

(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2004-208694

(P2004-208694A)

(43) 公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	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
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027		4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00		4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/18		4 B O 6 5
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 11/00		4 C O 8 4
	審査請求 有 請求項の数 37 O L	(全 89 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-29998 (P2004-29998)	(71) 出願人	501422277
(22) 出願日	平成16年2月5日 (2004.2.5)		エイチエスシー リサーチ アンド ディ
(62) 分割の表示	特願2001-402257 (P2001-402257) の分割		ベロップメント リミテッド
原出願日	平成2年8月20日 (1990.8.20)		H S C Research and De
(31) 優先権主張番号	396,894		velopment Limited
(32) 優先日	平成1年8月22日 (1989.8.22)		カナダ国 エム5ジー 1エックス8 オ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ンタリオ トロント ユニヴァーシティー
(31) 優先権主張番号	399,945		アヴェニュー 555
(32) 優先日	平成1年8月24日 (1989.8.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	401,609		
(32) 優先日	平成1年8月31日 (1989.8.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 嚢胞性繊維症関連遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 C F キャリアーのスクリーニング及び検出、C F 診断および治療のための技術を提供すること。

【解決手段】 C F キャリアーのスクリーニング及び検出、C F 診断および治療に使用し得る C F タンパク質遺伝子をクローニングし、単離精製する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製 DNA 分子であって、

(a) 以下に示す配列 1 :

配列 1 :

[化 1]

1 AATTGGAAGCAAATGACATCACAGCAGGTCAGAGAAAAAGGGTTGAGCGGCAGGCACCCA
 61 GAGTAGTAGGTCTTTGGCATTAGGAGCTTGAGCCCAGACGGCCCTAGCAGGGACCCCAGC
 121 GCCCGAGAGACCATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTT
 181 TTCACCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGAC
 241 ATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAACTCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAA
 301 TGGGATAGAGAGCTGGCTCAAAGAAAATCCTAAACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGT
 361 FFWR FMFYGI FLYLGEVTKA 96
 421 VOPLLL GR I I A S Y D P D N K E E 116
 481 R SIAIYLGI GLCLLFIVRTL 136
 541 LL H P A I F G L H H I G M Q M R I A M 156
 601 F S L I Y K K T L K L S S R V L D K I S 176
 661 I G Q L V S L L S N N L N K F D E GLA 196
 721 LAHFVWIA PLOVALLMGLI W 216
 781 E L L Q ASAFCLGLFLIVLLE 236
 841 OAGLG R M M M K Y R D Q R A G K I S 256
 901 E R L V I T S E M I E N I Q S V K A Y C 276
 961 W E E A M E K M I E N L R Q T E L K L T 296
 1021 R K A A Y V R Y F N S SAFFFSGF 316
 1081 VVFLSVLPYALI KGIILRKI 336
 1141 FTTISFCIVLRMAV T R Q F P W 356
 1201 A V Q T W Y D S L G A I N K I Q D F L Q 376
 1261 K Q E Y K T L E Y N L T T T E V V M E N 396
 1321 V T A F W E E G F G E L F E K A K Q N N 416
 1321 GTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGATTGGGAATTATTGAGAAAGCAAAACAAAACAAAT

10

20

30

40

[化 2]

1381 N N R K T S N G D D S L F F S N F S L L 436
 AACAAAGAAAACCTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTCAGTAATTTCTCACTTCTT

1441 G T P V L K D I N F K I E R G Q L L A V 456
 GGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTT

1501 A G S T G A G K T S L L M M I M G E L E 476
 GCTGGATCCACTGGAGCAGGCAA_△ACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGAACTGGAG

1561 P S E G K I K H S G R I S F C S Q F S W 496
 CCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCACAGTGAAGAATTTCACTTCTGTTCTCAGTTTTCTGG

1621 I M P G T I K E N I I F G V S Y D E Y R 516
 ATTATGCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGA

1681 Y R S V I K A C O L E E D I S K F A E K 536
 TACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTGCAGAGAAA

1741 D N I V L G E G G I T L S G G Q R A R I 556
 GACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATT

1801 S L A R A V Y K D A D L Y L L D S P F G 576
 TCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGG

1861 Y L D V L T E K E I F E S C V C K L M A 596
 TACCTAGATGTTTAAACAGAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCT

1921 N K T R I L V T S K M E H L K K A D K I 616
 AACAAAACCTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATA

1981 L I L H E G S S Y F Y G T F S E L Q N L 636
 TTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTA

2041 Q P D F S S K L M G C D S F D Q F S A E 656
 CAGCCAGACTTTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTGACCAATTTAGTGCAGAA

2101 R R N S I L T E T L H R F S L E G D A P 676
 AGAAGAAATTCATCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCT

2161 V S W T E T K K Q S F K Q T G E F G E K 696
 GTCTCCTGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGAAAAAA

2221 R K N S I L N P I N S I R K F S I V Q K 716
 AGGAAGAATTCATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTCCATTGTGCAAAAAG

2281 T P L Q M N G I E E D S D E P L E R R L 736
 ACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAGAGAGAAGGCTG

2341 S L V P D S E Q G E A I L P R I S V I S 756
 TCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGAGAGGCGATACTGCCTCGCATCAGCGTGATCAGC

2401 T G P T L Q A R R R Q S V L N L M T H S 776
 ACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGAGTCTGTCTGACCTGATGACACACTCA

2461 V N Q G Q N I H R K T A S T R K V S L 796
 GTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTG

2521 A P Q A N L T E L D I Y S R R L S Q E T 816
 GCCCCTCAGGCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAGAAGGTTATCTCAAGAACT

10

20

30

40

[化 3]

2581 G L E I S E E I N E E D L K | E C F F D D 836
GGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCTTTTTTGTATGAT

2641 M E S I P A V T T W N T Y L R Y I T V H 856
ATGGAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATATTACTGTCCAC

2701 K S L I F V L I W C L V I F L A E V A A 876
AAGAGCTAATTTTGTGCTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCT

2761 S L V V L W L L G M T P L Q D K G N S T 896
TCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACT

2821 H S R N N S Y A V I I T S T S S Y Y V F 916
CATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTT

2881 Y I Y V G V A D T L L A M G F F R G L P 936
TACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCA

2941 L V H T L I T V S K I L H H K M L H S V 956
CTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTGAAAATTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTT

3001 L Q A P M S T L N T L K A E G I L N R F 976
CTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTC

3061 S K D I A I L D D L L P L T I F D F I O 996
TCCAAAGATATAGCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAG

3121 L L L I V I G A I A V V A V L Q P Y I F 1016
TTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTGCGAGTTTACAAACCCTACATCTTT

3181 V A T V P V I V A F I M L R A Y F L Q T 1036
GTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACC

3241 S Q Q L K Q L E S E G R S P I F T H L V 1056
TCACAGCAACTCAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTT

3301 T S L K G L W T L R A F G R Q P Y F E T 1076
ACAAGCTTAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACT

3361 L F H K A L N L H T A N W F L Y L S T L 1096
CTGTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGACCTGTCAACACTG

3421 R W F Q M R I E M I F V I F F I A V T E 1116
CGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGTGCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTC

3481 I S I L T T G E G E G R V G I I L T L A 1136
ATTTCCATTTTAAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCC

3541 M N I M S T L O W A V N S S I D V D S L 1156
ATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTG

3601 M R S V S R V F K F I D M P T E G K P T 1176
ATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACC

3661 K S T K P Y K N G Q L S K V M I I E N S 1196
AAGTCAACCAACCATAACAAGAATGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCA

3721 H V K K D D I W P S G G Q M T V K D L T 1216
CACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACA

3781 A K Y T E G G N A I L E N I S F S I S P 1236
GCAAATACACAGAAGGTGGAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCTCT

3841 G Q R V G L L G R T G S G K S T L L S A 1256
GGCCAGAGGTGGGCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCT

10

20

30

40

【化4】

3901	<u>F L R L L N T E G E I O I D G V S W D S</u>	1276
	TTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTCTTGGGATCA	
3961	<u>I T L Q Q W R K A F G V I P O K V F I F</u>	1296
	ATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTT	
4021	<u>S G T F R K N L D P Y E Q W S D Q E I W</u>	1316
	TCTGGAACATTAGAAAAAAGCTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGG	
4081	<u>K V A D E V G L R S V I E Q F P G K L D</u>	1336
	AAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCTGGGAAGCTTGAC	
4141	<u>F V L V D G G C V L S H G H K Q L M C L</u>	1356
	TTTGTCTTGTGGATGGGGCTGTGTCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTG	
4201	<u>A R S V L S K A K I L L L D E P S A H L</u>	1376
	GCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGTCTGCTGATGAACCCAGTGCTCATTG	
4261	<u>D P V T Y Q I I R R T L K Q A F A D C T</u>	1396
	GATCCAGTAACATACCAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACA	
4321	<u>V I L C E H R I E A M L E C Q Q F L V I</u>	1416
	GTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAATTTTTGGTCATA	
4381	<u>E E N K V R Q Y D S I Q K L L N E R S L</u>	1436
	GAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTC	
4441	<u>F R Q A I S P S D R V K L F P H R N S S</u>	1456
	TTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTTCCCCACCGGAAGTCAAGC	
4501	<u>K C K S K P Q I A A L K E E T E E E V Q</u>	1476
	AAGTGAAGTCTAAGCCCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAA	
	D T R L =	1480

のアミノ酸残基位置1から1480までに対応するDNA配列、

(b) 上記配列1のアミノ酸残基位置1から1480までの配列を有する正常な囊胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質(CFTR)をコードするDNA配列、

(c) 上記配列1のアミノ酸残基位置1と1480の間にある少なくとも16個の連続するヌクレオチドからなる一部分のDNA配列、

(d) 少なくとも16個のヌクレオチドからなり、上記配列1のアミノ酸配列の部分断片をコードするDNA配列、および

(e) 上記配列1のアミノ酸残基位置1と1480の間の少なくとも18個の連続するヌクレオチドによってコードされるエピトープを含む以下の部分：

アミノ酸残基204~249の配列、アミノ酸残基347~698の配列、アミノ酸残基710~757の配列、アミノ酸残基758~796の配列、アミノ酸残基1188~1480の配列、アミノ酸残基28~45の配列、アミノ酸残基58~75の配列、アミノ酸残基104~117の配列、アミノ酸残基139~153の配列、アミノ酸残基279~294の配列、アミノ酸残基500~512の配列、アミノ酸残基725~739の配列、アミノ酸残基933~946の配列またはアミノ酸残基1066~1084の配列をコードするDNA配列

からなる群より選択されるDNA配列からなる精製DNA分子。

【請求項2】

請求項1の(a)、(b)または(c)の精製DNA分子であって、更にヒト体細胞内で発現した際に囊胞性線維症に関連する細胞機能の変化に関係するDNA配列の変化、欠損または非機能性変異部分を含み、該DNAの変化、欠損または非機能性変異部分が、上記配列1におけるアミノ酸残基位置508のフェニルアラニン残基をコードするヌクレオチドの欠失を含む精製DNA分子。

10

20

30

40

50

【請求項 3】

請求項 1 または 2 の (c)、(d) 及び (e) の部分に記載された配列を有する DNA または RNA ヌクレオチド配列を含む精製核酸プローブ。

【請求項 4】

該配列が A A A G A A A A T A T C A T C T T T G G T G T T およびその相補体を含む請求項 3 に記載の核酸プローブ。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 の DNA 分子を含む組換えクローニングベクター。

【請求項 6】

請求項 5 記載のベクターで形質転換された宿主。

10

【請求項 7】

請求項 1 に示す配列 1 のアミノ酸残基位置 1 ~ 1 4 8 0 の配列を有し、さらにアミノ酸残基位置 5 0 からのフェニルアラニンの欠失をもたらす三個の塩基対の除去によって特徴付けられる、変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質 (C F T R) をコードする DNA 配列を有する精製 DNA 分子。

【請求項 8】

被検対象の生物学的試料の分析方法であって、該生物学的試料中の、正常な嚢胞性線維症関連遺伝子 (C F 遺伝子)、正常 C F 遺伝子産物、変異 C F 遺伝子、変異 C F 遺伝子産物およびそれらの混合物からなる群から選択した少なくとも一つの存在の有無を検出する工程を有することを特徴とする分析方法。

20

【請求項 9】

生物学的試料が被検対象のゲノムの少なくとも一部を含み、検出工程がハイブリダイゼーションアッセイを含む請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

検出工程がさらに請求項 3 に記載の DNA または RNA ヌクレオチド配列を含む精製核酸プローブを含む請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

該配列が、A A A G A A A A T A T C A T C T T T G G T G T T およびその相補体を含む請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

生物学的試料が被検対象の嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質 (C G T R タンパク質) を含み、検出工程が免疫学的アッセイを含む請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 13】

免疫学的アッセイに、正常 C F T R タンパク質に特異的な抗体であり、正常 C F T R タンパク質に結合し、変異 C F T R タンパク質には結合しない抗体を用いる請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

免疫学的アッセイに、変異 C F T R タンパク質に特異的な抗体であり、正常 C F T R タンパク質には結合せず、変異 C F T R タンパク質には結合する抗体を用いる請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 15】

抗体が少なくとも一つのモノクローナル抗体である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

抗体が少なくとも一つのモノクローナル抗体である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

被検対象がヒト子宮内胎児である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

検出工程に、少なくとも一つの追加の請求項 4 に記載のヌクレオチドプローブが用いられる請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

50

請求項 1 に記載の配列 1 の DNA の異なる DNA 配列断片またはその RNA 相同体またはヒトクロモソーム 7 の異なる DNA 配列断片からなり、該配列 1 の DNA 配列のいずれかの側に位置している、二番目のヌクレオチドプローブを検出工程に用いる請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

嚢胞性線維症関連遺伝子 (CF 遺伝子) 中に同定された嚢胞性線維症変異の存在を示す潜在的 CF キャリアもしくは患者をスクリーニングする方法において、

(a) 該潜在的嚢胞性線維症 (CF) キャリアまたは潜在的患者の体細胞からゲノム DNA を単離し、

(b) 該 CF 遺伝子中のアミノ酸残基位置 5 0 8 のフェニルアラニンの欠失による変異にスパンし、該変異を検出することのできる DNA プローブを該単離されたゲノム DNA 上にハイブリダイズさせ、

(c) 該 DNA プローブの有無を決定するために該ゲノム DNA を処理し、それによって予め決定されたハイブリダイゼーション方法に従って該嚢胞性線維症変異の有無を示す過程を含む方法。

【請求項 2 1】

変異嚢胞性線維症関連遺伝子 (CF 遺伝子) としての請求項 2 の精製 DNA 分子の制限エンドヌクレアーゼでの切断部位の有無を決定することからなる嚢胞性線維症キャリアまたは患者の検出方法。

【請求項 2 2】

変異嚢胞性線維症関連遺伝子 (CF 遺伝子) におけるアミノ酸残基位置 5 0 8 のフェニルアラニンの欠失の結果としてのヘテロデュプレックス (heteroduplex) PCR 産物のポリアクリルアミドゲルにおける移動度の差の決定からなる嚢胞性線維症キャリアの検出方法。

【請求項 2 3】

イムノアッセイによる嚢胞性線維症関連遺伝子 (CF 遺伝子) の存在を測定するためのキットであって、

(a) CF 遺伝子の遺伝子産物に特異的に結合する抗体、

(b) 抗体の遺伝子産物への結合を検出するための試薬手段とを有し、

(c) これら抗体および試薬手段がイムノアッセイを行なうために有効な量で存在するキット。

【請求項 2 4】

ハイブリダイゼーションによって嚢胞性線維症関連遺伝子 (CF 遺伝子) の存在をアッセイするためのキットであって、

(a) CF 遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブ、

(b) オリゴヌクレオチドプローブの CF 遺伝子とのハイブリダイゼーションを検出するための試薬手段を有し、

(c) これらプローブ及び試薬手段がハイブリダイゼーションアッセイを行なうために有効な量でそれぞれ存在する

キット。

【請求項 2 5】

以下のタンパク質：

(1) 約 1 7 0 , 0 0 0 ダルトンのペプチド分子量、および細胞膜透過イオンコンダクタンス作用活性を有し、請求項 1 に記載の配列 1 におけるアミノ酸残基 1 ~ 1 4 8 0 のアミノ酸配列を有する精製された正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質、または

(2) 上記 (1) に記載の正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質の変異体であって、アミノ酸残基位置 5 0 8 のフェニルアラニンの欠失を含み、ヒト細胞中での嚢胞性線維形成活性を有する、精製された変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質、に特異的であり、免疫学的に活性な抗 - CF TR ポリクローナルまたはモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

薬学的に許容できる担体と組み合わせて、治療的に有効な量で以下のタンパク質：

- (1) 約 170,000 ダルトンのペプチド分子量、および細胞膜透過イオンコンダクタンス作用活性を有し、請求項 1 に記載の配列 1 におけるアミノ酸残基 1 ~ 1480 のアミノ酸配列を有する精製された正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質、または
- (2) 上記 (1) に記載の正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質の変異体であって、アミノ酸残基位置 508 のフェニルアラニンの欠失を含み、ヒト細胞中での嚢胞性線維形成活性を有する、精製された変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質を含み、細胞塩素イオン輸送回復による嚢胞性線維患者の治療に使用するための組成物。

【請求項 27】

呼吸器上皮細胞への該組成物の適用を促進するための肺表面活性剤タンパク質を担体を含む請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

請求項 1 の DNA 分子及び該 DNA 分子の嚢胞性線維患者細胞への伝達のための伝達手段を含む嚢胞性線維症の遺伝子治療に有用な組成物。

【請求項 29】

伝達手段が組換えベクターである請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 30】

嚢胞性線維症の徴候を示すトランスジェニックマウス。

【請求項 31】

正常または変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質 (CFTR) の製造法であって

(a) 組換えクローニングベクターでトランスフェクションされた宿主細胞を培地中で正常または変異 CFTR タンパク質の発現に好ましい条件下で培養し、

(b) 発現された正常または変異 CFTR タンパク質を単離する過程を有し、

前記組換えクローニングベクターが、

以下の (a) ~ (e) からなる群より選択される DNA 配列からなる精製 DNA 分子：

(a) 請求項 1 に記載の配列 1 のアミノ酸残基位置 1 から 1480 までに対応する DNA 配列、

(b) 上記配列 1 のアミノ酸残基位置 1 から 1480 までの配列を有する正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質 (CFTR) をコードする DNA 配列、

(c) 上記配列 1 のアミノ酸残基位置 1 と 1480 の間にある少なくとも 16 個の連続するヌクレオチドからなる一部分の DNA 配列、

(d) 少なくとも 16 個のヌクレオチドからなり、上記配列 1 のアミノ酸配列の部分断片をコードする DNA 配列および

(e) 上記配列 1 のアミノ酸残基位置 1 と 1480 の間の少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドによってコードされるエピトープを含む以下の部分：

アミノ酸残基 204 ~ 249 の配列、アミノ酸残基 347 ~ 698 の配列、アミノ酸残基 710 ~ 757 の配列、アミノ酸残基 758 ~ 796 の配列、アミノ酸残基 1188 ~ 1480 の配列、アミノ酸残基 28 ~ 45 の配列、アミノ酸残基 58 ~ 75 の配列、アミノ酸残基 104 ~ 117 の配列、アミノ酸残基 139 ~ 153 の配列、アミノ酸残基 279 ~ 294 の配列、アミノ酸残基 500 ~ 512 の配列、アミノ酸残基 725 ~ 739 の配列、アミノ酸残基 933 ~ 946 の配列またはアミノ酸残基 1066 ~ 1084 の配列をコードする DNA 配列；及び

(f) 前記 (a)、(b) または (c) の精製 DNA 分子であって、更にヒト体細胞内で発現した際に嚢胞性線維症に関連する細胞機能の変化に関係する DNA 配列の変化、欠損または非機能性変異部分を含み、該 DNA の変化、欠損または非機能性変異部分が、前記配列 1 におけるアミノ酸残基位置 508 のフェニルアラニン残基をコードするヌクレオチドの欠失を含む精製 DNA 分子；

10

20

30

40

50

から選択された精製 DNA 分子を含むことを特徴とする正常または変異 C F T R タンパク質の製造方法。

【請求項 3 2】

約 170,000 ダルトンのペプチド分子量、および細胞膜透過イオンコンダクタンス作用活性を有し、請求項 1 に記載の配列 1 におけるアミノ酸残基 1 ~ 1480 のアミノ酸配列を有する精製された正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質。

【請求項 3 3】

約 170,000 ダルトンのペプチド分子量、および細胞膜透過イオンコンダクタンス作用活性を有し、請求項 1 の配列 1 におけるアミノ酸残基 1 ~ 1480 のアミノ酸配列を有する精製された正常な嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質の変異体であって、

10

アミノ酸残基位置 508 のフェニルアラニンの欠失を含み、ヒト細胞中での嚢胞性線維形成活性を有する、精製された変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 の (a) ~ (f) から選択された DNA 配列にコードされ、正常または変異嚢胞性線維症膜通過伝導率制御タンパク質 (C F T R) の免疫学的または生物学的活性を示すポリペプチド。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 の正常または変異 C F T R タンパク質を該タンパク質を含む細胞から単離する方法であって、

20

(a) 該正常または変異 C F T R タンパク質が発現している細胞の選択された細胞膜にあるタンパク質を可溶化して、該 C F T R タンパク質の溶液を提供し、

(b) 基体に固定された該正常または変異 C F T R タンパク質に対する抗体に、該溶液を接触させて、該溶液から該 C F T R タンパク質を分離し、

(c) 該基体を洗浄して該抗体に結合しなかったタンパク質を除去し、

(d) 該抗体から該 C F T R タンパク質を離して、該 C F T R タンパク質を単離し、

(e) 該 C F T R タンパク質を精製して、他の残留している哺乳動物性タンパク質を除去する過程を有する正常または変異 C F T R タンパク質の単離方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 2 または 3 3 に記載の正常または変異 C F T R タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

30

【請求項 3 7】

請求項 3 1 の組換えクローニングベクターを含む異種細胞系を有し、該ベクターが嚢胞性線維症の症候を誘導するものであるヒトを除く動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国国立衛生研究所 (N I H) によって支給されたグラント R 0 1 D K 3 9 6 9 0 - 0 2 および D K 3 4 9 4 4 による政府後援で行われた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【0002】

40

本発明は、概して嚢胞性線維症 (C F) 遺伝子に関し、さらに詳細には正常および変異 C F 遺伝子類に対応する DNA 配列の同定、単離およびクローニング、ならびにそれらの転写体および遺伝子産物類に関する。本発明は、さらに、C F キャリアーのスクリーニングおよび検出方法、C F 診断および出生前 C F スクリーニングおよび診断、および前記 DNA タンパク質、および前記タンパク質の代謝機能から誘導した情報を用いる組換え技術および薬物療法を利用した遺伝子治療に関する。

【背景技術】

【0003】

嚢胞性線維症 (C F) は、コーカサス人種において最もよくみられる重篤な常染色体劣性遺伝的疾患である。それは、北アメリカにおける生存出生 2 0 0 0 人中およそ 1 人に影

50

響を及ぼす [Boatら、The Metabolic Basis of Inherited Disease, 第6版、2649-2680頁、McGraw Hill、NY (1989)]。20人中およそ1人が本疾患のキャリアーである。本疾患は1930年代後半に初めて記載されたが、その根本的欠陥は不明のままである。嚢胞性線維症の主な症状として、慢性肺疾患、腓外分泌不全、および汗電解質レベル上昇が挙げられる。本症状は、外分泌障害である嚢胞性線維症と一致している。最近CF患者細胞の上皮の先端膜を横断するイオン運搬の解析が進んではいるが、塩素イオン(chloride)チャンネルの異常制御が本疾患の一次欠陥を示すかどうかは明らかでない。本疾患の分子メカニズムの理解が欠如していることを考慮し、したがって、関与遺伝子の直接クローニングによりその染色体位置に基づいて分子欠損の性質を理解する試みが、異なる別の方法として行われた。しかし、本疾患の遺伝的基礎の正確な性質を導くようなまたは嚢胞性線維症遺伝子の同定を可能とするような明確な表現型は皆無である。集団遺伝学データに関連するCF欠陥の性質は、容易には明らかとはならない。本疾患の有病率および臨床的異質性は、2-3の異なるメカニズム；高変異率、ヘテロ接合体の長所、遺伝的変動、複数座、および繁殖代償作用によって説明されてきた。仮説の多くは、根本的欠陥の知識が欠けているために試験することができない。したがって、CF遺伝子の決定および特性解析のための別の方法では、遺伝子解析によってこの遺伝子の局在を同定する試みを中心とした。CF遺伝子の抗原性かつタンパク質マーカー類への連結解析が1950年代に試みられたが、確たる結果は全く得られなかった [Steinbergら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 8: 162-176, (1956); SteinbergおよびMorton、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 8: 177-189, (1956); Goodchildら、ジャーナル・オブ・メディカルジェネティクス (J. Med. Genet.) 7: 417-419, 1976]。

【0004】

さらに最近になって、連結解析を促進するためにRFLP類を使用することが可能となった。CF遺伝子へのRFLPの最初の連結は、1985年に記載され [Tsuiら、サイエンス (Science) 230: 1054-1057, 1985]、その中で連結がCF遺伝子と特性解析されていないマーカーDOCRI-917との間に見られた。本関連は、CFに罹患した子供を有する390家族の解析で判明した。このことは、染色体局在は立証されなかったが、本疾患遺伝子の局在がヒトゲノムのおよそ1%に、すなわち、3000万ヌクレオチド塩基対に狭められたことを示唆している。DOCRI-917プローブの染色体局在は、異なるヒト染色体補体を含むげっし類-ヒトハイブリッド細胞株類を用いて立証された。DOCRI-917 (およびしたがってCF遺伝子) がヒト染色体7にマップされることが示された。

【0005】

CF遺伝子の位置を特定する試みとして、さらに物理的および遺伝的な遺伝子連結研究を行った。Zengerlingら [アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 40: 228-236 (1987)] は、ヒト-マウス体細胞ハイブリッドを用いてCF遺伝子とそれに連結していることが公知のマーカー類とのさらに詳細な物理的関係を得たことを記載している。この刊行物は、CF遺伝子が、染色体7上のバンドq22の遠位部またはq31の近位部のいずれかに帰せられることを示している。Rommensら [アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 43: 645-663, (1988)] は、多数の新規7q31プローブ類の単離について詳細に検討している。概説された本方法により、互いに近接している2個の新規プローブ類、D7S122およびD7S340が単離された。パルスフィールドゲル電気泳動マッピングは、これらの2個のRFLPマーカー類がCF遺伝子に隣接する2個のマーカー類、MET [White, R., Woodward S., Leppert M.ら、ネイチャー (Nature) 318: 382-384, (1985)] およびD7S8 [Wainwright, B., J., S

cambler, P. J., および J. Schmidtke, ネーチャー (Nature) 318: 384 - 385, (1985)] の間にあり、したがって、CF 遺伝子領域の中にあることを示唆している。これらのマーカー類の発見は、染色体歩行およびジャンピング (jumping) の出発点を提供する。

【0006】

Estiville ら、[ネーチャー (Nature) 326: 840 - 845 (1987)] は、候補 cDNA 遺伝子の位置を調べ部分的に特性解析した。しかし、このことは、CF 遺伝子の正確な位置を教示するものではない。この参考文献は CpG 島の下流にある候補 cDNA 遺伝子を記載しており、これは、多数の脊椎動物遺伝子類の上流の低メチル化 GC ヌクレオチド含量の多い領域である。この候補座の染色体位置は、XV2C 領域として同定されている。この領域は、欧州特許出願 88303645.1 に記載されている。しかし、この実際の領域は、CF 遺伝子を擁していない。

10

【0007】

CF 遺伝子同定で大きな問題は、マップ位置の知識によるヒト疾患遺伝子のクローニングにおけるこれまでの全ての成功を非常に促進し細胞学的に検出可能な染色体再配列類または欠失類がないことであった。このような再配列類および欠失類は細胞学的に観察でき、その結果、特定染色体上における物理的位置が特定疾患と関連させられる。さらに、この細胞学的位置は、一般に入手可能な DNA プローブ類および細胞学的に可視可能な染色体中の改変の間の公知の關係に基づき、分子的位置と関連させられる。特定疾患遺伝子の分子的位置の知識によって、特に遺伝子産物が公知でかつこのクローニングされた遺伝子類の発現産物のイムノアッセイによって確認できる時、通常の操作によってこの遺伝子をクローニングしかつ配列決定することができるであろう。

20

【0008】

対照的に、先行技術では、嚢胞性線維症の遺伝子の細胞学的位置または遺伝子産物のいずれも公知でなかった。CF 遺伝子に隣接するがその分子的位置を特定することはないマーカー類である MET および D7S8 が最近同定され、本発明者らは、本発明によって CF 遺伝子に迫るためにさまざまな新しい手段を開発した。これらの手段に用いられた方法として、隣接マーカー類からの染色体ジャンピング、パルスフィールドゲル電気泳動の使用による定められた物理的領域からの DNA 断片類のクローニング、CF 近傍の低メチル化 CpG 島からの DNA 断片類の単離のために設計された体細胞ハイブリッドおよび分子クローニング技術の併用、染色体微細切断およびクローニング、および 7q31 領域からの多数の DNA マーカー類の飽和クローニングが挙げられる。これらの新規手段によって、本発明者らは、先行技術では明確でなくまたは 1 例では誤りがあった嚢胞性線維症に關与する遺伝子を同定することができた。

