

(19)日本国特許庁（J P）

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003－518385

(P2003－518385A)

(43)公表日 平成15年6月10日(2003.6.10)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		45/00	2 G 0 5 4
38/45		48/00	4 B 0 2 4
45/00		A 6 1 P 37/04	4 B 0 5 0
48/00		43/00 111	4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 60数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－548684(P2001－548684)	(71)出願人	オルスタビク、シグルド ノルウェー国、オスロ、イリスバイエン 18
(86)(22)出願日	平成12年12月22日(2000.12.22)	(71)出願人	レイントン、ニルス ノルウェー国、オスロ、ベスト Heim ガテ ン 6ビー
(85)翻訳文提出日	平成14年6月24日(2002.6.24)	(71)出願人	フレンゲン、エイリク ノルウェー国、オスロ、ストラスバイエン 27ビー
(86)国際出願番号	PCT/N000/00445	(71)出願人	ランゲランド、ビヨルン、トーレ ノルウェー国、オスロ、ホルゲルスリス トバイエン 25
(87)国際公開番号	W001/048171	(74)代理人	弁理士 浅村 皓 (外 3 名) 最終頁に続く
(87)国際公開日	平成13年7月5日(2001.7.5)		
(31)優先権主張番号	19996423		
(32)優先日	平成11年12月23日(1999.12.23)		
(33)優先権主張国	ノールウェー(N0)		

(54)【発明の名称】 ヒト c AMP 依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの新規なスプライス変異体の同定とそれらの使用

(57)【要約】

本発明は、C β 遺伝子が、C β 1、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4ab 及び C β 4abc と指定される、少なくとも 6 つの異なる遺伝子産物をコードすることを実証する。げっ歯類及びウシスプライス変異体の場合と同様、すべてのヒト C β スプライス変異体は、エキソン 2 によりコードされる部分に先立つ N-末端部分において異なる。これまで他のいかなる種においても同定されていない二つの新規な C β スプライス変異体 (C β 4ab 及び C β abc) に加え、マウス及びウシにおいて同定されているすべての C β スプライス変異体の相同志 (C β 1、C β 2、C β 3、及び C β 4) がヒトにおいて同定された。本発明はこの観点において、該スプライス変異体をコードし、配列番号：1、2、3、4、5 及び 6 をそれぞれ含む、ゲノム DNA 及び cDNA 配列を包含する。ここで、当該新規タンパク質は C β タンパク質の新規のスプライス変異体である。本発明はさらに、該 cDNA 配列を含むベクターに向けられている。本発明はまた、配列番号：7、8 及び 9 にそれぞれ示された C β スプライス変異体タンパク質の特異的アミノ酸により特徴付けられるタンパク質を包含する。本発明はさらに、診断及び治療目的のための医薬品の調製における該 C β スプライス変異体タンパク質及び DNA 配列の使用を包含

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $C\beta 1$ 、 $C\beta 2$ 、 $C\beta 3$ 、 $C\beta 4$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ スプライス変異体タンパク質をコードし、それぞれ、配列番号：1のヌクレオチド配列を含むゲノムDNA配列であって、該タンパク質は $C\beta$ と称されるc-AMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの新規なスプライス変異体である、上記ゲノムDNA配列。

【請求項2】 $C\beta 1$ 、 $C\beta 2$ 、 $C\beta 3$ 、 $C\beta 4$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ スプライス変異体タンパク質をコードし、それぞれ配列番号：2、3、4、5及び6のヌクレオチド配列を含むcDNA配列であって、該タンパク質が $C\beta$ と称されるc-AMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの新規なスプライス変異体である、上記cDNA配列。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項4】 それぞれ $C\beta 2$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ の配列番号：7、8及び9の特異的アミノ酸配列。

【請求項5】 請求項1又は2に記載のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質。

【請求項6】 配列番号：7、8及び9の特異的アミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の特異的DNA配列によりコードされるタンパク質。

【請求項7】 $C\beta 2$ 特異的DNAプローブを含むキット。

【請求項8】 $C\beta 2$ 、 $C\beta 4$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ タンパク質の医薬品の調製のための使用。

【請求項9】 $C\beta 2$ の酵素活性の阻害のための薬剤の調製のための $C\beta 2$ タンパク質の使用。

【請求項10】 $C\beta 2$ 相互作用を特異的にかつ不可逆的にブロックする薬剤の調製のための $C\beta 2$ タンパク質の使用。

【請求項11】 $C\beta 2$ の酵素活性を活性化する薬剤の調製のための $C\beta 2$ タンパク質の使用。

【請求項12】 アンチセンス医薬の調製のための、 $C\beta 1$ 、 $C\beta 2$ 、 $C\beta 3$ 、 $C\beta 4$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ のDNAに対し相補的なDNA配列の使用。

【請求項13】 C β 2の存在及び位置について患者のT細胞を検査し、スクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄、
 - b) 免疫蛍光法によるC β 2タンパク質の同定の用意、ここでT細胞は洗剤依存性溶解の後、L-リジンでコートされたカバースリップ上へ安定させる、
 - c) 一次抗体(Ab) (関連性のないAb又はC β 2特異的Abである)とのインキュベーション、過剰量のAbは洗浄用緩衝液で除去され、そして、T細胞は蛍光物質と結合した二次抗-IgG Abとインキュベーションする、
 - d) 蛍光顕微鏡下でのT細胞の検査、
- を含む、上記方法。

【請求項14】 膜関連C β 2触媒活性について患者のT細胞をスクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液リンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄、
 - b) 洗剤緩衝液中での溶解によるT細胞の用意、
 - b) 確立されているアッセイによるC β 2特異的な触媒活性のモニタリング、ここでC β 1活性は相対活性の決定のための内部対照として用いられる、
- を含む、上記方法。

【請求項15】 C β 2遺伝子及びmRNAにおける突然変異について患者をスクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄；
 - b) 確立された方法による総RNA及びゲノムDNAの単離、続いて、C β 2特異的ヌクレオチド又はエキソン1-2と指定されるC β 2特異的エキソンのcDNA配列に従うC β 2特異的プライマーを用いたRT-PCR、
- を含む、上記方法。

【請求項16】 請求項13、14及び15に記載の方法により製造された製品。

【請求項17】 C β 2タンパク質の阻害性分子又は活性化分子についてのスクリーニングのための試験システム。

【請求項18】 請求項17に記載のスクリーニング方法からの製品。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、C β の新規の変異体である、C β 1、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4ab、及びC β 4abcと呼ぶ、6つの異なる遺伝子産物をコードするゲノムDNA及び相補的DNA配列に関する。本発明はまた、該DNA配列を含むベクター類に関し、また、診断及び治療における該タンパク質に向けられている。

【0002】**(背景技術)**

環上3', 5'-アデノシンーリン酸 (cAMP) は重要な細胞内シグナル伝達分子であり、その主な機能は、cAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) の活性化である [1]。PKAは、調節サブユニット二量体及び二つの触媒サブユニットを有するヘテロ四量体である。ホロ酵素はcAMPの4つの分子がRサブユニット二量体に結合 (各Rサブユニットに二つずつ) した時に活性化され、二つの遊離の活性Cサブユニットを放出する [2]。ヒトにおいて、4つの異なるRサブユニット (RI α 、RI β 、RII α 、RII β) 及び4つの異なるCサブユニット (C α 、C β 、C γ 及びPrKX) が同定されている [3]。C α 及びC β サブユニットは、ほとんどの組織中で発現されるが、一方、C γ サブユニット (これはイントロンのない遺伝子から転写され、C α サブユニットから誘導されたレトロポゾンを表す [4]) はヒトの精巣においてのみ発現される [5]。PrKXはX染色体コードプロテインキナーゼであり、それは最近、PKI及びRI α の両方により阻害され、RI α /PrKX錯体はcAMPにより活性化される [6] ことから、PKA Cサブユニットとして同定された。

【0003】

C α 及びC β の両方のスプライス変異体は同定されている。C α のスプライス変異体はC α 1 (以前はC α と名付けられた [7])、C α 2 [8] 及びC α -s [9] と呼ばれている。元来C α 2はインターフェロン処理した細胞から単離され、C-末端先端切断C α 1サブユニットとして同定された。しかしながら、最近新規のC α 2スプライス変異体が報告された [10]。この新規なC α 2変

異体は以前に同定されたC α スプライス変異体、C α -sと同一であることが示された。さらに、元々ヒツジの精子から単離され同定されたC α -s [9] は、後にヒト精巢cDNAライブラリーからクローンされ、ヒト精子において同定された [11]。C α -s/C α 2の両方は、C α と比べると先端が切断されたN-末端と共にコードされる。C α 1及びC α -sの可変部分は、げっ歯類C α 遺伝子においてエキソン2の上流に位置し、これはC α 1及びC α -s/C α 2のN-末端における変化が異なる第一エキソンの選択使用によることを意味している。ヒツジにおいて、C β の二つのスプライス変異体が同定されていて、ヒツジC β 1 [12] 及びヒツジC β 2 [13] と称されている。ヒツジスプライス変異体は可変N-末端を含有し、その中で同一でない配列がエキソン1の異なる形態によってコードされていることが可能性が最も高い。ヒツジC β 2はほとんどの組織において低いレベルで発現されるが、脾臓、胸腺及び腎臓において最大に発現され、大脳においてもある程度は発現される。さらに、マウスにおいては、C β の三つのスプライス変異体が同定され、それらはC β 1、mC β 2及びマウスC β 3と指定されている [14]。マウスのC β 1は至る所で発現される一方、マウスC β 2及びマウスC β 3はこれまで大脳でしか同定されていない。マウスのC β 1及びヒツジC β 1は配列全体において類似しており、これは、これらがオルソログなタンパク質配列であることを表している。しかしながら、N-末端部分においてマウスC β 3とマウスC β 4のいずれもがウシC β 2に類似しておらず、これはこれらのN-末端は無関係のエキソンによりコードされていることを意味する。本研究以前は、ただ一つのみ、マウスC β 1及びウシC β 1と相同的なヒトC β のスプライス変異体が同定 (C β 1) されているに過ぎない。

【0004】

(発明の概要)

本発明は、C β 遺伝子が少なくとも、C β 1、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4a b及びC β a b cと指定される、6つの異なる遺伝子産物をコードすることを例証する。げっ歯類及びウシのスプライス変異体の場合と同様に、すべてのヒトC β スプライス変異体は、エキソン2によりコードされている部分に先立つN-末端部分において異なる。他のいかなる種においてもこれまで同定されていなかった

た、二つの新規なC β スプライス変異体（C β 4a b及びC β 4a b c）に加え、すべてのマウス及びウシにおいて同定されたC β スプライス変異体の相同体がヒトにおいて同定された（C β 1、C β 2、C β 3及びC β 4）。本発明は、この点で当該スプライス変異体をコードするゲノムDNA及びcDNA配列を包含し、配列番号：1、2、3、4、5及び6に示すそれぞれのヌクレオチド配列を包含する。ここで、当該タンパク質はC β タンパク質の新規なスプライス変異体である。本発明は、さらに、当該cDNA配列を含むベクターに向けられている。本発明はまた、配列番号：7、8及び9に示す特定のアミノ酸C β スプライス変異体タンパク質C β 2、C β 4a b及びC β 4a b cを特徴とするタンパク質を包含する。本発明はさらに、診断及び治療目的の医薬の調製における当該C β スプライス変異体タンパク質及びDNA配列の使用も包含する。

【0005】

（図面の概説）

図1：A：ヒトC β スプライス変異体をコードするcDNAの同定。ヒトに見出される種々のC β スプライス変異体のタンパク質コード配列の略図。総胎児及び脳由来のヒトcDNAはC β cDNAに相補的なプライマーを用いて増幅され、サブクローンされ、配列決定された。得られたcDNAはヌクレオチド46の下流（定常部）で以前に出版されているC β cDNA（C β 1）と同一であった。しかしながら、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4ab及びC β 4abcと指定される5つの新規cDNA配列は、配列の5'—末端（可変部）における違いに基づいて同定され得る。

【0006】

図2 A:新規のC β スプライス変異体をコードするヒトゲノム領域の構造。プライマーはエキソン2及び異なるC β cDNAの最も5'—末端に基づいて作られ、ヒトゲノムDNAのPCRによる増幅のために用いられた。14kb及び17kbの二つのオーバーラップするPCR生成物は、それぞれ、同定され、サザンブロット及び異なるcDNAに対応するオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによってマッピングされた。14及び17kbPCR生成物から誘導されるように、エキソン1—2、1—3、1—4及びエキソンa、b及びcは、エキソン2の31、14.1、14、8.1、5.4、及び4.4kb上流に位置する。PACクローンRPCI—6—228E23の制限地図に基づいて、エキソン1

ー1はエキソン1-2の約60kb上流に位置する。エキソン1-1は、Cβ1をコードするスプライス変異体に特異的である。エキソンは垂直線として示す。イントロンは示した通り一定の縮尺で描かれている。B：Cβの新規のスプライス変異体をコードするゲノム領域のヌクレオチド配列。タンパク質コード配列は大文字で示されており、イントロン及び5'-非翻訳配列は小文字である。翻訳開始コドンにはアンダーラインを付してある。エキソン2の5'-末端のみ含まれる。C：どのように種々のヒトCβエキソン5'からエキソン2がスプライスされ得るかを示す略図。上段のパネルは、エキソン1-1、1-2、1-3及び1-4と指定されるエキソン1の4つの変異体が選択的にエキソン1と共にスプライスし、Cβ1、Cβ2、Cβ3及びCβ4中のスプライス変異体特異的配列をコードする、可能性のあるモデルを記述する。下段パネルは、エキソンa、b及びcがエキソン2の上流のエキソン1-4及び1-3と共にスプライスし、Cβ4ab、Cβ4abc及びCβ3ab中のスプライス変異体特異的配列をコードする、モデルを記載する。

【0007】

図3：Cβスプライス変異体の演繹アミノ酸配列。図1Aに示したcDNAクローンに従う、Cβ1並びに、Cβ2、Cβ3、Cβ4、Cβ4ab及びCβ4abcとして指定される5つの新規のスプライス変異体のアミノ末端部分のアミノ酸配列。アミノ酸配列は一文字コード表示し、6つの新規なCβエキソンが、選択的なプロモーター使用及び選択的スプライシングの結果として5つの異なるcDNAを与えることが実証される。Cβ1において以前同定されたミリスチル化の目的は四角で囲まれている。Cβ1中に以前同定されているPKA自己リン酸化の目的は下線が付されており、リン酸化される可能性があるSer10はアスタリスクで標識した。エキソンaによりコードされ、Cβ4ab及びCβ4abcに存在するPKA自己リン酸化モチーフが存在することに留意されたい。

【0008】

図4：異なるCβスプライス変異体の組織分布である。種々のヒト組織を含むノーザンブロットを、Cβ1、Cβ2、Cβ4、エキソンa+bに特異的なプローブ及びすべてのCβスプライス変異体に共通のプローブ（Cβ共通）を用いてハイブリダイズした。比較のため、幾つかのブロットはGAPDH cDNA（GAPDH

）を用いてハイブリダイズした。すべてのC β mRNAは同一の見かけ長さ（4.4kb）を有した。

【0009】

図5：C β 2の種分布。様々な種由来のEcoRI消化ゲノムDNAを含むサザンブロットをエクソン1-2に対応するDNAプローブ（C β 2特異的）を用いてハイブリダイズした。ヒトエクソン1-2に相同なゲノム配列を同定する単一のハイブリダイズバンドが、マウス及びラットを除いて哺乳類、例えば、サル、イヌ、ウサギ及びヒトにおいて同定された。B：C β 2はマウスで発現されない。野生型（+／+）マウス脳及び脾臓（レーン1及び3）、C β 1（レーン2及び4）について除去されたマウス（-／-）の脳及び脾臓、並びに、ヒト末梢血液白血球（レーン5）から単離された総RNA（1レーンあたり20 μ g）を含むノーザンブロットを、すべての公知C β スプライス変異体を認識すると期待されるC β プローブ（C β 共通、上段パネル）及びC β 2スプライス変異体（C β 2、下段パネル）に特異的なC β プローブでプローブした。二つのプローブにより認識されるメッセンジャーRNAは4.4kbとして示す。

【0010】

（発明の詳細な説明）

本発明は、ヒトC β 遺伝子が、以前に同定されているスプライス変異体C β 1 [12]に加え、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4a b及びC β 4a b cと指定される、5つの新規なC β スプライス変異体をコードすることを例証する。すべてのC β スプライス変異体は、独特のN-末端を含み、組織特異的発現を示した。我々がエクソン1-1の上流にさらなるエクソンの証拠を発見しなかったこと、及びすべての特徴決定されたcDNAが独特の5'-末端を有していたことから、エクソン1-1、1-2、1-3及び1-4がそれぞれ別個のプロモーターを含むこと、及び、得られるmRNA産物は異なるプロモーターの選択使用によるということ、を仮定することが理にかなっている。これにも関わらず、我々は、これらのスプライス変異体の二つ又はそれ以上が、異なるエクソンを選択スプライスするために用いられる共通のプロモーターをシェアするという可能性を除外することはできない。さらに、我々は、エクソンa及びb、またはエクソンa、b及びcのいずれかの選

択スプライシングの結果である、二つのC β 変異体C β 4a b及びC β 4a b cを、エキソン1～4とエキソン2との間に発見した。対応するmRNAの存在は、エキソンa及びb中に見られる配列に相補的なプローブとのノーザンブロットハイブリダイゼーションによって確認された。このプローブ及びC β 4に特異的なプローブは、ヒト大脳中に存在する同一の見かけ長さを有するRNAに結合した。エキソンa、b及びcの位置は、これらが、本明細書に実証したものに加えて、C β のスプライス変異体を発生することを示唆し得る。実際に、ヒト幼児大脳由来の短いcDNAは配列決定され、エキソン1-3、a、b及び2の組み合わせを含むことが実証された（受け入れ番号 AA351487、図2C参照）。我々は、そのようなcDNAを作ることができなかったが、これは成人の大脳ではC β 3の発現レベルが低いことによるかもしれない。

【0011】

二つのスプライス変異体C α 1及びC β 1はエキソン1によりコードされた部分において、高度に保存されており、最初の16アミノ酸のうち2つしか異ならない[7; 12]。したがって、この領域がこれらのスプライス変異体の機能においてと役割を果たすことを示唆する気になる。このように、我々が、異なるN-末端を有する幾つかのC β スプライス変異体を同定したという事実は、N-末端ドメインが、各スプライス変異体に関連する特異的な機能的特徴を反映するかもしれないことを示唆し得る。これは、マウスC β 1 KOマウスの研究により裏付けられ、当該研究は、損なわれた海馬柔軟性を示した[16]。しかしながら、マウスにおけるN-末端先端切断C β スプライス変異体、C β 2及びC β 3が触媒活性であり、活性がインビボでPKI及びRサブユニットの両方により阻害されたことから、N-末端の違いがどの程度触媒活性に影響するかは知られていない。さらに、Herberg等による研究[17]により、C α アイソフォームにおけるアミノ酸1～14を欠失することによって、触媒活性が影響されなかったことを示し、C α 1/C β 1に特異的なN-末端は触媒活性に不必要であることを実証した。

【0012】

C α 1及びC β 1のN-末端は、翻訳後修飾のための二つの部位である、ミリスチル化部位及び自己リン酸化部位を含む[5; 18; 19]。C α 1、C β 1及びC β 3

において、N-末端アミノ酸はG (Gly) であり、これはミリスチル化のための絶対的な要件として示されている [20]。これにも関わらず、C β 3がインビボでミリスチル化を経ないことが、以前マウスにおいて実証された [14]。この現象は、ミリスチル化が起こるためには、Gに対するアミノ酸C-末端がNでなければならないことを実証した最近の研究に基づいて説明し得る。これは、Dを得るためのNの脱アミン化が絶対的な要件であることによる [21]。マウス及びヒトC β 3の両方において、Gに対するアミノ酸C-末端はLであるため、これにより何故マウスC β 3がミリスチル化されないのかが説明され、ヒトC β 3がインビボでミリスチル化されない可能性があることを示唆される。

【0013】

幾つかの非とC β スプライス変異体 (C β 2、C β 3、C β 4、C β ab及びC β 4abc) が、インビボでミリスチル化される能力に欠くという事実は、この翻訳後修飾の役割について疑問を持たせる。C α 結晶構造に基づく、ミリスチル基が大きなローブ中の疎水性ポケットを満たすか、又は遮る役割を果たすようであり [22]、このN-末端修飾がCサブユニットを可溶化する役割を果たすことが示唆される。これは二つの独立した観測により裏付けられる。第一に、C α 1のN-末端先端切断形態の発現は、Cサブユニットが粒子分画と密接に関連することを明らかにした [23]。第二に、天然に生じるN-末端先端切断スプライス変異体であるC α -s/C α 2はヒツジ [9; 24] 及びヒト [11] 精子の両方における細胞下構造に密接に関連する。このことと、ミリスチル基が、RIサブユニットではなく、RIIユニットと結合した時にCサブユニットの親油性を向上させる役割を果たすことを例証した [25] 最近の報告とを一緒にすると、ミリスチル化と共にC α 1のN-末端アミノ酸はCサブユニットの可溶性に影響する与える働きをすることが示唆される。このように、C α 1及びC β 1の間の配列類似性及びC α 1及びC α -s/C α 2の可溶性の相違は、C β 1及び先端切断されたC β 形態の間の可溶性の比較し得る相違を暗示し得る。

【0014】

以前、コンセンサス自己リン酸化モチーフ (—KKGS¹⁰—) がC α 1及びC β 1中に同定され [12; 26]、それらは、細菌中でC α 1が発現される時にリン酸

化される [18 ; 23] 。Yonemotoらの研究 (1993) において、 S^{10} の突然変異により、不活性のようである不溶性の酵素が得られた。したがって、N-末端ドメインはまた、未知の機構による触媒活性について示唆する。しかしながら、ヒトC β 2、C β 3、C β 4、と同様に、マウスC β 2及びC β 3は S^{10} を欠くが、これらのスプライス変異体は溶解性であり、インビボで触媒活性である [14] 。このことは、ヒト相同体は活性である可能性が最も高いことを示唆し、 S^{10} リン酸化がCサブユニットの触媒作用に決定的でないことを意味する。興味深いことに、我々は、C β 4a b及びC β 4a b c中に、エキソンaによりコードされた強力な自己リン酸化部位 (—R K S S⁶—) を同定した。この部位がどの程度、C β 4a b及びC β 4a b cの特性に影響を与える真の自己リン酸化部位であるかは、これから理解されるべきものとして残っている。

【0015】

ヒトC β スプライス変異体は、以前に同定されたヒツジC β 2スプライス変異体に類似しているが、我々はマウスにおいて同様のスプライス変異体を同定することができていない。興味深いことに、ヒトC β 2スプライス変異体は末梢組織においてのみ発現され、一方、ヒト大脳においては、検出可能なC β 2mRNAシグナルは見いだせない。しかしながら、C β 1スプライス変異体を欠くマウスの大脳の外側では、C β は検出することができない [14 ; 16] 。さらに、我々は、ヒトC β 2特異的プローブを用いてマウスDNAをハイブリダイズする時にはいかなるシグナルも検出することができなかった。したがって、マウスはヒト及びウシC β 2スプライス変異体の相同体を含有しないようである。

【0016】

興味深いことに、C β 2はC β スプライス変異体の最も異型なものである。このサブユニットは、伸長したN-末端ドメインと共にコードされ、これは他のC β スプライス変異体のいずれにも似ていない。この独特なドメインは、C β 2がミリスチル化部位及び自己リン酸化部位を欠いているという事実、及びC β 2が大脳において同定されていないただ一つのC β スプライスである事実と共に、更なる研究が待たれる他の組織におけるこのスプライス変異体に関する特異的で独特の特徴を示唆する。

【0017】

発明者らは、種々のC β スプライス変異体の、Rサブユニットと錯体形成した時の組織特異的発現が、cAMP効果の媒体として重要となり得る、特異的な特徴を有する新規のPKAホロ酵素を意味するということを提案する。本発明は、この点から、スプライス変異体、C β 1、C β 2、C β 3、C β 4、C β 4a b及びC β 4a b cをコードするゲノムDNA及びcDNA配列を包含し、配列番号1、2、3、4、5及び6に示すヌクレオチド配列をそれぞれ含む。ここで、当該タンパク質はC β タンパク質の新規のスプライス変異体である。本発明はさらに、該cDNA配列を含むベクターに向けられている。本発明はまた、配列番号：7、8及び9それぞれに示された、C β スプライス変異体タンパク質、C β 2、C β 4a b及びC β 4a b cを特徴とする、タンパク質を包含する。本発明はさらに、薬理的な組成物を同定し、特徴決定し、製造するための診断用、治療用医薬の調製における該C β スプライス変異体タンパク質及びDNA配列の使用を含む。

【0018】

C β 2はリンパ細胞において発現される酵素であり、それによるとその機能は、T細胞活性化に対するcAMPの調整効果の媒介である。したがって、発明者らの結果によると、C β 2の変化したレベル、位置及び／又は活性は、T細胞活性化に対し重要であり、cAMPによって調節される受容体及び酵素の調節及び通常機能に対し、影響を有する。この知識は、種々の免疫疾患に関連した過反応性及び機能障害T細胞の診断に使用することができる。

【0019】

1) 機能不全T細胞：T細胞依存性後天性免疫グロブリン血症（CVI）及び後天性免疫不全症候群（AIDS）を患った患者から単離されたT細胞は抗原に対して応答しないことが周知である。さらに、ある種のリウマチ性関節炎及び多くの自己免疫疾患を患った患者から単離されるT細胞は、異質の抗原に対し過敏である。両方の場合、これらの状況は、機能不全C β 2を巻き込む異常な免疫応答を起こす。これは、構造的に活性化されたC β 2、C β 2の正常以下の活性又は混乱のいずれかとして監視し得る。

【0020】

1.1) T細胞機能不全の改善：本発明は、高生産性スクリーニング後、C β 2の酵素活性を特異的に阻害する薬理的組成物の同定、特徴決定、及び製造を可能にする。これらの組成物は、これらが経口又は静脈注射で導入され、血液系に入り、機能障害T細胞に到達するように開発されるべきである。

【0021】

さらに、T細胞膜由来のC β 2タンパク質の混乱は適当な受容体に対するC β 2の調節効果を簡単にする。このように、本発明は、高生産性スクリーニング後、T細胞膜とのC β 2の相互作用を特異的に、かつ不可逆的にブロックする薬理的組成物の同定、特徴決定、及び製造を可能にする。これらの組成物は、傾向的に又は静脈注射により導入され、血液系に入り、T細胞に到達するように開発されるべきである。

【0022】

1.2) 異常高活性T細胞のダウンレギュレーション：本発明は、高生産性スクリーニング後、C β 2の酵素活性を特異的に活性化する薬理的組成物の同定、特徴決定、及び製造を可能にする。これらの組成物は、経口で又は静脈注射で導入され、血液系に入り、機能不全T細胞に到達するように開発されるべきである。

【0023】

1.3) C β 2突然変異を診断するためのキット：C β 2酵素活性の機能不全又は局在化により生じるT細胞機能不全は、C β 2タンパク質の突然変異により生じ得る。本発明は、突然変異C β 2が存在する場合、診断上薬にするキットの開発を可能にする。そのようなキットは、C β 2特異的DNAプローブとともに開発されるべきである。

【0024】

本発明は、C β 2の存在及び位置について、患者のT細胞を検査し、スクリーニングする方法であって、

- a) [27] に従い、単離された末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄；
- b) 免疫蛍光法によりC β 2タンパク質の同定のために準備すること、T細胞は

、洗剤一依存性溶解に続いて、ポリL-リジンでコートされたカバースリップ上に安定させる；

c) 一次抗体 (Ab) (関連性のないAb又はC β 2特異的なAbのいずれかである) とのインキュベーション、Abの過剰量は洗浄緩衝液により取り除かれ、T細胞は蛍光物質に結合された第2の抗-IgG Abとインキュベーションされる；

d) 蛍光顕微鏡の下でのT細胞の検査

を含む上記方法の開発を可能にする。

【0025】

本発明はさらに、膜に関連下C β 2触媒活性について、患者のT細胞をスクリーニングする方法であって、

a) [27] に従い、単離した末梢血液Tリンパ球の回収し及び緩衝液中での洗浄；

b) 洗剤緩衝液中での溶解による、T細胞の用意；

b) 確立されているアッセイによる、C β 2特異的触媒活性のモニタリング、ここでC β 1活性が相対活性を決定するための内部対照として用いられる；

を包含する上記方法の開発を可能にする。

【0026】

本発明はまた、C β 2遺伝子及びmRNAにおける突然変異について患者のスクリーニングであって、

a) [27] に従い、単離された末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄；

b) 確立された方法に従う総RNA及びゲノムDNAの単離、それに次ぐ、C β 2特異的ヌクレオチド又はC β 2特異的エキソンのcDNA配列に従うC β 2特異的プライマーを用いるRT-PCR、

を包含する上記スクリーニングを可能とする。

【0027】

材料及び方法

一般的プロトコル

相補的DNAプローブは、メガプライム (Megaprime) ランダムプライミングキット

及び α -[32P] dCTP [アマシャム (Amersham)] を用いて、製造者の指示に従い、少なくとも 1×10^9 cpmの特異的活性まで放射線標識された。合成オリゴヌクレオチドは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (ファーマシア) 及び γ -[32P] ATPを用いて、製造者の指示に従い放射線標識した。

【0028】

DNAは、Thermo Sequenase 放射線標識ターミネーターサイクル配列決定キット (radiolabeled terminator cycle sequencing kit) (アマシャム、バッキンガムシャー、英国) を用いて手動により、又はメジゲノミックス (Medigenomix) [マルチンスライド (Martinsried)、ドイツ]、のいずれかによって配列決定された。配列は、ウィスコンシン大学GCGプログラムパッケージ (UWGCG) 及びベーシックの局所的配置及びサーチツール (BLAST) 「15」を用いて分析された。

【0029】

cDNAの同定

ヒトC β cDNAの5'-末端をヒトの総胎児及び脳マラソンRACE-準備済みcDNA (Marathon RACE-ready cDNA) (Clontech) から、アドバンテージ KlenTaq ポリメラーゼ ミックス (Advantage KlenTaq Polymerase Mix) (Clontech) を用いて、製造者により記載された通りに増幅した。増幅は、アダプタープライマー1 (Clontech) 及びヒトC β cDNA配列に相補的な4つの異なるプライマー

(5'- CAACCCAAAGAGAAGTAAGAAAGTGGTCTA-3',

5'- TTGGTTGGTCTGCAAAGAATGGGGGATAGC-3',

5'-TTTTCTCATTCAAAGTATGCTCTATTTGC-3' 及び

5'- AGAATAATGCCGGAAGTTGAAGATTTTGAAA-3').

を用いて行った。45秒間95°C、2分間72°Cで5サイクルを行い、45秒間94°C、2分間70°Cで5サイクル、45秒間94°C、2分間68°Cで25サイクル行い、そして最後に10分間72°Cで延長した。得られた生成物をゲル電気泳動により分離し、正常者による指示に従って pCR2.1TOP0 (Invitrogen) ヘサブクローンし、配列決定した。

【0030】

C β 遺伝子断片の増幅

ゲノム断片を、エキソン1-3 (5'-GTTTAGGTGCAATCATTCTGCTGTTG-3') に対応するオリゴヌクレオチド及びエキソン2 (5'-AAAAAGTCTTCTTTGGCTTTGGCTAGA-3') 中の配列に相補的なプライマーを用いて増幅した。もう一つのゲノム断片はエキソン1-2 (5'-TGGCAGCTTATAGAGAACCACCTT-3') に対応するプライマー及びエキソン1-3 (5'-CAATCCCATGTTGAACCTGGCA-3') に見出される配列に相補的なプライマーを用いて増幅させた。PCR反応はボエリンガーマンハイム拡大長テンプレート (Boehringer-Mannheim Expand Long Template) PCRキットを用いて、製造者の指示に従い、緩衝液2を用いて行った。PCRはヒトゲノムDNA (ボエリンガーマンハイム) をテンプレートとして用いて、1分間95°C、10分間94°Cと30秒間60°Cと10分間 (サイクル11からサイクル30まで位置サイクル当たり20秒間延長した) 68°Cとの30サイクル、及び7分間68°Cの最終的なインキュベーションで行った。生成物は、アガロースゲル電気泳動により分離し、放射線標識cDNA及び異なるエキソンに対応する合成オリゴヌクレオチドを用いてサザンブロットにより分析した。

【0031】

PACライブラリーのスクリーニング及びエキソン含有配列のサブクローニング
ヒトP1-誘導人工染色体 (PAC) ライブラリ、RPCIをスクリーニングし、単離下細菌クローンを液体培養で成長させ、プラスミドDNAをイオン交換カラムを用いて、製造者 (Qiagen、Hilden、ドイツ) の記載通りに単離した。エキソン含有DNA制限断片を、放射線標識cDNA及び合成オリゴヌクレオチドを用いてサザンブロットにより同定した。エキソン含有断片をゲルから切り出し、pZER02.1ベクター (Invitrogen) へ製造者の指示に従いサブクローンした。

【0032】

スプライス特異的プローブの発生、ノーザンブロット、サザンブロット
cDNAのスプライス変異体特異的部分に対応するDNA断片をPCRによって増幅した。異なるスプライス変異体に関し、以下のプライマーが使用された：

CB1: 5'-GCTCTCCACCTCGCTGCCTTTCTT-3' 及びプライマー

5'-CCAGCCCCCTTCCCTTCCCTGAC-3',

CB2: プライマー 5'-TGGCAGCTTATAGAGAACCACCTT-3' 及びプライマー

5'-ATTGATCTGTCCATAAGGCAGTAT-3',

CB3: プライマー 5'-TCACAGCTAGCAGTAAGAGCTG-3' 及びプライマー

5'-CAATCCCATGTTGAACCTGGCA-3',

CB4: プライマー 5'-TCTCCAGTGTGTGTGTTTACAC-3' 及びプライマー

5'-ATGATGAAAACCAACCTTTCCA-3'.

【0033】

プライマーは、クローン化RACE-生成物から、Taq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer) を用いて、製造者の記載どおり、フラグメントの増幅のために用いられた。エキソン a 及び b を特異的に認識するプローブの生成のためには、プライマー:

5'-GATATTTCTGAAGAGGAGCAAGCAGATGCATCTGATGATTTGCGTG-3' 及び 5'-CACGCAAATCATCAGATGCATCTGCTTGCTCCTCTTCAGAAATATC-3'

をアニールし、リン酸化し、リゲートした。C β cDNA [5] の1.5kb断片をすべてのスプライス変異体に共通するC β mRNAの部分を確認するために用いた。種々のヒト源からのRNAを含む二つの類似するノーザンブロットをClontechから購入した。一つのプロットは、C β 2に特異的なプローブを用いてハイブリダイズされ、もう一方のプロットはC β 2、C β 4、エキソン a 及び b、及び1.5kb C β cDNAに特異的なプローブで連続してプローブした。両方のプロットは、GAPDH cDNAを対照として用いてハイブリダイズした。両方のプロットに対しGAPDHを用いて、ハイブリダイゼーションのほぼ同一のパターンが得られた。GAPDHプロットの一つだけを示す (図4)。すべてのプローブは、製造者の記載に従い、Express

Hybハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) 中でハイブリダイズされた。様々な種由来のEcoRIー消化DNAを含有するサザンブロット (Clontech) は並びに種々の酵素で消化したヒト及びマウスDNAを含有するサザンブロットは、C β 2に特異的なプローブを用いてハイブリダイズされた。フィルターは、5X デンハート溶液 (Denhardt's solution)、5 X SSC、50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8、0.1%SDS、250 μ g/ml一本鎖サケ精子DNA、及び50% (v/v) ホルムアミド中で、42°Cで3時間、プレハイブリダイゼーションし、そして、放射線標識C β 共通又はC β 2プローブを含有する同様の溶液中で16時間ハイブリダイゼーションした。

【0034】

膜を2 X SSC、0.1%SDS中で、室温下5分間洗浄し、次いで0.5 X SSC、0.1%SDSを用いて50°Cで30分間二回洗浄した。Amersham Hyperfilm MP及び増感スクリーンを用いて-70°Cでオートラジオグラフィーを行った。

【0035】

本発明がよりよく理解されるため、以下に例を挙げる。これらの例は、例証のみを目的とし、本発明の範囲をいかなる方法によっても制限するものとして解釈されるべきでない。

【0036】

例

例1

ヒトC β の新規なスプライス変異体をコードするエキソンの同定
ヒトC β cDNAの5'末端を、ヒト脳及び総胎児RACEー準備されているcDNA (RACE-ready cDNA) から、以前に出版されているヒトC β cDNA配列に相補的な4つの異なるオリゴヌクレオチドプライマーを、アンカープライマーと組み合わせて用いて増幅した。得られたPCR生成物をサブクローンし、配列決定し、以前に出版され、今C β 1として指定されているヒトC β cDNA配列 (図1) と比較した。配列決定されたすべてのクローンはヒトC β 1 cDNA配列中46個の最初のタンパク質コードヌクレオチドを欠いていることが示された。代わりに、タンパク質コード配列の5つの新規な伸長が同定された (図1、可変部)。クローンはそれぞれ、

翻訳開始コドン及び1個又はそれ以上のフレーム単位上流停止コドンを含んでいた。5つの新規なcDNA配列をC β 2、C β 3、C β 4、C β 4ab及びC β 4abcと指定した。

【0037】

すべてのC β cDNAは、C β 1cDNA中のヌクレオチド47から下流において類似しており、これはげっ歯類C β 遺伝子におけるエキソン2の開始に対応する。エキソン2の上流の新規なタンパク質コード配列の同定により、エキソン2の上流の幾つかの異なるエキソンの存在を示された。こうして、エキソン2（アンチセンス方向）に対応するプライマー及び異なる新規なcDNAの5'—末端（センス方向及びアンチセンス方向）の組み合わせを異なる組み合わせで使用することにより、ヒトゲノムDNAが増幅された。17kbのPCR生成物は、C β 2cDNA（センス方向）及びC β 3の5'—末端（アンチセンス方向）に対応するプライマーを用いた増幅の結果であった。さらに、14kbのPCR生成物はC β 3cDNAの5'—末端（センス方向）に対応するプライマー及びエキソン2（アンチセンス方向）に対応するプライマーを使用する増幅の結果であった。これらのクローンは、我々にC β 遺伝子中での6つの新規なエキソン（1-2、1-3、1-4、a、b、及びcとして指定される）の物理的マッピングを可能とし、そしてこれらはそれぞれ、エキソン2の31、14.1、14、8.1、5.4及び4.4kb上流に位置していた。さらに、PACライブラリーをプローブとしてC β 1及びC β 2 cDNAを用いてスクリーニングした。同定されたクローンの一つである、RPCI-6-228E23は、エキソン1-2と、我々がエキソン1-1と称する、C β 1 cDNAのスプライス変異体—特異的部分全体を含むエキソンとの両方を含んでいた。このPACクローンはCpGカッターを用いる詳細な制限地図のために選択された。消化されたPAC DNAをパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）によって分離し、サザンブロット膜に移し、エキソン1-1及び1-2、並びにSp6及びT7オリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイズした。

【0038】

これらの結果により、エキソン1-1及び1-2（図2A）の間がおよそ60kbであることが示された。異なるC β cDNA中に見出されるすべてのヌクレオチド配列は、ヒトゲノムDNAの連続的伸長中に同定され、これはこれらのcDNAが同一遺伝子

の産物であるという知見を指示する。エキソン1-1は、以前に同定されたげっ歯類C β 遺伝子のエキソン1Aに相同であった。図2Bに示した通り、エキソン1-2はC β 特異的配列全体を含み、エキソン1-3は、以前に同定されているマウスC β 遺伝子におけるエキソン1Bに相同であるC β 3に特異的な配列を含む。最終的に、エキソン1-4はヒトC β 4スプライス変異体に特異的な配列を含むことが示され、また、げっ歯類C β 2スプライス変異体においてN-末端をコードするげっ歯類エキソン1Cに相同であることが示された。C β ab及びC β abc cDNA配列に基づいて、エキソンa、b及びc（図2B）は、エキソン1-4及び2の間で、エキソン1-4、a、b及び2又はエキソン1-4、a、b、c及び2（図2C、下段パネル）と共にスプライスされることが示された。これらのcDNA配列は、他の種において同定されていない、新規なC β スプライス変異体を表す。

【0039】

例2

新規なC β スプライス変異体の演繹アミノ酸配列

依然に開示されているC β 1-配列及び5つの新規なC β スプライス変異体の演繹アミノ酸配列のN-末端部分を図3に示す（上段及び下段パネル）。スプライス変異体は、エキソン2によりコードされる配列（C β 1中のアミノ酸17）から始まりC-末端まで同一であるが、一方、N-末端は長さ及び配列組成の両方において異なる。C β 2スプライス変異体は、C β 1における最初の16個のアミノ酸に代えて63個のアミノ酸配列を含み、以前に同定されているウシC β 2 [12] に相同である。さらに、ヒトC β 3スプライス変異体は、C β 1中の最初の16個のアミノ酸に代えてN-末端に4つのアミノ酸を含み、以前に同定されているげっ歯類C β 3 [14] に類似する。ヒトC β 4はC β 1中の最初の16個のアミノ酸に代えて3つのアミノ酸を含み、げっ歯類C β 2 [14] に類似する。最後に、スプライス変異体C β 4ab及びC β 4abcは、C β 1の最初の16個のアミノ酸に代えて、それぞれ、18個及び21個のアミノ酸を含む。これらのスプライス変異体は、これまで同定されているいかなる他のCサブユニットのN-末端にも相同性を示さない。

【0040】

例3

C β スプライス変異体の組織分布

C β スプライス変異体の組織分布を調べるため、エキソン特異的DNAプローブ及びすべてのC β スプライス変異体に共通するDNAプローブを、種々のヒト組織由来のRNAを含む二つの類似するノーザンブロットとハイブリダイズした。比較のため、当該ブロットをグリセルーアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) をコードするcDNAとハイブリダイズした。図4 (パネルC β 1) において、我々はC β 1が脳及び腎臓において主に発現され、幾つかの他の組織においても低いレベルで発現されることを示した。C β 2は胸腺、脾臓、腎臓において高レベルで発現されるのに加え、他の組織においても弱いシグナルを示した (図4、パネルC β 2)。C β 2に対照的に、mRNAを含むエキソン1-4及びエキソンa及びbは、脳のみが存在するようであった (図4、パネルC β 4及びエキソンa+b)。最後に、すべてのC β スプライス変異体に共通のプローブによりノーザンブロットをプローブし、我々は、GAPDHシグナルに比べた場合、脳において最も強いシグナルを有し、脾臓及び胸腺におけるいくらか弱いシグナルを有する、あらゆる所でのC β の発現を観測した。C β 3特異的cDNAに対応するDNA断片を用いるハイブリダイゼーションは、脳におけるほとんど検出不可能なシグナル、及びその他の組織における検出不可能なシグナルを与えたに過ぎなかった (データは示していない)。

【0041】

例4

ヒトC β 2スプライス変異体はマウスには存在しない。

以前、我々はマウスにおけるC β の3つのスプライス変異体、C β 1、C β 2、及びC β 3を同定した [14]。本研究に基づけば、マウスC β 2がウシ又はヒトC β 2のいずれにも相同性でないことが明らかである。したがって、我々はヒトC β 2に類似するC β スプライス変異体がマウスゲノム中に存在するか否か調べた。ヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ及び酵母から単離されたゲノムDNAを含むズーブロット (Zoo-blot) を、ヒトC β のエキソン1-2に対応するDNA断片を用いてハイブリダイズした。図5 (パネルA、レーン1から9) において、我々はC β 2特異的プローブを用いて、ヒト、サル、イヌ、ウシ、及びウサギに

において、DNA断片が検出されたことを示す。対照的に、C β 2特異的プローブはラット及びマウスにおいていかなる断片も認識しなかった。これは、C β 2特異的エキソンがげっ歯類ゲノム中に存在しないことを示唆している。この観測をさらに実証するために、我々はヒト、野生型マウス、C β 遺伝子のエキソン1Aについて除去したマウス（ノックアウト、KO）[16] から総RNAを単離した。我々は、ヒト胸腺、脾臓、及び末梢血液白血球中にC β 2の高レベルの発現を、及び脳中に高いレベルの他のC β スプライス変異体を観測したため、当該RNAは免疫組織及び脳から単離した。ノーザンブロットはC β cDNAプローブ（すべての公知のC β スプライス変異体を認識すると期待される）及びC β 2特異的プローブ（材料及び方法を参照されたい）を用いてプローブした。図5B（上段パネル）において、我々はC β が野生型及びC β エキソン1KO（レーン1及び2）の脳、並びに、ヒトの末梢血液白血球（レーン5）中に存在することを実証した。マウス脾臓はC β mRNAを含有しなかった（レーン3及び4）。同一のフィルターをC β 2特異的プローブでプローブした時（図5、下段パネル）、C β 2メッセージはヒト末梢血液白血球（レーン5）においてのみ検出され、一方、すべてのマウスの組織はC β 2 mRNA（レーン1から4）について陰性だった。

【0042】

引用文献

- [1] Butcher, R.W., Ho, R.J., Meng, H.C., & Sutherland, E.W. (1965) 生物材料中のアデノシン 3', 5'-一リン酸. II. 組織中のアデノシン 3', 5'-一リン酸の測定及び脂肪のエピネフリンへの脂肪分解応答における環状ヌクレオチドの役割. *J. Biol. Chem.*, 240, 4515-4523.
- [2] Doskeland, S.O., Maronde, E., & Gjertsen, B.T. (1993) cAMP-依存性プロテインキナーゼの遺伝的サブタイプ--機能的に異なるか重複するか? *Biochim. Biophys. Acta*, 1178, 249-258.
- [3] Skalhogg, B.S. & Tasken, K. (1997) PKAサブユニットのcAMP/PKAシグナル伝達経路における特異性、差別的発現、調節. *Front Biosci.*, 2, d331-d342.
- [4] Reinton, N., Haugen, T.B., Orstavik, S., Skalhogg, B.S., Hansson, V., Jahnson, T., & Tasken, K. (1998) cAMP-依存性のプロテインキナーゼのCガンマ触媒サ

ブユニットをコードする遺伝子は転写されたレトロポゾンである. *Genomics*, 49, 290-297.

[5] Beebe, S. J., Oyen, O., Sandberg, M., Froya, A., Hansson, V., & Jahnsen, T. (1990) ヒト精巣からの組織特異的プロテインキナーゼの分子クローニング--cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットについての第三のアイソフォームを表す. *Mol. Endocrinol.*, 4, 465-475.

[6] Zimmermann, B., Chiorini, J. A., Ma, Y., Kotin, R. M., & Herberg, F. W. (1999) PrKXは、調節サブユニットI型により調節されるcAMP-依存性プロテインキナーゼの新規な触媒サブユニットである. *J. Biol. Chem.*, 274, 5370-5378.

[7] Showers, M. O. & Maurer, R. A. (1988) cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットについてのcDNAのクローニング. *Methods Enzymol.*, 159, 311-318.

【0043】

[8] Thomis, D. C., Floyd-Smith, G., & Samuel, C. E. (1992) インターフェロン作用のメカニズム. インターフェロン処置したヒト細胞由来のヒトプロテインキナーゼの触媒サブユニットの新規なスプライス部位変異体のcDNAの構造及び調節. *J. Biol. Chem.*, 267, 10723-10728.

[9] San Agustin, J. T., Leszyk, J. D., Nuwaysir, L. M., & Witman, G. B. (1998) ヒツジの精子鞭毛のcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットは、独特のアミノ末端配列を有する. *J. Biol. Chem.*, 273, 24874-24883.

[10] Desseyn, J. L., Burton, K. A., & McKnight, G. S. (2000) オス生殖細胞の発達のためのプロテインキナーゼAの触媒サブユニットの非ミリスチル化変異体の発現. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 6433-6438.

[11] Reinton, N., Orstavik, S., Haugen, T. B., Jahnsen, T., Tasken, K., & Skallehgg, B. S. (2000) ヒト環状3', 5'-アデノシンーリン酸依存性プロテインキナーゼの新規のアイソフォーム、カルファ-s、は精子の中央部分に集中する. *Biol. Reprod.*, 63, 607-611.

[12] Uhler, M. D., Chrivia, J. C., & McKnight, G. S. (1986) cAMP-依存プロテインキナーゼの触媒サブユニットの第二のアイソフォームの証拠[J Biol Chem 1

987 Apr 15;262(11):5431に誤植が出版されている]. *J. Biol. Chem.*, 261, 15360-15363.

[13] Wiemann, S., Kinzel, V., & Pyerin, W. (1991) アイスフォームCベータ2、ウシcAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの異常な形態。 *J. Biol. Chem.*, 266, 5140-5146.

[14] Guthrie, C.R., Skalhegg, B.S., & McKnight, G.S. (1997) げっ歯類cAMP-依存性プロテインキナーゼのCベータ遺伝子の2つの新規な脳-特異的スプライス変異体。 *J. Biol. Chem.*, 272, 29560-29565.

[15] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997) ギャップBLAST 及び PSI-BLAST: 新規なタンパク質データベース検索プログラムの発生。 *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

【0044】

[16] Qi, M., Zhuo, M., Skalhegg, B.S., Brandon, E.P., Kandel, E.R., McKnight, G.S., & Idzerda, R.L. (1996) cAMP-依存性プロテインキナーゼのCベータ1触媒サブユニットを欠くマウスにおける損なわれた海馬柔軟性。 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 1571-1576.

[17] Herberg, F.W., Zimmermann, B., McGlone, M., & Taylor, S.S. (1997) 安定性及び裂け目境界におけるサブドメインの方向のためのcAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのA-ヘリックスの重要性。 *Protein Sci.*, 6, 569-579.

[18] Yonemoto, W., McGlone, M.L., & Taylor, S.S. (1993) cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのN-ミリスチル化は、構造上の安定性を伝える。 *J. Biol. Chem.*, 268, 2348-2352.

[19] Clegg, C.H., Ran, W., Uhler, M.D., & McKnight, G.S. (1989) プロテインキナーゼAの触媒サブユニットにおける突然変異はミリスチル化を防ぐが、生物活性を阻害しない。 *J. Biol. Chem.*, 264, 20140-20146.

[20] Carr, S.A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D.C., & Titani, K. (1982) n-テトラデカノイルは、ウシ心筋由来の環状AMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのNH2末端ブロック基である。

[21] Jedrzejewski, P.T., Girod, A., Tholey, A., Konig, N., Thullner, S., Kinz

el, V., & Bossemeyer, D. (1998) キャピラリーLC-MS及びタンデム質量分析により検出された、哺乳類cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットにおけるAsn2の保存されたジアミル化部位. *Protein Sci.*, 7, 457-469.

[22] Zheng, J., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Sowadski, J. M., & Ten Eyck, L. F. (1993) cAMP-依存性プロテインキナーゼのミリスチル化触媒サブユニットの結晶構造は、開いた配座及び閉じた配座を示す. *Protein Sci.*, 2, 1559-1573.

[23] Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., & Taylor, S. S. (1997) 大腸菌におけるcAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの自己リン酸化. *Protein Eng.*, 10, 915-925.

【0045】

[24] San Agustin, J. T. & Witman, G. B. (1994) 脱膜化された(demembranated)ラムの精子の再活性化におけるcAMPの役割. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 27, 206-218.

[25] Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X., Taylor, S. S., & Johnson, D. A. (1999) アイソフォーム特異的分子間スイッチによるA-キナーゼN-ミリスチートの起動. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 12394-12399.

[26] Uhler, M. D., Carmichael, D. F., Lee, D. C., Chrivia, J. C., Krebs, E. G., & McKnight, G. S. (1986) マウスcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットをコードするcDNAクローンの単離. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 1300-1304.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og Bjørn S. Skålhegg

<120> Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of cAMP-dependent protein kinase and the use thereof

<160>9

<210>1

<211>

<212>genomic DNA

<213>Homo sapiens

<400>

Genomic sequence of exons and exon intron boundaries located upstream of exon 2 in the human C β gene.

Exon 1-1:

ccagcccccc ttcccttccc tgaccccttc ttgccatcgc cccagacATG
GGGAACGCGG CGACCGCCAA GAAAGGCAGC GAGGTGGAGA GCGgtgagtt gaaggccg

Exon 1-2:

agctttatat ttaatgctct cattagccta tatattaata ttaaaacacc
caaacataaa gccttttagg cagatattgc aagtttttaa aatcctcaac
tctagctgaa aagtgttttg ctaagaaaag ctcagtaatg tgctgtttta
tattaacagg aaacagaaca gcagtagtgg tttgaatacc ctgcaaacag
gaagtgtgac acatgcatag ctcttagctt ctgtgtaaga agttgtgagc
tccttctgga aacatttgca gttacattaa gtaaagtgtg aatgcacatg
aATGGCAGCT TATAGAGAAC CACCTTGTA CAGTATACA GGTACAAC TA
CAGCTCTTCA GAAATTGGAA GGTTTTGCTA GCCGGTTATT TCATAGACAC
TCTAAAGGTA CTGCACATGA TCAGAAAACA GCTCTGGAAA ATGACAGCCT
TCATTTCTCT GAACATACTG CCTTATGGGA CAGATCAAg t aagttttg

Exon 1-3 and 1-4:

tgtttttagg cagagttcag tggttcgtca caaataaatg tttcttaatt
tggtgtttat gactgctcga tttccagagc catgaaatca ttgtttttga
taattctgtt cagcttcata gttgtttctt aggaagattt cctgacttac
ttccacatca ccaaaagtcc tgcctcacat ggcaactgtt aaaatggcaa
gttcacgtgc tgaagtctta cttacaagg aaccattcta tagattcttt
gtaccatttt ggtacaaatt ttggatctct ggtaatcaaa acaatctgtt
caccatgcta ccagtcagc ccaccttgct atacaatctg tcatcttagt
cctgtttcat gtgaggaatt ttacatttct gcaataattg ccagtaactt
ttttgtgtat tttttctttt tgaataccac atggatggca tctgacactg
tttgaatgc tgaatttaat ggaagtttac aaataagtta ttctatgatt
ctcctttaa aatgcagata tacatatatg tatataatat tattctcttc
cataacacag aatgttttaa tggttaacat ttgtgctgca gtatagcttt
ctggctcatg aaaaatgaaa gctatcagcg atctcggcaa taagattcat
cgccaatagt cactagcaac agcacacagc attttaatat cagttaggtc
cacagctagc agtaagagct ggtgtaattg aaagacgttt aggtgcaatc

```

attctgctgt ttgctccttg ccagggttcaa cATGGGATTG Tgtgagtatt
tgaagaaaac agcaattttt tcatatcttt gaaagatgta aaaagcgtag
attagtgcctt aaattttaaga aatctggtaa tttataatca tgtggctcta
aaataaaaaag gtatttttatt tgtctgggtg attaaagcct tagaaaagct
acgccttgga tacaagtga cgcataatc tgggtctaatt ttgccgtggg
aacaactcat gctgatataa ttgagaacat cttatacatc ctgggttcgaa
cattttctcc ctgccatttt gagttgttct agtgggtatat gaaggaggct
gggataacta gcttgaaaaga aattcagtc agttatagac atctttggca
ttaatctgat gtttactagt gatattctcat gctaggcagt tatgctttgc
ttctaggggc ttctcttttt aaaacaaaag aaagctcttt tcgttttctg
tgtgctgcat gctccagtg gtgtgtttac accatcggtt cttctccctc
tagagattag cataactccc tttgctgttg gattgttatt ttgagcaata
tgttttggaa aggttggttt tcatcATGAG TGgtaagtat gc

```

Exon a

cttgatcaag **CACGCAAATC ATCAGATGCA TCTG**gtagga aaac

Exon b

tggacacaag **CTTGCTCCTC TTCAGAAATA TCTG**gtaggc aagt

Exon c

gaacatgtag **ATTCCTTTG**g tatgctcat

Exon 2

atattttcag **TGAAAGAGTT**...

SEQ ID NO:2

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og Bjørn S. Skålhegg

<120> Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of cAMP-dependent protein kinase and the use thereof

<160>9

<210>2

<211>3089 nt

<212>cDNA

<213>Homo sapiens

<400> C β 2

1 CCTTCTGGAA ACATTTGCAG TTACATTAAG TAAAGTGTAATG CACATGA

51 **ATGGCAGCTT** ATAGAGAACC ACCTTGTAAC CAGTATACAG GTACAACCTAC

101 AGCTCTTCAG AAATTGGAAG GTTTTGCTAG CCGGTTATTT CATAGACACT

151 CTAAAGGTAC TGCACATGAT CAGAAAACAG CTCTGGAAAA TGACAGCCTT

201 CATTCTCTG AACATACTGC CTTATGGGAC AGATCAATGA AAGAGTTTCT

251 AGCCAAAGCC AAAGAAGACT TTTTGAAAAA ATGGGAGAAT CCAACTCAGA

301 ATAATGCCGG ACTTGAAGAT TTTGAAAGGA AAAAAACCCT TGGAACAGGT
 351 TCATTTGGAA GAGTCATGTT GGTAAACAC AAAGCCACTG AACAGTATTA
 401 TGCCATGAAG ATCTTAGATA AGCAGAAGGT TGTAAACTG AAGCAAATAG
 451 AGCATACTTT GAATGAGAAA AGAATATTAC AGGCAGTGAA TTTTCCTTTC
 501 CTTGTTTCGAC TGGAGTATGC TTTTAAGGAT AATTCTAATT TATACATGGT
 551 TATGGAATAT GTCCCTGGGG GTGAAATGTT TTCACATCTA AGAAGAATTG
 601 GAAGGTTTCAG TGAGCCCCAT GCACGGTTCT ATGCAGCTCA GATAGTGCTA
 651 ACATTTCGAGT ACCTCCATTC ACTAGACCTC ATCTACAGAG ATCTAAAACC
 701 TGAAAATCTC TTAATTGACC ATCAAGGCTA TATCCAGGTC ACAGACTTTG
 751 GGTTCGCCAA AAGAGTTAAA GGCAGAACTT GGACATTATG TGGAACTCCA
 801 GAGTATTTGG CTCCAGAAAT AATTCTCAGC AAGGGCTACA ATAAGGCAGT
 851 GGATTGGTGG GCATTAGGAG TGCTAATCTA TGAAATGGCA GCTGGCTATC
 901 CCCCATTCCTT TGCAGACCAA CCAATTCAGA TTTATGAAAA GATTGTTTCT
 951 GGAAAGGTCC GATTCCCATC CCACTTCAGT TCAGATCTCA AGGACCTTCT
 1001 ACGGAACCTG CTGCAGGTGG ATTTGACCAA GAGATTTGGA AATCTAAAGA
 1051 ATGGTGTCAG TGATATAAAA ACTCACAAGT GGTTCGCCAC GACAGATTGG
 1101 ATTGCTATTT ACCAGAGGAA GGTGGAAGCT CCATTCATAC CAAAGTTTAG
 1151 AGGCTCTGGA GATACCAGCA ACTTTGATGA CTATGAAGAA GAAGATATCC
 1201 GTGTCTCTAT AACAGAAAAA TGTGCAAAAG AATTTGGTGA ATTTTAAAGA
 1251 GGAACAAGAT GACATCTGAG CTCACACTCA GTGTTTGAC TCTGTTGAGA
 1301 GATAAGGTAG AGCTGAGACC GTCCTTGTTG AAGCAGTTAC CTAGTTCCTT
 1351 CATTCCAACG ACTGAGTGAG GTCTTTATTG CCATCATCCG TGTGCGCACT
 1401 CTGCATCCAC CTATGTAACA AGGCACCGCT AAGCAAGCAT TGTCTGTGCC
 1451 ATAACACAGT ACTAGACCAC TTTCTTACTT CTCTTTGGGT TGTCTTTCTC
 1501 CTCTCCTACA TCCATTTCTT CCTTTTCAAT TTCATTGGTT TTCTCTAAAC
 1551 AGTGCTCCAT TTTATTTTGT TGGTGTTC AATGGGCAGT GTTATGGCTA
 1601 CGTGATATTT GAAGGGAAGG ATAAGTGTTG CTTTCAGTAG TTATTGCCAA
 1651 TATTGTTGTT GGTCAATGGC TTGAAGATAA ACTTTCTAAT AATTATTATT
 1701 TCTTTGAGTA GCTCAGACTT GGTTTTGCCA AACTCTTGG TAATTTTGA
 1751 AGATAGACTG TCTTATCACC AAGGAAATTT ATACAAATTA AGACTAAGTT
 1801 TCTTGGAATT CACTATTCTG GCAATAAATT TTGGTAGACT AATACAGTAC
 1851 AGCTAGACCC AGAAATTTGG AAGGCTGTAG ATCAGAGGTT CTAGTTCCTT

```

1901 TTCCCTCCTT TTATATCCTC CTCTCCTTGA GTAATGAAGT GACCAGCCTG
1951 TGTAGTGTGA CAAACGTGTC TCATTGAGCA GGAAAACTA ATGATATGGA
2001 TCATCACCCA GATTCTCTCA CTTGGTACCA GCATTTCTGT AGGTATTAGA
2051 GAAGAGTTCT AAGTTTCTTA AACCTTAAC GTTCCTTAAG GATTTTAGCC
2101 AGTATTTTAA TAGAACATGA TTAATGAAAG TGACAAATTT TAAATTTTCT
2151 CTAATAGTCC TCATCATAAA CTTTTTAAAG GAAAATAAGC AAATAAAAA
2201 GAACATTGGT TTAGATAAAT ACTTATACTT TGCAAAGTCA AAAATGGCTT
2251 GATTTTTTGA ACAATATAG AGGTATTCAT ATTTAAATGA GGGTTTACAT
2301 TTGTTTTGTT TTGTAACCGT TAAAAAGAAG TTGTTTCCAG CTAATTATTG
2351 TGGTGTACTA TATTTGTGAG CCTAGGGTAG GGGCACTGCT GCAACTTCTG
2401 CTTTCATCCC ATGCCTCATC AATGAGGAAA GGAACAAAG TGTATAAAAC
2451 CTGCCACAAT TGTATTTTAA TTTTGAGGTA TGATATTTTC AGATATTTCA
2501 TAATTTCTAA CCTCTGTTCT CTCAGTAAAC AGAATGTCTG ATCGATCATG
2551 CAGATACAAT GTTGGTATTT GAGAGGTTAG TTTTTTTCCT AACTTTTTTT
2601 TTGCCAACTG ACTTAACAAC ATTGCTGTCA GGTGGAAATT TCAAGCACTT
2651 TTGCACATTT AGTTCAGTGT TTGTTGAGAA TCCATGGCTT AACCCACTTG
2701 TTTTGCTATT TTTTCTTTG CTTTAAATTT TCCCCATCTG ATTTTATCTC
2751 TGCCTTTCAG TGACCTACCT TAAACAACA CACGAGAAGA GTTAAACTGG
2801 GTTCATTTTA ATGATCAATT TACCTGCATA TAAATTTAT TTTAATCAA
2851 GCTGATCTTA ATGTATATAA TCATTCTATT TGCTTTATTA TCGGTGCAGG
2901 TAGGTCATTA ACACCACTTC TTTTCATCTG TACCACACCC TGGTGAAACC
2951 TTTGAAGACA TAAAAAAAAC CTGTCTGAGA TGTTCTTTCT ACCAATCTAT
3001 ATGTCTTTCG GTTATCAAGT GTTCTGTCAT GGTAATGTCA TGTAAATGCT
3051 GATATTGATT TCACTGGTCC ATCTATATTT AAAACGTGC

```

SEQ ID NO:3

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og Bjørn S. Skålhegg

<120> Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of cAMP-dependent protein kinase and the use thereof

<160>9
 <210>3
 <211>2944 nt
 <212>cDNA
 <213>Homo sapiens

<400> Cβ3

1 TCACAGCTAG CAGTAAGAGC TGGTGTAATT GAAAGACGTT TAGGTGCAAT

51 CATTCTGCTG TTTGCTCCTT GCCAGGTTCA ACATGGGATT GTTGAAAGAG

101 TTTCTAGCCA AAGCCAAAGA AGACTTTTGT AAAAAATGGG AGAATCCAAC

151 TCAGAATAAT GCCGGACTTG AAGATTTTGA AAGGAAAAAA ACCCTTGGAA

201 CAGGTTCAAT TGAAGAGTC ATGTTGGTAA AACACAAAGC CACTGAACAG

251 TATTATGCCA TGAAGATCTT AGATAAGCAG AAGGTTGTTA AACTGAAGCA

301 AATAGAGCAT ACTTTGAATG AGAAAAGAAT ATTACAGGCA GTGAATTTTC

351 CTTTCCTTGT TCGACTGGAG TATGCTTTTA AGGATAATTC TAATTTATAC

401 ATGGTTATGG AATATGTCCC TGGGGGTGAA ATGTTTTCAC ATCTAAGAAG

451 AATTGGAAGG TTCAGTGAGC CCCATGCACG GTTCTATGCA GCTCAGATAG

501 TGCTAACATT CGAGTACCTC CATTCACTAG ACCTCATCTA CAGAGATCTA

551 AAACCTGAAA ATCTCTTAAT TGACCATCAA GGCTATATCC AGGTCACAGA

601 CTTTGGGTTT GCCAAAAGAG TTAAAGGCAG AACTTGGACA TTATGTGGAA

651 CTCCAGAGTA TTTGGCTCCA GAAATAATTC TCAGCAAGGG CTACAATAAG

701 GCAGTGGATT GGTGGGCATT AGGAGTGCTA ATCTATGAAA TGGCAGCTGG

751 CTATCCCCCA TTCTTTGCAG ACCAACCAAT TCAGATTTAT GAAAAGATTG

801 TTTCTGGAAA GGTCCGATTC CCATCCCCTC TCAGTTCAGA TCTCAAGGAC

851 CTTCTACGGA ACCTGCTGCA GGTGGATTTG ACCAAGAGAT TTGGAAATCT

901 AAAGAATGGT GTCAGTGATA TAAAACTCA CAAGTGGTTT GCCACGACAG

951 ATTGGATTGC TATTTACCAG AGGAAGGTTG AAGCTCCATT CATAACCAAG

1001 TTTAGAGGCT CTGGAGATAC CAGCAACTTT GATGACTATG AAGAAGAAGA

1051 TATCCGTGTC TCTATAACAG AAAAATGTGC AAAAGAATTT GGTGAATTTT

1101 AAAGAGGAAC AAGATGACAT CTGAGCTCAC ACTCAGTGTT TGCACCTCTG

1151 TGAGAGATAA GGTAGAGCTG AGACCGTCCT TGTTGAAGCA GTTACCTAGT

1201 TCCTTCATTC CAACGACTGA GTGAGGTCTT TATTGCCATC ATCCGTGTGC

1251 GCACTCTGCA TCCACCTATG TAACAAGGCA CCGCTAAGCA AGCATTGTCT

1301 GTGCCATAAC ACAGTACTAG ACCACTTTCT TACTTCTCTT TGGGTTGTCT

1351 TTCTCCTCTC CTACATCCAT TTCTTCCTTT TCAATTCAT TGGTTTTCTC

1401 TAAACAGTGC TCCATTTTAT TTTGTTGGTG TTTCAGATGG GCAGTGTTAT
 1451 GGCTACGTGA TATTTGAAGG GAAGGATAAG TGTGCTTTC AGTAGTTATT
 1501 GCCAATATTG TTGTTGGTCA ATGGCTTGAA GATAAACTTT CTAATAATTA
 1551 TTATTTCTTT GAGTAGCTCA GACTTGTTT TGCCAAAAC CTTGGTAATT
 1601 TTTGAAGATA GACTGTCTTA TCACCAAGGA AATTTATACA AATTAAGACT
 1651 AACTTTCTTG GAATTCAC TAATCTGGCAAT AAATTTTGGT AGACTAATAC
 1701 AGTACAGCTA GACCCAGAAA TTTGGAAGGC TGTAGATCAG AGGTTCTAGT
 1751 TCCCTTTCCC TCCTTTTATA TCCTCCTCTC CTTGAGTAAT GAAGTGACCA
 1801 GCCTGTGTAG TGTGACAAAC GTGTCTCATT CAGCAGGAAA AACTAATGAT
 1851 ATGGATCATC ACCCAGATTC TCTCACTTGG TACCAGCATT TCTGTAGGTA
 1901 TTAGAGAAGA GTTCTAAGTT TTCTAAACCT TAACTGTTCC TTAAGGATTT
 1951 TAGCCAGTAT TTAAATAGAA CATGATTAAT GAAAGTGACA AATTTTAAAT
 2001 TTTCTCTAAT AGTCCTCATC ATAAACTTTT TAAAGGAAAA TAAGCAAAC
 2051 AAAAGAACA TTGGTTTAGA TAAATACTTA TACTTTGCAA AGTCAAAAAT
 2101 GGCTTGATTT TTGGAACAA TATAGAGGTA TTCATATTTA AATGAGGGTT
 2151 TACATTTGTT TTGTTTGTG ACCGTTAAAA AGAAGTTGTT TCCAGCTAAT
 2201 TATTGTGGTG TACTATATTT GTGAGCCTAG GGTAGGGGCA CTGCTGCAAC
 2251 TTCTGCTTTC ATCCCATGCC TCATCAATGA GGAAGGGGAA CAAAGTGAT
 2301 AAAACCTGCC ACAATTGTAT TTTAATTTTG AGGTATGATA TTTTCAGATA
 2351 TTTCATAATT TCTAACCTCT GTTCTCTCAG TAAACAGAAT GTCTGATCGA
 2401 TCATGCAGAT ACAATGTTGG TATTTGAGAG GTTAGTTTTT TTCCTACACT
 2451 TTTTTTTGCC AACTGACTTA ACAACATTGC TGTGAGGTGG AAATTTCAAG
 2501 CACTTTTGCA CATTTAGTTC AGTGTGTTGTT GAGAATCCAT GGCTTAACCC
 2551 ACTTGTTTTG CTATTTTTTT CTTTGCTTTT AATTTTCCCC ATCTGATTTT
 2601 ATCTCTGCGT TTCAGTGACC TACCTTAAAA CAACACACGA GAAGAGTTAA
 2651 ACTGGGTTCA TTTTAATGAT CAATTTACCT GCATATAAAA TTTATTTTTA
 2701 ATCAAGCTGA TCTTAATGTA TATAATCATT CTATTTGCTT TATTATCGGT
 2751 GCAGGTAGGT CATTAAACACC ACTTCTTTTC ATCTGTACCA CACCCTGGTG
 2801 AAACCTTTGA AGACATAAAA AAAACCTGTC TGAGATGTTT TTTCTACCAA
 2851 TCTATATGTC TTTCGGTTAT CAAGTGTTTC TGCAATGGTAA TGTCATGTAA
 2901 ATGCTGATAT TGATTTCACT GGTCCATCTA TATTTAAAAC GTGC

SEQ ID NO:4

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og
Bjørn S. Skålhegg

<120> **Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of
cAMP-dependent protein kinase and the use thereof**

<160>9

<210>4

<211>2973

<212>cDNA

<213>Homo sapiens

<400> **C β 4**

```
1  CTCCAGTGTG TGTGTTTACA CCATCGGTTT TTCTCCCTCT AGAGATTAGC
51  ATAACTCCCT TTGCTGTTGG ATTGTTATTT TGAGCAATAT GTTTTGAAAA
101 GGTGGGTTTT CATCATGAGT GTGAAAGAGT TTCTAGCCAA AGCCAAAGAA
151 GACTTTTTGA AAAAATGGGA GAATCCAAC TACAATAATG CCGGACTTGA
201 AGATTTTGAA AGGAAAAAAA CCCTTGGAAC AGGTTCAATTT GGAAGAGTCA
251 TGTGGTAAA ACACAAAGCC ACTGAACAGT ATTATGCCAT GAAGATCTTA
301 GATAAGCAGA AGGTTGTAA ACTGAAGCAA ATAGAGCATA CTTTGAATGA
351 GAAAAGAATA TTACAGGCAG TGAATTTTCC TTTCCTGTT CGACTGGAGT
401 ATGCTTTTAA GGATAATTCT AATTTATACA TGGTTATGGA ATATGTCCCT
451 GGGGGTGAAA TGTTTTCACA TCTAAGAAGA ATTGGAAGGT TCAGTGAGCC
501 CCATGCACGG TTCTATGCAG CTCAGATAGT GCTAACATTC GAGTACCTCC
551 ATTACTAGA CCTCATCTAC AGAGATCTAA AACCTGAAAA TCTCTTAATT
601 GACCATCAAG GCTATATCCA GGTCACAGAC TTTGGGTTTG CCAAAAGAGT
651 TAAAGGCAGA ACTTGACAT TATGTGGAAC TCCAGAGTAT TTGGCTCCAG
701 AAATAATTCT CAGCAAGGGC TACAATAAGG CAGTGGATTG GTGGGCATTA
751 GGAGTGCTAA TCTATGAAAT GGCAGCTGGC TATCCCCCAT TCTTTGCAGA
801 CCAACCAATT CAGATTTATG AAAAGATTGT TTCTGGAAAAG GTCCGATTCC
851 CATCCCCTT CAGTTCAGAT CTCAAGGACC TTCTACGGAA CCTGCTGCAG
```


901 GTGGATTTGA CCAAGAGATT TGGAAATCTA AAGAATGGTG TCAGTGATAT
951 AAAAAGTCTAC AAGTGGTTTG CCACGACAGA TTGGATTGCT ATTTACCAGA
1001 GGAAGGTTGA AGCTCCATTC ATACCAAAGT TTAGAGGCTC TGGAGATACC
1051 AGCAACTTTG ATGACTATGA AGAAGAAGAT ATCCGTGTCT CTATAACAGA
1101 AAAATGTGCA AAAGAATTG GTGAATTTTA AAGAGGAACA AGATGACATC
1151 TGAGCTCACA CTCAGTGTTT GCACTCTGTT GAGAGATAAG GTAGAGCTGA
1201 GACCGTCCTT GTTGAAGCAG TTACCTAGTT CCTTCATTCC AACGACTGAG
1251 TGAGGCTTTT ATTGCCATCA TCCGTGTGCG CACTCTGCAT CCACCTATGT
1301 AACAAAGGCAC CGCTAAGCAA GCATTGTCTG TGCCATAACA CAGTACTAGA
1351 CCACTTTCTT ACTTCTCTT GGGTTGTCTT TCTCCTCTCC TACATCCATT
1401 TCTTCCTTTT CAATTCATT GGTTCCTCT AAACAGTGCT CCATTTTATT
1451 TTGTTGGTGT TTCAGATGGG CAGTGTTATG GCTACGTGAT ATTTGAAGGG
1501 AAGGATAAGT GTTGCTTTCA GTAGTTATTG CCAATATTGT TGTTGGTCAA
1551 TGGCTTGAAG ATAACTTTC TAATAATTAT TATTTCTTTG AGTAGCTCAG
1601 ACTTGGTTTT GCCAAACTC TTGGTAATTT TTGAAGATAG ACTGTCTTAT
1651 CACCAAGGAA ATTTATACAA ATTAAGACTA ACTTCTTTGG AATTCATAT
1701 TCTGGCAATA AATTTTGGTA GACTAATACA GTACAGCTAG ACCCAGAAAT
1751 TTGGAAGGCT GTAGATCAGA GGTTCAGTT CCCTTCCCT CCTTTTATAT
1801 CCTCCTCTCC TTGAGTAATG AAGTGACCAG CCTGTGTAGT GTGACAAACG
1851 TGTCTCATTC AGCAGGAAAA ACTAATGATA TGGATCATCA CCCAGATTCT
1901 CTCCTTGGT ACCAGCATTT CTGTAGGTAT TAGAGAAGAG TTCTAAGTTT
1951 TCTAAACCTT AACTGTTCTT TAAGGATTTT AGCCAGTATT TTAATAGAAC
2001 ATGATTAATG AAAGTGACAA ATTTTAAATT TTCTCTAATA GTCCTCATCA
2051 TAAACTTTTT AAAGGAAAAA AAGCAAATA AAAAGAACAT TGGTTTAGAT
2101 AAATACTTAT ACTTTGCAAA GTCAAAAATG GCTTGATTTT TGGAAACAAT
2151 ATAGAGGTAT TCATATTTAA ATGAGGGTTT ACATTTGTTT TGTTTTGTAA
2201 CCGTTAAAAA GAAGTTGTTT CCAGCTAATT ATTGTGGTGT ACTATATTTG
2251 TGAGCCTAGG GTAGGGGCAC TGCTGCAACT TCTGCTTTCA TCCCATGCCT
2301 CATCAATGAG GAAAGGGAAC AAAGTGTATA AAACCTGCCA CAATTGTATT

2351 TTAATTTTGA GGTATGATAT TTTCAGATAT TTCATAATTT CTAACCTCTG
2401 TTCTCTCAGT AAACAGAATG TCTGATCGAT CATGCAGATA CAATGTTGGT
2451 ATTTGAGAGG TTAGTTTTTT TCCTACACTT TTTTTTGCCA ACTGACTTAA
2501 CAACATTGCT GTCAGGTGGA AATTTCAAGC ACTTTTGCAC ATTTAGTTCA
2551 GTGTTTGTG AGAATCCATG GCTTAACCCA CTTGTTTTGC TATTTTTTTC
2601 TTTGCTTTTA ATTTTCCCCA TCTGATTTTA TCTCTGCGTT TCAGTGACCT
2651 ACCTTAAAC AACACACGAG AAGAGTTAAA CTGGGTTCAT TTTAATGATC
2701 AATTTACCTG CATATAAAAT TTATTTTTAA TCAAGCTGAT CTTAATGTAT
2751 ATAATCATTC TATTTGCTTT ATTATCGGTG CAGGTAGGTC ATTAACACCA
2801 CTTCTTTTCA TCTGTACCAC ACCCTGGTGA AACCTTTGAA GACATAAAAA
2851 AAACCTGTCT GAGATGTTCT TTCTACCAAT CTATATGTCT TTCGGTTATC
2901 AAGTGTCTCT GCATGGTAAT GTCATGTAAA TGCTGATATT GATTTCACTG
2951 GTCCATCTAT ATTTAAACG TGC

SEQ ID NO:5

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og
Bjørn S. Skålhegg

<120> **Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of
cAMP-dependent protein kinase and the use thereof**

<160>9

<210>5

<211>3017

<212>cDNA

<213>Homo sapiens

<400> C β 4ab

1 AGTGTGTGTG TTTACACCAT CGGTTCTTCT CCCTCTAGAG ATTAGCATAA
51 CTCCCTTTGC TGTTGGATTG TTATTTTGAG CAATATGTTT TGGaAAGGTT
101 GGTTTTCATC **ATG**AGTGCAC GCAAATCATC AGATGCATCT GCCTGCTCCT
151 CTTCAGAAAT ATCTGTGAAA GAGTTTCTAG CCAAAGCCAA AGAAGACTTT
201 TTGAAAAAAT GGGAGAATCC AACTCAGAAT AATGCCGGAC TTGAAGATTT

251 TGAAAGGAAA AAAACCCTTG GAACAGGTTC ATTTGGAAGA GTCATGTTGG
 301 TAAACACAA AGCCACTGAA CAGTATTATG CCATGAAGAT CTTAGATAAG
 351 CAGAAGGTTG TTAAACTGAA GCAAATAGAG CATACTTTGA ATGAGAAAAG
 401 AATATTACAG GCAGTGAATT TTCCTTTCCT TGTTCGACTG GAGTATGCTT
 451 TTAAGGATAA TTCTAATTTA TACATGGTTA TGGAAATATGT CCCTGGGGGT
 501 GAAATGTTTT CACATCTAAG AAGAATTGGA AGGTTCAAGT AGCCCCATGC
 551 ACGGTTCTAT GCAGCTCAGA TAGTGCTAAC ATTGAGTAC CTCCATTCAC
 601 TAGACCTCAT CTACAGAGAT CTAAACCTG AAAATCTCTT AATTGACCAT
 651 CAAGGCTATA TCCAGGTCAC AGACTTTGGG TTTGCCAAAA GAGTTAAAGG
 701 CAGAACTTGG ACATTATGTG GAACTCCAGA GTATTTGGCT CCAGAAATAA
 751 TTCTCAGCAA GGGCTACAAT AAGGCAGTGG ATTTGGTGGG ATTAGGAGTG
 801 CTAATCTATG AAATGGCAGC TGGCTATCCC CCATTCTTTG CAGACCAACC
 851 AATTCAGATT TATGAAAAGA TTGTTTCTGG AAAGGTCCGA TTCCCATCCC
 901 ACTTCAGTTC AGATCTCAAG GACCTTCTAC GGAACCTGCT GCAGSTGGAT
 951 TTGACCAAGA GATTTGGAAA TCTAAAGAAT GGTGTCAGTG ATATAAAAAC
 1001 TCACAAGTGG TTTGCCACGA CAGATTGGAT TGCTATTTAC CAGAGGAAGG
 1051 TTGAAGCTCC ATTCATACCA AAGTTTAGAG GCTCTGGAGA TACCAGCAAC
 1101 TTTGATGACT ATGAAGAAGA AGATATCCGT GTCTCTATAA CAGAAAAATG
 1151 TGCAAAAGAA TTTGGTGAAT **TTTAA**AGAGG AACAAGATGA CATCTGAGCT
 1201 CACACTCAGT GTTTGCACTC TGTGAGAGA TAAGGTAGAG CTGAGACCGT
 1251 CCTTGTGAA GCAGTTACCT AGTTCCTTCA TTCCAACGAC TGAGTGAGGT
 1301 CTTTATTGCC ATCATCCGTG TGCGCACTCT GCATCCACCT ATGTAACAAG
 1351 GCACCGCTAA GCAAGCATTG TCTGTGCCAT AACACAGTAC TAGACCACCT
 1401 TCTTACTTCT CTTTGGGTTG TCTTCTCCT CTCTACATC CATTTCTTCC
 1451 TTTTCAATTT CATTGGTTTT CTCTAAACAG TGCTCCATTT TATTTTGTG
 1501 GTGTTTCAGA TGGGCAGTGT TATGGCTACG TGATATTTGA AGGGAAGGAT
 1551 AAGTGTGCT TTCAGTAGTT ATTGCCAATA TTGTTGTTGG TCAATGGCTT
 1601 GAAGATAAAC TTTCTAATAA TTATTATTTC TTTGAGTAGC TCAGACTTGG
 1651 TTTTGCCAAA ACTCTTGGA ATTTTTGAAG ATAGACTGTC TTATCACCAA
 1701 GGAAATTTAT ACAAATTAAG ACTAACTTTC TTGGAATTCA CTATTCTGGC
 1751 AATAAATTTT GGTAGACTAA TACAGTACAG CTAGACCCAG AAATTTGGAA
 1801 GGCTGTAGAT CAGAGGTTCT AGTTCCTTT CCCTCCTTTT ATATCCTCCT

1851 CTCCTTGAGT AATGAAGTGA CCAGCCTGTG TAGTGTGACA AACGTGTCTC
1901 ATTCAGCAGG AAAAATAAT GATATGGATC ATCACCAGAG TTCTCTCACT
1951 TGGTACCAGC ATTTCTGTAG GTATTAGAGA AGAGTTCTAA GTTTTCTAAA
2001 CCTTAACTGT TCCTTAAGGA TTTTAGCCAG TATTTTAATA GAACATGATT
2051 AATGAAAGTG ACAAATTTTA AATTTTCTCT AATAGTCCTC ATCATAAACT
2101 TTTTAAAGGA AAATAAGCAA ACTAAAAAGA ACATTGGTTT AGATAAATAC
2151 TTATACTTTG CAAAGTCAAA AATGGCTTGA TTTTGGGAAA CAATATAGAG
2201 GTATTCATAT TTAAATGAGG GTTTACATTT GTTTTGTTTT GTAACCGTTA
2251 AAAAGAAGTT GTTTCAGCT AATTATTGTG GTGTACTATA TTTGTGAGCC
2301 TAGGGTAGGG GCACTGCTGC AACTTCTGCT TTCATCCCAT GCCTCATCAA
2351 TGAGGAAAGG GAACAAAGTG TATAAACCT GCCACAATTG TATTTTAATT
2401 TTGAGGTATG ATATTTTCAG ATATTTTATA ATTTCTAACC TCTGTTCTCT
2451 CAGTAAACAG AATGTCTGAT CGATCATGCA GATACAATGT TGGTATTGTA
2501 GAGGTTAGTT TTTTTCCTAC ACTTTTTTTT GCCAACTGAC TTAACAACAT
2551 TGCTGTCAGG TGGAAATTTT AAGCACTTTT GCACATTTAG TTCAGTGTTT
2601 GTTGAGAATC CATGGCTTAA CCCACTTGTT TTGCTATTTT TTTCTTTGCT
2651 TTTAATTTTC CCCATCTGAT TTTATCTCTG CGTTTCAGTG ACCTACCTTA
2701 AAACAACACA CGAGAAGAGT TAACTGGGT TCATTTTAAT GATCAATTTA
2751 CCTGCATATA AAATTTATTT TTAATCAAGC TGATCTTAAT GTATATAATC
2801 ATTCTATTTG CTTTATTATC GGTGCAGGTA GGTCAATTAAC ACCACTTCTT
2851 TTCATCTGTA CCACACCCTG GTGAAACCTT TGAAGACATA AAAAAACCT
2901 GTCTGAGATG TTCTTTCTAC CAATCTATAT GTCTTTCGGT TATCAAGTGT
2951 TTCTGCATGG TAATGTCATG TAAATGCTGA TATTGATTTC ACTGGTCCAT
3001 CTATATTTAA AACGTGC

SEQ ID NO:6

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og Bjørn S. Skålhegg

<120> Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of cAMP-dependent protein kinase and the use thereof

<160>9

<210>6

<211>3031

<212>cDNA

<213>Homo sapiens

<400> C β 4abc

```

1  GCTCCGAGTG TGTGTGTTTA CACCATCGGT TCTTCTCCCT CTAGAGTTAG
51  CATAACTCCC TTTGCTGTTG GATTGTTATT TTGAGCAATA TGTTTTGGaA
101 AGGTTGGTTT TCATCAATGAG TGCACGCAAA TCATCAGATG CATCTGCCTG
151 CTCCTCTTCA GAAATATCTG ATTCCTTTGT GAAAGAGTTT CTAGCCAAAG
201 CCAAAGAAGA CTTTTTGAAA AAATGGGAGA ATCCAACCTCA GAATAATGCC
251 GGAATTGAAG ATTTTGAAAG GAAAAAACC CTTGGAACAG GTTCATTGG
301 AAGAGTCATG TTGGTAAAC ACAAGCCAC TGAACAGTAT TATGCCATGA
351 AGATCTTAGA TAAGCAGAAG GTTGTTAAAC TGAAGCAAAT AGAGCATACT
401 TTGAATGAGA AAAGAATATT ACAGGCAGTG AATTTTCCTT TCCTTGTTcG
451 ACTGGAGTAT GCTTTTAAGG ATAATTCTAA TTTATACATG GTTATGGAAT
501 ATGTCCCTGG GGGTGAAATG TTTTCACATC TAAGAAGAAT TGGAAGGTTc
551 AGTGAGCCCC ATGCACGGTT CTATGCAGCT CAGATAGTGC TAACATTCGA
601 GTACCTCCAT TCACTAGACC TCATCTACAG AGATCTAAAA CCTGAAAATC
651 TCTTAATTGA CCATCAAGGC TATATCCAGG TCACAGACTT TGGGTTTGCC
701 AAAAGAGTTA AAGGCAGAAC TTGGACATTA TGTGGAACCT CAGAGTATTT
751 GGCTCCAGAA ATAATTCTCA GCAAGGGCTA CAATAAGGCA GTGGATTGGT
801 GGGCATTAGG AGTGCTAATC TATGAAATGG CAGCTGGCTA TCCCCCATTC
851 TTTGCAGACC AACCAATTCA GATTTATGAA AAGATTGTTT CTGGAAAGGT
901 CCGATTCCCA TCCCACCTCA GTTCAGATCT CAAGGACCTT CTACGGAACC
951 TGCTGCAGGT GGATTTGACC AAGAGATTTG GAAATCTAAA GAATGGTGTC
1001 AGTGATATAA AAACTCACAA GTGGTTTGCC ACGACAGATT GGATTGCTAT
1051 TTACCAGAGG AAGGTTGAAG CTCCATTCAT ACCAAAGTTT AGAGGCTCTG

