

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-24268

(P2004-24268A)

(43) 公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 6 3
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 40 O L (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-292589 (P2003-292589)	(71) 出願人	301034359
(22) 出願日	平成15年8月12日 (2003. 8. 12)		オレゴン ヘルス サイエンス ユニ バーシティー
(62) 分割の表示	特願平10-513828の分割		アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン ド エス. ダブリュー. サム ジャクソン パーク ロード 3 1 8 1
原出願日	平成9年9月10日 (1997. 9. 10)		
(31) 優先権主張番号	60/026, 451	(71) 出願人	502414600
(32) 優先日	平成8年9月11日 (1996. 9. 11)		アイシーエージェン, インコーポレイテ ィド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 7 0 3, ダラム, エンペラー ブールバ ード 4 2 2 2, スイート 3 5 0
(31) 優先権主張番号	60/040, 052	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成9年3月7日 (1997. 3. 7)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/045, 233		
(32) 優先日	平成9年4月17日 (1997. 4. 17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 低及び中間コンダクタンスのカルシウム活性化されたカリウムチャネル及びその使用

(57) 【要約】

【課題】 新規な、中間コンダクタンスのカルシウム活性化カリウムチャネルをコードする遺伝子及びタンパク質の提供。

【解決手段】 中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルのモノマーの少なくとも15個の隣接したアミノ酸をコードし、前記モノマーが、i . 42~52KDaの計算された分子量を有し；ii . 前記モノマーが、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、内部方向での30~60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii . 配列番号32に対して生成されたポリクローナル抗体に対して特異的に結合する、単離された核酸。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルのモノマーの少なくとも15個の隣接したアミノ酸をコードし、前記モノマーが、

i . 42~52KDa の計算された分子量を有し；

ii . 前記モノマーが、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、内部方向での30~60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii . 配列番号32に対して生成されたポリクローナル抗体に対して特異的に結合する、単離された核酸。

10

## 【請求項2】

配列番号：32、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列を有する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質からの少なくとも15個の隣接するアミノ酸をコードするが、但し、前記隣接するアミノ酸がグルタミン反復アミノ酸配列からは成らない単離された核酸。

## 【請求項3】

前記核酸が、30~60pSのコンダクタンス及び40~80KDa の分子量を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードし、そして前記核酸が、

i . 配列番号：31に記載の配列に対して、高緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする、請求項2に記載の単離された核酸。

20

## 【請求項4】

配列番号：32に記載の配列を有するタンパク質をコードする請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項5】

配列番号31に示される配列を有する、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項6】

配列番号32に記載のアミノ酸配列を有する、中間カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする少なくとも20個の長さのヌクレオチドの単離された核酸配列。

## 【請求項7】

配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸に対して、または、配列番号：31に記載のヌクレイチド配列を有する核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする、少なくとも20個の長さのヌクレオチドの単離された核酸配列。

30

## 【請求項8】

核酸によりコードされる単離された中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質であって、その一部が、プライマー対により増幅される場合、配列番号31に対して、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする増幅されたフラグメントを生成し、ここで前記プライマー対が、

5' GCCGTGCGTGCCAGGATTTAGG 3' (配列番号34)、

5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35)、

5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36)、及び

5' GGACTGCTGGCTGGGTTCTGG 3' (配列番号37)

40

から成る群から選択されることを特徴とする単離された核酸。

## 【請求項9】

配列番号：32及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列からの少なくとも15個の隣接したアミノ酸を有する、単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質であって、ここで前記変異体が配列番号：32のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して反応性の抗体と、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応することを特徴とする単離されたタンパク質。

50

## 【請求項 10】

キセノパス卵母細胞において発現される場合、30～60pSのコンダクタンス及び40～80kDaの分子量を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの形成を誘導する請求項9に記載の単離されたタンパク質。

## 【請求項 11】

配列番号：32に示される配列を有する請求項9に記載の単離されたタンパク質。

## 【請求項 12】

i . 42～52kDa の計算された分子量を有し；

ii . カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、内部方向での30～60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii . 配列番号32に対して生成されたポリクローナル抗体に対して特異的に結合する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質のモノマーからの少なくとも15個の隣接したアミノ酸を含んで成る請求項9に記載の単離されたタンパク質。

10

## 【請求項 13】

天然に存在する配列に対して同一のアミノ酸配列を有する請求項12に記載の単離されたタンパク質。

## 【請求項 14】

配列番号32で示される配列を有する請求項12に記載の単離されたタンパク質。

## 【請求項 15】

下記配列：

VRGPPCVQDLGAPLTSQPWPWGFLGQGEAL ( 配列番号33 )

からのいずれかの8個の隣接したアミノ酸をコードする請求項12に記載の単離されたタンパク質。

20

## 【請求項 16】

核酸によりコードされる単離された中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質であって、その一部が、プライマー対により増幅される場合、配列番号31に対して、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする増幅されたフラグメントを生成し、ここで前記プライマー対が、

5' GCCGTGCGTGCAGGATTTAGG 3' ( 配列番号34 )、

5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' ( 配列番号35 )、

5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' ( 配列番号36 )、及び

5' GGA CTGCTGGCTGGGTTCTGG 3' ( 配列番号37 )

から成る群から選択されることを特徴とする単離された核酸。

30

## 【請求項 17】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で、特異的に反応する抗体であって、前記タンパク質が配列番号：32に記載の配列を有することを特徴とする抗体。

## 【請求項 18】

前記抗体が、配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して特異的に反応する請求項17に記載の抗体。

40

## 【請求項 19】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項18に記載の抗体。

## 【請求項 20】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸を含んで成る発現ベクターであって、前記チャネルタンパク質が配列番号：32、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列を有し、前記保存的に修飾された変異体が、卵母細胞において発現される場合、30～80pSのコンダクタンス、40～80kDaの分子量を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの形成を誘導し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するチャネルタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質であることを特徴とする発現ベクター。

50

## 【請求項 2 1】

請求項20に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

## 【請求項 2 2】

生物学的サンプルにおけるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の存在を検出するための方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと抗体とを接触せしめ、ここで前記抗体は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するチャネルタンパク質に対して特異的に反応し；

(b) 免疫学的に反応性の条件下で、前記タンパク質への前記抗体の結合を可能にし、前記結合された抗体の検出が前記チャネルタンパク質の存在をますことを含んで成る方法。

## 【請求項 2 3】

少なくとも25個の長さのアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸の生物学的サンプルにおける存在を検出するための方法であって、

(a) 配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有する前記チャネルタンパク質をコードする核酸に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと前記サンプルとを、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；

(b) ハイブリダイゼーション複合体を形成するために、チャネルタンパク質をコードする前記核酸の前記プローブへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、前記ハイブリダイゼーション複合体の検出が前記サンプルにおける前記核酸配列の存在の表示であることを含んで成る方法。

## 【請求項 2 4】

hIK1のために、

5' GCCGTGCGTGCAGGATTTAGG 3' (配列番号34)、

5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35)、

5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36)、及び

5' GGACTGCTGGCTGGGTTCTGG 3' (配列番号37)

から成る群から選択されたプライマーと同じ配列に対して、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズするプライマーにより増幅される核酸によりコードされる、単離されたカルシウム - 活性化されるカリウムチャネルタンパク質。

## 【請求項 2 5】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを通してのカリウムイオン流を高め又は低める化合物を同定するための方法であって、

a) 配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質を発現されている真核宿主細胞又は細胞膜と前記化合物とを接触せしめ、ここで前記保存的に修飾された変異体は、配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有し、30~60pSのコンダクタンスを有し、そして40~80kDaの分子量を有する抗原と特異的に反応する抗体に対して特異的に結合し；そして

b) 前記チャネルを発現する細胞又は細胞膜に対する化合物の機能的効果を決定する段階を含んで成る方法。

## 【請求項 2 6】

前記カリウムイオンの高められた又は低められた流れが、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される請求項25に記載の方法。

## 【請求項 2 7】

前記チャネルタンパク質が、配列番号：32に記載のアミノ酸選択された配列を有する請求項25に記載の方法。

## 【請求項 2 8】

前記チャネルタンパク質が組換え体である請求項25に記載の方法。

## 【請求項 2 9】

少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたチャネルタンパク

質をコードする単離された真核細胞核酸であって、前記チャンネルタンパク質が、配列番号：32に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質のコア領域の少なくとも長さに対して少なくとも60%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成り、そして30~80pSのコンダクタンスを有することを特徴とする単離された核酸。

【請求項30】

前記チャンネルタンパク質が、前記コア領域内の少なくとも20個の隣接したアミノ酸残基の比較窓に対して少なくとも90%の配列類似性を有する請求の範囲第29項記載の単離された核酸。

【請求項31】

請求項30に記載の単離された核酸を含んで成るベクター。

10

【請求項32】

請求の範囲第31項記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項33】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質の製造方法であって、請求項24に記載の宿主細胞を、前記チャンネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

【請求項34】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質の製造方法であって、請求項24に記載の宿主細胞を、前記チャンネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

20

【請求項35】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルを通してのカリウムイオン流を高め又は低める化合物を同定するための方法であって、

a) 少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質を発現されている宿主細胞又は細胞膜と前記化合物を接触せしめ、ここで前記SKチャンネルタンパク質が、配列番号：32に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも60%の類似性を有するアミノ酸配列を有し、そして30~80pSのコンダクタンスを有し；そして

b) 前記チャンネルを発現する細胞又は細胞膜に対する前記化合物の機能的効果を決定する段階を含んで成る方法。

30

【請求項36】

前記緊縮ハイブリダイゼーション条件が、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件である請求の範囲第26項記載の方法。

【請求項37】

前記核酸配列が、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基及び30~80pSのコンダクタンスを有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする請求項35に記載の方法。

【請求項38】

前記核酸プローブが、前記チャンネルタンパク質コア領域内の副配列をコードする少なくとも250個の隣接したヌクレオチドを含んで成る請求項35に記載の方法。

40

【請求項39】

請求項29に項記載の単離された核酸によりコードされるタンパク質。

【請求項40】

前記カリウムイオンの高められた又は低められた流れが、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される請求項38に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低コンダクタンス(SK)及び中間コンダクタンス(IK)のカルシウム - 活性化された(alcium-activated)カリウムチャンネルに関する組成物及びその同定方法に関す

50

る。本発明はさらに、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを通してカリウムイオン流 (flux) を高め又は低める化合物についてのアッセイ方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

カルシウム - 活性化されたカリウム流は、広範囲の種類動物細胞、たとえば神経、筋肉、腺又は上皮組織において、及び免疫系から見出される。それらの流れを調節するチャネルは、内部カルシウム濃度が上昇するにつれて、開口し、そしてカリウムの排出を可能にする。カリウムイオンの外部流は、細胞の内部をより陰性にし、細胞に適用される脱分極化電圧を妨害する。

【0003】

2種の別個の種類のカリウム - 活性化された $K^+$ チャネル(Kcaチャネルが記載されている。高コンダクタンスのカリウム - 活性化された $K^+$ チャネル(BKチャネル)は、内部カルシウムイオン及び膜電位の協調された作用により閉じられ、そして100~200pSの単位コンダクタンスを有する。低(SK)及び中間(IK)コンダクタンスのカリウム - 活性化された $K^+$ チャネルは、内部カルシウムイオンにより単独で閉じられ、それぞれ2~20及び20~85pSの単位コンダクタンスを有し、そしてBKチャネルよりもカルシウムに対してより敏感である(総説として、Latorreなど., 1989, Ann Rev Phys, 51: 385-399を参照のこと)。さらに、個々のタイプの $K_{CB}$ チャネルは異なった薬理学的プロファイルを示す。3種類すべてが広く発現され、そしてそれらの活性は膜電位を高分極化する。BK(Atkinsonなど., 1991, Science, 253: 551-555; Adelmanなど., 1992 Neuron, 9: 209-216; Butler, 1993, Science, 261: 221-224)及びSK(Kohlerなど., 1996, Science, 273: 1709-1714)サブファミリーのメンバーがクローニング化され、そして異種細胞型において発現され、そこでそれらの生来の対応物の基本的性質を再現する。

【0004】

脊椎動物のニューロンにおいては、活動電位に続いて、数秒間持続し、そしてニューロンの開始パターンのための絶大な因果関係を有する後高分極化(afterhyperpolarization)(AHP)が存在する。AHPの変更は、発作活動(Algerなど., J. Physiol. 399: 191-205(1988))、並びに学習及び記憶(de Jongeなど., Exp. Br. Res. 80: 456-462(1990))に関係している。AHPは、2つの顕著な成分、すなわちバースト(burst)の開始においてスパイク頻度(spike frequency)を仲介する早い成分(fAHP)、及びそれに続く遅い成分(sAHP)であってスパイク - 頻度の適合をつかさどるものから構成される(Nicoll, Science 241: 545-551(1988))。

【0005】

AHPの個々の成分は動的に異なり、そして異なるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの活動によるものである。高コンダクタンス(100~200ピコジ - メンス(pS))の電圧 - 及びカルシウム - 活性化されたカリウムチャネル(BKチャネル)の活性化はfAHPの基礎となり、これは急速に進行し(1~2ミリ秒)、そして10ミリ秒内に崩壊する(Lancasterなど., J. Physiol. 389: 187-203(1987); Vianaなど., J. Neurophysiol. 69: 2150-2163(1993))。sAHPの基礎となるチャネルは、BKチャネルとは異なり、よりカルシウム感受性であり、電圧 - 閉鎖されず、そして低い単位コンダクタンスを有する、低コンダクタンスのカリウム活性化されたカリウムチャネル(SKチャネル)である(Lancasterなど., J. Neurosci. 11: 23-30(1991); San, J. Neurophysiol. 74: 1772-1776(1995))。

【0006】

fAHP及びsAHPは、それらの薬理学においても異なる。fAHPはBKチャネルの薬理学によれば、低濃度の外部テトラエチルアンモニウム(TEA)及びカリブドトキシン(CTX)によりブロックされる(Lancasterなど., J. Physiol. 389: 187-203(1987); Vianaなど., J. Neurophysiol. 69: 2150-2163(1993); Butlerなど., Science 261: 221-224(1993))。対照的に、sAHPはCTXに対して感受性ではないが、しかし八チ毒ペプチドトキシン、アパミンに対する感度に関して2つの種類に分類される。たとえば、海馬錐体ニューロ

10

20

30

40

50

ンにおいては、sAHPはアパミンに対して感受性ではないが (Lancaster など., J. Neurophysiol. 55 : 1268-1282 (1986) )、海馬ニューロン間及び迷走神経性ニューロンにおいては、それはナノモル濃度のトキシンによりブロックされる (Sah, J. Neurophysiol. 74 : 1772-1776 (1995) ; Zhang など., J. Physiol. 488 : 661-672 (1995) )。

#### 【 0 0 0 7 】

ニューロン細胞におけるその役割の他に、マイクロモルより低濃度のカルシウムにより活性化され、電圧閉鎖されていないアパミン - 感受性カリウムチャネルが、末梢細胞型、たとえば骨格筋 (Blatz など., Nature 323 : 718-720 (1986))、腺細胞 (Tse など., Science 255 : 462-464 (1992) ; Park, J. Physiol. 481 : 555-570 (1994)) 及び T - リンパ球 (Grissmer など., J. Gen. Physiol. 99 : 63-84 (1992) ) からも記載されている。

10

#### 【 0 0 0 8 】

たとえば、SKチャネルは、筋緊張性筋ジストロフィーを有する患者の筋膜に見出されるアパミン受容体を代表することが提案されている (Renaud など., Nature 319 : 678-680 (1986))。また、Grissmer など., (J. Gen. Physiol. 99 : 63-84 (1992)) は、CTX 非感受性、アパミン感受性、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルがヒト白血病 T 細胞に同定されることを報じており、そしてカルシウム活性化されたカリウムチャネルがカルシウムシグナルの力学的パターンを維持することによって T - 細胞活性化の間、支持の役割を演じることを示唆する。さらに、多くの細胞において、SKチャネルは、神経伝達物質又はホルモン作用の結果として活性化される (Haylett など., Potassium Channels : Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Cook, N. S., ed.), pp. 71-95, John Wiley and Sons, 1990) 。中間チャネルは赤血球細胞の生理学において役割を演じる。

20

#### 【 0 0 0 9 】

中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルは、それらの電気生理学により文献にこれまで記載されて来た。Gardosチャネルは、マイクロモルより低濃度の内部カルシウムにより開口され、そして - 120mV での 50pS ~ 120mV での 13pS の範囲の整流単位コンダクタンスを有する (対称 120mM  $K^+$  ; Christophersen, 1991, J. Membrane Biol., 119 : 75-83) 。それはカリブドトキシン (CTX) によりブロックされるが、しかし構造的に関連するペプチドイベリオトキシン (IBX) によってはブロックされず、それらの両者は BKチャネルをブロックする (Brugnara など., 1995a, J. Membr. Biol., 147 : 71-82) 。

30

#### 【 0 0 1 0 】

アパミン、ある生来の可能性あるブロッカー (Vincent など., 1975, J. Biochem., 14, 2521 ; Blatz and Mayleby, 1986, Nature, 323 : 718-720) 及びクローン化された SKチャネルは、IKチャネルをブロックしない (de-Allie など., 1996, Br. J. Pharm., 177 : 479-487) 。Gardosチャネルはまた、イミダゾール化合物、たとえばクロトリマゾールによりブロックされるが、しかしケトコナゾールによってはブロックされない (Bagnara など., 1993, J. Clin. Invest., 92 : 520-526) 。Gardosチャネルの電気生理学的及び薬理的性質は、それが本発明の IKサブファミリーに属することを示す。

40

#### 【 0 0 1 1 】

IKチャネルは、種々の他の細胞型において記載されている。ラット皮質収集管 (cortical collecting duct) の成分細胞 (principle cell) は、異なった種類の  $K^+$  チャネルを管腔膜と基底外側 (basolateral) 膜とに分離する。IKチャネルは、それらがこの膜を通しての  $K^+$  の再循環を促進し、 $Na^+ + K^+ - ATP$  アーゼの活性を高め、そしてそれにより血液中への  $Na^+$  再吸収を高める基底外側膜に存在する (Hirsch and Schlatter, 1995, Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol., 449 : 338-344) 。

#### 【 0 0 1 2 】

IKチャネルはまた、それらがブラジキニンの血管拡張効果を担当する腎臓の微小血管系に包含されている (Rapacon など., 1996) 。脳細管内皮細胞においては、IKチャネルは、

50

ニューロン及びグリアにより生成されるエンドセリンにより活性化され、過剰の $K^+$ を血液の方に向ける (Renterghemなど., 1995, J. Neurochem., 65 : 1274-1281)。微生物侵入に対して防御する好中球性顆粒球、すなわち移動性ファゴサイト細胞は、アゴニスト刺激に続いて、大きな脱分極化を受け、そしてIKチャネルはその刺激された顆粒球の再分極化に関連する (Varnaiなど., 1993, J. Physiol., 472 : 373-390)。IKチャネルはまた、体止及び活性化されたヒトT-リンパ球においても同定されている。

【0013】

Grissmerなど.(1993, J. Gen. Physiol. 102 : 601-630)は、IKチャネルが低ナノモル濃度のカリブドトキシンによりブロックされ、少々の又はまったくの電圧依存性を示さず、そしてアパミンに対して非感受性であることを報告している。このチャネルはまた、それが細胞内容積ホメオスタシスにおいて (Joiner, C. H., 1993, Am. J. Physiol. 264 : C251-270)及び平滑筋において (Van Renterghem, C.など., 1996, J. Neurochemistry 65 : 1274-1281)、重要な役割を演じるヒト赤血球細胞においても同定されている。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従って、SK及びIKチャネルは、多くの細胞型において鍵となる生理学的役割を演じるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルのサブファミリーを含むように思われる。従って、広範囲の種類 of 生理学的機能におけるSK及びIKチャネルの鍵となる役割を得る場合、当業界において必要とされることは、新規SK及びIKチャネルタンパク質及びそれをコードする核酸の同定である。従って、必要とされることは、学習及び記憶障害、発作、筋緊張性ジストロフィー、免疫応答、及び神経伝達物質又はホルモン分泌の処理又は調節への使用のためにSK及びIKチャネル流を高め又は低める化合物を同定する方法である。本発明はそれらの及び他の利点を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0015】

第1の広い観点において、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムイオンチャネルの、モノマーとして定義される新規タンパク質類及びそれらの対応する核酸を供給する。前記モノマーは、40~80kDaの分子量を有し、そして前記モノマーがキセノパス(Xenopus)卵母細胞において発現されるようなポリマー形で存在する場合、2~80pSのコンダクタンスの単位を有する。さらに、前記モノマーは、配列番号30又は42に対して生成される抗体に対して特異的に結合する。

30

【0016】

もう一つの観点において、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の少なくとも15個の隣接するアミノ酸をコードする単離された核酸に関する。SKチャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、並びに配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有する。

【0017】

いくつかの態様においては、単離された核酸は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2pSのコンダクタンス、40~100Kdの分子量を有し、そして緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、SK又はIKコード核酸、たとえばヒトゲノムライブラリーにおける配列番号13又はラットゲノムライブラリーにおける配列番号14と選択的にハイブリダイズし、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする。他の態様においては、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有するタンパク質をコードする。好ましい態様においては、核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44及び48から成る群から選択された配列を有する。

40

【0018】

もう一つの観点において、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47

50

、1、2、3、4、19、20、32、43及び47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列の少なくとも15個の隣接するアミノ酸を有する単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質に関し、ここで前記変異体は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1、2、3、4、19、20、30、32、43及び47から成る群から選択されたタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応する。

【0019】

広い態様において、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、少なくとも2 pSのコンダクタンス及び40~100Kdの分子量を有するものとして定義される。他の態様においては、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する。

10

【0020】

もう一つの観点においては、本発明は、配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47から成る群から選択された配列を有する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応する抗体に向けられる。好ましい態様においては、前記抗体はモノクローナル抗体に制限される。

【0021】

さらにもう一つの観点においては、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルのモノマーをコードする核酸を含んで成る発現ベクターに関し、ここで前記モノマーは配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47、及び配列番号1、2、3、4、19、20、32、43又は47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有し、そして前記修飾された変異体は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2 pSのコンダクタンス、40~100Kdの分子量を有し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47から成る群から選択された十分な長さのタンパク質と反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質である。

20

【0022】

もう一つの観点において、本発明は、配列番号1、2、3、19、20、32、43及び47、及び配列番号1、2、3、19、20、32、43又は47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質のモノマーをコードする核酸を含んで成るベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞に関し、ここで前記修飾された変異体は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2 pSのコンダクタンス、40~100Kdの分子量を有し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1、2、3、19、20、32、43及び47から成る群から選択された十分な長さのタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質である。典型的には、宿主細胞は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸の発現を可能にする条件下で培養される。

30

【0023】

さらにもう一つの観点においては、本発明は、配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47から成る群から選択された、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする少なくとも15個の長さのヌクレオチドの単離された核酸配列に関する。

40

【0024】

さらなる観点においては、本発明は、生物学的サンプルにおけるカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質の存在を検出するための方法に向けられる。この方法は、配列番号1、2、3、4、19、20、32、43及び47から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応する抗体と生物学的サンプルとを接触せしめ、そして免疫学的に反応性の条件下で前記タンパク質への前記抗体の結合を可能にすることを含んで成り、ここで前記結合された抗体の検出がチャンネルタンパク質の存在を示す。

【0025】

さらにもう一つの観点においては、本発明は、少なくとも25個の長さのアミノ酸のカル

50

シウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸配列の生物学的サンプルにおける存在を検出するための方法を提供する。この方法は、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有するチャンネルタンパク質をコードする核酸に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと生物学的サンプルとを緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；ハイブリダイゼーション複合体を形成するために前記プローブへの前記チャンネルタンパク質をコードする核酸のハイブリダイゼーションを可能にすることを含んで成り、ここで前記ハイブリダイゼーション複合体の検出がサンプルにおける核酸配列の存在を示すものである。いくつかの態様において、ハイブリダイゼーション条件は、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件である。

10

## 【0026】

他の態様においては、カルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質は、少なくとも 400個の長さのアミノ酸残基であり、そして卵母細胞において発現される場合、少なくとも 2 pSのコンダクタンスを有する。さらなる態様においては、核酸プローブは、小さな又は中位のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質コア領域内の副配列をコードする少なくとも 250個の隣接したヌクレオチドを含んで成る。

## 【0027】

さらなる観点において、本発明は、hSK1のために配列番号5、及び6；rSK2のために配列番号7及び8；内因性rSK3のために配列番号9及び10；rSK1のために配列番号11及び12；hSK2のために配列番号23及び24；hSK3のために配列番号25及び26；及びhIKのために、ヒトゲノム又はcDNAライブラリーからhIK1を同定するために選択的であるプローブを増幅するであろう次のプライマー対：約270個の塩基のプローブを生成する5' GCCGTGCGTGCGAGGATTTAGG 3' (配列番号34)及び5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35)、又は約165個の塩基のプローブを生成する5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36)及び5' GGACTGCTGGCTGGTTCTGG 3' (配列番号37)から成る群から選択されたプライマーと同じ核酸配列に、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、選択的にハイブリダイズするプライマーにより増幅される核酸によりコードされる、単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルに関する。

20

## 【0028】

十分な長さのhIK1の増幅のためには、次の2種のプライマー対が作動するであろう：5' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTTG 3' (配列番号38)及び5' CTACTTGGACTGCTGGCTGGGTTTC 3' (配列番号39)、又は5' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTGG 3' (イニシエーターメチオニンのコドンを含む) (配列番号40)及び5' GGGTCCAGCTACTTGGACTGCTG 3' (翻訳の終結のための停止コドンを含む) (配列番号41)。

30

## 【0029】

さらにもう1つの観点においては、本発明は、低又は中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルを通してカリウムイオン束を高め又は低める、クロトリミゾールではない化合物を同定する方法に関する。この方法は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及びそれらの保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルをコードする核酸を発現されている真核宿主細胞と前記化合物とを接触せしめ、ここで前記保存的に修飾された変異体は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたアミノ酸配列を有し、少なくとも2 pSのコンダクタンス及び40~100KDの分子量を有する抗原と特異的に反応する抗体に対して特異的に結合し；そして前記チャンネルを通しての高められた又は低められたカリウムイオン束を決定する段階を含んで成る。

40

## 【0030】

好ましい態様においては、前記高められた又は低められたカリウムイオン流(flux)は、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流又はイオン束を測定し、又は電流又はイオン束の変化により誘発される電圧の変化を直接的に測定することによって決定される。特に好ましい態様においては、前記チャンネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20

