

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5881270号
(P5881270)

(45) 発行日 平成28年3月9日(2016.3.9)

(24) 登録日 平成28年2月12日(2016.2.12)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N	33/50	(2006.01)	GO 1 N	33/50	Z N A Z
CO 7 K	16/18	(2006.01)	CO 7 K	16/18	
C 12 M	1/34	(2006.01)	C 12 M	1/34	A
C 12 N	5/16	(2006.01)	C 12 N	5/16	
C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A

請求項の数 5 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-549576 (P2008-549576)
(86) (22) 出願日	平成19年1月5日(2007.1.5)
(65) 公表番号	特表2009-522579 (P2009-522579A)
(43) 公表日	平成21年6月11日(2009.6.11)
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/000280
(87) 國際公開番号	W02007/081804
(87) 國際公開日	平成19年7月19日(2007.7.19)
審査請求日	平成21年12月25日(2009.12.25)
審判番号	不服2014-46 (P2014-46/J1)
審判請求日	平成25年12月26日(2013.12.26)
(31) 優先権主張番号	60/756,934
(32) 優先日	平成18年1月5日(2006.1.5)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	596115687 チルドレンズ メディカル センター コ ーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ボストン, シャタック・ストリート 55
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NFATの制御因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NFATの活性化を誘発する少なくとも1つのNFAT制御タンパク質をコードする異種性核酸を含む、体外における組換え細胞であって、該異種性核酸がNFAT制御遺伝子であり、該NFAT制御遺伝子がORAI1であり、ここで該ORAI1がSEQ ID NO:1またはそれと90%相同な配列を含む塩基配列であり、該組換え細胞が単離された細胞であり、かつ、以下の少なくとも1つを含む、組換え細胞：

- (i) NFAT制御遺伝子をコードする第二の異種性核酸、または
- (ii) 細胞内カルシウムイオン濃度の増加を誘発する異種性カルシウム調節剤。

【請求項 2】

哺乳動物細胞、ヒト細胞、齧歯動物細胞、昆虫細胞、またはアフリカツメガエル(Xenopus)細胞である、請求項1記載の組換え細胞。

【請求項 3】

核酸がヒト由来である、請求項2記載の組換え細胞。

【請求項 4】

ORAI1がSEQ ID NO:1を含む塩基配列である、請求項1記載の組換え細胞。

【請求項 5】

ORAI1ポリペプチドをコードする異種性核酸が細胞内で発現して異種性ポリペプチドを產生する、請求項1記載の組換え細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】**【0001】****政府支援**

本発明は、National Institute of Health(NIH)認可番号R01 AI40127、HD39685、R21 A1054933、およびGM 075256により一部支援された。米国政府は本発明の一定の権利を有する。

【0002】**発明の分野**

本発明は、NFATタンパク質として知られるカルシウム制御性転写因子ファミリーの制御の分野に関する。

10

【0003】**関連出願**

本出願は、2006年1月5日に出願された米国特許仮出願第60/756,934号の優先権を主張し、その全内容は本明細書に参照により組み入れられる。

【背景技術】**【0004】****発明の背景**

免疫系の機能亢進または不適当な活性は、深刻かつ一般に広まっている医学的問題である。それは、急性および慢性免疫疾患、例えば、アレルギー性およびアトピー性疾患、例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、およびアトピー性皮膚炎に、ならびに自己免疫疾患、例えば、リウマチ様関節炎、インスリン依存性糖尿病、炎症性腸疾患、自己免疫性甲状腺炎、溶血性貧血、および多発性硬化症に寄与する。免疫系の機能亢進または不適当な活性はまた、移植片拒絶および移植片対宿主病に関与している。

20

【0005】

転写因子のある特定のファミリーである、NFATタンパク質(活性化T細胞の核因子)は、免疫細胞に発現しており、免疫応答を誘発するにおいて重要な役割を果たしている。NFATタンパク質は、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入による、細胞内カルシウムレベルの増加により、活性化される。活性化されたNFATタンパク質は、立ち代わって、免疫応答に必要とされるサイトカイン遺伝子の転写を誘導する。免疫抑制薬シクロスボリンAおよびFK506は、活性化免疫細胞におけるサイトカイン遺伝子転写の強力なインヒビターであり、カルシニューリンがNFATを活性化できないようにカルシニューリンを阻害することにより作用すると報告されている。しかしながら、これらの薬物は、長期使用後、腎毒性および神経毒性効果を示しうる。カルシニューリンは多くの組織において普遍性に発現しているため、NFAT以外の基質に対するカルシニューリン活性の薬物の阻害が、観察される毒性に寄与している可能性がある。

30

【0006】

NFATの貯蔵量作動性カルシウム流入活性化を選択的に阻害する免疫抑制剤の必要性がある。

【発明の開示】**【0007】****発明の概要**

本発明は、NFAT活性を調節する作用物質を同定するための方法を提供する。一つの態様において、作用物質は、細胞内カルシウムレベルを調節することによってNFAT活性を調節する。一つの好ましい態様において、作用物質は、CRACチャネルの少なくとも1つの成分、例えば、ORAIタンパク質、例えば、ORAI1(NM_032790; SEQ ID NO:1)、ORAI2(BC069270; SEQ ID NO:2)、および/またはORAI3(NM_152288; SEQ ID NO:3)によりコードされるタンパク質を調節する。一つの態様において、作用物質は、NFATのリン酸化を、例えば、DYRKタンパク質、例えば、DYRK1A(NM_001396; SEQ ID NO:4)、DYRK1B(NM_004714; SEQ ID NO:5)、DYRK2(NM_003583; SEQ ID NO:6)、DYRK3(NM_003582; SEQ ID NO:7)、DYRK4(NM_003845; SEQ ID NO:8)、および/またはDYRK6(NM_005734; SEQ ID NO:9)によりコードされるタ

40

50

ンパク質の調節を介して、調節する。

【0008】

本発明は、少なくとも1つの試験作用物質を、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質(NFAT regulator protein)またはその断片もしくは誘導体を含む組換え細胞に接触させる段階；NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体についての活性、相互作用、発現、または結合に対する試験作用物質の効果を評価する段階；およびNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体についての活性、相互作用、発現、または結合に対する効果を有する試験作用物質を同定し、それによって、同定された試験作用物質がNFAT制御タンパク質を調節する作用物質として特徴付けられる段階を含む、NFAT制御タンパク質を調節する作用物質を同定する方法を提供する。

10

【0009】

一つの態様において、NFAT制御タンパク質は、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、ORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、およびDYRK6(SEQ ID NO:9)からなる群より選択される少なくとも1つのNFAT制御因子(NFAT regulator)によりコードされる。一つの態様において、NFAT制御タンパク質は、表Iに列挙された遺伝子の少なくとも1つによりコードされる。

【0010】

一つの態様において、試験作用物質の効果を評価する段階は、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、ORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、またはDYRK6(SEQ ID NO:9)によりコードされるNFAT制御タンパク質に特異的に結合する抗体を用いる事を含む。

20

【0011】

一つの態様において、方法はさらに、細胞の原形質膜を横断する電流に対する試験作用物質の効果を評価する段階を含む。一つの態様において、電流は、細胞を横断する一価陽イオンまたは二価陽イオンの流束(flux)によるものである。一つの態様において、方法はさらに、細胞内における細胞内カルシウムに対する試験作用物質の効果を評価する段階を含む。一つの態様において、方法はさらに、細胞内における細胞内カルシウムに対する効果を有する試験作用物質を同定し、それによって、同定された試験作用物質が、細胞内カルシウムを調節する作用物質およびNFAT制御タンパク質を調節する作用物質として特徴付けられる段階を含む。

30

【0012】

一つの態様において、細胞は、少なくとも1つの異種性NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む。一つの態様において、細胞は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含む。一つの態様において、細胞は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現するか、または過小発現する。

【0013】

本発明はさらに、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む組換え細胞と少なくとも1つの試験作用物質を接触させる段階；細胞内における陽イオンもしくは二価陽イオンの細胞内量もしくは濃度に対する、または細胞へのイオン流入に対する試験作用物質の効果を評価する段階；および細胞内における陽イオンもしくは二価陽イオンの細胞内量もしくは濃度に対する、または細胞へのイオン流入に対する効果を有する試験作用物質を同定し、それによって、同定された試験作用物質が、細胞内カルシウムを調節する作用物質として特徴付けられる段階を含む、細胞内カルシウムを調節する作用物質を同定する方法を提供する。一つの態様において、細胞内陽イオンはカルシウムである。一つの態様において、試験作用物質の効果を評価する段階は、細胞質におけるカルシウムレベルをモニタリングする事、細胞内カルシウム貯蔵におけるカルシウムレベルをモニタリングする事、またはカルシウム流入媒介性事象をモニタリングする事を含む。一つの態様において、方法はさらに、NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導

40

50

体についての活性、相互作用、発現、または結合に対する作用物質の効果を評価する段階を含む。一つの態様において、NFAT制御タンパク質は、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、またはORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、またはDYRK6(SEQ ID NO:9)からなる群より選択される少なくとも1つのNFAT制御因子によりコードされる。一つの態様において、細胞内カルシウムを調節する作用物質はさらに、NFAT制御タンパク質を調節する作用物質として特徴付けられる。一つの態様において、組換え細胞は、少なくとも1つの異種性NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む。一つの態様において、組換え細胞は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含む。一つの態様において、組換え細胞は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現する。一つの態様において、組換え細胞は、ホメオスタシス異常(dyshomeostasis)を示す。一つの態様において、組換え細胞は、カルシウムホメオスタシス異常を示す。

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、レポータータンパク質をコードする配列に機能的に連結した、少なくとも1つのNFAT制御ドメインまたはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含む少なくとも1つのベクターを含む組換え細胞に、少なくとも1つの試験作用物質を投与する段階；ベクターによりコードされる少なくとも1つの発現産物の細胞内局在をモニタリングし、それによって、発現産物の細胞内局在に対する効果を有する試験作用物質が、NFAT制御因子の機能を調節する作用物質として特徴付けられる段階を含む、NFAT制御因子の機能を調節する作用物質についてスクリーニングするための方法を提供する。一つの態様において、NFAT制御因子の機能を調節する作用物質は、発現産物の細胞質局在または核局在と関連している。一つの態様において、細胞は休止状態にある。一つの態様において、細胞は、カルシウム調節剤で刺激される。一つの態様において、細胞は、タブシガルジンまたはイオノマイシンで刺激される。一つの態様において、細胞は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含むベクターをさらに投与される。一つの態様において、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含むベクターは、レポータータンパク質をコードする配列に機能的に連結した、少なくとも1つのNFAT制御ドメインまたはその断片もしくは誘導体をコードする異種性核酸を含むベクターと同じベクターである。

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、ORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、DYRK6(SEQ ID NO:9)、または表Iに列挙された遺伝子のいずれかに対応する被験体由来の遺伝子における少なくとも25個の連續したヌクレオチドを配列決定する段階；および被験体の遺伝子の配列をその遺伝子の野生型配列と比較し、その遺伝子の野生型配列との差異が、被験体の遺伝子が免疫不全の原因であることを示す段階を含む、被験体において未解明の免疫不全を診断するための方法を提供する。一つの態様において、比較は、被験体由来の生物学的試料を得る段階、生物学的試料中のDNAを配列決定する段階、および生物学的試料から得られたDNA配列を野生型配列と電子的に整列させる段階を含む。一つの態様において、差異は、ORAI1(SEQ ID NO:1)のコード配列の271位におけるCからTへのヌクレオチド突然変異を含む。一つの態様において、未解明の免疫不全は、NFAT活性の制御における欠陥と関連している。一つの態様において、差異は、スプライス部位における突然変異を含む。一つの態様において、差異は、非同義(nonsynonymous)変異を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、NFAT制御タンパク質に関連した疾患または障害を示す生物体に対する試験作用物質の効果を評価する段階；およびその疾患または障害に関連した生物体の表現型に対する効果を試験作用物質が有する場合には、その試験作用物質を、NFAT制御タンパク質に関連した疾患または障害を処置または予防するための作用物質であると同定する段

10

20

30

40

50

階を含む、NFAT制御タンパク質に関連した疾患または障害を処置または予防するための作用物質を同定するための方法を提供し、その試験作用物質は、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体の活性、相互作用、発現、または結合を調節する。一つの態様において、生物体は、カルシウムホメオスタシス異常を示す1つまたは複数の細胞を含む。一つの態様において、生物体は、カルシウムホメオスタシス異常を示す。一つの態様において、試験作用物質が効果を生じる表現型は、疾患または障害と関連している。この方法は、細胞内カルシウムの調節の変化に関連した疾患または状態について、特に有用である。一つの態様において、疾患または障害は、主として、カルシウムシグナル伝達の乱れに起因する。一つの態様において、NFAT制御タンパク質に関連した疾患または障害は、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患、同種または異種移植拒絶、移植片対宿主病、再生不良性貧血、乾癬、紅斑性狼瘡、炎症性疾患、MS、I型糖尿病、喘息、肺線維症、強皮症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、心膜切開後症候群、川崎病、橋本甲状腺炎、グレーブス病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、慢性糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、ヴェグナー肉芽腫症、多発性硬化症、囊胞性線維症、慢性再発性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ブドウ膜炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、クローン病、潰瘍性結腸炎、結腸炎/炎症性腸症候群、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパシー、湿疹、および自己免疫性甲状腺炎である。移植片拒絶、後天性免疫不全症、分類不能型免疫不全症、心筋肥大、重症複合型免疫不全症、拡張型心筋症、過剰または病理的骨吸収、過剰脂肪細胞分化、肥満、または潜伏ウイルスの再活性化である。

10

20

【0017】

本発明はさらに、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、またはORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、もしくはDYRK6(SEQ ID NO:9)、またはその相同体によりコードされるNFAT制御タンパク質に特異的に結合する抗体を提供する。

【0018】

本発明のNFAT制御タンパク質は、当技術分野において公知の様々な手段、例えば、自動ペプチド合成によって、または、NFAT制御因子またはその断片もしくは誘導体を含む/コードする核酸配列を含む組換えベクターを含む宿主細胞を、NFAT制御因子の発現に適した条件下で培養することによって、作製されうる。

30

【0019】

本発明はさらに、少なくとも1つの異種性NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む、および/またはNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする少なくとも1つの異種性核酸を含む、単離された細胞；ならびに細胞の原形質膜を横断する電流をモニタリング、検出、または測定するために用いられるモニタリング剤を含むシステムを提供する。一つの態様において、モニタリング剤は装置である。一つの態様において、電流は、細胞を横断する陽イオンまたは二価イオンの流束によるものである。一つの態様において、モニタリング剤は、細胞内における細胞内カルシウムに対する試験作用物質の効果をモニタリングするために用いられる。一つの態様において、モニタリング剤は、カルシウム流入媒介性事象をモニタリング、検出、または測定するために用いられる。

40

【0020】

本発明はさらに、少なくとも1つの哺乳動物NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現する組換え細胞；およびカルシウム流入媒介性事象をモニタリング、検出、または測定するために用いられるモニタリング剤を含むシステムを提供する。一つの態様において、NFAT制御因子は、ORAI1(SEQ ID NO:1)、ORAI2(SEQ ID NO:2)、またはORAI3(SEQ ID NO:3)、DYRK1A(SEQ ID NO:4)、DYRK1B(SEQ ID NO:5)、DYRK2(SEQ ID NO:6)、DYRK3(SEQ ID NO:7)、DYRK4(SEQ ID NO:8)、またはDYRK6(SEQ ID NO:9)によりコードされる。

【0021】

50

本発明はさらに、少なくとも1つの異種性NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む、および/またはNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする少なくとも1つの異種性核酸を含む、組換え細胞を提供する。一つの態様において、組換え細胞は、少なくとも1つの哺乳動物NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現する。

【0022】

本発明はさらに、少なくとも1つの哺乳動物NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現する組換え細胞を提供する。

【0023】

本発明は、カルシウムシグナル伝達に関連した疾患または障害を処置または予防するための作用物質を同定する方法を提供する。方法は、疾患または障害を示す生物体に対する試験作用物質の効果を評価する段階、および少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片の活性、相互作用、発現、または結合を試験作用物質が調節する場合には、その試験作用物質を、疾患または障害を処置または予防するための作用物質であると同定する段階を含む。一つの態様において、疾患または障害は、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患、同種または異種移植拒絶、移植片対宿主病、再生不良性貧血、乾癬、紅斑性狼瘡、炎症性疾患、MS、I型糖尿病、喘息、肺線維症、強皮症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、心膜切開後症候群、川崎病、橋本甲状腺炎、グレーブス病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、慢性糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、ヴェグナー肉芽腫症、多発性硬化症、嚢胞性線維症、慢性再発性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ブドウ膜炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、クローアン病、潰瘍性結腸炎、結腸炎/炎症性腸症候群、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髓性多発根ニューロパシー、湿疹、および自己免疫性甲状腺炎である。移植片拒絶、後天性免疫不全症、分類不能型免疫不全症、心筋肥大、重症複合型免疫不全症、拡張型心筋症、過剰または病理的骨吸収、過剰脂肪細胞分化、肥満、または潜伏ウイルスの再活性化である。

10

20

30

【0024】

発明の詳細な説明

発明の局面は、NFAT活性を、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入(SOCE)を介して、またはNFATリン酸化の調節を介して制御する遺伝子の特徴付けに関する。特に、 Ca^{2+} 放出活性化 Ca^{2+} (CRAC)チャネルの必須成分の発見に関する。従って、本発明の局面は、NFAT活性の、特にT細胞におけるNFAT活性の調節に関して、新規な制御因子に関する。本発明の局面はまた、NFAT活性を調節する新規な作用物質についてスクリーニングするための方法に関する。本発明の局面はさらに、本発明のNFAT制御因子の活性を調節する作用物質についてスクリーニングするための方法に関する。本発明はさらに、本発明のNFAT制御因子を、細胞内カルシウムを調節することによって調節する作用物質についてスクリーニングするための方法を提供する。

【0025】

NFAT遺伝子およびタンパク質

NFAT(nuclear factor of activated T cells)タンパク質とは、メンバーNFAT1、NFAT2、NFAT3、およびNFAT4をいくつかのアイソフォームと共に含む転写因子のファミリーのメンバーを意味する。活性化がカルシニューリン依存性である任意の他のNFATタンパク質もまた含まれることを意図される。NFATタンパク質は、例えば哺乳動物、例えばヒトまたはマウスのタンパク質でありうる。NFAT1、NFAT2、およびNFAT4は、免疫細胞、例えば、Tリンパ球に発現しており、免疫応答を誘発するにおいて役割を果たしている。NFATタンパク質は、免疫応答中において、サイトカイン遺伝子、例えば、IL-2、IL-3、IL-4、TNF-、およびIFN-の転写制御に関与している。

40

【0026】

NFATの保存的制御ドメインは、約300アミノ酸長であるNFATのN末端領域である。マウスNFAT1の保存的制御ドメインはアミノ酸残基100位からアミノ酸残基397位まで及ぶ領域で

50

あり、ヒトNFAT1の保存的制御ドメインはアミノ酸残基100位からアミノ酸残基395位まで及ぶ領域であり、ヒトNFAT2の保存的制御ドメインはアミノ酸残基106位からアミノ酸残基413位まで及ぶ領域であり、ヒトNFAT2bの保存的制御ドメインはアミノ酸残基93位からアミノ酸残基400位まで及ぶ領域であり、ヒトNFAT3の保存的制御ドメインはアミノ酸残基102位からアミノ酸残基404位まで及ぶ領域であり、およびヒトNFAT4の保存的制御ドメインはアミノ酸残基97位からアミノ酸残基418位まで及ぶ領域である。保存的制御ドメインは、NFATファミリー、NFAT1、NFAT2、NFAT3、およびNFAT4のメンバー間で中程度に保存されている。保存的制御ドメインは、カルシニューリンへ直接結合する。保存的制御ドメインは、DNA結合ドメイン(マウスNFAT1におけるアミノ酸残基398位～680位、ヒトNFAT1におけるアミノ酸残基396位～678位、ヒトNFAT2におけるアミノ酸残基414位～696位、ヒトNFAT2bにおけるアミノ酸残基401位～683位、ヒトNFAT3におけるアミノ酸残基405位～686位、およびヒトNFAT4におけるアミノ酸残基419位～700位)のすぐN末端側に位置している。10

【0027】

貯蔵量作動性カルシウム流入

SOCEは、電気的非興奮性細胞において細胞内細胞質の遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]i)を増加させる主要な機構の一つである。Ca²⁺上昇は、事実上あらゆる細胞における重大なシグナル伝達機構である。細胞内Ca²⁺の厳格な制御および二次メッセンジャーとしてのその有用性は、[Ca²⁺]iレベルが典型的には70～100nMであるが、細胞外Ca²⁺レベル([Ca²⁺]ex)が10⁴倍高い、～1から2mMであるという事実により強調される。細胞シグナル伝達のためのCa²⁺の即時の源は、細胞内か細胞外のいずれかでありうる(図1)。細胞内Ca²⁺は、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP3)または他のシグナルによりER貯蔵から放出され、一方、細胞外Ca²⁺は、原形質膜における電圧依存性、リガンド依存性、貯蔵量作動性、または二次メッセンジャー依存性Ca²⁺チャネルを通じて流入する。リンパ球などの電気的非興奮性細胞において、Ca²⁺流入についての主要な機構は、細胞内Ca²⁺貯蔵の充満状態により制御される過程である、貯蔵量作動性Ca²⁺流入である。細胞内Ca²⁺貯蔵の枯渇は、カルシウム放出活性化Ca²⁺(CRAC)チャネルと呼ばれている、特定の電気生理学的特性をもつ膜Ca²⁺チャネルの活性化を誘発する(Parekh and Putney, Jr. 2005, *Physiol Rev* 85:757)。20

【0028】

Ca²⁺放出活性化Ca²⁺(CRAC)チャネル

CRACチャネルの電気生理学的特性は、集中的に研究されているが、チャネル自体の分子性質およびその活性化の機構はまだわかっていない。[Ca²⁺]i、イノシトールリン酸IP3またはIP4、cGMPまたはcAMPにおける増加を直接必要とせず、細胞内Ca²⁺貯蔵の枯渇がチャネル活性化にとって必要かつ十分であるというCRACチャネルの一つの定義が有効である(Parekh and Penner, 1997, *Physiol Rev*. 77:901)。生物物理学的に、CRAC電流は、いくつかある基準の中で特に、ER Ca²⁺貯蔵枯渇の結果としてのその活性化、一価陽イオン(Cs⁺、Na⁺)と比較してのCa²⁺へのその高い選択性、非常に低い單一チャネルコンダクタンス、顕著な内向き整流を有する特徴的なI-V関係、ならびに例えば、La³⁺および2-APB(100 μM)それぞれによる薬理学的遮断に対するその感受性により、定義される(Parekh and Putney, Jr. 2005, *Physiol Rev* 85:757; Lewis, 2001, *Annu Rev Immunol* 19:497)。30

