barhanin et al., 1996)。4つのHERGサブユニットは、MiRp1(KCNE2によってコードされる、化学量論は未知)で組み立てられて、心臓中の遅延整流カリウム電流を急速に活性化させる I_{Kr} チャネルを形成する(Abbott et al., 1999)。突然変異サブユニットは機能低下機構によって I_{Ks} または I_{Kr} を減少させ、これはしばしばドミナントネガティブ効果を伴う(Chouabe et al., 1997; Shalaby et al., 1997; Wollnik et al., 1997; Sanguinetti et al., 1996)。SCN5Aは、 I_{Na} (心臓中のナトリウム電流)を担う心臓ナトリウム電流をコードする(Gellens et al., 1992)。SCN5AのLQTS関連突然変異により、機能亢進が起こる(Bennett et al., 1995; Dumaine et al., 1996)。心臓では、 I_{Ks} もしくは I_{Kr} の減少または I_N の増加により、心臓活動電位が延長され、QT間隔が延長し、不整脈のリスクが増加する。KVLQT1およびKCNE1はまた、内耳にも発現する(Ney

roud et al., 1997; Vetter et al., 1996)。
本発明者らは、 I_{Ks} の完全な喪失により重篤な心臓表現型およびJLNにおける難聴が起こることを示した(Neyroud et al., 1997; Splawski et al., 1997b; Tyson et al., 1997; Schulze-Bahr et al., 1997)。

【0005】

現在、LQTSの前駆症状診断は、心電図のQT間隔の延長に基づいている。しかし、遺伝学研究では、心電図のみを基本とする診断は高感度でも特異的でもないことが示されている(Vincent et al., 1992; Priori et al., 1999)。突然変異分析を用いた遺伝子スクリーニングにより、前駆症状診断を改良することができる。しかし、5つ全ての遺伝子中の全てのLQTS関連突然変異を同定し、かつ目録を作る総括的研究は達成されていない。核遺伝子の相対変異突然頻度を同定し、前駆症状診断を容易にし、遺伝子型-表現型研究を可能にするために、本発明者らは262人の関連のないLQTS個体のプールを5つの限定した遺伝子の突然変異についてスクリーニングした。これらの研究結果を、後記の実施例で示す。

【0006】

本発明は、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変およびその改変の検出方法に関する。

【0007】

本発明の背景を例示するか実施に関するさらなる詳細を提供するために本明細書中で使用された刊行物および他の資料は、本明細書中で引用として援用され、便宜上、それぞれ添付の引例のリストに分類している。

【0008】

本発明は、QT延長症候群に関連する遺伝子および遺伝子産物の改変ならびにLQTSの診断および予防方法に関する。診断すべき個体のKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子のDNA配列の分析およびそれぞれのDNA配列と正常な遺伝子の既知のDNA配列との比較による本発明によってLQTSを診断する。あるいは、試験すべき個体のこれらの遺伝子

を、LQTSを発症する突然変異についてスクリーニングすることができる。LQTSの予測により、実施者は現存の医学療法を使用してこの障害を予防することができる。

【0009】

(発明の開示)

本発明は、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変およびその改変の検出方法に関する。KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変には、突然変異および多形が含まれる。突然変異にはフレームシフト、ナンセンス、スプライス、調節、およびミスセンス突然変異が含まれる。本明細書中に記載の改変を検出することができる任意の方法を使用することができる。このような方法には、DNA配列決定、対立遺伝子特異的探索、ミスマッチ検出、一本鎖立体配置多形検出、および対立遺伝子特異的PCR増幅が含まれるが、これらに限定されない。

【0010】

(発明の詳細な記載)

本発明は、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変およびその改変の検出方法に関する。KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変には、突然変異および多形が含まれる。突然変異にはフレームシフト、ナンセンス、スプライス、調節、およびミスセンス突然変異が含まれる。本明細書中に記載の突然変異および多形を検出することができる任意の方法を使用することができる。このような方法には、DNA配列決定、対立遺伝子特異的探索、ミスマッチ検出、一本鎖立体配置多形検出、および対立遺伝子特異的PCR増幅が含まれるが、これらに限定されない。

【0011】

KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2突然変異により、LQTSのリスクが増す。多くの異なる突然変異によりKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2が生じる。KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2遺伝子の改変の存在

を検出するために、血液などの生体サンプルを調製し、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2の所与の改変の有無について分析する。LQTSのリスクの増加またはこのようなリスクの減少を検出するために、生体サンプルを調製し、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2の突然変異対立遺伝子の有無について分析する。試験された個体に通達するために、これらの試験の結果および解釈するための情報を保健提供者に還元する。診断研究機関によってこのような診断を行うことができるか、診断キットを製造して保健供給者または自己診断用に個人に販売する。

【0012】

遺伝性LQTSの存在を、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子の突然変異について任意のヒト組織を試験することによって確認することができる。例えば、遺伝子生殖系列HERG突然変異を有する個体は、LQTSを発症する傾向がある。これを、個体の身体の任意の組織由来のDNAの試験によって同定することができる。最も簡単には、採血して血液細胞からDNAを抽出することができる。さらに、胎児細胞、胎盤細胞、羊膜細胞をKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子について試験することによって、出生前診断を行うことができる。例えば点突然変異または欠失による野生型KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2対立遺伝子の改変を、本明細書中で考察の任意の手段によって検出することができる。

【0013】

DNA配列の突然変異を検出するために使用することができるいくつかの方法が存在する。直接的配列決定、手動式配列決定または自動化蛍光配列決定によって配列の突然変異を検出することができる。別のアプローチは、一本鎖立体配置多形アッセイ(SSCP)である(Orita et al., 1989)。この方法は、特に200bpを超えるDNAフラグメントサイズの場合、全ての配列のシフトを検出しないが、ほとんどのDNA配列の突然変異を検出するように最適化することができる。検出感度の低下は不利であるが、SSCPを使用すると処理能力を向上可能であることは魅力的であり、研究ベースでの突然変異検出

用の直接的配列決定に代わって実行可能である。SSCPゲル上での移動度がシフトしたフラグメントを配列決定して、DNA配列の突然変異の正確な性質を同定する。2つの相補的なDNA鎖間のミスマッチの検出に基づく他のアプローチには、クランプ変性ゲル電気泳動(CDGE)(Sheffield et al., 1991)、ヘテロデュプレックス分析(HA)(White et al., 1992)、および化学的ミスマッチ切断(CMC)(Grompe et al., 1989)が含まれる。上記の方法は大きな欠失、重複、または挿入を検出することも、タンパク質の転写または翻訳に影響を与える調節突然変異を検出することもない。タンパク質切形アッセイまたは非対称アッセイなどのこれらの突然変異クラスを検出することができる他の方法は、突然変異の特定の型のみを検出するが、ミスセンス突然変異は検出しない。現在利用可能なDNA配列の突然変異の検出方法の総説を、Grompe(1993)の最近の総説に見出すことができる。一旦突然変異が識別されると、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションなどの対立遺伝子特異的検出アプローチを利用して、多数の他のサンプルの同一の突然変異について迅速にスクリーニングすることができる。このような技術では、金ナノ粒子で標識して目視可能なように色をつけたプローブを利用することができる(Elghanian et al., 1997)。

【0014】

DNA配列の多形を検出するための迅速な予備的分析を、1以上の制限酵素、好ましくは多数の制限酵素によるDNA切断物の一連のサザンプロットの調査によって行うことができる。各プロットは、一連の正常な個体および一連のLQTS症例を含む。ハイブリダイズするフラグメントを示すサザンプロットにより(HERG遺伝子座に隣接しているかそれを含む配列で探索した場合、コントロールDNAと長さが異なる)、可能な突然変異が示される。非常に長い制限フラグメントが得られる制限酵素を使用する場合、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を使用する。

【0015】

当該分野で周知の技術を用いたKVLQT1、HERG、SCN5A、KCN

E1、またはKCNE2対立遺伝子の分子クローニングおよび対立遺伝子の配列決定によって点突然変異の検出を行うことができる。また、遺伝子または遺伝子の一部を、例えばPCRまたは他の増幅技術によって増幅し、増幅遺伝子またはその遺伝子増幅の一部を配列決定することができる。

【0016】

罹患感受性対立遺伝子の存在を確認するためのより完全で依然として間接的な以下の6つの周知な試験法が存在する：1)一本鎖確認分析(SSCP)(Orita et al., 1989)、2)変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)(Wartell et al., 1990; Sheffield et al., 1989)、3)RNアーゼ保護アッセイ(Finkelstein et al., 1990; Kinszler et al., 1991)、4)対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASOs)(Conner et al., 1983)、5)ヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質(E. coli mutSタンパク質など)の使用(Modrich, 1991)、および6)対立遺伝子特異的PCR(Ruano and Kidd, 1989)。対立遺伝子特異的PCRのために、その3'末端で特定のKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2突然変異にハイブリダイズするプローブを使用する。特定の突然変異が存在しない場合、増幅産物は認められない。欧州特許出願番号0332435およびNewton et al., 19899に開示のように、増幅無反応性突然変異系(ARMS)も使用することができる。遺伝子の挿入および欠失を、クローニング、配列決定、および増幅によって検出することもできる。さらに、遺伝子または周囲のマーカー遺伝子用の制限フラグメント長多形(RFLP)プローブを使用して、対立遺伝子の改変または多形フラグメント中の挿入を記録することができる。このような方法は、個体に見出された突然変異存在について罹患した個体の親族のスクリーニングに特に有用である。当該分野で公知の他の挿入および欠失技術を使用することができる。

【0017】

第1の3つの方法(SSCP、DGGE、およびRNアーゼ保護アッセイ)では、新しい電気泳動バンドが認められる。配列のシフトにより一本鎖の分子内塩

基対合が異なるので、SSCPは異なって移動するバンドを検出する。RNアーゼ保護は、突然変異体ポリヌクレオチドの2以上のより小さなフラグメントへの切断を含む。DGGEは、変性勾配ゲルを使用して野生型配列と比較した突然変異配列の移動率の相違を検出する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドアッセイでは、特定の配列を検出するオリゴヌクレオチドを設計し、ハイブリダイゼーションシグナルの有無の検出によってアッセイを行う。mutSアッセイでは、タンパク質は、突然変異配列と野生型配列との間のヘテロデュプレックス中のヌクレオチドミスマッチを含む配列のみと結合する。

【0018】

本発明では、ミスマッチは、2つの鎖が100%相補的ではないハイブリダイズした核酸デュプレックスである。全相同性の喪失は、欠失、挿入、逆位、または置換による。ミスマッチ検出を使用して、遺伝子またはそのmRNA産物の点突然変異を検出することができる。これらの技術は配列決定よりも感度が低いが、多数のサンプルに対してより簡単に行われる。ミスマッチ切断技術の例は、RNアーゼ保護法である。本発明の実施において、本方法には、ヒト野生型KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子コード配列に相補的な標識リボプローブの使用が含まれる。リボプローブおよび個体から単離したmRNAまたはDNAのいずれかを互いにアニーリング（ハイブリダイズ）し、その後デュプレックスRNA構造中のいくつかのミスマッチを検出することができる酵素RNアーゼAで消化する。RNアーゼAによってミスマッチが検出された場合、ミスマッチ部位で切断される。したがって、アニーリングRNA調製物が電気泳動ゲル担体上で分離された場合、ミスマッチがRNアーゼによって切断されたならばリボプローブおよびmRNAまたはDNAについての全長デュプレックスRNAよりも小さなRNA産物が認められる。リボプローブは全長のmRNAまたは遺伝子である必要はないが、いずれかのセグメントであり得る。リボプローブがmRNAまたは遺伝子のセグメントのみを含む場合、全てのmRNA配列のミスマッチをスクリーニングするために多数のこれらのプローブを使用することが望ましい。

【0019】

類似の様式では、DNAプローブを使用して、ミスマッチを酵素または化学的切断によってミスマッチを検出することができる。例えば、Cotton et al.、1988; Shenk et al.、1975; Novack et al.、1986を参照のこと。あるいは、ミスマッチを、マッチしたデュプレックスと比較したミスマッチデュプレックスの電気泳動移動度のシフトによって検出することができる。例えば、Carriello、1988を参照のこと。リボプローブまたはDNAプローブのいずれかを使用して、PCR（以下を参照のこと）によってハイブリダイゼーション前に突然変異を含み得る細胞mRNAまたはDNAを増幅することができる。特にシフトが総再編性（欠失および挿入など）である場合、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子のDNAのシフトを、サザンハイブリダイゼーションを使用して検出することもできる。

【0020】

PCRの使用によって増幅されたKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子のDNA配列を、対立遺伝子特異的プローブを使用してスクリーニングすることもできる。これらのプローブは、核酸オリゴマーであり、それぞれ公知の突然変異を保有する遺伝子配列領域を含む。例えば、1つのオリゴマーは、遺伝子配列の一部に対応する約30ヌクレオチド長であり得る。このような対立遺伝子特異的プローブの使用によって、PCR増幅産物をスクリーニングして以前に同定された遺伝子の突然変異の存在を同定することができる。増幅したKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2配列との対立遺伝子特異的プローブのハイブリダイゼーションを、例えばナイロンフィルター上で行うことができる。高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件下での特定のプローブのハイブリダイゼーションは、対立遺伝子特異的プローブ中と同一の組織中の突然変異の存在を示す。

【0021】

マイクロチップ技術による新しく開発された核酸分析技術もまた、本発明に適用することができる。この技術では、事実上何千もの異なるオリゴヌクレオチドプローブをシリコンチップ上のアレイに累積させる。分析される核酸を蛍光標識

し、チップ上のプローブにハイブリダイズさせる。これらの核酸マイクロチップを使用して核酸 - タンパク質相互作用を研究することも可能である。この技術を使用して、突然変異の存在または分析される核酸の配列さえも同定することができるか、目的の遺伝子の発現レベルを測定することができる。この方法は、多数（数千でさえも）のプローブを一度に並行処理する方法であり、分析速度を極めて増大させることができる。この技術に使用するいくつかの論文が公開されている。これらのうちのいくつかは、Hacia et al., 1996; Shoemaker et al., 1996; Chee et al., 1996; Lockhart et al., 1996; DeRisi et al., 1996; Lipshutz et al., 1995である。この方法を使用して、乳癌遺伝子BRCA1の突然変異について個体がすでにスクリーニングされている(Hacia et al., 1996)。この新規の技術はChemical and Engineering News (Borman, 1996) の新規の論文で総説されており、論説の主題である(Editorial, Nature Genetics, 1996)。Fodor (1997)も参照のこと。

【0022】

候補遺伝子座中の突然変異についての最も信頼のおける試験は、患者由来のKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2ゲノム配列とコントロール集団由来のゲノム配列とを直接比較することである。あるいは、例えば、PCRによって増幅後の伝令RNAを配列決定し、それにより、候補遺伝子のエクソン構造の決定の必要性を排除することができる。

【0023】

KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2のコード領域の外側に存在する患者由来の突然変異を、非コード領域（イントロンおよび遺伝子付近またはその中の調節配列など）の試験によって検出することができる。非コード領域中の突然変異が重要な初期の指標は、コントロール個体と比較して異常なサイズであるか患者に豊富に含まれるメッセンジャーRNA分子を明らかにするノーザンブロット試験に由来し得る。

【0024】

KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2のmRNA発現の改変を、当該分野で公知の任意の技術によって検出することができる。これらには、ノーザンブロット分析、PCR増幅、およびRNアーゼ保護が含まれる。mRNA発現の減少により、野生型遺伝子の改変が示される。野生型遺伝子の改変を、野生型KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2タンパク質の改変のスクリーニングによって検出することもできる。例えば、HERGと免疫反応性のモノクローナル抗体を使用して、組織をスクリーニングすることができる。同族抗原の欠如は突然変異を示す。突然変異体対立遺伝子の産物に特異的な抗体を使用して、突然変異体遺伝子産物を検出することもできる。このような免疫学的アッセイを、当該分野で公知の任意の便利な形式で行うことができる。これらには、ウェスタンブロット、免疫組織化学的アッセイ、およびELISAアッセイが含まれる。改変したKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2タンパク質の検出手段を使用して、野生型KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子の改変を検出することができる。タンパク質結合決定などの機能的アッセイを使用することができる。さらに、KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2の生化学的機能を検出するアッセイを使用することができる。突然変異体KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子産物の発見により、野生型KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子の改変が示される。

【0025】

突然変異体KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2遺伝子または遺伝子産物を、他のヒト身体サンプル（血清、糞便、尿、および痰など）中で検出することもできる。上記で考察した同一の組織中の突然変異体遺伝子または遺伝子産物検出技術を、他の身体サンプルに適用することができる。このような身体サンプルのスクリーニングにより、遺伝性LQTSの簡単に早期の診断が可能である。

【0026】

まず、スクリーニング方法は、関連するKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、またはKCNE2配列の増幅を含む。本発明の別の好ましい実施形態では、スクリーニング方法は、非PCRベースのストラテジーを含む。このようなスクリーニング方法には、当該分野で周知の二段階標識増幅方法が含まれる。PCRおよび非PCRベースのスクリーニングストラテジーは共に、高レベルの感度で標的配列を検出することができる。これらの方法のさらなる詳細を以下に簡単に示し、PCT公開出願WO96/05306（本明細書中で引用して援用される）でさらなる説明を見出すことができる。

【0027】

今日使用されている最も一般的な方法は、標的増幅である。本発明では、ポリメラーゼを使用して標的核酸配列を増幅する。ポリメラーゼ駆動増幅を使用した1つの特定の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。ポリメラーゼ連鎖反応および他のポリメラーゼ駆動増幅アッセイは、ポリメラーゼ駆動増幅サイクルの使用によって100万倍を超えるコピー数の増加を達成することができる。一旦増幅されると、得られた核酸を配列決定してDNAプローブの基質として使用することができる。