```

1101 GAGATACCAG CAACTTTGAT GACTATGAAG AAGAAGATAT CCGTGTCTCT
 1151 ATAACAGAAA AATGTGCAAA AGAATTTGGT GAATTTTAAA GAGGAACAAG
 1201 ATGACATCTG AGCTCACACT CAGTGTTTGC ACTCTGTTGA GAGATAAGGT
 1251 AGAGCTGAGA CCGTCCTTGT TGAAGCAGTT ACCTAGTTCC TTCATTCCAA
 1301 CGACTGAGTG AGGTCTTTAT TGCCATCATC CGTGTGCGCA CTCTGCATCC
 1351 ACCTATGTAA CAAGGCACCG CTAAGCAAGC ATTGTCTGTG CCATAACACA
 1401 GTACTAGACC ACTTTCTTAC TTCTCTTTGG GTTGTCTTTC TCCTCTCCTA
 1451 CATCCATTTT TTCCTTTTCA ATTTTCATTGG TTTTCTCTAA ACAGTGCTCC
 1501 ATTTTATTTT GTTGGTGTTC CAGATGGGCA GTGTTATGGC TACGTGATAT
 1551 TTGAAGGGAA GGATAAGTGT TGCTTTCAGT AGTTATTGCC AATATTGTTG
 1601 TTGGTCAATG GCTTGAAGAT AAACCTTCTA ATAATTATTA TTTCTTTGAG
 1651 TAGCTCAGAC TTGGTTTTGC CAAAACCTCT GGTAATTTT GAAGATAGAC
 1701 TGTCTTATCA CCAAGGAAAT TTATACAAAT TAAGACTAAC TTTCTTGGAA
 1751 TTCACTATTC TGGCAATAAA TTTTGGTAGA CTAATACAGT ACAGCTAGAC
 1801 CCAGAAATTT GGAAGGCTGT AGATCAGAGG TTCTAGTTCC CTTTCCCTCC
 1851 TTTTATATCC TCCTCTCCTT GAGTAATGAA GTGACCAGCC TGTGTAGTGT
 1901 GACAAACGTG TCTCATTCAG CAGGAAAAAC TAATGATATG GATCATCACC
 1951 CAGATTCTCT CACTTGGTAC CAGCATTTCT GTAGGTATTA GAGAAGAGTT
 2001 CTAAGTTTTT TAAACCTTAA CTGTTCCCTA AGGATTTTAG CCAGTATTTT
 2051 AATAGAACAT GATTAATGAA AGTGACAAAT TTAAATTTT CTCTAATAGT
 2101 CCTCATCATA AACTTTTTAA AGGAAAATAA GCAAACTAAA AAGAACATTG
 2151 GTTTAGATAA ATACTTATAC TTTGCAAAGT CAAAATGGC TTGATTTTTG
 2201 GAAACAATAT AGAGGTATTC ATATTTAAAT GAGGGTTTAC ATTTGTTTTG
 2251 TTTTGTAACC GTTAAAAAGA AGTTGTTTCC AGCTAATTAT TGTGGTGTAC
 2301 TATATTTGTG AGCCTAGGGT AGGGGCACTG CTGCAACTTC TGCTTTCATC
 2351 CCATGCCTCA TCAATGAGGA AAGGGAACAA AGTGTATAAA ACCTGCCACA
 2401 ATTGTATTTT AATTTTGAGG TATGATATTT TCAGATATTT CATAATTTCT
 2451 AACCTCTGTT CTCTCAGTAA ACAGAATGTC TGATCGATCA TGCAGATACA
 2501 ATGTTGGTAT TTGAGAGGTT AGTTTTTTTC CTACACTTTT TTTTGCCAAC
 2551 TGACTTAACA ACATTGCTGT CAGGTGGAAA TTTCAAGCAC TTTTGCACAT
 2601 TTAGTTCAGT GTTTGTTGAG AATCCATGGC TTAACCCACT TGTTTGTCTA
 2651 TTTTTTCTT TGCTTTTAAT TTTCCCATC TGATTTTATC TCTGCGTTTC

2701 AGTGACCTAC CTTAAAACAA CACACGAGAA GAGTTAAACT GGGTTCATTT
2751 TAATGATCAA TTTACCTGCA TATAAAATTT ATTTTAAATC AAGCTGATCT
2801 TAATGTATAT AATCATTCTA TTTGCTTTAT TATCGGTGCA GGTAGGTCAT
2851 TAACACCACT TCTTTTCATC TGTACCACAC CCTGGTGAAA CCTTTGAAGA
2901 CATAAAAAAA ACCTGTCTGA GATGTTCTTT CTACCAATCT ATATGTCTTT
2951 CGGTTATCAA GTGTTTCTGC ATGGTAATGT CATGTAAATG CTGATATTGA
3001 TTTCACGGT CCATCTATAT TAAAACGTG C

SEQ ID NO:7

<110> Sigurd Ørstavik, Nils Reinton, Eirik Frengen, Bjørn Tore Langeland, Tore Jahnsen og Bjørn S. Skålhegg

<120> **Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit C β of cAMP-dependent protein kinase and the use thereof**

<160>9

<210>

<211>

<212>amino acid

<213>Homo sapiens

<400> **Proteinsequence C β 2**

Met-Ala-Ala-Tyr-Arg-Glu-Pro-Pro-Cys-Asn-Gln-Tyr-Thr-Gly-Thr-Thr-Thr-Ala-Leu-Gln-Lys-Leu-Glu-Gly-Phe-Ala-Ser-Arg-Leu-Phe-His-Arg-His-Ser-Lys-Gly-Thr-Ala-His-Asp-Gln-Lys-Thr-Ala-Leu-Glu-Asn-Asp-Ser-Leu-His-Phe-Ser-Glu-His-Thr-Ala-Leu-Trp-Asp-Arg-Ser-Met-Lys-Glu-Phe-Leu-Ala-Lys-Ala-Lys-Glu-Asp-Phe-Leu-Lys-Lys-Trp-Glu-Ser-Pro-Ala-Gln-Asn-Thr-Ala-His-Leu-Asp-Gln-Phe-Glu-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Gly-Thr-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Val-Met-Leu-Val-Lys-His-Lys-Glu-Thr-Gly-Asn-His-Tyr-Ala-Met-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Gln-Lys-Val-Val-Lys-Leu-Lys-Gln-Ile-Glu-His-Thr-Leu-Asn-Glu-Lys-Arg-Ile-Leu-Gln-Ala-Val-Asn-Phe-Pro-Phe-Leu-Val-Lys-Leu-Glu-Phe-Ser-Phe-Lys-Asp-Asn-Ser-Asn-Leu-Tyr-Met-Val-Met-Glu-Tyr-Val-Pro-Gly-Gly-Glu-Met-Phe-Ser-His-Leu-Arg-Arg-Ile-Gly-Arg-Phe-Ser-Glu-Pro-His-Ala-Arg-Phe-Tyr-Ala-Ala-Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Phe-Glu-Tyr-Leu-His-Ser-Leu-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asp-Leu-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn-Leu-Leu-Ile-Asp-Gln-Gln-Gly-Tyr-Ile-Gln-Val-Thr-Asp-Phe-Gly-Phe-Ala-Lys-Arg-Val-Lys-Gly-Arg-Thr-Trp-Thr-Leu-Cys-Gly-Thr-Pro-Glu-Tyr-Leu-Ala-Pro-Glu-Ile-Ile-Leu-Ser-Lys-Gly-Tyr-Asn-Lys-Ala-Val-Asp-Trp-Trp-Ala-Leu-Gly-Val-Leu-Ile-Tyr-Glu-Met-Ala-Ala-Gly-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe-Ala-Asp-Gln-Pro-Ile-Gln-Ile-Tyr-Glu-Lys-Ile-Val-Ser-Gly-Lys-Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Ser-His-Phe-Ser-Ser-Asp-Leu-Lys-Asp-Leu-Leu-Arg-Asn-Leu-Leu-Gln-Val-Asp-Leu-Thr-Lys-Arg-Phe-Gly-Asn-Leu-Lys-Asn-Gly-Val-Asn-Asp-Ile-Lys-Asn-His-Lys-Trp-Phe-Ala-Thr-Thr-Asp-Trp-Ile-Ala-Ile-Tyr-Gln-Arg-Lys-Val-Glu-Ala-Pro-Phe-Ile-Pro-Lys-Phe-Lys-Gly-Pro-Gly-Asp-Thr-Ser-Asn-Phe-Asp-Asp-Tyr-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Val-Ser-Ile-Asn-Glu-Lys-Cys-Gly-Lys-Glu-Phe-Ser-Glu-Phe

SEQ ID NO:8

<400> **Protein sequence C β 4ab**

Met-Ser-Ala-Arg-Lys-Ser-Ser-Asp-Ala-Ser-Ala-Cys-Ser-Ser-Ser-Glu-Ile-Ser-Val-Met-Lys-Glu-Phe-Leu-Ala-Lys-Ala-Lys-Glu-Asp-Phe-Leu-Lys-Lys-Trp-Glu-Ser-Pro-Ala-Gln-Asn-Thr-Ala-His-Leu-Asp-Gln-Phe-Glu-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Gly-Thr-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Val-Met-Leu-Val-Lys-His-Lys-Glu-Thr-Gly-Asn-His-Tyr-Ala-Met-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Gln-Lys-Val-Val-Lys-Leu-Lys-Gln-Ile-Glu-His-Thr-Leu-Asn-Glu-Lys-Arg-Ile-Leu-Gln-Ala-Val-Asn-Phe-Pro-Phe-Leu-Val-Lys-Leu-Glu-Phe-Ser-Phe-Lys-Asp-Asn-Ser-Asn

Leu-Tyr-Met-Val-Met-Glu-Tyr-Val-Pro-Gly-Gly-Glu-Met-Phe-Ser-His-Leu-Arg-Arg-Ile-Gly-Arg-Phe-Ser-Glu-Pro-His-Ala-Arg-Phe-Tyr-Ala-Ala-Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Phe-Glu-Tyr-Leu-His-Ser-Leu-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asp-Leu-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn-Leu-Leu-Ile-Asp-Gln-Gln-Gly-Tyr-Ile-Gln-Val-Thr-Asp-Phe-Gly-Phe-Ala-Lys-Arg-Val-Lys-Gly-Arg-Thr-Trp-Thr-Leu-Cys-Gly-Thr-Pro-Glu-Tyr-Leu-Ala-Pro-Glu-Ile-Ile-Leu-Ser-Lys-Gly-Tyr-Asn-Lys-Ala-Val-Asp-Trp-Trp-Ala-Leu-Gly-Val-Leu-Ile-Tyr-Glu-Met-Ala-Ala-Gly-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe-Ala-Asp-Gln-Pro-Ile-Gln-Ile-Tyr-Glu-Lys-Ile-Val-Ser-Gly-Lys-Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Ser-His-Phe-Ser-Ser-Asp-Leu-Lys-Asp-Leu-Leu-Arg-Asn-Leu-Leu-Gln-Val-Asp-Leu-Thr-Lys-Arg-Phe-Gly-Asn-Leu-Lys-Asn-Gly-Val-Asn-Asp-Ile-Lys-Asn-His-Lys-Trp-Phe-Ala-Thr-Thr-Asp-Trp-Ile-Ala-Ile-Tyr-Gln-Arg-Lys-Val-Glu-Ala-Pro-Phe-Ile-Pro-Lys-Phe-Lys-Gly-Pro-Gly-Asp-Thr-Ser-Asn-Phe-Asp-Asp-Tyr-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Val-Ser-Ile-Asn-Glu-Lys-Cys-Gly-Lys-Glu-Phe-Ser-Glu-Phe

SEQ ID NO:9

Protein sequence Cβ4abc

Met-Ser-Ala-Arg-Lys-Ser-Ser-Asp-Ala-Ser-Ala-Cys-Ser-Ser-Ser-Glu-Ile-Ser-Asp-Ser-Phe-Val-Met-Lys-Glu-Phe-Leu-Ala-Lys-Ala-Lys-Glu-Asp-Phe-Leu-Lys-Lys-Trp-Glu-Ser-Pro-Ala-Gln-Asn-Thr-Ala-His-Leu-Asp-Gln-Phe-Glu-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Gly-Thr-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Val-Met-Leu-Val-Lys-His-Lys-Glu-Thr-Gly-Asn-His-Tyr-Ala-Met-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Gln-Lys-Val-Val-Lys-Leu-Lys-Gln-Ile-Glu-His-Thr-Leu-Asn-Glu-Lys-Arg-Ile-Leu-Gln-Ala-Val-Asn-Phe-Pro-Phe-Leu-Val-Lys-Leu-Glu-Phe-Ser-Phe-Lys-Asp-Asn-Ser-Asn-Leu-Tyr-Met-Val-Met-Glu-Tyr-Val-Pro-Gly-Gly-Glu-Met-Phe-Ser-His-Leu-Arg-Arg-Ile-Gly-Arg-Phe-Ser-Glu-Pro-His-Ala-Arg-Phe-Tyr-Ala-Ala-Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Phe-Glu-Tyr-Leu-His-Ser-Leu-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asp-Leu-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn-Leu-Leu-Ile-Asp-Gln-Gln-Gly-Tyr-Ile-Gln-Val-Thr-Asp-Phe-Gly-Phe-Ala-Lys-Arg-Val-Lys-Gly-Arg-Thr-Trp-Thr-Leu-Cys-Gly-Thr-Pro-Glu-Tyr-Leu-Ala-Pro-Glu-Ile-Ile-Leu-Ser-Lys-Gly-Tyr-Asn-Lys-Ala-Val-Asp-Trp-Trp-Ala-Leu-Gly-Val-Leu-Ile-Tyr-Glu-Met-Ala-Ala-Gly-Tyr-Pro-Pro-Phe-Phe-Ala-Asp-Gln-Pro-Ile-Gln-Ile-Tyr-Glu-Lys-Ile-Val-Ser-Gly-Lys-Val-Arg-Phe-Pro-Ser-Ser-His-Phe-Ser-Ser-Asp-Leu-Lys-Asp-Leu-Lys-Asp-Leu-Leu-Arg-Asn-Leu-Leu-Gln-Val-Asp-Leu-Thr-Lys-Arg-Phe-Gly-Asn-Leu-Lys-Asn-Gly-Val-Asn-Asp-Ile-Lys-Asn-His-Lys-Trp-Phe-Ala-Thr-Thr-Asp-Trp-Ile-Ala-Ile-Tyr-Gln-Arg-Lys-Val-Glu-Ala-Pro-Phe-Ile-Pro-Lys-Phe-Lys-Gly-Pro-Gly-Asp-Thr-Ser-Asn-Phe-Asp-Asp-Tyr-Glu-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Val-Ser-Ile-Asn-Glu-Lys-Cys-Gly-Lys-Glu-Phe-Ser-Glu-Phe

【図面の簡単な説明】

【図1】

A：ヒトCβスプライス変異体をコードするcDNAの同定を示す。

【図2A】

新規のCβスプライス変異体をコードするヒトゲノム領域の構造を示す。

【図2B】

Cβの新規のスプライス変異体をコードするゲノム領域のヌクレオチド配列を示す。

【図2C】

どのように種々のヒトC β エキソン5'からエキソン2がスプライスされ得るかを示す略図である。

【図3】

C β スプライス変異体の演繹アミノ酸配列である。

【図4】

異なるC β スプライス変異体の組織分布である。

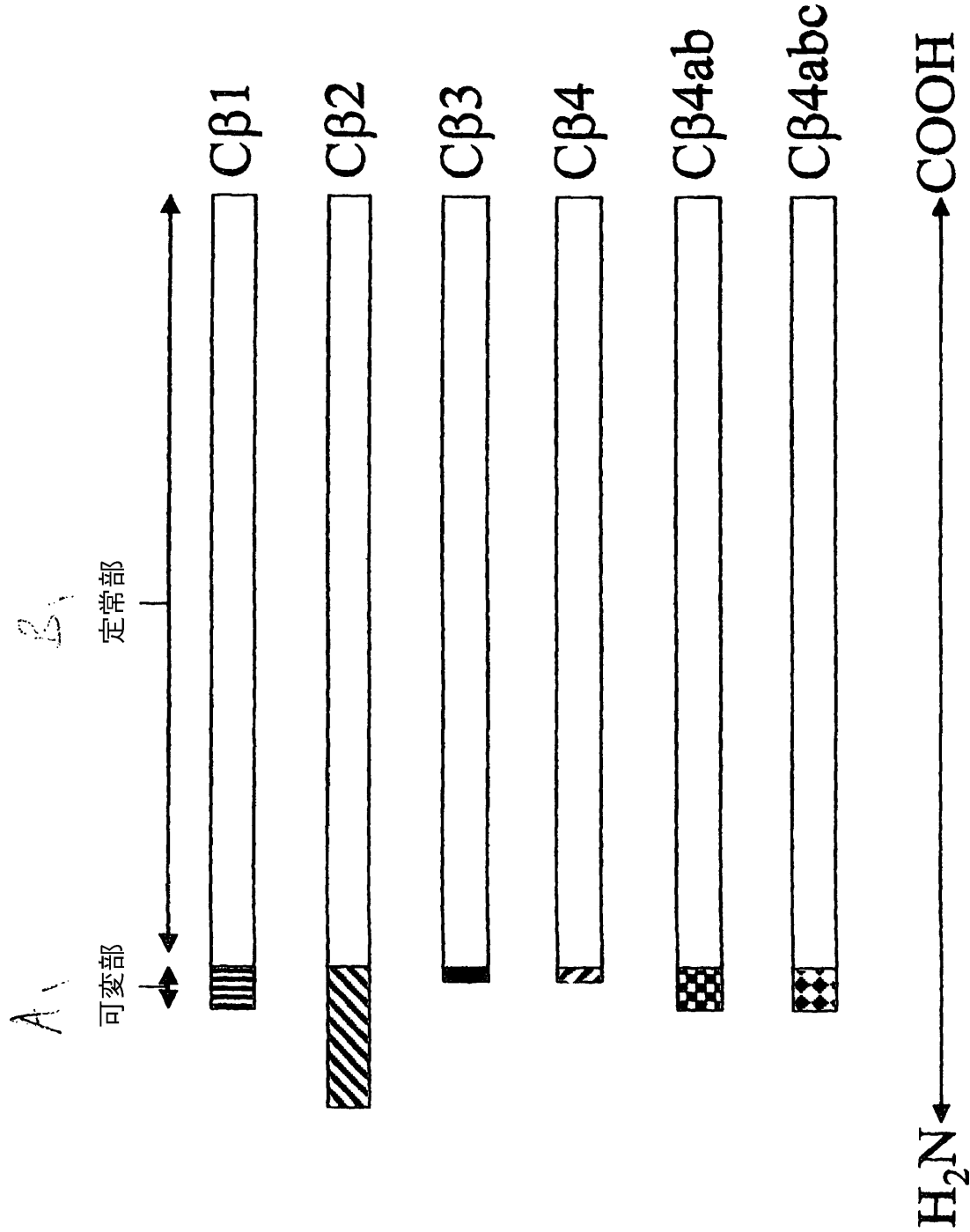
【図5A】

C β 2の種分布である。

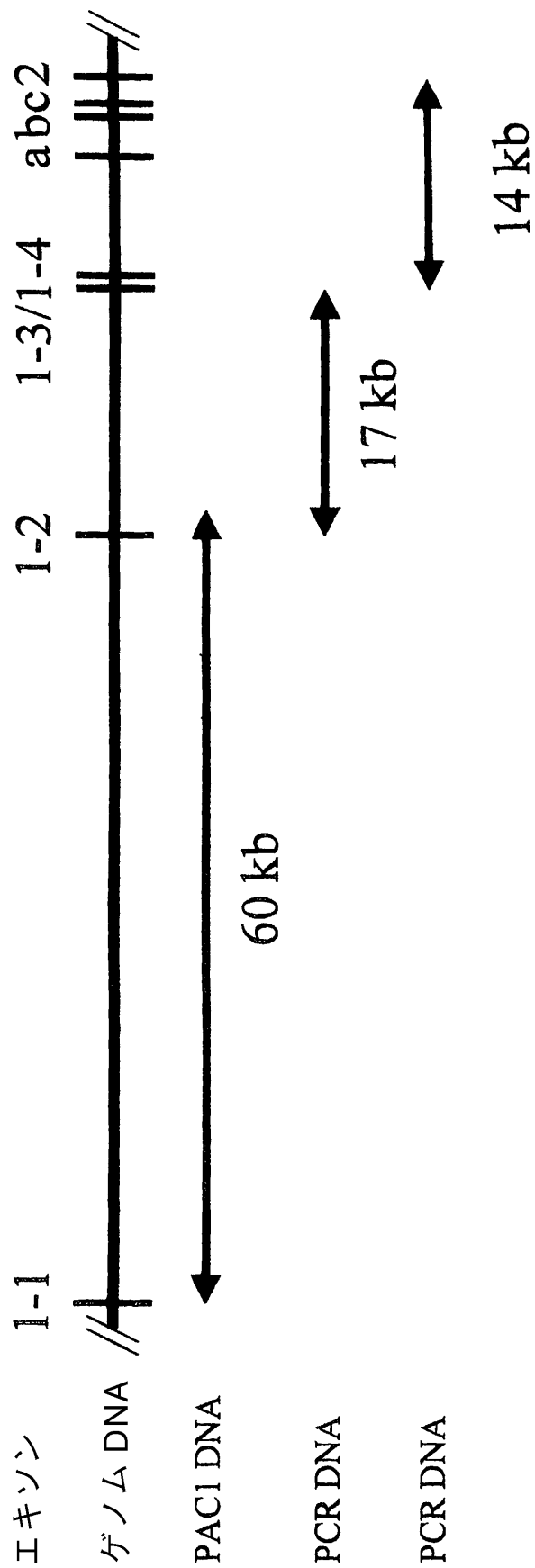
【図5B】

C β 2はマウスで発現されないことを示す。

【図1】



【図 2 A】



【図2B】

エキソン 1-1:

ccagcccccttcccttccctgaccccttcttgccatcgccccagac**ATGGGGAACGCGGCGACCG**
CCAAGAAAGGCAGCGAGgtggagagcg

エキソン 1-2:

agctttatatttaaatgctctcattagcctatatattaatattaaaacacccaaacataaagccttt
 taggcagatattgcaagtttttaaaatcctcaactctagctgaaaagtgttttgctaagaaaagct
 cagtaatgtgctgttttatattaacaggaaacagaaacagcagtagtggtttgaataccctgcaaac
 aggaagtttgacacatgcatagctcttagcttctgtgtaagaagtgtgagctccttctggaaaca
 tttgcagttacattaagtaaagtgtaaatgcacatga**ATGGCAGCTTATAGAGAACCACCTTGTA**
CCAGTATACAGGTACAACCTACAGCTCTTCAGAAATTGGAAGGTTTTGCTAGCCGGTTATTTTCATAG
ACACTCTAAAGGTACTGCACATGATCAGAAAACAGCTCTGGAAAATGACAGCCTTCATTCTCTGA
ACATACTGCCTTATGGGACAGATCAAgtaagttttg

エキソン 1-3 及び 1-4:

tgttttttaggcagagttcagtggttcgtcacaaataaatgtttcttaatttggtgtttatgactgc
 tgcatttccagagccatgaaatcattgtttttgataattctgttcagcttcatagttgtttcttag
 gaagatttctgacttacttccacatcacaaaaagtcctgcctcacatggcaactgttaaaatggc
 aagttcacgtgctgaagttctacttaacaaggaaccattctatagattctttgtaccatttttggt
 caaattttggatctctggtaatcaaaacaatctgttcacatgctacccagtcagccaccttgct
 atacaatctgtcatcttagtcctgtttcatgtgaggaattttacatttctgcaataattgccagta
 acttttttggtgattattttcttttgaaataccacatggatggcatctgacactgtttgtaatgctg
 aatttaattggaagtttacaaataagttattctatgattctcctttaaaaatgcagatatata
 tgtatataatattattctcttccataacacagaatgtttaaatgggttaacattttgtgctgcagtat
 agctttctggctcatgaaaaatgaaagctatcagcgatctcggcaataagattcatcgccaatagt
 cactagcaacagcacacagcatttttaatatcagtgaggtccacagctagcagtaagagctgggtgta
 attgaaagacgtttaggtgcaatcattctgctgtttgctccttgccaggttcaac**ATGGGATTGTg**
 tgagtatttgaaagaaaacagcaattttttcatatctttgaaagatgtaaaaagcgtagattagtgc
 ttaaatttaagaaatctggtaatttataatcatgtggctctaaaaataaaaaggtattttatttgct
 tgggtggattaaagcttttagaaaagctacgccttggtatacaagtgaaccgataattctgggtctaatg
 ttgccgtggtaacaactcatgctgatataattgagaacatcttatacatcctgggttcgaacatttt
 ctccctgccattttgagttgttctagtggtatatgaaggaggctgggataactagcttgaaagaaa
 ttcagctctagttatagacatctttggcattaatctgatgtttactagtgatctcatgctaggca
 gttatgctttgcttctaggggcttctcttttttaaaacaaaagaaagctcttttcgttttctgtgtg
 ctgcatgctccagtggtgtgtgtttacaccatcggttcttctccctctagagattagcataactccc
 tttgctggttggaattgttattttgagcaatatgttttggaaggttggttttcatc**ATGAGTG**gtaa
 gtatgc

エキソン a

cttgatcaag**CACGCAAATCATCAGATGCATCTG**gtaggaaaac

エキソン b

tggacacaag**CTTGCTCCTCTTCAGAAATATCTG**gtaggcaagt

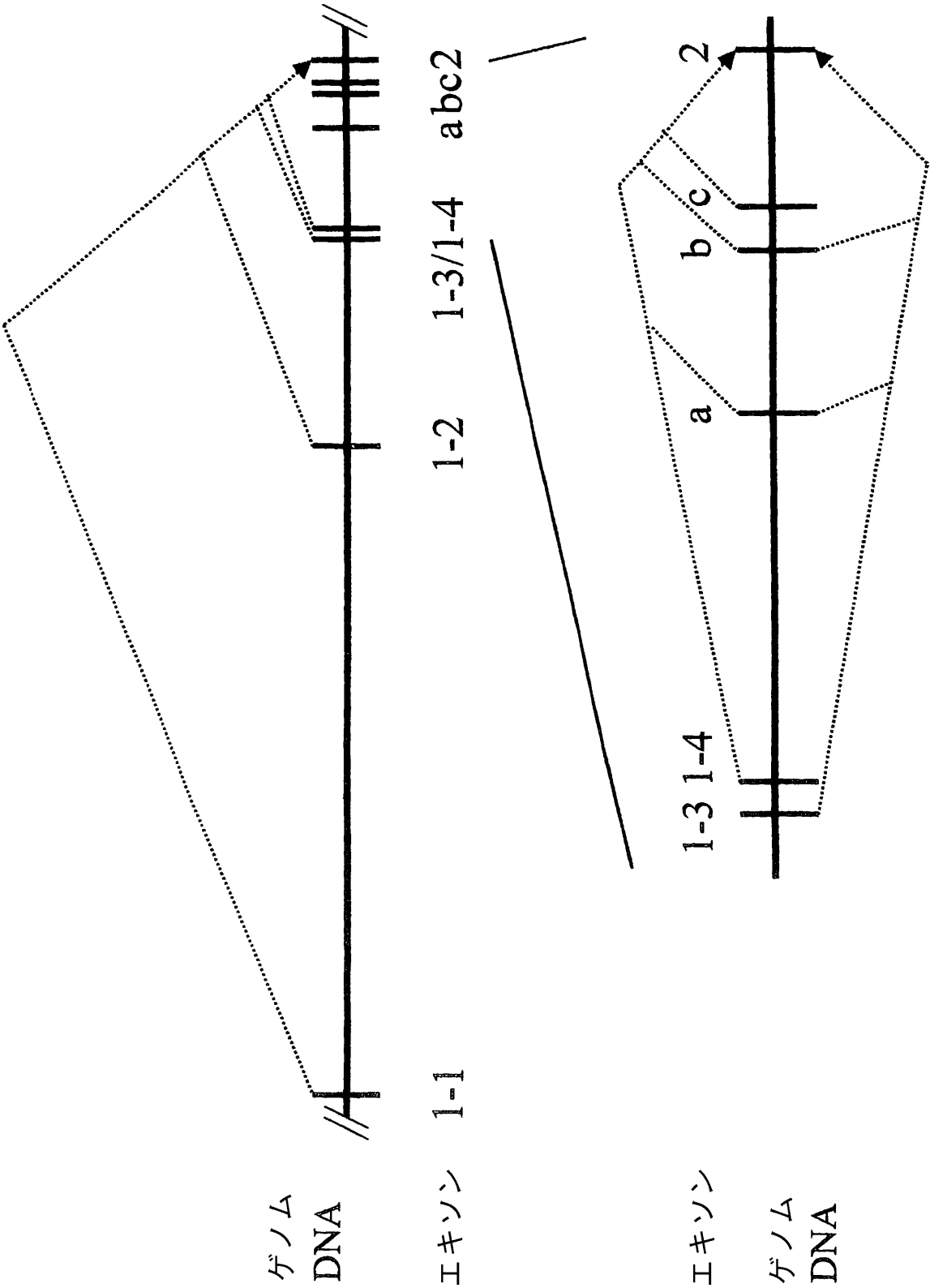
エキソン c

gaacatgtag**ATTCCTTTG**gtatgctcat

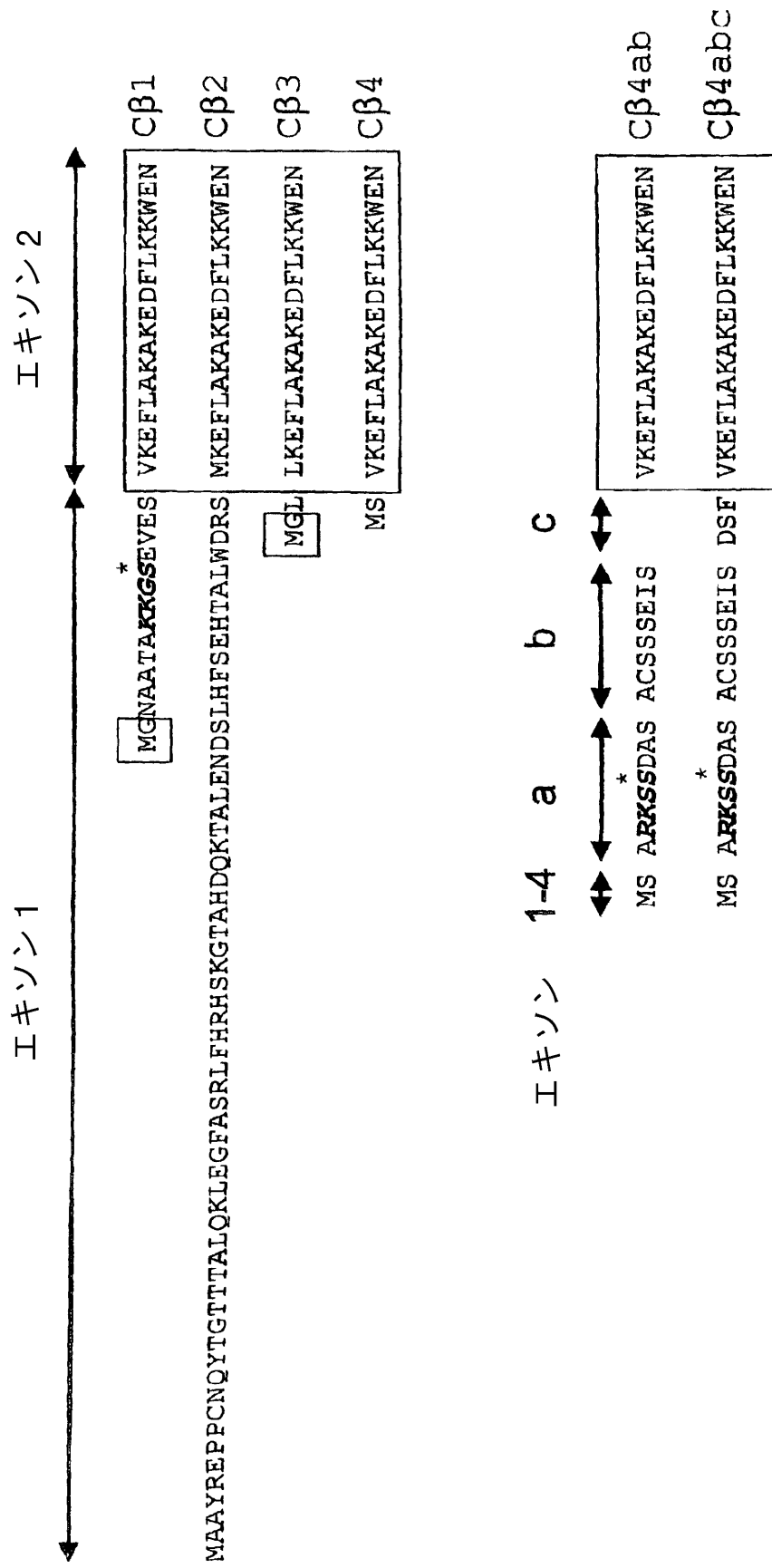
エキソン 2

atattttcag**TGAAAGAGTT**...

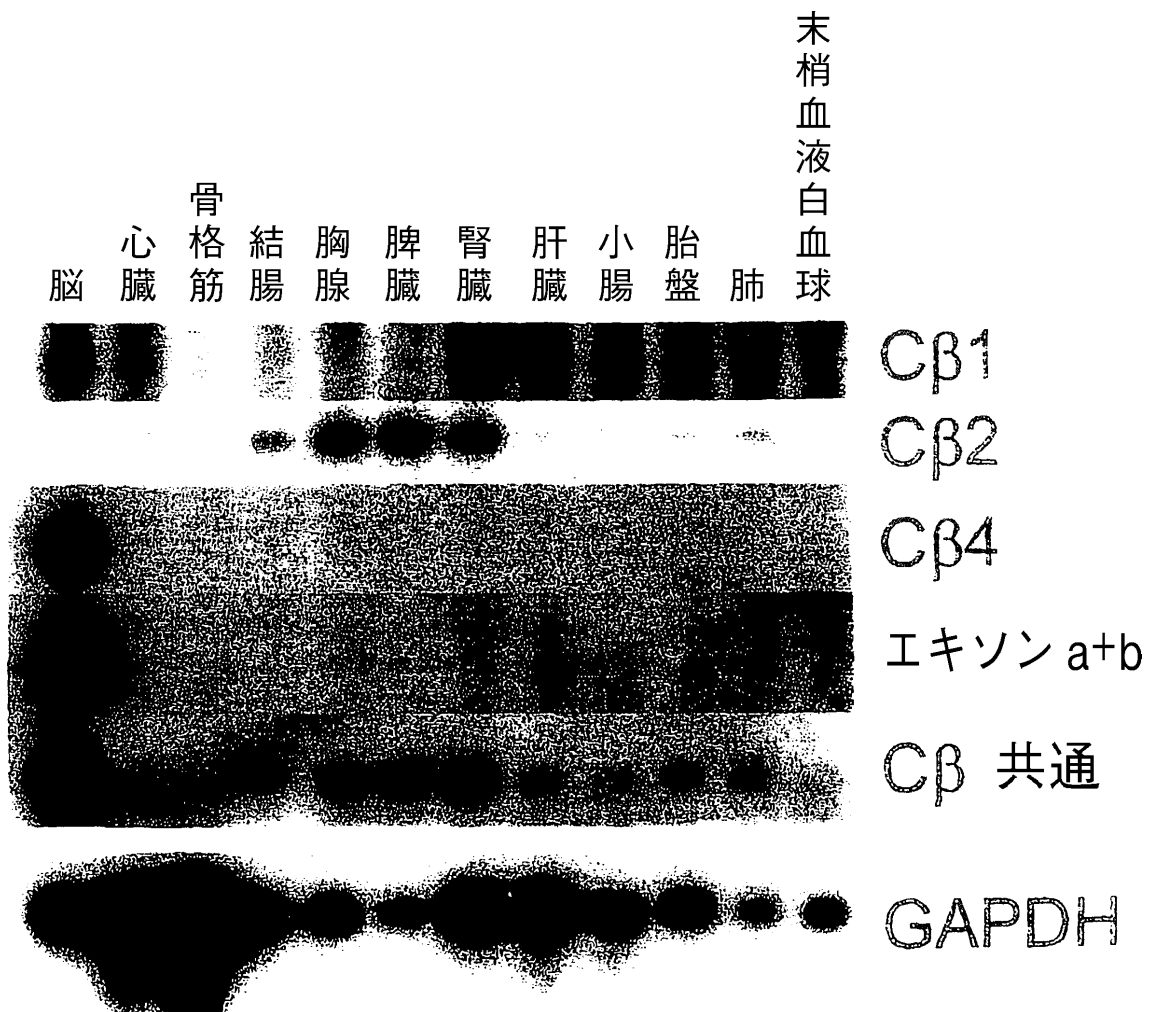
【図2C】



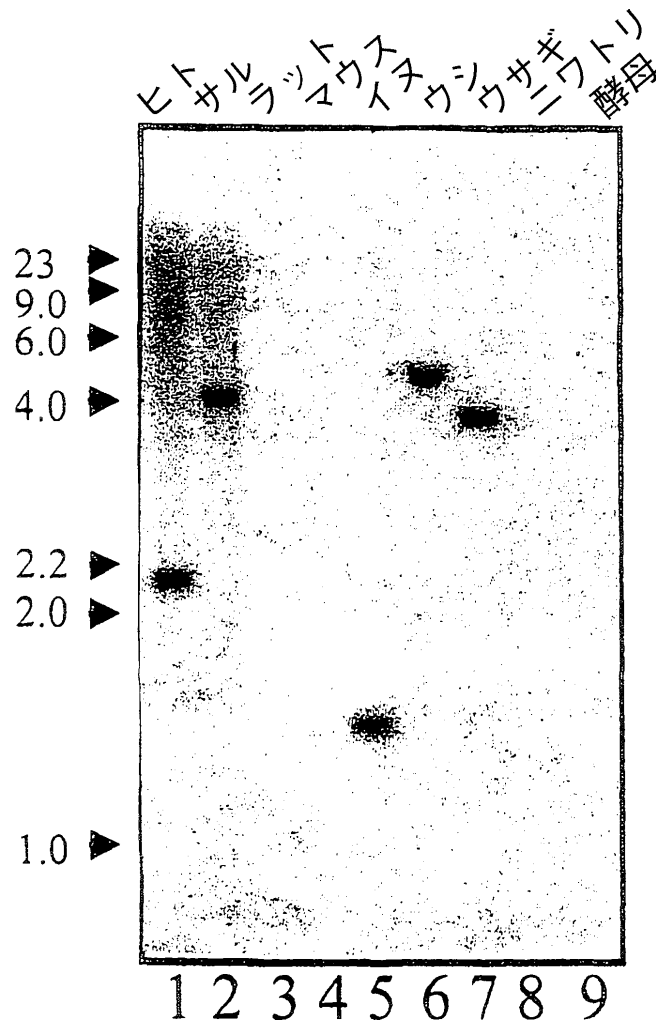
【図 3】



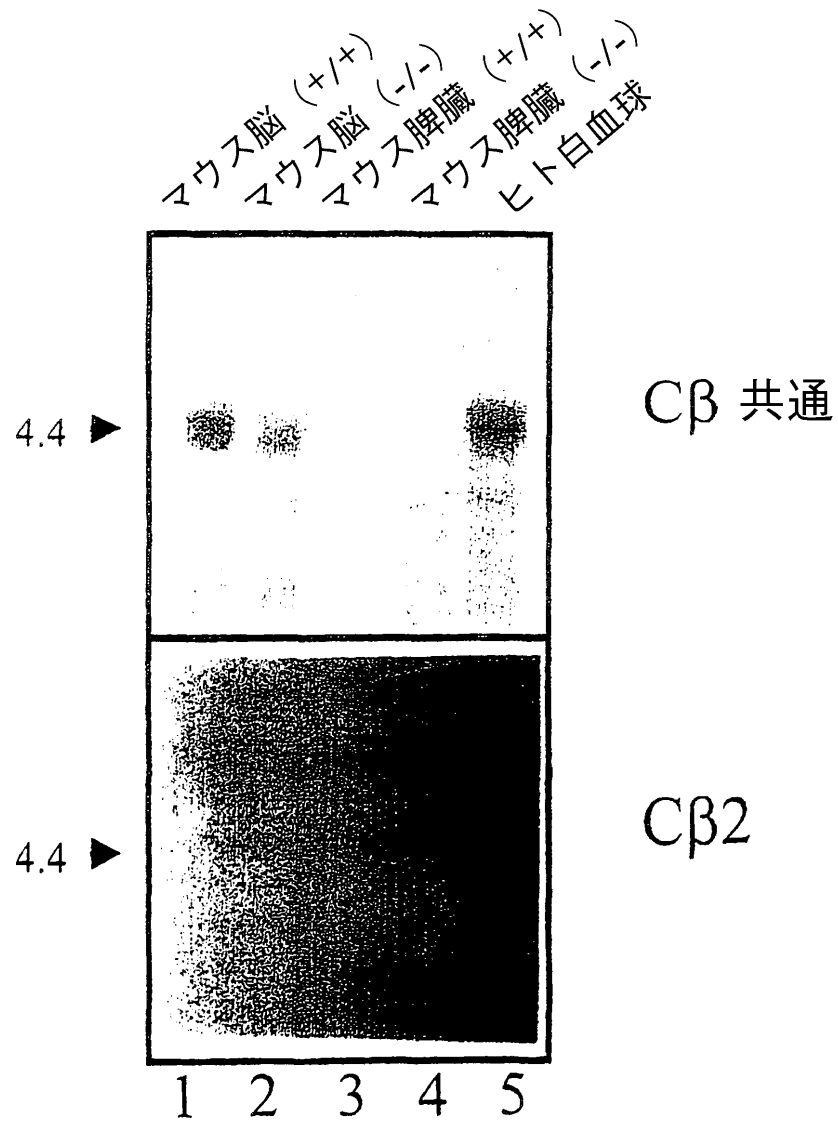
【図4】



【図 5 A】



【図5B】



【手続補正書】 特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成14年3月20日（2002. 3. 20）

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 $C\beta$ と称されるc-AMP依存性プロテインキナーゼの新規なヒト触媒サブユニット $C\beta 2$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ 変異体をコードし、配列番号：1のヌクレオチド配列を含む、ゲノムDNA配列。

【請求項2】 $C\beta$ と称されるc-AMP依存性プロテインキナーゼの新規なヒト触媒サブユニット $C\beta 2$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ 変異体をコードし、配列番号：2、5及び6のヌクレオチド配列をそれぞれ含む、cDNA配列。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のDNA配列を含むベクター。

【請求項4】 それぞれ $C\beta 2$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ の配列番号：7、8及び9の特異的アミノ酸配列。

【請求項5】 請求項1又は2に記載のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質。

【請求項6】 配列番号：7、8及び9の特異的アミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の特異的DNA配列によりコードされるタンパク質。

【請求項7】 請求項1又は2の $C\beta 2$ 特異的DNAプローブを含むキット。

【請求項8】 請求項1～6の $C\beta 2$ 、 $C\beta 4ab$ 及び $C\beta 4abc$ タンパク質の医薬品の調製のための使用。

【請求項9】 $C\beta 2$ の酵素活性の阻害のための薬剤の調製のための請求項1～6の $C\beta 2$ タンパク質の使用。

【請求項10】 $C\beta 2$ 相互作用を特異的にかつ不可逆的にブロックする薬剤の調製のための請求項1～6の $C\beta 2$ タンパク質の使用。

【請求項11】 $C\beta 2$ の酵素活性を活性化する薬剤の調製のための請求項1

～6のC β 2タンパク質の使用。

【請求項12】 アンチセンス医薬の調製のための、請求項1又は2に記載のC β 2、C β 4ab及びC β 4abcのDNAに対し相補的なDNA配列の使用。

【請求項13】 請求項1～6のC β 2の存在及び位置について患者のT細胞を検査し、スクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄、
 - b) 免疫蛍光法によるC β 2タンパク質の同定の用意、ここでT細胞は洗剤依存性溶解の後、Lーリジンでコートされたカバースリップ上へ安定させる、
 - c) 一次抗体(Ab) (関連性のないAb又はC β 2特異的Abである)とのインキュベーション、過剰量のAbは洗浄用緩衝液で除去され、そして、T細胞は蛍光物質と結合した二次抗-IgG Abとインキュベーションする、
 - d) 蛍光顕微鏡下でのT細胞の検査、
- を含む、上記方法。

【請求項14】 請求項1～6のC β 2の膜関連触媒活性について患者のT細胞をスクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液リンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄、
 - b) 洗剤緩衝液中での溶解によるT細胞の用意、
 - b) 確立されているアッセイによるC β 2特異的な触媒活性のモニタリング、ここでC β 1活性は相対活性の決定のための内部対照として用いられる、
- を含む、上記方法。

【請求項15】 請求項1又は2のC β 2遺伝子及びmRNAにおける突然変異について患者をスクリーニングする方法であって、

- a) 単離した末梢血液Tリンパ球の回収及び緩衝液中での洗浄；
 - b) 確立された方法による総RNA及びゲノムDNAの単離、続いて、C β 2特異的ヌクレオチド又はエキソン1-2と指定されるC β 2特異的エキソンのcDNA配列に従うC β 2特異的プライマーを用いたRT-PCR、
- を含む、上記方法。

【請求項16】 請求項13、14及び15に記載の方法により製造された製品。

【請求項17】 請求項1～6のC β 2タンパク質の阻害性又は活性化分子につ

いてのスクリーニングのための試験システム。

【請求項18】 請求項17に記載のスクリーニング方法からの製品。

【国際調査報告】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 00/00445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12N 9/12 // C12Q 1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C12N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	The Journal of Biological Chemistry, Volume 266, No 8, 1991, Stefan Wiemann et al, "Isoform CBeta2, an Unusual Form of the Bovine Catalytic Subunit of CAMP-independent Protein Kinase", page 5140 - page 5146, & Swissprot. Accession no. P24256, 01.03.1992, 93.5% identity in 400 aa overlap with SEQ ID No 7 --	1-18
X	The Journal of Biological Chemistry, Volume 272, No 47, 1997, Chris R. Guthrie et al, "Two Novel Brain-specific Splice Variants of the Murine C Beta Gene of caMP-dependent Protein Kinase", page 29560 - page 29565 --	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 May 2001

 Name and mailing address of the ISA/
 Swedish Patent Office
 Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
 Facsimile No. +46 8 666 02 86

Date of mailing of the international search report

30-05-2001

Authorized officer

 Yvonne Siösteen/BS
 Telephone No. +46 8 782 23 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 00/00445

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Molecular Endocrinology, Volume 4, No 3, 1990, Stephen J. Beebe et al, "Molecular Cloning of a Tissue-Specific Protein Kinase (C-Gamma) from Human Testis - Representing a Third Isoform of the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase", page 465 - page 475, & EMBASE/GENBANK/DBJ, accession no M34181, 23.06, 1990, 100% identity in 2852 bp overlap with SEQ ID No 2 --	1-18
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 261, No 33, 1986, Michael D. Uhler et al, "Evidence for a Second Isoform of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase", page 15360 - page 15363 --	1-18
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 261, No 35, 1986, Mark OI Showers et al, "A Cloned Bovine cDNA Encodes an Alternate Form of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase", page 16288 - page 16291 --	1-18
A	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 89, 1992, Sven Beushausen et al, "Catalytic subunit of Aplysia neuronal cAMP-dependent protein kinase with two different N termini" page 1641 - page 1645 --	1-18
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 273, No 38, 1998, Jovental T. San Agustín et al, "The Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase of Ovine Sperm Flagella Has a Unique Amino-terminal Sequence", page 24874 - page 24883 --	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NO00/00445**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see next sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NO00/00445

The International Searching Authority considers that the present application contains the following six inventions which relate to different splice variants of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase:

1. The splice variant c-beta1 according to part of claims 1-3, 5, 6 and 12.
2. The splice variant c-beta2 according to part of claims 1-6, 8, 12, 16 and claims 7, 9-11, 13-18.
3. The splice variant c-beta3 according to part of claims 1-3, 5 and 12.
4. The splice variant c-beta4 according to part of claims 1-3, 5, 8 and 12.
5. The splice variant c-beta4ab according to part of claims 1-6, 8 and 12.
6. The splice variant c-beta4abc according to claims 1-6, 8 and 12.

The invention listed as Groups 1-6 do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because they lack the same or corresponding novel special technical features for the following reasons: The claims are not so linked by a special technical feature so as to form a single inventive concept. Because c-beta splice variants of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase was already known from the prior art (see description page 2, line 19 and Guthrie et al, The journal of Biological Chemistry, Vol 272, No47, 1997, page 29560-29565) it cannot form basis of unity of invention.

As inventions 2-6 could be searched without effort justifying additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee for these inventions. Thus, inventions 1-6 have been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 00/00445

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Advanced, Volume 31, 1997, Kjetil Taskén et al, "Structure, Function and Regulation of Human cAMP-Dependent Protein Kinases" page 191 - page 204 -- -----	1-18

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 P 37/04		C 1 2 N 9/00	4 C 0 8 4
	43/00		4 C 0 8 6
	1 1 1		
C 1 2 N 9/00			
	9/12		
	9/99	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02			Z
	1/48		A
	1/68	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78			Z
	33/15		M
	33/48		Z
	33/50		Y
	33/53	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		A 6 1 K 37/52	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(71)出願人 ヤンセン、トーレ ノルウェー国、スキイ、イドレットスバイエン 44			
(71)出願人 スカルヘッグ、ビヨルン、エス. ノルウェー国、サンドビカ、エンゲルヨルデット 69			
(72)発明者 オルスタビク、シグルド ノルウェー国、オスロ、イリスバイエン 18			
(72)発明者 レイントン、ニルス ノルウェー国、オスロ、ベストヘイムガテン 6 ビー			
(72)発明者 フレンゲン、エイリク ノルウェー国、オスロ、ストラスバイエン 27 ビー			

- (72)発明者 ランゲランド、ビヨルン、トーレ
ノルウェー国、オスロ、ホルゲルスライス
トバイエン 25
- (72)発明者 ヤンセン、トーレ
ノルウェー国、スキイ、イドレットスベ
イエン 44
- (72)発明者 スカルヘッグ、ビヨルン、エス.
ノルウェー国、サンドビカ、エンゲルヨ
ロット 69

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB50 BB51
CB01 DA13 DA36 FA16 FB02
FB03 FB12 GC15
2G054 AA08 BB05 CA22 CA23 CA28
CE02 EA03
4B024 AA01 AA11 BA10 CA03 CA04
CA09 CA12 CA20 HA11 HA13
HA14 HA17
4B050 CC01 CC03 DD11 HH01 LL01
LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QA17 QQ08 QQ21
QQ27 QQ41 QQ44 QQ53 QQ61
QQ89 QR07 QR08 QR32 QR35
QR40 QR56 QR62 QS16 QS25
QS34 QS36 QX01 QX02
4C084 AA07 AA13 AA17 BA01 BA22
CA53 DC25 NA14 ZB09 ZC20
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZB09 ZC20

专利名称(译)	鉴定人cAMP依赖性蛋白激酶的催化亚基的新剪接变体及其用途		
公开(公告)号	JP2003518385A	公开(公告)日	2003-06-10
申请号	JP2001548684	申请日	2000-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	OL稳定西格尔德点击 雨吨尼尔斯 弗林根埃日库 兰格土地比约恩·托雷 扬森托雷 骷髅海格比约恩·ES		
申请(专利权)人(译)	Orusutabiku, 矽格 Reinton, 尼尔斯 Furengen, Eiriku 朗厄兰, 比约恩, 托雷 杨森, 十 Sukaruhegg, 比约恩, 上课.		
[标]发明人	オルスタビクシグルド レイントンニルス フレンゲンエイリク ランゲランドビヨルントーレ ヤンセントーレ スカルハッグビヨルンエス		
发明人	オルスタビク、シグルド レイントン、ニルス フレンゲン、エイリク ランゲランド、ビヨルン、トーレ ヤンセン、トーレ スカルハッグ、ビヨルン、エス.		
IPC分类号	G01N33/48 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/45 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/04 A61P43/00 C12N9/00 C12N9/12 C12N9/99 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61P37/04 A61P43/00 C12N9/1205 C12Q1/485 C12Y207/11011 G01N33/56972		
FI分类号	A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/04 A61P43/00.111 C12N9/00 C12N9/12 C12N9/99 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/48.M G01N33/50.Z G01N33/53.Y C12N15/00.ZNA.A A61K37/52		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/BB05 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/HH01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC25 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZC20 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB09 4C086/ZC20		

: 1]

The diagram shows a protein structure with several domains and modifications. The domains are labeled from left to right: α_1 , β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_4ab , and β_4abc . The α_1 domain is a small circle. The β_1 domain is a large rectangle with a small shaded area at the bottom left. The β_2 domain is a large rectangle with a shaded area at the bottom left. The β_3 domain is a large rectangle with a shaded area at the bottom left. The β_4 domain is a large rectangle with a shaded area at the bottom left. The β_4ab domain is a large rectangle with a shaded area at the bottom left. The β_4abc domain is a large rectangle with a shaded area at the bottom left. A double-headed arrow labeled "可逆化" (Reversible) is positioned above the α_1 and β_1 domains. A single-headed arrow labeled "磷酸化" (Phosphorylation) is positioned above the β_1 domain. A horizontal arrow at the bottom points from H_2N to $COOH$.