【0029】

SOCEおよびCRACについての候補遺伝子

CRACチャネルの分子性質はまだ完全にはわかっていない。最も広く研究されたCRACチャネルについての候補遺伝子は、ショウジョウバエ(*Drosophila*)光受容体TRP(Transient Receptor Potential(一過性受容体ポテンシャル))遺伝子の>25個の哺乳動物相同体であった。しかし、たいていのTRPタンパク質は、非特異的陽イオンチャネルを形成し、二価陽イオンに対していくらか優先を示すものでさえ、異種性に発現した場合、CRACチャネルの重要な生物物理学的に顕著な特徴のすべてを示すとは限らない(Clapham, 2003. *Nature* 426:517)。最近まで、TRPV6は、その生物物理学的特徴の一部がCRACのそれと重複するため、最も有望なCRACチャネル候補遺伝子であった。CRACのようにTRPV6はCa²⁺を選択性的に運ぶが、それは、CRACチャネルをよく表している特徴である貯蔵枯渇により活性化されない。40

10

20

30

40

50

RNAiを用いてTRPV6発現を抑制するノックダウン研究、およびTRPV6-/-マウス由来のT細胞を用いる本発明者らの研究は、TRPV6の非存在下においてSOCEまたはICRACにおける欠陥を示さなかった(Kahr, et al. 2004. *J Physiol* 557:121; Kepplinger, et al. *CaT1*もTRPC3タンパク質も、Tリンパ球のCRACに寄与しない。原稿準備中)。従って、TRPV6も任意の他の遺伝子も、SOCEまたはCRACチャネル活性に関与するとは確認されていない。

【0030】

SOCEおよびCRACチャネル活性化の機構

CRACチャネルが活性化される機構もまた不明である。細胞内Ca²⁺貯蔵の枯渇は、CRAC活性化に必要であるが、どのようにしてERにおける低下したCa²⁺濃度についての情報がCRAC細孔へ伝達されるかは、知られていない。3つの主要なモデルが提案されているが、合意には至っていない(Parekh and Putney, Jr. 2005, *Physiol Rev* 85:757)。(i)「立体構造的結合モデル」は、ERの表面における分子の立体構造的変化を前提とし、その後、分子はCRACチャネルに結合する；(ii)「分泌結合モデル」は、(恒常的に活性な)CRACチャネルが、貯蔵が枯渇すると原形質膜に融合する細胞質内小胞に存在することを示唆する；(iii)「カルシウム流入因子(CIF)モデル」は、刺激された細胞の細胞質へCIFが放出された場合に、CRACチャネルを通じてCa²⁺流入を活性化する可溶性小分子を予想する。

10

【0031】

間質相互作用分子1(STIM1)

最近の証拠は、STIM1が貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびCRACチャネル機能において重要な役割を果たすことを示唆している。Roosら(2005, *J Cell Biol* 169:435)、Liouら(2005, *Curr Biol* 15:1235)、および本発明者らのグループ(後述の実施例2参照)による3つの独立したRNAiスクリーニングは、RNAiによるSTIM発現の抑制が、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)S2細胞および哺乳動物細胞におけるCa²⁺流入を障害することを見出している(図5)。STIM1は、最初は、プレB細胞の増殖を促進する間質タンパク質として、および推定の腫瘍抑制因子として特徴付けられたI型膜貫通タンパク質である(Oritani, et al. 1996. *J Cell Biol* 134:771; Sabbioni, et al. 1997. *Cancer Res* 57:4493)。STIM1についてのヒト遺伝子は、ウィルムス腫瘍を含むいくつかの小児悪性腫瘍に関連した遺伝子を含むと考えられている染色体11p15.5上に位置する(Parker et al. 1996, *Genomics* 37:253)。STIM1は、そのER/細胞外領域におけるCa²⁺結合EFハンドモチーフおよび不活性 - モチーフ(sterile -motif)(SAM)ドメイン、1回膜貫通ドメイン、ならびに2つの推定細胞質コイルドコイル領域を含む(Manji et al. 2000, *Biochim Biophys Acta* 1481:147)。ドメイン構造およびゲノム組成は、STIM2と呼ばれる関連遺伝子に保存されており、STIM2は、主にそのC末端においてSTIM1と異なる(Williams et al. 2002, *Biochim Biophys Acta* 1596:131)。STIM1は、STIM2とホモ二量体化またはヘテロ二量体化することが可能である(Williams et al. 2002、前記)。ERに発現している場合、グリコシル化およびリン酸化研究により判断すると、そのC末端領域は細胞質に位置するが、N末端はERの内腔に存在する(Maji et al. 2000、前記；Williams et al. 2002、前記)。わずかなSTIM1が、原形質膜に位置する。STIM1発現のRNAi媒介性抑制はSOCEおよびCRACチャネルに干渉するが、STIM1がCa²⁺チャネル自体である可能性は低い。むしろ、STIM1は、ERにおいてそのEFハンドを介してCa²⁺レベルを感知する可能性がある(Putney, Jr. 2005. *J Cell Biol* 169:381; Marchant, 2005, *Curr Biol* 15:R493)。貯蔵量作動性Ca²⁺流入の立体構造的結合モデルと一致して、STIM1は、ERと原形質膜の間の空間に物理的に橋を架け、それに従って、原形質膜において枯渇Ca²⁺貯蔵の感知を貯蔵量作動性Ca²⁺チャネルへ直接連絡する、重要なアダプタータンパク質として働きうる(Putney, Jr. 2005. 前記；Putney, Jr. 1986, *Cell Calcium* 7:1)。

20

30

40

【0032】

NFAT制御因子

本明細書に用いられる場合、「NFAT制御因子(NFAT regulator)」という用語は、NFAT活性を制御するタンパク質(NFAT制御タンパク質(NFAT regulator protein))およびコード遺伝子(NFAT制御遺伝子(NFAT regulator gene))を指すように用いられる。本発明の方法は

50

、本明細書に記載されたNFAT制御因子の相同体、類似体、アイソフォーム(例えば、選択的スプライスバリアント)、誘導体、および機能性断片の使用を含むことを意図される。好ましくは、NFAT制御タンパク質の相同体は、本明細書に明確に同定されたものと少なくとも70%、より好ましくは80%、およびより好ましくは90%のアミノ酸同一性を有する。

【0033】

NFAT制御タンパク質

一つの好ましい態様において、本発明のNFAT制御タンパク質は、ORAI遺伝子によりコードされる。本発明の基礎となる発見以前には、ORAI遺伝子の機能は知られていなかった。ORAI1核酸配列はGenBankアクセション番号NM_032790に対応し、ORAI2核酸配列はGenBankアクセション番号BC069270に対応し、かつORAI3核酸配列はGenBankアクセション番号NM_152288に対応する。本明細書に用いられる場合、ORAIは、ORAI遺伝子、例えば、ORAI1、ORAI2、ORAI3のいずれか1つを指す。

【0034】

一つの態様において、本発明のNFAT制御タンパク質は、DYRK遺伝子によりコードされる。本発明の基礎となる発見以前には、DYRK遺伝子は、NFATの活性または機能を制御することは知られていなかった。DYRK1Aは、GenBankアクセション番号NM_001396、NM_101395、NM_130436、NM_130437、およびNM_130438を含む数個の核酸アイソフォームによりコードされる。DYRK1Bは、GenBankアクセション番号NM_004714、NM_006483、およびNM_006484を含む複数の核酸アイソフォームによりコードされる。DYRK2は、NM_003583およびNM_006482を含むGenBankアクセション番号によりコードされる。DYRK3は、NM_001004023およびNM_003582を含むGenBankアクセション番号によりコードされる。DYRK4は、GenBankアクセション番号NM_003845によりコードされる。HIPK3としても知られるDYRK6は、GenBankアクセション番号NM_005734によりコードされる。