30

【0009】

これらの遺伝的および分子クローニング手段を応用して、その染色体位置に基づき嚢胞性線維症遺伝子の単離および cDNA クローニングが、その方法を示唆するゲノム再配列の恩恵を受けることなく可能となった。CF 遺伝子および遺伝子産物の正常および変異形態の同定によって、核酸プローブ類およびこの遺伝子産物に対する抗体類を用いる CF スクリーニングおよび臨床試験の開発が可能となった。欠陥遺伝子産物およびこの遺伝子産物が關与する経路の相互作用によって、正常遺伝子産物補充および遺伝子操作および運搬 (デリバリ) による治療がこれで可能となる。

40

【非特許文献 1】Boat ら、The Metabolic Basis of Inherited Disease, 第 6 版、2649 - 2680 頁、McGraw Hill, NY (1989)

【非特許文献 2】Steinberg ら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 8: 162 - 176, (1956)

【非特許文献 3】Steinberg および Morton、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 8: 177 - 18

50

9, (1956)

【非特許文献4】Goodchildら、ジャーナル・オブ・メディカルジェネティクス (J. Med. Genet.) 7: 417 - 419, 1976

【非特許文献5】Tsuiら、サイエンス (Science) 230: 1054 - 1057, 1985

【非特許文献6】アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 40: 228 - 236 (1987)

【非特許文献7】アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 43: 645 - 663, (1988)

【非特許文献2】White, R., Woodward S., Leppert M.ら、ネイチャー (Nature) 318: 382 - 384, (1985) 10

【非特許文献2】Wainwright, B., J., Scambler, P. J., および J. Schmidtke, ネイチャー (Nature) 318: 384 - 385, (1985)

【非特許文献10】ネイチャー (Nature) 326: 840 - 845 (1987)

【特許文献1】欧州特許出願 88303645.1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

嚢胞性線維症疾患過程に關与する遺伝子は以下で"CF遺伝子"およびその機能的等価物と称するが、これが同定され、単離され、そして、cDNAがクローニングされ、その転写物および遺伝子産物が同定かつ配列決定された。前記遺伝子産物中におけるフェニルアラニン残基の欠失をもたらす3個の塩基対欠損が決定され、CF罹患患者の約70%におけるCF遺伝子の変異に対応しており、残りの症例の全部とはいわないまでもほとんどにおいて異なる変異が關与していた。前記遺伝子および遺伝子産物の同定および配列決定により、核酸プローブ類および前記遺伝子産物に対する作成した抗体類を種々のハイブリダイゼーションおよび免疫アッセイに用いて、正常または欠損CF遺伝子または遺伝子産物のいずれの存在をもスクリーニングしかつ検出できる。このようなスクリーニングおよび診断のためのアッセイキット類も、また、提供できる。さて、遺伝子組換え法を用いて産生を増幅できる前記の正常遺伝子産物またはその機能的等価物を補充することによる患者の治療が、同様に可能となった。さらに、嚢胞性線維症は、前記の遺伝子欠損をインサイチュー (in situ) で矯正するかまたは正常遺伝子産物発現が可能なDNA配列を前記患者の細胞に導入する組換えまたは他のベクター類を用いて治療できまたは管理することができる。 20 30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の1面によれば、DNA分子は、

(a) 図1に示したアミノ酸残基1位から1480位までのDNA配列に対応するDNA配列類；

(b) 図1によるアミノ酸残基1位から1480位までの配列を有する正常CFTRポリペプチド類をコードするDNA配列類； 40

(c) アミノ酸残基1位から1480位までの間の少なくとも16個の連続ヌクレオチド類を含む下記の図1の配列断片に対応するDNA配列類；

(d) 少なくとも16個のヌクレオチド類からなりかつ図1のアミノ酸配列の断片をコードするDNA配列類；および(e) 図1の配列中においてアミノ酸残基1位から1480位までの間の少なくとも18個の連続ヌクレオチド類によってコードされるエピトープをコードするDNA配列類、からなる群から選択されたDNA配列からなる。

【0012】

本発明のもうひとつの面によれば、精製された変異CF遺伝子はある1個のタンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA配列からなり、この中で、前記タンパク質は、ヒト体 50

細胞中で発現された時に遺伝的疾患嚢胞性線維症に相関する改変された細胞機能に関連している。

【0013】

本発明のもうひとつの側面によれば、精製されたDNA分子は、上記のDNA配列に対応するRNA配列からなる。本発明のもうひとつの側面によれば、1個のDNA分子は、上記のDNA配列に対応するcDNA分子からなる。本発明のもうひとつの側面によれば、精製された核酸プローブは、群(a)から(e)までの上記に記載の選択されたDNA配列類に対応するDNAまたはRNAヌクレオチド配列からなる。

【0014】

本発明のもうひとつの側面によれば、DNA分子は、下記の図1に示したアミノ酸残基1位から1480位までの配列を有する変異CFTRポリペプチドをコードするDNA配列からなる。本配列は、さらに、アミノ酸残基508位からのフェニルアラニンの欠失をもたらす3個の塩基対変異によって特徴づけられる。

10

【0015】

本発明のもうひとつの面によれば、1個のDNA分子は、(a)変異DNA配列に対応し、かつ、発現されると変異CFTRポリペプチドをコードするDNA配列類(b)少なくとも20個のヌクレオチド類を含む変異DNA配列類の1個の断片に対応するDNA配列類；(c)少なくとも20個のヌクレオチド類からなりかつ変異CFTRタンパク質アミノ酸配列の1個の断片をコードするDNA配列類；および(d)この変異DNA配列中の少なくとも18個の連続ヌクレオチド類によってコードされるエピトープをコードするDNA配列類、

からなる群から選択された1個のDNA配列からなる。本発明のもうひとつの面によれば、RNA配列からなる精製されたRNA分子は、変異DNA配列に対応する。

20

【0016】

本発明のもうひとつの面によれば、正常または変異DNAおよびその断片類のDNA配列類からなる組換えクローニングベクターが提供される。本発明の面によれば、前記ベクターが、組換えDNA分子中において発現制御配列に操作上連結され、その結果、正常CFTRタンパク質が発現されるか、または、これとは別に他の選択された変異DNA配列によって、変異CFTRポリペプチドが発現できる。発現制御配列は、原核または真核細胞類およびそれらのウイルス類およびその組み合わせ類の遺伝子類の発現を制御する配列

30

【0017】

本発明のもうひとつの面によれば、正常CFTRポリペプチドを産生する方法は、(a)培地中であつ正常CFTRポリペプチドの発現に好適な条件下で正常DNA配列のための組換えベクターを移入された宿主細胞を培養すること、および(b)前記発現された正常CFTRポリペプチドを単離すること、の段階からなる。

【0018】

本発明のもうひとつの面によれば、変異CFTRポリペプチド産生の方法は、(a)培地中であつ変異CFTRポリペプチドの発現に好適な条件下で変異DNA配列のための組換えベクターを移入された宿主細胞を培養すること、および(b)前記発現された変異CFTRポリペプチドを単離すること、の段階からなる。

40

【0019】

本発明のもうひとつの面によれば、ヒト細胞膜起源の精製されたタンパク質は、前記タンパク質がヒト細胞膜中に存在する時遺伝的疾患である嚢胞性線維症を起こす細胞機能と関連している変異DNA配列によってコードされるアミノ(酸)配列からなる。

【0020】

本発明のもうひとつの面によれば、前記CFTRポリペプチドは、約170,000ダルトンの分子量および上皮細胞膜通過(トランスメンブレン)イオン伝導率に影響を及ぼす活性を特徴とする。

【0021】

50

本発明のもうひとつの面によれば、実質的に純粋なCFTRタンパク質がヒト上皮細胞において発現され、かつ、上皮細胞膜に結合することによって上皮細胞膜中に形成されたチャンネルを介してイオンの動きを修飾することによって、上皮細胞を介してイオン輸送の制御およびコントロールに關与することができることを特徴とする。

【0022】

本発明のもうひとつの面によれば、CFTRタンパク質を単離する工程は、(a)末梢タンパク質を上皮細胞膜から抽出し、前記のCFTRタンパク質を含む必須タンパク質を有する膜物質を提供すること；(b)前記膜物質の前記必須タンパク質類を溶解し、前記必須タンパク質類の溶液を形成すること；(c)前記CFTRタンパク質を分離し、哺乳類起源の残りの全ての他のタンパク質類を除去すること、からなる。

10

【0023】

本発明のもうひとつの面によれば、対象がCFキャリアーまたはCF患者であるかどうかを決定するために患者をスクリーニングする方法が提供され、本方法は、前記スクリーニングすべき対象の生物試料を提供すること、前記生物試料中において正常CF遺伝子、正常CF遺伝子産物類、変異CF遺伝子、変異CF遺伝子産物類およびその混合物類からなる群由来の少なくとも1つの構成員の存在を検出するためのアッセイを提供することの段階からなる。本発明のもうひとつの面によれば、CFTRポリペプチドに特異的な免疫活性抗CFTRポリクローナルまたはモノクローナル抗体が提供される。

【0024】

本発明のもうひとつの面によれば、イムノアッセイ法によってCF遺伝子の存在をアッセイするキットは、(a)CF遺伝子の遺伝子産物に特異的に結合する抗体；(b)前記遺伝子産物への抗体の結合を検出するための試薬手段；および(c)それぞれ、前記イムノアッセイを実施するために有効な量で存在する抗体および試薬手段からなる。

20

【0025】

本発明のもうひとつの面によれば、ハイブリダイゼーション法によってCF遺伝子の存在をアッセイするためのキットは、(a)特異的に前記CF遺伝子に結合するオリゴヌクレオチドプローブ；(b)前記オリゴヌクレオチドプローブの前記CF遺伝子へのハイブリダイゼーションを検出するための試薬手段；および(c)それぞれ、前記ハイブリダイゼーションアッセイを実施するために有効な量で存在する抗体および試薬手段からなる。本発明のもうひとつの面によれば、患者の嚢胞性線維症を治療するための方法が提供される。本治療は、患者に対して治療有効量の正常CFTRタンパク質を投与する段階からなる。本発明のもうひとつの面によれば、嚢胞性線維症の遺伝子治療方法は、正常CFTRタンパク質をコードする正常DNA配列に対応する配列を含むDNA分子の運搬(デリバリ)段階からなる。本発明のもうひとつの面によれば、動物は、非相同細胞系からなる。前記細胞系は、この動物における嚢胞性線維症症状を含む変異DNA配列に対応する組換えDNA配列を含む組換えクローニングベクターを含む。本発明のもうひとつの面によれば、トランスジェニックマウスは、嚢胞性線維症症状を呈する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

1. 定義

本発明のさまざまな態様のレビューおよび本発明をなすためにかつそれを用いる際に利用したさまざまな要素類および構成の理解を円滑にするために、本発明に使用した以下の用語の定義は、下記のものである：

40

CF - 嚢胞性線維症

CFキャリアー - 外見上健康であるがその染色体がその人の子孫に遺伝することができる変異CF遺伝子を含む者。

CF患者 - 各染色体上に変異CF遺伝子を有する者で、それらが嚢胞性線維症の症状を示す者。

CF遺伝子 - その変異形態が本疾患嚢胞性線維症に関連している遺伝子。この定義は、存在する種々の配列多形性を含むものと理解されるが、前記遺伝子配列中でヌクレオチド置

50

換が前記遺伝子産物の必須機能に影響を及ぼさないことを特徴とする。この用語は、元来、単離されたコード配列に関するが、また、隣接制御要素類および/またはイントロン類の一部または全てを含むことができる。

CF - PI - 嚢胞性線維症腓不全は嚢胞性線維症患者の主要臨床サブグループであり、腓外分泌機能不全を特徴とする。

CF - PS - 嚢胞性線維症腓良好群 (sufficient) は、正常食物消化のための十分な腓外分泌機能を有する嚢胞性線維症患者の臨床サブグループである。

CFTR - 嚢胞性線維症膜通過 (トランスメンブレン) 伝導率制御タンパク質で、CF 遺伝子によってコードされる。この定義には、ヒトまたは動物起源から単離されたか、組換え有機体によって産生されたか、および化学的または酵素的に合成されたようなタンパク質を含む。この定義は、前記配列中の種々の領域内のアミノ酸置換が前記タンパク質の本来の機能、またはそのヒドロパシープロフィールまたは2次または3次構造に影響を及ぼさないさまざまな多形性形態を含むものと理解される。

DNA - 標準的命名法を用いて塩基類を同定した。

イントロンを有さないDNA - 内部非コードセグメント類、例えばcDNAを欠失しているDNA片。

IRP座配列 - (プロトオンコジーンint - 1関連) CF遺伝子近傍に局在する遺伝子。

変異CFTR - 1次、2次および3次構造の関連からCFTRに高度に類似しているタンパク質であるが、少数のアミノ酸置換および/または欠失および/または挿入の結果、その本来の機能が傷害され、上皮細胞がCFTRよりもむしろ変異CFTRを発現する有機体が嚢胞性線維症の症状を示すようなタンパク質。

mCF - ヒトCF遺伝子と同じ (orthologous) マウス遺伝子。

NBF類 - ヌクレオチド (ATP) 結合折り畳み。

ORF - 読みとり枠。

PCR - ポリメラーゼチェーン反応。

タンパク質 - 標準的一字表記命名法を用いてアミノ酸類を記載する。

R - 領域 - CFTRタンパク質の高度に価電された細胞質領域。

RSV - ラウス肉腫ウイルス。

SAP - 表面活性タンパク質

RFLP - 制限酵素断片長多形性。

【0027】

2. 前記CF遺伝子の単離

染色体歩行、ジャンピングおよびcDNAハイブリダイゼーションを用いて、500キロベース対 (kb) 以上を擁するDNA配列類を、嚢胞性線維症 (CF) 遺伝子を含むヒト染色体7の長腕上の領域から単離した。数個の転写配列および保存セグメント類を、本領域で同定した。これらのひとつはCF遺伝子に対応しており、かつ、ゲノムDNAのおよそ250kbにまたがる。重複する相補性DNA (cDNA) クローン類を、嚢胞性線維症遺伝子部分を含むゲノムDNAセグメントによって上皮細胞ライブラリから単離した。この単離されたcDNAのヌクレオチド配列は、図1に示してある。それぞれの配列類の各列で、下列はヌクレオチド配列の標準命名法によるリストである。それぞれの配列の各列の上列は、それぞれのコドンに対応するアミノ酸の標準一字表記命名法である。

【0028】

したがって、本発明は、(a) 下記の図1に示したアミノ酸残基1位から1480位までのDNA配列に対応するDNA配列類；

(b) 下記の図1によるアミノ酸残基1位から1480位までの配列を有する正常CFTRポリペプチド類をコードするDNA配列類；

(c) アミノ酸残基1位から1480位までの間の少なくとも16個の連続ヌクレオチド類を含む下記の図1の配列断片に対応するDNA配列類；

10

20

30

40

50

(d) 少なくとも16個のヌクレオチド類からなりかつ下記図1のアミノ酸配列の断片をコードするDNA配列類；および

(e) 下記1図の配列中においてアミノ酸残基1位から1480位までの間の少なくとも18個の連続ヌクレオチド類によってコードされるエピトープをコードするDNA配列類

、
からなる群から選択されたDNA配列からなるDNA分子を提供する。

【0029】

本発明は、また、

(a) ヒト上皮細胞中における嚢胞性線維症関連活性を特徴づける変異CFTRポリペプチドをコードするDNA配列、または、さらに3個の塩基対変異によりアミノ酸残基508位からフェニルアラニン欠失が結果として生じることを特徴とするアミノ酸残基1位から1480位までの図1のDNA配列に対応するDNA配列類；

(b) パラグラフa)の配列類の断片に対応しかつ少なくとも16個のヌクレオチド類を含むDNA配列類；

(c) 少なくとも16個のヌクレオチド類からなりかつパラグラフ(a)のDNA配列によってコードされるアミノ酸配列の断片をコードするDNA配列類；および(d) パラグラフa)の配列中の少なくとも18個の連続ヌクレオチド類によってコードされるエピトープをコードするDNA配列類、

からなる群から選択されたDNA配列からなるDNA分子を提供する。

【0030】

長さがおよそ6,500個のヌクレオチド類の転写体は、CF患者中の罹患組織中で検出可能である。単離されたヌクレオチド配列に基づいて、予測されたタンパク質は、それぞれが膜会合に一致する特性を有する第1領域およびATP結合に参与すると確信されている第2領域を有する2つの類似領域からなる。

【0031】

3bpの欠失は、第1予測ヌクレオチド結合領域(CF遺伝子産物のアミノ酸508位)の中央のフェニルアラニン残基の欠落となり、これは、CF患者中で検出された。図1の正常DNA配列中のこの変異は、嚢胞性線維症患者における変異のおよそ70%に対応する。推定された疾患遺伝子に緊密に結合したDNAマーカー類に基づいて延長されたハプロタイプデータから、CF変異遺伝子プールの残りが複数の異なる変異から構成されていることが示唆される。これらの後者の変異対立遺伝子のサブグループ(約8%)が、腓が良好である患者サブグループにおいて残りの腓外分泌機能を付与できる。

【0032】

2.1 染色体歩行およびジャンピング

Rommensら、同上のD7S122およびD7S340連結領域を包囲する大量のDNAが、候補遺伝子配列類として検索された。従来の染色体歩行方法に加えて、染色体ジャンピング法をこの検索過程を加速するために採用した。各ジャンピング終端から、新しい両方向性歩行を開始させることができた。しばしば哺乳類ゲノム中で遭遇する"クローニング不可"の領域による連続歩行の停止は、染色体ジャンピングによって回避することができた。

【0033】

使用した染色体ジャンピングライブラリは、過去に記載されている[Collinsら、サイエンス(Science)235,1046(1987);Ianuzzira、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス(Am.J.Hum.Genet.)44,695(1989)]。当初のライブラリは分取用パルスフィールドゲルによって調製し、70-130kbの部分的EcoRI断片類を含有させることを意図した；このライブラリによるその後の実験から、小断片類が同様に示されることが示唆され、ジャンピングの長さが25-110kbであることが判明した。このライブラリをsup宿主MC1061に接種し、標準的手法によってスクリーニングした[Maniatisら]。陽性クローンをpBRAva23Ava2中にサブクローニングし、Collin

10

20

30

40

50

sら、ゲノムアナリシス (Genome Analysis) : ア・プラクティカルアプローチ (A Practical Approach) (IRL, ロンドン, 1988)、73 - 94頁) に記載のようにして、ジャンピング開始および末端を EcoRI および AvaI 消化によって同定した。各クローンについて、ジャンピング末端からの断片を調べ、染色体7上におけるその位置を確認した。染色体歩行およびジャンピングによって包含される隣接染色体領域は約250kbであった。ジャンピングの方向は、プローブを注意深く選択することによって、CollinsらおよびIanuzziら、同上によって記載のようにして偏らせた。CF遺伝子 cDNAの使用によって単離された配列類を含む全領域をクローニングし、これは約500kbである。

【0034】

染色体歩行およびジャンピング手段の概略を図2に示した。CF遺伝子エクソン類は、本図においてローマ数字によって示されている。地図上の水平線は、歩行段階を示しており、一方、地図上の弓形はジャンプ段階を示している。本図では6段のそれぞれで左から右へ進行しており、末端の方向は、示してあるように、7canおよび7qterに向かっている。酵素EcoRI、HindIII、およびBamHI酵素類の制限地図は、実線上に示してあり、全クローン領域を網羅している。垂直線よりもむしる矢印で示した制限部位は、明確には位置が定められていない部位を示している。他の酵素類のための付加的制限部位を線の下に示してある。クローニングされた領域内のギャップは、|| (二本の縦線) によって示されている。これらは、CF転写体のcDNAクローン類によって検出される部分にのみ出現する。これらのギャップは、本領域のパルスフィールドマッピングに基づくと、大きいことはありえない。地図上の水平線によって示された歩行クローン類は、各クローンで得られた歩行の進行を示す矢印の方向を有している。コスミドクローン類は、文字cによって開始する。他の全てのクローン類は、ファージである。コスミドCF26はキメラであることが証明された；点線を付けた部分は、もうひとつの染色体上の異なるゲノム断片から由来する。

【0035】

ローマ数字IからXXIVまでは、CF遺伝子エクソン類の位置を示している。線の上を示した水平の四角は、本実験の間に使用したプローブ類である。前記プローブ類のうちの3個が、本領域の多形性検出のために先に同定された断片類の独立したサブクローニングを示している：H2.3AはプローブXV2C (X. Estivilleら、ネイチャー (Nature)、326 : 840 (1987)) に対応し、およびプローブE4.1はMp6d.9 (X. Estivilleら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 44、704 (1989)) に対応している。G-2は、転写された配列を検出するE6の小断片である。R161, R159、およびR160は、IRP座配列の部分から構築された合成オリゴヌクレオチドであり [B. J. Wainwrightら、EMBO J、7 : 1743 (1988)]、この転写体のゲノム地図上における位置を示している。

【0036】

前記の2個の別々に単離されたDNAマーカー類としてのD7S122 (pH131) およびD7S340 (TM58) はおよそ10kbしか離れていないので (図2)、前記歩行およびジャンピングは、本質的に単一点から開始されていた。METおよびD7S8に関する歩行およびジャンピングの方向は、次に、数個の稀にしか切断されない (XhoI、NruI および NotI に対するそれらのような、図2参照) 制限エンドヌクレアーゼ認識部位の交差によっておよび J. M. Rommensら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.)、印刷中； A. M. Poustkaら、ゲノミクス (Genomics) 2、337 (1988)； M. L. Drummら、ゲノミクス (Genomics) 2、346 (1988) の長い範囲の物理的地図を参考にして確認された。パルスフィールドマッピングデータは、同様に、本発明の発明者らによって同定されたこのNotI部位 (図2参照、113kb位) が、IRP座に関連した先に見いだされたもの (Estivilleら1987、同上) に

10

20

30

40

50

対応していることを明らかとしていた。その後の遺伝的研究からCFがIRPおよびD7S8の間に位置している可能性 [M. Farrallら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 43, 471 (1988)、B. S. Kerenら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 44, 827 (1989)] が極めて高かったので、歩行およびジャンピング作業をこの区間のクローニングにのみ向けて継続した。しかし、図2に示した他のコード領域は、例えば、G-2、CF14およびCF16が局在され、さらに、広範囲に研究された。これらのその他の領域のこのような広範囲の研究から、それらが遺伝的データおよび配列解析に基づきCF遺伝子ではないことが明らかとなった。CF遺伝子の位置およびその特徴についての知識がないので、この推定上の周辺コード領域を広い範囲で時間をかけて検討しても、CF遺伝子の検索の方向が進展することはなかった。しかし、これらの研究は、CF遺伝子がこれらの領域内にある可能性を除外するために必要であった。

10

【0037】

280 kb セグメント内の3つの領域が、最初に使用した増幅ゲノムライブラリ中に回収可能でないことが判明した。これらのクローニング可能性が少ない領域はH2.3AおよびX.6 DNA セグメントの近傍に位置しており、それぞれ、図2の75 - 100 kb, 205 - 225 kb および 275 - 285 kb 位のコスミド cW44 をちょうど越えたところにあった。H2.3Aの近傍の組換えクローン類は極めて不安定であり、細菌培養を数代しか継代しなくてもその後急激な再配列を起こすことが判明した。結果として生成したギャップを充填するため、不安定配列類の繁殖を可能とすると報告されている [A. R. Wyman, L. B. Wolfe, D. Botstein, プロシーディングズ・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス米国 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA) 82, 2880 (1985); K. F. Wertman, A. R. Wyman, K. F. Botstein, D. Barker, C. Helms, W. H. Petri, ジーン (Gene), 49, 263 (1986)] 特定の宿主-ベクター系を使用して1次歩行ライブラリを構築した。コスミド cW44 近傍の領域は回収されることに変わりはないが、X.6 近傍の領域はこれらのライブラリによって救援され成功した。

20

【0038】

2.2 ゲノムライブラリの構築

ゲノムライブラリは、Maniatis (Maniatis) ら、モレキュラークローニング (Molecular Cloning): ア・ラボラトリマニュアル (A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)) に記載の操作の後に構築され、表1に列挙した。これには、8つのファージ類が含まれており、そのひとつは、T. Maniatis [Fritschら、セル (Cell), 19:959 (1980)] によって提供された; 残りは、本研究の部分としてManiatisら、同上に記載の操作に従って構築した。下記製造業者によって供与されたベクター腕によって、4つのファージライブラリが DASH (Stratagene から商業的に入手可能) 中にクローニングされ、3つが FIX (Stratagene から商業的に入手可能) 中にクローニングされた。1つの DASH ライブラリは、ヒト染色体7含有ヒト-ハムスターハイブリッド (4AF/102/K015) 由来 Sau3A - 部分消化 DNA から構築され、他のライブラリは、ヒト末梢血またはリンパ芽球性 DNA の部分 Sau3A, 総 BamHI、または総 EcoRI 消化から構築された。

30

40

【0039】

不安定配列類の損失を避けるため、このファージライブラリの内の5つを組換え-欠失宿主 DB1316 (recD-), CES200 (recBC-) [Wymanら、同上、Wertman等、同上、Wyman等、同上]; または TAP90 [Pattersonらヌクレイックアシズリサーチ (Nucleic Acids Res.) 15:6

50

298 (1987)] 上で繁殖させた。3つのコスミドライブラリを次に構築した。1つでは、ベクター pCV108 [Laurer, Proceedings of National Academy of Sciences USA 80: 5225 (1983)] を用いて、部分消化 (Sau3A) DNA を 4AF/102/K015 [Rommensら、[Am. J. Hum. Genet.] 43: 4 (1988)] をクローニングした。第2のコスミドライブラリは、部分消化 (MboI) ヒトリンパ芽球性 DNA を、インターロイキン-2レセプター鎖のための前記 RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモータ駆動 cDNA (M. Fordis および B. Howard によって供与された) を pWE15 の新耐性遺伝子の代わりに挿入することによって調製したベクター pWE-IL2R 中にクローニングすることによって、調製した [Proceedings of National Academy of Sciences USA 84: 2160 (1987)]。追加の部分 MboI コスミドライブラリは、SalI リンカーを pWE-EL2R の BamHI クローニング部位に挿入することによって作製された [M. Drumm, 未公表データ] ベクター pWE-IL2-SalI 中で調製された; これによって、SalI および MboI 末端の連結のために部分充填法を使用でき、タンデム挿入を回避する [Zabarovskiyら、Gene (Gene) 42: 19 (1986)]。コスミドライブラリは、大腸菌 (E. coli) 宿主株 DH1 または 490A 中で繁殖させた [M. Steinmetz, A. Winoto, K. Minard, L. Hood, Cell (Cell) 28, 489 (1982)]。

10

20

【0040】

【表 1】

表 1
ゲノムライブラリ

ベクター	ヒトDNA 起源	宿主	複製性	参考文献
λ Charon 4A	HaeII/AluI- 部分消化 総ヒト肝DNA	LE392	1×10^6 (増幅)	Lawn et al 1980
PCV108	Sau3A- 部分消化 BKL DNA, 4AF/KO15 由来		3×10^6 (増幅)	
λ dash	Sau3A- 部分消化 LE 392 DNA, 4AF/KO15 由来		1×10^6 (増幅)	
λ dash	Sau3A- 部分消化 DB1316 総ヒト 末梢血 DNA		1.5×10^6	
λ dash	BamHI- 消化 総ヒト DB1316 ヒト末梢血 DNA		1.5×10^6	
λ dash	EcoRI- 部分消化 DB1316 総ヒト 末梢血 DNA		8×10^5	
λ FIX	MboI- 部分消化 LE392 ヒト リンパ芽球性 DNA		1.5×10^6	
λ FIX	MboI- 部分消化 CE 200 ヒト リンパ芽球性 DNA		1.2×10^6	
λ FIX	MboI- 部分消化 TAP90 ヒト リンパ芽球性 DNA		1.3×10^6	
pWE-IL2R	MboI- 部分消化 490A ヒト リンパ芽球性 DNA		5×10^5	
pWE-IL2R- Sal	MboI- 部分消化 490A ヒト リンパ芽球性 DNA		1.2×10^6	
λ Ch3A Alac (溶菌)	EcoRI- 部分消化 MC1061 (24-110 kb) ヒトリンパ芽球性 DNA		3×10^6	Collins et al 同上 Lanzuzzi et al 同上

このファージライブラリの3種を増殖させ、そして、大腸菌 (E. coli) 株 LE 392 中で増幅させた。4種のその後のライブラリは、組換え欠損宿主類 DB1316 (recD-) または CES200 (recBC-) [Wyman 1985, 同上; Wertman 1986, 同上; および Wyman 1986, 同上] にまたは1例では TAP90 [T. A. Patterson および M. Dean, Nucleic Acids Research) 15, 6298 (1987)] に接種された。各ファージまたはコスミド挿入物末端近傍の(繰り返し要素類を全く有していない) 単一コピーDNAセグメント類を精製し、標準的手法による重複DNA断片類を単離する

ためのライブラリスクリーニングのプロープ類として使用した (Maniatisら、同上)。 $1 - 2 \times 10^6$ ファージクローン類は、適当なインディケータ細菌宿主とともに 150 mm シャーレ $25 - 30$ 個に接種後、 37°C で $10 - 16$ 時間インキュベートした。各プレートについて二重"リフト"をニトロセルロースまたはナイロン膜で調製し、記載の条件で予備ハイブリダイズおよびハイブリダイズさせた [Rommensら、1988, 同上]。

【0041】

プロープは、ランダムプライミング操作 [A. P. FeinbergおよびB. Vogelstein、アナリティカルバイオケミストリ (Anal. Biochem. 132, 6 (1983))] を用いて比放射能 $5 \times 10^8 \text{ cpm} / \mu\text{g}$ を越えるまで ^{32}P で標識した。このコスミドライブラリをアンピシリン含有プレート上に塗布し同様にスクリーニングした。

