

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532029

(P2005-532029A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 48/00	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 P 1/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 1/00</b>	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 1/04</b>	A 6 1 P 3/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-527079 (P2003-527079)  
 (86) (22) 出願日 平成14年9月12日 (2002. 9. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年5月12日 (2004. 5. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/029087  
 (87) 国際公開番号 W02003/023014  
 (87) 国際公開日 平成15年3月20日 (2003. 3. 20)  
 (31) 優先権主張番号 60/318, 733  
 (32) 優先日 平成13年9月12日 (2001. 9. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/403, 254  
 (32) 優先日 平成14年8月13日 (2002. 8. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504396379  
 ファルマシア・アンド・アップジョン・カンパニー・エルエルシー  
 アメリカ合衆国ミシガン州49007, カラマズー, ヘンリエッタ・ストリート 301  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100076691  
 弁理士 増井 忠武  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトのイオンチャンネル

## (57) 【要約】

本発明は、新規なイオンチャンネルポリペプチドおよびそれらを同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。さらに本発明は、それらを製造するための発現ベクター、宿主細胞および方法を提供する。本発明は、ヒトの疾患および症状を処置するのに有用なイオンチャンネルアゴニスト/アンタゴニストの同定方法をも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

SEQ ID NO: 121、132 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドに特異的なエピトープを含むそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

## 【請求項 2】

SEQ ID NO: 121、132 よりなる群から選択される配列に対して少なくとも約 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドに特異的なエピトープを含むそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

## 【請求項 3】

SEQ ID NO: 120、131、135、136 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列、または前記ポリペプチドに特異的なエピトープをコードするそのフラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 4】

SEQ ID NO: 120、131、135、136 よりなる群から選択される配列に対して少なくとも約 90% の同一性を有するヌクレオチド配列、または前記ポリペプチドに特異的なエピトープをコードするそのフラグメントを含む、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 5】

精製されたポリヌクレオチドであって、SEQ ID NO: 120、131、135 および 136 よりなる群から選択されるヌクレオチド配列の相補体に下記のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド:

20

(a) 50% ホルムアミド、1% SDS、1M NaCl、10% デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中、42 で 16 時間のハイブリダイゼーション、そして

(b) 0.1 x SSC および 1% SDS を含む洗浄溶液中、60 で 30 分の洗浄 2 回;

その際、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 120、131、135 および 136 よりなる群から選択される配列と少なくとも 1 残基異なる。

30

## 【請求項 6】

核酸分子が DNA である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 7】

核酸分子が RNA である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

## 【請求項 9】

核酸分子が SEQ ID NO: 120、131、135、136 よりなる群から選択される配列、または前記ポリペプチドに特異的なエピトープをコードするそのフラグメントを含む、請求項 8 に記載の発現ベクター。

40

## 【請求項 10】

ベクターがプラスミドである、請求項 9 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 11】

ベクターがウイルス粒子である、請求項 9 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 12】

ベクターが、アデノウイルス、バキュロウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ならびにそのコンビネーションおよびサブコンビネーションよりなる群から選択される、請求項 11 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 13】

50

核酸分子が、サルウイルス40 (simian virus 40)、マウス乳癌ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの末端反復配列、マロニーウイルス、サイトメガロウイルス最初期プロモーター、エプスタイン・バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、ヒトメタロチオネイン、ならびにそのコンピネーションおよびサブコンピネーションよりなる群から選択されるプロモーターに作動可能な状態で連結している、請求項8に記載の発現ベクター。

【請求項14】

請求項9に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項15】

細胞が細菌細胞である、請求項14に記載の形質転換された宿主細胞。

10

【請求項16】

細菌細胞が大腸菌 (E. coli) である、請求項15に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項17】

細胞が酵母である、請求項14に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項18】

酵母がサッカロミセス・セレビスイエ (S. cerevisiae) である、請求項17に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項19】

細胞が昆虫細胞である、請求項14に記載の形質転換された宿主細胞。

20

【請求項20】

昆虫細胞が S. frugiperda である、請求項19に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項21】

細胞が哺乳動物細胞である、請求項14に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項22】

哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、アフリカミドリザル腎細胞、ヒトHEK-293細胞、およびマウス3T3線維芽細胞よりなる群から選択される、請求項21に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項23】

少なくとも10個のヌクレオチドを含む単離された核酸分子であって、SEQ ID NO: 120、131、135、136よりなる群から選択される配列またはポリペプチド特異的エピトープをコードするそのフラグメントに相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

30

【請求項24】

分子が、SEQ ID NO: 120、131、135および136よりなる群から選択される配列のある領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項23に記載の核酸分子。

【請求項25】

オリゴヌクレオチドが、SEQ ID NO: 120、131、135および136よりなる群から選択される配列の調節領域に対するものである、請求項24に記載の核酸分子。

40

【請求項26】

請求項1～5または25のいずれか1項に記載の核酸分子および許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む組成物。

【請求項27】

請求項8に記載の組換え発現ベクターおよび許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む組成物。

【請求項28】

SEQ ID NO: 121、132よりなる群から選択される配列を含むポリペプチ

50

ドまたは該ポリペプチドに特異的なエピトープを含むそのフラグメントを製造するための、下記の工程を含む方法：

- a) 請求項 8 に記載の組換え発現ベクターを適合する宿主細胞に導入し；
- b) 該ポリペプチドの発現のための条件下で宿主細胞を増殖させ；そして
- c) 該ポリペプチドを回収する。

【請求項 29】

SEQ ID NO：121、132 よりなる群から選択される配列に対して少なくとも約 90% の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは該ポリペプチドに特異的なエピトープを含むそのフラグメントを製造するための、下記の工程を含む方法：

- a) 請求項 8 に記載の組換え発現ベクターを適合する宿主細胞に導入し；
- b) 該ポリペプチドの発現のための条件下で宿主細胞を増殖させ；そして
- c) 該ポリペプチドを回収する。

10

【請求項 30】

宿主細胞を溶解し、そして宿主細胞の溶解物からポリペプチドを回収する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

宿主細胞を溶解せずに培地を精製することによりポリペプチドを回収する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 32】

SEQ ID NO：121、132 よりなる群から選択される配列を含むポリペプチドまたはポリペプチド特異的なエピトープを含むそのフラグメントを含む、単離されたポリペプチド。

20

【請求項 33】

SEQ ID NO：121、132 よりなる群から選択される配列に対して少なくとも約 90% の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはポリペプチド特異的なエピトープを含むそのフラグメントを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 34】

請求項 32 または 33 に記載のポリペプチドおよび許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む組成物。

【請求項 35】

請求項 32 または 33 に記載のポリペプチド上のエピトープに結合する、単離された抗体。

30

【請求項 36】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 35 に記載の抗体。

【請求項 37】

請求項 35 に記載の抗体および許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む組成物。

【請求項 38】

哺乳動物において請求項 32 または 33 に記載のポリペプチドに対する免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答を誘発するのに十分な量の該ポリペプチドを哺乳動物に投与することを含む方法。

40

【請求項 39】

請求項 32 または 33 に記載のポリペプチドを結合する化合物を同定するための、下記の工程を含む方法：

- a) 該ポリペプチドを化合物と接触させ；そして
- b) 該化合物が該ポリペプチドを結合するかを判定する。

【請求項 40】

ポリペプチドへの化合物の結合をタンパク質結合アッセイにより判定する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

タンパク質結合アッセイが、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射性標識競

50

合アッセイ、ファージをベースとする発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈、架橋、相互作用トラップ/2ハイブリッド分析、サウスウエスタン分析、ELISA、ならびにそのコンビネーションおよびサブコンビネーションよりなる群から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸分子を結合する化合物を同定するための、下記の工程を含む方法：

- a) 該核酸分子を化合物と接触させ；そして
- b) 該化合物が該核酸分子を結合するかを判定する。

【請求項43】

核酸分子が、SEQ ID NO：120、131、135および136よりなる群から選択される配列を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

結合をゲルシフトアッセイにより判定する、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

請求項32または33に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための、下記の工程を含む方法：

- a) 該ポリペプチドを化合物と接触させ；そして
- b) 該ポリペプチドの活性が調節されたかを判定する。

【請求項46】

ポリペプチドが、SEQ ID NO：121、132よりなる群から選択されるアミノ酸配列またはポリペプチド特異的エピトープを含むそのフラグメントを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

活性がリガンド結合性である、請求項45に記載の方法。

【請求項48】

リガンドがモノアミンである、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

モノアミンがセロトニンである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

リガンドがアセチルコリンである、請求項47に記載の方法。

【請求項51】

活性が神経ペプチドシグナル伝達である、請求項45に記載の方法。

【請求項52】

SEQ ID NO：121および132から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと該ポリペプチドの結合パートナーとの結合のモジュレーターとして有用な化合物を同定するための、下記の工程を含む方法：

a) 該結合パートナーと該ポリペプチドを含む組成物とを推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ；そして

b) 該結合パートナーと該ポリペプチドの結合を検出し、  
その際、推定モジュレーター化合物の不存在下での結合と比較して、推定モジュレーター化合物の存在下での該結合パートナーと該ポリペプチドの結合の低下および増強は、障害の処置に有用なモジュレーター化合物であることの指標となる。

【請求項53】

SEQ ID NO：121および132から選択される配列に対して少なくとも約90%相同であるアミノ酸配列を有するポリペプチドと該ポリペプチドの結合パートナーとの結合のモジュレーターとして有用な化合物を同定するための、下記の工程を含む方法：

a) 該結合パートナーと該ポリペプチドを含む組成物とを推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ；そして

b) 該結合パートナーと該ポリペプチドの結合を検出し、

10

20

30

40

50

その際、推定モジュレーター化合物の不存在下での結合と比較して、推定モジュレーター化合物の存在下での該結合パートナーと該ポリペプチドの結合の低下および増強は、障害の処置に有用なモジュレーター化合物の指標となる。

【請求項 5 4】

組成物が、表面に前記ポリペプチドを発現する細胞を含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

組成物が、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクションした細胞を含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の引照

本出願は、U.S.C. § 119 (e) のもとで米国仮特許出願 No. 60/403, 254 (2002年8月13日出願) および米国仮特許出願 No. 60/318, 733 (2001年9月12日出願) に基づく優先権を主張する。これらの各書類を本明細書に援用する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一部は、イオンチャンネルをコードする核酸分子、ヒトのこれらのイオンチャンネルの新規ポリペプチド、およびこれらのポリペプチドに結合し、および/またはそれらの活性を調節する化合物をスクリーニングするためのアッセイ法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

イオンチャンネルは、細胞へのイオンの流入流出を調節する "分子ゲート" である。イオンの流れは、学習や記憶に必要なすべての脳細胞連絡において重要な役割を果たす。さらにイオンの流れは、心拍および身体運動を含めた (これらに限定されない) 多くの生理的プロセスにおいて重要である。特にてんかん、統合失調症 (schizophrenia)、アルツハイマー病、片頭痛、不整脈、糖尿病、および発作損傷などの障害においてイオンチャンネルの異常が指摘されている。イオンは、それらの電気化学的勾配に従ってイオンチャンネルを通して流れる (受動輸送)。チャンネルのコアは親水性であり、そのタンパク質の一部である選択的フィルターを含み、これが特定のイオンのみを認識してそれらを通過させる。チャンネルは、それらを通過させるイオンにより命名されている。イオンチャンネルの例にはカルシウムチャンネル、カリウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、塩素イオンチャンネルなどが含まれるが、これらに限定されない。チャンネルの他の構成要素はゲートである。ゲートが開いているときだけ、選択的フィルターが認識したイオンがチャンネルを通過できる。ゲートは多様な刺激に応答して開く。これには膜電位の変化または細胞内外における特定の化学物質の存在が含まれるが、これらに限定されない。チャンネル名にはゲートを制御するものの指示も含まれることが多い: たとえば "電位依存性カルシウムチャンネル"。現在、50以上の異なるタイプのイオンチャンネルが同定されている。

30

40

【0004】

ニューロン間の連絡は、シナプス内への神経伝達物質の放出により達成される。次いでこれらの神経伝達物質がシナプス後ニューロン上の受容体を活性化する。これらの受容体の多くは、ナトリウム、カルシウム、カリウムおよび塩素などのイオンを速やかにニューロン内へ伝達するためのポアを含む。これらのポア、すなわちチャンネルは、一般に神経伝達物質依存性イオンチャンネルタンパク質と呼ばれるタンパク質ファミリーのメンバーであるタンパク質サブユニットから形成されている。このファミリーには下記のものが含まれる: セロトニン 5-HT<sub>3</sub> 受容体; - アミノ酪酸 (GABA) 受容体サブユニット

50

: - 1、 - 3および などを含む；ならびにアセチルコリン受容体タンパク質サブユニット: - 9鎖、 鎖、および - 2鎖を含む。

【0005】

神経伝達物質依存性イオンチャンネルスーパーファミリーには、5-HT<sub>3</sub>、GABA<sub>A</sub>、グルタミン酸、グリシンおよびニコチン性アセチルコリン受容体ファミリーが含まれる。このスーパーファミリーでは、4つの膜貫通ドメインおよび1つの細胞外リガンド結合ドメインをもつサブユニットのホモ-またはヘテロ五量体により機能性受容体が形成される。これらの受容体の膜貫通ドメインは、イオンポアの形成に寄与する。

【0006】

セロトニンは5-ヒドロキシトリプタミンまたは5-HTとしても知られ、神経伝達物質、マイトジェンおよびホルモンとして機能する生物源アミンである(Conley, E. C. (1995) THE ION CHANNELS FACTS BOOK, VOL. I. EXTRACELLULAR LIGAND-GATED CHANNELS, Academic Press, ロンドンおよびサンディエゴ, pp. 426)。セロトニンは多数の受容体を活性化し、その大部分はGタンパク質の活性化に関係する。ただし5-HT<sub>3</sub>受容体は構造的に異なり、神経伝達物質依存性イオンチャンネルスーパーファミリーに属する。5-HT<sub>3</sub>受容体は、中枢および末梢ニューロンにおいてシナプス前およびシナプス後の両方に発現する。シナプス後5-HT<sub>3</sub>受容体はシナプス後ニューロンに興奮性電位を誘発することによりそれらの作用を及ぼし、これに対しシナプス前5-HT<sub>3</sub>受容体はシナプス前ニューロンからの他の神経伝達物質の放出を調節する(Conley, 1995)。5-HT<sub>3</sub>受容体は、痛覚、認知、脳運動ニューロン活性、感覚処理および情動調節において重要な役割をもつ(Conley, 1995)。したがって、5-HT<sub>3</sub>受容体を調節するリガンドまたは薬物は、疼痛、ニューロパシー、片頭痛、認知障害、学習および記憶の欠陥、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、嘔吐、脳ニューロパシー、感覚欠陥、不安、うつ病、統合失調症、および他の情動障害の処置に有用となりうる。

【0007】

ニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)は、ニコチンに対するそれらの親和性、および神経伝達物質依存性イオンチャンネルスーパーファミリーのすべてのメンバーと同様なそれらの構造、すなわちホモ-またはヘテロ五量体により、他のアセチルコリン受容体と区別される。ニコチン性AChRは、骨格筋の神経筋接合部ならびに末梢および中枢ニューロンにみられる。これらの受容体は非選択的カチオンチャンネルを形成し、したがって活性化されると興奮性電流を誘発する。ニコチン性AChRは麻酔薬、鎮静薬および幻覚薬に対する受容体であり(Conley, 1995)、特定のリガンドが動物において学習および記憶の改善を示した(Levin et al., Behavioral Pharmacology, 1999, 10: 675-780)。したがって、ニコチン性AChRを調節するリガンドまたは薬物は、麻酔、鎮静、学習および記憶の改善、認知改善、統合失調症、不安、うつ病、注意欠陥多動性障害、ならびに嗜癮停止または禁煙に有用となりうる。特定の発生段階または疾患を特異的にターゲティングするリガンドまたは薬物の設計を可能にする開発に際しては、AChRサブユニットの発現を調節する。

【0008】

神経伝達物質 - アミノ酪酸(GABA)は、神経伝達物質依存性イオンチャンネルファミリー(GABA<sub>A</sub>)およびGタンパク質結合受容体ファミリー(GABA<sub>B</sub>)を活性化する(Conley, 1995)。GABA<sub>A</sub>受容体は、GABAまたはGABA<sub>A</sub>受容体アゴニストにより刺激されると抑制性または過分極性電流を誘発する塩素イオンチャンネルを形成する。(Conley, 1995)。GABA<sub>A</sub>受容体は、ベンジジアゼピン類、バルビツレート、ピクロトキシンおよびピククリンにより調節される(Conley, 1995)。したがって、GABA<sub>A</sub>受容体を調節するリガンドまたは薬物は、鎮静、不安、てんかん、発作、アルコール嗜癮または離脱、パニック障害、月経前症候群、片頭痛、および中枢または末梢ニューロンの過剰興奮を特色とする他の疾患に有用となりうる

る。GABA<sub>A</sub>受容体の薬理作用は、この受容体のサブユニット組成を変化させることにより影響を受ける。GABA受容体サブユニットは網膜にかなり特異的に発現し(Cutting et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 2673-7)、受容体ホモ多量体の薬理作用はいわゆるGABA<sub>C</sub>受容体のものに類似する(Shimada et al., 1992, Mol. Pharmacol. 41: 683-7)。したがって、サブユニットを含むGABA受容体は視覚異常、黄斑変性症、緑内障その他の網膜障害を処置するためのリガンドまたは薬物を見いだすのに有用なターゲットとなりうる。

#### 【0009】

これらのチャンネルの活性を修飾する化合物は、てんかんならびにパーキンソン病およびアルツハイマー病などの神経変性疾患を含めた神経運動疾患の制御にも有用となりうる。これらのチャンネルの活性を調節する化合物は、心血管性不整脈、発作、ならびに内分泌障害および筋障害を含めた(これらに限定されない)疾患も処置できる。

10

#### 【0010】

したがってイオンチャンネルは、統合失調症、うつ病、不安、注意欠陥多動性障害、片頭痛、発作、虚血、ならびに神経変性疾患、たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、緑内障、ならびに黄斑変性症を含めた多様な障害および欠陥を処置するためのリガンドまたは薬物を見いだすのに有用なターゲットとなりうる。さらに、イオンチャンネルを調節する化合物は、虚血、うつ血性心不全、不整脈、高血圧および再狭窄を含めた心血管疾患の処置にも使用できる。

20

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

##### 発明の概要

本発明は、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。この核酸分子はion-xの少なくとも一部をコードする

#### 【0012】

##### 【化1】

(ここでxは、

31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,

68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91,

92, 93, 94, 95, および 111, 5HT3C, 5HT3C-genomic, 5HT3C-genomic-long, 5HT-3C-cDNA,

ならびに 5HT-3C-cDNA-longである)。

30

#### 【0013】

ある態様において核酸分子は、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする配列を含む。ある態様において核酸分子は、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、およびSEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列に相同な配列、またはそのフラグメントを含む。ある態様において核酸分子は、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列、またはそのフラグメントを含む。

40

50

## 【0014】

配列群を示す場合、そのコンビネーションおよびサブコンビネーションも具体的に含まれることを理解すべきである。たとえば”SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102 ならびに SEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132 および 134 ”という開示については、本発明はそのコンビネーションおよびサブコンビネーションも含むと理解すべきである。これには SEQ ID NO: 52 および 53 ; 52 および 55 ; 52、53 および 55 ; などが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0015】

ある態様によれば、本発明は本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。ある態様においては、ベクターは発現ベクターである。 10

ある態様によれば、本発明は本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。ある態様においては、宿主細胞は発現ベクターを含む。

## 【0016】

本発明は、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、この一部は少なくとも10個のヌクレオチドを含むものである、単離された核酸分子を提供する。

## 【0017】

本発明は、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102 ならびに SEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132 および 134 よりなる群から選択される配列を含むポリペプチドまたはその相同体もしくはフラグメントを製造する方法を提供する。この方法は、それらのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを適合する宿主細胞に導入し、該ポリペプチドの発現のための条件下で宿主細胞を増殖させ、そして該ポリペプチドを回収する工程を含む。 20

## 【0018】

本発明は、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102 ならびに SEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132 および 134 よりなる群から選択される配列を含むポリペプチドまたはその相同体もしくはフラグメント上のエピトープに結合する、単離された抗体を提供する。 30

## 【0019】

本発明は、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102 ならびに SEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132 および 134 よりなる群から選択される配列を含むポリペプチドまたはその相同体もしくはフラグメントに対する哺乳動物の免疫応答を誘発する方法を提供する。この方法は、免疫応答を誘発するのに十分な量の上記ポリペプチドを哺乳動物に投与することを含む。

## 【0020】

本発明は、ion-x を結合する化合物を同定する方法を提供する。この方法は、ion-x を化合物と接触させ、そして該化合物が ion-x を結合するかを判定する工程を含む。ion-x を結合すると同定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これには in vivo モデルが含まれるが、これらに限定されない。 40

## 【0021】

本発明は、ion-x をコードする核酸分子を結合する化合物を同定する方法を提供する。この方法は、ion-x をコードする核酸分子を化合物と接触させ、そして該化合物が核酸分子を結合するかを判定する工程を含む。

## 【0022】

本発明は、ion-x の活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。この方法は 50

、ion-xを化合物と接触させ、そしてion-xの活性が調節されたかを判定する工程を含む。ion-x活性を調節すると同定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これにはin vivoモデルが含まれるが、これらに限定されない。

**【0023】**

本発明は、ion-xの動物相同体を同定する方法を提供する。この方法は、動物の核酸データベースを、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO:123~129、SEQ ID NO:131およびSEQ ID NO:133よりなる群から選択される配列またはその一部によりスクリーニングし、そしてそのライブラリーまたはデータベースの一部がSEQ ID NO:1~SEQ ID NO:51、およびSEQ ID NO:103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO:123~129、SEQ ID NO:131およびSEQ ID NO:133よりなる群から選択される配列またはその一部と相同であるかを判定する工程を含む。

10

**【0024】**

本発明は、ion-xの動物相同体を同定する方法を提供する。この方法は、動物の核酸ライブラリーを、SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO:123~129、SEQ ID NO:131およびSEQ ID NO:133よりなる群から選択される配列を有する核酸分子またはその一部によりスクリーニングし；そしてそのライブラリーまたはデータベースの一部がSEQ ID NO:1~SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO:123~129、SEQ ID NO:131およびSEQ ID NO:133よりなる群から選択される配列またはその一部と相同であるかを判定する工程を含む。

20

**【0025】**

本発明の他の態様は、脳に影響を及ぼす障害またはそれに対する遺伝的素因についてヒト対象を診断するためのスクリーニング方法に関する。この方法は、ヒト対象の核酸をアッセイして、脳に発現する少なくとも1種類のイオンチャンネルのアミノ酸配列、発現または生物活性を変化させる変異の存在または不存在を判定する工程を含む。イオンチャンネルは、SEQ ID NO:52~SEQ ID NO:102ならびにSEQ ID NO:105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択されるアミノ酸配列またはその対立遺伝子バリエーションを含む。障害または素因の診断は、その変異の存在または不存在から行われる。核酸中にイオンチャンネルのアミノ酸配列、発現または生物活性を変化させる変異が存在することは、その障害を発症するリスクが高いことと相関する。

30

**【0026】**

本発明はさらに、ヒト患者におけるion-x性精神障害遺伝子型をスクリーニングする方法に関する。この方法は、ion-xの対立遺伝子に対応する配列を含む核酸を含有する生物試料を患者から得る工程を含む。そのion-x対立遺伝子中に1以上の変異が存在すると、精神障害遺伝子型の指標が検出されたことになる。ある態様において、精神障害には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：統合失調症、情動障害、ADHD/A DD（すなわち注意欠陥多動性障害/注意欠陥障害）、ならびに神経障害、たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、片頭痛、および老年性痴呆、ならびにうつ病、不安、双極性疾患、てんかん、神経炎、神経衰弱症、ニューロパシー、ノイローゼなど。

40

**【0027】**

本発明は、精神障害またはそれに対する遺伝的素因を診断するためにヒト対象をスクリーニングするキットを提供する。このキットには、ヒトion-x遺伝子における多型を同定するためのプローブとして有用なオリゴヌクレオチドが含まれる。このオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド付加、ヌクレオチド欠失またはヌクレオチド置換よりなる群から

50

選択される1つの配列相異以外は野生型ヒト *ion-x* 遺伝子配列またはコード配列と同一または相補的である配列中の6～50個のヌクレオチドを含む。このキットには、オリゴヌクレオチドと共に包装された媒体も含まれる。この媒体には、精神障害またはそれに対する遺伝的素因と相関する多型を同定するための情報が含まれ、その多型は上記オリゴヌクレオチドをプローブとして用いて同定できる。

#### 【0028】

本発明はさらに、精神障害と相関するイオンチャンネル対立遺伝子バリエーションを同定する方法に関する。この方法は、精神障害を伴うと診断された患者からの、またはその患者の遺伝的祖先もしくは子孫からの核酸を含有する生物試料を用意し、その核酸中において脳に発現するイオンチャンネルにおける1以上の変異の存在を検出する工程を含む。イオンチャンネルは、SEQ ID NO: 52～SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択されるアミノ酸配列またはその対立遺伝子変異体を含む。核酸は、*ion-x* をコードする遺伝子または複数の遺伝子に対応する配列を含む。1以上の変異が検出されると、精神障害と相関する対立遺伝子バリエーションの指標となる。

10

#### 【0029】

本発明はさらに、精神障害を伴うヒトからの *ion-x* の対立遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含む、精製されたポリヌクレオチドに関する。このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1～SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123～129、SEQ ID NO: 131またはSEQ ID NO: 133の相補体に下記のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする：(a) 50%ホルムアミド、1% SDS、1M NaCl、10%デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で16時間のハイブリダイゼーション、そして(b) 0.1x SSCおよび1% SDSを含む洗浄溶液中、60℃で30分の洗浄2回。そのヒトの *ion-x* アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 52～SEQ ID NO: 102およびSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132または134と少なくとも1残基異なる。

20

#### 【0030】

本発明は、*ion-x* の生物活性のモジュレーターを同定するための方法であって、*ion-x* を発現する細胞を推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ、そして細胞における *ion-x* の生物活性を測定する工程を含む方法をも提供する。推定モジュレーター化合物の不存在下と対比して存在下での *ion-x* の生物活性の低下および増強は、生物活性のモジュレーターの指標となる。*ion-x* 活性を調節すると同定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これには *in vivo* モデルが含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0031】

本明細書中で用いるイオンチャンネルの“生物活性”という用語は、そのイオンチャンネルの天然活性を表わす。イオンチャンネルの活性には、特定の化合物を結合する能力またはそれにより影響される能力、およびイオンを膜の一方側から他方側へ輸送する能力が含まれるが、これらに限定されない。

40

#### 【0032】

本発明はさらに、精神障害の処置に有用な化合物を同定する方法を提供する。この方法は、*ion-x* を含む組成物と *ion-x* を結合すると推定される化合物とを接触させる工程を含む。*ion-x* と *ion-x* を結合すると推定される化合物との結合を検出する。*ion-x* を結合すると同定された化合物は、精神障害の処置に有用な候補化合物である。

#### 【0033】

本発明はさらに、*ion-x* と *ion-x* の結合パートナーとの結合のモジュレーター

50

として有用な化合物を同定する方法を提供する。この方法は、結合パートナーとion-xを含む組成物とを推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ、そして結合パートナーとion-xの結合を検出する工程を含む。推定モジュレーターの不存在下での結合と比較して、推定モジュレーターの存在下での該結合パートナーとion-xの結合の低下および増強は、精神障害の処置に有用なモジュレーター化合物の指標となる。

#### 【0034】

本発明は、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列の少なくとも一部を含み、この一部は少なくとも10個のヌクレオチドを含むものである、キメラ受容体を提供する。

10

#### 【0035】

これらおよび他の本発明の態様を以下にさらに詳細に記載する。

##### 好ましい態様の詳細な説明

本発明は特に、ヒトのイオンチャンネルまたはその一部をコードする単離および精製されたポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、これらのベクターで形質転換した宿主細胞、イオンチャンネルおよびサブユニットの調製方法、前記ポリヌクレオチドおよびベクターの使用法、単離および精製されたイオンチャンネルおよびサブユニット、イオンチャンネル活性を調節する化合物のスクリーニング方法、ならびにイオンチャンネル活性を調節する化合物を提供する。

20

#### 【0036】

##### 定義

本明細書全体において種々の定義を行う。大部分の語は、当業者がそれらの語に適用している意味をもつ。以下においてまたは本明細書の他の箇所において特別に定義する語は、本発明に関して提示した場合、全体として当業者が一般に理解している意味をもつ。

#### 【0037】

本明細書中で用いる句"イオンチャンネル"は、膜を通してイオンを移動させるチャンネル全体、およびそのチャンネルを構成するサブユニットポリペプチド鎖を表わす。本発明のイオンチャンネルはリガンド依存性であるので、これらのイオンチャンネルは"受容体"とも呼ばれる。当業者はイオンチャンネルがサブユニットからなることを認識しているであろう。本明細書中で用いる用語"サブユニット"はイオンチャンネルのいずれかの構成部分を表わし、これにはサブユニットその他の関連サブユニットが含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0038】

本明細書中で用いられ、当技術分野で理解されている"合成された"は、酵素によるものではなく純粋に化学的な方法で製造されたポリヌクレオチドを表わす。したがって"全"合成DNA配列は全体が化学的方法で製造されたものであり、"部分"合成DNAは得られたDNAの一部のみが化学的手段で製造されたものを含む。

#### 【0039】

用語"領域"は、生体分子の一次構造の物理的に連続した部分を意味する。タンパク質の場合、領域はそのタンパク質のアミノ酸配列の連続部分により規定される。

40

本明細書において用語"ドメイン"は、生体分子の構造部分であって、その生体分子の既知の機能または推定機能に関与する部分を表わすものと定義される。ドメインは領域またはその一部と同一の広がりをもって(c o - e x t e n s i v e)いてもよい;ドメインは、生体分子の特定領域の全部または一部のほかに、その特定領域と区別される部分を含むこともできる。イオンチャンネルドメインの例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない:細胞外(すなわちN末端)ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン(すなわちC末端);これらは同様な名称をもつイオンチャンネル領域と同一の広がりをもっている;ならびに隣接する膜貫通セグメントを連結する各ループセグメント(細

50

胞外ループおよび細胞内ループの両方)。

【0040】

本明細書中で用いる用語「活性」は、測定可能である多様な指標であって、直接または間接結合を示唆または表示するもの；応答に影響を及ぼすもの、すなわちある暴露または刺激に応答する測定可能な作用をもつものを表わす。これには、たとえば本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを直接結合することについての化合物の親和性が含まれる。活性は、ある刺激または事象の後の下流の酵素活性、ならびに下流のメッセンジャー、たとえば $K^+$ イオン、 $Ca^{2+}$ イオン、 $Na^+$ イオン、 $Cl^-$ イオン、サイクリックAMPおよびリン脂質を測定することによっても判定できる。たとえば、活性はイオンフラックスを測定することによっても判定できる。本明細書中で用いる用語「イオンフラックス」には、イオン電流が含まれる。活性は、電極もしくは電圧感受性色素を用いて膜電位の変化を測定し、または神経もしくは細胞の活性、たとえば活動電位の持続時間もしくは周波数、刺激作用電位の閾値、長期増強もしくは長期阻害を測定することによっても判定できる。

10

【0041】

本明細書中で用いる用語「タンパク質」は、タンパク質の全長および部分フラグメントを含むものとする。本明細書において用語「タンパク質」は、「ポリペプチド」と互換性をもって使用できる。したがって、本明細書中で用いる用語「タンパク質」には、ポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチドまたはアミノ酸配列が含まれる。

【0042】

本明細書中で用いる用語「キメラ受容体」は、1種類より多いタイプの受容体の一部を含む受容体を表わすものとする。限定ではない例としてキメラ受容体は、 $\alpha 9$ ニコチン性アセチルコリン受容体のポア形成性膜貫通ドメインおよび $\alpha 10$ ニコチン性アセチルコリン受容体の細胞外ドメインを含むものであってもよい。本発明のキメラ受容体は関連受容体のハイブリッドに限定されない；キメラ受容体はたとえば $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体のポア形成性膜貫通ドメインおよびGABA受容体の細胞外ドメインを含むこともできる。キメラ受容体は、既知の野生型受容体の一部および人工受容体の一部を含むこともできる。

20

【0043】

本明細書中で用いる用語「抗体」は、完全な無傷の抗体、そのFabフラグメント、および $F(ab)_2$ フラグメントを表わすものとする。完全な無傷の抗体には、モノクローナル抗体、たとえばネズミモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびファージディスプレイにより同定した組換え抗体が含まれる。

30

【0044】

本明細書中で用いる用語「結合」は、2つのタンパク質、化合物もしくは分子（核酸分子、たとえばDNAまたはRNAを含む）またはその組み合わせ間の物理的または化学的な相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用である結合は、直接的または間接的であってよく、間接的なものは他のタンパク質、化合物または分子を介し、またはその作用によるものである。直接結合は、他のタンパク質、化合物または分子を介して、またはその作用により行われるのではなく、他の実質的な介在物質のない相互作用を表わす。結合は多様な方法で検出できる。限定ではない例として、本発明のイオンチャンネルと化合物の物理的結合相互作用は標識化合物を用いて検出できる。あるいは、たとえば本発明のイオンチャンネルでトランスフェクションされてそれを発現する細胞を用いて、結合の機能的証拠を検出できる。細胞中へトランスフェクションしたイオンチャンネルのリガンドへのトランスフェクション細胞の結合は、結合の機能的証拠を提供する。結合を検出するための他の方法は当業者に周知である。

40

【0045】

本明細書中で用いる用語「化合物」は、同定可能な化学物質または分子を意味し、これには低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチドまたは核酸が含まれるが、これら

50

に限定されない。そのような化合物は天然または合成のいずれであってもよい。

【0046】

本明細書中で用いる用語“相補的”は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン・クリック塩基対合を表わす。

本明細書中で用いる用語“接触”は、ある化合物を直接的または間接的に本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドはかなり多数の緩衝液、塩類、溶液などの中に存在してもよい。接触には、たとえばイオンチャンネルポリペプチドもしくはそのフラグメントを、またはイオンチャンネルポリペプチドもしくはそのフラグメントをコードする核酸分子を収容したビーカー、マイクロタイプレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ、たとえば遺伝子チップなどの中へ化合物を入れることが含まれる。

10

【0047】

本明細書中で用いる用語“相同ヌクレオチド配列”または“相同アミノ酸配列”またはその変形は、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133の全体に対して、またはSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133の少なくとも一部（この一部は、コードしているポリペプチドの機能性ドメインをコードする）に対して、あるいはSEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 102またはSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132もしくは134に対して、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルで少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%の相同性を特色とする配列を表わす。本明細書中で用いる用語“約”は、参照数値の±10%の範囲を示す。たとえば“約80%相同”という句は、72~88%の相同範囲を表わし、“少なくとも約80%の相同性”という句は、少なくとも72%の相同性を表わす。本明細書中で用いる用語“少なくとも”は、そこに挙げた数値およびその特定範囲に含まれる整数値を含む。相同ヌクレオチド配列には、イオンチャンネルタンパク質のイソ型をコードする配列が含まれる。そのようなイソ型は、たとえばRNAのオルタナティブスプライシングの結果として、同一生物の異なる組織に発現する可能性がある。あるいは、イソ型は異なる遺伝子によりコードされる可能性がある。相同ヌクレオチド配列には、ヒト以外の種（哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない）のイオンチャンネルタンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。相同ヌクレオチド配列には、本明細書中で前記に述べたヌクレオチド配列の天然の対立遺伝子バリエーションおよび変異体も含まれるが、これらに限定されない。本発明は特定の配列を提示するが、本発明の範囲には本明細書に記載するイオンチャンネルの他のヒト対立遺伝子バリエーションおよびヒト以外の形態も含まれるものと理解すべきである。

20

30

【0048】

相同アミノ酸配列には、SEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 102またはSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132もしくは134およびイオンチャンネル活性をもつポリペプチドにおける、保存的アミノ酸置換を含むアミノ酸配列が含まれる。ただし相同アミノ酸配列は、イオンチャンネル活性をもつ既知ポリペプチドの配列を含まない。本明細書中で用いる用語“相同性%”は、2配列をアラインした際のそれらの配列のヌクレオチドまたはアミノ酸の総数と対比した同一ヌクレオチドまたは同一アミノ酸の比率を表わす。National Center for Biotechnology InformationのBLASTユーティリティプログラムによりデフォルト設定を用いて、DNAおよびタンパク質の両方に関する配列アラインメントを行った。より具体的には、2配列の相同性%を判定するために、最適比較が得られるようにそれらの配列をアラインする（たとえば、第1配列に第

40

50

2 配列との最適アラインメントのためにギャップを導入できる)。次いで対応する位置のヌクレオチドまたはアミノ酸を比較する。第1配列中のある位置が第2配列の対応する位置と同一のヌクレオチドまたはアミノ酸で占められている場合、それらの分子はその位置において相同である(すなわち本明細書中で用いる"相同性"は"同一性"と等しい)。さらに具体的には、配列相同性は、当技術分野で既知のコンピュータプログラム、たとえばGCGプログラムパッケージ中に提供されるGAPソフトウェア(Wisconsin Sequence Analysis Package、Unix(登録商標)用バージョン8、Genetics Computer group、University Research Park、ワイオミング州マディソン)を用いて判定できる。Needleman and Wunsch 1970 J Mol Biol 48:443-453参照。たとえば、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489;その全体を本明細書に援用する)を用いた配列比較のためのデフォルト設定付きGCG Gapソフトウェアを使用できる。本明細書中で用いる用語"相同性%"およびその変形は、"同一性%"および"類似性%"と互換性をもって用いられる。

【0049】

本明細書中で用いる用語"単離された"核酸分子は、その天然環境から取り出された核酸分子(DNAまたはRNA)を表わす。単離された核酸分子の例には、ベクターに組み込まれた組換えDNA分子、ヘテロログス宿主細胞中に保持された組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0050】

本明細書中で用いる用語"調節(modulates)"または"修飾(modifies)"は、特定の活性またはタンパク質の量、質または作用の低下または増大を意味する。

【0051】

用語"予防"は、生物が異常な状態を罹患または発現する確率を低下させることを表わす。

用語"治療"は、生物において療法効果をもつこと、および異常な状態を少なくとも部分的に軽減するかまたは排除することを表わす。

【0052】

用語"療法効果"は、異常な状態の原因となり、または関与している要因を、阻害または活性化することを表わす。療法効果は、異常な状態の1以上の症状のある程度軽減する。異常な状態の処置に関して、療法効果は下記のうち1以上を表わすことができる:(a)細胞の増殖、成長および/または分化の増大;(b)細胞死の阻害(すなわち遅延または停止);(c)変性の阻害;(d)異常な状態に関連する1以上の症状のある程度の軽減;ならびに(e)影響を受けた細胞集団の機能の増強。異常な状態に対する効果を示す化合物は、本明細書の記載に従って同定できる。

【0053】

用語"異常な状態"は、生物における正常な機能から逸脱した、その生物の細胞または組織の機能を表わす。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、細胞シグナル伝達または細胞生存に関係する可能性がある。異常な状態には、肥満症、糖尿病合併症、たとえば網膜変性、ならびにグルコースの取込みおよび代謝の不全、ならびに脂肪酸の取込みおよび代謝の不全も含めることができる。

【0054】

異常な細胞増殖状態には、癌、たとえば線維性障害およびメサンギウム障害、異常な血管形成および脈管形成、創傷癒合、乾癬、糖尿病および炎症が含まれる。

異常な分化状態には、神経変性性障害、創傷治癒速度の低下、および移植組織治癒速度の低下が含まれるが、これらに限定されない。異常な細胞シグナル伝達状態には、過度の神経伝達物質活性を伴う精神障害が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

異常な細胞生存状態は、プログラミングされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化または妨害された状態にも関する。アポトーシス経路には多数のプロテインキナーゼが関係する。これらのプロテインキナーゼのうちのいずれかの機能が異常であると、細胞不死または早期細胞死を生じる。

## 【 0 0 5 6 】

用語“投与”は、化合物を生物の細胞または組織に取り込ませる方法に関する。生物の細胞または組織が生物内または生物外にある状態で、異常な状態を予防または治療できる。生物外にある細胞は、細胞培養皿内で維持または増殖できる。生物内にある細胞については、当技術分野に多数の化合物投与方法があり、これには経口、非経口、皮膚、注射およびエアゾル剤投与が含まれる（これらに限定されない）。生物外にある細胞については、当技術分野に多数の化合物投与方法があり、これには細胞マイクロインジェクション法、形質転換法およびキャリア法が含まれる（これらに限定されない）。

10

## 【 0 0 5 7 】

異常な状態は、生物のイオンチャンネルに異常をもつ細胞群に化合物を投与することによって予防または治療できる。その際、化合物投与が生物の機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモットまたはヤギ、より好ましくはサルまたは類人猿、最も好ましくはヒトである。

## 【 0 0 5 8 】

“増幅”とは、正常な細胞と比較して細胞のDNAまたはRNAの数が増加することを意味する。ある正常細胞にはRNAの基礎発現がないので、RNAに関する“増幅”は、細胞中に検出可能なRNAが存在することであってもよい。他の正常細胞においては基礎レベルの発現があるので、これらの場合は増幅は基礎レベルと比較して少なくとも1～2倍、好ましくはそれ以上検出されることである。

20

## 【 0 0 5 9 】

本明細書中で用いる用語“オリゴヌクレオチド”は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に用いるのに十分な数の塩基をもつ一連の連結したヌクレオチド残基を表わす。この短い配列はゲノム配列またはcDNA配列を基礎とし（またはそれから設計され）、特定の細胞または組織における同一、類似または相補的DNAまたはRNAの存在を増幅、確認または解明するために用いられる。オリゴヌクレオチドは少なくとも約10ヌクレオチドないし約50ヌクレオチド、好ましくは約15～30ヌクレオチドをもつ核酸配列部分を含む。それらは化学的に合成でき、プローブとして使用できる。

30

## 【 0 0 6 0 】

本明細書中で用いる用語“プローブ”は、用途に応じて多様な長さ、好ましくは少なくとも約10ヌクレオチドないし約6,000ヌクレオチドをもつ核酸配列を表わす。それらは、同一、類似または相補的核酸配列の検出に用いられる。より長いプローブは、通常は天然源または組換え源から得られ、特異性が高く、オリゴマーよりハイブリダイズする速度がはるかに遅い。それらは一本鎖または二本鎖であってよく、PCR、ハイブリダイゼーション膜ベース法またはELISA様の方法において特異性をもつように慎重に設計される。

40

## 【 0 0 6 1 】

本明細書中で用いる句“ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件”または“ストリンジェントな条件”は、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドがそのターゲット配列にハイブリダイズするが、他の配列へのハイブリダイゼーションは最小数である条件を表わす。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、かつ異なる環境では異なるであろう。配列が長いほど、より高い温度でそれらの適正な相補体に特異的にハイブリダイズする。一般にストリンジェントな条件は、特定のイオン濃度およびpHで特異的配列の融点（ $T_m$ ）より約5%低くなるように選定される。 $T_m$ は、ターゲット配列に相補的なプローブの50%がターゲット配列に平衡状態でハイブリダイズする温度（一定のイオン濃度、pHおよび核酸濃度）である。ターゲット配列は一般に過剰に存在するの

50

で、 $T_m$  では50%のプローブがそれらの相補体に平衡状態でハイブリダイズする。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH7.0~8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01~1.0Mのナトリウムイオン(または他のイオン)となり、温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(たとえば10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30、より長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドについては少なくとも約60となる条件である。ストリンジェントな条件は、脱安定化剤、たとえばホルムアミドを添加しても達成できる。

【0062】

アミノ酸配列は、左から右にアミノ(N)からカルボキシ(C)方向へ示される。N末端 - アミノ基およびC末端 - カルボキシ基は配列中に示されない。ヌクレオチド配列は一本鎖のみで、左から右に5'から3'方向へ示される。ヌクレオチドおよびアミノ酸は、IUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する様式で示される。あるいは、アミノ酸はそれらの3文字コード表示法により示される。

【0063】

本発明は下記の出願に関連する：出願番号(Application Serial No.) 60/188,517；出願番号60/188,519；出願番号60/188,484；出願番号60/188,518；出願番号60/188,400；出願番号60/215,815；出願番号60/216,481；出願番号09/802,668；および出願番号09/802,668；これらそれぞれの全体を本明細書に援用する。

【0064】

ポリヌクレオチド

本発明は、未知のイオンチャンネルをコードする精製および単離されたポリヌクレオチド(たとえばDNA配列およびRNA転写体、センス鎖および相補的アンチセンス鎖の両方、一本鎖および二本鎖の両方、そのスプライスバリエーションを含む)を提供する。これらの遺伝子を本明細書にion-xと記載し、本明細書中でそのように総称する

【0065】

【化2】

(~~xは~~31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 111, 5HT-3C, 5HT-3C-genomic, 5HT-3C-genomic-long, 5HT-3C-cDNAおよび5HT-3C-cDNA-long)

【0066】

すなわち、これらの遺伝子および遺伝子産物を下記のように本明細書に記載し、本明細書中でそのように表示する：

【0067】

【化3】

ion-31, ion-32, ion-33, ion-34, ion-35, ion-36, ion-37, ion-38, ion-39, ion-40, ion-41, ion-52, ion-56, ion-57, ion-58, ion-59, ion-60, ion-61, ion-62, ion-63, ion-64, ion-65, ion-66, ion-67, ion-68, ion-69, ion-70, ion-71, ion-72, ion-73, ion-74, ion-75, ion-76, ion-77, ion-78, ion-79, ion-80, ion-81, ion-82, ion-83, ion-84, ion-85, ion-86, ion-87, ion-88, ion-89, ion-89, ion-90, ion-91, ion-92, ion-93, ion-94, ion-95, ion-111, ion-5HT-3C, ion-5HT-3C-genomic, ion-5HT-3C-genomic-long, ion-5HT-3C-cDNAおよびion-5HT-3C-cDNA-long.