【0035】

一つの態様において、本発明のNFAT制御タンパク質は、表Iに列挙された遺伝子によりコードされる。

【0036】

NFAT制御タンパク質へ言及する場合の「断片」または「誘導体」という用語は、少なくとも1つのアッセイにおいて、天然のNFAT制御タンパク質と本質的に同じ生物学的機能または活性を保持するタンパク質またはポリペプチドを意味する。例えば、本発明のNFAT制御因子断片または誘導体は、例えば、実施例1に記載されたカルシウム流入アッセイにより測定される場合、天然タンパク質の活性の少なくとも約50%、天然タンパク質の活性の好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも約95%を維持する。

【0037】

断片または誘導体は、その用語が本明細書に用いられる場合、特定のNFAT制御因子ドメイン活性に関して天然のNFAT制御因子の競合物質を含みうる。しかしながら、断片または誘導体は、本明細書に説明されているように、他の領域においてNFAT制御因子との全体的な類似性を示す。

【0038】

本明細書に用いられる場合、断片という用語は、NFAT制御タンパク質、または核酸配列の断片を示し、(コードされた)タンパク質は、完全長NFAT制御タンパク質の少なくとも1つの生物活性を保持する。断片および機能的断片という用語は本明細書で交換可能に用いられる。配列の断片は、対応する完全長配列より少ないヌクレオチドまたはアミノ酸を含み、存在する配列は、完全長配列に存在するのと同じ連続的順序である。したがって、断片は、断片により表される完全長配列の部分へのいかなるもの(例えば、核酸またはアミノ酸)の内部挿入または欠失も含まない。これは、誘導体と対照的であり、誘導体は、完全長配列に対応する核酸もしくはアミノ酸内に内部挿入もしくは欠失を含みうるか、または完全長コードと類似性をもちうる。

【0039】

誘導体は、完全長配列と同じもしくは異なる数の核酸またはアミノ酸を含みうる。NFAT

10

20

30

40

50

制御タンパク質に関して本明細書に用いられる場合の誘導体という用語は、1つもしくは複数の改変されたアミノ酸、例えば化学的に改変されたアミノ酸、またはアミノ酸配列への改変(置換、欠失、または挿入)を含む、NFAT制御タンパク質またはその断片を含む。そのような改変は、NFAT制御タンパク質の少なくとも1つの生物活性を実質的に保存すべきである。そのような生物活性は、当技術分野において公知のいくつかのアッセイ、例えば、後述の実施例1に記載されたカルシウム流入アッセイにより容易に測定される。非限定的な例として、誘導体は、当技術分野において周知であるように、NFAT制御タンパク質、その類似体、もしくはその機能性断片の1つもしくは複数のアミノ酸残基の側基を標準的に改変することにより、またはNFAT制御タンパク質、その類似体、もしくは断片を、もう一つの分子、例えば、抗体、酵素、受容体などに結合させることにより、調製されうる。従って、本明細書に用いられる場合の「誘導体」は、当技術分野において公知の手段により、残基上の側鎖として存在する官能基またはN末端基もしくはC末端基から調製されうる誘導体を網羅し、それらは本発明に含まれる。誘導体は、炭水化物残基またはリン酸残基などの化学的部分を有しうる。そのような誘導体化過程は、NFAT制御タンパク質の少なくとも1つの生物活性を保存すべきである。誘導体は、実験における利便性のために、特定のアッセイにおける利便性のために、検出を高めるために、または他の実験目的のために、作製されうる。誘導体は、ドミナントネガティブ、ドミナントポジティブ、および融合タンパク質を含む。

【0040】

抗体

一つの態様において、本発明は、本発明のNFAT制御タンパク質に対する抗体を提供する。本発明のペプチドの1つまたは複数の特定のドメインに結合する抗体を調製することができ、抗体をNFAT制御遺伝子またはタンパク質活性を調節するために用いることができる。

【0041】

さらに、NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体に対する抗体、好ましくはモノクローナルまたは単一特異性の抗体を哺乳動物細胞(ヒト細胞を含む)に投与することにより、免疫系関連遺伝子のNFAT誘導性転写を低減または排除することができ、それ故、投与は免疫系の機能亢進または不適当な活性を処置するのに役立つ。NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体、例えば、Oraiタンパク質に対する活性化抗体の投与は、NFATを活性化し、それにより、免疫応答関連遺伝子の転写を誘導することで、免疫系の機能低下を処置するのに役立ちうる。NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体、例えば、DYRKタンパク質に対する抗体の投与は、NFATを活性化し、それにより、免疫応答関連遺伝子の転写を誘導することで、免疫系の機能低下を処置するのに役立ちうる。

【0042】

本発明はまた、NFAT制御因子核酸分子の全部または一部によりコードされるタンパク質またはペプチドを結合する抗体、および変異体核酸分子の全部または一部によりコードされるタンパク質またはペプチドを結合する抗体に関する。例えば、記載されたポリペプチドもしくはタンパク質またはその断片もしくは誘導体に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体は本発明の範囲内である。

【0043】

本発明の抗体は、公知の方法を用いて産生されうる。マウス、ヤギ、ニワトリ、またはウサギなどの動物を、タンパク質またはペプチドの免疫原性形態(抗体応答を誘発する能力があるタンパク質またはペプチドの抗原性断片)で免疫することができる。タンパク質またはペプチドへ免疫原性を与えるための技術は、担体との結合、または当技術分野において周知の他の技術を含む。タンパク質またはペプチドは、アジュバントの存在下で投与されうる。免疫化の過程は、血漿または血清における抗体力値の検出によりモニタリングされうる。標準ELISAまたは他のイムノアッセイが、抗体のレベルを評価するために抗原としての免疫原と共に用いられる。免疫化後、抗ペプチド抗血清を得ることができ、必要に応じて、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。モノクローナル抗体

10

20

30

40

50

もまた、当技術分野において周知である標準技術により產生されうる(Kohler and Milstein, *Nature* 256:4595-497 (1975); Kozbar et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); およびCole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。そのような抗体は、無傷または破損した遺伝子についての診断法として、および無傷または破損した遺伝子のいずれかを同定するための探索ツールとしても、有用である。

【0044】

モノクロ抗体分泌性ハイブリドーマを調製することの代替として、NFAT制御タンパク質に対するモノクローナル抗体は、組換えコンビナトリアル免疫ライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)をスクリーニングし、それによりNFAT制御タンパク質に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することにより同定かつ単離されうる。ファージディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットは、例えば、Dyax Corp. (Cambridge, Mass.) およびMaxim Biotech(South San Francisco, Calif.)から市販されている。加えて、抗体ディスプレイライブラリーの作製およびスクリーニングに用いるのに特に適している方法および試薬の例が文献に見出されうる。

10

【0045】

ポリクローナル血清および抗体は、ウサギなどの適切な被験体をNFAT制御タンパク質(好ましくは、哺乳動物の; より好ましくはヒトの)またはその抗原性断片で免疫することにより產生されうる。免疫化被験体における抗体力価は、固定化マーカータンパク質を用いたELISAなどの標準技術により時間とともにモニタリングされうる。必要に応じて、NFAT制御タンパク質に対して方向づけられた抗体分子は、被験体または培地から単離され、プロテインAクロマトグラフィーなどの周知の技術によりさらに精製され、IgG画分を得ることができる。