10

【0042】

高いバックグラウンドシグナルを示すDNAプロープ類は、前記プロープをハイブリダイゼーションバッグに入れる前に沸騰したプロープを $250 \mu\text{g} / \text{ml}$ のせん断された変性胎盤DNAとともに60分間前アニーリングすることによって、より良好に頻繁に使用できた。

【0043】

各歩行段階について、クローニングされたDNA断片の中身は、その染色体位置を確認するための体細胞ハイブリッドパネルによるハイブリダイゼーションによって、そのゲノムとの同一直線性を確認するための制限マッピングおよびサザンブロット解析によって決定した。単離されたゲノムDNA配列類および重複するcDNAクローン類を全て組み合わせたクローニングされた領域は、 500 kb を越えて伸長していた。染色体歩行およびジャンピング操作によって単離されたDNAセグメント類は、ゲノム配列と同一直線にあることを立証するため、各セグメントを：(a) 染色体7の局在を確認するためのヒト-げっ歯類ハイブリッド体細胞によるハイブリダイゼーション解析、(b) パルスフィールドゲル電気泳動、および(c) クローニングされたDNAの制限地図とゲノムDNAのそれとの比較、によって調べた。

20

【0044】

したがって、単一コピーヒトDNA配列類は、各組換えファージおよびコスミドクローンから単離され、Maniatisら、同上の操作によって行うこれらのハイブリダイゼーション解析のそれぞれにおいてプロープとして使用した。ファージおよびコスミド単離物の大半は正確な歩行およびジャンプクローンを示す一方で、わずかが、クローニングアーティファクトまたはヒトゲノム中の他の領域からの交差ハイブリダイゼーション配列類から、または、前記ライブラリがヒト-ハムスターハイブリッド細胞株から由来する場合ハムスターゲノムから、結果として生成した。正確な位置の確認は、染色体ジャンピングによって単離されたクローン類について特に重要であった。多くのジャンプクローン類を検討し、前記遺伝子から研究の方向をそらすような結論とはならない情報が得られた。

30

【0045】

2.3 制限地図の確認

さらに、重複するクローン類の重複物理地図の確認を、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて長い範囲の制限マッピング解析によって得た (J. M. Rommens, アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet. 印刷中、A. M. Poustkaら、1988、同上、M. L. Drummら、1988、同上)。

40

【0046】

図3Aから3Eまでは、長い範囲の制限マッピング研究の知見を例示しており、その中で、本領域の概略をパネルEに示した。ヒト-ハムスター細胞株4AF/102/K015由来DNAは、酵素(A)SalI、(B)XhoI、(C)SfiIおよび(D)NaeIによって消化され、パルスフィールドゲル電気泳動によって分離され、そして、ゼ

50

ータプローブ (Zeta probe^R) (バイオラッド (BioRad)) に移した。各酵素について、単一プロットを連続して図 A から D までのパネル類のそれぞれの下に示したプローブ類とハイブリダイズさせ、前記プロットをハイブリダイゼーションの間で切断した。図 3 E の各酵素の記号は：A, Nae I; B, Bss H I I; F, Sfi I; L, Sal I; M, Mlu I; N, Not I; R, Nru I; および X, Xho I である。C は、ゲルの圧縮ゾーン領域に対応する。DNA 調製物、制限消化、および交差フィールドゲル電気泳動方法が記載されている (Rommens ら、印刷中、同上)。図 3 のゲル類は、0.5 X TBE 中を 20 時間、7 ボルト / cm で走行させ、(A), (B) および (C) について 10 - 40 秒間直線的に傾斜させて切り替え、8 ボルト / cm で 20 時間、(D) について 50 - 150 秒間直線的に傾斜させて切り替えた。ハイブリダイゼーションパターンの解釈図を各パネルの下に示した。断片長さはキロベースとして、そして、オリゴマーとしたバクテリオファージ DNA およびサッカロミセス・セレビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 染色体との比較によって大きさを分類した。

10

【0047】

H4.0, J44, EG1.4 は、歩行およびジャンピング実験から生じたゲノムプローブ類である (図 2 参照)。J30 は、D7S8 からの 4 つの連続ジャンプによって単離された (Collins ら、1987、同上; Ianuzzi ら、1989、同上; M. Dean ら、公表のために提出)。10-1, B.75, および CE1.5 / 1.0 は、CF 転写体の異なる領域を包含する cDNA プローブ類である：10-1 は、エクソン類 I-VI を含有し、B.75 はエクソン類 V-XII を含有し、および CE1.5 / 1.0 は、エクソン類 XII-XXIV を含有する。図 3 E には、全 MET-D7S8 区間の組成地図を示した。四角の領域は、歩行およびジャンピングによってクローニングされたセグメントを示唆しており、そして、斜線を入れた部分は、CF 転写体によって網羅された領域を示唆している。D7S23 座に関連した CpG 含量の多い領域 (Estivill ら、1987、同上) は、カッコに示した Not I 部位にある。カッコまたはカギカッコに示したこの部位および他の部位は、4AF / 102 / K015 内で切断せず、しかし、ヒトリンパ芽球性細胞株類で観察された。

20

【0048】

2.4 CF 遺伝子の同定

上記で詳細に述べた長い範囲の制限マッピングの知見に基づき、全 CF 遺伝子が、380 kb の Sal I 断片上に含有されることが決定された。パルスフィールドゲル解析から由来する制限部位類の部分重複ゲノム DNA クローン類で同定されたそれらとの配列から、この CF 遺伝子の大きさが約 250 kb であることが明らかとなった。クローニングされた DNA 断片類の地図および長い範囲の制限地図の配列に役だった最も情報に富んだ制限酵素は、Xho I であった；組換え DNA クローン類によって同定された 9 個の Xho I 部位の全てが、ゲノム DNA 中の少なくとも部分切断に感受性であるらしかった (図 1 および 2 の地図と比較)。さらに、CF 遺伝子の 3' 末端由来プローブ類とのハイブリダイゼーション解析では、2 個の Sfi I 部位が同定され、予測 Nae I 部位の位置が確認された。これらの知見は、さらに、染色体歩行およびジャンピング操作によって単離された DNA セグメント類が、真の配列と同一直線にあることを裏付けた。

30

40

【0049】

2.5 同定の基準

1 個以上の下記の基準に基づいた陽性の結果は、クローニングされた DNA セグメントが候補遺伝子配列類を含有できることを示唆していた：(a) 他種における交差ハイブリダイズ配列類の検出 (多くの遺伝子類が進化論的保存を示すので)

(b) 脊椎動物遺伝子類の 5' 末端を頻繁にマークする CpG 島の同定 [A. P. Bird, ナチャー (Nature), 321, 209 (1986); M. Gardiner-Garden および M. Frommer, ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.) 196, 261 (1987)]、(c) CF 患者中の罹患

50

組織中での可能な mRNA 転写体の検索、(d) 対応する cDNA 配列類の単離、(e) クローニングされた DNA セグメント類の直接配列決定による読みとり枠の同定。

【0050】

種間ハイブリダイゼーションは、CF14, E4.3 および H1.6 をプローブとして用いたときにヒトおよびウシ DNA の間に強い配列保存があることを示しており、その結果は、図 4A, 4B および 4C に示してある。

【0051】

ヒト、ウシ、マウス、ハムスター、およびニワトリゲノム DNA 類は、EcoRI (R), HindIII (H)、および PstI (P) によって消化され、電気泳動させ、そして、ゼータバインド (Zetabind^R) (バイオラド (BioRad)) にプロットされた。Rommens ら、1988, 同上のハイブリダイゼーション操作を、55、0.2X SSC, および 0.1% SDS による最大緊縮洗浄とともに用いた。図 4 のハイブリダイゼーションに使用したプローブ類は: (A) 全コスミド CF14, (B) E4.3, (C) H1.6 を含んでいた。図 (D) の略図において、影を付けた領域は、種間保存領域を示している。

【0052】

異なるサブセットのバンドがこれらの 2 つの重複する DNA セグメント類 (H1.6 および E4.3) で検出されたという事実は、この保存配列が重複した領域の境界に位置している (図 4 (D)) ことを示唆していた。これらの DNA セグメント類を用いてさまざまな組織から RNA 転写体を検出するとき、ハイブリダイゼーションシグナルが検出された。交差ハイブリダイズ領域を理解しかつ可能な読みとり枠を同定する試みとして、全 H1.6 の DNA 配列類および前記 E4.3 断片の部分を決定した。結果は、2 種の制限酵素 (BssHII および SacII) のための CG 含量の多い配列の長い伸長部はしばしば低メチル化 CpG 島に関連して見られるが、これらを除くと、強い種間ハイブリダイゼーションシグナル類を容易には説明できない短い読みとり枠しかなかったことを示していた。この CpG 高含量の領域の配列決定によって明らかとなったメチル化状況を調べるために、繊維芽細胞およびリンパ芽球性細胞から調製したゲノム DNA 試料を制限酵素 HpaII および MspI によって消化し、ゲルプロットハイブリダイゼーションによって解析した。酵素 HpaII は、第 2 のシトシンが低メチル化である時にのみ DNA 配列 5' - CCGG - 3' を切断し、一方、MspI は、メチル化の状態に関わらずこの配列を切断する。小さい DNA 断片類は両酵素によって産生され、この CpG 含量の多い領域が実際にはゲノム DNA 中において低メチル化であることを示唆していた。E4.3 セグメント (図 6) によるゲルプロットハイブリダイゼーションによって、両酵素によって極めて小さなハイブリダイズ断片類が明らかとなり、低メチル化 CpG 島の存在を示唆していた。

【0053】

上記の結果は、この座におけるコード領域の存在を示唆している。本領域から種間ハイブリダイゼーションシグナル類を検出する DNA セグメント類 (E4.3 および H1.6) をプローブ類として用いて、数組織および細胞タイプから作成した cDNA ライブラリをスクリーニングした。

【0054】

培養上皮細胞からの cDNA ライブラリは、下記のようにして調製した。CF 患者以外の者および CF 患者から由来する汗腺細胞を、記載のようにして初代継代した [G. Collie ら、インビトロセルラー・エンド・デベロップメントバイオロジー (In Vitro Cell. Dev. Biol.) 21, 592, 1985]。外側における整流チャンネルの存在は、これらの細胞中で確認された (J. A. Tabcharani, T. J. Jensen, J. R. Riordan, J. W. Hanrahan, ジャーナル・オブ・メンブレンバイオロジー (J. Memb. Biol.)、印刷中) が、しかし、この CF 細胞類は、サイクリック AMP による活性化に無感受性であった (T. J. Jensen, J. W. Hanrahan, J. A. Tabcharani, M. Buchw

10

20

30

40

50

aldおよびJ. R. Riordan, ペディアトリックパルモノロジー (Pediatric Pulmonology)、補遺2、100、1988)。RNAは、それらから、J. M. Chirgwinら (バイオケミストリ (Biochemistry) 18, 5294, 1979) の方法によって単離した。ポリA + RNAが選択され (H. AvivおよびP. Leder, プロシーディングズ・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス米国 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA) 69、1408, 1972)、オリゴ (dT) 12 - 18をプライマーとするcDNA合成のための鋳型 (テンプレート) として使用した。第2の鎖は、GublerおよびHoffmanによって合成した (ジーン (Gene) 25, 263, 1983)。これは、EcoRIメチラーゼによってメチル化され、末端は、T4DNAポリメラーゼによって平滑にした。リン酸化されたEcoRIリンカー類をこのcDNAに連結し、EcoRIによって制限した。

10

【0055】

過剰のリンカーの除去および部分的サイズ分画は、バイオゲル (Bio gel) A - 50クロマトグラフィによって達成した。このcDNA類は、次に市販のZAPのEcoRI部位に連結した。組換え体は、大腸菌 (E. coli) BB4中に封入され増殖させた。この封入された混合物の部分を増幅し、残りは、増幅前にスクリーニングのために保存した。同一操作を用いて、T-84結腸腫瘍細胞株 (Dharmasathaphoron、Kら、アメリカンジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 246, G204, 1984) の飽和前培養物から単離されたRNAからライブラリを構築した。3つのライブラリの独立した組換え体の数は、非CF汗腺細胞について 2×10^6 個、CF汗腺細胞について 4.5×10^6 個およびT-84細胞について 3.2×10^6 個であった。これらのファージ類は、15cmプレート当たり50,000個接種し、ブランクリフトは、ナイロン膜 (バイオダイン (Biodyne)) を用いて作成し、そして、DNAポリメラーゼIおよびプライマーとしてのオリゴヌクレオチド類の無作為混合物を用いて ^{32}P で標識したDNA断片でプロービングした。ハイブリダイゼーション条件は、G. M. WahlおよびS. L. Berger (メソッズ・イン・エンザイモロジー (Meth. Enzymol.) 152, 415, 1987) によった。ブルースクリプト (Bluescript^R) プラスミド類は、M13ヘルパーファージによる切断によってブランク生成クローン類から救援した。肺および膵ライブラリは、クロンテックラボラトリ社 (Clontech Lab. Inc.) から購入し、その報告された大きさは 1.4×10^6 および 1.7×10^6 個である独立したクローン類であった。

20

30

【0056】

それぞれが $1 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ 個の独立したクローン類を有する7種の異なるライブラリをスクリーニングした後、1個の単一クローン (10-1として同定) を、非罹患 (非CF) 者の培養汗腺上皮細胞類から作成したcDNAライブラリからH1.6によって単離した。

【0057】

DNA配列決定解析は、10-1が大きさが920bpの挿入物および1個の長い潜在的読みとり枠 (ORF) を含有することを示していた。本配列の1端はH1.6と完全な配列同一性を有していたので、cDNAクローンがおそらくこの領域から由来していると結論された。しかし、この共通のDNA配列は113bpの長さしかなかった (図1および7を参照)。下記に詳細に記したように、この配列は現実に推定CF遺伝子の最も5'側のエクソンに対応していた。短い配列の重複はしたがってライブラリスクリーニングにおける弱いハイブリダイゼーションシグナル類およびRNAゲルプロット解析における転写体の検出不能を説明した。さらに、転写単位の方法は、10-1の推定ORFによるゲノムDNA配列の整列を基準として暫定的に立証された。

40

【0058】

この対応する転写体は、RNAゲルプロットハイブリダイゼーション実験によって長さがおよそ6500個のヌクレオチドであると推定されたので、さらに、cDNAライブラリスクリーニングがコード領域の残りをクローニングするために必要となった。結腸腫瘍

50

細胞株 T 8 4 から作製された c D N A ライブラリによるいくつかの連続スクリーニングの結果、正常および C F 汗腺細胞、臍および成人肺、18 個のその他のクローン類が単離された（さらに詳細には下記で検討した、図 7）。D N A 配列解析は、これらの c D N A クローン類のいずれも観察された転写体の長さに対応していないことを明らかとしているが、しかし、重複領域類に基づいて共通配列を誘導することが可能であった。前記転写体の 5' および 3' 末端に対応する付加的 c D N A クローン類は、5' および 3' プライマー伸長実験から誘導した。これとともに、これらのクローン類は総計で 6.1 kb にわたりかつ 1480 アミノ酸残基のポリペプチドをコード可能な O R F を含有する。

【0059】

ここで単離された c D N A クローン類のほとんどは図 7 の制限地図のさまざまな位置における配列挿入物を含有していたことを観察したことは異常であった。本地図は、C F 遺伝子のゲノム構造を詳細に示している。エクソン/イントロン境界が示されており、その中では、単離された全ての c D N A クローン類が図の上半分に概略示されている。これらの余分な配列類の多くは、ゲノム D N A 配列類との配列で明らかのように、c D N A 構築の間に逆転写されたイントロン領域に明確に対応していた。ライブラリスクリーニングで検出された C F 遺伝子の組換え c D N A クローン類の数は R N A ハイブリダイゼーション実験で推定された豊富な転写体から予測されるよりもはるかに少なかったので、異常構造を含有するクローン類が優先して保存され一方適切なクローン類が増殖時に喪失するらしかった。本研究で単離された組換えクローン類の大半が、この解釈と一致するように、使用したベクターに無関係に増殖不良であることが観察された。

【0060】

c D N A の 5' および 3' 末端類を得るために使用した操作は、記載されたものと類似していた（M. Frohman ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス米国（Proc. Nat. Acad. Sci. USA）、85、8998-9002、1988）。5' 末端クローン類について、総臍および T 8 4 ポリ A + R N A 試料を、放射性トレーサーを本反応に含めた以外はプライマー伸長反応について記載されたのと同様に、エクソン 2 に特異的な 1 個のプライマー（10 b）を使用して逆転写した。1 次鎖合成のアガロースビーズカラムから採取した分画を、溶出分画のポリメラーゼチェーン反応（PCR）によってアッセイした。使用したオリゴヌクレオチドは、伸長プライマーのちょうど 5' の 10 - 1 配列内部に（ヌクレオチド 145 個離れて）あった。PCR 産物を生成する最初の分画をプールし、蒸発によって濃縮し、供給者（BRL ラボラトリ（BRL Labs.））が推奨するように末端デオキシヌクレチジルトランスフェラーゼ（BRL ラボラトリ）および d A T P でその後末端につないだ。次に、2 次鎖合成を、Taq ポリメラーゼ（シータス（Cetus）社、AmpliTaq^R）によって、末端に連結したリンカー配列 5' C G G A A T T C T C G A G A T C (T)₁₂ 3' を含有するオリゴヌクレオチドを用いて実行した。次に、前記のリンカー配列、および E c o R I 制限部位をその 5' 末端に有する伸長プライマーのちょうど内側のプライマーを用いる固定（PCR）実験による増幅を、行った。酵素類 E c o R I および B g l I I による制限およびアガロースゲル精製後、サイズ別に選択した産物を標準的操作によって（Maniatis ら、同上）Stratagene から購入可能なプラスミドブルースク립ト（Bluescript）KS ヘクローニングした。回収されたクローン類の基本的に全てが 350 個未満のヌクレオチド挿入物を含有していた。3' 末端クローン類を得るため、プライマー伸長のそれに類似の条件で、先に記載の末端連結リンカーオリゴヌクレオチドを用いて、1 次鎖 c D N A を 2 μ g の T 8 4 ポリ A + R N A の逆転写によって調製した。PCR による増幅を前記のリンカーオリゴヌクレオチドおよびクローン T 16 - 4 . 5 の公知の配列類に対応する 3 つの異なるオリゴヌクレオチド類によって実行した。分取用スケールの反応（2 × 100 μ l）を、配列 5' A T G A A G T C C A A G G A T T T A G 3' を有するこれらのオリゴヌクレオチド類のひとつで行った。

【0061】

このオリゴヌクレオチドは、T 16 - 4 . 5 の公知の配列内部の H i n d I I I 部位の

上流の約70個のヌクレオチドである。PCR産物のHindIIIおよびXhoIによる制限を行い、次に、アガロースゲル精製で1.0 - 1.4 kbのバンドをサイズ選択した。この産物をその後Stratageneから購入可能なプラスミドブルースク립トKS中にクローニングした。得られたクローンの約20%をT16-4.5の3'末端部分にハイブリダイズさせた。これらのクローン類から単離されたプラスミド類の10/10が同一制限地図を有しており、その挿入物の大きさは、約1.2 kbであった。PCR反応の全てを酵素供給業者が示唆した緩衝液中で30サイクル行った。10-1クローンの5'末端から157 ntに位置する伸長プライマーを用いて、推定CF転写体の開始点を同定した。このプライマーの末端を5000 キューリー/ミリモルで [³²P] ATP およびT4ポリヌクレオチドキナーゼで標識し、スパンカラムゲルろ過によって精製した。

10

【0062】

次に、放射性標識プライマーをT-84結腸腫瘍細胞から調製した4-5 μgのポリA+RNAと2x逆転写酵素緩衝液中で2時間、60°Cでアニーリングした。希釈およびAMV逆転写酵素(ライフサイエンス社(Life Sciences, Inc.))の添加後、41°Cにおけるインキュベーションを1時間行った。試料を次に0.4 M NaOHおよび20 mM EDTAに調節し、最終的にNH₄OAc、pH 4.6で中性とし、フェノール抽出、エタノール沈澱、ホルムアミドによる緩衝液への再溶解、さらに、ポリアクリルアミドシーケンシングゲル上での解析を行った。これらの方法の詳細は、記載されている(メソツズ・イン・エンザイモロジー(Meth. Enzymol.)) 152, 1987, S. L. Berger, A. R. Kimmel編著, アカデミックプレス(Academic Press), N. Y.)。

20

【0063】

10-1の5'末端からの157ヌクレオチドで開始する伸長オリゴヌクレオチドプライマーを用いるプライマー伸長実験の結果を、図10のパネルAに示した。HaeIII(BRLラボラトリ)で消化した末端標識X174バクテリオファージをサイズマーカーとして使用する。2個の主要産物が、216および100ヌクレオチドで観察される。10-1中の100ヌクレオチドに対応する配列は、極めてGC含量の多い配列(11/12)に対応し、これが逆転写酵素停止部位でありうることを示唆していた。5'固定PCR結果は、図10のパネルBに示してある。左に示した1.4%アガロースゲルをプロットし、ゼータベース(Zetabase[®])膜(バイオラドラボラトリ(Bio-Rad Lab))に移した。放射性標識10-1とのDNAゲルプロットハイブリダイゼーションは、右に示した。5'伸長産物は、170-280 ntまで大きさが変化し、主要産物は約200ヌクレオチドにあることがわかる。PCR対照レーンは、145ヌクレオチドの断片を示している。それは、10-1配列内部の試験オリゴマー類を用いて得られた。示したサイズマーカー類は、サイズ154, 220/210, 298, 344, 394ヌクレオチド類(1 kbラダー(Ladder))は、BRLラボラトリから購入した)に対応している。

30

【0064】

図10のパネルBの下方に示した略図は、図7に示したクローン類PA3-5およびTB2-7を産生するための増幅およびクローニングのために使用した2重鎖cDNAを得るための操作を概略したものである。3'末端を特性解析するための固定PCR実験は、パネルCに示した。図10Cの下方の略図に示したように、互いの相対位置が公知である3個のプライマー類を、逆転写されたT84RNAによる増幅のために記載のように使用した。これらの産物類は1%アガロースゲル上で分離し、上記に記載のようにナイロン膜上にプロットした。T16-4.5クローンの3'部分とのDNA-プロットハイブリダイゼーションは、使用した特定オリゴマーおよび転写体の3'末端の間の距離に対応する大きさのバンド類を産生した。レーン1, 2aおよび3内のこれらのバンド類は、図10のパネルCの下に概略示してある。レーン3のバンドは、このセグメントのヌクレオチド60個しか使用しなかったプローブと重複しないので、弱い。同様に略図に示しかつレー

40

50

ン 2 b に示したように、固定 P C R 産物の制限によって産生された産物はクローニングを促進し、図 7 に示した T H Z - 4 クローンを生産する。全転写体を網羅する c D N A 類の部分をプローブとした E c o R I および H i n d I I I 酵素類によって消化したゲノム D N A の D N A - プロットハイブリダイゼーション解析から、本遺伝子がローマ数字 I から X X I V までとして番号を付けた少なくとも 2 4 個のエクソン類を含有することを示唆している (図 9 参照)。これらは、図 7 に示した数値 1 から 2 4 までに対応する。各バンドの大きさは、k b で示してある。図 7 において、白色の四角は、c D N A ライブラリのスクリーニングからおよび前記の 5 ' および 3 ' 末端をクローニングするために設計された固定 P C R 実験から 2 2 個を超えるクローン類を単離することによって同定された 2 4 個のエクソン類のおよその位置を示している。各エクソンによって検出された E c o R I ゲノム断片の k b 単位の長さも、また、示した。図 7 の斜線入り四角は、イントロン配列類の存在を示唆しており、かつ、点線入り四角は、他の配列類を示している。左下に閉鎖四角で示したのは、正常汗腺ライブラリの 10^6 個のファージ中から最初の c D N A クローンを検出するために使用したクローン H 1 . 6 の相対位置である。図 4 (D) および 7 に示したように、このゲノムクローン H 1 . 6 は、部分的に 4 . 3 k b の E c o R I 断片と重複する。示した c D N A クローン類の全てがゲノム D N A にハイブリダイズし、および/または制限地図上に良好にマッピングされた。この c D N A 類内部または対応するゲノム断片類中に出現する制限部位類の例を示した。

10

【 0 0 6 5 】

図 9 を参照として、ハイブリダイゼーション解析は、プローブ類 ; すなわち、パネル A について c D N A クローン類、パネル B について T 1 6 - 1 (3 ' 部分)、パネル C について T 1 6 - 4 . 5 (中央部分) およびパネル D について T 1 6 - 4 . 5 (3 ' 末端部分) を含む。図 9 のパネル A において、c D N A プローブ 1 0 - 1 は、エクソン I から V I までのゲノムバンド類を検出している。N r u I 制限によって作製された T 1 6 - 1 の 3 ' 部分は、パネル B に示したようにエクソン I V から X I I I までを検出する。このプローブは、1 0 - 1 と部分的に重複する。パネル C および D は、それぞれ、クローン T 1 6 - 4 . 5 の中央および 3 ' 末端 E c o R I 断片類によって検出されるゲノムバンド類を示している。2 個の E c o R I 部位が c D N A 配列内部に出現し、エクソン X I I I および X I X を分割する。カッコ内のエクソン類によって示したように、2 個のゲノム E c o R I バンド類がこれらのエクソン類のそれぞれに対応する。他のゲノム断片類への交差ハイブリダイゼーションが観察された。これらのバンド類は N によって示され、それらはヒト染色体 7 を含有するヒト - ハムスターハイブリッド中に出現しないので、染色体 7 起源のものではない。カギカッコ中の X I によって示したパネル D 中のかすかなバンドは、前記 c D N A との内部相溶性による配列類の交差ハイブリダイゼーションが原因であると確信されている。

20

30

【 0 0 6 6 】

T - 8 4 結腸腫瘍細胞株由来 R N A のゲルプロットハイブリダイゼーション上で 1 0 - 1 が強いバンドを検出したので、この c D N A を用いてその起源から構築されたライブラリをスクリーニングした。1 5 個の陽性物が得られ、それから、クローン類 T 6 , T 6 / 2 0 , T 1 1 , T 1 6 - 1 および T 1 3 - 1 が精製されかつ配列決定された。同ライブラリを T 1 6 - 1 の 3 ' 末端からの B a m H I - E c o R I 断片 0 . 7 5 k b で再度スクリーニングして、T 1 6 - 4 . 5 を生成した。T 1 6 - 4 . 5 の 3 末端からの 1 . 8 k b の E c o R I 断片は、T 8 - B 3 および T 1 2 a を生成し、この後者は、ポリアデニル化シグナルおよび末端を有していた。同時に、ヒト肺 c D N A ライブラリをスクリーニングした ; ここで接頭辞 " C D L " によって示したものを含めて多くのクローン類が単離された。膀胱ライブラリを同様にスクリーニングして、クローン C D P J 5 を生成した。

40

【 0 0 6 7 】

この転写体コピーを C F 患者から得るため、患者 1 例からの汗腺上皮細胞の c D N A ライブラリを、T 1 6 - 1 の 3 ' 末端からの 0 . 7 5 k b の B a m H I - E c o R I 断片によってスクリーニングして、エクソン 1 を除く全てを包含するクローン類 C 1 6 - 1 およ

50

び C 1 - 1 / 5 を単離した。これら 2 種のクローン類は両方ともエクソン 10 中の 3 b p の欠損を示し、これは、そのエクソンを有する他の全てのクローンに存在していない。肺ライブラリ由来の C D L S 26 - 1 および T 8 4 から単離された T 6 / 20 および T 13 - 1 は、部分処理転写体類から誘導した。このことは、ゲノムハイブリダイゼーションによっておおよび各クローンのためのエクソン - イントロン境界を横切る配列決定によって確認した。T 11 は、同様に、各末端で付加的配列を有していた。T 16 - 4 . 5 は、イントロン配列に対応しないエクソン類 10 および 11 の間の境界近傍で小さい挿入物を有していた。肺ライブラリからのクローン類 C D L S 16 A , 11 A および 13 A は、同様に、未知の起源の外来性配列類を有していた。このクローン C 16 - 1 は、また、大腸菌 (E . c o l i) の - トランスポゾンの 1 部分に対応する短い挿入物を含有していた ; この要素は、他のクローン中で検出されなかった。隣 RNA から作製された 5 'クローン類 P A 3 - 5 および固定 P C R 法を用いて T 8 4 RNA から作製された T B 2 - 7 は、図 1 に示したように 5 '末端における 1 個のヌクレオチドの長さにおける差異を除いて同一の配列を有している。T 8 4 RNA から得られた 3 'クローンの T H Z - 4 は、この領域のゲノム配列に一致する転写体の 3 '配列を有している。

【 0 0 6 8 】

C F 遺伝子の推定コード領域を示す組み合わせ配列は、重複する c D N A クローン類から作製された。c D N A クローン類のほとんどが明らかに未処理転写体から誘導されたので、この組み合わせ配列の正確さを確認するためにさらに研究を行った。各 c D N A クローンについて、1 個のヒト染色体 7 を含有するヒト - ハムスター体細胞ハイブリッドによるハイブリダイゼーション解析によっておおよびパルスフィールドゲル電気泳動によって染色体 7 に対する局在を最初に試験した。微細な制限酵素マッピングを各クローンについて同様に行った。重複する領域が明らかにクローン類のほとんどについて同定可能であるので、多くが、独自の制限パターンの領域を含有していた。

【 0 0 6 9 】

さらにこれらの c D N A クローン類を解析するために、これらをプローブ類として E c o R I - または H i n d I I I で消化したヒトゲノム D N A によるゲルハイブリダイゼーション実験で用いた。図 9 に示したように、5 個乃至 6 個の異なる制限断片類が、10 - 1 c D N A によって検出でき、かつ、類似数の断片類が他の c D N A クローン類で検出でき、推定 C F 遺伝子のために複数のエクソン類が存在することを示唆している。このハイブリダイゼーション研究は、また、未処理イントロン配列類を有する c D N A クローン類がゲノム D N A 断片類のサブセットに対して優先的なハイブリダイゼーションを示したので、これらを同定した。確認された c D N A クローン類について、それらの対応するゲノム D N A セグメント類が単離されかつエクソン類および / またはエクソン / イントロン境界が配列決定された。図 7 に示したように、総計 24 個のエクソン類が識別された。この情報および物理的マッピング実験の結果に基づいて、遺伝子座が染色体 7 上で 250 k b に及ぶと推定された。

【 0 0 7 0 】

2 . 6 配列

図 1 は、演繹されたアミノ酸配列とともに、C F T R をコードするクローニングされた c D N A のヌクレオチド配列を示している。最初の塩基位置は、T b 2 - 7 よりもヌクレオチド 1 個だけ長い 5 '伸長クローン P A 3 - 5 中の最初のヌクレオチドに対応する。矢印は、プライマー伸長解析による転写開始部位の位置を示している。ヌクレオチド 6129 の後にポリ (d A) 鎖 (t r a c t) が続く。エクソン結合部の位置は、垂直線によって示唆される。膜を貫通する潜在的セグメント類は、E i s e n b e r g ら、ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J . M o l . B i o l .) 179 : 125 (1984) のアルゴリズムを用いて確認した。解析しかつ図 11 に示した膜をおおう潜在的セグメント類は、図 1 の四角に囲んだ。図 11 において、残基 9 個のペプチド類の平均ヒドロパシー係数 [K y t e および D o o l i t t l e , ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J . M o l . B i o l .) 157 : 105 , (1982)] をアミノ酸の数に

対してプロットする。Garnierら、(ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.) 157, 165 (1982)) によって予測した2次構造特徴の対応する位置は、下のパネルに示した。推定上のATP結合折り畳みからなるアミノ酸類は、図1でアンダーラインを付けた。プロテインキナーゼA (PKA) またはC (PKC) によってリン酸化が可能な部位は、白丸および黒丸によってそれぞれ示してある。白三角は、CFにおいて欠失している3bp (CTT) 上にある。図1のこのcDNAクローン類は、ジュボンジェネシス (DuPont Genesis) 2000^R 自動DNAシーケンサーにより³⁵S標識ヌクレオチド類を用いたジデオキシチェーン法によって配列決定した。

【0071】

組み合わせたcDNA配列は、未翻訳領域の3'末端のポリ(A)テイルを除く6129塩基対を跨いでおり、そして、1480個のアミノ酸のポリペプチドをコード可能なORFを有している(図1)。ATGトリプレット(AUG)が、このORFの最初に存在している(塩基位置133-135)。このコドン(5'-AGACCAUGCA-3')を取り囲むこのヌクレオチド配列は、真核生物翻訳開始部位の共通配列(CC)A/GCCAUGG(G)の提起された特徴を-3位の高度に保存されたAとともに有しているため、このAUGが推定ポリペプチドの最初のメチオニンコドンに対応すること可能性が極めて高い。転写体の5'末端に対応する配列を得るため、プライマー-伸長実験を先にも述べたように実施した。図10Aに示したように、約216個のヌクレオチド類のプライマー伸長産物が観察され、前記転写体の5'末端がcDNAクローン10-の末端の上流の約60個のヌクレオチドで開始することを示唆していた。次に修飾されたポリメラーゼチェーン反応(固定PCR)を用いて、この5'末端配列類のクローニングを促進した(図10b)。2個の独立した5'伸長クローン類はひとつは隣由来で他方はT84RNA由来であり、DNA配列決定によって特性解析し、長さで1塩基しか変わらないことが見いだされ、図1に示したように最も可能性の高い転写開始部位を示唆していた。

【0072】

開始cDNAクローン類のほとんどはmRNA末端を示唆するポリAテイルを有していないので、固定PCRを同様に転写体の3'末端に適用した(Frohmanら、1988, 同上)。3個の3'伸長オリゴヌクレオチド類をcDNAクローンT16-4.5の末端部分に対して作製した。図10cに示したように、異なる大きさの3個のPCR産物が得られた。全てが転写体の末端がヌクレオチド5027位IIにおけるHindIII部位の下流のおよそ1.2kbであるという解釈と矛盾していなかった(図1参照)。代表的クローン類から誘導したDNA配列は、T84cDNAクローンT12aのそれ(図1および7参照)、その対応する2.5kbのEcoRIゲノム断片の配列と一致していた。

【0073】

3.0 CFの分子遺伝学

3.1 発現部位

推定CF遺伝子のための転写体を可視化するため、RNAゲルプロットハイブリダイゼーション実験をプローブとしての10-1cDNAで行った。RNAハイブリダイゼーション結果は、図8に示した。RNA試料は、外科病理からまたは剖検で得られた組織試料から先に記載の方法にしたがって調製した(A.M. Kimmel, S.L. Berger, 編著、メソツズ・イン・エンザイモロジー (Meth. Enzymol.) 152, 1987)。ホルムアルデヒドゲルをナイロン膜に移した(ゼータプローブ (Zeta probe^R); バイオラドラボラトリ (BioRad Lab.))。先に公表された操作(J. Rommensら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 43, 645-663, 1988)にしたがって、ランダムプライミング法によってこの膜を次に標識されたDNAプローブ類と高比放射能となるまでハイブリダイズさせた(A.P. FeinbergおよびB. Vogelstein, アナリティカルバイオケミストリ (Anal. Biochem.) 132, 6,

10

20

30

40

50

1983)。図8は、cDNAクローン10-1による示した組織中における6.5kbの転写体へのハイブリダイゼーションを示している。各組織の総RNA(10μg)およびT84結腸腫瘍細胞株のポリ(A)+RNA(1μg)は、1%ホルムアルデヒドゲル上で分離した。28Sおよび18SrRNAバンド類の位置を示している。矢印は、転写体の位置を示している。RNAマーカー標準物質(BRLラボラトリ)との比較によって、大きさを決めた。HL60はヒト前骨髄細胞性白血病細胞株であり、T84はヒト結腸癌細胞株である。

【0074】

解析から、T84細胞中において大きさが約6.5kbの顕著なバンドが明らかとなった。同様に、強いハイブリダイゼーションシグナルが脾および鼻ポリープ由来細胞の初代培養中で検出され、推定CF遺伝子の成熟mRNAが約6.5kbであることを示唆している。おそらく分解産物を示しているのであろう小さなハイブリダイゼーションシグナルが、低サイズ範囲で検出されたが、それらは、異なる実験間で変化していた。同一の結果が、他のcDNAをプローブとしても得られた。ハイブリダイゼーションバンド強度および他の転写体について同一実験条件下で検出されたそれらとの比較に基づき、推定CF転写体がT84細胞中の総mRNAのおよそ0.01%を構成すると推定した。

【0075】

いくつかの他の組織も、10-1遺伝子の発現パターンとCFの病理を関連させるためにRNAゲルプロットハイブリダイゼーション解析によって調べた。図8に示したように、全て同一サイズの転写体が、肺、結腸、汗腺(培養上皮細胞)、胎盤、肝、および耳下腺で見られたが、これらの組織におけるシグナル強度は調製物が異なると変化し、かつ、脾および鼻ポリープ中で検出されるそれよりも一般に弱かった。強度は調製物が異なると変化しており、たとえば、腎におけるハイブリダイゼーションは、図8に示した調製物中で検出されなかったが、以後アッセイを繰り返して識別できる。脳または副腎ではいかなるハイブリダイゼーションシグナルも識別できず(図8)、または、皮膚繊維芽細胞およびリンパ芽球性細胞株でも識別できなかった。要約すれば、CF遺伝子の発現は調べた組織の多くで起こるらしかったが、CFに重篤に罹患している組織中で高レベルであった。この上皮組織特異的発現パターンは本疾患の病理と極めてよく一致している一方で、CFおよび対照組織由来転写体の量および大きさには有意な差が検出されず、CF変異がヌクレオチドレベルにおけるわずかな変化であるという仮定と一致している。

【0076】

3.2 主なCF変異

図17は、F508欠失におけるDNA配列を示している。左は、(cDNAクローンT16から誘導した)正常配列の塩基位置1649-1664からの配列の逆転写である。このヌクレオチド配列は、デュポンジェネシス(DuPont Genesis)2000^RNA解析システムの2個の光電子増倍管(PMT#1および#2)のそれぞれについて時間(x軸)に対してプロットした(勝手に付けた蛍光強度単位による、y軸)出力として表示されている。対応するヌクレオチド配列は、下方に示されている。右は、(cDNAクローンC16から誘導した)変異配列からの同一領域である。2重鎖プラスミドDNAテンプレートは、アルカリ溶解操作によって調製した。アニーリングを45°Cで30分間行ったことおよび伸長/終止段階を42°Cで10分間行ったことを除いて、DuPontによって推奨されたプロトコールにしたがって、プラスミドDNA5μgおよびオリゴヌクレオチドプライマー75ngを各配列決定反応に使用した。非取り込み蛍光ヌクレオチド類は、pH7.0の2.5M酢酸アンモニウムの存在下におけるDNA配列決定反応産物のエタノール沈澱によって除去し、70%エタノールで1回洗浄した。T16-1配列決定のために使用したプライマーは、塩基位置1708-1731にまたがる特異的オリゴヌクレオチド5'GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC3'であり、C16-1に対するそれは、ブラスクリプトベクター(Stratagene)に対する普遍的プライマーSKであった。

【0077】

図18は、また、手動配列決定によって決定したF508欠失の周りのDNA配列を示している。(cDNA T16-1からの)塩基位置1726-1651からの正常配列を(cDNAC16-1からの)CF配列の側に示した。左のパネルは、Bプライマー(5'GTTTTCTCTGGAT-TATGCCTGGGCAC3')によって得られたコード鎖からの配列を示しており、かつ、右のパネルは、Dプライマー(5'GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC3')による反対鎖のそれらを示している。カギカッコは、CFにはない正常者の3個のヌクレオチド類を示している(矢印先端)。配列決定は、F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson、プロシーディングズ・オブ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンシズ米国(Proc. Nat. Acad. Sci. USA) 74; 5463 (1977)に記載のようにして行った。この欠失を有するCF患者の割合を調べるため、患者およびその親からのゲノムDNA試料をそれぞれこの変異に隣接するオリゴヌクレオチドプライマー類でポリメラーゼチェーン反応で増幅し、正常および推定変異配列類(図2参照)に特異的な³²P標識オリゴヌクレオチド類にハイブリダイズさせた。本解析の結果は、表2に示してある。

【0078】
【表2】

表 2

3bp欠失の有無によるCFおよび
非CF(N)染色体の分布

a.	<u>CF染色体</u>	<u>N染色体</u>
欠失無	69	198
欠失有	145	0
計	214	198

b.	<u>CF染色体</u>	<u>欠失無</u>
3bp欠失有		
CF-PI	62	24
CF-PS	5	9
未分類	78	16
計	145 (68%)	69 (32%)

CF-PI(腓不全)およびCF-PS(腓良好)染色体のデータは、我々の連結解析で使用したCF家族から誘導した。これらの家族は、当初PIまたはPSの知識もなく選択された;その後同定されたCF-PSの15家族は、この計算の一部には入れなかった。未分類のCF染色体は、トロント小児病院のDNA診断室(DNA Diagnosis Laboratory at the Hospital for Sick Children)から得られ、それらについての腓機能データは入手できなかった。

【0079】

一般患者群のCF染色体の68%(145/214)は、F508欠失を有していた(表2)。対照的に、N染色体では、この欠失を有するものは皆無であり(0/198)(表2; $\chi^2 = 207, p < 10^{-57.5}$)、この配列変化がCFに特異的であることおよびそれが本疾患を起こす主な変異であることを示唆していた。F508欠失とCFとの間に全く組換えは検出されなかった。

【0080】

10

20

30

40

50

配列の他の差異は、正常 (T 1 6 - 4 . 5) および C F (C 1 - 1 / 5) c D N A クローン類との間で見られた。T 1 6 - 4 . 5 は、塩基位置 2 6 2 9 で 1 個の C を示し、C 1 - 1 / 5 は 1 個の T を示し、その結果、アミノ酸レベルでロイシン (L e u) からフェニルアラニン (P h e) への変化を起こしている。- 4 5 4 5 で、塩基は T 1 6 - 4 . 5 で G であるが、C 1 - 1 / 5 では A であった (V a l から M e t)。これらの知見は、配列多形性を表すと確信される。患者 / 家族 D N A の特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション解析によって、これらが他の変異可能性として同定されるであろう。さらに、ヌクレオチドにおける差異が、異なる c D N A クローン類とゲノム D N A 配列との間の 3 ' 未翻訳領域で観察された。配列のこのような差異および認識された他の配列修飾が可能である ; たとえば、この差異が正常配列多形性およびクローニングアーティファクトによるものであり、このような差異の全てがその機能およびその商業的適用の観点からして図 1 に記載のような配列に基本的に等価である。さらに遺伝的および物理的マッピングデータは、染色体上の小セグメントの D N A を中心とする分子クローニング研究に向けられた。C F における染色体欠失および再配列 (の知識が) が欠けているためにおよび C F 遺伝子産物のための十分に開発された機能的アッセイがないために、C F 遺伝子の同定では、座そのものの詳細な特性解析および C F および正常 (N) 対立遺伝子の間の比較を必要とした。ランダム (遺伝的に浮動性) で表現型では正常な者は、この群において無症状のキャリアーが高頻度であることから前記の比較の対照には入れなかった。その結果、それぞれが 1 個の N および 1 個の C F 染色体を有すると定義されている C F 患者の両親のみが、本解析に適していた。

10

20

【 0 0 8 1 】

さらに、C F および近接連結 D N A マーカーの一部の間で観察された強い対立遺伝子関連の故に、N および C F の間に検出された配列差異が本疾患座に関連する多形性である可能性を除外することが必要になった。

【 0 0 8 2 】

3 . 3 R F L P 類および家族研究の同定

染色体歩行およびジャンピング実験から単離された D N A セグメント類のそれぞれの C F との関係を決するため、制限断片長多形性 (R F L P 類) を同定しかつ C F と他の隣接 D N A マーカーとの間に交雑事象が過去に観察されている家族を研究するために用いた。図 1 4 に示したように、総計 1 8 種の R F L P 類が 5 0 0 k b 領域に検出された ; それらの内の 1 7 (E 6 から C E 1 . 0 まで) を表 3 に列挙した ; それらの一部は、先に報告されたマーカー類に対応していた。R F L P 類の 5 つが、すなわち、1 0 - 1 X . 6 , T 6 / 2 0 , H 1 . 3 および C E 1 . 0 が、推定 C F 遺伝子から誘導した c D N A およびゲノム D N A プローブ類で同定された。この R F L P データは表 3 に示してあり、M E T および D 7 S 8 領域中のマーカー類も比較のために示してある。これらのマーカー間の物理的距離ならびに D 7 S 8 に対する関連を図 1 4 に示した。

30

【 0 0 8 3 】

【表 3】

表 3 C F 遺伝子 関連 R F L P 類

7p-11q	断片 長さ	N1AL	CF-PI1A1	A1D1	*(C)	各号表紙
metD	BanI	28	48	0.60	0.10	J.E. Spence et al, Am. J. Hum. Genet. 39:729 (1986)
		59	25			
metD	TaqI	74	75	0.66	0.06	R. White et al, Nature 318:382 (1985)
		19	4			
meth	TaqI	45	49	0.35	0.05	White et al, NIDDK
		38	20			
E6	TaqI	58	62	0.45	0.06	B. Keren et al, Am. J. Hum. Genet. 44:827 (1989)
		42	17			
E7	TaqI	40	16	0.47	0.07	
		51	57			

10

20

30

40

【表 4】

PH31	Hlnfi	0.4	81	33	0.73	0.15	J. M. Rommens et al, <i>Am. J. Hum. Genet.</i> , 43:645 (1988)
W3D1.4	HlnclII	0.3	18	47			
H2.3A	TaqI	2.1	39	53	0.64	0.09	X. Estivill et al, <i>Nature</i> 326:840 (1987); X. Estivill et al, <i>Genomics</i> 1:257 (1987)
(WZC)		1.4	37	11			
EG1.4	HlnclII	3.8	31	69	0.89	0.17	
EG1.4	BglII	2.8	56	7			
EG1.4	BglII	20	27	69	0.89	0.18	
JG2E1	PstI	15	62	9			
		7.8	69	10	0.88	0.18	X. Estivill et al <i>SUP13</i> and B. Kerem et al <i>SUP13</i>

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

【表 5】

(K019)	6.6	30	70		
E2.6/E.9	MpI 1.1	34	6	0.85	0.14
	8.5	26	55		
H2.8A	NcoI	22	55	0.87	0.18
	8	52	9		
EA.1	MpI	37	8	0.77	0.11
	12				G. Ramso, personal communication
(Mp609)	8.5+3.5	38	64		
J44	XbaI	40	70	0.86	0.13
	15+3	44	6		
10-IX.6	NcoI	67	15	0.90	0.24
	3.5+3	14	60		
10-IX.6	HaeIII	14	61	0.91	0.25
	.6	72	15		
T6/20	MpI	56	66	0.51	0.54
	4.3	21	8		
H1.3	NcoI	53	7	0.87	0.15
	1+1.4	35	69		

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

【表 6】

CE1.0	NdaI	5.5	81	73	0.41	0.03	
		4.7±0.8	8	3			
J32	SacI	15	21	24	0.17	0.02	M.C. Iannuzzi et al <i>Am. J. Genet.</i> 44:695 (1989)
		6	47	38			
J3.11	HpaI	4.2	36	38	0.29	0.04	B.J. Wainright et al, <i>Nature</i> 318:384 (1985)
		1.8	62	36			
J29	PvuII	9	26	36	0.36	0.06	M.C. Iannuzzi et al, <i>EMBO</i>
		6	55	36			

表 3 の注

(a) NおよびCF-PI (不完全CF) 染色体の数は、関連解析に含めた家族の両親から誘導した [Tsuiら、コールドスプリングハーバーシンポジウム (Cold Spring Harbor Symp.) クオンティタティブバイオロジー (Quant. Biol.) 51:325 (1986)]。

(b) N染色体中におけるDNAマーカー対立遺伝子分布の変動で余り影響を受けない標 50

準化された関係 (A) をここで用いて、ユール (Yule) の連関係数 $A = (ad - bc) / (ad + bc)$ (式中、 a, b, c および d は N 染色体の数であり、それぞれ、DNA マーカー対立遺伝子は 1、CF は 1、N は 2、CF は 2 である) を比較した。相対リスクは、関係 $RR = (1 + A) / (1 - A)$ またはその逆数を用いて計算できる。

(c) A. Chakravarti ら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス (Am. J. Hum. Genet.) 36, 1239、(1984) によって本群における CF 染色体の頻度を 0.02 と想定し計算した対立遺伝子連関 (*) は、比較のために含めてある。

【0087】

本解析で利用できた組換え家族の数が研究したマーカー類と CF との距離が近接していることから予測されたように少ないために、また、診断過失の可能性のために、さらに CF 遺伝子の微細マッピングにおいて別の手法が必要であった。

【0088】

3.4 対立遺伝子連関

対立遺伝子連関 (連関非平衡) は、多くの近接連関 DNA マーカー類について検出された。対立遺伝子連関の遺伝子距離測定における用途は不確かである一方で、CF と隣接 DNA マーカー類との間で全体としての相関が観察された。CF による強い関連が、より近接した DNA マーカー類、D7S8 および D7S122 について注目され、一方、距離がより離れたマーカー類、MET、D7S8 または D7S24 についてはほとんどまたは全く関連が検出されなかった (図 1 参照)。

【0089】

3 にも示したように、DNA マーカー類と CF との間の連関の程度は、(ユールの連関係数によって測定したように) me t H について 0.35 からおよび J32 について 0.17 から 10-1X.6 について 0.91 まで (CF - PI 患者家族のみを本解析で使用。彼らが、CF - PS よりも遺伝的により均質であるように見えたので。) 連関係数は、EG1.4 から H1.3 で 300 kb にわたってやや一定しているように見えた; 数個の位置で検出された変動は、特に H2.3A、E4.1 および T6/20 で最も顕著であったのは、おそらく、N 染色体中における対立遺伝子分布の変動が原因であったのだろう (表 2 参照)。これらのデータは、したがって、組換え家族の研究からの結果と矛盾していなかった (図 14 参照)。同様に、CF 染色体類に関連する伸長された DNA マーカーハプロタイプ類を調べることによって、類似の結論に至った (下記参照)。しかし、EG1.4 と H1.3 の長い物理的距離にわたって検出された強い対立遺伝子連関も、CF 遺伝子のより詳細なマッピングをさらに可能とすることはなかった。J44 は染色体歩行およびジャンピングによって cDNA クローンが同定される前に単離された最後のゲノム DNA クローンであるので、前記の JG2E1 - J44 区間について検出された強い対立遺伝子連関によって、我々は、この全長にわたり候補遺伝子配列類を検索することになった。最大の対立遺伝子連関が、実際には、CF および 10-1X.6 によって検出された 2 個の RFLP 類の間で主要 CF 変異近傍領域で検出された。

【0090】

表 4 は、CF に近接して連関する DNA マーカー類間の対になった対立遺伝子連関を示している。これらの計算で用いた平均染色体数は、75 - 80 であり、CF - PI 家族由来染色体のみを CF 染色体を数える際に使用した。類似の結果が、ユールの標準化された連関 (a) を使用したときに得られた)。

【0091】

【表7】

表4 N染色体

	meI D		meH E6		E7 pH131		D1.4 H2.3A		EG1.4		JG2E1		E2.6 H2.8		E4.1		J44		10-1X.6		T6.20		H1.3		CE1.0		J3.2		J3.11		J29	
	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind	TaqI	Hind
meI D BarI	0.35	0.49	0.04	0.04	0.05	0.07	0.27	0.06	0.06	0.07	0.14	0.07	0.09	0.03	0.11	0.06	0.02	0.06	0.10	0.03	0.16	0.05	0.07	0.11	0.02	0.02	0.21	0.09	0.09	0.05	0.05	0.18
meI D TaqI	0.21	0.41	0.13	0.15	0.02	0.01	0.02	0.09	0.15	0.11	0.07	0.24	0.03	0.11	0.06	0.02	0.02	0.06	0.13	0.15	0.09	0.09	0.09	0.09	0.05	0.05	0.09	0.09	0.05	0.05	0.18	
meH TaqI	0.61	0.14	0.01	0.05	0.06	0.06	0.24	0.05	0.06	0.07	0.13	0.15	0.07	0.04	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	0.03	0.21	0.04	0.21	0.04	0.18	0.11	0.09	0.15	0.07	0.11	0.20	0.00
E6 TaqI	0.11	0.30	0.09	0.09	0.07	0.06	0.04	0.02	0.03	0.00	0.19	0.02	0.09	0.19	0.09	0.11	0.09	0.15	0.09	0.15	0.07	0.11	0.20	0.11	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E7 TaqI	0.16	0.31	0.02	1.00	0.11	0.09	0.03	0.03	0.04	0.01	0.11	0.00	0.07	0.22	0.01	0.02	0.09	0.13	0.06	0.06	0.16	0.04	0.16	0.04	0.16	0.04	0.16	0.04	0.16	0.04	0.16	0.04
pH131 Hind	0.45	0.28	0.23	0.38	0.46	0.91	0.12	0.04	0.06	0.05	0.06	0.03	0.03	0.03	0.08	0.16	0.15	0.20	0.04	0.03	0.06	0.08	0.06	0.08	0.06	0.06	0.08	0.06	0.08	0.06	0.08	0.06
WGD1.4 Hind	0.45	0.28	0.23	0.45	0.47	0.95	0.21	0.02	0.03	0.01	0.06	0.03	0.03	0.10	0.12	0.10	0.23	0.10	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.10	0.05	0.10	0.05	0.10	0.05	0.10	0.05	0.10
H2.3A TaqI	0.20	0.11	0.15	0.08	0.11	0.36	0.47	0.05	0.11	0.07	0.42	0.14	0.29	0.07	0.27	0.22	0.20	0.09	0.23	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12	0.04
EG1.4 Hind	0.11	0.06	0.07	0.06	0.07	0.20	0.24	0.95	0.87	0.76	0.86	0.81	0.60	0.07	0.13	0.61	0.56	0.04	0.24	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
EG1.4 Bgl	0.03	0.06	0.07	0.06	0.07	0.27	0.40	1.00	0.92	0.77	0.93	0.71	0.55	0.08	0.07	0.56	0.55	0.12	0.20	0.24	0.20	0.24	0.20	0.24	0.20	0.24	0.20	0.24	0.20	0.24	0.20	0.24
JG2E1 Pst	0.07	0.06	0.03	0.09	0.06	0.30	0.45	0.93	0.94	0.84	1.00	0.76	0.64	0.11	0.11	0.61	0.57	0.13	0.31	0.26	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
E2.6E.9 MspI	0.22	0.06	0.07	0.02	0.03	0.20	0.34	0.81	0.82	0.92	0.83	0.97	0.76	0.56	0.52	0.47	0.70	0.32	0.31	0.25	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
H2.8 NcoI	0.05	0.07	0.01	0.08	0.06	0.31	0.45	0.92	0.93	1.00	0.92	0.74	0.65	0.13	0.18	0.60	0.59	0.10	0.28	0.28	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
E4.1 MspI	0.12	0.06	0.07	0.05	0.03	0.25	0.48	0.82	0.86	0.94	1.00	0.93	0.71	0.49	0.49	0.68	0.68	0.35	0.27	0.25	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
J44 XbaI	0.18	0.05	0.06	0.01	0.01	0.26	0.28	0.45	0.71	0.89	0.80	0.80	0.85	0.33	0.40	0.65	0.64	0.32	0.24	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
10-1X.6 AccI	0.16	0.10	0.24	0.10	0.11	0.42	0.42	0.64	0.54	0.58	0.64	0.70	0.69	0.59	0.59	0.91	0.19	0.36	0.56	0.00	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
10-1X.6 HaeIII	0.16	0.10	0.25	0.09	0.11	0.41	0.41	0.65	0.54	0.59	0.64	0.70	0.69	0.59	1.00	0.18	0.43	0.62	0.02	0.02	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
T6.20 MspI	0.27	0.07	0.36	0.13	0.13	0.23	0.23	0.29	0.05	0.06	0.01	0.07	0.02	0.01	0.11	0.69	0.60	0.56	0.03	0.21	0.18	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
H1.3 NcoI	0.08	0.06	0.06	0.03	0.01	0.30	0.30	0.55	0.71	0.78	0.87	0.90	0.87	0.93	0.92	0.64	0.64	0.12	0.40	0.19	0.13	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
CE1.0 HdeI	0.00	0.04	0.02	0.11	0.11	0.25	0.25	0.08	0.59	0.55	0.43	0.55	0.37	0.44	0.24	0.24	0.07	0.40	0.19	0.13	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
J3.2 SacI	0.03	0.13	0.07	0.17	0.13	0.17	0.24	0.07	0.21	0.21	0.24	0.22	0.24	0.21	0.21	0.27	0.26	0.13	0.21	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
J3.11 MspI	0.14	0.11	0.15	0.07	0.06	0.05	0.12	0.11	0.10	0.13	0.18	0.19	0.15	0.20	0.26	0.29	0.24	0.14	0.07	0.81	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71
J29 PvuII	0.11	0.12	0.09	0.10	0.10	0.00	0.09	0.10	0.10	0.14	0.17	0.20	0.16	0.16	0.29	0.23	0.16	0.06	0.85	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97

CF染色体

強い対立遺伝子連鎖は、また、CFおよびN染色体の両方で小群のRFLP類中에서도検出された。表4に示したように、互いに物理的に近接しているDNAマーカー類は一般に互いに強い連鎖を有しているようであった。たとえば、強い(一部の場

完全な)対立遺伝子連関は、隣接マーカー類 E 6 および E 7 の間、p H 1 3 1 および W 3 D 1 . 4 の間、1 0 - 1 X . 6 によって検出されかつ E G 1 . 4 , J G 2 E 1 , E 2 . 6 (E . 9) , E 2 . 8 および E 4 . 1 中で検出された A c c - および H a e I I I 多形性部位類の間で検出された。M E T および D 7 S 8 領域中の遠位マーカー類の前記 2 群は、また、それ自体の間である程度の連関非平衡を示したが、それらは、E 6 から C E 1 . 0 までのマーカー類との連関をほとんど示さず、M E T と D 7 S 8 の遠い位置と矛盾していなかった。一方、物理的に近接している D N A マーカー間に関連がないことは、組換えホットスポットの存在を示唆するかも知れない。これらの潜在的ホットスポットの例として、E 7 および p H 1 3 1 との間、H 2 . 3 A の近傍、J 4 4 とプローブ類 1 0 - 1 X . 6 および T 6 / 2 0 によって網羅される領域との間の領域が挙げられる(図 1 4 参照)。頻度の高い組換え切断点を含むこれらの領域は、C F 領域のための伸長ハプロタイプデータの以下の解析で有用であった。