50

、32、43及び47から成る群から選択された配列を有する。もう1つの好ましい態様においては、チャンネルタンパク質は、組換え体である。

【0031】

さらなる観点においては、本発明は、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする単離された真核核酸に関し、ここで前記カルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55~60%の類似性を有するアミノ酸を含んで成り、そして少なくとも2 pSのコンダクタンスを有する。いくつかの態様においては、本発明は前記単離された真核核酸によりコードされるタンパク質に向けられる。他の態様においては、カルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、前記コア領域内の20個の隣接したアミノ酸残基の比較窓に対して少なくとも85%の配列類似性を有する。

10

【0032】

さらなる観点においては、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成り、そして少なくとも2 pSのコンダクタンスを有する、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする単離された真核核酸を含んで成るベクターに向けられる。典型的には、前記ベクターは、チャンネルタンパク質をコードする単離された真核核酸の発現を可能にする条件下で培養される宿主細胞中にトランスフェクトされる。

20

【0033】

さらなる観点においては、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルを通してのカリウムイオン束を高め又は低める化合物を同定するための方法に向けられる。この方法は、少なくとも400個の長さのアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質を発現している真核宿主細胞と前記化合物とを接触せしめ、ここでチャンネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55%の類似性を有するアミノ酸配列、及び少なくとも2 pSのコンダクタンスを有し；そしてチャンネルタンパク質を通しての高められた又は低められたカリウムイオン束を決定する段階を含んで成る。いくつかの場合、前記高められた又は低められたカリウムイオン束は、真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される。

30

【0034】

もう1つの観点においては、本発明は、SK及びIK遺伝子の突然変異のためのスクリーニング方法をコンピューターシステムに供給し、ここで前記方法は、(i)配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質をコードする第1核酸配列を入力し；(ii)前記第1核酸配列に対して実質的な同一性を有する第2核酸配列と前記第1核酸配列とを比較し；そして(iii)前記第1及び第2核酸配列間のヌクレオチド差異を同定する段階を含んで成る。第1の態様においては、前記第2核酸配列は、疾病状態に関連している。

40

【0035】

もう1つの観点においては、本発明はSK及びIKタンパク質の立体構造を同定するための方法のコンピューターシステムを提供し、ここで前記方法は、(i)配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から選択されたアミノ酸配列を有するカルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質、又は前記タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列のアミノ酸配列を入力し；そして(ii)前記アミノ酸配列によりコードされるタンパク質の立体構造を生成する段階を含んで成る。

【0036】

1つの態様においては、前記アミノ酸配列は、一次構造であり、そしてその生成段階は、前記一次構造によりコードされるエネルギー条件を用いて前記一次構造から二次構造を

50

形成し、そして前記二次構造によりコードされるエネルギー条件を用いて前記二次構造から三次構造を形成する段階を包含する。もう1つの態様においては、生成段階は、前記三次構造によりコードされる異方性条件を用いて前記三次構造から四次構造を形成する段階も包含する。もう1つの態様においては、前記方法はさらに、リガンドに結合するタンパク質の立体構造の領域を同定し、そして前記タンパク質に結合するリガンドを同定するために前記領域を用いる段階を含んで成る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

本発明は、新規の単離された低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム (SK) チャンネル、中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム (IK) チャンネル (集合的には、“カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネル”)、及び単離された核酸コードSK及びIKチャンネル(すなわち、SK及びIKチャンネル核酸)を供給する。その分布、機能及び薬理学は、SK又はIKチャンネルとしてのそれらの新規種類のチャンネルを定義する。

10

【0038】

宿主細胞における単離されたSK又はIKチャンネルタンパク質コード核酸の発現は、それぞれ、低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム (SK) チャンネル又は中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム (IK) チャンネルを通してのカリウムイオン束を高め又は低める化合物を同定するために使用され得る組成物を供給する。SKチャンネルはニューロンの後高分極化 (sAHP) の遅延成分に従がうので、ニューロンsAHPの変更はてんかん性発作を阻害し、又は学習又は記憶障害を調整するための手段を提供する。

20

【0039】

カルシウム - 活性化されたSKチャンネルはまた、T - 細胞活性化にも包含される。従って、上昇する又は低下するSKチャンネル流は、免疫応答を阻害し又は強化するための手段を提供する。さらに、SKチャンネルは、ホルモン及び神経伝達物質分泌に関係している。従って、SKチャンネル流の変更は、細胞又は腺分泌を調節し、そしてそれにより、その不均衡を処理するための手段を提供する。

カルシウム - 活性化された中間チャンネル (IK) はまた、特に末梢組織において重要な生理学的役割を演じると思われる。たとえば、中間チャンネルは、赤血球細胞において報告されており、そして一部、細胞脱水、すなわち鎌状赤血球貧血において悪化される工程に参与する。

30

【0040】

本発明はまた、単離された低コンダクタンス及び中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルの、及びSK及びIKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸のための副配列にも関する。SK又はIKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、異常型転写生成物、又はSK又はIKチャンネルをコードする高められた又は低められた転写レベルの遺伝子の同定のためのプローブとしての利用性を提供する。高められた又は低められた転写についてのアッセイは、薬物スクリーニングプロトコールに使用され得る。同様にSK又はIKチャンネルタンパク質は、薬物スクリーニングアッセイにおいて、高められた又は低められた、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルの発現の免疫診断アッセイへの使用のための抗体を生成するための免疫原として使用され得る。

40

【0041】

定義

単位、接頭辞及び記号は、それらのSI許容された形で示され得る。特にことわらない限り、核酸は、5' - 3' 配向で左から右に書かれ；アミノ酸配列はアミノ - カルボキシ配向で左から右に書かれる。核酸の範囲は、その範囲を定義する数字も包含する。下記に定義される用語は、全体として明細書により十分に定義される。

【0042】

用語“核酸”“プローブ”、又は“プライマー”は、一本鎖又は二本鎖形でのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーに対する関係を包含し、そして特にことわらない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似する態様で核酸に対してハイブリダイ

50

ズする天然のヌクレオチドの既知類似体を包含する。特にことわらない限り、特定の核酸配列は、その完全な相補的配列を包含する。真核核酸は、真核細胞、好ましくは多細胞真核生物の細胞からの核酸である。

【0043】

用語“組換え”は、細胞、又はタンパク質、核酸、又はベクターに関して使用される場合、細胞に対して生来でない形に、異種核酸の導入又は生来の核酸の変更により修飾されているか、又はそのように修飾された細胞に由来する、細胞、又はタンパク質、核酸又はベクターの言及を包含する。従って、たとえば組換え細胞は、生来（非組換え）形の細胞内に見出されない遺伝子及びタンパク質を発現し、又は発現されるか又はまったく発現されない条件下で、異常に発現される生来の遺伝子を発現する。

10

【0044】

参照される核酸配列に関する用語“副配列”とは、参照される核酸よりも長さにおいて短いヌクレオチドを有する核酸からの隣接した配列に関する言及を包含する。参照されるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチド配列（集合的には、“タンパク質”）に関しては、“副配列”とは、参照されるタンパク質よりも少ないアミノ酸を有する参照されるタンパク質からの隣接した配列を言及する。

【0045】

2種の核酸又はポリペプチド配列に関する用語“同一の”又は“配列同一性”とは、特定された比較窓に対して最大の対応のために整列される場合、同じである2種の配列における残基の言及を包含する。配列同一性の百分率がタンパク質に関して使用される場合、アミノ酸残基が類似する化学性質（たとえば電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基により置換され、そして従って、分子の機能的性質を変えない、保存性アミノ酸置換によって、同一でない残基位置がしばしば異なることが理解される。

20

【0046】

配列が保存性置換において異なる場合、%配列同一性は、置換の保存性質のためにより高い方に修正するよう調節され得る。この調節を行なうための手段は、当業者に良く知られている。典型的には、これは、完全なミスマッチよりもむしろ部分としての保存性置換の評点を包含する。従って、たとえば、同一のアミノ酸が1の評点を与えられ、そして非保存性置換がゼロの評点を与えられる場合、保存性置換は、ゼロ～1の間の評点を与えられる。保存性置換の評点は、たとえばプログラムPC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA)に従って実施されるような、Meyers and Miller, Computer Appli c. Biol. Sci., 4 : 11-17 (1988)のアルゴリズムに従って計算される。

30

【0047】

“比較窓”とは、本明細書において使用される場合、配列が、2種の配列が最適に一直線状に配置された後、同じ番号の隣接する位置の参照配列に比較され得る、20～600、通常約50～約200、より通常には約100～約150個から成る群から選択された隣接する位置の数のいずれか1つのセグメントの言及を包含する。

【0048】

比較のための配列の1列整列方法は、当業界において良く知られている。比較のための配列の最適な1列整列は、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2 : 482の局部相同アルゴリズムにより；Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443の相同1列整列アルゴリズムにより；Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444の類似性方法のための研究により；それらのアルゴリズムのコンピューター記憶された実施により（Intelligenetics, Mountain View, CaliforniaによるPC/Geneプログラムでの（LUSTAL, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, USAにおけるGAP, BESTFIT, BLAST, FASTA及びTFASTAを包含するが、但しそれらだけには限定されない）、実施され得；ここで前記（LUSTALプログラムは、Higgins and Sharp (1988) Gene, 73 : 237-244 及びHiggins and Sharp (1989) CABIOS 5 : 151-153 ; Corpet, など., (1988) Nucleic Acids Research 16 : 10881-90 ; Huang, など., (1992) Computer Applications in the Biosciences

40

50

8 : 155-65 ; 及び Pearson、など., (1994) *Methods in Molecular Biology* 24 : 307-31により十分に記載されている。一列配列はまた、検閲及び手動整合によってもしばしば実施される。

【0049】

用語、ポリヌクレオチド配列の“実質的な同一性”又は“類似性”とは、ポリヌクレオチドが、標準のパラメーターを用いての上記のプログラム（好ましくは BLAST）を用いて対照配列に比較される場合、少なくとも60%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%及び最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含んで成ることを意味する。2種の核酸配列が実質的に同一である1つの表示は、第1の核酸がコードするポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。

10

【0050】

2種の核酸配列が実質的に同一であるもう1つの表示は、それらの2種の分子が“中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件”（又は“中位の条件”）下でお互いに対してハイブリダイズすることである。代表的な“中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件”とは、40%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDSの緩衝液における37℃でのハイブリダイゼーション、及び45℃での1×SSCによる洗浄を包含する。陽性ハイブリダイゼーションは、少なくとも2倍のバックグラウンドである。当業者は、他のハイブリダイゼーション及び洗浄条件が類似する緊縮性の条件を付与するために利用され得ることを容易に理解するであろう。中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下でお互いに対してハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合、まだ実質的に同一である。これは、たとえば核酸のコピーが遺伝子コードにより可能にされる最大ゴドン縮重を用いて創造される場合に生じる。

20

【0051】

ペプチドに関する用語“実質的な同一性”又は“類似性”とは、ペプチドが、特定された比較窓に対する対照配列に対して、少なくとも60%の配列同一性、通常少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは85%、最も好ましくは少なくとも90%又は95%の配列同一性を有する配列を含んで成ることを示す。好ましくは、最適な一列配列は、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48 : 443の相同性一列配列アルゴリズムを用いて実施される。2種のペプチド配列が実質的に同一である表示は、1つのペプチドが第2

30

【0052】

従って、1つのペプチドは、第2ペプチドに対して、それらの2種のペプチドが保存性置換によってのみ異なる場合、実質的に同一である。一般的に、類似性は、20の隣接した位置からのいずれかの番号から、十分な長さのコア領域配列（すなわちアミノ酸残基135~462までのrSK2との最適な一列配列の領域）における残基の番号までの長さを有する、コア配列内にある比較窓を用いて決定される。

【0053】

用語“オリゴヌクレオチド”又は“ポリヌクレオチド”プローブは、二本鎖及び一本鎖のDNA又はRNAの両者の言及を包含する。それらの用語はまた、非核酸汚染を実質的に有さない、合成的に又は組換え的に誘導された配列も言及する。

40

本明細書において使用される場合、“接触”又は“接触する”とは、直接的な物理的会合で配置することを意味する。

【0054】

“生物学的サンプル”とは、本明細書において使用される場合、IK及び/又はSKチャネルタンパク質、又はその対応するIK及び/又はSKチャネルタンパク質をコードする核酸を含む生物学的組織又は流体のサンプルである。そのようなサンプルは、唾液、羊水、血液、血液細胞（たとえば白血球細胞）、又は組織を包含するが、但しそれらだけには限定されない。生物学的サンプルはまた、組織の断片、たとえば組織学的目的のために取られた凍結断片も包含する。生物学的サンプルの例は、神経、筋肉、腺又は上皮組織からの、又

50

は免疫系（たとえばT細胞）からの細胞サンプルを包含する。生物学的サンプルは典型的には、真核生物、好ましくは多細胞真核生物、たとえば昆虫、原生動物亜界、鳥、魚、八虫類、及び好ましくは哺乳類、たとえばラット、マウス、牛、犬、テンジクネズミ、又はウサギ、及び最も好ましくは、霊長類、たとえばマカークザル、チンパンジー又はヒトから得られる。

【0055】

用語“抗体”はまた、抗原結合形の抗体（たとえば、Fab, F(ab)<sub>2</sub>）も包含する。用語“抗体”とは、分析物（抗原）を特異的に結合し、そして認識する、免疫グロブリン遺伝子又は複数の免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされるポリペプチド、又はそのフラグメントを言及する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、 $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ 、及び $\mu$ 不変領域遺伝子、及び種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子を包含する。L鎖は、 $\kappa$ ,  $\lambda$ 、又は $\mu$ のいずれかとして分類される。H鎖は、それぞれ免疫グロブリン種類、IgG, IgM, IgA, IgD及びIgEを定義する、 $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ 、又は $\alpha$ として分類される。

10

【0056】

代表的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを含んで成る。個々のテトラマーは、同一の2対のポリペプチド鎖から成り、個々の対は1つの“L”鎖（約25KD）及び1つの“H”鎖（約50~70KD）を有する。個々の鎖のN-末端は、抗原認識を主に担当する約100~110又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語可変L鎖（V<sub>L</sub>）及び可変H鎖（V<sub>H</sub>）は、それぞれ、それらのL及びH鎖を言及する。

【0057】

抗体はたとえば、損なわれていない免疫グロブリンとして、又は種々のペプチダーゼによる消化により生成された多くの十分に特徴づけられたフラグメントとして存在する。従って、たとえば、ペプシンは、F(ab)<sub>2</sub>'、すなわちそれ自体、ジスルフィド結合によりV<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1に連結されるL鎖であるFabのダイマーを生成するために、ヒンジ領域におけるジスルフィド連鎖以下に抗体を消化する。F(ab)<sub>2</sub>'は、ヒンジ領域におけるジスルフィド連鎖を破壊するために温和な条件下で還元され得、それによりF(ab)<sub>2</sub>'ダイマーをFab'モノマーに転換する。Fab'モノマーは実質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである(Fundamental Immunology, Third Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. 1993を参照のこと)。

20

【0058】

種々の抗体フラグメントは、損なわれていない抗体の消化により定義されるが、当業者は、そのようなフラグメントが化学的に又は組換えDNA方法を用いることによって、新たに合成され得ることを認識するであろう。従って、用語抗体は、本明細書において使用される場合、また抗体フラグメント、たとえば一本鎖F<sub>V</sub>、キメラ抗体（すなわち、異なった種からの不変及び可変領域を含んで成る）、ヒト適合された抗体（すなわち、非ヒト源からの相補性決定領域(CDR)を含んで成る）、及びヘテロ接合抗体（たとえば二元特異的抗体）も包含する。

30

【0059】

アミノ酸は、それらの通常知られている3文字記号又はIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推薦される一文字記号のいずれかにより、本明細書において言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、それらの通常許容される一文字コードにより言及され得る。

40

【0060】

“保存的に修飾された変異体”は、アミノ酸及び核酸配列の両者に適用する。特定の核酸配列に関しては、保存的に修飾された変異体は、同一の又は実質的に同一のアミノ酸配列をコードするか、又は実質的に同一のアミノ酸配列をコードしないそれらの核酸を言及する。遺伝子コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸はいずれかの一定のタンパク質をコードする。たとえば、コドンGCA, GCC, GCG及びGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。従って、アラニンがコドンにより特定されるあらゆる位置で、そのコドンは、コードされるポリペプチドの変更を伴わないで、記載されるその対応するコドン

50

のいずれかに変更され得る。

【0061】

そのような核酸変動は、保存的に修飾された変動の1つの種である“サイレント変動”である。ポリペプチドをコードする本明細書におけるあらゆる核酸配列はまた、核酸のあらゆる可能なサイレント変動を説明する。当業者は、核酸における個々のコドン（但し、通常、メチオニンのための唯一のコドンであるAUGを除く）が機能的に同一の分子を生成するために修飾され得ることを理解するであろう。従って、ポリペプチドをコードする核酸の個々のサイレント変動は、個々の記載される配列に内在する。

【0062】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列における単一のアミノ酸又は低%のアミノ酸を変更し、付加し、又は欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の配列への個々の置換、欠失又は付加は、変更が化学的に類似するアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす“保存的に修飾された変異体”であることを認識するであろう。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存性置換表は、当業界において良く知られている。

10

【0063】

次の6つのグループはそれぞれ、お互いのための保存性置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；及び
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

20

【0064】

また、Creighton (1984) Proteins W. H. Freeman and Companyも参照のこと。

用語“生物学的に純粋な”または“単離された”とは天然に存在する環境で発見される時に、通常伴うかまたは相互作用する構成成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。

【0065】

核酸に関しての句“～から成る群から選択された配列に対して中位の緊縮性ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする核酸によりコードされるタンパク質をコードする”とは、天然に存在するタンパク質又は天然タンパク質の誘導体をコードするが、しかし言及された条件下で、天然起源のタンパク質に対してもはやハイブリダイズしないように故意に修飾され、又は構築されるそれらの核酸を意味する。

30

【0066】

“発現ベクター”は、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にする一連の特定された核酸要素により組換え的に又は合成的に生成された核酸構造体である。発現ベクターは、プラスミド、ウィルス、又は核酸フラグメントの一部であり得る。典型的には、発現ベクターは、転写されるべき核酸、及びプロモーターを含む。

【0067】

チャンネルに影響を及ぼす化合物を試験するためのアッセイに関しての句“機能的効果”とは、チャンネルの影響下で間接的に又は直接的に存在するいずれかのパラメーターの決定を包含する。それは、イオン束及び膜電位の変化を包含すると共に、また他の生理学的効果、たとえば転写又はホルモン開放の増強又は低下も包含する。

40

【0068】

“選択的にハイブリダイズする”又は“選択的ハイブリダイゼーション”とは、特定された核酸標的配列に対して、核酸配列が、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、非-標的核酸配列へのそのハイブリダイゼーションよりも検出的に高い程度に、又は非-標的核酸の実質的な排除までハイブリダイズすることを意味する。選択的にハイブリダイズする配列は、お互い、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、及び最と

50

も好ましくは 100%の配列同一性（すなわち、相補的な）を有する。

【0069】

“配列同一性の%”は、比較窓に対して2つの最適に1列配列された配列を比較することによって決定され、ここで比較窓におけるポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適な1列配列のための対照配列（付加又は欠失を含まない）に比較される場合、付加又は欠失（すなわちギャップ）を含むことができる。その%は、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が適合された位置の数を生成するために両配列において生じる位置の数を決定し、比較窓における位置の合計数により前記適合された位置の数を割り算し、そして配列同一性の%を生成するために100を前記結果に掛け算することによって計算される。

【0070】

用語“緊縮条件”又は“緊縮ハイブリダイゼーション条件”とはプローブがその標的配列に対して、他の配列よりも検出的に高い程度にハイブリダイズするであろう条件を言及する。緊縮条件は、配列-依存性であり、そして異なった環境において異なるであろう。長い配列ほど、高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のために熱溶融点（ $T_m$ ）よりも約5℃低くあるように選択される。 $T_m$ は、相補的標的配列の50%が完全に適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度及びpH下で）である。

【0071】

典型的には、緊縮条件は、塩濃度が pH7.0~8.3 で、約 1.0M以下のNaイオン濃度、典型的には約0.01~1.0 MのNaイオン濃度（又は他の塩）であり、そして温度が短いプローブ（たとえば10~50個のヌクレオチド）のために少なくとも約30℃及び長いプローブ（たとえば50個以上の、ヌクレオチド）のために少なくとも約60℃である条件であろう。緊縮条件はまた、不安定化剤、たとえばホルムアミドの添加によっても達成され得る。典型的な低緊縮条件は、30%のホルムアミド、1 MのNaCl、1%のSDSの緩衝溶液（37℃）によるハイブリダイゼーション、及び2×SSC(50℃)での洗浄を包含する。典型的な高緊縮条件は、50%のホルムアミド、1 MのNaCl、1%のSDS溶液（37℃）によるハイブリダイゼーション及び0.1×SSC(60℃)での洗浄を包含する。

【0072】

核酸ハイブリダイゼーションアッセイ型における“緊縮ハイブリダイゼーション条件”又は“緊縮条件”は、配列依存性であり、そして異なった環境パラメーター下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションに関する多数のガイドが、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes Part 1, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays"*, Elsevier, New Yorkに見出される。緊縮条件は、配列-依存性であり、そして異なった環境下で異なるであろう。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。

【0073】

“ハイブリダイゼーション複合体”とは、2つの一本鎖核酸配列のお互いとの選択的ハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸配列を意味する。

“宿主細胞”とは、発現ベクターを含み、そしてその発現ベクターの複製又は発現を支持する細胞を意味する。宿主細胞は、原核細胞、たとえばE.コリ、又は真核細胞、たとえば酵母、昆虫、両性類、又は哺乳類細胞であり得る。

【0074】

“コンダクタンス”とは、電気的コンダクタンスを意味する。電気的コンダクタンスは、便利には、ジ-メンズ（ $1/\text{ohm} = \text{mho}$ ）で測定される。単位コンダクタンスは、120mMの対称カリウムイオン濃度を用いて例6（たとえば卵母細胞）に示される条件下でパッチクランププロトコルを用いて単一のチャンネル流を測定することによって決定される。一般的には、Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MAを参照のこと。本発明においては、“コンダクタンス”とは、言及されたSK又はIKチャンネルタンパク質の単一のホモマータンパク質の単位電気的コンダクタ

10

20

30

40

50

ンスを意味する。

【0075】

“卵母細胞において発現される場合、SKチャネルの形成を導びく”とは、多くの言及されたSKタンパク質が、SKチャネルを形成するために、単独で又は他の内因性キセノパス卵母細胞分子と共にアセンブリされる言及されたSKタンパク質の発現を包含する。キセノパス卵母細胞内での発現は、本明細書に提供される例、たとえば例3に開示される。

【0076】

“卵母細胞において発現される場合、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの形成を導びく”とは、多くの言及されたIK及びノ又はSKタンパク質が、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを形成するために、単独で又は他の内因性キセノパス卵母細胞分子と共にアセンブリされる言及されたIK及びノ又はSKタンパク質の発現を包含する。キセノパス卵母細胞内での発現は、本明細書に提供される例、たとえば例3に開示される。

10

【0077】

“免疫学的に反応性の条件”とは、特定のエピトープに対して生成される抗体のそのエピトープへの結合を、その抗体が実質的にすべての他のエピトープに結合するよりも検出的に高い程度まで可能にする条件を意味する。免疫学的に反応性の条件は、抗体結合反応の形式に依存し、そして典型的には、イムノアッセイプロトコールに利用される条件である。イムノアッセイ形式及び条件の記載については、Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York を参照のこと。

20

“タンパク質に対して反応性の抗体”とは、タンパク質が“抗体と特異的に免疫反応する”ことを意味する。

【0078】

タンパク質又はペプチドを言及する場合、用語“抗体と特異的に免疫反応する”、又は“抗体に対して特異的に結合する”とは、抗体と、その抗体の抗原結合部位により認識されるエピトープを有するタンパク質との間の結合反応を言及する。この結合反応は、タンパク質及び他の生物学的物質の異種集団の存在間での認識されるエピトープを有するタンパク質の存在の決定因子である。従って、企画されたイムノアッセイ条件下で、特定された抗体は、認識されるエピトープを有するタンパク質に結合し、そしてあったとしても、サンプルに存在する、エピトープを欠いている他のタンパク質に対して、検出的に低い程度、結合する。

30

【0079】

そのような条件下での抗体に対する特異的結合は、特定タンパク質に対するその特異性のために選択される抗体を必要とする。たとえば、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47に示されるアミノ酸配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して生ぜしめられた抗体は、低及びノ又は中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質と特異的に免疫反応するが、しかし他のタンパク質とは免疫反応しない抗体を得るために選択され得る。免疫原として使用されるタンパク質は、線状エピトープを供給するために生来のコンホメーションで存在するか又は変性され得る。

40

【0080】

種々のイムノアッセイ形式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために使用され得る。たとえば、固相ELISA イムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を選択するために通常使用される。特定の免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイ形式及び条件の記載については、Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York を参照のこと。

【0081】

“トランスフェクトされた”とは、真核細胞中への核酸の導入を意味し、ここで核酸が細胞のゲノム(すなわち、染色体、プラスミド、又はミトコンドリア DNA)中に導入され

50

、自己レプリコン中に転換され、又は過渡的に発現される（たとえば、トランスフェクトされた mRNA）。トランスフェクションは、インビボ又はエクスピボで存在する。“エクスピボ”とは、細胞又は複数細胞が得られ、又は細胞系が単離される生物の体外を意味する。エクスピボトランスフェクションに続いて、好ましくは、生物中への細胞の再注入が伴う。対照的に、“インビボ”とは、細胞が得られ、又は細胞系が単離される生物の体内を意味する。

【0082】

“抗原”とは、抗体が生成され得、そして抗体が特異的に免疫反応する物質を意味する。特定抗原と免疫学的に反応する抗体は、インビボで、又は組換え方法、たとえばファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーの選択により生成され得る。たとえば、Huseなど。(1989) Science 246 : 1275-1281 ; 及びWard, など。(1989) Nature 341 : 544-546 ; 及びVaughan など。(1996) Nature Biotechnology, 14 : 309-314 を参照のこと。

10

【0083】

特定された核酸に関する“コードする”又は“コードされる”とは、その特定されたタンパク質中への翻訳のための情報を含んで成ることを意味する。その情報は、コドンの使用により特定される。典型的には、アミノ酸配列が“普遍的”遺伝子コードを用いて核酸によりコードされる。しかしながら、いくつかの植物、動物及び菌類ミトコンドリア、細菌性マイコプラズマカプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) (Proc. Natl. Acad. Sci., 82 : 2306-2309 (1985)) 又は繊毛虫マクロヌクレウス (*Macronucleus*) に存在するような普遍的コードの変異体が、核酸がそれらの生物を用いて発現される場合、使用され得る。