【0068】

下記の表1に、新規遺伝子配列ion-xの表示、遺伝子配列のSEQ ID NO：、およびそれがコードするポリペプチドのSEQ ID NO：を示す。

【 0 0 6 9 】

【 表 1 】

表 1

ion-x	ヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:)	アミノ酸配列 (SEQ ID NO:)	最初の出願	ion-x	アミノ酸配列 (SEQ ID NO:)	ヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:)	最初の出願
31	1	52	A	71	27	78	C
31	103	105	H	72	28	79	C
31	104	106	H	73	29	80	C
32	2	53	A	74	30	81	C
33	3	54	A	75	31	82	C
34	4	55	A	76	32	83	D
35	5	56	A	77	33	84	D
36	6	57	A	78	34	85	D
37	7	58	A	79	35	86	D
38	8	59	A	80	36	87	D
39	9	60	A	81	37	88	D
40	10	61	A	82	38	89	D
41	11	62	A	83	39	90	D
52	107	109	F	84	40	91	D
56	12	63	B	85	41	92	D
57	13	64	B	86	42	93	E
58	14	65	B	87	43	94	E
59	15	66	B	88	44	95	E
60	16	67	B	89	45	96	E
61	17	68	B	90	46	97	E
62	18	69	B	91	47	98	E
63	19	70	B	92	48	99	E
64	20	71	B	93	49	100	E
65	21	72	B	94	50	101	E
66	22	73	C	95	51	102	E
67	23	74	C	111	108	110	G
68	24	75	C	5HT-3C	118	119	I
69	25	76	C	5HT-3C-genomic	120	121	I
70	26	77	C	5HT-3C-genomic-long	131	132	各 J/K,
				5HT-3C-cDNA	135	121	各 J/L,
				5HT-3C-cDNA-long	136	132	各 J/K,

## 注釈

A= Ser. No. 60/188,517

B= Ser. No. 60/188,519

C= Ser. No. 60/188,484

D= Ser. No. 60/188,518

E= Ser. No. 60/188,400

F= Ser. No. 60/215,815

G= Ser. No. 60/216,481

H= Ser. No. 09/802,668

I= Ser. No. 60/318,733

J= 本明細書

K= Ser. No. 60/403,254

【 0 0 7 0 】

特定の ion - x (たとえば ion - 5 - HT 3 C) を指定すると、その特定のイオンチャンネルサブユニットのみを表わすことが理解される。

本発明は、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチドを含む精製および単離されたポリヌクレオチド(たとえば cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、RNA、またはその組み合わせ; 一本鎖または二本鎖のいずれも)を提供する。そのようなポリヌクレオチドは、受容体の組換え発現および細胞における受容体発現の検出(たとえばノーザンハイブリダイゼーションおよび in situハイブリダイゼーションアッセイを使用)に有用である。そのようなポリヌクレオチドは、培養細胞、組織または動物において ion - x の発現を抑制するためのアンチセンスその他の分子の設計に; 療法用として; または異常な ion - x 発現を特色とする疾患もしくは症状のモデルの提供にも有用

である。本発明のポリヌクレオチドの定義から特に除外されるのは、宿主細胞の単離された非組換え天然染色体全体である。好ましいポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列をもつ。これらは天然の ion - x 配列に対応する。普遍遺伝子コードがもつ周知の縮重のため、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102 ならびに SEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132 および 134 よりなる群から選択される配列をもつ ion - x を同様にコードする他の多数のポリヌクレオチド配列があることは認識されるであろう。

10

## 【0071】

本発明は、哺乳動物ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む精製および単離されたポリヌクレオチドであって、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列をもつポリヌクレオチドまたはそれに相補的な非コード鎖に、下記のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドをも提供する：

(a) 50%ホルムアミド、1% SDS、1M NaCl、10%デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中、42 で16時間のハイブリダイゼーション；そして

20

(b) 0.1x SSC および 1% SDS を含む洗浄溶液中、60 でそれぞれ30分の洗浄2回。ヒト対立遺伝子バリエーションをコードするポリヌクレオチドがきわめて好ましい。

## 【0072】

本発明はまた、前記イオンチャンネルをコードする遺伝子配列を含む分子；それらの遺伝子配列を組み込んだ構築体および組換え宿主細胞；それらの遺伝子配列がコードする新規な ion - x ポリペプチド；それらのポリペプチドおよび相同体に対する抗体；それらのポリヌクレオチドおよびポリペプチドを用いたキット；ならびに以上のすべてを製造および使用方法に関する。さらに本発明は、前記遺伝子配列およびポリペプチドの相同

30

## 【0073】

本発明のゲノムDNAは、本発明のポリペプチドに対するタンパク質コード領域を含み、その対立遺伝子バリエーションをも含むものとする。多くの遺伝子に関して、ゲノムDNAがRNA転写体に転写され、これが1またはそれより多くのスプライシング事象を受け、その際、転写体のイントロン（すなわち非コード領域）が除去される、すなわち“スプライスアウト”されることは広く理解されている。オルタナティブ機序によりスプライスされ、したがって異なるRNA配列が除去されるが、なお ion - x ポリペプチドをコードするRNA転写体を、当技術分野でスプライスバリエーションと呼ぶ。これらも本発明に含まれる。したがって本発明に含まれるスプライスバリエーションは、同じ起源ゲノムDNA配列

40

## 【0074】

本発明には、ion - x をコードするRNAポリヌクレオチドの逆転写により得られるcDNAも含まれる（慣習的に、続いて相補鎖の第2鎖合成により二本鎖DNAを得る）。

## 【0075】

50

ヒト ion-xポリペプチドをコードする好ましいDNA配列は、SEQ ID NO : 1 ~ SEQ ID NO : 51、SEQ ID NO : 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO : 123 ~ 129、SEQ ID NO : 131およびSEQ ID NO : 133よりなる群から選択される配列に示される。本発明の好ましいDNAは、二本鎖分子に加えて、DNAに関するワトソン・クリック塩基対合規則に従ってコード鎖から明確に演繹できる相補分子(“非コード鎖”または“相補体”)を含む。SEQ ID NO : 52 ~ SEQ ID NO : 102ならびにSEQ ID NO : 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列のion-xポリペプチドをコードする他のポリヌクレオチドであって、普遍核遺伝子コードがもつ周知の縮重のためSEQ ID NO : 1 ~ SEQ ID NO : 51、SEQ ID NO : 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO : 123 ~ 129、SEQ ID NO : 131およびSEQ ID NO : 133よりなる群から選択される配列のポリヌクレオチドと配列が異なるものも好ましい。

#### 【0076】

ある好ましい態様において、単離された核酸分子は、SEQ ID NO : 105、106、または119の配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。SEQ ID NO : 105、106、または119の配列を含むポリペプチドは、下記の配列のうち1以上のものからのアミノ酸残基を少なくとも1個またはそれ以上含む：ion31 (SEQ ID NO : 52)、ion52 (SEQ ID NO : 109)、ion111 (SEQ ID NO : 110)、ion-5HT-3C (SEQ ID NO : 119)。

#### 【0077】

ある好ましい態様において、単離された核酸は、SEQ ID NO : 105、106、または119の配列をもつポリペプチドをコードするSEQ ID NO : 103、104、または118のヌクレオチド配列を含む。SEQ ID NO : 105、106、または119の配列をもつポリペプチドをコードする単離された核酸は、下記の配列のうち1以上のものからのヌクレオチドを少なくとも1個またはそれ以上含む：ion31 (SEQ ID NO : 1)、ion52 (SEQ ID NO : 107)、ion111 (SEQ ID NO : 108)、ion-5HT-3C (SEQ ID NO : 120)。

#### 【0078】

ある好ましい態様において、単離された核酸はSEQ ID NO : 118、120、131または133のヌクレオチド配列を含む。この単離された核酸は、SEQ ID NO : 130 (ATGTTAGCTTTCATTTTATCACGGGCGACCC)のうち少なくとも10、好ましくは少なくとも12、より好ましくは少なくとも14、より好ましくは少なくとも16、より好ましくは少なくとも18、より好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも22、より好ましくは少なくとも24、より好ましくは少なくとも26、より好ましくは少なくとも28、より好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも31個の連続ヌクレオチドを含む。

#### 【0079】

ある好ましい態様において、SEQ ID NO : 105、106、または119の配列をもつポリペプチドをコードする単離された核酸は、SEQ ID NO : 130 (ATGTTAGCTTTCATTTTATCACGGGCGACCC)のうち少なくとも10、好ましくは少なくとも12、より好ましくは少なくとも14、より好ましくは少なくとも16、より好ましくは少なくとも18、より好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも22、より好ましくは少なくとも24、より好ましくは少なくとも26、より好ましくは少なくとも28、より好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも31個の連続ヌクレオチドを含む。

#### 【0080】

ある好ましい態様において、単離された核酸はキメラ受容体をコードする。このキメラ受容体コード核酸は、SEQ ID NO: 130 (ATGTTAGCTTTCATTTTATCACGGGCGACCC)のうち少なくとも10、好ましくは少なくとも12、より好ましくは少なくとも14、より好ましくは少なくとも16、より好ましくは少なくとも18、より好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも22、より好ましくは少なくとも24、より好ましくは少なくとも26、より好ましくは少なくとも28、より好ましくは少なくとも30、より好ましくは少なくとも31個の連続ヌクレオチドを含む。

#### 【0081】

本発明はさらに、ヒト *ion-x* DNAの、他の種、好ましくは哺乳動物の相同体を含む。種相同体(時には"オルソログ"と呼ばれる)は一般に、本発明のヒトDNAと少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性をもつ。一般に、本発明のポリヌクレオチドに関して配列"相同性"%は、配列をアラインし、最大%の配列同一性を達成するために必要ならばギャップを導入した後、候補配列中において、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される *ion-x* 配列中のヌクレオチドと同一であるヌクレオチド塩基の%として計算できる。

#### 【0082】

本発明のポリヌクレオチドは、サザンおよび/またはノーザンハイブリダイゼーション、ならびにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含めた周知の方法により、関連の *ion-x* ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、たとえばヒト対立遺伝子バリエーションおよび種相同体を同定および単離するのを可能にする。関連ポリヌクレオチドの例には、*ion-x* に相同なポリペプチドならびに *ion-x* の1以上の生物学的、免疫学的および/または物理的特性をもつ構造関連ポリペプチドをコードする、ヒトおよびヒト以外のゲノム配列(対立遺伝子バリエーションを含む)ならびにポリヌクレオチドが含まれる。*ion-x* に相同なタンパク質をコードするヒト以外の種の遺伝子も、サザンおよび/またはPCR分析により同定でき、*ion-x* 障害の動物モデルに有用である。ヒト *ion-x* DNA配列の知見は、サザンハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の採用により、*ion-x* 発現を制御する調節配列、たとえばプロモーター、オペレーター、エンハンサー、リプレッサーなどをコードするゲノムDNA配列の同定も可能にする。本発明のポリヌクレオチドは、細胞の *ion-x* 発現能を検出するハイブリダイゼーションアッセイにも有用である。本発明のポリヌクレオチドは、1以上の疾病状態の原因である *ion-x* 遺伝子座の遺伝子変化を同定するのに有用な診断方法の基礎も提供できる。この情報は診断および療法戦略選定の両方に有用である。

#### 【0083】

本発明によれば、本明細書に開示する *ion-x* ニュクレオチド配列を用いて他の動物における *ion-x* 相同体を同定できる。動物にはヒトおよび他の哺乳動物ならびに無脊椎動物が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に開示するいずれかのヌクレオチド配列またはその一部をたとえばプローブとして用いて、当業者に周知のスクリーニング法によりデータベースまたは核酸ライブラリー、たとえばゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングし、相同体を同定できる。したがって、*ion-x* 配列と少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも100%の相同性をもつ相同体を同定できる。

#### 【0084】

本明細書に開示する *ion-x* ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから、当業者はイオンチャンネルポリヌクレオチドの多数の可能なフラグメントを容易に得ることができる。本明細書に示すポリヌクレオチド配列は、たとえば（限定ではない）天然チャンネル、構成性活性チャンネル、または優性ネガティブチャンネルをコードすることができる。

**【0085】**

本発明の好ましい態様は、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 ならびにそのフラグメントよりなる群から選択される配列に相同な配列を含む、単離された核酸分子を提供する。他の好ましい態様は、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 ならびにそのフラグメントよりなる群から選択される配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

10

**【0086】**

本発明において用いる *ion-x* コードポリヌクレオチドのフラグメントは、*ion-x* をコードするポリヌクレオチドの少なくとも10、好ましくは少なくとも12、14、16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含む。本明細書中で用いる用語“少なくとも”は、そこに挙げられた数値およびその特定範囲に含まれる整数値を含む。好ましくは、本発明のフラグメントポリヌクレオチドは *ion-x* をコードするポリヌクレオチド配列にユニークな配列を含み、したがって *ion-x* をコードするポリヌクレオチド（またはそのフラグメント）に高度ストリンジェントまたは中等度ストリンジェント条件下でのみ（すなわち“特異的に”）ハイブリダイズする。本発明のゲノム配列のポリヌクレオチドフラグメントは、コード領域にユニークな配列を含むだけでなく、全長配列のイントロン、調節領域および/または他の非翻訳配列に由来するフラグメントも含む。本発明のポリヌクレオチドにユニークな配列は、他の既知ポリヌクレオチドとの配列比較により識別でき、当技術分野でルーティンに採用されるアラインメントプログラム、たとえば公開配列データベースで得られるものを用いて同定できる。そのような配列は、ポリヌクレオチドがハイブリダイズするゲノムDNAフラグメント数を調べるサザンハイブリダイゼーション分析からも識別できる。本発明のポリヌクレオチドは、それらの検出を可能にするように標識することができ、これには放射性標識、蛍光標識および酵素標識が含まれる。

20

30

**【0087】**

フラグメントポリヌクレオチドは、全長 *ion-x* ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを検出するためのプローブとして特に有用である。*ion-x* をコードするポリヌクレオチドの存在を検出するのに用いるための、または *ion-x* をコードするポリヌクレオチド配列における変異を検出するのに用いるための1以上のポリヌクレオチドを、キットに収容することができる。

**【0088】**

本発明は、*ion-x* ポリペプチドをコードするDNAであって、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列に示したポリヌクレオチドの非コード鎖または相補体に、中等度ストリンジェントまたは高度ストリンジェント条件下でハイブリダイズするDNAをも含む。

40

**【0089】**

高度ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の例は下記のものである：50%ホルムアミド、1% SDS、1M NaCl、10% デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中、42 °Cでのハイブリダイゼーション、そして0.1x SSC および1

50

% SDSを含む洗浄溶液中、60 で30分の洗浄2回。温度および緩衝液または塩濃度の変更により同等なストリンジェンシー条件を達成できることは、当技術分野で理解されている；Ausubel et al. (編), PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1994), pp. 6.0.3 - 6.4.10に記載。ハイブリダイゼーション条件の変更は経験的に判定するか、あるいはプローブの長さおよびグアノシン/シトシン(GC)塩基対合%に基づいて厳密に計算することができる。ハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al. (編), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(1989), pp. 9.47 - 9.51の記載に従って計算できる。

10

**【0090】**

本発明に開示するヌクレオチド配列情報の知見により、当業者は多様な手段で多様な供給源(すなわち種々の組織または種々の生物)からion-xをコードするヌクレオチド配列を同定および入手できる；それらの手段は当業者に周知であり、たとえばSambrook et al. (編), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(1989)に記載されている；その全体を本明細書に援用する。

**【0091】**

ion-xをコードするDNAは、たとえば本明細書に示すion-x遺伝子配列情報から作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いてmRNA、cDNAまたはゲノムDNAをスクリーニングすることにより得ることができる。当業者に既知であって一般的なハイブリダイゼーションアッセイに用いられている方法、たとえばSambrookらが記載したものに従って、プローブを検出可能な基、たとえば蛍光性基、放射性原子または化学発光性基で標識できる。

20

**【0092】**

あるいは、前記のいずれかのion-xヌクレオチド配列を含む核酸分子はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により合成でき、PCRオリゴヌクレオチドプライマーは本明細書に示すヌクレオチド配列から作製される。USP 4,683,195(Mullisら)および4,683,202(Mullisら)参照。PCR反応は、特定の核酸配列が予め精製されていなくても、またその試料中に1コピーしか存在しなくても、その配列の濃度を選択的に高める方法を提供する。この方法を用いて一本鎖または二本鎖DNAを増幅できる。この方法の本質は、目的核酸分子の鋳型依存性ポリメラーゼ伸介複製のためのプライマーとして作用する2種類のオリゴヌクレオチドプローブを用いることである。

30

**【0093】**

他の多様なクローニングおよびin vitro増幅方法が当業者に周知である。これらの方法の例は、たとえばBerger et al., 分子クローニング法の指針, METHODS IN ENZYMOLOGY 152, Academic Press, Inc., カリフォルニア州サンディエゴ(Berger)にみられる；その全体を本明細書に援用する。

40

**【0094】**

ion-xのヌクレオチド配列の入手または確認のために、自動化された配列決定法を使用できる。本発明のion-xヌクレオチド配列は100%正確であると考えられる。しかし当技術分野で知られているように、自動化法で得られるヌクレオチド配列は若干の誤りを含む可能性がある。自動化法で決定されたヌクレオチド配列は、その核酸分子の配列の実際のヌクレオチド配列と一般に少なくとも約90%、より一般的には少なくとも約95%ないし少なくとも約99.9%同一である。実際の配列は、当技術分野で周知の手動による配列決定法を用いると、より正確に決定できる。1個以上のヌクレオチドの挿入または欠失を生じるような配列における誤りは、翻訳におけるフレームシフトを生じる可

50

能性があり、したがって推定アミノ酸配列は、変異点から出発して核酸分子の実際のヌクレオチド配列から推定するものと異なるであろう。

#### 【0095】

本発明の核酸分子およびそれに由来するフラグメントは、特定の障害に関連する制限断片長多型(RFLP)のスクリーニング、および遺伝子地図作製に有用である。

本発明により提供されるポリヌクレオチド配列情報は、それがコードするポリペプチドを当技術分野で周知のルーティンに実施されている方法で大規模発現させるのを可能にする。

#### 【0096】

##### ベクター

本発明の他の態様は、前記のいずれかの核酸分子を含むベクターまたは組換え発現ベクターに関する。本発明においては、ion-xをコードするDNAもしくはRNAの増幅のために、および/またはion-xをコードするDNAの発現のためにベクターを用いる。好ましいベクターにはプラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子またはウイルス、および組み込み可能なDNAフラグメント(すなわち相同的組換えにより宿主ゲノムに組み込むことができるフラグメント)が含まれるが、これらに限定されない。好ましいウイルス粒子にはアデノウイルス、バキュロウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスが含まれるが、これらに限定されない。好ましい発現ベクターにはpcDNA3(Invitrogen)およびpSVL(Pharmacia Biotech)が含まれるが、これらに限定されない。他の発現ベクターにはpSPORT(商標)ベクター、pGEM(商標)ベクター(Promega)、pPROEXベクター(商標)(LTI、メリーランド州ベテスタ)、Bluescript(商標)ベクター(Stratagene)、pQE(商標)ベクター(QuiaGen)、pSE420(商標)(Invitrogen)、およびpYES2(商標)(Invitrogen)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

#### 【0097】

発現構築体は、好ましくは内因性または外因性の発現制御DNA配列および転写ターミネーターに作動可能な状態で結合したion-xコードポリヌクレオチドを含む。発現制御DNA配列はプロモーター、エンハンサー、オペレーター、および調節要素結合部位を一般的に含み、そして典型的にはその発現構築体を利用する発現系に基づいて選択される。好ましいプロモーターおよびエンハンサー配列は一般に遺伝子発現を増大させる能力で選択され、一方、オペレーター配列は一般に遺伝子発現を調節する能力で選択される。本発明の発現構築体は、その構築体を保有する宿主細胞を同定できる1以上の選択マーカーをコードする配列を含むこともできる。発現構築体は、宿主細胞における相同的組換えを容易にし、好ましくは促進する配列を含むこともできる。本発明の好ましい構築体は、宿主細胞における複製に必要な配列をも含む。

30

#### 【0098】

発現構築体は、好ましくはコードされるタンパク質の産生に利用されるが、単にion-xコードポリヌクレオチド配列を増幅するのにも利用できる。好ましい態様においてベクターは、発現制御配列を含むポリヌクレオチドに本発明のポリヌクレオチドが作動可能な状態で結合した発現ベクターである。本発明のポリヌクレオチドを組み込んだ自律複製型の組換え発現構築体、たとえばプラスミドおよびウイルスDNAベクターも提供される。好ましい発現ベクターは、適切な宿主におけるion-x発現に影響を及ぼしうる適切な制御配列にion-xをコードするDNA配列が作動可能な状態で連携または結合した、複製可能なDNA構築体である。DNA領域は、それらが互いに機能可能な関係にある場合、作動可能な状態で連携または結合している。たとえばプロモーターは、それがコード配列の転写を制御する場合、その配列に作動可能な状態で連携または結合している。増幅ベクターは発現制御ドメインを必要とせず、宿主において複製する能力(通常は複製起点により与えられる)および形質転換体の識別を容易にする選択遺伝子のみを必要とする

40

50

。発現ベクターにおける制御配列の必要性は、選択された宿主および選ばれた形質転換方法に応じて異なるであろう。一般に制御配列には、転写プロモーター、転写を制御するための所望による (optional) オペレーター配列、mRNAの適切なりボソーム結合をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終止を制御する配列が含まれる。

#### 【0099】

好ましいベクターは、好ましくは宿主生物が認識するプロモーターを含む。本発明のプロモーター配列は、原核細胞、真核細胞またはウイルス性のものであってよい。適切な原核細胞配列には下記のものが含まれる：バクテリオファージのP<sub>R</sub>およびP<sub>L</sub>プロモーター (THE BACTERIOPHAGE LAMBDA, Hershey, A. D. 編, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (1973) ; その全体を本明細書に援用する ; LAMBDA II, Hendrix, R. W. 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (1980) ; その全体を本明細書に援用する) ; 大腸菌 (E. coli) の trp、recA、熱ショック、および lacZ プロモーター、ならびに SV40 初期プロモーター (Benoit et al., Nature, 1981, 290, 304-310 ; その全体を本明細書に援用する)。他のプロモーターには下記のものが含まれるが、これらに限定されない：マウス乳癌ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスLTR (long terminal repeat)、マロニーウイルス、サイトメガロウイルス極初期プロモーター、エプスタイン・バーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、ヒトメタロチオネイン。

10

20

#### 【0100】

好ましいベクターは追加の調節配列も含むことができる。適切な調節配列の好ましい例は、ファージMS-2のレプリカーゼ遺伝子およびバクテリオファージの遺伝子cIIのシャイン・ダルガーノにより示される。シャイン・ダルガーノ配列のすぐ後にion-xをコードするDNAがあってもよく、これにより成熟ion-xタンパク質が生成する。

#### 【0101】

さらに、適切な発現ベクターは、形質転換された宿主細胞のスクリーニングを可能にする適切なマーカを含むことができる。選択した宿主の形質転換は、当業者に周知であってSambrookら (前掲) が記載した種々の方法のいずれかを用いて実施される。

30

#### 【0102】

複製起点も、外因性起点を含むようにベクターを構築することにより得られ、あるいは宿主細胞の染色体複製機序により得られる。ベクターを宿主細胞染色体に組み込む場合、後者で十分であろう。あるいは、ウイルスの複製起点を含むベクターを用いずに、当業者は選択マーカとion-x DNAの同時形質転換方法により哺乳動物細胞を形質転換することができる。適切なマーカの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはチミジンキナーゼである (USP 4, 399, 216 参照)。

#### 【0103】

ion-xをコードするヌクレオチド配列を、常法によりベクターDNAで組み換えることができる。これには、ライゲーションのための平滑末端または付着末端形成、適切な末端を得るための制限酵素消化、突出末端の適宜なフィリングイン、不都合な接合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および適切なりガーゼによるライゲーションが含まれる。そのような操作のための方法はSambrookら (前掲) に示されており、当技術分野で周知である。哺乳動物発現ベクターの構築方法は、たとえばOkayama et al., Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 280 ; Cosman et al., Mol. Immunol., 1986, 23, 935 ; Cosman et al., Nature, 1984, 312, 768 ; EP-A-0367566、およびWO91/18982に示されている ; これらそれぞれの全体を本明細書に援用する。

40

50

## 【0104】

宿主細胞

本発明の他の態様によれば、コードされる *ion-x* ポリペプチドの発現が可能な様式で本発明のポリヌクレオチド（または本発明のベクター）を含む宿主細胞（原核細胞および真核細胞を含む）が提供される。本発明のポリヌクレオチドを、環状プラスミドの一部として、または単離されたタンパク質コード領域を含む線状DNAもしくはウイルスベクターとして、宿主細胞に導入することができる。DNAを宿主細胞に導入するために当技術分野でルーティンに実施されている周知の方法には、リポソーム、ミセル、ゴースト細胞およびプロトプラストなどのキャリアと合わせた形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、核内注入、または融合が含まれる。本発明の発現系には、細菌、酵母、真菌、植物、昆虫、無脊椎動物、脊椎動物および哺乳動物の細胞系が含まれる。

10

## 【0105】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のベクターで形質転換またはトランスフェクションした（安定または一過性）宿主細胞を提供する。前記のように、そのような宿主細胞は前記ポリヌクレオチドの増幅、およびそのポリヌクレオチドがコードする *ion-x* ポリペプチドまたはそのフラグメントの発現に有用である。

## 【0106】

さらに他の関連態様において本発明は、*ion-x* ポリペプチド（またはそのフラグメント）を製造する方法であって、本発明の宿主細胞を栄養培地で増殖させ、そして細胞または培地からポリペプチドまたはそのバリエーションを単離する工程を含む方法を提供する。*ion-x* は膜貫通チャンネルであるので、特定の活性のアッセイなどある種の用途については、好ましい単離は埋め込まれた状態のポリペプチドを含む細胞膜の単離を伴う場合があることは理解されるであろう。一方、他の用途についてはより完全な単離が好ましいであろう。

20

## 【0107】

本発明のある態様によれば、前記のいずれかの核酸分子を含む発現ベクターをもつ形質転換された宿主細胞が提供される。ヌクレオチド配列の発現は、ベクターが適切な宿主細胞に導入された場合に起きる。本発明のポリペプチドの発現に適した宿主細胞には原核細胞、酵母および真核細胞が含まれるが、これらに限定されない。原核細胞発現ベクターを用いる場合、適切な宿主細胞はそのクローン化配列を発現するいずれかの原核細胞である。適切な原核細胞には、*Escherichia*、*Bacillus*、*Salmonella*、*Pseudomonas*、*Streptomyces* および *Staphylococcus* 属の細菌が含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【0108】

真核細胞発現ベクターを用いる場合、適切な宿主細胞はそのクローン化配列を発現するいずれかの真核細胞である。好ましくは、真核細胞は高等真核生物の細胞である。適切な真核細胞にはヒト以外の哺乳動物の組織培養細胞およびヒトの組織培養細胞が含まれるが、これらに限定されない。好ましい宿主細胞には昆虫細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎細胞（COS細胞）、ヒトHEK-293細胞、およびマウス3T3線維芽細胞が含まれるが、これらに限定されない。細胞培養におけるそのような細胞の増殖はルーティンな方法になっている（*Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson 編（1973）参照；その全体を本明細書に援用する）。

40

## 【0109】

さらに、酵母宿主を宿主細胞として使用できる。好ましい酵母細胞にはサッカロミセス（*Saccharomyces*）、ピチア（*Pichia*）およびクルベロミセス（*Kluyveromyces*）属が含まれるが、これらに限定されない。好ましい酵母宿主はサッカロミセス・セレビスエ（*S. cerevisiae*）およびピチア・パストリス（*P. pastoris*）である。好ましい酵母ベクターは、2T酵母プラスミド由来の複製

50

起点配列、自律複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終止のための配列、および選択マーカー遺伝子を含むことができる。これには酵母と大腸菌の両方における複製のためのシャトルベクターも含まれる。

#### 【0110】

あるいは、昆虫細胞を宿主細胞として使用できる。ある好ましい態様においては、バキュロウイルス発現系を用いて本発明のポリペプチドを発現させる (参照: Luckow et al., *Bio/Technology*, 1988, 6, 47; BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, O'Rielly et al. (編), W.H. Freeman and Company, ニューヨーク, 1992; および USP 4, 879, 236; これらそれぞれの全体を本明細書に援用する)。さらに、たとえば MAXBAC (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (Invitrogen) を昆虫細胞における産生のために使用できる。

10

#### 【0111】

本発明の宿主細胞は、ion-x と特異的に免疫反応する抗体の発現に有用な免疫源である。本発明の宿主細胞は、ion-x ポリペプチドの大規模製造方法にも有用であり、その際、細胞を適切な培養培地で増殖させ、目的ポリペプチド生成物を細胞から、または細胞を増殖させた培地から、当技術分野で既知の精製法、たとえば下記を含めた一般的なクロマトグラフィー法により単離する: 免疫アフィニティークロマトグラフィー、受容体アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除濾過、カチオンまたはアニオン交換クロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)、逆相 HPLC など。さらに他の精製法には、特異的結合パートナーもしくは試薬が認識する特異的なタグ、標識、またはキレート形成部分をもつ融合タンパク質として目的タンパク質を発現させ、そして精製する方法が含まれる。精製されたタンパク質を開裂させて目的タンパク質を得るか、あるいは融合タンパク質のままにしておくことができる。融合タンパク質の開裂により、開裂処理の結果として付加アミノ酸残基をもつ形の目的タンパク質が得られる場合がある。

20

#### 【0112】

ion-x DNA 配列の知見から、内因性 ion-x の発現を可能にし、または増大するように、細胞を修飾できる。細胞が ion-x をより高いレベルで発現するように天然 ion-x プロモーター全体または一部をヘテロロガスプロモーター全体または一部と交換することにより細胞を修飾して (たとえば相同的組換えにより)、発現を増大させることができる。ヘテロロガスプロモーターを、内因性 ion-x コード配列と作動可能な状態で結合するように挿入する (たとえば PCT 国際特許出願公開 WO 94 / 12650、PCT 国際特許出願公開 WO 92 / 20808、および PCT 国際特許出願公開 WO 91 / 09955 参照)。ヘテロロガスプロモーター DNA のほかに、増幅可能なマーカー DNA (たとえば ada、dhfr、ならびにカルバモイルリン酸シンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼおよびジヒドロオロターゼをコードする多機能 CAD 遺伝子) および / またはイントロン DNA をヘテロロガスプロモーター DNA と一緒に挿入することも考慮される。ion-x コード配列に結合させると、標準的選択法によりマーカー DNA が増幅され、ion-x コード配列が細胞において同時増幅される。

30

40

#### 【0113】

##### ノックアウト

本発明により提供される DNA 配列情報は、機能性 ion-x を発現できないかまたは ion-x のバリエーションを発現する動物の開発 (たとえば相同的組換えまたは "ノックアウト" 法による; Capecchi, *Science* 244: 1288-1292 (1989) 参照; これを本明細書に援用する) も可能にする。そのような動物 (特に小型の実験動物、たとえばラット、ウサギおよびマウス) は、ion-x および ion-x モジュレーター *in vivo* 活性を研究するためのモデルとして有用である。

#### 【0114】

##### アンチセンス

50

同様に本発明により得られるのは、ion-xをコードするポリヌクレオチドを認識してそれにハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチドである。全長およびフラグメントアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。本発明のフラグメントアンチセンス分子には、(i) ion-x RNAを特異的に認識してそれにハイブリダイズするもの (ion-xをコードするDNAと他の既知分子をコードするDNAとの配列比較により判定) が含まれる。ion-xをコードするポリヌクレオチドにユニークな配列の同定は、公開された配列データベースを用いて、および/または市販の配列比較プログラムを用いて実施できる。目的配列を同定した後、当技術分野で周知の制限消化または既知のポリメラーゼ連鎖反応法を用いた増幅により単離を行うことができる。アンチセンスポリヌクレオチドは特に、ion-x mRNAを発現する細胞によるion-x発現の調節に係る。 10

#### 【0115】

ion-x発現制御配列またはion-x RNAに特異的に結合しうるアンチセンス核酸 (好ましくは10~30塩基対のオリゴヌクレオチド) を細胞に導入する (たとえばウイルスベクター、またはコロイド分散系、たとえばリポソームによる)。アンチセンス核酸は細胞中のion-xターゲットヌクレオチド配列に結合して、ターゲット配列の転写および/または翻訳を妨げる。ホスホロチオエートおよびメチルホスホナートアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明による療法用途のために特に考慮される。ロックされた核酸も本発明による療法用途のために特に考慮される (たとえばWahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(10), 5633-5638 (2000) 参照; その全体を本明細書に援用する)。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、それらの5'末端へのポリ-L-リシン、トランスフェリンポリリシン、またはコレステロール部分の付加によりさらに修飾することができる。転写または翻訳レベルでのion-x発現の抑制は、異常なion-x発現を特色とする疾患/症状の細胞モデルまたは動物モデルの作製に有用である。 20

#### 【0116】

本発明のion-xをコードするヌクレオチド配列に由来するSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択されるヌクレオチド配列またはそれに相補的もしくは相同な配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはフラグメントは、種々の組織における遺伝子発現を検査する診断ツールとして有用である。たとえば、検出可能な基をもつオリゴヌクレオチドプローブを用いて一般的なオートラジオグラフィ法により組織をin situ検査して、この酵素の自然発現またはそれに関連する病的状態を調べることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列またはそれに対応するmRNAの調節領域に対するものである。これには開始コドン、TATAボックス、エンハンサー配列などが含まれるが、これらに限定されない。 30 40

#### 【0117】

##### 転写因子

本発明において教示されるion-x配列は、天然の細胞または動物、およびion-xポリヌクレオチドにより形質転換またはトランスフェクションした細胞における、ion-x発現を調節するための新規な転写因子の設計を容易にする。たとえば、それらのジンクフィンガードメインによりDNAを結合するCys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>ジンクフィンガータンパク質は、異なるターゲット配列を認識するような構造変化を受けやすいことが示されている。これらの人工的ジンクフィンガータンパク質は特異的ターゲット部位を高い親和性および低い解離定数で認識するので、遺伝子発現を調節する遺伝子スイッチとして作用できる。本発明の特定のion-xターゲット配列の知見から、構造に基づくモデリング 50

とファージディスプレイライブラリーのスクリーニングとの組み合わせなど既知方法を用いた、ターゲット配列特異的なジンクフィンガータンパク質の工学的作製が容易になる (Segal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2758-2763 (1999); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:5525-5530 (1997); Greisman et al., Science 275:657-661 (1997); Choo et al., J. Mol. Biol. 273:525-532 (1997))。各ジンクフィンガードメインは通常は3またはそれより多くの塩基対を認識する。いずれの既知ゲノムにおいてもユニークなものであるためには一般に18塩基対の認識配列で十分な長さであるので、当該配列について6タンデム・リピートのジンクフィンガーよりなるジンクフィンガータンパク質が確実に特異的であると予想される (Segal et al.)。ion-x配列に基づいて設計した人工的ジンクフィンガーリピートを活性化ドメインまたは抑制ドメインに融合させて、ion-x発現を促進または抑制する (Liu et al.)。あるいは、ジンクフィンガーペプチドとTATAボックス結合因子 (TBP) の間に多様な長さのリンカー領域においてジンクフィンガードメインをTBPに融合させ、転写アクチベーターまたはリプレッサーを作製することができる (Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3616-3620 (1997))。このようなタンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、天然細胞、動物およびヒト; ならびに/あるいはion-xコード配列でトランスフェクションした細胞のいずれにおいても、in vivoでのion-x発現を調節するのに有用である。新規な転写因子を発現する構築体のトランスフェクションにより (遺伝子療法)、またはそのタンパク質の導入により、新規な転写因子をターゲット細胞へ送達できる。アンチセンスまたは触媒RNA法に対する代替として療法に使用するために、RNA配列を結合するように工学的に作製したジンクフィンガータンパク質を設計することもできる (McCole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9521-9526 (1997); Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:344-348 (1995))。本発明は、本発明の遺伝子配列に基づいたそのような転写因子、およびカスタマイズドジンクフィンガータンパク質を、設計する方法を含む; これらは、これらの配列を遺伝子相補体中に含む細胞 (天然または形質転換したもの) におけるion-x発現の調節に有用である。

#### 【0118】

##### ポリペプチド

本発明は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる精製および単離された哺乳動物ion-xポリペプチドをも提供する。現在好ましいある態様には、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列に示すアミノ酸配列を含むヒトion-xポリペプチド、またはポリペプチド特異的エピトープを含むそのフラグメントが含まれる。"に特異的なエピトープ"もしくは"ポリペプチド特異的エピトープ"またはその変形は、のちに詳述するようにion-xまたはアミノ酸配列に特異的な抗体により認識可能な、ion-xペプチド受容体またはアミノ酸配列の一部を意味する。

#### 【0119】

提示する配列は特定のヒト配列であるが、本発明の範囲には、他のヒト対立遺伝子バリエーション; ヒト以外の哺乳動物形のion-x、および他の脊椎動物形のion-xが含まれるものとする。

#### 【0120】

ion-xなどの受容体に結合する抗体その他の結合化合物の産生およびスクリーニングのために細胞外エピトープが特に有用であることは理解されるであろう。したがって他の好ましい態様において本発明は、ion-xの少なくとも1つの細胞外ドメインを含む、精製および単離されたポリペプチドを提供する。ion-xの細胞外ドメインを含む、

精製および単離されたポリペプチドはきわめて好ましい。ion-xの細胞外ドメイン、ion-xの膜貫通ドメイン、ion-xの細胞質領域、およびその融合体よりなる群から選択されるion-xフラグメントを含む、精製および単離されたポリペプチドも好ましい。そのようなフラグメントは天然受容体の連続部分であってもよい。しかし、本明細書に提示するion-x遺伝子およびタンパク質配列の知見から、天然タンパク質において連続していない種々のドメインの組換えが可能となることも理解されるであろう。

【0121】

"tmrest.all"と呼ばれるFROTRANコンピュータプログラム[P arodi et al., Comput. Appl. Biosci. 5: 527-535 (1994)]を用いて、ion-xは膜貫通ドメインを含むことが示された。

10

【0122】

本発明は、本発明の好ましいポリペプチドに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%の同一性および/または相同性をもつポリペプチドをも含む。本明細書において、本発明の好ましいポリペプチドに関するアミノ酸配列"同一性"%は、両配列をアラインし、最大の配列同一性%を達成するために必要ならばギャップを導入した後、ion-x配列中の残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される；保存置換は配列同一性の一部として考慮されない。本明細書において、本発明の好ましいポリペプチドに関する配列"相同性"%は、配列をアラインし、最大の配列同一性%を達成するために必要ならばギャップを導入した後、ion-x配列中の残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される；保存置換も配列同一性の一部として考慮される。

20

【0123】

1態様において相同性%は、アラインメントを最大にするために長さ100アミノ酸に4つのギャップを導入した場合、2配列のうち短い方において、比較される配列中の同一アミノ酸残基とアラインするアミノ酸残基の%として計算される[Dayhoff, ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, Vol. 5, p. 124, National Biochemical Research Foundation, ワシントンD.C. (1972)；本明細書に援用する]。

30

【0124】

本発明のポリペプチドは、天然細胞源から単離するか、あるいは化学合成することができるが、好ましくは本発明の宿主細胞を用いる組換え法により製造される。哺乳動物細胞の使用は、本発明の組換え発現生成物に最適な生物活性を付与するのに必要な翻訳後修飾（たとえばグリコシル化、トランケーション、脂質化およびリン酸化）を提供すると期待される。グリコシル化および非グリコシル化形のion-xポリペプチドが本発明に含まれる。

【0125】

本発明は、バリエーション（または類似体）ion-xポリペプチドをも含む。一例においては、1個以上のアミノ酸残基がion-x配列に補充された挿入バリエーションが提供される。挿入はタンパク質の一方または両方の末端に位置してもよく、あるいはion-xアミノ酸配列の内部領域に配置されてもよい。一方または両方の末端に付加残基をもつ挿入バリエーションには、たとえば融合タンパク質、およびアミノ酸タグまたは標識を含むタンパク質を含めることができる。

40

【0126】

挿入バリエーションには、ion-x配列またはその生物活性フラグメントに1個以上のアミノ酸残基が付加されたion-xポリペプチドが含まれる。

本発明のバリエーション生成物には、成熟ion-x生成物、すなわちリーダー配列またはシグナル配列が除去されたion-x生成物であって、付加アミノ末端残基をもつものも含まれる。付加アミノ末端残基は他のタンパク質に由来するものであってもよく、あるい

50

は特定のタンパク質に由来するものと同定できない1個以上の残基を含有してもよい。位置-1に付加メチオニン残基をもつion-x生成物(Met<sup>-1</sup>-ion-x)、および位置-2および-1に付加メチオニンおよびリシン残基をもつion-xバリエーション(Met<sup>-2</sup>-Lys<sup>-1</sup>-ion-x)が考慮される。付加Met、Met-Lys、Lys残基(または一般に1個以上の塩基性残基)をもつion-xバリエーションは、細菌宿主細胞における組換えタンパク質産生の増大に特に有用である。

【0127】

本発明は、特定の発現系の使用により得られる付加アミノ酸残基をもつion-xバリエーションをも含む。たとえば、目的ポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合生成物の一部として発現する市販ベクターを使用すると、目的ポリペプチドからGST成分を開裂させた後、位置-1に付加グリシン残基をもつ目的ポリペプチドが得られる。他のベクター系における発現により生じるバリエーションも考慮される。

10

【0128】

挿入バリエーションには、ion-xのアミノ末端および/またはカルボキシ末端が他のポリペプチドに融合した融合タンパク質も含まれる。

他の態様において本発明は、ion-xポリペプチド中の1個以上のアミノ酸残基が除去された欠失バリエーションを提供する。欠失はion-xポリペプチドの一方または両方の末端で行われてもよく、あるいはion-xの末端以外の1個以上のアミノ酸残基が除去されてもよい。したがって、欠失バリエーションにはすべてのion-xポリペプチドフラグメントが含まれる。

20

【0129】

本発明は、SEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列のポリペプチドフラグメントであって、ion-xポリペプチドの生物学的特性(たとえばリガンド結合性および/またはイオン転送性)および/または免疫学的特性を保持したフラグメントをも含む。

【0130】

本発明のある好ましい態様において、単離された核酸分子はSEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列に相同なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含み、その核酸分子はion-xの少なくとも一部をコードする。より好ましい態様において、単離された核酸分子はSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列ならびにそのフラグメントを含む。

30

【0131】

本発明において用いるポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列の少なくとも5、10、15、20、25、30、35または40個の連続アミノ酸を含む。好ましいポリペプチドフラグメントは、ヒトion-xならびにその対立遺伝子相同体および種相同体にユニークまたは特異的な抗原特性を示す。目的とする生物学的特性および免疫学的特性をもつ本発明のフラグメントは、当技術分野で周知のルーティンに実施されているいずれかの方法で作製できる。

40

【0132】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 1を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 1のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 1のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラ

50

グメントはSEQ ID NO: 1のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 1の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 1の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

【0133】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 2を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 2のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 2のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 2のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 2の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 2の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はNMDAグルタミン酸受容体に関連する配列を含む。

10

【0134】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 3を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 3のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 3のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 3のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 3の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 3の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はNMDAグルタミン酸受容体に関連する配列を含む。

20

【0135】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 4を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 4のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 4のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 4のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 4の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 4の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はNMDAグルタミン酸受容体に関連する配列を含む。

30

【0136】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 5を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 5のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 5のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 5のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 5の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 5の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、-2サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

40

【0137】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 6を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 6のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 6のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 6のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 6の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 6の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体に関連する配列を含む。

【0138】

50

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 7を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 7のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 7のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 7のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 7の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 7の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、-9鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0139】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 8を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 8のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 8のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 8のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 8の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 8の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体に関連する配列を含む。

【0140】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 9を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 9のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 9のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 9のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 9の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 9の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体に関連する配列を含む。

【0141】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 10を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 10のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 10のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 10のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 10の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 10の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、-1サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

【0142】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 11を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 11のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 11のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 11のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 11の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 11の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はグルタミン酸受容体、イオンチャンネル共役型カイニン酸4前駆体に関連する配列を含む。

【0143】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 12を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 12のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 12のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 12のいかなる部分に位置してもよく、SEQ

SEQ ID NO: 12の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 12の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 1 a鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0144】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 13を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 13のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 13のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 13のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 13の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 13の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 3鎖前駆体に関連する配列を含む。

10

【0145】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 14を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 14のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 14のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 14のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 14の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 14の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 4鎖前駆体に関連する配列を含む。

20

【0146】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 15を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 15のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 15のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 15のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 15の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 15の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 7鎖前駆体に関連する配列を含む。

30

【0147】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 16を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 16のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 16のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 16のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 16の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 16の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 9鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0148】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 17を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 17のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 17のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 17のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 17の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 17の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - 9鎖前駆体に関連する配列を含む。

40

【0149】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 18を含む。ある

50

いは、核酸分子はSEQ ID NO: 18のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 18のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 18のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 18の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 18の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、-9鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0150】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 19を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 19のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 19のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 19のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 19の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 19の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、-9鎖前駆体に関連する配列を含む。

