

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5622345号
(P5622345)

(45) 発行日 平成26年11月12日(2014.11.12)

(24) 登録日 平成26年10月3日(2014.10.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 14/705	(2006.01)	C 07 K 14/705
C12N 1/15	(2006.01)	C 12 N 1/15
C12N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19
C12N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21
C12N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 1

請求項の数 23 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-569011 (P2001-569011)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月13日 (2001.3.13)
 (65) 公表番号 特表2004-512009 (P2004-512009A)
 (43) 公表日 平成16年4月22日 (2004.4.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2001/002791
 (87) 國際公開番号 WO2001/070811
 (87) 國際公開日 平成13年9月27日 (2001.9.27)
 審査請求日 平成20年2月21日 (2008.2.21)
 審判番号 不服2012-1102 (P2012-1102/J1)
 審判請求日 平成24年1月20日 (2012.1.20)
 (31) 優先権主張番号 100 13 732.6
 (32) 優先日 平成12年3月21日 (2000.3.21)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 397056695
 サノフィー・アベンティス・ドイチュラント
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
 テル・ハフツング
 ドイツ連邦共和国デー- 65929 フラン
 クフルト・アム・マイン・ブリュニングシ
 ュトラーセ 50
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系疾患および心血管系疾患の標的であるカリウムチャネルタンパク質KCNQ5

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S E Q I D N o . 2 のアミノ酸配列を有し、カリウムチャネル活性を有するポリペプチドをコードする D N A 。

【請求項 2】

次の群のポリヌクレオチド配列：

a) S E Q I D N o . 1 のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、及び
 b) a) に定義されるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド
 から選択される請求項 1 記載の D N A 。

【請求項 3】

D N A が哺乳類の部分である請求項 1 または 2 記載の D N A 。

【請求項 4】

D N A がヒトの部分である請求項 1 または 2 記載の D N A 。

【請求項 5】

ベクターが、

a) 原核細胞または真核細胞においてベクターを増殖に適したものとするポリヌクレオチドエレメント、
 b) 請求項 1 ~ 4 のうちのいずれかに記載の D N A
 からなるものである、組換え D N A ベクター。

【請求項 6】

10

20

原核細胞において、ベクターを増殖に適当なものとするポリヌクレオチドエレメントからなる、請求項 5 記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 7】

バクテリア細胞が *Escherichia coli* または *Bacillus spec* の細胞である、請求項 5 または 6 記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 8】

真核細胞において、ベクターを増殖に適当なものとするポリヌクレオチドエレメントからなる請求項 6 記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 9】

細胞系の細胞が COS 細胞系、HeLa 細胞系、または 3T3 細胞系であり、酵母細胞が *Saccharomyces cerevisiae* の細胞である、請求項 8 記載の組換え DNA ベクター。 10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の DNA が関連 RNA の転写および / または関連タンパク質の発現をさせるプロモーターエレメントに実施可能に結合するものである、請求項 5 ~ 9 のいずれかに記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 11】

プロモーターエレメントが原核プロモーターである、請求項 10 記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 12】

プロモーターエレメントが真核プロモーターである、請求項 10 記載の組換え DNA ベクター。 20

【請求項 13】

プロモーターエレメントが誘導可能である請求項 11 または 12 記載の組換え DNA ベクター。

【請求項 14】

請求項 5 ~ 13 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの組換え DNA ベクターを包含する宿主細胞。

【請求項 15】

宿主細胞が真核細胞または原核細胞である、請求項 14 記載の宿主細胞。

【請求項 16】

原核細胞がバクテリアである、請求項 15 記載の宿主細胞。 30

【請求項 17】

真核細胞が細胞系の細胞である、請求項 15 記載の宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 5 ~ 13 のいずれかに記載の組換え DNA ベクターにより宿主細胞が形質転換されるものである、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載の宿主細胞の製造方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の DNA の一つにコードされたタンパク質。

【請求項 20】

第 1 に請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載の宿主細胞を培養し、第 2 にその細胞を採集して処理し、次いで第 3 にタンパク質の精製をすることにより製造される、請求項 19 記載のタンパク質。 40

【請求項 21】

a) 請求項 19 または 20 記載のタンパク質を用意すること；

b) 少なくとも 1 つの化合物を用意すること；

c) 上記 b) の化合物を上記 a) のタンパク質とインキュベートすること；

d) 上記 a) のタンパク質の活性を測定すること

からなる、請求項 19 または 20 に記載のカリウムチャネル活性を有するタンパク質の活性の修飾に適した化合物を同定する方法。

【請求項 22】

50

請求項 21 の a) に記載のタンパク質が、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載の宿主細胞内に提供され、その宿主細胞がそのタンパク質を発現するものである、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

請求項 21 の a) に記載のタンパク質が KCNQ3 と相互作用するものである、請求項 21 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、新規なカリウムチャネルタンパク質である KCNQ5 に関するものであり、それは中枢神経系疾患および心血管系疾患の標的であると考えられている。そのタンパク質は 10 中枢神経系および心血管系の疾患の症状を改善する化合物を同定するためのスクリーニングツールとして用いられている。

【0002】

電位依存性カリウムチャネルは静止膜電位のキー・レギュレーターであり、ニューロンおよび心筋細胞のような電気的に活性な細胞の興奮性を調節する。電位依存性 K^+ チャネルのクラスのいくつかがクローニングされており、恐らく全てが 4 つの α -タンパク質サブユニットの会合によって、オリゴマーのタンパク質を形成する。さらに、4 量体のポア複合体は、ポアを形成する β -サブユニットによって媒介される電流を増強および / または修飾する補助的なサブユニットと相互作用できる。