20

【0046】

NFAT制御タンパク質に対する抗体の断片は、当技術分野において周知の方法に従って抗体の切断により生成されうる。例えば、免疫学的に活性のあるF(ab')およびF(ab')₂断片は、ペプシンなどの酵素で抗体を処理することにより作製されうる。さらに、ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む、NFAT制御タンパク質に対するキメラの、ヒト化した一本鎖抗体は、標準組換えDNA技術を用いて作製されうる。内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現する能力はないがヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて、NFAT制御タンパク質に対するヒト化抗体をまた產生することができる。

30

【0047】

NFAT関連疾患

本発明の方法はまた、NFAT制御不全/機能不全および/またはカルシウムシグナル伝達に関連した状態および疾患を処置するために、またはその状態および疾患の処置に有用な作用物質を同定するために利用されうる。そのような疾患には、非限定的に、免疫系の機能亢進または不適当な活性を含む免疫系疾患、例えば、急性免疫疾患、慢性免疫疾患、および自己免疫疾患が挙げられる。そのような疾患の例には、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患、同種または異種移植拒絶(器官、骨髄、幹細胞、他の細胞および組織)、移植片対宿主病、再生不良性貧血、乾癬、紅斑性狼瘡、炎症性疾患、MS、I型糖尿病、喘息、肺線維症、強皮症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、心膜切開後症候群、川崎病、橋本甲状腺炎、グレーブス病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、慢性糸球体腎炎、グッドパスチャーリー症候群、ウェグナー肉芽腫症、多発性硬化症、囊胞性線維症、慢性再発性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、ブドウ膜炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、クローン病、潰瘍性結腸炎、結腸炎/炎症性腸症候群、ギラン・バレー症候群、慢性炎症性脱髓性多発根ニューロパシー、湿疹、および自己免疫性甲状腺炎が含まれる。移植片拒絶は、組織または器官移植に起因しうる。移植片対宿主病は、骨髄または幹細胞移植に起因しうる。免疫系の機能亢進を含む免疫系疾患に

40

50

は、例えば、HIV疾患などの後天性免疫不全症、および分類不能型免疫不全症(CVID)を含む免疫不全疾患が挙げられる。

【0048】

本発明の方法はまた、免疫介在性ではないが、それでもなお、NFATのCa²⁺カルシニューリン媒介性活性化、例えば、カルシニューリンとNFATの間のタンパク質-タンパク質相互作用に関係する状態および疾患を処置する、またはその状態および疾患の処置に有用な作用物質を同定するために利用されうる。例には、心筋肥大、拡張型心筋症、過剰または病理的骨吸収、過剰脂肪細胞分化、肥満、および潜伏ヒトヘルペスウイルス-8または他のウイルスの再活性化が挙げられる。さらに、本発明の方法は、NFAT制御タンパク質の機能変化に起因する細胞性Ca²⁺シグナル伝達の機能不全に関係する状態を処置するか、またはその状態の処置に有用な作用物質を同定するために利用されてもよい。ここで、Ca²⁺シグナル伝達の機能不全は、少なくとも一部、Ca²⁺-カルシニューリン-NFAT経路に加えて他のCa²⁺依存性経路に対するその効果によって、疾患または障害を引き起こし、またはCa²⁺シグナル伝達の機能不全は、主としてそのような他の経路によって作用し、NFAT機能の変化は付属的である。

10

【0049】

重症複合型免疫不全症

一つのNFAT関連疾患/障害は、重症複合型免疫不全症(SCID)である。SCIDは、Tリンパ球およびBリンパ球の両方が損なわれたもしくは障害された発生ならびに/または機能により引き起こされる一群の先天性免疫障害である。100,000人の個体群あたり1人の推定有病率をもつまれな疾患であるSCIDは、20個より多い異なる遺伝子における突然変異により引き起こされうる。X連鎖SCIDをもたらす、インターロイキン2(IL-2)、IL-4、IL-7、IL-9、およびIL-15受容体のコモン鎖(c)における突然変異が、全症例の50%を占める。全SCID症例の約10%は、T細胞およびB細胞の発生または機能、特にシグナル伝達(CD3 およびZAP-70、p56^{lck}、CD45、JAK3、IL-7R 鎖)、にとって重要な遺伝子における様々なまれな突然変異による。これらの突然変異が低発生率であり小さなファミリーサイズであるため、古典的な位置クローニングは、通常、これらのSCID疾患の大部分に対して不可能であり、突然変異は、しばしば、T細胞の機能分析、続いて候補遺伝子の配列決定により、公知のシグナル伝達遺伝子に見出された。科学的には、SCID疾患は、T細胞およびB細胞の機能解明において極めて価値があり、免疫系における遺伝子機能不全の帰結を浮き彫りにしている。

20

【0050】

一つの態様において、本発明は、本発明のNFAT制御因子を含む被験体由来の遺伝子に対応するヌクレオチド配列と、その遺伝子の野生型配列との比較を含み、ここで、遺伝子のヌクレオチド配列の野生型配列からの変化は、遺伝子における変化が免疫不全の原因であることを示す、被験体において未解明の免疫不全を診断するための方法に関する。一つの態様において、遺伝子における変化は、スプライス部位における突然変異である。一つの態様において、遺伝子における変化は、非同義突然変異である。一つの態様において、未解明の免疫不全は、NFAT活性の制御の欠陥と関連している。

30

【0051】

一つの態様において、比較は、被験体由来の生物学的試料を得る段階、生物学的試料中のDNAを配列決定する段階、および生物学的試料から得られたDNA配列を野生型配列と電子的に整列させる段階によって達成される。

40

【0052】

一つの態様において、比較は、DNA試料を得る段階、DNAがハイブリダイゼーションに利用できるようにDNA試料を処理する段階、DNA試料における相補的ヌクレオチド配列とのプローブとのハイブリダイゼーションに適切な条件下で、本発明のNFAT制御因子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列とDNAとを組み合わせて、それにより組み合わせを生成する段階；および組み合わせにおけるハイブリダイゼーションを検出し、ここで、組み合わせにおけるハイブリダイゼーションの非存在が、遺伝子におけるヌクレオチド配列

50

の変化を示す段階によって達成される。

【0053】

NFAT制御因子の機能を調節する作用物質についてスクリーニングするための方法

一つの態様において、本発明は、NFAT制御因子発現または機能を変化させる作用物質についてスクリーニングするための方法に関する。一つの態様において、本発明は、NFAT制御タンパク質の機能を変化させる作用物質についてスクリーニングするための方法に関する。CRACチャネル活性化の調節に関して、NFAT制御因子の機能が変化しうる。NFATリン酸化の調節に関して、NFAT制御因子の機能が変化しうる。NFAT細胞内局在性の調節に関して、NFAT制御因子の機能が変化しうる。遊離細胞内カルシウムレベルの調節に関して、NFAT制御因子の機能が変化しうる。カルシニューリン活性の調節に関して、NFAT制御因子の機能が変化しうる。一つの態様において、変化させる、または調節するとは、活性の上方制御または増強を指す。一つの態様において、変化させる、または調節するとは、下方制御または阻害を指す。

【0054】

本明細書に用いられる場合、「NFAT制御遺伝子」という用語は、SOCEによる、NFATの直接的なリン酸化による、または実施例2に記載されているような他の手段によることを含む、NFAT活性を制御する本発明の方法により同定された遺伝子を指すように用いられる。本発明のNFAT制御遺伝子は以下を含む：ORA11、ORA12、ORA13、ならびに、DYRK1A、DYRK1B、DYRK2、DYRK3、DYRK4、およびDYRK6を含むDYRK遺伝子、ならびに実施例3の表Iに開示された遺伝子。一つの好ましい態様において、本発明のNFAT制御遺伝子は、ORA1、例えばORA11、ORA12、およびORA13である。NFAT制御遺伝子および/またはそれらのコードタンパク質産物は、直接的かまたは間接的かのいずれかで、NFATの活性を調節する。

【0055】

本明細書に用いられる場合、「調節する」という用語は、遺伝子産物を含む作用物質が、第二の遺伝子産物を含む別の作用物質に対して有する効果を指す。一つの態様において、別の作用物質を調節する作用物質は、第二の作用物質の活性を上方制御する、または増加させる。一つの態様において、別の作用物質を調節する作用物質は、第二の作用物質の活性を下方制御する、または減少させる。

【0056】

本明細書に記載されるRNAiスクリーニングによって検出されるNFAT制御因子の一つの例は、カルシニューリンである。NFATシグナル伝達におけるカルシニューリンの役割は、以前に知られていた。具体的には、カルシニューリンはNFATを脱リン酸化して、活性化し、それゆえに、正の制御因子である。

【0057】

カルシニューリンは、制御因子の発現の変化とNFATシグナル伝達の変化の間の関係を明らかにする役割を果たす。カルシニューリンの過剰発現は、標準アッセイにおいてNFATの活性化の増加をもたらす；逆に、後述の実施例1に詳述されたRNAiスクリーニングにおけるような、カルシニューリンの発現の減少は、NFAT活性化の減少をもたらす。カルシニューリンはまた、作用物質による制御因子の活性の変化が、NFATシグナル伝達の変化に反映されることを明らかにしている。従って、シクロスボリンAおよびFK506は、それらの細胞質結合タンパク質(それぞれ、シクロフィリンAおよびFKBP12)と複合体を形成する場合、カルシニューリンインヒビターであり、これらの化合物のカルシニューリンへの阻害作用は、例えば、タブシガルジンで刺激された細胞において、またはT細胞受容体を通して生理的に刺激されたT細胞において、シクロスボリンAおよびFK506のNFAT局在に対する効果を調べることにより、検出されうる。

【0058】

NFAT制御因子に影響を及ぼす作用物質についてのアッセイは、NFATを直接含む必要はない。従って、カルシニューリンの活性を変化させるいくつかの作用物質、例えば、PV1V1Tペプチドおよびその誘導体、CsA-シクロフィリンA複合体、およびFK506-FKBP12複合体が、それらのカルシニューリンへの結合を調べることによりアッセイされうる；およびカル

10

20

30

40

50

シニューリン自己阻害性ペプチドが、NFAT以外の基質の脱リン酸化に対するその効果を調べることによりアッセイされうる。

【0059】

NFATの正の制御因子は、 Ca^{2+} -カルシニューリン-NFATシグナル伝達経路の他の段階で作用することが知られている。例えば、Orai1およびSTIM1は、細胞質 $[Ca^{2+}]$ の上昇に寄与し、それによりカルシニューリンの活性化、およびその後、NFATの活性化を誘発する。ここで再び、Orai1またはSTIM1の発現を減少させる作用物質(例えば、Orai1およびSTIM1の両方について本明細書で示されているように；およびRoos et al (2005) J Cell Biol 169, 435-445; Liou et al (2005) Current Biology 15, 1235-1241にdStimおよびSTIM1について示されているように、RNAi試薬)が、NFAT活性化(例えば、NFAT脱リン酸化または細胞内局在)に対する、または問題のNFAT制御因子の機能を診断する他のパラメーター(例えば、細胞質 Ca^{2+} レベル)に対するいずれかのそれらの効果により認識されうる。

【0060】

1つまたは複数のNFAT制御タンパク質に影響を及ぼすことにより Ca^{2+} -カルシニューリン-NFATシグナル伝達経路の機能を阻害する作用物質、例えば、CRACチャネルを通して Ca^{2+} 流入を阻害する作用物質(例えば、 La^{3+} 、 Gd^{3+} 、2-APB)が、同様に、容易に検出される。現在、知られている阻害性作用物質は、しかしながら、完全に選択的というわけではなく、このことは、この経路のNFAT制御タンパク質をより選択的に標的とする作用物質を発見するための価値のあるツールを、本明細書に記載のアッセイが制定する理由である。

【0061】

本発明は、 Ca^{2+} -カルシニューリン-NFATシグナル伝達の負の制御因子を含む。これらには、例えば、DYRKファミリーキナーゼ、カゼインキナーゼ-1アイソフォーム、およびグリコーゲンシンターゼキナーゼ(GSK-3)が挙げられる。これらの負の制御因子の発現の阻害、例えばRNAi処理による阻害、またはそれらの活性の阻害、例えば各場合において酵素活性を阻害する作用物質(例えば、カゼインキナーゼインヒビターCKI-7; GSK-3インヒビターとしての Li^+)での処理による阻害は、NFAT活性化の局面をモニタリングするアッセイを用いて検出されうる。

【0062】

本発明は、NFAT制御タンパク質もしくはNFATに結合する、例えば、NFAT制御遺伝子発現もしくはタンパク質活性に対して、NFAT遺伝子発現もしくはタンパク質活性に対して阻害(または刺激)効果を生じる、または例えば、NFAT制御因子相互作用性タンパク質(例えば、NFAT制御因子基質)もしくはNFAT相互作用性タンパク質(例えば、NFAT基質)の発現もしくは活性に対して刺激もしくは阻害効果を生じる調節因子、すなわち、候補化合物または作用物質(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、ペプトイド、オリゴヌクレオチド(siRNAまたはアンチセンスRNA)、非核酸有機小分子、無機小分子、または他の薬物)を同定するためのスクリーニング方法(本明細書では「アッセイ」とも呼ばれる)に関する。そのような相互作用タンパク質には、 Ca^{2+} およびカルシウムチャネルの他のサブユニット、1つまたは複数のOraiタンパク質と相互作用するタンパク質、例えば、追加のCRACチャネルサブユニットまたはCRACチャネル調節タンパク質を挙げることができる。このように同定された化合物は、治療プロトコールにおいて直接的もしくは間接的かのいずれかで標的遺伝子産物(例えば、NFAT制御因子ポリペプチド、NFATポリペプチド)の活性を調節するために、標的遺伝子産物の生物学的機能を作製する(elaborate)ために、または標的遺伝子もしくは遺伝子産物の正常な相互作用を乱す化合物を同定するために、用いられる。NFAT制御遺伝子もしくはコードされた産物の遮断剤またはインヒビターの同定は、本発明のスクリーニング方法および当技術分野における公知の他の方法を用いて行われうる。

【0063】

NFAT制御因子の発現または活性に影響を及ぼす化合物は、本明細書に記載されているように、または当技術分野における公知の他の方法を用いて、同定されうる。調節化合物は、カルシウムチャネル調節因子としてのいずれの型の活性をも有するとはこれまでに同定

10

20

30

40

50

されていない新規な化合物、またはカルシウムチャネルを調節することは以前に知られていたが、カルシウム流入を調節するために有効であることがこれまで知られていなかった濃度において用いられる化合物でありうる。調節因子はまた、CRACチャネル構成要素以外のNFAT制御因子についての調節化合物でありうる。

【0064】

本明細書中、および本明細書を通して用いられる、「作用物質」または「化合物」という用語は、アンチセンス核酸、siRNAもしくはshRNAなどのRNAiなどの修飾および非修飾核酸、ペプチド、ペプチド模倣体、受容体、リガンド、ならびに抗体を含む任意の有機または無機分子を意味する。

【0065】

NFAT制御因子の活性または発現を阻害する化合物は、NFAT制御因子を発現する細胞に関する障害の処置に有用である。特に関連のある障害は、本明細書でさらに記載されているように、免疫系の機能亢進もしくは不適当な活性、または免疫系の機能低下に関するものである。