10

【0151】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 20を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 20のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 20のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 20のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 20の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 20の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、-9鎖前駆体に関連する配列を含む。

20

【0152】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 21を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 21のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 21のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 21のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 21の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 21の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

30

【0153】

本発明の1他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 22を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 22のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 22のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 22のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 22の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 22の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

40

【0154】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 23を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 23のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 23のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 23のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 23の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO:

50

23の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0155】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 24を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 24のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 24のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 24のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 24の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 24の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

10

【0156】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 25を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 25のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 25のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 25のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 25の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 25の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

20

【0157】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 26を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 26のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 26のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 26のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 26の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 26の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0158】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 27を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 27のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 27のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 27のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 27の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 27の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

30

【0159】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 28を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 28のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 28のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 28のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 28の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 28の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

40

【0160】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 29を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 29のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ

50

ＩＤ ＮＯ：２９のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：２９のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：２９の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：２９の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

【０１６１】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO：３０を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO：３０のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO：３０のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：３０のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：３０の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：３０の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

10

【０１６２】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO：３１を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO：３１のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO：３１のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：３１のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：３１の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：３１の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

20

【０１６３】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO：３２を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO：３２のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO：３２のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：３２のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：３２の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：３２の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

30

【０１６４】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO：３３を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO：３３のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO：３３のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：３３のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：３３の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：３３の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

40

【０１６５】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO：３４を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO：３４のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO：３４のフラグメントであって、少なくとも１４、好ましくは少なくとも１６、１８、２０、２５、５０または７５個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO：３４のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO：３４の部分の１より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO：３４の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はアセチルコリン受容体、 - ４鎖前駆体（非 - ２）に関連する配列を含む。

50

ルコリン受容体、非鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0166】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 35を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 35のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 35のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 35のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 35の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 35の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、 $\pi$ サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

10

【0167】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 36を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 36のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 36のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 36のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 36の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 36の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、 $\pi$ -1サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

【0168】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 37を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 37のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 37のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 37のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 37の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 37の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、 $\pi$ -3サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

20

【0169】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 38を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 38のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 38のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 38のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 38の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 38の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、 $\pi$ -1サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

30

【0170】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 39を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 39のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 39のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 39のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 39の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 39の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、 $\pi$ サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

40

【0171】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 40を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 40のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 40のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも

50

16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 40のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 40の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 40の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、-2サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

【0172】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 41を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 41のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 41のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 41のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 41の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 41の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はGABA受容体、-2サブユニット前駆体に関連する配列を含む。

10

【0173】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 42を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 42のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 42のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 42のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 42の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 42の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はグルタミン酸受容体、イオンチャンネル共役型カイニン酸5前駆体(グルタミン酸受容体ka-2)に関連する配列を含む。

20

【0174】

本発明の1態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 43を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 43のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 43のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 43のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 43の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 43の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はグルタミン酸受容体、イオンチャンネル共役型カイニン酸5前駆体(グルタミン酸受容体ka-2)に関連する配列を含む。

30

【0175】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 44を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 44のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 44のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 44のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 44の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO: 44の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はグルタミン酸受容体前駆体(カイニン酸結合タンパク質)に関連する配列を含む。

40

【0176】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 45を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO: 45のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO: 45のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO: 45のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO: 45の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID

50



Q ID NO : 51のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 51のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 51の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 51の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はグリシン受容体、鎖前駆体に関連する配列を含む。

【0183】

本発明の他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO : 107を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO : 107のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO : 107のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 107のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 107の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 107の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

10

【0184】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO : 108を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO : 108のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO : 108のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 108のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 108の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 108の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

20

【0185】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO : 118を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO : 118のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO : 118のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 118のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 118の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 118の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

30

【0186】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO : 120を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO : 120のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO : 120のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 120のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 120の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 120の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

40

【0187】

本発明のさらに他の態様において、核酸分子はSEQ ID NO : 131を含む。あるいは、核酸分子はSEQ ID NO : 131のフラグメントを含む。好ましくは本発明は、SEQ ID NO : 131のフラグメントであって、少なくとも14、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続ヌクレオチドを含むものを提供する。このフラグメントはSEQ ID NO : 131のいかなる部分に位置してもよく、SEQ ID NO : 131の部分の1より多くを含んでもよく、あるいはSEQ ID NO : 131の部分の反復を含んでもよい。ある好ましい態様において、核酸

50

分子はセロトニン受容体に関連する配列を含む。

【0188】

さらに他の態様において本発明は、ion-xポリペプチドの置換バリエーションを提供する。置換バリエーションには、ion-xポリペプチドの1個以上のアミノ酸残基が除去されて他の残基と置き換えられたポリペプチドが含まれる。1態様において、置換は保存的性質のものである；しかし本発明は、保存的でない置換をも含む。この目的のための保存的置換は下記の表2、3または4に示すように定義できる。

【0189】

バリエーションポリペプチドには、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾により保存的置換が導入されたものが含まれる。アミノ酸は、物理的特性ならびにタンパク質の二次および三次構造への関与に従って分類できる。当技術分野において保存的置換は、あるアミノ酸が類似の特性をもつ他のアミノ酸により置換されたものと認識されている。保存的置換の例を下記の表2に示す(WO97/09433、10頁から、1997年3月13日公開(PCT/GB96/02197、9/6/96出願))。

10

【0190】

【表2】

表 2  
保存置換 I

側鎖特性	アミノ酸
脂肪族	
非極性	GAP ILV
極性-非荷電	CSTM NQ
極性-荷電	DE KR
芳香族	HFWY
その他	NQDE

20

30

【0191】

あるいは、保存的アミノ酸は表3に示すようにLehninger[BIOCHEMISTRY, 第2版; Worth Publishers, ニューヨーク州ニューヨーク(1975), pp. 71-77]の記載に従って分類できる。

【0192】

【表 3】

表 3  
保存置換 II

側鎖特性	アミノ酸	
非極性(疎水性)		
A.脂肪族:	ALIVP	
B.芳香族:	FW	
C.硫黄含有:	M	
D.境界:	G	10
非荷電一極性		
A.ヒドロキシル:	STY	
B.アミド:	NQ	
C.スルフヒドリル:	C	
D.境界:	G	
正に荷電(塩基性):	KRH	
負に荷電(酸性):	DE	

【0193】

さらに他の別法として、保存的置換の例を下記の表 4 に示す。

20

【0194】

【表 4】

表 4  
保存置換 III

元の残基	置換例	
Ala (A)	Val, Leu, Ile	
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	30
Asp (D)	Glu	
Cys (C)	Ser	
Gln (Q)	Asn	
Glu (E)	Asp	
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe	
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	
Met (M)	Leu, Phe, Ile	
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	
Pro (P)	Gly	
Ser (S)	Thr	40
Thr (T)	Ser	
Trp (W)	Tyr	
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	

【0195】

本発明のポリペプチドの定義は、アミノ酸残基の挿入、欠失または置換以外の修飾をもつポリペプチドを含むと理解すべきである。たとえば、修飾は共有結合性のものであってもよく、たとえばポリマー、脂質、他の有機部分および無機部分との化学結合を含む。そのような誘導体は、ポリペプチドの循環半減期を延長するために作製でき、あるいは目的とする細胞、組織または臓器に対するポリペプチドのターゲティング能を改善するために

50

設計できる。同様に本発明はさらに、1以上の水溶性ポリマー付加物、たとえばポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含むように共有結合により修飾されたion-xポリペプチドをも含む。天然ion-xがもつリガンド結合特性を示しかつより高レベルで発現するすバリアント、および構成性活性受容体を提供するバリアントは、本発明のアッセイ法に特に有用である；これらのバリアントは、疾患/症状の異常なion-x活性を特色とする細胞、組織および動物モデルの作製にも有用である。

#### 【0196】

関連態様において、本発明は精製された本発明のポリペプチドを含む組成物を提供する。好ましい組成物は、本発明のポリペプチドのほかに、医薬ビヒクル、賦形剤または媒質として用いられる医薬的に許容できる（すなわち無菌かつ無毒性）液体、半固体または固体希釈剤を含む。当技術分野で既知のいかなる希釈剤も使用できる。希釈剤の例には水、塩類溶液、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ステアリン酸マグネシウム、ヒドロキシ安息香酸メチルおよびプロピル、タルク、アルギナート、デンプン、乳糖、シヨ糖、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、リン酸カルシウム、鉱油ならびにカカオ脂が含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0197】

天然ion-xがもつリガンド結合特性を示しかつより高レベルで発現するすバリアント、および構成性活性受容体を提供するバリアントは、本発明のアッセイ法に特に有用である；これらのバリアントは、異常なion-x活性を特色とする疾患/症状の細胞、組織および動物モデルの作製にも有用である。

20

#### 【0198】

##### 抗体

本発明には、ion-xまたはそのフラグメントに特異的な抗体（たとえばモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、二官能性/二特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および相補性決定領域(CDR)-グラフト抗体；本発明のポリペプチドを特異的に認識するCDR配列を含む化合物が含まれる）も含まれる。本発明の好ましい抗体は、WO93/11236（1993年6月20日公開；その全体を本明細書に援用する）に記載の方法に従って調製され、同定されるヒト抗体である。Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびF<sub>v</sub>を含めた抗体フラグメントも本発明により提供される。本発明の抗体について述べる際に”に特異的”という用語は、本発明の抗体の可変部がion-xポリペプチドのみを認識して結合する（すなわち、ion-xと他の既知イオンチャンネルポリペプチドの間に局所的な配列同一性、相同性または類似性があったとしても、測定可能な結合親和性の差により、ion-xポリペプチドをその既知イオンチャンネルポリペプチドと識別できる）ことを示す。特異的抗体が、それらの抗体の可変部以外の配列、特にその分子の定常部、を介した相互作用により他のタンパク質（たとえば緑膿菌(S. aureus)プロテインA、またはELISA法における他の抗体）と相互作用してもよいことも理解されるであろう。本発明の抗体の結合特異性を測定するスクリーニングアッセイ法は当技術分野で周知であり、ルーティンに実施されている。そのようなアッセイ法の包括的考察については、Harlow et al. (編), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory: ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(1988), 6章参照。本発明のion-xポリペプチドのフラグメントを認識して結合する抗体も、この抗体がion-xポリペプチドに特異的であれば考慮される。本発明の抗体は、当技術分野で周知のルーティンに実施されているいかなる方法によっても調製できる。

30

40

#### 【0199】

本発明は、本発明のion-xに特異的な抗体を提供する。抗体特異性について以下にさらに詳細に記載する。ただし、文献にこれまでに記載されているポリペプチドから産生できる抗体であって偶然にion-xと交差反応しうる抗体（たとえば、両ポリペプチド

50

中に偶然に類似エピトープが存在するため)は、"交差反応性抗体"であることを強調すべきである。そのような交差反応性抗体は、ion-xに"特異的な"抗体ではない。抗体がion-xに特異的であるか、または他の既知受容体と交差反応性であるかの判定は、当技術分野で周知の幾つかのアッセイ法のいずれか、たとえばウェスタン・ブロッティングアッセイ法を用いて行われる。ion-xを発現する細胞の同定、およびion-x-リガンド結合活性の調節のためには、ion-xの細胞外エピトープに特異的に結合する抗体が好ましい。

#### 【0200】

ある好ましい別態様において、本発明はモノクローナル抗体を提供する。そのような抗体を産生するハイブリドーマも本発明の態様として考慮される。さらに他の別態様において、本発明はヒト化抗体を提供する。ヒト化抗体はin vivo療法適用に有用である。

10

#### 【0201】

他の別態様において本発明は、少なくとも1種類の抗体がion-xに特異的な本発明の抗体であるポリクローナル抗体を含む無細胞組成物を提供する。動物から単離した抗血清が組成物の一例であり、抗血清の抗体画分を水または他の希釈剤、賦形剤もしくはキャリアーに再懸濁したものを含む組成物もそうである。

#### 【0202】

さらに他の関連態様において、本発明はion-xに特異的な抗体に特異的な抗イデオタイプ抗体を提供する。

20

抗体が比較的小さな抗原結合ドメインを含み、これらを化学的に、または組換え法により単離できることは周知である。そのようなドメインは有用なion-x結合分子そのものであり、ヒト抗体に再導入するか、または毒素もしくは他のポリペプチドに融合させることもできる。したがって、さらに他の態様において本発明は、ion-x特異的抗体のフラグメントを含むポリペプチドを提供する；この場合、このフラグメントおよびポリペプチドがion-xに結合する。限定ではない一例として、本発明は、一本鎖抗体およびCDR-グラフト抗体であるポリペプチドを提供する。

#### 【0203】

ヒト以外の抗体を当技術分野で既知のいずれかの方法でヒト化することができる。1方法においては、ヒト以外のCDRをヒト抗体またはコンセンサス抗体の枠組み配列に挿入

30

#### 【0204】

本発明の抗体は、たとえば療法用(ion-xの活性を調節することによる)として、ion-xを検出または定量する診断用として、またion-xの精製に有用である。本明細書に記載するいずれかの目的に用いるための本発明の抗体を含むキットも含まれる。一般に本発明のキットは、それに対して抗体が免疫特異的である対照抗原も含む。

#### 【0205】

##### 組成物

ion-x遺伝子生成物の正常な機能を失うようなion-x遺伝子の変異がion-x関連のヒト疾病状態の原因である。本発明は、ion-x活性を回復させてこれらの疾病状態を処置する遺伝子療法を含む。適切な細胞への機能性ion-x遺伝子の送達は、ex vivo、in situ、またはin vivoで、ベクター、より具体的にはウイルスベクター(たとえばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルス)を用いて、あるいはex vivoで物理的DNA伝達方法(たとえばリポソームまたは化学的処理)を用いて行われる。たとえばAnderson, Nature, vol. 392, No. 6679への補稿, pp. 25-20(1998)参照。遺伝子療法の概説についてはさらにFriedmann, Science, 244: 1275-1281(1989); Verma, Scientific American: 68-84(1990); およびMiller, Nature, 357: 455-460(1992)

40

50

を参照されたい。あるいは他のヒト疾病状態においては、ion-x発現の阻止またはion-x活性の阻害が疾病状態の処置に有用であると考えられる。ion-xの発現を負に調節するためにはアンチセンス療法または遺伝子療法を適用できると考えられる。

#### 【0206】

本発明の他の態様は、前記のいずれかの核酸分子または組換え発現ベクターおよび医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む組成物（医薬組成物を含む）に関する。好ましくは、キャリアーまたは希釈剤は医薬的に許容できるものである。適切なキャリアーは、この分野の標準的参考文献であるRemington's Pharmaceutical Sciences, A. Osolの最新版に記載されている；その全体を本明細書に援用する。そのようなキャリアーまたは希釈剤の例には水、塩類溶液、リンゲル液、デキストロス溶液および5%ヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。リボソーム、および非水性ビヒクル、たとえば固定油も使用できる。配合物を常法により殺菌する。

#### 【0207】

本発明の範囲には、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体に、たとえば医薬的に許容できるキャリアーを配合したものを含む組成物も含まれる。

本発明は、本発明の抗体の使用方法をも提供する。たとえば本発明は、ion-xのリガンド結合性を調節する方法であって、ion-xとそのion-xに特異的な抗体を、抗体がこの受容体を結合する条件下で接触させる工程を含む方法を提供する。

#### 【0208】

脳に発現する可能性のあるイオンチャンネル、たとえばion-xは、異常なion-xシグナル伝達活性が1以上の神経障害または精神障害に相関することを示す。本発明は、神経障害または精神障害を処置する方法であって、その処置を必要とする哺乳動物に、その哺乳動物のニューロンにおいてion-xへのリガンド結合を調節するのに十分な量の本発明の抗体様ポリペプチドを投与する工程を含む方法をも提供する。ion-xは多数の組織においても発現する可能性がある。これには腎臓、結腸、小腸、胃、精巣、胎盤、副腎、末梢血白血球、骨髄、網膜、卵巣、胎児脳、胎児肝臓、心臓、脾臓、肝臓、肺、筋肉、甲状腺、子宮、前立腺、皮膚、唾液腺、および膵臓が含まれるが、これらに限定されない。本発明の特定のion-xが発現する組織を後記の実施例12において同定する。

#### 【0209】

##### キット

本発明はまた、医薬キットを含めたキットに関する。このキットは、前記のいずれかの核酸分子、前記のいずれかのポリペプチド、または前記の本発明ポリペプチドに結合するいずれかの抗体、および陰性対照を含むことができる。キットは、好ましくは他の要素、たとえば指示書、固体支持体、定量に有用な試薬などを含む。

#### 【0210】

他の態様において本発明は、疾患または障害の診断ツールとして試料中のポリペプチドを検出するための下記工程を含む方法である：(a) SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列をもつポリペプチドの核酸ターゲット領域にハイブリダイゼーションアッセイ条件下でハイブリダイズする核酸プローブと試料を接触させ、このプローブはこれらのポリペプチドをコードする核酸配列、そのフラグメント、ならびにこれらの配列およびフラグメントの相補体を含み；そして(b)疾患の指標としてプローブ：ターゲット領域のハイブリッドの存在または量を検出する。

#### 【0211】

本発明のある好ましい態様において、疾患は特に下記よりなる群から選択される：消化管障害；甲状腺障害（たとえば甲状腺中毒症、粘液水腫）；腎不全；炎症症状（たとえばクローン病）；細胞の分化および恒常性に関連する疾患；慢性関節リウマチ；自己免疫障

10

20

30

40

50

害；運動障害；CNS障害（たとえば疼痛：ニューロパシー性疼痛、片頭痛、および他の頭痛を含む；発作；精神障害および神経障害：不安、統合失調症、躁うつ病、不安、全般性不安障害、外傷後ストレス障害、うつ病、双極性障害、譫妄、痴呆、重篤な精神遅滞を含む；ジスキネジア、たとえばハンチントン病またはトゥレット症状群；注意欠陥障害：ADDおよびADHDを含む；ならびに変性性障害、たとえばパーキンソン病およびアルツハイマー病；運動障害：運動失調症、核上麻痺などを含む）；感染症、たとえばHIV-1またはHIV-2によるウイルス感染症；代謝および心血管疾患および障害（たとえば2型糖尿病、肥満症、食欲不振症、低血圧症、高血圧症、血栓症、心筋梗塞、心筋障害、アテローム性硬化症など）；増殖性疾患および癌（たとえば胸部癌、結腸癌、肺癌など種々の癌、および乾癬、前立腺肥大などの過増殖性障害）；ホルモン障害（たとえば雄性/雌性ホルモン置換、多嚢胞卵巣症候群、脱毛症など）；ならびに性的機能障害。

10

## 【0212】

組織が神経性であることを同定するために、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現またはタンパク質そのものを検出するように、キットを設計できる。たとえば、ion-x特異的DNAに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを入れた容器、ならびに所望により陽性対照および陰性対照を入れた各容器、ならびに/あるいは指示書を含む、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションキットを提供できる。同様に、ion-x特異的配列のDNAに特異的なプライマーを入れた容器、ならびに所望によりサイズマーカー、陽性対照および陰性対照を入れた各容器、ならびに/あるいは指示書を含む、PCRキットを提供できる。

20

## 【0213】

ハイブリダイゼーション条件は、他の核酸分子の存在下で前記遺伝子とだけハイブリダイゼーションが起きるものでなければならない。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下では、相補性の高い核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは、そのような条件は20個の連続ヌクレオチドにつき1つまたは2つの不適正塩基対をもつ核酸のハイブリダイゼーションを妨げる。そのような条件を前記に定義した。

## 【0214】

試料中の遺伝子の検出が診断となりうる疾患には、正常細胞と比較して核酸（DNAおよび/またはRNA）が増幅した疾患が含まれる。“増幅”とは、ある細胞において正常細胞と比較してDNAまたはRNAの数が増加することを意味する。

30

## 【0215】

試料中の核酸の検出により診断できる疾患には、好ましくは中枢神経系疾患および代謝疾患が含まれる。本発明の核酸検査法に適した被験試料には、たとえば細胞もしくは細胞の核酸抽出物、または生物学的流体が含まれる。前記方法に用いる試料は、アッセイ形式、検出方法、およびアッセイされる組織、細胞または抽出物の性質に応じて異なるであろう。細胞の核酸抽出物の調製方法は当技術分野で周知であり、採用する方法に適した試料を得るために容易に適合させることができる。

## 【0216】

あるいは、ion-xタンパク質に特異的な抗体を入れた容器、ならびに所望により陽性対照および陰性対照を入れた各容器、ならびに/あるいは指示書を含む、免疫アッセイキットを提供できる。

40

## 【0217】

ion-x結合パートナー、たとえば天然のリガンド、神経伝達物質、またはモジュレーター（アゴニストまたはアンタゴニスト）の同定に有用なキットも提供できる。障害または疾患の処置に有用な物質は、問題の疾患または障害の処置に対応する活性についての1以上のin vitroアッセイにおいて陽性結果を示すことが好ましい。前記ポリペプチドの活性を調節する物質には、好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、アゴニストおよびアンタゴニスト、ならびにプロテインキナーゼ阻害薬が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0218】

50

### 免疫応答を誘発する方法

本発明の他の態様は、哺乳動物に免疫応答を誘発するのに十分な量の本発明ポリペプチドを投与することにより、その哺乳動物において本発明ポリペプチドに対する免疫応答を誘発する方法に関する。その量は、動物の種、動物の体格などに依存するが、当業者が決定できる。

#### 【0219】

### リガンドを同定する方法

本発明は、ion-xを結合する化合物を同定するためのアッセイ法をも提供する。そのようなアッセイ法の一つは、下記の工程を含む：(a) ion-xを含む組成物を、ion-xを結合すると思われる化合物と接触させ；そして(b)その化合物とion-xの結合を判定する。1変法において、組成物は表面にion-xを発現する細胞を含む。他の変法では、単離されたion-x、またはion-xを含む細胞膜を用いる。結合は、たとえば標識化合物を用いて直接判定でき、あるいはその化合物により誘発されたion-xのイオン転送の測定を含めた幾つかの方法により間接的に判定できる。ion-xを結合すると判定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これにはin vivoモデルが含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0220】

単離または組換えion-x生成物、ion-xバリエーション、または好ましくはそのような生成物を発現する細胞を用いて、天然リガンドおよび合成化合物を含めた特異的結合分子を同定または開発できる。結合パートナーは、既知の免疫学的方法を用いて流体および組織試料中のion-x生成物を精製し、そしてion-x生成物を検出または定量するのに有用である。結合分子は、ion-xの生物活性、特にシグナル伝達に關与する活性の調節（たとえば遮断、阻害または刺激）にも有用なことは明らかである。

20

#### 【0221】

本発明により提供されるDNAおよびアミノ酸の配列情報は、ion-xポリペプチドまたはポリヌクレオチドが相互作用する結合パートナー化合物の同定も可能にする。結合パートナー化合物の同定方法には、溶液アッセイ法、ion-xポリペプチドを固定化したin vitroアッセイ法、および細胞ベースのアッセイ法が含まれる。ion-xポリペプチドの結合パートナー化合物の同定により、ion-xの正常および異常な生物活性に關連する病的状態に治療介入または予防介入するための候補が得られる。

30

#### 【0222】

本発明には、ion-x結合パートナーを同定するための幾つかのアッセイ系が含まれる。溶液アッセイにおいて、本発明方法は(a)ion-xポリペプチドを1種類以上の結合パートナー候補化合物と接触させ、そして(b)ion-xポリペプチドに結合する化合物を同定する工程を含む。ion-xポリペプチドを結合する化合物の同定は、ion-xポリペプチド/結合パートナー複合体を単離し、結合パートナー化合物をion-xポリペプチドから分離することにより達成できる。結合パートナー化合物の物理的、生物学的および/または生化学的特性を解明する追加工程も、本発明の他の態様に含まれる。1態様においては、ion-xポリペプチドまたは結合パートナー候補化合物のいずれかに対して免疫特異的な抗体を用いて、ion-xポリペプチド/結合パートナー複合体を単離する。

40

#### 【0223】

さらに他の態様においては、ion-xポリペプチドまたは結合パートナー候補化合物のいずれかが、その単離を容易にする標識またはタグを含み、結合パートナー化合物を同定するための本発明方法は、この標識またはタグとの相互作用によりion-xポリペプチド/結合パートナー複合体を単離する工程を含む。このタイプのタグの一例は、一般に約6個のヒスチジン残基のポリ-ヒスチジン配列であり、こうして標識された化合物をニッケルキレーションにより単離できる。他の標識およびタグ、たとえば当技術分野で周知のルーティンに用いられるFLAG（登録商標）タグ（Eastman Kodak, 二

50

ューヨーク州ロチェスター)が本発明に含まれる。

【0224】

In vitroアッセイ法の1変法において、本発明は(a)固定化したion-xポリペプチドと結合パートナー候補化合物を接触させ、そして(b)ion-xポリペプチドへの候補化合物の結合を検出する工程を含む方法を提供する。他の態様においては、結合パートナー候補化合物を固定化し、ion-xの結合を検出する。固定化は当技術分野で周知のいずれかの方法を用いて達成できる。これには下記の方法が含まれる：支持体、ビーズもしくはクロマトグラフィー樹脂への共有結合、および共有結合以外の高親和性相互作用、たとえば抗体結合、または固定化される化合物がビオチン部分を含むストレプトアビジン/ビオチン結合の使用。結合の検出は下記により達成できる：(i)固定化しない化合物に放射性標識を使用、(ii)固定化しない化合物に蛍光を使用、(iii)固定化しない化合物に対して免疫特異的な抗体を使用、(iv)固定化した化合物が結合している蛍光性支持体を励起する標識を、固定化しない化合物に使用；および当技術分野で周知のルーティンに実施されている他の方法。

10

【0225】

本発明は、ion-xポリペプチドの結合パートナー化合物を同定するための細胞ベースのアッセイ法をも提供する。1態様において本発明は、細胞表面に発現したion-xポリペプチドを結合パートナー候補化合物と接触させ、そしてion-xポリペプチドへの結合パートナー候補化合物の結合を検出する工程を含む方法を提供する。ある好ましい態様において検出は、前記分子への結合により細胞に生じたカルシウムフラックスまたは他の生理学的現象の検出を含む。

20

【0226】

本発明の他の態様は、ion-xまたはion-xをコードする核酸分子のいずれかに結合する化合物を同定する方法であって、ion-xまたはそれをコードする核酸分子と化合物を接触させ、そしてその化合物がion-xまたはそれをコードする核酸分子を結合するかを判定することを含む方法に関する。結合は当業者に周知の結合アッセイ法により判定でき、これには下記の方法が含まれるが、これらに限定されない：ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット、放射性標識競合アッセイ、ファージベースの発現クローニング、クロマトグラフィーによる同時分画、共沈、架橋、相互作用トラップ/2ハイブリッド分析、サウスウェスタン分析、ELISAなど；これらはたとえばCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1999, John Wiley & Sons (ニューヨーク)に記載されており、その全体を本明細書に援用する。スクリーニングされる化合物には、細胞外、細胞内、生物または化学物質に由来するものが含まれる(ion-xまたはそれをコードする核酸分子を結合すると推測される化合物も含まれる)が、これらに限定されない。本発明方法は、標識、たとえば放射性標識(たとえば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ )、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識および免疫学的標識に結合したリガンド、特に神経ペプチドをも含む。本発明の範囲に含まれるモジュレーターには非ペプチド分子、たとえば非ペプチド模倣体、非ペプチドアロステリックエフェクター、およびペプチドが含まれるが、これらに限定されない。そのような試験に用いられるion-xポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、溶液中で自由であるか、固体支持体に結合しているか、細胞表面に保有されているか、あるいは細胞内に位置し、または細胞の一部と結合している。当業者は、たとえばion-xと被験化合物の複合体形成を測定できる。あるいは当業者は、被験化合物により生じたion-xとその基質の複合体の形成の減少を調べることができる。

30

40

【0227】

本発明の他の態様においては、ion-xに対する適切な結合親和性をもつ化合物のハイスクリーンングを採用する。要約すると、多数の異なる小ペプチド被験化合物を固体支持体上で合成する。これらのペプチド被験化合物をion-xと接触させ、そして洗浄する。次いで、結合したion-xを当技術分野で周知の方法により検出する。精製された本発明のポリペプチドを、前記の薬物スクリーニング法に用いるプレート上

50

に直接コーティングすることもできる。さらに、非中和抗体を用いてタンパク質を捕獲し、それを固体支持体上に固定化することもできる。

【0228】

一般に、発現した *ion-x* をその特定リガンド（この場合は *ion-x* を活性化する対応する神経ペプチド）と共に HTS 結合アッセイに使用できる。同定したペプチドを、当業者に周知の方法により、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>35</sup>S または <sup>32</sup>P を含めた（これらに限定されない）適切な放射性同位体で標識する。あるいは、周知の方法によりペプチドを適切な蛍光性誘導体で標識してもよい（Baindur et al., Drug Dev Res., 1994, 33, 373-398; Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160）。組換えタンパク質を発現する細胞系から調製した膜調製物中の受容体に特異的に結合した放射性リガンドは、幾つかの標準法のいずれかの HTS アッセイ法において検出できる；これには、結合したリガンドを結合していないリガンドから分離するための受容体-リガンド複合体の濾過が含まれる（Williams, Med. Res. Rev., 1991, 11, 147-184; Sweetnam et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455）。別法には、そのような分離を必要としないシンチレーション近接アッセイ（SPA）または Flash Plate 形式が含まれる（Nakayama, Cur. Opin. Drug. Disc. Dev., 1998, 1, 85-91; Bosse et al., J. Biomolecular Screening, 1998, 3, 285-292）。蛍光性リガンドの結合は多様な方法で検出でき、これには蛍光エネルギー伝達（FRET）、結合したリガンドの直接分光蛍光測光分析、または蛍光偏光が含まれる（Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160; Hill, Cur. Opin. Drug. Disc. Dev., 1998, 1, 92-97）。

【0229】

他のアッセイ法を用いて *ion-x* 受容体の特異的リガンドを同定できる。これには、ターゲットタンパク質への被験リガンドの直接結合を測定することによりターゲットタンパク質のリガンドを同定するアッセイ法、およびイオンスプレー質量分析/HPLC法によるアフィニティー限外濾過によりターゲットタンパク質のリガンドを同定するアッセイ法、または他の物理的方法および分析法が含まれる。あるいは、Fields et al., Nature, 340: 245-246 (1989) および Fields et al., Trends in Genetics, 10: 286-292 (1994)（両者を本明細書に援用する）に記載される酵母ツーハイブリッドシステムを用いて、そのような結合相互作用を間接的に評価する。ツーハイブリッドシステムは2種類のタンパク質またはポリペプチド間の相互作用を検出するための遺伝学的アッセイ法である。それは、問題となっている既知タンパク質に結合するタンパク質の同定、または相互作用に重要なドメインもしくは残基の解明に使用できる。DNA結合タンパク質をコードする遺伝子のクローニング、あるタンパク質に結合するペプチドの同定、および薬物スクリーニングのために、この方法の変法が開発された。ツーハイブリッドシステムは、相互作用するタンパク質対が、レポーター遺伝子の上流活性化配列（UAS）に結合するDNA結合ドメインに転写活性化ドメインを近接させる能力を利用し、一般に酵母において行われる。このアッセイ法には下記をコードする2種類のハイブリッド遺伝子の構築が必要である：（1）第1タンパク質に融合したDNA結合ドメイン、および（2）第2タンパク質に融合した活性化ドメイン。DNA結合ドメインは、第1ハイブリッドタンパク質をレポーター遺伝子のUASにターゲティングする；しかし、大部分のタンパク質は活性化ドメインをもたないので、このDNA結合ハイブリッドタンパク質はレポーター遺伝子の転写を活性化しない。活性化ドメインを含む第2ハイブリッドタンパク質自体は、UASに結合しないのでレポーター遺伝子の発現を活性化できない。しかし、両方のハイブリッドタンパク質が存在すると、第1タンパク質と第2タンパク質の非共有相互作用により活性化ドメインがUASに繋ぎ留められ、レポーター遺伝子の転写が活性化される。たとえば、第

10

20

30

40

50

1 タンパク質がイオンチャンネル遺伝子生成物またはそのフラグメント（他のタンパク質もしくは核酸と相互作用することが分かっている）である場合、このアッセイ法を利用して、結合相互作用を妨害する薬剤を検出できる。種々の被験薬剤をこの系に添加してレポーター遺伝子の発現をモニターする。阻害薬が存在すると、レポーターシグナルが失われる。

#### 【0230】

酵母ツーハイブリッドアッセイ法を利用して、遺伝子生成物に結合するタンパク質を同定することもできる。ion-x受容体またはそのフラグメントに結合するタンパク質を同定するアッセイにおいては、ion-x受容体（またはフラグメント）およびUAS結合ドメイン（すなわち第1タンパク質）の両方をコードする融合ポリヌクレオチドを使用できる。さらに、活性化ドメインに融合した異なる第2タンパク質をそれぞれコードする多数のハイブリッド遺伝子を調製し、このアッセイ法でスクリーニングすることができる。一般に第2タンパク質は全cDNAまたはゲノムDNA融合ライブラリーの1以上のメンバーによりコードされ、第2タンパク質コード領域はそれぞれ活性化ドメインに結合している。この系は多様なタンパク質に適用でき、第2結合タンパク質の正体または機能が分かっている必要すらない。この系は高感度であり、他の方法で解明されない相互作用を検出できる；一過性の相互作用ですら、安定なmRNAを産生する転写の引き金を引く可能性があり、これにより反復翻訳されてレポータータンパク質を得ることができる。

10

#### 【0231】

他のアッセイ法を用いて、ターゲットタンパク質に結合する薬剤を探索できる。ターゲットタンパク質への被験リガンドの直接結合を同定するようなスクリーニング法の一つがUSP5, 585, 277に記載されており、これを本明細書に援用する。この方法は、タンパク質は一般に折りたたまれた状態と折りたたまれていない状態の混合物として存在し、これら2つの状態間で絶えず変動しているという原理に依存する。被験リガンドが折たたまれた形のターゲットタンパク質に結合すると（すなわち被験リガンドがターゲットタンパク質のリガンドであると）、リガンドが結合したターゲットタンパク質分子はその折りたたまれた状態を維持する。したがって、折りたたまれたターゲットタンパク質が存在する度合いは、ターゲットタンパク質を結合する被験リガンドの存在下の方がリガンドの不存在下より大きい。ターゲットタンパク質へのリガンドの結合は、ターゲットタンパク質の折りたたまれた状態と折りたたまれていない状態を識別するいずれかの方法で判定できる。このアッセイを実施するためにターゲットタンパク質の機能が分かっている必要はない。この方法で実質的にいかなる物質も被験リガンドとして評価でき、これには金属、ポリペプチド、タンパク質、脂質、多糖類、ポリヌクレオチド、および有機低分子が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0232】

ターゲットタンパク質のリガンドを同定するための他の方法は、Wieboldt et al., Anal. Chem., 69:1683-1691 (1997)に記載されており、これを本明細書に援用する。この方法は、一度に20~30種類の物質のコンビナトリアルライブラリーを溶液相でターゲットタンパク質への結合についてスクリーニングする。ターゲットタンパク質に結合する物質を、簡単な膜洗浄により他のライブラリー成分から分離する。フィルターに保持されている特異的に選択された分子を、次いでターゲットタンパク質から遊離させ、HPLCおよび空気介助エレクトロスプレー（イオンスプレー）イオン化質量分析法により分析する。この方法で、ターゲットタンパク質に対する親和性が最大のライブラリー成分が選択され、特に低分子ライブラリーに有用である。

40

#### 【0233】

本発明の他の態様は、競合スクリーニングアッセイ法の使用を含む。この方法では、本発明のポリペプチドを結合しうる中和抗体が、そのポリペプチドへの結合に対して被験化合物と特異的に競合する。こうして、抗体を用いてion-xと共通の1以上の抗原決定基をもつペプチドの存在を検出できる。放射性標識競合結合試験はA. H. Lin et al., Antimicrobial Agents and Chemothera

50

py, 1997, 41(10): 2127-2131に記載されており、その内容全体を本明細書に援用する。

#### 【0234】

##### 調節薬の同定

本発明は、ion-xとion-x結合パートナーの結合のモジュレーターを同定するための、下記の工程を含む方法をも提供する：(a) ion-x結合パートナーとion-xを含む組成物とを推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ；(b) 結合パートナーとion-xの結合を検出し；そして(c) 推定モジュレーターの不存在下での結合と比較した、推定モジュレーター化合物の存在下での結合パートナーとion-xの結合の低下および増強からみて、推定モジュレーター化合物またはモジュレーター化合物を同定する。ion-xとion-x結合パートナーの結合を調節すると同定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これにはin vivoモデルが含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0235】

ion-x活性を刺激するion-x結合パートナーは、不十分なion-xシグナル伝達（たとえばion-xリガンド活性が不十分な結果として）を特色とする疾病状態または症状においてアゴニストとして有用である。リガンド仲介ion-xシグナル伝達を遮断するion-x結合パートナーは、過剰なion-xシグナル伝達を特色とする疾病状態または症状を処置するためのion-xアンタゴニストとして有用である。さらに、ion-xモジュレーター全般ならびにion-xポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、そのような疾病または症状の診断アッセイに有用である。

20

#### 【0236】

他の態様において本発明は、その処置を必要とする患者に、SEQ ID NO: 52 ~ SEQ ID NO: 102ならびにSEQ ID NO: 105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択される配列をもつポリペプチドの活性または発現を調節する物質を投与することにより、疾患または異常な状態を処置する方法を提供する。

#### 【0237】

ion-xの活性または発現を調節（すなわち増強、低下、または遮断）する薬剤は、ion-xポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含有する細胞と共に推定モジュレーターをインキュベートし、そしてion-xの活性または発現に対する推定モジュレーターの影響を判定することにより同定できる。ion-xの活性を調節する化合物の選択性は、ion-xに対するその作用と他のイオンチャンネル化合物に対するその作用を比較することにより評価できる。選択的モジュレーターには、たとえばion-xポリペプチドまたはion-xコード核酸に特異的に結合する抗体および他のタンパク質、ペプチド、または有機分子を含めることができる。ion-x活性のモジュレーターは、正常または異常なion-x活性が関与する疾患および生理学的状態を処置する療法に有用であろう。ion-x活性を調節すると同定された化合物は、それらの活性を確認または定量するためにさらに他のアッセイ法で試験することができる。これにはin vivoモデルが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0238】

ion-xポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびモジュレーターは、特に下記の疾患および症状の処置に使用できる：感染症、たとえばHIV-1またはHIV-2によるウイルス感染症；消化管障害；甲状腺障害（たとえば甲状腺中毒症、粘液水腫）；腎不全；炎症症状（たとえばクローン病）；細胞の分化および恒常性に関連する疾患；慢性関節リウマチ；自己免疫障害；運動障害；CNS障害（たとえば疼痛：ニューロパシー性疼痛、片頭痛、および他の頭痛を含む）；発作；精神障害および神経障害：不安、統合失調症、躁うつ病、不安、全般性不安障害、外傷後ストレス障害、うつ病、双極性障害、譫妄、痴呆、重篤な精神遅滞を含む；ジスキネジア、たとえばハンチントン病またはトゥレット症状群；注意欠陥障害：ADDおよびADHDを含む；ならびに変性性障害、たとえばパーキ

50

ンソン病およびアルツハイマー病；運動障害：運動失調症、核上麻痺などを含む）；感染症、たとえばH I V - 1またはH I V - 2によるウイルス感染症；代謝および心血管疾患および障害（たとえば2型糖尿病、肥満症、食欲不振症、低血圧症、高血圧症、血栓症、心筋梗塞、心筋障害、アテローム性硬化症など）；増殖性疾患および癌（たとえば胸部癌、結腸癌、肺癌など種々の癌、および乾癬、前立腺肥大などの過増殖性障害）；ホルモン障害（たとえば雄性/雌性ホルモン置換、多嚢胞卵巣症候群、脱毛症など）；ならびに性的機能障害。i o n - xポリヌクレオチドおよびポリペプチドならびにi o n - xモジュレーターは、そのような疾患または症状の診断アッセイにも使用できる。

#### 【0239】

モジュレーターを同定するための本発明方法には、結合パートナー化合物を同定するための前記のいずれかの方法の変法が含まれる。これらの変法には、結合パートナー化合物を同定し、そして候補モジュレーターの存在下または不存在下で結合アッセイを実施する方法が含まれる。候補モジュレーター化合物の不存在での結合と比較して候補モジュレーターの存在下でi o n - xポリペプチドと結合パートナー化合物の結合が変化した場合に、モジュレーターと同定される。i o n - xポリペプチドと結合パートナー化合物の結合を増強するモジュレーターは増強薬または活性化剤と表現され、i o n - xポリペプチドと結合パートナー化合物の結合を低下させるモジュレーターは阻害薬と表現される。

#### 【0240】

本発明は、i o n - xポリペプチドと相互作用し、またはその生物活性を阻害する（すなわち酵素活性、結合活性などに影響を及ぼす）化合物を同定するための、ハイスループットスクリーニング（H T S）アッセイ法をも含む。H T Sアッセイは、多数の化合物の効果的なスクリーニングを可能にする。i o n - x受容体-リガンド相互作用を調べるための細胞ベースのH T S系が考慮される。H T Sアッセイは目的特性をもつ”ヒット”または”リード化合物”を同定するように設計され、これらからその目的特性を改良するための修飾を設計できる。”ヒット”または”リード化合物”の化学的修飾は、”ヒット”とi o n - xポリペプチドの同定可能な構造/活性関係に基づく場合が多い。

#### 【0241】

本発明の他の態様は、i o n - xの活性を調節（すなわち増強または低下）する化合物を同定する方法であって、i o n - xをある化合物と接触させ、そしてその化合物がi o n - xの活性を修飾するかを判定することを含む方法に関する。被験化合物の不存在下での活性と対比した被験化合物の存在下での活性を測定する。当業者は、たとえば前記の電気生理学的方法を用いてイオンチャンネルポリペプチドの活性を測定できる。被験化合物を含有する試料の活性が被験化合物を含有しない試料の活性より高い場合、その化合物が活性を増大させたのであろう。同様に、被験化合物を含有する試料の活性が被験化合物を含有しない試料の活性より低い場合、その化合物が活性を阻害したのであろう。

#### 【0242】

本発明ポリペプチドの活性は、限定ではないが、たとえば下記のを結合または活性化される能力によっても測定できる：特定のリガンド：既知の神経伝達物質を含むが、これらに限定されない；アゴニストおよびアンタゴニスト：セロトニン、アセチルコリン、ニコチン、およびG A B Aを含むが、これらに限定されない。あるいはイオンチャンネルの活性は、カルシウムイオン、ホルモン、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ヌクレオチド、脂質、臭気物質および光子を結合する能力、またはそれらにより影響される可能性などの活性を調べることによりアッセイできる。この方法の多様な態様において、アッセイは下記の形をとることができる：イオンフラックスアッセイ、膜電位アッセイ、酵母増殖アッセイ、c A M Pアッセイ、イノシトールトリリン酸アッセイ、ジアシルグリセロールアッセイ、エクオリンアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、細胞内C a <sup>2+</sup>濃度に関するF L I P Rアッセイ、マイトジェネシスアッセイ、M A Pキナーゼ活性アッセイ、アラキドン酸放出アッセイ（たとえば[<sup>3</sup>H]-アラキドン酸を使用）、および細胞外酸性化速度に関するアッセイ、ならびに当技術分野で一般に知られている他の結合または機能をベースとするアッセイ法。

10

20

30

40

50

## 【0243】

イオンチャンネルの活性を調べるのに有用な可能性のある他のアッセイ法は、電気生理学的方法、すなわち細胞膜のイオン透過性の測定である。この方法は、たとえば下記に記載されている：ELECTROPHYSIOLOGY, A PRACTICAL APPROACH, 編者D. I. Wallis, オックスフォード大学出版社 IRL Press (1993)、およびVOLTAGE AND PATCH CLAMPING WITH MICROELECTRODES, 編者Smithら, 米国生理学会Waverly Press, Inc. (1985); これらそれぞれの全体を本明細書に援用する。

## 【0244】

イオンチャンネル活性を調べるための他のアッセイ法は、たとえば膜電位を測定する細胞ベースのハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイを実施するためにPharmacia CorporationのDr. Vince Groppiが開発したFLIPR(Fluorometric Imaging Plate Reader、蛍光イメージングプレートリーダー)システムを用いるものである。細胞膜電位の変化は、細胞内または外へのイオンの移動に伴うイオンチャンネルの調節と相関する。FLIPRシステムは膜電位のそのような変化を測定する。これは、イオンチャンネル遺伝子を発現する細胞に、膜電位の変化を測定するのに適した細胞膜透過性蛍光指示薬色素、たとえばdiBAC(ビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)ペンタメチンオキソノール、Molecular Probes)を添加することにより達成される。したがって、イオンチャンネル活性の調節は、diBAC色素の発光スペクトルの変化としてFLIPRにより評価および検出できる。

## 【0245】

本発明は、多様な薬物スクリーニング法のいずれかにおいて、ion-xを用いて化合物をスクリーニングするのに特に有用である。スクリーニングされる化合物(ion-x活性を調節すると推測される化合物を含む)には、細胞外、細胞内、生物または化学物質起源のものが含まれるが、これらに限定されない。そのような試験に用いるion-xポリペプチドはいかなる形態であってもよく、好ましくは溶液中で自由であるか、固体支持体に結合しているか、細胞表面に保有されているか、あるいは細胞内に位置する。当業者は、たとえばion-xと被験化合物の複合体形成を測定できる。あるいは当業者は、被験化合物により生じたion-xとその基質の複合体の形成の減少を調べることができる。