20

【0084】

特定された配列からの特定された数のアミノ酸残基に関する“～からの隣接するアミノ酸”とは、対照配列におけるのと同じアミノ酸に直接的に隣接する個々のアミノ酸の同一の順序を有する特定された対照配列内からの特定された数のアミノ酸の配列を意味する。

【0085】

“低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネル”、又は“SKチャンネル”とは、電圧 - 閉鎖されておらず、約30nM ~ 10  $\mu$ M のカルシウムにより活性化され、そして例6に特定される条件を用いて、120mMの対称カリウム濃度下で測定される場合、約2 ~ 60pS、しばしば2 ~ 25pSの単位コンダクタンスを有する膜チャンネルを意味する。SKチャンネルは、サブユニットとして複数のSKチャンネルタンパク質、典型的には4個のSKチャンネルタンパク質（たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのSKチャンネルタンパク質）を含んで成る。

30

【0086】

“低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質”又は“SKチャンネルタンパク質”とは、SKチャンネルを製造するアミノ酸配列からの少なくとも10個の長さの隣接するアミノ酸のペプチドを意味する。それらのタンパク質は、十分な長さである場合、SKチャンネルのモノマーとして作用する。従って、SKチャンネルタンパク質は、SKチャンネルの機能的特徴を有するヘテロマー又はホモマータンパク質を形成する機能的特徴を有し、又はそのペプチドフラグメントであり得る。たとえば、N - 末端延長された rsk3 (配列番号43) 及び切断された rSK3 (配列番号3) の両者は、実質的に同一の機能的特徴を示す。

40

【0087】

“中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネル”、又は“IKチャンネル”とは、電圧 - 閉鎖されておらず、約30nM ~ 10  $\mu$ M のカルシウムにより活性化され、そして例6に特定される条件を用いて、120mMの対称カリウム濃度下で測定される場合、約20 ~ 80pS、より通常とは30 ~ 70pS, 40 ~ 60pS又は最も好ましくは35 ~ 40pSの単位内部コンダクタンスを有する膜チャンネルを意味する。IKチャンネルは、サブユニットとして複数

50

のIKチャンネルタンパク質、典型的には4個のIKチャンネルタンパク質(たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのIKチャンネルタンパク質)を含んで成る。

【0088】

“中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたチャンネルタンパク質”又は“IKチャンネルタンパク質”とは、IKチャンネルを製造するアミノ酸配列からの少なくとも10個の長さの隣接するアミノ酸のペプチドを意味する。それらのタンパク質は、十分な長さである場合、IKチャンネルのモノマーとして作用する。従って、IKチャンネルタンパク質は、IKチャンネルの機能的特徴を有するヘテロマー又はホモマータンパク質を形成する機能的特徴を有し、又はそのペプチドフラグメントであり得る。

【0089】

“カルシウム-活性化されたカリウムチャンネル”とは、低コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(SK)チャンネル及び中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(IK)チャンネルを意味する。

用語“ポリペプチド”、“ペプチド”、及び“タンパク質”は、アミノ酸残基のポリマーを言及するために、本明細書においては、互換的に使用される。それらの用語は、1又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的類似体であるアミノ酸ポリマー、及び天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。

“特異的に反応する”又は“特異的反応性の”とは、抗体とその抗体と“特異的に結合する”タンパク質との間の反応により示される特異性の反応を意味する。

【0090】

“ヒトゲノムライブラリー”とは、ヒトの完全なゲノムを実質的に表わす単離されたDNA分子の収集を意味す。ゲノムライブラリーの構成は、次の標準の分子生物学文献に教授されている: Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger)*; Sambrookなど. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3*; 及び *Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel など., eds., Current Protocols, & joint venture between Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel)*。

【0091】

“増幅された”とは、鋳型として少なくとも1つの核酸配列を用いての核酸配列の複数コピー又は核酸配列に対して相補的な複数コピーの構成を意味する。増幅システムは、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)システム、リガーゼ鎖反応(LCR)システム、核酸配列に基づく増幅(NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario), Q-Beta Replicaseシステム、転写に基づく増幅システム(TAS)及び鎖置換増幅(SDS)を包含する。たとえば、*Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications, Ed. D. H. Persingなど., American Society for Microbiology, Washington, D. C.* を参照のこと。

【0092】

用語“残基”又は“アミノ酸残基”又は“アミノ酸”とは、本明細書において使用される場合、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド(集合的には“ペプチド”)中に組込まれるアミノ酸を言及する。前記アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸であり、そして特にことわらない限り、天然に存在するアミノ酸と類似する態様で機能することができる天然のアミノ酸の既知類似体を包含する。

“核酸のセグメント”とは、15~約1500個の長さのヌクレオチド、又はヌクレオチド類似体のいずれか1つの核酸配列、又はそのような配列のコンカテマーを意味する。

【0093】

“機能的効果の決定”とは、細胞及び細胞膜機能により、細胞又は細胞膜に対するカリウムイオン流を高め又は低める化合物の効果を試験することを意味する。好ましくは、前記用語は、SK及びIKチャンネル活性に対する化合物の機能的効果、たとえばコンダクタンスの変更、電圧閉鎖、及び同様のことを言及する。

【0094】

10

20

30

40

50

低及び中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質

本発明は、中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された (IK) カリウムチャンネルタンパク質、及び低コンダクタンスのカルシウム - 活性化された (SK) チャンネルタンパク質 (集合的には、“カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネル”) を提供する。本発明の単離された低コンダクタンスのカルシウム - 活性化された (SK) チャンネルタンパク質は、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列のいずれか 1 つからの少なくとも N 個のアミノ酸を含んで成り、ここで前記 N は 10 ~ 600 から成る群から選択された整数のいずれか 1 つであり、そして前記配列は起源のタンパク質に対してユニークである。

## 【0095】

同様に、本発明の単離された中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された (IK) チャンネルタンパク質は、配列番号 32 及び保存的に修飾されたその変異体からの少なくとも N 個のアミノ酸を含んで成り、ここで N は 10 ~ 600 から成る群から選択された整数のいずれか 1 つであり、そして前記配列は、起源のタンパク質に対してユニークである。

## 【0096】

典型的には、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質及び特異的ペプチドは、少なくとも 15, 25, 35 又は 50 個の長さのアミノ酸、より好ましくは、少なくとも 100, 200, 300, 400 又は 500 個の長さのアミノ酸、及び最も好ましくは、十分な長さの配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 又は 47、又は保存的に修飾されたそれらの変異体である。従って、本発明は、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47 の十分な長さの配列及び副配列、及び配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47 の保存的に修飾された変異体の十分な長さの配列及び副配列を提供する。

## 【0097】

配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 又は 47 の“十分な長さ”の配列とは、それぞれ、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 又は 47 の配列を意味する。配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 又は 47 の保存的に修飾された変異体の“十分な長さ”の配列とは、それぞれ、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 又は 47 の保存的に修飾された変異体の配列を意味する。本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質及びペプチドは、薬物スクリーニングアッセイにおいて、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルの高められた又は低められた発現を評価するための免疫診断プローブの調製のための免疫原として使用され得る。

## 【0098】

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質はまた、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列のいずれか 1 つの配列からの少なくとも N 個のアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質に対しての実質的な同一性 (すなわち類似性) を有するタンパク質を包含し、ここで前記 N は 10 ~ 600 から成る群から選択された整数のいずれか 1 つである。

## 【0099】

一般的に、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、少なくとも 50 個、典型的には少なくとも 100 個、好ましくは少なくとも 200 個、より好ましくは少なくとも 300 個、及び最も好ましくは少なくとも 400 個の長さのアミノ酸残基である。典型的には、カルシウム - 活性化されたカリウム SK 又は IK チャンネルタンパク質の実質的に類似する又は保存的に修飾された変異体は、好ましくは、多細胞真核生物、たとえば昆虫、原生動物、鳥、魚、両生類、八虫類又は哺乳類からの真核タンパク質である。

## 【0100】

配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47 から選択された配列を有する SK チャンネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体である SK チャンネルタンパク質は、免疫学的に反応する条件下で、配列番号 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43 及び 47 から成る群から選択された SK チャンネルタンパク質に対して反応性の免疫

10

20

30

40

50

グロブリンと特異的に反応するであろう。

【0101】

同様に、配列番号32からの選択された配列を有するIKチャンネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるIKチャンネルタンパク質は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号32のIKチャンネルタンパク質に対して反応性の免疫グロブリンと特異的に反応するであろう。種々のイムノアッセイ形式が、そのような免疫学的に特異的な反応、たとえばELISA、競争イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、間接的免疫蛍光アッセイ及び同様のものを評価するために使用され得る。

【0102】

他方では、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43及び47から選択された配列を有するSKチャンネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるSKチャンネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43及び47から成る群から選択されたSKチャンネルタンパク質のコア配列(又は“コア領域”)内の比較窓に対して60%~100%の類似性の値のいずれか1つを有するアミノ酸配列を含んで成るであろう。配列番号32の配列を有するIKチャンネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるIKチャンネルタンパク質は、IKチャンネルタンパク質 hIK1のコア配列(又は“コア領域”)内の比較窓に対して60%~100%の類似性の値のいずれか1つを有するアミノ酸配列を含んで成るであろう。

【0103】

従って、類似性は、コア領域又はその副配列への参照により決定される。hSK1(配列番号1)のコア領域は、アミノ酸残基124~451(配列番号27)である。rSK2(配列番号2)のコア領域は、アミノ酸残基135~462である。切断されたrSK3(配列番号3)のコア領域は、アミノ酸残基109~436である。N-末端延長されたrSK3(配列番号43)のコア領域は、288~615である。rSK1(配列番号4)のコア領域は、前述の領域と整合する領域により定義される。hSK2(配列番号19)のコア領域は、アミノ酸残基134~461である。

【0104】

切断されたhSK3(配列番号20)のコア領域は、アミノ酸残基109~436である。N-末端延長されたhSK3(配列番号47)のコア領域は238~465である。従って、配列番号1~4, 19, 20, 43及び47のコア領域は、アミノ近位端でアミノ酸残基副配列LSDYALIFGM(配列番号17)及びカルボキシル近位端でQRKFLQAIHQ(配列番号18)を含み、そしてそれらにより定義される。hIK1(配列番号32)のコア領域は、アミノ酸残基25~351である。前記コア領域の副配列は、10~配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47のコア配列の長さまでの数のいずれか1つの長さを有する。好ましくは、SK又はIKチャンネルタンパク質は、コア配列内からの20の隣接したアミノ酸の比較窓に対して少なくとも90%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成る。

【0105】

類似性はまた、カルシウム-活性化されたチャンネルタンパク質の機能的特徴によっても決定される。たとえば、本発明は、発現される場合、実質的に同一の流れを有するいくつかのSK3アミノ酸配列を供給する。rSK3をコードするcDNAは、2種の異なった形で単離されて来た。第1の配列番号43をコードする配列番号44は、内因性rSK3又はN-末端延長されたrSK3である。第2の配列番号3をコードする配列番号16は、そのN-末端で配列番号43に対して切断される。

【0106】

切断されたrSK3タンパク質(配列番号3)はまた、異なったC-末端を有し、ここで配列番号43の最後の9個のアミノ酸が5個の異なったアミノ酸により置換されている。それらの配列はN-及びC-末端の両方で異なるけれども、それらは実質的に同一の流れを発現する。N-末端延長され、そして切断されたSK3はその同じ、流れを発現するので、それ自体チャンネル機能に必須ではないが、しかしもっともらしいN-末端延長は、細胞に

10

20

30

40

50

おける特定の位置へのタンパク質の標的化に關与した。

【0107】

同様に、hSK3のための次の2種のcDNAが同定されている：N-末端延長されたhSK3（配列番号47をコードする配列番号48）及び切断されたhSK3（配列番号20をコードする配列番号22）。さらに、類似するN-末端延長がSK2に關して存在する。SK2及びSK3の兩者に關するマウスからのゲノム配列は、兩者が、機能的流れの発現が示されているアミノ酸配列と隣接する延長された読み取り枠を有することを示す。従って、實質的に同一のSKチャンネルタンパク質、又は保存的に修飾されたその変異体はまた、機能的特徴に基づいても同定される。

【0108】

本発明は、機能的SK及びIKチャンネルタンパク質及びその副配列を提供する。本発明の機能的SKチャンネルは、2～60pS、より通常には5～25pSの単位コンダクタンス、及びSKチャンネルを製造するSKチャンネルタンパク質の個々に關して、40～100Kd、より通常には50～80KDの分子量を有する。機能的IKチャンネルは、20～80pS、及びしばしば30～60pSの単位コンダクタンスを有する。単位コンダクタンスは便利には、裏がえし（inside-out又はoutside-out）パッチクランプ形状を用いて決定され得る。

【0109】

それらの形状は、イオンチャンネルの生物物理（運動学、導電率、選択性、透過及びブロックの機構）の研究のために特に示される。パッチクランプ方法は当業界において良く知られている。たとえば、Franciolini, Patch Clamp technique and biophysical study of membrane Channels, *Experientia*, 42 (6) : 589-594 (1986) ; 及びSakmann など., Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes, *Annual Review of Physiology*, 46 : 455-472 (1984)を参照のこと。

【0110】

本発明の範囲内の単離されたSK及びIKタンパク質は、十分な長さであり、そして通常系からの細胞において発現される場合、それぞれ、SKチャンネル又はIKチャンネルの徴候である機能性及び薬理学を定義するタンパク質を包含する。通常系は、その生来の状態において（たとえば、組換えSK又はIKチャンネルを発現しない）、低いか又は興味ない電気活動を有する細胞系、たとえばCHO細胞系である。

【0111】

たとえば、対照細胞（本発明の推定上のSKチャンネルの発現を有さない）及び実験細胞（推定上のSKチャンネルを発現する）が、本明細書に開示される実施例に供給されるように、電気生理学的パラメーターの測定のための標準である条件下で維持される。個々の細胞が、カルシウムイオノフォアにより処理される。典型的なイオノフォアは、イオノマイシン（Sigma Chemical Co.）又はA23187（Sigma Chemical Co.）のような標準の化合物を包含するが、但しそれらだけには限定されない。細胞はしばしば、約1  $\mu$ Mの濃度でイオノフォアにより処理される。

【0112】

続いて、細胞の電気生理学測定が、カリウム流の誘発（たとえば、ラジオトレーサーにより）、又は細胞のコンダクタンスの変化（たとえばパッチクランプにより）、又は電圧の変化（たとえば、蛍光色素により）を検出するために取られる。存在するなら、イオンチャンネルは、カルシウム誘発された変化により示され、続いての試験が、本発明のSKチャンネルとしてチャンネルを特徴づけるために使用される。好ましくは、少なくとも2種の特徴が決定され、より好ましくは少なくとも3又は4種の特徴が決定される。本発明のSKチャンネルの特徴は、本明細書に十分に開示されている。

【0113】

たとえば、本発明のSKチャンネルを発現する細胞は、2～30pS、しばしば2～25pSのコンダクタンスを有することができ、しかし必ずしも必要ではないが、10pM～約100nMの範囲でアミンによるブロックを示すことができ、約40～80KDのSKチャンネルタンパク質を含んで成ることができ、本明細書に開示される典型的なSKチャンネルタンパク質のコア領域との

10

20

30

40

50

一列配列において、少なくとも60%、及びより好ましくは少なくとも70%、80%、90%又は95%の配列類似性を示すことができ、そして本明細書に開示される典型的なSK又はIKチャンネル(たとえば、配列番号1~4, 19, 20, 32, 43及び47)に対して生ぜしめられた抗体と、免疫学的に反応する条件下で特異的に反応することができる。そのような標準の方法は、本発明のSKタンパク質の同定を助ける。IKチャンネルを発現する細胞は、同じ機能的特徴を有するが、但しそれらはCTXによりブロックされるが、しかしIBX又はアパミンによってはブロックされず、そして20~80pS、しばしば35~40pSの単位コンダクタンスを有する。

#### 【0114】

約50個以下の長さのアミノ酸のSK又はIKチャンネルタンパク質の固相合成は、不溶性支持体への配列のC-末端アミノ酸の結合、配列における残るアミノ酸の続く連続的な付加により達成され得る。固相合成のための技法は、Burany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptides Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963)、及びStewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)により記載されている。より長い長さのSK又はIKチャンネルタンパク質は、短いフラグメントのアミノ及びカルボキシ末端の縮合により合成され得る。カルボキシ末端の活性化によるペプチド結合の形成方法(たとえば、カップリング試薬N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドの使用による)は、当業者に知られている。

#### 【0115】

##### カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸の獲得

本発明は、上記でより十分に論じられたように、カルシウム - 活性化されたSKチャンネルタンパク質("SKチャンネルタンパク質核酸")又はカルシウム - 活性化されたIKチャンネルタンパク質("IKチャンネルタンパク質核酸")をコードする、RNA, DNA又はそれらのキメラの単離された核酸を供給する。本発明の核酸は、たとえばmRNAのレベルでの欠損の検出において、遺伝子における突然変異(たとえば、置換、欠失又は付加)の検出において、薬物スクリーニングアッセイにおけるSK又はIKチャンネルのアップレギュレーションのモニターのために、又は抗体の調製において免疫原として使用するためのSK又はIKチャンネルタンパク質の組換え発現のために、プローブとして使用され得る。

#### 【0116】

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸は、標準の組換え又は合成技法を用いて製造され得る。本発明において供給されるSK又はIKチャンネルタンパク質のアミノ酸配列により、当業者は、機能的に等しい核酸、たとえば同じタンパク質をコードする核酸を含む種々のクローンを容易に構成することができる。それらの目的を達成するためのクローニング方法、及び核酸の配列を確かめるための配列決定方法は、当業界において良く知られている。

#### 【0117】

適切なクローニング及び配列決定技法の例、及び多くのクローニング実験を通して当業者を方向づけるのに十分な説明が、次の文献に見出される: Sambrook、など., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), *Methods in Enzymology*, Vol. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Berger and Kimmel(eds.), San Diego; Academic Press, Inc. (1987)), 又は *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, など. (eds), Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)).

#### 【0118】

生物学的試薬及び実験装置の製造業者からの製品情報はまた、既知の生物学的方法において有用な情報も提供する。そのような製造業者は次の通りである: SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R & D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes C

10

20

30

40

50

orp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Invitrogen, San Diego, CA、及びApplied Biosystems (Foster City, CA)、並びに、当業者に知られている多くの他の広告源。

【0119】

1. 核酸ハイブリダイゼーションによるSK及びIKチャンネルタンパク質の単離

本発明の単離された核酸組成物は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、又は種々の組合せのハイブリッドのいずれにせよ、生物学的源から単離され、又はインビトロで合成される。デオキシヌクレオチドは、いずれかの適切な方法、たとえば適切な配列のクローニング及び制限方法、又は次の方法による直接的な化学合成により調製され得る：Narangなど., Meth. Enzymol. 68 : 90-99 (1979) のホスホトリエステル方法；Brownなど., Meth. Enzymol. 68 : 109-151 (1979) のホスホジエステル方法；Beaucageなど., Tefra. Lett., 22 : 1859-1862 (1981) のジエチルホスホラミジット方法；Needham-VanDevanterなど. (1984) Nucleic Acids Res., 12 : 6159-6168 に記載されるような自動合成機を用いての、Beaucage and Caruthers (1981), Tetrabedron Letts., 22 (20) : 1859-1862により記載される固相ホスホラミジットトリエステル方法；及びアメリカ特許第 4,458,066号の固相支持方法。

10

【0120】

化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、相補的配列によるハイブリダイゼーションにより、又は鋳型として一本鎖を用いてのDNAポリメラーゼによる重合により二本鎖に転換され得る。当業者は、DNAの化学合成は約100個の塩基の配列に限定されるが、より長い配列が短い配列の連結により得られることを認識するであろう。

20

【0121】

配列番号1のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGCCGGGTCCCCGGGCGGCCTGC(配列番号5)及びTCACCCGAGTCCGAGGGGGCCAC(配列番号6)を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号2のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCAGCTGCAGGTACAACGGG(配列番号7)及びCTAGCTACTCTCAGATGAAGTTGG(配列番号8)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。

30

【0122】

配列番号43のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCTCCTGCAAATACAGCGGT(配列番号9)及びTTAGCAACTGCTTGAAGTTG(配列番号10)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号4のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：TCAGGGAAGCCCCGACCGTCAAGT(配列番号11)及びTCACCCACAGTCTGATGCCGTGGT(配列番号12)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号19のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCAGCTGCAGGTACAACG(配列番号23)及びCTAGCTACTCTCTGATGAAGTTG(配列番号24)を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。

40

【0123】

配列番号20(hSK3)のSKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCTCTGCAAGTATAGC(配列番号25)及びTTAGCAACTGCTTGAAGTTGTG(配列番号26)を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号32のIKチャンネルタンパク質をコードする核酸は、配列：(配列番号38及び39)及び(配列番号40及び41)を有する単離された核酸プライマー対を用いてのヒト膵臓cDNAライブラリーの増幅により得られる。

【0124】

本発明の単離された核酸は、クローン化され、又はインビトロ方法、たとえばポリメラーゼ鎖反応(PCR)、リガーゼ鎖反応(LCR)、転写に基づく増幅システム(TAS)、自己維持された配列複製システム(SSR)により増幅され得る。広範囲の種類のカローニング及びイ

50

ンビトロ増幅方法は、当業者に良く知られている。多くのクローニング試験を通して当業者を方向づけるのに十分なそれらの技法及び説明の例は、次のものに見出される：

【0125】

Berger and Kimmel. Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, inc., San Diego, CA (Berger) ; Sambrook など. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook et al.) ; Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel など., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel) ; Cashion など., アメリカ特許第 5,017,478号 ; 及び Carr. ヨーロッパ特許第 0,246,864号。

10

【0126】

インビトロ増幅方法を通して当業者を方向づけるのに十分な技法の例は、次のものに見出される：Berger, Sambrook, and Ausubel, as well as Mullis など., (1987) アメリカ特許第 4,683,202号、PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis など. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990)(Innis) ; Amheim & Levinson (October 1, 1990) C & EN 36-47 ; The Journal Of NIH Research (1991) 3 : 81-94 ; (Kwoh など. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173 ; Guatelli など. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874 ; Lomell など. (1998) J. Clin. Chem., 35 : 1826 ; Landegren など., (1988) Science. 241 : 1077-1080 ; Van Brunt (1990) Biotechnology, 8 : 291-294 ; Wu and Wallace, (1989) Gene, 4 : 560 ; 及び Barringer など. (1990) Gene, 89 : 117 。

20

【0127】

SKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号 1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20及びそれらの副配列から成る群から選択されたSKチャンネルタンパク質をコードする核酸配列を含んで成る。好ましい態様においては、SKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号 13 , 14 , 15 , 16 , 21 , 22及びそれらの副配列から成る群から選択される。

【0128】

IKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、IKチャンネルタンパク質をコードする核酸配列、たとえば配列番号 32及びその副配列を含んで成る。好ましい態様において、IKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号 31及びその副配列である。

30

【0129】

本明細書において同定される単離された核酸の他に、本発明はまた、配列番号 1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 32 , 43、及び 47及びそれらの副配列から成る群から選択されたタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で選択的にハイブリダイズする、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする他の単離された核酸も包含する。一般的に、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、コア領域をコードする配列番号 13 , 14 , 15 , 16 , 21 , 22 , 31 , 44又は 48又はその副配列からの核酸配列に対して、少なくとも中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするであろう。

40

【0130】

他方では、又はさらに、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、コア領域の長さに対して少なくとも 60% , 70% , 80%又は 90%の類似性のアミノ酸配列をコードするであろう。便利には、コア領域の副配列をコードする核酸は、配列番号 13 , 14 , 15 , 16 , 21 , 22 , 32 , 44又は 48から得られ、そして 15 ~ 400個の長さのヌクレオチド、及び一般的には少なくとも 250又は 300個の長さのヌクレオチドの少なくともいづれか 1つであり ; 好ましくは核酸は完全なコア配列をコードするであろう。カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする核酸配列又は

50

その副配列は、少なくともN'個の長さのヌクレオチドを含んで成り、ここでN'は18~2000から成る群から選択された整数のいずれか1つである。従って、本発明の核酸は、ゲノムDNA、及びSK及びIKチャンネルタンパク質をコードする核転写体を含んで成る。

#### 【0131】

SK又はIKチャンネルタンパク質をコードする核酸が核酸プローブとして使用される予定である場合、検出できるラベルにより核酸をラベルすることがしばしば所望される。ラベルは、当業者に良く知られている多くの手段により組込まれ得る。しかしながら、好ましい態様においては、ラベルは、核酸の調製における増幅段階の間、同時に組込まれる。従って、たとえば、ラベルされたプライマー又はラベルされたヌクレオチドによるポリメラーゼ鎖反応(PCR)は、ラベルされた増幅生成物を提供するのであろう。もう1つの好ましい態様においては、ラベルされたヌクレオチド(たとえばフルオレセイン-ラベルされたUTP及び/又はCTP)を用いての転写増幅は、転写された核酸中にラベルを組込む。

10

#### 【0132】

他方では、ラベルは、元の核酸サンプル(たとえば、mRNA、ポリA mRNA、cDNA、等)に対して、又は増幅が完結された後、増幅生成物に対して直接的に付加され得る。核酸にラベルを結合する手段は、当業者に良く知られており、そしてたとえば核酸のリン酸化、及びサンプル核酸をラベル(たとえば蛍光団)に連結する核酸リンカーの続く結合(連結)によるニックトランスレーション又は末端-ラベリング(たとえば、ラベルされたRNAによる)を包含する。

#### 【0133】

本発明への使用のための適切な検出できるラベルは、分光、放射性同位体、光化学、生化学、免疫化学、電気、光学又は化学的手段により検出できるいずれかの組成物を包含する。本発明における有用なラベルは、ラベルされたストレプトタピジン接合体により染色するためのビオチン、磁気ビーズ、蛍光色素(たとえば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン蛍光タンパク質、及び同様のもの)、放射性ラベル(たとえば、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、又は<sup>32</sup>P)、酵素(たとえば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びELISAに通常使用される他のもの)、及び比色ラベル、たとえばコロイド状金又は着色されたガラス又はプラスチック(たとえば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、等)ビーズを包含する。そのようなラベルの使用を教授する特許は、アメリカ特許第3,817,837号;第3,850,752号;第3,939,350号;第3,996,345号;第4,277,437号;第4,275,149号及び第4,366,241号を包含する。