10

【 0 0 9 2 】

3 . 5 ハプロタイプ解析

2 3 個の D N A マーカー類に基づいた伸長ハプロタイプ類は、先に関連解析で使用した収集された家族中の C F および N 染色体類について作製された。異なるハプロタイプの染色体間の組換えを想定して、観察された C F 染色体類のいくつかの系統を構築すること、および本疾患座の位置を予測することが可能であった。異なる C F 変異の性質を理解するために有用な情報をさらに得るため、F 5 0 8 欠失データを伸長 D N A マーカーハプロタイプ類と関連させた。表 5 に示したように、N および C F ハプロタイプの 5 種の主な群が、推定 C F 遺伝子内部またはそれに直接隣接する(領域 6 - 8) R F L P 類によって定義された。

20

【 0 0 9 3 】

【表 8】

表 5 C F 座にまたがる D N A マーカーハプロタイプ

類

I.(a)	CF(b)			
	PI (F508)	PS (F508)	PI others	PS others
1	A A A A A A A B B B B B A A A B B E D D B C A D A D B A A A A A			
2	A A A A A A A A A A A A A B D C B C B B B A A D C D D B B B E C C			
3	A A A A A . A . A . A A A A A A A A A B . . A A A . . A . B A .			
4	A C			
5	A A . . A A . A A A . A . A A A A A . . A A A A A . A A A A A .			
6	A A A . A A A A A A A A A . A A A A A . A A A A A A A A A A A A			
7	A . A			
8	A A A . . A A A A A A A A A . A A A A A . A A A A A A A A A A A A			
9	A A A A B B B C A A A . A A A A A A A A A B B B B B B B B B B B B			
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				

117°D9470(a)

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

表 5 (続き)

(a) 伸長されたハプロタイプデータは、先の連関研究で使用した C F 家族 (表 3 の脚注 (a) 参照) ならびにその後収集した C F - P S 家族 (K e r e m ら、アメリカンジャーナル・オブ・ヒューマンジェネテックス (A m . J . H u m . G e n e t .) 4 4 : 8 2 7 (1 9 8 9)) から誘導した。このデータは、紙面削減のため群 (領域) 別に示してある。領域は、表 4 に示した対にした関連データにしたがって、おもに示されており、領域 6 - 8 は、推定 C F 座 (F 5 0 8) にまたがる領域であり、欠失は領域 6 と 7 の間にある。棒線 - は、不完全データまたは相確立が不可であったためにハプロタイプが決定されなかった領域に示されている。異なるハプロタイプ認定もデータが不完全である場合に示してある。未分類には、3 個以上の分類不明の染色体を含めてある。9 つの各領域のハプロタイプ定義は、下記のようなものである：

10

【 0 0 9 8 】

【 表 1 3 】

領域 1-	metD <u>BanI</u>	metD <u>TaqI</u>	meth <u>TaqI</u>
A =	1	1	1
B =	2	1	2
C =	1	1	2
D =	2	2	1
E =	1	2	-
F =	2	1	1
G =	2	2	2

20

領域 2-	E6 <u>TaqI</u>	E7 <u>TaqI</u>	pH131 <u>HinXI</u>	W3D1.4 <u>HindIII</u>
A =	1	2	2	2
B =	2	1	1	1
C =	1	2	1	1
D =	2	1	2	2
E =	2	2	2	1
F =	2	2	1	1
G =	1	2	1	2
H =	1	1	2	2

30

領域 3-	H2.3A <u>TaqI</u>
A =	1
B =	2

領域 4-	EG1.4 <u>HincII</u>	EG1.4 <u>BglI</u>	JG2E1 <u>PstI</u>
A =	1	1	2
B =	2	2	1
C =	2	2	2
D =	1	1	1
E =	1	2	1

40

【 0 0 9 9 】

【表 1 4】

領域	5-	E2.6 <u>MspI</u>	E2.8 <u>NcoI</u>	E4.1 <u>MspI</u>
A =		2	1	2
B =		1	2	1
C =		2	2	2
領域	6-	J44 <u>XbaI</u>	10-1X.610-1X.6 <u>AccI</u> <u>HaeIII</u>	
A =		1	2	1
B =		2	1	2
C =		1	1	2
D =		1	2	2
E =		2	2	2
F =		2	2	1
領域	7-	T6/20 <u>MspI</u>		
A =		1		
B =		2		
領域	8-	H1.3 CE 1.0 <u>NcoI</u> <u>NdeI</u>		
A =		2	1	
B =		1	2	
C =		1	1	
D =		2	2	
領域	9-	J32 <u>SacI</u>	J3.11 <u>MspI</u>	J29 <u>PvuII</u>
A =		1	1	1
B =		2	2	2
C =		2	1	2
D =		2	2	1
E =		2	1	1

10

20

30

(b) 各群で数えた染色体の数 : CF - PI (F) = F 5 0 8 欠失を有する CF - PI 患者からの CF 染色体類 ;

CF - PS (F) = F 5 0 8 欠失を有する CF - PS 患者からの CF 染色体類 ;

CF - PI = CF - PI 患者からの他の CF 染色体類 ;

CF - PS = CF - PS 患者からの他の CF 染色体類 ;

N = キャリアー両親から誘導した正常染色体類。

【 0 1 0 0 】

ほとんどの組換えは領域 1 と 2 および領域 8 と 9 の間に起こることが明らかで、再度、これらの領域間の相対的に長い物理的距離と良好な一致を示していた。より頻度は低い但他の切断点も短距離区間に観察され、それらは、一般に、上記に示した対になった対立遺伝子関連研究によって同定されたホットスポットに対応していた。驚くべき結果として、この F 5 0 8 欠失が、最も頻度が高い CF ハプロタイプである I 群とほとんど独占的に関連していたことが挙げられ、この欠失が CF における主な変異を構成しているという見解を裏付けている。さらに重要であることとして、この CF 染色体の 89% (62 / 70)

50

で検出され、AAハプロタイプ（前記2個の領域6と7に対応している）が前記欠失に隣接しているが、同一群内部で14N染色体類中で全く見られなかった（ $\chi^2 = 47.3$, $p < 10^{-4}$ ）ことである。このF508欠失は、したがって、I群のハプロタイプのコアに関連した共通の配列多形性ではなかった（表5参照）。

【0101】

F508欠失のための特異的オリゴヌクレオチドプローブによって検出されたCF染色体類のひとつは、異なるハプロタイプ群（III群）に属していることが判明した。同一群の他の9個のCF染色体または17N染色体類のいずれもこのプローブにハイブリダイズしなかった。この特異的ハイブリダイゼーション結果は、この染色体に含まれる変異がF508に類似していることを示唆している。組換えまたは遺伝子変換はI群以外のハプロタイプ上における欠失の存在を説明できるメカニズムではあるが、これらの2種のIII群染色体類が再発変異事象、すなわち、グロビン座における^Sおよび^E変異に類似の状況を表わす可能性が高い。これとともに、前記のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション研究の結果およびハプロタイプ解析は、本文に述べた遺伝子座がCF遺伝子であること、および前記の3bp（F508）欠失がCFにおける最も一般的な変異であるという事実を裏付ける。

10

【0102】

3.6 他のCF変異

F508欠失の1個の共通及び1個の稀なCFハプロタイプとの連関によって、本患者群に関連している可能性のある変異事象の数についての洞察がさらに得られた。広範囲のハプロタイプデータに基づき、F508欠失が起こっている2個の元来の染色体類が、表5にも示したように、ハプロタイプ - A A A A A A A - (Ia群)、および - C B A A C B A - (IIIa群)を有しているらしい。この欠失を有している他のI群CF染色体は、おそらく、当初の染色体から誘導した組換え産物類であろう。もし各ハプロタイプ群中のこのCF染色体類が同一起源から誘導されると見なされるならば、3-4個の付加変異事象しか予測されないであろう（表5参照）。しかし、同一群内のCF染色体類の多くは互いに顕著に異なっているので、各群をさらに細かく群別することが可能である。その結果、より多くの独立した変異事象が考えられ、そして、本データは、少なくとも7個の付加的推定変異もまたCF - PI表現型に関連していることを示唆する（表4参照）。CF - PSサブグループを生む変異類は、おそらくさらに不均質であろう。

20

30

【0103】

7個の付加的CF - PI変異は、ハプロタイプ類： - C A A A A A A - (Ib群)、 - C A B C A A D - (Ic群)、 - - - B B B A C - (IIa群)、 - C A B B B A B - (Va群)によって表される。これらの各変異における分子欠損はまだ決定されていないが、これらの変異のいずれも、PCR/ハイブリダイゼーション実験で使用したオリゴヌクレオチド結合部位類に対応する領域に影響を及ぼさないことが明らかである。

【0104】

3.7 腓良好

CF - PSは、食物消化のための腓外分泌機能が良好であるとして臨床的には定義される；しかし、残りの腓酵素活性の消化系におけるレベルは、患者毎に変化する。先のハプロタイプデータは、CF - PIおよびCF - PS患者が異なる変異対立遺伝子の故に存在することを示唆していた。CFにおける根本的生化学的欠損はまだ明らかとなっていないが、CF - PS患者におけるこの残りの腓酵素活性が変異CF遺伝子産物の活性を直接反映している可能性がある。したがって、穏和な（CF - PS）対立遺伝子によって付与された残りの外分泌機能は正常遺伝子産物のそれよりもはるかに低い、ほとんどか全く機能を持たないより重篤な（CF - PI）変異のそれをしのぐ優性表現型を構成するのである。したがって、重篤対立遺伝子を2コピーしか有していない患者のみがCF - PIであり、かつ、1個または2個の穏和な対立遺伝子を有する患者はCF - PSであるのであろう。上記仮説を試験するため、F508欠失を有するCF患者の割合についての情報を利用することができた。重篤な変異は穏和な変異に対して劣性でかつCF対立遺伝子の患

40

50

者群での分布がハーディー・ワインバーグ則 (Hardy - Weinberg law) に従うと想定して、重篤対立遺伝子の頻度が 0.62 であり、穏和对立遺伝子 (M) のそれは 0.08 であると推定できた (表 6 参照)。

【 0 1 0 5 】
【 表 1 5 】

表 6

CF - PI および CF - PS 群解析

	観 測 遺 伝 子 (a)	予 測 頻 度 (b)	観 察 値 (c)	期 待 値 (d)
解 不 全 (PI)	FF	0.459	21	21.1
	FS	0.331	14	15.2
	SS	0.060	4	2.7
	Total	0.850	39	-
解 良 好 (PS)	FM	0.106	15 ^(e)	14.8
	SM	0.038	6	6.2
	MM	0.006		
	Total	0.150	21	

10

20

(a) 対立遺伝子定義 : F = 前記の 3 b p 欠失 (アミノ酸 5 0 8 位におけるフェニルアラニン欠失) ; S = 未解析の重篤変異対立遺伝子 ; M = 未解析穏和对立遺伝子。

(b) CF - PI 変異表現型は、CF - PS 変異表現型に対して劣性であると想定して、3 b p 欠失を含む CF - PI 変異対立遺伝子の頻度を CF 臨床で観察された CF - PI 患者の割合から推定できた [Corey ら、ジャーナル・オブ・ペディアトリックス (J . P e d i a t r .) 1 1 5 : 2 7 4 (1 9 8 9)]、すなわち、(0 . 8 5) = 0 . 9 2。観察された総 CF 群における F の対立遺伝子頻度は 0 . 6 8 (表 3) である ; S の頻度は 0 . 9 2 - - 0 . 6 8 - 0 . 2 4 である ; M の頻度は 1 - 0 . 9 2 - 0 . 0 8 である。各遺伝型の頻度を次に、ハーディー・ワインバーグ則 (Hardy - Weinberg law) を用いて計算した。

30

(c) 各分類の CF - PI および CF - PS 患者の数は、図 1 5 に示したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによって得られた。患者は、我々の連関解析で使用した CF 家族由来であり、さらに、その他に以後の研究からの 1 4 CF - PS 患者 / 家族があった。SM および MM は遺伝型または表現型では識別できないが、それらは、本解析でまとめた。

40

(d) 期待数は、各群内で標準化した後 CF - PI および CF - PS について計算した。適合の ² は、0 . 8 6 であり、d . f . = 3 , 0 . 7 4 < p < 0 . 9 0 である。

(e) この数値は、もし F 5 0 8 欠失が全 CF 染色体中でハーディー・ワインバーグ (Hardy - Weinberg) 平衡にあるならば、期待されるよりも高い (観察値 1 5 対期待値 9 . 6) (² = 6 . 4 8、d . f . = 1 , p < 0 . 0 1 1) 。

【 0 1 0 6 】

CF - PI 患者の大半は F 5 0 8 変異に対してホモ接合 (F) であることが見いだされたので、この変異が重篤対立遺伝子のひとつに対応すると想定することが論理的であった。調べた CF 群における F の観察頻度 (0 . 6 8) を考慮し、残りの重篤対立遺伝子 (S) の頻度を誘導できた。FF , SS , MM , FS , FM および SM 患者の割合を次に計算

50

した。SMおよびMMの各患者は表現型または遺伝型で識別できなかったので、それらを解析でまとめた。表6に示したように、全5群の患者の観察頻度は、この仮説から予測された通りであった。したがって、上記解析から、CF-PIが2個の重篤対立遺伝子の存在によることおよびCF-PS患者が単一の重篤対立遺伝子かまたは2個の穏和な対立遺伝子のいずれかを有しているという我々の見解の強い裏付けが得られる。このモデルは、同様に、CF-PI群よりもCF-PIにおけるF508欠失の低い頻度および1コピーの欠失を有するCF-PS患者の過剰数を説明する。M対立遺伝子によって付与される予測優性表現型を考慮すれば、M対立遺伝子類を有する者を同定するために、CF-PS患者中におけるCF染色体を検討することが必要であった。表7に示したように、70の代表的CF-PS患者の内の5例が1コピーのF508欠失を有している；少なくとも5種の異なるハプロタイプのCF染色体と関連づけることができた。

10

【0107】

【表 16】

表 7 CF-PS 患者および MI を有する家族中における CF 染色体のハプロタイプ

家族#	1	2	3	4	5	6	7	8	9.	CF 対立遺伝子	
(a) CF-PS 個体											
	A	A	A	A	A	A	-	-	A	F (Group Ia)	10
	D	C	B	A	A	C	B	A	A	M (予測) Group IIIb)	
	B	A	A	A	-	A	A	A	A	F (Group Ia)	
	B	C	B	B	-	B	A	C	C	M (予測) Group IIa)	
	A	B	-	A	A	A	A	A	E	F (Group Ia)	
	A	C	-	A	A	A	A	A	A	M (予測) Group Ib)	
	A	C	-	C	-	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	B	A	-	B	-	B	A	A/C	B	M (予測) Group IIa)	20
	D	A	A	A	A	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	F	C	B	A	A	C	B	C	A	M (予測) Group IV)	
	C	C	A	B	B	B/C	A	C	A	M (予測) Group IIa)	
	F	D	A	B	B	B/C	A	C	C	M (予測) Group IIa)	
	B	C	A	B	C	C	A	C	A	M or S (予測), Group Vb)	
	B	B	A	A	A	C	B	A	A	M (予測) Group IIIb)	30
(b) MIを有する家族											
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	F (Group Ia)	
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	F (Group Ia)	
	D	B	A	A	-	A	-	A	A	F (Group Ia)	
	A	D	A	A	-	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	A	E	B	A	A	A	A	A	E	F (Group Ia)	
	B	C	A	A	A	A	A	A	B	S (予測) Group Ib)	40
	A	A	-	A	A	A	A	A	C	F (Group Ia)	
	A	A	-	A	A	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	B	B	-	A	A	A	-	A	B	F (Group Ia)	
	B	A	-	A	A	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	A	A	A	A	A	A	A	A	B	F (Group Ia)	
	A	A	A	A	A	A	A	A	B	F (Group Ia)	

(a) ハプロタイプ定義は表 5 の場合と同様である。

(b) 対立遺伝子の定義は表 6 の場合と同様である : F = F 5 0 8 欠失 ; S = 未解析重篤 50

変異対立遺伝子；M = 未解析穏和変異対立遺伝子。

これらの後者の観察から、CF-PS患者の大半が複合ヘテロ接合体であることの裏付けがさらに得られる。

【0108】

4.0 CFTRタンパク質

図1のDNA配列に関して検討したように、重複しているcDNAクローン類の配列の解析から、分子量168,138ダルトンを有するアミノ酸1480個の未処理ポリペプチドが予測された。以下で説明するように、前記タンパク質における多形性の故に、このタンパク質の分子量は、あるアミノ酸の置換または欠失の可能性のために変化することができる。この分子量は、また、炭水化物単位の付加で変化し、糖タンパク質を形成するであろう。また、前記細胞中の機能的タンパク質が、未処理ポリペプチドに類似であろうと考えられるが、細胞代謝の故に改変されるかもしれない。したがって、本発明は、分子量約170,000ダルトンおよび上皮細胞膜通過(トランスメンブレン)イオン伝導率活性を有することを特徴とする精製された正常CFTRポリペプチドを提供する。この正常CFTRポリペプチドは実質的に他のヒトタンパク質類を全く含んでおらず、上述のDNA配列によって図1の1態様によって、コードされる。このようなポリペプチドは、正常CFTRポリペプチドの免疫または生物活性を示す。以下でも説明するが、このCFTRポリペプチドまたはその断片類は、化学または酵素ペプチド合成によって作製できるかまたは適当な培養細胞系で発現できる。本発明は、また、ヒト上皮細胞における嚢胞性線維症関連活性を特徴とする精製された変異CFTRポリペプチドを提供する。このような変異CFTRポリペプチドは、他のヒトタンパク質を実質的に含まないので、この変異DNA配列によってコードできる。

10

20

【0109】

4.1 CFTRの構造

前記の予測タンパク質の最も特徴的な特性として、それぞれが膜を数回貫通することが可能な1組のアミノ酸残基類とその後に続く共通配列(ATP)結合折りたたみ(NBFs)に類似の配列で構成されている2種の繰り返し単位が存在していることが挙げられる(図11、12および16)。これらの特徴は、哺乳類多剤耐性P-糖タンパク質およびいくつかの他の膜関連タンパク質類のそれに極めて類似しており、したがって、前記予測されたCF遺伝子産物が膜を横切る物質類(イオン類)の運搬に関与しているらしいことおよびこの膜が膜タンパク質スーパーファミリの一員であるらしいことを示唆している。

30

【0110】

図13は、予測CFTRタンパク質の概略モデルである。図13において、円柱は膜を貫通するらせんを示しており、斜線を入れた(hatched)球はNBF類を示している。この点を入れた球は、極性のR領域である。前記分子の各半分における6本の膜を貫通するらせんは、円柱として描かれている。内部の細胞質に対してNBF類は斜線入り球として示されており、スロットは、ヌクレオチドによる流入手段を示している。この2個の半分の結合する大きい極性R領域は、点入り球によって表される。膜通過(トランスメンブレン)セグメント類内部およびR領域表面上の価電された各アミノ酸類は、電荷の符号を有する小円として描かれている。膜円柱に結合する内部および外部ループ類上およびNBF類の領域上における真の電荷は、白色正方形中に含まれている。プロテインキナーゼAまたはCによるリン酸化の部位類は、それぞれ、黒の三角形および白の三角形で示されている。K, R, H, DおよびEは、それぞれ、アミノ酸類であるリシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸の標準的命名法である。

40

【0111】

CFTRタンパク質の予測された膜関連領域のそれぞれは、高度に疎水性でKyteおよびDoolittleのアルゴリズムおよびGarnierら(ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー(J. Mol. Biol.)120,97(1978))のアルゴリズムに従って脂質2重層にまたがること可能な6個のセグメント類から構成されている(図13)。この膜関連領域には、それぞれ、NBF類を含有する大きな親水性領域

50

が続いている。他の公知のヌクレオチド結合タンパク質類との配列整列に基づくと、CFTRにおける推定NBF類のそれぞれは、少なくとも残基150個からなる。CF患者の大半で検出された前記の3bp欠失は、CFTRの第1番目のNBFの最も高度に保存されたセグメント類2個の間に局在している。フェニルアラニン欠失を取り囲む領域といくつかの他のタンパク質類の対応する領域類間のアミノ酸配列同一性から、この領域が機能的に重要であることが示唆される(図16)。通常芳香族側鎖を有するものである疎水性アミノ酸1個が、CFTRタンパク質のF508に対応する位置のこれらのタンパク質類のほとんどに存在している。アミノ酸多形性がDNA多形性の結果として存在できることがわかる。

【0112】

図16は、CFTRの伸長されたNBF類の最も保存されたセグメント類3個の整列と他のタンパク質類の対応する領域類を示している。これらの3個のセグメント類は、CFTRのN末端半分の残基433-473, 488-513, および5432-584およびC末端半分の1219-1259, 1277-1302, および1340-1382から構成されている。厚く線を重ねたところは、類似性最大の領域類を示唆している。ギャップを導入しなくても付加的な一般的相同性が見られる。

【0113】

NBF類のタンパク質の構造および配列保存における全体としての対称性にもかかわらず、予測されたCFTRタンパク質の2個の半分の間の配列相同性が中等度である。このことは図12に示されており、アミノ酸1-1480が各軸上に示されている。同一性斜線の片側の線は、内部類似性の位置を示している。したがって、4組の内部配列同一性が、Lawrenceら[C. B. Lawrence, D. A. Goldman, およびR. T. Hood, プリテン・オブ・マシマティカルバイオロジー(Bull Math Biol.) 48, 569 (1986)]によって適用されたDayhoff点数表を用いて図12に示したように検出でき、これらの内の3つのみが、標準偏差の小さい方のしきい値設定値で明らかである。最も強い同一性は、NBF類のカルボキシル末端における配列類の間にある。配列した66個の残基中、27%が同一で、さらに11%が機能的に類似である。全体的に弱い相同性が、遺伝子複製仮説が提示されている(Grosら、セル(Cell) 47, 371, 1986, C. Chenら、セル(Cell) 47, 381, 1986, Gerlachら、ネイチャー(Nature), 324, 485, 1986, Grosら、モレキュラーセルバイオロジー(Mol. Cell Biol.) 8, 2770, 1988) P-糖タンパク質中においてはるかに高度(>70%)であるのと対照的である。エクソン-イントロン境界の相対的位置における保存の欠如は、CFTRのこのようなモデルに反するとして議論できる(図2)。CFTRのアミノ末端にシグナルペプチドは明らかに存在していないので、最初のトラスメンブラン配列に先行する高度に電荷を帯びた親水性セグメントは、おそらく細胞質の方向を向いているであろう。2組の疎水性ヘリクスは膜を介して3つのトランスバースループを形成していると考えられ、トラスメンブランセグメント7と8との間の領域を除いて、タンパク質全体の配列のうち、外表面に出ている部分はほとんどないことが考えられる。Nグリコシル結合をする可能性のある2つの部位は後の領域に含まれることに着目することが大切である。

【0114】

膜会合領域のそれぞれに上記のNBFが後続する。さらに、高度に電荷を帯びた細胞質ドメインは、予想されるCFTRポリペプチドの中央部に見い出すことができ、このタンパク質の両半分を連結している。このドメインは、R-ドメインと呼ばれ、単一の大きなエクソンによって機能的に限定される。なお、このエクソン中では、241個のアミノ酸のうち69個が、正および負の荷電を交互に繰り返すクラスター中に存在する極性残基である。さらに、プロテインキナーゼA(PKA)によるリン酸化に必要な10個のコンセンサス配列のうち9個、およびCFTRに見られるプロテインキナーゼC(PKC)に対して可能性のある基質領域の7つは、このエクソン中に位置している。

【0115】

10

20

30

40

50

4.2 CFTRの機能

CFTRの性質は、他の膜会合タンパク質との比較から理解される(図16)。哺乳類のp-糖タンパクとの全体的構造類似性に加えて、CFTR中の2つの予想されるドメインのそれぞれは、大腸菌のヘモリシンの単ドメイン構造およびショウジョウバエの白色遺伝子産物に著しく類似している。これらのタンパク質は、ヘモリシン系の溶解ペプチドおよび眼の色素分子の輸送にそれぞれ関与している。大腸菌のビタミンB12輸送系、BtuD、および機能が未知の苔類のクロロプラスト遺伝子も、類似構造のモチーフを有している。さらに、CFTRタンパク質は、グラム陰性菌のペリプラズム溶解輸送系のいくつかと構造的類似性を共有している。なお、そのグラム陰性菌では、トランスメンブラン領域およびATP結合層が、第3の基質結合ポリペプチドと関連して機能する別々のタンパク質に含まれている。

【0116】

CFTR中のトランスメンブラン領域の全構造配列は、最近記載されたウシの脳のアデニレートシクラーゼ、ならびに数種のカチオンチャンネルタンパク質および数種のカチオントランスローケイションATPアーゼに類似している。この位相的分類は、6つのトランスメンブラン領域からなるが、その分類の機能的意義は推測の域を出ない。

【0117】

また、配列を同定する短い領域が、CFTRの想定トランスメンブラン領域と他の膜貫通タンパクとの間で検出されている。興味あることに、CFTRのカルボキシ末端から約50残基に位置する長さ18残基のアミノ酸配列、およびこれらの12位が同一のアフリカ・ツメガエルのrafセリン/スレオニンキナーゼ前癌遺伝子の配列も存在する。

【0118】

最後に、アミノ酸配列の同定(10/13保存残基)は、CFTRの高度に電荷を帯びたRドメイン内の親水性セグメント(701~713位)と、ラットの脳およびウナギの両者にみられるナトリウムチャンネルの最初のトランスメンブランループ直前の領域との間で着目されてきた。CFTRの電荷を帯びたRドメインは、位相的に極めて関連したP糖タンパクとの共有点はなく、2つのタンパク質間で241個のアミノ酸連結ペプチドに大きな相違は明らかでない。

【0119】

つまり、CFTRタンパク質の1次構造の特徴は、それが、CFで影響を受けた組織の上皮細胞におけるイオン輸送の調節と制御への関与に適した性質をもっていることである。2つの領域中で膜へ確実に結合することは、細胞膜の細胞質表面近くの3つの主要な細胞内ドメイン(ヌクレオチド結合層1および2ならびにRドメイン)を配置させるに役立つ。そこで、これらのドメインは、CFTRトランスメンブランセグメントまたは他の膜タンパク質によって形成されたチャンネルを通るイオンの移動を調節する。

【0120】

遺伝子データ、組織特異性、およびCFTRタンパク質の想定された性質の観点から、CFTRがCFに直接起因するとの結論が理に適ったものである。しかし、CFTRが上皮細胞の頂端膜のイオン伝導度の制御に関与するか否かは不明である。

【0121】

CFTRがイオンチャンネル自体として機能することが考えられる。図13に示すように、12個のトランスメンブラン領域のうち10個は、電荷を帯びた側鎖を有する1つ以上のアミノ酸、脳のナトリウムチャンネルに類似の特性、およびGABA受容体塩化物チャンネルのサブユニットを含む。そこで、電荷を帯びた残基は、サブユニットすなわち繰り返し単位ごとに6個の各膜会合ドメインうちの4個、および4個のうち3個に存在する。これらトランスメンブランセグメントの両親媒性によって、これら分子のチャンネル形成能が付与されると考えられる。また、CFTRは、イオンチャンネルではないこともあるが、イオンチャンネル活性の調節に役立つ。後者の仮定を支持する上で、脂質膜中の塩化物チャンネルを再構成し得る、気管および腎臓から得られた精製ポリペプチド[Landry et al, Science 224:1469(1989)]のどれもが、

分子量から判断した場合、CFTRとは考えられない。

【0122】

どちらの場合も、CFTR中にATP結合ドメインが存在することは、ATP加水分解が輸送機能に直接関与しかつ必要であることを示唆する。PKAおよびPKCに対する高密度リン酸化部位、ならびにRドメインにおける荷電残基のクラスターは、両者とも上記の活性の調節機能をはたす。NBF中におけるフェニルアラニン残基の欠失によって、ATPの適切な結合または立体配座の変化が起きなくなることがある。なお、これは一般的にはないことであるが、CF頂端塩化物の伝導回路のPKAまたはPKC媒介リン酸化による活性化に対する悲感受性となって認められる。この想定タンパク質は、いくつかのドメインを含み、他成分分子系の一部として機能することが多い一群のタンパク質に属するので、CFTRは、活性の上皮組織機能またはイオン輸送に無関係の調節にも関与することがある。

10

【0123】

用手法で単離したCF遺伝子(cDNA)を用いれば、CFにおける基本的な生化学的欠陥を限定することができ、そして更に、一般的な上皮細胞のイオン輸送回路の調節を容易にすることができる。したがって、CFTRの想定構造とは無関係に得られた知識とともにこのタンパク質自体の研究からの知見によって、この疾病の改良された治療法の開発の基礎が得られる。こういった研究では後述のように、CFTRタンパク質に対する抗体がつけられてきた。

【0124】

4.3 タンパク質の精製

CFTRタンパク質は、その配列から明らかにされたように、性質に基づいて選択された方法によって選択することができる。例えば、それが膜内在性タンパク質の際立った性質を有するために、それが高度に発現される上皮細胞の膜分画は、確立された方法[J. E. Langridge, et al, Biochim. Biophys. Acts. 751: 318 (1938)]を用いて最初に分離される。これらの膜の周縁タンパク質は、高濃度の塩、高pHまたはジヨードサリチル酸リチウムなどのカオトロピック試薬を用いた抽出によって除去されたものである。次いで、CFTRタンパク質を含む内在性タンパク質のすべては、オクチルグルコシドなどの界面活性剤(Landryら、上掲)、CHAPS[D. J. Berros, et al, J. Biol. Chem. 262: 10613 (1987)]、または類似作用の他の化合物を用いて可溶化される。CFTRのヌクレオチド結合ドメインを利用するとともに、シバクロンブルー[S. T. Thompson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 669 (1975)]を使って、CFTRタンパク質を結合させ、これを界面活性剤安定化混合物に存在する他の内在性タンパク質から除去する。CFTRが糖タンパクであるため、分別レクチンクロマトグラフィーによって更なる精製が可能である[Riordan et al. J. Biol. Chem. 254: 1270 (1979)]。続いて、均質化のための最終的精製が、他の標準的な精製手法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーまたは必要に応じて等電点電気泳動を用いて行われる。また、CFTRタンパク質(もしくはその断片)に対する固定化抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーまたはApplied Biosystems社の「230 HPEC System」のような新型装置を用いた調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動など単一の精製法も利用される。p-糖タンパク[Riordan et al, 上掲]の精製、すなわちヌクレオチド結合輸送・会合膜タンパク質による一般的方法に基づけば、CFTRタンパク質の精製が容易になる。

20

30

40

【0125】

CFTRタンパク質が高度に発現する組織および細胞からの精製法に加えて、上記のようにCF遺伝子(cDNA)を含むベクターで感染させた細胞からCFTRを精製するために類似の手法が用いられる。cDNA配列の修飾型の発現から得られるタンパク質産物を類似の方法で精製する。このように提供されたタンパク質の相同性の範囲には、2次元

50

ゲル電気泳動およびN末端アミノ酸分析などタンパク化学の領域で標準的なものが含まれる。この精製タンパク質は、その2次および3次構造の性質を決定するために用いられ、CFの突然変異型の適切な機能を促進する薬剤の設計に役立つ。タンパク療法で使用するための調製では、有毒と思われる夾雑物質が入らないことが重要である。このタンパク質の疎水性には、操作の全段階で界面活性剤やその他の物質 [V . J . Ambud Kar and P . C . Maloney J . Biol . Chem . 261 : 10079 (1986)] などの両親媒性の化合物が含まれていることを必要とする。

【0126】

5.0 CFのスクリーニング

5.1 DNA診断

ここに記載されたように、主要な突然変異型の知識があれば、キャリアーのスクリーニングおよび出産前の診断を以下のように実施することができる。嚢胞性線維症に対する高リスク集団は、白人である。生殖年齢に達した各白人の女性および/または男性は、彼らがキャリアーであるか否かを判定するためにスクリーニングされることになる（各個人に対して約5%の確率）。両人がキャリアーであれば、彼らは嚢胞性線維症の子供が生まれるリスクが高い夫婦である。リスクの高い夫婦の各子供が嚢胞性線維症にかかる率は25%である。プローブを用いてキャリアーの状態を判定する手法は以下に開示される。

【0127】

正常および突然変異型CF遺伝子のDNA配列に関する1つの大きな応用例は、遺伝子試験、キャリアー検出および出生前診断の領域にある。CF遺伝子の突然変異を有するキャリアー（疾病のキャリアーまたは患者）は、さまざまな手法を使用してDNAレベルで検出することができる。診断に使用されるベノムDNAは、抹消血、尿、唾液、組織生検試料、外科的試料および剖検物質中に存在する細胞など、体内の細胞から得ることもできる。そのDNAは、特異的配列の検出のために直接使用されることもあり、解析に先立ってPCR法 [Saiki et al . Science 230 : 1350 - 1353 (1985) , Saiki et al . Nature 324 : 163 - 166 (1986)] を用いてインビトロで酵素的に増幅されることも可能である。RNAまたはそのcDNA型は、同一の目的のために使用されることもある。このテーマに関する最近の総説は、カスキーの文献 [Science 236 : 1223 - 8 : (1989)] およびランデグレンらの文献 [Science 242 : 229 - 237 (1989)] に提示されてきた。

【0128】

特異的DNAの検出は、特異的オリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション [Wallace et al . Cold Spring Harbour Symp . Quant . Biol . 51 : 257 - 261 (1986)] 、 DNAの直接配列決定法 [Church and Gilbert , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 81 : 1991 - 1995 (1988)] 、制限酵素の使用 [Flavell et al . Cell 15 : 25 (1978) ; Geever et al . Proc . Natl . Acad . Sci . USA 78 : 5081 (1981)] 、変成剤を用いたゲル中での電気泳動的移動度に基づく識別 [Myers and Maniatis , Cold Spring Harbour Symp . Quant . Biol . 51 : 275 - 284 (1986)] 、RNアーゼの保護 [Myers , R . M . , Larin , J . , and T . Maniatis Science 230 : 1242 (1985)] 化学的開裂 [Cottont et al . Proc . Natl . Acad . Sci . USA 85 : 4397 - 4401 , (1988)] およびリガーゼ媒介型検出法 [Landegren et al . Science 241 : 1077 (1988)] などの方法によって行うこともできる。

【0129】

正常または突然変異型配列に特異的なオリゴヌクレオチドは、市販の機器を用いて化学的に合成され、同位体 (^{32}P など) で放射線標識または非放射線 (ビオチンなどの Taq つき) 標識され [Ward and Langer et al . Proc . Natl . Ac

10

20

30

40

50

ad. Sci. USA 78: 6633 - 6657 (1981)], およびドットプロットまたは電気泳動後のゲルからのトランスファーによる膜または固体支持体上で固定化された各DNA試料にハイブリダイズさせられる。これら特異的配列の有無は、オートラジオグラフィーまたは蛍光反応 [Landegren et al. (1989)、上掲] もしくは呈色反応 [Gebeyehu et al. Nucleic Acids Res 15: 4513 - 4534 (1987)] などの方法によって肉眼で観察される。このオリゴヌクレオチドスクリーニング法の実例は、ここに記載されるようなF508欠失の検出に応用されてきた。

【0130】

正常と突然変異型との間の配列の差異は、チャーチとギルバートのDNA直接配列決定法(上掲)によって明らかにされることもある。クローン化DNAセグメントは、特異的DNAセグメントを検出するためにプローブとして使用することもできる。この方法の感受性は、PCR法と組み合わせた場合に大幅に高められる [Wrichnik et al. Nucleic Acids Res. 15: 529542 (1987); Wong et al. Nature 330: 384 - 386 (1987); Stoflet et al. Science 239: 491 - 494 (1988)]。後者の方法では、増幅配列中にある配列プライマーが、2本鎖PCR産物または修飾PCRによって生じる1本鎖鋳型とともに使用される。配列の決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いた従来の方法または蛍光Taqを用いた自動配列決定法によって行われる。

【0131】

配列の変更は、適当な酵素での消化の後に行われる従来のゲルプロットハイブリダイゼーション [Southern, J. Mol. Biol. 98: 503 (1975)] の使用によって明らかにされる偶然の制限酵素認識部位を稀に生じ得る。この部位(正常または突然変異)を有するDNA断片は、サイズの減少または対応する制限酵素断片数の増加によって検出される。ゲノムDNA試料は、適当な制限酵素を用いた処理に先立つPCRによって増幅されることもあり、異なったサイズの断片は、ゲル電気泳動後の臭化エチジウムの存在下UV光のもとで肉眼で観察される。

【0132】

DNA配列の差異に基づく遺伝的試験は、変成剤の有無にかかわらずゲル中でのDNA断片の電気泳動的移動度の変化を検出することによって行うことも可能である。小さい配列の欠失および挿入は、高解像度のゲル電気泳動によって肉眼で観察することができる。例えば、3bpの欠失を有するPCR産物は、変成剤を含有しない8%のポリアクリルアミドゲル上で正常な配列から明らかに区別される。異なった配列組成物のDNA断片は、異なったDNA断片の移動度が比「部分的溶解」温度に従ったさまざまな位置でゲル中での遅れが生じる変成ホルムアミド勾配ゲル上での区別が可能である (Myers、上掲)。さらに、配列の変更、特に小さな欠失は、3bp (F580) 突然変異および他の実験系で検出されるように、非変成ゲル電気泳動におけるDNAヘテロ2本鎖の移動パターンの変化として検出されることもある [Nagamine et al. Am. J. Hum. Genet., 45: 337 - 339 (1989)]。また、単一塩基の置換または他の小変化は、PCRにおける識別プライマーの長さに基づくこともあり得る。例えば、1つの不変プライマーは、突然変異に特異的なプライマーに添加して使用可能である。次いで、正常および突然変異型遺伝子のPCR産物が、アクリルアミドゲル中で別個に検出され得る。

【0133】

特定部位での配列の変化は、RNアーゼの保護 [Myers、上掲]、S1保護 [Berk, A. J., and P. A. Sharpe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1274 (1978)]、化学的開裂法 [Cotton、上掲] およびリガーゼ媒介型検出法 [Landegren、上掲] などの方法によって解明し得る。

【0134】

従来のゲル電気泳動およびプロットハイブリダイゼーション法に加えて、DNA断片は

、個々のDNA試料が膜に固定化されない方法によっても肉眼で観察し得る。このプローブおよび標的配列は双方とも溶液中に存在することがあり、またはそのプローブ配列が固定化されていることもある [Saiki et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6230 - 6234 (1989)]。放射性同位体が関与するオートラジオグラフィ、放射能崩壊の直接検出 (シンチラントの有無にかかわらず)、呈色反応が関与する分光光度法、および蛍光反応が関与する蛍光分析法など、さまざまな方法を使用して特定個人の遺伝子型を同定することもできる。

【0135】

1カ所を超える突然変異がCF遺伝子中に生じていることが予想されるので、マルチブルシステムは、CFキャリアーのスクリーニングおよび特定の突然変異型検出のための理想的なプロトコルである。例えば、複数の特異的オリゴヌクレオチドプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを使用して、起こり得るすべての突然変異を同時に同定することもできる [Chamberlain et al. Nucleic Acids Research 16: 1141 - 1155 (1988)]。この方法には、固定化された配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ [Saiki et al. 上掲] が含まれることもある。

【0136】

5.2 主要な突然変異型の検出

これらの検出法は、羊水細胞および絨毛膜絨毛生検によるか、母体の循環血液から死細胞を分けることによって、出生前の診断に応用することもできる。集団中のCFキャリアーの試験は、共通の疾病に関する大規模な遺伝的試験計画に重要な一環として取り入れることもできる。次いで、この発明の一実施態様によれば、この実施態様に基づく突然変異などの突然変異を検知するDNAセグメント部分、すなわち、F508の欠失の近傍にある部分は、標準的なPCR法 [Science 242: 229 - 237 (1988)] に記された、Landegren, Ulf, Robert Kaiser, C. Thomas Caskey, and Leroy Hoodの総説「DNA診断 - 分子的手法および自動化」]。使用されるDNAセグメント部分は、単一のDNAセグメントまたは異なったDNAセグメントの混合物であってもよいことが示唆される。この方法の詳細な記載は以下の通りである。

【0137】

ヒトまたは胎児からのゲノムDNAの特定領域がスクリーニングの対象となる。こういった特定領域は、オリゴヌクレオチドプライマーC16B (5'GTTTTCCTGGA TTA TG C CT G G G C A C 3') およびC16D (5'GTTGGCATGCTTTG A TT G A C G C T T C 3') によって限定される。この特定領域は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅される。CF患者および彼らの親の培養リンパ芽球または抹消血試料から得られた200~400ngのゲノムDNAを、上記のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた各PCRで使用した。このオリゴヌクレオチドは、販売元が進める方法に従って、Oligonucleotide Purification CartridgesTM (Applied Biosystems社) またはNENSORBTM PREPカラム (Dupont社) を用いて精製した。このプライマーを62℃で45秒間アニーリングし、72℃で120秒 (Taq DNAポリメラーゼ2単位を用いて) かけて伸長させて、Step-Cycleプログラム (1.5分で変換セッティング) を用いたPerkin-Elmer/Cetus自動サーモサイクラー中で28サイクルと7分間の最終サイクルに94℃で60秒間かけて変成させた。

【0138】

PCR産物の部分を1.4%アガロースゲルの電気泳動によって分離し、標準法に従ってZetabindTM (Biorad社) 膜に転写した。50mM Tris-HCl (pH 7.6)、10mM MgCl₂、0.5mMジチオスレイトール、10mMスベルミジン、1mM EDTAおよび30~40μCiの [³²P]ATPを含む10μlの反応液に溶けた10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Pharmacia社) で、図1

10

20

30

40

50

5 (各 10 ng) の 2 つのオリゴヌクレオチドプローブを別々に 37 °C で 20 ~ 30 分間かけて標識した。取り込まれなかった放射能ヌクレオチドを、使用前に Sephadex G-25 のカラムで除去した。ハイブリダイゼーション条件は、温度を 37 °C とした以外は前記 [J . M . Rommets et al . Am . J . Hum . Genet . 43 , 645 (1988)] と同様であった。膜は、5 × SSC を用いて室温で 2 回洗浄し、2 × SSC を用いて 37 °C で 2 回洗浄した (1 × SSC = 150 mM NaCl および 15 mM クエン酸ナトリウム) 。オートラジオグラフィーを室温で一晩実施した。オートラジオグラフィーは、図 15 に示したように、2 つの特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたゲノム DNA のハイブリダイゼーション結果を示す。プローブ C は、正常な DNA 配列を検出し、プローブ F は突然変異型配列を検出する。家族の一人一人から得られたゲノム DNA 試料をポリマーゼ連鎖反応によって増幅させ、産物を 1.4 % アガロースゲルの電気泳動によって分離してから標準法に従って Zetabind (Biorad 社) 膜に転写した。水盲検およびプラスミド DNA、T16 および C16 [それぞれ正常配列 (N) および F508 欠失 (CF) に相当する] を対照として含めた。

10

20

30

40

50

【 0139 】

また、3 bp の欠失はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって見い出された。上記の C16B および C16D プライマーによって生じた PCR を、90 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) 中にて 20 V / cm で 2 時間 8 % ポリアクリルアミドゲルにかけたとき、3 bp の欠失をとまなわない個人、欠失に対してヘテロ型またはホモ型の個人を明確に検出した。さらに、エキストラ DNA バンドは、正常 DNA 鎖と突然変異 DNA 鎖との間のヘテロ 2 本鎖であるが、ヘテロ接合体に着目した。また、PCR 中に形成されたヘテロ 2 本鎖のゲル移動度における類似の変更が、小さな欠失が関与する実験系で報告されている (Nagamine et al . 上掲) 。これら移動度のシフトは、非放射性遺伝的スクリーニング試験の基礎として使用されることもある。

【 0140 】

5.3 CF のスクリーニング法

キャリアーの 70 % だけが、この発明におけるこの特別な実施態様の特異的 F508 プローブを用いて検出可能であることが認識される。したがって、F508 プローブを使って試験された個人がキャリアーでなければ、キャリアーの状態を除くことはできず、彼らに前記のような他の突然変異が生じている可能性がある。しかし、試験された個人とその配偶者の双方が F508 突然変異のキャリアーであれば、彼らが高リスクの高い夫妻となることは当然である。ここに開示したような遺伝子配列は、その他の突然変異型を判定するための基本的な必要条件である。

【 0141 】

出生前の診断は、キャリアースクリーニングの論理的な延長線にある。2 通りのうちのいずれかで、夫妻が嚢胞性線維症の子供をもつリスクがあると見られる。彼らが嚢胞性線維症の子供 1 人をすでにもっているならば、この夫妻はどちらかが、定義によって嚢胞性線維症のキャリアーとみられ、その後から生まれる子供がこの疾患にかかる率は 25 % である。この発明の主要な利点は、家系分析を必要としない点であり、この発明によれば、上記のような遺伝子突然変異スクリーニング法または他の類似の方法を用いて、機能の変化したタンパク質の産生につながる遺伝的突然変異を同定することができる。これは、疾病の子供から前の家系を確認することにはつながらない。上記のように、胎児の DNA 試料、例えば羊水細胞および絨毛膜絨毛検体を得ることができる。次いで、標準的な PCR 法による増幅を、この鋳型 DNA 上で行うことができる。

【 0142 】

両親が F508 欠失をもつキャリアーであることが分かれば、結果の解釈は以下のようなものとなる。正常 (図 15 に示すような非欠失) プローブに対して胎児の DNA がハイブリダイズすれば、この胎児は嚢胞性線維症にかからないであろうが、CF キャリアーである可能性はある (リスクの高い夫妻の 1 人の胎児に対する確率は 50 %) 。この胎児の DNA が F508 欠失プローブとのみハイブリダイズし、正常プローブ (図 15 に示した

ように)とはハイブリダイズしなければ、この胎児は嚢胞性線維症に罹患するであろう。

【0143】

C F 遺伝子におけるこれらの突然変異について、さまざまな一連の特異的方法を用いて、すべての潜在的 C F キャリアーまたは患者に対する完全な診断を行うことができる。3種類の方法を後で十分に記載する。

【0144】

したがって、被験者が C F キャリアーまたは C F 患者であれば、この発明によって測定方法および測定用キットが提供される。すなわち、このスクリーニング法は、スクリーニング対象となる被験者の生体試料を提供する工程、ならびにその生体試料中に、正常な C F 遺伝子、正常な C F 遺伝子産物、突然変異 C F 遺伝子、突然変異 C F 遺伝子産物およびそれらの混合物からなる群より選ばれた少なくとも1つの要素の有無を検出する方法を提供する工程を含む。

10

【0145】

この方法は、例えば図1のDNAにおける異なったDNA断片、またはヒトの第7染色体の異なったDNA配列断片であり、図1のDNA配列のどちらかの側に位置する少なくとも1つ以上のヌクレオチドプローブを含むことによってさらに特徴づけることができる。

【0146】

この発明の一実施態様に従って、スクリーニング法での使用に適し、免疫検定法によって C F 遺伝子の有無をスクリーニングするためのキットは、以下からなる。

20

(a) C F 遺伝子の遺伝子産物に特異的に結合する抗体、(b) その遺伝子産物に対する抗体への結合を検出する試薬、ならびに(c) その抗体および試薬が、その免疫検定法を実施するに有効量存在する。C F 遺伝子の存在を検出するためのキットはまた、ハイブリダイゼーション法によっても提供され得る。

【0147】

このキットは、以下からなる。

(a) C F 遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブ、(b) C F 遺伝子に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出する試薬、ならびに(c) このプローブおよび試薬が、そのハイブリダイゼーション法を実施するに有効量存在する。

【0148】

30

5.4 C F T R を検定する抗体

上記のように、C F T R タンパク質内のエピトープに対する抗体は、このタンパク質の性質に関する徹底的な知見および他の有意義な知見を提供するために作成される。後者の知見は以下からなる。

1. タンパク質が免疫プロット法(ウエスタン法)、その後のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって発現される、細胞および組織中のタンパク質の肉眼での観察を可能とすること。これによって、例えば、オリゴサッカリド鎖およびフォスフェート基などの翻訳後の修飾部分をもった細胞からの影響を含む成熟タンパク質の分子量サイズの推定がなされる。免疫蛍光法および免疫電子顕微鏡法を含む免疫細胞化学的手法を利用でき、細胞膜のタンパク質の細胞質中の局在が確立される。この抗体を利用して、サイズが変化したタンパクの合成を生じる他のいかなる C F 突然変異型を検出する上でもう一つの手法を提供することができる。

40

2. このタンパク質の別のドメインに対する抗体を利用して、細胞膜中でのタンパク質の位相的配列を解明することができる。これによって、薬物療法のための外から投与された調節剤に許容的であるタンパク質のセグメントに関する情報が得られる。

3. このタンパク質のさまざまな部分の構造と機能との関係は、特異的抗体を用いて調べることができる。例えば、細胞中に、トランスメンブラン配列ならびにヌクレオチド結合層の部分および R ドメインを連結させる荷電した各細胞質ループを認識する抗体を導入することができる。タンパク質の機能的パラメータへのこれら抗体の影響を考慮すると、細胞の調節機構の洞察が得られ、C F 患者における欠陥タンパク質の活性を調節する手段が

50

示唆される。

4. 適当な結合能を有する抗体は、そのタンパク質の免疫沈降および免疫親和的精製を可能とする。免疫沈降から、合成ならびにATP結合およびリン酸化を含む翻訳後修飾の特徴が容易に解明される。精製は、タンパク質の構造の研究およびその機能の研究に必要であって、タンパク質療法にも必要である。

【0149】

抗体を調製するために、適切なクローニングビークル中で相当するDNA配列を発現させることによって、CFTRポリペプチドの限定部分を含む融合タンパク質を合成し、一方小さなペプチドを表8に記載された通り化学的に合成した。この融合タンパク質を、例えば、グルタチオン-アガロースのアフィニティークロマトグラフィーによって精製して、このペプチドをキャリアタンパク質(ヘモシアニン)に結合させ、フロインドアジュバントと混合して、ウサギに注射した。2週間間隔でのブースター注射に続いて、ウサギを放血させて血清を分離した。染色された融合タンパク質を図19aに示す。レーン1は非誘導の対照プラスミド、レーン2はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を発現するIPTG誘導の対照プラスミド、レーン3はアフィニティー精製した27キログルトン(kD)のGSTバンド、レーン4は非誘導プラスミド、レーン5は誘導プラスミドであり、レーン6は表8の精製された融合タンパク質#1である。図19では、表8(レーン1および2)の融合タンパク質#5ならびに表8(レーン3および4)の融合タンパク質#2を含むpGETプラスミドで形質転換された細菌からの溶解物のゲル電気泳動を示す。図19bのレーン1は非誘導プラスミドに関するものであるが、レーン2は融合タンパク質#5を発現させる誘導プラスミドに関するものである。図19bのレーン3は非誘導プラスミドに関するものであるが、レーン2は融合タンパク質#2を発現させる誘導プラスミドに関するものである。2匹の異なったウサギの2回目の放血から得られた抗血清でプローブした融合タンパク質#1のイムノプロットを図20に示す。染色は、アルカリフォスファターゼ結合第2抗体を用いて行う[Blake et al. Anal. Biochem. 136:175(1984)]。これら免疫染色の両者は、32kDの融合タンパク質を染色するが、プレ免疫血清は染色しない。図21は、CFTR転写物を高レベルで発現させるT84コロニー癌細胞から分離された、膜中のサイズが約200kDのバンドに対するこれら免疫血清のうちの1つとの反応性を示す。このバンドは、翻訳後修飾前の想定分子量169kDを有するCFTRタンパク質で期待し得るサイズ領域にある。ペプチド#2のLKH複合体で免疫したウサギからの血清を、図22で示されるように純粋なペプチドとLKHの両者に対してスクリーニングした。この図では、Hはヘモシアニンを、P1はペプチド#1を、P2はペプチド#2を示す。ngでドットされたタンパク質またはペプチドの量を示す。この抗血清は、そのペプチドを1ng程度の少量まで検出し、対照タンパク質#1とは全く反応しない。

【0150】

したがって、CFTRタンパク質の部分および配列の短いセグメントに相当するペプチドを含む両融合タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を作成することが可能である。同様に、マウスに表8のペプチド1、2および7のLKH複合体を注射し、CFTRタンパク質のこれらのセグメントに対するモノクローナル抗体を産生させることができる。モノクローナル抗体は、同様にCFTRタンパク質の他のドメインに対しても作成することができる。

【0151】

ポリクローナル抗体の産生に関して、CFTRタンパク質に対するモノクローナル抗体(mAbs)作成用の免疫原は、CFTRポリペプチドの部分または配列の短い(アミノ酸12ないし25個の長さ)セグメントに相当する合成ペプチドを含む細菌の融合タンパク質[Smith et al. Gene 67:31(1988)]。基本的な方法論は、コーラーとミルシュタインのもの[Nature 25:495(1975)]である。

【0152】

BALB/cマウスを、不完全フロインドアジュバントに溶けた純粋な融合タンパク質

10

20

30

40

50

または合成ペプチド500 μ gの腹腔内注射によって免疫する。2回目の注射は14日後に行い、21日後に3回目、そして28日後に4回目の注射を行う。こうして免疫した各動物を、最終の注射から1、2および4週後に解剖する。脾臓を摘出し、その細胞をばらしてから回収し、文献[Gefter et al. Somatic Cell Genetics 3:231(1977)]に従ってSp2/O-Ag14黒色腫細胞と融合させた。この融合混合物を融合細胞の増殖用培地に播種し、融合細胞を、それらが約25%コンフルエンスに達するまで増殖させる。同時に、培養上清に対して、特定のCFTR抗原と反応する抗体の存在を調べる試験を行う。次いで、アルカリホスファターゼ標識抗マウス第2抗体を使って陽性のものを検出する。さらに、陽性の培養穴からの細胞を培地中で増殖させ、更なる試験のために上清を回収し、細胞は凍結保護剤含有培地中で凍結させた。大量のmAbを得るために、産生細胞を動物あたり細胞濃度 5×10^6 で腹腔に注射し、腹水を得る。精製は、文献[Ey et al. Immunochimistry 15:429(1977)]に従ってプロテインGおよびプロテインAアガロースのクロマトグラフィーによって行う。

【0153】

CFTRタンパク質とこれらmAbの反応性は、CFTRタンパク質が発現される上皮細胞から分離された膜のポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびイムノブロット[Towbin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350(1979)]によって確認される。CFTRタンパク質の異なった各ドメインに特異的なモノクローナル抗体の使用してそれら個々の機能を調べることに加えて、その他のmAbは、CFTRタンパク質の正常と突然変異型との間の識別することが可能であるが、鼻粘膜の生検検体「ブルッシュリング(brushings)」[R. De-Lough and J. Rutland, J. Clin. Pathol. 42, 613(1989)]または汗腺を含む皮膚の生検検体など、患者から得られた上皮細胞試料中の突然変異タンパク質を検出するために用いられる。

【0154】

この識別可能な抗体は、アミノ酸位508(例えば、GTIKENIIIFGVSY)にフェニルアラニンを含むペプチドまたはF508を欠く以外同一のペプチド(GTIKENIIIGVSY)で免疫化した何組かの対のマウスからのハイブリドーマを識別的にスクリーニングすることによって得られる。F508欠失が加わったかまたはそれを欠いた患者に存在するCFTRタンパク質の他の突然変異型を認識し得るmAbは、類似のモノクローナル抗体産生法を使って得られる。

【0155】

CFTRタンパク質およびそのセグメントの正常およびCF型に対する抗体は、免疫細胞化学および免疫蛍光光学顕微鏡法ならびに免疫電子顕微鏡法による診断に使用され、CF患者、CFキャリアーおよび非CFキャリアーの人の器官内におけるCFTRの細胞および細胞下分布が示される。

【0156】

CF患者およびCF患者の細胞におけるCFTRタンパク質の活性を促進させることによって、治療面で調節を行うのに抗体が用いられる。こういった調節様式には、多価抗体とCFTRタンパク質分子との架橋による刺激、ならびにインシュリン受容体[O'Brien et al. J. Biol. Chem. 258:846(1983)]、上皮成長因子受容体[Schreiber et al. J. Biol. Chem. 258:846(1983)]などのある種の細胞表面の膜受容体、およびCD4[Veillette et al. Nature, 338:257(1987)]などのT細胞受容体関連分子の刺激が関与する。

【0157】

CFにおいて欠陥CFTRタンパク質を発現する細胞への治療薬の運搬を規定するために抗体が用いられる。この目的には、抗体は、薬剤などの治療薬または正常遺伝子を運ぶリボソーム[Mathay et al. Cancer Res. 46:4904(19

86)]などのピークルに取り込まれる。

【0158】

【表17】

表 8

抗体作成に使用されたCFTR断片

CFTR残基を含む	図13における	10
GAS ^a 融合タンパク質	CFTRドメイン	
1. 204-249	TM3、Ext.2、TMA	
2. 347-698	NBF-1、N末端1/2Rドメイン	
3. 710-757	負電荷のRドメイン中央部	20
4. 758-796	正電荷のRドメインセグメント	
5. 1188-1480	NBF-2をもつC末端ドメイン	
CFTRペプチドを含む		
KLH ^b 複合体		
1. 28-45	細胞質のN末端	30
2. 58-75	細胞質のN末端	
3. 104-117	1番目の細胞外	
4. 139-153	2番目の細胞質	
5. 279-294	3番目の細胞質のN末端	
6. 500-512	NBF-1; F508欠失近傍	40
7. 725-739	荷電したRドメインの中央部	
8. 933-946	5番目の細胞質	
9. 1066-1084	6番目の細胞質	

a 文献 [Smith et al. Gene 67: 31 (1988)] で確認

a 文献 [Smith et al. Gene 67:31 (1988)] で確認されたように、pGEXプラスミド発現ベクター中で、日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) のグルタチオンS-トランスフェラーゼの3'末端に連結したこれら断片をコードする制限酵素切断断片。

b 文献 [Green et al. Cell 28:477 (1982)] に従って、キャリアタンパク質のキーホール・リンペットのヘモシアニン (K L H) にN末端システインを介して結合したペプチド。T Mはトランスメンブラン配列を示す。

【0159】

5.5 RFLP分析

この発明は、ただちに実際的用途が見い出されるCF遺伝子の発見および特徴決定から直接由来する多くの利点を提供する。CFTRのアミノ酸配列から、CFTRが関与し、10
 嚢胞性線維症で欠陥を提示する分子的機構と同様に、このタンパク質の構造および機能の洞察が可能である。この知見によれば、この疾病に対する研究および治療において、いっ
 そうの手段および概念の形成され得る。

【0160】

この発明の用途のうちには、キャリアの検出、DNA診断、家系図調査などが挙げられる。従来のDNAを基準とする遺伝的試験は、疾病のある子供をもった家族およびその
 近親者に対して主に利用されてきた。DNA配列レベルでCF突然変異が知られば、い
 かなる個人の試験も任意に行える。われわれの推定によれば、過去の家系が分からないCF
 F患者の46%は、DNA解析によって正確に判断可能であって、母集団中のCFキャ
 リヤーの68%がF508欠失によって確認できる。20

【0161】

北アメリカの母集団におけるキャリアの頻度を1/20とすれば、例えば、キャリ
 ヤーの状態に関して生殖年令の女性および/または男性のすべてをスクリーニングするこ
 とが妥当である。