## 【0246】

本発明のion-xポリペプチドの活性は、たとえば化学合成されたペプチドリガンドを結合する能力またはそれらにより活性化される可能性を調べることにより測定できる。あるいはion-xポリペプチドの活性は、カルシウムイオン、ホルモン、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ヌクレオチド、脂質、臭気物質および光子を結合する能力を調べることによりアッセイできる。あるいはion-xポリペプチドの活性は、アデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼおよびイオンチャンネルを含めた(これらに限定されない)エフェクター分子の活性を調べることにより判定できる。よって、ion-xポリペプチド活性のモジュレーターはイオンチャンネル機能、たとえばチャンネルの結合特性またはイオン選択性などの活性を変化させる可能性がある。この方法の多様な態様において、アッセイは下記の形をとることができる：イオンフラックスアッセイ、酵母増殖アッセイ、cAMPアッセイ、イノシトールトリリン酸アッセイ、ジアシルグリセロールアッセイ、エクオリンアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に関するFLIPRアッセイ、マイトジェネシスアッセイ、MAPキナーゼ活性アッセイ、アラキドン酸放出アッセイ(たとえば[<sup>3</sup>H]-アラキドン酸を使用)、および細胞外酸性化速度に関するアッセイ、ならびに当技術分野で一般に知られている他の結合または機能をベースとするion-x活性のアッセイ法。ion-x活性は、当業者に周知のFARF活性アッセイに用いられる方法により測定できる。本発明によるion-x受容体の生物活性には、天然または天然以外のリガンドの結合、および当技術分野で既知のイオンチャンネル

機能活性のいずれか1以上が含まれるが、これらに限定されない。

【0247】

本発明のモジュレーターは多様な化学構造を示し、一般に天然イオンチャンネルリガンドの非ペプチド模倣体、イオンチャンネルのペプチドおよび非ペプチドアロステリックエフェクター、ならびにイオンチャンネルの活性化薬または阻害薬（競合的、不競合的および非競合的）として機能しうるペプチド（たとえば抗体生成物）に分類できる。本発明は適切なモジュレーターの供給源を限定せず、それらは天然の供給源、たとえば植物、動物もしくは鉱物の抽出物、または天然以外の供給源、たとえばライブラリー構築のためのコンビナトリアルケミストリー法の生成物を含めた低分子ライブラリー、ならびにペプチドライブラリーから得ることができる。

10

【0248】

イオンチャンネルの有機モジュレーターの例はGABA、セロトニン、アセチルコリン、ニコチン、グルタメート、グリシン、NMDA、およびカイニン酸である。

他のアッセイ法を用いて酵素活性を調べることができ、これには測光法、放射能測定法、HPLC、電気化学的方法などが含まれるが、これらに限定されない；これらはたとえばENZYMES ASSAYS: A PRACTICAL APPROACH, 編者R. E. Eisinger and M. J. Danson, 1992 (オックスフォード大学出版社)に記載されており、その全体を本明細書に援用する。

【0249】

イオンチャンネルをコードするcDNAを薬物探索計画に用いることは周知である；1日数千種類の未知化合物をハイスループットスクリーニング(HTS)で試験できるアッセイ法については十分に文献記載されている。文献には放射性標識リガンドを薬物探索のためのHTS結合アッセイに使用する例が多数示されている(概説に関しては: Williams, Medicinal Research Reviews, 1991, 11, 147-184; Sweetnam et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455参照)。結合アッセイHTSには組換え受容体が好ましい。それらは、より良好な特異性(より高い相対純度)を示し、多量の受容体材料を産生することができ、かつ多様な形式に使用できるからである(参照: Hodgson, Bio/Technology, 1992, 10, 973-980; これらそれぞれの全体を本明細書に援用する)。

20

30

【0250】

組換え受容体の機能発現には、当業者に周知の多様なヘテロロガス系を利用できる。そのような系には下記のものが含まれる: 細菌(Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences, 1992, 13, 95-98)、酵母(Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494)、数種類の昆虫細胞(Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology, 1996, 164, 189-268)、両生類細胞(Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8, 629-634)および数種類の哺乳動物細胞系(CHO、HEK-293、COSなど; 参照: Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology, 1997, 334, 1-23)。これらの例は、ネマトーダから得られる細胞系(PCT出願WO98/37177)を含めた他の可能な細胞発現系の使用を除外しない。

40

【0251】

本発明の好ましい態様において、ion-x活性を調節する化合物のスクリーニング方法は、被験化合物をion-xと接触させ、そしてその化合物とion-xの複合体の存在をアッセイすることを含む。そのようなアッセイにおいて、リガンドは一般に標識される。適切なインキュベーションの後、遊離リガンドを結合形で存在するものから分離し、遊離または非複合化標識の量はその化合物がion-xを結合する能力の尺度である。

【0252】

50

そのような生物学的応答の例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：特異的に遺伝子工学処理した酵母細胞が制限栄養素の不存在下で生存する能力 (Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494)；蛍光色素により測定した細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化 (Murphy, et al., Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 192-199)。蛍光変化を利用して、リガンド誘発性の膜電位または細胞内 pH の変化をモニターすることもできる；これらの目的に対する HTS に適した自動化システムが記載されている (Schroeder, et al., J. Biomolecular Screening, 1996, 1, 75-80)。アフリカツメガエル種 (Xenopus laevis) から調製した黒色素胞は、ヘテロログイオンチャンネル活性化にตอบสนองして、リガンド依存性の色素オーガニゼーション変化を示す；この変化を HTS 形式に適用できる (Jayawickreme et al., Curr. Opin. Biotechnology, 1997, 8, 629-634)。cAMP、ホスホイノシチドおよびアラキドン酸を含めた一般的なセカンドメッセンジャーを測定するためのアッセイ法もあるが、これらは一般に HTS には好ましくない。

10

**【0253】**

本発明の他の態様においては、永久トランスフェクション CHO 細胞を、有意量の組換え受容体タンパク質を含有する膜の調製に使用できる；次いでこれらの膜調製物を受容体結合アッセイに用い、その際その受容体に特異的な放射性標識リガンドを使用する。あるいは、機能アッセイ、たとえばこれらの各受容体を個別にまたは組み合わせて含有する永久トランスフェクション CHO 細胞におけるリガンド誘発による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度または膜電位の変化の蛍光モニタリングが、HTS に好ましいであろう。同様に好ましいのは、同様な形式における別タイプの哺乳動物細胞、たとえば HEK-293 または COS 細胞である。より好ましいのは、永久トランスフェクション昆虫細胞系、たとえばショウジョウバエ (Drosophila) S2 細胞であろう。さらに好ましいのは、当業者に周知の HTS 形式におけるキイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) 受容体を発現する組換え酵母細胞であろう (たとえば Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494)。

20

**【0254】**

本発明は、ion-x に結合するリガンドの阻害薬をスクリーニングおよび同定するための多数のアッセイ法を考慮する。一例においては、ion-x を固定化し、候補モジュレーター、たとえば阻害化合物の存在下および不存在下で結合パートナーとの相互作用を評価する。他の例では、溶液アッセイ法において、候補阻害化合物の存在下と不存在下の両方で ion-x とその結合パートナーとの相互作用を評価する。いずれのアッセイ法においても、ion-x とその結合パートナーの結合を低下させる化合物として阻害薬を同定する。考慮される他のアッセイ法は、形質転換またはトランスフェクションした宿主細胞における正のシグナルの検出によりタンパク質/タンパク質相互作用の阻害薬を同定するジハイブリッドアッセイの変法を伴う；PCT 公開番号 WO 95/20652 に記載：1995年8月3日公開。

30

**【0255】**

本発明により考慮される候補モジュレーターには、潜在活性化薬または潜在阻害薬のライブラリーから選択される化合物が含まれる。低分子モジュレーターの同定に用いられる多種多様なライブラリーがあり、これには (1) 化学物質ライブラリー、(2) 天然物ライブラリー、および (3) ランダムペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子からなるコンビナトリアルライブラリーが含まれる。化学物質ライブラリーはランダムな化学構造体からなり、それらのうちあるものは既知化合物の類似体または他の薬物探索スクリーニングにおいて "ヒット" もしくは "リード" と同定されている化合物の類似体であり、それらのうちあるものは天然物に由来し、それらのうちあるものは無制御の合成有機化学から得られたものである。天然物ライブラリーは、下記によりスクリーニング用混合物を調製するために用いた微生物、動物、植物または海洋生物の回収物である：(1) 土壌、

40

50

植物もしくは海洋微生物からの発酵およびブロスの抽出、または(2)植物もしくは海洋生物の抽出。天然物ライブラリーには、ポリペプチド、非リボソームペプチド、およびそのバリエーション(天然に存在しないもの)が含まれる。概説についてはScience 282: 63-68 (1998)参照。コンビナトリアルライブラリーは、多数のペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機化合物を混合物として含む。これらのライブラリーは伝統的な自動合成法、PCR、クローニング、または特許合成法で比較的容易に調製される。特に重要なものは、ペプチド以外のコンビナトリアルライブラリーである。さらに他の対象のライブラリーには、ペプチド、タンパク質、ペプチド模倣体、多重平行合成の回収物、組換えおよびポリペプチドのライブラリーが含まれる。コンビナトリアルケミストリーおよびそれにより作製されたライブラリーの概説についてはMyers, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 701-707 (1997)参照。本明細書に記載する種々のライブラリーを用いてモジュレーターを同定することにより、候補"ヒット"(または"リード")を修飾して"ヒット"の効力を最適化できる。

10

**【0256】**

本発明により考慮されるさらに他の候補阻害薬を設計でき、これには可溶性の結合パートナー、およびキメラタンパク質または融合タンパク質のような結合パートナーが含まれる。本明細書中で用いる"結合パートナー"には、広く非ペプチドモジュレーター、ならびにペプチドモジュレーター、たとえば神経ペプチド(天然リガンド以外のもの)、抗体、抗体フラグメント、および、同定されたion-x遺伝子の発現生成物に免疫特異的な抗体ドメインを含む修飾化合物が含まれる。

20

**【0257】**

本発明のポリペプチドは、相互作用性調節タンパク質の同定、特性解明および精製のための研究ツールとして用いられる。当技術分野で既知の多様な方法で適切な標識を本発明のポリペプチドに取り込ませ、それらのポリペプチドを相互作用分子の捕獲に用いる。たとえば分子を標識ポリペプチドと共にインキュベートし、結合していないポリペプチドを洗浄除去し、そしてポリペプチド複合体を定量する。種々の濃度のポリペプチドを用いて得たデータを利用して、ポリペプチドとタンパク質の複合体の数、親和性および結合に関する数値を計算する。

**【0258】**

標識ポリペプチドは、ポリペプチドが相互作用する分子を精製するための試薬としても有用である。これには阻害薬が含まれるが、これらに限定されない。アフィニティー精製の1態様においては、ポリペプチドをクロマトグラフィーカラムに共有結合させる。細胞およびそれらの膜を抽出し、種々の細胞サブコンポーネントをカラムに通す。分子はポリペプチドに対するそれらの親和性によりカラムに結合する。ポリペプチド-複合体をカラムから回収し、解離し、回収された分子をタンパク質配列決定する。次いでこのアミノ酸配列を利用して捕獲分子を同定し、または適宜なcDNAライブラリーから対応する遺伝子をクローニングするための縮重オリゴヌクレオチドを設計する。

30

**【0259】**

あるいは、本発明のion-xに対するリガンドと類似の特性を示すが人体または動物体の内因性リガンドより低分子でありより長い半減期を示す化合物を同定できる。有機化合物を設計する場合、本発明による分子を"リード"化合物として用いる。既知の医薬有効化合物に対する模倣体の設計は、そのような"リード"化合物に基づく医薬開発において周知の方法である。模倣体の設計、合成および試験は、標的特性に対する多数の分子のランダムなスクリーニングを避けるために一般に採用される。さらに、本発明のDNAがコードする演繹アミノ酸配列の分析から得られる構造データは、より特異的な、したがって薬理効果がより高い新規薬物の設計に有用である。

40

**【0260】**

本発明のタンパク質配列と利用できるすべてのデータベースにある配列との比較により、イオンチャンネルタンパク質の膜貫通ドメイン(ポアドメインを含む)について有意の相同性が示された。したがって、コンピューターモデリングを用いて、入手できる他のタ

50

ンパク質の膜貫通ドメインの情報に基づいて本発明のタンパク質の推定三次構造を開発できる。こうして、ion-xの推定構造に基づく新規リガンドを設計できる。

【0261】

具体的態様において、本発明のスクリーニング法により同定した新規分子は低分子量有機分子であり、この場合、その経口摂取用の組成物または医薬組成物、たとえば錠剤を調製できる。本明細書に記載するスクリーニング法により同定した核酸分子、ペクター、ポリペプチド、抗体および化合物を含む組成物または医薬組成物は、いかなる投与経路用にも調製でき、これには経口、静脈内、皮膚、皮下、鼻腔、筋肉内または腹腔内が含まれるが、これらに限定されない。キャリアーまたは他の成分の性質は個々の投与経路および投与される本発明の個々の態様に依存するであろう。これに関して有用な方法およびプロトコルの例は、特にREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第16版, Osol, A(編), 1980中にみられ、その全体を本明細書に援用する。

10

【0262】

この低分子量化合物の投与量は、処置すべき疾病状態または症状、および他の臨床的要因、たとえばそのヒトまたは動物の体重および状態、ならびに化合物の投与経路に依存するであろう。ヒトまたは動物を処置するためには、約0.5~500mg/体重kgの化合物を投与できる。療法には一般に低い方の用量で投与し、目的とする療法結果がみられるまで継続する。

【0263】

本明細書に記載するスクリーニング法により同定した核酸分子、ポリペプチド、抗体、化合物を含めた本発明の化合物および方法は、多様な医薬用途をもち、たとえば癌および腫瘍の増殖など、無調節な細胞増殖を治療または予防するために使用できる。具体的態様において、本発明の分子は遺伝子療法に用いられる。遺伝子療法の概説については、たとえばAnderson, Science, 1992, 256, 808-813を参照；その全体を本明細書に援用する。

20

【0264】

本発明には、哺乳動物において天然ion-x結合パートナー関連活性に作動(刺激)または拮抗する方法であって、前記に開示するポリペプチドのいずれか一つに対するアゴニストまたはアンタゴニストを、その作動または拮抗を生じるのに十分な量で哺乳動物に投与することを含む方法も含まれる。したがって本発明の1態様は、哺乳動物において本発明のタンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストにより疾患を処置する方法であって、ion-x関連機能に作動または拮抗するのに十分な量のアゴニストまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む方法である。

30

【0265】

本発明に基づいて処置できる疾患および症状の例には特に下記のものが含まれるが、これらに限定されない：消化管障害；甲状腺障害(たとえば甲状腺中毒症、粘液水腫)；腎不全；炎症症状(たとえばクローン病)；細胞の分化および恒常性に関連する疾患；慢性関節リウマチ；自己免疫障害；運動障害；CNS障害(たとえば疼痛：ニューロパシー性疼痛、片頭痛、および他の頭痛を含む)；発作；精神障害および神経障害：不安、統合失調症、躁うつ病、不安、全般性不安障害、外傷後ストレス障害、うつ病、双極性障害、譫妄、痴呆、重篤な精神遅滞を含む；ジスキネジア、たとえばハンチントン病またはトゥレット症状群；注意欠陥障害：ADDおよびADHDを含む；ならびに変性性障害、たとえばパーキンソン病およびアルツハイマー病；運動障害：運動失調症、核上麻痺などを含む)；感染症、たとえばHIV-1またはHIV-2によるウイルス感染症；代謝および心血管疾患および障害(たとえば2型糖尿病、肥満症、食欲不振症、低血圧症、高血圧症、血栓症、心筋梗塞、心筋障害、アテローム性硬化症など)；増殖性疾患および癌(たとえば胸部癌、結腸癌、肺癌など種々の癌、および乾癬、前立腺肥大などの過増殖性障害)；ホルモン障害(たとえば雄性/雌性ホルモン置換、多嚢胞卵巣症候群、脱毛症など)；ならびに性的機能障害。

40

50

## 【0266】

細胞膜を通過でき、かつ酸加水分解抵抗性である化合物は、患者に経口投与した後の生物学的利用能が高くなるので、療法薬として有利な可能性がある。しかし、これらのタンパク質阻害薬の多くは機能を軽度に阻害するにすぎない。さらに、多くは多様なプロテinkinナーゼを阻害するので、疾患の療法薬として多数の副作用を引き起こすであろう。

## 【0267】

患者に投与する化合物量を決定する方法および化合物を生物に投与する様式は、米国特許出願番号08/702,282(1996年8月23日出願)および国際特許出願公開番号WO96/22976(1996年8月1日公開)に開示されており、図面、式または表を含めて両者の全体を本明細書に援用する。そのような記載を本発明に利用でき、容易に適合させることは、当業者に理解されるであろう。

10

## 【0268】

適正な投与量は、処置すべき疾患のタイプ、使用する個々の組成物、ならびに患者の体格および生理学的状態など、種々の要因に依存する。本明細書に記載する化合物の療法有効量は、まず細胞培養および動物モデルから推定できる。たとえば、まず細胞培養アッセイにおいて判定した $IC_{50}$ を考慮した循環濃度範囲を達成する用量を、動物モデルに処方することができる。この動物モデルデータを利用して、ヒトに有用な用量をより正確に決定できる。

## 【0269】

障害を抑制するのに最適な薬物の選択を容易にするために、血漿、腫瘍および主要臓器における薬物および代謝産物の血漿内半減期および生体内分布を判定することもできる。そのような測定を実施できる。たとえば、薬物で処理した動物の血漿についてHPLC分析を実施し、放射性標識化合物の位置をX線、CATスキャンおよびMRIなどの検出方法により判定できる。スクリーニングアッセイにおいては有効な阻害活性を示すけれども薬物動態特性が低い化合物は、化学構造を変化させて再試験することにより最適化できる。これに関して、良好な薬物動態を示す化合物をモデルとして使用できる。

20

## 【0270】

血球組成を調べることにより毒性試験を実施することもできる。たとえば、適切な動物モデルにおいて下記の毒性試験を実施できる：1)化合物をマウスに投与し(非処理対照マウスも使用すべきである)；2)各処理群中1匹のマウスから尾静脈より血液試料を定期的に採取し；そして3)赤血球数および白血球数、血球組成、ならびに多形核血球に対するリンパ球の%について試料を分析する。毒性があれば、各投与方式についての結果と対照の比較により示される。

30

## 【0271】

各毒性試験が終了すると、動物を殺すことによりさらに試験を実施できる(好ましくは、米国獣医学会指針、安楽死に関する米国獣医学会パネルの報告書に従う、*Journal of American Veterinary Medical Assoc.*, 202:229-249, 1993)。次いで各処理群からの代表的動物を、転移の直接的証拠、異例の疾患または毒性について、肉眼検死により検査する。組織の肉眼的異常を記録し、組織を組織学的に検査する。体重または血液成分の減少を生じる化合物は主要臓器に有害作用を及ぼす化合物であるので、好ましくはない。一般に有害作用が大きいほど、その化合物はより好ましくない。

40

## 【0272】

癌の処置のためには、疎水性医薬の予想日量は1~500mg/日、好ましくは1~250mg/日、最も好ましくは1~50mg/日である。有効部分の血漿中濃度が療法効果の維持に十分であれば、薬物の投与頻度はより少なくてもよい。血漿中濃度に薬物の力価を反映させるべきである。一般に、化合物の力価が高いほど、有効性を達成するのに必要な血漿中濃度はより低い。

## 【0273】

ion-x mRNA転写体は多くの組織中にみられ、これには脳、腎臓、結腸、小腸

50

、胃、精巣、胎盤、副腎、末梢血白血球、骨髄、網膜、卵巣、胎児脳、胎児肝臓、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、肺、筋肉、甲状腺、子宮、前立腺、皮膚、唾液腺、および膵臓が含まれるが、これらに限定されない。特定の *ion-x* mRNA を発現する組織を、後記の実施例において同定する。

【0274】

SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列ならびにそのフラグメントは、前記に詳述したように、*ion-x* を活性化、作動し、またはそれに拮抗する内因性神経伝達物質/ホルモン/リガンド、および特に下記を含めた（これらに限定されない）障害の処置における潜在的有用性をもつ化合物のスクリーニングを可能にする：消化管障害；甲状腺障害（たとえば甲状腺中毒症、粘液水腫）；腎不全；炎症症状（たとえばクローン病）；細胞の分化および恒常性に関連する疾患；慢性関節リウマチ；自己免疫障害；運動障害；CNS 障害（たとえば疼痛：ニューロパシー性疼痛、片頭痛、および他の頭痛を含む；発作；精神障害および神経障害：不安、統合失調症、躁うつ病、不安、全般性不安障害、外傷後ストレス障害、うつ病、双極性障害、譫妄、痴呆、重篤な精神遅滞を含む；ジスキネジア、たとえばハンチントン病またはトゥレット症状群；注意欠陥障害：ADD および ADHD を含む；ならびに変性性障害、たとえばパーキンソン病およびアルツハイマー病；運動障害：運動失調症、核上麻痺などを含む）；感染症、たとえば HIV-1 または HIV-2 によるウイルス感染症；代謝および心血管疾患および障害（たとえば 2 型糖尿病、肥満症、食欲不振症、低血圧症、高血圧症、血栓症、心筋梗塞、心筋障害、アテローム性硬化症など）；増殖性疾患および癌（たとえば胸部癌、結腸癌、肺癌など種々の癌、および乾癬、前立腺肥大などの過増殖性障害）；ホルモン障害（たとえば雄性/雌性ホルモン置換、多嚢胞卵巣症候群、脱毛症など）；ならびに性的機能障害。

【0275】

たとえば *ion-x* は、呼吸器疾患、たとえば T 細胞が疾病に関与している喘息の処置に有用であろう。気道平滑筋の収縮はトロンピンにより刺激される。Cicala et al. (1999) Br. J. Pharmacol. 126: 478 - 484。さらに、閉塞性細気管支炎においてはトロンピン受容体の活性化が有害な可能性がある」と指摘されている。Hauck et al. (1999) Am. J. Physiol. 277: L22 - L29。さらに、マスト細胞がトロンピン受容体をもつことも示されている。Cirino et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 821 - 827。*ion-x* は、線維芽細胞プロコラーゲン合成の刺激による慢性肺炎状態の気道構造の再現にも有用であろう。たとえば Chambers et al. (1998) Biochem. J. 333: 121 - 127; Trejo et al. (1996) J. Biol. Chem. 271: 21536 - 21541 参照。

【0276】

他の例で、トロンピン受容体の活性化後に T 細胞による sCD40L 放出および CD40L 発現が増大したことは、T 細胞および炎症の作用による不安定狭心症の処置に *ion-x* が有用である可能性を示唆する。Aukrust et al. (1999) Circulation 100: 614 - 620 参照。

【0277】

他の例は、炎症性疾患、たとえば乾癬、炎症性腸疾患、多発硬化症、慢性関節リウマチ、および甲状腺炎の処置である。組織の *ion-x* 発現プロファイルからみて、トロンピン受容体の阻害がこれらの疾患に有益であろう。たとえば Morris et al. (1996) Ann. Rheum. Dis. 55: 841 - 843 参照。T 細胞のほか、NK 細胞および単球もこれらの疾患の発病に関与する重要な細胞タイプである。たとえば Naldini & Carney (1996) Cell Immunol 172: 35 - 42; Hoffman & Cooper (1995) Blood Cells Mol

10

20

30

40

50

. Dis. 21: 156 - 167; Colotta et al. (1994) Am. J. Pathol. 144: 975 - 985 参照。

【0278】

脾臓に ion-x が発現することは、それが造血系前駆細胞の増殖において役割を果たしている可能性を示唆する。DiCuccio et al. (1996) Exp. Hematol. 24: 914 - 918 参照。

【0279】

他の例として、ion-x は急性および/または外傷性脳傷害の処置に有用であろう。星状神経膠細胞はトロンピン受容体を発現することが証明された。脳傷害後の星状神経膠症にトロンピン受容体の活性化が関与している可能性がある。したがって、受容体活性の阻害は神経炎症の抑制に有益であろう。星状神経膠細胞により仲介される癥痕形成も、トロンピン受容体の阻害により抑制されるであろう。たとえば Pindon et al. (1998) Eur. J. Biochem. 255: 766 - 774; Ubl & Reiser (1997) Glia 21: 361 - 369; Grabham & Cunningham (1995) J. Neurochem. 64: 583 - 591 参照。

【0280】

ion-x 受容体の活性化は、神経細胞および星状神経膠細胞のアポトーシスならびに神経突起伸展の阻止を仲介すると思われる。阻害は慢性および急性脳傷害のいずれにも有益であろう。たとえば Donovan et al. (1997) J. Neurosci. 17: 5316 - 5326; Turgeon et al. (1998) J. Neurosci. 18: 6882 - 6891; Smith-Swintosky et al. (1997) J. Neurochem. 69: 1890 - 1896; Gill et al. (1998) Brain Res. 797: 321 - 327; Suidan et al. (1996) Semin. Thromb. Hemost. 22: 125 - 133 参照。

【0281】

添付の配列表には本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドが含まれ、その全体を本明細書に援用する。

したがって、アゴニストおよびアンタゴニストのようなモジュレーターの同定は、神経性の疾患および障害を処置するのに有用な化合物の同定に有用である。そのような神経性の疾患および障害には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：統合失調症、情動障害、ADHD / ADD (すなわち注意欠陥多動性障害 / 注意欠陥障害)、ならびに神経障害、たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病、片頭痛、および老年性痴呆、ならびにうつ病、不安、双極性障害、てんかん、神経炎、神経衰弱症、ニューロパシー、ノイローゼなど。

【0282】

ヒト対象のスクリーニング法

したがってさらに他の態様において本発明は、ヒトゲノム - - 特に本発明のイオンチャンネルに対するそれらの対立遺伝子 - - を分析して、遺伝的要素をもつと思われる精神障害または脳疾患に罹患しているかまたはそれを発症するリスクをもつと考えられる他の個体にみられる遺伝的特徴をその個体もつかを判定することを伴う遺伝子スクリーニング法を提供する。たとえば1態様において本発明は、ヒト対象において脳に影響を与える障害を発症する可能性を判定する方法であって、そのヒト対象に由来する1またはそれより多くのイオンチャンネル遺伝子のコード配列を分析し、そしてこの分析工程からそのヒト対象におけるその障害の発症の可能性を判定する工程を含む方法を提供する。

【0283】

より具体的には本発明は、脳に影響を与える障害またはそれに対する遺伝的素因を診断するためにヒト対象をスクリーニングする方法であって、下記の工程を含む方法を提供する：(a) ヒト対象の核酸をアッセイして、脳に発現する可能性のある少なくとも1種類のイオンチャンネルのアミノ酸の配列、発現または生物活性を変化させる変異の存在また

10

20

30

40

50

は不存在を判定する；その際イオンチャンネルはSEQ ID NO：52～SEQ ID NO：102ならびにSEQ ID NO：105、106、109、110、119、121、122、132および134よりなる群から選択されるアミノ酸配列またはその対立遺伝子バリエーションを含み、核酸はイオンチャンネルをコードする遺伝子に対応する；そして（b）その変異の存在または不存在から障害または素因を診断する；その際、アミノ酸の配列、発現または生物活性を変化させる変異が核酸の対立遺伝子中に存在することは、その障害を発症するリスクが高いことと相関する。

【0284】

”ヒト対象”とは、ヒト、ヒトの胚、またはヒト胎児のいずれかを意味する。本発明方法が、脳に影響を与える障害をもつと診断された個体自身または脳に影響を与える障害をもつと診断された血縁者をもつ個体に特に重要であることは自明であろう。

10

【0285】

”高いリスクについてのスクリーニング”とは、ヒト対象において、脳に影響を与える障害を発症する可能性がヒト集団全体またはその個体が属する関連民族もしくは人種亜集団にみられるより高いことと相関する遺伝子変異があるかを判定することを意味する。陽性および陰性両方の判定（すなわち遺伝的素因マーカーが存在するか不存在であるかの判定）が本発明のスクリーニング法の範囲に含まれるものとする。ある好ましい態様において、核酸中における少なくとも1つのion-xイオンチャンネル対立遺伝子の配列または発現を変化させる変異の存在はその障害を発症するリスクが高いことと相関し、一方、そのような変異の不存在は陰性の判定として報告される。

20

【0286】

本発明の”アッセイ”工程は、核酸の特性を判定するための分析に利用できるいかなる技術も伴うことができ、これにはたとえば下記の周知の技術が含まれるが、これらに限定されない：一本鎖コンホメーション多型分析（SSCP）[Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2766-2770 (1989)]；ヘテロデュプレックス分析[White et al., Genomics, 12:301-306 (1992)]；変性剤濃度勾配ゲル電気泳動分析[Fischer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:1579-1583 (1983)]；およびRiesner et al., Electrophoresis, 10:377-389 (1989)]；DNA配列決定法；RNase開裂[Myers et al., Science, 230:1242-1246 (1985)]；不適正塩基対の化学的開裂法[Rowley et al., Genomics, 30:574-582 (1995)]；およびRoberts et al., Nucl. Acids Res., 25:3377-3378 (1997)]；制限断片長多型分析；シングルヌクレオチドプライマー伸長分析[Shumaker et al., Hum. Mutat., 7:346-354 (1996)]；およびPastinen et al., Genome Res., 7:606-614 (1997)]；5'ヌクレアーゼアッセイ[Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5022-5026 (1994)]；DNAマイクロチップ分析[Ramsey, G., Nature Biotechnology, 16:40-48 (1999)]；およびCheer, USP5, 837, 832]；およびリガーゼ連鎖反応[Whiteley, USP5, 521, 065]。[全般的にSchaffer and Hawkins, Nature Biotechnology, 16:33-39 (1998)参照]。以上の文献すべての全体を本明細書に援用する。

30

40

【0287】

したがって、たとえばion-x配列のスクリーニングを伴うある好ましい態様において、アッセイ工程は下記よりなる群から選択される少なくとも1つの操作を含む：（a）ヒト対象の少なくとも1つのion-x対立遺伝子の少なくとも1つのコドンのヌクレオチド配列を決定する；（b）ハイブリダイゼーションアッセイを実施して、ヒト対象からの核酸が1以上の標準配列と同一または異なるヌクレオチド配列をもつかを判定する；（

50

c) ポリヌクレオチド移動アッセイを実施して、ヒト対象からの核酸が1以上の標準配列と同一または異なるヌクレオチド配列をもつかを判定する；および(d)制限ヌクレアーゼ消化を実施して、ヒト対象からの核酸が1以上の標準配列と同一または異なるヌクレオチド配列をもつかを判定する。

【0288】

きわめて好ましいある態様においてアッセイは、利用できるいずれかの配列決定法により核酸配列を決定してそのヌクレオチド配列を決定することを伴う[たとえば Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74:5463-5467 (1977) (ジデオキシチエンターミネーション法, dideoxy chain termination method); Mirzabekov, TIB TECH, 12:27-32 (1994) (ハイブリダイゼーションによる配列決定); Drmanac et al., Nature Biotechnology, 16:54-58 (1998); 米国特許第5,202,231号; および Science, 260:1649-1652 (1993) (ハイブリダイゼーションによる配列決定); Kieleczawa et al., Science, 258:1787-1791 (1992) (プライマー・ウォーキング法による配列決定); (Douglas et al., Biotechniques, 14:824-828 (1993) (PCR生成物の直接配列決定); および Akane et al., Biotechniques, 16:238-241 (1994); Maxam and Gilbert, Meth. Enzymol., 65:499-560 (1977) (化学的終結による配列決定) 参照; すべてを本明細書に援用する]。分析は、ion-x 遺伝子ゲノムDNA配列全体もしくはその一部の配列決定; または受容体コード配列全体もしくはその一部の配列決定を伴うことができる。場合により、分析は個体が特定の対立遺伝子バリエーションをもつかの判定を伴ってもよく、この場合、核酸の小部分のみ - - その対立遺伝子バリエーションを特徴づける特定のコードの配列を決定するのに十分な - - の配列決定で十分である。この方法は、たとえば家族の他のメンバーについて以前に解明されたものと同じの対立遺伝子バリエーションを家族の1メンバーが遺伝しているか、あるいはより一般的に、以前に解明された、遺伝的要素をもつ精神障害と相関するバリエーションのある者のゲノムが含むかを判定するためにアッセイする場合に適切である。

【0289】

きわめて好ましい他のある態様において、アッセイ工程は、ハイブリダイゼーションアッセイを実施してヒト対象からの核酸が1以上の標準配列と同一または異なるヌクレオチド配列をもつかを判定することを含む。ある好ましい態様において、ハイブリダイゼーションはヒト対象からの核酸が1以上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするかを判定することを含み、その際オリゴヌクレオチドは本明細書に教示する ion-x 遺伝子の一部と同一であるかまたは1つの不適正塩基対以外は同一であるヌクレオチド配列をもつ。ハイブリダイゼーション条件は、完全な配列相補性と1個以上の塩基が異なる不完全な塩基対合とを識別するように選択される。これにより、そのようなハイブリダイゼーション実験で、実験に用いるオリゴヌクレオチド配列の知見によりヒト対象からの核酸について一塩基多型配列情報を得ることができる。

【0290】

以上に概説した幾つかの方法は、変性または非変性条件下に、たとえばポリアクリルアミド電気泳動ゲル(またはキャピラリー電気泳動システム)上で、ポリヌクレオチド移動アッセイを実施する分析を伴う。ヒト対象に由来する核酸を、通常は1以上の標準核酸、たとえば SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 よりなる群から選択される配列(または1つの既知の多型以外は同一のもの)の全体または一部と同一のコード配列をもつ標準イオンチャンネルコード配列に隣接して(または共装填して)ゲル電気泳動処理する。ヒト対象からの核酸と標準配列に同様な化学的処理または酵素処理を施し、

10

20

30

40

50

次いでこれらのポリヌクレオチドが同一配列を含まない限り異なる移動パターンを示す条件下で電気泳動する。[一般に Ausubel et al. (編), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ニューヨーク, John Wiley & Sons, Inc. (1987-1999); および Sambrook et al. (編), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー: Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989) 参照; 両者の全体を本明細書に援用する。]

アッセイに関して用語 " ヒト対象の核酸 " は、ヒト対象から直接得た核酸 (たとえば、血液、組織、または他の細胞もしくは流体試料から得た DNA または RNA ); およびヒト対象から直接得た核酸に由来する核酸を含むものとする。限定ではない例として、ヒト対象からの生物試料に由来する RNA に相補的な cDNA を作製するために、およびヒト対象から得た生物試料に由来する DNA または RNA を増幅するために、周知の方法がある。ヒト対象自身の DNA / RNA の関連ヌクレオチド配列情報を保持するそのような由来のポリヌクレオチドはいずれも、本発明の目的に関して本発明の " ヒト対象の核酸 " の定義に含まれるものとする。

#### 【0291】

アッセイに関して用語 " 変異 " には、ion-x 遺伝子配列の1個以上のヌクレオチドの付加、欠失および/または置換 (たとえば SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131 および SEQ ID NO: 133 に示すイオンチャンネルコード配列と比較して)、ならびにイントロン (イントロンがある場合) に起きる他の多型であって、配列決定、制限断片長多型その他の方法で同定できるものが含まれる。本明細書に示す多様な活性の例により、ある変異が種々の被験物質の存在下または不存在下で関連受容体の活性を調節するかを判定できる。

#### 【0292】

関連する態様において本発明は、ある者の遺伝子型を本発明のイオンチャンネルに関してスクリーニングし、そしてそのような遺伝子型を疾患の診断または疾患の素因 (遺伝子カウンセリングのために) と関連させる方法を提供する。たとえば、本発明はヒト患者において ion-x 精神障害遺伝子型についてスクリーニングするための、下記の工程を含む方法を提供する: (a) 患者からの核酸であって患者の ion-x 対立遺伝子に対応する配列を含む核酸を含有する生物試料を用意し; (b) その核酸を1以上の変異の存在について分析し; (c) 分析工程から ion-x 遺伝子型を判定し; そして (d) ion-x 対立遺伝子における変異の存在を精神障害遺伝子型と関連させる。ある好ましい態様において生物試料は、ヒト対象のゲノム DNA を含むヒト細胞を含有する細胞試料である。分析は、前記の各節に記載したアッセイと同様に実施できる。たとえば、分析は核酸 (たとえば DNA または RNA) の一部の配列決定を含み、この一部は ion-x 対立遺伝子の少なくとも1つのコドンを含む。

#### 【0293】

核酸分析を伴う方法より時間および経費がかかるが、本発明はヒト対象のタンパク質をアッセイして、ヒト対象からのイオンチャンネルタンパク質におけるアミノ酸配列変異の存在または不存在を判定することによっても実施できる。そのようなタンパク質分析は、たとえばイオンチャンネルタンパク質を化学的方法または酵素法により切断し、得られたペプチドを配列決定することにより; あるいはイオンチャンネルの特定の対立遺伝子バリエーションに対する特異性をもつ抗体を用いるウェスタン分析により実施できる。

#### 【0294】

本発明は、本発明方法の実施に有用な材料をも提供する。たとえば本発明は、前記の多くの分析法においてプローブとして有用なオリゴヌクレオチドを提供する。一般に、そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、本明細書に教示するヒトのイオンチャンネル遺伝子配列 (またはその対立遺伝子バリエーション) の一部と同一もしくは厳密に相補的であるか

10

20

30

40

50

、または1個のヌクレオチド置換以外は同一もしくは厳密に相補的である配列をもつ、6、7、8、9、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または50個のヌクレオチドを含む。ある好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは本明細書に教示するヒトのイオンチャンネルコード配列、特にSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133に示すコード配列に上記と同様に対応する配列をもつ。1変法においては、本発明のオリゴヌクレオチドプローブを精製および単離する。他の変法においては、オリゴヌクレオチドプローブをたとえば放射性同位体、発色団または発蛍光団で標識する。さらに他の変法においては、プローブを固体支持体に結合させる。[全般的にAusubel et al.およびSambrook et al. (前掲)参照。]

10

関連態様において、本発明は本発明方法の実施に有用な試薬を含むキットを提供する。たとえば本発明は、下記のものと一緒に含む、ヒト対象を精神障害または遺伝的素因の診断のためにスクリーニングするキットを提供する：(a)ヒトion-xイオンチャンネル遺伝子における多型を同定するためのプローブとして有用なオリゴヌクレオチド；このオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド付加、ヌクレオチド欠失またはヌクレオチド置換よりなる群から選択される1つの配列相異以外はヒトion-x遺伝子配列またはion-xコード配列の一部と同一もしくは厳密に相補的である配列をもつ6~50個のヌクレオチドを含む；および(b)オリゴヌクレオチドと共にパッケージした、精神障害またはその遺伝的素因と相関する、前記プローブにより同定できる多型を同定する情報を含む媒体。情報を含む媒体の例には、印刷した紙パッケージ同封物または包装ラベル；ならびに遺伝子スクリーニングおよびカウンセリングサービスを行う専門家がコンピューターまたは機器により読み出し可能な磁気および光学記憶媒体が含まれる。専門家はこの媒体中に提供された情報を用いて、オリゴヌクレオチドによる分析結果を診断と相関させる。ある好ましい変法においては、オリゴヌクレオチドを標識する。

20

#### 【0295】

さらに他の態様において本発明は、精神障害と相関する、本発明のイオンチャンネルの対立遺伝子バリエーションを同定する方法を提供する。ion-xを含めたイオンチャンネルが脳を含む多くの異なる組織に発現することは周知である。したがって、本発明のion-xは特に精神障害の処置および/または診断に有用である。たとえば本発明は、精神障害と相関するイオンチャンネル対立遺伝子バリエーションを同定するための、下記の工程を含む方法を提供する：(a)精神障害をもつと診断されたヒト患者またはその患者の遺伝的祖先もしくは子孫からの核酸を含む生物試料を用意し；(b)脳に発現する少なくとも1種類のイオンチャンネルにおける1以上の変異の存在について核酸を分析し、その際イオンチャンネルはSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133よりなる群から選択されるアミノ酸配列またはその対立遺伝子バリエーションを含み、核酸はイオンチャンネルをコードする1以上の遺伝子に対応する配列を含み；(c)分析工程からイオンチャンネルについて患者の遺伝子型を判定し；そして(d)判定工程から精神障害と相関する対立遺伝子バリエーションを同定する。この方法を促進するために、患者(および可能なならばその家族)において連鎖調査を実施して、染色体マーカーと疾病状態を相関させることが望ましいであろう。本明細書に提示する染色体位置データは、染色体マーカーによる関連イオンチャンネルの同定を容易にする。

30

40

#### 【0296】

前記方法を実施して、本発明のイオンチャンネルを、障害の原因であるかまたはヒトをその障害に罹患しやすくする遺伝的要素をもつ多数の障害と相関させることができる。た

50

たとえばある好ましい変法において、イオンチャンネルはSEQ ID NO: 82に示すアミノ酸配列ion-75またはその対立遺伝子バリエーションを含む。

【0297】

同様に本発明の一部として考慮されるのは、そのような方法で同定した対立遺伝子バリエーション配列を含むポリヌクレオチド、およびその対立遺伝子バリエーション配列によりコードされるポリペプチド、ならびに同定した変異を含むそのオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドのフラグメントである。そのような材料は、リード化合物および障害を処置するための療法薬を同定するin vitro無細胞および細胞ベースアッセイに有用である。たとえば、前記バリエーションを本明細書に記載する活性アッセイ、結合アッセイ、および活性モジュレーターをスクリーニングするアッセイに使用できる。ある好ましい態様において本発明は、前記方法に従って同定したイオンチャンネル対立遺伝子バリエーションをコードするヌクレオチド配列を含む精製および単離されたポリヌクレオチド；ならびにion-x対立遺伝子バリエーションをSEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133に示す配列から識別する配列を含むオリゴヌクレオチドを提供する。本発明は、前記ポリヌクレオチドを含むベクター（好ましくは発現ベクター）；および前記ポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換またはトランスフェクションした宿主細胞をも提供する。本発明は、前記の対立遺伝子バリエーションイオンチャンネルポリペプチドを発現する単離された細胞系；そのような細胞から精製された細胞膜；精製されたポリペプチド；および前記対立遺伝子バリエーションアミノ酸配列を含む合成ペプチドをも提供する。具体的な1態様において本発明は、精神障害に罹患しているヒトのion-5HT-3Cタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む精製されたポリヌクレオチドであって、SEQ ID NO: 118の相補体下記にハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する：(a) 50%ホルムアミド、1% SDS、1M NaCl、10%デキストラン硫酸を含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で16時間のハイブリダイゼーション、そして(b) 0.1x SSCおよび1% SDSを含む洗浄溶液中、60℃で30分の洗浄2回；このポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 119と少なくとも1残基異なるion-5HT-3Cアミノ酸配列をコードする。

【0298】

対立遺伝子バリエーションを用いたアッセイ法の一例は、ion-x生物活性のモジュレーターを同定するための、下記の工程を含む方法である：(a) 対立遺伝子バリエーションを発現する細胞を推定モジュレーター化合物の存在下および不存在下で接触させ；(b) 細胞におけるion-x生物活性を測定し；そして(c) 推定モジュレーターの不存在下に対比して存在下で低下または増強したion-x生物活性からみて推定モジュレーター化合物を同定する。

【0299】

本発明の他の特色は下記の実施例から明らかであろう。実施例1、2、12、および実施例3の一部は実際のものであり、残りの実施例は予測である。本発明の他の特色および変法は、詳細な説明を含めた本明細書全体から当業者に明らかであろう。それらの特色すべてを本発明の態様とする。同様に本明細書に記載する本発明の特色の組合わせを変更して他の態様にもすることもでき、その特色の組合わせが本発明の観点または態様として前記に具体的に述べたものであるかどうかにかかわらず、これらも本発明の態様とする。また、本発明に必須なものとして本明細書に記載した限定のみを限定とみなすべきである；必須なものとして本明細書に記載していない限定を含まない本発明の変更は本発明の態様とする。

【0300】

表5は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列、ならびにこれらの配列のクローニングに有用なプライマー例を含む。"X"は未知のアミノ酸またはギャップ（アミノ酸が存在しない）を示す。

【 0 3 0 1 】

【 表 5 - 1 】

表 5

下記の DNA 配列 Ion31<SEQ ID NO:1>はヒトにおいて同定された：

CCCTCCTCCCTGGCCCCGGGTGCCCTTTCTCCTCCTGAAGTGGGAGGAGCCATACTGATGAGGGGGGT  
GCCACTGGCAGGGGAGCAAGTCATTCATCATGAGCAGGAAGACGTTGTAGCCCAGCAGAAGTGTATC  
TTGAATGGGGCAGCATTCTCGCTCTCTGCTGGCAGGTAGAAGCTGAGGGCATCAATGGCAACCAGAAA  
GCTACTGGGCACCAGCAGGTTTATGATGTAGAGGCTTGGCCTGCGCCTGATGGCCACCTGGAGAGAGA  
CCGGAGAAGATGGCAAAATAATAGATGTCAGAGGGCTCAATTTGTATATCTGACCCCTAATCTTTGCC

【 0 3 0 2 】

【 表 5 - 2 】

AATGTGCTGTGAGGCTGCTGGGGACGATCTTTTAAAGTAACACTTTGCATATAATTGTGCTCGCCTA  
CATAGGGCCTCTGATTTTGTGTCTAATTTTTATTCAATTTTAACTACTAGGAACACAATGACTGTA  
GAATTTAGGTGCAAGTGGGCCCTTTAAGTCATTCTGAGCAGTAGGGGTGAGCTGATCCATTCTGAGC  
AGCAGGGCTTATTACAGTCCAGCCATTCT

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:52>は SEQ ID NO:1 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 52>  
VAIRRRPSLYIINLLVPSFLVAIDALSFYLPASEENRAPFKITLLLGYNVFLMMNDLL

