

(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 I	
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 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)	(73) 特許権者	397056695
(86) (22) 出願日	平成13年3月13日 (2001.3.13)		サノフィーアベンティス・ドイツュラント
(65) 公表番号	特表2004-512009 (P2004-512009A)		・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
(43) 公表日	平成16年4月22日 (2004.4.22)		テル・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/002791		ドイツ連邦共和国デー 6 5 9 2 9 フラン
(87) 国際公開番号	W02001/070811		クフルト・アム・マイン・ブリュニングシ
(87) 国際公開日	平成13年9月27日 (2001.9.27)		ユトラーセ 5 0
審査請求日	平成20年2月21日 (2008.2.21)	(74) 代理人	100127926
審査番号	不服2012-1102 (P2012-1102/J1)		弁理士 結田 純次
審査請求日	平成24年1月20日 (2012.1.20)	(74) 代理人	100105290
(31) 優先権主張番号	100 13 732.6		弁理士 三輪 昭次
(32) 優先日	平成12年3月21日 (2000.3.21)	(74) 代理人	100140132
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		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 K C N Q 5

(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】

請求項 2 1 の a) に記載のタンパク質が、請求項 1 4 ~ 1 7 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 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 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 2 1 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氣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一つがクローン化されており、恐らく全てが4つの - 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 - 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 - 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の機能的変異の一つの欠失は聴力損失に関連する。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そらく重要である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(Schrouder, 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ン化され、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; Charrier, C. et al.; N. Genet. 18, 53-55, 1998)。てんかんは脳における電氣的な異常興奮性によるものであるため、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

様に、KCNQ2/KCNQ3チャネル活性は、ムスカリ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ェ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ェ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は好ましい種類は、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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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チ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る。真核プロモーターが真核生物で転写を誘導することができ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ができ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。

【 0 0 1 4 】

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。

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

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。

【 0 0 1 8 】

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、アフィニティーク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。

【 0 0 1 9 】

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。

【 0 0 2 0 】

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
20
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。

【 0 0 2 1 】

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】

【 0 0 2 2 】

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クエンス(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シーケンサー(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 message mMachineキット(AMBIION)を用いて合成した。ノーザンブロット分析用には、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DIG RNA Labeling kit (ROCHE Diagnosticsから市販)で作製し、一連のヒトRNAブロット(CLONT
50

ECHから市販)とハイブリダイズした。

【 0 0 2 3 】

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 d U T P で標識し、標識されたプローブを P H A 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

【 0 0 2 4 】

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OR 2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 c R N A とそれぞれ個別に注入するか、または10ngのhKCNQ5に加えて、5ng hIsk (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。公開されたシーケンス (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) と組合わせた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

【 0 0 2 5 】

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 A T G 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 1 A ~ 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 5 0 % 相同であるが、KCNQ1に対しては 4 0 % しかない (図 1 D)。相同性は、膜貫通領域から膜貫通セグメントである S 5 および S 6 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。

ノーザンブロット分析により、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3A)、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つの指数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3B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次指数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96mM 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58mVの逆電位に変化した(図3C)、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3Dに示す。KCNQ5電流は、KCNQ3の報告と同様、非選択的 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 μ 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 μ 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 $IC_{50} < 10 \mu$ 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の薬理的な特徴は、KCNQ2よりもKCNQ3の薬理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ポリ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。

10

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示した。

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ったが、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。

20

聞くとおおよそ、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った。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かった。

【0030】

脳のいろいろな部位においてKCNQ5がKCNQ3と共局在しており、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。

30

40

【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 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。てんかん疾患に関与する第6染色体の2つの座と、進行性ミオクロノステんかん2型で欠損している6q24にある既知の遺伝子、若年性ミオクロノステんかん(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。

50

【 0 0 3 2 】

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.: Atlsabel 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。

【 0 0 3 3 】

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ン化および同定された。

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：フィトヘマグルチニン、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 1 A】 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ボア領域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 1 B】 図 1 A に続くアラインメントを示す。