【0162】

F508欠失に特異的なプローブを用いたキャリアの検出は、キャリアの70%ま
 で見い出されよう。残りのキャリアは、上記でさまざまなハプロタイプ群に特異的な一
 群のプローブによって検出されよう。F508欠失は全CF突然変異型の約70%を構成
 するので、RFLP分析は、CF患者の家族または近親者に対する直接検出試験を補足す
 るものとして使用が可能である。F508突然変異が起きていないCF患者の約55%が
 われわれのCFリンケージ家族の事後分析に基づいてDNAマーカーJG2E1 (KM1
 9) [Kerem et al. Am. J. Hum. Genet. 44:827-834 (1989); Estivell et al. Genomics 1:257 (1987)]
 から知見が得られるものと予想され、E6 (TaqI) [Kerem et al. 上掲]
 およびJ3.11 (MspI) [Wainright et al. Nature (1985)] も試験された場合、さらに39%の知見が得られるであろう。30

【0163】

すなわち、H2.3 (XV2C-TaqI) [Kerem et al. 上掲; Estivell et al. Nature (1987)], E2.6 (E.9) (MspI)
 [必要に応じて入手可能なプローブ]、E4.1 (Mp6d.9) (MspI) [必要に
 応じて入手可能なプローブ、Estivell et al. Am. J. Hum. Gene
 t. (1989)], J44 (E3.1) (XbaI) [必要に応じて入手可能なプロー
 ブ] およびmetD (BanI) [Spence et al. Am. J. Hum. Gen
 et. (1989); ATCC #40219] が含まれる場合、ほぼすべての親から知見
 が得られることになる。40

【0164】

これらプローブの有用性は、これらが多形の制限酵素切断部位を認識するという事実
 にある。したがって、これらのプローブは一般に、多形部位を介してこれらの配列によっ
 て限定されず、隣接配列の知見に基づいて利用されるので、当該分野の技術者には既に知ら
 40

れているように、問題の領域におけるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を可能とする。

【0165】

例えば、プローブ E2.6 (MspI) は、2つの隣接オリゴマー (5'GTGATCCAGTTTGCTCTCCA3'、および5'GGAAATCACTCTCTTCTGATAT3') によって完全に限定される。MspIの多形性を検出するE2.6PCR産生プローブを使用することによって、MspI部位の有無に応じて、2つの異なった対立遺伝子 (850kbの断片、または490bpおよび360bp断片) が検出されよう。同様に、プローブ J44 (E3.1) (XbaI) は、2つの隣接オリゴマー (5'CAATGTGATTTGGTGAACAATA3'、および5'CTTCTCTCTCTCTAGACAACCTGCAT3') によって完全に限定される。XbaIの多形性を検出するE2.6PCR産生プローブを使用することによって、XbaI部位の有無に応じて、2つの異なった対立遺伝子 (860kbの断片、または610bpおよび250bp断片) が検出されよう。連結されたRFLPは、F508欠失をもたない個人に対するリスクの計算に使用することもできる。一般的なリスクの推定法は、文献 [Beaudet et al. Am. J. Hum. Genet. 44: 319-326] で考察されている。

10

【0166】

出生前診断には、微小絨毛性小腸酵素の分析を行って、DNA診断が不完全な場合に診断の信頼性を高めることもできる。

【0167】

DNA診断は現在、胎児が嚢胞性線維症にかかっているか否かを判定するために使用されているが、歴史的には、特定の両親に確実なキャリアーと同定された1人の嚢胞性線維症児が生まれた後にだけ実施されてきた。しかし、上記のようなキャリアー検出と組み合わせ、キャリアーの夫妻でのすべての妊娠に対してDNA診断を行うことは可能であろう。両親がすでに1人の嚢胞性線維症児をもっていれば、広範なハプロタイプ分析を行うことができ、疑陽性または疑陰性の比率が大幅に減少されよう。

20

【0168】

嚢胞性線維症には臨床的異質なものと多年考えられてきたが、現在では、いわゆる健全な膵臓 (CF-PS) および膵臓不全 (CF-PI) という2分類が登場している。これらの疾病の概念に関連した突然変異の特徴がよく解明されれば、この疾病の臨床的表現形をもった特定の突然変異に結び付けることができる。これによって、各患者の治療が変えられる。したがって、突然変異の特徴から、ある程度まで、患者の診断が予測され、特定の治療方針が定まるであろう。

30

【0169】

6.0 嚢胞性線維症の分子生物学

CFTRが、イオンチャンネル、特にCFにおける機能的欠陥として意味付けられる塩素チャンネルの外向きへの機能を調節し得るとする仮説は、アフリカルメガエルの卵細胞においてインビトロで転写された完全な長さのCFTRmRNAの注入および翻訳によって調べることができる。卵細胞の膜を通過するイオン流の確かな変化は、電位が固定弁で調節されるので、測定することができる。CFTRは内在性卵細胞のチャンネルを調節することができ、またはチャンネルタンパク質の翻訳を規定するために上皮細胞RNAを導入させるためにも必要であり得る。この発明によって提供されるように、正常なCFTRおよび突然変異型CFTRをコードするmRNAの使用によって、これらの実験が可能となる。

40

【0170】

異質細胞系における他の発現様式によっても、構造-機能の関係の解明が容易になる。プラスミド発現ベクターに連結された完全なCFTRのDNA配列は、細胞を感染させるために使用される結果、イオン輸送に対する影響を判定することができる。特定部位で修飾された配列部分とともに正常CFTR配列の一部を有するプラスミド発現ベクターは、調節機能に決定的なCFTRタンパク質の部分を同定するために行われるインビトロでの突然変異実験に使用することができる。

50

【0171】

6.1 DNA配列の発現

このDNA配列は、その遺伝子および産物の発現を理解する研究、ならびに機能的解析、抗体産生および患者の治療のために大量のタンパク質を産生させる研究において操作可能である。この配列の変化は、相対量、組織特異性および機能的特性の面で発現パターンを変えることも変えないこともある。部分的または完全な長さのcDNA配列は、目的とするタンパク質をコードし、修飾または未修飾のものがあり、以下のような細菌の発現ベクターに連結することも可能である。例えば、従来考察されたタンパク質の精製法に従って分離し得る対応のタンパク質の産生のために大腸菌細胞に導入可能なpRIT[Nilsson et al. EMBO J. 4: 1075 - 1080 (1985)]、pGEX[Smith and Johnson, Gene 67: 31 - 40 (1988)]またはpATH[Spindler et al. J. Virol. 49: 132 - 141 (1984)]の各プラスミドである。このDNA配列を本来の配列から他のクローニングベクター、例えば、他のプラスミド、バクテリオファージ、コスミド、動物ウイルス、酵母の合成染色体(YAC)[Burke et al. Science 236: 806 - 812, (1987)]、体細胞、ならびに細菌、苔[Timberlake and Marshall, Science 244: 1313 - 1317 (1989)]、無脊椎動物、植物[Gasser and Fraley, Science 244: 1293 (1989)]および豚[Purcell et al. Science 244: 1281 - 1288 (1989)]などの他の下等および高等生物に移入させることもできる。

【0172】

哺乳類細胞における発現では、このcDNA配列を、サルウイルス(SV)40、pSV2ベクター中のプロモーター[Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 - 2076 (1981)]などの異質プロモーターに連結することもでき、サルのCOS-1細胞[Gluzman, Cell, 23: 175 - 182 (1981)]などの細胞に導入して、一過性または長期にわたって発現させることもできる。キメラ遺伝子構成体の安定な組込みは、ネオマイシン[Southern and Berg, J. Mol. Appln. Genet. 1: 327 - 341 (1981)]およびマイコフェノール酸[Mulligan and Berg, 上掲]を使った生化学的選択によって哺乳類細胞中で維持することもできる。

【0173】

DNA配列の操作は、制限酵素での消化、DNAポリメラーゼを用いた挿入、エキソヌクレアーゼによる欠失、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼによる伸長、合成またはクローン化DNA配列の連結、1本鎖バクテリオファージ中間体またはPCRと組み合わせた特異的オリゴヌクレオチドの使用による部位特異的配列の変更などの標準的な方法で行うことができる。

【0174】

cDNA配列(もしくはそれに由来する部分)またはミニ遺伝子(イントロンおよびそれ独自のプロモーターを有するcDNA)を、従来手法によって真核細胞の発現ベクターに導入される。cDNAの転写を開始および昂進させ、その適切なスプライシングおよびポリアダニル化を保証する調節配列を提供することによって真核細胞中でcDNAを転写させるように、これらのベクターが設計される。サルウイルス(SV)40のプロモーターおよびエンハンサー領域、またはラウス肉腫ウイルスのLTR、ならびにポリアダニル化およびSV40からのスプライシングシグナルを含むベクターは容易に入手できる[Mulligan et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1078 - 2076 (1981); Gorman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6777 - 6781 (1982)]。また、CFTRの内存在性プロモーターも使用できる。cDNAの発現レベルは、この型のベクターを用いて以下のいずれかの方法によって操作することができる。すなわち、さまざまな活性(例えば、バキュロウイルスpAC373は、S. フルギペルダ(Frugiperda)細胞中

で高レベルのcDNAを発現し得る[M. D. Summers and G. E. Smith "Genetically Altered Viruses and the Environment" (B. Fields, et al. 編) vol. 22 no 3 19-328, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Harbour, New York, 1985])を有するプロモーターを使用するか、調節を受け易いプロモーター(例えば、マウスの乳癌ウイルス[Lee et al. Nature 294: 228 (1982)]から得られるグルココルチコイド反応性プロモーターを含むベクターを使用する。cDNAの発現は、レシピエント細胞中で導入後24~72時間モニター可能である(一過性発現)。

【0175】

さらに、ベクターの中には、選択可能なマーカー(gpt [Mulligan et Berg, 上掲])または化学的選択によって細胞を分離させるneo [Southern and Berg J. Mol. Appln. Genet 1: 327-341 (1982)]細菌遺伝子も含まれ、これらは、レシピエント細胞中で安定で長期間ベクターを発現させる。これらベクターは、パピローマ [Sarver et al. Mol. Cell Biol. 1: 186 (1981)]またはエプシュタイン-パール [Sugden et al. Mol. Cell Biol. 5: 410 (1985)]などのウイルスの調節エレメントを用いて、自由に複製するエピトープなどの細胞中で維持することができる。また、このベクターをゲノムDNAに組み込んだ細胞系を産生することもできる。これら両型の細胞系は、遺伝子産物を連続的に産生する。ベクターのコピー数(したがって、cDNAのコピー数も)を増幅させ、高レベルの遺伝子産物を産生し得る細胞系を創製することもできる [Alt et al. J. Biol. Chem. 253: 1357 (1978)]。

【0176】

真核細胞、特にヒトまたは他の哺乳類細胞へのDNAの転移は、現在では一般的方法である。ベクターは、例えば、リン酸カルシウムを用いた沈澱 [Graham and vander Eb, Virology 52: 466 (1973)]、リン酸ストロンチウム [Brash et al. Mol. Cell Biol. 7: 2013 (1987)]、電気穿孔法 [Neumann et al. EMBO J 1: 841 (1982)]、リポフェクション (lipofection) [Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413 (1987)]、DEAEデキストラン法 [McCuthan et al. J. Natl Cancer Inst. 41: 351 (1968)]、マイクロインジェクション法 [Muller et al. Cell 15: 579 (1987)]、プロトプラスト融合法 [Sshfner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 2163]またはペレットガン法 [Klein et al. Nature 327: 70 (1978)]によって、純粋なDNAとしてレシピエント細胞中に導入(移入)される。また、cDNAは、ウイルスベクターを用いた感染によって導入することができる。例えば、レトロウイルス [Bernstein et al. Genetic Engineering 7: 235 (1985)]、アデノウイルス [Ahmad et al. J. Virol 57: 267 (1986)]またはヘルペスウイルスを使ったシステムが開発されている。これら真核細胞の発現系は、CF遺伝子およびCFTR産物に関する多くの研究に使用することができる。これらには、以下のような研究が挙げられる。例えば、(1) 遺伝子が適切に発現されているか否か、および完全な生物学的活性が適切に現れるか否かの測定。(2) CF遺伝子の5'末端に位置する調節エレメント、ならびにCF遺伝子発現の組織制御および一時的制御における調節エレメントの役割の確認。(3) 分離および精製のため大量の正常タンパク質の産生。(4) CFTRタンパク質に対する抗体を調べる測定系または薬剤の有効性を試験する測定系としてCFTRタンパク質を発現する細胞の使用。(5) 正常で完全なタンパク質、タンパク質の特定部分、または天然に存在する突然変異型タンパク質もしくは人工的に産生された突然変異型タンパク質の機能の研究。天然に存在する突然変異型タンパク質はCF患

10

20

30

40

50

者に存在する一方、人工的に産生された突然変異型タンパク質は、部位特異的配列を変更することによって設計可能である。これら後者の研究では、アミノ酸をコードするヌクレオチドを突然変異させることによってタンパク質中の目的とするいかなるアミノ酸残基の機能も調べることができる。

【0177】

上記の方法を用いて、CF遺伝子配列またはその断片を含む発現ベクターを、必要に応じてヒトの細胞、ヒト以外の哺乳類細胞または非哺乳類細胞に導入することができる。細胞の選択は、処理の目的によって決められる。例えば、高レベルのSV40T抗原を産生し、複製のSV40源を含むベクターを複製させるサルのコス細胞 [Gluzman, Cell, 23:175 (1981)] を使用することができる。この細胞を使用して、機能は要求されないので、ベクターがタンパク質産物を発現し得ることを示すことができる。類似の処理は、チャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) またはマウスのNIH3T3線維芽細胞、またはヒトの線維芽細胞もしくはリンパ芽球を用いて行うことができよう。この発明の組換えクロニングベクターは、適切な宿主中での発現に対してこの発明のDNA配列の中から選定されたDNAを含む。DNAをベクターに連結させ、発現の対照配列は、原核または真核細胞の遺伝子ならびにそれらのウイルスおよびそれらの組み合わせの発現を調節するさまざまな配列からなる群より選ばれてもよい。発現対照の配列は、lac系、trp系、tac系、trc系、ファージの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の対照領域、SV40の初期および後期プロモーター、ポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルスおよびサルウイルスから由来するプロモーター、3-フォスホグリセレートキナーゼのプロモーター、酵母の酸性ホスファターゼのプロモーター、酵母の - 対合因子のプロモーター、ならびにそれらの組み合わせからなる群より特に選ばれてもよい。

【0178】

この発明のベクターで感染させることもできる宿主細胞は、大腸菌、シュードモナス、枯草菌、バチルス・ステアロサーモフィリスまたは他の桿菌、他の細菌、酵母、苔、昆虫、マウスもしくは他の動物、植物宿主、またはヒトの組織細胞からなる群より選ばれてもよい。

【0179】

突然変異DNA配列では、類似の系を使用して突然変異産物を発現および産生させることは当然である。

【0180】

6.2 タンパク質機能の考察

CFTRタンパク質の機能を研究するには、レシピエントとしての上皮細胞を使用することが好ましい。適切な機能の発現には、他の経路またはこの種の細胞中でのみ発現される遺伝子産物が必要だからである。使用可能な細胞の例としては、健常者もしくはCF被験者由来のT84 (ATCC#CRL248) もしくはPANC-1 (ATCC#CCL1469) などのヒト上皮細胞系、またはT43不動化CF鼻上皮細胞系 [Jettan et al. Science (1989)]、および初代 [Yanhoskes et al. Ann. Rev. Resp. Dis. 132:1281 (1985)] もしくは形質転換 [Scholte et al. Exp. Cell Res. 182:559 (1989)] ヒト鼻ポリープもしくは気道細胞、膵臓細胞 [Harris and Coleman J. Cell Sci. 87:695 (1987)]、または汗腺細胞 [Collie et al. In Vitro 21:597 (1985)] が挙げられる。CF細胞は、突然変異CF遺伝子の機能的活性を調べるために使用することができる。現在利用可能な機能測定法には、細胞中AMPレベルを上昇させ、塩素チャンネルを活性化する試薬によって、細胞の刺激機能として細胞膜を通過するアニオン (ClまたはI) の移動試薬が含まれる。その他の測定法には、細胞全体もしくは分離さらた膜のパッチクランピングによる細胞電位の変化の測定 [Frizzell et al. Science 233:558 (1986); Welsh and Liedtke Nature 332:467 (1

10

20

30

40

50

986)]、またはコンフルエント細胞の上皮層におけるイオン流の試験 [W i d d i c o m b e e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 2 : 6 1 6 7 (1 9 8 5)] が含まれる。また、CF遺伝子から作成されたRNAは、アフリカツメガエルの卵細胞に注入し得る。この卵細胞はRNAをタンパク質に翻訳するので、この試験が可能となる。その他のより特異的な測定法も開発されているので、感染されたCFTRタンパク質の試験にも使用できる。

【0181】

CFTRとヒトの多剤耐性p-糖タンパクとの間の「ドメイン交換」実験は、CFTRタンパク質の更なる研究で行うことができる。これらの実験では、プラスミド発現ベクターは、これら2つのタンパク質の各部分を含むタンパク質がプラスミドで感染された宿主細胞によって合成されるように、CFTR配列の断片およびDNAリガーゼで連結されたp-糖タンパクの配列断片から通常の方法によって構成される。この手法には、多剤耐性に関連した多くの実験的パラメータが測定可能であるという利点がある。したがって、CFTRのセグメントがこれらパラメータに及ぼす影響力を評価することができる。

10

【0182】

イオン輸送に関するCFTRの影響を調べるこれらの実験は、上皮輸送の分野を分子論的に解明するに役立つであろう。これは、完全な1次構造を示す上皮細胞から第1輸送に関連した分子である。CFTRの知識は、この分野における上皮細胞膜の特徴を分子レベルでより理解するために利用できる。例えば、CFTRに最も類似した分子は、架橋実験によって判明することができる。CFTRの役割がイオンチャンネルを調節することであるという仮説は、必ずしもこのカテゴリーにあてはまらないであろう。CFTR cDNAのクローニングのために構成された大きな高品質のcDNAライブラリーも、共輸送、逆輸送および能動輸送系と同様に他のチャンネルを含む他の輸送系を構成するポリペプチドのcDNAのクローニングに有用であろう。

20

【0183】

6.3 治療法

この発明の組成物を用いたさまざまな生化学的試験の主要な目的は、CF疾患を克服する治療法の開発であって、薬理学的手段といわゆる遺伝子療法の両者が試みられる。

【0184】

薬理学的手段では、CF疾患を克服する薬剤が探求される。最初は、基本的には化合物がランダムにスクリーニングされるので、多くの候補化合物から識別するためのスクリーニングシステムが必要である。この発明は、さまざまな突然変異CF遺伝子を発現する宿主細胞系を提供し、第1段階のスクリーニングシステムとして使用するに最適である。好ましくは、CF発生突然変異型を含むCFTRタンパク質のコードDNA配列からなる発現ベクターを感染させた哺乳類細胞（ヒトの細胞が最も好ましい）を使った細胞培養系スクリーニング法に用いられる。候補にあがった薬剤は、その薬剤の存在下で細胞をインキュベーションし、CFTRに依存するこれらの細胞性機能を測定すること、特にトランスメンブラン電位が固定弁でクランプされるイオン流を測定することによって試験される。しかし、多数の測定試料を扱うには、例えば、イオン感受性蛍光色素の使用に基づいたより簡便な測定法がある。塩素イオン濃度SPQまたはその類似体の変化を検出することが有用である。

30

40

【0185】

また、無細胞系も使用可能である。精製されたCFTRは、人工膜中で再構成され、薬剤が無細胞系でスクリーニング可能となる [A l - A q w a t t , S c i e n c e , (1 9 8 9)] 。

【0186】

第2段階では、動物試験が必要である。マウスなどの動物でCF遺伝子に相対する遺伝子の正常な発現を阻害することによってCFのモデル実験の開発が可能である。動物の胚に遺伝子の突然変異型を導入することによる遺伝子の「ノックアウト」によって、CF様症候群の動物系統が得られる。これによって、第1段階の細胞レベルでのスクリーニング

50

で有望とみられる薬剤の試験が可能である。

【0187】

タンパク質の性質とその機能について更に詳しい知識が得られるので、CFTRタンパク質と相互作用するタンパク質または他の化合物の構造を予測することができよう。これに続いて、このタンパク質と相互作用し、患者の治療になんらかの効果がみられるような薬剤に関するある種の予想が可能となる。すなわち、この種の薬剤は設計が可能であり、CFTRのドメインとの相互作用が要求される仮定の構造に基づいて化学的に合成され得る。この試みは、総説 [Capsey and Delvatte, Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs, Stockton Press, New York, 1988] にまとめられている。これら可能性のある薬剤は、このスクリーニング系で試験されねばならない。

10

【0188】

6.3.1 タンパク質置換療法

CFの治療は、欠陥タンパク質を正常なタンパク質で置換すること、欠陥タンパク質の機能を調節すること、または生理学的異常を矯正するためにCFTRが関与する経路の一つの段階を修飾することによって行うことができる。

【0189】

この欠陥タンパク質を正常なもので置換可能とするには、大量の純粋なCFTRタンパク質を当然得ねばならない。初めに記載したように、純粋なタンパク質は培養細胞系から得られる。疾病に侵された気道にこのタンパク質を運搬するには、細胞膜中にこのタンパク質を容易に取り込ませる脂質含有ビークル中にこれをパッケージングする必要がある。少なくとも肺胞細胞では、当然この機能を発揮する、SAP(Val)またはSAP(Phe)などの界面活性タンパク質のようなタンパク質を取り込むビークルを使用することが妥当といえよう。[PCT特許出願 WO/8803170, Whitsett et al. 1988年5月7日; PCT特許出願 WO89/04327, Benson et al. 1989年5月18日]。このCFTR含有ビークルは、CFの治療に現在使用されている方法である吸入または刺激によって気道に導入される [Boat et al. 上掲]。

20

【0190】

6.3.2 薬物療法

CFTR機能の調節は、治療薬(薬物)を使用して行うことができる。これらは、欠陥CFTRタンパク質を調節する際の有効性がインビトロでモニターされるスクリーニング法を用いてランダムな手段で確認することができる。このスクリーニング法では、そこで欠陥CFTRタンパク質が発現される培養細胞系が用いられる。また、CFTRタンパク質の構造と機能との相関に関する知見、ならびにさまざまなCFTR突然変異タンパク質の特定の欠陥に関する知見 [Capsey and Delvatte, 上掲] から、CFTR活性を調節するために薬物を設計することができる。各突然変異CFTRタンパク質は、特定の調節のために異なった薬物を必要とすることが考えられる。したがって、薬物療法を開始する前に各CF患者で特異的な突然変異を同定する必要がある。

30

【0191】

薬物を設計して、CFTRタンパク質の構造または機能に関して異なった観点で相互作用を起こさせることができる。例えば、薬物(または抗体)は、タンパク質の折り畳み構造に結合して欠陥構造を修正することができる。また、特定の機能をもつ残基に結合して、基質またはコファクターに対する親和性を増す薬剤もある。CFTRが構造的に相同性をもつタンパク質群の要員は、さまざまな薬物と相互作用し、これに結合し、これを輸送するので、薬物関連療法がCFの治療に有効であることが当然予想される。

40

【0192】

有効な薬物の活性を高める第3の機構があるとすれば、細胞中でCFTRの産生または安定性を調節することであろう。CFTR量の増加によって、その欠陥機能の代償となり得る。

50

【0193】

薬物療法は、CFTR機能の発現にとって必要な生理学的または生化学的経路の他の成分との相互作用によってCFTRの欠陥機能を補うためにも利用され得る。これら相互作用は、付随タンパク質の活性の減少または増加に結び付き得る。これら薬物の同定法は、CFTR関連薬物に関して上記で記載したものと類似しているであろう。

【0194】

他の遺伝的疾患では、食餌を改良することによって正常な機能の変化または欠損による状況を改善することができる。これは、フェニルケトン尿症の場合のように代謝産物の除去という形をとる。その疾病では、知的発育の遅れを防ぐため、生後5年間食餌からフェニルアラニンが除かれる。または、アデノシンデアミナーゼ欠損症の場合のように、大量の代謝産物を食餌に添加することもある。この疾病では、食餌に酵素を添加することによって、酵素活性の機能的修復をはかることができる。したがって、CFTR機能の詳細が解明され、CFの基礎的欠陥が定義されれば、食餌の調節によって治療を行うこともできる。

10

【0195】

第2の重要な治療法は、いわゆる「遺伝子療法」であって、これでは、罹患した組織の重要な上皮細胞において正常なタンパク質を好適にコードするように、患者にCF遺伝子の正常なコピーが導入される。気管の気道上皮細胞にこれを到達させる試みが最も重要である。CF遺伝子は、それが取り込まれ、調節機能を与えるに十分なタンパクをコードし得る形態で、これらの細胞に運ばれる。結果として、患者の生命の質と長さが大幅に伸びる。勿論、この遺伝子をすべての罹患した組織に運ぶことが究極の目的である。

20

【0196】

6.3.3 遺伝子療法

CFの療法の一つは、罹患した患者の気道上皮に正常な形のCF遺伝子を挿入することである。呼吸器系がCFにおける罹患率と死亡率の主要な原因であり、膵臓疾患は主要な性質であるが、今日この疾患は酵素の補充によって比較的よく治療されることに着目するのは重要である。したがって、気道を標的とする体細胞の遺伝子療法[総説として、T. Friedmann, Science 244: 1275 (1989)]は、CFに関連した最も重篤な疾患を軽減するであろう。

A. レトロウイルスのベクター。レトロウイルスは、感染効率が高く、安定な組込みおよび発現を有し、体細胞遺伝子療法における実験で好ましいベクターと見られてきた[Orkin et al. Prog. Med. Genet 7: 130 (1988)]。欠点があるとすれば、レトロウイルスの組込みにとって細胞の分裂を要し、その結果、細胞周期にある気道の標的細胞をレトロウイルスの感染に先立って化学的手段によって引き出す必要があることである。完全な長さのCF遺伝子のcDNAは、レトロウイルス中にクローニングすることができ、その内在性プロモーターまたはレトロウイルスのLTRから抜くことができる。ウイルスの投与は気管へのエアロゾル噴霧または滴下によって行うことができよう。

30

【0197】

B. その他のウイルスベクター。利用可能な他の運搬系としては、アデノウイルス[AAV, McLaughlin et al. J. Virol 62: 1963 (1988)]、ウシパピローマウイルス[Rasmussen et al. Methods Enzymol 139: 642 (1987)]またはエプシュタイン-バールウイルスなどのヘルペスウイルス群の一員[Margolske et al. Mol. Cell Biol 8: 2937 (1988)]が挙げられる。これらの基礎的な生物学を知る必要性は大きい。気管支に対する天然の向性を有するウイルスベクター(例えば、呼吸器シンシチアルウイルス、エコウイルス、コクサックウイルスなど)を使用するという考え方も可能である。

40

C. 非ウイルス遺伝子の運搬呼吸器上皮細胞へのCF遺伝子の他の挿入方法は生産的であり、これらの多くは効率が低く、インビトロでの感染、トラスフェクタントの選択、およ

50

び再移植を潜在的に必要とする。これには、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、電気穿孔、およびプロトプラスト融合が含まれる。特に興味深い概念は、リポソームの使用であって、これはインビボでの実施が可能である [Ostro, Liposomes, Marcel - Dekker, 1987]。

DOTMA [Felger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987)] などの合成カチオン性脂質は、効率を高め、この方法の実施を容易にすることもある。

【0198】

6.4 CFの動物実験モデル

CFに対するマウスまたは他の動物実験モデルの作成は、この疾病および可能性のある治療法を理解するに重要である [動物実験モデル作成の一般的総説: Erickson, Am. J. Hum. Genet. 43: 582 (1988)]。現在では、CFの動物実験モデルは全くない。図4に示すように、進化におけるCF遺伝子の保存性 (E4.3およびH1.6に対して交差種のハイブリダイゼーションプロットで示される) は、マウスにおけるオートログス (orthologous) 遺伝子の存在を示し (以降、mCFと標記され、それに相当するタンパク質はmCFTRと標記される)、これは、ヒトのCF遺伝子を用いてマウスのゲノムおよびcDNAライブラリーにクローニングすることが可能である。F508突然変異に類似したマウスの遺伝子中の特定突然変異の形成は表現型を再生産するために最適であるが、mCFTRの完全な不活化は、有効な突然変異といえることが期待される。

A. 突然変異誘起

受精後のマウスのmCF遺伝子の不活化は化学薬品 [例えば, Johnson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3138 (1981)] またはX線突然変異誘起 [Popp et al. J. Mol. Biol. 127: 141 (1979)] によって行われる。次いで、mCFTRの不活化に対する異質の子孫はサザン法によって同定され、用量によって1つの対立遺伝子の欠損が示され、RFLPマーカが評価されるならば、1匹の親の対立遺伝子を受け継がない。この方法は従来、マウスにおいて - グロブリン [Whiney et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1087 (1980)]、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ [McDonald et al. Pediatr. Res. 23: 63 (1988)]、およびカルボニックアンヒドラーゼII [Lewis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 1962 (1988)] の突然変異型を同定するために用いられてきた。

【0199】

B. トランスジェニック

卵細胞インジェクションの標準法を用いて、CFTRまたはmCFTRの正常型または突然変異型をマウスの生殖系に挿入することができる [Camper, Trends in Genetics (1988)]、mCF遺伝子を不活化または置換することが望ましければ、胚の幹 (ES) 細胞 [Capecchi, Science 244: 1288 (1989)] を使って同族の組換え系を利用することができる。