下記の DNA 配列 Ion32<SEQ ID NO:2>はヒトにおいて同定された：

AGAAGAAAACAGTGACTGGTCCCAAGTAAGTCTGAAACCAACAGGAGGAAACAACATGAAATGTTAC  
GGCTTGAGAATAATCATTGGCTCAATGTTCTGCCCTCCAGGCCACTAAGGTGATAGTGCCACCTTCA  
GGACACAATGGGTAGCAGCCCTGCCCTGTGGCTTTGGGTGGCCTTGCCCTGAGGCAGCCATGTGCT  
TGTGCCTTGCTCCTGCCTCCACAGTAGCTCTGTGCCTGGGTGATGCATCTGAGGCTCTCCTGGAAACC  
ACCCTGGTACTCTACTGGTCTGGACTCATGGGCCTAGTGGGGGCCCTCTGTAGTGGCCCTTCCCA  
ACAGTGATTCTCCGTCTCAGCCCCATGGCTCTCTTGGGGCATCCTTTAATTCTGGGGGAAGGCAGCC  
ATGCCCCACATCTTTCTACTCAAGGCCCGTGATGGGATGGGTAGCTGTGATGA

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:53>は SEQ ID NO:2 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 53>  
SAPWLSWGILLILGEGSHAPTSFYSR

下記の DNA 配列 Ion33<SEQ ID NO:3>はヒトにおいて同定された：

TATACTATACATAAAACAATTAGAGAACAACACTAAGTGCTAAATTAAGTTTTCTGGCAATGGTTTCTGA  
TTATATATTTGTTGATTTTAAAGGTATACATGCATGTAGTTTCAGAGTTAGAAGGCAAAGTAGTTCT  
ATAAACCTTGTAACAAAATAGCAATTCTTGAGGCCTGCATCATCTTAGGTTTCAGCTTTTCAGAGGCA  
ACACTTAAATGTTTCAGCTGGTAATGTTCTAGGACTGTACCTCCATATCTATAACACAGATGTA  
TGGTTTTTTTTTATTAGGCATTATCCATGGACTTTTCATTATGAAAGATGAAGATTTCTGCCCTAAC  
CCACACCCCTACTCCCCACCACACAATTGTCTTCT

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:54>は SEQ ID NO:3 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 54>  
RTVPPYLYNTDVWFFIFIRHYPW

下記の DNA 配列 Ion34<SEQ ID NO:4>はヒトにおいて同定された：

CCGGCCTTCCCCTGCCCTCACAGTCCCTCCTCCTCAGCTGTTTCAGCTAAAGTCCCAGGATTAATGCTT  
ATTGGCTGGCTTGGGCCTGAAGTGAAGTCCCTGAACTGAGGCTAGCAGGATGAAATGCTCTAATCAGC  
CAGATGTGAGTCATTACCCCTCTGGAGCCTGGGGCTGGGGACCTGTGGGTGTCAACCTTGCCAAG  
TGACCTGGACAGAACACAGAGGAGCAGAAATCCCCAGAGGGAAGTGGAGGTTGGGGTGGAGGGA  
CACAGAGCCAGCAGGGCCACCGGAAGGAGGCCCTTGCATTTCTGCACATCCACCCAGCCAGGAGGAGA  
CAGCTAGGCCCAAGGGTTCGGCAGTGCCTGCAAGGCGTTTCTTGCAGGAGAGGCTGGTGTTTACAG  
GGGACAGGAAATGTGGGTGAAGTCAAGCCGTTTCTTTGGGGGGCAGAAATGTACAGGCTGATACAGTG  
ACCCAGAAAGCTGGGTCCCTCTGGGGTTTGTGGCAGTGAAGACCCCGTCTGCCCCCTGCA  
CAGCTCCTTGGGCTTCCAAATTTTTGTCTGTGCTGACAGCTT

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:55>は SEQ ID NO:4 の DNA 配列

【 0 3 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

<p>から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 55&gt; GGRRGSSLPQNPTGGPSSFCGHCI SLYILPPQR</p>	
<p>下記の DNA 配列 Ion35&lt;SEQ ID NO:5&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CCTTTCATCAATTCTTGAAAATCTTAGGCTTTATGTTTCAAATATGCCTCTTCTCTTTTCTTTTA CTTTTGGGAAACTCCCATTATGTATATGATGGACTTTCTTATTCTGTCTTCTCTATCTTTTCCATAT TTTCCACTTTTATATTGGTCTCCTTTTCTTAGAATTTCTCAAATCTCT</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:56&gt;は SEQ ID NO:5 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 56&gt; LLLGNSHVYVDGLSYSVFPIFFHIFHFLYWSPFS</p>	10
<p>下記の DNA 配列 Ion36&lt;SEQ ID NO:6&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>TCTGTGTGTTTACCCAGGGGACTGCCGCATGGCCCATGCCGAGCAGAACTGATGGACGACCTTCTGA ACAAAACCTGTTACAACAACCTGGATCCGCCAGCCACCAGCTCCTCACAGCTCATCTCCATCCAGAC GGCGTCTCCCTGGCCAGTGCATCAGCGTGGTAGGTGCAGAGGGTACCTGTGGCTCAGGCTCAGGTG AAGAGGCAGCTCATGCCCAAGCCCTAAGCAGTCAATGTCCAGAGGAATGAAATGACTAGAGTTGA</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:57&gt;は SEQ ID NO:6 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 57&gt; GDCRMAHAEQKLMDDLLNKTCYNNLDPPSHQLLTAHL</p>	20
<p>下記の DNA 配列 Ion37&lt;SEQ ID NO:7&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CCCTTGTGATTGACACATCTGCCCTGGGACCCACAGTAGGTTCCGAGGGAGACGTTTCAGCCTGGGCTG GCCTGGGATAGCCTAAAGTGGGGGTGCCATGGGAGGGGCTGAGTGTGGCAGCTTAGAAGGGTCTT GGGAAAAGCTTCCAGGGCAGCGTGGCAACCAGGTTATGTGGTAGGGAGAGGGGATCACTACACCCCC ACAGCTAAGGGCAAGTCTAGAGAGGGTAAGAGAGAGAGGGGCCAGATAGGCAGTACTTGTTATAG AGTACGATGTCTGGCCGCCACACAAGACTGCTGGGGATGCGGATGGCATCCAGGCCACCATAGGCATT GGGTTCCCATCGTAGGTAGGCATCTGTCCACTCCTGCCGTATCCACAGATACAGGGTCAGCACCTGGT TCCGTTTCATCCTAGTGGGGCAGGGAATGGCAGAGATGTGGACATGTATATGCATATCCTGCCCTGTC TGTGCACACTCCCTGCAGGGCTCTGGTCAGCACCCACAAACCTGACTTGTCATACCGTCCAGTTCC CACCCAGACCTGACCTTGCCATGTGACCTTAGTGGGCTTCTCTTTTCTGCCCGTTTCCTCAGCAGG AATATGGGGTGAGAATCCCTGCTTA</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:58&gt;は SEQ ID NO:7 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 58 &gt; DERNQVLTLYLWIRQEWTDAYLRWDPNAYGGLDAIRIPSSLVWRPDI VLYNK</p>	30
<p>下記の DNA 配列 Ion38&lt;SEQ ID NO:8&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CCTCTTAGTGTGTAATCAGCCACCCTATTTTTTTTTTTTCCAAAAGCAAATGTTCTTTGCAAGAAC AATTCTATTGACTTCAAATTA CTCTGCTATAGGTCCTTTCGAAGTATCGTCATGACATGTACACACA GACTTGAGGGAAAAAGTGCTTTTCTGAAAAAGTAATGATTGAAATTTTTTAAATGATTCCTTA GATTGAATTCATTTAGATTAACAGATTTTCTGCCAATTGATTTCTGGCATCCATGCAGTGATCC</p>	40

【 0 3 0 4 】

【表 5 - 4】

<p>AGCAGAGATAAAATGGGGTTCATTTAGTCCATGGCTCCAAGGAAAAGTGAGAGCCTGGCAAAGAGAG  CCAGCAAAGCTTCTTTCTTGCTGCTCGGTTGGAGCAGGACAACCTGGAGCCGGTCAGCTGCTGACCAG  ATGCTGCCTTCAATTAATATTTCCAACCTCAAAGACATTTATCGCTTACTCTCGAAAGCAGAGCAGCT  GAGTAATAAAGGGAACCACTAAAGCTGTTTTTTTTTCAAGAGCATTTATAATGGCTAAATTGCTTGAA  ATAAATTAGCACGAAAAATAAACATAGTTGTACAGTATCTGTAAACAAATTTCCAATCTTGGGAAA  ATAGAGCGACAAAGTGGGAGCTGCATT</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:59&gt;は SEQ ID NO:8 の DNA 配列  から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 59&gt;  HFVALFSQDWKFLVLI</p>	10
<p>下記の DNA 配列 Ion39&lt;SEQ ID NO:9&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CAAGTGCAGGCCAATATATTGGTGTGGTCCCTAACTCCAAGTGGTTTTAGGCCATATTTAATATCTGTC  TGCCAAAAGGCTATCAAGGGTACTTTTTCTGGTGACACCTTGTAAATCAAGAATGGGGGATAGGCT  GTGGTTATTAGGGTCACAAATGGGAGTGGGAGGATCAAGGTTTAAAGAAGAATGGAAAGGGTGGGAGA  GGCCGACAGGACAAGCTCACCGTCACTACCTCTGTCCCTCACTGCCCTGATGCAGGTATGGGACAAT  CCTTTTCATTAATTGGAACCCAAAAGAGTGTGTTGGCATCAATAAACTCACAGTATTAGCTGAAAACCT  GTGGCTCCAGACATCTTCATCGTGGAAATCGTGCATGACAGGCTGGGGAAGCCAGCGTGAACCTCA  TCTGCCGAGAACAGCTAGGGTCAGCACAGGGCATGGGGCCACCGAAAAGATTGAGACAGGCACACAGT  CTCAACGAACTGACTTCCACACATCACTACGAGTAGAAGAGGCGAGAGAGTGACATTAAGAAAGAGC  CCAGGGCCAGGCGCGGTGGCTCACGCCTG</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:60&gt;は SEQ ID NO:9 の DNA 配列  から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 60&gt;  LMQVWDNPFINWNPKECVGINKLTVLAENLWLPDIFIVES</p>	20
<p>下記の DNA 配列 Ion40&lt;SEQ ID NO:10&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CAATTATATACCTGTGTCTTTAATCCCTGAGAGCAGAATGATGAATATTTGAGCCCCAGTATATCATA  TATACATGTAATTAATTTTTAAAAGGTAGTTCAATATTCAAATTTATGCAAAGTGGCCAAGAACAGT  GCAAGTGTGACGACTTATAAATAGAATACATTGACTATTTACATTAGGTTCTTGAGGATTGAAATA  ACATTCTTCTGTTTTTCCCTAATAAATGACAGGCTTATATACATAGACTTGAGTTAAAAATTGACCAAT  ATTAAGTCCCATGAGCCCGTGGTGAACAAATTATGCTGTCATCTCAAACACAATAATTAATAGATTA  ATTACTAGGATTTACCAAAATGGCTTTTTGAAGATCTATTTTTAATGTTCTTTTCTGTTAAAAGCAGC  TTACACAAGTTTCTAAATCTATACTGCCACTAATGATAGTACCACAGCATCTTAGTATAAAATTTCT  GGAGTTTGAATGTTGCCCTCCAAAATTCACGTTGAAATTTAATTGTCATTGTAAAAGTATTAAGA  TATGAGACCTTTAAGAGGTGATTAGGCCACCCAGTATTATGGGTGGAATTAATGCCATTATGAAAGAA  TGAATTTGGTTCCCTTTTTCTCTGTGTCCTTTGGCCATGTAATGAGACAACAAGAAAGCCCTTGTCA  GATGTCACCATTCTTTATATTGGACTTTCCAGCCTT</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:61&gt;は SEQ ID NO:10 の DNA 配列  から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 61&gt;  REPNSFFHNGINSTHNTGWPNHLLKVSYLNTFTMTIK</p>	30
<p>下記の DNA 配列 Ion41&lt;SEQ ID NO:11&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>CTTCTTATTCTTGGACTTTATAAATATTTGAACCATCACATGTATAAGTTCAGGCCATATGTAATAA  GACATTGTACATACTTGATFGGTTTATTATTGCCTATTGCTTTCTCCCTATCAATTTCCCCAAAATCA</p>	40

【 0 3 0 5 】

【表 5 - 5】

```

GTGTTATGCAGATTTACTGTATTAACTACAATCCATTCCTTCATCCTTTATAGCCATATAAATTAT
ATTTCTGAGAGTAGCTAATATATGCTGTGATTCCTTAAAGTCAATATACCACAGTCTGATCCAATCTA
GGCAGAAAGATATAGTGGGTCAAATTTGGAATTTAAAACATAGGGCTTCTTCAGGTTTATTAAAGCTT
GCTAAAAAATCAAAGCCTACCAAGCTAGTTAGTCTTTCTGTGTCCACACTTGCTACCAATGGAGTTCT
CCCTTTTCAGAAGTAAATAGAGGTCCACACAGTTGTCTGGAAGAAAATTGATCTTGAAGTACATCATG
TCTATTCAACACCAAATTTACTAGGTTCAACATGGAGCATTCAATCAGAGTGTGTGTCTATAAGAACC
AAGCTCACGTTTCATGTGATTATCTGGTTGGGCCAATGAGTTGCTTGGGGCTCTGTAGGAAAGATTTA
CAGCAAAGTAGTAAGGCT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:62>は SEQ ID NO:11 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 62>  
 TLIECSMLNLVNLVLRHDVLRARSIFQTTVWTSITSEKGEPLVASVTQKD

10

下記の DNA 配列 Ion56<SEQ ID NO:12>はヒトにおいて同定された：

```

ATCAGCTGAAGGATCAAAGTCACAATTACTAGCTGTGAGTGTGCCAAGCTAACCATTTAGCACCCATG
CCACAAGCATGCTCTGTGCTACTCAGCATCATGTACACATTCTCAGAAGTGACACAAGTTGACATCAG
AAGTGTTTTGTATTTTCAGATTTAGGGATTTTCATTATAGTTATCAGTTGAGCATCTCAAATCCTGAA
AATCCAAAACACTCCAATGAGCATTTCCTTTGAGTGTACATTGGTACTCAAAGAATTCAGATTTTG
GAGCATTTTGGATTTTCAGGTTTGGCATGTACATTAGTCCACGTTCCACACTGTTACAAGACATCCC
AAGACTGGGTAATTTATAAAGAAAAGAGGTTAAATGACTCACAGTTCACATGGCTGGTGGAGCCAC
AGGAAACTTACAATCATGGCGAAAAGCACCTCTTCACAGGGCAGCAGGAGACAGAAGGGTGAGGAGCA
AAGGGGGAGGAGCCCTTATAAAACCATCAGATCTCCTGAGAATCCCCTCGTTATCAAGAACAGCA
TGGGGGAAATCACCCCATGATCCCATCTCTAGGATTCTACTGGATCCAGCCTGTCCAATAGATTT
TTTTTTT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:63>は SEQ ID NO:12 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 63>  
 CISDLGIFHYSYQLSISNPENPKHSNEHFLVSHWYSKNFRFW

20

下記の DNA 配列 Ion57<SEQ ID NO:13>はヒトにおいて同定された：

```

GACCATTTAGGTGGCTATGGTCATAATCATGAAAGCTTGGACACAGTGGTGGTGGTGCAGGTGATGAG
GTTTGGAGCAAAGGATGACGTGATCTGACTGAGGCTTAATAGGATCATTCTGGTTTCTGGGGATGAGA
AAGTAAAATTTGTAGATATTTTGAAGCATTTTCTGTTGGCCTGAATGGCAGGAGTATGTGTGGAAAAG
GAAGAAGGAATCCATAGACTTGCTATTTGAGTTTAGAAAAGGTTTGGCCTCATCAAGGTATACTCGG
TCACTGGGCGTGTGAAAAAAGATGGCCGAGGGAGAATTCCTAGAAGGGGAAAATAGGGAGGGAGGACA
TGGGAGGATAACAGACTCCTAAATACATGTGGTTGAGTTCATTGGTTGTGCATATGGAAATTACCCCT
ACCTCAAACCATCACACAAATGATGAATTTAAGATATCAG

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:64>は SEQ ID NO:13 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 64>  
 SSHVLPPYFPLLGLPRPSFFTRPVTEYTLMRPKPFLNSNSKSMDSFFLFHTYSCHS

30

下記の DNA 配列 Ion58<SEQ ID NO:14>はヒトにおいて同定された：

```

ACTCCTGAAATCCTAGCCCGGACCCCTGAGCCATTCAACTCAAGCAGCCCTGAGACTAACATAGGGAG
CTGCCTGGAGACTTCCCACAGTATTTCATTCTGAGAGGAAGCTCACACAGGGTCCCTAGACAGCTCCTAA
ATCCTAAGCAGCTACAGGAAGGCACCATTTGAGAACACAGCCCTATCATACTGTATTCTGCTGGAG

```

40

【 0 3 0 6 】

【表 5 - 6】

```

GGCCCAATAGCCCCTGTATCTTCACATCCCTGGAGCCCCATTGACATTCTCCACCTTTATTCACCACC
GCAGCTGGCTCTGCTGCCAAGGCCAAAATGCAAGCCATTGTGTAACCCAGCTGCCTCCAGTAGCAG
GGCCACTGTGCATTTAAAGGCATCCCAAAAAAGGCTATCTCATTATAGCAGCCACCTGAGGCCAAA
ATGTGTGCTCCCAGCCACCTTACTGTTGCCACTGAAAGCAACCCTGCCCTCCCTAGCAGCAGGGTCC
TGGCACAGCTGCTGCTGCCACCCAGGCATTCTGCCAATGGCCTGGGATCACTACATTCCGGGCTA
CCA

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:65>は SEQ ID NO:14 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 65>
PETNIGSCLTSHSIHSEKLTQGPRLNPKQLQEGTILRTQPLSYCILLEGPIAPVSSHPWSPIDILHL
YSPQLALLPRPKCKPLSVTQLPPVA

```

10

下記の DNA 配列 Ion59<SEQ ID NO:15>はヒトにおいて同定された：

```

CTGGGCAAGCTTTAAAGTTTGGGATTTTCCACTGTCCTTTCCGGTGCAGCATTATGAATTTGCA
GTAGTCTCCATAATTTACTGAGGAGCTACAGGAGGAGAAACAGAAAACAGTTAGGATATGCCATGCTT
TCCAAGAGGAAGTGGCAACTGCAGTGAGGATGCATTTAAACAAACCAGTGTGAGGATAGATCTCTCTA
CGTTATGCAGATCCACTCCATTTCTAAAAGCAAGTTGAACAGCAAATTTCAAGTTGATGGGAACCTATA
TTTGATTATTTAAAATAGGAAAACAGTGATTACATTTATAACAGTGTAAAATTGGTAATGTATTATT
TATAATTATTATAATCATGTGTTTCCAATCCACAAAAGAATATGTACCAATTTGGCCAACATCACT
AAAATACTCTTAAGTCTATAGTAAATCAACAAGGTTTATTCAAGCTAATTACAACCCCCCCCCCTTTT
TTTTTTTTTAGCACTTTGCAAACCTTAGGACTGTGCTGTGTGTGGTATACACATTGAAATAAACAGG
GTAATTTATTGTATTCTAACAATGGCTCCTTCTCTCCTCCTCCTATGGAGGAATCCCCGGCAAGGAG
GAGTGAAAGGGTCTATGAGTGTGCAAGAGCCCTACCCGATGTCACCTTTCACAGTGACCATGCGC
CGCAGGACGCTCTACTATGG

```

20

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:66>は SEQ ID NO:15 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 66>
PARRSERVYECCKEYPDVTF

```

下記の DNA 配列 Ion60<SEQ ID NO:16>はヒトにおいて同定された：

```

CAGCGCATCGTCAAGTCCCCCGCGCCCCGCTGCTCACCGATGAGCGGCAGCTCTCGGCCGGTGGC
ATGCTCTCGGCCAGCAGCAACTGGGAAGACGGTGAGCGCCAGCAGCAGGTTGACGCCAGCGACACCT
TCTCGCCTGAGTCGGCAGCAGGTGGAAGCGAGCGCGCAAGCAGCGAGATGAGCAGCGAGGCGAGC
AGCAGGTTGCACACGTAGGGCGGGCGGGCGGGCGGCAGCAGCAGCGTGAAGGTGACGTCGGGGTAGG
GCTCGGAGCAGCAGCCGTAGGTGAGCAGCGCCGCGCGCCGCGCATGCCAGCAGCGCCACTCCACG
TTCTCCACGAAGTCCGCCAGGCTGGCTGCAGCGCCGCGGGCCGCACATCCAGTTGGTGCCCGCCGTG
AGTCCAGGAGCCGAACGTCAGGCCGAGTGTGGGCGTGAACGGGAAGGCTGCTACATCCACGCGGC
ACGAGCTGCGCGTGTGACCGGCGCTTCCAGCGCACGGCGCCATCGTGCGCAGGACCACGTGGT
GCTGGCGGAACCTGGAGGCTGCG

```

30

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:67>は SEQ ID NO:16 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 67>
NAPAI TRSSCRVDVAAPFDQAHCGLTFGSWTHGGHQLDVRPRGAAASLADFVENV
EWRVLGMPARRRVLTYGCCSEYPDVTF

```

下記の DNA 配列 Ion61<SEQ ID NO:17>はヒトにおいて同定された：

40

【表 5 - 7】

CCTCCCCTAGCACTTGACCTTTTATTAACCTCAGGTAAGCATCACCACAAACCTAGGAAGTAGGTCCTCT  
 GGGTATCCCATTGTGTACAAAAGGGATTTCGTATCTTGCCCCAGCTCATGCCCGTCTTATTTGAGAGC  
 GGGACTGTCTGGATTGTGTATGAGTGCAGCCTCCAGCAGTGACGGGAGCAATTAGAGAGCAGTAGCT  
 TCTGATGACCCACGTTAGGAATGAAGGATGGGGAGAAGCTCGGCCCTTACCTCCTTCTCTGCTTCCATC  
 CATGGGGCTTGGAGGGTCTGGAGAGCTTCCATGGTGGGCTTATTTCCATTGTGCAGAGGTGGCTGGGA  
 AGCTCAGGAACCACAGGCTTTTGTGGTGGTCAATTGGCTTTCTCTCTCTTGCAGGGAAGTACTAC  
 TGGCCACTATGACCATGGTCACATTCTCAACAGCACTCACCATCCTTATCATGAACCTGCATTACTGT  
 GTCCCAGTGTCCGCCAGTGCCAGCCTGGG

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:68>は SEQ ID NO:17 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 68>  
 SLSLAGKYMATMTMVFSTALTLIMNLHYCGPSVRFVPAW

10

下記の DNA 配列 Ion62<SEQ ID NO:18>はヒトにおいて同定された：

AGGGCCGGCTGGCTCTCAAGCTGTTCCGTGACCTCTTGCCTACTACCAAGTGCCCTGAGACCTGTG  
 GCAGACACAGACCAGACTCTGAATGTGACCCTGGAGGTGACACTGTCCCAGATCATCGACATGGTGGC  
 TTGTGGTGGTGGTACAGCTGTGGAGTCTTACCTGTCACAGTGTCAAGAAATGAAGGGGTGAGAGACTG  
 GGATTATTCTCCATGGAAATTTCTTTTCTGTAATGTTAATATTAACAAAGGTAGCAGTTACAACTGT  
 TGGGTACTGACTGTTGGGTACTGAGTATTGGGTGCCTACCTCGTGCCTCAATATTTGTTACCTGAAC  
 TTAAGTGAATCCTGCTAAGCAGGGGATTCTCACCCCATATTCCTGCTGAGGAAACGGCCAGAAAAGAG  
 AAGAGCCCCTAAGGTACATGGCAAGGTCAAGTCTGG

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:69>は SEQ ID NO:18 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 69>  
 GRLALKLFRDLFANYTSALRPVADTDQTLNVTLLEVTLSQLIIM

20

下記の DNA 配列 Ion63<SEQ ID NO:19>はヒトにおいて同定された：

CAGTGGGATTTAGAATCCCTGGGTGAAAGTCTGGACTCTTGTGGCTTATTTGGGCCCTCTAGCATT  
 GTGGAGAGGCAGGCAGACTCCAGGTCCTTGAAAAGGGGAGGGTGGAGGAGAAATTTGTCAGCCTGGCG  
 CCAGAAGATAGTACCAGTTCACCTCCATGGCCTTTACCTCATGTGTCCCTGCAGGCAGGCCAGGGAGGA  
 ACTAGAGCCACAGCTAGAGCAAGAGAAGGCAGACACCAGGAGGACACTCATAAGGACAGGGCCCCAGC  
 CCTGGGAGTGGAGGGTGTGAGCAGAGGCCCTGGGACTAGGGCCTGGGATGGACAACCCCTCCTTACTGA  
 CCCTCCAGAGTGCCTGGGAGCTGAGGGCCGGCTGGCTCTCAAGCTGTTCCGTGACCTCTTGGCAACT  
 ACACAAGTGCCTGAGACCTGTGGCAGACACAGACCAGACTCTGAATGTGACCCTGGGAGGTGACAC  
 TGTCCCAGATCATTGACATGGTGCCTTGTGGTGGGTGACAGCTGTGGAGTCTTACCTGTACAGT  
 GTCAAGAAATGAAAGGGGTGAGAGACTGGGATTATTTCCATGG

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:70>は SEQ ID NO:19 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 70>  
 AEGRLALKLFRDLFANYTSALRPVADTDQTL

30

下記の DNA 配列 Ion64<SEQ ID NO:20>はヒトにおいて同定された：

TTAGTGACGCCATTATCCAAATCTTCTAATACTTCAAAAAGGGAATCCTACAAAATAAATAATGCA  
 GTATTGTTTTATTGAGTTATACCTATATGCCCCACATACTCCACCAAAGATTTATTATTGATCTATCC  
 AGTCTCACCCATTTCTCTATTTTCTATTTGTCTAATAAAGCAGTCTCATTGTTCTTTGTCTATC  
 TGCCATCCGTCCGTCTTCTTCTTCTTCCACAGACTTCTTCTACATCCCTGCCTCTGTCTTCCC

40

【 0 3 0 8 】

【表 5 - 8】

```

CATCATCAGTACATGACATCCCCTATCTACCCATTGTTTAGACATCATCCCTACACTCACTGATTCTAC
ATTTAATTTATTTCTCAAATTCATTTACCTGGTGATTTTTCTCCATAAGCACCCCTAATCCTGACCTAT
GATTCATCTCTATACTGAGAGTCTCTTCAATTGTTTCATACTATTTATTACAACAATAATATAAT
TAGTAACTGTGTTAATGTCTGTGTACCCTAAACTATACCACAGCTCC

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:71>は SEQ ID NO:20 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 71>  
 QSHPFVLYFSICLIKQSSFVPLSICHPSVLPSPFPQTSFYIPAS

下記の DNA 配列 Ion65<SEQ ID NO:21>はヒトにおいて同定された：

```

TTTACAATAAGCAAAGGTGACAGCAACCCCAAGTGCCACTGACAGGATGAACGGGTAAACAAAACATG
GTATATACATACAATGGGAATATATTTAGCCTTAAAAAGGAAGGAAATTCGACACATGCTACAATA
TTATGTTAAATCAGCAAGTCACAAAAGAACAATACTGTATGATTTTCAATTTATATTAAGTACTTAGGG
TAGCCAAATTCATAGACACACAAGGTAGCATGGTGGTTGCCAGGAGCTGGGGGCAGGGGAAACGGGA
GTTATCGTTTAAATAGATAGGAAGTTTCAGTTTGGGAAGATGGAAAAAGTTATGGAGATGTATGGTGGT
GACATTTGCACAACAATATAAATATACGTAATGCCACTAAGCTGTATACTTAAGGATGGTTAAAATAG
TAAGTTTAAATGTTATATATATTTAACCACAGTTTTTAAAAATCCAAGTATGATTTGATTTTAA
GTACTTCTGTACTTTCTGAAATAAAAAGATGTTCAAGCCCTCTTATATTTTCCTTGCCCTACTCCTG
CTGCTAGCCATTTCTCAAGAATCTTAGTTCCTTTTAGTAGACTCATATTTAGAAACCAAGATCTGG
ACACTAGACATGCTCATTGCT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:72>は SEQ ID NO:21 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 72>  
 HYVYLYCCANVTIHLHNFHLPKLPKIYITIPVSPCQLLATMMLPCVSMNLATLSTYKNHTVFLVLL

下記の DNA 配列 Ion66<SEQ ID NO:22>はヒトにおいて同定された：

```

CTTCTGCCTCTTTTTTACATATTTCTATTTTAAAGTTTGTGAGTCAAAGAAGTTTTCACATATCCTA
AATGCTTATGGAATATGTATAATTACATTTGGAATGTTGATGCATACACTTCTGTTTTTTGTTTTT
CTTAGAGGAAAAGGTGATTTTCTCCATTGATTTGTGTAATTTTTTTCAAAGCTTAATAAGTAT
TTTATTTTGTCTTCTGTTTATGTCATTTTATGGCATTAGGACAATTAATAATATCCAGTGAAGAAAAC
CTCTCTTTTCAGTATAGCAAAATCCAAATAATTGAAAAGATTTTATTTGTTTTCATGTGGAGAAAGAG
GTGAGTCCCTCCGATTTTATGAATCTCTTAGTGCAGTAGGACATTAATTTGCTCCCCTTTCTACTT
CTTGCCATCACTAACC AATTGCCAAATGACACATCTTCTGTTTTGTTTCCCAGAAAGCTATCTGCAT
TTTTAAGAGCATCTGTATTTGTATCTAGC

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:73>は SEQ ID NO:22 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 73>  
 FSHILNAYWNMYNYIWNVDAYTSVFLFFLEEKVYFPPLICVN

下記の DNA 配列 Ion67<SEQ ID NO:23>はヒトにおいて同定された：

```

CCCACAAGTGTCAAAGGAAAAACGGAATAAGAATTCATTCAATAAAACAGGCCTTAAAGATGAATTTT
TTAAAAAAGGTAGAATAATGTTAACATGGAAAGTGAAATAGAGAGACAAAATGAGAAGTAGGCAA
AACATTACAGAGTTACCAAGTTAACCATAAAGGGAAGGAAATGTAGTAATGGCAAAGAGAAAATCCTT
GAGATAAATTAAGTCTGAATTCAGAAAAAAGGAGACAAGGAATAATCACAGAGTTGATGAAAAA
GATGGAAGGCAGAGATGATACAACATAGGAATAATGGTTTCTTTAATAGGGACCCATACTAATGG
AACAGAAATAAGTTTACAGAAAATTTCCCTAAAGGAAGGAAGAAATAACTATATATTGAAATGAC

```

10

20

30

40

【表 5 - 9】

GTGTGGTATATAAGAAAAAAGCTGATTGATAAAGAAGAATTTACATGGAAACCTCACTTCAAATAAAA  
 TCTGAGACCTTCAATTGCCTCAAAGCCCAAGGTGACACATATGCCATTGCCTCTGTGACTTCATCT  
 CATATTTATCTTGGAAAGAACTCACTCTTCACTGGCCATGCTTATCTTCTTGGCTGTCACTCAATATG  
 TCACTGACAATAATGCCCATGGTC

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:74>は SEQ ID NO:23 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 74>  
 ETNYSYVVSSLPSIFFINSVIIPCLLFFFSEFRVVISRIFSLP

下記の DNA 配列 Ion68<SEQ ID NO:24>はヒトにおいて同定された：

ATAGTCAAACCAAACTGTATATGTACTTTAACTCCCATGGTTTCCCATTCATTAAGCAGAAATTGAA  
 TGTGAAAGGGCCAAATATCTATTTTCTCCACCTACCTTCCCTTTTTCAGGGTGATTTCTTTGAGT  
 TTGGAGAAATGGGTCTGGAAACTGTAAGAGCAGAAATAATTTATTTTACTAGTGCTGTCTGTGTC  
 CTTTATTGGTTCCCTTAGCTAAGATTGACTGTCATTGATATTTATGAAGTTGGCATCAAATGCTGAC  
 TCCATTGTGCAAAAACAGAGAGTTTAAAGAGAACTTGTAGGATAGAAATTCACCTTAGTTTGGACTC  
 TCTAAATCTCTCTCTTAACTCTTGCCTGCAATAGTACACCACAATTTTCCCCTTCATCAGGTGAC  
 CTCCTTGCATAAAATATTTAAAGAGGGCTTATGCTTAGCAAGAGTCCACGTGGCCTACTTTACATA  
 CAAAAAAGCTCAAAGATTCTTATTTTGTCAATCTCTTTTCTTCAAAAAAATAATGAGAGGAAAA  
 GAAATCTGGCACCTCATTGGCAGAGATCACCTGC

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:75>は SEQ ID NO:24 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 75>  
 FFEEGEWVLETVKGRKYLEFYCC

下記の DNA 配列 Ion69<SEQ ID NO:25>はヒトにおいて同定された：

ATTATGACAGTTGATCCTCATAACAACCTCTGGAGCTACATACTGGGTGCTGTGTTATTCTCACTTT  
 ACAGATGAGTAACTGAAGGTAAGAAAAGTTGAGTGCCCGCCAGGGTTGCAAAGCGAGGAAGTGGT  
 GGAGCTGGGATGGGTGTGCCACAGTCTCTTTTGGCGAGACTGAACATGCCTAGGCTCCTAATGA  
 TTCTGCTATCTTCTTCTTTTCCCTGAGCCCCGGGCTGTGCAACCTGTGGCCAGCTTCTCTGACGGGG  
 TACATCTCAACCTACCCCATCCCTGAAAGAAGGGGCAACACGCAACCCATTCACTCCCTCCCAA  
 TGCTGGCACTGTGCTGGGGGCTGGGCTGTGATGGTGACGGTCCCTGCCCTCGCAAAGGATACTGTGTA  
 TGGGCACTGCCTGTGATGTGTTGGCTGTCTAGGCACACGAGGAGGGAGACAGGGCTGAGGAAGTG  
 GAGAGAGTGAGACAGGCAAGGGAAGGGGAAAGAGTGTTCAGGTAGAGGGAGAGTCTGAGCAGAGGC  
 CCAGAGACTGAAGAGACAGGCACATCTGAGAAGCTGAAGGGAGTCCAGTGGGTACGTGCATCAGGACG  
 CATGCTGGGAGGTCCCTGGGGTGGGGTTATGAAAGGTGCCAAGAGACTGAATGGCCACACAGAGCAC  
 ACTGAAGCCACTACAGTTGCATATTCAGAAATGCCTGAGTTCCTGGA

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:76>は SEQ ID NO:25 の DNA 配列  
 から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 76>  
 EKLSAPPRVAKRGGGAGIGCATVSFFGQTEHAAPNDSALFLPFPEPRAVQPVASFDP

下記の DNA 配列 Ion70<SEQ ID NO:26>はヒトにおいて同定された：

CAAATACATTCAGAAAACCTGTACTTAATTCACCTCTTAGGACTCATAATACATATTAGCACAGTC  
 AAGACACTGAGAAAGTCTGCAGTAAATAAATGTGGTTATGTTATTTAATCCAGTGTTTAATATTA  
 GGGCACTTTTGTAAATTAATCTGTGTGTAACGAATAACCTCAAAATCCCAGTGGCTTATAACCACAAA  
 GGTTGATTTGTGCTCATATTCGTGTGAGCTGTGCTTTGGCTCTGCTCCAGATGTCTTCTTCAATTC

10

20

30

40

【表 5 - 1 0】

```

AGATGTAGGCTAAAGGTGCAGCCTTTTTTCAGGAATATGCCATCTTATGATAAAGGGAAAAGAGCAA
AAGCCATGCCAGACAATGTCTCCTAAAGTGTCTTGCCCAAATGTGTCATGTACCGTGTCTCTCACATT
CCATTGTCCAAAGCAAATCACATGGACAAGGCCAATGTCACATAAATGGAAAGTCACAGAGCCTCCCA
CAGTGCAGTGTCTGCCAGTCCATGGAAATGCACTGTATGTATATAATCCTCTTAGAGGAAACGAAACA
TAATGTAATAATGAAATCTGCCACAAAATACACTATTTTTACACCAAATCTTTTTTAATTTAATTA
CCATATGATTGAGCAATTTTACTCTTAAGTATATATTTCAAAGAAGTGTAGACAAGCATTCAAATGAA
AACTTGTAATGAATGTCATAGCAGCACTATTCATAGTAGT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:77>は SEQ ID NO:26 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 77>
WQISLLHYCSFPLRGLYTSAFPDCDQWQHTVGGSVTFHFSDIGLVHVICFGQWNVVDT

```

10

下記の DNA 配列 Ion71<SEQ ID NO:27>はヒトにおいて同定された：

```

TATGGAATGAATGAATGAATGCATTGAAAGCCTACTTACCTAAAATCTCCTATATATTTCAAATGATTA
ATCAAAGATCTTTTCATTCACAAAATGAACTGAGTGCATTTAGAAGGCATGTGGGGTGAAGGAGATG
TGGCCCTTCTCTCTGGAGCTTAGAGTCTGTCTCCACCATTGAATCTGAAAAGCTAGCCAAATACAT
GAGTAAAAAATTAATAATCCAAATCTTTTACCAATAAATACATCGGATGACATGGCTGTAATGATCAAA
TAATTACCTGATTTCTTCCGATTCGGTTTTTAAATGTTAAACATTCAGTGTGGTTAACATACTCGCTG
ATGTGAAAGGTTGGGGCTGACTCATTACTGGGGCTAGGACAAGGGCAAATCGTGGCTCAGAAGTGTG
ATTCAGAGCCTCTTGTGTCTCTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGT
TGTCATTCTTGTTTTATGTACTCAAATGCTTCTTCTCATTGTCAACATCTGCTCTGAACTTTAAGTC
AGGCCACTTGTTTGTAAGATAGTCAATGACATAAAGCAAATAACACATCCCAGCCAGTCAAATCCA
AGAAACTCAGCTTTAAAAACACATTTGTATTAAGAATTTCACTGCAAATCCATTCTATTGTTTACC
T

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:78>は SEQ ID NO:27 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 78>
WICSEILYKCVFKAFLGFDWLGCVICFMSMSYSTNK

```

20

下記の DNA 配列 Ion72<SEQ ID NO:28>はヒトにおいて同定された：

```

CTCTCTTATGCTCTCCAGCAAAATAACTTCAGTACTTTATCAGAAATGGGGTTTTAGACAGGATGTT
TCTTTGGTTAGATTTGGTATCATGTGTCTTAGGTATTTATATCTTTATCCCTTAACCATACACATACT
TTACTTGGGGTAACCTTAGTAAATAAGATCTTCAATTAAGCTTAGAAGCTTGTAGGATATTAGAAAGC
CAGAGTCCATATCTGTTTGTGGGGACAACCTCAGACATCCCATCTCCATTGACTATATTTTTGAGTGA
CTTTTTCGTAATTAGACTCTCTACCTTCAAATTCAGTCTCTGTGGGATCATTGATTAAA

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:79>は SEQ ID NO:28 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 79>
VLDRMFLWLDLVSCVLGIYIFIP

```

30

下記の DNA 配列 Ion73<SEQ ID NO:29>はヒトにおいて同定された：

```

AGCTGAGCAGAGTCTATGCAGGCCATTGGCTGCCTAGCCAGTGGTGATCCCGCTCCCACCCTCATT
CTTCTTTGTTAAGAAAACCATGACCTCATTAAATATGGACACCTATAAACCTCAGGGACCTTGGTGC
AGCCTCCCCGCCAGTATTGGTGTAGTCTAAGTCAACTCTGGTCAATTCATTCTCTGGACATTGATTG
CTTGAGGCTTGGGCATGAGCTGCCTCTTCACTGTAGCCTGAGCCACAGGTGCCCTCTGCACTTACCAC
ACTGATGCACTGCCCCAGGGAGACTCTGTCTCGATGGAGATGAGCTGTGAGGAGCTGGTGGCTGGGC

```

40

【 0 3 1 1】

【表 5 - 1 1】

```

AGATCAGGTTGTTGTAACGGGTTTGTTCAGAAGGTCGTCCATCAGCTTCTGCTCAGCATGAGCCATG
CGGCAGTCCCCTGGGTAAACACACAGACATGCTGGGCCCTTGTGCAGCTGTCCCACACTGCAGATGAC
AGCTACAAAGCAGGAGCCAAGAGGGCCAGGGGAGCACAGGCACCCCGGGGGCCGGCTGAAGCAGTGAA
GGTGCTGGCGGACCAGGCTCTCCCTGGGGACTTCAAATGACATTCATGACAGAGCTCAGCTACTTT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:80>は SEQ ID NO:29 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 80>
GDCRMAHAEQKLMDDLLNKTRYNNLICPATSSSQLISIE TELSLAQ CISVVS AE

```

下記の DNA 配列 Ion74<SEQ ID NO:30>はヒトにおいて同定された：

```

TCTGCAGGCCCATTTGGCTGCCTAGCCAGTGGTGATCTCGCTCCCACCCCTCATTTCTCTTTGTTAACA
AAACCATGACCTCATTAAATACTGGACACCTATAAACCTCATGGACCCCTCCTCCAGCCTCCCACCGT
GTACCGGTGAGTCTAAGTCAACTTAGTCAATTTCTCTGGACATTGACTGCTTAGGGCTTGGGC
ATGAGCTGCCTCTTACCTGAGCCTGAGCCACAGGTACCCTCTGCACCTACCACGCTGATGCACTGGG
CCAGGGAGAGCGCCGTCTGGATGGAGATGAGCTGTGAGGAGCTGGTGGCTGGGCGGATCAGGTTGTTG
TAACAGGTTTTGTTTCAAGAAGGTCGTCATCAGTTTCTGCTCGGCATGGGCCATGCGGCAGTCCCCTGG
GTAAACACACAGACATGCTGGGCCCTTGTGCAGCTGTCTCCACTGCAGCTGACAGCTATGAAGCAGG
AGCTGAGAGGGCCAGGGAGCACAGACACCCCTGAGAGCTGGCTGAAGCAGTGAAGGTGCTGGCCGGCT
GGCTTTCCCTGGGGACTTCAAATGACATTCAGACAGAGCTCAGCTACCTCCTCCCATGCCATACCT
CT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:81>は SEQ ID NO:30 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 81>
GDCRMAHAEQKLMDDLLNKTCYNNLIRPATSSSQLISIQ TALS LAQCISV

```

下記の DNA 配列 Ion75<SEQ ID NO:31>はヒトにおいて同定された：

```

CTGTGAGGAGCTGGTGGCTGGGCGGATCAGGTTGTTGTAACAGGTTTTGTTTCAGGAAGTCGTCCATCA
GTTTCTGCTCGGCATGGGCCATGCGGCAGTCCCCTGGGTAAACACACAGACATGCTGGGCCCTTGTGC
AGCTGTCTCCCACTGCAGCTTGACAGCTATGAAAGCAGGAGCTGAGAGGGCCAGGGAGCACA

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:82>は SEQ ID NO:31 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 82>
GDCRMAHAEQKLMDDFLNKTCYNNLIRPATSSSQ

```

下記の DNA 配列 Ion76<SEQ ID NO:32>はヒトにおいて同定された：

```

AGCTCCATCTCGATGGAGATGAGCTGTGAGGAGCTGGCGGCTGGGCGGGATCAGGTTGTGGTAAACGGG
TTTTGTTTCAAGAAGGTCGTCATCAGCTTCTGCTCGGCAGGGCCATGCGGCAGAACCCCTGCGTAAACAC
ACAGGACCTGCTTGGTCTTGTGCAGCTGTCCCCACTGCAGCTGACAGCTATGAAGCAGGAGCTGAG
AGGGCCAGGGAGCACAGACACCCCTGAGAGCTGGCTGAAGCAGTGAAGGGGCTGGCCGGCCTGGCTCTC
CCTGGGACTTCAAATGACATTCATGACAGAGCTCAGCTACCTCCTCCATGCCATACCTCTTCTCTCC
TCCTCCTCCCTCAATCAATGAACAGCATCCCACGCTCTACACATCTGATACAAAAC TGGGTATCTCTT
CCTGACCCCTCCCTTGGTTCAATAAGTGGCCACCAAGTCTCTGTCTGCCATCTCCACGGGTAC
AGCCATGTCCCTGCCTCCCCCGCCCTGCCACCTTCTATTCTCTCCACCTGCACCCCTGCCCTG

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:83>は SEQ ID NO:32 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

【 0 3 1 2】

10

20

30

40

【表 5 - 1 2】

<p>&lt;SEQ ID NO: 83&gt; AEQKLMDDLLNKTRYHNLIPPSRQLLTAHL</p>	
<p>下記の DNA 配列 Ion77&lt;SEQ ID NO:33&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>AGACACCCAGTTTGTATCAGATGTGTAGAGCGTGGGATGCTGTTATTGATCGAAGGAGGAGGAGGA GGAAGAGGTGTGGCATGGGCGGAAGTAGCTGAGCTCTGTCATGAATGTCATTTGAAGTCCCCAGGGAG AGCCTGGTCCGCCAGCACCTTCACTGCTTCAGCCGGCCCCGGGGTGCCTGTGCTCCCTGGCCCTCTT GGCTCCTGCTTTGTAGCTGTACCTGTGAGTGTGGACAGCTGCACAAGGGCCAGCATGTCTGTGTGT TTACCCAGGGGACTCCGCATGGCTCATGCTGAGCAGAAGCTGATGGACGACCTTCTGAACA</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:84&gt;は SEQ ID NO:33 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 84&gt; GDCRMAHAEQKLMDDLLN</p>	10
<p>下記の DNA 配列 Ion78&lt;SEQ ID NO:34&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>TCTTATTTTTCCAATGTAGTTTCTAGAACCGTTAGCACAGAAAGTTATAAACATTGTATAATTATTCA TCTAAATGAATGTAATAATAACTACAAAAAATTATGCTACTGGCTGTAACATAACTTAGTAATTAT TCTGTTTGTATGTAAGTACTAGTCCAGAGGTTTATGGCTAAATGATCTCTAATAATTATTCTTAT TTTCAAATTTAAATGTCAATTTGCTGAATATATACATAACAATAAAGGCTTTATAACTATGTGTATTAGT TTGCTAGGAATGTCATAACAAAATACCATAGACTATGTGGTTTAAACAGCAGAAATGCATTTTCTCAC AGCTTCAAAAAGGCTCTAAGTCTGGTATCAAGGTGTTAGCAAATTTGGTTTTTCCCTAAGGTCTATCTT CTTTCTTTTCAGATGGCTGCCTTCTCCTGTGTCCTCAGATGGGCTTTTCTGTGTGCATATGCATCCT GTGCTATGTCCAAATTTCTTTTTAAATAATGACCCAGTCATACTGAATGAAGGTCCACTCATATG ATTTTCTAAGCTTAATTACCACCTTAGAGGCCCTATTCTAAATATGGTCATATTCTGTGGAACGTG AGAATTAGCTCTCAACATATGAATTTGGGGGACAAAATTCAGCATATATTTCTGATACATAGAGC</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:85&gt;は SEQ ID NO:34 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 85&gt; NLVFPKVVYLLFFQMAAFFLCPHMGFSLCICILCLCPNFLFKIM</p>	20
<p>下記の DNA 配列 Ion79&lt;SEQ ID NO:35&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>TTCAATCTGCAATGTCCCTTGCACTGACCAGGGCTCCATTTCCCTTATCAGAGGCTATGATGGAAATGA TGTGGGAGTTCACCTGGCTGAGACGGGAATGACTCTGTGCATGGGCTGGAAACCCTGTGGCTTGCTTAG TACACCATAACAATGGTATTTACCTTGGACACCAGATTGCAGCAGGAGACAGGTAACATGTGACAA TTTTTTTTTTTTAATTTTTTACCATTGTTTTCGTAGATATTTCTAGGCCAGTCTAAGAGTTTGTCTT TGGGAGATTAGTCTGGAGGCCAGAAGTCTGAGATCAAGGTTGGTTTTTCTGAGGCCTCTCCTTG GCTTGGAAACAGCCGTTTTCTCGGTGCTTTCACATGGTCTTTTGTCTGTACCTGTCCAAATTTCCCTT TTCTTATAAGGACATCACTTGTATAAGATAAGGGTTTTCCCTCATTTAACTTAATTACCTCTTTAA AGGCCCTATCTCCAACACAGTTACATTTCCGAGGTACTGCAGGTCAGGGCTTCAGCACATGAATTTG GGCAAGGATGGAGAGGTTGGAACAATAACAATTCACCCGTAACACCAGATCTGACTCCTCTCACTA GCCTCCT</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:86&gt;は SEQ ID NO:35 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 86&gt; EFTWLRNDSVHGLETLWLAYTIQWYFTLDTRLQOETGN</p>	30

10

20

30

40

【 0 3 1 3 】

【表 5 - 1 3】

下記の DNA 配列 Ion80<SEQ ID NO:36>はヒトにおいて同定された：

ATTGCCCTGCTCTGGAAGCATGCAAAGTGGACCAAATTCAGTCCAAAGGCTCTGGGAGTAAATTTAGCTC
TGCCACTTACTTGCCTTGTGACCTTGGACAATGATCATCTATAAAGGAGTGATGAGAAATAGTACTAC
TTCTTTGGTATATGTTGTGTGTGTGTTTTGCGTGTGCGCCATGTGTGGGTGCGCGTATTTAAAAA
GCTAAGAAATGCAAAGGGTCAAAGCGCTAAGCCTGGGCTCAAGAGGTGCTCAGGGAAAGCTGATTG
TCAGTCAAAAAGTCAAACCTGCACGTTTTCTACCACCACTTGTGGTAGCGGTAGCGGGCAATGACTC
TTCCGGGGTCTCCTGTGTGCGCTAGGCTGGCGCCGAGGTCCTCGACTGTAGAAAAGATAGTTGATGTAG
ACATACTCCAGCAAGGACAGGAACACAAGAACAAGCACACGAGGATATAGATATCAATGGCCCTTGAT
ACAGAAATGTTGGGGAGCTTATCCCGCAGATGTGAGTCGATGGTGGTTCAGGATGAGCATTGAAGTTA
AGCCTGTAAGCAACACAGTACAGACTTAGTCTCCTCTGATGGCTAACGTTCTTGCCAACCT

10

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:87>は SEQ ID NO:36 の DNA 配列
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 87>
GLTSMILILTTIDSHLRDKLPNISCIKAIDYIXXXXXXXXXXXXLEVVYINLYFY

下記の DNA 配列 Ion81<SEQ ID NO:37>はヒトにおいて同定された：

AAACATTCAAACCTGTATCAGAGGCCAAGGCAGTTCAGGCTGAGTGAACAGCAGTGTCAAATACTGCT
CAGGTCAGAGCTGGTGTGGCCAGTGAACCTGGGAAATTTAACATCAGAGGGGGCAATCTTGACTTTCTC
CAAAGCATTCTCAGTGGAGTGGTAGGAGTAGGAGTCCAGAAGATTGGGGATGAGTGAAGTGGC
TGAGATGGGAAAACAGCAAGTGTAGAAAATCATAACAAGTTTGGTTGTGAAGTGACAGAAAGAGTAGC
TAGAGAAGTGAAGGATTTCTTAGCTGGTAGAGATCCAGGGATGCTCCATTGCTTATGAGGGGACA
GGAAAGAGGGGAGGGTTGAAGATATGGGATGAATGACAGGGAAGAAAGCATTCCCAAACACAGAGGAG
GTCCCCAAAATGGATCCTGATACAGGTAAGTGGAAAGGTTTGTGGCAGAATGTTGAGAAACCATCCA
TTCAATGGCTTCTGTTTAGTCTCTGATATGAAAGACAAAGTCCCTGCCAGATGGATGAAAAGATAG
TGGGATAGAAAATGGAAAAAAAACAAAAAAGGGAAAAAGGTTGAAATAGCCTTTGAGAAGCATGAA
GAGAGAGCTGGAGGCTTGTGAACCTGCTGAGAGCCAGTGGAAAGCTGGAGACTG

20

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:88>は SEQ ID NO:37 の DNA 配列
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 88>
LSFISETKQKPLNGWFLNLPQTFFPLTCIRIHFHGGPPLCLGM

下記の DNA 配列 Ion82<SEQ ID NO:38>はヒトにおいて同定された：

CTTTAAACACAGTGGGACACTACCATTAAAGAGGAATCTTCATCACTAAAAGTAAGGTAATTTTGT
TAGAAAATGCAAATCCTAACACAAAAATCGGATCAAAGGTAAATCACAAATAATGTTTGGGTACAA
AGAATCTACCACTGTGGGAAAATTCAGGCCATAATAACCACTCTTACACAGGGGATCCAATGGGAG
ACATTTGAAAAACAGAAATACACTTTTCTTGGTGAGCAATGTTAGGTACTCCAGTTTCACTTAACTT
TGTCTTTGGTTATGGGCTCAAGCGTCCCTATTTCTGTAAACAAACACATAAATATTCAAAAGAGTAT
CTCTAAGTAAGTTGAGGTTTATAAAATAGAAATTTTCTTTTAAACATACCGAGGCTTTATTTTTTAG
CTTTCTGCTTTAGTAGCAGTCTTCTCTTTTGGTTGCTGGTAAAATAATGCAAGGTTCCATATCCCA
TCAAGGGCTGCAAAAACAAAAATGAAACAAACAGAAACAAAG

30

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:89>は SEQ ID NO:38 の DNA 配列
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 89>
LFLFVSFLFLQPLMEYGLHYFTSNQKGTATKDRKLNKASV

40

【 0 3 1 4】

【表 5 - 1 4】

下記の DNA 配列 Ion83<SEQ ID NO:39>はヒトにおいて同定された：

CTCTATGTAGCCCCAACTAAACATGTCTGTGGGCTAGATTAGCCCTTTGGCCAGCTGGCCACCAGTTG  
ACCATTTCTGTAGACAAGATTCTCAGAAAGGCAACCACAGCCTCAACTTTTACAGGATTATTTTCTAC  
CTAAAGAGGCATGTGCATAAATGGCAGGATGCCAGCACACCTCATTTTACTGTGTTCACTTTATTG  
TACTTCACAAATATTGCATTTTTTAACAAATGGAAGGTTTCTGGCAACCCTGTGTCAAGCAAATCTAT  
CAGTGCCATTTGTCCAACAGCATGGCTCCCTTCCCTGCTCTGGGTACATTTTGGTAATTTTTCGCA  
CATTTACAGTTTCTCATTATTATATATCTGTTATGGTGATCTGTGATCAGTGATCTTTGATATCC  
TATTCTAATTTGTTTCAGGGAGCCACAACTGTGCCCATATAAGATGGAAAACCTCCAATAAATGCTGT  
GTGPTTCTGACTGCTCATCACTGATTGGCTGTTCCCTCATCTCTTCTTCTCCTAGGGCCTCCCTA  
TTCCCTGAGAGACATCAATACTGAAATTAGGCCAATCAATAACCCTACAATGGCCTCTATGTGTTCAA  
GTGAA

10

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:90>は SEQ ID NO:39 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 90>  
LASWPPVDHFCRQDSQRGNHSLNFYRIIFYLKRHVHKWQDAQHTSFYCVSLYCTSQILHFLTNGRFLATLC  
QANLSVFPVQOHALPSCLVWTFW

下記の DNA 配列 Ion84<SEQ ID NO:40>はヒトにおいて同定された：

TCCAGCTCAGAACTACCAGCCTTCATCAACATGCTGAGCTTAGGGGCATGGATATGTGGAGAGCAGG  
AGCCTCAGTGGTGGCCTTGTGTCCCCAGTCTGGCTGGACACTCGCCTGGCCTGGAACTAGTGCAC  
ACCCGCGGCACGCCATCAGCTGCCCTGGGAGTCTCTCTGGACACCAAGGCTCACCATCCTGGAGGCG  
TAAGTGAGACAGTTCCCTGCCCGAGGAATCTGCCATGCATAGCCCTCCTTTCCCACTTACAACTAG  
AGGCTGTCTGAGTGAATATGACCCTCCTGGCGGTCCCGCCGGACTAGCAGTGCACCTTCACTGCCTC  
GAATCCCCCTCCACTGCCAGAACTCTGAAAGCAGCTGGGGTTGGGGTTGGGATGCCAGGGTCTCCCC  
CCGGCCCCGTCCAAGAAGGGGCTGGGGCTGGCTGTGGTGCCTTCCCCACAGGCTCTGGGTGGACT  
GGAGGGACCAGAGCCCCAGGCTCGAGTAGACCAGGACGGCCACGTGAAGCTCAACCTGGCCCTCACC  
ACGGAGACCAACTGCAACTTTGAGCTCCTCCACTTCCCCGGGACCACAGCAACTGCAGCCTCAGCTT  
CTACGCTCTCAGCAACACGGGTGCTGACAGGGCAGGGGCTGCAGGGTTGAGGAGGGGA

20

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:91>は SEQ ID NO:40 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 91>  
RVDQDGHVKLNLLALTTETNCNFELLHFPRDHSNCSLSFYALSNT

下記の DNA 配列 Ion85<SEQ ID NO:41>はヒトにおいて同定された：

AGGCCATGGCAACCTGAGCCTCTGGCCTTGTGCAAGGGGCCGAGCCACTGCAGTGCCTATGGCTGTG  
GAGGGCAGTTGCTCTGGGGAGGACAGAAGACTGATGTGCTCGGACCTCTGGGATTGCAGAGCTGCTGC  
GAATGTTTGAGTCTGTACCCCTAGAGAGGGGCCCTGAGGCTACCGCTGAGCACAGAGATGGGCTGCCA  
CTCGAGTGGGGGGCGCAGTGGGAGAGCAGGTGCTGCCCGCCTAAGCCTGGGGTAGACTGCTCTGAACA  
CAGATCTGGGAGTTCGCCTTCTGTCTGCCTTTGCCCTTCCCCTTGCCCCGCACCCTGCCCTGCACC  
ACAGACCTGGGAGTTCCCCTCCCCACCTTCCTCCTCCCCTCCTCAACCCTGCAGCCCTGCCCTGTC  
AGCACCCGTGTGCTGAGAGCGTAGAAGCTGAGGCTGCAGTTGCTGTGGTCCCGGGGAAGTGGAGGA  
GCTCAAAGTTGCAGTTGGTCTCCGTGGTGAGGGCCAGGTTGAGCTTCACGTGGCCGTCTGGTCTACT  
CGAGCCTGGGGGCTCTGGTCCCTCCAGTCCACCCAGAGCCTGTGGGAAAGGCACCACAGCCAGAGCC  
CCAGCCCTTCTTGGACGGGGCCGGGGGAGACCTGGCA

30

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:92>は SEQ ID NO:41 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

40

【 0 3 1 5】

【表 5 - 1 5】

<p>&lt;SEQ ID NO: 92&gt; RVDQDGHVKLNALTTETNCNPELLHFFRDHSNCSLSFYALSNT</p>	
<p>下記の DNA 配列 Ion86&lt;SEQ ID NO:42&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>AATTATAGAAAATCCAAATATCCTGGCTGGGGTGAGAGTCTGTAAGCTAGCCAGAGAAAACAGCTAAG GCTAAGAAAATAAAATATAGGAGAAAATCTAGAAAATCCAGATATCCTGGCTGGGGTGAGAGTCTGT AAGCTAGCCAGAGAAAAGAGCTGAGGCCAAGACAATAAAATATAGGAGAAAATCTAGAAAATGAAA ATTGGTTTTATGTCCCAGATCTGTACCCTTCTCCCCCTCTGATPGTTCACCTTGATTTTAGATGGTGAA TGACAAATATTGGTGAAGAAAATCATTCCATGAAACACTGGTAACCATTTGTCGAAAACGCCTTCATG GCAGCATGCCGTGGCTCAGTACATTGCACCTGCACCTCCAAAGTGAAGGTGACTGTTACCTGAAACC CATGTGCCCTGGCACACATGACCAGCCTTGGACACAAGAGGCCTTTGATCAGAAACTGGGAGGCACTCC CACATCCCACAATGAAATCCGTGGGTGCCTGTACCCTGAGTTCATCCAACACATGGTTACTGATCA TGTAGGGTGTACCAGGCTATGTCAGACGTTAGAGACACCATGAAGAGCAAACAGTTAGCTTATGGGGA GTGCCTAACGCACACCTGCCATTTACATCTTTGTCTCATGATTCCTCCCACTGAACCAATGGCACTG</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:93&gt;は SEQ ID NO:42 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 93&gt; LEFSPIFYCLRLSSFLWLAYRLSPQPGYLDLFLEFSPIFYFLSLSCFLWLAYRLSPQPGY</p>	10
<p>下記の DNA 配列 Ion87&lt;SEQ ID NO:43&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>ATGTCTCTTTTGTAAATAGTTTTGGGTGGCTCAATTTTAGGACTATTGTTCTGTTTTCTTTCCT CAGTTTTAATTGCCAATTTAAGCTCTGGACAAAATCTGAAAATTTACAACCTGGAATTTACAAGAAGG CCTCGTATTATAAAGTTTGTGCTGGTTTGTGAGACTTGGGTGTGGACAGTTTGAATAAGGTTTTTC ATAGAAAAGCATCAGTGAAAGAAAAGAAAATAAATATATTTTTAAAGTAACTTTCCTCCTTCCAATAAA ACTTCTAAAAGTCAATACATAGACTTTTTCAAAAACATAAAAAAAATGCCAGATATAGGGCTCTTC ACCCAAAGATTAAAATAAGTTTTTTTTAAAACAAAACAAAACAAAACAAAAGAACATATGGCTGAA ATAAAAGTGCCCTTTGGTAGAATATGCAATGAAAGTGTAGGTTGGGTCCAGAGAAACAGTTGTGTGCA GACATCAATCTCAGGAGACAATGAGGAGTGAAGCAACAAGATTGAATGGCGGAAAGTTGAAGGGTG ATACTGTTGAAATAG</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:94&gt;は SEQ ID NO:43 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p> <p>&lt;SEQ ID NO: 94&gt; FNFFPFNLVCFTPHCLLRIDVCTQLFLWTQPTLSLHIL</p>	20
<p>下記の DNA 配列 Ion88&lt;SEQ ID NO:44&gt;はヒトにおいて同定された：</p> <p>TCTCCTTCATAGATTACTCTTTTTCATTACCCTTGTGCCATATAACATCTTAGCTGTGTGAGACCAGGG AGAAAGGTGTGGTCACTACCTTGGCAGTAGGAAGTCTTTCAGATCTGATATTAATTGTGTATTCA AATGTCAAGGTATCCTAGTACAGAAAATATCAGTGGGTATTCTGATAAGGAAAATACTATTTGCTAA TTTTAGAAAAGAGAAATATGCTAAAAGTTACACCTCAGAGGGAATATCATTTGATATGGTGAACAGGAA ACCCAAAGAGTTGTGAATCCATTCAAAAGATGAACTGCTTAGAAGATAATGTAAGGTTCTCACCCA ACATGAGCACTGCACCAAGCCATTTCTAGGATGAAAGGTTGGGATGATTATCTATATTTCCAGCCA TGAATTTATTTCTGTGGCCTCCAGAAGATGCAACTGAATTGTAGCTATGTGTCAGAAATCGGTTCCCTTC TGGTGGGTTCTTGGTCTCGCTGACTTCAAGAATGAAGCCGTGGACCCTCAGGTGAGTGTTCAGTTC TTAAAGATGGTGTGCTGGAGTTTGTTCCTTCAGATATTCAGATGTGTCCCGGAGTTCTTTCTTCTGT GTGGGTTTTGTGGTCTTACTGACTTCAGGAGTGAAGC</p> <p>下記のアミノ酸配列&lt;SEQ ID NO:95&gt;は SEQ ID NO:44 の DNA 配列 から誘導される推定アミノ酸配列である：</p>	30

【 0 3 1 6】

10

20

30

40







【表 5 - 1 9】

```

AGAAACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTTCCCCTTCGACCAGCAGAACTGC
ACACTCACCTTCAGCTCATCTCTACACAGTGGACAGCATGTTGCTGGACATGGAGAAAGAAGTGTGGGA
AATAACAGACGCATCCCGAACATCCTTCAGACCCATGGAGAATGGGAGCTCCTGGGCCCTCAGCAAGGCCA
CCGCAAAGTTGTCCAGGGGAGGCAACCTGTATGATCAGATCGTGTCTATGTGGCCATCAGGCGCAGGCC
AGCCTCTATGTATAAACCTTCTCGTGCCAGTGGCTTTCTGGTGGCCATCGATGCCCTCAGCTTCTACCT
GCCAGTGAAGTGGGAATCGTGTCCATTCAAGATAACGCTCCTGCTGGGCTACAACGTTCTCCTGCTCA
TGATGAGTGACTTGCTCCCCACCAGTGGCACCCCCCTCATCGGTGTCTACTTCGCCCTGTGCCTGTCCCTG
ATGGTGGGACGCTGCTGGAGACCATCTTCATCACCCACCTGCTGCACGTGGCCACCACCAGCCCCACC
CCTGCCCTCGGTGGCTCCACTCCCTGCTGCTCCACTGCAACAGCCCCGGGAGATGCTGTCCCACTGCGCCCC
AGAAGGAAAATAAGGGCCCCGGTCTCACCCCCACCACCTGCCCGGTGTGAAGGAGCCAGAGGTATCAGCA
GGGCAGATGCCGGCCCTGCCGAGGCAGAGCTGACAGGGGCTCAGAATGGACAAGGGCCAGCGGGAACA
CGAGGCCCAGAAGCGACACTCAGTGGAGCTGTGGTTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCTCTTCC
GCCTTACTGCTCTTCATGGCCTCCTTATCATCACCGTCATATGCCCTGGAACACCTAGGCAGGTGCT
CACCTGCCAACTTCAGTCTGGAGCTTCTCTGCTCCAGGGACTGGCCAGGTCTCCCCCTTTCCCTGAGTA
CAAATATCATATCCCCAAGATGACTGAGTCTCTGCTGATTCCATGTATCCCAATCCGGTCTGCTGAT
CAATCCAAATCCAGACATTTCTCCCTGTTCCCTGCATTTGTTGGCTTCCTTCACTCCTACCATATGGTTC
TAGGTCCTCTTACGTCATGTCATAGCAGACTATACCTCTTCTGCCCGCTGACTTGCCCAATAATAATT
CTGCAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCG
CTCT

```

10

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:106>は SEQ ID NO:104 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 106>
GTGPEFPGRPALGFLSYREHRVALLHLTHSMSTTGRGVFTTINCSGFGQHGADPTALNSVFNRKPFRRPVT
NISVPTQVNISFMSAILDVNEQLHLLSSFLWLEMVWDNPFISWNPEECEGITKMSMAAKNLWLPDIFIIE
LMDVDKTPKGLTAYVSNEGRIRYKPKMKVDSICNLDFYFPDQONCTLTFFSFLYTVDSMLLMEKEVWE
ITDASRNILQTHGEWELLGLSKATAKLSRGGNLYDQIVFYVAIRRRPSLYVINLLVPSGFLVAIDALSFYL
PVKSGNRVPFKITLLGYNVFLMMSDLLPTSGTPLIGYFALCLSLMVGSLLETIFITHLLHVATTQPPP
LPRWLHSLLLHCNSPGRCCPTAPQENKGPGLTPTHLPGVKEPEVSAGQMPGPAEELTGGSEWTRAQREH
EAQKQHSVELWLQFSHAMDAMLFRLYLLEFMASIIITVICLWNTAGAHLPTSVWSFSCLOGLARSPPFPEYQ
LSYPQRLSLCCIPCIPIRSCSIPIDISPCSCILLASFPTIWFVPLTSSAQTIPLLPADLPNKFCREKKK
KKKKKKKKKKKKKRAAA

```

20

下記の DNA 配列 Ion52<SEQ ID NO:107>はヒトにおいて同定された：

```

CTGAAAGGTCCATCGCGTGGCTGAACTGCAACCACAGCTCCACTGAGTGTGCTTCTGGCCCTCGTGTTC
CCGCTGGGCCCTTGTCATCTGAGCCCCCTGTCAGCTCTGCCTCCGCAGGGCCCGGCATCTGCCCTGCTG
ATACCTCTGGCTCCTTCACACCTACAGAAAGACAGAGACTCAGCCATGGGCTGCAAATGTCACCTGTGGAG
GGAGGGAGACAGGGAAGGAGGCAGGACAGAGAAGTGGAGGTGGGGGAAGAGGAATGTGACTTCCCTCACC
GGCAGGTGGGTGGGGGTGAGACCCGGGCCCTTATTTCTTCTGGGGCGCAGTGGGACAGCATCTCCCC
GGGCTGTTGAGTGGAGCAGCAGGGAGTGGAGCCACCGAGGCAGGGGTGGGGCTGGGTGGTGGCCACGTG
CAGCAGGTGGGTGATGAAGATGGTCTCCAGCAGGCTGCCACCATCAGGGACAGGCACA

```

30

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:109>は SEQ ID NO:107 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 109>
CLSLMVGSLLETIFITHLLHVATTQPPPLPRWLHSLLL

```

下記の DNA 配列 Ion111<SEQ ID NO:108>はヒトにおいて同定された：

```

CCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGSTGGGTGGATCACTTCAAGTTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAA
CATGGTGAACCTCATCTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCAGGCCTGGTGGTGCCTG
TAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCTGAGACAGGAGGATCATTGAGCCAGGACATGGAAGTTG
CAGTGAGCTGAGAGCATGCCACTTACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGATCCTGTCTCAAAAAA

```

40

【表 5 - 2 0】

```

AAAAAAAAAAAAAGGAGAGAGAAAAGTGGCGCCCTGCCTCTTGCGTTATCTCTCCTCCAGCATGGA
TGTGGATAAAACCCCAAAGGCTCACAGCATATGTAAGTAATGAAGGTCGCATCAGGTATAAAAAAC
CCATGAAGGGGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTTCCCCTTCGACCAGCAAACTGCACA
CTCACCTTCAGCTCATTCCCTCTACACAGGTAAGTTGCAGTGAGGTTCTCAGGGATGGGGTGAATGAGAG
CAACCAACAAATTTAAAGAACTATGAGTAAATGGTGACC

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:110>は SEQ ID NO:108 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 110>  
LSSSMDVDKTPKGLTAYVSNRIRYKPKMGDSICNLDFYFPDQONCTLTFSSFLYT

下記の DNA 配列 5HT-3C<SEQ ID NO:118>はヒトにおいて同定された：

```

ATGTTAGCTTTTCATTTTATCACGGGCGACCCACGCCCTGCCTTGGGGCCCCTCTCATATAGGGAGCACAG
GGTTGCCTCTCCTTCATCTCACACATTCGATGTCCACTACAGGAAGGGGCGTTACTTTCACCATCAATTGCT
CAGGGTTTGGCCAGCAGCGGGGCGGATCCCACTGCTCTGAATTCAGTGTTAATAGAAAGCCCTCCGTCCG
GTCACCAACATCAGCGTCCCCACCAAGTCAACATCTCCTTCGCGATGTCTGCCATCCTAGATGTGAATGA
ACAGCTGCACCTCTTGTATCATTCCTGTGGCTGGAAATGTTTGGGATAACCCATTTATCAGCTGGAAAC
CAGAGGAATGTGAGGGCATCAGGAAGATGAGTATGGCAGCCAAGAACCTGTGGCTCCAGACATTTTCATC
ATTGAACATCAATGGATGTGGATAAGACCCCAAAGCCCTCACAGCATAATGAAGTAAATGAAGGTCGCATCAG
GTATAAGAAAACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTCCCCTTCGACCAGCAGA
ACTGCACACTCACCTTCAGCTCATTCCCTTACACAGTGGACAGCATGTTGCTGGACATGGAGAAAGAAGTG
TGGGAAATAACAGACGCATCCCGGAACATCCTTCAGACCCATGGAGAATGGGAGCTCCTGGGCCTCAGCAA
GGCCACCCGAAAGTTGTCCAGGGGAGGCAACCTGTATGATCAGATCGTGTCTATGTGGCCATCAGGGCGA
GGCCAGCCTCTATGTCATAAACCTTCTCGTGCCAGTGGCTTCTGTTGCCATCGATGCCCTCAGCTTC
TACCTGCCAGTGAAAAGTGGGAATCGTGTCCCATTCAAGATAACGCTCCTGCTGGGCTACAACGTTCTCT
GCTCATGATGAGTGACTTGTCTCCCACAGTGGCACCCCTCATCGGTGTCTACTTCGCCCTGTGCCCTGT
CCCTGATGGTGGGCAGCCTGCTGGAGACCATCTTCATCACCCACCTGCTGCACGTGGCCACCACCCAGCCC
CCACCCCTGCCTCGGTGGCTCCACTCCCTGCTGCTCCACTGCAACAGCCCGGGGAGATGCTGTCCCCTGC
GCCCCAGAAAGGAAAATAAGGGCCCGGGTCTCACCCACCACCTGCCCGTGTGAAGGAGCCAGAGGTAT
CAGCAGGGCAGATGCCGGCCCTGCGGAGGCAGAGCTGACAGGGGGCTCAGAATGGACAAGGGCCAGCGG
GAACACGAGGCCCAGAAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGGTTGCAGTTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCT
CTTCCGCTCTACCTGCTCTTATGGCTCCTCTATCATCACCGTCAATATGCCTCTGGAACACCTAGGCAG
GTGCTCACCTGCCAACTTCAGTCTGGAGCTTCTCTGCCTCCAGGACTGGCCAGGTCTCCCCCTTTCTCT
GAGTACCAACTATCATATCCCCAAAGATGACTGACTCTCTGCTGATTTCCATGTATCCCAATCCGGTCTG
CTGATCAATCCAATCCCAGACATTTCTCCCTGTTCTGCAATTTTGTGGCTTCTTCAGTCTACCATAT
GGTTCTAGTCCCTCTACGTCATCTGCATAGCAGACTATACCTCTTCTGCCCCTGACTTGCCCAATAAA
TAATTCTGCAGAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGC
GGCCGCTCTAGAGTATCCCTCAGGGGCCAAGCTTACGCGTACCAGCTTCTTGTACAAAGGTCCTTA
TAGTGAGTCGTATTTAAGT

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:119>は SEQ ID NO:118 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

<SEQ ID NO: 119>  
MLAFILSRATPRPALGFLSYREHRVALLHLTHSMSTTGRGVFTTINCSGFGQHGDPTALNSVFNRKPFPRP  
VTNISVPTQVNI SFAMSAILDVNEQLHLLSSFLWLEMVWDPFI SWNPEECEGITKMSMAAKNLWLPDIFI  
IELMDVDKTPKGLTAYVSNRIRYKPKMKVDSICNLDFYFPDQONCTLTFSSFLYTVDMSLLDMEKEV  
WEITDASRNILQTHGEWELLGLSKATAKLSRGGNLYDQIVFYVAIRRRPSLYVINLLVPSGFLVAIDALSF  
YLPVKSGNRVFPFKITLLLLGYNVFLMMSDLLPTSGTPLIGVYFALCLSLMVGSLLETIFITHLLHVATTQP  
PPLPRWLHSLLLHCNSPGRCCPTAPQKENKGPGLTPHLPVKEPEVSAGQMPGPAEAEELTGGSEWTRAQR  
EHEAQKQHSVELWLQFSHAMDAMLFRLYLLFMASIIITVICLWNTAGHLPTS VNSFSCLQGLARSPPFPE  
YQLSYPQRLSLCCIPICIRSCSIPIDISPCSCILLASFPTIWFVPLTSSAQTIPLLPADLPNKFCREK  
KKKKKKKKKKKKKRAALEYPSRGP SLRVP SFLVQRPVIVSRI

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic<SEQ ID NO:120>はヒトにおいて同定された：

【 0 3 2 1】

10

20

30

40

【表 5 - 2 1】

```

AAACAGGTGTCTCTCCGGGGCCCGGACTGTAATCCTATCGGATGACTATCAACATTCAGGCTCAGT
TTGCATATNAGATTGGGCATGCTTTGCATGGAGACAGAAATATTAGAAAGGAGGCTGGAGCTCTAGCTCA
GCTTTGCTACATTAGCTTCCAGAAATTTGCATTCCAGCTCACCCCATCTCCCGGGCTCGGAAGGAAGAGC
CCAGCGTCTGGACCCCTCTCGGTGATCCCTCCCCATCTTTCATCTCATCCCTGGGGACGTATAGCACAGC
AGCAGCAGCAAAACCTGGGTTGAGAACAAGTCCGGCTTCTGCCTTTTATGGCTGTCTGACTGTAGGAAGT
TACTTCCCTTATTGGCACCTTAGTTAGCTCGTTTATTACATGAGGGTAAAGCAGTATCTACCTGATAGGGG
ATTGGGAGGATTAATGAGGTAATCCATTTTAAAGGGCTTAGAATATACCTGACACACAGCCAGTGCTCA
ACAAATGTTAGCTTTTCATTTTATCACGGGGACCCACGCCCCTGCCTTGGGGCCCTCTCATATAGGGAGC
ACAGGGTGTCTCTCTCATCTCACACATTCGATGTCCACTACAGGAAGGGGCGTACTTTCACCATCAAT
TGCTCAGGGTTTGGCCAGCACGGGGCGGATCCCACTGCTCTGAATTCAGTGTAAATAGAAAGCCCTCCG
TCCGGTCCACCAACATCAGCGTCCCACAGTCAACATCTCTTACGATGTCTGCCATCCTAGATGTGG
TGAGTGTCTGACCTCTCTAGCCCTCTTGGTGTCTTAACTTTTTCAGCCCTGGCAAAGTGGCCCCCA
AAGCCCTTATCCACATTTCTGCTTCTCCACCCTGCTGGATGGCATTTCCTGGCATGGGGATCTCAAAG
AAGCTCTGTCCAGGGCAGCAGGTTGAGGTATAACAGCACATGGAAGAGAATCTTTTNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNAATGAACAGCTGCACCTCTTGTCATCATCTCTGTGGCTGGAAATGNNNNNNNNNNN
NNNNNCAAGTAAATTTAATAAAATTTAATGCCCCAAGTTGGTGTGTAATACATAGATGTTGTACAG
CATTTTATATATTTTTCTATATGCTTGAAGTATTTCTATAACTTTTTTTTTTAAAGAAAGAAATAAAAGGCA
GGAGACTCACCTCTCCTCCACCTGGGCTTTAGGTTTGGGATAACCCATTTATCAGCTGGAACCCAGAGGAA
TGTGAGGGCATCACGAAGATGAGTATGGCAGCCAAGAACCTGTGGCTCCAGACATTTTCATCATTGAACT
GTGCGTATCAAGGGCTGGTCAGAGGGAAGTCCCATCTCTGGTAGCCACAGAGATCACAGTTTACCATTGG
GGCCACTGTAAGTGTCTTTAGATGGCTAAGAAACAACCAGAGAGATAAGAAGAGAACTGAGCCAGGGCG
AGTGGCTAATGCTGTAAATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGTGGATCACTTCAGTTCCAGGAGTTG
AGACCAGCTGGGCAACATGGTGAACCTCATCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCAGGCCT
GGGTGCGCTGTAGTCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCTGAGACAGGAGGATCATTTGAGCCAGGACA
TGGAAATGTGAGCTGAGCTGAGAGCATGCCACTTACTCCAGCCTGGGTGACAGGCAAGATCCTGTCTCAA
AAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GGATGTGGATAAGACCCCAAAGGCCTCACAGCATATGTAAGTAATGAAGGTGCGATCAGGTATAAGAAC
CCATGAAGGTGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTTCCCCTTGGACCAGCAGAACTGCACACTC
ACCTTCAGCTCATTCCCTACACAGGTAAGTTCAGTGTAGGCTCAGGGATGGGGTGAATGAGAGCAACCA
ACAAATATAAAGAAACTATGAGTAAATGGTGACCAAGGAGTATGGGTGGGAGAAGAATAAGGCTCTATG
ATGCTAAAAATTTTTCCATAAAGCAGAACCCAAAGTCTGTCTTGTTCCTTACCATCCCAAGCTCCTGGCAA
GTTTCTCCGATGTGGGAGGCACTCAAAAATATTTGTGAAAGAAAGGATGGAAAAAGAGTGCAGTTGAGC
CACCAGAAACTATCTCCTTGAATAATGATTCAGATGGTTCTCATTTTCAGTGGACAGCATGTGCTGGAC
ATGGAGAAAGAGTGTGGAAATAACAGACGCATCCCGGAACATCCTTCAGACCCATGGAGAAATGGGAGCT
CCTGGCCCTCAGCAAGGCCACCCGAAAGTTGTCCAGGGGAGGCAACCTGTATGATCAGATCGTGTCTATG
TGAGCTTGGAGGCTCTTACTCTTCTTCCCTCCCGCACTTTTACCCTTGCCATAGAATGTCCATCAAATATG
TATCTCCCAAGTTTCAGGGTCTCCCAATGTTACCCTCTCTCTGGCTTCCAGCCTCATTCTTCATCCAAA
GCTCAGGGCTCTGGCCTAACTGTCTCTTTGAGGTTCTATACCAGATTTCAAAGCTGCATTCCCACAGCT
CCAGATCCCAGGGTGATATCAGGCCAAAGAAAAAGGCAGAGACAGAAATGTCACTGCTATTCTGGATT
GAGGTTCTCTGACCCCATAACTACTTACCACCTCTCTCCTACCACAGGTGGCCATCAGGCGCAGGCC
CAGCCTCTATGTATAAACCTTCTCGTGCCAGTGGCTTCTGGTGGCATCGATGCCCTCAGCTTCTACC
TGCCAGTGAAGTGGGAATCGTGTCCATCAAGATAACGCTCCTGCTGGGCTACAACGCTCTCCTGCTC
ATGATGAGTGAAGTGGTCCCCACAGTGGCACCCCTCATCGGTATGGCTCCTCCACCTTTTGGAAAGAG
AAGGGTGGGAATAACTCAGGAAGGGAGGATTTTGGAAAAAGGAGGCCGATGCCAGGAGGTTGGGAT
GGAAGAGAAGAAAGAAATTTAGGTGGTGCCTCTGGCCCTACTAGGCCCCCTTCCCTCAGGTGTCTAC
TTGCCCCGTGCTGCTGCTGATGGTGGGAGCCTGCTGGAGACCATCTTCATCACCACCTGCTGCAGT
GGCCACCACCCAGCCCCACCCCTGCTCGGTGGCTCCACTCCTGCTGCTCCACTGCAACAGCCCGGGGA
GATGCTGTCCACTGCGCCCCAGAGAAAATAAGGGCCCGGTCTCANCCCCACCCACCTGCCCGGTGA
GGGAAGTACATTCCTCTTCCCCACCTCCACTTCTGCTCCTGCCTCCTTCCCTGCTCCTCCCTCCA
CAGGTGACATTTGAGCCCATGGCTGAGTCTGTCTTCTGTAGGTGTGAAGAGCCAGAGGTATCAGCA
GGCAGATGCCCGGCCCTGCGGAGGCAGAGCTGACAGGGGGCTCAGAAATGGACAAGGGCCAGCGGGAACA
CGAGGCCAGAAAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGGTTGAGTTCAGCCACGGATGGACGCCATGCTCTTCC
NGCCTTACCTGCTTTCATGGCCTCCTCTATCATCACCGTCAATGCCTTGGAAACCTTAGGCAGGTGC
TCACCTGCCAACTTCAGTCTGGAGCTTCTCTGCTCCAGGGACTGGCCAGGTCTCCCCCTTCTCTGAGT
ACCAACTATCATATCCCAAAGATGACTGAGT

```

下記の DNA 配列 5HT-3C genomic-exon1-2 <SEQ ID NO:123> はヒトにおいて推定された：

```

ATGTTAGCTTTCATTTTATCACGGGCGACCCACGCCCTGCCTTGGGGCCCTCTCATATAGGGAGCACAG

```

10

20

30

40

【 0 3 2 2 】

【表 5 - 2 2】

```

GGTTGCTCTCCTTCATCTCACACATTCGATTCCACTACAGGAAGGGGCGTTACTTTCACCATCAATTGCTC
AGGGTTTGGCCAGCACGGGGCGGATCCCACTGCTCTGAATTCAGTGTTTAATAGAAAGCCCTCCGTCGGG
TCACCAACATCAGCGTCCCCACCAAGTCAACATCTCCTTCGGGATGTCTGCCATCCTAGATGTGAATGAA
CAGCTGCACCTCTTGTTCATCATTCTGTGGCTGGAAATG

```

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exons3<SEQ ID NO:124>はヒトにおいて  
推定された：

```

GTTTGGGATAAACCATTATCAGCTGGAACCCAGAGGAATGTGAGGGCATCACGAAGATGAGTATGGCAGC
CAAGAACCTGTGGCTCCAGACATTTTCATCATTGAACT

```

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exon4<SEQ ID NO:125>はヒトにおいて  
推定された：

```

CATGGATGTGGATAAGACCCCAAAGGCCCTCACAGCATATGTAAGTAATGAAGGTCGCATCAGGTATAAGA
AACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTTCCCTTCGACCAGCAGAAGTGCACA
CTCACCTCAGCTCATTCCTCTACACAG

```

10

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exon5<SEQ ID NO:126>はヒトにおいて  
推定された：

```

TGGACAGCATGTTGCTGGACATGGAGAAAGAGTGTGGGAAATAACAGACGCATCCCGGAACATCCTTCAG
ACCCATGGAGAATGGGAGCTCCTGGGCCCTCAGCAAGGCCACCGCAAAGTTGTCCAGGGGAGGCAACCTGTA
TGATCAGATCGTGTCTAT

```

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exon6<SEQ ID NO:127>はヒトにおいて  
推定された：

```

GTGGCCATCAGGCGCAGGCCAGCCCTCTATGTCATAAAACCTTCTCGTGCCAGTGGCTTTCTGGTTGCCAT
GTGACCCCTCAGCTTCTACCTGCCAGTAAAAGTGGGAATCGTGTCCCATCAAGATAACGCTCCTGTCTGG
GCTACAACGTCTTCTGTCTATGATGAGTGACTTGCTCCCAACAGTGGCACCCCTCATCG

```

20

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exon7<SEQ ID NO:128>はヒトにおいて  
推定された：

```

GTGTCTACTTCGCCCTGTGCCTGTCCCTGATGGTGGGCGAGCCTGCTGGAGACCATCTTCATCACCCACCTG
CTGCACGTGGCCACCACCCAGCCCCACCCCTGCCTGGTGGCTCCACTCCCTGCTGCTCCACTGCAACAG
CCCGGGGAGATGCTGTCCCACTGCGCCCCAGAAGGAAAATAAGGGCCCGGGTCTCACCCCAACCCACCTGC
CCG

```

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-exon8<SEQ ID NO:129>はヒトにおいて  
推定された：

```

GTGTGAAGGAGCCAGAGGTATCAGCAGGGCAGATGCCGGCCCTGCCGAGGCAGAGCTGACAGGGGGCTCA
GAATGGACAAGGGCCAGCGGGAACACGAGGCCAGAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGGTTGCAGTTCAG
CCACGCGATGGACGCATGCTCTCCGCCCTACCTGCTCTTCATGGCCTCCTCTATCATCACCGTCATAT
GCCTCTGGAACACCTAGGCAGGTGCTCACCTGCCAACTTCAGTCTGGAGCTTCTCTTGCC

```

30

下記の アミノ酸配列<SEQ ID NO:121>は SEQ ID NO:120 の DNA 配列  
から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

<SEQ ID NO: 121>
MLAFILSRATPRPALGPLSYREHRVALLHLTHSMSTTGRGVFTINCSGFGQHGDPTALNSVFNRPFRP
VTNISVPTQVNISFAMSAILDVNEQLHLLSSFLWLEMVWDNPFISWNPEECEGITKMSMAAKNLWLPDIFI
IELMDVDKTPKGLTAYVSNAGRIRYKKPMKVDSICNLDIIFYFPFDQONCTLTFSSFLYTVDSMLLDMEKEV
WEITDASRNILQTHGEWELLGLSKATAKLSRGGNLYDQIVFYVAIRRRPSLYVINLLVPSGFLVAIDALSF
YLPVKSGNRVFPFKITLLGYNVFLMMSDLLPTSGTFLIGVYFALCLSLMVGSLLETIFITHLLHVATTQP
PPLPRWLHSLLLHCNSPGRCCPTAPQKENKGPGLTPTHLPGVKEPEVSAGQMPGPAEAEELTGGSEWTRAQR

```

40

【 0 3 2 3 】

【表 5 - 2 3】

EHEAQKQHSVELWLQFSHAMDLFRLLYLLFMASIIITVICLWNT

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:122>は SEQ ID NO:121 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

MLAFILSRATPRPALGPLSYREHRVALLHLTHS

下記の DNA 配列 5HT-3C cDNA<SEQ ID NO:135>は SEQ ID NO:121 のアミノ酸配列をコードする推定 cDNA 配列である：

ATGTTAGCTTTTCATTTTATCACGGGCGACCCACGCCCTGCCTTGGGGCCCTCTCATATAGGGAGCACAG  
 GGTGCTCTCCTTCATCTCACACATTCGATGTCCACTACAGGAAGGGCGTACTTTCACCATCAATTGCT  
 CAGGGTTTGGCCAGCACGGGGCGGATCCCACCTGCTCTGAATTCAGTGTAAATAGAAAGCCCTTCCGTCCG  
 GTCACCAACATCAGCGTCCCCACCCAAAGTCAACATCTCCTTCGGCATGTCTGCCATCCTAGATGTGAATGA  
 ACAGCTGCACCTCTTGTGCATCATCCTGTGGCTGGAAATGGTTTGGGATAACCCATTTATCAGCTGGAACC  
 CAGAGGAATGTGAGGGCATCACGAAGATGAGTATGGCAGCCAAGAACCTGTGGCTCCCAGACATTTTCATC  
 ATTTGAACCTCATGGATGTGGATAAGACCCCAAAGGCCCTCACAGCATATGTAAGTAATGAAGGTCGCATCAG  
 GTATAAGAAACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACTTCCCCCTTCGACCAGCAGA  
 ACTGCACACTCACCTTCAGCTCATCTCCTCTACACAGTGGACAGCATGTTGCTGGACATGGAGAAAGAAAGTG  
 TGGGAAATAACAGACGCATCCCAGAACATCCTTCAGACCCATGGAGAATGGGAGCTCCTGGGCCCTCAGCAA  
 GGCCACCGCAAAGTTGTCAGGGGAGGCAACCTGTATGATCAGATCGTGTCTATGTGGCCATCAGGCGCA  
 GGCCAGCCTCTATGTCATAAACCTTCTCGTCCCCAGTGGCTTTCTGGTTGCCATCGATGCCCTCAGCTTC  
 TACCTGCCAGTAAAAGTGGGAATCGTGTCCATTCAAGATAACGCTCCTGCTGGGCTACAACGCTTCTCCT  
 GCTCATGATGAGTGACTTCTCCCCACAGTGGCACCCCTCATCGGTGTCTACTTCGCCCTGTGCCTGT  
 CCCTGATGGTGGGACGCTGTGAGACCATCTTTCATCACCCACCTGCTGCAGTGGCCACCACCCAGCCC  
 CCACCCCTGCTCGGTGGCTCCACTCCTGCTGCTCCACTGCAACAGCCCGGGGAGATGCTGTCCACTGC  
 GCCCAGAAAGGAAAATAAGGGCCCGGTCTCACCCCCACCCACCTGCCCGGTGTAAGGAGCCAGAGGTAT  
 CAGCAGGGCAGATGCCGGGCCCTGCCGAGGCAGAGCTGACAGGGGGCTCAGAAATGGACAAGGGCCAGCGG  
 GAACAGGAGGCCAGAAAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGTTGCAGTTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCT  
 CTTCCGCTCTACCTGCTCTCATGGCCTCCTCTATCATCACCGTCATATGCCTCTGGAACACC