【図 1 C】 図 1 B に続くアラインメントを示す。

【図 1 D】 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。

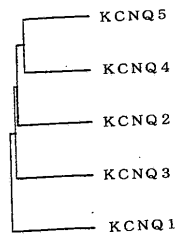
【図 2】 ヒトカリウムチャネルKCNQ5の組織分布を示す。種々の組織のノーザンプロットおよび poly(A)⁺RNA (CLONTECH)を含有するヒト脳の異なる部分からの2つのプロットをKCNQ5特異的なDIG標識されたRNAプローブとハイブリダイズした。

【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。

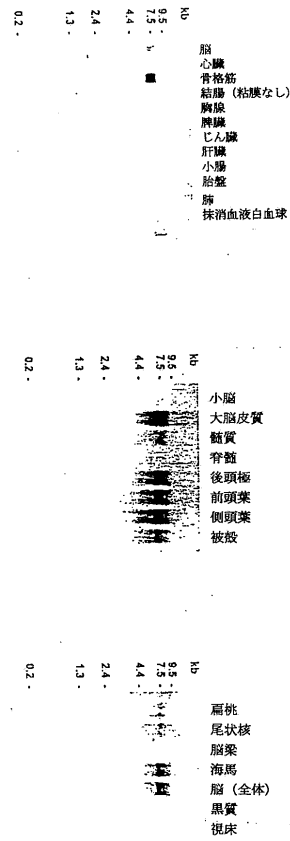
【図 4】 KCNQ5とKCNQ3の機能的相互作用を示す。A：図 3 A と同一のプロトコールを用いて、KCNQ5およびKCNQ3を共に注入された卵母細胞から記録された代表的な電流トレース。B：KCNQ3+KCNQ5を発現している卵母細胞 (n = 11) のI-V関係図。C：100～+40 mVの3s試験パルスの末端における電流増幅の平均を示す棒グラフ。卵母細胞はKCNQ5 (n=14)、KCNQ3 (n=6)、またはKCNQ5+KCNQ3 (n = 12) をコードするcRNAを注入された。エラーバーはSEMを示す。

【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、活性化および非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。

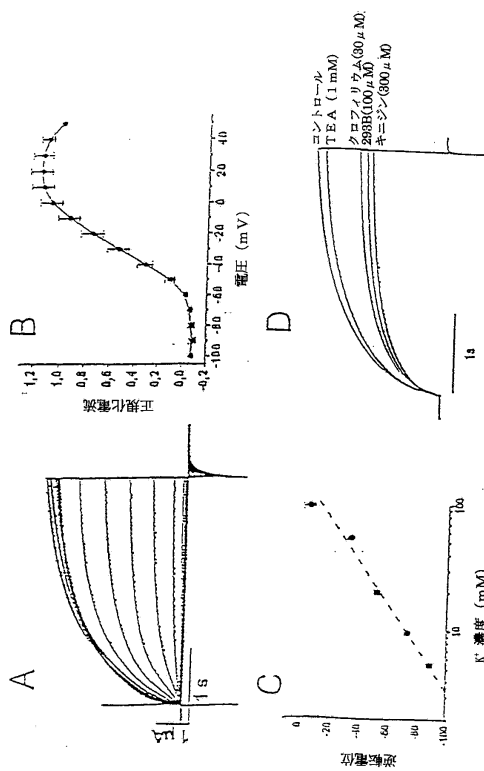
【図1D】



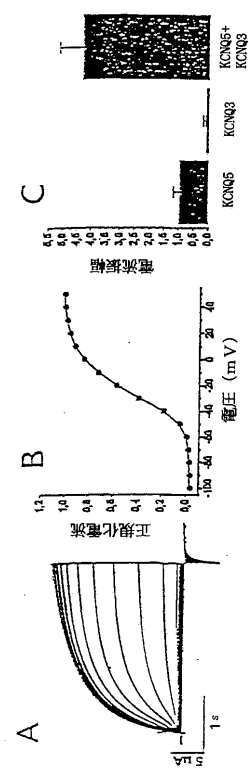
【図2】



【図3】



【図4】



【図 5】

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

【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 クリスティアン・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ッセ 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ッセ 1 7
- (72)発明者 アンドレアス・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 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 国際公開第 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

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

UniProt/PIR/Geneseq

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq