

本案已向

國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	2001/02/06	60/266,641	有
英國 GB	2001/08/09	0119438.0	有

有關微生物已寄存於	寄存日期	寄存號碼
-----------	------	------

無



五、發明說明(1)

發明背景

細胞間交流對於細胞整體行為協調相當重要，並於細胞發育、分化、及器官(例如心臟及腦)之正常運作上扮演重要角色。生物體內極大多數細胞種類含有適用於細胞間交流之專門蛋白質，其具有如間隙連結通道之特徵，見 Dermietzel, R., Brain Research Reviews, 26, 176-183, 1998 及 Kumar, N. and Gilula, N., Cell, 84, 381-388, 1996 之回顧。間隙連結通道由以接合素(connexins)代表的蛋白質族組成，一般相信其於細胞表面聚集成為六聚物複合物。所得複合物稱為接合質(connexons)，其與另一細胞上之互補接合質配對時，可於兩細胞間形成連續通道，稱為間隙連結。於特定實驗範例中，未成對之接合質亦展現離子滲透性，稱為半通道。

接合素的命名係根據特定蛋白質之分子量。例如，「Cx43」係指於肝、心及腦中表現之 43 kDa 分子量接合素蛋白質。接合素族之大小因分子轉殖技術而增加。目前，於分子層次已有 11 個人類接合素及 13 個啮齒類接合素被敘述。有些接合素於其編碼序列具多形現象，可能影響其傳導性質或其與間隙連結結合之能力。又，於特定疾病中，鑑定出某些接合素之變異。例如，Cx32 變異型與末梢神經變性症、夏柯馬利吐司氏症(Charcot Marie Tooth disease)相關連。接合素變異亦與耳聾及皮膚病例如掌跖處角皮症相關連，並已鑑定出許多異常之 Cx26 及 Cx31 變異型。Cx46、Cx50 與 Cx43 之變異亦已被鑑定與白內

五、發明說明(2)

障或心臟畸形相關連。Cx37 之變異與女性不孕症相關。接合素亦與腫瘤相關，例如，剔除 Cx32 之小鼠，其由天然及化學引發之肝腫瘤罹病率高。將接合素基因轉染入發生腫瘤的細胞中，可恢復正常生長。基因轉殖小鼠於肝細胞中變異型 Cx32 過度表現之研究顯示，於部分肝切除後之肝臟再生中，Cx32 扮演關鍵角色。

在接合素種類具分子多樣性之此等背景下，很清楚地，間隙連結的組成存在大量之組合可能性。其複雜性分 3 個層次：接合素、接合質、及連結。既定之組織或細胞型通常表現多個接合素。茲已證實兩個接合素組合成為同種性 (homomeric)(由單一物種組成)或異種性 (heteromeric)(由一個以上之接合素蛋白質種類組成)接合質。最後，已證實不同物種之同種性接合質形成功能性連結。基於接合素族成員對組織及細胞具專一性之表現模式，及觀察到接合質之特定組合無法形成功能性連結，使前述可能性範圍有某種程度之減少。雖然如此，一般預期連結的結構將具相當大的分子多樣性，且於藥理及生理上分化而導使成為專一性治療引導劑。

於腦中，鈣過渡體(calcium transients)之連結傳導被認為是憂鬱擴散時及施用麩胺酸後所見鈣波之基本原因 (Venance, L. et al., J. Neuroscience, 17, 1981-1992, 1997)。於暴露於多種毒性侵入(toxic insults)之神經膠質細胞培養物中，觀察到由間隙連結傳介之傷害傳導。對該侵入敏感的細胞經由連結交流，可傳送「死亡訊息」至正常的感覺

五、發明說明(3)

遲鈍之細胞(Lin, J., et al., Nature Neuroscience, 1, 494-500, 1998)。這些作者提示，此現象提供大腦局部缺血後梗塞擴大之模式。心肌細胞之連結結合有助於心臟之心搏傳導。抑制心臟連結傳送會產生心律不整現象；其促進則可

- 5 解除傳導異常(Dhein, S. et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 350, 174-184, 1994)。形態發生之訊息傳遞例如神經胚細胞有系統的遷移、肝細胞之分化、及於腫瘤形成期間之去分化，各被假設係連結結合層次改變的結果，見上文引述之回顧及 Zhu, D. et al., Proc. Natl. Acad.
10 Sci. USA, 89, 10218-10221, 1992。

- 區別接合素傳介之傳導及習知離子通道傳導的特徵之一為間隙連結孔徑較大之特性。的確，已知間隙連結可為大小多達 1 kDa 的各種不同分子所滲透，及容許離子、第二信使、及代謝物(例如環狀 AMP、肌醇三磷酸、鈣及
15 鉀；見上文引述之回顧文獻)通過。

- 偵測間隙連結滲透性之現行試驗係利用孔徑及專一性之相對缺乏。這些試驗與本發明之區別在於使用裝載示蹤物質之細胞。通常，彼等方法包括使用可直接顯現(例如螢光染料)或於酵素性擴增後(例如以生物素標記之示蹤物)
20 被檢測。於刮削-裝載範例中，以尖筆抓搔表面，局部傷害單層培養之細胞。施加螢光染料[例如蟲螢光黃(lucifer yellow)及連接若丹明之葡聚糖]混合物於單層一段時間，然後洗滌細胞，固定，於顯微鏡下予以檢視。此二染料均進入抓搔處附近單層中，充塞於受傷害細胞之細胞質。螢

五、發明說明(4)

- 光黃可以經由間隙連結擴散，將經由間隙連結連接的鄰近細胞染色。對照之下，若丹明葡聚糖為大的聚合物，無法滲透間隙連結，僅能標示抓搔處附近之受傷細胞。相對於若丹明陽性細胞數之蟲螢光素酶陽性數，提供經由間隙連結連接之指標。類似之方法包括經由示蹤物(例如神經生物素)顯微注射，將染料引入單細胞中。另一替換法使用可滲入細胞之螢光染料前驅物，例如羧甲基螢光黃，裝載細胞。在以胞液酯酶將染料裂解後，產生不能滲透細胞膜之染料，例如羧基螢光黃。經裂解之產物保持間隙連結滲透性，並可作為細胞間連接之標記。將裝載細胞之小區域曝露於高強度的光，會藉由所謂螢光漂白法使螢光團永遠失去活性。然後可經時偵測該漂白區域是否回復螢光訊號，此代表該區域被位於連接細胞中之染料分子再裝填。上述方法有幾項限制：其需要機械介入、通常敏感性低、不易定量、及無法進行自動操作。這些特徵使其於發現調控連結傳送之製劑過程中之低限度連接或需進行許多測量情形下之用途受到限制，El Fouly, M.H. et al., Exp. Cell Res., 168, 519-526, 1987; Giuame, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5577-5581, 1991。
- 20 Goldberg 等敘述利用預裝載兩種螢光染料來規避一些上述限制之技術(Goldberg et al., Biotechniques, 18(3): 490-497, 1995)。於此方法中，將含接合素之「給予」細胞裝載可滲入連結之染料(鈣黃綠素-AM)及膜標記染料 DiI (1,1'-兩個十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶胡蘿蔔花青苷)。

五、發明說明(5)

然後洗滌細胞，懸浮，並與未經裝載之含接合素細胞體混合。測量於 DiI 螢光不存在下展現鈣黃綠素螢光之細胞數，以檢測連結傳送。此方法中之染料導入雖然簡單明確，其缺點為需要人力介入或複雜的影像處理方法來鑑定

5 及定量僅展現鈣黃綠素螢光之細胞。

先前技藝亦教示代謝缺陷試驗，其中第一細胞於一部分必要代謝途徑有缺陷，但是具有可通過間隙連結移動的小代謝物之合成能力，第二細胞於相同必要代謝途徑具有不同缺陷，惟可由第一細胞製造之小代謝物予以校正。在
10 將兩個細胞一起培養時，於兩個細胞之間形成功能性間隙連結，該小代謝物移入第二細胞中，因而維持第二細胞之生存力。

本發明所敘述之間隙連結連接試驗具高度靈敏性、定量性，易於自動化而供篩選鑑定調節連結傳送的化合物之
15 大化合物庫用。

發明概述

本發明之試驗提供一種方便、迅速、可重複之研究間隙連結細胞間交流(下文簡稱 GJIC)之方法，詳言之，係提供一種篩選影響 GJIC 的化合物之方法。或者，本發明
20 亦有關鑑定能形成功能性間隙連結的新穎接合素之方法。本發明之重要特徵在於使用兩種不同細胞群，其一細胞為能產生內源信使(messenger)反應之給予細胞系，第二種細胞為對應於內源信使反應時，具有產生通訊反應(reporter response)能力之接受細胞，其中內源信使反應係經由功能

五、發明說明(6)

性間隙連結，或位於給予及接受細胞表面之接合素形成之接合質，而轉移至接受細胞。此試驗之原則為在兩種不同細胞中，將訊息產生(亦即，內源信使反應)與呈通訊反應檢測(可為通訊基因表現之活化)分離，其中需要由接合質
5 形成之活性間隙連結。

發明之詳細說明

本發明之方法係用於鑑定能改變間隙連結功能的試驗化合物，此方法包括

- 10 (1) 於一分析反應中添加試驗化合物，該分析反應含有給予細胞及接受細胞，其中
 - (a) 該給予細胞(1)表現位於細胞表面、形成第一接合質之第一接合素，及(2)於受到外源刺激時，具有產生內源信使反應的能力；
 - (b) 該接受細胞(1)表現位於細胞表面、形成第二
15 接合質之第二接合素，(2)於受到外源刺激時，不能產生內源信使反應，及(3)於受到由給予細胞產生的內源信使反應時，具有產生通訊反應的能力；
 - (c) 第一接合質與第二接合質形成間隙連結；
- 20 (2) 於該分析反應添加外源刺激；及
- (3) 檢測該通訊反應。

「試驗化合物」為任何有機或無機分子，或該等分子之複合物，可為天然存在或合成之分子。較佳之試驗化合物為有機分子，更佳者為小於約 5,000 Da 之有機分子，

五、發明說明 (7)

又更佳者為小於約 2,000 Da 之有機分子。

「能改變」係指試驗化合物影響(無論直接或間接)間隙連結性質(相較於無試驗化合物存在下之性質)之能力。

「改變」包括更改間隙連結性質，例如容許較大的分子通過，以及限制能通過間隙連結的分子之大小。「改變」亦包括完全抑制任何分子通過間隙連結；改變具缺陷之間隙連結，使其回復間隙連結之正常功能；及改變特定間隙連結接合質性質而未改變其他接合質性質，或較小程度地影響其他接合質性質的能力之選擇性。當試驗化合物直接與接合質結合時，則對間隙連結產生直接影響。當試驗化合物與細胞成分(例如轉錄因子)結合或作用，由於該項結合或作用而改變間隙連結時，則謂試驗化合物對間隙連結產生間接影響。

「間隙連結」為毗連細胞間形成之連結複合物，係由直接連接相鄰細胞內部的一群通道所組成。間隙連結由各位於不同細胞上的兩個接合質相連接形成通道而產生，此通道通常容許小分子從一個細胞移入第二個細胞。這些分子的大小典型地為約一至約二 kDa，通常為離子、第二信使例如 cAMP、cGMP、鈣、肌醇三磷酸或細胞代謝物。

「分析反應」通常為適於令細胞-細胞接觸之水性環境，含有給予細胞及接受細胞。較佳之「分析反應」亦包括適於支撐細胞持續生長及/或維生之生長培養基。分析反應較佳為含有一個以上之給予細胞，或者，一個以上之接受細胞。特佳為分析反應含有一個以上接受細胞及一個

五、發明說明(8)

以上給予細胞。

適當接受及給予細胞之選擇並未限制於特定的細胞種類，給予細胞及接受細胞二者也不需相同。適當之給予或接受細胞包括自包含哺乳類細胞株之動物獲得者，特佳之

- 5 細胞株為自人類組織分離或培養者。細胞株可生長於初級培養基中或可使用細胞株。適當細胞株之來源包括得自商業來源，例如美國菌種保存中心(ATCC)，之細胞株。給予細胞及接受細胞不需為相同之細胞類型，但是其為本發明方法最常使用之方式。

- 10 「給予細胞」(1)表現位於細胞表面、形成第一接合質之第一接合素及(2)於受到外源刺激時，具有產生內源信使反應的能力。

- 「接受細胞」(1)表現位於細胞表面、形成第二接合質之第二接合素，(2)於受到外源刺激時，不能產生內源
15 信使反應，及(3)於受到由給予細胞產生的內源信使反應時，具有產生通訊反應的能力。

- 「外源」係指自第一細胞外側產生或源自第一細胞外側，或由於第一細胞外部原因產生，或者，自第一細胞外側引入或產生之物。外源刺激可為由不同細胞產生之胜肽
20 激素、類固醇、或其他分子，或小的有機分子。

「內源」係指源自第一細胞內部，或由於第一細胞內部原因產生之物。內源信使反應典型地為 cAMP、cGMP、鈣、肌醇三磷酸或細胞代謝物。本發明所用之較佳內源信使反應為其大小典型地多達約一至約二 kDa，通

五、發明說明(9)

常為離子、第二信使例如 cAMP、cGMP、鈣、肌醇三磷酸或細胞代謝物之小分子。或者，可使用糖類、核苷酸、胺基酸、脂肪酸、小胜肽、藥物及致癌物作為內源信使反應。

- 5 適用於本發明之「接合素」包含天然及非天然存在之接合素。天然存在之接合素包含正常型(亦即，野生型)以及變異型接合素。變異型接合素包含天然存在的野生型接合素之變異體，例如接續自人類或其他物種者，以及經人工改質之變異體型，其可能包含小鼠-人類嵌合體、或經
- 10 化學改質之人類 Cx43。接合素可選自先前已鑑定為接合素者，如下文表 1(人類接合素)及表 2(啮齒類接合素)所示者，或其同源物或同質物，或另外物種之接合素。為推定接合素(putative connexins)之蛋白質亦可於本發明中使用。推定接合素之鑑定係根據與先前已被鑑定及證明能形
- 15 成接合質之接合素具有高度序列同質性者，較佳為與接合素具有至少 70%序列同質性之蛋白質，更佳為與接合素具有至少 80%序列同質性之蛋白質，又更佳為與接合素具有至少 90%序列同質性之蛋白質。於本發明之一態樣中，本文所述之試驗利用證明一推定接合素能與一已知接
- 20 合素形成間隙連結，而可用於證實鑑定該推定接合素為「接合素」。本發明亦可用於確認推定接合素可與那一個其他接合素形成間隙連結。

五、發明說明 (10)

表 1. 已知人類接合素核酸序列(包含部分轉殖體及序列變異體)及基因庫寄存編號表

名稱	寄存編號	名稱	寄存編號
Cx26	NM_004004	Cx37 變異體	AF139105
Cx26	M86849	Cx37 變異體	AF13904
Cx26	U43932	Cx37 變異體	AF139103
Cx30	NM_006783	Cx37 變異體	AF139102
Cx30	AJ005585	Cx37 變異體	AF139101
Cx31	AF052692	Cx37 變異體	AF139100
Cx31	AF099730	Cx40	NM_005266
Cx31	AJ004856	Cx40	AF151979
Cx31.1	AF052693	Cx40	L34954

Cx31.1	AF099731	Cx43	NM_000165
Cx32	NM_000166	Cx43	AF151980
Cx32	L47127	Cx43	U64573
Cx36	AB037509	Cx43	M65188
Cx36	AF153047	Cx43 偽基因	M65189
Cx37	NM_002060	與Cx43相關之偽基因	Z92542
Cx37	M96789	Cx45	NM_005497
Cx37	AF181620	Cx50	AF217524
Cx37 多形體	AF180815	Cx50	NM_005267

五、發明說明(11)

表 2. 已知啮齒類接合素核酸序列(包含部分轉殖體及序列變異體)及基因庫寄存編號表

名稱	寄存編號	物種	名稱	寄存編號	物種
$\alpha 3$ -接合素(Cx46)	U44955	小鼠	Cx32	X84215	小鼠
Cx26	M81445	小鼠	Cx32	X84214	小鼠
Cx26	M81444	小鼠	Cx32	M81447	小鼠
Cx26	M63803	小鼠	Cx32	M81446	小鼠
Cx30	NM_008128	小鼠	Cx32	M63802	小鼠
Cx30	Z70023	小鼠	Cx36	AF016190	小鼠
Cx30.3	M91443	小鼠	Cx37	X57971	小鼠
Cx31	X63099	小鼠	Cx40	X61675	小鼠
Cx31.1	M91442	小鼠	Cx43	NM_010288	小鼠
Cx31.1	M91236	小鼠	Cx43	U17892	小鼠
Cx32	AJ271753	小鼠	Cx43	X62836	小鼠
Cx43	X61576	小鼠	Cx33	M76534	大鼠
Cx43	M63801	小鼠	Cx36	Y16898	大鼠
Cx43	L10388	小鼠	Cx37	M76532	大鼠
Cx43	M61896	小鼠	Cx40	AF022136	大鼠
Cx43	L10387	小鼠	Cx40	AF021806	大鼠
Cx45	X63100	小鼠	Cx40	AF025765	大鼠
Cx50	NM_008123	小鼠	Cx40	AH006192	大鼠
Cx50	M91243	小鼠	Cx40	AF025767	大鼠
Cx57	NM_010289	小鼠	Cx40	AF025766	大鼠
Cx57	AJ010741	小鼠	Cx40	M83092	大鼠
Cx26	X51615	大鼠	Cx40	M76535	大鼠
Cx30	AF170284	大鼠	Cx43	NM_012567	大鼠
Cx30.3	X76168	大鼠	Cx43	X06656	大鼠
Cx31	M59936	大鼠	Cx43	AH003191	大鼠

五、發明說明 (12)

Cx32	M23565	大鼠	Cx43	L36950	大鼠
Cx32	AH003192	大鼠	Cx43	L36949	大鼠
Cx32	L36875	大鼠	Cx46	X57970	大鼠
Cx32	L36876	大鼠	CXN-311	M76533	大鼠

與疾病相關之哺乳類接合素變異體形式為較佳之接合素變異體形式。

於本發明之一具體實例中，第一及第二接合素係選自已知形成功能性間隙連結之接合素族成員，此包括形成同種性接合質之單一接合素物種或產生異聚性接合質之接合素混合物。給予及接受細胞可具有相同或不同之接合質組成，只要兩個接合質可形成功能性間隙連結即可。因此，此方法可應用於同種及異種間隙連結。接合素可利用轉染引入，及可暫時表現或穩定合併以產生表現接合素之細胞株。或者，此方法可應用於表現內源接合素之細胞而不需轉染。

本發明所用之接合素可為正常表現之原態接合素，此意指細胞於一般培養條件下，能表現特定接合素。接合素之原態表現可為基本的，例如在接合素以可測量之量正常存在於細胞表面時，或者，原態接合素之表現可於已知促進該接合素表現之條件下引入。或者，接合素可為非原態，因此若細胞以帶有編碼接合素且與表現載體連接的DMA之表現載體轉染或轉形，則在非原態啟動子控制下予以表現。本發明用來產生轉染細胞之轉染方法包括磷酸鈣轉染、使用 DEAE-葡聚糖、電穿孔法、或使用陽離子

五、發明說明 (13)

性脂質試劑。以利用反轉錄載體，或者利用同質重組之基因引導之轉染作用，可引入基因。此外，原態接合素可利用轉殖 DNA 之誘變處理(使用，例如，寡核苷酸引導之誘變)、利用以簡併寡核苷酸之誘變處理、利用 PCR 隨機誘變處理、利用 DNA 之連接子掃描誘變處理、或利用使用聚合酶連鎖反應之引導誘變處理，予以選擇性地改變。此外，編碼原態或非原態接合素蛋白質之接合素可藉由使用互相促發的長寡核苷酸之基因合成法重新製造。或者，以非原態啟動子取代原態啟動子(例如，利用同質重組，以另一啟動子取代原態啟動子)之結果，於細胞中表現接合素。適於將細胞轉形或轉染以獲得非原態蛋白質表現之技術及試劑為熟習此項技藝人士所悉知，參見例如，Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons。非原態接合素，例如人類接合素，可於非人類細胞(例如 CHO 細胞、鼠類、或衍生自非人物種之其他細胞)中表現。

形成間隙連結之「接合質」包含同種性(由單一物種接合素組成)或異種性(由一個以上之接合素蛋白質種類組成)接合質。異種性間隙通道可能具有與同種性間隙通道不同的滲透性及調控性，及可提供調控通過其間隙連結通道的分子種類之許多附加選擇。接合質係聚集六個所謂接合素之蛋白質次單元而形成，該等接合素於漿膜中摺疊成大約為「M」之形狀。胺基及羧基終端突出於細胞膜中，接合素其餘部分穿越漿膜四次。接合素之第三跨膜功能部

五、發明說明（14）

位含高比例之親水性胺基酸，被認為係沿著通道內側排列。四個跨膜功能部位及胞外圈環於已轉殖的許多不同接合素之間具有高度保守性，細胞質區域之間則較少同質性。有些接合素於羧基尾端被磷醯化。給予或接受細胞上

5 之接合素可為同物種，例如屬於同組接合素，例如 Cx32；或為不同物種，例如各來自不同組，例如，Cx32 與 Cx43。也可為相同組但選自不同動物或哺乳類物種之接合素，例如小鼠 Cx32 及人類 Cx32。接合素可為天然存在的接合素，或為與疾病狀態相關之變異體形式。接合

10 素可為非天然存在的接合素，其中接合素一或多個功能部位之一或多個胺基酸被不同接合素對應功能部位之胺基酸取代、被相同電荷、極性、或大小之胺基酸取代、或被刪除之嵌合體。或者，磷醯化接合素羧基尾端之磷醯化區域被通常未磷醯化之接合素取代，或添加於通常未磷醯化之

15 接合素。於一較佳具體實例中，在第一及第二細胞表面形成之接合質形成功能性間隙連結，而容許小分子例如糖類、核苷酸、胺基酸、脂肪酸、小胜肽、藥物及致癌物之細胞間傳送。亦可瞭解由第一及第二接合質形成之間隙連結不正常或有缺陷，則相對於其他間隙連結，小分子之傳

20 送將受損或甚至被阻止。

於本發明另一具體實例中，分析的目的在於鑑定修復有缺陷的間隙連結形式或變異體。此等分析在鑑定能回復與疾病相關的變異體間隙連結的正常功能之試驗化合物時，特別有用。於該等具體實例中，接合質形成有缺陷的

五、發明說明 (15)

間隙連結，通常失去小分子細胞間傳送的能力，或具有受損之細胞間傳送。然而，如果試驗化合物能改變該有缺陷之間隙連結，則可於接合質之間形成功能性間隙連結，使第二信使訊號可於接受細胞中誘導出可檢測之反應。此等

5 分析可用於篩選「校正性」試驗化合物，而非「抑制性」試驗化合物。

於本發明另一具體實例中，分析的目的可為鑑定影響接合素表現之試驗化合物。例如，生理、藥理及膳食因素常以細胞專一性之方式改變接合素之表現。Cx32 及 Cx26
10 於肝細胞中之表現因糖皮質激素而增加，於肝上皮細胞中則不然，參見例如，Kwiatkowski, A.P., et al., Carcinogenesis 15:1753-1758(1994), Ren, P., et al., Carcinogenesis 15:1807-1814(1994)，及 Ren, P., and Ruch, R.J., Carcinogenesis 17:2119-2124(1996)。雌激素增加
15 Cx43 之轉錄作用(Yu, W. et al., Proc. R. Soc. Lond [Biol] 255:125-132(1994))。cAMP、佛可林(forskolin)、及胰增血糖素增加 Cx32 與 Cx43 於特定細胞中之轉錄作用(參見例如，Saez, J.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:2473-2477(1986), Traub, O., et al., Eur. J. Cell Biol. 43:48-
20 54(1987), Mehta, P.P., et al., Mol. Biol. Cell 3:839-850(1992), Burghardt, R.C., et al., J. Membr. Biol. 148:243-253(1995), 及 Matesic, D.F., et al., Neuroendocrin. 64:286-297(1996))。因此，可建立間隙連結之形成係取決於接合素在接受及/或給予細胞中的表現之分析。於一此等分析

五、發明說明 (16)

中，功能性間隙連結之形成係取決於 Cx32 在給予肝細胞中之表現，此表現因糖皮質激素而增加。或者，可建立改變給予及/或接受細胞的接合素於轉錄後的調控作用，例如接合素之磷醯化作用，進而影響其形成功能性間隙連結之穩定性及/或能力之分析。含 Cx32 的間隙連結之降解可利用由鈣活化之蛋白酶、 μ -鈣蛋白酶及 m-鈣蛋白酶傳介，Cx50 係由鈣蛋白酶於眼部水晶體中處理。

於本發明之又另一具體實例中，可建立測定試驗化合物的腫瘤發生性質或抗腫瘤發生性質能力之分析。許多致癌基因例如 ras、neu 及 src，阻斷 GJIC。因此，可建立測定試驗化合物經由其於給予或接受細胞中表現或抑制致癌基因而改變間隙連結的能力之分析。

於本發明之又另一具體實例中，可改變分析條件而測定推定接合素是否能與已知接合素形成功能性間隙連結。因此，本發明之一態樣為鑑定及確認推定接合素，及以此等推定接合素鑑定功能性接合質之方法。於一態樣中，係在接受或給予細胞中表現推定接合素，另一者細胞，分別為給予或接受細胞，則表現已知接合素。於以已知試驗化合物刺激後，或於適於產生內源信使反應之條件下，如果接受細胞表現通訊反應，則推定接合素被鑑定係能形成間隙連結，因此，該推定接合素被鑑定係功能性接合素。

於本發明之又另一具體實例中，可改變已知接合素之一或多個胺基酸，以測定此等改變對於形成功能性接合質能力之衝擊。此改變可包括以相同大小、極性、疏水性之

五、發明說明 (17)

胺基酸取代單一胺基酸，或可包括刪除或添加一或多個胺基酸。若內源信使反應係憑藉誘發通訊反應予以檢測，則該胺基酸之改變或該部位之改變對於接合素形成功能性接合質之能力應影響很小或無影響。若通訊反應不是在活化

5 未改變的接合素中之通訊反應條件下予以檢測，則經改變之胺基酸於形成功能性接合質之能力上具有重要角色。因此，本發明之此具體實例得以鑑定與功能性接合質之形成相關之特定胺基酸。

給予細胞可含適當激動劑認識之膜受體。有多種受體

10 可使用，包括給予細胞之內源受體。主宰給予細胞受體選擇之唯一需求為其於接受細胞中不存在。通常係利用轉染，將編碼細胞表面受體之 cDNA 分子引入給予細胞中。可使用暫時轉染或穩定表現。較佳為於給予細胞中穩定地表現經轉染之受體，其中需使用精選之標記，及將已

15 於其基因體內併入編碼受體的 DNA 之細胞單離。

「外源刺激」係指分析反應中之任何外源變化，包括添加諸分子，例如受體之天然存在之配位體、激動劑、拮抗劑、逆激動劑等，或其他可滲入細胞之化合物。如果接受細胞對於可滲入細胞之化合物不具反應之能力，則以可

20 滲入細胞之化合物為適當。例如，如果接受細胞不具腺苷酸環化酶，則適當之外源刺激可包含可滲入細胞之腺苷酸環化酶活化劑，例如佛可林。適當之外源刺激亦包含能於第一細胞而不於第二細胞產生內源信使反應之分析反應環境條件之化學、物理或任何外源變化，例如溫度變化。較

五、發明說明 (18)

佳外源刺激可與位於細胞表面之一或多個與 G 連接之蛋白質受體(GPCRs)或其他受體結合或將其活化，進而活化腺苷酸環化酶或鳥苷酸環化酶，分別使 cAMP、或 cGMP 含量增加。可使用能引發可檢測的內源信使反應之其他途

5 徑，以增加鈣或肌醇三磷酸之含量。

多種激動劑可用來活化給予細胞上之受體。激動劑之選擇取決於其在不影響接受細胞下，活化給予細胞之專一性。激動劑必須對間隙連結之滲透性不具固有影響，對細胞生存力不具有害影響，及於受體不存在下，對通訊系統
10 之活性無影響。

較佳內源信使反應包含能通過間隙連結而於第二細胞引發可檢測反應之由第一細胞產生之任何生物反應。可檢測反應之引發可為直接性的，例如於第一細胞中環狀腺苷單磷酸(cAMP)含量增加，進而引發例如連接於含有
15 cAMP 反應元件(CRE)的啟動子-通訊子構築體的第二通訊基因之轉錄作用。如果內源信使反應為鈣，則可檢測之反應可為接受細胞中水母發光蛋白(aequorin)之活化作用。或者，如果內源信使反應為肌醇三磷酸，則可檢測之反應可為連接於含有 SRE 或 TRE 反應元件的啟動子-通訊子
20 構築體之通訊基因。本發明中亦可使用其他反應元件，如類固醇性反應元件，例如雌激素反應元件。類固醇性反應元件包含內源或天然存在之類固醇性反應元件，及經改質或變異之類固醇性反應元件。

可檢測反應之引發亦可為間接性的，例如由信使反應

五、發明說明 (19)

含量之增加促使活化附加之途徑，而於一些位點，在第二細胞中產生可檢測之反應。於一具體實例中，外源刺激只能抑制接受細胞中之組成蛋白質而不能抑制給予細胞中之組成蛋白質，此結果只有在給予細胞與接受細胞為不同細胞型，或雖為相同細胞型，但其中一者或兩者均於遺傳上有所改變時才可能達成。可檢測反應之引發包括引發細胞途徑，例如引發細胞凋亡，其中內源信使反應增加死亡訊息蛋白質之含量，進而引發細胞凋亡途徑中蛋白質之轉錄作用。於使用該等系統時，檢測方法可與細胞生存力或細胞死亡結合。

多種通訊構築體為此項技藝中已知而可用於本發明方法，只要該通訊構築體適用於檢測藉由活化給予細胞上之受體而產生之第二信使即可。通訊構築體由含對第二信使誘發的改變具反應之元件之啟動子序列所組成。啟動子序列為啟動基因之轉錄作用以產生 mRNA 之 DNA 序列，及可為 RNA 聚合酶(轉錄酶)之連接位點。啟動子可含 TATA 框、或見於原核生物之普里布諾框(Pribnow box)。啟動子序列係位於容許其調控編碼易檢測蛋白的 DNA 序列轉錄之位置。或者，可使用分子生物技術將已知之通訊子改質，以產生具有檢測所需生化事件優勢之經改質之通訊系統。已知之啟動子序列實例包含，惟不限於，cAMP 反應元件(CRE)、血清反應元件(SRE)、TPA 反應元件(TRE)。已知、易檢測之蛋白質實例為蟲螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯黴素乙醯轉化酶、及水母發光蛋白。

五、發明說明 (20)

被考慮實施本發明所用轉錄調控元件之其他實例包含具血管活性之腸胜肽基因啟動子(cAMP 反應性; Fink et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85:6662-6666)、生長激素釋放抑制因子基因啟動子(cAMP 反應性; Montminy et al. 5 (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. 83:6682-6686)、腦啡肽原啟動子(對 cAMP、菸鹼酸激動劑、及巴豆毒醇酯具反應性; Comb et al. (1986), Nature 323:353-356)、磷酸烯醇丙酮酸羧酸激酶基因啟動子(cAMP 反應性; Short et al. (1986), J. Biol. Chem. 261:9721-9726)、NGFI-A 基因啟動 10 子(對 NGF、cAMP、及血清具反應性; Changelian et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. 86:377-381)等。

表 3. 經選定之受體、通訊子、及激動劑組合實例

受體	通訊子	激動劑
D ₁ -多巴胺	6CRE-蟲螢光素酶	阿撲嗎啡 (Apomorphine)
D ₁ -多巴胺	6CRE-β-半乳糖苷酶	阿撲嗎啡
α _{1A} -腎上腺素功能藥物	粒線體水母發光蛋白	苯基腎上腺素
M ₃ -蕁毒鹼性乙醯膽鹼	粒線體水母發光蛋白	胺甲醯膽鹼
β-腎上腺素功能藥物	6CRE-蟲螢光素酶	異丙基腎上腺素
具血管活性之腸多肽	6CRE-蟲螢光素酶	具血管活性之腸多肽
A _{2A} -腺苷	6CRE-蟲螢光素酶	CGS 21680
5HT ₇ -羥色胺	6CRE-蟲螢光素酶	8-羥基 DPAT
P _{2y} -嘌呤功能藥物	粒線體水母發光蛋白	ATP

五、發明說明 (21)

「檢測通訊反應」意指分析反應混合物中是否存在所需通訊分子。所用方式取決於所選擇之通訊子。如果通訊子係表現通常不在接受細胞中表現之蛋白質，則適當的檢測方式包括測定通訊蛋白是否被表現之方法。非典型或外源蛋白質之表現可能為最常見之第二通訊子，可使用任何適當蛋白質，例如蟲螢光素酶、綠螢光蛋白質(GFP)、及其在其他波長發螢光的許多改質形式、或-半乳糖苷酶，並易於以標準實驗流程檢測。或者，第二通訊子可能為通常由接受細胞表現的蛋白質之抑制作用。若該可檢測之反應為引發細胞凋亡，則通訊反應之檢測可能包含使用生存性染色、或其他比色分析染料、或 DNA 梯度測定。於細胞凋亡試驗中，惟有接受細胞必須成為細胞凋亡，而非給予細胞。

除了上述之外，其他通訊基因包含 CAT(Alton and Vapnek (1979), Nature 282:864-869)；螢火蟲蟲螢光素酶(deWet et al. (1987), Mol. Cell. Biol. 7:725-737)；細菌蟲螢光素酶(Engebrecht and Silverman (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. 1:4154-4158; Baldwin et al. (1984), Biochemistry 23:3663-3667)；鹼性磷酸酶(Toh et al. (1989), Eur. J. Biochem. 182:231-238)等。

很明顯地，此分析對增加及降低連結的滲透性之試劑均敏感。此類調節作用從相對於缺乏調節劑時，調節劑存在下的通訊系統之輸出明白可見。於調節劑物質存在下增加的反應表示其為有助於連結滲透性之物質，而較低之反

五、發明說明 (22)

應代表其為間隙連結封阻劑。

於本發明之一具體實例中，該訊號為以適當激動劑刺激「給予細胞」細胞膜中細胞表面受體，例如多巴胺 D1-受體，引致之細胞間 cAMP 含量增加。激動劑對受體之活化作用產生第二信使反應。於 D1 受體之情形下，此反應為環狀腺苷單磷酸(cAMP)細胞間濃度之提升。第二信使訊號之檢測係根據獨特地侷限於「接受細胞」中之轉錄試驗。接受細胞含有質體，其具有對第二信使作用之生化結果敏感之啟動子序列。例如，D1 受體誘發之 cAMP 增加可利用含有 cAMP 反應元件(CRE)、驅使編碼通訊酵素(例如螢火蟲螢光素酶)DNA 之轉錄的適當啟動子-通訊子構築體予以檢測。本發明之獨特特徵在於第二信使之產生及其檢測發生於兩個不同細胞，且只有在功能性間隙連結存在才可能發生。當這些條件滿足時，接受細胞中 cAMP 細胞間濃度增加，一種造成 CRE 活化及螢火蟲螢光素酶轉錄之通訊級聯即在運行，其存在易於利用化學發光試驗予以檢測。

由於通訊蛋白只在給予細胞與接受細胞間存在 GJIC 時才產生，因此此分析系統易於用來鑑定改變間隙連結滲透性之試劑。於添加受體激動劑(例如以阿撲嗎啉活化 D1 多巴胺受體)後，利用接受細胞中化學發光訊號大小之改變可檢測該等化合物。使用於相關第二信使物種中產生與受體無關的增加之適當物質來證明通訊系統之健全。於 D1 受體實例中，為腺苷酸環化酶活化劑之雙帖佛可林，

五、發明說明 (23)

可於給予及接受細胞中用來提升 cAMP，及增加通訊酵素之含量。

前述實驗中使用兩種細胞，於下文分別予以討論。第一組實驗乃有關已知內源地表現功能性接合素通道，因此
5 展現具效能的 GJIC 之細胞類型。所選定代表此類細胞之細胞株為 NRK (正常大鼠腎細胞，見述於 Li, H., et al., J. Cell Biol., 134(4):1019-30, 1996)及 CHO(中國倉鼠卵巢細胞)。

由於許多細胞通常表現多種接合素，且一般已知許多
10 不同的接合素可補償缺陷接合素之不足，表現多種接合素之原態細胞對於接合素族特定成員之研究用途較少。因此，下述實例亦說明使用未具內源可檢測 GJIC 之細胞，利用帶有適當接合素 cDNA 質體之轉染，使其產生 GJIC。本文中用於此類實驗例示之細胞型為海拉細胞株
15 (Graeber, S.H.M. and Hulser, D. Exp'l Cell Res., 243, 142-149, 1998)。

下文所述所有實驗均根據下述實驗流程進行。

實驗流程

第 1 天：於適當培養基中，以每 6 公分培養盤大約
20 1.5 百萬個細胞之密度進行細胞之平板培養。

第 2 天：根據 Optimem Plus 實驗流程，分別以各種質體(例如，CRE-蟲螢光素酶、D1-受體、Cx32、Renilla 蟲螢光素酶)轉染給予細胞及接受細胞。簡言之，於室溫，以 Plus 試劑將適量 DNA 預培養 15 分鐘，然後與經

五、發明說明 (24)

稀釋之 Lipofectamine 試劑混合，於室溫再培養 15 分鐘。
接著逐滴添加轉染溶液(每個培養盤 1.5 毫升)至各含 5 毫升 Optimem 培養基之培養盤中。在添加 6.5 毫升含 20% 胎牛血清之 Optimem 培養基之前，於 37°C 將各盤培養 3
5 小時。然後使細胞於 37°C 生長隔夜。

第 3 天：在下文所示時間，進行下述步驟：

時間=0 小時：培養盤以磷酸鹽緩衝鹽液(PBS)清洗一次，於胰蛋白酶或 Cell Dissolution Solution(細胞分解液，Sigma)中收集細胞，離心(500 rpm，2 分鐘)，再懸浮於 12
10 至 14 毫升培養基中；然後將其分配於 12 或 24 槽培養盤之各槽中，至總容積分別為 1.2 毫升或 0.5 毫升；給予細胞與接受細胞之比率各實驗均不相同(見下文)；然後將培養盤放回培養箱中，令細胞附著二至三小時。

時間=2 1/2 小時：適當時，以抑制劑(試驗化合物於
15 載劑中)或僅以載劑處理細胞；本實例所用載劑為 DMSO 及 0.1%抗壞血酸。

時間=3 小時：以刺激劑(阿撲嗎啉、佛可林、cAMP，各於載劑中)或僅以載劑處理細胞。

時間=9-11 小時：收集細胞；自各槽將培養基抽離；
20 使用 CHO 或海拉細胞之實驗，細胞以 PBS 清洗一次；NRK 細胞則不進行此步驟，因其易自培養盤脫離；然後使用得自 Promega Dual 蟲螢光素酶通訊子套組(見下文)之 Passive Lysis 緩衝液收集細胞成 200-250 微升(12 槽培養盤)或 100 毫升(24 槽培養盤)；將該等溶胞液移入微離心

五、發明說明 (25)

管中，於-80℃貯存隔夜。

- 第4天：於實驗桌上，將細胞解凍，於14,000 rpm，在桌上型離心機中離心2分鐘；將20微升上澄液移入白色96槽培養盤中；以50微升 Promega Dual 蟲螢光素酶套組提供之試劑分析 Renilla 及螢火蟲螢光素酶活性。

結果計算

典型地，實驗係進行三重複或四重複。將螢火蟲訊號常態化成為 Renilla 訊號，以說明細胞數及轉染效率之差異。結果以平均值± S.E.M.表示。

10 材料

- NRK 及海拉細胞用細胞培養基：帶有依爾氏平衡鹽溶液，1%麩胺醯胺(GIBCO-BRL)、10%胎牛血清、1%丙酮酸鈉及1%非必要胺基酸之基本培養基。
- CHO 細胞用細胞培養基：Ham F12 培養基，10%胎牛血清及1%青黴素-鏈黴素溶液(GIBCO-BRL)
- CHO-K1 細胞，ATCC 目錄#CCL-61
- 海拉細胞，ATCC 目錄#CCL-2
- NRK 細胞，ATCC 目錄#CRL-6509
- pRL-SV40 (Promega, E2231)、pRL-CMV (Promega, E2261)
- 20 -細胞分解液(Sigma, C5914)
- Lipofectamine Plus (GIBCO, 10964-013)
- Dual Luciferase Reporter Assay System(雙蟲螢光素酶通訊分析系統)(Promega, E1910)
- 阿撲嗎啉鹽酸鹽(Merck Chemical Co. 1161)

五、發明說明 (26)

-18- α -甘草次酸(Sigma, G8503)

各實驗中，於使用前，才將阿樸嗎啉於含 0.1%抗壞血酸之 DMSO 中稀釋成 10 mM 貯液濃度。將環狀 AMP 溶於水中。所有其他化合物均溶於 DMSO 及 0.1%抗壞血酸(載劑)中。阿樸嗎啉、環狀 AMP 及佛可林均呈 1000x 貯液予以添加。化合物添加代表最高為槽容積之 1.5%，並使用相同容積之載劑作為對照組。

實例 1 具有內源間隙連結接合素之間隙連結試驗

A. 具有內源 GJIC 的細胞之實驗

10 NRK(正常大鼠腎臟)細胞主要表現 Cx43 並具有有效之 GJIC (Li, H., et al., J. Cell Biol., 134(4):1019-39, 1996)。因此，這些實驗中，沒有外源接合素 DNA 被轉染。

A.1. 從給予細胞至接受細胞之由間隙連結傳介之反應轉移

15 每 6 公分培養盤，以 10 微克 D1-受體 DNA 及 500 奈克 pRLSV40 DNA(給予細胞)或 10 微克 CRE-蟲螢光素酶 DNA 及 500 奈克 pRLSV40 DNA(接受細胞)轉染細胞。以 5:1 之給予細胞:接受細胞比率將細胞接種於 24 槽培養盤
20 之各槽。於收集細胞前，以緩衝液或阿樸嗎啉處理細胞 6 小時。其結果示於下文表 4。表中之數值代表 3 個測定之平均值 $\pm$ SEM。

五、發明說明 (27)

表 4

激動劑	接受細胞反應
緩衝劑	100 ± 4.9%
阿樸嗎啉	324 ± 14.4%

A.2.NRK 細胞不表現內源 D1-受體

進行這些實驗以研究 NRK 細胞是否內源地表現 D1-
5 受體。如果 NRK 細胞內源地表現 D1 受體，則接受細胞
將不受 GJIC 及給予細胞釋出之內源信使之影響而可釋出
cAMP 及產生化學發光訊號。因此此實驗僅使用接受細
胞。

每 6 公分培養盤，以 5 微克 CRE-蟲螢光素酶 DNA
10 及 500 奈克 pRLSV40 DNA 轉染細胞。使 24 槽培養盤之
各槽接收 250 微升細胞懸浮液及 250 微升培養基，或大約
25 000 個細胞。於收集細胞前，以 10 μ M 佛可林或阿樸
嗎啉刺激細胞 6 1/2 小時。蟲螢光素酶反應為 100.0 % $\pm$
19.9(對照組)、124.8 % $\pm$ 6.8(阿樸嗎啉)及 876.6 % $\pm$
15 64.1(佛可林)。

這些結果顯示，於 NRK 細胞中，阿樸嗎啉無法誘發
反應，表示內源 D1-受體不存在。對照之下，cAMP 不受
受體影響之刺激劑，佛可林，則引致化學發光訊號 8 倍以
上之增加，表示 CRE-蟲螢光素酶之轉染成功，將訊號自
20 cAMP 傳達蟲螢光酶表現所需之細胞內裝置是完整的。

五、發明說明 (28)

A.3. cAMP 之擠出及再攝取不對所觀察之 CRE-蟲螢光素酶活化作用負責

此試驗之目的為測定 GJIC。由於已知環狀 AMP 可滲透間隙連結，因此專一性地被選擇作為訊號分子。然而，
5 另一項可能性亦不可被忽視：於阿撲嗎啉刺激 D1-受體後，給予細胞釋出之 cAMP 可能被擠壓進入胞外周圍環境，由於被動擴散通過接受細胞之細胞膜而被攝入，如此將構成 GJIC 存在之「假陽性」訊息。惟，由於 cAMP 不穩定且無法輕易地滲入細胞膜，因此發生上述一連串事件
10 的可能性很小。經測定，胰增血糖素對人體之 IV 注射可使血漿之 cAMP 含量達到 200 nM (Komatsu, R., Tsushima, N. Matusyama, T. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 17, 271-277, 1997)。我們測試 1 μ M cAMP 外源添加於給予及接受細胞混合物之效果。

15 每 6 公分培養盤，以 10 微克 D1-受體 DN Δ 及 500 奈克 pRL-SV40 轉染給予細胞；以 5 微克 CRE-蟲螢光素酶及 500 奈克 pRL-SV40 轉染接受細胞。以 1:1 之比率混合給予細胞及接受細胞並接種於 12 槽培養盤(每槽 1 毫升或 100 000 個細胞)。以 10 μ M 佛可林或 1 μ M cAMP 刺激細
20 胞 6 小時。蟲螢光素酶反應為 $100.0 \pm 1.9\%$ (對照組)、 $669.3 \pm 56.8\%$ (佛可林)及 $87.5 \pm 5.8\%$ (cAMP)。

這些結果表示，過量的外源 cAMP 不會活化接受細胞中螢火蟲蟲螢光素酶之轉錄。因此，cAMP 訊號從給予細胞傳送到接受細胞是經由 GJIC 而發生。

五、發明說明 (29)

A.4. 阿樸嗎啉誘發接受細胞中之化學發光訊號，其可被 GJIC 之已知抑制劑專一性地抑制

每 6 公分培養盤，以 5 微克 D1-受體 DNA 及 500 奈克 pRL-SV40 轉染 NRK 給予細胞，及以 5 微克 CRE-蟲螢光素酶 DNA 及 500 奈克 pRL-SV40 轉染 NRK 接受細胞。以 1:1 之比率將其混合，並取 500 微升(大約 50,000 個細胞)平板培養於 24 槽培養盤。於 37°C 放置 2 1/2 小時，使細胞沉澱。然後添加三種不同濃度之 GJIC 抑制劑，18- α -甘草次酸(18-AGA) (Davidson, J.S., Baumgarten, I.M., Harley, E.H., Biochem. And Biophys. Res. Comm., 134(1), 29-36, 1986)。抑制劑之添加量為於 DMSO 中總容積之 1.5%最高容積，對照組則使用相同容積之 DMSO。30 分鐘後，添加呈 1000x 貯液之佛可林及阿樸嗎啉(各 10 μ M)，令其接觸 6 1/2 小時，其結果示於下文表 5。

表 5. 結果

激動劑	載劑	50 μ M AGA	100 μ M AGA	150 μ M AGA
對照組	100.0 $\pm$ 19.4%	100.0 $\pm$ 21.3%	100.0 $\pm$ 5.2%	100.0 $\pm$ 8.4%
阿樸嗎啉	297.5 $\pm$ 21.7%	156.0 $\pm$ 8.9%	137.6 $\pm$ 9.3%	109.7 $\pm$ 8.0%
佛可林	581.3 $\pm$ 47.2%	732.6 $\pm$ 52.2%	669.9 $\pm$ 18.3%	685.8 $\pm$ 32.0%

這些結果顯示，相對於對照組之化學發光訊號，阿樸嗎啉可引致 3 倍量之增加。由於只有接受細胞具有蟲螢光素酶質體，因此代表 GJIC 存在。GJIC 之已知抑制劑，

五、發明說明 (30)

18- α -甘草次酸，可以依存濃度之方式降低此作用。此 AGA 作用並不是由於對 cAMP 反應之細胞裝置之非專一性作用，因為無關於 GJIC 之佛可林之反應並不受影響。

B. 無內源 GJIC 的細胞之實驗

5 海拉細胞衍生自人類惡性腫瘤並缺乏 GJIC (Graeber, S.H.M., and Hulser, D.F., Expl Cell Res., 243, 142-149, 1998 及見下文)。使用暫時轉染，我們證實 George 等於 Biochem and Biophys Res Comm, 247(3):785-789, 1998 中所述之實驗，該實驗證明於引入編碼 Cx32 之 DNA 後，
10 海拉細胞可用於表現 GJIC。下文實例進一步證明本發明之試驗可檢測由 Cx32 傳介之 GJIC。

I. 將含有六個重複 CRE 單元(TGACGTCA)之核苷酸序列，SEQ ID NO. 1，自 Sac I (最先六個鹼基，GAGCTC)及 Blg II 位點(最後六個鹼基，AGATCT)轉殖入得自
15 Promega 之 pGL3 載體(GenBank 寄存編號 U47295)中。
SEQ ID NO. 1

GAGCTCCGATAAGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGAGGCGATAAGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGAG
GCGATAAGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGCTCCGATAAGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGCTCCGATA
AGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGCTCCGATAAGGGCTCGTTGACGTCAACCAAGCTCACTGTGTGCGAC
GCGTGCAAGGACTCTATATACAGAGGGAGCTTCCTAGCTGGGATATTGGAGCAGCAAGAGGCTG
GGAAGCCATCACTTACCTTGCACTGAGATCT

II. 將人類 D1 受體(得自 Duke University，其序列亦揭示於 Dearry, A., et al., Nature 347(6288), 72-76 (1990)，寄存
20 編號 X55760)自 Bam HI 位點轉殖入 pcDNA3.1zeo

五、發明說明 (31)

(Invitrogen, V860-20) 中。編碼受體之核苷酸以大寫字母表示，載體序列以小寫字母表示。

gacggatcgggagatctcccgatcccctatggcgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgc
ttgtgtgttgaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgct
tagggtaggcgttttgcgctgcttcgcgatgtacggccagatatacgcttgacattgattattgactagtattaatagtaataattacg
gggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggccgcttggtgaccgccaacgacccccgc
ccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaattccattgacgtcaatgggtggactattacggtaaactgc
ccactggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggccgcttggtcattatgccca
gtacatgaccttatgggactttctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtagcatcaat
ggcggtggatagcggttgactcacgggattccaagctccacccattgacgtcaatgggagtttggcaccacaaatcaacgg
gactttccaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtggaggtctatataagcagagctct
ctggctaactagagaacccactgcttactggcttatcgaaattaatacgtactcattataggagacccaagctggttagcggttaactta
agcttggtaccgagctcggatccaagATGAGGACTCTGAACACCTCTGCCATGGACGGGACTGG
GCTGGTGGTGGAAAGGGACTTCTCTGTTCGTATCCTCACAGCCTGTTTCCTGTCGC
TGCTCATCCTGTCCACGCTCCTGGGGAACACGCTGGTCTGTGCTGCCGTTATCAGG
TTCCGACACCTGCGGTCCAAGGTGACCAACTTCTTTGTCATCTCCTTGGCTGTGTC
AGATCTCTTGGTGGCCGTCCTGGTTCATGCCCTGGAAGGCAGTGGCTGAGATTGCT
GGCTTCTGGCCCTTTGGGTCCTTCTGTAACATCTGGGTGGCCTTTGACATCATGTG
CTCCACTGCATCCATCCTCAACCTCTGTGTGATCAGCGTGGACAGGTATTGGGCTA
TCTCCAGCCCTTTCCGGTATGAGAGAAAGATGACCCCCAAGGCAGCCTTCATCCT
GATCAGTGTGGCATGGACCTTGTCTGTACTCATCTCCTTCATCCCAGTGCAGCTCA
GCTGGCACAAGGCAAAACCCACAAGCCCCTCTGATGGAAATGCCACTTCCCTGGC
TGAGACCATAGACAACCTGTGACTCCAGCCTCAGCAGGACATATGCCATCTCATCC
TCTGTAATAAGCTTTTACATCCCTGTGGCCATCATGATTGTCACCTACACCAGGAT
CTACAGGATTGCTCAGAAACAAATACGGCGCATTGCGGCCTTGGAGAGGGCAGC

五、發明說明 (32)

AGTCCACGCCAAGAATTGCCAAACCACCACAGGTAATGGAAAGCCTGTCTGAATGT
 TCTCAACCGGAAAGTTCTTTTAAGATGTCTTCAAAAGAGAACTAAAGTCCTGA
 AGACTCTGTCTGGTGATCATGGGTGTGTTTGTGTGCTGTTGGCTACCTTTCTTCATCT
 TGAAGTGCATTTTGGCCTTCTGTGGGTCTGGGGAGACGCAGCCCTTCTGCATTGAT
 TCCAACACCTTTGACGTGTTTGTGTGGTTTGGGTGGGCTAATTCATCCTTGAACCC
 CATCATTTATGCCTTTAATGCTGATTTTCGGAAGGCATTTTCAACCCTCTTAGGAT
 GCTACAGACTTTGCCCTGCGACGAATAATGCCATAGAGACGGTGAGTATCAATAA
 CAATGGGGCCGCGATGTTTTCCAGCCATCATGAGCCACGAGGCTCCATCTCCAAG
 GAGTGCAATCTGGTTTACCTGATCCCACATGCTGTGGGCTCCTCTGAGGACCTGA
 AAAAGGAGGAGGCAGCTGGCATCGCCAGACCCTTGGAGAAGCTGTCCCAGCCC
 TATCGGTCATATTGGACTATGACACTGACGTCTCTCTGGAGAAGATCCAACCCAT
 CACACAAAACGGTCAGCACCCAACCTGAggatccactagtccagtgtggtggaattctgcagatatccagca
 cagtggcggccgctcagtgtagaggggccgttaaacccgctgacagccctgactgtgccttctagtgccagccatctgtgttggc
 cctccccgtgccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtagg
 tgcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggt
 gggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcgg
 cgggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcggcctagcggcgctccttctgcttcttcccttcttctgccac
 gttcggcgcttccccgtcaagctctaatacggggcatcccttaggggtccgatttagtccttacggcacctcgaccccaaaaaactg
 attagggtgatgttcacgtagtggccatcgccctgatagacggtttctgcccttgacgttgaggatccagcttcttaatagtggactctt
 gttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctttgattataagggttttggggatttcggcctattggttaaaaaatgagc
 tgatttaacaaaaatttaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgcagtaggggtgtggaagtcgccaggctcccaggcaggcagaa
 gtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtggaagtcgccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgca
 tctcaattagtcagcaaccatagtcggcccttaactccggccatcccgcccttaactccggccaggttcggccattctccggccatgg
 ctgactaattttttttatgacagggccgaggccgctctgctctgagctattccagaagttagtgaggagcctttttgaggcctagg
 cttttgcaaaaagctcccgggagcttgatatccatttctggatctgacagcacgtgttgacaaltaatcatcggcatagtatatcggcata
 gtataatacgacaagggtgaggaactaaaccatggccaagttgaccagtgcggttccggtgctaccgcgcgcgacgtcggcgagcg
 gtcgagttctggaccgaccggctcgggttctccgggacttcgtggaggacgacttcggcggtgtggtccgggacgacgtgacctgt
 tcatcagcgcgggtccaggaccagggtggtgccggacaacacctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacggcga
 gtggtcggaggtcgtgtccacgaacttcgggacgcctccggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggaggga
 gttcggcctgcgcgacccggcggaactgcgtgcacttcgtggcgaggagcaggactgacacgtgtacgagatttcgattccacc
 gccgccttctatgaaaggttgggttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatctccagcgcggggatctcatgctggagttc
 ttccgccacccaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttactgca
 ttctagttgtggttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatacatggtcatagct
 gtttctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtgtg

五、發明說明 (33)

agctaactcacattaattgcgttgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcg
 cggggagaggcggtttgcgtattggcgctctccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcggcgttcggctgcggcgagcggta
 tcagctcactcaagcggtataacggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaag
 gccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtc
 agaggtggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctgtgcgtctcctgttccgaccctgcc
 gcttaccggatacctgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatcicagttcgggttaggtcgt
 tcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgatccaacccggt
 aagacacgacttatcgcactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtctacagagttcttgaag
 tggtagcciaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgtctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttggtagct
 ctgatccggcaaacaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaag
 atcctttgatcttttctacggggtcgtgcgtcagtggaacgaaactcacgttaagggattttgtcatgagattatcaaaaaggatcttca
 cctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatcctaaagtatatatagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagttag
 gcacatatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtgataactacgatacgggagggttaccatct
 ggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccga
 gcgcagaagtgtcctgcaacttatccgctccatccagcttattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtt
 gcgcacggtgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaagg
 cgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtggtatc
 actcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattct
 gagaatagtgtatcgggcgaccgagttgctcttgcggcggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtc
 atcattggaaaacgttctcggggcgaaaactcgaagatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcacccaact
 gatcttcagcatcttttactttcaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgaca
 cggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtattta
 gaaaaataaacaatagggggttccgcgcacattccccgaaaaagtgccacctgacgtc

B.1. 海拉細胞除非以 Cx32 DNA 轉染，否則不具 GJIC

以 500 奈克 pRL-SV40、5 微克 D1-受體 DNA (序列提供於上)及添加或不加 4.8 微克 Cx32 DNA 轉染含海拉
 5 給予細胞之六公分培養盤(Paul, D.L., J. Cell Biol. 103, 123-134, 1986)。以相同方法轉染接受細胞，惟以 5 微克 CRE-蟲螢光素酶取代 D1-受體 DNA。

五、發明說明 (34)

收集經轉染之細胞，將其再懸浮於 14 毫升培養基中，於 12 槽培養盤之各槽中進行平板培養(1 毫升給予細胞 + 0.2 毫升接受細胞)。令細胞附著 3 小時，然後以 10 μ M 阿樸嗎啉、10 μ M 佛可林或載劑進行刺激。其結果示於下文表 6。表中之數值代表單一實驗二重複之平均值 $\pm$ SEM。

表 6

	以 Cx32 轉染之細胞*	未以 Cx32 轉染之細胞*
對照組	100.0 $\pm$ 6.6%	100.0 $\pm$ 14.5%
阿樸嗎啉	109.5 $\pm$ 1.1%	217.5 $\pm$ 3.0%
佛可林	272.5 $\pm$ 40.9%	254.6 $\pm$ 113.3%

*所示結果以對照組之百分比表示。

這些實驗顯示，阿樸嗎啉只在共轉染 Cx32 時，方可誘發接受細胞之反應。此結果證明專一性接合素 cDNA 之轉染可誘發可利用本發明試驗測定之 GJIC。未以 Cx32 轉染的細胞則無反應，亦表示接受細胞未具有內源 D1-受體。此可由添加阿樸嗎啉至僅含接受細胞之槽中之實驗如預期地未誘發反應而獲得證實。蟲螢光素酶活性值為 100.0 $\pm$ 6.5%(對照組，n=2)及 75.9 $\pm$ 3.0%(阿樸嗎啉，n=2)。

五、發明說明 (35)

B.2. GJIC 的效能可利用轉染的 Cx32 DNA 之量予以調控

以 2.4 微克 D1-受體 DNA、500 奈克 pRL-CMV DNA 及 2.4 微克(單劑量)或 4.8 微克 Cx32 DNA(雙劑量)轉染給予細胞。以 2.4 微克 Cx32 DNA、500 奈克 pRL-5 CMV DNA 及 2.4 微克 CRE-蟲螢光素酶轉染接受細胞。

收集細胞，將其再懸浮於 14 毫升培養基中。於 12 槽培養盤之各槽中進行平板培養(1 毫升給予細胞，0.2 毫升接受細胞)，培養 30 分鐘，然後添加 10 μ M 阿撲嗎啉、10 μ M 佛可林或對照試劑。其結果示於下文表 9。表中所示數據代表二重複之平均值 $\pm$ SEM。

表 9

激動劑	單劑量 Cx32	雙劑量 Cx32
對照組	100.0 $\pm$ 0.4%	100.0 $\pm$ 12.3%
阿撲嗎啉	121.1 $\pm$ 7.2%	176.5 $\pm$ 8.1%
佛可林	139.0 $\pm$ 14.3%	195.1 $\pm$ 18.2%

這些數據顯示，GJIC 之效能可藉由使用較大量 Cx32 轉染而增加。

15

五、發明說明 (36)

C. 外源接合素 DNA 於具有 GJIC 的細胞中之表現

這些實驗中使用 CHO 細胞(中國倉鼠卵巢細胞)。每 6 公分培養盤以 3.6 微克 D1-受體 DNA、500 奈克 pRL-SV40 及添加或不加 3.6 微克 Cx32 DNA 轉染 CHO 給予細胞。以 3.6 微克 CRE-蟲螢光素酶 DNA、500 奈克 pRL-SV40 及添加或不加 3.5 微克 Cx32 DNA 轉染 CHO 接受細胞。

將細胞再懸浮於 14 毫升培養基中，於 12 槽培養盤之各槽中進行平板培養(1 毫升給予細胞，0.2 毫升接受細胞)。於 37°C 培養 3 小時後，於收集細胞之前，以 10 μ M 阿撲嗎啉、10 μ M 佛可林或載劑處理細胞 8 小時。其結果示於下文表 8。表中所示數據為二重複測定之平均值 $\pm$ SEM。

表 8

激動劑	無外源 Cx32	有外源 Cx32
對照組	100.0 $\pm$ 13.2%	100.0 $\pm$ 4.3%
阿撲嗎啉	222.6 $\pm$ 22.6%	302.2 $\pm$ 2.2%
佛可林	701.9 $\pm$ 0.0%	356.5 $\pm$ 21.8%

15

這些數據顯示，相較於內源 GJIC 背景，外源 Cx32 之表現可增加細胞交流，可能係經由形成另外的間隙連結通道。

五、發明說明 (37)

D. 使用不同細胞種類的給予與接受細胞及利用給予細胞上的內源受體之實例

本發明之一具體實例為使用不同細胞種類之給予及接受細胞。此外，於此具體實例中，若內源受體獨特地存在
5 給予細胞上，則可予以使用。中國倉鼠卵巢(CHO-K1)細胞具有與核苷酸環化酶之刺激作用相連接之內源促腎上腺皮質素釋放因子(CRF)受體。如下文所述以 Cx32 轉染
10 CHO-K1 細胞係用於產生給予細胞群。每 6 公分培養盤以 500 奈克 pRL-SV40 及添加或不加 3.6 微克 Cx32 DNA 轉染 CHO-K1 單層細胞。以 3.6 微克 CRE-蟲螢光素酶 DNA、500 奈克 pRL-SV40 及添加或不加 3.5 微克 Cx32 DNA 轉染 C6- 神經交質瘤接受細胞。

將細胞再懸浮於 14 毫升培養基中，於 12 槽培養盤之各槽中進行平板培養(1 毫升給予細胞，0.2 毫升接受細胞)。
15 於 37°C 培養 3 小時後，於收集細胞之前，以 100 nM CRF、10 μ M 佛可林或載劑處理細胞 8 小時。以 CRF 刺激之經 Cx32 轉染細胞之通訊子活性增加，表示 GJIC 存在。

上述實例意在說明本發明而不擬對本發明之範圍構成
20 局限。

四、中文發明摘要（發明之名稱：

間隙連結滲透性之分析

本發明乃有關一種間隙連結分析方法，並提供確認接合素 (connexins) 之方法及鑑定影響間隙連結功能的化合物之方法。

英文發明摘要（發明之名稱：

Gap junction permeability assay

The present invention is a gap junction assay method and provide methods for both characterizing connexins and for identifying compounds that affect gap junctions function.

I312808

公告本

96年7月23日

修正
補充

申請日期：91. 2. 4

IPC分類

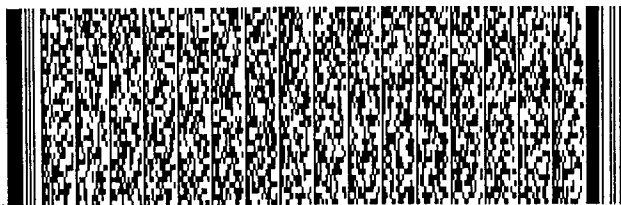
申請案號：91101835

C12Q 1/02, 1/42, G01N 33/50, 33/566

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	間隙連結滲透性之分析
	英文	Gap junction permeability assay
二、 發明人 (共2人)	姓名 (中文)	1. 巴安恩 2. 房布克
	姓名 (英文)	1. Ann J. BARBIER 2. Bruce M. BARON
	國籍 (中英文)	1. 美國 US 2. 美國 US
	住居所 (中文)	1. 美國加州拉喬亞茵達大道7421號 2. 美國紐澤西州西廣場市林蔭大道763號
	住居所 (英文)	1. 7421 Eads Avenue, La Jolla, California 92037, U.S.A. 2. 763 Boulevard, Westfield, New Jersey 07090, U.S.A.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	1. 阿凡提斯藥品公司
	名稱或 姓名 (英文)	1. Aventis Pharmaceuticals Inc.
	國籍 (中英文)	1. 美國 US
	住居所 (營業所) (中文)	1. 美國紐澤西州橋水市企業路55號 (本地址與前向貴局申請者不同)
	住居所 (營業所) (英文)	1. 55 Corporate Drive, Bridgewater, New Jersey 08807, USA
	代表人 (中文)	1. 歐蘿絲
	代表人 (英文)	1. Ross J. Oehler



修正
97.10.02 補充

六、申請專利範圍

1. 一種鑑定能改變間隙連結功能的試驗化合物之方法，
包括

(1) 於一分析反應中添加試驗化合物，該分析反應
含有給予細胞及接受細胞，其中

5 (a) 該給予細胞(1)表現位於細胞表面、形成第
一接合質(connexon)之第一接合素
(connexin)，及(2)於受到外源刺激時，具有
產生內源信使(messenger)反應的能力；

10 (b) 該接受細胞(1)表現位於細胞表面、形成第
二接合質之第二接合素，(2)於受到外源刺
激時，不能產生內源信使反應，及(3)於受
到由給予細胞產生的內源信使反應時，具
有產生通訊反應(reporter response)的能力；

(c) 第一接合質與第二接合質形成間隙連結；

15 (2) 於該分析反應添加外源刺激；及

(3) 檢測該通訊反應；

其中該通訊反應為連接於含有 cAMP 反應元件(CRE)
的啟動子-通訊子構築體之第二通訊基因之轉錄作用、
水母發光蛋白(aequorin)活化作用、或連接於含有 SRE
20 或 TRE 反應元件的啟動子-通訊子構築體之通訊基
因；且

其中該通訊反應係利用測量外源蛋白質之表現量予以
檢測；且

其中該外源蛋白質係選自包括螢火蟲螢光素酶、細

六、申請專利範圍

菌蟲螢光素酶、鹼性磷酸酶、綠螢光蛋白質(GFP)、及在與 GFP 不同波長處發螢光之改質型 GFP、 β -半乳糖苷酶、及 CAT 之組群。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一接合素
5 係給予細胞中之原態接合素。

3. 根據申請專利範圍第 2 項之方法，其中該原態接合素為哺乳類接合素。

4. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。
10

5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第二接合素係接受細胞中之原態接合素。

6. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中該原態接合素為哺乳類接合素。

7. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。
15

8. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一接合素或第二接合素係選自包括 cx32 之原態哺乳類接合素之組群。
20

9. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一接合素係給予細胞中之非原態接合素。

10. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該非原態接合素為哺乳類接合素。

六、申請專利範圍

11. 根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第二接合素
5 係接受細胞中之非原態接合素。
13. 根據申請專利範圍第 12 項之方法，其中該非原態接合素為哺乳類接合素。
14. 根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合
10 素、或鼠科接合素之組群。
15. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一接合素或第二接合素係選自包括 cx32 之非原態哺乳類接合素之組群。
16. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該第一接合素
15 或第二接合素係非天然存在之接合素。
17. 根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該非天然存在之接合素為原態接合素一或多個功能部位中之一或多個胺基酸被不同原態接合素對應功能部位之胺基酸取代之嵌合體接合素。
- 20 18. 根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該非天然存在之接合素為原態接合素一或多個功能部位中之一或多個胺基酸被相同電荷、極性、或大小之胺基酸取代或被刪除之嵌合體接合素。
19. 根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該非天然存在

六、申請專利範圍

之接合素為磷醯化接合素羧基尾端之磷醯化區域被通常未磷醯化之原態接合素取代，或添加於通常未磷醯化之原態接合素，之嵌合體接合素。

20. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該內源信使反應係環狀腺苷單磷酸(cAMP)、鈣、或肌醇三磷酸含量增加。

21. 一種鑑定能改變間隙連結功能的試驗化合物之方法，包括

(1) 於一分析反應中添加外源刺激，該分析反應含有給予細胞及接受細胞，其中

(a) 該給予細胞(1)表現位於細胞表面、形成第一接合質之第一接合素，及(2)於受到外源刺激時，具有產生內源信使反應的能力；

(b) 該接受細胞(1)表現位於細胞表面、形成第二接合質之第二接合素，(2)於受到外源刺激時，不能產生內源信使反應，及(3)於受到由給予細胞產生的內源信使反應時，具有產生通訊反應的能力；

(c) 第一接合質與第二接合質形成間隙連結；

(2) 於該分析反應添加試驗化合物；及

(3) 檢測該通訊反應；

其中該通訊反應為連接於含有 cAMP 反應元件(CRE)的啟動子-通訊子構築體之第二通訊基因之轉錄作用、水母發光蛋白活化作用、或連接於含有 SRE 或 TRE

六、申請專利範圍

反應元件的啟動子-通訊子構築體之通訊基因；且

其中該通訊反應係利用測量外源蛋白質之表現量予以檢測；且

其中該外源蛋白質係選自包括螢火蟲蟲螢光素酶、細菌蟲螢光素酶、鹼性磷酸酶、綠螢光蛋白質(GFP)、及在與 GFP 不同波長處發螢光之改質型 GFP、 β -半乳糖苷酶、及 CAT 之組群。

5

22. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第一接合素係給予細胞中之原態接合素。

10 23. 根據申請專利範圍第 22 項之方法，其中該原態接合素為哺乳類接合素。

24. 根據申請專利範圍第 23 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。

15 25. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第二接合素係接受細胞中之原態接合素。

26. 根據申請專利範圍第 25 項之方法，其中該原態接合素為哺乳類接合素。

20 27. 根據申請專利範圍第 26 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。

28. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第一接合素或第二接合素係選自包括 cx32 之原態哺乳類接合素之組群。

六、申請專利範圍

29. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第一接合素係給予細胞中之非原態接合素。
30. 根據申請專利範圍第 29 項之方法，其中該非原態接合素為哺乳類接合素。
- 5 31. 根據申請專利範圍第 30 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。
32. 根據申請專利範圍第 31 項之方法，其中該第二接合素係接受細胞中之非原態接合素。
- 10 33. 根據申請專利範圍第 32 項之方法，其中該非原態接合素為哺乳類接合素。
34. 根據申請專利範圍第 33 項之方法，其中該哺乳類接合素係選自包括人類接合素、靈長類接合素、老鼠接合素、或鼠科接合素之組群。
- 15 35. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第一接合素或第二接合素係選自包括 cx32 之非原態哺乳類接合素之組群。
36. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該第一接合素或第二接合素係非天然存在之接合素。
- 20 37. 根據申請專利範圍第 36 項之方法，其中該非天然存在之接合素為原態接合素一或多個功能部位中之一或多個胺基酸被不同原態接合素對應功能部位之胺基酸取代之嵌合體接合素。
38. 根據申請專利範圍第 36 項之方法，其中該非天然存在

六、申請專利範圍

之接合素為原態接合素一或多個功能部位中之一或多個胺基酸被相同價數、極性、或大小之胺基酸取代或被刪除之嵌合體接合素。

39. 根據申請專利範圍第 36 項之方法，其中該非天然存在
5 之接合素為磷醯化接合素羧基尾端之磷醯化區域被通常未磷醯化之原態接合素取代，或添加於通常未磷醯化之原態接合素，之嵌合體接合素。

40. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該內源信使反
10 應係環狀腺苷單磷酸(cAMP)、鈣、或肌醇三磷酸含量增加。

裝

訂

線