10

20

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-long<SEQ ID NO:131>はヒトにおいて  
同定された：

TATAACCATTACGTTGCAGTGAATACCTAAGACTAAGATAAAGTCTTAAAGCAGACT  
 GAACCTTAAGCATAGGCAAGAACAAGACAACCAGAACACTCTTTGAAGGAAGGTTACAAA  
 TGTCAGTGGTCAACCAATGCTATTAGTATTCAAAGTCAGACTCTAGGTGTGGCCTGTGCT  
 GCTTTAATCTGGGCATTCCTGGGTCCCAGTACATGTTTCAGAGAAGAACTTAGACAAAGAA  
 GATGGAAGGAAGCTGGTTCACAGGAAAAGATTTTCCTTCTACCTCCTTCTCGGTTTTCT  
 GCTTCAAGGTAAGAAAGGAGCAATGATGGGGGAAGGCGGAAGAAGGAGGACCTCTCTCTA  
 GTGGAACATCTAGGAACTTTTTTCAAATTTCCAACCTCCTAGAGATGTCTAAGATGGATA  
 GAGTCTTTTCATAGCTACATTAAGATGCCACATAGACTTTCTTTTCCGAAAGACG  
 GAAAAATCCCTTCCAGTTACATGCCAAACAAGAGCACTTTCATTTTCCTTCTCGAAAAAT  
 AGAGTTCAACACCAGCAAACCTTTATCCTTTACATATGGATATCCAGTTTTTCCCAATACT  
 ACTTGAAAAGTCTGTCTTTCTCCATGGTACCCTACATGGAAGACAACCATCCACGATC  
 GCTTCTCTTGTATTAGTTCATATCCATCCATCTTCTATCCACAGGTGAATTCTT  
 TCTCTACAGGTATGAAACCCAAACCATTTGATGCAAGTGGCCACCTCCTTAGCCATA  
 ATTTCCCTGTCCATCTGCTGGATCCAAGGGCTTAGGTTAGGTAAGGTGCCAGAAGGCAG  
 CAGGTCAAGGGTGAAAGTGAATGTGCTTCTCTCCAGGGGTCAGCATGGTAGAGAGAC  
 AAGAACATGGGATTTGGAGACAGGTGGACCTGGGTTTGAATCTTGGTGTCTCACGTTGCT  
 AGTTTATAAACTTGGATGCACTGCTTAACCTTATCTGAGCTCTGGTTTCTCATCTGTAA  
 AACAGAACCTACCTTGCAGGGTTGTGAGGATTCAGTAAGAGAAGGAGGGAAGCACAGTGT  
 CTGGCACTTGGTAAAAGTGCCAATAACTGTCTCTCTCCTCGTTAGATTATCCATGACT  
 TTGGATAAGGAGGCACAGGAGAGGACTGAACCAGAGGTGACTTTAAAGGCCAGCACAGGG  
 AAGAGACACAAATGTACACCTGGTCTAGGCAGTGTAAATGGTTATGAAAGCTCCTCTGG  
 GCACTTGCACACAGGGGTTGACAAAATGAATATCACTGTCTTAGAGTGGTTAAGAATT  
 TGCCGTGAAAGCACTGTGACGTTGGGAATGGATAAGGCTCAATGTCCTTGGCACAGAGGT  
 TATCAACCATCTCTCAGTCCAAGTGTGTGCTCCTCCAACACATTTTCATGACTAGAAA

30

40

【 0 3 2 4】

【表 5 - 2 4】

```

ATTTAAAAATTATTAGTTAGAAGAGGGTGGGACGGGTCAGGTGAGGTGGCTCACACCTG
TAATCCCAGCACTTGGGAGGCTGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTCAAGAGTTCAGAGCC
AGCCTGGCTAACATGGTGAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAACTAGCCTGATGTG
GTGGTAGTGCTGTAATCCCAGTTACTTGGGAGGCTGAGGCAGAAGAAATCGGTTGAACCT
GGGAGCCAGAGATTGCAGTGAATCAAGATCGCACCACTGCCTCCAGCCTGGGTGACAGA
GTGAGACTCCCTCTAAAAAAATTTAAAAATTTAAAAAAGAAATTTTTAAAAATCCAC
CCACACTTCTAAAAATAGCTATGTGGCTAGGAATGGTGGCTCACACCTATAATTCCAGAA
CTTTGGGAGGCCAGGTGGGAGAATCACCTGAGCCCGGGGTTTGGAGCCAGCCTGGGCA
ATATAGTGAGATCCCGTCTCTACAAAAATTTTTAAAAAAATTAGCCAAAGTGTGGTGGG
GAACGCTGTAGTACAGTTACTTGGGAGGCTGAGGTGGGAAGATCCCTAAGCCAGAG
GCTGAGGCCAAGTGAATGCGCCACTGCCTCCAGCCTGGGCAGTAGAGTGAAGTGCCTGTC
TCAAAAAACCCCAAAAAACCCCAAACTAAGAAATATGCACAATTAGGCCGGCAGCGTGG
CTCAGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGTTGGATCATGAAGTCAGGAG
ATTGAGACCATCTGGCTAACAGGTGAAACCCCTCTCTACTAAAAATACAAAAATTA
GCCGGGCGCGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAAAT
GGCGTGAACCCGGGAAGCGGAGCTGCAGTGAAGCCGAGATTGCGCCACTGCAGTCCGCAG
TCCGGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA
ATATGCACAATTATTATATGTCCATTAATAATAAAATAAACTTTTTAAAGCCTCAAAC
TAGAACGCTGGTGAAGAGTTGGGTAAAGTCAAGTAAAGAAAGGAGGTTGGGGCAGTCCGG
GTGAAAACAGGTGTGTCTCTCCGGGGCCCGGCACTGTAATCCTATCGGATGACTATCA
ACATTCAGGCTCAGTTGCATATAGATTGGGCATGCTTTGCATGGAGACAGAAATATT
AGAAAGGAGGCTGGAGCTCTAGCTCAGCTTTGCTACATNNGCNTNNGANNNTNCTANTN
CANCNACCCCATNCTCCCGGGCCTCGGAAGGAAGAGCCAGNGTCTGGACCCCTCTCGG
TGATCCCTCCCATCTCTCATCTCATCCCTGGGACGTATAGCACAGCAGCAGCAGACA
AACCTGGGTTGAGAACAGTCCGGCTTCTGCCTTTTATTGGCTGTCTGACTGTAGGAAGT
TACTTCCCTTATTGCACTTGTAGTCTGTTTTATTACATGAGGGTAAAGCAGTATCTA
CCTGATAGGGGATTGGGAGGATTAATGAGGTAATCCATTTTTAAAGGGCTTAGAATATA
CCTGACACACAGCCAGTGTCTAACAAATGTAGCTTTTATTTATCACGGGCGACCCAC
GCCCTGCCTTGGGGCCCTCTCATATAGGGAGCACAGGGTTGCTCTCCTTCATCTCACCC
ATTCGATGTCCACTACAGGAAGGGCGTFACTTTACCATCAATTGCTCAGGTTGGCC
AGCACGGGCGGATCCCACTGCTCTGAAATTCAGTGTAAATAGAAAGCCCTTCCGTCCGG
TCACCAACATCAGCGTCCCAACCAAGTCAACATCTCCTTCNCGATGCTGCCATCCTAG
ATGTGGTGAAGTGTGACCTCTTAGCCCTCCTTGGTGTCTTAACCTTTTTCCAGCCCT
GGCAAAGTGGCCCCCAAAGCCCTTATCCATTTCTGCTTCTCCACCCTGCTGGATG
GCATTTGCCCTGGCATGGGATCTCAAAGAAAGCTCTGTCAGGGCAGCAGGGTGAAGTATA
ACAGCACATGGAAGAGAATCTTTCTTCTCTCTGGCTGTATACCAGTGACCAGGTTCT
AATCTCAGAGGTTTTGATTGGATGAACCCAAGCCTCGTTTTTGTGTTTTGTTTTT
GTTTTTGTATTTTTGAGATGGAGTCTCACTCTGTGCCAGGCTGGAGTGAATGGCAC
GGTCTTGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCTGGGCTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTC
CCAAGTAGCTGGGATTTAGGATGCGTCAACAACCTGGCTAATTTTTGTACTTTTAGT
AGAGACGGAGTTTACCATGTTGGCCAAGCTGGTCTCAAACCTCCTGACCTCAAGTGATCT
GCCTGTCTCGGCCCTCCAGGCATTACAGGCATGAGCCACCGCCCGCCACATCGATAT
TTTTAAGCTTCTCGAGTATTCTCATATACAGCGAGGGTTGAGAAGGACTACTTTACTCC
CGCCCTGCTGAACTCTCGTGTACGTAGACTACCACATTTGTTGGATCCAGCTTGTGTT
CCTGTATCTCCATTCTCCTGACCGACCGGGTGAAGTCCGAACTCCAACCTGGCGATCGAG
GGAGACCGACGAGAGAGCCATTGCCGACCTGAGGCACGTCCCGACGGCTCTGCTCCCAA
TGACCGGCACTCCTCTTGAATCGGTCCTGGGCTGTAAAAGGTATGTGACTCTT
TGGGCGATTACTCCCGCCATATCTAAGCTGGTGCCTGTTGTAAGCCGTTACGGGCTATT
GATTTCTATCGCCCGGATCTTCTCTTCCGACCTTCTCTAAAGCACTTGCAGTTTTGGCG
GACGCGGGCTGGTGAAGCGGTTGTACCAACCTCGTTTGGTTTTGCCACCGCGGACTTC
GCCCGCGCGGCGTTTTACGCGCCCACTCGAACCTGGGGGTGCGATTTTGCAGATCTC
TTGACTCCGGGTTGGCGGACTAACTGGACGACTTTGGGACAGCGGATTTCTACGGACCAT
CCGCCAGTATTGGGATTGCGCGCGGGCCGTCGTTTCTACCTATTTTGTACGCCAAAG
TGATAGAGCACGAGCTCGCGCGGTAACCCGGGAAGATGTTCCGCGTGGTTTTCTCTTCC
GGCGCGGCGGCGTGTTTTTATCTGACGCGCCGTCGCGCTTTTTATACCCAGCGGAAT
TCGGCCCTCGGGAGCAGCCGCGGAATATTTAGTGTGTTGTTGACGAGCGGGGCATCTCT
GCGTCCGCGCGGCTATATCTGGACAGCGATGTATATTGCGCCACTCACGTGCCGATAT
TCTTGCTCACCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCATGGTGACATGTGCCAG

```

10

20

30

40

【 0 3 2 5 】

【表 5 - 2 5】

```

TAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCACAAGAATCGCTTGAGCCAGGGAGCACAGAGG
TTGCAGTTGGCCGAGATCACACCCTGCAGCTTAGGCTACGGAGTGAGACTGCAT
CTCAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAACCTTGTCTTGGGAATTTAAAATTAACTTCTAA
ATATTTGAGGCAAAGGAGAAAATAAGCAATTAAGTAGAAATACGAAGTAATTAGAAAT
GAAAATTATACATATGAAAATCTATGGAATGTAGTCAAAGCATAACCCAGTGAAAAATTT
ATATCTTAATGCATTGATAAGAAAACAAGGTGTGTGGGAGGATGGGGGAAATAAAAGC
AAATGAATTGAGTTTCCAACCTGAAAAGCCTGCTTGATGGCTGGGCTTGGTGGTTCACAC
CTATAATCCCAGCTCTTTGGGAGGCTAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGA
GACCAGCCTGGCCAACATGATGAACTCCATCTCTACCAAAAATATAAAAAAATCAGCCG
GGTGGTGGCCGGGGCGGCTGACGCCTGTAATCCCAGCACTTGGAAAGCCGAGGGCG
GGTGGATCATGAGGTGAGGATCAAGACCATCCTGGCTAACACGGTGAACCCCGTCTC
TACTAAAAATACAAAAAATAGCCAGGCGTGGTGGCAGGCGCTGTAGTCCCAGCTACTC
GGGAGGCTGAGGCAGGAGAAATGGCCTGAACCCAGGAGGCAGAGGTGTCAGTGAGCCAAGA
TCGCGCCACTGCACTCCAGCCAGGCAACAGTGCAAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAA
AAAAAATTAGCCAGATGGTGGCACACCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGC
AGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACACCCTGCA
CTCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGACTCCATCTCAGAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGAAA
AGAAAAAGAAAAAAGAAAAGCCTGCTTGGAGGAAAGGAAGGAGGCTGGAGAAAAGA
TAATACAATCATCTAACCTCACCTTCAAAGTGTGGTTCACAGACCACAGCGCTGGCTGA
TCAAAATTTATGAGAATGGTCCCAGGCAGGTTCCGATTTTATCTATAATCTCATTTCTT
GAAAAAAGCAAGTAAATTTAATAAAATATTAATGCCACAAAGTGGGTTGTAATAACA
TAGATGTTTGTACAGCATTTTATATATTTTTCTATATGCTTGAAGTATTTCACTAACTTT
TTTTTTAAAGAAGAAATAAAAGGCAGGAGACTCACCTCTCCTCCACCTGGGCTTTAGG
TTTGGGATAACCCATTTATCAGCTGGAACCCAGAGGAATGTGAGGGCATCACGAAGATGA
GTATGGCAGCAAGAACCTGTGGCTCCCAGACATTTTCATCATGAACTGTGCGTATCAA
GGCTGGTCAGAGGGGAGTCCCATCTCCTGGTAGCCACAGAGATCACAGTTTACCATTGG
GGCCACTGTAAGTGGTCTTTAGATGGCTAAGAAACAACCAGAGAGATAAGAAGAGAAACT
GAGCCAGGCGCAGTGGCTAATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGTGG
ATCACTTCAGTTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAACCTCATCTCTTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCAGGCTGGGGGTGCGCCTGTAGTCCCAGCTACT
TGGGAGGCTGAGGCTGAGACAGGAGGATCATTTGAGCCAGGACATGGAAGTTGCACTGA
GCTGAGAGCATGCCACTCTACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCAAGATCCTGTCTCAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGAGAGAGAGAACTGCAGCACCTGCCTCTTGCCTTATCTCTCCT
CCAGCATGGATGTGGTAAGACCCCAAAAGGCCTCACAGCATATGTAAGTAATGAAGGTC
GCATCAGGTATAAGAAACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACATCTTCTACT
TCCCTTCCAGCCAGCAACTGCACACTCACCTCAGTCTATCCTCTACACAGGTAAGT
TGCAGTGAGGTCTCAGGGATGGGGTGAATGAGAGCAACCAACAAATATAAAGAACTATG
AGTAAATGGTGACCAAGGAGTATGGGTGGGGAGAAGAATAAGGCTCTATGGATGCTAAAA
TATTTTCCATAAAGGCAGAACCCAGTCTGTCTTGTCTTACCATCCCAAGCTCCTGGC
AAGTTTCTGGCATGTGGGAGGCACTCAAAAATTTTGTGAAAGAAAGGATGGAAAAAG
AGTGCAGTTGAGCCACCAGGAACTATCTCCTTGAAAAATGATTCAGATGGTTCTCATTT
TCAGTGGACAGCATGTGCTGGACATGGAGAAAGAAGTGTGGGAAATAACAGACGCATCC
CGGAACATCCTTCAGACCCATGGAGAATGGGAGCTCCTGGGCCTCAGCAAGGCCACCGCA
AAGTTGTCCAGGGGAGGCAACCTGTATGATCAGATCGTGTCTATGTGAGCTTGGAGGCT
CTACTCTTTCTTCTCCCGCACTTTTACCCTTGCTAGAAATGTCCATCAAAATATGTAT
CTCCCAAGTTTCAGGGTCTCCCAATGTTACCCTCTCCTGGCTTCCAGCCTCATTTCTT
CATCCTAAAGCTCAGGGCTCTGGCCTAACTGTCTCTTGCAGGTTCTATACCAGATTCTA
AAGCTGCATTTCCACAGCTCCAGATCCAGGGTGATATCAGGCCAAAGAAAAGGCAGA
GACAGAAATGTCACTGCTATTTCTGGATTTGAGGGTTCCCTTGACCCATAACTACTTA
CCACCCTCTCTACCCACCAGGTGGCCATCAGGCGCAGGCCAGCCTCTATGTCATAAA
CCTTCTCGTGCCAGTGGCTTTCTGGTTGCCATCGATGCCCTCAGCTTCTACCTGCCAGT
GAAAAGTGGGAATCGTGTCCCATTAAGATAACGCTCCTGCTGGGCTACAACGTCTTCTT
GCTCATGATGAGTGACTTGTCTCCACCACTGGCACCCCTCATCGGTATGGTCTCTCC
CACCTTTTGAAGAGAAGGGTGGGAACCTAACTCAGGAAGGGAGGTATTTTGA AAAAGGA
GGCCGTATGCCTGCCAGGTGGGATTTGAAGAGAAGAAAGAAATCTAGGTGGTGCCTCT
GGCCCTCACTAGGCCCCCTTCCCTCCAGGTGTCTACTTCCCTGTGCTGTGCTGTCCCTGAT
GGTGGGCAGCCTGCTGGAGACCATCTTCATACCCACCTGCTGCAGGTGGCCACCACCCA
GCCCCACCCCTGCCTCGGTGGTCCACTCCCTGCTGCTCCTGCAACAGCCCGGGGAG

```

10

20

30

40

【 0 3 2 6 】

【表 5 - 2 6】

```

ATGCTGTCCCCTGCGCCCAAGGAAAAAAGGGCCCGGCTCACCCCCACCCACT
GCCCGGTGAGGGAAGTCACATTCCTCTTCCCCACCTCCACTTCTCTGCTCCTGCCTCCT
TCCTGTCTCCTCCCTCCACAGGTGACATTTGCAGCCCATGGCTGAGTCTCTGTCTTTC
TGAGGTGTGAAGGAGCCAGAGGTATCAGCAGGGCAGATGCCGGGCCCTGCGGAGGCAGA
GCTGACAGGGGGCTCAGAATGGACAAGGGCCAGCGGGAACAGAGGCCAGAAGCAGCA
CTCAGTGGAGCTGTGGTTGCAGTTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCTCTCCGCCCTTA
CCTGCTCTTATGGCCTCCTCTATCATCACCGTCATATGCCCTCTGGAACACCTAGGCAGG
TGCTCACCTGCCAACTTCTAGTCTGGAGCTTCTCTTGCTCCAGGGACTGGCCAGGTCTCC
CCCTTTCCCTGAGTACCAACTATCATATCCCCAAGATGACTGAGTCTCTGCTGTATTC
ATGTATCCCAATCCGGTCTGCTGATCAATCCAATCCCAGACATTTCTCCCTGTTCCTG
CATTTTGTGGCTTCCCTCAGTCCCTACCATATGGTTCAGGTCCTCTTACGTCATCTGC
ATAGCAGACTATACCTCTTCTGTCCGCTGACTTGCCCAATAAATAATTCTGCAGAGATT
CTGGCTCTTTGTGAGGTGCTAGGGTAGAACTTAACCTAACCCCGGGTGCAGTGGTTC
CGCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTGAGGCATT
AGAGACCAGCTGGCCACATGGAGAACTCATCTCTACAAAAAGTACAAAAATTAGC
CGGTGTGGTGGTGGTCCCTGTAATCCCAGCTACTCCAGAGGCTGAAGCAGGAAAAATTG
CTTGAACCTAGGAGGGGAGGTTACAGTGAGCCAAGATCGTGCCACTGCACTCCAGCCTA
GGCAACAAGAGCAAACTCCGTCTCAAATA

```

10

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:132>は SEQ ID NO:131 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

MEGSWFHRKRFSFYLLGLLQGRGVFTTINCSTGFGQHGADPTALNSVFNKPFPRVPTNISVPTQVNI SFA
MSAILD VNEQLHL LSSFLWLEMVW DNFISWNPEECEGITKMSMAAKNLWLPDIFI IELMDVDKTPKGLTA
YVSN EGRIRYK KPMKVDSI CNLDI FYFPDQNCITLTFSSFLYTVDSMLL DMEKEVWEITDASRNILQTHG
EWELLGLSKATAKLRGNLYDQIVFYVAIRRRPSLYVINLLVPSGFLVALDALS FYLPVKSGNRVVPFKIT
LLLGYNVFLMMSDLLPTSGTPLIGVYFALCLSLMVGSLLETIFITHLLHVATTQPPPLPRWLHSLLLHCN
SPGRCCPTAPQKENKGPLTPHLPVKEPEVSAGQMPGPAEELTGGSEWTRAQREHAQKQHSVELWLQ
FSHAMDAMLFRLYLLFMASSIITVICLWNT

```

20

下記の DNA 配列 5HT-3Cgenomic-long-exon1 <SEQ ID NO:133>はヒトにおいて推定された：

```

ATGGAAGGAAGCTGGTCCACAGGAAAAGATTTCCCTTCTACCTCCTTCTCGGTTTTCTGCTTCAAGGAAG
GGCGGTACTTTACCATCAATTGCTCAGGGTTGGCCAGCAGGGGCGGATCCCCTGCTCTGAATTCAG
TGTTAATAGAAAGCCCTCCGTCGGTCCCAACATCAGCGTCCCCACCCAAGTCAACATCTCCTTCAGC
ATGCTGCCATCCTAGATGTGG

```

下記のアミノ酸配列<SEQ ID NO:134>は SEQ ID NO:133 の DNA 配列から誘導される推定アミノ酸配列である：

```

MEGSWFHRKRFSFYLLGLLQGRGVFTTINCSTGFGQHGADPTALNSVFNKPFPRVPTNISVPTQVNI SFA
MSAILDV

```

30

下記の DNA 配列 5HT-3C cDNA-long <SEQ ID NO:136>は SEQ ID NO:132 のアミノ酸配列をコードする推定 cDNA 配列である：

```

ATGGAAGGAAGCTGGTCCACAGGAAAAGATTTCCCTTCTACCTCCTTCTCGGTTTTCTGCTTCAAGGAAG
GGCGGTACTTTACCATCAATTGCTCAGGGTTGGCCAGCAGGGGCGGATCCCCTGCTCTGAATTCAG
TGTTAATAGAAAGCCCTCCGTCGGTCCCAACATCAGCGTCCCCACCCAAGTCAACATCTCCTTCAGC
ATGCTGCCATCCTAGATGTGAATGAACAGCTGCACCTCTTGCATCATTCCTGTGGCTGGAATGGTTTG
GGATAACCCATTTATCAGCTGGAACCCAGAGGAATGTGAGGGCATCACGAAGATGAGTATGGCAGCCAGA
ACCTGTGGCTCCCAGACATTTTCATCATTGAACTCATGGATGTGGATAAGACCCAAAAGGCTCACAGCA
TATGTAAGTAATGAAGTTCGCATCAGGTATAAGAAACCCATGAAGGTGGACAGTATCTGTAACCTGGACAT
CTTCTACTTCCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACACTCACCTTCAGCTCATTCCTCTACACAGTGGACAGCA
TGTGCTGGACATGGAGAAAGAAGTGTGGGAAATAACAGACGCATCCCGGAACATCCTTCAGACCCATGGA
GAATGGGAGCTCCTGGCCCTCAGCAAGGCCACCGCAAAGTTGTCCAGGGGAGGCACCTGTATGATCAGAT

```

40

【 0 3 2 7 】

【表 5 - 2 7】

```

CGTGTCTATGTGGCCATCAGGCGCAGGCCAGCCTCTATGTCATAAACCTTCTCGTGCCAGTGGCTTTC
TGGTTGCCATCGATGCCCTCAGCTTCTACCTGCCAGTGAAAAGTGGGAATCGTGTCCCATTCAAGATAACG
CTCCTGCTGGGCTACAACGCTTCTCCTGCTCATGATGAGTACTTGTCTCCCACCAAGTGGCACCCTCAT
CGGTGCTACTTCCCTTCCCTGTCCCTGTCCTGATGGTGGGAGCCTGCTGGAGACCATCTTCATACCCACC
TGCTGCACGTGGCCACCACCCAGCCCCACCCCTGCCTCGGTGGCTCCACTCCCTGCTGCTCCACTGCAAC
AGCCCGGGAGATGCTGTCCACTGCGCCCCAGAAGGAAAAAAGGGCCCGGCTCACCCACCCACCT
GCCCGGTGTGAAGGAGCCAGAGGTATCAGCAGGGCAGATGCCGGGCCCTGCGGAGGCAGAGCTGACAGGGG
GCTCAGAATGGACAAGGGCCAGCGGGAACACGAGGCCAGAAAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGGTTGCAG
TTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCTCTCCGCCCTACCTGCTCTTCATGGCTCCTCTATCATCACCGT
CATATGCCCTCTGGAACACC

```

50

## 【実施例】

## 【0328】

## 実施例

## 実施例1: GenBank / EMBLにおけるイオンチャンネルの同定

検索メカニズムの簡単な説明を以下に示す。BLASTアルゴリズム (Basic Local Alignment Search Tool) は、配列類似性の判定に適する (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; その全体を本明細書に援用する)。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) により公開されている。このアルゴリズムは、下記によりまず高評点配列対 (HSP) を同定することを伴う: データベース配列中の同一長さのワードとアラインした場合、質問配列中において、ある正の数値をもつ閾値評点 "T" と調和するかまたはそれを満たす長さ "W" の短いワードを同定する。Tを近傍ワード評点閾値と呼ぶ (Altschul et al., 前掲)。これらの初期近傍ワードヒットは、それらを含むHSPを見いだす検索を開始するためのシード (seed) として用いられる。累積アラインメント評点を増加させうる限り、これらのワードヒットを各配列に沿って両方向へ伸長する。下記の場合、各方向へのワードヒットの伸長を中止する: 1) 累積アラインメント評点とその最大達成値から量Xだけはずれた場合; 2) 1以上のマイナス評点残基アラインメントの蓄積により累積評点がゼロ以下になった場合; または3) いずれかの配列の末端に到達した場合。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXはアラインメントの感度および速度を決定する。BLASTプログラムはデフォルトとして、ワード長さ (W) 11、BLOSUM62採点マトリックス (Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-19参照; その全体を本明細書に援用する) アラインメント (B) は50、期待値 (E) は10、M = 5、N = 4、および両鎖の比較を用いる。

## 【0329】

BLASTアルゴリズム (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787; その全体を本明細書に援用する) および Gapped BLAST (Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389-3402; その全体を本明細書に援用する) は、2配列間の類似性の統計分析を行う。BLASTアルゴリズムにより得られる類似性の1尺度は最小和確率 (P(N)) であり、これは2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の一致が偶然に起きることを示す確率指標を与える。たとえばイオンチャンネル核酸と比較した被験核酸の最小和確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、核酸はイオンチャンネル遺伝子またはcDNAに類似するとみなされる。

## 【0330】

Celerデータベースを、NCBIプログラムBLAST (Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389; その全体を本明細書に援用する) により、新規イオンチャンネルを示唆するパターンを見いだすための質問配列として SWISSPROTデータベースから得た既知のイオンチャンネルタンパク質配列を用いて検索した。具体的には、BLASTプログラムの一つである TBLASTN を用いて、タンパク質配列を、6つのリーディングフレームにおいて動的翻訳した DNAデータベースと比較した。あるいは、6つのリーディングフレームにおいて翻訳したそのヌクレオチドデータベースに質問する第2の検索方式を、隠れマルコフモデル (HMM) (Krogh et al., J. Mol. Biol., 1994, 235: 1501-1531) を用いて開発した。本明細書中で用いるHMMは、関連タンパク質ファミリーと比較した場合の保存配列の確率分布を表わす。この異なる検索アルゴリズムのため、HMMを用いると、BLAST検索により得られるものと異なる、より関連性があると

思われる結果が得られる可能性がある。正のヒットをプログラムBLASTXによりNCBIが保持する非重複タンパク質およびヌクレオチドデータベースに対比してさらに分析し、どのヒットが新規イオンチャンネルをコードする可能性が最も高いかを標準(デフォルト)パラメーターを用いて判定した。この検索方式と本発明者らの洞察により、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 131およびSEQ ID NO: 133を候補配列として同定した。

#### 【0331】

実施例2：イオンチャンネルのオープンリーディングフレームの検出および一次転写体の推定

10

一次転写体および成熟mRNAの推定を手動で行った。参考文献(すなわちLodish, H. et al., Molecular Cell Biology, 1997, ISBN: 0-7167-2380-8)にみられるコンセンサス配列、および既知のイオンチャンネルに類似する領域を用いて、イオンチャンネルポリペプチドの一次転写体を見いだした。

#### 【0332】

実施例3：イオンチャンネルcDNAのクローニング

全長イオンチャンネルタンパク質をコードするcDNAクローンを単離するために、SEQ ID NO: 1~SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123~129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133またはその相補的ヌクレオチド配列の一部に対応するDNAフラグメントを、ファージ、ファージミド、またはプラスミドcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションスクリーニングするためのプローブとして使用できる。これらのDNAフラグメントをPCRにより増幅する。PCR反応混合物50 $\mu$ lは、ポリメラーゼ混合物(0.2mM dNTP、1 $\times$ PCR緩衝液、および0.75 $\mu$ lのExpand High Fidelity Polymerase (Roche Biochemicals)、100ng~1 $\mu$ gのヒトcDNA、ならびに50pmolのフォワードプライマーおよび50pmolのリバースプライマーを含有する。プライマーは本明細書に提示するヌクレオチド配列に基づいて当業者が容易に設計できる。増幅はApplied Biosystems PE2400サーモサイクラーにより、たとえば下記のプログラムを用いて実施される：95 で15秒、52 で30秒、および72 で90秒；25サイクル反復。実際のPCR条件は、たとえばオリゴヌクレオチドプライマーの物理的特性およびPCR生成物の長さに依存するであろう。増幅生成物をプラスミドからアガロースゲル電気泳動により分離し、Quiaquick (商標)ゲル抽出キット(Quiaagen)により精製することができる。

20

30

#### 【0333】

ライブラリーZAPIIファージベクター中へクローニングしたcDNAを含むラムダファージライブラリーを大腸菌XL-1 blue宿主と共に、15cmのLB-寒天プレートにプレート当たり50,000pfuの密度で接種し、37 で一夜増殖させる；(Sambrook et al. (前掲)に従って接種)。ファージブランクをナイロン膜に移し(Amersham Hybond NJ)、変性溶液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)中で2分間変性させ、再生溶液(1M Tris pH7.5, 1.5M NaCl)中で5分間再生し、2 $\times$ SSC(20 $\times$ SSC: 3M NaCl, 0.3Mクエン酸ナトリウム)中で短時間洗浄する。フィルターメンブランを乾燥させ、80 で120分間インキュベートして、ファージDNAをメンブランに架橋させる。

40

#### 【0334】

メンブランを前記に従って調製したDNAプローブとハイブリダイズさせる。Redi prime (商標)ランダムプライミング(Amersham Pharmacia Biotech)を用い、製造業者の指示に従って、DNAフラグメント(25ng)を<sup>-32</sup>P-dCTP(NEN)で標識する。取り込まなかったヌクレオチドからS200

50

スピンカラム (Amersham Pharmacia Biotech) により標識 DNA を分離し、95 で5分間変性させ、氷上に保存する。DNA を含むメンブラン (前記) を50ml の ExpressHyb (商標) (Clontech) 溶液中、68 で90分間、プレハイブリダイズさせる。次いで標識 DNA プローブをハイブリダイゼーション溶液に添加し、プローブを68 で70分間、メンブランにハイブリダイズさせる。メンブランを2×SSC、0.1% SDS 中、42 でそれぞれ5分間、5回洗浄し、最後に0.1×SSC、0.2% SDS で30分間洗浄する。増感スクリーンを用いてフィルターをKodak XARフィルム (Eastman Kodak Company, 米国ニューヨーク州ロチェスター) に-80 で16時間露光する。1つの陽性コロニーをプレートから単離し、15cm のLBプレートに約1000 pfu で再接種する。接種、フィルターへのブランクのリフト、およびハイブリダイゼーションを前記に従って実施する。この二次スクリーニングで約4つの陽性ファージブランクを単離できる。

10

#### 【0335】

単離ファージおよびExcisionヘルパーファージを同時感染させたXL-1 blue細胞の培養により、cDNA を含むプラスミド (pBlue-script SK-) を単離ファージからin vivo切除により開放する；製造業者 (Stratagene) の記載に従う。プラスミドを含むXL-1細胞をLBプレートに接種し、37 で16時間増殖させる。各プレートからのコロニー (18) をLBプレートに再接種し、増殖させる。各プレートから1つのコロニーをナイロンフィルターに秩序アレイ状に植え付け、フィルターをLBプレートに乗せてコロニーを増殖させる。フィルターを前記に従って標識プローブとハイブリダイズさせる。約3つの陽性コロニーを選択し、LB培地で増殖させる。これらの3コロニーからQiagen Midi Kit (Qiagen) により、製造業者の指示に従ってプラスミドDNA を単離する。挿入サイズを確定する制限酵素NotIおよびSalIでプラスミドを消化することにより、挿入配列のサイズを決定する。

20

#### 【0336】

ABI377蛍光ベースシーケンサー (Perkin-Elmer / Applied Biosystems Division, PE/ABD, カリフォルニア州フォスターシティ)、およびTag FSTMポリマーゼ付きのABI PRISM (商標) Ready Dye-Deoxy Terminatorキットを用いて、これらのコロニーを直接配列決定する。各ABIサイクルの配列分析反応は、約0.5µgのプラスミドDNA を含む。下記によりサイクル配列分析を実施する：98 で1分の初期変性、続いて下記のパラメーターで50サイクル：98 で30秒、50 で30秒のアニーリング、そして60 で4分の伸長。温度サイクルおよび時間をPerkin-Elmer 9600サーモサイクラーにより制御する。Centriflex (商標) ゲル濾過カートリッジ (Advanced Genetic Technologies Corp., メリーランド州ガイザースバーグ) を用いて伸長生成物を精製する。各反応生成物をピペットでカラムに装填し、スインギングバケット遠心機 (SorvallモデルRT6000B卓上型遠心機) により1500×gで4分間、室温において遠心分離する。カラム精製試料を約40分間真空乾燥し、5µlのDNA装填溶液 (83%の脱イオンホルムアミド、8.3mMのEDTA、および1.6mg/mlのBlue Dextran) に溶解する。試料を90 に3分間加熱し、ABI377シーケンサーによる配列分析のためにゲル試料ウェルに装填する。ABI377ファイルをシーケンサープログラム (Gene Codes, ミシガン州アンアーバー) にインポートすることにより配列分析を実施する。一般に、約700bpまでの配列の読出しが得られる。両方のDNA鎖から情報を得ることにより、また困難な領域は異なる位置でアニーリングするプライマーを用いてすべての配列決定のあいまいさが除かれるまで反復配列決定することにより、配列分析潜在誤差を最小限に抑える。

30

40

#### 【0337】

i o n 3 1

50

GENETRAPPERR (特許出願中) cDNA Positive Selection Systemにより、本明細書にSEQ ID NO: 1として示したion31の配列を用いて、全長と思われるクローンを単離した。GENETRAPPERR Systemは、cDNAライブラリー(10<sup>12</sup>のDNA分子を含む)より調製したDNAからcDNAクローンを単離する。このシステムでは、ターゲットcDNAのセグメントに相補的なオリゴヌクレオチドの3'末端をターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)によりビオチン-14-dCTPでビオチニル化する。同時に、cDNA挿入配列を含む複雑な二本鎖ファージミッドDNA集団(それぞれ10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>のメンバー)を、Gene I I (ファージF1エンドヌクレアーゼ)および(大腸菌)エキソヌクレアーゼI I I (Exo I I I)により一本鎖DNAに変換する。ビオチニル化オリゴヌクレオチドと一本鎖DNAのハイブリッドを溶液中で形成し、次いでストレプトアビジンコーティングした常磁性ビーズに捕獲させる。磁石を用いて溶液から常磁性ビーズを回収すると、ハイブリダイズしていない一本鎖DNAが残る。次いで、捕獲された一本鎖DNAターゲットを、常磁性ビーズに結合したままのビオチニル化オリゴヌクレオチドから離脱させる。離脱後、回収された一本鎖DNAターゲットから二本鎖DNAへの変換を特異的に開始する非ビオチニル化ターゲットオリゴヌクレオチドを用いて、目的とするcDNAクローンをさらに富化する。形質転換および平板培養の後、一般に20~100%のコロニーが目的とするcDNAクローンである。

10

## 【0338】

ion31について、ビオチニル化オリゴヌクレオチドは下記の配列をもつ：  
TGCCAGTGAAAGTGGGAATCGTGTC C C A T (SEQ ID NO: 111)。

20

下記の配列をもつPCRプライマー：

5' CCCAGCCTCTATGTCATAAACCC (SEQ ID NO: 112) および

3' TCATGAGCAGGAAGACGTTG (SEQ ID NO: 113)

を、製造業者の指示に従ってライブラリースクリーニングおよびコロニースクリーニングに用いた。

## 【0339】

全長と思われる2つのクローン、ion31d6およびion31c4をこの方法で単離した。これら2クローンを配列決定して、表5および添付の配列表に示すヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 103およびSEQ ID NO: 104)および推定アミノ酸配列(SEQ ID NO: 105およびSEQ ID NO: 106)を得た。

30

## 【0340】

これらのクローンの分析により、特許出願中の出願No. 60/255,692(2000年12月15日出願;その全体を本明細書に援用する)に出願したion1、ならびに本明細書に記載するion31、ion51、ion52、ion110、およびion111に対する高い相同性が明らかになる。

## 【0341】

ゲノム構造

5HT-3a遺伝子の既知の構造(Bruss et al., Neuropharmacology, 2000 Jan 4; 39(2): 308-15)を用いて5HT-3受容体相同体のゲノム構造を決定した。この構造を利用し、EMBOSSパッケージ(Sanger Centre)の一部である"est2genome"プログラムを用いて、cDNAクローンのエキソンを推定した。デフォルトパラメーターを用いてこのプログラムを実行した。

40

## 【0342】

ion31c4クローン(SEQ ID NO: 104)の配列を個別のエキソンに分割し、利用できるすべてのゲノムおよびESTデータベースの検索にこれらを用いた(SEQ ID NO: 123~129)。デフォルトパラメーター付きblastnアルゴ

50

リズムを用いて検索を行った。高評点ゲノムフラグメントをC e l e r aおよび公開ゲノムデータベースにおいて同定した。これらのフラグメントの配列をS e q u e n c h e rプログラム(G e n e C o d e s)により再生およびアセンブルした。得られたコンティグをS E Q I D N O : 1 0 4と比較した。2つのコンティグが大部分の5 H T - 3受容体遺伝子配列を含んでいた。これらのコンティグをそれぞれ5'および3'と命名した。5'および3'コンティグは新規かつユニークであり、いずれのデータベース中にも存在しなかった。エキソン2に対応するゲノム配列は、いずれのゲノムデータベース中にも存在しなかった。2つのコンティグの配列を1つに結合し、ギャップの位置を示す"N"を挿入した。結合したコンティグの中間に推定エキソン2の配列を挿入し、ギャップ(Nのストリングとして示す)を隣接させて、ゲノム配列(S E Q I D N O : 1 2 0)を得た。この配列を、e s t 2 g e n o m eプログラムによりS E Q I D N O : 1 0 4と比較した。出力ファイルをフォーマティングし、ゲノムブラウザープログラム" A r t e m i s " (S a n g e r C e n t r e)に挿入し、イントロン/エキソン境界を手動で調節した。この分析の最終結果を前記の表5および添付の配列表に示す。

10

#### 【0343】

別形態の推定ゲノム配列をS E Q I D N O : 1 2 0およびS E Q I D N O : 1 3 1として前記に示す。推定タンパク質配列を、それぞれS E Q I D N O : 1 2 1およびS E Q I D N O : 1 3 2として示す。S E Q I D N O : 1 2 1のアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列S E Q I D N O : 1 3 5の推定c D N Aによりコードされる：これはS E Q I D N O : 1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8および1 2 9で構成される。S E Q I D N O : 1 3 2のアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列S E Q I D N O : 1 3 6の推定c D N Aによりコードされる：これはS E Q I D N O : 1 3 3、S E Q I D N O : 1 2 3の一部、ならびにS E Q I D N O : 1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8および1 2 9で構成される。既知の5 - H T受容体との相同性に基づいて、S E Q I D N O : 1 2 2の最初の33個のアミノ酸(M L A F I L S R A T P R P A L G P L S Y R E H R V A L L H L T H S)はタンパク質を適切な細胞コンパートメント中へターゲティングするシグナルペプチドであると推定された。

20

#### 【0344】

##### 実施例4：ノーザンブロット分析

イオンチャンネル発現パターンは、種々のタイプの細胞および組織からのm R N Aのノーザンブロット分析により判定できる。一般に、そのような細胞または組織から単離されたm R N Aの"ブロット"を標準法により調製し、あるいは業者から購入し、次いでイオンチャンネルポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのフラグメントであるヌクレオチドプローブを用いて検査する。

30

#### 【0345】

当業者には、S E Q I D N O : 1 ~ S E Q I D N O : 5 1、S E Q I D N O : 1 0 3、1 0 4、1 0 7、1 0 8、1 1 8、1 2 0、S E Q I D N O : 1 2 3 ~ 1 2 9、S E Q I D N O : 1 3 1およびS E Q I D N O : 1 3 3に由来するセンスおよびアンチセンス配向のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて適切なプローブを作製するための標準P C Rプロトコルは周知である。P C R処理においては、分析に際して検出できるように、R e d i p r i m e (商標) D N A標識システム(A m e r s h a m P h a r m a c i a)を用いて<sup>-3</sup><sup>2</sup>P-d C T Pによりプローブを放射性標識する。プローブをN i c k C o l u m n (A m e r s h a m P h a r m a c i a)によりさらに精製する。

40

#### 【0346】

C l o n t e c hから得られる多重ヒト組織ノーザンブロット(H u m a n I I # 7 7 6 7 - 1)をプローブとのハイブリダイゼーション反応に用いて、どの組織がイオンチャンネルを発現するかを判定する。42で4時間、5 x S S C、1 x デンハート試薬、0.1% S D S、50%ホルムアミド、250 μ g / m lのサケ精子D N A中においてプ

50

レハイブリダイゼーションを実施する。約  $1.5 \times 10^6$  cpm/ml の標識プローブを添加した同混合物中において、42 で一夜、ハイブリダイゼーションを実施する。42 で、 $0.2 \times SSC$ 、 $0.1\%$  SDS 中において、フィルターを数回洗浄する。増感スクリーンを用いてフィルターを Kodak XAR フィルム (Eastman Kodak Company, 米国ニューヨーク州ロchester) に -80 で16時間露光すると、mRNA 発現を分析できる。

#### 【0347】

##### 実施例5：哺乳動物細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現

###### 1. HEK-293細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現

哺乳動物細胞 HEK-293細胞 (トランスフォームしたヒト一次胚性腎細胞) におけるイオンチャンネルポリペプチド発現のために、ベクター pCDNA6 (Invitrogen) を用いて関連イオンチャンネルコード配列を保有するプラスミドを調製する。ベクター pCDNA6 は、CMV プロモーター、および安定形質転換細胞を選択するためのプラスチサイジン耐性遺伝子を含む。たとえば異なるプロモーター、タンパク質の検出および/または精製のためのエピトプタグ、ならびに耐性遺伝子を含む、他の多数のベクターを使用できる。このイオンチャンネルポリペプチドをコードする cDNA を増幅するためのフォワードプライマーは当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、イオンチャンネル cDNA 配列中に存在しない制限クローニング部位、たとえば HindIII 制限部位、およびそのイオンチャンネルヌクレオチド配列に一致するヌクレオチドを導入するための 5' 側伸長ヌクレオチドを含む。リバープライマーも当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、イオンチャンネル cDNA 配列中に存在しない制限クローニング部位、たとえば XhoI 制限部位、およびそのイオンチャンネルヌクレオチド配列の逆相補体に対応するヌクレオチドを導入するための 5' 側伸長ヌクレオチドを含む。PCR 条件は、オリゴヌクレオチドプライマーの物理的特性およびイオンチャンネル遺伝子の長さにより決まる。PCR 生成物をゲル精製し、ベクターの HindIII-XhoI 部位にクローニングする。

#### 【0348】

プラスミド DNA を Qiagen プラスミド mini-prep キットにより精製し、たとえば HEK-293細胞中へ DOTAP トランスフェクション培地 (Boehringer Mannheim, インディアナ州インディアナポリス) を用いてトランスフェクションする。24~48時間後、一過性トランスフェクションした細胞のイオンチャンネルの活性および発現を、確立された電気生理学的方法により検査する; ELECTROPHYSIOLOGY, A PRACTICAL APPROACH, 編者 D. I. Wallis, オックスフォード大学出版社 IRL Press (1993)、および VOLTAGE AND PATCH CLAMPING WITH MICROELECTRODES, TG Smith, H Lecar, SJ Redman and PW Gage, 編, 米国生理学会 Waverly Press, Inc. (1985)。これはイオンチャンネル活性を解明できる1手段を提供する。

#### 【0349】

DNA を Qiagen クロマトグラフィーカラムにより精製し、HEK-293細胞中へ DOTAP トランスフェクション培地 (Boehringer Mannheim, インディアナ州インディアナポリス) を用いてトランスフェクションする。トランスフェクションの24時間後、一過性トランスフェクションした細胞の発現を、抗-His抗体および抗イオンチャンネルペプチド抗体により検査するウェスタンブロットにより調べる。永久トランスフェクションした細胞を Zeocin で選択し、増殖させる。組換えタンパク質の産生を細胞と培地の両方から、抗-His、抗-Myc または抗-イオンチャンネルペプチド抗体で検査するウェスタンブロットにより検出する。

#### 【0350】

###### 2. COS細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現

COS細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現のために、SEQ ID NO 50

: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド分子またはその相補的ヌクレオチド配列を、ベクターp3-CI中へクローニングできる。このベクターはpUC18由来のプラスミドであり、bGH(ウシ成長ホルモン)ポリアデニル化配列の上流に位置するHCMV(ヒトサイトメガロウイルス)イントロン、および多重クローニング部位を含む。さらに、このプラスミドは、薬物メトトレキサン(MTX)の存在下で安定形質転換細胞の選択のための選択を可能にするdhrf(ジヒドロ葉酸レダクターゼ)遺伝子を含む。たとえば異なるプロモーター、タンパク質の検出および/または精製のためのエピトープタグ、ならびに耐性遺伝子を含む、他の多数のベクターを使用  
10

#### 【0351】

フォワードプライマーは当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、クローニングのためのXbaI制限部位を導入する5'側伸長配列、続いてSEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133に示すヌクレオチド配列に対応するヌクレオチドまたはその一部を含む。リバースプライマーも当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、SalIクローニング部位を導入する5'側伸長ヌクレオチド、続いてSEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104  
20、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133に示すヌクレオチド配列の逆相補体に対応するヌクレオチドまたはその一部を含む。

#### 【0352】

PCRは、95 で5分の初期変性; 95 で30秒の変性、58 で30秒のアニリング、そして72 で30秒の伸長を30サイクル; 続いて72 で5分の伸長からなる。PCR生成物をゲル精製し、ベクターp3-CIのXbaIおよびSalI部位にライゲートする。この構築体を増幅およびDNA精製のために大腸菌細胞に形質転換する。DNAをQuiaGenクマトグラフィーカラムで精製し、Lipofectamine(商標)試薬(Gibco/BRL)により製造業者のプロトコルに従ってCOS 7  
30細胞中へトランスフェクションする。トランスフェクションの48および72時間後、培地および細胞を組換えタンパク質発現について検査する。

#### 【0353】

培養COS細胞において発現したイオンチャンネルポリペプチドは、細胞をホモジナイゼーションにより破壊し、遠心分離により膜を精製し、適切な界面活性剤によりタンパク質を可溶化し、そしてタンパク質をたとえばクマトグラフィーにより精製することによって精製できる。精製したイオンチャンネルを、YM-10メンブラン付きAmicon濃縮装置で0.5mg/mlに濃縮し、-80 に保存する。

#### 【0354】

##### 実施例6: 昆虫細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現

バキュロウイルス系におけるイオンチャンネルポリペプチド発現のために、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133よりなる群から選択される配列をもつポリヌクレオチド分子またはその一部もしくは相補体をPCRにより増幅する。フォワードプライマーは当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、NdeIクローニング部位を付加する5'側伸長配列、続いてSEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133に示すヌクレオチド配列に対応するヌクレオチドまたはその一部を含む。リ  
50

バースプライマーも当技術分野で周知の方法により決定され、好ましくは、K p n I クローニング部位を導入する5'側伸長配列、続いてSEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133に示すヌクレオチド配列の逆相補体に対応するヌクレオチドまたはその一部を含む。

#### 【0355】

PCR生成物をゲル精製し、Nde I およびK p n I で消化し、そしてベクターp A C H T L - A (Pharming en, カリフォルニア州サンディエゴ)の対応する部位にクローニングする。p A c H T L 発現ベクターは、オートグラフィア・カリフォルニカ (A u t o g r a p h a c a l i f o r n i c a) 核多角体病ウイルス (A c M N P V) の強力なポリヘドリンプロモーター、および多重クローニング部位上流の10X His タグを含む。リン酸化のためのプロテインキナーゼ部位および組換えタンパク質切除のためのトロンピン部位も多重クローニング部位の前に存在する。もちろんp A c H T L - A の代わりに、他の多数のパキユロウイルスベクター、たとえばp A c 3 7 3、p V L 9 4 1 およびp A c I M 1 も使用できる。イオンチャンネルポリペプチドの発現のための他の適切なベクターも、それらのベクター構築体が必要に応じて適切な位置に転写、翻訳および転送のためのシグナル配列、たとえば読み枠の一致したA U G およびシグナルペプチドを含む限り使用できる。そのようなベクターは、特にL u c k o w e t a l . , V i r o l o g y , 1 9 8 9 , 1 7 0 , 3 1 - 3 9 に記載されている。

10

20

#### 【0356】

標準的なパキユロウイルス発現法、たとえばS u m m e r s e t a l . , パキユロウイルスベクターおよび昆虫細胞培養操作のための方法の手引き書, T e x a s A g r i c u l t u r a l E x p e r i m e n t a l S t a t i o n B u l l e t i n N o . 1 5 5 5 ( 1 9 8 7 ) に記載の方法により、ウイルスを増殖および単離する。

#### 【0357】

ある好ましい態様においては、イオンチャンネルポリペプチドをコードする遺伝子を含むp A c H T L - A を、" B a c u l o G o l d " トランスフェクションキット ( P h a r m i n g e n , カリフォルニア州サンディエゴ)により、製造業者が提示する方法でパキユロウイルスに導入する。感染の24時間後に感染細胞を<sup>35</sup>S-メチオニンで放射性標識することにより、個々のウイルス単離体をタンパク質産生について分析する。感染の48時間後に感染細胞を収穫し、標識タンパク質をS D S - P A G E オートラジオグラフィにより視覚化する。高い発現レベルを示すウイルスを単離し、規模を拡大した発現に使用することができる。

30

#### 【0358】

S f 9 昆虫細胞におけるイオンチャンネルポリペプチド発現のために、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 103、104、107、108、118、120、SEQ ID NO: 123 ~ 129、SEQ ID NO: 131もしくはSEQ ID NO: 133の配列をもつポリヌクレオチド分子またはその一部を、パキユロウイルス発現に関する前記のプライマーおよび方法を用いてPCRにより増幅する。イオンチャンネルポリペプチドをコードするcDNA挿入配列を、ベクターp A c H T L - A (Pharming en)のNde I 部位とK p n I 部位の間にクローニングする(内部Nde I 部位を除去した後)。DNAをQ u i a g e n クロマトグラフィークラムにより精製する。精製していないブランクを、予備ウェスタンブロット実験により、ポリ-His タグ抗体と反応する予想サイズの組換えタンパク質の存在について検査する。イオンチャンネルポリペプチドは膜統合タンパク質であるので、界面活性剤抽出によりタンパク質試料の調製を容易にする。さらにH i G 5 昆虫細胞において精製および発現最適化した後、結果を確認する。

40

#### 【0359】

実施例7: 相互作用トラップ/ツ-ハイブリッドシステム

50

イオンチャンネルポリペプチド相互作用タンパク質をアッセイするために、相互作用ト  
 ラップ/ツーハイブリッドライブラリースクリーニング法を採用できる。このアッセイ法  
 は最初に Fields, et al., Nature, 1989, 340, 245 に記載  
 された；その全体を本明細書に援用する。プロトコルは下記に公表されている：CURR  
 ENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1999,  
 John Wiley & Sons, ニューヨーク, および Ausubel, F.M.  
 et al. 1992, SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR  
 BIOLOGY, 第4版, Greene and Wiley-Interscience,  
 ニューヨーク；両者の全体を本明細書に援用する。キットは Clontech (カリ  
 フォルニア州パロアルト) から入手できる (Matchmaker Two Hybrid System 3)。

10

## 【0360】

イオンチャンネルポリペプチドの全部または一部をコードするヌクレオチド配列と酵母  
 転写因子 GAL4 DNA 結合ドメイン (DNA-BD) の融合体を、適切なプラスミド  
 (すなわち pGBKT7) 中に標準的サブクローニング法により構築する。同様に GAL  
 4 活性ドメイン (AD) 融合ライブラリーを、第2プラスミド (すなわち pGADT7)  
 中に潜在イオンチャンネルポリペプチド結合タンパク質の cDNA から構築する (cDN  
 Aライブラリー作製に関するプロトコルについては Sambrook et al., 前  
 掲、参照)。DNA-BD/イオンチャンネル融合構築体を配列決定により確認し、自律  
 レポーター遺伝子活性化および細胞毒性について検査する；これらは両者ともツーハイブ  
 リッド分析の達成を妨害する。AD/ライブラリー融合構築体について同様な対照試験を  
 実施して、宿主細胞における発現を確認し、転写活性がないことを確認する。酵母細胞を  
 、標準プロトコル (Ausubel, et al., 前掲) に従ってイオンチャンネルお  
 よびライブラリー両方の融合プラスミドで形質転換する (約  $10^5$  の形質転換体 / mg  
 DNA)。DNA-BD/イオンチャンネルと AD/ライブラリータンパク質の in v  
 i v o 結合により、特異的な酵母プラスミドレポーター遺伝子 (すなわち lacZ、HI  
 S3、ADE2、LEU2) が転写される。酵母細胞を栄養欠乏培地に接種して、レポー  
 ター遺伝子の発現をスクリーニングする。コロニーを、Xgal (5-プロモ-4-クロ  
 ロ-3-インドリル-D-ガラクトシド) 補充培地中で増殖させた際の -ガラクト  
 シダーゼ活性について二重アッセイする (-ガラクトシダーゼ活性のフィルターアッセ  
 イは Breeden, et al., Cold Spring Harb. Symp. Q  
 uant. Biol., 1985, 50, 643 に記載されており、その全体を本明細書  
 に援用する)。陽性 AD-ライブラリープラスミドを形質転換体から開放し、元の酵母株  
 、および無関係な DNA-BD 融合タンパク質を含む他の株に再導入して、特異的なイオ  
 ンチャンネルポリペプチド/ライブラリータンパク質相互作用を確認する。挿入 DNA を  
 配列決定して、GAL4 AD に融合したオープンリーディングフレームの存在を確認し  
 、イオンチャンネルポリペプチド結合タンパク質の同一性を判定する。

20

30

## 【0361】

実施例 8：イオンチャンネルポリペプチドに関するタンパク質-タンパク質相互作用の  
 FRET 分析

40

イオンチャンネルポリペプチド相互作用タンパク質をアッセイするためには、蛍光共鳴  
 エネルギー転移 (FRET) 法を採用できる。このタイプのアッセイ法の例は Mahajan  
 NP, et al., Nature Biotechnology, 1998, 1  
 6, 547 に記載されており、その全体を本明細書に援用する。このアッセイ法は、適切  
 な励起/発光特性をもつ2種類の蛍光性部分を接近させると、励起されたドナー発光団  
 がそのエネルギーをアクセプター発光団に転移することができるという事実に基づき、  
 その発光を測定する。ドナーの発光スペクトルはアクセプターの吸光スペクトルと重なら  
 なければならないが、それぞれ2つの吸光スペクトル間の重なりおよび2つの発光スペク  
 トル間の重なりは最小限に抑えるべきである。有用なドナー/アクセプター対の例は、C  
 yan Fluorescent Protein (CFP) / Yellow Fluor

50

rescent Protein (YFP)である (Tsien, RY (1998), Annual Rev Biochem 67, 509-544; その全体を本明細書に援用する)。

#### 【0362】

イオンチャンネルポリペプチド全部または一部をコードするヌクレオチド配列とCFPの融合体を、適切なプラスミド中に、標準的なサブクローニング法により構築する。同様に、可能性のある相互作用ターゲットタンパク質のYFP融合体をコードするヌクレオチドを、第2プラスミド中に構築する。CFP/イオンチャンネルポリペプチド融合構築体を配列決定により証明する。YFP/ターゲットタンパク質構築体について同様なコントロールを実施する。各タンパク質の発現を蛍光法 (たとえば蛍光顕微鏡検査または蛍光分光法) によりモニターできる。標準法に従って、宿主細胞をCFP/イオンチャンネルポリペプチドとYFP/ターゲットタンパク質の両方の融合プラスミドで形質転換する。CFP発蛍光団の励起後にYFP発蛍光団をモニターすることにより、CFP/イオンチャンネルポリペプチドとYFP/ターゲットタンパク質のin situ相互作用を検出する。蛍光は蛍光顕微鏡検査または蛍光分光法によりモニターされる。さらに、たとえば外部刺激による相互作用の変化を時間分解蛍光法により判定する。

10

#### 【0363】

あるいは、潜在イオンチャンネルポリペプチド結合タンパク質のcDNAからYFP融合ライブラリーを構築できる (cDNAライブラリー作製に関するプロトコルについては Sambrook et al., 前掲、参照)。宿主細胞をCFP/イオンチャンネルポリペプチドとYFP融合ライブラリーの両方のプラスミドで形質転換する。次いでFRETを示すクローンを単離し、YFP/ターゲット融合タンパク質をコードするDNAの開放および配列決定により、イオンチャンネルポリペプチドと相互作用するタンパク質を同定する。

20

#### 【0364】

##### 実施例9：イオンチャンネル活性のモデュレーターを同定するためのアッセイ法

イオンチャンネル活性のモデュレーター (アゴニストおよびアンタゴニスト) を同定するための、限定ではない幾つかのアッセイ法を以下に示す。以下のアッセイ法は一般にカルシウムフラックスを測定するが、他のイオンの測定も実施できると考えられる。これらのアッセイ法により同定できるモデュレーターには、イオンチャンネルの天然リガンド化合物; 天然リガンドの合成類似体および誘導体; 抗体、抗体フラグメント、および/または天然抗体もしくは抗体様コンビナトリアルライブラリーに由来する抗体様化合物; ならびに/あるいはライブラリーのハイスループットスクリーニングにより同定した合成化合物; などである。イオンチャンネルを結合するすべてのモデュレーターが、組織試料中のそのようなイオンチャンネルの同定に有用である (たとえば診断用、病態生理学用など)。アゴニストおよびアンタゴニストモデュレーターは、異常なイオンチャンネルレベルを特色とする疾病状態を処置するために、イオンチャンネル活性のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションにそれぞれ有用である。アッセイは、単一の推定モデュレーターを用いて実施し、および/または既知のアゴニストを候補アンタゴニストと組み合わせて用いて (またはその逆) 実施することができる。

30

40

#### 【0365】

##### A. エクオリンアッセイ法

1 アッセイ法においては、細胞 (たとえばCHO細胞) をイオンチャンネル発現構築体および発光タンパク質アポエクオリンをコードする構築体の両方で一過性共トランスフェクションする。補因子コエレンテラジンの存在下で、アポエクオリンは細胞内 (細胞質) 遊離カルシウムの量に比例した測定可能なルミネセンスを発する。 (全般的に下記を参照: Cobbold, et al., "細胞質遊離カルシウムのエクオリン測定": McCormack J. G. and Cobbold, P. H., 編, CELLULAR CALCIUM: A PRACTICAL APPROACH, オックスフォード: IRL Press (1991); Stables et al., Analytical B

50

biochemistry 252:115-26 (1997); および Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, 第6版; Eugene OR: Molecular Probes (1996); それぞれの全体を本明細書に援用する。

【0366】

1 アッセイ例においては、イオンチャンネル核酸を市販の発現ベクター pzeoSV2 (Invitrogen) 中へサブクローニングし、発光タンパク質アポエクオリン (Molecular Probes, Eugene, OR) をコードする構築体と一緒に、トランスフェクション試薬 FuGENE 6 (Boehringer Mannheim) および製品同封物として提供されるトランスフェクションプロトコルにより、CHO細胞中へ一過性共トランスフェクションする。

10

【0367】

細胞を37°Cで24時間、10%のウシ胎仔血清、2mMのグルタミン、10U/mlのペニシリンおよび10µg/mlのストレプトマイシンを補充したMEM (Gibco/BRL, メリーランド州ガイザースバーグ) 培養し、その時点で5µMのコエレンテラジン (Molecular Probes, Eugene, OR) を含有する無血清MEMに培地を交換する。次いで37°Cでさらに2時間、培養を続ける。その後、VERSENE (Gibco/BRL) により細胞をプレートから脱着し、洗浄し、無血清MEMに200,000個/mlで再懸濁する。

【0368】

無血清MEM中に候補イオンチャンネルモジュレーター化合物の希釈液を調製し、不透明な96ウェルアッセイプレートのウェルに50µl/ウェルで分注する。次いでプレートをMLXマイクロタイタープレートルミノメーター (Dynex Technologies, Inc., バージニア州シャンティリー) に載せる。50µlの細胞懸濁液を各ウェルに1回で1ウェルずつ分注するように計測器をプログラミングし、直ちに15秒間、ルミネセンスを読みとる。それぞれの光信号ピークの曲線下面積を用いて、候補モジュレーターの用量-応答曲線を作成する。データをSledeWriteにより1部位リガンドに関する方程式を用いて分析し、EC<sub>50</sub>値を求める。ルミネセンスの変化を生じた化合物をモジュレーター活性の候補とみなす。

20

【0369】

B. FLIPRを用いた細胞内カルシウム測定

細胞内カルシウム濃度の変化はイオンチャンネル活性について認識されている他の指標であり、そのようなアッセイ法を用いてイオンチャンネル活性のモジュレーターをスクリーニングできる。たとえば、イオンチャンネル発現ベクターで安定トランスフェクションしたCHO細胞を、プレートの種々のウェルから発せられる蛍光信号を識別するために特別に設計されたPackard黒壁96ウェルプレートに4×10<sup>4</sup>個/ウェルの密度で接種する。36mg/Lのピルビン酸および1g/Lのグルコースを含有し、さらに1%のウシ胎仔血清および4種類のカルシウム指示薬色素 (Fluo-3 (商標) AM、Fluo-4 (商標) AM、Calcium Green (商標) -1 AM、またはOregon Green (商標) 488 BAPT A-1 AM) のうち1種類 (それぞれ4µMの濃度) を添加した改変ダルベッコPBS (D-PBS) 中、37°Cで60分間、細胞をインキュベートする。1%のウシ胎仔血清を含有しない改変D-PBSでプレートを1回洗浄し、37°Cで10分間インキュベートして、残留色素を細胞膜から除去する。さらに、カルシウム応答を活性化する直前に、1%のウシ胎仔血清を含有しない改変D-PBSで一連の洗浄を行う。

30

40

【0370】

1種類以上の候補受容体アゴニスト化合物、カルシウムイオノホアA23187 (10µM; 陽性対照)、またはATP (4µM; 陽性対照) の添加により、カルシウム応答を開始する。Molecular Deviceのアルゴンレーザー付きFLIPR (488nmで励起) により蛍光を測定する (たとえばKuntzweiler et al.

50

, Drug Development Research, 44(1):14-20(1998)参照)。検出器カメラのF-stopを2.5に設定し、露光時間を0.4ミリ秒とした。候補アゴニスト、ATPまたはA23187の添加前に細胞の基礎蛍光を20秒間測定し、応答信号からこの基礎蛍光レベルを差し引いた。カルシウム信号を約200秒間測定し、2秒毎に読みとる。カルシウムイオノホアA23187およびATPは、カルシウム信号をベースラインより200%増強する。

【0371】

#### C. 細胞外酸性化速度

さらに他のアッセイにおいて、被験化合物により誘発される細胞外pHの変化をモニターすることによって、イオンチャンネル活性の候補モデュレーター的作用をアッセイする(たとえばDunlop et al., Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 40(1):47-55(1998)参照)。1態様においては、イオンチャンネル発現ベクターでトランスフェクションしたCHO細胞を、12mmのカプセルカップ(Molecular Devices Corp.)に、10%のウシ胎仔血清、2mMのL-グルタミン、10U/mlのペニシリンおよび10 $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを補充したMEM中、4 $\times$ 10<sup>5</sup>個/カップで接種する。細胞を、この培地中、37 $^{\circ}$ Cで5%CO<sub>2</sub>中において24時間インキュベートする。

10

【0372】

Cytosensorマイクロフィジオメーター(Molecular Device Corp.)により細胞外酸性化速度を測定する。カプセルカップをマイクロフィジオメーターのセンサーチャンバーに装入し、チャンバーにランニング緩衝液(バイカーボネートを含むしないMEM:4mMのL-グルタミン、10U/mlのペニシリン、10 $\mu$ g/mlのストレプトマイシン、26mMのNaClを補充)を100 $\mu$ l/分の流速で灌流する。候補アゴニストまたは他の薬剤をランニング緩衝液中に希釈し、第2流路を通して灌流する。各60秒のポンプサイクル中、ポンプを38秒間運転し、残りの22秒間は停止する。センサーチャンバー内のランニング緩衝液のpHを、サイクル中43秒から58秒まで記録し、60秒目にポンプを再始動して次のサイクルを開始する。記録時間内のランニング緩衝液の酸性化速度をCytosoftプログラムにより計算する。モデュレーター候補添加後の最高速度測定値からベースライン値(モデュレーター候補添加直前の4回の速度測定値の平均)を差し引くことにより、酸性化速度の変化を計算する。選択した計測器は、61mV/pH単位を検出する。イオンチャンネルのアゴニストとして作用するモデュレーターは、アゴニスト不存在下での速度と比較して細胞外酸性化速度を高める。この応答は、イオンチャンネルのアンタゴニストとして作用するモデュレーターにより遮断される。

20

30

【0373】

#### 実施例10:FLIPRを用いたイオンチャンネルモデュレーターのハイスループットスクリーニング

イオンチャンネルポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための1方法は、FLIPR(Fluorometric Imaging Plate Reader、蛍光イメージングプレートリーダー)システムを用いるものである。このシステムは、Pharmacia CorporationのDr. Vince Groppeが、たとえば膜電位を測定する細胞ベースのハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイを実施するために開発した。細胞膜電位の変化は、細胞内または外へのイオンの移動に伴うイオンチャンネルの調節と相関する。FLIPRシステムは膜電位のそのような変化を測定する。これは、イオンチャンネル遺伝子を発現する細胞に、膜電位の変化を測定するのに適した細胞膜透過性蛍光指示薬色素、たとえばdiBAC(ビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)ペンタメチンオキソノール、Molecular Probes)を添加することにより達成される。したがって、イオンチャンネル活性の調節は、diBAC色素の発光スペクトルの変化としてFLIPRにより評価および検出できる。

40

50

## 【0374】

一例として、目的のイオンチャンネル遺伝子でトランスフェクションしたCOS細胞をdiBACに浸漬する。細胞内に内因性カリウムチャンネルとトランスフェクションチャンネルの両方が存在するため、30mMの細胞外カリウムの添加により膜の脱分極が起き、その結果、細胞によるdiBAC取込みが増加し、したがって蛍光が全般的に増強する。細胞をカリウムチャンネル開放物質、たとえばクロマカリム(chromakalim)で処理すると、膜は過分極し、diBACの正味流出が起き、したがって蛍光が減少する。こうして、このアッセイ法により未知の被験化合物が膜電位に及ぼす影響を評価できる。

## 【0375】

実施例11：キメラ受容体

リガンドの天然受容体活性を容易に測定できない場合、キメラ受容体を用いてリガンド結合の活性を測定できる。そのようなキメラは、1つの受容体のリガンド結合ドメインが他の受容体のポア形成ドメインに融合したものからなってもよい。そのようなキメラの有用な例はW000/73431 A2にみることができる。

## 【0376】

ion-5HT-3C(SEQ ID NO:119)のポア形成膜貫通ドメインを、たとえば7ニコチン性アセチルコリン受容体の細胞外ドメインと融合させて、7受容体リガンドに結合するがion-5HT-3Cのように電流を通すキメラ受容体を形成することができる。このキメラを作製するために、7受容体(GenBank寄託番号U62436)の5'側領域を3'末端プライマー上のion-5HT-3Cとオーバーラップして増幅するPCRプライマーを設計する。

## 【0377】

適切なcDNAクローンを鋳型として用い、Platinum Taqポリメラーゼ(Life Technologies, メリーランド州ガイザースバーグ)を使用して、製造業者の指示に従ってPCRを実施する。次いでこれら2つの反応からのPCR生成物を1:1000希釈し、スプライス-オーバーラップPCRにより最終キメラcDNAを作製するために適切に設計されたプライマーを含む第2PCR混合物中にプールする。これらのプライマーはまた、pcDNA3.1(Invitrogen)中へのサブクローニングを容易にするために、EcoRI制限部位を5'末端に、NotI部位を3'末端に付加される。PCR生成物をpcDNA3.1中へライゲートし、コンピテント大腸菌(Life Technologies, メリーランド州ガイザースバーグ)中へ形質転換する。アンピシリン含有培地で選択した孤立大腸菌コロニーを単離して増殖させる。大腸菌中のプラスミド由来DNAを単離し、配列決定して予想配列が得られたことを確認する。次いでこのDNAをカチオン性脂質トランスフェクション試薬によりSH-EP1細胞などの哺乳動物細胞中へ形質転換する。安定形質転換された細胞を800µg/mlのジェネチシン(geneticin)の存在下で選択する。次いでこれらの細胞を前記に従って、リガンド、たとえばニコチンに応答した細胞内カルシウムの変化または膜電位の変化についてアッセイする。

## 【0378】

実施例12：組織発現プロファイリング

ゲノムDNAを鋳型として用い、下記のものを含む100µLの反応混合物中でのPCRにより、ion31およびion52の組織発現プロファイリングを調べた：各0.5mMのフォワードおよびリバースプライマー、1×PCR緩衝液II(Perkin-Elmer)、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>(Perkin-Elmer)、各0.2mMのdNTP(Gibco-BRL)、0.5mgのヒトゲノムDNA(Clontech)ならびに5単位のAmpli Taq Gold(Perkin-Elmer)；Perkin-Elmer 9600サーモサイクラーにおいて下記のサーモサイクリング条件を採用：95 で10分を1サイクル；94 で30秒、55 で30秒、72 で1分を35サイクル；72 で10分を1サイクル；続いて4 でソーキング。

10

20

30

40

50

## 【0379】

0.5 mg/mLの臭化エチジウムを含有する2%アガロースゲル上、Tris - Acetate EDTAランニング緩衝液(Gibco-BRL)中で移動させて、生成物を分析する。ヒト組織cDNA由来のcDNAは、Origene(メリーランド州ロックビル)から入手したパネルであった。

## 【0380】

ion31

ion31の発現を検出するために用いたフォワードプライマーは下記のものであり：

5'GCCATCAGGCGCAGGCCAA(SEQ ID NO:114)

リバースプライマーは下記のものであった：

5'CAAGTCATTTCATCATGAGCAGGA3'(SEQ ID NO:115)。

## 【0381】

ion31 mRNAは、精巣、網膜、肺、脳、胎児脳、筋肉、腎臓および小腸を含めた組織中に検出された。これは、ion31の活性を調節する化合物が下記を含めた疾患(これらに限定されない)の処置に有用である可能性を示す：アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、うつ病、不安、片頭痛、てんかん、肥満症、双極性障害その他の情動障害、炎症性腸疾患、下痢または便秘、喘息、関節炎、白血病およびリンパ腫、神経変性、網膜変性、再狭窄、心不整脈、糖尿病、毛髪生育、高血圧、疼痛、ならびに化学療法または制吐による悪心。

## 【0382】

ion52

ion52の発現を検出するために用いたフォワードプライマーは下記のものであり：

TGCCCTGTCCTTGATGGTGGG(SEQ ID NO:116)

リバースプライマーは下記のものであった：

GAGCAGCAGGGAGTGGAGC(SEQ ID NO:117)。

## 【0383】

ion52 mRNAは、脳、胎児脳、心臓、腎臓、肺、小腸、筋肉、脾臓、末梢血白血球、精巣および網膜を含めた組織中に検出された。これは、ion52の活性を調節する化合物が下記を含めた疾患(これらに限定されない)の処置に有用な可能性を示す：アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、うつ病、不安、片頭痛、てんかん、肥満症、双極性障害その他の情動障害、炎症性腸疾患、下痢または便秘、喘息、関節炎、白血病およびリンパ腫、神経変性、網膜変性、再狭窄、心不整脈、糖尿病、毛髪生育、高血圧、疼痛、ならびに化学療法または制吐による悪心。

## 【0384】

他のion-xをコードするcDNAの組織特異的発現を同様な方法で達成できる。

実施例13：セロトニン受容体3様遺伝子5HT-3Cおよび5HT-3-longの組織および細胞系発現に関するTaqman(登録商標)分析

組織および細胞系のRNAのTaqman(登録商標)リアルタイムPCR分析により、推定遺伝子の発現を調べた。Taqman(登録商標)PCR分析は、二重標識蛍光原プローブの使用により各PCRサイクルの試料増幅を測定できる。プローブを消光色素とレポーター色素の両方に結合させる。各PCRサイクルの伸長に際して、アニールしたプローブはDNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によりレポーター色素から開裂する。これによりレポーター色素は消光色素から離脱し、検出可能な蛍光増強が生じる。したがって蛍光の増強はターゲットの増幅と相関する。Taqman(登録商標)アッセイはPCRアッセイであるので、低濃度のターゲットDNAに対してもきわめて高感度である。さらに、このアッセイの条件を高特異性に設計するのは容易であり、一塩基置換でPCR増幅は阻止される。Taqman PCRアッセイにより、ion-5HT-3Cおよびion-5HT-3C-longを高感度で特異的にスクリーニングできる。本発明者が設計したプライマーおよびプローブは、両方の形の遺伝子を検出できる。

10

20

30

40

50

## 【0385】

材料および試薬

Taqman (登録商標) PCRアッセイに下記の材料および試薬を用いた: 0.2 mlのMicroAmp (登録商標) 光学試験管 (Ca#N801-0933, Applied Biosystems); 光学キャップ (Ca#N801-0935, Applied Biosystems); Taqman (登録商標) プライマー (Ca#4304971, Applied Biosystems); Taqman (登録商標) プローブ (Ca#450025, Applied Biosystems); Taqman (登録商標) 万能PCRマスターミックス (Ca#4304437, Applied Biosystems); SUPERSCRIPT (登録商標) II RT (Ca#18064-014, Invitrogen); dNTPミックスPCRグレード (Ca#18427-013, Invitrogen); ランダムプライマー (Ca#48190-011, Invitrogen); 改変イーグル培地 (Ca#11090-081, Gibco); ダルベッコ改変イーグル培地 (Ca#12375-048, Gibco); ウシ胎仔血清、検定済み (Ca#16000-044, Gibco); LIPOFECTAMINE PLUS (登録商標) 試薬 (Ca#10964-013, Invitrogen); LIPOFECTAMINE (登録商標) 試薬 (Ca#18324-012, Invitrogen); およびRNeasy (登録商標) Midi Kit (Ca#15142, QIAGEN)。

10

## 【0386】

細胞

Caco-2細胞(腸細胞系)は、4.5g/Lのグルコースを含有し、10%のウシ胎仔血清(FBS)および1%の非必須アミノ酸(Gibco/BRL)を補充したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中に維持された。未分化Caco-2細胞を周密状態に達したとき継代した。未分化細胞を周密後、継代せずに2~3週間増殖させると(培地を2~3日毎に交換)、分化したCaco-2細胞が得られた。HEK 293細胞は、10%のFBS、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、0.1mMの非必須アミノ酸、および10U/ml-10μg/mlのペニシリン-ストレプトマイシンを補充したMEM(Gibco/BRL)中に維持された。すべての細胞を37、5.0%CO<sub>2</sub>、95%湿度で増殖させた。

20

30

## 【0387】

細胞のトランスフェクション

HEK 293細胞を、5μgの推定5HT-3C鋳型DNAで、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、0.1mMの非必須アミノ酸を含有する無血清MEM中において、Gibco BRL LIPOFECTAMINE PLUS(商標)プロトコルに従って一過性トランスフェクションした。トランスフェクション体を37で3時間インキュベートした後、細胞を前記に従って維持した。48時間後、細胞からRNAを単離した。

## 【0388】

RNAおよびcDNA

組織由来の全RNAおよびポリA+RNAは、下記のもの以外はClontechから購入された: 小腸RNAの1試料はCH Laboratoriesから購入され、色素上皮および網膜全RNAはPharmaciaで調製され、ここから入手された。全SW480 RNAはClontechから得られた。

40

## 【0389】

分化および未分化Caco-2細胞ならびに一過性トランスフェクションしたHEK 293細胞からの全RNAを、QIAGEN RNeasy(登録商標)ミディキットにより、製造業者のプロトコルに従って調製した。

## 【0390】

Taqman(登録商標)PCR分析

50

### プローブおよびプライマーの設計

5HT-3Cおよび5HT-3D Celer a推定配列に対するTaqman (登録商標) プローブおよびプライマーの初期セットを、Primer Express 1.0プライマー設計ソフトウェア (Applied Biosystems) により作製した。プローブおよびプライマーの最終セットを、Livak (Biomol Engineering 14:143-149, 1999) の指針に基づいて選択した。FAMレポーター色素およびTetra消光色素で二重標識したプローブとして、オリゴ体をApplied Biosystemsに注文した。

#### 【0391】

##### cDNA合成

2 μgの全RNAまたは0.2 μgのポリA RNAならびに1 μgのランダムプライマーを65 °Cで10分間変性した (Gibco/BRL)。プライマーの伸長を、37 °Cで1時間、1 × 10<sup>5</sup> Strand Buffer、6.7 mMのDTT、333 μMのdNTP (Gibco/BRL) および200単位のSuperScript II酵素 (Invitrogen) の存在下に、全容量30 μlで実施した。65 °Cで10分間の加熱により反応を停止した。陰性対照をSuperScript II逆転写酵素の不存在下で (-RT) 実施した。cDNAを直ちにTaqman (登録商標) 分析に用いた、または-20 °Cで保存した。

10

#### 【0392】

##### PCR反応条件

Taqman (登録商標) PCR分析を、2 μlのcDNA反応、陰性対照反応 (-RT)、またはH<sub>2</sub>Oで、全容量25 μlの1 × Taqman (登録商標) 緩衝液 (Applied Biosystems) 中において、50 ~ 400 nMのフォワードプライマー、リバースプライマー、およびプローブを用いて実施した。リアルタイムPCRを実施し、ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) により分析した。下記の温度プログラムを用いた: 50 °Cで2分、95 °Cで10分、そして95 °Cで15秒および60 °Cで1分を40サイクル。

20

#### 【0393】

##### Taqman (登録商標) アッセイの開発

Taqman (登録商標) PCRアッセイを5HT-3Cおよび5HT-3C-long配列の検出に用いた。前記に従って近位および遠位5HT-3Cプローブ (それぞれ5HT-3Cプローブ1および2) を設計した。このプライマー/プローブを下記に示す。フランキング配列から区別するために、プローブおよびプライマーの配列に下線を施した。セット1プライマー プローブ中の星印はスプライス部位を示す。プローブ配列は太字のものである。

30

#### 【0394】

プライマー プローブ セット1 (SEQ ID NO: 137)

#### 【0395】

##### 【化4】

...ttctaCTTCCCCTTCGACCAGCAGAACTGCACACTCACCTTCAGCTCATTCTCTACACAGTGG

\*ACAGCATGTTGCTGgacat...

40

#### 【0396】

プライマー プローブ セット2 (SEQ ID NO: 138)

#### 【0397】

##### 【化5】

...acacgAGGCCCAGAAGCAGCACTCAGTGGAGCTGTGGTTGCAGTTCAGCCACGCGATGGACGCCATGCT

Cttccg...

#### 【0398】

両プライマー/プローブセットを、Taqman (登録商標) リアルタイムPCR反応

50

における機能について、5HT-3CベクターDNAおよび5HT-3C発現RNAを用いて試験した。推定5HT-3C配列を含むpCMV・SPORT6発現ベクターで一過性トランスフェクションしたHEK 293細胞から、RNAを単離した。この単離されたRNA上で一本鎖cDNA合成を実施した。試料の潜在汚染またはPCR反応中の異常増幅に対する対照とするために、逆転写酵素を用いない反応(-RT)を並行して実施した。いずれの5HT-3CプローブについてのTaqman(登録商標)分析も、ベクターDNAおよび生成cDNAの顕著な増幅を示したが、陰性対照は鋳型を用いないPCR反応と同等レベルで増幅した。したがって、プローブの機能およびRNAの統合性が共に確認された。鋳型を用いない対照および逆転写酵素を用いない対照における低い増幅は、PCR試薬の低濃度の汚染またはプライマー/プローブセット固有の特性によるものと思われる。

10

#### 【0399】

5HT-3CベクターDNAのTaqman(登録商標)PCR分析にはシグナル飽和があったので、飽和せずに最高シグナルが得られるようにアッセイ条件を最適化した。50~400nMのプローブ濃度および200~400nMのプライマー濃度を試験した。より高いプローブ濃度はより高い最終シグナル強度と相関し、わずかに低いサイクルで閾値に達した。しかし200nM以上のプローブ濃度はプラトーに達しない傾向があった。これらの結果は、両5HT-3Cプローブについて類似していた。したがって、Taqman(登録商標)リアルタイムPCRによる組織および細胞系cDNAのスクリーニングは、140nMのプローブ濃度および300nMのプライマー濃度を用いて行われた。

20

#### 【0400】

##### 5-HT3Cおよび5-HT3-longの組織発現

プライマー/プローブセットが最適化されると、入手できる組織cDNAをion5HT-3Cおよびion5HT-3C-longの発現についてプローブ1によりスクリーニングした。組織cDNAの5HT-3C分析から、脳における存在が低く、小腸における存在が高いことが示唆された(表6)。ion5HT-3Cおよびion5HT-3C-longの発現が検出されたことは、それらが偽遺伝子またはクローニングの人工産物ではなく機能性遺伝子として存在することを支持する。リアルタイムPCRを用いた場合、プライマー/プローブセットが相同遺伝子配列を検出するわずかな可能性がしばしばある。この問題に対処するために、発現を確認するプローブ2で小腸試料をアッセイした。

30

#### 【0401】

【表 6】

表 6

組織	平均 ΔCT
副腎	1.4325
扁桃体(ポリ A)	0.7725
骨髄	-1.69
脳	0.4625
尾状核(ポリ A)	-0.945
小脳	0.9325
脳梁(ポリ A)	-0.66
胎児脳	-0.49
胎児肝臓	0.8425
心臓	1.8
海馬(ポリ A)	1.5525
腎臓	-1.2675
肝臓	0.1825
肺	2.0275
色素上皮	1.055
胎盤	0.5
前立腺	0.305
網膜	2.945
小腸	4.495
小腸(CH Laboratoris)	2.505
脊髄	-0.6375
脊髄(ポリ A)	1.955
精巣	1.5325
視床(ポリ A)	0.825
胸腺	0.87
甲状腺	-0.23
子宮	2.8925

10

20

30

CTはサイクル閾値を表す

## 【0402】

## 5HT-3Cおよび5HT-3-longの細胞系発現

5HT-3Cおよび/または5HT-3-longを内因性発現する細胞を同定するために、細胞系RNA(cDNAによる)をセロトニン受容体様遺伝子の発現についてTaqman(登録商標)リアルタイムPCRアッセイによりスクリーニングした。小腸で有意の5HT-3C発現があるのは明らかなので、ヒト結腸直腸腺癌細胞系SW480およびCaco-2を発現についてTaqman(登録商標)PCR分析によりまず試験した。単離した分化および未分化Caco-2全RNAからcDNAを調製し、SW480全RNA(Clontech)をこの目的のために購入した。5HT-3Cおよび/または5HT-3-long発現を、SW480細胞および分化したCaco-2細胞の両方において、プローブ1により検出した。未分化Caco-2細胞の5HT-3Cおよび/または5HT-3-long発現レベルははるかに低く、反復実験において必ずしも常には検出できなかった。

40

## 【0403】

## 結論

50

Taqman (登録商標)リアルタイムPCRアッセイを、既知の5HT-3受容体サブユニットに相同なion-5HT-3Cおよびion-5HT-3C long 遺伝子発現の検出に合わせて、両配列を認識するプライマー-プローブセットを用いて調整した。

【0404】

このアッセイは、これらの配列が腸の機能に関与することを示唆する。小腸では一方または両方の形が発現する。将来の特性解明を補助するために、5HT-3Cを内因性発現する細胞系を同定した。分化したCaco-2細胞およびSW480細胞は5HT-3Cを発現する。したがってこのアッセイ法は、薬物開発のための受容体機能評価に際して5HT-3C発現が有用な工程であることを証明できた。

10

【0405】

小腸における5HT-3C発現は、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、下痢、便秘、悪心、嘔吐を含めた症状にこれが関与することを示す。5HT-3アンタゴニストである薬物オンダンセトロン(Ondansetron, Zofran)は過敏性腸症候群に用いられている。本発明の5HT-3Cおよび5HT-3C long 遺伝子、ならびにそれらをアゴニストおよびアンタゴニストの同定に利用するアッセイ法は、潜在的に副作用の少ないより具体的な化合物を同定するためのきわめて有用なツールである。

【0406】

本発明の精神から逸脱することなく本発明の好ましい態様を多様に変更および改変できることは、当業者に理解されるであろう。そのようなすべての変更が本発明の範囲に含まれるものとする。本明細書に引用した各刊行物の内容全体を本明細書に援用する。

20

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 5/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 P 9/02	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
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 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886  
弁理士 村上 清

(72)発明者 ロバーズ, スティーヴン・エル  
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 3 8 , グレンコ, リッジウッド・マナー・ドライブ 7 1 8

- (72)発明者 ベンジャミン，クリストファー・ダブリュー  
アメリカ合衆国ミシガン州 4 8 1 0 3 ，アン・アーバー，モス・ローズ・コート 2 3 2 4
- (72)発明者 カーノヴスキー，アラ・エム  
アメリカ合衆国ミシガン州 4 8 1 7 6 ，セイレン，ウィスパリング・パインズ・コート 9 6 0 2
- (72)発明者 ルーブル，キャラ・エル  
アメリカ合衆国インディアナ州 4 6 1 4 3 ，グリーンウッド，トールウッド・レイン 3 5 9 5
- F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA02 DA06 DA12 DA20 GA11 HA12  
HA20  
4B063 QA18 QQ42 QQ79 QQ96 QR48 QR55 QS32 QX01  
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA13 BA02 BA22 BA23 BA44 CA53 DC50 ZA02 ZA05  
ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA22 ZA36 ZA42 ZA45 ZA54 ZA66  
ZA68 ZA69 ZA70 ZB02 ZB11 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZC03  
ZC55  
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	人体离子通道		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005532029A</a>	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2003527079	申请日	2002-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	法玛西雅厄普约翰美国公司		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚和普强公司有限责任公司		
[标]发明人	ロバースティーヴンエル ベンジャミンクリストファーダブリュー カーノヴスキーアラエム ルーブルキャラエル		
发明人	ロバース, スティーヴン・エル ベンジャミン, クリストファー・ダブリュー カーノヴスキー, アラ・エム ルーブル, キャラ・エル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P5/00 A61P7/02 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 C07H21/04 C07K14 /47 C07K14/705 C07K16/18 C12N C12N1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/705 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P5/00 A61P7/02 A61P9 /00 A61P9/02 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P25/00.101 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/DA20 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA20 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063 /QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA12 4C084 /ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA22 4C084/ZA36 4C084/ZA42 4C084/ZA45 4C084/ZA54 4C084/ZA66 4C084/ZA68 4C084/ZA69 4C084/ZA70 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084 /ZB26 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC03 4C084/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 村上 清		
优先权	60/318733 2001-09-12 US 60/403254 2002-08-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明提供了鉴定和编码它们的新颖的离子通道多肽和多核苷酸。另外，本发明提供了表达载体，宿主细胞及其生产方法。本发明还提供了鉴定用于治疗人类疾病和病症的离子通道激动剂/拮抗剂的方法。

ion-x	ヌクレオチド* 配列 (SEQ ID NO.)	アミノ酸 配列 (SEQ ID NO.)	最初の 出順	ion-x	アミノ酸 配列 (SEQ ID NO.)	ヌクレオチド* 配列 (SEQ ID NO.)	最初の 出順
31	1	52	A	71	27	78	C
31	103	105	H	72	28	79	C
31	104	106	H	73	29	80	C
32	2	53	A	74	30	81	C
33	3	54	A	75	31	82	C
34	4	55	A	76	32	83	D
35	5	56	A	77	33	84	D
36	6	57	A	78	34	85	D
37	7	58	A	79	35	86	D
38	8	59	A	80	36	87	D
39	9	60	A	81	37	88	D
40	10	61	A	82	38	89	D
41	11	62	A	83	39	90	D
52	107	109	F	84	40	91	D
56	12	63	B	85	41	92	D
57	13	64	B	86	42	93	E
58	14	65	B	87	43	94	E
59	15	66	B	88	44	95	E
60	16	67	B	89	45	96	E
61	17	68	B	90	46	97	E
62	18	69	B	91	47	98	E
63	19	70	B	92	48	99	E
64	20	71	B	93	49	100	E
65	21	72	B	94	50	101	E
66	22	73	C	95	51	102	E
67	23	74	C	111	108	110	G
68	24	75	C	5HT-3C	118	119	I
69	25	76	C	5HT-3C-	120	121	I
70	26	77	C	genomic			
				5HT-3C-	131	132	各 J/K.
				long			
				5HT-3C-	135	121	各 J/L.
				cDNA			
				5HT-3C-	136	132	各 J/K.
				cDNA-			
				long			