20

30

#### 【0134】

そのようなラベルを検出するための手段は、当業者に良く知られている。従って、たとえば、放射性ラベルは、写真フィルム又はシンチレーションカウンターを用いて検出され得、蛍光マーカーは放された光を検出するために光検出器を用いて検出され得る。酵素ラベルは典型的には、酵素に基質を供給し、そして基質に対する酵素の作用により生成される反応生成物を検出することによって検出され、そして比色ラベルは着色されたラベルを単純に可視化することによって検出される。

#### 【0135】

プローブは、特定の組織(たとえば、心臓、脳、脾臓)を包含する興味あるいずれかの源、及び動物源、たとえばラット、ヒト、鳥、等からゲノム又はcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用される。スクリーニング技法は、当業界において知られており、そして上記で引用された一般的テキスト、たとえばSambrook and Ausubelに記載されている。

40

#### 【0136】

### 2. イムノスクリーニングによるSK及びIKチャンネルタンパク質の単離

本明細書において請求されるタンパク質の新規形を同定するために核酸プローブを用いる他に、発現ライブラリーをプローブするために抗体を使用することが可能である。これは、良く知られている技法である(Young and Davis, 1982 Efficient isolation of genes using antibody probes Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 1194-1198を参照のこ

50

と)。一般的に、cDNA発現ライブラリーは、市販のキットから、又は容易に入手できる成分を用いて調製され得る。ファージベクターは好ましいが、しかし種々の他のベクターがタンパク質の発現のために利用できる。

#### 【0137】

そのようなベクターは、酵母、動物細胞及びキセノパス卵母細胞を包含するが、但しそれらだけには限定されない。標的タンパク質により富化された源からmRNAを選択し、そして次にベクター中に連結され、そしてイムノスクリーニングのためにライブラリー宿主細胞を形質転換するcDNAを創造する。スクリーニングは、細胞上の特定のタンパク質に結合され、又は固体支持体、たとえばニトロセルロース又はナイロン膜上に固定される抗体の結合及び可視化を包含する。陽性クローンが、均質に精製するために選択され、そして単離されたcDNAが所望する宿主細胞における発現のために調製される。この技法の一般的な再考は、Methods of Cell Biology Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Ed. DJ Asai pp. 369-382, 1993に見出され得る。

10

#### 【0138】

カルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質を得るために選択する場合、完全なタンパク質又はその一部を選択するための抗体が使用され得る。適切なペプチドは、GHRRALFEKRRKRLSDY (配列番号28)、FTDASSRSIGAL (配列番号29)、ARKLELTKAEKHVHNFMMDTQLTKR (配列番号30) 又は ARKLELTKAEKHVHNFMMDTQLTK (配列番号42) を包含するが、但し、それらだけには限定されない。

#### 【0139】

#### 核酸アッセイ

本発明はまた、遺伝子転写物 (たとえば核RNA, mRNA) についてアッセイすることによってSK又はIKチャネルタンパク質発現を検出し、そしてノ又は定量化するための方法も提供する。このアッセイは、正常な遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在について、異常遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在について、又は正常又は異常SK又はIKチャネルタンパク質遺伝子生成物の転写レベルの定量化のために存在することができる。

20

#### 【0140】

好ましい態様において、核酸アッセイは、試験されるべき生物から単離された核酸のサンプルにより実施される。最も単純な態様においては、そのような核酸サンプルは、生物学的サンプルから単離された全mRNAである。核酸 (たとえば、ゲノムDNA 又はmRNAのいづれか) は、当業者に良く知られている多くの方法のいづれかに従って、サンプルから単離される。

30

#### 【0141】

中でも核酸アッセイに使用するための全DNA 又はmRNAを単離するための方法は、当業者に良く知られている。たとえば、核酸の単離及び精製方法は、Chapter 3 of Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part 1, Theory and Nucleic Acid Preparation, P. Tijssen, ed. Elsevier, N. Y. (1993) に詳細に記載される。当業者は、SK又はIKチャネルタンパク質をコードする遺伝子のコピー数の変更が検出される場合、ゲノムDNA が好ましくは、単離されることを認識するであろう。逆に言えば、遺伝子又は複数遺伝子の発現レベルが検出される場合、好ましくは、RNA (mRNA) が単離される。

40

#### 【0142】

時おり、ハイブリダイゼーションの前、核酸サンプルを増幅することが所望される。当業者は、どんな増幅方法が使用されても、定量結果が所望される場合、増幅された核酸の相対的頻度を維持し又は調節する方法を使用することに注意が払われるべきであることを認識するであろう。“定量”増幅の方法は当業者に良く知られている。たとえば、定量PCRは、同じプライマーを用いて、既知量の対照配列を同時に同時増幅することを包含する。これは、PCR反応を検量するために使用され得る内部標準を提供する。次に、高密度アレイは、増幅された核酸の定量化のために内部標準に対して特異的なプローブを包含する。定量PCRのための詳細なプロトコールは、PCR Protocols, A Guide to Methods and

50

Applications, Innisなど., Academic Press, Inc. N. Y. (1990)に供給されている。

【0143】

SKチャンネルタンパク質をコードする核酸配列の存在を検出するための方法は一般的に：  
(a) 配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43及び47から成る群から選択されたSKチャンネルタンパク質をコードする核酸配列に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと生物学的サンプルとを、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；(b) ハイブリダイゼーション複合体を形成するために、SKチャンネルタンパク質をコードする核酸への前記プローブの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることを含んで成り、ここで前記ハイブリダイゼーション複合体の検出がサンプルにおけるSK核酸配列の存在の徴候である。IKチャンネルタンパク質の検出は、配列番号32のIKチャンネルタンパク質をコードする核酸配列に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを用いて類似する態様で達成される。

10

【0144】

プローブの核酸セグメントは、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 44及び48、並びにそれらの相補的配列から成る群から選択されたSKチャンネルをコードする核酸からの少なくともN'の長さの隣接するヌクレオチドの副配列である。前記N'は、15~1500の個々の整数から成る群から選択された整数のいずれか1つである。IKチャンネルタンパク質の存在を検出するためには、核酸セグメントは、配列番号31のIKチャンネルをコードする核酸からの少なくともN'の長さの隣接するヌクレオチドの副配列である。参照核酸からの“隣接するヌクレオチド”とは、参照核酸におけるのと同じ順序を有し、且つ同じヌクレオチドに直接的に隣接する(すなわち、付加又は欠失を伴わない)ヌクレオチドの配列を意味する。典型的には、核酸セグメントは、少なくとも18個の長さのヌクレオチドである。核酸プローブの好ましい長さは、24~200個の長さのヌクレオチドである。

20

【0145】

特に好ましい態様においては、核酸セグメントは、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質からのコア領域をコードする核酸に由来する。便利には、コア領域をコードする核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44, 48及びそれらの相補的配列から成る群から選択された核酸の副配列である。通常、及び特に、交差-種ハイブリダイゼーションに関しては、核酸セグメントは、コア領域内からのアミノ酸配列をコードし、そして少なくとも250個の長さのヌクレオチドであり、最とも好ましくは、コア領域のすべてをコードし、そして/又は中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下で標的配列に対してハイブリダイズするであろう。

30

【0146】

当業者は、プローブの核酸配列が、標的物へのその核酸セグメントの選択的ハイブリダイゼーションを妨害しないように選択されるであろうことを認識するであろう。従って、たとえば、核酸セグメントに結合されるいずれかの追加のヌクレオチドは一般的に、緊縮条件下で、核酸標的物(可能性ある誤った陰性)にも、SK又はIKチャンネルタンパク質又はペプチドをコードしない核酸(可能性ある誤った陽性)にも、選択的にハイブリダイズしないように選択されるであろう。選択性及び特異性を確かめるために負及び正の対照の使用は、当業者に知られている。一般的に、プローブの長さは、所望する結果を達成するために必要な最少の長さに維持されるべきである。SK又はIKチャンネルタンパク質又はペプチドをコードする核酸(すなわち、それぞれ“SKチャンネルタンパク質核酸”又は“IKチャンネルタンパク質核酸”)の長さは、前記で十分に論ぜられたが、しかし好ましくは、少なくとも30個の長さのヌクレオチドである。

40

【0147】

種々の核酸ハイブリダイゼーション形式が当業者に知られている。たとえば、通常形式は、サンドイッチアッセイ及び競争又は置換アッセイを包含する。ハイブリダイゼーション技法は一般的に、Bergen and Kimmel, (1987)、前記；“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach” (Hames, B. D. and Higgins, S. J. (eds.), IRL Press, 1985；Gall and Pardue, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 63 : 378-383 (1969))；及び

50

John, Burnsteil and Jones (Nature, 223 : 582-587 (1969))に記載されている。

【0148】

サンドイッチアッセイは、核酸配列を検出し、又は単離するために商業的に有用なハイブリダイゼーションアッセイである。そのようなアッセイは、固体支持体に共有固定される“捕獲”核酸、及び溶液における、ラベルされた“シグナル”核酸を用いる。生物学的サンプルは、標的核酸を供給するであろう。“捕獲”核酸プローブ及び“シグナル”核酸プローブは、標的核酸とハイブリダイズし、“サンドイッチ”ハイブリダイゼーション複合体を形成する。効果的であるためには、シグナル核酸は、捕獲核酸とハイブリダイズすることができない。

【0149】

現場ハイブリダイゼーションにおいては、標的核酸は、続く解釈及び分析のために細胞形態を保持しながら、細胞内でのハイブリダイゼーションのために利用できるように、その細胞周囲から遊離される。次の文献が、現場ハイブリダイゼーションの技術の概観を提供する：Singerなど., *Biotechniques* 4 (3) : 230-250 (1986) ; Haase など., *Methods in Virology*, Vol. VII, pp. 189-226 (1984) ; Wilkinson, “The theory and practice of in situ hybridization” In : *In situ Hybridization*, Ed. D. G. Wilkinson, IRL Press, Oxford University Press, Oxford ; 及び *Nucleic Acid Hybridization : A Practical Approach*, Ed. Hames, B. D. and Higgins, S. J., IRL Press (1987) 。

【0150】

典型的には、ラベルされたシグナル核酸は、ハイブリダイゼーションを検出するために使用される。相補的核酸又はシグナル核酸は、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドの存在を検出するために典型的に使用されるいくつかの方法のいずれか1つによりラベルされ得る。最も通常の検出方法は、 $^3\text{H}$  ,  $^{125}\text{I}$  ,  $^{35}\text{S}$  ,  $^{14}\text{C}$  又は  $^{32}\text{P}$  - ラベルされたプローブ又は同様のものによるオートラジオグラフィーの使用である。他のラベルは、ラベルされた抗体に結合するリガンド、蛍光団、化学発光剤、酵素、及びラベルされたりガンドのための特異的結合対メンバーとして作用することができる抗体を包含する。

【0151】

ラベルはまた、ハイブリダイゼーション複合体の間接的検出も可能にする。たとえば、ラベルがハプテン又は抗原である場合、サンプルは抗体を用いることによって検出され得る。それらのシステムにおいては、シグナルは、抗体に蛍光又は酵素分子を結合することによって、又は多くの場合、放射性ラベルへの結合により生成される。(Tijssen, “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology” (Burdon, van Knippenberg (eds.), Elsevier, pp. 9-20 (1985)) 。

【0152】

本発明の核酸に使用される検出可能ラベルは、前記で論ぜられたように、当業者に知られている多くの手段のいずれかにより組込まれ得る。そのようなラベルを検出する手段は、当業者に良く知られている。

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を増幅する核酸増幅システムの使用により増強され得る。そのようなシステムの例は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)システム及びリガーゼ鎖反応(LCR)システムを包含する。当業者において知られている他の方法は、核酸配列に基づく増幅(NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario)及びQ-Beta Replicaseシステムである。

【0153】

当業者は、異常な発現レベル又は異常な発現生成物(たとえば、突然変異誘発された転写体、切断された又はナンセンスタンパク質)が、正常な発現レベル及び正常な発現生成物への比較により同定されることを認識するであろう。正常な発現レベル又は正常な発現生成物は、当業者に知られている標準方法に従って、いずれか特定集団、副集団、又は生物グループに関して決定され得る。

【0154】

10

20

30

40

50

典型的には、これは、健康な生物（すなわち、コンダクタンス及びカルシウム感受性の  
ような性質により示されるような機能的SK又はIKチャンネルタンパク質を有する生物）を同  
定し、そしてSK又はIKチャンネルタンパク質遺伝子（本明細書に記載されるような）の発現  
レベルを測定し、又は典型的な（正常な）配列変動を得るために、遺伝子、mRNA又は逆転  
写されたcDNAを配列決定することを包含する。分子遺伝学に使用される標準の統計学的方  
法の適用は、発現の基線レベル、及び正常な遺伝子生成物、並びにそのような基線レベル  
からの有意な偏差の決定を可能にする。

【0155】

#### 核酸アッセイキット

本発明の核酸は、本発明のSK又はIKチャンネルをコードする正常な遺伝子又は遺伝子生成  
物の存在又は不在を、SK又はIKチャンネルをコードする異常な遺伝子又は遺伝子生成物の存在  
又は不在について、又は正常又は異常なSK又はIKチャンネルタンパク質遺伝子生成物の転  
写レベルの定量化を、生物学的サンプルにおいて決定するために使用され得るキットに含  
まれ得る。

10

【0156】

キットは典型的には、本発明のアッセイを実施するための核酸プローブの安定した調製  
物を含む。さらに、キットはまた、標的のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタ  
ンパク質又はカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質核酸へのプローブの  
ハイブリダイゼーションのための、乾燥形又は液体形のいずれかでのハイブリダイゼーシ  
ョン溶液、所望しない及びハイブリダイズされなかった核酸の洗浄及び除去のための溶液  
、ハイブリダイゼーションを検出するための基質、及び/又はアッセイを実施し、そして  
解釈するための説明書を包含することができる。

20

【0157】

#### 核酸の発現

本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質をコードする核酸が単離され、そしてクローン化  
されると、組換え的に構築された細胞、たとえば細菌、酵母、昆虫（特に、バキュロウィ  
ルスベクターを用いる）、及び哺乳類細胞において所望するタンパク質を発現することが  
できる。“組換えタンパク質”は、タンパク質を発現することができるDNAの内因性コピ  
ーを、それらの生来の形で有さない細胞を用いて生成されたタンパク質である。細胞は、  
それらが適切な単離された核酸配列（たとえば、SK又はIKチャンネルタンパク質核酸を含ん  
で成るベクター）の導入により遺伝的に変更されているので、組換えタンパク質を生成す  
る。

30

【0158】

当業者は、SK又はIKチャンネルタンパク質をコードするDNAの発現のために利用できる多  
くの発現システムに知識があることが予測される。原核生物又は真核生物におけるタンパ  
ク質の発現について知られている種々の方法を詳細に記載する試みは行なわれないであ  
ろう。

【0159】

簡単に要約すると、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質を  
コードする天然又は合成核酸の発現は典型的には、プロモーター（構成的又は誘発性のい  
づれかである）にDNA又はcDNAを操作可能的に連結し、続いて発現ベクター中に組込むこ  
とによって達成されるであろう。ベクターは、原核生物又は真核生物のいずれかにおける  
複製及び組込みのために適切である。典型的な発現ベクターは、転写及び翻訳ターミネ  
ーター、開始配列、及びSK又はIKチャンネルタンパク質をコードするDNAの発現の調節のため  
に有用なプロモーターを含む。クローン化された遺伝子の高いレベルの発現を得るため  
には、転写を方向づけるための強いプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位、  
及び転写/翻訳ターミネーターを少なくとも含む発現ベクターを構成することが所望され  
る。

40

【0160】

当業者は、修飾がその生物学的活性を低めないで、SK又はIKチャンネルタンパク質に対し

50

て行なわれ得ることを認識するであろう。いくつかの修飾が、クローニング、発現、又は融合タンパク質中への標的分子の組込みを促進するために実施され得る。そのような修飾は、当業者に良く知られており、そしてたとえば、開始部位を供給するためにアミノ末端で付加されるメチオニン、又は便利に配置された制限部位、又は終結コドン、又は精製配列を創造するためにいずれかの末端上に配置される追加のアミノ酸（たとえばポリHis）を含む。

#### 【0161】

##### 1. 原核生物における発現

E. コリにおいてこの目的のために適切な調節領域の例は、Yanofsky, Bacteriol. 158 : 1018-1024 (1984) により記載されるようなE. コリトリプトファン生合成路のプロモーター及びオペレーター領域、及びHerskowitz and Hagen, Ann. Rev. Genet., 14 : 399-445 (1980) により記載されるようなファージの左方向プロモーター (P<sub>L</sub>) である。E. コリにおいてトランスフェクトされたDNA ベクターにおける選択マーカーの包含はまた有用である。そのようなマーカーの例は、アンピシリン、テトラサイクリン又はクロラムフェニコールに対する耐性を特定する遺伝子を包含する。E. コリにおいて使用するための選択マーカーに関する詳細については、Sambrook、など. を参照のこと。

10

#### 【0162】

ベクターは、適切な宿主細胞中への導入を可能にするよう選択される。細菌ベクターは典型的には、プラスミド又はファージ起源のものである。適切な細菌細胞は、ファージベクター粒子により感染され、又は裸のファージベクターDNA によりトランスフェクトされる。プラスミドベクターが使用される場合、細菌細胞はプラスミドベクターDNA によりトランスフェクトされる。SKチャンネルタンパク質を発現するための発現システムは、E. コリ、バシラスsp. (Bacillus sp.) 及びサルモネラ (Salmonella) を用いて入手できる (Palva、など., Gene 22 : 229-235 (1983) ; Mosbach、など., Nature 302 : 543-545 (1983)) 。

20

#### 【0163】

S. チピムリウム (S. typhimarium) においてSK又はIKチャンネルタンパク質を発現する場合、プラスミドベクターの固有の不安定性を気づくべきである。これを回避するためには、外来性遺伝子が、宿主染色体の非必須領域中に組込まれ得る。これは、まず、遺伝子をプラスミド中に、それがサルモネラ染色体において挿入部位に対して相同のDNA の領域を端に有するように、挿入することによって達成される。S. チピムリウム中へのプラスミドの導入の後、外来性遺伝子は、フランキング配列と染色体DNA との間での相同組換えにより染色体中に組込まれる。

30

#### 【0164】

これがいかにして達成され得るかの例は、サルモネラのhis オペロンに基づかされている。2つの段階がこの工程に包含される。第1においては、his オペロンのセグメントがキャリアーとして選択されるサルモネラ株において欠失されるべきである。第2においては、SK又はIKチャンネルタンパク質をコードする遺伝子の下流に欠失されたhis 領域を担持するプラスミドを用いて、his サルモネラ株がトランスフェクトされる。his 配列及びSK又はIKチャンネルタンパク質をコードする遺伝子の両者の組込みが生じ、his<sup>+</sup> として選択され得る組換え株をもたらす。

40

#### 【0165】

発現されたタンパク質の検出は、当業界において知られている方法により達成され、そしてたとえば、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット技法又は免疫沈殿法を包含する。E. コリからの精製は、アメリカ特許第 4,511,503号に記載される方法に従って達成され得る。

#### 【0166】

##### 2. 真核生物における発現

種々の真核発現システム、たとえば酵母、昆虫細胞系、鳥、魚、カエル、及び哺乳類細胞が当業者に知られている。下記に手短かに説明されるように、本発明のSK又はIKチャンネル

50

タンパク質は、それらの真核システムにおいて発現され得る。真核生物におけるSK又はIKチャンネルの発現は特に好ましい。

【0167】

酵母における異種タンパク質の合成は良く知られている。Methods in Yeast Genetics, Sherman, F., など., Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)は、酵母においてタンパク質を生成するために利用できる種々の方法を記載する十分に認識された研究である。適切なベクターは通常、発現制御配列、たとえばプロモーター、たとえば3'-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素、及び複製の起点、終結配列、及び同様のものを有する。たとえば、適切なベクターは、文献に記載されている(Botstein、など., 1979, Gene, 8 : 17-24 ; Broach、など., 1979, Gene, 8 : 121-133)。

10

【0168】

2種の方法が、酵母細胞のトランスフェクションに使用される。第1の場合、酵母細胞がまず、チモリアーゼ、リチカーゼ、又はグルスラーゼを用いてプロトプラスト中に転換され、続いて、DNA及びポリエチレングリコール(PEG)が添加される。次に、PEG-処理されたプロトプラストは、選択条件下で、3%寒天培地において再生される。この方法の詳細は、J. D. Beggs, 1978, Nature (London), 275 : 104-109 ; 及びHinnen, A., など., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 1929-1933による文献に与えられている。第2の方法は、細胞壁の除去を含まない。代わりに、細胞は、塩化リチウム、又はアセテート及びPEGにより処理され、そして選択プレート上に置かれる(Ito, H., など., 1983, J. Bact., 153 : 163-168)。

20

【0169】

本発明のカルシウム-活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、発現されると、細胞を溶解し、そしてその溶解物に標準のタンパク質単離技法を適用することによって、酵母から単離され得る。精製工程のモニターリングは、ウェスタンブロット技法、又は他の標準イムノアッセイ技法のラジオイムノアッセイを用いて達成され得る。

【0170】

カルシウム-活性化されたカリウムチャンネルタンパク質をコードする配列はまた、たとえば哺乳類、昆虫、鳥、両性類又は魚起源の細胞培養物をトランスフェクトすることに使用するために種々の発現ベクターに連結され得る。ペプチドの生成のために有用な細胞培養物の実例は、哺乳類細胞である。哺乳類細胞システムはしばしば、細胞の単層の形で存在するが、但し、哺乳類細胞懸濁液もまた用いられ得る。損なわれていないタンパク質を発現できる多くの適切な宿主細胞系は、当業界において開発されており、そしてHEK293, BHK21、及びCHO細胞系、並びに種々のヒト細胞、たとえばCOS細胞系、HeLa細胞、骨髄細胞系、Jurkat細胞を包含する。いくつかの態様においては、キセノパス卵母細胞が使用される。

30

【0171】

当業者は、SK又はIKチャンネルを発現するための好ましい細胞系は、本発明のカルシウム-活性化されたカリウムチャンネルにより供給される細胞系(すなわち、“静止系”)と競争するコンダクタンスを実質的に欠いている。それらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、たとえば複製の起点、プロモーター(たとえば、CMVプロモーター、HSV tkプロモーター又はpgk(ホスホグリセリン酸キナーゼ)プロモーター)、エンハンサー(Queenなど., (1986) Immunol. Rev. 89 : 49)、及び必要なプロセッシング情報部位、たとえばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位(たとえばSV40大TA gポリA付加部位)、及び転写ターミネーター配列を含むことができる。SKチャンネルタンパク質の生成のために有用な他の動物細胞は、たとえばAmerican Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (7th edition, 1992)から入手できる。

40

【0172】

昆虫細胞においてSK又はIKチャンネルタンパク質を発現するための適切なベクターは通常、SF9バキュロウイルスに由来する。適切な昆虫細胞系は、蚊幼虫、蚕、アワヨトウの幼虫、蛾及びショウジョウバエ細胞系、たとえばSchneider細胞系を包含する(Schneider,

50

J. Embryol. Exp. Morphol. 27 : 353-365 (1987)を参照のこと)。

上記に示されるように、宿主細胞をトランスフェクトするために使用されるベクター、たとえばプラスミドは好ましくは、転写を開始するためのDNA配列、及びタンパク質の翻訳を制御するための配列を含む。それらの配列は、発現制御配列として言及される。

#### 【0173】

酵母に関して、高等動物宿主細胞が使用される場合、既知の哺乳類遺伝子からのポリアダニル化又は転写ターミネーター配列が、ベクター中に組込まれるためには必要である。ターミネーター配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアダニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列もまた含まれ得る。スプライシング配列の例は、SV40からのVP1イントロンである (Sprague, J. など., 1983, J. Virol. 45 : 773-781)。

10

#### 【0174】

さらに、宿主細胞における複製を制御するための遺伝子配列が、ベクター、たとえばウシ乳頭腫ウイルス型 - ベクターに見出されるベクター中に組込まれ得る。Saveria - Camp o, M., 1985, "Bovine Papilloma virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector" in DNA Cloning Vol. II a Practical Approach Ed. D. M. Glover, IRL Press, Arlington, Virginia pp. 213-238を参照のこと。

#### 【0175】

宿主細胞は、コンピテントであり、又は種々の手段により、トランスフェクションのためにコンピテントにされる。動物細胞中にDNAを導入するためのいくつかの良く知られている方法が存在する。それらは次のものを包含する：リン酸カルシウム沈殿、DNAを含む細菌性プロトプラストと受容体細胞との融合、DNAを含むリポソームによる受容体細胞の処理、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション及び細胞中へのDNAの直接的なマイクロインジェクション。トランスフェクトされた細胞は、当業界において良く知られている手段により培養される。Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., (1977)を参照のこと。発現されたタンパク質は、良く知られている機械的、化学的又は酵素的手段により回収される。

20

#### 【0176】

##### 発現されたペプチドの精製

組換えDNA技法により生成される本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質は、当業者に良く知られている標準の技法により精製され得る。組換え的に生成されたSK又はIKチャンネルタンパク質は、直接的に発現され、又は融合タンパク質として発現され得る。本発明の組換えカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、細胞溶解 (たとえば、音波処理) 及びアフィニティークロマトグラフィーの組合せにより精製される。融合生成物に関しては、適切なタンパク質分解酵素による融合タンパク質の続く消化は、所望する組換えカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質を開放する。

30

#### 【0177】

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質 (組換え又は合成) は、当業界において良く知られている標準技法、たとえば硫酸アンモニウムのような物質による選択沈殿、カラムクロマトグラフィー、免疫精製法、及び他の方法により実質的な純粋性に精製され得る。たとえば、R. Scopes, Protein Purification : Principles and Practice, Springer - Verlag : New York (1982) ; Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press, 1990を参照のこと。たとえば、本発明のタンパク質は、本明細書に記載されるようなSK又はIKチャンネルタンパク質に対して生ぜしめられた抗体を用いてイムノアフィニティークラムにより精製され得る。

40

#### 【0178】

##### カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質の対する抗体

抗体は、本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質、たとえば個々の対立遺伝子、株、又は種変異体、及びそれらのフラグメントに対して、それらの天然に存在する (十分な長さ) 形で及び組換え形で生ぜしめられる。さらに、抗体は、それらの生来の形状又は非生来の

50

形状で、それらのタンパク質に対して生ぜしめられる。抗 - イジオタイプ抗体がまた生成され得る。抗体を製造する多くの方法が当業者に知られている。次の議論が利用できる技法の一般的な概観として存在するが、しかしながら、当業者は、次の方法に基づく多くの変法が知られていることを認識するであろう。