【0200】

1. 卵細胞インジェクション

マウスの生殖系にランダムに位置する正常または異常mCFの1つ以上のコピーの置換は、受精したてのマウス卵細胞の前核へのマイクロインジェクションによって行なうことができ、続いて、疑妊娠の養母に再移植する。新生マウスのインテグランドを、ヒトCF遺伝子配列の存在に対して尾のDNAの解析によってスクリーニング可能である。同一のプロトコルを使って、突然変異mCF遺伝子に挿入することができる。マウスの実験モデルを作成するには、突然変異誘起 (上記参照) または同質的組換え (下記参照) によって、内在性mCFが不活化されているマウスにこのトランスジーンを挿入することを考えるであろう。このトランスジーンは次のいずれかであり得る。a) 完全なゲノム配列で

10

20

30

40

50

あるが、このサイズ(約250kb)では、このトランスジーンを酵母の人工染色体または染色体断片に注入する必要がある。b)天然のプロモーターまたは異質プロモーターを有するcDNA。c)コード領域のすべて、ならびにイントロン、プロモーターおよび最適発現に必要とみられる3'末端隣接エレメントなどの他のさまざまなエレメントを含む「ミニ遺伝子」。

【0201】

2. 初期胚のレトロウイルス感染

この代替の方法は、レトロウイルスベクターにCFTRまたはmCFを挿入し、発生の初期段階にあるマウスの胚に直接感染させ、キメラを作成することである [Soriano et al. Cell 46:19(1986)]。このうちの少なくともいくつかは、生殖系トランスミッションに結びつくであろう。 10

【0202】

3. ES細胞および相同期組換え

胚の幹細胞方法 [Capecchi, 上掲; Capecchi, Trends Gene 5:70(1989)]によって、遺伝子トランスファーを行える確率が得られ、スクリーニングが可能となり、全形成能細胞が生じて、希な相同期組換えを確認できる。一度確認されれば、これらの組換え体を使って、マウスの芽球の注入によってキメラが生じ、得られるマウスの比率は、組換え体系から生殖系への伝達を示す。これがCFに関するマウスの実験モデルの作成に有用であり得るいくつかの方法がある。 20

【0203】

a) mCFの不活化は、neoなどの選択可能なマーカーに隣接するmCFTRエクソンからの配列を含むDNA断片を設計することによって好適に行われる。相同期組換えは、エクソンの中央部でのneo配列の挿入につながり、mCFTRを不活化するのである。この相同期組換え(通常約1/1000)は、個々のクローンのDNA解析[通常PCRを使う。Kim et al. Nucleic Acids Res. 16:8887(1988); Joyner et al. Nature 338:153(1989); Zimmer et al. 上掲p.150]、または異質組換え体に対する負の選択[構成体の末端でHSVTK遺伝子の使用に続いてガンシクロビル(Gancyclovir)選択など、Mansour et al. Nature, 336:348(1988)]によって異質のものから確認される。次いで、この不活化mCFTRマウスは、突然変異CF遺伝子またはF508異常もしくは他のいかなる目的とする突然変異をも含むmCF遺伝子を導入するために使用され得る。 30

【0204】

b) mCFTRの特定の突然変異を1段階で生起させることができる。例えば、5'末端にmCFイントロン9配列、中央部に選択可能なneo遺伝子、および3'末端にイントロン9+エクソン10(F508突然変異のマウス型を含む)を含む構成体を作成することができる。相同期組換えはイントロン9におけるneo遺伝子の挿入および突然変異型でのエクソン10の置換につながる。 40

c) イントロン中の選択可能なneoマーカーの存在がmCF遺伝子の発現を変更させる場合、第2の相同期組換え段階におけるその切り出しが可能である。 40

d) 目的とする突然変異型を含むオリゴヌクレオチドの注入および得られた細胞のPCRによるスクリーニングによってマウスの生殖系に突然変異を誘起させることができる。

【0205】

この発明のこの実施態様は、嚢胞性線維症に関するマウスの実験モデルと主に考えられてきた。図4は、マウスのDNAだけでなく、ウシ、ハムスター、およびニワトリのDNAに対する種間ハイブリダイゼーションを主に示す。したがって、オルソログス遺伝子は他の多くの種類にも存在するものと考えられる。そこで、類似の手法を用いて他の動物実験モデルを作り出すことができよう。この発明の好ましい実施態様がここで詳細に記載されているが、当該分野の技術者には、この発明の精神または添付の請求の範囲の領域から逸脱することなく、それに対してさまざまな変更を行えることが理解されよう。 50

【図面の簡単な説明】

【0206】

【図1A】図1Aは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図1B】図1Bは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図1C】図1Cは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図1D】図1Dは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

10

【図2A】図2Aは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図2B】図2Bは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図2C】図2Cは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図2D】図2Dは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図2E】図2Eは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

20

【図2F】図2Fは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図2G】図2Gは、CF遺伝子の制限地図および前記遺伝子への染色体歩行およびジャンピングに使用された略手段である。

【図3】図3は、前記CF遺伝子を含みかつ取り囲む領域のパルスフィールドゲル電気泳動地図である。

【図3E】図3は、前記CF遺伝子を含みかつ取り囲む領域のパルスフィールドゲル電気泳動地図である。

【図4A】図4Aは、種間ハイブリダイゼーションによる保存されたヌクレオチド配列類の検出を示している。

30

【図4B】図4Bは、種間ハイブリダイゼーションによる保存されたヌクレオチド配列類の検出を示している。

【図4C】図4Cは、種間ハイブリダイゼーションによる保存されたヌクレオチド配列類の検出を示している。

【図4D】図4Dは、プローブ類E4.3およびH1.6の重複するセグメント類の制限地図である。

【図5】図5は、ゲノムおよびcDNAプローブ類を用いたRNAプロットハイブリダイゼーション解析である。繊維芽細胞、気管（正常およびCF）、膵、肝、HL60、T84、および脳RNAへのハイブリダイゼーションを示している。

【図6】図6は、前記CF遺伝子の5'末端におけるE4.3クローニング領域のメチル化状況である。

40

【図7A】図7Aは、cDNAのゲノムDNA断片類への配列を示したCFTR cDNAの制限地図である。

【図7B】図7Bは、cDNAのゲノムDNA断片類への配列を示したCFTR cDNAの制限地図である。

【図8】図8は、CFTR cDNA（クローン10-1）の部分による6.5kbのmRNA転写体への種々のヒト組織中におけるハイブリダイゼーションを示したRNAゲルプロット解析である。

【図9A】図9Aは、EcoRIおよびHindIIIで消化したゲノムRNAへのCFTR cDNAクローン類によるハイブリダイゼーションを示したDNAプロットハイブ

50

リダイゼーション解析である。

【図9B】図9Bは、EcoRIおよびHindIIIで消化したゲノムRNAへのCFTR cDNAクローン類によるハイブリダイゼーションを示したDNAプロットハイブリダイゼーション解析である。

【図9C】図9Cは、EcoRIおよびHindIIIで消化したゲノムRNAへのCFTR cDNAクローン類によるハイブリダイゼーションを示したDNAプロットハイブリダイゼーション解析である。

【図9D】図9Dは、EcoRIおよびHindIIIで消化したゲノムRNAへのCFTR cDNAクローン類によるハイブリダイゼーションを示したDNAプロットハイブリダイゼーション解析である。

10

【図10A】図10Aは、CFTR cDNAの5'および3'末端を特性解析したプライマー延長実験である。

【図10B】図10Bは、CFTR cDNAの5'および3'末端を特性解析したプライマー延長実験である。

【図10C】図10Cは、CFTR cDNAの5'および3'末端を特性解析したプライマー延長実験である。

【図11】図11は、ヒドロパシープロフィールであり、かつ、CFTRの予測2次構造を示している。

【図12】図12は、予測されたCFTRポリペプチド中における内部相同性のドットマトリックス解析である。

20

【図13】図13は、予測されたCFTRタンパク質の略モデルである。

【図14】図14は、CF遺伝子に緊密に連結した制限断片長多形性(RFLP類)の略図であり、その中で、倒立三角形は、F508 3塩基対欠失の位置を示している。

【図15】図15は、正常配列を検出するプローブNおよびCF変異配列を検出するプローブFによるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによるF508変異の検出を示したものである。

【図16A】図16Aは、CFTRの延長NBF類の最もよく保存されたセグメント類と他のタンパク質類の匹敵する領域類との配列を示したものである。

【図16B】図16Bは、CFTRの延長NBF類の最もよく保存されたセグメント類と他のタンパク質類の匹敵する領域類との配列を示したものである。

30

【図17】図17は、F508欠失周辺のDNA配列である。

【図18A】図18Aは、F508欠失におけるDNA配列を示したヌクレオチド配列決定ゲルを示したものである。

【図18B】図18Bは、F508欠失におけるDNA配列を示したヌクレオチド配列決定ゲルを示したものである。

【図19A】図19aは、pGEXプラスミド類によって形質転換された細菌溶解物(JM101)からのタンパク質の電気泳動後クーマシーブルー(Coomassie Blue)染色ポリアクリルアミドゲル類である。

【図19B】図19bは、pGEXプラスミド類によって形質転換された細菌溶解物(JM101)からのタンパク質の電気泳動後クーマシーブルー(Coomassie Blue)染色ポリアクリルアミドゲル類である。

40

【図20】図20は、2匹の異なるウサギから得た免疫前および免疫血清による融合タンパク質#1含有細菌溶解物のイムノプロットである。

【図21】図21は、図20のウサギ#1からの免疫血清を用いたT-84膜類のイムノプロットである。

【図22】図22は、表8のペプチド#2とKLHとの結合物で免疫したウサギ由来免疫前血清および免疫血清で探索したイムノプロットである。

【図23A】図23Aは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図23B】図23Bは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前

50

記アミノ酸配列である。

【図23C】図23Cは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図23D】図23Dは、CF遺伝子のヌクレオチド配列およびCFTRタンパク質の前記アミノ酸配列である。

【図1A】

1 AATTGGAAGCAATGACATCACAGCAGTTCAGAGAAAAGGGTTGAGCGCGCAGGCCCA

61 GAGTAGTAGGCTTTGGCATTAGGAGCTTGAGCCACAGCGCCCTAGCAGGGACCCCA

121 GCCCAGAGACCATGCAGAGTCCGCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTT

181 FSHWTRPILRLRKG YRORLELS D

241 IYQIPSVDSADNLS EKLEHE

301 MDR ELAS KKNPKLINALLRR

361 FFWRFMFYGI FLV LGEVTKA

421 VQPLLIGRI IAS YD PDK E

481 RSI AIY L G I G L L F I V R T L

541 LHPAIFGLHHIGHMQR IAH

601 FSLIYKKITLKLSSRVLDKIS

661 I G Q L V S L L S N N L N K F D E

721 LAHFVWJAPLOVALLMGLI W

781 ELLQASAFCLGFLIVLALF

841 OAGLGRMMHMKYRDORAGKIS

901 ERLVITSEMIENIQSVKAYC

961 WEEAMEKMIENLRDTELEKLT

1021 RKAAYVRYFNS AF F P S G F

1081 VVFLSVLPYAL I N G I I L R K I

1141 FTTFISFCJIVLRMAV T R Q P W

1201 AVQTVWYDLSLGA INKI QD FLQ

1261 KQ E Y K T L E Y N L T T E V V H E N

1321 V T A F W E E G F G E L F E K A K Q N N

【図1B】

1381 NNRKTS N G D D S L F F S N F S L L

1441 G T P V L K D I N F K I E R G Q L L A V

1501 A G S T G A G K I T S L L H M I M G E L E

1561 P S E G K I K H S G R I S F C S O F S W

1621 I M P C T I K E N I I F G V S Y D E Y R

1681 Y R S V I K A C O L E E I D I S K F R E K

1741 D N I V L G E G G I T L S G G O R A R I

1801 S L A N A V Y K D A D L Y L L D S P F G

1861 Y L D V L T E K E I F E S C V C K L M A

1921 N K T R I L V T S K M E H L K K A D K I

1981 L I L H E G S S Y F Y G G T F S E L O N L

2041 O P D F S S K L M G C D S F D Q P S A E

2101 R R N S I L T E T L H R F S L E G D A P

2161 V S W T E T K K Q S F K O T G E F G E K

2221 R K N S I L N P I N S I R K F S I V Q K

2281 T P L Q M N G I E E D S D E P L E R R L

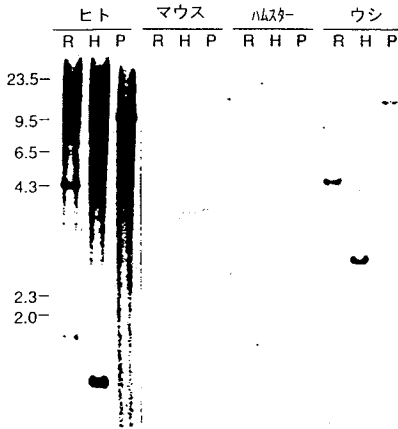
2341 S L V P D S E O G E A I L L P R I S V I S

2401 T G P T L Q A R R R Q S V L N L M T H S

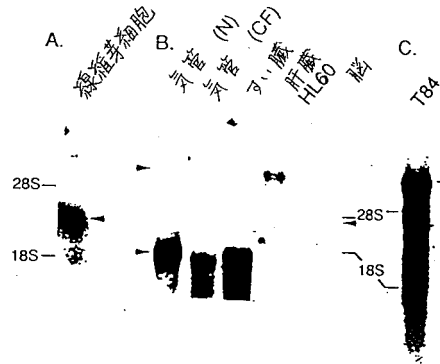
2461 V N Q G O N I H R K T T A S T R K V S L

2521 A P Q A N L T E L D I Y S R R L S Q E T

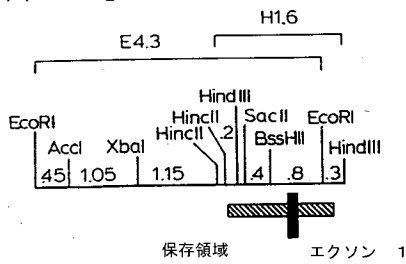
【 図 4 C 】



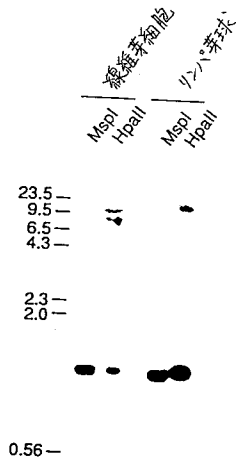
【 図 5 】



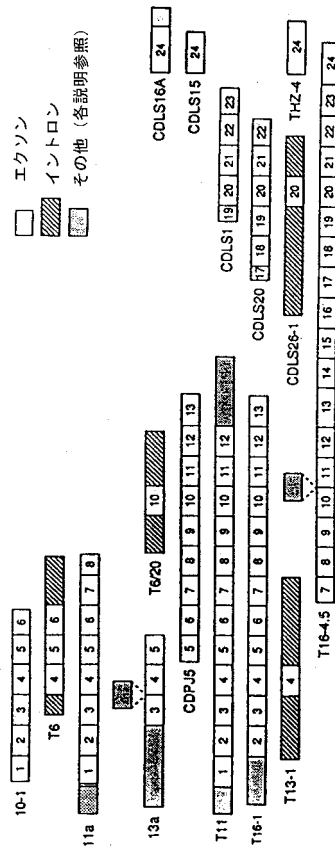
【 図 4 D 】



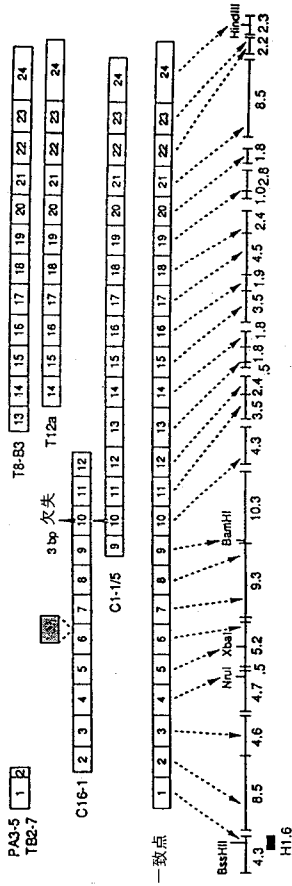
【 図 6 】



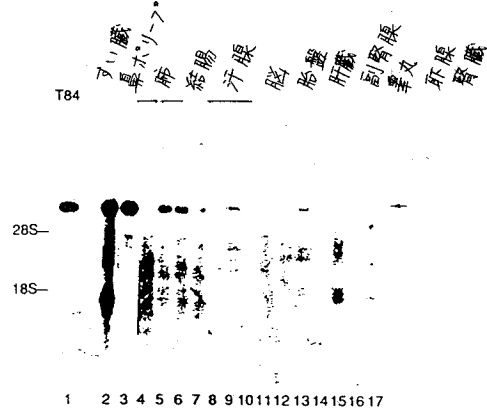
【 図 7 A 】



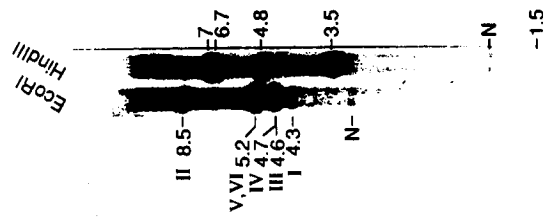
【 図 7 B 】



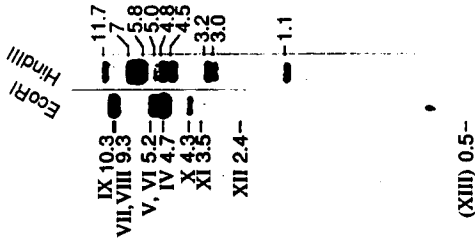
【 図 8 】



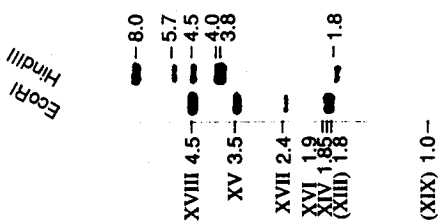
【 図 9 A 】



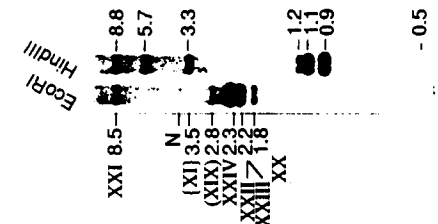
【 図 9 B 】



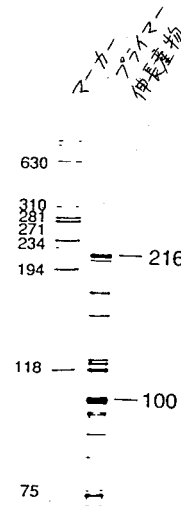
【 図 9 C 】



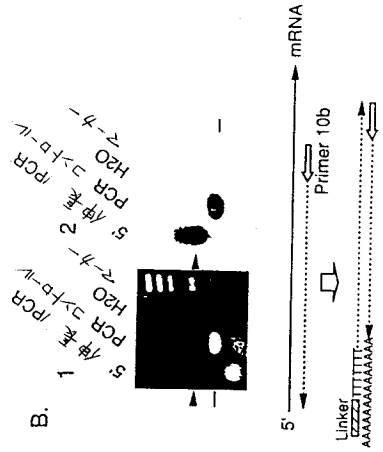
【 図 9 D 】



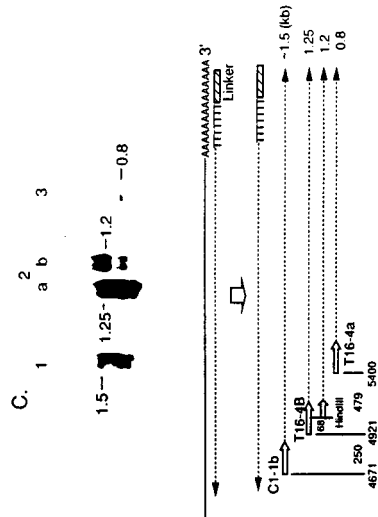
【 図 10 A 】



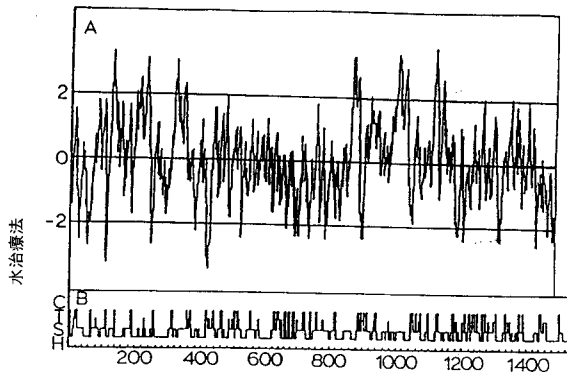
【 図 1 0 B 】



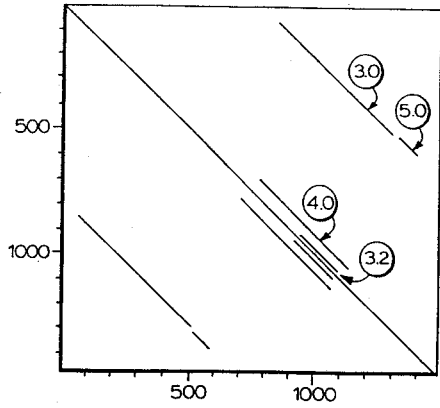
【 図 1 0 C 】



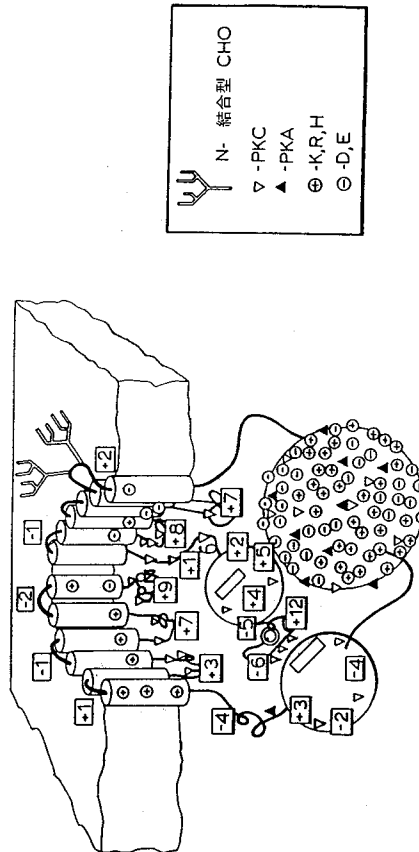
【 図 1 1 】



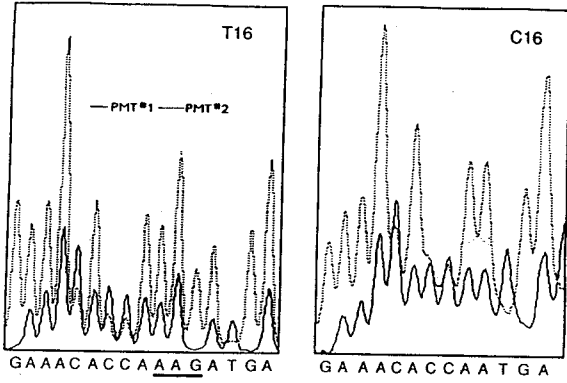
【 図 1 2 】



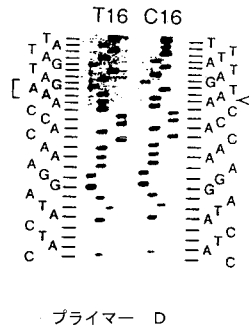
【 図 1 3 】



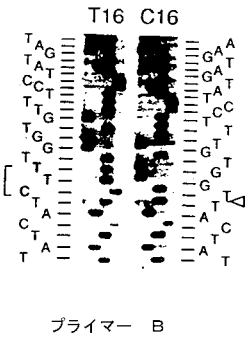
【 図 1 7 】



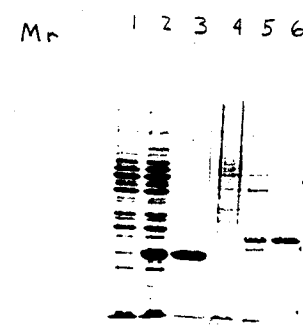
【 図 1 8 B 】



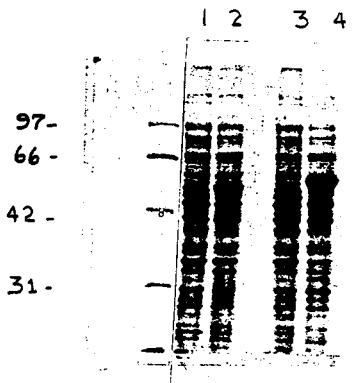
【 図 1 8 A 】



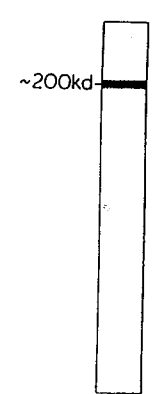
【 図 1 9 A 】



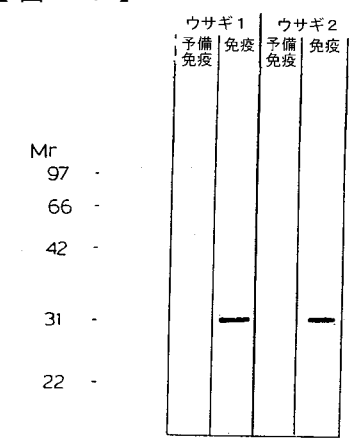
【 図 1 9 B 】



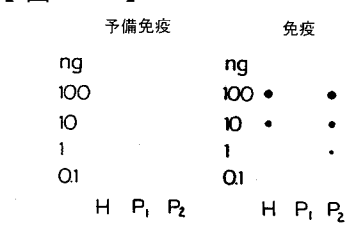
【 図 2 1 】



【 図 2 0 】



【 図 2 2 】



【手続補正書】

【提出日】平成16年3月8日(2004.3.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項29

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項29】

伝達手段が組換えベクターである請求項28に記載の組成物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(71)出願人 501422288

ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシティー オブ ミシガン

The Regents of the University of Michigan

アメリカ合衆国 4 8 1 0 9 - 1 2 8 0 ミシガン州 アン アーバー エス.ステート ストリート 3 0 0 3 ウルヴァリン タワー 2 0 7 1

(74)代理人 100123788

弁理士 宮崎 昭夫

(74)代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74)代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72)発明者 ラブ-チー ツイ

カナダ国 エム9アール 3ゼット4 オンタリオ州 トロント ウィローリッジ ロード 9 4

(72)発明者 ジョン アール. リオルダン

カナダ国 エム5アール 2ケイ7 オンタリオ州 トロント ベドフォード ロード 1 3 7

(72)発明者 フランシス エス. コリンズ

米国 4 8 1 0 3 ミシガン州 アン アーバー スィーオ チャーチ ロード 4 3 4 0

(72)発明者 ジョアンナ エム. ローメンズ

カナダ国 エム2エヌ 1エル1 オンタリオ州 ウィローデイル ボガート アベニュー 1 9 9

(72)発明者 マイケル シー. イアヌツィ

米国 4 8 1 0 3 ミシガン アン アーバー チャーサー ストリート 2 0 7 3

(72)発明者 パト-シェヴァ カーレム

カナダ国 エム6ビー 1ビー1 オンタリオ州 トロント エーピーティー. 8 1 7 エルム
リッジ ドライヴ 1 4 0

(72)発明者 ミッチェル エル. ドラム

米国 4 8 1 0 3 ミシガン州 アン アーバー パインクレスト ストリート 2 4 3 1

(72)発明者 マニュアル バックワルド

カナダ国 エム4ケー 1エム6 オンタリオ州 トロント ベアーボーン アベニュー 1 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA09 GA11 HA12 HA15

4B063 QA12 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR55 QR62 QS25 QS32

专利名称(译)	囊性纤维化相关基因		
公开(公告)号	JP2004208694A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2004029998	申请日	2004-02-05
[标]申请(专利权)人(译)	H.卡尔弗特SC研究开发有限公司 密歇根大学		
申请(专利权)人(译)	H.卡尔弗特SC研究开发有限公司 密歇根州的盐湖城大学董事会		
[标]发明人	ラプチーツイ ジョンアールリオルダン フランシスエスコリンズ ジョアンナエムローメンズ マイケルシーイアヌツツイ バトシェヴァカーレム ミッチェルエルドラム マニユアルバックワルド		
发明人	ラプ-チー ツイ ジョン アール. リオルダン フランシス エス. コリンズ ジョアンナ エム. ローメンズ マイケル シー. イアヌツツイ バト-シェヴァ カーレム ミッチェル エル. ドラム マニユアル バックワルド		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P5/00 A61P11/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K1/22 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/85 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33 /566 G01N33/577		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0306 A61K48/00 A61P1/18 A61P3/00 A61P5 /00 A61P11/00 A61P43/00 B82Y5/00 C07K14/4712 C07K16/18 C07K16/28 C12N15/8509		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K48/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16 /18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33 /566 G01N33/577.B C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15 /00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/GA11 4B024 /HA12 4B024/HA15 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064 /CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065 /AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084 /ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZB21 4C084/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045 /FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	07/396894 1989-08-22 US		

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供筛查和检测CF载体，CF诊断和治疗的技术。 解决方案：克隆并分离和纯化可用于筛选和检测CF载体的CF蛋白基因，CF诊断和治疗。 【选择图】无

非CF(N)染色体的分布

a.		CF 染色体	N 染色体
欠失		69	198
欠有		145	0
計		214	198

b.		CF 染色体	N 染色体
CF-PI	62		24
CF-PS	5		9
未分類	78		16
計	145 (68%)		69 (32%)