【0003】

電位依存性 K^+ チャネルである KCNQ ファミリーは、元来 6 個の膜貫通型ドメインおよび特徴的なポア領域を有し、 K^+ チャネルタンパク質をコードする KCNQ1 遺伝子 (KvLQT1) のポジショナルクローニングによって確立された。従来、KCNQ ファミリーはその全てがヒト疾患に関連する 4 つのメンバーからなる。KCNQ1 は単一の膜貫通ドメインを有する小さな α -サブユニットタンパク質である KCNE1 と機能的に相互作用し、心筋細胞の緩徐活性化型遅延整流性 I_{KS} 電流を生じる。両方のサブユニットにおける不活性化型突然変異により、QT 延長症候群 (LQTS) の患者にて心室活動電位の延長および心室不整脈の危険が増加するという結果になる。また、KCNQ1 および KCNE1 は内耳で発見され、KCNE1 および KCNQ1 の機能的変異のいくつかの欠失は聴力損失と関連する。おそらく腸において KCNQ1 は構造的に関連した KCNE3 タンパク質に関与し、異なる K^+ チャネルを生成している。KCNQ1/KCNE3 チャネル複合体は、先端の (apical) cAMP 刺激性塩化物イオン分泌における重要な結腸陰窩における基底外側の (basolateral) cAMP 制御された K^+ コンダクタンスを示し、それは分泌性下痢および結腸線維症に関係している。

【0004】

KCNQ2 および KCNQ3 は脳で発現し、多様な脳領域において共局在する (Biervert, C. et al.; Science 279, 403-406, 1998)。一方、KCNQ2 は KCNQ1 と大変似た K^+ 電流を発生する (Schroeder, B.C. et al.; Nature 396, 687-690, 1998)。KCNQ3 は、単独で小さい電流のみを作り出す (Wang, W.-P. et al., J. Biol. Chem. 273, 19419-19423, 1998)。KCNQ2 および KCNQ3 の両方を共発現させることにより、KCNQ2 単独の電流よりも少なくとも 10 倍大きい電流が結果として生じた (Wang, H. S. et al.; Science 282, 1890-1893, 1998) ことから、KCNQ3 は KCNQ2 および KCNQ3 サブユニットのヘテロマー複合体を形成することによって、KCNQ2 サブユニットの発現を促進するということが示唆された。KCNQ2 および KCNQ3 をコードする遺伝子は、ヒト胎児のてんかんの形態とそれらが連鎖するためにクローニングされ、機能損失 (loss of function) 型突然変異は、良性家族性新生児痙攣 (BNFC) の患者の両方の遺伝子において同定された (Sigh, N. A. et al.; N. Genet. 18, 25-29, 1998; Charlier, C. et al.; N. Genet. 18, 53-55, 1998)。てんかんは脳における電気的な異常興奮性によるものであるので、KCNQ は神経系において重要な安定化の役割を担っているようである。KCNQ2/KCNQ3 電流の生物物理学的および薬理学的な特徴は、ムスカリノン様の調節によっても特徴付けられ、同様に神経の興奮性の重要なレギュレータであると考えられている自然のニューロンの M 型 K^+ 電流の特徴と極めて類似している。自然の M 型電流と同

10

20

30

40

50

様に、KCNQ2/KCNQ3チャネル活性は、ムスカリノン性アセチルコリンアゴニストによって強く減少し、それ故に、現在、KCNQ2およびKCNQ3サブユニットは自然のM型チャネルに貢献すると考えられている。

【0005】

この遺伝子ファミリーの他のメンバーであるKCNQ4は、うずまき管の外毛感覚細胞 (sensory outer hair cell) において発現しており、優性難聴において突然変異している。また、興味深いことには、KCNQ/KCNQ3共発現で観察されたよりもずっと少ない範囲ではあるが、KCNQ3およびKCNQ4の共発現により電流の振幅が増加する。これにより異なるKCNQチャネルが組み合わさって、神経系の異なった部分におけるM型電流の変形を生じるという可能性が生じる。

10

【0006】

本発明の課題は、多様な疾患の治療のための標的として使用するために、KCNQファミリーに属する他のメンバーの遺伝子（タンパク質を含む）を同定することであった。

【0007】

KCNQ5は脱分極によって活性化され、他のKCNQチャネルによって生じる電流と極めて類似するK⁺チャネルを作り出す。KCNQ5は骨格筋および脳において発現し、その発現パターンは、自然のM型電流の基礎になるKCNQ2およびKCNQ3の発現パターンと重複する。KCNQ2と同様に、KCNQ5はKCNQ3と機能的ヘテロマーを形成し、これはおそらく、ニューロンのM型チャネルもまたKCNQ5サブユニットを含むことができるということを示唆するものである。

20

【0008】

本発明の主題は、KCNQ5活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列に関するもので、そのポリペプチドは次の群から選択される：

- a) カリウムチャネルであるKCNQ5のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- b) SEQ ID No.2のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- c) b)が1つまたはそれ以上のアミノ酸において欠失するものであるポリペプチド、
- d) b)に関して1つまたはそれ以上のアミノ酸が置換されているポリペプチド。

【0009】

さらに、本発明はDNA配列に関するものであり、そのDNA配列は、次の群のポリヌクレオチド配列の少なくとも1つから選択される：

30

- a) SEQ ID No.1のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、
- b) a)に関するポリヌクレオチド配列にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- c) a)に関するポリヌクレオチド配列に、低または中程度のストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、
- d) a)、b)、またはc)の1つに定義されたようなポリヌクレオチド配列に相補性を有するポリヌクレオチド配列。

【0010】

上記のようなDNA配列は、KCNQ5に対する遺伝子が存在する各器官のゲノムの部分であることができる。特に、そのDNA配列は哺乳類またはヒトの部分である。本発明の目的のための哺乳類の内で好ましい種類は、マウスおよびラットである。

40

【0011】

さらに、本発明は、組換えDNAベクターに関するものであり、前記ベクターはポリヌクレオチド配列からなり、原核細胞または真核細胞における増殖に好適なベクターに関するもので、KCNQ5のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列をコードする、前述のDNA配列である。この増殖に好適なベクターに関するDNA配列は、複製起点であることができ、原核細胞または真核細胞において正しく機能する。原核細胞で機能する複製起点の例は、co IE1 oriである。組換えベクターには、さらに、ベクターを含むこれらの生物の増殖を制御するための選択マーカーが必要である。選択マーカーとして好適なものは、抗生物質（例えばアンピシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール）から生物を保護する

50

(抗生物質耐性)遺伝子か、または細胞内タンパク質として発現される場合に環境的条件(独立栄養で増殖する条件)から除去された化合物の存在下で増殖させる遺伝子である。

【0012】

前記の組換えベクターの増殖のための本発明の好ましい実施態様においては、原核細胞はバクテリアである。本発明の特に好ましい変形においては、バクテリアは特にEscherichia coliまたはBacillus specのバクテリアである。前記組換えベクターの増殖のための本発明のさらに好ましい実施態様においては、真核細胞は、細胞系の細胞または酵母細胞である。本発明の特に好ましい変形においては、細胞系の細胞がCOS細胞系、HeLa細胞系または3T3細胞系の細胞であり、酵母細胞がSaccharomyces cerevisiaeの細胞である。

【0013】

前記組換えDNAはプロモーター配列を提供でき、それはKCNQ5のアミノ酸配列またはポリヌクレオド配列をコードするDNA配列に操作可能に結合しており、関連RNAの転写および/または関連タンパク質の発現をさせる。このプロモーター配列は、原核プロモーターまたは真核プロモーターから本発明の好ましい変形をとることができ。真核プロモーターが真核生物で転写を誘導することによって特徴付けられるように、原核プロモーターは、原核生物における転写を誘導することによって特徴付けられる。原核プロモーターおよび真核プロモーターの配列の両方が、好ましい誘導プロモーターまたはさらに好ましい構造プロモーターであることができる。誘導プロモーターは、シグナルが存在する場合にのみスイッチされる。

【0014】

シグナルは生物の代謝によって生じ得る。次に、シグナルはしばしば代謝産物、ホルモン、巨大分子の分解産物または他の代謝誘導物質からなる。また、シグナルは環境から提供され得る。

【0015】

次に、それは環境由来の放射線照射、温度または化合物から構成され得る。構造プロモーターは、活性化のために誘導する必要が全くない。

【0016】

さらに本発明は宿主細胞を包含し、この宿主細胞は前記の組換えDNAベクターの少なくとも1つからなる。宿主細胞は原核細胞または真核細胞由来が好ましい。宿主細胞が原核細胞である場合に、宿主細胞はバクテリア、特に、Escherichia coliまたはBacillus specの細胞であることが好ましい。この宿主細胞が真核細胞で構成される場合には、宿主細胞は細胞系の細胞、特に、COS細胞系、HeLa細胞系または3T3細胞系または酵母細胞、特にSaccharomyces cerevisiaeの細胞であるのが好ましい。

【0017】

この宿主細胞は、KCNQ5のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列をコードするDNA配列からなる、組換えDNAベクターによって前記の宿主細胞を形質転換させることによって作製することができる。例えばリン酸カルシウム沈殿法またはエレクトロポレーション法によるコンピテント細胞の形質転換のような、微生物学で用いられる通常の方法によって形質転換することができる。

【0018】

また、本発明は、前記のDNA配列の1つによりコードされるタンパク質に関する。このタンパク質はKCNQ5活性を有する。KCNQ5活性は、このタイプのトランスポータのイオン輸送によって特徴付けされる。さらに、包含されるものはタンパク質の製造であり、それは最初にKCNQ5のアミノ酸配列およびポリヌクレオチド配列をコードするDNA配列を含む組換えベクターを含有する宿主細胞は、関連する細胞のタイプによってバクテリア用または真核細胞用の培地のいずれかから選択される好適な増殖培地にて増殖する。

第2に、この増殖した細胞は遠心分離または濾過のような生化学の常法によって採集され、処理されて、細胞粗抽出物を得る。第3に、次いでこれらの細胞抽出物はサイズ交換クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー他といったタンパク質精製に用いられる方法によって精製され、細胞溶解液の他の組成

10

20

30

40

50

物から単離した興味のあるタンパク質 (KCNQ5)を得られる。

【0019】

さらに、本発明は、化合物の同定のための方法を包含し、その化合物は、

- a) KCNQ5またはKCNQ5活性を有するタンパク質を用意すること、
- b) 少なくとも1つの化合物を用意すること；
- c) b)の化合物とa)のタンパク質とをインキュベートすること；
- d) a)のタンパク質の活性を測定すること

からなる、前記のようなKCNQ5活性を有するタンパク質の活性の修飾に好適である。

本発明の好ましい実施態様において、a)からクレームされたようにKCNQ5活性を有するタンパク質は、前記のような宿主細胞内に提供される。KCNQ5は、この発明の目的のため10に本発明のさらに好ましい変形において、他のタンパク質と相互作用し得る。特に、それはKCNQ3と相互作用する。このようなスクリーニングアッセイは、KCNQ5活性を修飾する少なくとも1つの化合物を同定するのに適用でき、それは中枢神経系または心血管系の疾患に影響を与える。

【0020】

さらに、本発明は、次の工程；

- a) 生物学的材料を用意して、
- b) 生物学的材料とKCNQ5活性を有するタンパク質の活性を修飾する化合物、そして必要な場合には参照目的で、KCNQ5活性を調節しない化合物と、インキュベートし；
- c) 生物学的材料とb)の化合物とをインキュベートした後に、KCNQ5活性を有するタンパク質の活性を測定すること

からなるKCNQ5活性を有するクレームされたようなタンパク質の検出方法に関する。20

【0021】

さらに、本発明に包含されるものは、異なる部分、特にKCNQ5活性を修飾するのに適した化合物からなる試験キットである。

このような化合物は、KCNQ5活性を有するタンパク質の修飾のためのこの試験用キットの部分として適用でき、前記のような方法に従って同定され得る。

【実施例】

【0022】

実施例1：KCNQ5の分子クローニングおよび発現

カリウムチャネルKCNQファミリーの新規なメンバーであるKCNQ5を単離した。その遺伝子は、脳および骨格筋の異なった領域において発現している。アフリカツメガエル卵母細胞で発現させた場合に、KCNQ5は単独では電位依存性であり、K⁺チャネル遮断薬であるTEAに非感受性であるK⁺選択性電流をゆっくり活性化する、正の膜電圧で著しい内向き整流を示す。関連するKCNQ3チャネル内で共発現するとK⁺電流の増幅が4～5倍に増加した。また、ホモマーのKCNQ5電流に比較して、KCNQ3/KCNQ5ヘテロマーの電流は、遅延活性化および内向き整流の減少を示し、KCNQ5がKCNQ3と結合して機能性チャネルタンパク質を形成することを示す。ニューロンM様電流の既知のタンパク質サブユニットであるKCNQ5およびKCNQ3間における機能的相互作用は、KCNQ5がおそらく自然のニューロンM様電流に貢献できると示唆される。40

最初に、KCNQ5遺伝子はGenBankのホモロジーサーチにおいてゲノムサーベイシーケンス(BACクローン) (寄託番号 AQ344243)として同定された。この配列を用いて、ヒト脳cDNAライブラリー (Edge BioSystemsから市販)をスクリーニングした。合成された全長のcDNA構築物は、2つの重複するcDNAクローンから集められて、アフリカツメガエル用発現ベクターであるpSGEM中にサブクローニングされた(Villmann, C. et al.; J. Neurosci. 17, 7634-7643)。cDNAは自動DNAシークエンサー(ABI 310)を用いて、両鎖の配列決定された。アフリカツメガエル卵母細胞にて発現させるために、キャップ化された。cRNAはT7 mMessage mMachineキット(AMBION)を用いて合成した。ノーザンプロット分析用には、DIG標識された長さ1.6kbのリボプローブ(主にC末端配列を含有する)を製品説明書に従ってDIGR NA Labeling kit (ROCHE Diagnosticsから市販)で作製し、一連のヒトRNAプロット(CLONT 50

ECHから市販)とハイブリダイズした。

【0023】

実施例2: KCNQ5の染色体上の局在性

蛍光In Situハイブリッド形式(FISH, Genome Systemsから市販)分析は、KCNQ5の染色体上の位置決定を決定するために実施された。簡単に言えば、BACクローン(AQ344243)から精製されたDNAは、ニックトランスレーション法によってジゴキシゲニンドUTPで標識し、標識されたプローブをPHA刺激された末梢血液リンパ球から誘導されたヒトの中期染色体にハイブリダイズした。KCNQ5に特異的なシグナルは、蛍光抗ジゴキシゲニン抗体を用いて第6番染色体の長腕(6q14)に検出され、次にDAPIで対比染色し、以前6p21にマップされたゲノムのクローンと共にハイブリダイズすることによって確認した。

10

【0024】

実施例3: 電気生理学

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵母細胞をトリカインで麻酔した動物から得た。卵巣をOR2溶液(NaCl 82.5mM, KCl 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 5mM, pH 7.4)中で120分間コラゲナーゼ(1mg/1mL, Worthington, タイプII)処理し、次いでND-96(NaCl 96mM, KCl 2mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 5mM, pH 7.4)、さらにピルビン酸ナトリウム(275mg/L)、テオフィリン(90mg/L)およびゲンタマイシン(50mg/L)を加えた記録(recording)溶液中に18℃で保存した。卵母細胞は、hKCNQ5、rKCNQ3(GenBank寄託番号AF087454)、hKCNQ2およびhKCNQ1をコードする10ngのcRNAと個別に注入するか、または10ngのhKCNQ5に加えて、5ng hlsk(KCNE1)、hMiRP1(KCNE2)、hMiRP2(KCNE3)、mMiRP3(KCNE4)をそれぞれ共に注入した。rKCNQ3は、プローブとしてDIG標識された(ROCHE)ESTクローン(GenBank寄託番号AA019129)を用いてZAP cDNAライブラリー(STRATAGENE)からクローン化された。公開されたシークエンス(13)から得られたプライマーを用いて、hMiRP1およびhMiRP2はヒトゲノムDNAから、mMiRP3はハツカネズミ脳cDNAから、クローン化された。

20

標準的な二電極電圧-固定記録法(two-electrode voltage-clamp recording)は、室温でTurbo Tec 10CD(NPI)増幅器、Pulse software(HEKA)と組合せたITC-16インターフェースおよびPentium II PCによるデータ収集Originを用いて実施した。

注入後2~4日間、肉眼で電流を記録した。フィッティング方法は全て、シンプレックス法(Simplex algorithm)に基づいた。Studentのt検定は、統計的有意性を試験するために用いられ、P<0.05ならば有意と仮定し、*によって示した。

30

【0025】

実施例4: KCNQ5のクローニングおよび組織分布

GenBankのデータベースのサーチにより、ヒトBAC末端配列(AQ344243)は、KCNQ K⁺チャネルファミリーと著しく相同性があることが分かった。その配列情報は、ヒト脳cDNAライブラリー(Edge Biosystems)由来の重複しているcDNAクローンを単離するために使用され、2つのcDNAクローンは、全長cDNAクローンを作製するため集められた。cDNAの開始メチオニンは、in frameで最初のATGに決定されて、それと同じフレームで終止コドンを置いた。全長のKCNQ5 cDNAは、932アミノ酸のポリペプチドをコードしており、推定される分子量は約102kDaである(図1A~C)。ヒドロパシイ(Hydropathy)解析により6個の膜貫通型ドメインを有するトポロジーモデルが立証された。KCNQ5は、他のKCNQタンパク質に著しい相同性を示し、KCNQ4に最も近縁である(65%同一)。KCNQ5は、KCNQ3およびKCNQ2に対して約50%相同であるが、KCNQ1に対しては40%しかない(図1D)。相同性は、膜貫通領域から膜貫通セグメントであるS5およびS6間で保存されたP-ループまで観察された。KCNQタンパク質は大変長いC末端尾部に特徴がある。KCNQ5は、全てのKCNQタンパク質のうち最長のC末端を有し、KCNQ2およびKCNQ3がそれに続く。それは、依然として知られていない機能を有する高度に保存された領域を含有するが、その領域は他のKCNQタンパク質においては頻繁に突然変異している。さらにBNFCファミリーにおいては、保存されていない3'末端におけるフレームシフト変異により、そのC末端に56アミノ酸を付加して突然変異型KCNQ2タンパク質を作製した。驚くべきことに、より大きな変異型タンパク

40

50

質によって卵母細胞にて生じた電流は、野生型と比較して 50 % 減少した。さらに、全く同じ位置に終止の突然変異を導入して、最後の 7 アミノ酸をトランケートすると、チャネル活性が 2 倍増加した。これらの結果を総合すると、KCNQ タンパク質の C 末端領域はチャネルの機能にとって重要であることが示された。

【 0026 】

KCNQ5 タンパク質は、非常に多くの PKC によるリン酸化の可能性のある部位を含んでいるが、KCNQ1 および KCNQ2 に存在する cAMP 依存性リン酸化のための N 末端共通部位を欠いている。KCNQ2 電流に対する PKA の影響に関して、矛盾するデータが報告される一方で、KCNQ1 および I_{Ks} 電流は PKA により刺激を受ける。

ノーザンプロット分析により、長さが 7.5kb である KCNQ5 転写産物がヒト骨格筋および脳において検出された。脳において転写産物は、大脳皮質、後脳極、前頭葉、および側頭葉において強い発現で広範に分布する。より低いレベルの転写産物が海馬および被殻において検出された。脳における KCNQ5 の発現パターンは、前述の KCNQ2 および KCNQ3 の発現パターンに大変類似しており、その転写産物のサイズはそれぞれ 8.5kb および 10.5kb であった。KCNQ2 と対照的に、KCNQ5 は小脳にはおそらく存在しない。

【 0027 】

実施例 5 : アフリカツメガエル卵母細胞における KCNQ5 の発現

カリウムチャネルとしての KCNQ5 の可能な機能は、in vitro 転写された KCNQ5 cRNA と共に注入されたアフリカツメガエル卵母細胞の電気生理学的な解析によって検討された。注入後 2 ~ 4 日間、水を注入したコントロールの卵母細胞では観察されなかった新規な電流が検出された。電流は大変ゆっくりと活性化し(図 3 A)、実に 2 秒以内では十分に活性化されなかった。より低い電位で、KCNQ5 電流は、KCNQ1 電流と同様、活性化における遅延を示した。+20 mV を超える活性化のトレース (trace) は、クロスオーバーの現象を示した。一般的に KCNQ5 電流の活性化は他の KCNQ 電流の活性化よりも遅い。しかし、それは 2 つの指數関数によって説明され得る。-100 ~ +40 mV の脱分極パルスの間、電流は 116 ± 7 ms、および 927 ± 51 ms の時定数で活性化された(図 5)。

【 0028 】

KCNQ5 電流の電流 - 電圧の関係を図 3 B に示す。電流は、-60 mV よりも正の脱分極電位で活性化され、0 mV よりも大きい電位で著しく大きく整流した。強い内向き整流作用のみが、関連 KCNQ3 チャネルに対して証明された。KCNQ5 の非活性化は、2 次指數関数に良く適合する。不活性化の 2 つの成分は脱分極している電圧である -100 mV、次に 3s 脱分極段階である +40 mV まで測定された。時定数は 64 ± 5 ms および 269 ± 24 ms であった(図 5)。KCNQ1 尾部の電流は不活性化からの回復を示す特徴的な「かぎ」を示した。-100 ~ +40 mV の電圧ではこのような電圧は観察されなかった。さらに、一般的にカリウム電流の不活性化を証明するのに用いられるダブル - パルスプロトコールが実施された。

KCNQ5 電流の K^+ 選択性を調べるために、末尾電流の逆転電位を 5.4、9.6、20、54 および 96 mM K^+ を含有するバス溶液において測定した。外部 K^+ における 10 倍の減少により 58 mV の逆電位に変化した(図 3 C)、これは KCNQ5 が完全に K^+ 選択性であることを示すものである。

KCNQ5 の薬理学的な特徴を図 3 D に示す。KCNQ5 電流は、KCNQ3 の報告と同様、非選択性 K^+ チャネル遮断薬である TEA に対して非感受性である。一貫して、両方のチャネルタンパク質は、TEA による遮断に対する感受性を測定される部位にあるポア領域内にスレオニン残基を含有する。対照的に、この部位のチロシン残基は、KCNQ2 が TEA に対して高い感受性を示す原因である。非特異的なイオンチャンネル遮断薬である キニジン は $300 \mu M$ で KCNQ5 電流を 50 % 遮断する。

KCNQ1 および I_{Ks} の抑制は、これらの電流を完全にまたは強力に遮断する濃度で試験された。それらのことから、クロマノール (chromanol) 293B は、最も効果的なものであるが、それは $100 \mu M$ で KCNQ5 電流を 45 % だけブロックした。それに対して、KCNQ1 はこの濃度で 80 % 遮断する。クロフィリウム (Clofilium) は、クラス III の抗不整脈剤であり、KCNQ1 を $I_{C50} < 10 \mu M$ で遮断する。それ

10

20

30

40

50

は、そのKCNQ3に対する抑制作用(10 μ Mで30%抑制する)と同様に、30 μ MでKCNQ5電流を40%減少した。クロフィリウムは、10 μ MでKCNQ2を少し抑制した。このようにKCNQ5の薬理学的な特徴は、KCNQ2よりもKCNQ3の薬理学的な特徴に似ている。

【0029】

実施例6：KCNQ5およびKCNQ3の機能的相互作用

KCNQファミリーの全てのメンバーは、相同性を有する機能性ヘテロマーか、または構造的に異なるK⁺チャネルサブユニットを形成する。KCNQ5もまた異なるタンパク質サブユニットを有する混成チャネルを形成し得るという可能性を調査するために、KCNQ5を他のKCNQタンパク質および異なるKCNEペプチドをコードするcDNAとアフリカツメガエル卵母細胞で共発現した。

他のKCNQ1またはKCNQ2と、または4つの既知のKCNEペプチド(KCNE1からKCNE4)のうちの1つと共に発現した後、それらのタンパク質の1つとKCNQ5との機能的相互作用の証拠は全く観察されなかった。しかし、KCNQ5のKCNQ3との共発現は、結果の電流を著しく変化させた。以前の研究結果と一致して、KCNQ3単独で生じた非常に小さな電流はバックグラウンドレベルからはほとんど見分けがつかないが、一方、KCNQ5との共注入によってKCNQ5単独と比較して約4～5倍電流が増加した。その電流の電圧依存性において著しいシフトは全くなかったが、I-V関係図はKCNQ5/KCNQ3電流が正の膜電位で内向き整流が減少したことを見た。

図5に示されるように、ゲート反応速度における変化に伴って電流増幅の増加もまた生じた。KCNQ3を混和することにより、活性化の速い成分が著しく遅くなつたが、遅い成分には影響しなかった。さらにKCNQ5/KCNQ3電流の速い不活性化はホモマーのKCNQ5に比較して遅かった。

聞くところによれば、電流増幅における大きな増加に加えて、KCNQ2およびKCNQ3の会合もまた結果のヘテロマー電流の流入する特徴を変化させた。それ故に、KCNQ2/KCNQ3電流のゲート反応速度を調べ、それをKCNQ5/KCNQ3と比較した(図5)。不活性化の速い成分と同様に、KCNQ2/KCNQ3において速い時定数および遅い時定数が共に遅くなつた。このようにKCNQ2/KCNQ3ヘテロマーは依然としてKCNQ3/KCNQ5ヘテロマーよりも速く活性化する一方、両方のヘテロマーの不活性化反応速度論には有意差があるとはいえない。

【0030】

脳のいろいろな部位においてKCNQ5がKCNQ3と共に局在しており、電流が大きく増加し、共発現させた後に観察されたゲート反応速度における違いがみられたことは、KCNQ5がKCNQ3と会合し、機能性チャネルを形成できることを強く示すものである。KCNQ2/KCNQ3チャネルはニューロンのM様電流の分子的基板を構成すると考えられており、さらに我々の結果はKCNQ5がまたこの生理学的に重要な電流のサブユニットであるということを示唆する。そのM様電流は末梢および中枢のニューロンに発現しているが、小脳には説明されていない。不思議なことに、小脳で強く発現しているKCNQ2に対して、KCNQ3およびKCNQ5は一貫してこの領域では微弱に発現しているか、または全く発現していない。KCNQ4もまた機能的にKCNQ3と相互作用でき、M様電流を発生し、M様電流の外生の集団が末梢神経系内および中枢神経系内に存在し、恐らくそれらの反応速度的および薬理的特徴において変化するという可能性を生む。M様チャネルの分子組成中の不均質性は、さらに他のファミリー由来のK⁺チャネルの寄与によって増加し得る。

【0031】

脳内でKCNQ5タンパク質がM様電流に寄与できるという可能性は、KCNQ5遺伝子がてんかん疾患に対する推定上の候補であることを示すものである。蛍光in situ hハイブリッド形式(FISH)解析によって、我々はKCNQ5遺伝子を染色体6q14にマップした。てんかん疾患に関する第6染色体の2つの座と、進行性ミオクローヌステンかん2型で欠損している6q24にある既知の遺伝子、若年性ミオクローヌステンかん(EJM1)の原因である6p12-p11にある未知遺伝子があった。しかし、我々のマッピング結果は、後者の疾患におけるKCNQ5の関与を排除している。現在、KCNQ5の同定により、遺伝的に受け継いだてんかんの他の形態との関与の可能性を研究することができる。

【0032】

本発明の特許請求の範囲内に記載された方法は、分子生物学に関しては、"Current protocols of Molecular Biology; eds.: Atsubel F. M. et al.; Wiley Interscience, New York ; 2000 (最新版)"、そして生化学に関しては、"Experimental Biochemistry; eds.: Switzer, R. L. et al. W. H. Freeman & Co 1999"を参考文献として用いた。

【0033】

本発明において、KCNQファミリーの新規なメンバーがクローニングおよび同定された。

使用された略語は下記の通りである：

cAMP：サイクリック 5'-アデノシンモノホスフェート、DIG：ジゴキシゲニン、GCG：遺伝子コンピュータグループ、ウィスコンシン パッケージ バージョン 10 (Genetics Computer Group, Wisconsin package version 10)、 I_{KS} ：心臓の遅延整流性電流の遅い成分、kb：キロベース、KCNQ：KCNQ遺伝子ファミリーのカリウムチャネル、PHA：フィトヘマグロチニン、PKA：プロテインキナーゼA、SEM：平均標準誤差、TEA：テトラエチルアンモニウム。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 KCNQ5のタンパク質配列および他のKCNAタンパク質との比較、すなわちヒトKCNQ5とヒトKCNQ1、KCNQ2、KCNQ3およびKCNQ4とのアラインメントを示す。同定され保存されたアミノ酸は、それぞれ黒および灰色で囲まれている。推定上のS1～S6の6個の膜貫通ドメインおよびポア領域H5は点線によって示された。KCNQ5配列はEMBL/GenBankデータベースに寄託された。

【図1B】 図1Aに続くアラインメントを示す。

【図1C】 図1Bに続くアラインメントを示す。

【図1D】 GCGソフトウェアパッケージのPileupプログラムから作製されたヒトKCNQタンパク質のデンドログラムである。

【図2】ヒトカリウムチャネルKCNQ5の組織分布を示す。種々の組織のノーザンプロットおよび poly(A)⁺RNA (CLONTECH)を含有するヒト脳の異なる部分からの2つのプロットをKCNQ5特異的なDIG標識されたRNAプローブとハイブリダイズした。

【図3】 アフリカツメガエル卵母細胞におけるKCNQ5の機能的発現を示す。A : KCNQ5を卵母細胞に注入し、パルスプロトコールに供し、段階的に保持電圧(-100 mV)から膜電位へ上げて-100～+50 mVのパルスを試験し、保持電位に戻した代表的電流図。B : KCNQ5を発現している卵母細胞 (n = 12) でAのプロトコールを用いて記録されたI - V関係図。C : 細胞外K⁺濃度の関数としてKCNQ5電流の末尾電流 (tail current) 逆転電位。点線は、完全選択的K⁺チャネル (n = 5) に対してネルンストの式に従って描かれた。D : KCNQ5電流に対するTEA、クロフィリウム、キニジン、およびクロマノール293Bの効果。積載電流は、同じ実験の間に-100 mV～0 mVの3s脱分極段階の間に得られた。化合物間相互作用において、逆の効果を達成するまで卵母細胞にND96が注入された(電流トレースはコントロールに正規化され、5つの卵母細胞から平均化された)。エラーバーはSEMを示す。

【図4】 KCNQ5とKCNQ3の機能的相互作用を示す。A : 図3Aと同一のプロトコールを用いて、KCNQ5およびKCNQ3を共に注入された卵母細胞から記録された代表的な電流トレース。B : KCNQ3+KCNQ5を発現している卵母細胞 (n = 11) のI-V関係図。C : 100～+40 mVの3s試験パルスの末端における電流増幅の平均を示す棒グラフ。卵母細胞はKCNQ5 (n=14)、KCNQ3 (n=6)、またはKCNQ5+KCNQ3 (n = 12)をコードするcRNAを注入された。エラーバーはSEMを示す。

【図5】 ホモマーおよびヘテロマーのKCNQチャネルの活性化および非活性化の時定数。卵母細胞にKCNQ5またはKCNQ2のcRNAを10ng注入するか、またはKCNQ5およびKCNQ3、またはKCNQ2およびKCNQ3のcRNAのそれぞれ10ngの混合物を注入した。それぞれテキストおよび実験方法に記載のように電流が測定され、活性化および不活性化の時定数に適合させた。アステリスクは有意差を示す。値は(平均して9～16個の卵母細胞から)平均 ± SEMである。

Table 1

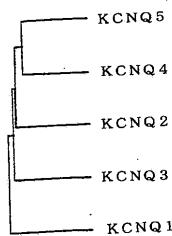
	KCNQ5	KCNQ6/KCNQ3	KCNQ2	KCNQ2/KCNQ3
activation, t_{fast}	116 \pm 7 ms	171 \pm 6 ms*	40 \pm 6 ms	73 \pm 6 ms*
activation, t_{slow}	927 \pm 51 ms	897 \pm 20 ms	291 \pm 71 ms	490 \pm 31 ms*
deactivation, t_{fast}	64 \pm 5 ms	42 \pm 3 ms*	29 \pm 5 ms	47 \pm 3 ms*
deactivation, t_{slow}	269 \pm 24 ms	213 \pm 38 ms	241 \pm 64 ms	226 \pm 29 ms

【図1B】

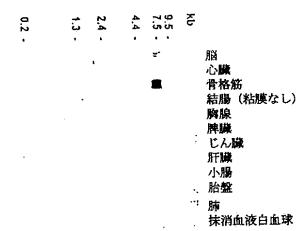
【図1C】

【図 1 A】

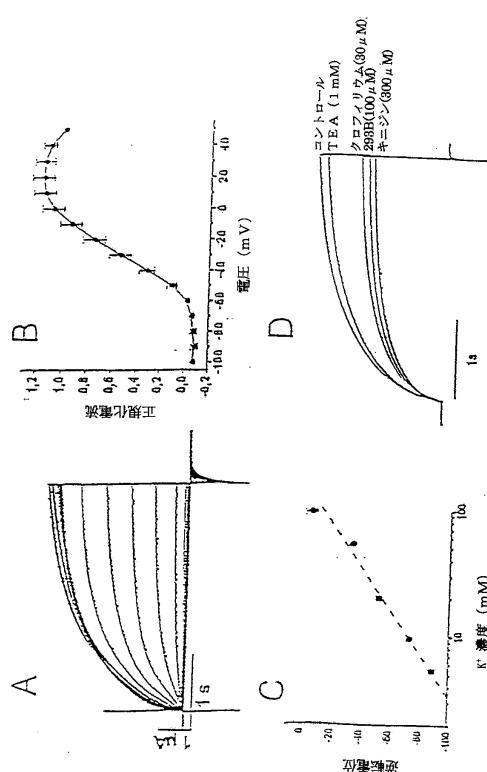
【図1D】



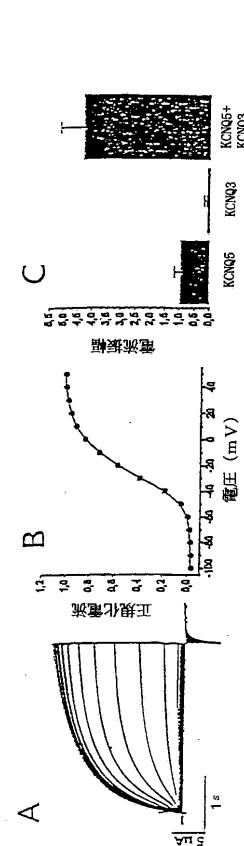
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

	KCNQ5	KCNQ5/KCNQ3	KCNQ2	KCNQ2/KCNQ3
活性化 t_{fast}	116 ± 7 ms	171 ± 6 ms*	40 ± 6 ms	73 ± 6 ms*
活性化 t_{slow}	927 ± 51 ms	897 ± 20 ms	291 ± 71 ms	490 ± 31 ms*
脱活性化 t_{fast}	64 ± 5 ms	42 ± 3 ms*	28 ± 5 ms	47 ± 3 ms *
脱活性化 t_{slow}	269 ± 24 ms	213 ± 38 ms	241 ± 64 ms	226 ± 29 ms

【配列表】

0005622345000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	15/09	(2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P	21/02	(2006.01) C 1 2 P 21/02 C
G 0 1 N	33/15	(2006.01) G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01) G 0 1 N 33/50 Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01) G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N	33/566	(2006.01) G 0 1 N 33/566

- (72)発明者 クリストイアン・レルヒエ
ドイツ連邦共和国 4 0 2 2 1 デュッセルドルフ . ニーフェンハイナーシュトラーセ 1 5
- (72)発明者 コンスタンツェ・シェーラー
ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービンゲン . アーホルンヴェーク 4
- (72)発明者 ギスカルト・ゼーボーム
ドイツ連邦共和国 3 7 6 4 7 ポーレ . ハイムベルクシュトラーセ 1 7
- (72)発明者 アンドレーアス・ブッシュ
ドイツ連邦共和国 6 5 7 7 9 ケルクハイム . ヴァルトプラトー 8 3
- (72)発明者 クラウス・シュタイン - マイアー
ドイツ連邦共和国 6 0 3 2 3 フランクフルト . グリューネブルクヴェーク 1 1 2

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 中島 庸子

審判官 植原 克典

(56)参考文献 國際公開第 0 0 / 0 7 7 0 3 5 (WO , A 1)
Cell , 1999 , vol . 96 , pp . 437 - 446

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

IPC C12N15/00-90
B I O S I S / W P I (D I A L O G)
P u b M e d
U n i P r o t / P I R / G e n e s e q
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e s e q