【0179】

A. 抗体生成

多くの免疫原が、SK又はIKチャンネルタンパク質と特異的に反応する抗体を生成するために使用される。5個の長さ又はそれ以上の長さの、及び配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の副配列から選択された、単離された組換え、合成又は生来のSK又はIKチャンネルタンパク質が、モノクローナル又はポリクローナル抗体の生成のための好ましい免疫原(抗原)である。当業者は、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質が典型的には、発現ライブラリーをスクリーニングするために、又は本発明の推定上のカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質が非生来の二次、三次、又は四次構造で発現され又は変性される他のアッセイのために、抗体の形成の前に変性されることを容易に理解するであろう。

10

【0180】

免疫原として使用するための典型的なタンパク質は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない: GHRRALFEKRRLSDY (配列番号28)、FTDASSRSIGAL (配列番号29)、ARKLELTKAEKHVHNFMMDTQLTKR (配列番号30)、及びARKLELTKAEKHVHNFMMDTQLTK (配列番号42)。1つの種類の好ましい態様においては、免疫原性タンパク質接合体がまた、免疫原とに包含される。天然に存在するSK又はIKチャンネルタンパク質はまた、純粋な形又は不純な形のいずれかで使用される。

20

【0181】

次に、SK又はIKチャンネルタンパク質が、抗体を生成できる動物中に注入される。モノクローナル又はポリクローナル抗体が、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質の存在及び量を測定するためにイムノアッセイへの続く使用のために生成され得る。ポリクローナル抗体を生成するための方法は、当業者に知られている。手短には、免疫原(抗原)、好ましくは精製されたSK又はIKチャンネルタンパク質、適切なキャリアー(たとえば、GST、キーホールリンペットヘマノシアニン、等)に結合されたSK又はIKチャンネルタンパク質、免疫化ベクター、たとえば組換えワクシニアウィルス中に組込まれたSK又はIKチャンネルタンパク質(アメリカ特許第4,722,848号を参照のこと)が、アジュバントと共に混合され、そして動物がその混合物により免疫化される。

30

【0182】

免疫原調製物に対する動物の免疫応答が、試験採血を取り、そして興味あるカルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質に対する反応性の力価を決定することによってモニターされる。免疫原に対する適切に高い力価の抗体が得られる場合、血液が動物から採血されて、そして抗血清が調製される。SK又はIKチャンネルタンパク質に対して反応性の抗体を富化するために抗血清のさらなる分別が、所望の場合、実施される(たとえば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; 及びHarlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NYを参照のこと)。

40

【0183】

SK又はIKチャンネルタンパク質の前もって決定されたフラグメントに対する抗体、たとえばその結合フラグメント及び一本鎖組換え型は、上記のようなキャリアータンパク質と前記フラグメントとの接合体により動物を免疫化することによって生ぜしめられる。典型的には、興味ある免疫原は、少なくとも約5個のアミノ酸のSK又はIKチャンネルタンパク質である。より典型的には、SK又はIKチャンネルタンパク質は、10個の長さ、好ましくは15個の長さのアミノ酸であり、そしてより好ましくは、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質は、20個又はそれ以上の長さのアミノ酸である。ペプチドは典型的には、キャリアータンパク質(たとえば、融合タンパク質として)に結合され、又は免疫化ベク

50

ターに組換え的に発現される。抗体が結合するペプチドに基づく抗原決定基は、典型的には、3～10個の長さのアミノ酸である。

【0184】

モノクローナル抗体は、所望する抗体を分泌する細胞から調製される。モノクローナル抗体は、免疫原が由来するSK又はIKチャンネルタンパク質に対する結合についてスクリーンされる。特異的モノクローナル及びポリクローナル抗体は通常、少なくとも約0.1mM、より通常には少なくとも約50 $\mu$ M、及び最とも好ましくは少なくとも約1 $\mu$ M又はそれ以上の $K_D$ を伴って結合するであろう。

【0185】

多くの場合、種々の哺乳類宿主、たとえばマウス、ゲッ歯動物、霊長類、ヒト、等からモノクローナル抗体を調製することが所望される。そのようなモノクローナル抗体を調製するための技法の記載は、たとえば次の文献に見出される：Stites など. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA、及びそこに引用される文献；Harlow and Lane、前記；Goding (1986) Monoclonal Antibodies : Principle and Practice (2d ed.) Academic Press, New York, NY；及びKohler and Milstein (1975) Nature 256 : 495-497。

10

【0186】

手短に要約すると、この方法は、SK又はIKチャンネルタンパク質を含んで成る免疫原を動物に注射することによって進行する。次に、動物が殺され、そして細胞がその脾臓から取られ、ここで細胞は骨髄腫細胞により融合されている。その結果物は、インビトロで再生できるハイブリッド細胞又は“ハイブリドーマ”である。次に、ハイブリドーマの集団がスクリーンされ、個々のクローンが単離され、その個々のクローンが免疫原に対する単一の抗体種を分泌する。この態様においては、得られる個々の抗体種は、免疫原性物質上に認識される特異的部位に应答して生成される免疫動物からの不滅化され、そしてクローン化された単一のB細胞の生成物である。

20

【0187】

不滅化の方法は、Epstein Barrウイルス、腫瘍遺伝子、又はレトロウイルスによるトランスフェクション、又は当業界において知られている他の方法を包含する。単一の不滅化された細胞から生じるコロニーが、抗原のための所望する特異性及び親和性の抗体の生成のためにスクリーンされ、そしてそのような細胞により生成されるモノクローナル抗体の収量は、種々の技法、たとえば脊椎動物（好ましくは哺乳類）宿主の腹膜腔中への注射により増強される。本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質及び抗体は、修飾なしに、又は修飾を伴って使用され、そしてキメラ抗体、たとえばヒト適合されたネズミ抗体を包含する。

30

【0188】

他の適切な技法は、ファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーの選択を包含する（たとえば、Huseなど. (1989) Science 246 : 1275-1281；及びWard, など. (1989) Nature 341 : 544-546；及びVaughan など. (1996) Nature Biotechnology 14 : 309-314を参照のこと）。他方では、高い結合活性のヒトモノクローナル抗体が、転位されていないヒトH鎖及びL鎖Ig遺伝子座のフラグメントを含んで成るトランスジェニックマウス（すなわち、ミニ遺伝子座トランスジェニックマウス）から得られる。Fish wildなど., Nature Biotech., 14 : 845-851 (1996)。

40

【0189】

時おり、SK又はIKチャンネルタンパク質及び抗体は、検出できるシグナルを提供する物質を、共有又は非共有結合することによってラベルされるであろう。広範囲の種類ラベル及び接合技法が知られており、そして科学及び特許文献の両者に広く報告されている。適切なラベルは、放射性ヌクレオチド、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光成分、化学発光成分、磁気粒子、及び同様のものを包含する。そのようなラベルの使用を教授する特許は、アメリカ特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；及び第4,366,241号を包含する。また、組換え免

50

疫グロブリンが生成され得る。Cabilly、アメリカ特許第 4,816,567号；及びQueen など、(1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86 : 10029-10033を参照のこと。

【0190】

本発明の抗体はまた、SK又はIKチャンネルタンパク質タンパク質を単離することにおいてアフィニティークロマトグラフィーのためにも使用される。カラムは、たとえば固体支持体、たとえば粒子、たとえばアガロース、Sephadex又は同様のものに連結される抗体により調製され、ここで細胞溶解物がカラムに通され、洗浄され、そして高まる濃度のマイルドな変性剤により処理され、それにより、精製されたSK又はIKチャンネルタンパク質が放される。

【0191】

抗体は、特定の発現生成物、たとえば正常又は異常ヒトSK又はIKチャンネルタンパク質のための発現ライブラリーをスクリーンするために使用され得る。通常、そのような方法における抗体は、抗体結合により抗原の存在の容易な検出を可能にする成分によりラベルされる。

SK又はIKチャンネルタンパク質に対して生ぜしめられる抗体はまた、抗 - イディオタイプの抗体を生ぜしめるためにも使用され得る。それらは、それぞれの抗原の存在に関連する種々の病理学的状態を検出し、又は診断するために有用である。

【0192】

B. ヒト又はヒト適合された(キメラ性)抗体生成

本発明の抗 - SK又は抗 - IKチャンネルタンパク質抗体はまた、治療目的のために哺乳類(たとえばヒト患者)に投与され得る(たとえば、エフェクター分子、たとえばラベル、細胞毒素、酵素、成長因子、薬物、等に接合され、又は融合される場合、標的化分子として)。抗体が生ぜしめられる種以外の生物に投与される抗体はしばしば、免疫原性である。従って、たとえば、ヒトに投与されるネズミ抗体はしばしば、複数回の投与に基づいて、抗体に対する免疫応答(たとえば、ヒト抗 - マウス抗体(HAMA)応答)を誘発する。抗体の免疫原性質は、抗体の一部又はすべてを、特徴的なヒト配列に変更することによって低められ、それにより、それぞれ、キメラ又はヒト抗体が生成される。

【0193】

i) ヒト適合された(キメラ性)抗体

ヒト適合された(キメラ性)抗体は、ヒト及び非ヒト部分を含んで成る免疫グロブリン分子である。より特定には、ヒト適合されたキメラ抗体の抗原組合せ領域(又は可変領域)は、非ヒト源(たとえばネズミ)に由来し、そしてキメラ抗体の不変領域(免疫グロブリンに生物学的エフェクター機能を付与する)は、ヒト源に由来する。ヒト適合されたキメラ抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性、及びヒト抗体分子により付与されるエフェクター機能を有すべきである。

【0194】

キメラ抗体を生成するための多くの数の方法が当業者に良く知られている(たとえば、アメリカ特許第 5,502,167号；第 5,500,362号；第 5,491,088号；第 5,482,856号；第 5,472,693号；第 5,354,847号；第 5,292,867号；第 5,231,026号；第 5,204,244号；第 5,202,238号；第 5,169,939号；第 5,081,235号；第 5,075,431号及び第 4,975,369号を参照のこと)。キメラ(ヒト適合された)抗体の調製のための詳細な方法は、アメリカ特許第 5,482,856号に見出され得る。

【0195】

ii) ヒト抗体

もう一つの態様において、本発明は十分なヒト抗 - SKチャンネルタンパク質抗体を供給する。ヒト抗体は、特徴的なヒトポリペプチド配列から完全に成る。本発明のヒト抗 - SK又は抗 - IKチャンネルタンパク質抗体は、広範囲の種類の方法を用いて生成され得る(たとえば、Larrick など、アメリカ特許第 5,001,065号を参照のこと)。

【0196】

好ましい態様においては、本発明のヒト抗 - SKチャンネルタンパク質抗体は通常、トリオ

10

20

30

40

50

ーマ (trioma) 細胞において始め生成される。次に、その抗体をコードする遺伝子が他の細胞、特に非ヒト哺乳類細胞においてクローン化され、そして発現される。トリオーマ技法によりヒト抗体を生成するための一般的なアプローチは、Ostberg など. (1983), Hybridoma 2 : 361-367, Ostberg、アメリカ特許第 4,634,664号及びEngelmanなど., アメリカ特許第 4,634,666号により記載されている。この方法により得られる抗体 - 産生細胞系は、それらが3種の細胞、すなわち2種のヒト細胞及び1種のマウス細胞から由来するので、トリオーマと呼ばれる。トリオーマは、ヒト細胞から製造される通常のハイブリドーマよりもより安定して抗体を生成することが見出された。

#### 【0197】

トリオーマ細胞系により分泌される免疫グロブリンのH及びL鎖をコードする遺伝子は、当業界において知られている、ポリメラーゼ鎖反応を包含する方法に従って、クローン化される(たとえば、Sambrookなど., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 ; Berger & Kimmel, Methods in Enzymology, Vol. 152 : Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987 ; Coなど., (1992) J. Immunol., 148 : 1149 を参照のこと)。たとえば、H及びL鎖をコードする遺伝子は、トリオーマのRNAの逆転写により生成されるトリオーマDNA又はcDNAからクローン化される。クローニングは、クローン化される遺伝子又は遺伝子のセグメントを端に有するか又はそれをオーバーラップする配列に対してハイブリダイズするPCRプライマーの使用を包含する従来技法により達成される。

#### 【0198】

#### カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルタンパク質イムノアッセイ

SK及びIKチャンネルタンパク質についてのイムノアッセイは、少なくとも2種の異なる目的のために使用され得る。それらは、免疫学的に交差反応できることによりタンパク質の関連性を決定するために、又はチャンネルタンパク質の存在又は不在の検出のために使用され得る。

#### 【0199】

未知のタンパク質が本発明のチャンネルタンパク質に関連するかどうかを決定する場合、種々のアッセイが使用され得る。たとえば、交差 - 反応性について試験するために競争イムノアッセイが好ましい。たとえば、配列番号2又は32のタンパク質が固体支持体に固定され得る。タンパク質又はペプチドが、前記固定された抗原に対する抗血清の結合と競争するアッセイに添加される。固定されたタンパク質への抗血清の結合と競争する上記タンパク質の能力が、試験タンパク質に関連すると思われるタンパク質に比較される。

#### 【0200】

試験される抗血清が特定のタンパク質に対して特異的であるか又はそれに対して選択的に結合することを確かめるために、それが、他の密接に関連するタンパク質に対する交差反応性について試験されるであろう。これは、低、中間及び高いコンダクタンスのチャンネル間を区別するであろう血清の生成を可能にする。上記タンパク質についての%交差反応性が、標準の計算を用いて計算され得る。上記に列挙される個々のタンパク質と10%以下の交差反応性を有する。それらの抗血清が選択され、そしてプールされる。交差反応する抗体は、任意には、上記列挙されたタンパク質による免疫吸着によりプールされた抗血清から除去される。

#### 【0201】

次に、免疫吸着され、そしてプールされた抗血清は、請求された又はプロトタイプの免疫原タンパク質に第2タンパク質を比較するために、上記競争結合イムノアッセイに使用される。この比較を行なうために、2種のタンパク質が、広範囲の濃度でそれぞれアッセイされ、そして固定されたタンパク質に対しての抗血清の結合の50%を阻害するために必要とされる個々のタンパク質の量が決定される。必要とされるタンパク質の量がプロトタイプタンパク質の量の2倍以下である場合、その第2タンパク質は、プロトタイプ免疫原に対して生成される抗体に特異的に結合すると言われる。

#### 【0202】

10

20

30

40

50

抗体が短いペプチドに対して生成される場合、試験タンパク質は任意には、選択結合について十分に試験するために変性される。標的ペプチドが、大きなペプチドの一部であるので、抗体に容易に接近できない状況においては、類似するサイズのプロトタイプタンパク質に対する試験タンパク質の関連性を測定することが適切であり、たとえば抗血清がプロトタイプのモノマーのペプチドに対して生成されても、プロトタイプの十分な長さのモノマーに対する十分な長さのモノマーを試験することができる。これは、試験結果の読み取りを単純にし、そして競争イムノアッセイから生成されるデータの決定におけるコンホメーション問題及び分子量/モル濃度の考慮を回避する。

#### 【0203】

本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質を検出するための手段は、本発明の決定的観点ではない。好ましい態様において、SK又はIKチャンネルタンパク質は、多くの十分に認識される免疫学的結合アッセイのいずれかを用いて検出され、そして/又は定量化される(たとえば、アメリカ特許第 4,366,241号;第 4,376,110号;第 4,517,288号;及び第 4,837,168号を参照のこと)。一般的なイムノアッセイの再考のためには、また、Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, ed. Academic Press, Inc. New York (1993); Basic and Clinical Immunology 7th Edition, Sites & Terr, eds. (1991) を参照のこと。

10

#### 【0204】

免疫学的結合アッセイ(又はイムノアッセイ)は典型的には、分析物(この場合、カルシウム-活性化されたカリウムチャンネルタンパク質)を特異的に結合し、そしてしばしば固定するために“捕獲剤”を用いる。前記捕獲剤は、分析物を特異的に結合する成分である。好ましい態様においては、捕獲剤は、本発明のカルシウム-活性化されたカリウムチャンネルタンパク質を特異的に結合する抗体である。前記抗体(抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体)は、本明細書に記載されるように当業者に知られている多くの手段のいずれかにより生成され得る。

20

#### 【0205】

イムノアッセイはまたしばしば、捕獲剤及び分析物により形成される結合複合体に特異的に結合し、そしてそれをラベルするためのラベリング剤を利用する。そのラベリング剤は、それ自体、抗体/分析物複合体を含んで成る成分の1つであり得る。従って、ラベリング剤は、ラベルされたSK又はIKチャンネルタンパク質又はラベルされた抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体であり得る。他方では、ラベリング剤は、第三成分、たとえば抗体/SK又は抗体/IKチャンネルタンパク質複合体に対して特異的に結合するもう1つの抗体であり得る。

30

#### 【0206】

好ましい態様においては、ラベリング剤は、ラベルを担持する第2のSK又はIKチャンネルタンパク質抗体である。他方では、前記第2のSK又はIKチャンネルタンパク質抗体は、ラベルを欠くことができるが、しかしそれは、第2抗体が由来する種の抗体に対して特異的なラベルされた第3抗体により結合され得る。前記第2抗体は、第3のラベルされた成分;たとえば酵素-ラベルされたストレプトビジンが特異的に結合し得る検出可能成分、たとえばビオチンにより修飾され得る。

40

#### 【0207】

免疫グロブリン不変領域を特異的に結合できる他のタンパク質、たとえばプロテインA又はプロテインGはまた、ラベリング剤としても使用され得る。それらのタンパク質は、ストレプトコカカル(Streptococcal)細菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、種々の種からの免疫グロブリン不変領域と強い非免疫原性反応性を示す(一般的に、Kronval、など。(1973) J. Immunol., 111: 1401-1406;及びAkerstrom、など。(1985) J. Immunol., 135: 2589-2542を参照のこと)。

#### 【0208】

アッセイを通して、インキュベーション及び/又は洗浄段階は、試薬の個々の組合せの後に必要とされる。インキュベーション段階は、約5秒~数時間まで、好ましくは約5分

50

～約24時間まで変化し得る。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイ形式、分析物、溶液の体積、濃度、及び同様のものに依存するであろう。通常、アッセイは周囲温度で実施されるが、但しそれらは、広範囲の温度、たとえば10～40にわたって実施され得る。

#### 【0209】

本発明のイムノアッセイの詳細は使用される特定の形式により変化し得るが、生物学的サンプルにおけるSK又はIKチャンネルタンパク質を検出するための方法は一般的に、生物学的サンプルと、SK又はIKチャンネルタンパク質に対して特異的に反応する抗体とを、免疫学的に反応する条件下で接触せしめる段階を含んで成る。抗体は、免疫学的に反応する条件下でSK又はIKチャンネルタンパク質への結合を可能にし、そして結合された抗体の存在が直接的に又は間接的に検出される。

10

#### 【0210】

##### A．非競争アッセイ形式

本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質を検出するためのイムノアッセイは、競争及び非競争形式を包含する。非競争イムノアッセイは、捕獲された分析物（この場合、SK又はIKチャンネルタンパク質）の量が直接的に測定されるアッセイである。好ましい“サンドイッチ”アッセイにおいては、捕獲剤（抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体）が、それらが固定される固体支持体に直接的に結合され得る。

#### 【0211】

次に、それらの固定された抗体が、試験サンプルに存在するSK又はIKチャンネルタンパク質を捕獲する。次に、このようにして固定されたSK又はIKチャンネルタンパク質が、ラベリング剤、たとえばラベルを担持する第2のヒトSK又はIKチャンネルタンパク質抗体により結合される。他方では、第2のSK又はIKチャンネルタンパク質抗体は、ラベルを欠いているが、しかしそれは第2抗体が由来する種の抗体に対して特異的なラベルされた第3抗体により結合され得る。前記第2抗体は、第3のラベルされた成分、たとえば酵素-ラベルされたストレプトビジンが特異的に結合する検出可能成分、たとえばビオチンにより修飾され得る。

20

#### 【0212】

##### B．競争アッセイ形式

競争アッセイにおいては、サンプルに存在する分析物（SK又はIKチャンネルタンパク質）の量は、サンプルに存在する分析物により捕獲剤（抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体）から置換される（又は競争される）添加された（外因性の）分析物（SK又はIKチャンネルタンパク質）の量を測定することによって、間接的に測定される。1つの競争アッセイにおいては、この場合、既知量のSK又はIKチャンネルタンパク質が、サンプルに添加され、そして次に、そのサンプルが、捕獲剤、この場合、SK又はIKチャンネルタンパク質を特異的に結合する抗体と接触される。抗体に結合されるSK又はIKチャンネルタンパク質の量が、サンプルに存在するSK又はIKチャンネルタンパク質の濃度に反比例する。

30

#### 【0213】

特に好ましい態様においては、抗体は固体支持体上に固定される。抗体に結合されるSK又はIKチャンネルタンパク質の量は、その対応するSK又はIKチャンネルタンパク質/抗体複合体に存在するSK又はIKチャンネルタンパク質の量を測定し、又は他方では、残る複合体化されていないSK又はIKチャンネルタンパク質の量を測定することによって、決定され得る。SK又はIKチャンネルタンパク質の量は、ラベルされたSK又はIKチャンネルタンパク質分子を供給することによって検出され得る。

40

#### 【0214】

ハプテン阻害アッセイは、もう1つの好ましい競争アッセイである。このアッセイにおいては、既知の分析物、この場合、SK又はIKチャンネルタンパク質が、固体支持体上に固定される。それぞれ、既知量の抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体がサンプルに添加され、そして次に、そのサンプルが固定されたSK又はIKチャンネルタンパク質と接触せしめられる。この場合、固定されたSK又はIKチャンネルタンパク質に結合される抗-SK又は抗-

50

IKチャンネルタンパク質抗体の量が、サンプルに存在するSK又はIKチャンネルタンパク質の量に反比例する。再び、固定された抗体の量は、抗体の固定された画分、又は溶液に残る抗体の画分のいずれかを検出することによって検出され得る。検出は、抗体がラベルされる場合、直接的であり、又は上記のような抗体に特異的に結合するラベルされた成分の続く添加によりラベルされる場合、間接的であり得る。

#### 【0215】

##### C. 他のアッセイ形式

特に好ましい態様においては、ウェスタンブロット(イムノブロット)分析は、サンプルにおけるSK又はIKチャンネルタンパク質の存在を検出し、そして定量化するために使用される。その技術は一般的に、分子量に基づいてゲル電気泳動によりサンプルタンパク質を単離し、適切な固体支持体(たとえば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化されたナイロンフィルター)に前記調製されたタンパク質を移し、そして前記サンプルを、SKチャンネルタンパク質を特異的に結合する抗体と共にインキュベートすることを含んで成る。抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質抗体は、それぞれ、固体支持体上のSK又はIKチャンネルタンパク質に特異的に結合する。それらの抗体は間接的にラベルされ得、又は他方では、抗-SK又は抗-IKチャンネルタンパク質に対して特異的に結合するラベルされた抗体(たとえば、ラベルされた羊抗-マウス抗体)を用いて検出され得る。

10

#### 【0216】

他のアッセイ形式は、特定分子(たとえば抗体)を結合し、そして封入された試薬又はマーカーを開放するよう企画されたりリポソームを使用するリポソームイムノアッセイ(LIA)を包含する。次に、その開放された化学物質が標準の技法に従って検出される(Monroeなど、(1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5 : 34-41 を参照のこと)。

20

#### 【0217】

##### D. ラベル

アッセイに使用される特定のラベル又は検出できるグループは、それがアッセイに使用される抗体の特異的結合を有意に妨害しない限り、本発明の決定的観点ではない。検出できるグループは、検出できる物理的又は化学的性質を有するいずれかの材料であり得る。そのような検出できるラベルはイムノアッセイの分野においては十分に開発されており、そして一般的に、そのような方法において有用なほとんどのいずれかのラベルが本発明に適用され得る。従って、ラベルは、分光、光化学、生化学、免疫化学、放射性同位体、電気、光学又は化学的手段により検出できるいずれかの組成物である。本発明における有用なラベルは、前記で論ぜられたような核酸のラベリングに使用されるものを包含する。

30

#### 【0218】

ラベルは、当業界において良く知られている方法に従って、アッセイの所望する成分に直接的に又は間接的に結合され得る。上記のように、広範囲の種類ラベルが使用され得、そしてラベルの選択は、必要とされる感度、化合物との接合の容易性、安定性の必要条件、利用できる装置及び捨棄規定に依存する。

#### 【0219】

非放射性ラベルはしばしば、間接的手段により結合される。一般的に、リガンド分子(たとえばビオチン)は分子に共有結合される。次に、リガンドが、本来検出できるか、又はシグナルシステム、たとえば検出できる酵素、蛍光化合物又は化学発光化合物に共有結合される抗-リガンド(たとえばストレプトアビジン)分子に結合する。多くの数のリガンド及び抗-リガンドが使用され得る。リガンドが天然の抗-リガンド、たとえばビオチン、チロキシン及びコルチゾールを有する場合、それはラベルされた、天然に存在する抗-リガンドと接合して使用され得る。他方では、いずれかのハプテン性又は抗原性化合物が、抗体と組合して使用され得る。

40

#### 【0220】

分子はまた、たとえば酵素又は蛍光団との接合により、シグナル生成化合物に直接的に接合され得る。ラベルとしての興味ある酵素は、主にヒドロラーゼ、特にホスファターゼ

50

、エステラーゼ及びグリコシダーゼ、又はオキシレダクターゼ、特にペルオキシダーゼであろう。蛍光化合物は、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、等を包含する。化学発光化合物は、ルシフェリン、及び2, 3 - ジヒドロフタルアジンジオン、たとえばルミノールを包含する。使用され得る種々のラベリング又はシグナル生成システムの再考のためには、アメリカ特許第 4,391,904号を参照のこと。

#### 【0221】

ラベルを検出する手段は、当業者に良く知られている。従って、たとえば、ラベルが放射性ラベルである場合、検出のための手段は、シンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィとしての写真フィルムを包含する。ラベルが蛍光ラベルである場合、それは、光の適切な波長を有する蛍光色素を励起せしめ、そしてその得られる蛍光を検出することによって検出され得る。蛍光は、可視的に、写真フィルムにより、電子検出機、たとえば電荷結合の装置(CCD<sub>s</sub>)又は光増幅機、及び同様のものにより検出され得る。

10

#### 【0222】

同様に、酵素ラベルは、酵素のために適切な基質を供給し、そしてその得られる反応生成物を検出することによって検出され得る。最終的に、単純な比色ラベルは、ラベルに関連する色彩を観察することによって、単純に検出され得る。従って、種々のディプスティクアッセイにおいては、接合された金がしばしばピンク色に見え、そして種々の接合されたビーズがビーズの色を現わす。

#### 【0223】

いくつかのアッセイ形式は、ラベルされた成分の使用を必要としない。たとえば、凝集アッセイは標的抗体の存在を検出するために使用され得る。この場合、抗原 - 被覆された粒子が、標的抗体を含んで成るサンプルにより凝集される。この形式においては、どの成分もラベルする必要はなく、そして標的抗体の存在は、単純な眼での調査により検出される。

20

#### 【0224】

##### イムノアッセイ検出キット

本発明はまた、発現されるSK又はIKチャンネルタンパク質のレベルにおいて不完全な生物(たとえば患者)の診断のためのキットを提供する。キットは好ましくは、動物におけるSK又はIKチャンネルタンパク質の量を検出するための1又は複数の試薬を含む。好ましい試薬は、正常なSK又はIKチャンネルタンパク質又はその副配列に対して特異的に結合する抗体を包含する。抗体は自由であるか、又は固体支持体、たとえば試験管、マイクロウェルプレート、ディプスティック及び同様のもの上に固定され得る。キットはまた、SK又はIKチャンネルタンパク質の検出のためのアッセイにおける抗体の使用を教授する説明材料を含むこともできる。キットは、ラベルの検出のための適切な試薬、正及び負の対照、洗浄溶液、希釈緩衝液及び同様のものを含むことができる。

30

#### 【0225】

##### K<sup>+</sup> 流を高めるか又は低める化合物についてのアッセイ

細胞において発現される本発明の単離されたSK又はIKチャンネル核酸は、それぞれ、SK又はIKチャンネルを通しこのカリウムの流れ(すなわち、流入又は流出)を高めるか又は低める化合物を検出するために種々のアッセイに使用され得る。一般的に、カリウムイオン流を低める化合物は、少なくとも10%又は20%、より好ましくは少なくとも30%、40%又は50%、及び最も好ましくは少なくとも70%、80%、90%又は100%の低下を引き起こすであろう。カリウムイオン流を高める化合物は、SK又はIKチャンネルの開口の可能性を高め、そしてカリウムイオンの通過を可能にすることによって、カリウムイオン流密度の検出できる上昇を引き起こすであろう。

40

#### 【0226】

典型的には、その流れは、少なくとも20%、50%、100%又は200%、しばしば少なくとも400%、600%、1,000%、5,000%、又は10,000%上昇するであろう。高められた又は低められたカリウム流は、SK又はIKチャンネルを発現する細胞の分極化(すなわち、電

50

位)の変化を決定することによって評価され得る。細胞分極化の変化を決定するための特に好ましい手段は、電圧-クランプ技法である。全細胞流は便利には、例3に示される条件を用いて決定される。他の既知のアッセイは、放射性ラベルされたルビジウム流アッセイ、及び電圧感受性色素を用いての蛍光アッセイを包含する。

#### 【0227】

たとえば、Vestergarrd - Bogindなど., J. Membrane Biol., 88 : 67-75 (1988) ; Danielなど., J. Pharmacol. Meth., 25 : 185-193 (1993) ; Holevinskyなど., J. Membrane Biology, 137 : 59-70 (1994)を参照のこと。SKチャネルタンパク質を通してのカリウム流を阻害し又は高めることができる化合物についてのアッセイは、本発明のSK又はIKチャネルを有する細胞と接触して存在し、そしてそれを含んで成る槽溶液への前記化合物の適用により実施され得る。たとえば、Blatzなど., Nature, 323 : 718-720 (1986) ; Park, J. Physiol., 481 : 555-570 (1994)を参照のこと。一般的に、試験されるべき化合物は、1 pM ~ 100mM の範囲で存在する。チャネルの機能の変化は、電流又はイオン流で、又は電流及びイオン流の変化の結果により測定され得る。

10

#### 【0228】

チャネルの機能に対する試験化合物の効果は、電流又はイオン流の変化により、又は電流及びイオン流の変化の結果により測定され得る。電流又はイオン流の変化は、カチオン、たとえばカリウム又はルビジウムイオンの流れの上昇又は低下により測定される。カチオンは種々の標準手段により測定され得る。それらは、イオンの濃度変化により直接的に、又は膜電位又はイオンの放射性ラベリングにより間接的に測定され得る。イオン流に対する試験化合物の結果は非常に多様であり得る。

20

#### 【0229】

従って、いずれかの適切な生理学的変化は、本発明のチャネルに対する試験化合物の影響を評価するために使用され得る。チャネル機能の変化は、リガンド置換、たとえばCTX開放により測定され得る。機能結果が損なわれていない細胞又は動物を用いて決定される場合、種々の効果、たとえば伝達物質(たとえばドーパミン)開放、ホルモン(たとえばインシュリン)開放、既知の及び特徴づけられていない遺伝子マーカーに対する転写変化(たとえばノザンプロット)、細胞体積変化(たとえば赤血球細胞における)、免疫応答(たとえば、T細胞活性化)細胞代謝、たとえば細胞成長の変化又はpH変化を測定することができる。

30

#### 【0230】

好ましくは、アッセイのSKチャネルは、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43又は47又は保存的に修飾されたその変異体のチャネルタンパク質から選択されるであろう。アッセイのIKチャネルは、好ましくは配列番号32又は保存的に修飾されたその変異体に示されるような配列を有するであろう。他方では、アッセイのSKチャネルは、真核生物に由来し、そして配列番号1 ~ 4, 19, 20, 43及び/又は47のSKチャネルタンパク質のコア領域に対して配列類似性を有するアミノ酸副配列を含むであろう。

#### 【0231】

IKは典型的には、真核生物に由来し、そして配列番号32のIKチャネルタンパク質のコア領域に対して配列類似性を有するアミノ酸副配列を含むであろう。一般的に、機能的なSK又はIKチャネルタンパク質は、少なくとも400, 450, 500又は550個の長さのアミノ酸であろう。配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域との配列類似性の%は、60 ~ 100の間の整数のいずれか1つであろう。一般的に、配列類似性は、少なくとも60%、典型的には少なくとも70%、一般的には少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%及びしばしば少なくとも95%であろう。

40

#### 【0232】

従って、SKチャネル相同体は、中位のハイブリダイゼーション条件下で、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22及びその相補的配列から成る群から選択された核酸のコア領域からの少なくとも300個の長さのヌクレオチドの核酸に対してハイブリダイズするであろう。IK

50

チャンネル相同体は、中位のハイブリダイゼーション条件下で、配列番号31の核酸のコア領域からの少なくとも300個の長さのヌクレオチドの核酸に対してハイブリダイズするであろう。

#### 【0233】

配列番号13~16, 21, 22, 44及び48の“コア領域”又は“コア配列”は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43及び47と rSK2 (配列番号2) アミノ酸残基 135~462 との間の一列配列のコードされた領域に対応する。hIK1のコア領域は、アミノ酸残基25~351である。好ましい態様においては、SKチャンネルは、コア領域内の20個の隣接するアミノ酸残基のいずれか1つ~300個の隣接するアミノ酸残基のいずれかの比較窓に対して、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43又は47の配列からのコア配列に比較して、少なくとも90%の配列類似性を有するであろう。好ましい態様においては、IKチャンネルは、コア領域内の20個の隣接するアミノ酸残基のいずれか1つ~300個の隣接するアミノ酸残基のいずれかの比較窓に対して、配列番号32のコア配列に比較して、少なくとも90%の配列類似性を有するであろう。

10

#### 【0234】

SKチャンネル相同体は一般的に、実質的に類似するコンダクタンス特性(たとえば2~60 pS)及びカルシウム感受性(30nM~10 μM)を有するであろう。IKチャンネル相同体は同様に、IKチャンネルと類似するSKチャンネルコンダクタンス特性(たとえば20~80pS)及びカルシウム感受性(30nM~10 μM)を有するであろう。配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20、又は32の少なくとも2つの配列の発現により形成されるキメラがまた使用され得る。好ましい態様においては、カリウム流を高め又は低めることについてアッセイされる化合物と接触して配置される細胞は、真核細胞、より好ましくはキセノパス(たとえば、キセノパスラエビス(*Xenopus laevis*))の卵母細胞である。

20

#### 【0235】

カルシウム活性化されたカリウムチャンネルにおいてカリウム流を高め又は低める化合物についてのもう1つのアッセイは、コンピューターシステムがアミノ酸配列によりコードされる構造情報に基づいてSK及びIKタンパク質の立体構造を生成するために使用される“バーチャル遺伝学(virtual genetics)”を包含する。アミノ酸配列は、タンパク質の二次、三次及び四次構造モデルを生成するためにコンピュータープログラムにおける予定されたアルゴリズムと直接的及び活性的に相互作用する。次に、タンパク質構造のモデルが、リガンドに結合する能力を有する構造の領域を同定するために試験される。

30

#### 【0236】

タンパク質の立体構造モデルは、コンピューターシステム中に、チャンネルタンパク質をコードするチャンネルタンパク質アミノ酸又は核酸配列を入力することによって生成される。チャンネルタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択される。アミノ酸配列は、タンパク質の構造情報をコードする、タンパク質の一次配列を表わす。アミノ酸配列は、電子貯蔵媒体(たとえば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、及びチップス)、光媒体(たとえば、CD ROM、電話線)、インターネット部位へのアドレス及びRAMを包含する(但しそれらだけには限定されない)コンピューター読み取り媒体からのコンピューターシステム中に入力される。次にチャンネルタンパク質の立体構造モデルがアミノ酸配列及びコンピューターシステムの相互作用により生成される。ソフトウェアは、市販のプログラム、たとえばBiopolymer, Quanta及びInsightである。

40

#### 【0237】

アミノ酸配列は、タンパク質の二次、三次及び四次構造を形成するために必要な情報をコードする一次構造を表わす。ソフトウェアは、その構造モデルを生成するために一次配列によりコードされる一定のパラメーター調べる。それらのパラメーターは、“エネルギー項”として言及され、そして主に、静電位、疎水性電位、溶媒接近性表面及び水素結合を包含する。第2のエネルギー項は、der Waals 電位を包含する。生物学的分子は、累積態様でエネルギー項を最少にする構造を形成する。従って、コンピュータープログラムは

50

、二次構造モデルを創造するために、一次構造又はアミノ酸配列によりコードされるそれらの項を用いる。

【0238】

次に、二次構造によりコードされるタンパク質の三次構造は、二次構造のエネルギー項に基づいて形成される。この点での使用者は、タンパク質が膜結合されるか又は可溶性であるかの追加の変数、身体におけるその位置、及びそれが細胞質性、表面性又は核性のいづれかであるかの変数を入力することができる。二次構造のエネルギー項と共にそれらの変数は、三次構造のモデルを形成するために使用される。三次構造を形成する場合、コンピュータプログラムは、二次構造の疎水性タンパク質面と同様のものとを、及び親水性二次構造と同様のものとを適合せしめる。

10

【0239】

最終的に、複数 - サブユニットタンパク質の四次構造は、異方性項を用いて、類似する態様で調節される。それらの項は、サブユニットの相互作用をエネルギー的に最少にするために異なったタンパク質サブユニットを調整する。チャンネルタンパク質の場合、典型的には4つの同一のサブユニットがチャンネルの四次構造を組立てる。

【0240】

構造が生成されると、可能性あるリガンド結合領域が、コンピュータシステムにより同定される。可能性あるリガンドのための立体構造は、上記のように、化合物のアミノ酸及びヌクレオチド配列又は化学式を入力することによって生成される。次に、可能性あるリガンドの立体構造が、チャンネルタンパク質に結合するリガンドを同定するためにチャンネルタンパク質の立体構造と比較される。タンパク質とリガンドとの間の結合親和性が、リガンドがタンパク質の結合の増強された可能性を有するかどうかを決定するために、エネルギー項を用いて決定される。

20

【0241】

コンピュータシステムはまた、SK及びIK遺伝子の突然変異についてスクリーンするためにも使用される。そのような突然変異は、疾病状態と関係している。突然変異が同定されると、診断アッセイが、疾病状態と関連するそのような突然変異誘発された遺伝子を有する患者を同定するために使用され得る。突然変異誘発されたSK及びIK遺伝子の同定は、配列番号1, 2, 3, 4, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたその変異体から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するカルシウムチャンネルタンパク質をコードする第1核

30

【0242】

前記配列は、上記のようなコンピュータシステム中に入力されている。次に、第1核酸配列が、第1核酸配列に対して実質的な同一性を有する第2核酸配列に比較される。第2核酸配列は、上記態様でコンピュータシステム中に入力される。第1及び第2配列が比較されると、配列間のヌクレオチド差異が同定される。そのような配列は、SK及びIK遺伝子における対立遺伝子差異、及び疾病状態との突然変異の関連性を示すことができる。

【0243】

細胞トランスフェクション及び遺伝子療法

本発明は、インビトロ及びインビボでの細胞のトランスフェクションのためのパッケージ可能なSK及びIKチャンネルタンパク質核酸(cDNA)を供給する。それらのパッケージ可能な核酸は、下記に記載されるように、標的細胞及び生物のトランスフェクションのために多くの良く知られているベクターのいづれか中に挿入され得る。核酸は、ベクター及び標的細胞の相互作用を通して、エクスピボ又はインビボで細胞中にトランスフェクトされる。次に、SK又はIKチャンネルタンパク質核酸は、プロモーターの制御下で、本発明のカルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質核酸を発現し、それにより、SK又はIKチャンネルタンパク質遺伝子の不在の、一部不活性化の、又は異常な発現の効果を弱める。

40

【0244】

そのような遺伝子療法は、多くの状況において、獲得され、そして伝達された遺伝子欠損、癌及びウィルス感染を補正するために使用されて来た。ヒトにおける人工遺伝子を発

50

現する能力は、多くの重要なヒト疾病、たとえば他の治療による処理に対して影響されない多くの疾病の予防及び/又は治療を促進する。例として、コレステロール - 調節遺伝子、HIV の複製を選択的に阻止する遺伝子及びヒト患者における腫瘍 - 抑制遺伝子のインビボ発現は、それぞれ心臓疾患、AIDS及び癌の処理を劇的に改良する。遺伝子療法の再考のためには、次の文献を参照のこと。

【 0 2 4 5 】

: Anderson, Science (1992) 256 : 803-813 ; Nabel and Felgner (1993) TIBTECH 11 : 211-217 ; Mitani and Caskey (1993) TIBTECH 11 : 162-166 ; Mulligan (1993) Science 926-932 ; Dillon (1993) TIBTECH 11 : 167-175 ; Miller (1992) Nature 357 : 455-460 ; Van Brunt (1988) Biotechnology 6 (10) : 1149-1154 ; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neurosciences 8 : 35-36 ; Kremer and Perricaudet (1995) British Medical Bulletin 51 (1) 31-44 ; Haddadaなど. (1995) Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohn (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany ; 及びYnなど., Gene Therapy (1994) 1 : 13-26. 10

【 0 2 4 6 】

細胞中への遺伝子又は遺伝子材料の供給は、疾病の遺伝子療法処理において最初の決定的段階である。多くの供給方法が当業者に良く知られている。そのような方法は、たとえばリポソームに基づく遺伝子供給 (Debs and Zhu (1993) WO 93/24640, Mannino and Gould - Fogerite (1988) Bio Techniques 6 (7) : 682-691 ; Roseアメリカ特許第 5,279,833号 ; Brigham (1991) WO 91/06309 ; 及びFelgner など. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7413-7414) 、及びレトロウイルスゲノムの一部として治療ポリヌクレオチド配列を有する複製欠損レトロウイルスベクター (たとえば、Millerなど. (1990) Mol. Cell. Biol. 10 : 4239 (1990) ; Kolberg (1992) J. NIH Res. 4 : 43、及びCornettaなど. Hum. Gene Ther. 2 : 215 (1991)) を包含する。 20

【 0 2 4 7 】

広く使用されるレトロウイルスベクターは、ネズミ白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、Simian免疫欠損ウイルス (SIV)、ヒト免疫欠損ウイルス (HIV) 、及びそれらの組合せに基づくベクターを包含する。たとえば、Buchscher など. (1992) J. Virol. 66 (5) 2731-2739 ; Johannなど. (1992) J. Virol. 66 (5) : 1635-1640 (1992) ; Sommerfelt など., (1990) Virol. 176 : 58-59 ; Wilson など. (1989) J. Virol. 63 : 2374-2378 ; Millerなど., J. Virol. 65 : 2220-2224 (1991) ; Wong - Staal など., PCT/US94/05700 、及びRosenburg and Fauci (1993) Fundamental Immunology, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York andそこに引用される引例、及びYuなど., Gene Therapy (1994)前記を参照のこと。 30

【 0 2 4 8 】

AA.V - に基づくベクターはまた、核酸及びペプチドのインビトロ生成において、及びインビボ及びエクスピボ遺伝子療法において、標的核酸により細胞をトランスダクトするために使用される。AA.Vベクターの概観については、Westなど. (1987) Virology 160 : 38-47 ; Carterなど. (1989) アメリカ特許第 4,797,368号 ; Carterなど. WO 93/24641 (1993) ; Kotin (1994) Human Gene Therapy 5 : 793-801 ; Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94 : 1351及びSamulski (前記) を参照のこと。 40

【 0 2 4 9 】

組換えAA.Vベクターの構成は、次の多くの文献に記載されている : Lebkowski 、アメリカ特許第 5,173,414号 ; Tratschinなど. (1985) Mol. Cell. Biol. 5 (11) : 3251-3260 ; Tratschin、など. (1984) Mol. Cell. Biol., 4 : 2072-2081 ; Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 : 6466-6470 ; McLaughlin など. (1985)及びSamulskiなど. (1989) J. Virol., 63 : 03822-3828 。rAAVによりトランスフェクトされ得る細胞系は、Lebkowski など. (1988) Mol. Cell. Biol., 8 : 3988-3996に記載される細胞系を包含する。

【 0 2 5 0 】

### A. 細胞のエキスピボトランスフェクション

診断、研究又は遺伝子療法のためのエキスピボ細胞トランスフェクション（たとえば、宿主生物中へのトランスフェクトされた細胞の再注入による）は、当業者に良く知られている。好ましい態様においては、細胞が対象生物から単離され、SK又はIKチャネルタンパク質核酸（遺伝子又はcDNA）によりトランスフェクトされ、そして対象生物（たとえば患者から細胞をいかにして単離し、そして培養するかについては、患者）中に再注入される。エキスピボトランスフェクションのために適切な種々の細胞型は、当業者に良く知られている（たとえば、Freshneyなど., Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley - Liss, New York (1994)及びそこに引用される引例を参照のこと）。

10

#### 【0251】

上記のようにして、好ましい態様においては、SK又はIKチャネルタンパク質をコードするパッケージ可能核酸は、活性化された又は構成的プロモーターの制御下にある。トランスフェクトされた細胞は、欠失する又は異常なSK又はIKチャネルタンパク質遺伝子発現の効果を弱める機能的SK又はIKチャネルを発現する。

#### 【0252】

1つの特に好ましい態様においては、幹細胞が、細胞トランスフェクション及び遺伝子療法のためのエキスピボ方法に使用される。幹細胞を用いる利点は、それらが他の細胞型にインビトロで分化され得、又はそれらが骨髄に移植するであろう哺乳類（たとえば細胞のドナー）中に導入され得ることである。GM-CSF、IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\alpha$ のようなサイトカインを用いて、臨床学的重要な免疫細胞型にインビトロでCD34<sup>-</sup>細胞を分化するための方法は知られている（Inabaなど., (1992) J. Exp. Med. 176, 1693-1702及びSzabolcsなど. (1995) 154 : 5851-5861を参照のこと）。

20

#### 【0253】

幹細胞は、既知方法を用いて、トランスダクション及び分化のために単離される。たとえば、マウスにおいては、骨髄細胞が、マウスを殺害し、そして脚の骨を一对のハサミにより切断することによって分離される。幹細胞は、所望しない細胞、たとえばCD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>（T細胞）、CD45<sup>+</sup>（pan B細胞）、GR-1（顆粒球）及びIa<sup>d</sup>（分化された抗原表示細胞）を結合する抗体により骨髄細胞をパンニングすることによって骨髄細胞から単離される。このプロトコルの例に関しては、Inabaなど. (1992) J. Exp. Med. 176 : 1693-1702を参照のこと。

30

#### 【0254】

ヒトにおいては、腸骨付近の稜からの骨髄吸入が、たとえば手術室においての一般的な麻酔下で実施される。骨髄吸入は、約1,000mlの量であり、そして後部腸骨及び稜から集められる。集められた細胞の合計数が約 $2 \times 10^8$  / kg以下である場合、後部稜の他に、胸骨及び前方腸骨稜を用いての第2の吸入が行われる。手術の間、2単位の照射された、パックされた赤血球細胞が、吸収により採取される骨髄の体積を置換するよう投与される。ヒト造血前駆体及び幹細胞が、CD34表面膜抗原の存在により特徴づけられる。この抗原は、精製、たとえばCD34を結合する親和性カラムに使用される。骨髄が収穫された後、単核細胞が他の成分からフィコールグラジエント遠心分離により分離される。

40

#### 【0255】

これは、細胞分離機（たとえば、Baxter Fenwal CS3000+又はTerumo機械）を用いて半自動方法により実施される。ほとんど単核細胞から構成される低密度細胞が集められ、そしてその細胞がプラスチックフラスコにおいて、37 $^{\circ}$ Cで1.5時間インキュベートされる。付着細胞（単球、マクロファージ及びB細胞）が捨てられる。次に、非付着細胞が集められ、そしてモノクローナル抗-CD34抗体（たとえばネズミ抗体9C5）と共に、軽く攪拌しながら、4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートされる。抗-CD34抗体のための最終濃度は、10 $\mu$ g/mlである。2回の洗浄の後、羊抗-マウスIgG (Fc)抗体により被覆された常磁性微小球（Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Californiaにより供給されるDyna Beads）が、2細胞/ビーズの割合で細胞懸濁液に添加される。

50

## 【 0 2 5 6 】

4 で30分間のさらなるインキュベーションの後、磁気ビーズによるロゼット形成された細胞が磁気により集められる。200U/mlの最終濃度でのキモパイン (Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, California により供給される) が、CD34<sup>+</sup> 細胞からビーズを放すために添加される。他方では、及び好ましくは、CD34、又はCD34に結合される抗体に結合する親和性カラム単離方法が使用され得る (下記を参照のこと)。Hoなど. (1995) Stem Cells 13 (Suppl.3) : 100-105、及びまた、Brenner (1993) Journal of Hematotherapy 2 : 7-17を参照のこと。

## 【 0 2 5 7 】

もう1つの態様においては、造血幹細胞は、胎児コード血液から単離される。Yuなど. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 : 699-703 は、レトロウイルスベクターを用いてヒト胎児コード血液からCD34<sup>+</sup> 細胞をトランスダクトするための好ましい方法を記載する。 10

## 【 0 2 5 8 】

## B. インビボトランスフェクション

治療核酸を含むベクター (たとえばレトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム、等) が、インビボでの細胞のトランスフェクションのために生物に直接的に投与され得る。投与は、血液又は組織細胞と究極的に接触して分子を導入するために通常使用される経路のいずれかによるものである。パッケージされた核酸は、好ましくは医薬的に許容できるキャリアーと共に、いずれかの適切な態様で投与される。そのようなパッケージされた核酸を投与するための適切な方法は、入手でき、そして当業者に良く知られており、そして 20 1つ以上の経路が特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路はしばしば、他の経路よりもより早く且つより効果的な反応を提供することができる。

## 【 0 2 5 9 】

医薬的に許容できるキャリアーは、投与される特定の組成物により、及び組成物を投与するために使用される特定の方法により一部決定される。従って、本発明の医薬組成物の広範囲の種類適切な配合物が存在する。

## 【 0 2 6 0 】

経口投与のために適切な配合物は、(a) 液体溶液、たとえば希釈剤、たとえば水、塩溶液又はPEG400に懸濁されるパッケージされた有効量の核酸; (b) 予定された量の活性成分を液体、固体、顆粒又はゼラチンとして含む、カプセル、サケット又は錠剤; (c) 適切な液体における懸濁液; 及び (d) 適切なエマルジョンから成る。錠剤形は、1又は複数のラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ポテトスターチ、トラガカント、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化珪素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、風味剤、顔料、砕解剤、及び医薬的に適合できるキャリアーを含むことができる。トローチ形は、風味剤、通常スクロース及びアカシア又はトラガカントにおける活性成分を含んで成り、そしてパステルは不活性基材、たとえばゼラチン及びグリセリン又はスクロース、及びアカシアエマルジョン、ゲル、及び活性成分の他に、当業界において 40 知られているキャリアーに活性成分を含んで成る。

## 【 0 2 6 1 】

パッケージされた核酸は、単独で又は他の適切な成分と組合して、吸入により投与されるエアゾール配合物 (すなわち、それらは“噴霧され”得る) に製造され得る。エアゾール配合物は、加圧された許容できる推進剤、たとえば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素及び同様のものに配合され得る。

直腸投与のための適切な配合物は、たとえばパッケージされた核酸及び坐剤基材から成る坐剤を含む。適切な坐剤基材は、天然又は合成のトリグリセリド又はパラフィン炭化水素を包含する。さらに、パッケージされた核酸と基材、たとえば液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール及びパラフィン炭化水素との組合せから成るゼラチン性直腸カプセ 50

ルを用いることもまた可能である。

【0262】

関節内（関節における）、静脈内、筋肉内、経皮内、腹腔内、及び皮下経路による非経口投与のために適切な配合物は、酸化防止剤、緩衝剤、制細菌剤、及び意図された受容体の血液により配合物を等張性にする溶質を含むことができる、水性及び非水性、等張性滅菌注射用溶液、及び懸濁剤、溶解剤、増粘剤、安定剤及び保存剤を含むことができる、水性及び非水性滅菌懸濁液を包含する。本発明の実施においては、組成物は、たとえば静脈内注入、経口、局所、腹腔内、ノウ胞内又は包膜内投与され得る。非経口投与及び静脈内投与が好ましい投与方法である。パッケージされた核酸の配合物は、単位 - 投与又は複数 - 投与の密封された容器、たとえばアンプル及びバイアルに供給され得る。

10

【0263】

注射溶液及び懸濁液は、前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。エクスピゴ治療に関して上記のようにパッケージされた核酸によりトランスダクトされた細胞がまた、上記のように、静脈内又は非経口投与され得る。

【0264】

本発明に関して、患者に投与される用量は、時間にわたって患者における有益な治療応答をもたらすのに十分であるべきである。用量は、使用される特定のベクターの効能、及び患者の状態、並びに処理される患者の体重又は表面積により決定されるであろう。用量のサイズはまた、特定の患者における特定のベクター又はトランスダクトされた細胞型の投与に伴ういづれかの悪い副作用の存在、性質及び程度により決定されるであろう。

20

【0265】

SK又はIKチャンネルタンパク質の減じられた又は異常な発現による状態の処理又は予防において投与されるべきベクターの有効量を決定する場合、医者は、ベクターの循環血漿レベル、ベクター毒性、疾病の進行、及び抗 - ベクター抗体の生成を評価する。一般的に、ベクターからの裸の核酸の用量は、典型的な70kgの患者に対して約  $1 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$  であり、そしてレトロウィルス粒子を含むベクターの用量は、治療核酸の等量を生成するよう計算される。

【0266】

投与に関しては、本発明のインヒビター及びトランスダクトされた細胞は、患者の集団及び全体の健康に適用される場合、インヒビター、ベクター又はトランスダクトされた細胞型のLD - 50、及びインヒビター、ベクター又は細胞型の種々の濃度での副作用により決定される割合で投与され得る。投与は、一回の用量又は分割された用量で投与され得る。

30

【0267】

好ましい態様においては、注入の前、血液サンプルが得られ、そして分析のために保存される。  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  個のトランスダクトされた細胞が、60 ~ 200分にわたって静脈内注入される。パルス酸素濃度計による生命徴候及び酸素飽和が密接してモニターされる。血液サンプルが、注入に続いて5分及び1時間後に得られ、そして続く分析のために保存される。リユーコフェレーシス (leukopheresis)、トランスダクション、及び再注入が2 ~ 3ヵ月ごとにくり返えされる。最初の処理の後、注入が臨床医の自由に外来患者に対して実施され得る。再注入が外来患者として与えられる場合、関係者は、治療に続いて少なくとも4及び好ましくは8時間、モニターされる。

40

【0268】

トランスダクトされた細胞が、確立された方法に従って、再注入のために調製される。 Abrahamsenなど., (1991) J. Clin. Apheresis, 6 : 48-53 ; Carterなど. (1988) J. Clin. Arpheresis, 4 : 113-117 ; Aehersold など. (1988) J. Immunol. Meth., 112 ; 1-7 ; Muulなど. (1987) J. Immunol. Methods, 101 : 171-181 及びCarterなど. (1987) T ransfusion 27 : 362-365 を参照のこと。培養での約2 ~ 4週間後、細胞は  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  個の数になるべきである。これに関して、細胞の増殖特徴は、患者から患者に、及び細胞型から細胞型に異なる。トランスダクトされた細胞の再注入の約72時間前、アリコートが表現型の分析、及び治療剤を発現する細胞の百分率についての分析のために採取さ

50

れる。

本発明は、明確に理解するために例示的且つ例的にいくらか詳細に記載されて来たが、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で実施され得ることは明白である。

【0269】

例1

例1は、低及び中間コンダクタンスのカリウム - 依存性カリウムチャネルをコードするクローンの単離及び配列決定を記載する。

A. 低コンダクタンスのカリウムチャネル(但し、minkタンパク質(Takumiなど., Science, 242: 1042-1045 (1988)を除く)は、一価カチオンのための特徴的選択性配列を指図する配列を包含するコア領域内の構造モチーフを共有する(Heginbothamなど., Biophys. J., 66: 1061-1067 (1994))。 10

【0270】

ミスマッチを可能にする問題の配列FXSIPXXXWWAXVTMTTVGYGDMXP(配列番号45)を用いてのESTデータベースのBLAST研究は、既知のカリウムチャネル配列及びGenbank # M62043を再生した。# M62043のヌクレオチド6-36(センス)及び258-287(アンチセンス)に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(Genosys, The Woodlands, TX)、ポリヌクレオチドキナーゼ(BRL)及び<sup>32</sup>P-ATP(NEN)を用いて放射性ラベルし、そしてヒト海馬cDNAライブラリーからの約10<sup>6</sup>個の組換えファージをスクリーンするために使用した(40%ホルムアミド; 1MのNaCl、1% SDS, 37 ; 1×SSC, 50での洗浄)。 20

【0271】

二重の陽性ハイブリダイズファージを、低められた密度で再スクリーンすることによって精製した。cDNA挿入体をM13中にサブクローン化し、そしてそのヌクレオチド配列を、ジデオキシ鎖終結方法及びT7 DNAポリメラーゼを用いて決定した(Sequenase, UBI)。ポア(pore)ドメイン(アミノ酸325-522)を含むクローンのフラグメントを、ランダムプライマー(Boehringer)を用いて放射性ラベルし、そしてラット脳cDNAライブラリーをスクリーンするために使用した(30%ホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS, 37 ; 2×SSC, 50での洗浄)。陽性のハイブリダイズするファージを精製し、そして挿入体のヌクレオチド配列を決定した。コンピューター分析を、GCGソフトウェアスイート(Genetics Computer Group; version 8.1)を用いて、実施した。 30

【0272】

既知のカリウムチャネルの他に、ヒト海馬からの検出された配列の1つは、それがコンセンサスモチーフを含むが、しかしいくつかのあいまい性を含むことを示唆した(Genebank # M62043)。この配列に基づいて、センス鎖のヌクレオチド6~36及びアンチセンス鎖のヌクレオチド258~287により示される配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。そのオリゴヌクレオチドを用いて、ヒト海馬cDNAライブラリーをプローブした。 30

【0273】

十分な長さのコード配列、hSK1(配列番号13)を単離し、そして読み取り枠、Kozakコンセンサス配列、可能性あるトランスメンブランドメイン及び予測されるタンパク質構造について分析した。推定上のコア領域を含むフラグメントを、ランダムプライミングにより放射性ラベルし、そして40%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS、及び100µg/mlの酵母RNAのハイブリダイゼーション溶液を用いて37でラット脳cDNAライブラリーをプローブするために使用し、そして0.5×SSCを用いて55で洗浄した。異なった十分な長さのコード配列を含む次の2種のクローンを単離し、そして分析した: rSK2(配列番号15)及びrSK3(配列番号16)。さらに、hSK1のラット相同体(rSK1(配列番号14))を示す部分的クローンを同定した。 40

【0274】

前記配列は、推定上のコア領域における12個のアミノ酸配列は別として、他のクローン化されたカリウムチャネルとの相同性の範囲を含まない(すなわち、低い緊縮条件下でバックグラウンド以上のシグナルを含まない)、hSK1のための561個のアミノ酸(配列番号1)、rSK2のための580個のアミノ酸(配列番号2)、及びrSK3のための553個の 50

アミノ酸（配列番号3）のタンパク質を予測する。疎水性の分析は、細胞の内部に存在するN-及びC-末端を有する6個のトランスメンブランセグメントを予測する。それらの配列は、それらのトランスメンブランコアを通して高く保存されるが（80~90%の同一性）、しかしそれらのN-及びC-末端ドメイン内の配列及び長さで異なる。

【0275】

【表1】

表 1

FSK2	.....MS	SCRXNGGVHR	PLSNLSSRR	NLHEHDS	EAQ
FSK3	.....MS	SCXYSGGVMK	PLSRLSASRR	NLIEAE	PEGG
FSK1	.....	.....	.....	.....	.....
hSK1	HPGPRAAACSE	PNPCTQVMN	SHSYNGSVGR	P...LGSGPG	ALGRDPFPOPE
FSK2	PLOPPASVVG	GGGASSPSA	AAAASSAPE	IVVSKPEHNN	SNNLALYGTG
FSK3	PLQLF	.....	...SPSNPPE	IISSREDNH	AHQTLHHPN
FSK1	.....	.....	.....	.....	.....
hSK1	AGHPPQPPHS	PGLOVVVAKS	EPARSPGSP	RCQPQDDDD	EDDEDEAAGR
FSK2	GGSTGGGG	GGGGGGSGH	GSSSTKSSK	KKNONIGYKL	GHRRALFEKR
FSK3	ATHNHQHAGT	TAGSTIEP..	.....XANK	RKNONIGYKL	GHRRALFEKR
FSK1	.....	.....	.....S	GKPPTVSHRL	GHRRALFEKR
hSK1	QR.....	.....	.....AS	GKPSNVGHRLL	GHRRALFEKR
FSK2	KRLSDYALIF	GHEGIVVMVI	ETELSHGAYD	KASLYSLALK	CLISLSTIIL
FSK3	KRLSDYALIF	GHEGIVVMVI	ETELSHGLYS	KDSHFSLALK	CLISLSTIIL
FSK1	KRLSDYALIF	GHEGIVVMVT	ETELSHGVYT	KESLCSFALK	CLISLSTVIL
hSK1	KRLSDYALIF	GHEGIVVMVT	ETELSHGVYT	KESLYSFALK	CLISLSTAIL
FSK2	LGLIIVYHAR	EIQLEHVDNG	ADDWRIAMTY	ERIFFICLEI	LVCAIHPVPG
FSK3	LGLIIVYHTR	EVQLFVIDNG	ADDWRIAMTY	ERILYISLEH	LVCAIHPVPG
FSK1	LGLVILYHAR	EIQLELVDNG	ADDWRIAMTH	ERVSLISLEL	AVCAIHPVPG
hSK1	LGLVVLVYHAR	EIQLEHVDNG	ADDWRIAMTC	ERVSLISLEL	AVCAIHPVPG

【0276】

10

20

30

【表 2】

FSK2	NYTFTWTARL	AESYAPSTTT	ADVDIILSIP	MFLRLYLIAR	VMLLHSKLET
FSK3	EYKEFTWTARL	AFSYTPSRAE	ADVDIILSIP	MFLRLYLIAR	VMLLHSKLET
FSK1	HYREFTWTARL	AFSLVPSAAE	ADVDVLLSIP	MFLRLYLLAR	VMLLHSRIET
hSK1	HYREFTWTARL	AFTYAPSAE	ADVDVLLSIP	MFLRLYLLGR	VMLLHSKIET
FSK2	DASSRSIGAL	NKINENTREV	MKTLMTICPG	TVLLVFSISL	WIIAAWTVRA
FSK3	DASSRSIGAL	NKINENTREV	MKTLMTICPG	TVLLMESISL	WIIAAWTVRV
FSK1	DASSRSIGAL	NRVTENTREV	TKTLMTICPG	TVLLVFSISS	WIIAAWTVRV
hSK1	DASSRSIGAL	NKIITENTREV	MKTLMTICPG	TVLLVFSISS	WIIAAWTVRV
FSK2	CERYHQDQDV	TSNFLGAMHL	ISITFLSIGY	GDMVPNTYCG	KGVCLLTGIM
FSK3	CERYHQDQDV	TSNFLGAMHL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG	KGVCLLTGIM
FSK1	CERYHDXQEV	TSNFLGAMHL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG	KGVCLLTGIM
hSK1	CERYHDXQEV	TSNFLGAMHL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG	KGVCLLTGIM
FSK2	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNEMH	DTQLTKRVKN	AAANVLRETH
FSK3	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNEMH	DTQLTKRIKN	AAANVLRETH
FSK1	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNEMH	DTQLTKRVKN	AAANVLRETH
hSK1	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNEMH	DTQLTKRVKN	AAANVLRETH
FSK2	LIYKHTKLVK	KIDHAKVRKH	ORKFLOAIHQ	...LRSVKME	ORKLNDQANT
FSK3	LIYKHTKLLK	KIDHAKVRKH	ORKFLOAIHQ	...LRGVKME	ORKLSDQANT
FSK1	LIYKHTRLVK	KPDQSRVRKH	ORKFLOAIHQ	AOKLRTVKIE	QCKVNDQANT
hSK1	LIYKHTRLVK	KPDQARVRKH	ORKFLOAIHQ	AOKLRSVKIE	QCKLNDQANT

【 0 2 7 7 】

10

20

30

【表 3】

```

rSK2  LVDLAKTONI  MYDMISOLNE  RSEDFEKRIV  TLETKLETLI  GSIHALPGLI
rSK3  LVDLSXMONV  MYDLITELND  RSEDLKQIG  SLESKLEHLT  ASFNSLPLLI
rSK1  LADLAKAQS I  AYEVSSELOA  QOEELARLA  ALESRLDVLG  ASLOALPSLI
hSK1  LIDLAKTQIV  HYDLVSELHA  QHEELARLA  TLESRLDVLG  ASLOALPGLI

rSK2  SQTI...RQ  QQRDFIETOM  ENYDKHYTYN  AERSR555RR  RRS555TAPPT
rSK3  ADTLRQCCQ  LLTAEVEARG  ISVAVG...  .....  ...TSHAPPS
rSK1  AQAICPLPP  W...PCPSHL  ITAAQSPQSH  HLPTTASDCG  *.....

```

10

20

30

【0278】

4番目の予測されるメンブラン延長ドメインは、電圧 - 依存性カリウムチャネル (Durell など., Biophys. J., 62 : 238-250 (1992)) におけるようにあらゆる第3位置を占めるとは限らないが、しかし6及び7個の残基により分離される3つの陽性電荷の残基を含む。種々のタンパク質キナーゼによるリン酸化のための複数のコンセンサン標的が存在する。それらの部位のいくつかは、すべてのクローンに見出される。しかしながら、個々のクローンは、すべてのメンバー間には保存されない可能性あるリン酸化部位を含む。予測される細胞外ドメインには保存されたN - 結合グリコシル化部位 (NXXS/T) (配列番号46) は存在せず、そしてコンセンサヌクレオチド又はカルシウム結合ドメイン (E - Fバンド) にもそれらは存在しない。

40

【0279】

ラット脳及び骨格筋のノザンプロットは、それらの組織からの rSK3 転写体が、rSK3 クローン配列番号16に対してN - 末端延長されたタンパク質をコードすることを示した。rSK3 N - 末端延長をコードする核酸をクローン化し、そして配列決定し、そしてN - 末端延長された rSK3 をコードするcDNAを配列番号44により表わす。さらに、内因性 rSK3 は、配列番号43の最後の9個のアミノ酸により置換された配列番号3の最後の5個のアミノ酸を有するC - 末端を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有すること

50

が示された。同様に、hSK3は、N-末端延長を有することが示され、そしてこのN-末端延長をコードするcDNAが配列番号48により示される。

#### 【0280】

B. 中間コンダクタンスのカルシウム-活性化された $K^+$ タンパク質を単離するために、PCRを標準条件下で用いることができる。適切なプライマーは、約270個の塩基のプロープを生成する配列番号34及び35、及び約165個の塩基のプロープを生成する配列番号36及び37である。それらのプライマーは、クローン化されたhIK1を含んで成るプラスミドDNAを、又はhIK1を発現する組織からの逆転写されたRNA、たとえば膵臓からのcDNAライブラリーに基づいて、増幅するために使用され得る。PCR反応は、hIK1及び関連する遺伝子に対して特異的な配列を含む、特定されたサイズのDNAフラグメントを生成するであらう。

10

#### 【0281】

続いて、それらのDNAフラグメントを、標準のランダム-プライミングプロトコールによりハイブリダイゼーションプロープとして使用するためにラベルする。次に、そのラベルされたプロープを用いて、hIK1配列のみを単離するために高い緊縮性で、又は推定上、関連する配列を単離するために適度に低い緊縮性(30~40%のホルムアミド、37でのhyb/1×SSC, 55での洗浄)で、ライブラリーをスクリーンする。他方では、PCRプライマー対、配列番号38及び39又は40及び41を用いて、膵臓cDNAライブラリーからの損なわれていないhIK1遺伝子を増幅することができる。

#### 【0282】

##### 例2

例2は、ラットSKチャネルクローンの個々とは異なる配列を用いてのラット脳断片の現場ハイブリダイゼーション、及び種々の末梢組織からの転写物サイズの決定を記載する。

20

#### 【0283】

雌の成熟したSprague-Dawleyの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。ラットを、ペントバルビタールにより深く麻酔をかけ、そして氷冷却された塩溶液、続いて氷冷却された0.1Mの硼酸ナトリウム(pH9.5)中、4%パラホルムアルデヒドにより心臓を通して灌流した。脳をすばやく除去し、そして10%スクロースを含む硼酸塩緩衝液(pH9.5)中、4%パラホルムアルデヒドに4で一晩、後固定した。

30

#### 【0284】

低温マイクロトーム断片(25mm)を、ゼラチン-及びポリ-L-リシン-被覆されたガラススライド上に固定し、そして0.1MのPBS中、4%パラホルムアルデヒドにおいて15分間、インキュベートし、0.1MのPBSにより2度洗浄し、そして100mMのトリス中、10mg/mlのプロテイナーゼK、50mMのEDTA(pH8)の溶液において37で30分間、続いて、0.1Mのトリエタノールアミン中、0.0025%無水酢酸において室温で処理した。次に、断片を、2×SSCにより洗浄し、上昇する濃度のエタノールにより脱水し、そして室温で真空乾燥せしめた。

#### 【0285】

プロープ合成のための鑄型は、個々のクローンに対してユニークなC-末端及び3'翻訳配列を表わし、そしてpKS中にサブクローン化した。線状化された鑄型DNAを用いて、<sup>35</sup>S-ラベルされたアンチセンスcDNAプロープを65に5分間加熱し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液:66%のホルムアミド、260mMのNaCl, 1.3×Denhardt溶液(13mMのトリス、pH8.0, 1.3mMのEDTA, 13%の硫酸デキストラン)により10<sup>7</sup>cpm/mlに希釈した。ハイブリダイゼーション混合物中の断片を、シリコン処理されたガラスカバースリップにより被覆し、そしてDPX封入剤を用いて密封した。

40

#### 【0286】

58で20時間のインキュベーションの後、スライドを4×SSCによりソークし、カバースリップを除き、次に、4×SSCによりすすぎ(4度、それぞれ5分間)、続いて、リボヌクレアゼA処理した(37で30分間、20mg/mlで)。次にスライドを、1mMのDTTを含

50

む、下降する濃度のSSC溶液から最終緊縮性の $0.1 \times \text{SSC}$ 、1 mMのDTT溶液までの溶液により65 で30分間すすいだ。上昇する濃度のエタノールによる断片の脱水の後、それらを真空乾燥せしめ、そしてDuPont Cronex - 4 X - 線フィルムに7日間暴露した。フィルムを、Microtek Scan Maker 1850 Sにより728ピクセル/cmの解像度で走査し、そして像を、Image V1.55 ソフトウェア(NIH)及びPhotoshop (Adobe)を用いて分析した。

#### 【0287】

その結果は、ラット配列に対するmRNAがCNSを通して、特徴的であるが、しかしオーバーラップするパターンで広く分布されることを示す。rSK1は、海馬及び歯状回、小脳の顆粒層、及び前方嗅核に発現される。rSK1 mRNAはまた、支柱、嗅結節及び新皮質にも検出される。rSK2 mRNAは最も広く発現され、そして海馬において最高の発現が生じ、そしてより低いレベルでの発現が歯状回、嗅球及び前方嗅核に生じる。rSK2 mRNAはまた、小脳の顆粒層、視床の網様核、及び橋核にも検出される。rSK2 mRNAのための現場ハイブリダイゼーションのパターンは、ラット脳における放射性ラベルされたアパミン結合のパターンと一致する(Gelhart, Neuroscience, 52: 191-205 (1993))。rSK3 mRNAは、嗅結節及び嗅球、視床じゅう、外側中隔、復側被蓋部分、及び黒質細胞層に検出された。中位のレベルが海馬、尾状被殻、及び中隔側坐核じゅうに検出された。

10

#### 【0288】

rSK1及びrSK2のための同じ明確な配列が、全体の脳及びいくつかの末梢組織から単離されたmRNAにより調製されたノザンプロットをプローブするために使用された。全RNAを、生後3週目のSprague - Dawleyラットの脳、副腎、胸腺、脾臓、骨格筋、心臓、腎臓、肝臓、及び肺から抽出した(Chirgawinなど., Biochem., 18: 5294-5300 (1979))。ポリ(A)<sup>+</sup> mRNAをオリゴd(T)セルロースクロマトグラフィー(Collaborative Research)により精製し、そして個々の組織からの3 µgを、1%アガロース - ホルムアルデヒドゲルを通しての電気泳動によりノザンプロットとして調製し、そしてGenescreen (NEN) ナイロン膜に移した。

20

#### 【0289】

現場ハイブリダイゼーションのために使用されるのと同じ配列のアンチセンスリボプローブを、<sup>32</sup>P - UTP (NEN)を用いて、線状化されたDNA鋳型から合成した。プロットを、50%ホルムアミド、5% SDS, 400mMのNaPO<sub>4</sub>, 1 mMのEDTAにおいて60 で12時間ハイブリダイズせしめ、続いて、 $0.05 \times \text{SSC}$ により65 で洗浄し、そして15時間後、Phosphorimager 445 S 1 (Molecular Dynamics)を用いて可視化した。

30

#### 【0290】

rSK1 mRNAはラット脳及び心臓において検出されたが、ところがrSK2 mRNAは脳及び副腎において検出された。その結果は、異なったサイズのrSK1 mRNAが脳(3.2kb)及び心臓(4.4kb)に存在することを示す。rSK2 mRNAは、脳、及び副腎において2.2及び2.4kbの2つのバンドとして検出された。rSK1 mRNAもrSK2 mRNAも、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓又は骨格骨には検出されなかった。

#### 【0291】

##### 例3

例3は、SK及びIKチャネルタンパク質のインビトロ発現を記載する。

40

3A. 例3Aは、キセノパス卵母細胞におけるrSK2及びhSK1 mRNAのインビトロ発現、及び電気コンダクタンスの測定を記載する。

インビトロmRNA合成及び卵母細胞注入を、Adelman、など., Neuron, 9: 209-216 (1992)に記載のようにして行なった。キセノパスの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。カエルはわずか2回の手術を受け、少なくとも3週までに分離され、そして手術は十分に確立された技法を用いて行なわれた。カエルに、3 - アミノ安息香酸エチルエステルの通気された溶液により麻酔をかけた。

#### 【0292】

卵母細胞は、2 ngのmRNAの注入の後2 ~ 5日で研究された。全細胞流を、Macintosh Quadra 650コンピューターに接続されるCA - 1増幅機により、2つの電極電圧クランプを用

50

いて、mRNA注入の後に測定した。データを、500HzでのPulse (Heka, Germany) 及び10HzでのChart (AD Instrument, Australia) を通して同時に得た。記録の間、卵母細胞は、96mMのNaCl, 2 mMのKCl, 1.8mMのCaCl<sub>2</sub>, 1 mMのMgCl<sub>2</sub>, 5 mMのHEPES (NaOHによりpH7.5にされる)を含むND-96溶液により室温で連続して洗い流された。

**【0293】**

Cl<sup>-</sup>流を最少にするために、いくつかの卵母細胞をソークし、そしてCl<sup>-</sup>-フリーのND96溶液(96mMのグルコン酸ナトリウム、2 mMのグルコン酸カリウム、2.7mMのグルコン酸カルシウム、1 mMのグルコン酸マグネシウム、5 mMのHEPES, NaOHによりpH7.5にされる)において研究した。-80mVの保持電位からの電圧プロトコールは、対照卵母細胞とは異なる電流の発生に失敗した。

10

**【0294】**

rSK2の発現パターンは、mGlu R1a、すなわち代謝向性グルタミン酸受容体の発現パターンに類似するので(Houamedなど., Science, 252: 1318-1321 (1991); Masuなど., Nature, 349: 760-765 (1991))、mGlu R1a mRNAをSK mRNAと共に又はそれを伴わないで注入した。mGlu R1a mRNAのみにより注入された卵母細胞を含んで成る槽へのグルタミン酸(1 mM)の添加は、細胞内カルシウムの開放に続いての内因性カルシウム-活性化された塩化物チャネルの活性化のために過渡的な内部方向への流れを引き起こした(Houamedなど., Science, 252: 1318-1321 (1991); Masuなど., Nature, 349: 760-765 (1991))。

**【0295】**

類似する結果が、mGlu R1aにより注入された6個の他の卵母細胞に得られた。内部方向応答のピーク近くで適用された-120mV ~ 60mVの電圧ランプは、Cl<sup>-</sup>逆電位近くの-25mVで逆転された外部方向に整流する流れを引き起こした。mGlu R1a及びrSK2 mRNAにより同時注入された卵母細胞へのグルタミン酸(1 mM)の添加は、mGlu R1a注入された卵母細胞に観察される過渡的なカルシウム-活性化された塩化物流を引き起こし、続いて、大きな過渡的な外部方向への流れを引き起こした。

20

**【0296】**

類似する結果が、mGlu R1a及びrSK2により同時注入された14個の他の卵母細胞に観察された。外部方向応答のピーク近くで適用される-120 ~ 60mVの電圧ランプは、K<sup>+</sup>逆電位に近い-95mV近くで逆転された大きな内部方向に整流する流れを引き起こした。この結果は、クローン化されたサブユニットの個々により得られ、そしてこれは、クローン化された配列がカリウムチャネルをコードすることを示唆した。

30

**【0297】**

2-電極電圧クランプの確立に続いて、卵母細胞を、KOHにより7.2のpHに調整された200mMのEGTAを含む第3電極により突き刺した。入力耐性を、卵母細胞の生存性を確かめるために突き刺しの間モニターした。示された時間で、50nlのEGTA溶液を卵母細胞中に注入した。1 μlの卵母細胞体積を仮定して、EGTAの予定された最終濃度は10mMであった。EGTAの細胞内注入は、グルタミン酸の続く適用により引き起こされる両流れ応答を完全に破壊し、このことは、両成分がカルシウム-活性化されたことを示唆する。

**【0298】**

mGlu R1a及びrSK2を同時注入した他の3つの卵母細胞から類似の結果が得られた。2.6又は20mMのK<sup>+</sup>を含むCl<sup>-</sup>-フリー外部溶液中、rSK2 mRNAにより注入された卵母細胞に流れ-電圧関連性が存在した。流れは、約1 mMの最終濃度までのCaCl<sub>2</sub>の注入により活性化された(Adelmanなど., Neuron, 9: 209-216 (1992))。バックグラウンド流を、100nMのアパミンの適用により決定した。アパミン-非感受性バックグラウンド流は、外部K<sup>+</sup>により変化しなかった。

40

**【0299】**

注入の2日後、卵母細胞を、Cl<sup>-</sup>流を最少にするためにCl<sup>-</sup>フリーND96溶液に24時間以上ソークした。2-電極記録モードにおいては、チャネルを、第3電極を通して5 nl ~ 200 nMのCaCl<sub>2</sub>の注入により活性化し、約1 mMのCa<sup>2+</sup>の最終細胞内濃度をもたらした。この

50

方法は、mGlu R1a及び rSK2 により同時注入された卵母細胞においてグルタミン酸により活性化された流れよりも  $K^+$  流のより長く持続する活性化をもたらした。それらの卵母細胞においては、逆電位が 100nMのアパミンにおけるバックグラウンド流に対して決定された。〔  $K^+$  〕。に対してプロットされた平均逆電位  $\pm$  S.D.は、55.4mV / 〔  $K^+$  〕。における10倍の変化の傾斜及び 1 mMの 〔  $K^+$  〕。で - 110mV の y - 切片をもたらす。

