

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-544314

(P2009-544314A)

(43) 公表日 平成21年12月17日 (2009. 12. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁)

(21) 出願番号 特願2009-521815 (P2009-521815) (86) (22) 出願日 平成19年7月24日 (2007. 7. 24) (85) 翻訳文提出日 平成21年1月21日 (2009. 1. 21) (86) 国際出願番号 PCT/US2007/016705 (87) 国際公開番号 W02008/094194 (87) 国際公開日 平成20年8月7日 (2008. 8. 7) (31) 優先権主張番号 60/832, 780 (32) 優先日 平成18年7月24日 (2006. 7. 24) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 508223620 アテナ ダイアグノスティックス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01605 ウスター, プランテーション ストリート 377, フォー バイオテック パーク (71) 出願人 509021133 ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ アメリカ合衆国 メリーランド 21201 ボルティモア, 5ティーエイチ フロア, ノース チャールズ ストリート 100 (74) 代理人 100095832 弁理士 細田 芳徳
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P K Dの変異およびその評価

## (57) 【要約】

本発明は、個体における常染色体優性多発性嚢胞腎疾患 (A D P K D) の発症を検出または予測するため、A D P K Dに関連性があると判定されているP K D 1および/またはP K D 2遺伝子における新規な変異を検出する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体における常染色体優性多発性嚢胞腎疾患（ADPKD）の発症を検出または予測する方法であって、前記個体から得られた核酸試料中の配列番号 1 または配列番号 7 のヌクレオチド配列を有する PKD 1 遺伝子内での 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在を検出するステップを含み、ここで前記 1 つまたは複数の変化は、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 5 9 ~ 5 6 3 での T T T A A の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 1 2 4 での C T の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 2 2 9 1 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 2 2 9 7 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 3 6 5 での T の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 6 6 6 での G の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 8 8 1 での A の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 7 1 3 での T の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 9 1 3 4 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 9 5 3 6 での 5 ヌクレオチドの挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 2 3 9 での T の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 4 8 3 での C から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 4 5 1 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 7 0 0 6 での C から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 2 6 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 6 3 9 での G から T への変化、配列番号 7 のヌクレオチド位置 2 0 1 6 8 での G から A への変化、配列番号 7 のヌクレオチド位置 3 1 0 2 5 での G から T への変化、配列番号 7 のヌクレオチド位置 3 3 4 1 5 での G から C への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 0 8 ~ 5 1 6 での C A A の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 8 4 8 ~ 1 8 5 0 での T G G の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 8 9 2 ~ 8 9 0 0 での C C A A C T C C G の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 9 9 0 5 ~ 9 9 0 7 での A A G の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 0 7 0 ~ 1 0 0 7 2 での C T C の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 2 5 9 7 ~ 1 2 5 9 9 での T G G の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 2 3 での C から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 3 8 5 での G から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 4 7 0 での A から G への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 4 2 6 2 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 8 5 5 での T から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 7 9 4 での A から G への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 0 3 6 での G から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 2 0 4 2 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 3 3 5 1 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 7 5 6 での A から G への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 7 9 3 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 7 0 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 1 8 7 での G から C への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 7 1 1 6 での C から G への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 3 1 1 での A から G への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 7 5 5 4 での T から C への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 7 7 5 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 0 6 7 での T から C への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 1 3 8 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 5 0 9 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 0 9 6 での C から A への変化、および配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 2 6 5 8 での C から T への変化からなる群から選択され、ここで前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の検出は前記個体が ADPKD を有するかまたは ADPKD を発症することになることを示す、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に挙げられる前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化以外の少なくとも 1 つのヌクレオチド配列の変化も配列番号 1 および配列番号 4 からなる群から選択される配列内で検出され、ここで前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列の変化は ADPKD に関連性がある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記核酸配列内での前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在が、配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、変性高性能液体クロマトグラフィーおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される方法により検出される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の PKD 1 遺伝子産物に対する効果を、前記 PKD 1 遺伝子産物の発現および前記 PKD 1 遺伝子産物の切断からなる群から選択される少なくとも 1 つの活性についてアッセイすることにより評価するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

個体における常染色体優性多発性嚢胞腎疾患 (ADPKD) の発症を検出または予測する方法であって、前記個体から得られた核酸試料中の配列番号 4 のヌクレオチド配列を有する PKD 2 遺伝子内での 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在を検出するステップを含み、ここで前記 1 つまたは複数の変化は、配列番号 4 のヌクレオチド位置 2 2 2 6 での A の挿入、配列番号 4 のヌクレオチド位置 2 4 2 2 ~ 2 4 2 3 での AG の欠失、配列番号 4 のヌクレオチド位置 2 6 8 0 での C から T への変化、IVS 7 - 1 G > A、IVS 8 + 5 G > A、配列番号 4 のヌクレオチド位置 3 7 4 ~ 3 7 6 での TGG の欠失および配列番号 4 のヌクレオチド位置 1 8 7 6 ~ 1 8 8 1 での TTC の欠失からなる群から選択され、ここで前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の検出は、前記個体が ADPKD を有するかまたは ADPKD を発症することになることを示す、方法。

10

【請求項 6】

請求項 5 に挙げられる前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化以外の少なくとも 1 つのヌクレオチド配列の変化も配列番号 1 および配列番号 4 からなる群から選択される配列内で検出され、ここで前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列の変化は ADPKD に関連性がある、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記核酸配列内での前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在が、配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、変性高性能液体クロマトグラフィーおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される方法により検出される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の PKD 2 遺伝子産物に対する効果を、前記 PKD 2 遺伝子産物の発現についてアッセイすることにより評価するステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 9】

個体における変異 PKD 遺伝子の存在または不在を検出する方法であって、

a) 前記個体から核酸試料を得るステップと；

b) 前記個体の PKD 1 または PKD 2 遺伝子内での 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在または不在を検出するステップを含み、ここで前記 1 つまたは複数の変化は、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 5 9 ~ 5 6 3 での TTTAA の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 1 2 4 での CT の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 2 2 9 1 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 2 2 9 7 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 5 3 6 5 での T の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 6 6 6 での G の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 6 8 8 1 での A の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 7 1 3 での T の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 9 1 3 4 での A、T、G、もしくは C の挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 9 5 3 6 での 5 ヌクレオチドの挿入、配列番号 1 のヌクレオチド位置 1 0 2 3 9 での T の欠失、配列番号 1 のヌクレオチド位置 4 8 3 での C から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 4 5 1 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 7 0 0 6 での C から A への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 2 6 7 での C から T への変化、配列番号 1 のヌクレオチド位置 8 6 3 9 での G から T への変化、配列番号 7 のヌクレオチド位置 2 0 1 6 8 での G から A への変化、配列番号 7 のヌクレオチド位置 3 1 0 2 5 での G から

40

50

Tへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置33415でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置508～516でのCAAの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1848～1850でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置8892～8900でのCCAACTCCGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置9905～9907でのAAGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置10070～10072でのCTCの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置12597～12599でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1023でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置385でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1470でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4262でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8855でのTからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1794でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6036でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置2042でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置3351でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6756でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置5793でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6707でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10187でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7116でのCからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10311でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7554でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7757でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8067でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8138でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8509でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10096でのCからAへの変化および配列番号1のヌクレオチド位置12658でのCからTへの変化、配列番号4のヌクレオチド位置2226でのAの挿入、配列番号4のヌクレオチド位置2422～2423でのAGの欠失、配列番号4のヌクレオチド位置2680でのCからTへの変化、IVS7-1G>A、IVS8+5G>A、配列番号4のヌクレオチド位置374～376でのTGGの欠失、および配列番号4のヌクレオチド位置1876～1881でのTTCの欠失からなる群から選択され、

ここで前記1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の検出は変異PKD遺伝子について示す、方法。

#### 【請求項10】

前記個体の前記PKD1またはPKD2遺伝子の1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在が、前記個体が常染色体優性多発性嚢胞腎疾患(ADPKD)を有するかまたはADPKDを発症しうることを示す、請求項9に記載の方法。

#### 【請求項11】

前記核酸配列内での前記1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在または不在が、配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、変性高性能液体クロマトグラフィーおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される方法により検出される、請求項10に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2006年7月24日に出願された米国仮特許出願第60/832,780号明細書の優先権を主張するものである。上記出願の教示内容全体は参照により本明細書中に援用される。

#### 【0002】

政府支援

本発明は、部分的にはスペイン科学技術省(Ministerio de Ciencia y Tecnologia)のBecas FPI de investiga

10

20

30

40

50



c i o n (スペイン)ならびに国立衛生研究所 (N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h) の助成金 R 0 1 D K 7 0 6 1 7、P 5 0 - D K 5 7 3 2 5 および R 3 7 D K 4 8 0 0 6 により支援を受けた。政府は本発明における特定の権利を有する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

##### 発明の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎疾患 (A D P K D) は、ヒトにおいて 6 0 0 ~ 1 0 0 0 個体当たり約 1 個体が罹患する極めて一般的な遺伝性疾患である (ガボウ P . A . ( G a b o w P . A . )、N E n g l J M e d 3 2 9 ( 5 ) : 3 3 2 - 3 4 2 頁、1 9 9 3 年)。この疾患は腎嚢胞の年齢依存性の成長として特徴づけられ、典型的には末期腎疾患 (E S R D) が中年期に続発する。その代わりにまたはそれに加え、A D P K D は、肝臓および脾臓を含む他の器官における嚢胞、ならびに胃腸、心血管、および筋骨格の異常を含みうる (ガボウ P . A . ( G a b o w P . A . )、N E n g l J M e d 3 2 9 ( 5 ) : 3 3 2 - 3 4 2 頁、1 9 9 3 年; ガボウ P . ( G a b o w P . ) ら、A d v N e p h r o l 1 8 : 1 9 - 3 2 頁、1 9 8 9 年)。1 型 A D P K D および 2 型 A D P K D のいずれも、あらゆる範囲の腎性および腎外性の徴候が共通するが、2 型 A D P K D は 1 型 A D P K D に対して発症が遅延するようである。高血圧、血尿および尿管感染を含む、A D P K D で認められる共通の表現型合併症は、2 型患者では臨床的に軽度なようである。

#### 【0004】

A D P K D の症例の約 8 5 パーセントは、染色体 1 6 上に位置する P K D 1 遺伝子 [ M I M 6 0 1 3 1 3 ] における変異により引き起こされる一方、残りは染色体 4 上に位置する P K D 2 遺伝子 [ M I M 1 7 3 9 1 0 ] の変異によるものである (ピーターズ (P e t e r s) ら、C o n t r i b N e p h r o l 9 7 : 1 2 8 - 1 3 9 頁、1 9 9 2 年; E u r o p e a n P o l y c y s t i c K i d n e y D i s e a s e C o n s o r t i u m、C e l l、7 7 ( 6 ) : 8 8 1 - 8 9 4 頁、1 9 9 4 年; I n t e r n a t i o n a l P o l y c y s t i c K i d n e y D i s e a s e C o n s o r t i u m、C e l l 8 1 ( 2 ) : 2 8 9 - 2 9 8 頁、1 9 9 5 年; ヒュー J . ( H u g h e s J . ) ら、N a t G e n e t 1 0 ( 2 ) : 1 5 1 - 1 6 0 頁、1 9 9 5 年; モチズキ T . ( M o c h i z u k i T . ) ら、S c i e n c e 2 7 2 ( 5 2 6 6 ) : 1 3 3 9 - 1 3 4 2 頁、1 9 9 6 年)。しかし、A D P K D に対する遺伝子試験は、D N A 診断の観点で独特の一連の課題を提起している。特に P K D 1 の分析は、遺伝子の 5 ' 部分 (エクソン 1 ~ 3 4) が染色体 1 6 上の他の場所の (2 % 未満の発散で) 少なくとも 5 つの極めて相同性の高いコピー内で複製されることから複雑になっている (ヒュー J . ( H u g h e s J . ) ら、N a t G e n e t 1 0 ( 2 ) : 1 5 1 - 1 6 0 頁、1 9 9 5 年)。P K D 1 変異体の分析がさらに複雑であり、P K D 1 が潜在的に病原性のない D N A 変異を高頻度に有することから、検出される各変化の性質が検証される必要がある。入れ子 P C R 技術を介してスクリーニングされた大きい産物を増幅するための遺伝子特異的なプライマーの使用、入れ子 P C R 産物における変異についてスクリーニングするための変性高性能液体クロマトグラフィー (D H P L C)、および P K D 1 コード配列全体の直接配列決定を含むいくつかの技術を用い、P K D 1 遺伝子における変異が検出されている (ワトニック T . J . ( W a t n i c k T . J . ) ら、H u m M o l G e n e t 6 ( 9 ) : 1 4 7 3 - 1 4 8 1 頁、1 9 9 7 年; ワトニック T . J . ( W a t n i c k T . J . ) ら、M o l C e l l 2 ( 2 ) : 2 4 7 - 2 5 1 頁、1 9 9 8 年; ワトニック T . ( W a t n i c k T . ) ら、A m J H u m G e n e t 6 5 ( 6 ) : 1 5 6 1 - 1 5 7 1 頁、1 9 9 9 年; ファクデーキッチャロエン B . ( P h a k d e e k i t c h a r o e n B . ) ら、K i d n e y I n t 5 8 ( 4 ) : 1 4 0 0 - 1 4 1 2 頁、2 0 0 0 年; ファクデーキッチャロエン B . ( P h a k d e e k i t c h a r o e n B . ) ら、J A m S o c N e p h r o l 1 2 : 9 5 5 - 9 6 3

頁、2001年；トーマス R. (Thomas R.) ら、Am J Hum Genet 65 (1) : 39 - 49 頁、1999年；ペリコット R. A. (Perichot R. A.)、Hum Genet 105 (3) : 231 - 239 頁、1999年；ペリコット R. (Perichot R.) ら、Eur J Hum Genet 8 (5) : 353 - 359 頁、2000年；アフザル A. R. (Afzal A. R.) ら、Genet 4 (4) : 365 - 370 頁；ロゼッティ S. (Rossetti S.) ら、Lancet 361 (9376) : 2196 - 2201 頁、2003年；ロゼッティ S. (Rossetti S.) ら、Kidney Int 61 : 1588 - 1599 頁、2002年；ロゼッティ S. (Rossetti S.) ら、Am J Hum Genet 68 (1) : 46 - 63 頁、2001年、イノウエ S. (Inoue S.) ら、Hum Mutat 19 (6) : 622 - 628 頁、2002年；バーテイ S. (Burtsey S.) ら、J Med Genet 39 (6) : 422 - 429 頁、2002年；ミゾグチ M. (Mizoguchi M.) ら、J Hum Genet 46 (9) : 511 - 517 頁、2001年；チャン D. Y. (Zhang D. Y.) ら、中華医学遺伝学雑誌 (Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi) 21 (3) : 211 - 214 頁、2004年)。しかし、これらの方法の一部は定期的な臨床試料分析にとって費用効果的でない場合があり、かつ/またはそれらの変異検出率は確立されていないかまたは不十分である。例えば、PKD1 または PKD2 のいずれかにおいて同定されている変異のホットスポットが全く存在しないことから、PKD1 および PKD2 のコード領域全体の直接 DNA 配列決定が必要であると考えられる。PKD1 および PKD2 におけるいくつかの病原性変異が同定されているが、既知の変異があらゆる ADPKD を有する個体を説明するわけではない。したがって、疾患を正確に診断しかつ治療するため、ADPKD に関連性がある PKD1 または PKD2 の他の変異を同定することが依然として求められている。

10

20

30

40

50

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

ADPKD に関連した PKD1 および PKD2 遺伝子におけるいくつかの新規なヌクレオチド配列変化が同定されている。PKD1 および PKD2 における変異が遺伝子の直接配列決定により見出され、変異の病原性が様々な分析およびアルゴリズムの併用により判定された。病原性があるものとして同定された PKD1 および PKD2 遺伝子における変異を用い、個体における ADPKD の発症の検出および/または予測が可能である。これは、ADPKD における遺伝子の診断的分析および予後分析において臨床的に重要である。

#### 【0006】

したがって、本発明は、個体における ADPKD の発症を検出または予測する方法に関する。一態様では、本発明は、個体における常染色体優性多発性嚢胞腎疾患 (ADPKD) の発症を検出または予測する方法であって、前記個体から得られる核酸試料中に配列番号1または配列番号7のヌクレオチド配列を有する PKD1 遺伝子内での1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在を検出するステップを含む方法に関し、ここで前記1つまたは複数の変化は、配列番号1のヌクレオチド位置559～563でのTTTAAの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1124でのCTの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置2291でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置2297でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置5365でのTの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置6666でのGの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置6881でのAの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置8713でのTの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置9134でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置9536での5ヌクレオチドの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置10239でのTの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置483でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4517でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7006でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8267でのCからT

への変化、配列番号1のヌクレオチド位置8639でのGからTへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置20168でのGからAへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置31025でのGからTへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置33415でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置508～516でのCAAの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1848～1850でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置8892～8900でのCCAACTCCGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置9905～9907でのAAGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置10070～10072でのCTCの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置12597～12599でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1023でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置385でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1470でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4262でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8855でのTからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1794でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6036でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置2042でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置3351でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6756でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置5793でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6707でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10187でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7116でのCからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10311でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7554でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7757でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8067でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8138でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8509でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10096でのCからAへの変化、および配列番号1のヌクレオチド位置12658でのCからTへの変化からなる群から選択される。列挙されたヌクレオチド配列の変化のうちの1つまたは複数の検出は、個体がADPKDを有するかまたはADPKDを発症することになることを示す。一実施形態では、上で挙げられた1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化以外の少なくとも1つのヌクレオチド配列の変化は配列番号1および/または配列番号4においても検出され、ここでさらに検出される少なくとも1つのヌクレオチド配列の変化はADPKDに関連性がある。別の態様では、1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化は、配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、DHPLCまたはそれらの組み合わせにより検出される。

#### 【0007】

本発明は、個体における常染色体優性多発性嚢胞腎疾患(ADPKD)の発症を検出または予測する方法であって、前記個体から得られる核酸試料中に配列番号4のヌクレオチド配列を有するPKD2遺伝子内での1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在を検出するステップを含む方法にも関し、ここで前記1つまたは複数の変化は、配列番号4のヌクレオチド位置2226でのAの挿入、配列番号4のヌクレオチド位置2422～2423でのAGの欠失、配列番号4のヌクレオチド位置2680でのCからTへの変化、IVS7-1G>A、IVS8+5G>A、配列番号4のヌクレオチド位置374～376でのTGGの欠失および配列番号4のヌクレオチド位置1876～1881でのTTCの欠失からなる群から選択され、ここで1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の検出は、個体がADPKDを有するかまたはADPKDを発症することになることを示す。一実施形態では、上で挙げられた1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化以外の少なくとも1つのヌクレオチド配列の変化は配列番号1および/または配列番号4においても検出され、ここでさらに検出される少なくとも1つのヌクレオチド配列の変化はADPKDに関連性がある。さらに別の実施形態では、1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化は、配列決定、PCR、DHPLCまたはそれらの組み合わせにより検出される。

#### 【0008】

本発明は、さらに個体における変異PKD遺伝子の存在または不在を検出するための方

法であって、個体から核酸試料を得るステップと、個体のPKD1またはPKD2遺伝子内での1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在または不在を検出するステップとを含む方法に関し、ここで1つまたは複数の変化は、配列番号1のヌクレオチド位置559～563でのTTTAの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1124でのCTの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置2291でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置2297でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置5365でのTの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置6666でのGの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置6881でのAの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置8713でのTの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置9134でのA、T、G、もしくはCの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置9536での5ヌクレオチドの挿入、配列番号1のヌクレオチド位置10239でのTの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置4833でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4517でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7006でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8267でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8639でのGからTへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置20168でのGからAへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置31025でのGからTへの変化、配列番号7のヌクレオチド位置33415でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置508～516でのCAAの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1848～1850でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置8892～8900でのCCAACTCCGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置9905～9907でのAAGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置10070～10072でのCTCの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置12597～12599でのTGGの欠失、配列番号1のヌクレオチド位置1023でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置385でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1470でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4262でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8855でのTからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1794でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6036でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置2042でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置3351でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6756でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置5793でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置6707でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10187でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7116でのCからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10311でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7554でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7757でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8067でのTからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8138でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置8509でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置10096でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置12658でのCからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7476でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置3527でのCからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1947でのCからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置3312でのAからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4391でのCからGへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置11040でのTからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置840でのGからTへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置7197でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置351でのGからCへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置4757でのGからAへの変化、配列番号1のヌクレオチド位置1023でのAからCへの変化、配列番号4のヌクレオチド位置2226でのAの挿入、配列番号4のヌクレオチド位置2422～2423でのAGの欠失、配列番号4のヌクレオチド位置2680でのCからTへの変化、IVS7-1G>A、IVS8+5G>A、配列番号4のヌクレオチド位置374～376でのTGGの欠失、配列番号4のヌクレオチド位置1876～1881でのTTCの欠失、および配列番号4のヌクレオチド位

置 6 3 4 での G から A への変化からなる群から選択され、ここで 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の検出は変異 P K D 遺伝子について示唆する。一実施形態では、個体の P K D 1 または P K D 2 遺伝子内での 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在または不在は、個体が A D P K D を有することを示す。別の実施形態では、P K D 1 または P K D 2 の核酸配列内での 1 つまたは複数のヌクレオチド配列の変化の存在または不在は、配列決定、P C R および / または D H P L C により検出される。

#### 【 0 0 0 9 】

A D P K D に関連性がある変異の同定は、決定的な診断情報を提供し、個体の血縁において標的化された P K D 遺伝子分析を用いたカウンセリングおよびプランニングを意図して発症前に安価に評価することが可能になり、予想される生存する血縁の腎臓提供者における試験やその後の提供に対するより確実な受け入れまたは拒絶が可能になる。A D P K D における発症前試験は、A D P K D 家系からの生存する腎臓提供者の評価だけでなく、疾患経過の早期（例えば嚢腫性疾患が視認される前）での使用、家族計画、超音波イメージングが正確かつ / もしくは十分でない場合の若年個体（例えば 3 0 歳未満の個体）または臨床的により軽度な疾患である P K D 2 関連の A D P K D を有する家系に対する A D P K D の検出に適応されうる、新しい作用物質による治療における早期検出において特に関連しうる。さらに臨床医は、診断が確定的でない非定型嚢腫性疾患を有する患者に出会う場合がある。したがって、本発明の方法は、P K D 1 および P K D 2 遺伝子内で同定された新規な病原性変異を用い、既存の A D P K D の診断および管理における支援を改善するのに役立ち、かつ / または個体における A D P K D の発症の可能性を予測する。

10

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【 0 0 1 0 】

【図 1 A - E】図 1A ~ E は、P K D 1 コード配列（G e n B a n k 登録番号 L 3 3 2 4 3 ）（配列番号 1）を示す。

【図 2 A - B】図 2A ~ B は、P K D 2 コード配列（G e n B a n k 登録番号 A F 0 0 4 8 5 9 - A F 0 0 4 8 7 3 ）（配列番号 4）を示す。

【図 3 A - T】図 3A ~ T は、本発明の一実施形態に記載の野生型 P K D 1 c D N A コード配列を示す。エクソンと P C R 産物の接合がヌクレオチド配列上に示され、アミノ酸が各コドンの中央の下部に位置づけられる。

【図 4 A - D】図 4A ~ D は、本発明の一実施形態に記載の野生型 P K D 2 c D N A コード配列を示す。エクソンと P C R 産物の接合がヌクレオチド配列上に示され、アミノ酸が各コドンの中央の下部に位置づけられる。

30

【図 5】図 5 は、P K D 1 リピートおよび C - レクチンドメインに作用するミスセンス変異を図示する。コンセンサス配列を破壊する変化は赤色（黒色の網掛け）であり、破壊することのない変化は黄色（薄い網掛け）である。コンセンサス配列コードは、1（脂肪族）、a（芳香族性）、c（帯電性）、s（小さい残基）、p（極性残基）、b（大きい残基）、h（疎水性）であり、大文字は対応するアミノ酸コドンを表す。示されるミスセンス変化が潜在的に病原性がある場合の P K D リピート（5 B）および C - レクチンドメイン（5 C）のリボンダイアグラムを示す。

【図 6】図 6 は、示される各アミノ酸置換の M（ミスセンス）または P（多型）の位置を伴う P K D 1 変異ポリペプチドの概略図ならびに各変異タンパク質における完全長のフラッグ - タグ化 P K D 1 コンストラクトおよび任意の切断産物のウエスタンブロットの写真を図示する。F L：完全長、N T F：P K D 1 の N 末端切断断片、C T F；P K D 1 の C 末端切断断片。

40

【図 7 A - B】図 7A ~ B は、同定されたすべての P K D 1（5 A）および P K D 2（5 B）の変異を図示する概略図である。番号 1 ~ 1 1 3 は表 8 における変異の識別子を示す。

【図 8 A - B】図 8A ~ B は、ポリシスチン - 1（P C - 1）（8 A）およびポリシスチン - 2（P C - 2）（8 B）の概略図である。病原性（クラス I およびクラス II、実施例を参照）変異の位置が示される。

#### 【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 0 1 1 】

P K D 遺伝子は、染色体位置 1 6 p 1 3 . 3 ( P K D 1 ) または染色体位置 4 q 2 1 ~ 2 3 ( P K D 2 ) にマッピングされたゲノム DNA 配列であり、P K D 1 および P K D 2 タンパク質をコードするメッセンジャー RNA 分子を生じさせる。P K D 1 および P K D 2 遺伝子は、配列番号 1 および配列番号 4 の配列を各々含み、それらはイントロンおよび推定上の調節配列を含む。P K D 1 および P K D 2 遺伝子配列は、多数の他の遺伝子のよう、個体間で比較される場合、遺伝子発現または遺伝子産物の発現および / もしくは機能に作用することのない配列変異を示す。

## 【 0 0 1 2 】

P K D 1 遺伝子 ( 例えば、GenBank 登録番号 L 3 9 8 9 1、配列番号 7 ) は、染色体 1 6 ( 1 6 p 1 3 . 3 ) 上の約 5 4 k b のゲノム DNA の範囲に及び、1 4 k b m R N A の転写の元となる 4 6 のエクソンに分かれる 1 2 , 9 0 6 塩基対のコード配列を有する。P K D 1 のタンパク質産物、ポリシスチン - 1 ( P C - 1 ) ( GeneBank 登録番号 A A C 3 7 5 7 6、配列番号 3 ) は予測される質量が 4 6 0 k D a の 4 3 0 3 個のアミノ酸のタンパク質であり、細胞膜で多タンパク質複合体を形成しかつ細胞 - 細胞および細胞 - マトリックスシグナル調節において機能すると考えられる ( アーノルド T . ( A r n o u l d T . ) ら、J B i o l . C h e m 2 7 3 : 6 0 1 3 - 6 0 1 8 頁、1 9 9 2 年 ; パーネル S . C . ( P a r n e l l S . C . ) ら、J B i o l C h e m、2 7 7 : 1 9 5 6 6 - 1 9 5 7 2 頁、2 0 0 2 年 ; ブニア A . K . ( B h u n i a A . K . ) ら、C e l l、1 0 9 : 1 5 7 - 1 6 8 頁、2 0 0 2 年 ; ナウリ S . M . ( N a u l i S . M . ) ら、N a t G e n e t 3 3 : 1 2 9 - 1 3 7 頁、2 0 0 3 年 ) 。約 7 5 % の P K D 1 遺伝子は複製され、その相同コピーと約 9 7 % の同一性を共有する。反復領域は、最初から 3 4 のエクソンを有する遺伝子の 5 0 k b ( 5 ' ) 部分を包含する。エクソン 3 5 ~ 4 6 を有する遺伝子の 3 ' 末端の 5 . 7 k b のみが P K D 1 に固有である。P K D 1 遺伝子の別の注目すべき特徴は、ヒトゲノム内で最長といわれる 2 . 5 k b 長のイントロン 2 1 におけるポリピリミジン管 ( t r a c t ) である。

## 【 0 0 1 3 】

P K D 2 遺伝子 ( 例えば、GenBank 登録番号 A F 0 0 4 8 5 9 ( エクソン 1 ) ~ A F 0 0 4 8 7 3 ( エクソン 1 5 )、配列番号 4 を参照 ) ( GenBank 登録番号 V 5 0 9 2 8 も参照 ) は、6 8 k b のゲノム DNA の範囲に及び、染色体 4 上に位置する ( 4 q 2 1 ~ 2 3 ) 。P K D 2 は、1 5 エクソンを有し、約 1 1 0 k D a の 9 6 8 個のアミノ酸のタンパク質産物、ポリシスチン - 2 ( P C - 2 ) の生成元である 5 . 4 k b の転写産物 ( 例えば、GenBank 登録番号 N M 0 0 0 2 9 7 を参照 ) をコードする ( 配列番号 6 ) ( GenBank 登録番号 N P 0 0 2 8 8 も参照 ) 。ポリシスチン - 2 は、P C - 1 のカルボキシ末端と相互作用することが示されており、P C - 1 との複合体における陽イオンチャンネルとして機能する ( ゴンザレス - ペレット S . ( G o n z a l e z - P e r r e t t S . ) ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 8 : 1 1 8 2 - 1 1 8 7 頁、2 0 0 0 年 ; ヴァシレブ P . M . ( V a s s i l e v P . M . ) ら、B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n 2 8 2 : 3 4 1 - 3 5 0 頁、2 0 0 1 年 ; コウレン P . ( K o u l e n P . ) ら、N a t C e l l B i o l 4 : 1 9 1 - 1 9 7 頁、2 0 0 2 年 ; ハナオカ K . ( H a n a o k a K . ) ら、N a t u r e 4 0 8 : 9 9 0 - 9 9 4 頁、2 0 0 0 年 ) 。P K D 2 は、P K D 1 と異なり単一コピー遺伝子であることから、その分析ははるかにより容易なものになる。P K D 遺伝子の概要については表 1 を参照のこと。P K D 1 および P K D 2 遺伝子、遺伝子およびタンパク質の変化ならびにそれらを検出する方法についてのさらなる考察が、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 4 6 5 0 4 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 0 8 2 8 8 号明細書、国際公開第 2 0 0 2 / 0 0 6 5 2 9 号パンフレット、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 7 3 9 9 号明細書、米国特許第 7 , 0 8 3 , 9 1 5 号明細書、米国特許第 6 , 0 3 1 , 0 8 8 号明細書、米国特許第 6 , 2 2 8 , 5 9 1 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 6 6 7 5 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 0 0 8 9 8 号

10

20

30

40

50

明細書、米国特許第 6,916,619 号明細書、米国特許第 6,656,681 号明細書、米国特許第 6,485,960 号明細書、米国特許第 6,380,360 号明細書および国際公開第 1995/018225 号パンフレット（すべては参照により本明細書中に援用される）において見出されうる。

【0014】

【表 1】

表 1: PKD 遺伝子の記述

遺伝子の記述	PKD1	PKD2	
染色体	16p13.3	4q21-23	
ゲノム長	54 kb	68 kb	
エクソン	46	15	
塩基対	12,909	2,904	
コドン	4,303	968	
タンパク質	ポリシスチン-1	ポリシスチン-2	
分析:			合計
長距離 PCR	8	-	8
アンプリコン	54	17	71
評価された塩基対 (隣接イントロン配列を含む)	13,830	3,204	17,034

10

20

【0015】

#### PKD 遺伝子の分析

対象由来の試料から得られるゲノム DNA は、1 つまたは複数の PKD に特異的な増幅産物（例えば長距離 PKD 増幅産物）を生成するための鋳型として用いられうる。DNA 試験は、（例えば連鎖研究において家系員が用いられうる場合）単離された個体に対して遺伝子情報を提供する可能性を有することから有利である。変異が正常なハプロタイプ上でかつ/または他のアミノ酸を切断する変異との組み合わせで検出されていることから、個体における PKD 遺伝子の両コピーであれば、分析/配列決定により真の遺伝子変異が同定されるはずである。

30

【0016】

試料は、標的核酸（例えば PKD 遺伝子を含む核酸）を有する自然環境から単離される生物学的材料でありうるとともに、精製または単離された核酸からなりうるかまたは標的核酸を含有する組織試料、体液試料、または細胞試料などの生物学的試料を含有しうる。組織試料の収集は、個体の組織由来の培養されたヒト細胞のインビトロでの収集あるいは例えば採血、脊椎穿刺、組織塗抹または組織生検によりインビボで対象から直接サンプリングする任意の手段も含む。場合により、組織試料は、抗凍結剤、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、またはプロパンジオール-スクロースの存在下での、分析可能な条件、例えば迅速な凍結、または制御された凍結レジーム（regime）の下で試料の核酸を保護する周知の保存手段により分析前に保存されうる。組織試料はまた、分析のための増幅を目的として保存前または保存後にプールされうる。いくつかの実施形態では、試料は 2 種以上の異なる個体由来する DNA、組織または細胞を含有する。別の実施形態では、PKD 遺伝子の分析に必要な試料の量は試料のタイプに依存し（例えば血液については 5 ミリリットル超）、この量は当業者により評価されるのが最もよい。好ましくは、無菌技術を用いてこれらの試料を得ることによりその汚染を回避する。

40

【0017】

ゲノム DNA を特定の試料から単離する方法は、周知であり、日常的なものである（サムブルック（Sambrook）ら、上記、1989 年を参照）。特定の実施形態では、

50

ゲノム P K D DNA の増幅は、例えば P K D 遺伝子のエクソンおよびイントロンの分析が可能であることを含め、c D N A の増幅プロセス全体にわたって利点を有する。このようにして、P K D 遺伝子のイントロンまたはエクソン配列のいずれかに関連性がある目的の標的配列が増幅されかつ特徴づけられうる。目的の標的配列は、P K D 関連障害または疾患（例えば A D P K D ）に相関する変化を含むヌクレオチド配列の変化を有するかまたは有すると考えられる P K D 遺伝子の任意の配列または遺伝子座である。

#### 【 0 0 1 8 】

P K D 遺伝子内での変異は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、リガーゼ連鎖反応、自己持続配列複製、転写増幅系、Q - レプリカーゼ、または任意の他の核酸増幅方法を含む増幅とその後の増幅産物の検出により検出可能である。したがって、一実施形態では、全血から抽出されるゲノム D N A は、P K D 1 全体が複製された領域を包含する 8 つのセグメントの長距離増幅による極めて特異的な P K D 1 遺伝子の増幅における鋳型としての役割を果たす。特異的な長距離増幅により、本来であれば分析が困難になる P K D 1 相同体の誤った増幅が阻止される。これらの P K D 1 相同体は、P K D 1 に密接な関連性があるが、発現された P K D 1 遺伝子産物をコードすることのない配列である。実際、P K D 1 遺伝子の分析は、主に、染色体 1 6（1 6 p 1 3 . 1）沿いの P K D 1 に隣接してマッピングされた、P K D 1 遺伝子に相同性が高いコピーが少なくとも 3 つ存在することから、遺伝分析に対して感度は高くなかった。これらの P K D 1 遺伝子相同体の配列は、Gen Bank 登録番号 A C 0 0 2 0 3 9、A C 0 1 0 4 8 8、A C 0 4 0 1 5 8、A F 3 2 0 5 9 3 および A F 3 2 0 5 9 4（これら各々は参照により本明細書中に援用される）に含まれる。染色体位置 1 6 p 1 3 . 1 または 4 q 2 1 ~ 2 3 にマッピングされたかかる相同体の数例が、同定されかつ配列決定されている。P K D 1 相同体は、真の P K D 遺伝子に対して 9 5 % を超える配列同一性を共有しうる。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態では、入れ子（n e s t e d）増幅が、先行する増幅反応における増幅産物を鋳型として用いて実施される。好ましくは、入れ子増幅反応は、先行する P C R 反応からの P C R 増幅産物を鋳型として用いる入れ子 P C R である。プライマーのアニーリング温度の最適化に加えて「入れ子」増幅を用いることで、P K D に特異的な増幅アッセイの特異性および感受性の増大が可能である。例えば、入れ子 P C R を含む方法は、2 つの連続 P C R 反応を含みうる。少なくとも 1 つの P K D に特異的なプライマー（例えば、P K D に特異的なプライマーと対照プライマーまたは 2 つの P K D に特異的なプライマー）を含む第 1 のプライマー対を用いる P C R の複数のサイクル（例えば 1 0 ~ 4 0 もしくは 1 0 ~ 3 0 もしくは 1 0 ~ 2 0 サイクル）後、1 回目の反応における少量の一定分量（例えば、5 0  $\mu$  l の反応における 1  $\mu$  l）が、第 1 の対の内部にあるかまたはその間で入れ子構造をした配列にアニールする、少なくとも 1 つの P K D に特異的なプライマー（例えば、P K D に特異的なプライマーと対照プライマーまたは 2 つの P K D に特異的なプライマー）を含む新しいプライマーセットを用いた P C R 反応の複数のサイクル（例えば 1 0 ~ 4 0 もしくは 1 0 ~ 3 0 もしくは 1 0 ~ 2 0 サイクル）を含む 2 回目における鋳型の役割を果たす。

#### 【 0 0 2 0 】

特定の実施形態では、上記の 8 つの長距離 P C R 産物は、4 3 の入れ子 P C R 反応における鋳型としての役割を果たし、P K D 1 遺伝子のエクソン 1 ~ 3 4 をカバーする。P K D 1 遺伝子に固有領域（エクソン 3 5 ~ 4 6）および P K D 2 遺伝子全体は、2 8 の追加の遺伝子セグメントとしてゲノム D N A から増幅される。入れ子 P C R 法を用い、増幅が奏功した鋳型は P K D 特異性に対して 2 回選択される。単一のプライマー対の機能が自然に失われる場合、入れ子 P C R の使用により、種特異的な産物の収量や、ひいてはアッセイの感受性も大幅に増大する可能性がある。

#### 【 0 0 2 1 】

プライマーを設計しかつ P C R を実施するための方法は当該技術分野で既知である（「分子生物学 最新プロトコル（C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c

10

20

30

40

50



ular Biology)」、上記を参照)。プライマーを選択するための一般的基準は、長距離PCRと入れ子PCRの双方におけるプライマーに適用される。入れ子PCRにおけるプライマーに関しては、両方の入れ子プライマーであれば、第1のプライマー対の内側の(例えばその内部の)配列および少なくとも1つの入れ子プライマーにアニールする必要がある。PKD1相同体の意図されない増幅を排除するいくつかのPKD1に特異的なプライマーが開発されている(例えば、参照により本明細書中に援用される米国特許出願公開第2003/0008288号明細書を参照)。「PKDに特異的な」プライマーが特定のストリンジェントな条件下で(イントロンおよびエクソンを含む)PKD遺伝子内部の配列にアニールする核酸配列となる場合、他のかかるプライマーの設計が可能である。PKDに特異的なプライマーは、特定のストリンジェントな条件下で、真に発現されたPKD1遺伝子内に存在する固有部位にアニールし、PKD1相同体または他の配列にアニールすることがない。したがって、PKDに特異的なプライマーは、これらの固有のPKD部位を用いて設計可能である。固有部位の長さは、数個のヌクレオチドから数千個のヌクレオチドまで変化しうる。同定されている大部分の固有部位は、100個以下のヌクレオチド、例えば、50個以下のヌクレオチド、または30個以下のヌクレオチドを含む。PKDに特異的なプライマーを用いる増幅により増幅反応の特異性が高まり、PKD相同体から増幅された副産物の量が減少する。プライマーは10~60ヌクレオチド長、例えば18~52ヌクレオチド長でありうる。

#### 【0022】

71のPCR産物が双方向に配列決定されることで、ヌクレオチド配列の変化が検出される。特定の実施形態では、すべてのPCRプライマーがタグ(例えばM13フォワードおよびリバースプライマー配列)を含むことで、同じプライマーを用いた全断片の双方向の配列決定が可能になる。DNAを配列決定する方法は当該技術分野で周知であり、プライマー位置および/または断片長に依存する。例えば、一実施形態では、配列決定はABI Big Dyeターミネーターの化学反応後にABI 3730キャピラリーシーケンサー上での電気泳動を用いて実施される。本発明のヌクレオチドの変化をPKD配列内で検出し、既に発症しているかまたは発症しうるADPKDの評価が可能である。同定される新規な変化は、疾患関連変異、例えばフレームシフトまたはナンセンス変異または変異のないスプライス部位の変化として臨床的に解釈されうる。良性の多型であれば、サイレントまたは保存的ミスセンス変異、イントロン変異体および同義語コドンの変化を含むことになる。

#### 【0023】

PKD遺伝子内での配列の変化は、変性高性能液体クロマトグラフィー(DHPLC)を用いても検出可能である。DHPLCを用い、(変異の存在から生じる)ヘテロ二本鎖と同じ塩基対長を有するホモ二本鎖を分離することにより、配列変異体が検出されている。この分離は、ヘテロ二本鎖がホモ二本鎖よりも低い融解温度( $T_m$ )を有するという事実に基づく。DHPLCでは、特定の条件下でわずか1塩基対だけ異なるヘテロ二本鎖の分離が可能である。「ヘテロ二本鎖部位分離温度」または「中間温度」または「 $T_m$ 」は、1つまたは複数の塩基対がヘテロ二本鎖DNA断片内の塩基対ミスマッチの部位で変性する、すなわち分離する温度を意味するように本明細書中で定義される。DHPLCが塩基対ミスマッチの部位で部分的に変性する温度、すなわちヘテロ二本鎖を変性するのに十分な温度で実施される場合、ホモ二本鎖は、同じ塩基対長を有するヘテロ二本鎖から分離され、かつ様々な方法(例えばゲル電気泳動)によって検出されうる。DHPLCを用い、異なる塩基対長を有する二本鎖を分離することも可能である。

#### 【0024】

同定されたPKDヌクレオチドの変化の評価

PKDにおける極めて多数の新規なヌクレオチドの変化が同定されている(表4~7を参照)。次いで、これらの配列の変化を評価することで病原性があるか否かが判定され、この結果、改変されたPKD遺伝子産物(例えばタンパク質、ポリペプチド)が得られた。「ヌクレオチド配列の変化」または「ヌクレオチドの変化」または「変異」は、正常な

10

20

30

40

50

P K D 遺伝子（例えば配列番号 1、配列番号 7 または配列番号 4）に対する、1 つまたは複数の置換（転位またはトランスポージョン）、欠失（遺伝子座の欠失を含む）、挿入（複製を含む）、転座、逆位および / または他の修飾を含むヌクレオチド配列の修飾を示す。したがって、P K D 1 または P K D 2 ヌクレオチド配列（例えば D N A または m R N A）におけるヌクレオチドの改変 / 変化は、欠失、挿入、置換または逆位でありうるか、または P K D ポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドのリーディングフレームにおいて全く変化が存在しないようなサイレントでありうる。病原性変異は、アミノ酸の変化（例えば、サイレントでないかまたは非保存性の変化）をもたらし、かつ / または停止コドンヌクレオチド配列に導入するかまたは P K D 1 または P K D 2 ヌクレオチド配列の転写または翻訳に關与するヌクレオチド配列を変化させる核酸の変化であり、例えば P K D 1 または P K D 2 遺伝子転写産物の m R N A への改変されたスプライシングをもたらす変化である（図 7 A および 7 B を参照）。「アミノ酸の変化」は、正常な P K D アミノ酸配列（例えば配列番号 3 または配列番号 6）に対する、置換、フレームシフト、欠失、切断および挿入、および / または他の修飾を含むアミノ酸修飾を示す。したがって、P K D 遺伝子配列内での変異は、切断された P K D ポリペプチドの発現または P K D ポリペプチドの発現の完全な低下までももたらしうる。

#### 【 0 0 2 5 】

それに対し、多型性変異または変異体は、P K D タンパク質 / ポリペプチドを上記の方法で改変することがない、かつ / または改変すると予想されない、ならびに / あるいは A D P K D などの P K D 関連疾患の徴候または症状と相關することがない核酸の変化である（表 8 および 9 を参照）。これらの変異は、例えば、コードされたアミノ酸の変化をもたらすことのないヌクレオチド置換、すなわちサイレント変異を含み、ここでは野生型（例えば配列番号 1、7 または 4 を参照）と変異体コドンの双方は同じアミノ酸をコードし、それらは疾患の場合に分離することがないものかまたは 1 群の未罹患個体内で見出されるものである。P K D ポリペプチドの二次構造および耐水性（*h y d r o p a t h i c n a t u r e*）であればこれらの変異により実質的に変化しないと予想されるため、野生型アミノ酸（例えば配列番号 3 または 6 を参照）が類似の特性を有する別のアミノ酸と置換される保存性アミノ酸置換を引き起こす核酸の変化は非病原性の多型性変異でもありうる。一般に、アミノ酸置換の以下の群、すなわち（1）*a l a*、*p r o*、*g l y*、*g l u*、*a s p*、*g l n*、*a s n*、*s e r*、*t h r*；（2）*c y s*、*s e r*、*t y r*、*t h r*；（3）*v a l*、*i l e*、*l e u*、*m e t*、*a l a*、*p h e*；（4）*l y s*、*a r g*、*h i s*；および（5）*p h e*、*t y r*、*t r p*、*h i s* が保存的であると考えられる。次いで多型は、P K D 変異に関しては、（i）アミノ酸を改変すると予測されていない配列変異体；（i i）少なくとも 1 個体内でのホモ接合性にて見出されるミスセンス変化；（i i i）未知の重要性があるイントロン配列；または（i v）未知の重要性がある 3' U T R の変化として定義される。したがって、多型性変異であれば、依然として適切に発現されかつ / または完全に機能的である P K D タンパク質 / ポリペプチドをもたらすと予想されることになり、すなわちこれらの変異体であれば A D P K D に関連性があると予想されないことになる。

#### 【 0 0 2 6 】

P K D 1 および P K D 2 遺伝子内で同定されたヌクレオチド配列の変化における病原性については多数の方法で評価可能である。変異 P K D ヌクレオチド配列と野生型 P K D 配列（配列番号 1 および 4）との比較が可能であり、かつ、核酸配列の変化のアミノ酸コドンに対する効果が評価可能である。例えば、停止コドン（例えば U G A、U A A、U A G）またはフレームシフトを生成するヌクレオチド配列の変化は、一般にナンセンスポリペプチドを生成しかつ / または停止コドンも生成するか、あるいはコンセンサスドナー / アクセプタのスプライス部位を改変するヌクレオチド配列の変化であれば、非機能性の P K D タンパク質、切断された P K D タンパク質を生成するか、またはその発現を完全に失わせることになる。これらの変異であれば病原性があると予想されることから、この変異は A D P K D と相關する。

## 【 0 0 2 7 】

停止コドン、フレームシフトまたはスプライス部位変異をもたらすことのない P K D 核酸配列の変化についても、変異 P K D アミノ酸配列を様々な種由来の野生型 P K D アミノ酸配列と比較し、変化が数種を通じて保存されるアミノ酸残基に作用するか否かを判定することにより評価可能である。特に、アミノ酸の変化（すなわちミスセンス変異）または場合により 1 つまたは複数のアミノ酸残基の完全な欠失（すなわちインフレーム欠失；表 5 も参照）の原因となるいくつかの隣接ヌクレオチド残基の欠失（例えば 3、6 もしくは 9 ヌクレオチドの欠失）であれば、依然として発現される P K D ポリペプチドが生成されることになる。数種（例えば、ヒト、イヌ、マウス、魚、ショウジョウバエ、線虫など）を通じて保存されるアミノ酸残基の変化または欠失は、「保存された」アミノ酸残基が同一であるかまたは類似の特性を有するものである場合（例えば、a l a、p r o、g l y、g l u、a s p、g l n、a s n、s e r、t h r）、アミノ酸残基が P K D タンパク質の機能にとって重要 / 重大であることを明示することになる。したがって、かかる P K D の変異であっても、A D P K D と関連性がありかつ / またはそれを予測するものであることが予想されうる。

10

## 【 0 0 2 8 】

さらに、P K D 核酸配列に対する変化、特にミスセンス変異をもたらすものの予測 / 評価に利用可能なアルゴリズムもいくつか存在する。これらのアルゴリズムは、例えば、ミラー (M i l l e r) / クマー (K u m a r) マトリックス (ミラー M . P . (M i l l e r M . P .) およびクマー S . (K u m a r S .) 、H u m M o l G e n e t 1 0 ( 2 1 ) : 2 3 1 9 - 2 3 2 8 頁、2 0 0 1 年) ; 「G r a n t h a m ' s c h e m i c a l d i f f e r e n c e m a t r i x ; O n l i n e M e n d e l i a n I n h e r i t a n c e i n M a n (O M I M)」、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>; S p l i c e S i t e P r e d i c t i o n b y N e u r a l N e t w o r k (S S P N N) (レーゼ M . G . (R e e s e M . G .) ら、J C o m p u t B i o l 4 ( 3 ) : 3 1 1 - 3 2 3 頁、1 9 9 7 年も参照)、<http://fruitfly.org/seqtools/splice.html>; A u t o m a t e d S p l i c e S i t e A n a l y s e s (A S S A) (ナラ V . K . (N a l l a V . K .) ら、H u m M u t a t 2 5 ( 4 ) : 3 3 4 - 3 4 2 頁、2 0 0 5 年およびロガン P . K . (R o g a n P . K .) ら、H u m M u t a t 1 2 ( 3 ) 1 5 3 - 1 7 1 頁、1 9 9 8 年も参照)、<https://splice.cmh.edu/>; S i m p l e M o d u l a r A r c h i t e c t u r e R e s e a r c h T o o l (S M A R T) 、<http://smart.embl.de>; P f a m 、<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>; M D R D 方程式 : <http://nephron.com/cgi-bin/MDRDSI.cgi>; P r e d i c t i o n o f P r o t e i n S o r t i n g S i g n a l s a n d L o c a l i z a t i o n S i t e s i n A m i n o A c i d S e q u e n c e s I I (P S O R T I I) (クログ A . (K r o g h A .) ら、J M o l B i o l 3 0 5 : 5 6 7 - 5 8 0 頁、2 0 0 1 年も参照)、<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>; および T r a n s m e m b r a n e H e l i c e s P r e d i c t i o n (T M H M M) 、(グリム D . H . (G r i m m D . H .) ら、J B i o l C h e m 2 7 8 : 3 6 7 8 6 - 3 6 7 9 3 頁、2 0 0 3 年も参照)、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> を含む。これらや他のアルゴリズムは、m R N A および / またはタンパク質の構造、機能およびモチーフの予測による、変異（例えばミスセンス変異）が多型に対する病原性の変化を表すという可能性の判定に役立ちうる。

20

30

40

## 【 0 0 2 9 】

病原性の有無が定かでない P K D 変異をさらに評価する場合、人種的に多様な非罹患個体の集団に由来する完全な配列情報を含むデータセットによっても容易となりうる。かか

50

る集団に由来する正常または野生型の P K D 1 および P K D 2 配列情報であれば、対照集団内での配列変異体の存在または不在を評価しかつ既知の非病原性の配列変異体のスペクトルを拡張するのに同定された新規な P K D 変異との比較にとって有用な対照となる。同定されている P K D 変異に対する比較対象のかかるデータセットを有するのであれば、診断的かつ予後的に、特に A D P K D を有する確率が 5 0 % 未満である個体（例えば A D P K D を有する個体の子孫および / または同胞でない個体）の分析において有利となる。

#### 【 0 0 3 0 】

P K D 遺伝子内での変異 P K D 遺伝子産物に対する効果は、保有するポリヌクレオチドまたは作成されたポリヌクレオチド（例えば組換えポリヌクレオチド）を発現させて同定された変異を得ることにより評価および / または確認がなされう。ポリヌクレオチドは変異 P K D ポリペプチドまたは組換え核酸分子の一部を含む可能性があり、それは例えば融合 P K D タンパク質（例えばタグ化 P K D タンパク質）をコードしう。変異ポリヌクレオチドまたは組換え核酸分子はベクターに挿入可能であり、それは発現ベクターでありうるとともにプラスミド、ウイルスなどから誘導可能である。発現ベクターは、一般に、複製の開始点、プロモーター、およびベクターを有する形質転換細胞の表現型選択を可能にする 1 つまたは複数の遺伝子を有する。使用に適する発現ベクターは当該技術分野で周知であり、例として細菌内での発現用の T 7 に基づく発現ベクター、哺乳類細胞内での発現用の p M S X N D 発現ベクターまたは昆虫細胞内での発現用のバキュロウイルス由来ベクターなどが挙げられる。ベクターの選択は、ポリヌクレオチド配列のサイズおよび用いられるべき宿主細胞に依存することになる。したがって、本発明の方法において用いられるベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、レオウイルス、パラミクソウイルスなど）、またはその選択された部分（例えばコートタンパク質、スパイク糖タンパク質、キャプシドタンパク質）でありう。例えば、コスミドおよびファージミドは、これらのベクターが大きいポリヌクレオチドを安定的に伝播可能であることから、典型的には分析または修飾対象の特定の核酸配列が大きい場合に用いられる。コスミドおよびファージミドは、特に P K D ポリヌクレオチド（例えば配列番号 1）または変異 P K D 1 ポリヌクレオチドの発現または操作に適する。

#### 【 0 0 3 1 】

種々の宿主 - 発現ベクター系は、野生型 P K D ポリヌクレオチド配列（例えば配列番号 1 または配列番号 4）、P K D コード配列（例えば配列番号 2 または配列番号 5）および変異体または変異 P K D 1 もしくは変異 P K D 2 ポリヌクレオチドを発現するのに用いられう。特定の実施形態では、P K D ポリヌクレオチドをタグ化することで（例えば、F L A G、M y c、ビオチン、ストレプトアビジン（streptavidin）、アビジン（avidin）など）、P K D ポリペプチドの暴露後での精製および / または画像化が促進される。かかる宿主 - 発現系は、目的のヌクレオチド配列の生成とそれに続く精製を媒介する媒体を表し、かつ、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換または形質移入される場合に、原位置で P K D 変異体またはその変異ポリペプチドもしくはペプチド部分を含む P K D タンパク質を発現しうる細胞も表す。かかる細胞は、限定はされないが、P K D 1 ポリヌクレオチドもしくはそのオリゴヌクレオチド部分（野生型、変異体または他の変異体）を有する組換えバクテリオファージ D N A、プラスミド D N A またはコスミド D N A の発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌（E . c o l i）、枯草菌（B . s u b t i l i s））；P K D ポリヌクレオチドもしくはそのオリゴヌクレオチド部分（野生型、変異体または他の P K D 変異体）を有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス（S a c c h a r o m y c e s）、ピヒア（P i c h i a））；P K D ポリヌクレオチドもしくはそのオリゴヌクレオチド部分（野生型、P K D 変異体または他の変異体）を有する組換えウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルスまたはタバコモザイクウイルス）で感染されるかまたは変異 P K D ポリヌクレオチドもしくはそのオリゴヌクレオチド部分を有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば T i p

ラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター(例えばメタロチオネインプロモーター)または哺乳類ウイルス由来のプロモーター(例えばアデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を有する組換え発現コンストラクトを内在する哺乳類細胞系(例えばHEK293、COS、CHO、BHK、3T3)などの微生物を含む。PKDポリヌクレオチドにおけるベクターおよび発現系についてのさらなる考察が、例えば米国特許出願公開第2003/0008288号明細書中に見出されうる。

#### 【0032】

例えば、細胞-細胞および細胞-マトリックス接合での細胞表面のシグナル伝達受容体や腎細胞内でのメカノセンサとして機能すると考えられているPKD1遺伝子産物のポリシスチン-1(PC-1)は、長いN末端細胞外領域および短い細胞質テールを有する11-膜貫通糖タンパク質である(ボレッタ A. (Boletta A.) およびゲルミノ G. G. (Germino G. G.), Trends Cell Biol 13 (9): 484-492 頁、2003年;ハリス P. C. (Harris P. C.) およびトレス V. E. (Torres V. E.), Curr Opin Nephrol Hypertens 15 (4): 456-463 頁、2006年;ナウリ S. M. (Nauli S. M.) ら、Nat Genet 33 (2): 129-137 頁、2003年;ヒュー J. (Hughes J.) ら、Nat Genet 10 (2): 151-160 頁、1995年)(図8Aも参照)。PC1は、目的のいくつかのアミノ酸配列モチーフ(例えば、卵ゼリーの受容体(REJ)ドメイン、G-タンパク質共役受容体タンパク質分解部位(GPS)、C型レクチンドメイン、ロイシンリッチリピート(LRR)、多発性嚢胞腎疾患リピート(polycystic kidney disease repeat)(PKD-R)、膜貫通ドメイン(TM)、コイルドコイルドメイン(CC))を有する(図4も参照)。PC-1機能/活性の評価にとって有用な部位は、PC-1タンパク質が切断を受ける部位のGPSドメインである(チェン F. (Qian F.) ら、Proc Natl Acad Sci USA 99 (26): 16981-16986 頁、2002年)。PC1のこの部位での切断によりN末端断片(NTF)およびC末端断片(CTF)が生成され、この切断は正常なPC-1機能にとって重要である(チェン F. (Qian F.) ら、Proc Natl Acad Sci USA 24: 99 (26): 16981-16986 頁)。したがって、PKD1遺伝子産物の発現および切断を用い、同定されたPKD1の変異、特にミスセンス変異の病原性の評価が可能である。PKD1変異体は(例えば発現ベクター内での)作成や上記の方法での(例えば組換え的にタグ化された融合タンパク質としての)発現が可能であり、かつPKD1変異体産物の切断については(例えば免疫沈降および/またはウエスタンブロット、タグの蛍光、放射活性などにより)アッセイ可能である。

#### 【0033】

PKD変異を評価するための上記の方法のうちの1つまたは複数を用い、同定されているPKD1またはPKD2遺伝子の変異が良性の多型であるかまたは病原性があるかが判定可能であることから変異がADPKDに関連する可能性があり、次いでそれらを用い、例えば本発明の方法においてADPKDを診断または予測することが可能である。

#### 【0034】

本発明の方法

病原性があると同定されかつ判定されたPKD変異が表4~7に列挙される。これらの変異を本発明の方法において用いると、個体におけるADPKDの発症が検出または予測されるかあるいは個体における変異PKD遺伝子の存在または不在が検出される。詳細には、個体から得られる核酸試料中の配列番号1または配列番号7のヌクレオチド配列を有するPKD1遺伝子内での1つまたは複数の同定されたヌクレオチド配列の変化の存在を検出することにより、ADPKDが検出されるかまたはADPKDの発症が予測される。同様に、ADPKDは、本発明の方法を用い、個体から得られる核酸試料中の配列番号4のヌクレオチド配列を有するPKD2遺伝子内での1つまたは複数の同定されたヌクレオ

チド配列の変化の存在を検出することにより、個体において検出または予測されうる。A D P K Dに関連性があるP K D遺伝子内でのいくつかの変異が単一の個体/家系に限って検出されていることから（例えば表7を参照）、上に列挙されていないP K D 1 遺伝子（例えば配列番号1または7）および/またはP K D 2 遺伝子（配列番号4）におけるこれらの他のヌクレオチド配列の変化（発明の概要および表4～7を参照）は本発明の方法においても検出可能である。本方法は、上記の1つまたは複数の方法（例えばDNA単離方法/キット）および/または1つまたは複数の方法（例えば配列決定、PCR、DHPLC）により個体由来の試料（例えば体液、組織、細胞）を得ることによって実施可能である。

#### 【0035】

さらに、本発明は、上記の方法（例えばDNA単離方法/キット）により個体由来の核酸試料（例えば、体液、組織または細胞試料）を得ることによって個体における変異P K D 遺伝子の存在または不在を検出する方法と、1つまたは複数の上記の方法（例えば配列決定、PCR、DHPLCなど）の使用によりP K D 1またはP K D 2 遺伝子内での1つまたは複数の同定されたヌクレオチド配列の変化の存在または不在を検出する方法に関する。特定の実施形態では、1つまたは複数の同定されたP K Dヌクレオチド配列の変化の検出は、個体がA D P K Dを有するかまたはA D P K Dを発症することになることを示す。

#### 【実施例】

#### 【0036】

患者の募集および臨床評価

82の血縁関係を持たないA D P K D患者を腎臓の外来診療所から募集した。ジョンズ・ホプキンス（Johns Hopkins）の治験審査委員会（Institutional Review board）が試験を承認し、各患者からインフォームドコンセントを得た。A D P K Dの診断は、確立された超音波基準（ラヴィン（Ravine）ら、Lancet 2:343（8901）:824-7頁、1994年に記載）に基づくものであった。詳細な病歴については、各参加者から試験への参加時に得た。コード化した血液試料を各発端者から収集し、変異分析のためにアテナ・ダイアグノスティクス社（Athena Diagnostics, Inc.）に送った。たいいていの場合、定期的な実験室データは標準的な医学的評価の一部として得られた。

#### 【0037】

試験集団のベースライン特性を表2にまとめる。試験参加者の平均年齢は46.5歳であった。変異分析の実施時にE S R Dに達したのは22%に過ぎなかった。E S R Dに達しなかった参加者における平均糸球体濾過率（GFR）は68ml/分であった。家族歴は、患者の34%において未知かまたはA D P K Dに対して陰性のいずれかであった。

#### 【0038】

変異分析

患者試料のDNA配列分析を、過去に詳細な記載がなされ、アテナ・ダイアグノスティクス社（Athena Diagnostics, Inc.）で最適化された方法を用いて行った（ワトニック T. J.（Watnick T. J.）ら、Hum Mol Genet 6（9）:1473-1481頁、1997年；ワトニック T. J.（Watnick T. J.）ら、Mol Cell 2（2）:247-251頁、1998年；ワトニック T.（Watnick T.）ら、Am J Hum Genet 65（6）:1561-1571頁、1999年；ファクデーキッチャロエン B.（Phakdeekitcharoen B.）ら、Kidney Int 58（4）:1400-1412頁、2000年；ファクデーキッチャロエン B.（Phakdeekitcharoen B.）ら、J Am Soc Nephrol 12:955-963頁、2001年）（参考文献は全体が本明細書中に援用される）。例えば、ゲノムDNAは、Puregene（登録商標）DNA抽出キット（ミネソタ州ミネアポリス（Minneapolis）のジェントラ・システムズ社（Gentra Systems, I

10

20

30

40

50

nc.) または他の適切な抽出方法を用いて全血から得られる。増幅されたDNA産物は、PKD1複製領域全体を包含する8つのセグメントの極めて特異的な長距離PCR増幅における鋳型としての役割を果たし、場合により分析が困難となるPKD1相同体の増幅が阻止された。8つの長距離PCR産物が43の入れ子PCR反応における鋳型としての役割を果たす一方、PKD1遺伝子および全PKD2遺伝子の固有領域が28の追加の遺伝子セグメントとしてゲノムDNAから増幅された。PCRプライマーをM13フォワードおよびリバースプライマー配列でタグ化し、同じプライマーを用いる全断片の双方向の配列決定を可能にした。

#### 【0039】

次いでPCR産物を、例えばABIビッグ・ダイ(Big Dye)(商標)ターミネーターの化学反応(バージョン3.1および1.1、プライマー位置および/または断片長に依存)後にABI3730キャピラリーシーケンサー(コネティカット州ノーウォーク(Norwalk)のアプレラ・コーポレーション(Applera Corporation))上での電気泳動を用いて双方向に配列決定した。このプロセスは、高度に保存されたエクソン-イントロンスプライス接合を含む、PKD1およびPKD2遺伝子の全コード領域における配列データを提供する。

#### 【0040】

##### 正常試料の分析

正常集団を、65歳を超える匿名の試料から選択し、運動失調試験のためにアテナ・ダイアグノスティクス社(Athena Diagnostics, Inc.)に送った。最低171の個体からのPCR産物を配列決定し、PKD1またはPKD2のいずれかにおける特定の共通の変異体の頻度を判定した。これらの試料については完全なDNA分析を行わなかった。

#### 【0041】

##### 切断試験のためのPC-1変異体コンストラクトの生成

ミスセンス変異体を、例えばクイックチェンジ(Quick Change)(商標)部位特異的変異誘発キット(Site-Directed Mutagenesis Kit)(ストラタジーン(Stratagene))を用いて生成した。完全長の野生型PKD1 cDNAコンストラクトおよびこのコンストラクトのうちの3つ(Q3016R、F3064L、F2853S)については過去に記載がなされており(ハナオカ K. (Hanaoka K.)ら、Nature 408:990-994頁、2000年; チェン F. (Qian F.)ら、Proc Natl Acad Sci USA 24:99(26):16981-16986頁、2002年)、その全体が本明細書中に援用される。

#### 【0042】

##### 切断アッセイ

コンストラクトを、リポフェクタミン・プラス(Lipofectamine Plus)(商標)(メリーランド州ロックヴィル(Rockville)のライフ・テクノロジーズ(Life Technologies))を用いてHEK293細胞に形質移入した。形質移入後、細胞を、氷上、プロテアーゼ阻害剤(ロシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ(Roche Molecular Biochemicals))の存在下で緩衝液[20mMリン酸ナトリウム、pH7.2、150mM NaCl、1mM EDTA、10%(vol/vol)グリセロール、0.5%トリトンX-100]中に1時間溶解した。細胞溶解液をアンチ-フラグ(ANTI-FLAG)(登録商標)M2ビーズのアフィニティゲル・フリーザー-セイフ(Affinity Gel Freezer-Safe)(シグマ(SIGMA))を用いて免疫沈降(IP)し、次いでニューページ(NuPAGE)(登録商標)3~8%トリス-アセテートゲル(Tris-Acetate Gel)(インビトロジェン(Invitrogen))上に溶解した。IP産物を、イモビロン(Immobilon)(商標)転写膜(ミリポア(MILLIPORE))上にエレクトロブロットし、-ロイシンリッチリピート(LRR)および

10

20

30

40

50

P C 1 に対する - C 末端 ( C T ) 抗体でプローブした。これらの抗体については過去に記載がなされている ( ボレッタ A . ( B o l e t t a A . ) ら、M o l C e l l 6 : 1 2 6 7 - 1 2 7 3 頁、2 0 0 0 年 ; チェン F . ( Q i a n F . ) ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 2 4 : 9 9 ( 2 6 ) : 1 6 9 8 1 - 1 6 9 8 6 頁、2 0 0 2 年 ) 。

#### 【 0 0 4 3 】

##### 結果

D N A 配列の分散分析により 3 種の変異体を同定した。クラス I 変異体を、追加情報なしに診断に用いられる、停止コドン、フレームシフトおよびスプライス部位変化を含む、確実に病原性のある配列変異体を有するものとして定義した ( 表 3、4 )。クラス I I 変異体は、下記に詳述のように様々なアルゴリズムに基づき病原性がある可能性が高いと判定されたインフレーム欠失またはアミノ酸置換を示すものを含んだ。クラス I I I 変異体は、病原性の変化が全く確認されないものを含んだ。

#### 【 0 0 4 4 】

##### クラス I 変異体

4 2 パーセント ( N = 3 4 ) の試験集団が、停止コドン、フレームシフトまたはスプライス部位変化を有した ( 表 3、4 )。これらの変化のうち、2 4 が P K D 1 で生じ ( 全試料の 2 9 % )、かつ 1 0 が P K D 2 で生じた ( 全試料の 1 2 % )。クラス I 変異体内で見出された変異は、P K D 1 または P K D 2 タンパク質の早発性の切断を生じることから、A D P K D の場合に分離すると予想された。

#### 【 0 0 4 5 】

##### クラス I I 変異体

参加者 3 0 名が、病原性がある可能性が高いとされるインフレーム欠失または少なくとも 1 つのアミノ酸置換のいずれかを有した ( 表 5 および 6 )。全部で 8 つの固有のインフレーム欠失 ( P K D 1 遺伝子で 6 つと P K D 2 遺伝子で 2 つ ) が検出された ( 表 5 )。いずれの場合も、欠失がトラフグ ( F u g u r u b r i p e s ) ( フグ ) およびハツカネズミ ( M u s m u s c u l u s ) ( マウス ) のポリシスチンタンパク質の間で完全または高度に保存された 1 つまたは複数の残基に作用した。

#### 【 0 0 4 6 】

固有のイントロン変異体を有する他の切断性の P K D 変異を全く有しない 1 0 の個体が存在した。予測されたスプライス部位変異のうち 2 つがコンセンサススプライスドナー / アクセプタ部位に直接作用することがなく、J H U 5 7 3 および J H U 5 9 5 は、8 4 % のドナースプライス部位でグアニンとして高度に保存された残基に作用するイントロン 2 4 のスプライスドナー部位から 5 番目の塩基対でイントロン変化を有した ( I V S 2 4 + 5 G > C )。ニューラルネットワーク・スプライスサイト ( N e u r a l N e t w o r k S p l i c e S i t e ) 予測プログラム ( S S P N ) およびオートメテッド・スプライスサイト・アナリシズ ( A u t o m a t e d S p l i c e S i t e A n a l y s e s ) ( A S S A ) の双方は、かかる変化があればエクソン 2 4 / イントロン 2 4 の境界でスプライスドナー部位の構造を大きく破壊するものとして、これらの変異体が不適切なスプライシングをもたらすことを予測する。J H U 1 0 5 は、P K D 2 エクソン 8 のスプライスドナー部位の末端から 5 番目の塩基対 ( すなわち、配列番号 5 のヌクレオチド残基 1 9 6 4 から下流のイントロン ( イントロン 8 ) へ、左から右に数えて 5 番目のヌクレオチド塩基 ) で類似の変化 ( I V S 8 + 5、G > A ) を有し、そこでは高度に保存されたグアニン残基がアデニンと置換された。さらに、I V S 3 7 - 1 0 C > A ( J H U 6 0 4 ) がヨーロッパ家系における A D P K D の場合に分離することが過去に報告された ( ボグダノヴァ M . ( B o g d a n o v a M . ) ら、H u m M u t a t 1 6 ( 2 ) : 1 6 6 - 1 7 4 頁、2 0 0 0 年 )。J H U 5 6 2 は、スプライス部位に作用する P K D 2 の病原性変異、I V S 7 - 1 G > A ( すなわち、エクソン 8 の開始点から上流のイントロン ( イントロン 7 ) へ、右から左へ数えて 1 番目のヌクレオチド残基 ( 例えば配列番号 5 のヌクレオチド残基 1 7 8 3 ) でのグアニンからアデニンへの変化 ) も有し、その結

10

20

30

40

50



果、エクソン 7 においてアクセプタ部位の欠失がもたらされた。

#### 【0047】

残りの参加者の大部分は、主に PKD 1 においてアミノ酸置換の組み合わせを有した。3 つの主な基準を用い、各ミスセンス変異体の病原性を判定した。ヒトポリシスチン - 1 とフグおよびマウスタンパク質の間での改変された残基の保存について試験した。「完全に保存された」と考えられるアミノ酸は 3 種全部で同一のものであった一方、類似の特性を有する（すなわち同じクラスに属する）アミノ酸を「高度に保存された」残基とした。さらに、各ミスセンス変異体に対して病原性スコアを、ミスセンス変化が病原性の変化に対する多型を表す相対的可能性を定義するミラー（Miller）およびクマー（Kumar）のマトリックス（ミラー M. P. (Miller M. P.) およびクマー S. (Kumar S.)、Hum Mol Genet 12 (21) : 2319 - 2328 頁、2001 年）を用いて割り付けた。このアルゴリズムは、（結節硬化症および嚢性線維症を含む）7 つの疾患遺伝子を通じてのアミノ酸置換変異の共通の属性を判定するためのグランタム（Grant ham）の化学的差異マトリックスと共役された種間配列比較を用いて開発された。他の研究者らは、この方法を用い、アミノ酸置換の特徴づけに役立てている（シャープ A. M. (Sharp A. M.) ら、J Med Genet 42 (4) : 336 - 349 頁、2005 年）。最後に、文献をレビューし、変異体のいずれかが未罹患個体において生じることを他によって報告されたか否かを判断した。1 つまたは複数の個体においてホモ接合性で検出されたいくつかのアミノ酸置換（N = 13、表 9）を多型として分類した。生殖系の ADPKD 変異がヘテロ接合性であることから、これらの変化のうちの 1 つであればおそらくは未罹患の親から継承された野生型対立遺伝子に関連するはずであることになる。

#### 【0048】

患者でグループ分けされた各アミノ酸置換の分析について、表 6 にまとめる。アミノ酸置換が完全または高度に保存されたアミノ酸残基で生じる場合やミラーおよびクマーのマトリックスを用いてより高い病原性の可能性を有することも予測される場合、アミノ酸置換を病原性があると見なした（表 6、灰色の網掛け）。これらの厳しい基準を用い、患者 30 名のうちの 24 名が 1 つまたは複数の病原性のあるアミノ酸置換を有した。これらのミスセンス変化のうちの 6 つが、C 型レクチン（Y420C、Y528C）または PKD リピート（S1047L、R1340W、R1351W、T1861I）のうちの 1 つのいずれかの構造的決定因を破壊することが予測された（図 5 A および 5 B）。ミスセンス変化のうちの 3 つ（Q3016R、E2771K、F2853S）が正常なポリシスチン - 1 の機能にとって重要な特性であるポリシスチン - 1 の切断を破壊することが過去に示された（図 6 参照）（チェン F. (Qian F.) ら、Proc Natl Acad Sci USA 24 : 99 (26) : 16981 - 16986 頁、2002 年）。

#### 【0049】

病原性における基準を満たす再発性の PKD 1 変異体（R2200C、Q739R、G2814R、Q2182R、G2309R、R1340W）が、7 個体において観察され、鎖末端での変異または他の予測された病原性のあるアミノ酸置換のいずれかを内在させた他の個体においても見られた（表 4、6 および 7）。例えば、R2200C は患者 4 名、すなわち JHU584、JHU606、JHU111 および JHU573 において見られた。後者の 2 個体は各々、PKD 1 のフレームシフト変異およびスプライス部位変異を有した。この関連性は、これらの変化が多型を表すことを示唆した。ミスセンス変異をさらに特徴づけるため、342 の正常な染色体を配列決定して多型を同定したところ、小さい（1.4%）が多型の閾値である 1% よりも大きい画分で R2200C の配列の変化が見られた。同様に、Q739R（この試験で 6.4%）および G2814R（ロゼッティ (Rossetti) ら、0.9%）についても未罹患集団のほんの一部で報告されており、各々、多型であるかまたは多型でありうる（トーマス T. (Thomas T.) ら、Am J Hum Genet 65 (1) : 39 - 49 頁、1999 年およびロゼッティ S. (Rossetti S.) ら、Kidney Int 61 (5) : 15

10

20

30

40

50

88 - 1599 頁、2002 年)。

【0050】

これらの病原性のある再発性の変異体のみを有する(追加的な鎖末端での変異または他の病原性のあるアミノ酸置換を有しない)患者が除外される場合、約21%の試料(N = 17/82の患者)が病原性のあるPKD1のミスセンス変異を内在することが予測されることになる。

【0051】

参加者5名、JHU602(N = 2)、JHU100(N = 3)、JHU588(N = 2)、JHU411(N = 2)、JHU114(N = 2)が、病原性における基準を満たす2つ以上のPKD1アミノ酸変異を有した。この観察により、シス型のミスセンス変化を組み合わせてレベルが低下した機能的PKD1タンパク質が協働的にもたらされうという可能性が出てくる(レイテロヴァ J. (Reiterova J.)ら、Hum Mutat 19(5): 573 頁、2002 年)。

【0052】

PKD1に対し、患者37名の中で検出された、鎖末端での変異がないPKD2のアミノ酸置換は2つに過ぎなかった。1つの変化(JHU559におけるM800L、表6)は本系の基準では病原性があると考えられず、PKD2の家系における疾患の場合に分離しなかった。第2のPKD2の置換であるA190Tが患者3名にて見出され、それは正常な3.2%の染色体において同定されたことから同様に病原性における基準を満たさなかった(表6)。

【0053】

クラスII変異体の評価においては、インフレーム欠失の検出が病原性についての有用な予測材料であった。ポリシスチン-1の切断の欠如をもたらすアミノ酸置換についても病原性を予測するものであった。

【0054】

PKD-1タンパク質(ポリシスチン-1)およびPKD-2タンパク質(ポリシスチン-2)におけるクラスIおよびクラスIIのアミノ酸変化を図8中の概略図に示す。

【0055】

クラスIII変異体

試験における対象18名では決定的な病原性のある配列の変化が見られなかった(表6および9)。これらのうちの9名が多発性嚢胞腎疾患の明確かつ広範な家族歴を有した(表9)。他の9名が嚢胞を伴う拡張した腎臓を有し、これら個体のうちの4名はDNA試験時に有意な腎機能障害(GFR < 40)を患っていた。

【0056】

多発性嚢胞腎疾患を有する個体のサブセットにおいて病原性があるかまたは潜在的に病原性がある変化の検出ができないということはいくつかの理由に起因しうる。クラスIII試験の場合に個体において変異事象があれば、用いられる方法論によってアッセイされていないイントロンまたは他の調節領域が関与しうる。直接配列決定であれば欠失または複製にも奏功しない可能性があり、それはホモ接合性の正常な配列の領域として見られることになる。あるいは、用いられるストリンジェントな基準では、いくつかのミスセンス変化が実際に病原性があっても良性として同定されている可能性がある。例えば、ADPKDの広範な家族歴を有するJHU617が、ミラーノクマーのマトリックスによって多型である可能性がより高いと判断されたPKDリピート4において固有のロイシンからバリンへの変化を有することが見出された。それに対し、この変化はPKDリピート4の構造を破壊することなく、病原性がある可能性がある(図5Aおよび5Bを参照)。さらにレイノルズ(Reynolds)の報告によると、ミスセンス変異体は、予想外にも潜在的なスプライス部位を活性化させ、それにより正常な転写産物のレベルを低下させる可能性がある(レイノルズ D. M. (Reynolds D. M.)ら、J Am Soc Nephrol 10(11): 2342 - 2351 頁、1999 年)。

【0057】

## ミスセンス変化の機能分析

病原性があると予測された P K D 1 アミノ酸置換のサブセットがタンパク質の機能特性を破壊したことを確認するため、完全長の変異体コンストラクトが H E K 2 9 3 細胞内で生成されかつ一時的に発現された。図 6 は、E 2 7 7 1 K、Q 3 0 1 6 R および F 2 8 5 3 S が、3 つのさらなるミスセンス変化 ( R 2 6 4 3 C、R 2 7 6 7 C および L 2 6 1 9 P ) と同様に切断を破壊することを示す。

## 【 0 0 5 8 】

## P K D 遺伝子における多型および変動性

表 4 ~ 7 に記載の配列の変化に加え、多数の多型が検出された ( 表 9 ) ( 図 7 A および 7 B も参照 )。多型は、( i ) アミノ酸を改変することが予測されない配列変異体；( i i ) 少なくとも患者 1 名においてホモ接合性で見出されるミスセンス変化；( i i i ) 未知の重要性があるイントロン配列；または ( i v ) 未知の重要性がある 3 ' U T R の変化として定義される。

## 【 0 0 5 9 】

上記の実施例についてのさらなる考察が、M . A . ガルシア - ゴンザレス ( M . A . G a r c i a - G o n z a l e z ) ら、「E v a l u a t i n g t h e c l i n i c a l u t i l i t y o f a m o l e c u l a r g e n e t i c t e s t f o r p o l y c y s t i c k i d n e y d i s e a s e」、M o l . G e n e t . M e t a b ( 2 0 0 7 年 ) 近刊、d o i : 1 0 . 1 0 1 6 / j . y m g m e . 2 0 0 7 . 0 5 . 0 0 4 ( 参照により本明細書中に援用される ) において見出されう。

## 【 0 0 6 0 】

本明細書で引用されるすべての特許、公開された出願および参考文献における教示内容はそれら全体が参照により援用される。

## 【 0 0 6 1 】

本発明がその実施形態例に関して特に示されかつ記載されている一方、当業者により形態および細部の様々な変化が、添付の特許請求の範囲により包含される本発明の範囲から逸脱することなく本明細書中でなされうることが理解されるであろう。

## 【 0 0 6 2 】

## 【 表 2 】

表 2: コホート特性。\*N = 82 の対象。<sup>6</sup>ESRD は移植、透析または MDRD GFR<10ml/分として定義。<sup>7</sup>N = 患者 80 名

% 女性*	50%
試験時の平均年齢*	46.5 (1~73 歳の範囲)
% ESRD <sup>6</sup> *	20.7%
平均 GFR (ml/分) <sup>7</sup>	68.7 (14~126 の範囲)
% 肝嚢胞*	74.3%
% 血管合併症*	9.8%
% 未知または家族歴なし*	30.5%

## 【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3: 確実に病原性のある PKD 変異

遺伝子	切断およびスプライシング			合計 %
	停止コドン	フレームシフト	スプライシング	
<i>PKD1</i>	8 (9.8%)	14 (17.1%)	4 (4.9%)	31.7%
<i>PKD2</i>	6 (7.3%)	3 (3.7%)	2 (2.4%)	13.4%
合計 %	17.1%	20.8%	7.3%	45.1%

10

【 0 0 6 4 】

【表 4】

表 4: 切断およびスプライス部位変異。ロイシンリッチリピート(LRR)、多発性嚢胞腎疾患リピート(PKD-R)、卵ゼリーの受容体ドメイン(REJ)、膜貫通(TM)、コイルドコイル(CC)、新規な変化(N)。変異についての参考として全参考文献リストを参照

ID	変異		変異効果		エクソン	ドメイン	率	参考文献
	cDNA	タンパク質	停止コドン	スプライス部位				
<b><u>PKD1 遺伝子</u></b>								
<b>フレームシフト:</b>								
JHU111	559delTTTAA	N116fsX	117		3	LRR2	1/164	N.
JHU568	1124insCT	W305 fsX	334		5	PKDR1	1/164	N.
JHU582	2291insI	P694 fsX	713		10		1/164	N.
JHU585	2297insI	A696 fsX	713		10		1/164	N.
JHU15	5225delAG	R1672 fsX	1721		15	PKDR11	1/164	1, 8, 23
JHU508	5365insT	V1718 fsX	1770		15	PKDR12	1/164	N.
JHU613	6666insG	D2152 fsX	2174		15	REJ	1/164	N.
JHU611	6881insA	P2224 fsX	2261		15	REJ	1/164	N.
JHU577	8713delT	F2834 fsX	2874		23		1/164	N.
JHU600	9134insI	P2975 fsX	3068		24		1/164	N.
JHU579	9536ins5	I3109 fsX	3317		26		2/164	N.
JHU609	9536ins5	I3109 fsX	3317		26		2/164	N.
JHU599	10239delT	L3343 fsX	3395		30	TM3	1/164	N.
JHU104	11587delG	G3792 fsX	3824		40		1/164	26
<b>ナンセンス:</b>								
JHU605	483 C>A	S91X	91		2	LRR1	1/164	N.
JHU567	4517 C>T	R1436X	1436		15	PKDR8	1/164	N.
JHU108	7006 C>A	Y2265X	2265		15	REJ	1/164	N.
JHU563	7499 C>T	R2430X	2430		18	REJ	1/164	2, 3
JHU593	7877 C>T	Q2556X	2556		19	REJ	1/164	N.

20

30

40

JHU083	8267 C>T	Q2686X	2686		22	REJ	1/164	N.
JHU574	8639 G>T	E2810X	2810		23	REJ	1/164	N.
JHU620	12243 G>A	W4011X	4011		44	TM9	1/164	N.
<b>スプライシング:</b>								
JHU572		IVS4+1G>A.		ドナー部位の欠失	4		1/164	N.
JHU580		IVS19+1G>T.		ドナー部位の欠失	19	REJ	1/164	N.
JHU573		IVS24+5G>C.		ドナー部位の欠失	24		2/164	N.
JHU595		IVS24+5G>C.		ドナー部位の欠失	24		2/164	N.
<b>PKD2 遺伝子</b>								
<b>フレームシフト:</b>								
JHU586	2226insA	720fsX			11		2/164	N.
JHU116	2226insA	720fsX			11		2/164	N.
JHU591	2422delAG	786fsX			12	CC	1/164	N.
<b>ナンセンス:</b>								
JHU578	982 C>T	R306X			4	TM1	2/164	5
JHU583	982 C>T	R306X			4	TM1	2/164	5
JHU607	2224 C>T	R742X			11		1/164	6
JHU594	2680C>T	R872X			14		3/164	N.
JHU566	2680C>T	R872X			14		3/164	N.
JHU608	2680C>T	R872X			14		3/164	N.
<b>スプライシング:</b>								
JHU562		IVS7-1G>A		アクセプタ部位の欠失	7		1/164	N.
JHU105 <sup>L2</sup>		IVS8+5G>A		ドナー部位の欠失	8		1/164	N.

10

20

【 0 0 6 5 】

【 表 5 】

表 5: インフレーム欠失。ロイシンリッチリピート-2(LRR2)、多発性嚢胞腎疾患リピート(PKD-R)、卵ゼリーの受容体ドメイン(REJ)、膜貫通(TM)、コイルドコイル(CC)、新規な変化(N)、\*ドメインにおけるコンセンサス配列を破壊

ID	変異		エクソン	ドメイン	保存			変異体	参考文献
	cDNA	タンパク質			フグ	マウス	レベル		
<u>PKD1 遺伝子</u>									
JHU115	514-551delCAA	N101del	3	LRR2	N	N	完全	1/164	N.
JHU107 <sup>L1</sup>	1848-1851delTGG	V546del	8		V	V	完全	1/164	N.
JHU560	8892-8898delCCAAC TCCG	ANS2894del1	23		AGA	VGS	高い	1/164	N.
JHU592	9905-9909delAAG	K3232del	28	PLAT	I	K	高い	1/164	N.
JHU571	10070-10074delCTC	L3287del	29	TM2	L	L	完全	1/164	N.
JHU112	12597-12600delTGG	V4129del	45		V	V	完全	1/164	N.
<u>PKD2 遺伝子</u>									
JHU 596	374-378delTGG	V103del	1	Poly-Glu	-	V	高い	1/164	N.
JHU416 <sup>L2</sup>	1879-1882delTTC	F605del	8	TM5	-	F	高い	1/164	N.

30

40

【 0 0 6 6 】

【表 6】

表 6: 1つまたは複数のアミノ酸変化を有する家系。下線を引いた家系は、病原性の基準を満たし（灰色の網掛け）、かつ病原性配列変異体を確実に有する患者において見だされていない1つまたは複数のアミノ酸変化を有する家系である。Fp = 切斷を破壊することがない; Fm = 切斷を破壊する。変異についての参考として全参考文献リストを参照

ID	変異			エクソン	ドメイン	グラハム (Graham)	保存			率	参考文献	変異体の 合計#	
	遺伝子	cDNA	タンパク質				フグ	マウス	レベル			PKD 1	PKD 2
JHU612	PKD1	1023C>A	A271D	5	WSC	Path.H.	A	A	完全	1/164	N.	4	0
	PKD1	385G>A	A92T	2		Equal	F	A	高い	1/164	N.		
JHU602	PKD1	1470A>G	Y420C	6	C-LECT*	Path.H.	F	Y	高い	1/164	N.	25	1
	PKD1	4262C>T	R1351W	15	PKDR7*	Path.H.	R	R	完全	1/164	N.		
	PKD1	8855T>A	W2882R	23		Path.H.	G	Q	なし	1/164	N.		
	PKD1	9109G>C	E2966D <sup>Fp</sup>	24		Poly. H.	G	E	高い	1/164	10, 3, 24, 27		
JHU103	PKD1	1794A>G	Y528C	7	C-LECT*	Path.H.	Y	Y	完全	1/164	N.	28	1
	PKD1	6036G>A	R1942H	15	PKDR14	Equal	R	R	完全	1/164	N.		
JHU001	PKD1	2042C>T	R611W	9		Path.H.	R	R	完全	1/164	N.	6	0
	PKD1	8651G>A	G2814R	23	REJ	Path.H.	A	G	高い	6/164	8, 9		
JHU411	PKD1	3351C>T	S1047L	13	PKDR4*	Path.H.	M	S	高い	1/164	N.	60	1
	PKD1	6756A>G	Q2182R	15	REJ	Path.H.	G	Q	高い	2/164	N.		
	PKD2	634G>A	A190T	1		Equal	-	A	高い	3/164	N.		
JHU100	PKD1	5793C>T	T1861I	15	PKDR13*	Path.H.	T	S	高い	1/164	N.	8	1
	PKD1	6707C>T	R2166C	15	REJ	Path.H.	P	R	高い	1/164	N.		
	PKD1	4229C>T	R1340W	15	PKDR6*	Path.H.	H	H	完全	3/164	8		
JHU564	PKD1	10187G>C	G3326R	30	TM3	Path.H.	G	G	完全	1/164	N.	4	1
	PKD1	7116C>G	A2302G	15	REJ	Equal	S	A	高い	1/164	N.		
	PKD1	10311A>G	I3367V	31		Poly. H.	I	V	高い	1/164	N.		
JHU588	PKD1	7554T>C	L2448P	18	REJ	Path.H.	L	L	完全	1/164	N.	39	0
	PKD1	4229C>T	R1340W	15	PKDR6*	Path.H.	H	H	高い	3/164	8		
JHU603	PKD1	7757C>T	R2516C	19	REJ	Path.H.	R	R	完全	1/164	N.	4	0

10

20

30

JHU569	PKD1	8067T>C	L2619P	20	REJ	Path.H.	L	L	完全	1/164	N.	22	2
	PKD1	8411C>A	P2734T	23	REJ	Equal	P	P	完全	1/164	3		
	PKD1	8415A>T	Q2735L	23	REJ	Equal	S	Q	高い	1/164	3		
JHU597	PKD1	8138C>T	R2643C	21	REJ	Path.H.	R	R	完全	1/164	N.	3	1
JHU101	PKD1	8509C>T	R2767C	23	REJ	Path.H.	R	R	完全	1/164	N.	4	2
JHU109	PKD1	8522G>A	E2771K <sup>fm</sup>	23	REJ	Path.H.	E	E	完全	1/164	3, 24, 23	3	0
JHU589	PKD1	8769T>C	F2853S <sup>fm</sup>	23		Path.H.	F	F	完全	1/164	4, 24	22	2
JHU 576	PKD1	10096C>A	N3295K	29	TM2	Path.H.	N	N	完全	1/164	N.	3	0
JHU114	PKD1	12658C>T	R4149C	46		Path.H.	R	R	完全	1/164	N.	22	1
	PKD1	4229C>T	R1340W	15	PKDR6*	Path.H.	H	H	高い	3/164	8		
JHU601B	PKD1	9258A>G	Q3016R <sup>fm</sup>	25	GPS	Path.H.	Q	Q	完全	1/164	4, 3, 27, 24	43	1
	PKD1	2427A>G	Q739R	11		Path.H.	R	Q	高い	11/164	21		
JHU565	PKD1	7476C>A	T2422K	18	REJ	Equal	T	T	完全	1/164	N.	24	0
	PKD1	3527C>G	L1106V	15	PKDR4	Poly. H.	S	V	なし	1/164	N.		
	PKD1	3713C>T	P1168S	15	PKDR5	Equal	-	P	高い	2/164	8		
JHU570	PKD1	1947C>A	P579Q	9		Equal	P	P	完全	1/164	N.	5	1
	PKD1	2427A>G	Q739R	11		Path.H.	R	Q	高い	11/164	21		
JHU575	PKD1	3312A>G	N1034S	13	PKDR4	Poly. H.	G	S	なし	1/164	N.	17	1
JHU178	PKD1	3713C>T	P1168S	15	PKDR5	Equal	-	P	高い	2/164	8	2	1
	PKD2	634G>A	A190T	1		Equal	-	A	高い	3/164	N.		
JHU610	PKD2	634G>A	A190T	1		Equal	-	A	高い	3/164	N.	40	2
JHU617	PKD1	4391C>G	L1394V	15	PKDR8*	Poly. H.	V	L	高い	1/164	N.	5	1
	PKD1	11040T>A	L3730Q	39		Equal	F	L	高い	1/164	N.		
JHU587	PKD1	840G>T	C210F	5		Equal	C	C	完全	1/164	N.	6	2
	PKD1	7197G>A	R2329Q	16	REJ	Equal	E	R	高い	1/164	N.		
	PKD1	2427A>G	Q739R	11		Path.H.	R	Q	高い	11/164	21		
JHU559	PKD1	351G>C	C47S	1	LRR-N	Poly. H.	W	C	高い	1/164	N.	24	3
	PKD2	2464A>C	M800L	13		Poly. H.	-	M	高い	1/164	11		
JHU606	PKD1	6809C>T	R2200C	15	REJ	Path.H.	R	R	完全	4/164	23	5	2
JHU584	PKD1	6809C>T	R2200C	15	REJ	Path.H.	R	R	完全	4/164	23	20	1
JHU106	PKD1	8651G>A	G2814R	23	REJ	Path.H.	A	G	高い	6/164	3, 8	4	1
JHU614	PKD1	4757G>A	A1516T	15	PKDR9	Equal	T	I	なし	2/164	N.	10	0
	PKD1	1973A>C	E586D	9		Equal	A	E	高い	1/164	N.		
	PKD1	2427A>G	Q739R	11		Path.H.	R	Q	高い	11/164	21		

10

20

30

【 0 0 6 7 】

【表 7】

表 7: ADPKD に関連性のある複数の PKD 変異を有する家系

場合により、疾患に対して関連性がある変異を有する家系は、発明者らの基準を満たすかまたはドメイン\*のコンセンサス配列を破壊することにより疾患に対して関連性があるものとしてさらに分類されうる他の変化を有した

家系	疾患に関連性がある変異		病原性の高いアミノ酸変化		患者当たりの変化の#	
	PKD1	PKD2	PKD1	PKD2	PKD1	PKD2
JHU605	S91X				4	0
JHU 567	R1436X				24	0
JHU108	Y2265X		Q739R		5	1
JHU563	R2430X		Q739R	R807Q	19	1
JHU593	Q2556X				3	2
JHU083	Q2686X				5	0
JHU574	E2810X		G2814R		4	0
JHU620	W4011X				22	0
JHU568	W305 fsX		W305C*		4	1
JHU582	P694 fsX				1	0
JHU585	A696 fsX				6	2
JHU508	V1718 fsX				5	2
JHU613	D2152 fsX		E624K		21	0
JHU611	P2224 fsX				29	1
JHU600	P2975 fsX		Q739R		25	2
JHU609	I3109 fsX				41	1
JHU579	I3109 fsX		G2814R		23	2
JHU577	F2834fsX		Q739R		4	1
JHU111	N116 fsX		R2200C S1619F		7	1
JHU15	R1672 fsX				5	1
JHU599	L3343 fsX		R1312Q		20	1
JHU104	G3792 fsX				4	2
JHU115	N101del				20	0

10

20

30



JHU107	V546del		R1142W		25	1
JHU560	ANS2894del				21	1
JHU592	K3232del				3	1
JHU571	L3287del				10	0
JHU112	V4129del		S4053F		19	2
JHU580	IVS19+1G>T.		G2814R		5	1
JHU573	IVS24+5G>C		R2200C		5	0
JHU595	IVS24+5G>C				16	2
JHU572	IVS4+1G>A				17	1
JHU578		R306X			3	3
JHU583		R306X			5	1
JHU607		R742X			21	1
JHU594		R872X			22	3
JHU566		R872X			1	3
JHU608		R872X	G2814R		4	2
JHU596		V103del	Q2182R		35	1
JHU416		F605del			2	3
JHU591		786fsX			4	2
JHU562		IVS7-1G>A			3	2
JHU105		IVS8+5G>A	T1773I*		3	2
JHU116		720 fsX	Q739R		3	2
JHU586		720 fsX	T1773I*		22	1

10

20

【 0 0 6 8 】

【表 8】

表 8: 疾患関連の PKD 変異を有しない家系

\*コンセンサス配列を破壊する。^^新しいスプライス部位を生成することが予測

ID	非病原性のミスセンス		イントロン変化		家族歴	変化の#	
	PKD1	PKD2	PKD1	PKD2		PKD1	PKD2
JHU565	L1106V P1168S T2422K				あり	24	0
JHU570	Q739R P579Q				あり	5	1
JHU575	N1034S				なし	17	1
JHU178	P1168S	A190T			あり	2	1
JHU610		A190T			なし	40	2
JHU617	L1394V* L3730Q				あり	5	1
JHU587	C210F Q739R R2329Q				なし	6	2
JHU559	C47S	M800L			あり	24	3
JHU604	Q739R		IVS37-10C>A^^		あり	2	0
JHU606	R2200C				なし	5	2
JHU584	R2200C				なし	20	1
JHU590			IVS24+28G>T^^		あり	3	1
JHU106	G2814R				あり	4	1
JHU614	E586D Q739R A1516T				なし	10	0
JHU102 <sup>L1</sup>					あり	21	0
JHU616					あり	17	0
JHU615					なし	0	1
JHU110 <sup>L3</sup>					あり	3	0
JHU113					なし	2	1
JHU598					なし	19	0

【 0 0 6 9 】

10

20

30

【表 9】

表 9: 同定された多型。変異についての参考として全参考文献リストを参照

ID#	記号	cDNA 変化	位置	ドメイン	頻度	参考文献
<b>PKD1 多型</b>						
-	T263S(H)	1004C>T	エクソン 5		2/164	N.
-	P572S(H)	1925C>T	エクソン 8		4/164	8
-	M1092T(H)	3486T>C	エクソン 14	PKD R4	30/164	8
-	W1399R(H)	4406T>G	エクソン 15	PKD R8	22/164	1, 8, 16
-	V1943I(H)	6038G>A	エクソン 15	PKD R14	5/164	8
-	E2548Q(H)	7853G>C	エクソン 19	REJ	4/164	1
-	H2638R(H)	8124A>G	エクソン 21	REJ	32/164	1
-	P2674S(H)	8231C>T	エクソン 21	REJ	2/164	3, 8
-	F3066L (H)	9407T>C	エクソン 25		38/164	3, 17, 34
-	V3408L(H)	10433G>C	エクソン 33		5/164	N.
-	A3511V(H)	10743C>T	エクソン 35		13/164	3, 8
-	I4044V(H)	12341A>G	エクソン 44	TM10	42/164	3, 8, 17, 18, 14,10
-	A4058V(H)	12386C>T	エクソン 45		12/164	8, 10
1		104C>T	エクソン 1	5'UTR	1/164	N.
2		145C>T	エクソン 1	5'UTR	2/164	N.
3		160C>T	エクソン 1	5'UTR	1/164	N.
4		210C>T	エクソン 1	5'UTR	1/164	N.
5	L72L	425C>T	エクソン 1	LRR1	2/164	N.
6	G109G	538A>T	エクソン 3	LRR2	1/164	N.
7	IVS4+1G>A(H)		イントロン 4		1/164	N.
8	S196S	799C>T	エクソン 5		2/164	N.
9	A341A	1234C>T	エクソン 5	PKD R1	5/164	3

10

20

30

10	L373L(H)	1330T>C	エクソン 5		36/164	3, 8, 15
11	G441G	1534G>A	エクソン 6	C-LECT	1/164	N.
12	H570H	1921C>T	エクソン 8		1/164	3, 8
13	IVS9+2del7		イントロン 9		12/164	N.
14	IVS9+2 T>A		イントロン 9		1/164	N.
15	IVS9+28del7 (H)		イントロン 9		4/164	8
16	ISV9-44G>C		イントロン 9		1/164	8
17	IVS9-4A>G		イントロン 9		42/164	8
18	IVS10-4 G>A		イントロン 10		1/164	N.
19	P738P(H)	2425C>G	エクソン 11		4/164	N.
20	A745A	2448C>G	エクソン 11		1/164	N.
21	A898A	2905A>C	エクソン 11	PKD R2	4/164	8, 9
22	P900P	2911G>A	エクソン 11	PKD R2	10/164	8, 16, 9
23	D910D	2941C>T	エクソン 11	PKD R2	10/164	8, 16, 9
24	IVS11-5C>T		イントロン 11		2/164	8
25	IVS11+23C>T(H)		イントロン 11		4/164	N.
26	IVS12-15C>T		イントロン 12		5/164	N.
27	G1021G(H)	3274T>C	エクソン 13	PKD R4	30/164	8, 16, 9
28	L1037L	3392A>G	エクソン 13	PKD R4	15/164	9
29	E1061E	3394G>A	エクソン 14	PKD R4	1/164	N.
30	P1076P	3439G>A	エクソン 14	PKD R4	1/164	N.
31	A1124A	3583C>T	エクソン 15	PKD R4	25/164	8,9
32	S1125S	3586C>T	エクソン 15	PKD R5	25/164	8,9
33	F1163F	3700C>T	エクソン 15	PKD R5	1/164	N.
34	T1171T	3724C>G	エクソン 15	PKD R5	1/164	N.

10

20

35	D1310D	4141C>T	エクソン 15	PKD R7	1/164	N.
36	L1357L	4282G>T	エクソン 15	PKD R7	1/164	N.
37	S1373S	4330C>T	エクソン 15	PKD R7	1/164	N.
38	S1452S	4567T>C	エクソン 15	PKD R8	1/164	N.
39	P1511P	4744G>A	エクソン 15	PKD R9	1/164	N.
40	A1555A(H)	4876A>C	エクソン 15	細胞外	42/164	16, 1, 9
41	T1558T	4885G>A	エクソン 15	細胞外	9/164	2
42	S1603S	5020C>T	エクソン 15	細胞外	1/164	N.
43	T1724T(H)	5383C>T	エクソン 15	PKD R12	40/164	8, 9, 21
44	A1818A(H)	5665G>A	エクソン 15	PKD R13	5/164	8, 9
45	G1860G	5791C>A	エクソン 15	PKD R13	1/164	N.
46	A1894A	5893C>T	エクソン 15	PKD R14	1/164	8, 9
47	L1921L	5974G>A	エクソン 15	PKD R14	2/164	8, 9
48	V2026V	6289C>T	エクソン 15	PKD R15	1/164	N.
49	R2121R	6574C>T	エクソン 15	PKD R16	1/164	N.
50	T2180T	6751C>T	エクソン 15	REJ	1/164	N.
51	A2202A	6817G>A	エクソン 15	REJ	1/164	N.
52	V2257V	6982G>A	エクソン 15	REJ	1/164	N.
53	G2309G	7138C>T	エクソン 16	REJ	4/164	8, 9
54	IVS16+10 G>A		イントロン 16	REJ	1/164	N.
55	R2359R	7289G>C	エクソン 17	REJ	3/164	N.
56	L2389L(H)	7376T>C	エクソン 17	REJ	46/164	1, 2, 8, 9.
57	G2425G	7486C>T	エクソン 18	REJ	1/164	N.
58	L2481L(H)	7652C>T	エクソン 18	REJ	39/164	1, 8
59	IVS19+24 C>A		イントロン 19	REJ	2/164	N.

10

20

60	L2570L(H)	7919T>C	エクソン 20	REJ	31/164	1, 9
61	IVS20+ C>A		イントロン 20	REJ	1/164	N.
62	ISV20-16C>G		イントロン 20	REJ	2/164	N.
63	T2708M	8334C>T	エクソン 22	REJ	1/164	3, 8
64	IVS22+8G>A (H)		イントロン 22	REJ	1/164	1, 8
65	S2729S	8398G>A	エクソン 23	REJ	2/164	N.
66	A2749A	8458G>A	エクソン 23	REJ	1/164	N.
67	S2766S	8509C>T	エクソン 23	REJ	1/164	13
68	D2789D	8578C>T	エクソン 23	REJ	2/164	N.
69	S2813S	8650C>T	エクソン 23	REJ	2/164	3, 8, 24
70	S2893S	8890C>G	エクソン 23		2/164	3
71	A2971A(H)	9124T>C	エクソン 24		2/164	N.
72	IVS24-20G>A (H)		イントロン 24		3/164	N.
73	IVS24-17A>G(H)		イントロン 24		6/164	N.
74	IVS24+17A>G		イントロン 24		32/164	N.
75	S3007S	9232C>T	エクソン 25		1/164	N.
76	V3065V(H)	9406G>C	エクソン 25		38/164	24
77	V3090V	9481C>T	エクソン 26	TM1	3/164	N.
78	P3110P(H)	9543T>C	エクソン 26		37/164	6
79	IVS26+76C>A		イントロン 26		1/164	N.
80	IVS27-13T>C(H)		イントロン 27		15/164	8
81	T3223T	9880G>A	エクソン 28	PLAT	2/164	6, 3, 8
82	S3265S	10006C>T	エクソン 29		1/164	N.
83	IVS29-4 C>T		イントロン 29		1/164	N.
84	A3455A	10576C>T	エクソン 34		1/164	N.

10

20

85	L3589L	10976C>T	エクソン 36	TM5	5/164	N.
86	IVS37-4C>T		イントロン 37		1/164	N.
87	IVS38+11G>A		イントロン 38		4/164	N.
88	R3752R	11385C>A	エクソン 39	ポリシスチン モチーフ	1/164	N.
89	L3753L	11465G>C	エクソン 39	ポリシスチン モチーフ	1/164	N.
90	IVS39-25del72bp		イントロン 39		1/164	7, 3
91	IVS41+C>T		イントロン 41		1/164	N.
92	IVS41+5insGGG		イントロン 41		2/164	8
93	IVS41-11C>T	C>T	イントロン 41		2/164	N.
94	S3893S(H)	11890C>T	エクソン 42		3/164	8
95	IVS43+42C>A		イントロン 43		6/164	N.
96	R3971R	12124C>T	エクソン 43		3/164	N.
97	L4025L	12286C>T	エクソン 44		1/164	N.
98	L4035L	12316C>T	エクソン 44	TM10	1/164	N.
99	IVS44+22delG		イントロン 44		4/164	N.
100	L4089L	12478C>G	エクソン 45	TM11	1/164	N.
101	A4091A(H)	12484A>G	エクソン 45	TM11	43/164	8, 3, 17, 18, 7
102	L4136L(H)	12617C>T	エクソン 45		13/164	8, 14
103	V4152V	12667C>T	エクソン 46		2/164	N.
104	P4161P	12696C>A	エクソン 46		1/164	N.
105	S4189S	12778C>T	エクソン 46		1/164	6
106	P4209P(H)	12838T>C	エクソン 46		40/164	8, 6, 3
107	L4221L	12874C>T	エクソン 46	コイルドコイル	1/164	N.
108	A4255A	12978C>T	エクソン 46		1/164	N.
109		13135G>A	3'UTR		2/164	8

10

20

PKD2 多型						
-	R28P(H)	149C>T	エクソン 1		50/164	8, 10, 22
110	R60R	246G>A	エクソン 1		1/164	N.
111	G140G(H)	486G>A	エクソン 1		22/164	N.
112	IVS6-4C>T		イントロン 6		1/164	N.
113	L539L	1683G>C	エクソン 7		1/164	N.

30

40

50

## 【 0 0 7 0 】

## 全参考文献リスト

1. Watnick T, Phakdeekitcharoen B, Johnson A, et al. Mutation detection of PKD1 identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease. Am J Hum Genet 65(6):1561-71, 1999.
2. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Ahn C, et al. Thirteen novel mutations of the replicated region of PKD1 in an Asian population. Kidney Int 58(4):1400-12, 2000.
3. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, et al. Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. Am J Hum Genet 68(1):46-63, 2001.
4. Peral B, Gamble V, Strong C, et al. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. Am J Hum Genet 60(6):1399-410, 1997.
5. Veldhuisen B, Saris JJ, de Haij S, et al. A spectrum of mutations in the seco

- nd gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am J Hum Genet* 61(3):547-55, 1997.
6. Peral B, Ong AC, San Millan JL, et al. A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum Mol Gene* 5(4):539-42, 1996.
  7. Peral B, San Millan JL, Ong A, et al. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 58(1):86-96, 1996.
  8. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, et al. A complete mutation screen of the AD PKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 61, 1588-1599, 2002. 10
  9. Thomas R, McConnell R, Whittacker J, et al. Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR. *Am J Hum Genet* 65(1):39-49, 1999.
  10. Rossetti S, Bresin E, Restagno G, et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exons 44 and 45 of the PKD1 Gene. *Am J Med Genet* 16;65(2):155-9, 1996.
  11. Reiterova J, Stekrova J, Peters DJ, et al. Four novel mutations of the PKD2 gene in Czech families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mutat* 19(5):573, 2002. 20
  12. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-994, 2000.
  13. Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, et al. Mutation analysis in PKD1 of Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Hum Mutat* 19(6):622-8, 2002.
  14. Perrichot RA, Mercier B, Simon PM, et al. DGGE screening of PKD1 gene reveals novel mutations in a large cohort of 146 unrelated patients. *Hum Genet* 105(3):231-9, 1999.
  15. Bogdanova N, McCluskey M, Sikmann K, et al. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in 41 Bulgarian and Australian kindreds reveals a prevalence of protein truncating mutations. *Hum Mutat* 16(2):166-74, 2000. 30
  16. Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, et al. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 2(2):247-51, 1998.
  17. Perrichot R, Mercier B, Quere I, et al. Novel mutations in the duplicated region of PKD1 gene. *Eur J Hum Genet* 8(5):353-9, 2000.
  18. Boletta A, Qian F, Onuchic L F, et al. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol. Cell* 6, 1267-1273, 2000. 40
  19. Aguiari G, Savelli S, Garbo M, et al. Novel splicing and missense mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene: expression of mutated genes. *Hum Mutat* 16(5):444-5, 2000.
  20. Bycroft M, Bateman A, Clarke J, et al. The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. *EMBO J.* 15;18(2):297-305, 1999.
  21. Torra R, Viribay M, Telleria D, et al. Seven novel mutations of the PKD2 gene in families with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 56(1):28-33, 1999.
  22. Rossetti S, Chauveau D, Kubly V, et al. Association of mutation position in 50



- polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet* 28;361(9376):2196-201, 2003.
23. Afzal AR, Florencio RN, Taylor R, et al. Novel mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene provides supporting evidence for gene conversion. *Genet* 4(4):365-70, 2000.
24. Roelfsema JH, Spruit L, Saris JJ, et al. Mutation detection in the repeated part of the PKD1 gene. *Am J Hum Genet* 61(5):1044-52, 1997.
25. Bogdanova N, McCluskey M, Sikmann K, et al. Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in 41 Bulgarian and Australian kindreds reveals a prevalence of protein truncating mutations. *Hum Mutat* 16(2):166-74, 2000. 10
26. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24;99(26):16981-6, 2002.
27. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 29;329(5):332-42, 1993.

## 【図 1 A】

図1

```

gcactgcagc gccagcgctcc gagcggggcgg ccgagctccc ggagcggcct gggcccgagc 60
cccgagcggg cgtcgctcag cagcaggtcg cgcccgcgca gcccaccca gcccgcgccc 120
cgccatgccc tcccgggggcc ccgctctgagc tgcgggtctcc gcgcgggggc gggcctgggg 180
acggcggggc catgcgcgcg ctgcccctaac gatgccgccc gccgcgccc cccgcctggc 240
gctggccctg ggcctggggc tgtggctcgg ggcgctggcg gggggccccc ggcgcggcctg 300
cgggccctgc gagcccccct gcctctcgcg ccagcgccc ggcccgccct gccgcgtcaa 360
ctgctcgggc cgggggctgc ggacgctcgg tcccgcgctg cgcacccccg cggacgccac 420
agcgctagac gtctcccaca acctgctccg ggcgctggac gttgggctcc tggcgaaacct 480
ctcgcgctg gcagagctgg atataagcaa caacaagatt tctacgttag aagaaaggaat 540
atttgctaatt ttatttaatt taagtgaatt aaacctgagt gggaacccgt ttgagtgtga 600
ctgtggcctg gcgtggctgc cgcgatgggc ggaggagcag caggtgcccgg tggcgagcc 660
cgaggcagcc acgtgtgctg ggccctggctc cctggctggc cagcctctgc ttggcatccc 720
cttgctggac agtggctgtg gtgaggagta tgtcgccctgc ctccctgaca acagctcagg 780
caccgtggca gcagtgtcct ttccagctgc ccacgaaggc ctgcttcagc cagaggcctg 840
cagcgccctc tgcttctcca cggccaggcg cctcgagccc ctctcgagc agggctgggtg 900
cctgtgtggg ggcgcccagc cctccagtgc ctcccttgcc tgcctgtccc tctgctccgg 960
ccccccgcca cctcctgccc ccacctgtag gggcccccacc ctccctcagc acgtcttccc 1020
tgcccccaca ggggcccacc ttgtggggcc ccacggacct ctggcctctg gccagctage 1080
agccttccac atcgctgccc cgctccctgt cactgccaca cgctgggact tgggagacgg 1140
ctccgcccag gtggatgccc ctggggccggc tgcctcgcat cgctatgtgc tgcctgggcg 1200
ctatcacgtg accgcccgtg tggccctggg ggcggctca gccctgctgg ggacagacgt 1260
gcaggtggaa ggcgcacctg ccgcccctgga gctcgtgtgc ccgtcctcgg tgcagagtga 1320
cgagagcctt gacctcagca tccagaaccg cggtggttca ggccctggagg ccgcctacag 1380
catcgtggcc ctggggcagg agccggcccg acgggtgcac ccgtctgccc cctcgacac 1440
ggagatcttc cctggcaacg ggcactgcta ccgcttggtg tgggagaagg cggcctggct 1500
gcaggcgagc gagcaggtgc aggcctgggc cgggggccgcc ctggcaatgg tggacagtcc 1560
cgccgtgcag cgcttccctg tctcccgggt caccaggagc ctacagctgt ggaacggcct 1620
ctcgactgtg caggggggtg aggtggggccc agcgccgcag ggcgagccct tcagcctgga 1680
gagctgcccag aactggctgc ccggggagcc acacccagcc acagccgagc actgcgtccg 1740
gctcggggccc accgggtggt gtaacaccca cctgtgctca gcgcgcgaca gctacgtctg 1800
cgagctgcag cccggagggc ctagtcagga tgcgagaac ctccctgctg gagcgcccag 1860
tggggacctg cagggacccc tgacgcctct ggacagcagc gacggcctct cagccccgca 1920
cgagcccggt gaggtcatgg tattcccggg cctgctctg agccgtgaag ccttctccac 1980
cacggccgaa ttggggaccc aggagctccg gcggcccgcc cagctgcccg tcagagtgta 2040
ccggctcctc agcacagcag ggaacccgga gaacggcagc gagcctgaga gcaggtcccc 2100
ggacaacagg acccagctgg ccccccggcg catgcccagg ggaacgctggt gccctggagc 2160
caacatctgc ttgcccgtgg acgccccttg ccacccccag gcctgcccga atggctgcac 2220
gtcagggcca gggctacccc gggcccctta tgcgctatgg agagagtcc tcttctccgt 2280
tgccgcgggg ccccccggcg agtactcggt caccctccac ggccaggatg tctcatgct 2340
ccctgggtgac ctctgtggct tgcagcacga cgctggccct ggccgcccct tgcactgctc 2400
gccggctccc ggcacacctg gtccccaggc ccgctacccc tccgccaacg cctcgtcatg 2460
gctgccccac ttgccagccc agctggaggc cacttggggc tgcctgccc gtgcctcg 2520
gctgcttgca gccacgggaa agctcaccgt gctgctgggc ttgaggccca accctggact 2580
gcggatgcct gggcgctatg aggtcccggc agaggtgggc aatggcgtgt ccaggcaca 2640
cctctcctgc agctttgaog tggctctccc agtggctggg ctgcccgtca tctaccctgc 2700
cccccgcgac ggcgcctct acgtgccac caacggctca gccttgggtg tccagtgga 2760
ctctggtgcc aacgccacgg ccacggctcg ctggcctggg ggcagtgta gcgcccgtt 2820
tgagaatgtc tgcctgccc tgggtggccc ctctgctccc ggcgccccct gggagaccaa 2880
cgataccctg ttctcagtgg tagcactgcc gtggctcagt gagggggagc acgtggtgga 2940
cgtggtgggt gaaaacagcg ccagccgggc caacctcagc ctgcccgtga cggcgaggga 3000
gcccactctg ggcctccgcg ccacgcccag ccccgaggcc cgtgtactgc agggagtcc 3060
agtgaggtac agccccgtg tggaggccgg ctccgacatg gtcttccggt ggaccatcaa 3120
cgacaagcag tccctgacct tccagaacct ggtcttcaat gtcatctatc agagcgcggc 3180
ggtcttcaag ctctcactga cggcctccaa ccacgtgagc aacgtcaccg tgaactaaa 3240
cgtaaccgtg gagcgatga acaggatgca gggctcgcag gtctccacag tgcggccgt 3300
gctgtccccc aatgccacgc tagcactgac ggcggcgctg ctgggtggact cggcgtgga 3360
ggtggccctc ctgtggaact ttggggatgg ggagcaggcc ctccaccagt tccagcctcc 3420

```

FIG. 1A

## 【図 1 B】

図1続き

```

gtacaacgag tccttcccgg ttccagaccc ctcggtggcc caggtgctgg tggagcaca 3480
tgtcatgcac acctacgctg cccaggtga gtacctcctg accgtgctgg catctaagc 3540
cttcgagaac ctgacgcagc aggtgcctgt gagcgtgcgc gcctccctgc cctccgtggc 3600
tgtgggtgtg agtgacggcg tcctgggtggc cggccggccc gtccaccttc acccgaccc 3660
gctgcccctg cctgggggtg ttctttacac gtgggacttc ggggacggct cccctgtcct 3720
gacctagagc cagccggctg ccaaccacac ctatgcctcg aggggacact accacgtgcg 3780
cctggaggtc aacaacacgg tgagcgggtg ggcggcccag gcggtatgtg gcgtctttga 3840
ggagctccgc ggactcaagc tggacatgag cctggccgtg gagcaggggc ccccggtggt 3900
ggtcagcgcc gcggtgcaga cggcgacaa catcacgtgg accttcgaca tgggggacgg 3960
caccgtgctg tcggggcccg aggcaacagt ggagcatgtg tacctgcggg cacagaactg 4020
cacagtgaac gtgggtgcgg ccagccccgc cggccacctg gcccggagcc tgacagtgt 4080
ggtcttcgtc ctggaggtgc tgcgcgttga acccgccgcc tgcacccca cgcagcctga 4140
cgcgcggtc acggcctacg tcaccgggaa cccggcccac tacctcttcg actggacctt 4200
cggggatggc tcctccaaca cgaccgtgcg ggggtgcccg acggtgacac acaacttcac 4260
gcgagcggc acgttcccc tggcgctggt gctgtccagc cgcgtgaaca gggcgcat 4320
cttcaccagc atctgcgtgg agccagaggt gggcaacgtc accctgcagc cagagaggca 4380
gtttgtgcag ctccgggacg aggcctggct ggtggcatgt gcctggcccc cgttccccca 4440
ccgtacacc tgggactttg gcaccgagga agccgcccc acccgtgcca ggggcctga 4500
ggtgacgttc atctaccgag acccaggctc ctatcttgtg acagtcaacc cgtccaaca 4560
catctctgct gccaatgact cagccctggt ggaggtgcag gagccgtgc tggtcaccag 4620
catcaaggtc aatggctccc ttgggtgga gctgcagcag ccgtacctgt tctctgtgt 4680
gggcccgtgg cgccccgcca gctacctgtg gcatctgggg gacggtgggt ggctcgagg 4740
tccggaggtc acccagcctt acaacagcac aggtgacttc accgttaggg tggccggctg 4800
gaatgaggtg agccgagcgt aggcctggct caatgtgacg gtgaagcgcc gcgtgcgggg 4860
gctcgtcgtc agcccaagcc gcaagggtgt gccctgaat gggagcgtga gcttcagcac 4920
gtcgtggag gccggcagtg atgtgcgcta ttctgggtg ctctgtgacc gctgcacgcc 4980
catccctggg ggtcctacca tctcttacac cttccgctcc gtgggcaact tcaatatcat 5040
cgtcacggct gagaacgagg tgggtccgc ccaggacagc atctctgtct atgtctgca 5100
gctcatagag gggctgcagg ttggtggcgg tggccgctac ttccccacca accacacgg 5160
acagctgcag gccgtggtta gggatggcac caacgtctcc tacagctgga ctgcctggag 5220
ggacaggggc cggcccttgg ccggcagcgg caaaggcttc tcgctcaccg tgctcgaggc 5280
cggcacctac cagctgcagc tgcgggccac caacatgctg ggcagcgctt gggcgactg 5340
caccatggac ttctgtggagc ctgtgggtg gctgatggtg accgctccc cgaaccagc 5400
tgccgtcaac acaagcgtca ccctcagtc cgagctggct ggtggcagtg gtgtcgtata 5460
caacttgctc ttggaggagg ggctgagctg ggagacctcc gagccattta ccaacctag 5520
cttccccaca cccggcctgc acttggctac catgacggca gggaaaccgc tgggtcagc 5580
caacgccacc gtggaagtgg atgtgcaggt gcctgtgagt ggcctcagca tcagggccag 5640
cgagccccga gccagcttcg tggcgccgg gtccctctgt cccttttggg ggcagctggc 5700
cacgggcacc aatgtgagct ggtgctgggc tgtgcccggc ggcagcagca agcgtggccc 5760
tcagtgcacc atggtcttcc cggatgctgg caaccttctc atccggctca atgcctccaa 5820
cgagctcagc tgggtctcag ccacgtacaa cctcacggcg gaggagccca tcgtgggccc 5880
ggtgctgtgg gccagcagca aggtgggtgg gccggggcag ctggtccatt ttcagatcct 5940
gctggctgcc ggctcagctg tcaccttccg cctgcaggtc ggcggggcca accccagagt 6000
gctccccggg ccccgcttct cccacagctt ccccgcgctc ggagaccacg tggtagcgt 6060
gcggggcaaa aaccagctga gctggggcca ggcgaggtg cgcacgtggt tgctggaggc 6120
cgtgagtggt ctgcagatgc ccaactgctg cgagcctggc atcgccacgg gcactgagag 6180
gaacttcaca gcccgctgac agcgcggtc tcgggtgccc tacgctggt acttctcgt 6240
gcagaaggct caggggcact cgtgggtcat cctgtcgggc cgcgacgtca cctacacgcc 6300
cgtggccgcg gggctgttgg agatccaggt gcgcgccttc aacgccttg gcagtgaaga 6360
ccgcacgctg gtgctggagg ttccaggacgc cgtccagtat gtggccctgc agagcgccc 6420
ctgcttcacc aaccgctcgg cgcagtttga ggccgccacc agccccagcc cccggcgtgt 6480
ggcctaccac tgggactttg gggatgggtc gccagggcag gacacagatg agccagggc 6540
cgagcactcc tacctgaggt ctggggacta ccgctgcag gtgaacgcct ccaacctggt 6600
gagcttcttc gtggcgagc ccacgggtgac cgtccaggtg ctggcctgcc gggagccgga 6660
ggtggagctg gtccctgccc tgcaggtgct gatcgggcga tcacagcgca actacttga 6720
ggccacggtt gacctgcgag actgcgtcac ctaccagact gagtaccgct gggaggtgta 6780
tcgcaccgcc agctgccagc ggcggggggc cccagcgctg gtggccctgc cggcgctgga 6840

```

FIG. 1B

## 【図 1 C】

図1続き

```

cgtgagccgg cctcggctgg tgctgccggc gctggcgctg cctgtggggc actactgctt 6900
tgtgtttgtc gtgtcatttg gggacacgcc actgacacag agcatccagg ccaatgtgac 6960
gggtggccccc gagcgccctg tgcccatcat tgaggggtgg tcataccgcg tgtggtcaga 7020
cacacgggac ctggtgctgg atgggagcga gtcttacgac cccaacctgg aggacggcga 7080
ccagacgccc ctgagtttcc actgggcccgt tgtggcttcg acacagaggg aggtgggcgg 7140
gtgtgcgctg aactttgggc cccgcgggag cagcacggtc accattccac gggagcggt 7200
ggcggtggc gtggagtaca ccttcagcct gaccgtgtgg aaggccggcc gcaaggagga 7260
ggccaccaac cagacggtgc tgatccggag tggccgggtg cccattgtgt ccttggagt 7320
tgtgtcctgc aaggcacagg ccgtgtacga agtgagccgc agctcctacg tgtacttgg 7380
ggggcgctgc ctcaattgca gcagcggtc caagcgagg cggtgggctg cactgacgtt 7440
cagcaacaag acgctggtgc tggatgagac caccacatcc acgggcagtg caggcatg 7500
actggtgctg cggcgggggc tgctgcgga cggcgaggga tacacctca cgctcacggt 7560
gctggggcgc tctggcgagg aggggggctg cgctccatc cgctgtccc ccaaccggcc 7620
gcccgtgggg ggctcttgc gcctctccc actggcgct gtgcacgccc tcaccaccaa 7680
ggtgcacttc gaatgcacgg gctggcatga cgggaggat gctggcgccc cgctggtgta 7740
gcccctgctg ctgcccgcgt gtcccgagg ccactgagag gaggctctgt tctacaagg 7800
cagcctctcc agctacggag ccgtgtgccc cccgggttcc agggcacact tcgagggtgg 7860
cctggcgctg gtggtgcagg accagctggg agcgcgtgtg gtcccccctc acaggtctt 7920
ggccatcacc ctcccagag ccaacggcag cgcaacgggg ctacagctc ggctgcacgg 7980
gctcaccgct agtgtgctcc cagggtgctg gcggcaggcc gatccccagc acgtcatcga 8040
gtactcgttg gccctggtca ccgtgtgtaa cagtagcag cggggccctg acgtggcgcc 8100
agagcccaag cagagcgcc agcaccgagc ccagatacgc aagaacatca cggagactct 8160
gggtgtccctg aggttccaca ctgtggatga catccagcag atcgctgctg cgctggccca 8220
gtgcatgggg ccagcaggg agctcgtag ccgctcgtgc ctgaagcaga cgctgcacaa 8280
gctggaggcc atgatgctca tcttgacggc agagaccacc gggggcaccg tgacgcccac 8340
cgccatcgga gacagcatcc tcaacatcac agtagacctc atccacctg ccagctcgga 8400
cgtgcgggca ccacagccct cagagctggg agccgagtc ccatctcgga tgggtggcgc 8460
ccaggccctac aacctgacct ctgccctcat gcgcatcctc atgcgctccc gctgtgctca 8520
cgaggagccc ctgacgctgg cgggcgagga gatcggtggc cagggcaagc gctcggaacc 8580
gcggagcctg ctgtgctatg gcggcgcccc agggcctggc tgccacttct ccatccccga 8640
ggctttcagc gggggccctg ccaacctcag tgacgtgggt cagctcatct ttctggtgga 8700
ctccaatccc ttccctttg gctatatcag caactacacc gtctccacca aggtggcctc 8760
gatggcattc cagacacagg ccggcgcccc gatccccatc gagcggtctg cctcagagcg 8820
cgccatcacc gtgaaggctg ccaacaactc ggactgggct gccgggggccc accgcagctc 8880
cgccaaactc gccaaactcg ttgtggtcca gcccaaggcc tccgtcggtg ctgtggtcac 8940
cctggacagc agcaacctg cggccgggct gcacttgag ctcaactata cgctgctgga 9000
cggccactac ctgtctgagg aacctgagcc ctacctggga gtctacctac actcggagcc 9060
cgggcccatt gagcacaact gctcggttag caggaggatc cggccagagt cactccaggg 9120
tgctgaccac cggccctaca ccttcttcat ttcccgggg agcagagacc cagcggggag 9180
ttaccatctg aacctctcca gccacttccg ctggtcgcg ctgcaggtgt ccgtgggcct 9240
gtacacgtcc ctgtgccagt acttcagcga ggaggacatg gtgtggcgga cagaggggct 9300
gctgcccctg gaggagacct cgcccggcca ggccgtctgc ctacccgccc acctcacgc 9360
cttcggcgcc agcctctctg tgcccacaag ccatgtccgc ttgtgtttc ctgagccgac 9420
agcggatgta aactacatcg tcatgctgac atgtgctgtg tgcctggtga cctacatggt 9480
catggccgccc atcctgcaca agctggacca gttgtagtgc agccggggcc gcgccatccc 9540
tttctgtggg cagcggggcc gcttcaagta cgagatcctc gtcaagacag gctggggccc 9600
gggctcaggt accacggccc acgtgggcat catgctgtat ggggtggaca gccggagcgg 9660
ccaccggcac ctggacggcg acagagcctt ccaccgcaac agcctggaca tcttccggat 9720
cgccaccccg cacagcctgg gtacgctgtg gaagatccga gtgtggcacg acaacaaagg 9780
gctcagccct gcctggttcc tgcagcacgt catcgtcagg gacctgcaga cggcacgcag 9840
cgccctcttc ctggtcaatg actggcttcc ggtggagacg gagggcaacg ggggcctggt 9900
ggagaaggag gtgctggcgg cgagcgacgc agcccttttg cgcttccggc gcctgctggt 9960
ggctgagctg cagcgtggct tctttgacaa gcacatctgg ctctccatat gggaccggcc 10020
gcctcgtagc cgtttcactc gtatccagag ggccacctgc tgcgttctcc tcatctgct 10080
cttctggggc gccaacggcg tggtgtacgg ggctgttggc gactctgcct acagcacggg 10140
gcattgttcc agcgtgagcc cgctgagcgt cgacacagtc gctgttggcc tgggttccag 10200
cgtggttgc tatcccgctt acctggccat cctttttctc ttccggatgt cccggagcaa 10260

```

FIG. 1C

## 【図 1 D】

図1続き

```

gggtggctggg agccccgagcc ccacacctgc cgggcagcag gtgctggaca tcgacagctg 10320
cctgggactcg tccgtgctgg acagctcctt cctcacgttc tcaggcctcc acgctgaggc 10380
ctttgttggg cagatgaaga gtgacttggt tctggatgat tctaagagtc tgggtgtgctg 10440
gcccctccggc gagggaaacgc tcagttggcc ggacctgctc agtgaccctg ccattgtggg 10500
tagcaatctg cggcagctgg caccggggcca ggcggggccat gggctggggc cagaggagga 10560
cggcttctcc ctggccagcc cctactcgcc tgccaaatcc ttctcagcat cagatgaaga 10620
cctgatccag caggtccttg ccgaggggggt cagcagccca gccctacccc aagacaccca 10680
catggaaacg gacctgctca gcagcctgtc cagcactcct ggggagaaga cagagacgct 10740
ggcgctgcag aggcctggggg agctggggcc acccagccca ggctgaact gggaacagcc 10800
ccaggcagcg aggcctgtcca ggacaggact ggtggagggt ctgcggaagc gcctgctgcc 10860
ggcctgggtg gcctccctgg cccacgggct cagcctgctc ctgggtggctg tggctgtggc 10920
tgtctcaggg tgggtgggtg cgagcttccc cccgggcgtg agtggtgctg ggctcctgtc 10980
cagcagcgcc agcttctctg cctcattcct cggctggggg ccaactgaagg tcttgtctga 11040
agcctgtac ttctcactgg tggccaagcg gctgcacccg gatgaagatg acaccctggt 11100
agagagcccg gctgtgacgc ctgtgagcgc acgtgtgccc cgcgtacggc caccacagg 11160
ctttgcactc ttcttgagca aggaagaagc ccgcaaggtc aagaggctac atggcatgct 11220
gcggagcctc ctggtgtaca tgctttttct gctggtgacc ctgctggcca gctatgggga 11280
tgctcatgc catgggcagc cctaccgtct gcaaagcgcc atcaagcagg agctgcacag 11340
ccgggcttcc ctggccatca cgcggtctga ggagctctgg ccatggatgg cccacgtgct 11400
gctgcccacg tccacgggga accagtcacg cccagagctg gggcccccac ggctgcggca 11460
gggtcggctg caggaaagcac tctacccaga cccctccggc cccagggtcc acacgtgctc 11520
ggcgcagga ggcttcagca ccagcgatta cgacgttgcc tgggagagtc ctcacaatgg 11580
ctcggggacg tgggcctatt cagcgccgga tctgctgggg gcatggtcct ggggctcctg 11640
tgccgtgtat gacagcgggg gctacgtgca ggagctgggg ctgagcctgg agggagcgg 11700
gcaccggctg cgcttctctg agctgcacaa ctggctggac aacaggagcg cgcgtgtgtt 11760
cctggagctc acgcgctaca gcccggcgt ggggctgcac gccgcgctc cgtgctgcct 11820
cgagttcccg gcggccggcc gcgcctggc cgcctcagc gtccgcccct ttgcgctgctg 11880
ccgctcagc gcgggctctc cgtgcctct gctcacctcg gtgtgcctgc tgcgtgtcgc 11940
cgtcacttc gccgtggcgc aggcctgtac ttggcacagg gaaggcgct ggcgctgct 12000
gcggctcgga gcctgggcgc ggtggctgct ggtggcgctg acggcggcca cggcactggt 12060
acgcctcgcc cagctgggtg ccgctgacc ccagtgacc cgtttcgtgc gcggccgccc 12120
gcgcgcttc actagcttcg accaggtggc gcagctgagc tccgcagccc gtggcctggc 12180
ggcctcgctg ctcttctctg ttttggtaaa ggctgccag cagctacgct tctgtcgcca 12240
gtggtccgtc tttggcaaga cattatgccc agctctgcca gagctcctgg ggggtcacct 12300
ggccacagag gactcttacc agctggagca gcagctgacc atcctgctcg tctcttctcg 12360
tgtggaactc ctctggagcg tggcccaggc cctgttggtg ctgtgccctg ggactgggct 12420
ctctaccctg tgcctgccc agtccctgga cctgtcaccc ctgctgtgtg tggggctctg 12480
ggcactgctg ctgtggggcg cctaaggct gggggtgtt attctccgct ggcgctacca 12540
cgcttgcgt ggagagctgt accggccggc ctgggagccc caggactacg agatggtgga 12600
gttgttctcg cgaggctgc gcctctggat gggcctcagc aaggtcaagg agttccgcca 12660
caaaagtccg tttgaaggga tggagccgct gccctctcgc tectccaggg gctccaagg 12720
atccccggat gtgccccac ccagcgctgg ctccgatgcc tcgcacccct ccacctctc 12780
cagccagctg gatgggctga gcgtgagcct gggccggctg gggacaagg 12840
gcccctccgc ctccaagcgc tgttcgaggg cctgctcacc cagtttgacc gactcaacca 12900
ggccacagag gacgtctacc agctggagca gcagctgacc agcctgcaag gccgcaggag 12960
cagccggggc cccgcccggat ctcccgctgg cccatccccg ggctgcgggc cagcactgcc 13020
cagccgcctt gccggggcca gtcggggtgt ggacctggcc actggcccca gcaggacacc 13080
ccttcggggc aagaacaagg tccaccccag cagcacttag tccctcttcc tggcggggg 13140
gggcccgtga gtcggagtgg acaccgctca gtattacttt ctgcccgtgt caaggccgag 13200
ggccaggcag aatgggtgca cgtaggttcc ccagagagca ggcaggggca tctgtctgtc 13260
tgtgggcttc agcactttaa agaggctgtg tggccaacca ggacccaggg tccccctccc 13320
agctcccttg ggaaggacac agcagttatg gacggtttct agcctctgag atgctaattt 13380
atttcccca gtcctcaggt acagcgggct gtgcccggcc ccaccccctg ggcagatgtc 13440
ccccactgct aaggctgctg gcttcaggga gggttagcct gcacggcgcc caccctgccc 13500
ctaagtattt acctctccag ttctaccgt actcctgca ccgtctcact gtgtgtctcg 13560
tgtcagtaat ttatatgggt ttaaaatgt tatatttttg tatgtacta ttttctactag 13620
ggctgagggg cctgcgcccc gagctggcct ccccaacac ctgctgcgct tggtaggtgt 13680

```

FIG. 1D

## 【 図 1 E 】

図1続き

```
ggtggcggtta tggcagcccg gctgctgctt ggatgcgagc ttggccttgg gccggtgctg 13740
ggggcacagc tgtctgccag gcactctcat caccacagag gccttgatc cctcccttgc 13800
cccaggccag gtagcaagag agcagcgccc aggcctgctg gcatcaggtc tgggcaagta 13860
gcaggactag gcatgtcaga ggaccccggt gtggttagag gaaaagactc ctccctggggg 13920
ctggctccca ggggtggagga aggtgactgt gtgtgtgtgt gtgtgcgcgc gcgacgcgcg 13980
agtgtgctgt atggcccagg cagcctcaag gccctcggag ctggctgtgc ctgcttctgt 14040
gtaccacttc tgtgggcatg gccgcttcta gagcctcgac acccccctaa ccccgccacc 14100
aagcagacaa agtcaataaa agagctgtct gactgc 14136
```

FIG. 1E

## 【図 2 A】

図2

```

ggctcctgag ggcacacagc cgcagcgcgg cgcgcgcgac ccgcgcgcgg gacgccagt 60
accgcgatgg tgaactccag tcgcgtgcag cctcagcagc ccggggagcg caagcggcgg 120
cccgcgcccc gcgcgcgcgg ccggggcggg ctgatggctg gctgcgcggc cgtgggccc 180
agcctcgccg ccccgggcgg cctctgcgag cagcggggcc tggagatcga gatgcagcgc 240
atccggcagg cggccgcggg ggaccccccg gccggagccg cggcctcccc ttctcctccg 300
ctctcgtcgt gctcccggca ggcgtggagc cgcgataacc ccggcttcga ggccgaggag 360
gaggaggagg aggtggaagg ggaagaaggc ggaatggtgg tggagatgga cgtagagtgg 420
cgcccgggca gccggaggtc ggccgcctcc tcggccgtga gctccgtggg cgcgcgagc 480
cgggggcttg ggggctacca cggcgcgggc caccgcagcg ggaggcggcg ccggcgagag 540
gaccagggcc cgcgtgccc cagcccagtc ggcgcgggg acccgctgca tcgccacctc 600
cccctggaag ggcagccgcc ccgagtgccc tgggcggaga ggctggttcg cgggctgcga 660
ggtgtaagag cgcgcgaccc gcagcggcag atgcacgaac cagaacggcc ggcgccggng 720
gcttcttaaa taaaatgata tcttttcttt tcttcattat tattttaaag gtctctggg 780
aacaagactc atggaggaaa gcagcactaa ccgagagaaa taccttaaaa gtgttttacg 840
ggaactggtc acatactctc tttttctcat agtcttgtgc atctgtaagt agaataatct 900
cttgcaacta tgggaaagt tgaacgat gtgaattgt ccaaaatgt tatccacagg 960
aacaatccct ttgtgaaggc tgctggtatg tggatgtgtg ccggttccct tggggcggtt 1020
atttgatct ttctgtgttc cagtgcacta cggcatgat agctccaatg tgtactacta 1080
caccggatg atgtcacag tcttctctaga caccgccgtg tccaaaacgg agaaaactaa 1140
ctttaaaact ctgtcttcca tgggaagact ctggaaggtt tttggaata actttgaaag 1200
tacctctcta tcacaagcca atgcttggtt atgcaacgat gcaggcaggg caaagcagcg 1260
gcatgagctt gaactnnnnn agatgttnc tttcttttag ttcacagaag gctccttatt 1320
ggatgggctg tactggaaga tgcagccag caaccagact gaagctgaca accgaagttt 1380
catcttctat gagaacctgc tgttaggggt tccacgaata cggcaactcc gagtgcagaa 1440
tggatcctgc tctatcccc aggacttgag agatgaaatt aaagagtgt atgatgtcta 1500
ctctgtcagt agtgaagata gggctccctt tgggccccga aatggaaccg cgtaatgtgc 1560
tgtgactcat tggcactcgg tgatattcat ccttgtaatt gctcaagt tccactgat 1620
tgtaactgtt tgttttngg ttttgtttt aatcagttgg atctacaca gtgaaaaaga 1680
cttgaatggt agtagccact ggggaatcat tgcaacttat agtggagctg gctattatct 1740
ggatttgtca agaacaagag aggaaacagc tgcacaagtt gctagcctca agaaaaatgt 1800
ctggctggac cgaggaaacca gggcaacttt tattgacttc tcagtgtaca acgccaacat 1860
taacctgttc tgtgtgtgca ggtgtgtgac tgaggacatg catccctctc atttctgtgt 1920
ggttgtacat acatctatt ctagggttac ccagaaaaac cttttntgca aggtgtttat 1980
tgttttaatt gttcttattt acatgcagg tattggttga attcccagca acaggtggtg 2040
tgattccatc ttggcaattt cagcctttaa agctgactcg atatgtcaca acttttgatt 2100
tcttcctggc agcctgtgag attatctttt gtttctttat cttttactat gtgggtggaag 2160
agatattgga aattcgcatt cacaactac actatctcag gaggttcttg aattgtcttg 2220
atgttgtgat cgttgtggta ggtccganca ncancacaa atttctatt ctattctaca 2280
agnatgttaa caattaatac attggtgaag aaaaatatac tagtcatatt aaggtaagtt 2340
tcataattct aaaacactgt aataaaatat aaatattttg cttttcagct gtcagtggta 2400
gctataggaa ttaacatata cagaacatca aatgtggagg tgctactaca gtttctgga 2460
gatcaaaata ctttcccaa ctttgagcat ctggcatatt ggcagataca gttcaacaat 2520
atagctgctg tcacagtatt ttttgtctgg attaaggtaa tttataaatt tcatgttcta 2580
cattnnaaat aatattttct ttaaaaaaaa tgagtccac aaaancatgc gaaacaatgt 2640
tttattatac acagtccacac catttgggtt atccattcat ctattgatgt cttctctctc 2700
ttacagctct tcaaatcat caattttaac aggaccatga gccagctctc gacaaccatg 2760
tctcgatgtg ccaaaagacct gtttggtctt gctattatgt tcttcattat tttcctagcg 2820
tatgctcagt tggcataacct tgtcttggc actcaggtcg atgacttcag tactttocaa 2880
gagtgtatgt aagtatatat gaaattaaga agaaaaatt agtcagagta gncactgttg 2940
cgtggacant ctttgggttt gtattgtggt gntttgtntt atttttatag cttcactcaa 3000
ttccgtatca ttttggcgca tatcaacttt gcagagattg aggaagctaa tcgagttttg 3060
ggaccaattt atttcactac atttgtgttc tttatgttct tcattctttt ggtagtaca 3120
tttataattt tagtggagg tcaatttaaa cttcgtaaat ccttgctctc tcttttttga 3180
ttgataattc caaattatgt ttcttctctt aatttttgcc ctctttctat ttacaaacag 3240
aatatgtttt tggctatcat caatgatact tactctgaag tgaatctga cttggcacag 3300
cagaaagctg aatggaact ctcagatct atcagaaagg taggaaaaac ctttaattctc 3360
aaaaattctt ctgtttctga cataaaatga gcattgtttc acccanattt tagaatacnc 3420

```

FIG. 2A



## 【図 2 B】

図2続き

```

taaaccaagt cttttatctt ttctctctct gatagggtta ccataaagct ttgggtcaaac 3480
taaaactgaa aaaaaatacc gtggatgaca ttctagagag tctgctggcaa ggaggaggca 3540
agttaaactt tgacgaactt cgacaagatc tcaaagggtg agaatacatgc ttcttgagggt 3600
tctnaaaat tctgtctctt aaagataaat tcttggtgat aagagtattt cttagcccaag 3660
ggctcatggg aacanaggat gaattgtatc tgtatcctct ctctaatttc aggaagggcc 3720
atactgatgc agagattgag gcaatattca caaagtacga ccaagatgga gaccaagaac 3780
tgaccgaaca tgaacatcag cagatgagag acgacttggg gaaagagagg gtgggtctgg 3840
tttagaggna accgattttg atttggtacc tacaacacca cacttctgtg gggctctcagt 3900
gttctgctcc tcaactcagt accccttgtt cttcaggagg acctggattt ggatcacagt 3960
tctttaccac gtcccatgag cagccgaagt ttccctcgaa gcctggatga ctctgaggag 4020
gatgacgatg aagatagcgg acatagctcc agaaggaggg gaagcatttc tagtggcgtt 4080
tcttaccgaag agtttcaagt gtaagtataa aggaattggc agaatttgcg tngacaattt 4140
gtccctctgt actgtgtttt ccttgacgac tgggtgagac agtggaccgg atggagcatt 4200
ccatcgccag catagtgttc aagattgacg ccgtgatcgt gaagctagag attatggagc 4260
gagccaaact gaagaggagg gagggtctgg gaaggctgtt ggtgggggtg gccgagggtca 4320
gtagtcatga gctgaanaca ccgtctgtga gcatgggtgt attaatnnna atatattgtt 4380
ctgacagttg tatttnaagt attnaactgac cccaacacc agtttctttt tcccttttta 4440
ggatgaaagg ctgggtctgt acagtgaat ccatagggaa cagatggaac ggctagtacg 4500
tgaagagttg gaacgctggg aatccgatga tgcagcttcc cagatcagtc atgggttagg 4560
cacgccagtg ggactaaatg gtcaacctcg cccagaagc tcccgcccat ctctctccca 4620
atctacagaa ggcattggaag gtgcaggtgg aaatgggagt tctaattgtc acgtatgata 4680
tgtgtgttcc agtatgtgtt ttctaataa gtgagggaag ggctgtcctg aattgctgta 4740
acaagcacac tatttatatg ccctgaccac cataggtatg tagtctttgt gaccgattgc 4800
taattcttctg cacttttaatt tattttatat aaactttacc catggttcaa agattttttt 4860
ttctttttct catataagaa atctaggtgt aaatattgag tacagaaaaa aaatcttcat 4920
gatgtgtatt gagcgtgtacg ccagttgtcc accatgactg agtcttctca gttgacaatg 4980
aagtagcctt ttaaagctag aaaactgtca aagggtctct gagtctcatt tccagtcaca 5040
aaaatcagta ttgttatctt ttccaagag tgtgaaggaa aatggggcaa ttcttttcca 5100
ctctggcata gttcatgagc ttaatacata gctttctttt aagaaaggag cctttttttt 5160
caactagctt cctggggtaa acttttctaa aagataaaat gggaaggaaac tccaaactat 5220
gatagaatct gtgtgaatgg ttaagatgaa tgttaaatat tatgcttttt tgtaagttag 5280
tcgtatctga tgtctgtggg actaactgta tcaacttaatt tttaacctat ttgggtctca 5340
atttgaataa gctgagtaaa accaccaaa atcagttata ggataaaatg gcatctctaa 5400
ccataacaca gggaatttg aaggagccct aagtgtgtac tcagtttaat ttcttttaat 5460
ggttagttaa gcctaaagat ttatctgcat attcttttcc ccatgtggct ctactcattt 5520
gcaactgaat ttaattgttat aactcatcta gtgagaccaa cttactaaat ttttagtatg 5580
cactgaaagt ttttatccaa caattatgtt cattttaagc aaaattttta gaaagttttg 5640
aaattcataa agcattttgtt tttaaactat tttaagaata tagtactcgg tcagggtatgn 5700
nncacgcctg taatcccagc actttgggag gccgaaacag gcgaatcact tgagcccagg 5760
agttcaagac caacatgggc aatgtggcga aactccatct ctacaaaaaa tgcaaaaaata 5820
aaaaatatag tactcaagta ttcttgatcc tgtgtttcaa aactagaatt tgtaatgcaa 5880
atggagctca gtctaataaa aaagagggtt tggattataa agttcataca ttagacagta 5940
tcagccaaaaa tttgagttag caacactgtt ttctttacga gagggtctca cccaaattta 6000
tggggagaaa tctatttctc aaaaaaaaaa aatcttcttt tacagaaatg ttgagtaagg 6060
tgacattttg agcgctaata agcaaaagag catgcagtgc tggtagataa cctcactttg 6120
gagaaccaag agaactcctg cgtttaatgc tatattttaa ttccacaagt tgttcattta 6180
actggtagaa tgtcagttca atctccaatg agaacatgag caaatagacc tttccagggt 6240
gaaagtgaaa catactgggt ttctgttaagt ttttctctat ggcttcatct ctatctttac 6300
tttctcttga atagtctaca caaagtctct tattactaca tactaaagt tgcattccag 6360
ggatattgac tgtacatatt tatgtatatg taccatgttg ttacatgtaa acaaaactta 6420
atttgaagtg cagctattat gtggtatcca tgtgtatcga ccatgtgcca tatatcaatt 6480
atgggtcacta gaaagtctct ttatgatact ttttattgta ctgtttttca tttcacttgc 6540
aaaattttgc agaattctct ctttctaccc ataaattaca tataattttt ctctcttagt 6600
catggagaac nccccccat catctcanc cttattanc tcccatgtgt actggtatta 6660
ttaaaaaagc atttaccatc gcaagttttt cactgacaan caagaatgtt attaatgtgt 6720
aatactgagc acntttactt cttaataaa 6749

```

FIG. 2B



图 3

图 3A

## 【図 3 B】

## 図 3 続き

196 797 **tccttttcagctgccacgaaggcctgcttcagccagaggcctgc**  
**S F S A A H E G L L Q P E A C**

211 842 **agcgcccttctgcttctccacggccagggcctgcgagccctctcc**  
**S A F C F S T G Q G L A A L S**  
 → 5-B

226 887 **gagcaggcctggtgcctgtgtggggcgccagccctcagtgcc**  
**E Q G W C L C G A A Q P S S A**  
 ← 5-A

241 932 **tcctttgcctgctgctccctctgctccggcccccgcacactctc**  
**S F A C L S L C S G P P P P P**

256 977 **gccccacactgtaggggcccccacctctccagcagctcttcctc**  
**A P T C R G P T L L Q H V F P**

271 1022 **gcctcccagggccacccctggtggggcccccacggacctctggcc**  
**A S P G A T L V G P H G P L A**

286 1067 **ctggccagctagcagccttccacatcgctgcccgcctcctgtc**  
**S G Q L A A F H I A A P L P V**  
 → 5-C

301 1112 **actgcccacagctgggacttcggagacggctccggcaggtggat**  
**T A T R W D F G D G S A E V E**  
 ← 5-B

316 1157 **gccgctggggccggctgcctcgcatcgctatgtgctgctggggcc**  
**A A G P A A S H R Y V L P G R**

331 1202 **tatcacgtgacggccgtgctggccctggggccggctcagccctc**  
**Y H V T A V L A L G A G S A L**

346 1247 **ctggggacagacgtgcaggtggaagcggcacctgccgcctggag**  
**L G T D V Q V E A A P A A L E**

361 1292 **ctcgtgtgcccgtcctcggtgcagagtgcagagaccttgacctc**  
**L V C P S S V Q S D E S L D L**



376 1337 **agcatccagaaccgggtggttcaggcctggaggccgcctacagc**  
**S I Q N R G G S G L E A A Y S**  
 17/26



391 1382 **atcgtggccctggggcagggagccggcccgac**  
**I V A L G E E P A R A**



図 3B



## 【図 3 C】



## 図 3 続き



406 1427   




421 1472   


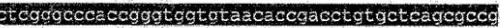

436 1517   
  
**エクソン7**



451 1562   
  
**S L D**



466 1607   
  
**V W I G F S T V Q G V E V G F**



481 1652   
  
**A P Q G E A F S L E S C Q N W**



496 1697   
  
**L P G E P H P A T A E H C V R**

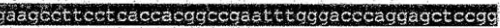

511 1742   
  
**L G P T G W C N T D L C S A F**  
**エクソン8**

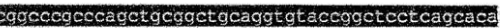

526 1787   
  
**H S Y V C E L Q P G**

541 1832   
  
**E P R L L P L G L A P S L P L T O S**

556 1877   
  
**E L L I P L P L D S L P L H**  
**エクソン9**

571 1922   
  
**E P L P L V M V F P G L R L S R**

586 1967   
  
**E A F L T T A E F G T Q E L R**

601 2012   
  
**R P A Q L R L Q V Y R L L S T**  
**エクソン10**



616 2057   
  
**A G L P L P L P L P L P L P L P L P**

図 3C

## 図 3 続き



図3 続き

図 3E

## 【図 3 F】

## 図 3 続き

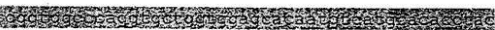
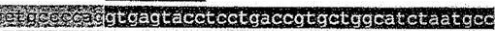
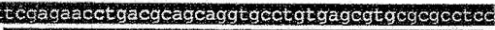
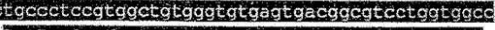


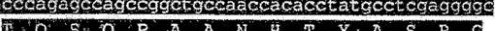
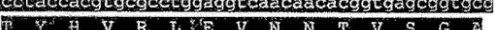

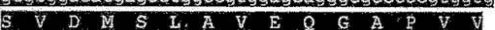
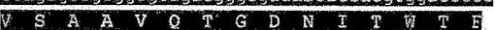
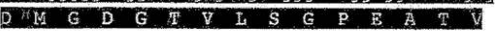


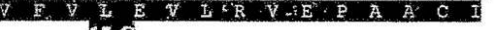
1081 3452   
 エクソン15-A  
 1096 3497   
 G E Y L L T V L A S N A  
 1111 3542   
 F E N L T Q Q V P V S V R A S  
 1126 3587   
 L P S V A V G V S D G V L V A  
 →15-B  
 1141 3632   
 G R P V T F Y P H P L P S P G  
 1156 3677   
 G V L Y T W D F G D G S P V L  
 ← 15-A  
 1171 3722   
 T Q S Q P A A N H T Y A S R G  
 1186 3767   
 T Y H V R L E V N N T V S G A  
 1201 3812   
 A A Q A D V R V F E E L R G L  
 →15-C  
 1216 3857   
 S V D M S L A V E Q G A P V V  
 ← 15-B  
 1231 3902   
 V S A A V Q T G D N I T W T E  
 1246 3947   
 D M G D G T V L S G P E A T V  
 1261 3992   
 E H V Y L R A Q N C T V T V G  
 1276 4037   
 A A S P A G H L A R S L H V I  
 →15-D  
 1291 4082   
 V F V L E V L R V E P A A C I  
 ← 15-C

図 3F

【図 3 G】

図 3 続き

4127 ccacgcagcctgacgcgcgggtcacggcctacgtcaccgggaac  
 1306 P T Q P D A R L T A Y V T G N  
 4172 ccggccactacctcttcgactggaccttcggcgatgctcctcc  
 1321 P A H Y L F D W T F G D G S S  
 4217 aacacgaccgtgcgggggtgcccgacggtgacacacaattcacg  
 1336 N T T V R G C P T V T H N F T  
 → 15-D  
 4262 cggagcggcacgttccccctggcggtggtgctgtccagccgctg  
 1351 R S G T F P L A L V L S S R V  
 ← 15-D  
 4307 aacagggcgcattacttcaccagcatctgcgtggagccagaggtg  
 1366 N R A H Y F T S I C V E P E V  
 4352 ggcaacgtcaccctgcagccagagagcagtttgtgcagctccgg  
 1381 G N V T L Q P E R Q F V Q L G  
 4397 gacgaggcctggctgggtgcatgtgcctggcccccttccccctac  
 1396 D E A W L V A C A W P P F P Y  
 4442 ccctacacctgggactttggcaccgaggaagccgccccaccctg  
 1411 R Y T W D F G T E E A A P T F  
 → 15-F  
 4487 gccaggggcccctgaggtgacgttcatctaccgagaccaggtcc  
 1426 A R G P E V T F I Y R D P G S  
 ← 15-E  
 4532 tatcttgtgacagtcacccgtccaacaacatctctgctgccaat  
 1441 Y L V T V T A S N N I S A A N  
 4577 gactcagccctgggtggaggtccagagcccgctgctggtcaccagc  
 1456 D S A L V E V Q E P V L V T S  
 4622 atcaagggtcaatggctcccttgggctggagctgcagcagccgtac  
 1471 I K V N G S L G L E L Q Q P Y  
 → 15-G  
 4667 ctgttctctgctgtgggccctggggcgccccgccagctacctgtg  
 1486 L F S A V G R G R P A S Y L W  
 4712 gatctgggggacggtgggtggtcgaggggtccgaggtcacccac  
 1501 D L G D G G W L E G P E V T H  
 ← 15-F  
 4757 gcttacaacagcacaggtgacttcaccgttaggggtggccggctg  
 1516 A Y N S T G D F T V R V A G W

FIG. 3G

【図 3 H】

図 3 続き

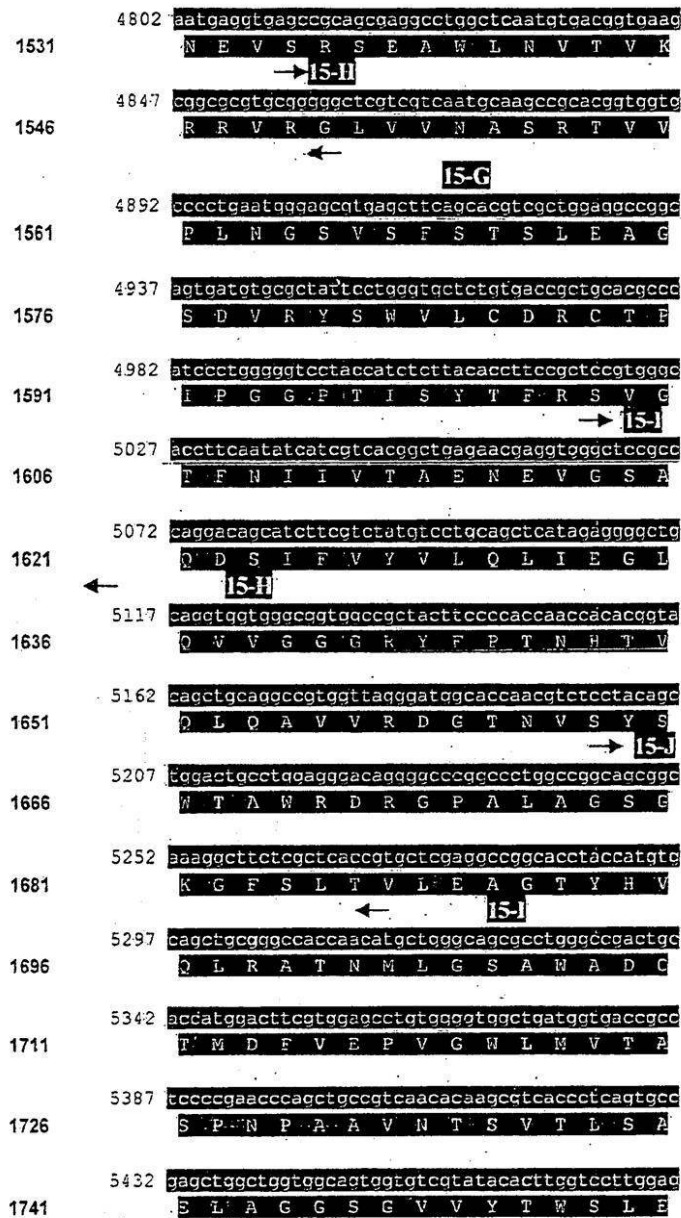


FIG. 3H



## 【図 3 I】

## 図 3 続き

→15-K

5477 gaggggctgagctgggagacctccgagccattaccacccatagc  
1756 E G L S W E T S E P F T T H S

5522 ttccccacaccccccctgcacttggtcaccatgacggcagggaaac  
1771 F P T P G L H L V T M T A G N

5567 ccgctgggctcagccaacgccaccgtggaagtggatgtgcaggtg  
1786 P L G S A N A T V E V D V Q V

5612 cctgtgagtgccctcagcatcagggccagcagccggaggcagc  
1801 P V S G L S I R A S E P G G S

5657 ttctgtggcggccgggtcctctgtgcccttttgggggcagctggcc  
1816 F V A A G S S V P F W G Q L A

←15-J

5702 acgggcaccaatgtgagctgggtgctgggctgtgcccgccgcagc  
1831 T G T N V S W C W A V P G G S

5747 agcaagcgtggccctcatgtcaccatggtcttcccgatgctggc  
1846 S K R G P H V T M V F P D A G

5792 accttctccatccggctcaatgcctccaacgcagtcagctgggtc  
1861 T F S I R L N A S N A V S W V

5837 tcagctacgtacaacctcagggcggaggagcccatcgtggccctg  
1876 S A T Y N L T A E E P I V G I

→15-L

5882 gtgctgtgggccagcagcaaggtagtgccggccgggcagctggtc  
1891 V L W A S S K V V A P G Q L V

←15-K

5927 cattttcagatcctctgctgctgcccgtcagctgtcacttccgc  
1906 H F Q I L L A A G S A V T F R

5972 ctgcaggtcggcggggcccaaccgccgagtgctcccgggcccggt  
1921 L Q V G G A N P E V L P G P R

6017 ttctccacagcttccccgcgtcggagaccagtggtgagcgtg  
1936 F S H S F P R V G D H V V S V

6062 cggggcaaaaaccacgtgagctgggcccagggcaggtgcgcac  
1951 R G K N H V S W A Q A Q V R I

6107 gtgggtcgtggagggcgtgagtgggctgcagatgcccaactgctgc  
1966 V V L E A V S G L Q M P N C C

FIG. 3I

【図 3 J】

図 3 続き

6152 **gagcctggcatcgccacgggcactgagaggaacttcacagccgc**  
 1981 **E P G I A T G T E R N F T A R**

6197 **gtgcagcgggctctcgggtcgctacgcctggtaacttctcgctg**  
 1996 **V Q R G S R V A Y A H Y F S L**  
 →15-M

6242 **cagaaggtccagggcgactcctgggtcctcctgtcgggccggac**  
 2011 **Q K V Q G D S L V I L S G R D**

6287 **gtcacctacacgcccgtggccgggggtgttgagatccaggtg**  
 2026 **V T Y T P V A A G L L E I Q V**  
 ← 15-L

6332 **cgcgcttcaacgcccctgggcagtgagaaccgcacgctgggtgctg**  
 2041 **R A F N A L G S E N R T L V L**

6377 **gaggttcaggacgcccgtccagtatgtggccctgcagagcggcccg**  
 2056 **E V Q D A V Q Y V A L Q S G F**

6422 **cgcttcaccaaccgctcggcgcagtttgaggcccccaccagcccg**  
 2071 **C F T N R S A Q F E A A T S F**

6467 **agcccccgcggtgtggcctaccactgggactttggggatgggtcg**  
 2086 **S P R R V A Y H W D F G D G S**

6512 **ccagggcaggacacagatgagcccagggccgagcactcctacctg**  
 2101 **P G Q D T D E P R A E H S Y L**

6557 **agccttggggactaccgctgcaggtgaacgcctccaacctggtg**  
 2116 **R P G D Y R V Q V N A S N L V**

6602 **agcttcttcgtggcgcagggccaggtgaccgtccagggtgctggcc**  
 2131 **S F F V A Q A T V T V Q V L A**

6647 **tgccgggagccggaggtggacgtggtcctgcccctgcaggtgctg**  
 2146 **C R E P E V D V V L P L Q V L**  
 →15-N

6692 **atgcggcgatcacagcgcaactacttgaggccccacgttgacctg**  
 2161 **M R R S Q R N Y L E A H V D L**

6737 **cgcgactgcgtcacctaccagactgagtaccgctggggaggtgtat**  
 2176 **R D C V T Y Q T E Y R W E V Y**

6782 **cgcacccgacgtgccagcggccggggcgcccacgcgctgtggcc**  
 2191 **R T A S C Q R P G R P A R V A**

FIG. 3J

## 【図 3 K】

## 図 3 続き

← **15-M**

2206 6827 ctgcccggcgtggacgtgacccggcctcggctgggtgctgccggg  
L P G V D V S R P R L V L P R

2221 6872 ctggcgctgcctgtggggcactactgcttgggttggcgtgtca  
L A L P V G H Y C F V F V V S

2236 6917 ttgggggacacggcactgacacagagcatccaggccaatgtgacg  
F G D T P L T Q S I Q A N V T

2251 6962 gtggcccccggagcgcctgggtgcccattgagggtggctcatac  
V A P E R L V P I I E G G S Y

2266 7007 cgcgtgtgtgcagacacacgggacotgggtgctggatgggagcgac  
R V W S D T R D L V L D G S E

2281 7052 tcctacgaccccaacctggaggacggcgaccagacggcgcctcagt  
S Y D P N L E D G D Q T P L S  
**エクソン 16**

2296 7097 ttccactgggcctgtgtggcttegacacacgagggggggggggg  
E H W A C V A S T Q H A G T G

2311 7142 ctcccgctgacgtggggccgggggagggagcagggacacggg  
A L L A R P A G P A C A S V Y C

2326 7187 ctacgggagctgctggcggtggcctgggtgctgctgctgctgctg  
S A L R R L S A F C A L L A T A T S A L

2341 7232 acgggtgcaaacgcccgggtcctaggagctaggccaccatctgacg  
A L L A R P A G P A C A S V Y C  
**エクソン 17**

2356 7277 gtgctgacccggagtgccgggtgcccattgtgtccttggagtggt  
V L I R S G R V P I V S L E C

2371 7322 gtgtcttgcaaggcacaggccgtgtacgaagtgaagccgagctcc  
V S C K A Q A V Y E V S R S S

2386 7367 tacgtgtacttgaggggccgctgctcaattgcagcagggctcc  
Y V Y L E G R C L N C S S G S  
**エクソン 18**



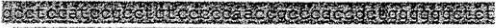

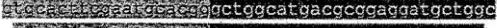


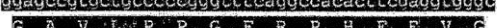







2401 7412 aagcgacggggtctggatgctgctgctgctgctgctgctgctg  
K R G A L L A R P A G P A C A S V Y C

2416 7457 gtgctggatgagaccagacatcccgaggagctgagggatggcga  
A L L A R P A G P A C A S V Y C

図 3K

## 【 図 3 L 】

## 図 3 続き

2431 7502   
 2446 7547   
 2461 7592   
 2476 7637   
 2491 7682   
 2506 7727   
 2521 7772   
 2536 7817   
 2551 7862   
 2566 7907   
 2581 7952   
 2596 7997   
 2611 8042   
 2626 8087   
 2641 8132 

エクソン19

エクソン20

エクソン21

図 3L

図 3 続き

図 3M

図 3 続き

图 3N



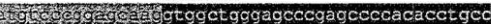







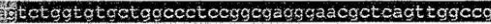

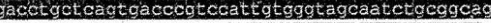



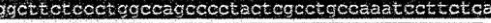

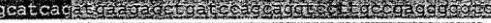











## 【図 30】

## 図 3 続き

9527 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 3106 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 9572 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 3121 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 9617 gccacgtgggcatcatgctgtatgggtggacagcccgagcggc  
 3136 A H V G I M L Y G V D S R S G  
 9662 caccggcacctggacggcgacagagccttccaccgaacagcctc  
 3151 H R H L D G D R A F H R N S L  
 9707 gacatcttccggatcgccaccccgacagcctgggtagcgtgtgc  
 3166 D I F R I A T P H S L G S V W  
 9752 aagatccgagtgtggcagcacaacaacggtgacgacgacgacg  
 3181 K I R V W H D N K  
 9797 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 3196 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 9842 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 3211 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 9887 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 3226 gacacgaggaatcccttcttctgacacgaugctccttcaatctc  
 9932 gcccttttgcgttccggcgctgctggtggctgagctgcagcgt  
 3241 A L L R F R R L L V A E L Q R  
 9977 ggcttctttgacaagcacatctggctctccatattgggacggcgg  
 3256 G F F D K H I W L S I W D R P  
 10022 cctcgtagccgtttcactcgcacccagagggccacotgctgcgtt  
 3271 P R S R F T R I Q R A T C C V  
 10067 ctctcatctgcctcttctctggggcgccaacgacggtgtgttacggg  
 3286 L L I C L F L G A N A V W Y G  
 10112 gctgttggcgactctgcctacagcagggacgacgacgacgacg  
 3301 A V G D S A Y S  
 10157 gccgctgagcgcacacagcagcgtggtggtggtggtggtggtg  
 3316 S P L S V P I L L S V G I V S S

## 【図 3 P】



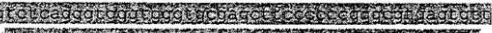





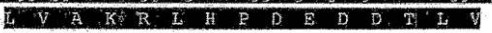
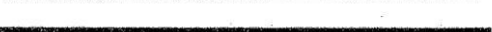











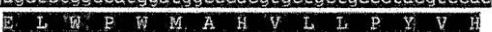
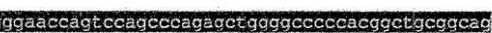
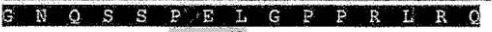
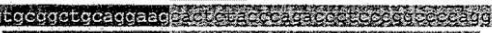


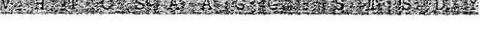


## 図 3 続き

10202   
 3331   
**エクソン31**  
 10247   
 3346   
 10292   
 3361   
**エクソン32**  
 10337   
 3376   
 10382   
 3391   
**エクソン33**  
 10427   
 3406   
 10472   
 3421   
 10517   
 3436   
 10562   
 3451   
**エクソン34**  
 10607   
 3466   
 10652   
 3481   
**エクソン35**  
 10697   
 3496   
 10742   
 3511   
**エクソン36**  
 10787   
 3526   
 10832   
 3541 



## 【図 3 Q】

## 図 3 続き

10877   
 3556   
 10922   
 3571   
 10967   
 3586   
 11012   
 3601   
 11057   
 3616   
 11102   
 3631   
 11147   
 3646   
 11192   
 3661   
 11237   
 3676   
 11282   
 3691   
 11327   
 3706   
 11372   
 3721   
 11417   
 3736   
 11462   
 3751   
 11507   
 3766 

## 図 3Q

## 【図 3 R】

## 図 3 続き



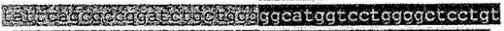



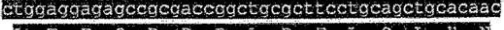








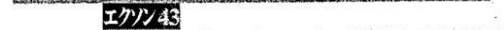

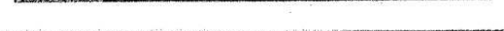
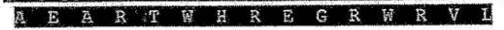
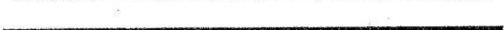












11552   
 3781  **エクソン41**  
 11597   
 3796  A W S W G S C  
 11642   
 3811  A V Y D S G G Y V Q E L G L S  
 11687   
 3826  E E S R D R L R F L Q L H N  
 11732  **エクソン42**  
 3841  W L D N R S R A V B L E A L R  
 11777   
 3856   
 11822   
 3871   
 11867   
 3886  **エクソン43**  
 11912   
 3901  V C L L L F A V H E A V  
 11957   
 3916  A E A R T W H R E G R W R V L  
 12002   
 3931  R L G A W A R W L L V A L T A  
 12047   
 3946  A T A L V R L A Q L G A A D R  
 12092   
 3961  Q W T R F V R G R P R R F T S  
 12137   
 3976  F D Q V A Q L S S A A R G L A  
 12182  **エクソン44**  
 3991  A S L L F L L L V K A S I Q Q L



図 3 続き

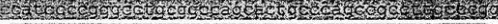

图 3S



## 【 図 3 T 】

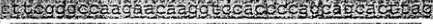

## 図 3 続き

4231 12902   
4231 12902 

4246 12947   
4246 12947 

4261 12992   
4261 12992 

4276 13037   
4276 13037 

4291 13082  13120 (配列番号 2)  
4291 13082  (配列番号 3)

## 图 4

图 4A

図 4 続き

図 4B

## 【図 4 C】

## 図 4 続き

1552  
 496  
 1597  
 511  
 1642  
 526  
 1687  
 541  
 1732  
 556  
 1777  
 571  
 1822  
 586  
 1867  
 601  
 1912  
 616  
 1957  
 631  
 2002  
 646  
 2047  
 661  
 2092  
 676  
 2137  
 691  
 2182  
 706  
 2227  
 721  
 2272

エクソン 7  
 L S V V A I G I N  
 I Y R T S N V E V L L Q F L E  
 D O N T F P N F E H L A Y W Q  
 I Q F N N I A A V T V F F V W  
 エクソン 8  
 I K  
 エクソン 9  
 F T Q F R I I L G D I N  
 F A E I E E A N R V L G P I Y  
 エクソン 10  
 F T T F V F F M F F I L L N N M  
 エクソン 11  
 G Y H K A L V K L K L K K N  
 T V D D I S E S L R Q G G G K  
 エクソン 12

図 4C

## 【図 4 D】

## 図 4 続き

736 L N F D E L R O D L K G  
 2317  
 751  
 2362  
 766  
 エクソン13  
 2407  
 781 E D L D L D H S S  
 2452  
 796 L P R P M S S R S F P R S L D  
 2497  
 811 D S E E D D D E D S G H S S R  
 2542  
 826 R R G S I S S G V S Y E E F Q  
 エクソン14  
 2587  
 841  
 2632  
 856  
 2677  
 エクソン15  
 2722  
 886 D E R L G R D S E I  
 2767  
 901 H R E Q M E R L V R E E L E R  
 2812  
 916 W E S D D A A S Q I S H G L G  
 2857  
 931 T P V G L N G Q P R P R S S R  
 2902  
 946 P S S S Q S T E G M E G A G G  
 2947  
 961 N G S S N V H V \*

(配列番号 5)

(配列番号 6)

図 4D



## 5A-5C

A)

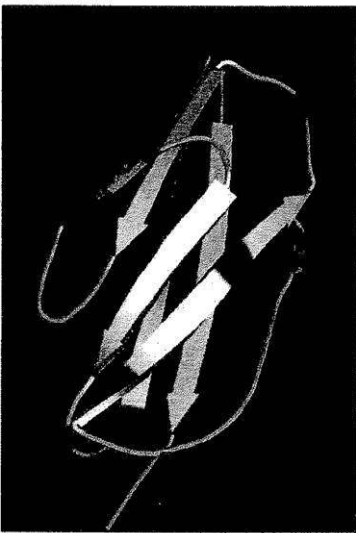
PKD1R4 R1142W L1394V S1047L  
 PKD1R5 N1034S  
 PKD1R7 //LS--FNATL ALTAGV--- IVD **R**AVEYAF // DGE(20)VAQ VLVE---HN VTHTYAAP--GEYLLTVL//  
 PKD1R8 //LV--AG **R**PV TFFPH---P LPSPG-GVLY // DGS---PVL TQSQ---PA ANHTYASR--GTYHVRLE//  
 PKD1R9 //PT---QPDALRTAYV---TGMPAHYLE // DGS---SMT TV **R**G---CPT VTHNFT **S**--GTFPLATV//  
 PKD1R13 //GLE--LOOPY LESAAG---RGRPASV // TEEA---APT RARG---PE VTEIYRDP--GSYLTVTV//  
 PKD1R14 //EG(5)AGSSV PFWQL---ATGTNYSW // GC-----G WLEG---PE VTHAYNST--GDFTVRAA//  
 //VV--APGQLY HEQILL---AAGS--AYTF // GAN-----PE VLPG---PR FSHSPPRV--G **R**ESIRLN//  
 //s-----sdsV p **R**ssps---ss-sssa // DG-----p sss-ss ssasysps--gsysip **l**s//

Y420C

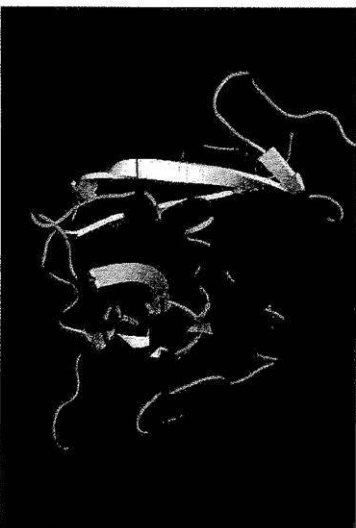
Y528C

C-**L**777-**R**PKD1 C(1)PSDTEI FPG---NGHC **R**LVYER---AAMLQAOE // ---MCNTD--LCSA---P **R**SHVCE  
 コ **L**77777/60% C---sssa6-b-----spc Ybhnsp---bsappp // ---p **R**ps-s---Cs-----pb-**a**lcc

B)



C)



【 図 6 】

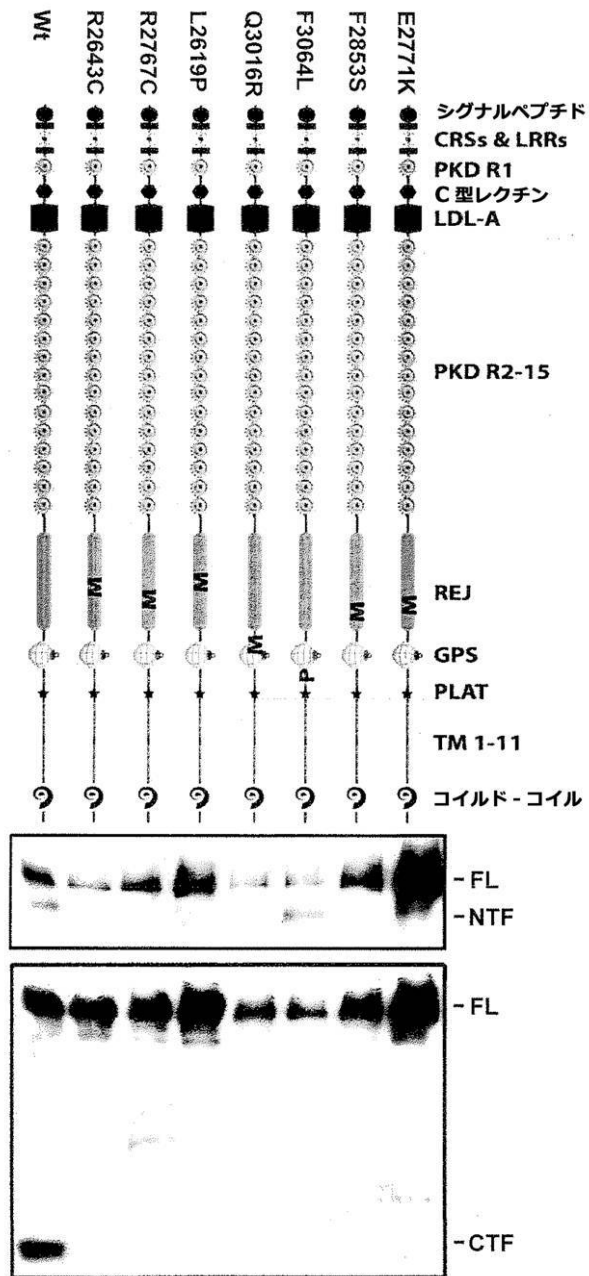


図 6

Figure 7A

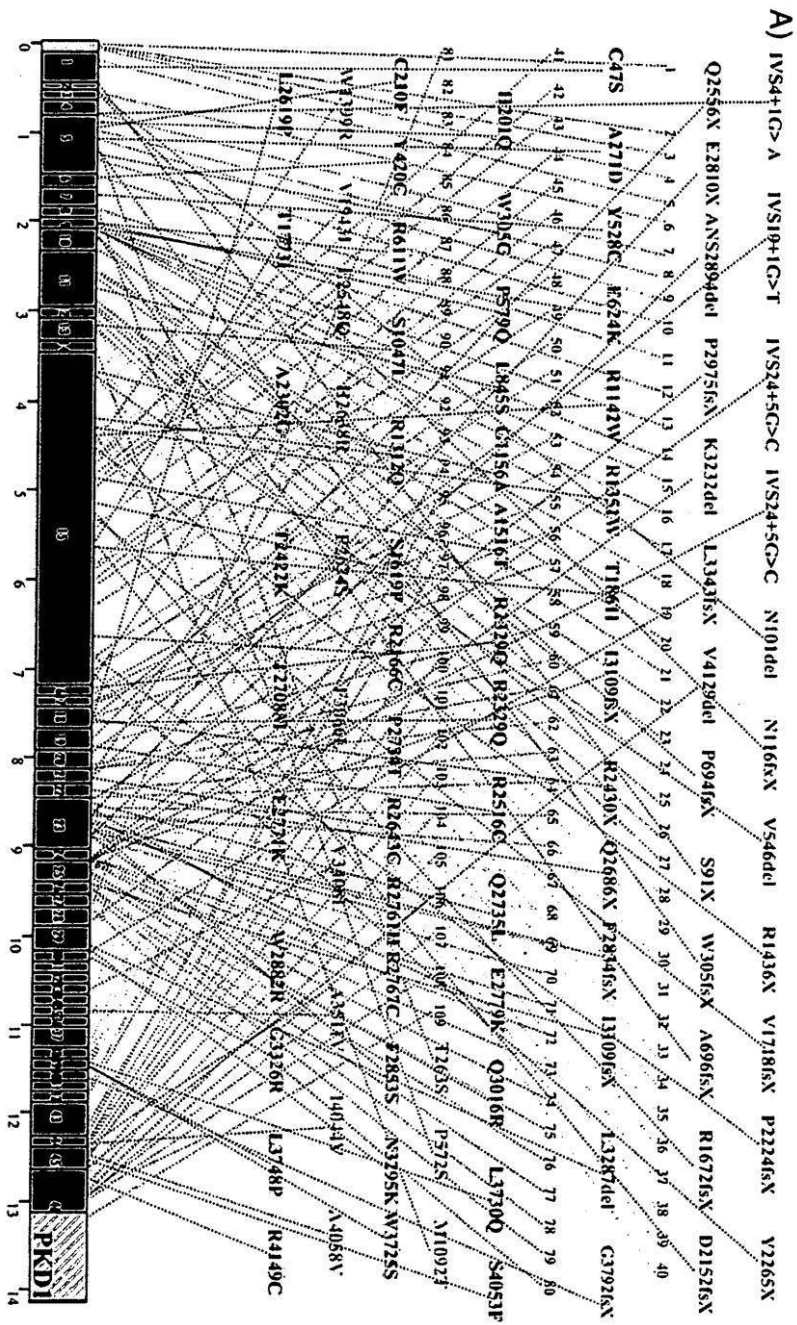
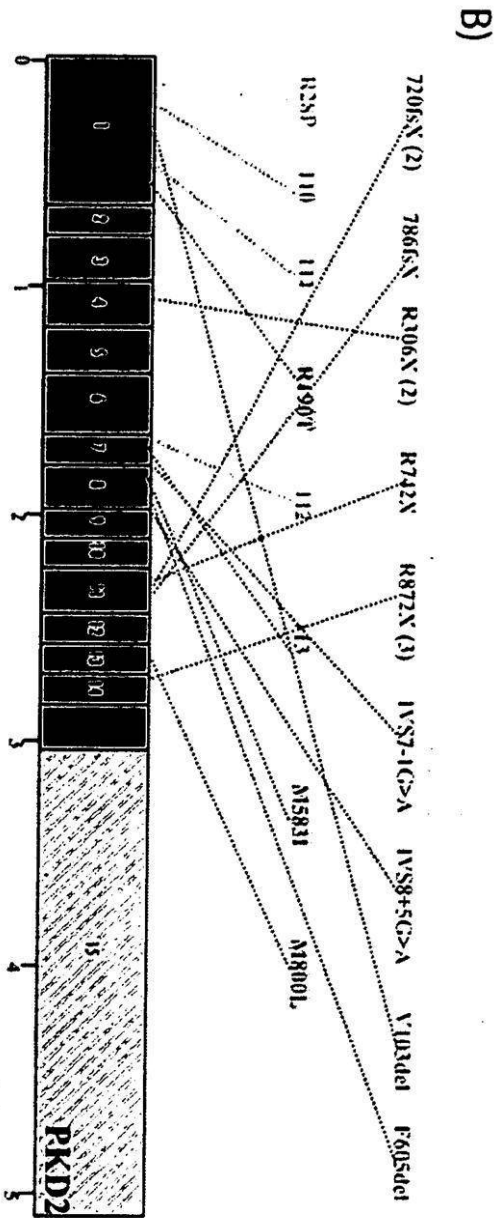


Figure 7B



【 図 8 A 】

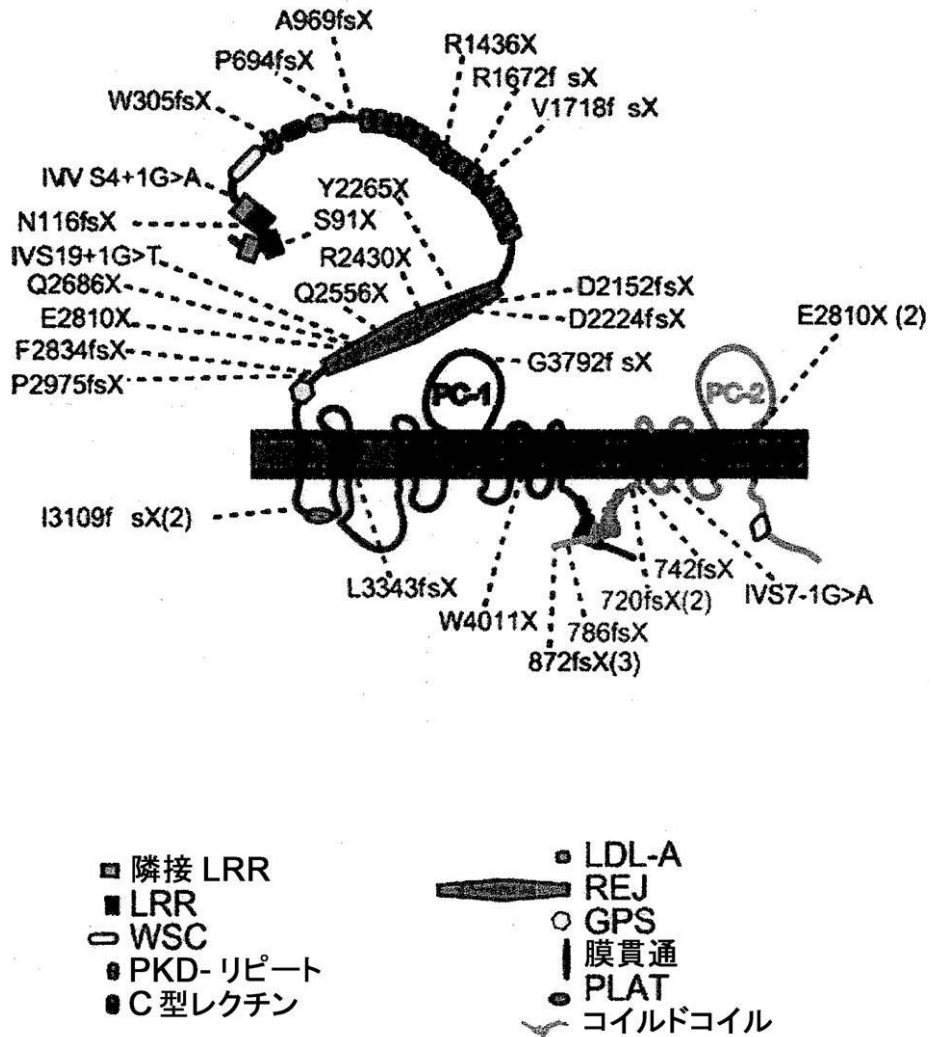


図 8A

【 図 8 B 】

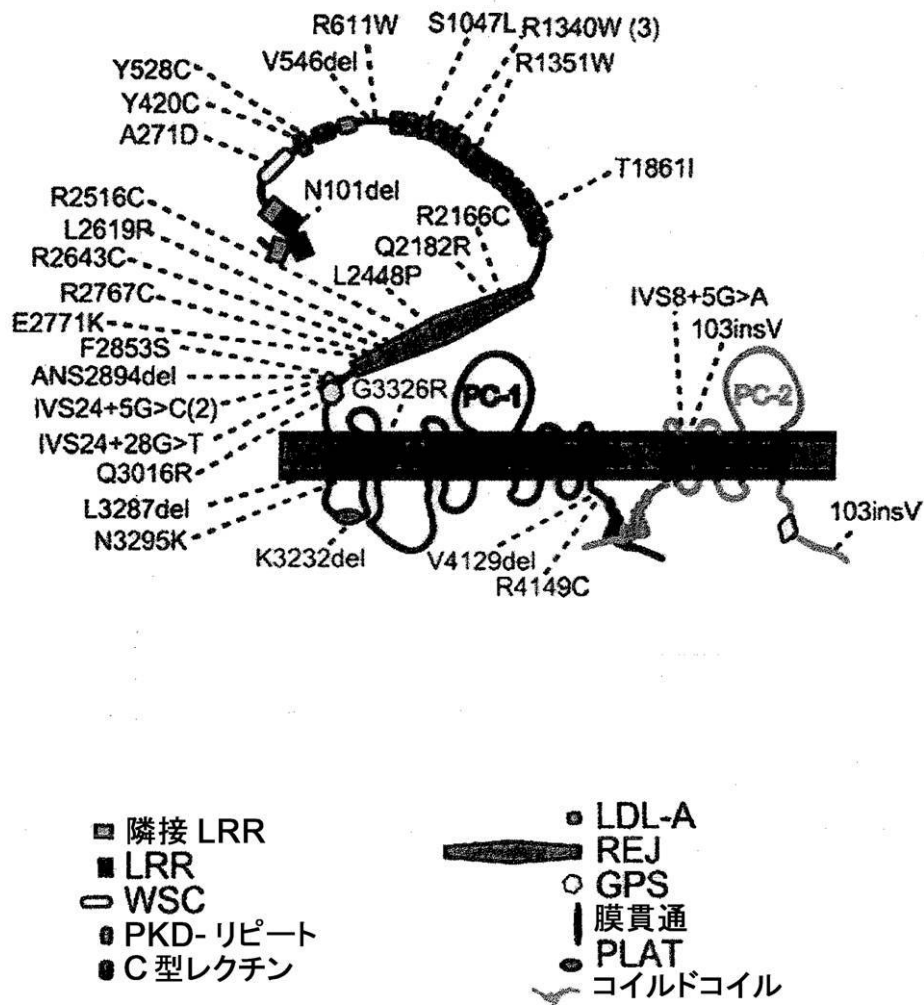


図 8B

【 配 列 表 】

2009544314000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/016705
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/12033 A (IG LAB INC [US]; UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 25 April 1996 (1996-04-25) claim 20 the whole document	1-4,9-11
A	WO 02/06529 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED [US]; GERMINO GREGORY G [US]; WATNICK TERRY J []) 24 January 2002 (2002-01-24) claims 25,30 the whole document	1-4,9-11
A	US 2003/008288 A1 (GERMINO GREGORY G [US] ET AL) 9 January 2003 (2003-01-09) claims 25,30 the whole document	1-4,9-11
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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) "C" 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. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 August 2008		Date of mailing of the international search report  25/11/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL- 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer  Helliot, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/016705

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TURCO A E ET AL: "A NOVEL NONSENSE MUTATION IN THE PKD1 GENE (C3817T) IS ASSOCIATED WITH AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE (ADPKD) IN A LARGE THREE-GENERATION ITALIAN FAMILY" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 4, no. 8, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 1331-1335, XP001117586 ISSN: 0964-6906 abstract the whole document</p>	1-4,9-11
A	<p>BRESIN E ET AL: "A common polymorphism in exon 46 of the human autosomal dominant polycystic kidney disease 1 gene (PKD1)." MOLECULAR AND CELLULAR PROBES DEC 1996, vol. 10, no. 6, December 1996 (1996-12), pages 463-465, XP002492761 ISSN: 0890-8508 abstract the whole document</p>	1-4,9-11
A	<p>PERAL B ET AL: "SCREENING 3' REGION OF THE POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE 1 (PKD1) GENE REVEALS SIX NOVEL MUTATIONS" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL, US, vol. 58, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 86-96, XP001018250 ISSN: 0002-9297 abstract the whole document</p>	1-4,9-11
A	<p>PERAL BELEN ET AL: "A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1)" HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 5, no. 4, 1996, pages 539-542, XP002492762 ISSN: 0964-6906 abstract the whole document</p>	1-4,9-11

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/016705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NEOPHYTOU P ET AL: "Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 98, no. 4, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 437-442, XP002217560 ISSN: 0340-6717 abstract the whole document	1-4,9-11
A	TURCO ALBERTO E ET AL: "Three novel mutations of the PKD1 gene in Italian families with autosomal dominant polycystic kidney disease" HUMAN MUTATION, vol. 10, no. 2, 1997, pages 164-167, XP002492763 ISSN: 1059-7794 abstract the whole document	1-4,9-11
A	ROELFSEMA J H ET AL: "Mutation detection in the repeated part of the PKD1 gene" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL, US, vol. 61, no. 5, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 1044-1052, XP002217563 ISSN: 0002-9297 abstract the whole document	1-4,9-11
A	ROSSETTI S ET AL: "Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA)" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 11, no. 2, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 155-160, XP004459921 ISSN: 0890-8508 abstract the whole document	1-4,9-11

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/016705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERRICHOT R A ET AL: "DGGE screening of PKD1 gene reveals novel mutations in a large cohort of 146 unrelated patients" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 105, no. 3, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 231-239, XP002217561 ISSN: 0340-6717 abstract the whole document	1-4,9-11
A	WATNICK T ET AL: "Mutation detection of PKD1 identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL, US, vol. 65, no. 6, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 1561-1571, XP002217557 ISSN: 0002-9297 abstract the whole document	1-4,9-11
A	THONGNOPPAKHUN A ET AL: "A novel splice-acceptor site mutation (IVS13-2A>T) of polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene resulting in an RNA processing defect with a 74-nucleotide deletion in exon 14 of the mRNA transcript." HUMAN MUTATION JAN 2000, vol. 15, no. 1, January 2000 (2000-01), page 115, XP002492764 ISSN: 1098-1004 abstract the whole document	1-4,9-11
A	THOMAS R ET AL: "Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL, US, vol. 65, no. 1, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 39-49, XP002217562 ISSN: 0002-9297 abstract the whole document	1-4,9-11

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/016705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BOUBA IOANNA ET AL: "Novel PKD1 deletions and missense variants in a cohort of Hellenic polycystic kidney disease families" EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 9, no. 9, September 2001 (2001-09), pages 677-684, XP002492765 ISSN: 1018-4813 abstract the whole document</p>	1-4,9-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/016705**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:  
1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (completely)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007/016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

A method of detecting or predicting the occurrence of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an individual comprising detecting the presence of one or more nucleotide sequence alterations in a PKD 1 gene having the nucleotide sequence of SEQ ID N° 1 or SEQ ID N° 7 in a nucleic acid sample obtained from said individual, wherein said one or more alterations is a deletion of TTAA at nucleotide positions 559 to 563 of SEQ ID N° 1 and wherein detection of said one or more nucleotide sequence alterations indicates that said individual has ADPKD or will develop ADPKD.

2. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of CT at nucleotide position 1124 of SEQ ID N° 1.

3. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of an A, T, G, or C at nucleotide position 2291 of SEQ ID N° 1.

4. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of an A, T, G, or C at nucleotide position 2297 of SEQ ID N° 1.

5. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of a T at nucleotide position 5365 of SEQ ID N° 1.

6. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007/016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of a G at nucleotide position 6666 of SEQ ID N°1.

7. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of an A at nucleotide position 6881 of SEQ ID N°1.

8. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of a T at nucleotide position 8713 of SEQ ID N°1.

9. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of an A, T, G, or C at nucleotide position 9134 of SEQ ID N°1.

10. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is an insertion of 5 nucleotides at nucleotide position 9536 of SEQ ID N°1.

11. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of a T at nucleotide position 10239 of SEQ ID N°1.

12. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to an A at nucleotide position 483 of SEQ ID N°1.

13. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007 /016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 4517 of SEQ ID N°1.

14. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to an A at nucleotide position 7006 of SEQ ID N°1.

15. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to T at nucleotide position 8267 of SEQ ID N°1.

16. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a G to a T at nucleotide position 8639 of SEQ ID N°1.

17. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a G to an A at nucleotide position 20168 of SEQ ID N° 7.

18. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is , a change of a G to a T at nucleotide position 31025 of SEQ ID N° 7.

19. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is , a change of a G to a C at nucleotide position 33415 of SEQ ID N° 7.

20. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007/016705

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of CAA between nucleotide positions 508 to 516 of SEQ ID N° 1.

21. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of TGG at nucleotide positions 1848 to 1850 of SEQ ID N° 1.

22. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of CCAACTCCG at nucleotide positions 8892 to 8900 of SEQ ID N° 1.

23. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of AAG at nucleotide positions 9905 to 9907 of SEQ ID N° 1.

24. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of CTC at nucleotide positions 10070 to 10072 of SEQ ID N° 1.

25. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a deletion of TGG at nucleotide positions 12597 to 12599 of SEQ ID N° 1.

26. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to an A at nucleotide position 1023 of SEQ ID N° 1.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007 /016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

27. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a G to an A at nucleotide position 385 of SEQ ID N° 1.

28. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of an A to a G at nucleotide position 1470 of SEQ ID N° 1.

29. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 4262 of SEQ ID N° 1.

30. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a T to an A at nucleotide position 8855 of SEQ ID N° 1.

31. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of an A to a G at nucleotide position 1794 of SEQ ID N° 1.

32. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a G to an A at nucleotide position 6036 of SEQ ID N° 1.

33. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 2042 of SEQ ID N° 1.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007 /016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

34. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 3351 of SEQ ID N° 1.

35. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of an A to a G at nucleotide position 6756 of SEQ ID N° 1.

36. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 5793 of SEQ ID N° 1.

37. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 6707 of SEQ ID N° 1.

38. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a G to a C at nucleotide position 10187 of SEQ ID N° 1.

39. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a G at nucleotide position 7116 of SEQ ID N° 1.

40. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of an A to a G at nucleotide position 10311 of SEQ ID N° 1.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007 /016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

41. claims: (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a T to a C at nucleotide position 7554 of SEQ ID N° 1.

42. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 7757 of SEQ ID N° 1.

43. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a T to a C at nucleotide position 8067 of SEQ ID N° 1.

44. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 8138 of SEQ ID N° 1.

45. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 8509 of SEQ ID N° 1.

46. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to an A at nucleotide position 10096 of SEQ ID N° 1.

47. claims: 1 (partially), 2-4 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US2007 /016705

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Same method as herein above, wherein said one or more alterations is a change of a C to a T at nucleotide position 12658 of SEQ ID N° 1.

48. claims: 5 (partially), 6-8 (completely), 9 (partially), 10-11 (totally)

A method of detecting or predicting the occurrence of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an individual comprising detecting the presence of one or more nucleotide sequence alterations in a PKD2 gene having the nucleotide sequence of SEQ ID N° 4 in a nucleic acid sample obtained from said individual, wherein said one or more alterations are selected from the group consisting of: an insertion of: an A at nucleotide position 2226 of SEQ ID N° 4, a deletion of AG at nucleotide positions 2422 to 2423 of SEQ ID N° 4, a change of a C to a T at nucleotide position 2680 of SEQ ID N° 4, IVS7-1G>A, IVSB+5G>A, a deletion of TGG at nucleotide positions 374-376 of SEQ ID N° 4 and a deletion of TTC between nucleotide positions 1876-1881 of SEQ ID N° 4, wherein detection of said one or more nucleotide sequence alterations indicates that said individual has ADPKD or will develop ADPKD.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/016705

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9612033	A	25-04-1996	AT 316136 T	15-02-2006
			AU 706167 B2	10-06-1999
			AU 4002795 A	06-05-1996
			CA 2202283 A1	25-04-1996
			DE 69534753 T2	02-11-2006
			DK 0782630 T3	29-05-2006
			EP 0782630 A1	09-07-1997
			ES 2256851 T3	16-07-2006
			JP 2001520502 T	30-10-2001
			PT 782630 T	30-06-2006
			US 6867288 B1	15-03-2005
WO 0206529	A	24-01-2002	AU 7199801 A	30-01-2002
			CA 2395781 A1	24-01-2002
			JP 2004504038 T	12-02-2004
US 2003008288	A1	09-01-2003	US 2006246504 A1	02-11-2006

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ワトニック, テリー, ジェイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 1 ボルティモア, 5 ティーエイチ フロア, ノース  
チャールズ ストリート 1 0 0

(72)発明者 ガルシア - ゴンザレス, ミゲル.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 1 ボルティモア, 5 ティーエイチ フロア, ノース  
チャールズ ストリート 1 0 0

(72)発明者 ジェルミノ, グレゴリー, ジー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 0 1 ボルティモア, 5 ティーエイチ フロア, ノース  
チャールズ ストリート 1 0 0

(72)発明者 ジョーンズ, ジェフリー, ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 0 9 5 ウィルブラム, ホースシュー レーン 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20 DA03 EA04 GA11

4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR62 QS25