【0028】

プローブを使用して標的配列の存在を検出する場合、分析すべき生体サンプル（血液または血清など）を、所望ならば核酸抽出処理することができる。サンプル核酸を標的配列の検出を容易にする種々の方法（例えば、変性、制限消化、電気泳動、またはドットプロットティング）で調製することができる。分析物核酸の標的領域は、通常、プローブの標的配列とハイブリダイズするために少なくとも部分的に一本鎖でなければならない。配列が自然に一本鎖である場合、変性は必要ない。しかし、配列がデュプレックスである場合、配列は恐らくは変性する必要がある。当該分野で公知の種々の技術によって変性を行うことができる。

【0029】

分析物核酸およびプローブを、プローブ中の標的配列と分析物中の推定標的配列との安定なハイブリダイゼーションを促進する条件下でインキュベートする。分析物に結合させるために使用するプローブ領域を、遺伝子の標的領域に完全に

相補的にすることができる。したがって、偽陽性を防止するために高ストリンジエンシー条件が望ましい。しかし、高ストリンジエンシー条件は、プローブがゲノム中でユニークな染色体領域に相補的である場合のみに使用する。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを、ハイブリダイゼーション中および洗浄工程中の多数の要因（温度、イオン強度、塩基の組成、プローブ長、およびホルムアミド濃度を含む）によって決定する。一定の環境下では、標的配列の検出手段を得るためにより高次のハイブリッド（トリプレックス、クアドラプレックス）の形成が望ましいであろう。

【0030】

存在するならば、得られたハイブリッドの検出を、通常、標識プローブの使用によって行う。あるいは、プローブは非標識であってよいが、直接的または間接的に標識されたりガンドとの特異的結合によって検出可能である。適切な標識ならびにプローブおよびリガンドの標識法は当該分野で公知であり、例えば、公知の方法（ニックトランスレーション、ランダムプライミング、またはキナーゼ処理）によって取り込むことができる放射性標識、ビオチン、蛍光基、化学発光基（例えば、ジオキセタン、特に誘導ジオキセタン）、酵素、抗体などが含まれる。この基本的スキームの変形形態が当該分野で公知であり、外来性物質由来の検出されるべきハイブリッドの分離を容易にし、そして/または標識部分由来のシグナルを増幅する変形形態が含まれる。多数のこれらの変形形態が周知である。

【0031】

上記のように、非PCRベースのスクリーニングアッセイもまた本発明に含まれる。この手順は、核酸プローブ（または通常のスホジエステルと置換したスホン酸メチル骨格などのアナログ）と低レベルのDNA標識とをハイブリダイズさせる。このプローブは、プローブに共有結合した酵素を有するので、共有結合架橋によりハイブリダイゼーションの特異性は干渉されない。次いで、酵素-プローブ-標的核酸複合体を、有利のプローブ酵素結合物から単離して、酵素検出に添加することができる。 $10^3 \sim 10^6$ 倍の感度の増加をもたらす発色およびルミネセンス出力の変化として、酵素活性が観察される。例えば、オリゴデオキシヌクレオチド-アルカリ性ホスファターゼ結合物の調整およびハイブリダイ

ゼーションプローブとしてのその使用は周知である。

【0032】

2段階標識増幅法は当該分野で公知である。これらのアッセイは、小さなリガンド（ジゴキシゲニン、ビオチンなど）を標的遺伝子に特異的に結合可能な核酸プローブに結合させる原理に従う。対立遺伝子特異的プローブはまた、本実施例の範囲内である。

【0033】

1つの例では、核酸プローブに結合する小さなリガンドは、抗体-酵素結合物によって認識される。この例の1つの実施形態では、ジゴキシゲニンを核酸プローブに結合させる。化学発光基質にシフトする抗体-アルカリ性ホスファターゼ結合物によってハイブリダイゼーションを検出する。第2の例では、小さなリガンドを、第1のリガンドと特異的に複合体化することができる第2のリガンド-酵素結合物によって認識する。この例の周知の実施形態は、ビオチン-アビジン型の相互作用である。核酸プローブの標識法およびビオチン-アビジンベースのアッセイにおけるその使用は周知である。

【0034】

これはまた、本発明の核酸プローブアッセイが遺伝子を検出可能な核酸プローブのカクテルを使用する本発明の範囲内であると意図される。したがって、細胞サンプル中のKVLQT1の存在を検出するための1つの例では、KVLQT1に相補的な1つを超えるプローブを使用し、特に異なるプローブの数は、2、3、または5つの異なる核酸プローブ配列である。別の例では、カクテルがKVLQT1改変患者集団中で同定される対立遺伝子特異的突然変異に結合することができるプローブを含む場合、患者中のKVLQT1遺伝子配列の突然変異の存在を検出するためにKVLQT1に相補的な1つを超えるプローブを使用する。この実施形態では、任意の数のプローブを使用することができる。

【0035】

適切な宿主細胞中での複製によって、大量の本発明のポリヌクレオチドを産生させることができる。所望のフラグメントをコードする天然または合成のポリヌクレオチドフラグメントを、原核細胞または真核細胞への導入および複製が可能

な組換えポリヌクレオチド構築物（通常、DNA構築物）に組み込む。通常、ポリヌクレオチド構築物は、酵母または細菌などの単細胞宿主中での複製に適切であるが、培養哺乳動物もしくは植物または他の真核細胞株への導入（ゲノム内へ組み込まれるか組み込まれない）を意図することもできる。本発明の方法によって産生される核酸の精製は、例えば、Sambrook et al.、1989またはAusubel et al.、1992に記載されている。

【0036】

本発明のポリヌクレオチドを、化学合成（例えば、Ceaucage and Caruthers（1981）に記載のホスホルアミダイド法またはMatteucci and Caruthers（1981）のトリエステル法）によって産生するか、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機で行うこともできる。相補鎖の合成および適切な条件下での鎖の相互アニーリング、またはDNAポリメラーゼを使用した相補鎖への適切なプライマー配列の添加のいずれかによって、化学合成の一本鎖産物からデュプレックスフラグメントを得ることができる。

【0037】

原核宿主または真核宿主への導入のために調製されたポリヌクレオチド構築物は、所望のポリペプチドをコードする意図するポリヌクレオチドフラグメントを含む宿主によって認識される複製系を含み得るか、好ましくは、ポリペプチドコードセグメントに作動可能に連結された転写および翻訳開始調節配列も含む。発現ベクターは、例えば、複製起点または自律複製配列（ARS）および発現調節配列、プロモーター、エンハンサーおよび必要なプロセッシング情報部位（リボゾーム結合部位）、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列、およびmRNA安定化配列を含み得る。このようなベクターを、当該分野で周知の標準的な組換え技術によって調製することができ、これはSambrook et al.（1989）またはAusubel et al.（1992）で考察されている。

【0038】

宿主中で機能的な適切なプロモーターおよび他の必要なベクター配列を選択し

、これには、適切ならば、KVLQT1または他の遺伝子と天然に会合する配列を含み得る。細胞株と発現ベクターとの機能的組み合わせの例は、Sambrook et al. (1989)またはAusubel et al. (1992)に記載されている。また、Metzger et al., 1988を参照のこと。多数の有用なベクターが当該分野で公知であり、このようなベクターはStratagene、New England Biolabs、Promega Biotechなどから得ることができる。trp、lac、およびファージプロモーター、tRNAプロモーター、および解糖酵素プロモーターなどのプロモーターを、原核生物で使用することができる。有用な酵母プロモーターには、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、または他の解糖酵素(エノラーゼまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼなど)、マルトースおよびガラクトース利用を担う酵素などのプロモーター領域が含まれる。酵母発現での使用に適切なベクターおよびプロモーターは、Hitzeman et al. に付与された欧州特許第73,675Aにさらに記載されている。適切な非天然哺乳動物プロモーターには、SV40由来の初期および後期プロモーター(Fiers et al., 1978)またはマウスモロニー白血病ウイルス、マウス腫瘍ウイルス、トリ肉腫ウイルス、アデノウイルスII、ウシ乳頭腫ウイルス、またはポリオーマウイルス由来のプロモーターが含まれる。さらに、遺伝子のコピーを多数作製することができるように、構築物を増幅用遺伝子(例えば、DHFR)に結合することができる。適切なエンハンサーおよび他の発現調節配列については、「エンハンサーおよび真核遺伝子発現」、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、New York、1983も参照のこと。例えば、米国特許第5,691,198号、同第5,735,500号、同第5,747,469号、および同第5,436,146号もまた参照のこと。

【0039】

このような発現ベクターは自律的に複製することができる一方で、当該分野で周知の方法によって宿主細胞のゲノムへの挿入によっても複製することができる。

。

【0040】

発現およびクローニングベクターは、選択マーカー（ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードする遺伝子）を含むようである。この遺伝子の存在により、インサートを発現する宿主細胞のみの成長が保証される。典型的な選択遺伝子は、a) 抗生物質または他の有毒基質（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートなど）への耐性を付与するタンパク質、b) 栄養要求欠失に相補的なタンパク質、またはc) 天然培地からは利用不可能な重要な栄養素を提供する（*Bacillus* 属のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）タンパク質をコードする。適切な選択マーカーの選択は宿主細胞に依存し、異なる宿主に適切なマーカーは、当該分野で周知である。

【0041】

目的の核酸を含むベクターを、*in vitro*で転写することができ、得られたRNAを例えば注入（Kubo et al., 1988を参照のこと）によって宿主細胞に直接導入することができるか、当該分野で主知の方法によってベクターを宿主細胞に直接導入することができ、この方法は細胞宿主の型に依存してシフトするが、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の基質を使用したトランスフェクション、マイクロプロジェクタル衝撃、リポフェクション、感染（ベクターがレトロウイルスゲノムなどの感染因子である場合）、および他の方法が含まれる。一般に、Sambrook et al. (1989)またはAusubel et al. (1992)を参照のこと。当該分野で公知の任意の方法（特に、上記の方法を含む）による宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入を、本明細書中では「形質転換」という。上記の核酸を導入した細胞は、このような細胞の子孫も含むことを意味する。

【0042】

大量の本発明の核酸およびポリペプチドを、ベクターまたは適合性原核または真核宿主細胞中の発現送達体中でのKVLQT1核酸またはその一部の発現によって調製することができる。最も一般的に使用されている原核生物宿主は、*Es*

cherichia coli株であるが、Bacillus subtilisまたはPseudomonasなどの他の原核生物も使用することができる。

【0043】

哺乳動物または他の真核宿主細胞（酵母、糸状菌、植物、昆虫、または両生類、または鳥類など）もまた、本発明のタンパク質の産生に有用であり得る。培養物中での哺乳動物細胞の増殖自体が周知である。Jakoby and Pastan（編）（1979）を参照のこと。一般的に使用されている哺乳動物宿主株の例は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、WI38、BHK、およびCOS細胞株であるが、例えばより高い発現、所望のグリコシル化パターン、または他の特徴を得るために他の細胞株が適切であることが当業者に認識される。一般に使用されている昆虫細胞株の例はSF9である。

【0044】

ベクター構築様式に依存したマーカーの使用によって、クローンを選択する。マーカーは、同一または異なるDNA分子、好ましくは同一のDNA分子であり得る。原核生物宿主では、アンピシリン、テトラサイクリン、または他の抗生物質への耐性によって形質転換体を選択することができる。温度感受性に基づいた特定の産物を適切なマーカーとして使用することができる。

【0045】

本発明のポリヌクレオチドで形質転換された原核細胞または真核細胞は、本発明の核酸およびポリペプチドの産生だけでなく、例えば、KVLQT1または他のポリペプチドの特徴の研究にも有用である。

【0046】

KVLQT1または本明細書中で開示の他の遺伝子配列に基づいたプローブおよびプライマーを使用して、他の種中の相同なKVLQT1または他の遺伝子配列ならびにタンパク質を同定する。これらの遺伝子およびタンパク質は、単離された種の本明細書中に記載の診断/予防、治療、および薬物スクリーニングに使用される。

【0047】

以下の実施例に記載の研究により、多数の新規の突然変異が同定される。以前の研究では、LQTS遺伝子KVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2の突然変異を生じる126の異なる疾患を定義した(Wang Q. et al., 1996a; Curran et al., 1995; Wang et al., 1995a; Splawski et al., 1997a; Abbott et al., 1999; Chouabe et al., 1997; Wollnik et al., 1997; Neyroud et al., 1997; Splawski et al., 1997b; Tyson et al., 1997; Schulze-Bahr et al., 1997; Priori et al., 1999; Splawski et al., 1998; Wang et al., 1995b; Russell et al., 1996; Neyroud et al., 1998; Neyroud et al., 1999; Donger et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Jongbloed et al., 1999; Priori et al., 1998; Itoh et al., 1998a; Itoh et al., 1998b; Mohammad Panah et al., 1999; Saarinen et al., 1998; Ackerman et al., 1998; Berthet et al., 1999; Kanters, 1998; van den Berg et al., 1997; Dausse et al., 1996; Benson et al., 1996; Akimoto et al., 1998; Satler et al., 1996; Satler et al., 1998; Makita et al., 1998; An et al., 1998; Schulze-Bahr et al., 1995; Duggal et al., 1998; Chen Q. et al., 1999; Li et al., 1998; Wei et al., 1999; Larsen et al., 1999a; Bianchi et al., 1999; Ackerman et al., 1999a; Ackerman et al., 1999b; Murray et al., 1999; Larsen et al., 1999b; Yoshida e

t al., 1999; Wattanasirichaigoon et al., 1999; Bezzina et al., 1999; Hoorntje et al., 1999)。各野生型遺伝子の配列は公開されている。KVLQT1 じゃ Splawski et al. (1998) に見出すことができ、cDNA のコード領域を本明細書中に配列番号 1 として示し、コード KVLQT1 を配列番号 2 として示す。SCN5A は、Gellens et al. (1992) で報告され、その配列を GenBank 番号 NM_000335 で得られる。SCN5A のコード配列を本明細書中の配列番号 3 で示し、コード SCN5A を、配列番号 4 として示す。ほとんどの突然変異は、KVLQT1 (Yoshida et al., 1999) および HERG (Itoh et al., 1998b) で見出され、SCN5A (Wang Q. et al., 1996a)、KCNE1 (Jiang et al., 1994)、および KCNE2 (Ward, 1964) ではより少なかった。これらの突然変異は、公知のイントロン/エクソン構造を有する領域、主に膜貫通および小孔ドメインで同定された。本研究では、本発明者らは、公知の全ての不整脈遺伝子の突然変異について 252 人の LQTS 個体をスクリーニングした。本発明者らは 134 個の突然変異を同定し、そのうち 80 個が新規であった。本発明者らの以前の研究における 43 個の突然変異とあわせると、現在 262 人の LQTS 個体中 177 個の突然変異を同定した (68%)。個体の 32% の突然変異を同定不可能であったのは、表現型のエラー、不完全な SSCP 感受性、または調節配列中突然変異の存在に起因し得る。しかし、さらなる LQTS 遺伝子が発見されることも明らかである (Jiang et al., 1994; Schott et al., 1995)。

【0048】

ミスセンスが最も一般的 (72%) で、次いでフレームシフト突然変異 (10%)、インフレーム欠失、ナンセンス、およびスプライス部位突然変異 (それぞれ 5~7%) と続く。ほとんどの突然変異は、細胞内 (52%) および膜貫通 (30%) ドメインで起こっていた。12% は小孔で見出され、6% は細胞外セグメントで見出された。129 個の異なる LQTS 突然変異のうち 100 個 (78

%)が単一の家族または個人であった。177個の突然変異のほとんどは、KVLQT1(75または42%)およびHERG(80または45%)に見出された。これら2つの遺伝子は、同定された突然変異の87%を占めるが、SCN5A(14または8%)、KCNE1(5または3%)、およびKCNE2(3または2%)中の突然変異は13%を占めた。

【0049】

KVLQT1およびHERGのS5、S5/P、P、およびS6をコードする領域で複数の突然変異が見出された。カリウムチャネルのP領域は外側の小孔を形成し、選択フィルターを含む(Doyl e et al .、1998)。KcsAの内部ラセンに対応する膜貫通セグメント6は、小孔の2/3内部に形成される。この構造は、KcsAの外側のラセンに対応するS5膜貫通セグメントによって支持され、原核生物から真核生物にまで保存されている(MacKinnon et al .、1998)。これらの領域の突然変異は、おそらくカリウム輸送を乱すであろう。KVLQT1およびHERGのC末端に多数の突然変異が同定された。HERGのC末端のシフトにより、四量体形成が異常になり、これは、HERGに関してはeagのC末端がこの工程に関連することが提案されている(Ludwig et al .、1994)。

【0050】

KVLQT1およびHERGと異なる領域にも複数の突然変異が同定された。KVLQT1では、S2/S3およびS4/S5リンカーをコードする配列に複数の突然変異が見出された。Xenopus 卵母細胞における野生型KVLQT1とのS2/S3突然変異体の同時発現により、 I_{K_s} チャネルの生物物理学的性質を有意にシフトさせる異なる単純な機能喪失またはドミナントネガティブ効果が誘導された(Chouabe et al .、1997; Shalaby et al .、1997; Wang et al .、1999)。それに対して、S4/S5突然変異はチャネルのゲーティング特性をシフトさせ、かつminKサブユニットとのKVLQT1相互作用を改変した(Wang et al .、1999; Franquez a et al .、1999)。HERGでは、N末端で20個を超える突然変異が同定された。個の領域を欠くHERGチャ

ネルは、より急速に非活性化され、この領域の突然変異は類似の効果を有する (Chen J. et al., 1999)。

【0051】

minKおよびMiRP1 (それぞれ I_{Ks} および I_{Kr} の α -サブユニット) をコードするKCNE1およびKCNE2の突然変異は、チャネルの生物物理学的性質をシフトさせた (Splawski et al., 1997a; Abbott et al., 1999; Sesti and Goldstein, 1998)。クラリスロマイシン誘導性不整脈に関連するMiRP1突然変異は、抗生物質によるチャネル遮断を増加させた (Abbott et al., 1999)。SCN5A (心臓 I_{Na} を担うナトリウムチャネル α -サブユニット) の突然変異は、不活化ゲートを不安定化させて、チャネル不活化を遅延させ、再開口を分散した (Bennett et al., 1995; Dumaine et al., 1996; Wei et al., 1999; Wang DW et al., 1996)。1つのSCN5A突然変異は、ナトリウムチャネル α -サブユニットとの相互作用に影響を与えた (An et al., 1998)。

【0052】

KCNE1およびKCNE2突然変異の発端者は他の遺伝子型を有する発端者よりも老いており、かつQTが短いことに留意のこと。これらの相違の有意性は未知であるが、KCNE1およびKCNE2遺伝子型を有する発端者の数は少ない。

【0053】

この突然変異カタログにより、遺伝子型 - 表現型分析が容易になる。これはまた、前駆症状診断および、いくつかの症例では治療についての臨床的意味を有する。例えば、KVLQT1、HERG、KCNE1、およびKCNE2が突然変異した患者は、カリウム治療で恩恵を受け得る (Compton et al., 1996)。それに対して、ナトリウムチャネルブロッカーはSCN5A突然変異患者に有益であり得る (Schwartz et al., 1995)。突然変異の同定は、イオンチャネル研究と同様に重要である。異種系の突然変異チ

チャネルの発現によって、構造シフトがチャネルの挙動にどのように影響を与えるのかまたは突然変異によってどのようにプロセシングに影響を与えるのかを明らかにすることができる (Zhou et al., 1998; Furutani et al., 1999)。これらの研究により、チャネル機能の理解が深められ、疾患の機構が洞察される。最後に、突然変異の同定は、不整脈感受性の遺伝子スクリーニングの開発に貢献する。

【0054】

本発明を以下の実施例によって示すが、これは例示を目的とし、本発明の限定を意図しない。当該分野で周知の標準的な技術または実施例に特別に記載の技術を利用した。

【0055】

実施例1：確認および表現型分類。北米および欧州の診療所で個体を確認した。個体を、QTc（心拍数で修正したQT間隔）に基づくLQTSおよび症状の存在について評価した。本研究では、発端者に注目した。個体は、QT間隔の延長を示し（460ms以上のQTc）、そして/またはtorsades de pointes、心室細動、心停止、または異常な突然死を記録した。地域の検閲局ガイドラインに従って、同意通知を得た。表現型データを、遺伝子型の知識なしで解釈した。コード領域が改変しているか少なくとも400個の染色体で検出されなかったスプライシングに影響を与えると予想される配列のシフトを突然変異と定義した。コントロール集団中のいかなる遺伝子にも既知の多形以外にシフトは検出されなかった。これにより、いくつかの突然変異は疾患に関連しない稀な突然変異であるという可能性が排除されない。

【0056】

実施例2：突然変異分析。LQTS突然変異を同定するために、SSCP（一本鎖立体配座多形）およびDNA配列分析を使用して、262人の無関係のLQTS個体をスクリーニングした。17個のプライマー対を使用してKVLQT1をスクリーニングし (Splawski et al., 1998)、3個のプライマー対をKCNE1 (Splawski et al., 1997a) およびKCNE2 (Abbott et al., 1999) に使用した。33個の

プライマー対 (Wang et al., 1996b) をSSCP分析に使用して、 I_{Na} が異常と疑われる50人の個体の全SCN5Aエクソンをスクリーニングした。以前に突然変異が同定されているエクソン23~28が262人全員の個体でスクリーニングされた。

【0057】

性、年齢、QTc、および症状の存在を表1にまとめる。確認での平均年齢は492msの修正QT間隔を有する29歳であった。75%は、症状の履歴を有し、女性は約2:1の比で優勢であった。数は少ないが、KCNE1およびKCNE2突然変異を有する個体の修正QT間隔は、457msとより短い。

【0058】

【表1】

表 1

年齢、QTc、性、および症状の存在

遺伝子型	年齢* (年) (平均±SD)	性 (F/M)	QTc (ms) (平均±SD)	症状+
KVLQT1	32±19	52/23	493±45	78%
HERG	31±19	51/29	498±48	71%
SCN5A	32±24	8/6	511±42	55%
KCNE1	43±16	3/2	457±25	40%
KCNE2	54±20	3/0	457±05	67%
未知	25±16	56/29	484±46	81%
全部	29±19	173/89	492±47	75%

* 確認時の年齢、

+ 症状には失神、心停止、または突然死が含まれる。

【0059】

SSCP分析により多数の突然変異が明らかとなった。52人の個体でLQTSに関連するKVLQT1突然変異が同定された(図1および表2)。20個の

突然変異は新規であった。68人のLQTS個体でHERG突然変異が同定された(図2および表3)。これらの突然変異のうち23個の突然変異は新規であった。8人の症例でSCN5A突然変異が同定された(図3および表4)。突然変異のうち5つが新規であった。3個の新規のKCNE1突然変異が同定され(図4および表5)、KCNE2に3個の突然変異が同定された(図5および表6)(Abbott et al., 1999)。400個のコントロール染色体でKVLQT1、HERG、SCN5A、KCNE1、およびKCNE2突然変異が認められた。

【0060】

【表2】

表 2
全KVLQT1変異のまとめ*

ヌクレオチドの変化†	コード効果	位置	エクソン	ファミリー数++	研究
de1211-219	de171-73	N末端	1	1	Ackerman et al., 199a
A332G†	Y111C	N末端	1	1	本研究
de1451-452	A150fs/132	S2	2	1 JLN	Chen Q. et al., 1999
T470G	F157C	S2	1	1	Larsen et al., 1999a
G477+1A	M159sp	S2	1	1 JLN 1 UK	本研究; Donger et al., 1997
G477+5A	M159sp	S2	1	1	Ackerman et al., 1999b
G478A†	E160K	S2	3	1	本研究
de1500-502	F167W/del G168	S2	3	1	Wang Q. et al., 1996a
G502A	G168R	S2	3	7	本研究; Splawski et al. 1998; Donger et al., 1997
C520T	R174C	S2/S3	3	1	Donger et al., 1997
G521A†	R174H	S2/S3	3	1	本研究
G532A	A178T	S2/S3	3	1	Tanaka et al., 1997
G532C	A178P	S2/S3	3	1	Wang Q. et al., 1996a
G535A†	G179S	S2/S3	3	1	本研究
A551C	Y184S	S2/S3	3	2	本研究; Jongbloed et al., 1999
G565A	G189R	S2/S3	3	3	Wang Q. et al., 1996a, Jongbloed et al., 1999
insG567-568	G189fs/94	S2/S3	3	1 (RW+ JLN)	Splawski et al., 1997b
G569A	R190Q	S2/S3	3	2	Splawski et al., 1998, Donger et al., 1997
de1572-576	L191fs/90	S2/S3	3	1 JLN, 1 RW2 (JLN+RW)	Tyson et al., 1997; Ackerman et al., 199b
G580C†	A194P	S2/S3	3	1	本研究

【0061】

【表3】

表 2 (続き)

C674T	S225L	S4	4	2	本研究;Priori et al.、 1999
G724A	D242N	S4/S5	5	1	Itoh et al.、1998b
C727T†	R243C	S4/S5	5	2	本研究
G728A	R243H	S4/S5	5	1 JLN	Saarinen et al.、1998
T742C†	W248R	S4/S5	5	1	本研究
T749A	L250H	S4/S5	5	1	Itoh et al.、1998a
G760A	V254M	S4/S5	5	4	本研究;Wang Q. et al.、 1996a;Donger et al.、 1997
G781A	E261K	S4/S5	6	1	Donger et al.、1997
T797C†	L266P	S5	6	1	本研究
G805A	G269S	S5	6	1	Ackerman et al.、1999b
G806A	G269D	S5	6	3	本研究;Donger et al.、1 997
C817T	L273F	S5	6	2	本研究;Wang Q. et al.、 1996a
A842G	Y281C	S5	6	1	Priori et al.、1999
G898A	A300T	S5/小孔	6	1	Priori et al.、1998
G914C	W305S	小孔	6	1 JLN	Chouabe et al.、1997
G916A	G306R	小孔	6	1	Wang Q. et al.、1996a
del921- (921+2)	V307 sp	小孔	6	1	Li et al.、1998
G921+ 1T†	V307 sp	小孔	6	1	本研究
A922- 2C†	V307 sp	小孔	7	1	本研究
G922-1C	V307 sp	小孔	7	1	Murray et al.、1999
C926G	T309R	小孔	7	1	Donger et al.、1997
G928A†	V310I	小孔	7	1	本研究
C932T	T311I	小孔	7	1	Saarinen et al.、1998
C935T	T312I	小孔	7	2	本研究;Wang Q. et al.、 1996a
C939G	I313M	小孔	7	1	Tanaka et al.、1997

【表4】

表 2 (続き)

G940A	G314S	小孔	7	7	Splawski et al.、1998; Russell et al.、1996; Donger et al.、1997; Jongbloed et al.、1999; Itoh et al.、1998b
A944C	Y315S	小孔	7	3	Donger et al.、1997; Jongbloed et al.、1999
A944G	Y315C	小孔	7	2	Priori et al.、1999; Splawski et al.、1998
G949A	D317N	小孔	7	2	Wollnik et al.、1997; Saarinen et al.、1998
G954C	K318N	小孔	7	1	Splawski et al.、1998
C958G	P320A	小孔	7	1	Donger et al.、1997
G973A	G325R	S6	7	4	本研究;Donger et al.、 1997; Tanaka et al.、1997
del11017 -1019	delF34 0	S6	7	2	本研究;Ackerman et al. 、1998
C1022A	A341E	S6	7	5	本研究;Wang Q. et al.、 1996a;Berthet et al.、 1999
C1022T	A341V	S6	7	7	本研究;Wang Q. et al.、 1996a;Russell et al.、 1996; Donger et al.、1997; Li et al.、1998
C1024T	L342F	S6	7	1	Donger et al.、1997
C1031T	A344V	S6	7	1	Donger et al.、1997
G1032A	A344sp	S6	7	9	本研究;Kanters、1998; Li et al.、1998; Ackerman et al.、1996b; Murray et al.、1999
G1032C	A344sp	S6	7	1	Murray et al.、1999
G1033C	G345R	S6	8	1	van den Berg et al.、 1997
G1034A	G345E	S6	8	1	Wang Q. et al.、1996a
C1046G†	S349W	S6	8	1	本研究
T1058C	L353P	S6	8	1	Splawski et al.、1998
C1066T†	Q356X	C末端	8	1	本研究
C1096T	R366W	C末端	8	1	Splawski et al.、1998
G1097A†	R366Q	C末端	8	1	本研究

【表5】

表 2 (続き)

G1097C	R366P	C末端	8	1	Tanaka et al.,1997
G1111A	A371T	C末端	8	1	Donger et al.,1997
T1117C	S373P	C末端	8	1	Jongbloed et al.,1999
C1172T†	T391I	C末端	9	1	本研究
T1174C	W392R	C末端	9	1	Jongbloed et al.,1999
C1343G†	P448R	C末端	10	2	本研究
C1522T	R518X	C末端	12	1JLN,3RW	本研究;Larsen et al.,1999
G1573A	A525T	C末端	12	1	Larsen et al.,1999b
C1588T†	Q530X	C末端	12	1JLN,1RW	本研究
C1615T	R539W	C末端	13	1	Chouabe et al.,1997
del16/ins7	E543fs/107	C末端	13	1JLN	Neyroud et al.,1997
C1663T	R555C	C末端	13	3	Donger et al.,1997
C1697T†	S566F	C末端	14	3	本研究
C1747T†	R583C	C末端	15	1	本研究
C1760T	T587M	C末端	15	1JLN,1RW	Donger et al.,1997; Itoh et al.,1998b
G1772A	R591H	C末端	15	1	Donger et al.,1997
G1781A†	R594Q	C末端	15	3	本研究
del1892-1911	P630fs/13	C末端	16	1JLN	Donger et al.,1997
insC1893-1894	P631fs/19	C末端	16	1	Donger et al.,1997

* ins は挿入を示し、del は欠失を示し、sp は予想されるスプライス突然変異前の最後の影響を受けないアミノ酸を示す；fs はフレームシフトによって影響を受けない最後のアミノ酸を示し、続くfs は終結前のアミノ酸数を示す；X は生じた終止コドンを示す。

† は新規の突然変異を示す。

++ は特記しない限りロマノーワード家族数を示す。(UK-未知)

【0064】

【表6】

表 3
全HERG変異のまとめ*

変異の 変化	コード効果	位置	功 効	RW ファミリー 数	研究
C87A†	F29L	N末端	2	1	本研究
A98C†	N33T	N末端	2	2	本研究
C132A†	C44X	N末端	2	1	本研究
G140T†	G47V	N末端	2	1	本研究
G157C†	G53R	N末端	2	1	本研究
G167A†	R56Q	N末端	2	1	本研究
T196G†	C66G	N末端	2	1	本研究
A209G†	H70R	N末端	2	2	本研究
C215A†	P72Q	N末端	2	1	本研究
del221-251†	R73fs/ 31	N末端	2	1	本研究
G232C†	A78P	N末端	2	1	本研究
dup1234-250†	A83fs/ 37	N末端	2	1	本研究
C241T†	Q81X	N末端	2	1	本研究
T257G†	L86R	N末端	2	1	本研究
insC422-423†	P141fs /2	N末端	3	1	本研究
insC453-454†	P151fs /179	N末端	3	1	本研究
dup1558-600	L200fs /144	N末端	4	1	Hoorntje et al.,1999
insC724-725†	P241fs /89	N末端	4	1	本研究
del885†	V295fs /63	N末端	4	1	本研究
C934T†	R312C	N末端	5	1	本研究
C1039T†	P347S	N末端	5	1	本研究
G1128A†	Q376sp	N末端	5	1	本研究
A1129-2G†	Q376sp	N末端	6	1	本研究
del1261	Y420fs /12	S1	6	1	Curran et al.,1995
C1283A	S428X	S1/S2	6	1	Priori et al.,1999
C1307T	T436M	S1/S2	6	1	Priori et al.,1999
A1408G	N470D	S2	6	1	Curran et al.,1995
C1421T	T474I	S2/S3	6	1	Tanaka et al.,1997
C1479G	Y493X	S2/S3	6	1	Itoh et al.,1998a
del1498-1524	del500-508	S3	6	1	Curran et al.,1995
G1592A†	R531Q	S4	7	1	本研究
C1600T	R534C	S4	7	1	Itoh et al.,1998a

【表7】

表 3 (続き)

T1655C†	L552S	S5	7	1	本研究
delT1671	T556fs /7	S5	7	1	Schulze-Bahr et al.,1995
G1672C	A558P	S5	7	1	Jongbloed et al.,1999
G1681A	A561T	S5	7	4	本研究;Dausse et al.,1996
C1682T	A561V	S5	7	4	本研究;Curran et al.,1995; Priori et al.,1999
G1714C	G572R	S5/小孔	7	1	Larsen et al.,1999a
G1714T	G572C	S5/小孔	7	1	Splawski et al.,1998
C1744T	R582C	S5/小孔	7	1	Jongbloed et al.,1999
G1750A†	G584S	S5/小孔	7	1	本研究
G1755T†	W585C	S5/小孔	7	1	本研究
A1762G	N588D	S5/小孔	7	1	Splawski et al.,1998
T1778C†	1593T	S5/小孔	7	1	本研究
T1778G	1593R	S5/小孔	7	1	Benson et al.,1996
G1801A	G601S	S5/小孔	7	1	Akimoto et al.,1998
G1810A	G604S	S5/小孔	7	2	本研究;Jongbloed et al., 1999
G1825A†	D609N	S5/小孔	7	1	本研究
T1831C	Y611H	S5/小孔	7	1	Tanaka et al.,1997
T1833 (Aま たはG)	Y611X	S5/小孔	7	1	Schulze-Bahr et al.,1995
G1834T	V612L	小孔	7	1	Satler et al.,1998
C1838T	T613M	小孔	7	4	本研究;Jongbloed et al., 1999
C1841T	A614V	小孔	7	6	Priori et al.,1999; Splawski et al.,1998; Tanaka et al.,1997; Satler et al.,1998
C1843G†	L615V	小孔	7	1	本研究
G1876A†	G626S	小孔	7	1	本研究
C1881G†	F627L	小孔	7	1	本研究
G1882A	G628S	小孔	7	2	本研究;Curran et al.,1995
A1885G	N629D	小孔	7	1	Satler et al.,1998
A1886G	N629S	小孔	7	1	Saler et al.,1998
C1887A	N629K	小孔	7	1	Yoshida et al.,1999
G1888C	V630L	小孔	7	1	Tanaka et al.,1997
T1889C	V630A	小孔	7	1	Splawski et al.,1998
C1894T†	P632S	小孔	7	1	本研究
A1898G	N633S	小孔	7	1	Satler et al.,1998
A1912G†	K638E	S6	7	1	本研究
del1913- 1915†	delK63 8	S6	7	1	本研究
C1920A	F640L	S6	7	1	Jongbloed et al.,1999

【表8】

表 3 (続き)