#### 【 0 3 0 0 】

肉眼で見える流れをまた、摘出されたパッチから記録した。流れは、 rSK2 を発現する卵母細胞からの摘出された裏がえしパッチにおいて - 100 ~ 100mV の 2.5秒電圧ランプにより誘発された。適用されるカルシウム槽なしでは、流れは対照の卵母細胞と異ならなかった。卵母細胞を、2 - 電極電圧クランプ記録のために記載のようにして注入した。

10

#### 【 0 3 0 1 】

注入の 2 ~ 9 日後、裏がえしのマクロパッチを、 $CaCl_2$  及び / 又は EGTA により補充された、116mM のグルコン酸カリウム、4 mMの KCl, 10mMの HEPES (KOHにより調節された pH7.25) を含む槽溶液中に摘出した。公称 Ca - フリー溶液を得るために、1 mMの EGTAを添加した。他方では、 $CaCl_2$  を前記槽溶液に添加し、1 ~ 10  $\mu$  Mの遊離カルシウム濃度を付与した。この場合、グルコン酸に結合するカルシウムの割合を、 $15.9M^{-1}$ のグルコン酸カルシウムの安定性定数を仮定して、コンピュータープログラム (CaBuf) により決定した (Daws onなど., Data for Biochemical Research (Oxford University Press, New York, (1969)) )。

#### 【 0 3 0 2 】

1  $\mu$  M以下の  $Ca^{2+}$  濃度を得るために、5 mMの EGTAを、前記槽溶液に添加し、そして  $CaCl_2$  を、CaBuf プログラム及び公開された安定性定数を用いて計算して添加した (Fabiato など., J. Physiol., 75 : 463-505 (1979))。  $Mg^{2+}$  が槽溶液に添加される実験のために、 $MgCl_2$  を、テキストに言及された全濃度に添加した。それらの条件下で、グルコン酸への  $Mg^{2+}$  の結合は無視できる (安定性定数  $1.7M^{-1}$ ) 。

20

#### 【 0 3 0 3 】

電極を薄い壁のフィラメント繊維の珪硼酸ガラス (World Precision Instruments) から製造し、そして 116mMのグルコン酸カリウム、4 mMの KCl, 10mMの HEPES (pH7.25) により充填した。電極抵抗は典型的には 2 ~ 5 M であった。膜パッチを、Axopatch 200A 増幅機 (Axon Instruments) を用いて電圧クランプした。データは、2 kHzで低 - 通過 Bessel 濾過され、そして Pulse ソフトウェア (HEKA Elektronik) を用いて獲得した。分析は、Pulse, Kaleidograph (Abelbeck) 又は Igor (Wavemetrics) ソフトウェアを用いて実施された。すべての実験は - 80mVの維持電位から、室温で実施された。 - 100 ~ 100mV の 2.5秒電圧ランプを、500Hz のサンプリング周波数で獲得した。他方では、流れ - 電圧の関係を、5 kHz でサンプリングされた、20mVのインクレメントでの - 100 ~ 100mV 間の電圧に対しての 500msのコマンドの間の平均流から得た。

30

#### 【 0 3 0 4 】

細胞内 (槽) 溶液への 5  $\mu$  Mの  $Ca^{2+}$  の添加は、実質的な流れを引き起こした。対称 120 mMの  $K^+$  及び内部  $Mg^{2+}$  の不在における電圧ランプは、わずかな内部方向への整流の流れ - 電圧関係を示した。 - 80mVの維持電位からの - 100 ~ 100mV 間の電圧段階は、時間 - 依存性流れを引き起こした。誘導された I - V 関係は、電圧ランプから明らかな内部方向整流に影響を及ぼす。流れは、 rSK2 を発現する卵母細胞から摘出された裏がえしのマクロパッチから電圧段階により引き起こされた。

40

#### 【 0 3 0 5 】

槽における 5  $\mu$  Mの  $Ca^{2+}$  により、膜を - 80mVの維持電位から - 100 ~ 100mVの間の試験電位まで進め、そして次に、 - 50mVに再分極化した。流れは即時に活性化し、そして 500msの試験パルスの間、不活性化を示さなかった。類似する結果が、hSK1 に関して得られ、但し、内部方向整流は言明されなかった。それらの結果は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャンネルとしてこの新しいファミリーを同定する。

#### 【 0 3 0 6 】

50

3 B . 例 3 B は、 hIK1 チャンネルの電気生理学を記載する。すべての hIK1 チャンネルサブユニットを、複数の制限部位を含むポリリンカーを端に有するキセノパス - グロビン遺伝子からの 5' 及び 3' 翻訳領域を供給する卵母細胞発現ベクター-pBF(未公開、Dr. B. Fakler により親切に供給される)中にサブクローン化した。インビトロ mRNA を SP6 ポリメラーゼ (GibcoBRL) を用いて生成し; 合成に続いて、mRNA を分光学的に、及びアガロースゲル電気泳動の後の臭化エチジウム染色により評価した。

【0307】

上記のように、キセノパスの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。カエルは、わずか 2 回の手術を受け、少なくとも 3 週までに分離され、そしてすべての手術は十分に確立された技法を用いて実施された。カエルに、3 - アミノ安息香酸エチルエステルの通気された溶液により麻酔をかけた。卵母細胞は、0.5 ~ 5 ng の mRNA の注入の 2 ~ 14 日で研究された。

10

【0308】

裏がえしのマクロパッチを、5  $\mu$  M の遊離カルシウム濃度を付与するために  $\text{CaCl}_2$  により補充された、116mM のグルコン酸カリウム、4 mM の KCl, 10mM の HEPES (pH7.2, KOH により調節された) を含む細胞内溶液中に抽出し; グルコン酸へのカルシウム結合の割合を、 $15.9 \text{ M}^{-1}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  グルコン酸のための安定性定数を仮定して、コンピュータプログラム (CaBuf) により決定した (Dawson など., 1969)。1  $\mu$  M 以下の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を得るために、1 mM の EGTA を槽溶液に添加し、そして  $\text{CaCl}_2$  を、CaBuf プログラム及び公開された安定性定数を用いて計算して、添加した (Fabiato and Fabiato, 1979)。

20

【0309】

電極を薄い壁のフィラメント繊維の珪硼酸ガラス (World Precision Instruments) から製造し、そして 116mM のグルコン酸カリウム、4 mM の KCl, 10mM の HEPES (pH7.2) により充填した。電極抵抗は典型的には 2 ~ 5 M  $\Omega$  であった。裏がえしのマクロパッチのためには、溶液を逆にした。膜パッチを、Axopatch 200A 増幅機 (Axon Instruments) を用いて電圧クランプした。データは、1 kHz で低 - 通過 Bessel 濾過され、そして Pulse ソフトウェア (HEKA Elektronik) を用いて獲得した。

【0310】

分析は、Pulse, Kaleidagraph (Abelbeck) 又は IGOR (Wavemetrica) ソフトウェアを用いて実施された。特にことわらない限り、すべての実験は 0 mV の維持電位から、室温で実施された。-100 ~ 60 又は 100mV の 2.5 秒電圧ランプを、500Hz のサンプリング周波数で獲得した。値は、平均  $\pm$  SD として表わされた。統計学的差異は、無対の t - テストを用いて決定され; 0.05 以下の p 値が有意として見なされた。

30

【0311】

単一チャンネルの記録のためには、卵母細胞を、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の報告された濃度を得るために、 $\text{CaCl}_2$  により調整された、116mM のグルコン酸カリウム、4 mM の KCl, 10mM の HEPES, 5 mM の EGTA, pH7.2 の槽溶液に添加した。すべての記録は、116mM のグルコン酸カリウム、4 mM の KCl, 10mM の HEPES, pH7.2 を含む、厚壁の石英電極 (13 ~ 15 M  $\Omega$ ) を用いて、裏がえしパッチ形状で実施された。膜パッチを、Axopatch 200 増幅機 (Axon Instruments) により電圧クランプした。

40

【0312】

連続した記録は、1 kHz で低通過 Bessel 濾過され、Pulse ソフトウェア (Heka Elektronik) を用いて 10KHz で獲得し、そして Macintosh Quadra 650 上に直接的に保存した。単一チャンネルの記録を、現象の振幅を評価するために "50% 閾値" 技法を用いて、Mac Tac (SKALAR Instruments) により分析し、そして個々の遷移を、許容される前、眼により調べた。振幅ヒストグラムを、Mac Tacfit (SKALAR Instruments) を用いて構成した。少なくとも 1 m 秒続く現象のみが包含され、そして振幅ヒストグラムを単一の Gaussian 分布により適合せしめた。すべての実験は、室温で実施された。

【0313】

キセノパス卵母細胞における hIK1 の発現は容易に検出できた。5  $\mu$  M の  $\text{Ca}^{2+}$  中に抽出

50

された裏がえしのパッチに付与される電圧ランプ命令は、注入されていない卵母細胞からのパッチ（示されていない）又は $\text{Ca}^{2+}$ -フリーの媒体に浸された裏がえしのパッチに存在しない、強い内部方向整流の肉眼で見える流れ応答を引き起こした。電圧段階命令は、 $\text{Ca}^{2+}$ が（槽）内部溶液に含まれる場合のみ、高い時間-無関係流れを引き起こす。外部 $\text{K}^+$ 濃度の変更（Naにより置換された）は、 $\text{K}^+$ -選択性コンダクタンスについてのネルンスト予測に従って逆電位をシフトした（57mV/ $\text{K}^+$ における10倍の変化）。電圧ランプ命令により引き起こされた流れは、SK2チャンネルに類似して、膜の内面に適用される $\text{Ca}^{2+}$ の濃度に依存した。

#### 【0314】

##### 例4

例4は、rSK2及びhSK1チャンネルのカルシウム感度を記載する。

上記のような裏がえしのマイクロパッチを用いて、電圧ランプにより引き起こされたrSK2流れは、内部（槽）溶液におけるカルシウムの濃度に依存することが示された。逆電位での傾斜コンダクタンスを、カルシウム濃度の関数として、プロットし、そしてデータ点をHill等式により適合せしめる。8個のパッチからのカルシウムについての平均Kdは、 $0.63 \pm 0.23 \mu\text{M}$ である。そのプロットが見出されるカルシウムに対する急勾配の依存性は、 $4.81 \pm 1.46$ のHill係数により影響され、このことは、少なくとも2つのカルシウムがチャンネルゲートに包含されることを示唆する。hSK1により実施された類似する実験は、 $0.70 \pm 0.06 \mu\text{M}$ のKd及び $3.90 \pm 0.45$ のHill係数を生成した。

#### 【0315】

hIK1及びSK2を比較するために、標準化された流れを、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の関数としてプロットし、そしてそれらのデータ点をHill等式により適合せしめる。両チャンネルは、同じ $K_{0.5}$ （最大の半分の活性化のための濃度、hIK1に関しては $0.32 \pm 0.03 \mu\text{M}$ （ $n = 7$ ）及びSK2に関しては $0.31 \pm 0.05 \mu\text{M}$ （ $n = 4$ ）； $p = 0.68$ ）を示したが、しかし $\text{Ca}^{2+}$ -依存性の急勾配においては異なっており、すなわちSK2は $3.5 \pm 0.4$ （ $n = 4$ ）のHill係数を有し、ところがhIK1は $1.7 \pm 0.3$ （ $n = 7$ ， $p < 0.001$ ）のHill係数を有した。それらの結果は、hIK1がまた、カルシウム-活性化されたカリウムチャンネルであることを示す。

#### 【0316】

##### 例5

例5は、rSK2チャンネルについてのマグネシウム誘発された内部方向整流を記載する。

上記に記載されるrSK2についての内部方向整流を、カリウム及びカルシウム（ $5 \mu\text{M}$ ）以外の内部カチオンの不在下で観察した。生来のSKチャンネルは、内部 $\text{Mg}^{2+}$ イオンにより誘発された内部方向整流を示す（Lancasterなど., J. Neurosci., 11: 23-30 (1991)）。海馬において、SKチャンネルは内部 $\text{Mg}^{2+}$ の存在下で有意な内部方向整流を示す。流れは、種々の濃度の内部 $\text{Mg}^{2+}$ 及び $10 \mu\text{M}$ の $\text{Ca}^{2+}$ の存在下で、rSK2を発現する卵母細胞から抽出された裏がえしのマクロパッチから誘導された。異なった濃度の $\text{Mg}^{2+}$ （ $0.1 \sim 3 \text{mM}$ ）が裏がえしのパッチを浸している溶液に添加される場合、外部方向流が有意に減じられた。

#### 【0317】

$\text{Mg}^{2+}$ 誘発された内部方向整流の濃度-及び電圧-依存性を試験した。高まる $\text{Mg}^{2+}$ に従っての内部方向流のわずかな低下が観察された。従って、-100mVでの内部方向流に対する、20~100mVの電位での外部方向流の比を、異なった濃度の内部 $\text{Mg}^{2+}$ の関数としてプロットした。複数の実験から、異なった $\text{Mg}^{2+}$ 濃度及び電圧で得られたデータをHill等式により適合せしめ、 $0.94 \pm 0.27$ （ $n = 24$ ）の平均Hill係数を生成した。続いて、そのHill係数を1で固定し、そして平均Kdを試験電位の関数としてプロットした。

#### 【0318】

上昇する電圧と共に低下するKdは、 $\text{Mg}^{2+}$ 阻止が電圧-依存性であることを示す。 $\text{Mg}^{2+}$ のためのKdを、20, 40, 60, 80及び100mVでパネルBにおいて示されるように5個のパッチから得た。個々の電位での値を平均し、電圧の関数としてプロットし、そしてWoodhull等式、すなわち $Kd(0 \text{mV}) \exp(-zFE/RT)$ により適合せしめ、ここで前記式中、 $Kd(0 \text{mV})$ は6mMであり、 $z$ は $\text{Mg}^{2+}$ により検知される電場率0.30であり、 $Z$ はこの原子価2であり、

10

20

30

40

50

そしてF, E, R、及びTはそれらの有用な意味を有する (Woodhull, J. Gen. Physiol., 61: 687-708 (1973))。Woodhull等式の適用は、 $Mg^{2+}$  イオンが約0.30の膜電場を検知することを示した。

#### 【0319】

##### 例6

例6は、卵母細胞からの単一チャネルの記録を記載する。

6A. 例6Aは、単一チャネルが rSK2 を発現する卵母細胞から摘出された裏がえしのパッチを用いて試験されることを記載する。 $\mu$ モル以下の濃度でのカルシウムの添加は、対照には見出されないチャネル活性を誘発した。代表的なパッチは、槽溶液に適用される  $0.2 \mu M$  のカルシウムが複数の開口部を単一の開口に誘発したことを示した。チャネル活性は、カルシウム濃度が高められるにつれて、上昇し、その結果、 $0.6 \mu M$  のカルシウムにおいて、単位開口部はもはや分解され得ない。カルシウムの洗い流しに基づいて、チャネル活性は消出した。 $0.4 \mu M$  のカルシウムの存在下でのチャネル活性を、いくつかの電圧で記録した。肉眼で見えるランプ記録に類似して、チャネル開口確立は、電圧に対して明らかに依存しなかった。

10

#### 【0320】

いくつかの電圧で測定された単位開口部を用いて、単一チャネル I - V 関係を構成した。使用される溶液はマクロパッチ記録に関してと同じであった (例5)。電極を Corning 7052 ガラス (Garner) から製造し、そしてそれは  $9 \sim 13 M\Omega$  の抵抗を有した。データを  $1 kHz$  (Bessel) で濾過し、Pulse (HEKA Elektronik) を用いて  $10 kHz$  で獲得し、そして Macintosh Quadra 650 上に直接的に貯蔵した。単一チャネルを、Mac Tac (SKALAR Instruments) を用いて分析した。“50% 閾値” 技法を用いて、現象の振幅を評価した。

20

#### 【0321】

閾値を個々の開口のために調整し、そして個々の遷移を、許容される前、眼により調べた。振幅ヒストグラムを、Mac Tacfit (SKALAR Instruments) を用いて構成し、そして単一 Gaussian 分布により最良に適合せしめる。チャネル開口確立を  $NP(0)$ ; すなわちチャネルの数により掛け算された開口確立の生成物として評価した。 $NP(0)$  を、合計時間により割り算される (滞留時間  $\times$  レベル数) の合計として計算した。N は、 $0.4 \mu M$  のカルシウムでの同時開口チャネルの数として評価された。rSK2 又は hSK1 のいづれかを発現する卵母細胞からの3個のパッチに対する線状回帰分析は、それぞれ  $9.9 \pm 0.9 pS$  及び  $9.2 \pm 0.3 pS$  の平均単一チャネルコンダクタンスを生成した。

30

#### 【0322】

6B. 例6Bは、hIK1の単一チャネルコンダクタンスを記載する。この方法は、例3Bに記載されている。 $0.2 \sim 1.0 \mu M$  の遊離カルシウムを含む槽溶液中に摘出された裏がえしのパッチからの定常記録は、カルシウムの不在下で見出されなかった短 - 持続期間の開口部を示した。代表的な痕跡は、 $-60 mV$  で記録された。チャネル活性の程度は、内部カルシウムの濃度に依存した。細胞内カルシウムの低減はチャネル活性を低め、そして内部カルシウムの除去は、チャネル活性を破壊し、これは  $Ca^{2+}$  の再適用の後、戻った。

#### 【0323】

持効性チャネル活性が  $-100 mV \sim +100 mV$  の範囲の膜電圧で見うけられ、そして開口確立は明らかに、電圧依存性ではなかった。選択パッチに関しては、開口部の振幅を測定し、ヒストグラム中にアセンブルし、そして Gaussian 分布により適合せしめる。その得られる平均振幅を用いて、流れ - 電圧の関係を構成した。単一チャネルの流れ - 電圧関係は、肉眼で見える流れ - 電圧関係に類似する内部方向整流を示す。このパッチのための、内部方向流れ - 電圧関係の線状回帰分析は、 $35 pS$  の単一チャネルコンダクタンスを生成し; 4個のパッチからの結果は、 $38 \pm 4 pS$  の単位コンダクタンスを付与した。外部方向コンダクタンスの測定はより変動的であり、 $5 \sim 12 pS$  の範囲である。

40

#### 【0324】

##### 例7

例7は、新規ラット及びヒトカリウムチャネルの薬理学を記載する。

50

7 A . 肉眼で見える rSK2 流が、例 3 に記載されるパッチ用ピペットにより 0 又は 60pM のアパミン、又は 0 又は 2  $\mu$  M の d - ツボクレートを注入することにより裏がえしのマクロパッチからの 5  $\mu$  M の  $Ca^{2+}$  で記録された。クローン化されたチャネルの機能的特徴は、ニューロン (Lancaster and Adams, *J. Neurophysiol.*, 55 : 1268-1282 (1986) ; Lancaster など., *J. Neurosci.*, 11 : 23-30 (1991) ; Sah など., *J. Neurophysiol.*, 68 : 1834-1841 (1992))、骨格筋 (Blatz and Magleby, *Nature*, 323 : 718-720 (1986))、副腎クロム親和性細胞 (Park, *J. Physiol.*, 481 : 555-570 (1994) ; Artalejo など., *Pflugers Archiv.*, 423 : 97-103 (1993))、及び T - リンパ球 (Grissmer など., *J. Gen. Physiol.*, 99 : 63-84 (1992)) に記載される SK 種類のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを暗示する。

10

## 【 0 3 2 5 】

生来の SK チャネルは、明確な薬理学を表わす。それらは、サソリペプチドカリブドトキシン (CTX)、すなわち BK カリウムチャネルの有能なブロッカーによりブロックされない (Miller など., *Nature*, 313 : 361-318 (1985))。しかしながら、すべてではないが、多くの SK チャネルは、ハチ毒物トキシン、アパミン及び植物アルキロイド、すなわち d - ツボクラレによりブロックされる (dTc ; Zhang and McBain, *J. Physiol.*, 488 : 661-672 (1995) ; Park, *J. Physiol.*, 481 : 555-570 (1994) ; Dun など., *J. Physiol.*, 375 : 499-511 (1986))。

## 【 0 3 2 6 】

500nM の CTX の適用は、rSK2 又は hSK1 をブロックしないが、しかし hSlo BK 流の活性を破壊した。rSK2 流は、63pM の  $K_d$  を有するピコモル濃度のアパミンにより効果的にブロックされた。対照的に、100nM のアパミンの適用は hSK - 1 流に影響を及ぼさなかった (n = 8)。dTc はまた、2.4  $\mu$  M の  $K_d$  により rSK2 流をブロックし、ところが hSK1 は、76.2  $\mu$  M の  $K_d$  に対して、約 30 倍低い感度であった。

20

## 【 0 3 2 7 】

7 B . hIK1 の薬理的試験に関して、クロトリマゾールは Sigma からであり、ケトコナゾール及びイベリオトキシンは RP1 からであり、アパミンは Calbiochem からであり、カリブドトキシンは Dr. Chris Miller の親切な贈与であった。hIK1 の機能的特徴は、赤血球細胞 (The Gardas channel ; Gardos, 1958) 及び他の組織から記載される中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された  $K^+$  チャネルを暗示する。生来の IK チャネルは識別する薬理学を提供し、カリブドトキシン (CTX) によりブロックされるが、しかし高コンダクタンスの電圧 - 及び  $Ca^{2+}$  - 活性化された  $K^+$  チャネル (BK チャネル) とは異なり、イベリオトキシンによってはブロックされない。

30

## 【 0 3 2 8 】

また、IK チャネルは、ハチ毒物ペプチドトキシンアパミン、すなわち生来の及びクローン化された SK チャネルのブロッカーに対して敏感ではない。さらに、いくつかの IK チャネル、著しくは Gardos チャネルは、いくつかのイミダゾール誘導体、たとえばクロトリマゾールに対して敏感であるが、しかし他のもの、たとえばケトコナゾールに対して敏感ではない。hIK1 流は、2.5nM の  $K_i$  を有する CTX により効果的にブロックされ (n = 4)、そして 50nM の IBX はわずか 15  $\pm$  3 % をブロックした。ヒト IK1 は 24.8nM の  $K_i$  をもってクロトリマゾールに対して敏感であるが、しかしわずか 24  $\pm$  6 % が 10  $\mu$  M のケトコナゾールによりブロックされた。100nM のアパミンは、hIK1 流をわずか 12  $\pm$  5 % 減じた。

40

## 【 0 3 2 9 】

本明細書に言及されるすべての出版物及び特許は、個々の出版物又は特許が引用により本明細書に組込まれることを特異的且つ個々に示されるかのように同じ程度に明細書中に引用により組込まれる。

## 【 配列表 】

[2004024268000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 アデルマン, ジョン ピー .

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェスト ミッチェル ストリート 2 4 3 3

(72)発明者 メイリー, ジェイムス

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェスト ウェストウッド ドライブ 1 4 4 5

(72)発明者 ボンド, クリス ティー .

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェスト ミッチェル ストリート 2 4 3 3

(72)発明者 シルビア, クリストファー ピー .

アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 7 1 2, ダーハム, ブルームセッジ ウェイ 3 1 0 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA05 CA11 DA02 DA06 EA03 HA14  
HA174B063 QA06 QA13 QA18 QQ08 QQ43 QQ79 QQ89 QR32 QR48 QR50  
QR55 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02 QX05

4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 CA45 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	低中等电导钙激活钾通道及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004024268A</a>	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2003292589	申请日	2003-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康科学大学 眼科另类科技中心代雷法团去开球		
申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康科学大学 眼科另类科技中心仁, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	アデルマンジョンピー メイリージェイムス ボンドクリスティー シルビアクリストファーピー		
发明人	アデルマン,ジョンピー. メイリー,ジェイムス ボンド,クリスティー. シルビア,クリストファーピー.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 C07H21/04 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33 /53 G01N33/68 G06F17/30		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/06 A61P9/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K2299 /00 G01N33/6872 G01N2500/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12N5/00.A C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024 /DA06 4B024/EA03 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063 /QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX05 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065 /AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	60/026451 1996-09-11 US 60/040052 1997-03-07 US 60/045233 1997-04-17 US		
其他公开文献	JP4052582B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供编码具有中等电导率和蛋白质的新钙激活钾通道的基因。解决方案：获得编码具有中等电导的钙激活钾通道单体的至少15个相邻氨基酸的分离的核酸。单体 ( i ) 具有42-52KDa的计算分子量, ( ii ) 作为钾通道的功能聚合物存在, 并且当在非爪蟾卵母细胞中表达时在内部方向具有30-60pS的单位电导, 和 ( iii ) 特异性结合由SEQ ID NO.1形成的多克隆抗体。 32.Ž

FSK2 .....HS SCRMGGWR PLSNLSRR NUHEWDEAQ  
FSK3 .....HS SCXSGOMK PLRLSASRR NLLGEPGQ  
FSK1 .....  
HSK1 HEGPRLJCE PNPQIVVM SWSMGSVGR P...JGSGFG ALGQDPPOPE  
  
FSK2 PLQPPASVWG GGGASDSEA AASSSAPZ IVMYDPEHM SNNIALLYGTG  
FSK3 PLQLI..... ..EPNPEE IISREDNH AMQLLHRPN  
FSK1 .....  
HSK1 AGHPEOPHS PLQIVVAKS EPARRSPGP RQPPQDDDD EDOEDEAGR  
  
FSK2 GGGSTGGGG GGGGGGGH GSSGTSSK XKNONIGYXL GHRRALEKR  
FSK3 ADRNHQACT TAGSTIFF.....KANK RKNONIGYXL GHRRALEKR  
FSK1 .....S GXPTVSHRL GHRRALEKR  
HSK1 QR.....AS GXPSYGHRL GHRRALEKR  
  
FSK2 KRUSDYALIF GHEGIVWVI ETELSNGVD KASLSLALK CLISLSTILL  
FSK3 KRUSDYALIF GHEGIVWVI ETELSNGVLS KDSHESLALK CLISLSTILL  
FSK1 KRUSDYALIF GHEGIVWVT ETELSNGVVT KESLSLPAK CLISLSTVIL  
HSK1 KRUSDYALIF GHEGIVWVT ETELSNGVVT KESLSLPAK CLISLSTALL  
  
FSK2 LGLIIVYHAR EQIUVHNG ADPRHMYT ERFITFCEI LWCAIHPFG  
FSK3 LGLIIVYHAR EQIUVHNG ADPRHMYT ERLYLSLH DWCAIHPFG  
FSK1 LGLIIVYHAR EQIUVHNG ADPRHMYT ERVLSLSL AWCAIHPFG  
HSK1 LGLIIVYHAR EQIUVHNG ADPRHMYT ERVLSLSL AWCAIHPFG