A1933T†	M645L	S6	7	1	本研究
del1951- 1952	L650fs /2	S6	8	1	Itoh et al., 1998a
G2044T†	E682X	S6/cNBD	8	1	本研究
C2173T	Q725X	S6/cNBD	9	1	Itoh et al., 1998a
insT2218 -2219†	H739fs /63	S6/cNBD	9	1	本研究
C2254T†	R752W	S6/cNBD	9	1	本研究
dup12356 -2386	V796fs /22	cNBD	9	1	Itoh et al., 1998a
del2395†	I798fs /10	cNBD	9	1	本研究
G2398+1C	L799sp	cNBD	9	2	本研究; Curran et al., 1995
T2414C†	F805S	cNBD	10	1	本研究
T2414G†	F805C	cNBD	10	1	本研究
C2453T	S818L	cNBD	10	1	Berthet et al., 1999
G2464A	V822M	cNBD	10	2	Berthet et al., 1999 Satler et al., 1996
C2467T†	R823W	cNBD	10	2	本研究
A2582T†	N861I	C末端	10	1	本研究
G2592+1A	D864sp	C末端	10	2	本研究; Berthet et al., 1999
del2660†	K886fs /85	C末端	11	1	本研究
C2750T†	P917L	C末端	12	1	本研究
del2762†	R920fs /51	C末端	12	1	本研究
C2764T†	R922W	C末端	12	1	本研究
insG2775 -2776†	G925fs /13	C末端	12	1	本研究
del2906†	P968fs /4	C末端	12	1	本研究
del2959- 2960†	P986fs /130	C末端	12	1	本研究
C3040T†	R1014X	C末端	13	2	本研究
del3094†	G1031fs /24	C末端	13	1	本研究
insG3107 -3108	G1036fs /82	C末端	13	1	Berthet et al., 1999
insC3303 -3304†	P1101 fs	C末端	14	1	本研究

*全ての文字が表2と同一である。

【0067】

【表9】

表 4
全SCN5A変異のまとめ

ヌクレオチド の変化	コード効果	位置	エク ソン	RW ファミリー 数	研究
G3340A†	D1114N	DII/DI II	18	1	本研究
C3911T	T1304M	DIII/S 4	22	1	Wattanasirichaigoon et al. 、1999
A3974G	N1325S	DIII/S 4/S5	23	1	Wang et al.、1995b
C4501G†	L1501V	DIII/D IV	26	1	本研究
del14511 -4519	del150 5-1507	DIII/D IV	26	4	Wang et al.、1995a; Wang et al.、1995b
del14850 -4852†	del16 17	DIV/S3 /S4	28	1	本研究
G4868A	R1623Q	DIV/S4	28	2	本研究、;Makita et al. 1998
G4868T†	R1623L	DIV/S4	28	1	本研究
G4931A	R1644H	DIV/S4	28	2	本研究、;Wang et al.、1995b
C4934T	T1645M	DIV/S4	28	1	Wattanasirichaigoon et al. 、1999
G5350A†	E1784K	C末端	28	2	本研究;Wei et al.、1999
G5360A†	S1787N	C末端	28	1	本研究
A5369G	D1790G	C末端	28	1	Anet al.、1998
insTGA5385 -5386	insD1795 -1796	C末端	28	1	Bezzina et al.、1999

*全ての文字が表2と同一である。I_{Na}が異常であると疑われる50人の個体を、全SCN5Aエクソンについてスクリーニングした。全個体を、エクソン23~28についてスクリーニングした。

【0068】

【表10】

表 5
全KCNE1変異のまとめ*

ヌクレオチド の変化	コード効果	位置	エク ソン	ファミリ ー数	研究
C20T	T71	N末端	3	1 J L N	Schulze-Bahe et al., 1997
G95A†	R32H	N末端	3	1	本研究
G139T	V47F	S1	3	1 J L N	Bianchi et al.,1999
TG151- 152AT	L51H	S1	3	1 J L N	Bianchi et al.,1999
A172C/ TG176- 177CT	TL58- 59PP	S1	3	1 J L N	Tyson et al.,1997
C221T	S74L	C末端	3	1	Splawski et al.,1997a
G226A	D76N	C末端	3	1JLN,1R W, 1(JLN+R W)	Splawski et al.,1997a, Tyson et al.,1997; Duggal et al.,1998
T259C	W87R	C末端	3	1	Bianchi et al.,1999
C292T†	R98W	C末端	3	1	本研究
C379A†	P127T	C末端	3	1	本研究

*全ての文字が表2と同一である。

【0069】

【表11】

表 6

全KCNE2突然変異のまとめ

ヌクレオチド のシフト	コード 効果	位置	エクソ ン	家族数	研究
C 2 5 G	Q 9 E	N末端	1	1	Abbott et al., 1999
T 1 6 1 T	M 5 4 T	S 1	1	1	Abbott et al., 1999
T 1 7 0 C	I 5 7 T	S 1	1	1	Abbott et al., 1999

【0070】

【表12】

表 7

型による突然変異

型	KVLQT1	HERG	SCN5A	KCNE1	KCNE2	合計
ミスセンス	59	52	9	5	3	128
ナンセンス	6	5	0	0	0	11
AA欠失*	2	2	5	0	0	9
フレームシ フト	1	16	0	0	0	17
スプライス	7	5	0	0	0	12
合計	75	80	14	5	3	117

* AAはアミノ酸を示す。

【0071】

【表13】

表 8

位置による突然変異

遺伝子タンパク質位置	<i>KVLQ</i> <i>TI</i> K V L Q T 1	<i>HERG</i> HERG	<i>SCN5A</i> S C N 5 A	<i>KCNE1</i> K C N E 1 m i n K	<i>KCNE2</i> K C N E 2 M i R P 1	合計
細胞外	0	7	1	1	1	10
膜貫通	33	13	5	0	2	53
小孔	9	12	0	N/A	N/A	21
細胞内	33	48	8	4	0	93
合計	75	80	14	5	3	177

【0072】

本発明を本発明の好ましい実施形態の詳細を参考にして本特許出願で開示しているが、当業者によって発明の精神および添付の特許請求の範囲の範囲内で修正形態を容易に行されることが意図されるように、この開示は限定の意味よりもむしろ例示を意図していることが理解される。

【0073】

文献のリスト

【0074】

【表14】

- Abbott GW, et al. (1999). *Cell* 97:175-187.
- Ackerman MJ, et al. (1998). *Pediatr. Res.* 44:148-153.
- Ackerman MJ, et al. (1999a). *N. Engl. J. Med.* 341:1121-1125.
- Ackerman MJ, et al. (1999b). *Mayo Clin. Proc.* 74:1088-1094.
- Akimoto K, et al. (1998). *Hum. Mutat.* 1:S184-S186.
- An RH, et al. (1998). *Circ. Res.* 83:141-146.
- Ausubel FM, et al. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley and Sons, New York, New York).
- Barhanin J, et al. (1996). *Nature* 384:78-80.
- Beaucage SL and Caruthers MH (1981). *Tetra. Letts.* 22:1859-1862.
- Bennett PB, et al. (1995). *Nature* 376:683-685.
- Benson DW, et al. (1996). *Circulation* 93:1791-1795.
- Berthet M, et al. (1999). *Circulation* 99:1464-1470.
- Bezzina C, et al. (1999). *Circ. Res.* 85:1206-1213.
- Bianchi L, et al. (1999). *Hum. Mol. Genet.* 8:1499-1507.
- Borman S (1996). *Chemical & Engineering News*, December 9 issue, pp. 42-43.
- Cariello NF (1988). *Am. J. Human Genetics* 42:726-734.
- Chee M, et al. (1996). *Science* 274:610-614.
- Chen J, et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:10113-10118.
- Chen Q, et al. (1999). *Circulation* 99:1344-1347.
- Chouabe C, et al. (1997). *EMBO J.* 16:5472-5479.
- Compton SJ, et al. (1996). *Circulation* 94:1018-1022.
- Conner BJ, et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282.
- Cotton RG, et al. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401.
- Curran ME, et al. (1995). *Cell* 80:795-803.
- Dausse E, et al. (1996). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:1609-1615.
- DeRisi J, et al. (1996). *Nat. Genet.* 14:457-460.
- Donger C, et al. (1997). *Circulation* 96:2778-2781.
- Doyle DA, et al. (1998). *Science* 280:69-77.
- Duggal P, et al. (1998). *Circulation* 97:142-146.

【 0 0 7 5 】

【表 1 5】

- Dumaine R, et al. (1996). *Circ. Res.* 78:914-924.
- Editorial (1996). *Nature Genetics* 14:367-370.
- Elghanian R, et al. (1997). *Science* 277:1078-1081.
- Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1983).
- Fiers W, et al. (1978). *Nature* 273:113-120.
- Finkelstein J, et al. (1990). *Genomics* 7:167-172.
- Fodor SPA (1997). *Science* 277:393-395.
- Franqueza L, et al. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:21063-21070.
- Furutani M, et al. (1999). *Circulation* 99:2290-2294.
- Gellens M, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:554-558.
- Grompe M (1993). *Nature Genetics* 5:111-117.
- Grompe M, et al., (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5855-5892.
- Hacia JG, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:441-447.
- Hoorntje T, et al. (1999). *Circulation* 100:1264-1267.
- Itoh T, et al. (1998a). *Hum. Genet.* 102:435-439.
- Itoh T, et al. (1998b). *Hum. Genet.* 103:290-294.
- Jakoby WB and Pastan IH (eds.) (1979). Cell Culture. Methods in Enzymology volume 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (New York)).
- Jervell A and Lange-Nielsen F (1957). *Am. Heart J.* 54:59-68.
- Jiang C, et al. (1994). *Nat. Genet.* 8:141-147.
- Jongbloed RJ, et al. (1999). *Hum. Mutat.* 13:301-310.
- Kanters J (1998). *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 9:620-624.
- Keating M, et al. (1991). *Science* 252:704-706.
- Kinszler KW, et al. (1991). *Science* 251:1366-1370.
- Kubo T, et al. (1988). *FEBS Lett.* 241:119.
- Larsen LA, et al. (1999a). *Hum. Mutat.* 13:318-327.
- Larsen LA, et al. (1999b). *Eur. J. Hum. Genet.* 7:724-728.
- Li H, et al. (1998). *Circulation* 97:1264-1269.
- Lipshutz RJ, et al. (1995). *Biotechniques* 19:442-447.
- Lockhart DJ, et al. (1996). *Nature Biotechnology* 14:1675-1680.

【 0 0 7 6 】

【表 1 6】

- Ludwig J, et al. (1994). *EMBO J.* 13:4451-4458.
- MacKinnon R, et al. (1998). *Science* 280:106-109.
- Makita N, et al. (1998). *FEBS Lett.* 423:5-9.
- Matteucci MD and Caruthers MH (1981). *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185.
- Metzger D, et al. (1988). *Nature* 334:31-36.
- Modrich P (1991). *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253.
- Mohammad-Panah R, et al. (1999). *Am. J. Hum. Genet.* 64:1015-1023.
- Moss A, et al. (1991). *Circulation* 84:1136-1144.
- Murray A, et al. (1999). *Circulation* 100:1077-1084.
- Newton CR, et al. (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516.
- Neyroud N, et al. (1997). *Nat. Genet.* 15:186-189.
- Neyroud N, et al. (1998). *Eur. J. Hum. Genet.* 6:129-133.
- Neyroud N, et al. (1999). *Circ. Res.* 84:290-297.
- Novack DF, et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586-590.
- Orita M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766-2770.
- Priori SG, et al. (1998). *Circulation* 97:2420-2425.
- Priori SG, et al. (1999). *Circulation* 99:529-533.
- Romano C, et al. (1963). *Clin. Pediatr.* 45:656-683.
- Ruano G and Kidd KK (1989). *Nucl. Acids Res.* 17:8392.
- Russell MW, et al. (1996). *Hum. Mol. Genet.* 5:1319-1324.
- Saarinen K, et al. (1998). *Hum. Mutat.* 11:158-165.
- Sambrook J, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).
- Sanguinetti MC, et al. (1996a). *Nature* 384:80-83.
- Sanguinetti MC, et al. (1996b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2208-2212.
- Satler CA, et al. (1996). *Am. J. Med. Genet.* 65:27-35.
- Satler CA, et al. (1998). *Hum. Genet.* 102:265-272.
- Schott J, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* 57:1114-1122.
- Schulze-Bahr E, et al. (1995). *N. Engl. J. Med.* 333:1783-1784.
- Schulze-Bahr E, et al. (1997). *Nat. Genet.* 17:267-268.
- Schwartz PJ, et al. (1975). *Am. Heart J.* 89:378-390.

【 0 0 7 7 】

【表 1 7】

- Schwartz PJ, et al. (1995). *Circulation* 92:3381-3386.
- Sesti F and Goldstein SA (1998). *J. Gen. Physiol.* 112:651-663.
- Shalaby FY, et al. (1997). *Circulation* 96:1733-1736.
- Sheffield VC, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236.
- Sheffield VC, et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706.
- Shenk TE, et al. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989-993.
- Shoemaker DD, et al. (1996). *Nature Genetics* 14:450-456.
- Splawski I, et al. (1997a). *Nat. Genet.* 17:338-340.
- Splawski I, et al. (1997b). *N. Engl. J. Med.* 336:1562-1567.
- Splawski I, et al. (1998). *Genomics* 51:86-97.
- Tanaka T, et al. (1997). *Circulation* 95:565-567.
- Tyson J, et al. (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6:2179-2185.
- van den Berg MH, et al. (1997). *Hum. Genet.* 100:356-361.
- Vetter DE, et al. (1996). *Neuron* 17:1251-1264.
- Vincent GM, et al. (1992). *N. Engl. J. Med.* 327:846-852.
- Wang DW (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13200-13205.
- Wang Q, et al. (1995a). *Cell* 80:805-811.
- Wang Q, et al. (1995b). *Hum. Mol. Genet.* 4:1603-1607.
- Wang Q, et al. (1996a). *Nat. Genet.* 12:17-23.
- Wang Q, et al. (1996b). *Genomics* 34:9-16.
- Wang Z, et al. (1999). *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10:817-826.
- Ward OC (1964). *J. Ir. Med. Assoc.* 54:103-106.
- Wartell RM, et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705.
- Wattanasirichaigoon D, et al. (1999). *Am. J. Med. Genet.* 86:470-476.
- Wei J, et al. (1999). *Circulation* 99:3165-3171.
- White MB, et al. (1992). *Genomics* 12:301-306.
- Wollnik B, et al. (1997). *Hum. Mol. Genet.* 6:1943-1949.
- Yoshida H, et al. (1999). *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10:1262-1270.
- Zhou Z, et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273:21061-21066.
- Hitzeman et al., EP 73,675A.
- European Patent Application Publication No. 0332435.

【表18】

U.S. Patent No. 5,436,146

U.S. Patent No. 5,691,198

U.S. Patent No. 5,735,500

U.S. Patent No. 5,747,469

【図面の簡単な説明】

【図1】

KVLQT1の予想トポロジーおよびLQTS関連突然変異の位置の略図である。KVLQT1は、6つの推定膜貫通セグメント(S1~S6)および小孔(Pore)領域からなる。各円は、アミノ酸を示す。本発明者らが同定したLQTS関連突然変異のおおよその位置を黒丸で示す。

【図2】

HERG突然変異の略図である。HERGは、6つの推定膜貫通セグメント(S1~S6)および小孔(Pore)領域からなる。LQTS関連突然変異の位置を黒丸で示す。

【図3】

SCN5AおよびLQTS関連突然変異の位置の略図である。SCN5Aは、4つのドメイン(DI~DIV)からなり、それぞれ6つの推定膜貫通セグメント(S1~S6)および小孔(Pore)領域を有する。本発明者らが同定したLQTS関連突然変異の位置を黒丸で示す。

【図4】

minKおよびLQT関連突然変異の位置の略図である。minKは1つの推定膜貫通セグメント(S1)からなる。本発明者らが同定したLQTS関連突然変異のおおよその位置を黒丸で示す。

【図5】

MiRP1の予想トポロジーおよび不整脈関連突然変異の位置の略図である。MiRP1は1つの推定膜貫通セグメント(S1)からなる。本発明者らが同定した不整脈関連突然変異のおおよその位置を黒丸で示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Splawski, Igor
Keating, Mark T.
University of Utah Research Foundation

<120> ALTERATIONS IN THE LONG QT SYNDROME GENES KVLQT1 AND
SCN5A AND METHODS FOR DETECTING SAME

<130> 2323-155.PCT

<140> Not yet assigned
<141> 2000-08-09

<150> 60/190,057
<151> 2000-03-17

<150> 60/147,488
<151> 1999-08-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 2028
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2028)

<400> 1
atg gcc gcg gcc tcc tcc ccg ccc agg gcc gag agg aag cgc tgg ggt 48
Met Ala Ala Ala Ser Ser Pro Pro Arg Ala Glu Arg Lys Arg Trp Gly
1 5 10 15
tgg ggc cgc ctg cca ggc gcc ccg cgg ggc agc gcg gcc ctg gcc aag 96
Trp Gly Arg Leu Pro Gly Ala Arg Arg Gly Ser Ala Gly Leu Ala Lys
20 25 30
aag tgc ccc ttc tgg ctg gag ctg gcg gag gcc gcc ccg gcg gcc gcc 144
Lys Cys Pro Phe Ser Leu Glu Leu Ala Glu Gly Gly Pro Ala Gly Gly
35 40 45
gcg ctc tac gcg ccc atc gcg ccc gcc gcc cca ggt gcc gcg ccc cct 192
Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro
50 55 60
gcg tcc ccg gcc gcg ccc gcc gcg ccc cca gtt gcc tcc gac ctt gcc 240
Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Pro Val Ala Ser Asp Leu Gly
65 70 75 80
ccg cgg ccg ccg gtg agc cta gac ccg cgc gtc tcc atc tac agc acg 288
Pro Arg Pro Pro Val Ser Leu Asp Pro Arg Val Ser Ile Tyr Ser Thr
85 90 95
cgc cgc ccg gtg ttg gcg cgc acc cac gtc cag gcc cgc gtc tac aac 336
Arg Arg Pro Val Leu Ala Arg Thr His Val Gln Gly Arg Val Tyr Asn
100 105 110

ttc ctc gag cgt ccc acc ggc tgg aaa tgc ttc gtt tac cac ttc gcc	384
Phe Leu Glu Arg Pro Thr Gly Trp Lys Cys Phe Val Tyr His Phe Ala	
115	125
gtc ttc ctc atc gtc ctg gtc tgc ctc atc ttc agc gtg ctg tcc acc	432
Val Phe Leu Ile Val Leu Val Cys Leu Ile Phe Ser Val Leu Ser Thr	
130	140
atc gag cag tat gcc gcc ctg gcc acg ggg act ctc ttc tgg atg gag	480
Ile Glu Gln Tyr Ala Ala Leu Ala Thr Gly Thr Leu Phe Trp Met Glu	
145	155
atc gtg ctg gtg gtg ttc ttc ggg acg gag tac gtg gtc cgc ctc tgg	528
Ile Val Leu Val Val Phe Phe Gly Thr Glu Tyr Val Val Arg Leu Trp	
165	175
tcc gcc ggc tgc cgc agc aag tac gtg ggc ctc tgg ggg cgg ctg cgc	576
Ser Ala Gly Cys Arg Ser Lys Tyr Val Gly Leu Trp Gly Arg Leu Arg	
180	185
ttt gcc cgg aag ccc att tcc atc atc gac ctc atc gtg gtc gtg gcc	624
Phe Ala Arg Lys Pro Ile Ser Ile Ile Asp Leu Ile Val Val Val Ala	
195	205
tcc atg gtg gtc ctc tgc gtg gcc tcc aag ggg cag gtg ttt gcc acg	672
Ser Met Val Val Leu Cys Val Gly Ser Lys Gly Gln Val Phe Ala Thr	
210	215
tcc gcc atc agg gcc atc cgc ttc ctg cag atc ctg agg atg cta cac	720
Ser Ala Ile Arg Gly Ile Arg Phe Leu Gln Ile Leu Arg Met Leu His	
225	235
gtc gac cgc cag gga gcc acc tgg agg ctc ctg gcc tcc gtg gtc ttc	768
Val Asp Arg Gln Gly Gly Thr Trp Arg Leu Leu Gly Ser Val Val Phe	
245	255
atc cac cgc cag gag ctg ata acc acc ctg tac atc gcc ttc ctg gcc	816
Ile His Arg Gln Glu Leu Ile Thr Thr Leu Tyr Ile Gly Phe Leu Gly	
260	265
ctc atc ttc tcc tcc tac ttt gtg tac ctg gct gag aag gac gcg gtg	864
Leu Ile Phe Ser Ser Tyr Phe Val Tyr Leu Ala Glu Lys Asp Ala Val	
275	285
aac gag tca ggc cgc gtg gag ttc gcc agc tac gca gat gcc ctg tgg	912
Asn Glu Ser Gly Arg Val Glu Phe Gly Ser Tyr Ala Asp Ala Leu Trp	
290	300
tgg ggg gtg gtc aca gtc acc acc atc gcc tat ggg gac aag gtg ccc	960
Trp Gly Val Val Thr Val Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Lys Val Pro	
305	315
cag acg tgg gtc ggg aag acc atc gcc tcc tgc ttc tct gtc ttt gcc	1008
Gln Thr Trp Val Gly Lys Thr Ile Ala Ser Cys Phe Ser Val Phe Ala	
325	335
atc tcc ttc ttt gcg ctc cca gcg ggg att ctt gcc tog ggg ttt gcc	1056
Ile Ser Phe Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala	
340	345
ctg aag gtg cag cag aag cag agg cag aag cac ttc aac cgg cag atc	1104
Leu Lys Val Gln Gln Lys Gln Arg Gln Lys His Phe Asn Arg Gln Ile	
355	365

cgc	gca	gcc	tca	ctc	att	cag	acc	gca	tgg	agg	tgc	tat	gct	gcc	1152	
Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	Ala	Trp	Arg	Cys	Tyr	Ala	Ala	
	370					375				380						
gag	aac	ccc	gac	tcc	tcc	acc	tgg	aag	atc	tac	atc	cgg	aag	gcc	ccc	1200
Glu	Asn	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Trp	Lys	Ile	Tyr	Ile	Arg	Lys	Ala	Pro	
385					390					395					400	
cgg	agc	cac	act	ctg	ctg	tca	ccc	agc	ccc	aaa	ccc	aag	aag	tct	gtg	1248
Arg	Ser	His	Thr	Leu	Leu	Ser	Pro	Ser	Pro	Lys	Pro	Lys	Lys	Ser	Val	
			405						410					415		
gtg	gta	aag	aaa	aaa	aag	ttc	aag	ctg	gac	aaa	gac	aat	ggg	gtg	act	1296
Val	Val	Lys	Lys	Lys	Lys	Phe	Lys	Leu	Asp	Lys	Asp	Asn	Gly	Val	Thr	
			420					425					430			
cct	gga	gag	aag	atg	ctc	aca	gtc	ccc	cat	atc	acg	tgc	gac	ccc	cca	1344
Pro	Gly	Glu	Lys	Met	Leu	Thr	Val	Pro	His	Ile	Thr	Cys	Asp	Pro	Pro	
		435					440						445			
gaa	gag	cgg	cgg	ctg	gac	cac	ttc	tct	gtc	gac	ggc	tat	gac	agt	tct	1392
Glu	Glu	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Phe	Ser	Val	Asp	Gly	Tyr	Asp	Ser	Ser	
	450					455					460					
gta	agg	aag	agc	cca	aca	ctg	ctg	gaa	gtg	agc	atg	ccc	cat	ttc	atg	1440
Val	Arg	Lys	Ser	Pro	Thr	Leu	Leu	Glu	Val	Ser	Met	Pro	His	Phe	Met	
465					470					475					480	
aga	acc	aac	agc	ttc	gcc	gag	gac	ctg	gac	ctg	gaa	ggg	gag	act	ctg	1488
Arg	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Leu	Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	
				485					490					495		
ctg	aca	ccc	atc	acc	cac	atc	tca	cag	ctg	cgg	gaa	cac	cat	cgg	gcc	1536
Leu	Thr	Pro	Ile	Thr	His	Ile	Ser	Gln	Leu	Arg	Glu	His	His	Arg	Ala	
			500					505						510		
acc	att	aag	gtc	att	cga	cgc	atg	cag	tac	ttt	gtg	gcc	aag	aag	aaa	1584
Thr	Ile	Lys	Val	Ile	Arg	Arg	Met	Gln	Tyr	Phe	Val	Ala	Lys	Lys	Lys	
		515					520					525				
ttc	cag	caa	cgc	cgg	aag	cct	tac	gat	gtg	cgg	gac	gtc	att	gag	cag	1632
Phe	Gln	Gln	Ala	Arg	Lys	Pro	Tyr	Asp	Val	Arg	Asp	Val	Ile	Glu	Gln	
	530					535					540					
tac	tgc	cag	ggc	cac	ctc	aac	ctc	atg	gtg	cgc	atc	aag	gag	ctg	cag	1680
Tyr	Ser	Gln	Gly	His	Leu	Asn	Leu	Met	Val	Arg	Ile	Lys	Glu	Leu	Gln	
545					550					555					560	
agg	agg	ctg	gac	cag	tcc	att	ggg	aag	ccc	tca	ctg	ttc	atc	tcc	gtc	1728
Arg	Arg	Leu	Asp	Gln	Ser	Ile	Gly	Lys	Pro	Ser	Leu	Phe	Ile	Ser	Val	
				565					570					575		
tca	gaa	aag	agc	aag	gat	cgc	ggc	agc	aac	acg	atc	ggc	gcc	cgc	ctg	1776
Ser	Glu	Lys	Ser	Lys	Asp	Arg	Gly	Ser	Asn	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Leu	
			580					585					590			
aac	cga	gta	gaa	gac	aag	gtg	acg	cag	ctg	gac	cag	agg	ctg	gca	ctc	1824
Asn	Arg	Val	Glu	Asp	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Asp	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	
		595					600					605				
atc	acc	gac	atg	ctt	cac	cag	ctg	ctc	tcc	tty	cac	ggt	ggc	agc	acc	1872
Ile	Thr	Asp	Met	Leu	His	Gln	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Ser	Thr	
	610					615						620				

ccc gcc agc ggc ggc ccc ccc aga gag gcc ggg gcc cac atc acc cag 1920
 Pro Gly Ser Gly Gly Pro Pro Arg Glu Gly Ala His Ile Thr Gln
 625 630 635 640

ccc tgc ggc agt ggc gcc tcc gtc gac cct gag ctc ttc ctg ccc agc 1968
 Pro Cys Gly Ser Gly Ser Val Asp Pro Glu Leu Phe Leu Pro Ser
 645 650 655

aac acc ctg ccc acc tac gag cag ctg acc gtg ccc agg agg gcc ccc 2016
 Asn Thr Leu Pro Thr Tyr Glu Gln Leu Thr Val Pro Arg Arg Gly Pro
 660 665 670

gat gag ggg tcc 2028
 Asp Glu Gly Ser
 675

<210> 2
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Ala Ala Ser Ser Pro Pro Arg Ala Glu Arg Lys Arg Trp Gly
 1 5 10 15
 Trp Gly Arg Leu Pro Gly Ala Arg Arg Gly Ser Ala Gly Leu Ala Lys
 20 25 30
 Lys Cys Pro Phe Ser Leu Glu Leu Ala Glu Gly Gly Pro Ala Gly Gly
 35 40 45
 Ala Leu Tyr Ala Pro Ile Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro
 50 55 60
 Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Pro Val Ala Ser Asp Leu Gly
 65 70 75 80
 Pro Arg Pro Pro Val Ser Leu Asp Pro Arg Val Ser Ile Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Arg Arg Pro Val Leu Ala Arg Thr His Val Gln Gly Arg Val Tyr Asn
 100 105 110
 Phe Leu Glu Arg Pro Thr Gly Trp Lys Cys Phe Val Tyr His Phe Ala
 115 120 125
 Val Phe Leu Ile Val Leu Val Cys Leu Ile Phe Ser Val Leu Ser Thr
 130 135 140
 Ile Glu Gln Tyr Ala Ala Leu Ala Thr Gly Thr Leu Phe Trp Met Glu
 145 150 155 160
 Ile Val Leu Val Val Phe Phe Gly Thr Glu Tyr Val Val Arg Leu Trp
 165 170 175
 Ser Ala Gly Cys Arg Ser Lys Tyr Val Gly Leu Trp Gly Arg Leu Arg
 180 185 190
 Phe Ala Arg Lys Pro Ile Ser Ile Ile Asp Leu Ile Val Val Val Ala
 195 200 205

Ser Met Val Val Leu Cys Val Gly Ser Lys Gly Gln Val Phe Ala Thr
 210 215 220
 Ser Ala Ile Arg Gly Ile Arg Phe Leu Gln Ile Leu Arg Met Leu His
 225 230 235 240
 Val Asp Arg Gln Gly Gly Thr Trp Arg Leu Leu Gly Ser Val Val Phe
 245 250 255
 Ile His Arg Gln Glu Leu Ile Thr Thr Leu Tyr Ile Gly Phe Leu Gly
 260 265
 Leu Ile Phe Ser Ser Tyr Phe Val Tyr Leu Ala Glu Lys Asp Ala Val
 275 280 285
 Asn Glu Ser Gly Arg Val Glu Phe Gly Ser Tyr Ala Asp Ala Leu Trp
 290 295 300
 Trp Gly Val Val Thr Val Thr Thr Ile Gly Tyr Gly Asp Lys Val Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Trp Val Gly Lys Thr Ile Ala Ser Cys Phe Ser Val Phe Ala
 325 330 335
 Ile Ser Phe Phe Ala Leu Pro Ala Gly Ile Leu Gly Ser Gly Phe Ala
 340 345 350
 Leu Lys Val Gln Gln Lys Gln Arg Gln Lys His Phe Asn Arg Gln Ile
 355 360 365
 Pro Ala Ala Ala Ser Leu Ile Gln Thr Ala Trp Arg Cys Tyr Ala Ala
 370 375 380
 Glu Asn Pro Asp Ser Ser Thr Trp Lys Ile Tyr Ile Arg Lys Ala Pro
 385 390 395 400
 Arg Ser His Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Lys Pro Lys Lys Ser Val
 405 410 415
 Val Val Lys Lys Lys Lys Phe Lys Leu Asp Lys Asp Asn Gly Val Thr
 420 425 430
 Pro Gly Glu Lys Met Leu Thr Val Pro His Ile Thr Cys Asp Pro Pro
 435 440 445
 Glu Glu Arg Arg Leu Asp His Phe Ser Val Asp Gly Tyr Asp Ser Ser
 450 455 460
 Val Arg Lys Ser Pro Thr Leu Leu Glu Val Ser Met Pro His Phe Met
 465 470 475 480
 Arg Thr Asn Ser Phe Ala Glu Asp Leu Asp Leu Glu Gly Glu Thr Leu
 485 490 495
 Leu Thr Pro Ile Thr His Ile Ser Gln Leu Arg Glu His His Arg Ala
 500 505 510
 Thr Ile Lys Val Ile Arg Arg Met Gln Tyr Phe Val Ala Lys Lys Lys
 515 520 525
 Phe Gln Gln Ala Arg Lys Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Gln
 530 535 540

Tyr Ser Gln Gly His Leu Asn Leu Met Val Arg Ile Lys Glu Leu Gln
 545 550 555 560
 Arg Arg Leu Asp Gln Ser Ile Gly Lys Pro Ser Leu Phe Ile Ser Val
 565 570 575
 Ser Glu Lys Ser Lys Asp Arg Gly Ser Asn Thr Ile Gly Ala Arg Leu
 580 585 590
 Asn Arg Val Glu Asp Lys Val Thr Gln Leu Asp Gln Arg Leu Ala Leu
 595 600 605
 Ile Thr Asp Met Leu His Gln Leu Leu Ser Leu His Gly Gly Ser Thr
 610 615 620
 Pro Gly Ser Gly Gly Pro Pro Arg Glu Gly Gly Ala His Ile Thr Gln
 625 630 635 640
 Pro Cys Gly Ser Gly Gly Ser Val Asp Pro Glu Leu Phe Leu Pro Ser
 645 650 655
 Asn Thr Leu Pro Thr Tyr Glu Gln Leu Thr Val Pro Arg Arg Gly Pro
 660 665 670
 Asp Glu Gly Ser
 675

<210> 3
 <211> 6048
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(6048)

<400> 3
 atg gca aac ttc cta tta cct cgg ggc acc agc agc ttc cgc agg ttc 48
 Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe
 1 5 10 15
 aca cgg gag tcc ctg gca gcc atc gag aag cgc atg gcg gag aag caa 96
 Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln
 20 25 30
 gcc cgc ggc tca acc acc ttg cag gag agc cga gag ggg ctg ccc gag 144
 Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu
 35 40 45
 gag gag gct ccc cgg ccc cag ctg gac ctg cag gcc tcc aaa aag ctg 192
 Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu
 50 55 60
 cca gat ctc tat ggc aat cca ccc caa gag ctc atc gga gag ccc ctg 240
 Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu
 65 70 75 80
 gag gac ctg gac ccc ttc tat agc acc caa aag act ttc atc gta ctg 288
 Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu
 85 90 95

aat	aaa	ggc	aag	acc	atc	ttc	ogg	ttc	agt	gcc	acc	aac	gcc	ttg	tat	336
Asn	Lys	Gly	Lys	Thr	Ile	Phe	Arg	Phe	Ser	Ala	Thr	Asn	Ala	Leu	Tyr	
			100					105					110			
gtc	ctc	agt	ccc	ttc	cac	cca	gtt	cgg	aga	gcg	got	gtg	aag	att	ctg	384
Val	Leu	Ser	Pro	Phe	His	Pro	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Lys	Ile	Leu	
			115				120					125				
gtt	cac	tcg	ctc	ttc	aac	atg	ctc	atc	atg	tgc	acc	atc	ctc	acc	aac	432
Val	His	Ser	Leu	Phe	Asn	Met	Leu	Ile	Met	Cys	Thr	Ile	Leu	Thr	Asn	
			130			135					140					
tgc	gtg	ttc	atg	gcc	cag	cac	gac	cct	cca	ccc	tgg	acc	aag	tat	gtc	480
Cys	Val	Phe	Met	Ala	Gln	His	Asp	Pro	Pro	Pro	Trp	Thr	Lys	Tyr	Val	
					150					155					160	
gag	tac	acc	ttc	acc	gcc	att	tac	acc	ttt	gag	tct	ctg	gtc	aag	att	528
Glu	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ala	Ile	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ser	Leu	Val	Lys	Ile	
				165					170					175		
ctg	gct	cga	gct	ttc	tgc	ctg	cac	gcg	ttc	act	ttc	ctt	cgg	gac	cca	576
Leu	Ala	Arg	Ala	Phe	Cys	Leu	His	Ala	Phe	Thr	Phe	Leu	Arg	Asp	Pro	
				180				185					190			
tgg	aac	tgg	ctg	gac	ttt	agt	gtg	att	atc	atg	gca	tac	aca	act	gaa	624
Trp	Asn	Trp	Leu	Asp	Phe	Ser	Val	Ile	Ile	Met	Ala	Tyr	Thr	Thr	Glu	
							200					205				
ttt	gtg	gac	ctg	ggc	aat	gtc	tca	gcc	tta	cgc	acc	ttc	cga	gtc	ctc	672
Phe	Val	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Arg	Thr	Phe	Arg	Val	Leu	
						215					220					
egg	gcc	ctg	aaa	act	ata	tca	gtc	att	tca	ggg	ctg	aag	acc	atc	gtg	720
Arg	Ala	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Thr	Ile	Val	
					230					235					240	
ggg	gcc	ctg	atc	cag	tct	gtg	aag	aag	ctg	gct	gat	gtg	atg	gtc	ctc	768
Gly	Ala	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Lys	Lys	Leu	Ala	Asp	Val	Met	Val	Leu	
				245				250						255		
aca	gtc	ttc	tgc	ctc	agc	gtc	ttt	gcc	ctc	atc	ggc	ctg	cag	ctc	ttc	816
Thr	Val	Phe	Cys	Leu	Ser	Val	Phe	Ala	Leu	Ile	Gly	Leu	Gln	Leu	Phe	
				260				265					270			
atg	ggc	aac	cta	agg	cac	aag	tgt	gtg	cgc	aac	ttc	aca	gcg	ctc	aac	864
Met	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Lys	Cys	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	Ala	Leu	Asn	
				275			280					285				
ggc	acc	aac	ggc	tcc	gtg	gag	gcc	gac	ggc	ttg	gtc	tgg	gaa	tcc	ctg	912
Gly	Thr	Asn	Gly	Ser	Val	Glu	Ala	Asp	Gly	Leu	Val	Trp	Glu	Ser	Leu	
						295					300					
gac	ctt	tac	ctc	agt	gat	cca	gaa	aat	tac	ctg	ctc	aag	aac	ggc	acc	960
Asp	Leu	Tyr	Leu	Ser	Asp	Pro	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Thr	
					310					315					320	
tct	gat	gtg	tta	ctg	tgt	ggg	aac	agc	tct	gac	got	ggg	aca	tgt	cag	1008
Ser	Asp	Val	Leu	Leu	Cys	Gly	Asn	Ser	Ser	Asp	Ala	Gly	Thr	Cys	Pro	
					325					330				335		
gag	ggc	tac	cgg	tgc	cta	aag	gca	ggc	gag	aac	ccc	gac	cac	ggc	tac	1056
Glu	Gly	Tyr	Arg	Cys	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Asn	Pro	Asp	His	Gly	Tyr	
				340				345					350			

acc agc ttc gat tcc ttt gcc tgg gcc ttt ctt goa ctc ttc cgc ctg	1104
Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu	
355 360 365	
atg acg cag gac tgc tgg gag cgc ctc tat cag cag acc ctc agg tcc	1152
Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser	
370 375 380	
gca ggg aag atc tac atg atc ttc ttc atg ctt gtc atc ttc ctg ggg	1200
Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly	
385 390 395 400	
tcc ttc tac ctg gtg aac ctg atc ctg gcc gtg gtc gca atg gcc tat	1248
Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr	
405 410 415	
gag gag caa aac caa gcc acc atc gct gag acc gag gag aag gaa aag	1296
Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys	
420 425 430	
cgc ttc cag gag gcc atg gaa atg ctc aag aaa gaa cac gag gcc ctc	1344
Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu	
435 440 445	
acc atc agg ggt gtg gat acc gtg tcc cgt agc tcc ttg gag atg tcc	1392
Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser	
450 455 460	
cct ttg gcc cca gta aac agc cat gag aga aga agc aag agg aga aaa	1440
Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys	
465 470 475 480	
cgg atg tct tca gga act gag gag tgt ggg gag gac agg ctc ccc aag	1488
Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys	
485 490 495	
tct gac tca gaa gat ggt ccc aga gca atg aat cat ctc agc ctc acc	1536
Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr	
500 505 510	
cgt ggc ctc agc agg act tct atg aag cca cgt tcc agc cgc ggg agc	1584
Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser	
515 520 525	
att ttc acc ttt cgc agg cga gac ctg ggt tct gaa gca gat ttt gca	1632
Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala	
530 535 540	
gat gat gaa aac agc aca gcg cgg gag agc gag agc cac cac aca tca	1680
Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser	
545 550 555 560	
ctg ctg gtg ccc tgg ccc ctg cgc cgg acc agt gcc cag gga cag ccc	1728
Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro	
565 570 575	
agt ccc gga acc tgc got cot ggc cac gcc ctc cat ggc aaa aag aac	1776
Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn	
580 585 590	
agc act gtg gac tgc aat ggg gtg gtc tca tta ctg ggg gca gcc gac	1824
Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp	
595 600 605	

cca gag gcc aca tcc cca gga agc cac ctc ctc cgc cct gtg atg cta Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu 610 615 620	1872
gag cac ccg cca gac acg acc acg cca tcc gag gag cca ggc ggc ccc Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro 625 630 635 640	1920
cag atg ctg acc tcc cag gct ccg tgt gta gat ggc ttc gag gag cca Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro 645 650 655	1968
gga gca ccg cag cgg gcc ctc agc gca gtc agc gtc ctc aca agc gca Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala 660 665 670	2016
ctg gaa gag tta gag gag tct cgc cac aag tgt cca cca tgc tgg aac Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn 675 680 685	2064
cgt ctc gcc cag cgc tac ctg atc tgg gag tgc tgc ccg ctg tgg atg Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met 690 695 700	2112
tcc atc aag cag gga gtg aag ttg gtg gtc atg gag cgc ccc ttt act gac Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp 705 710 715 720	2160
ctc acc atc act atg tgc atc gta ctc aac aca ctc ttc atg gcg ctg Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu 725 730 735	2208
gag cac tac aac atg aca agt gaa ttc gag gag atg ctg cag gtc gga Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly 740 745 750	2256
aac ctg gtc ttc aca ggg att ttc aca gca gag atg acc ttc aag atc Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile 755 760 765	2304
att gcc ctc gac ccc tac tac tac ttc caa cag ggc tgg aac atc ttc Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Phe Gln Gln Trp Asn Ile Phe 770 775 780	2352
gac agc atc atc gtc atc ott agc ctc atg gag ctg ggc ctg tcc cgc Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg 785 790 795 800	2400
atg agc aac ttg tcc gtg ctg cgc tcc ttc cgc ctg ctg ccg gtc ttc Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe 805 810 815	2448
aag ctg gcc aaa tca tgg ccc acc ctg aac aca ctc atc aag atc atc Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile 820 825 830	2496
ggg aac tca gtg ggg gca ctg ggg aac ctg aca ctg gtg cta gcc atc Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile 835 840 845	2544
atc gtg ttc atc ttt gct gtg gtg ggc atg cag ctc ttt gcc aag aac Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn 850 855 860	2592

tac Tyr 865	tog Ser	gag Glu	ctg Leu	agg Arg	gac Asp 870	agc Ser	gac Asp	tca Ser	ggc Gly 875	ctg Leu	ctg Leu	cct Pro	ogc Arg	tgg Trp 880	cac His	2640
atg Met	atg Met	gac Asp	ttc Phe 885	ttt Phe 885	cat His	gcc Ala	ttc Phe	cta Leu	atc Ile 890	atc Ile	ttc Phe	cgc Arg	atc Ile	ctc Leu 895	tgt Cys	2688
gga Gly	gag Glu	tgg Trp	atc Ile 900	gag Glu	acc Thr	atg Met	tgg Trp	gac Asp 905	tgc Cys	atg Met	gag Glu	gtg Val	tgg Ser 910	ggg Gly	cag Gln	2736
tca Ser	tta Leu	tgc Cys 915	ctg Leu	ctg Leu	gtc Val	ttc Phe 920	ttg Leu	ctt Leu	gtt Val	atg Met	gtc Val	att Ile 925	ggc Gly	aac Asn	ctt Leu	2784
gtg Val	gtc Val	ctg Leu 930	aat Asn	ctc Leu	ttc Phe 935	ctg Leu	gcc Ala	ttg Leu	ctg Leu	ctc Leu	agc Ser 940	tcc Ser	ttc Phe	agt Ser	gca Ala	2832
gac Asp 945	aac Asn	ctc Leu	aca Thr	gcc Ala	cct Pro 950	gat Asp	gag Glu	gac Asp	aga Arg	gag Glu 955	atg Met	aac Asn	aac Asn	ctc Leu	cag Gln 960	2880
ctg Leu	gcc Ala	ctg Leu	gcc Ala	cgc Arg 965	atc Ile	cag Gln	agg Arg	ggc Gly	ctg Leu 970	cgc Arg	ttt Phe	gtc Val	aag Lys	egg Arg 975	acc Thr	2928
acc Thr	tgg Trp	gat Asp	ttc Phe 980	tgc Cys	tgt Cys	ggt Gly	ctc Leu	ctg Leu 985	cgg Arg	cac His	cgg Arg	cct Pro	cag Gln	aag Lys	ccc Fro	2976
gca Ala	gcc Ala	ctt Leu 995	gcc Ala	gcc Ala	cag Gln	ggc Gly	cag Gln 1000	ctg Leu	ccc Pro	agc Ser	tgc Cys	att Ile 1005	gcc Ala	acc Thr	ccc Pro	3024
tac Tyr	tcc Ser	cag Pro	cca Pro	ccc Pro	cca Pro	gag Glu 1015	acg Thr	gag Glu	aag Lys	gtg Val	cct Pro 1020	ccc Pro	acc Thr	cgc Arg	aag Lys	3072
gaa Glu 1025	aca Thr	cag Gln	ttt Phe	gag Glu	gaa Glu	ggc Gly	gag Glu	caa Gln	cca Pro	ggc Gly	cag Gln	ggc Gly	acc Thr	ccc Pro	ggg Gly 1040	3120
gat Asp	cca Pro	gag Glu	ccc Pro	gtg Val	tgt Cys	gtg Val	ccc Pro	atc Ile	gct Ala	gtg Val	gcc Ala	gag Glu	tca Ser	gac Asp	aca Thr	3168
gat Asp	gac Asp	caa Gln	gaa Glu	gag Glu	gat Asp	gag Glu	gag Glu	aac Asn 1065	agc Ser	ctg Leu	ggc Gly	acg Thr	gag Glu	gag Glu	gag Glu	3216
tcc Ser	agc Ser	aag Lys	cag Gln	cag Gln	gaa Glu	tcc Ser	cag Gln	cct Pro	gtg Val	tcc Ser	ggc Gly	tgg Trp	ccc Pro	aga Arg	ggc Gly	3264
cct Pro	cag Pro	gat Asp	tcc Ser	agg Arg	acc Thr	tgg Trp	agc Ser	cag Gln	gtg Val	tca Ser	gcg Ala	act Thr	gcc Ala	tcc Ser	tct Ser	3312
gag Glu 1105	gcc Ala	gag Glu	gcc Ala	agt Ser	gca Ala	tct Ser	cag Gln	gcc Ala	gac Asp	tgg Trp	cgg Arg	cag Gln	cag Gln	tgg Trp	aaa Lys 1120	3360

gcg gaa ccc cag gcc cca ggg tgc ggt gag acc cca gag gac agt tgc Ala Glu Pro Gln Ala Pro Gly Cys Gly Glu Thr Pro Glu Asp Ser Cys 1125 1130 1135	3408
tcc gag ggc agc aca gca gac atg acc aac acc gct gag ctc ctg gag Ser Glu Gly Ser Thr Ala Asp Met Thr Asn Thr Ala Glu Leu Leu Glu 1140 1145 1150	3456
cag atc cct gac ctc gcc cag gat gtc aag gac cca gag gac tgc ttc Gln Ile Pro Asp Leu Gly Gln Asp Val Lys Asp Pro Glu Asp Cys Phe 1155 1160 1165	3504
act gaa ggc tgt gtc cgg cgc tgt ccc tgc tgt gcg gtg gac acc aca Thr Glu Gly Cys Val Arg Arg Cys Pro Cys Cys Ala Val Asp Thr Thr 1170 1175 1180	3552
cag gcc cca ggg aag gtc tgg tgg cgg ttg cgc aag acc tgc tac cac Gln Ala Pro Gly Lys Val Trp Trp Arg Leu Arg Lys Thr Cys Tyr His 1185 1190 1195 1200	3600
atc gtg gag cac agc tgg ttc gag aca ttc atc atc ttc atg atc cta Ile Val Glu His Ser Trp Phe Glu Thr Phe Ile Ile Phe Met Ile Leu 1205 1210 1215	3648
ctc agc agt gga gcg ctg gcc ttc gag gac atc tac cta gag gag cgg Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg 1220 1225 1230	3696
aag acc atc aag gtt ctg ctt gag tat gcc gac aag atg ttc aca tat Lys Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr 1235 1240 1245	3744
gtc ttc gtg ctg gag atg ctg ctc aag tgg gtg gcc tac gcc ttc aag Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe Lys 1250 1255 1260	3792
aag tac ttc acc aat gcc tgg tgc tgg ctc gac ttc ctc atc gta gac Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile Val Asp 1265 1270 1275 1280	3840
gtc tct ctg gtc agc ctg gtg gcc aac acc ctg gcc ttt gcc gag atg Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe Ala Glu Met 1285 1290 1295	3888
ggc ccc atc aag tca ctg cgg acg ctg cgt gca ctc cgt cct ctg aga Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg 1300 1305 1310	3936
gct ctg tca cga ttt gag ggc atg agg gtg gtg gtc aat gcc ctg gtg Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val Val Asn Ala Leu Val 1315 1320 1325	3984
ggc gcc atc ccg tcc atc atg aac gtc ctc ctc gtc tgc ctc atc ttc Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe 1330 1335 1340	4032
tgg ctc atc ttc ago atc atg ggc gtg aac ctc ttt gcg ggg aag ttt Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe 1345 1350 1355 1360	4080
ggg agg tgc atc aac cag aca gag gga gac ttg cct ttg aac tac acc Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr 1365 1370 1375	4128

atc gtg aac aac aag agc cag tgt gag tcc ttg aac ttg acc gga gaa	4176
Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu	
1380 1385 1390	
ttg tac tgg acc aag gtg aaa gtc aac ttt gac aac gtg ggg gcc ggg	4224
Leu Tyr Trp Thr Lys Val Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly	
1395 1400 1405	
tac ctg gcc ctt ctg cag gtg gca aca ttt aaa ggc tgg atg gac att	4272
Tyr Leu Ala Leu Leu Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile	
1410 1415 1420	
atg tat gca gct gtg gac tcc agg ggg tat gaa gag cag cct cag tgg	4320
Met Tyr Ala Ala Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp	
1425 1430 1435 1440	
gaa tac aac ctc tac atg tac atc tat ttt gtc att ttc atc atc ttt	4368
Glu Tyr Asn Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe	
1445 1450 1455	
ggg tct ttc ttc acc ctg aac ctc ttt att ggt gtc atc att gac aac	4416
Gly Ser Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn	
1460 1465 1470	
ttc aac caa cag aag aaa aag tta ggg ggc cag gac atc ttc atg aca	4464
Phe Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr	
1475 1480 1485	
gag gag cag aag aag tac tac aat gcc atg aag aag ctg ggc tcc aag	4512
Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser Lys	
1490 1495 1500	
aag ccc cag aag ccc atc cca cgg ccc ctg aac aag tac cag gcc ttc	4560
Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln Gly Phe	
1505 1510 1515 1520	
ata ttc gac att gtg acc aag cag gcc ttt gac gtc acc atc atg ttt	4608
Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr Ile Met Phe	
1525 1530 1535	
ctg atc tgc ttg aat atg gtg acc atg atg gtg gag aca gat gac caa	4656
Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu Thr Asp Asp Gln	
1540 1545 1550	
agt cct gag aaa atc aac atc ttg gcc aag atc aac ctg ctc ttt gtg	4704
Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile Asn Leu Leu Phe Val	
1555 1560 1565	
gcc atc ttc aca ggc gag tgt att gtc aag ctg gct gcc ctg cgc cac	4752
Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys Leu Ala Ala Leu Arg His	
1570 1575 1580	
tac tac ttc acc aac agc tgg aat atc ttc gac ttc gtg gtt gtc atc	4800
Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile Phe Asp Phe Val Val Val Ile	
1585 1590 1595 1600	
ctc tcc atc gtg ggc act gtg ctc tog gac atc atc cag aag tac ttc	4848
Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe	
1605 1610 1615	
ttc tcc ccg acg ctc ttc cga gtc atc cgc ctg gcc cga ata ggc cgc	4896
Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg	
1620 1625 1630	

atc ctc aga ctg atc cga ggg gcc aag ggg atc cgc acg ctg ctc ttt Ile Leu Arg Leu Ile Arg Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe 1635 1640 1645	4944
gcc ctc atg atg tcc ctg cct gcc ctc ttc aac atc ggg ctg ctg ctc Ala Leu Met Met Ser Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu 1650 1655 1660	4992
ttc ctc gtc atg ttc atc tac tcc atc ttt ggc atg gcc aac ttc gct Phe Leu Val Met Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala 1665 1670 1675 1680	5040
tat gtc aag tgg gag gct gcc atc gac gac atg ttc aac ttc cag acc Tyr Val Lys Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr 1685 1690 1695	5088
ttc gcc aac agc atg ctg tgc ctc ttc cag atc acc acg tcg gcc ggc Phe Ala Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly 1700 1705 1710	5136
tgg gat ggc ctc ctc agc ccc atc ctc aac act ggg ccg ccc tac tgc Trp Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys 1715 1720 1725	5184
gac ccc act ctg ccc aac agc aat gcc tct cgg ggg gac tgc ggg agc Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly Ser 1730 1735 1740	5232
cca gcc gtg ggc atc ctc ttc ttc acc acc tac atc atc atc tcc ttc Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile Ser Phe 1745 1750 1755 1760	5280
ctc atc gtg gtc aac atg tac att gcc atc atc ctg gag aac ttc agc Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu Asn Phe Ser 1765 1770 1775	5328
gtg gcc acg gag gag agc acc gag ccc ctg agt gag gac gac ttc gat Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu Asp Asp Phe Asp 1780 1785 1790	5376
atg ttc tat gag atc tgg gag aaa ttt gac cca gag gcc act cag ttt Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu Ala Thr Gln Phe 1795 1800 1805	5424
att gag tat tcg gtc ctg tct gac ttt gcc gac gcc ctg tct gag cca Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala Asp Ala Leu Ser Glu Pro 1810 1815 1820	5472
ctc cgt atc gcc aag ccc aac cag ata agc ctc atc aac atg gac ctg Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu 1825 1830 1835 1840	5520
ccc atg gtg agt ggg gac cgc atc cat tgc atg gac att ctc ttt gcc Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala 1845 1850 1855	5568
ttc acc aaa agg gtc ctg ggg gag tct ggg gag atg gac gcc ctg aag Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys 1860 1865 1870	5616
atc cag atg gag gag aag ttc atg gca gcc aac cca tcc aag atc tcc Ile Gln Met Glu Glu Lys Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser 1875 1880 1885	5664

tac gag ccc atc acc acc aca ctc cgg cgc aag cac gaa gag gtg tcg 5712
 Tyr Glu Pro Ile Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser
 1890 1895 1900

gcc atg gtt atc cag aga gcc ttc cgc agg cac ctg ctg caa cgc tct 5760
 Ala Met Val Ile Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser
 1905 1910 1915 1920

ttg aag cat gcc tcc ttc ctc ttc cgt cag cag gcg ggc agc ggc ctc 5808
 Leu Lys His Ala Ser Phe Leu Phe Arg Gln Gln Ala Gly Ser Gly Leu
 1925 1930 1935

tcc gaa gag gat gcc cct gag cga gag ggc ctc atc gcc tac gtg atg 5856
 Ser Glu Glu Asp Ala Pro Glu Arg Glu Gly Leu Ile Ala Tyr Val Met
 1940 1945 1950

agt gag aac ttc tcc cga ccc ctt gcc cca ccc tcc agc tcc tcc atc 5904
 Ser Glu Asn Phe Ser Arg Pro Leu Gly Pro Pro Ser Ser Ser Ile
 1955 1960 1965

tcc tcc act tcc ttc cca ccc tcc tat gac agt gtc act aga gcc acc 5952
 Ser Ser Thr Ser Phe Pro Pro Tyr Asp Ser Val Thr Arg Ala Thr
 1970 1975 1980

agc gat aac ctc cag gtg cgg ggg tct gac tac agc cac agt gaa gat 6000
 Ser Asp Asn Leu Gln Val Arg Gly Ser Asp Tyr Ser His Ser Glu Asp
 1985 1990 1995 2000

ctc gcc gac ttc ccc cct tct ccg gac agg gac cgt gag tcc atc gtg 6048
 Leu Ala Asp Phe Pro Pro Ser Pro Asp Arg Asp Arg Glu Ser Ile Val
 2005 2010 2015

<210> 4
 <211> 2016
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Asn Phe Leu Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Phe Arg Arg Phe
 1 5 10 15
 Thr Arg Glu Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Met Ala Glu Lys Gln
 20 25 30
 Ala Arg Gly Ser Thr Thr Leu Gln Glu Ser Arg Glu Gly Leu Pro Glu
 35 40 45
 Glu Glu Ala Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Gln Ala Ser Lys Lys Leu
 50 55 60
 Pro Asp Leu Tyr Gly Asn Pro Pro Gln Glu Leu Ile Gly Glu Pro Leu
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr Gln Lys Thr Phe Ile Val Leu
 85 90 95
 Asn Lys Gly Lys Thr Ile Phe Arg Phe Ser Ala Thr Asn Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Val Leu Ser Pro Phe His Pro Val Arg Arg Ala Ala Val Lys Ile Leu
 115 120 125

Val His Ser Leu Phe Asn Met Leu Ile Met Cys Thr Ile Leu Thr Asn
 130 135 140
 Cys Val Phe Met Ala Gln His Asp Pro Pro Pro Trp Thr Lys Tyr Val
 145 150 155 160
 Glu Tyr Thr Phe Thr Ala Ile Tyr Thr Phe Glu Ser Leu Val Lys Ile
 165 170 175
 Leu Ala Arg Ala Phe Cys Leu His Ala Phe Thr Phe Leu Arg Asp Pro
 180 185 190
 Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Thr Thr Glu
 195 200 205
 Phe Val Asp Leu Gly Asn Val Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu
 210 215 220
 Arg Ala Leu Lys Thr Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Thr Ile Val
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Ile Gln Ser Val Lys Lys Leu Ala Asp Val Met Val Leu
 245 250 255
 Thr Val Phe Cys Leu Ser Val Phe Ala Leu Ile Gly Leu Gln Leu Phe
 260 265 270
 Met Gly Asn Leu Arg His Lys Cys Val Arg Asn Phe Thr Ala Leu Asn
 275 280 285
 Gly Thr Asn Gly Ser Val Glu Ala Asp Gly Leu Val Trp Glu Ser Leu
 290 295 300
 Asp Leu Tyr Leu Ser Asp Pro Glu Asn Tyr Leu Leu Lys Asn Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Asp Val Leu Leu Cys Gly Asn Ser Ser Asp Ala Gly Thr Cys Pro
 325 330 335
 Glu Gly Tyr Arg Cys Leu Lys Ala Gly Glu Asn Pro Asp His Gly Tyr
 340 345 350
 Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp Ala Phe Leu Ala Leu Phe Arg Leu
 355 360 365
 Met Thr Gln Asp Cys Trp Glu Arg Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Ser
 370 375 380
 Ala Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe Phe Met Leu Val Ile Phe Leu Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile Leu Ala Val Val Ala Met Ala Tyr
 405 410 415
 Glu Glu Gln Asn Gln Ala Thr Ile Ala Glu Thr Glu Glu Lys Glu Lys
 420 425 430
 Arg Phe Gln Glu Ala Met Glu Met Leu Lys Lys Glu His Glu Ala Leu
 435 440 445
 Thr Ile Arg Gly Val Asp Thr Val Ser Arg Ser Ser Leu Glu Met Ser
 450 455 460

Pro Leu Ala Pro Val Asn Ser His Glu Arg Arg Ser Lys Arg Arg Lys
 465 470 475 480
 Arg Met Ser Ser Gly Thr Glu Glu Cys Gly Glu Asp Arg Leu Pro Lys
 485 490 495
 Ser Asp Ser Glu Asp Gly Pro Arg Ala Met Asn His Leu Ser Leu Thr
 500 505 510
 Arg Gly Leu Ser Arg Thr Ser Met Lys Pro Arg Ser Ser Arg Gly Ser
 515 520 525
 Ile Phe Thr Phe Arg Arg Arg Asp Leu Gly Ser Glu Ala Asp Phe Ala
 530 535 540
 Asp Asp Glu Asn Ser Thr Ala Arg Glu Ser Glu Ser His His Thr Ser
 545 550 555 560
 Leu Leu Val Pro Trp Pro Leu Arg Arg Thr Ser Ala Gln Gly Gln Pro
 565 570 575
 Ser Pro Gly Thr Ser Ala Pro Gly His Ala Leu His Gly Lys Lys Asn
 580 585 590
 Ser Thr Val Asp Cys Asn Gly Val Val Ser Leu Leu Gly Ala Gly Asp
 595 600 605
 Pro Glu Ala Thr Ser Pro Gly Ser His Leu Leu Arg Pro Val Met Leu
 610 615 620
 Glu His Pro Pro Asp Thr Thr Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Gly Pro
 625 630 635 640
 Gln Met Leu Thr Ser Gln Ala Pro Cys Val Asp Gly Phe Glu Glu Pro
 645 650 655
 Gly Ala Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Val Leu Thr Ser Ala
 660 665 670
 Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ser Arg His Lys Cys Pro Pro Cys Trp Asn
 675 680 685
 Arg Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Ile Trp Glu Cys Cys Pro Leu Trp Met
 690 695 700
 Ser Ile Lys Gln Gly Val Lys Leu Val Val Met Asp Pro Phe Thr Asp
 705 710 715 720
 Leu Thr Ile Thr Met Cys Ile Val Leu Asn Thr Leu Phe Met Ala Leu
 725 730 735
 Glu His Tyr Asn Met Thr Ser Glu Phe Glu Glu Met Leu Gln Val Gly
 740 745 750
 Asn Leu Val Phe Thr Gly Ile Phe Thr Ala Glu Met Thr Phe Lys Ile
 755 760 765
 Ile Ala Leu Asp Pro Tyr Tyr Tyr Phe Gln Gln Gly Trp Asn Ile Phe
 770 775 780
 Asp Ser Ile Ile Val Ile Leu Ser Leu Met Glu Leu Gly Leu Ser Arg
 785 790 795 800

Met Ser Asn Leu Ser Val Leu Arg Ser Phe Arg Leu Leu Arg Val Phe
805 810 815

Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile Ile
820 825 830

Gly Asn Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Leu Val Leu Ala Ile
835 840 845

Ile Val Phe Ile Phe Ala Val Val Gly Met Gln Leu Phe Gly Lys Asn
850 855 850

Tyr Ser Glu Leu Arg Asp Ser Asp Ser Gly Leu Leu Pro Arg Trp His
865 870 875 880

Met Met Asp Phe Phe His Ala Phe Leu Ile Ile Phe Arg Ile Leu Cys
885 890 895

Gly Glu Trp Ile Glu Thr Met Trp Asp Cys Met Glu Val Ser Gly Gln
900 905 910

Ser Leu Cys Leu Leu Val Phe Leu Leu Val Met Val Ile Gly Asn Leu
915 920 925

Val Val Leu Asn Leu Phe Leu Ala Leu Leu Leu Ser Phe Ser Ala
930 935 940

Asp Asn Leu Thr Ala Pro Asp Glu Asp Arg Glu Met Asn Asn Leu Gln
945 950 955 960

Leu Ala Leu Ala Arg Ile Gln Arg Gly Leu Arg Phe Val Lys Arg Thr
965 970 975

Thr Trp Asp Phe Cys Cys Gly Leu Leu Arg His Arg Pro Gln Lys Pro
980 985 990

Ala Ala Leu Ala Ala Gln Gly Gln Leu Pro Ser Cys Ile Ala Thr Pro
995 1000 1005

Tyr Ser Pro Pro Pro Pro Glu Thr Glu Lys Val Pro Pro Thr Arg Lys
1010 1015 1020

Glu Thr Gln Phe Glu Glu Gly Glu Gln Pro Gly Gln Gly Thr Pro Gly
1025 1030 1035 1040

Asp Pro Glu Pro Val Cys Val Pro Ile Ala Val Ala Glu Ser Asp Thr
1045 1050 1055

Asp Asp Gln Glu Glu Asp Glu Glu Asn Ser Leu Gly Thr Glu Glu Glu
1060 1065 1070

Ser Ser Lys Gln Gln Glu Ser Gln Pro Val Ser Gly Trp Pro Arg Gly
1075 1080 1085

Pro Pro Asp Ser Arg Thr Trp Ser Gln Val Ser Ala Thr Ala Ser Ser
1090 1095 1100

Glu Ala Glu Ala Ser Ala Ser Gln Ala Asp Trp Arg Gln Gln Trp Lys
1105 1110 1115 1120

Ala Glu Pro Gln Ala Pro Gly Cys Gly Glu Thr Pro Glu Asp Ser Cys
1125 1130 1135

Ser Glu Gly Ser Thr Ala Asp Met Thr Asn Thr Ala Glu Leu Leu Glu
 1140 1145 1150
 Gln Ile Pro Asp Leu Gly Gln Asp Val Lys Asp Pro Glu Asp Cys Phe
 1155 1160 1165
 Thr Glu Gly Cys Val Arg Arg Cys Pro Cys Cys Ala Val Asp Thr Thr
 1170 1175 1180
 Gln Ala Pro Gly Lys Val Trp Trp Arg Leu Arg Lys Thr Cys Tyr His
 1185 1190 1195 1200
 Ile Val Glu His Ser Trp Phe Glu Thr Phe Ile Ile Phe Met Ile Leu
 1205 1210 1215
 Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ala Phe Glu Asp Ile Tyr Leu Glu Glu Arg
 1220 1225 1230
 Lys Thr Ile Lys Val Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Lys Met Phe Thr Tyr
 1235 1240 1245
 Val Phe Val Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe Lys
 1250 1255 1260
 Lys Tyr Phe Thr Asn Ala Trp Cys Trp Leu Asp Phe Leu Ile Val Asp
 1265 1270 1275 1280
 Val Ser Leu Val Ser Leu Val Ala Asn Thr Leu Gly Phe Ala Glu Met
 1285 1290 1295
 Gly Pro Ile Lys Ser Leu Arg Thr Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg
 1300 1305 1310
 Ala Leu Ser Arg Phe Glu Gly Met Arg Val Val Val Asn Ala Leu Val
 1315 1320 1325
 Gly Ala Ile Pro Ser Ile Met Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe
 1330 1335 1340
 Trp Leu Ile Phe Ser Ile Met Gly Val Asn Leu Phe Ala Gly Lys Phe
 1345 1350 1355 1360
 Gly Arg Cys Ile Asn Gln Thr Glu Gly Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Thr
 1365 1370 1375
 Ile Val Asn Asn Lys Ser Gln Cys Glu Ser Leu Asn Leu Thr Gly Glu
 1380 1385 1390
 Leu Tyr Trp Thr Lys Val Lys Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Ala Gly
 1395 1400 1405
 Tyr Leu Ala Leu Leu Gln Val Ala Thr Phe Lys Gly Trp Met Asp Ile
 1410 1415 1420
 Met Tyr Ala Ala Val Asp Ser Arg Gly Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Trp
 1425 1430 1435 1440
 Glu Tyr Asn Leu Tyr Met Tyr Ile Tyr Phe Val Ile Phe Ile Ile Phe
 1445 1450 1455
 Gly Ser Phe Phe Thr Leu Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn
 1460 1465 1470

Phe Asn Gln Gln Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr
 1475 1480 1485
 Glu Glu Gln Lys Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser Lys
 1490 1495 1500
 Lys Pro Gln Lys Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Tyr Gln Gly Phe
 1505 1510 1515 1520
 Ile Phe Asp Ile Val Thr Lys Gln Ala Phe Asp Val Thr Ile Met Phe
 1525 1530 1535
 Leu Ile Cys Leu Asn Met Val Thr Met Met Val Glu Thr Asp Asp Gln
 1540 1545 1550
 Ser Pro Glu Lys Ile Asn Ile Leu Ala Lys Ile Asn Leu Leu Phe Val
 1555 1560 1565
 Ala Ile Phe Thr Gly Glu Cys Ile Val Lys Leu Ala Ala Leu Arg His
 1570 1575 1580
 Tyr Tyr Phe Thr Asn Ser Trp Asn Ile Phe Asp Phe Val Val Val Ile
 1585 1590 1595
 Leu Ser Ile Val Gly Thr Val Leu Ser Asp Ile Ile Gln Lys Tyr Phe
 1605 1610 1615
 Phe Ser Pro Thr Leu Phe Arg Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg
 1620 1625 1630
 Ile Leu Arg Leu Ile Arg Gly Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe
 1635 1640 1645
 Ala Leu Met Met Ser Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu
 1650 1655 1660
 Phe Leu Val Met Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ala Asn Phe Ala
 1665 1670 1675 1680
 Tyr Val Lys Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr
 1685 1690 1695
 Phe Ala Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly
 1700 1705 1710
 Trp Asp Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys
 1715 1720 1725
 Asp Pro Thr Leu Pro Asn Ser Asn Gly Ser Arg Gly Asp Cys Gly Ser
 1730 1735 1740
 Pro Ala Val Gly Ile Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile Ser Phe
 1745 1750 1755 1760
 Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu Asn Phe Ser
 1765 1770 1775
 Val Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu Asp Asp Phe Asp
 1780 1785 1790
 Met Phe Tyr Glu Ile Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu Ala Thr Gln Phe
 1795 1800 1805

Ile Glu Tyr Ser Val Leu Ser Asp Phe Ala Asp Ala Leu Ser Glu Pro
 1810 1815 1820
 Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Gln Ile Ser Leu Ile Asn Met Asp Leu
 1825 1830 1835 1840
 Pro Met Val Ser Gly Asp Arg Ile His Cys Met Asp Ile Leu Phe Ala
 1845 1850 1855
 Phe Thr Lys Arg Val Leu Gly Glu Ser Gly Glu Met Asp Ala Leu Lys
 1860 1865 1870
 Ile Gln Met Glu Glu Lys Phe Met Ala Ala Asn Pro Ser Lys Ile Ser
 1875 1880 1885
 Tyr Glu Pro Ile Thr Thr Thr Leu Arg Arg Lys His Glu Glu Val Ser
 1890 1895 1900
 Ala Met Val Ile Gln Arg Ala Phe Arg Arg His Leu Leu Gln Arg Ser
 1905 1910 1915 1920
 Leu Lys His Ala Ser Phe Leu Phe Arg Gln Gln Ala Gly Ser Gly Leu
 1925 1930 1935
 Ser Glu Glu Asp Ala Pro Glu Arg Glu Gly Leu Ile Ala Tyr Val Met
 1940 1945 1950
 Ser Glu Asn Phe Ser Arg Pro Leu Gly Pro Pro Ser Ser Ser Ile
 1955 1960 1965
 Ser Ser Thr Ser Phe Pro Pro Ser Tyr Asp Ser Val Thr Arg Ala Thr
 1970 1975 1980
 Ser Asp Asn Leu Gln Val Arg Gly Ser Asp Tyr Ser His Ser Glu Asp
 1985 1990 1995 2000
 Leu Ala Asp Phe Pro Pro Ser Pro Asp Arg Asp Arg Glu Ser Ile Val
 2005 2010 2015

【图1】

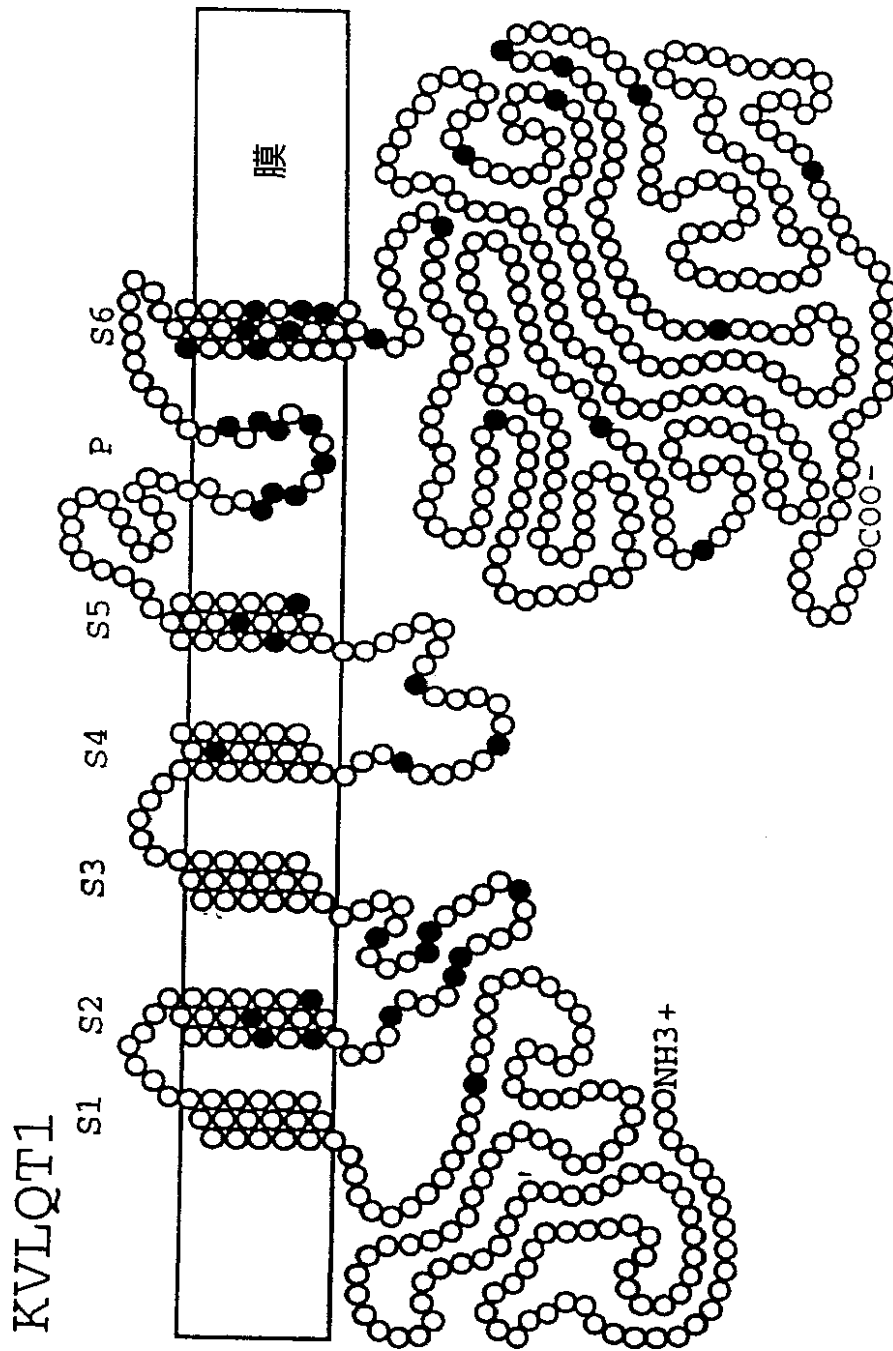


FIG. 1

【图2】

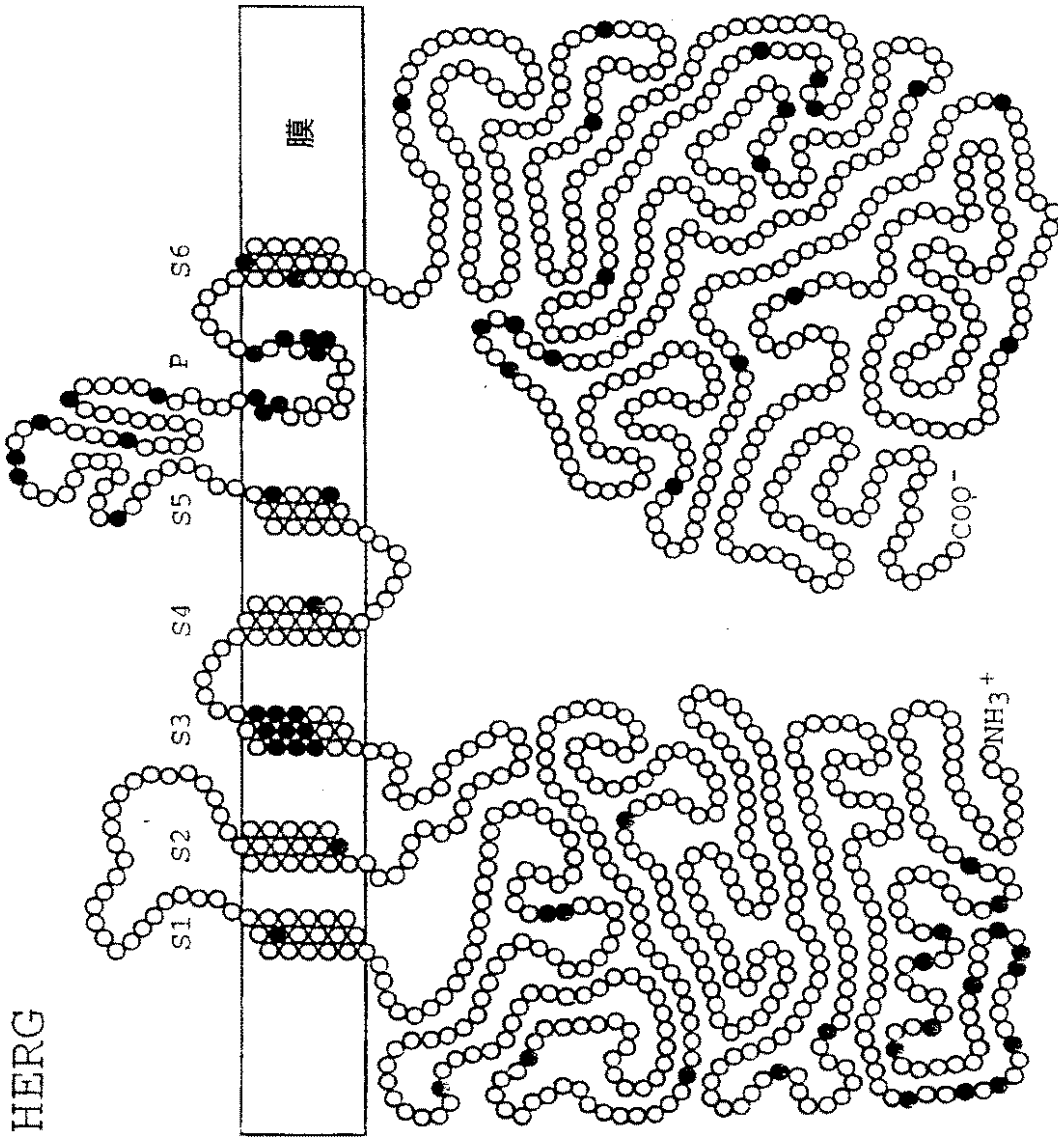


FIG.2

【图3】

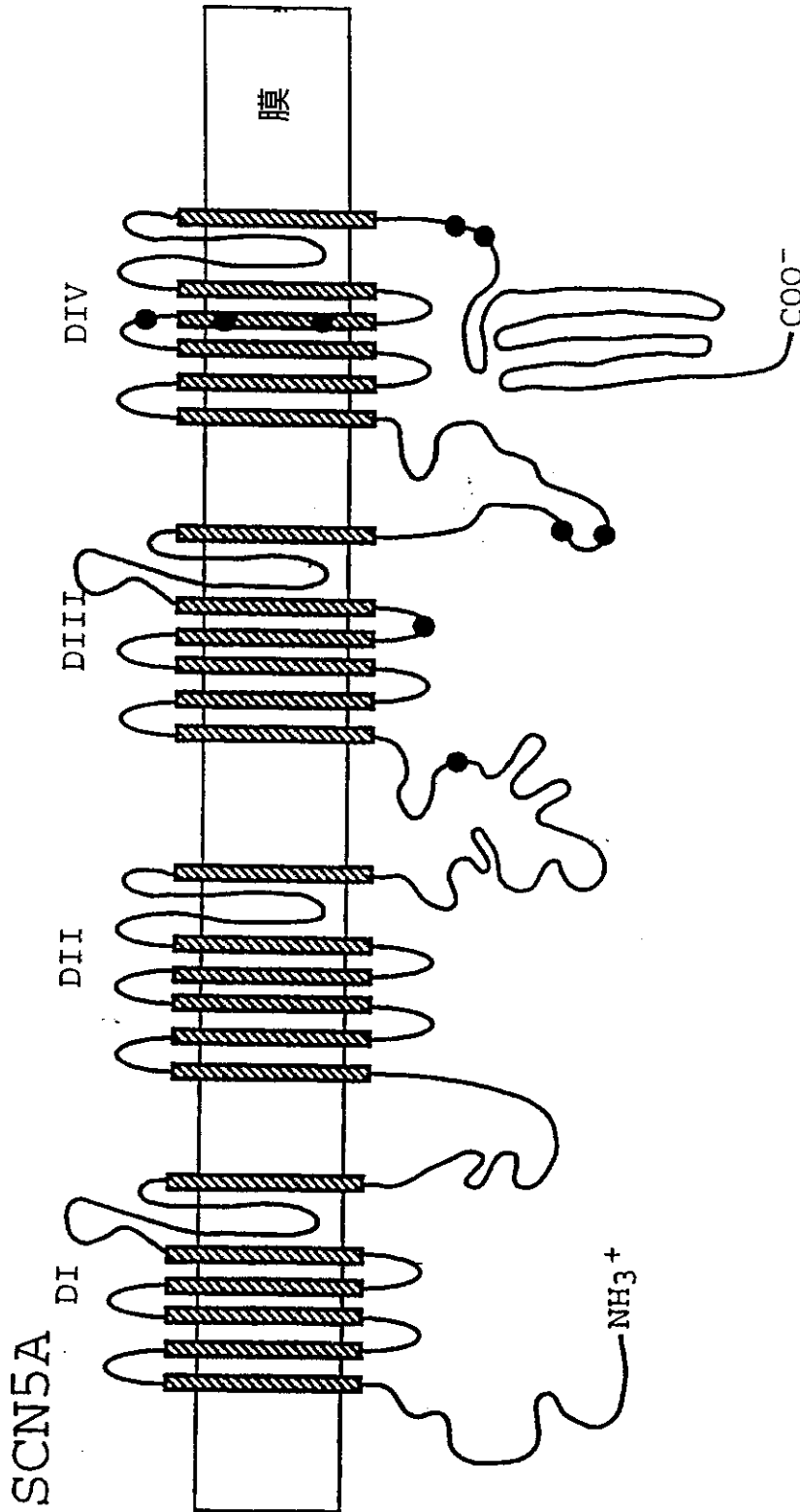


FIG. 3

【图4】

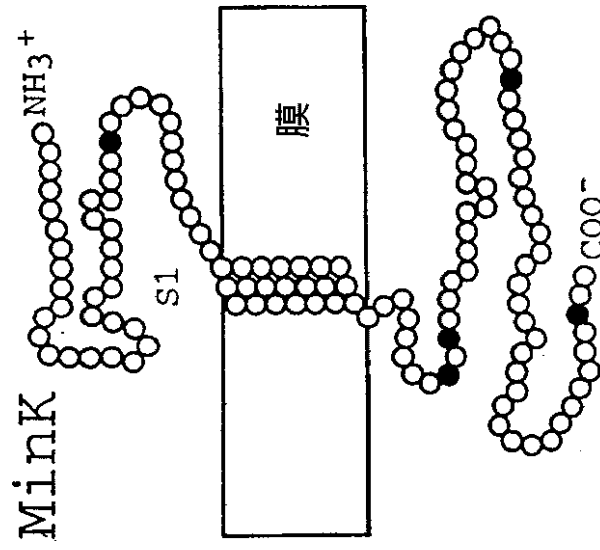


FIG. 4

【图5】

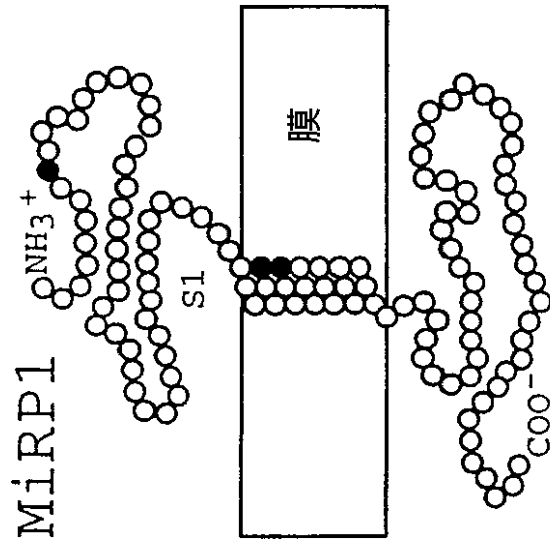


FIG. 5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/21660	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/04; C07K 14/00, 16/00 US CL : 435/6, 91.1, 91.2; 536/23.1, 24.1; 530/350, 387.1 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) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2; 536/23.1, 24.1; 530/350, 387.1			
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) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	FRANQUEZA et al. Long QT Syndrome-associated Mutations in the S4-S5 Linker of KvLQT1 Potassium Channels Modify Gating and Interaction with minK Subunits. Journal of Biological Chemistry. July 23, 1999. Vol. 274, No. 30. pages 21063-21070, see especially abstract, page 21063, fig 1, page 21069.	6 1-5, 7-23, 25	
Y	NEYROUD et al. Heterozygous Mutation in the Pore of Potassium Channel Gene KvLQT1 Causes an Apparently Normal Phenotype in Long QT Syndrome. European Journal of Human Genetics. 1998, Vol. 6, pages 129-133, see especially abstract, page 129 and 130.	9-11	
Y	AN et al. Novel LQT-3 Mutation Affects Na ⁺ Channel Activity Through Interactions Between alpha and beta 1-Subunits. Circulation Research. 1998, Vol. 83, pages 141-146, see especially page 141.	34-36	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"U"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 December 2001		Date of mailing of the international search report 12 FEB 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. 703 305-3230		Authorized officer JEHANNE SOUAYA <i>JS</i> Telephone No. 703 308-1235	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US00/21660

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, GENBANK, EAST, WEST
search terms: KvLQT1, SCN5A, mutation, polymorphism, long qt syndrome, review

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/483	F
	33/483		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53			M
			33/566	
	33/566	C 1 2 P	21/08	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考)	2G045 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03 FB05 FB07 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 HA14 4B063 QA17 QA18 QA19 QQ43 QR08 QR14 QR55 QR62 QS25 QS34 QX04 4B064 AG27 DA01 DA13 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 EA50			

专利名称(译)	QT长期综合征基因KVLQT1和SCN5A的修饰及其检测方法		
公开(公告)号	JP2003529331A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001527686	申请日	2000-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学		
[标]发明人	マーク・テイキーティング イゴール・スプロースキー		
发明人	マーク・テイキーティング イゴール・スプロースキー		
IPC分类号	G01N33/483 A61P9/02 C07C209/84 C07C211/42 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6883 C07C209/84 C07C211/42 C07C2602/10 C12Q2565/131 C12Q2600/156		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/42 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/483.F G01N33/50.Z G01N33/53. D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 4B024 /AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QX04 4B064/AG27 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	60/147488 1999-08-09 US 60/190057 2000-03-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

长QT综合征 (LQTS) 是一种心血管疾病, 其特征在于心电图, 晕厥, 癫痫发作和猝死的QT间隔时间延长。Romano-Ward综合征涉及五个基因 (LQTS的常染色体显性形式)。这些基因是KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1和KCNE2。KVLQT1和KCNE1的突变会导致Jewel-Langer-Nielsen综合征, 这是一种以常染色体隐性遗传的遗传表型疾病, 是一种与听力损失相关的LQTS。突变分析用于筛选262名LQTS无关个体的五个定义基因中的突变。观察到的134个突变中有80个是新突变。

遗传子型	年龄* (年) (平均±SD)	性 (F/M)	QTc (ms) (平均±SD)	症状+
KVLQT1	3.2±1.9	5.2/2.3	4.93±4.5	7.8%
HERG	3.1±1.9	5.1/2.9	4.98±4.8	7.1%
SCN5A	3.2±2.4	8/6	5.11±4.2	5.5%
KCNE1	4.3±1.6	3/2	4.57±2.5	4.0%
KCNE2	5.4±2.0	3/0	4.57±0.5	6.7%
未知	2.5±1.6	5.6/2.9	4.84±4.6	8.1%
全部	2.9±1.9	17.3/8.9	4.92±4.7	7.5%