【0066】

これらの障害によって冒された細胞または組織は、例えば、NFAT調節因子の発現または活性を調節する作用物質が、罹患細胞の増殖を低下させうるかどうか、異常なSOCE機能を緩和しうるかどうか、または異常なNFAT活性を緩和しうるかどうかを試験するためのスクリーニング方法に用いられる。本発明のスクリーニング方法に有用な他の細胞は、昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ細胞(例えば、シュナイダー(Schneider)2またはS2細胞)、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、神経細胞または神経系細胞、例えば、SHSY5Y神経芽腫細胞およびPC12細胞、ラット好塩基球性白血病(RBL)細胞、および免疫系細胞、例えば、ヒトまたはマウスなどの哺乳動物由来の一次T細胞、ジャーカット細胞を含むTリンパ球などのリンパ球を含む、貯蔵量作動性カルシウム流入を示す細胞である。下記のノックアウトまたはトランスジェニック動物由来の細胞は有用でありうる。T細胞および線維芽細胞を含む、免疫不全の患者、例えば、実施例1に記載された患者に由来する細胞は本発明の方法に有用でありうる。

【0067】

本明細書に用いられる場合、「組換え細胞」という用語は、細胞のクローン性増殖に組み込まれたままとなるように安定に組み込まれるか、または細胞(または細胞集団)へ一過性に導入されるかのいずれかの状態に組み込まれた外因性および/または異種性核酸を有する細胞を指すように用いられる。核酸は、例えば、NFAT制御遺伝子もしくはそのmRNA、もしくはその相補(アンチセンス)鎖、またはshRNAもしくはsiRNA、または前述の任意の断片もしくは誘導体を含みうる。核酸は、NFAT制御タンパク質、その断片または誘導体のゲノムDNAを含みうる。核酸は、対応するコードおよび非コードmRNA、または対応するmRNAの発現を制御するために用いられるその相補(アンチコード)鎖、例えば、shRNAもしくはsiRNAの対応する短いヌクレオチドを含みうる。核酸は、結果として、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはそのmRNAもしくはアンチセンスの発現の変化(例えば、過剰発現または過小発現)を生じうる。それはまた、結果として、そうでなければレシピエント細胞には発現しない、NFAT制御タンパク質の機能性断片または誘導体の発現を生じうる。

【0068】

試験化合物

本発明の試験化合物は、以下を含む、当技術分野において公知のコンピナトリアルライブラリー方法における多数のアプローチのいずれかを用いて得られる：生物学的ライブラリー；ペプトイドライブラリー(ペプチドの機能性を有するが、酵素分解に対して抵抗性である新規な非ペプチド骨格を有し、それにもかかわらず生理活性が残存する、分子のライブラリー；例えば、Zuckermann, et al., 1994 J. Med. Chem. 37:2678-85参照)；空間的にアドレス可能なパラレル固相または液相ライブラリー；逆重畠積分を必要とする合成ライブラリー方法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー方法；およびアフィニティーコロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー方法。生物学的ライブラリーおよびペプト

10

20

30

40

50

イドライプラリーアプローチは、ペプチドライプラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子の化合物のライプラリーに適用できる(Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

【0069】

分子ライプラリーの合成のための方法の例は、当技術分野において、例えば、以下に見出されうる: DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; およびGallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233。 10

【0070】

化合物のライプラリーは、溶液中に(例えば、Houghten, 1992, *Biotechniques* 13:412-421)、またはビーズ(Lam (1991) *Nature* 354:82-84)、チップ(Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556)、細菌(Ladner, 米国特許第5,223,409号)、胞子(Ladner, 米国特許第5,223,409号)、プラスミド(Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869)上に、またはファージ(Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310); およびLadner, 前記)上に提示されうる。

【0071】

本明細書に記載の方法によりスクリーニングされうる化合物には、限定されるわけではないが、天然源および/または合成源由来の任意の小分子化合物ライプラリー、非核酸有機小分子、無機小分子、ペプチド、ペプトイド、ペプチド模倣体、オリゴヌクレオチド(例えば、siRNA、アンチセンスRNA、SELEXを用いて同定されるものなどのアプタマー)、ならびに合成成分を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。 20

【0072】

試験化合物は、例えば、細胞を維持する培地へ化合物を希釈すること、試験化合物を試験動物の食物または液体と混合すること(下記参照)、薬学的に許容される担体中の化合物を試験動物へ局所投与すること、徐放性ビーズなどの、試験化合物に浸漬した三次元基質を用いて、そのような基質を試験動物へ埋め込むこと、化合物を頭蓋内に投与すること、化合物を非経口で投与することにより、投与されうる。 30

【0073】

様々な他の試薬もまた、混合物に含まれうる。これらには、最適なタンパク質-タンパク質結合および/もしくはタンパク質-核酸結合を促進する、ならびに/または非特異的相互作用もしくはバックグラウンド相互作用を低下させるなどのために用いられる、塩、緩衝液、中性タンパク質、例えば、アルブミン、界面活性剤などの試薬が挙げられる。また、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤などの、アッセイの効率を別な方法で向上させる試薬が用いられる。

【0074】

「薬学的に許容される担体」という専門用語は、化合物と同時投与することができ、かつ活性成分が神経系の疾患を予防する、改善する、阻止する、または排除することを可能にする物質を含むことが意図される。そのような担体の例には、溶媒、分散媒、アジュvant、遅延剤などが挙げられる。薬学的活性物質のためのそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。化合物と適合性のある任意の通常の媒体および作用物質が本発明内で用いられる。 40

【0075】

化合物は、選択された投与経路に従って製剤化されうる。ゼラチン、香味剤、またはコーティング材の添加は、経口投与に用いられる。溶液または乳濁液について、一般的に、担体は、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水性もしくはアルコール性/水性溶液、乳濁液、または懸濁液を含みうる。非経口媒体は、とりわけ、塩化ナトリウム、塩化カリウムを含みうる。加えて、静脈内媒体は、とりわけ、流体および栄養補充液、電解質補充液 50

を含みうる。

【0076】

保存剤および他の添加剤もまた存在しうる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスが添加されうる(一般的には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, Mack, 1980参照)。

【0077】

NFAT活性を調節する作用物質についての試験アッセイ

本発明のもう一つの局面は、実施例1~3に記載されているように、遊離細胞内 Ca^{2+} レベル、カルシニューリン活性化、および細胞におけるNFAT局在性の制御因子についてスクリーニングするための方法に関する。一つの態様において、全NFAT制御ドメインまたはその機能性断片もしくは誘導体、および機能的に連結したレポータータンパク質(制御ドメインの細胞内局在を測定するための、例えば、GFPまたは抗原性エピトープ)を含む融合タンパク質をコードする組換えベクターが、細胞、すなわち、試験細胞へトランスフェクションされる。ベクターをトランスフェクションした試験細胞を、試験作用物質と接触させる。何時間か後、例えば、48~72時間後、試験細胞に、NFAT-レポーター融合タンパク質の細胞内局在についてスコアを付ける。スコア付けは、実施例におけるように自動顕微鏡法、例えば、蛍光顕微鏡法、共焦点顕微鏡法を手段として、または手作業の顕微鏡法を手段として、達成されうる。二次試験アッセイは、カルシウム流入検出アッセイを含む。試験作用物質が組換えベクターの発現産物の細胞内局在性に対する効果を有する場合には、これは、その試験作用物質がNFAT制御因子の機能を調節することを示している。

【0078】

一つの態様において、細胞はまた、外因性(例えば、異種性または相同性)のNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を発現し、および/またはNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体の発現の変化を示し、これは、本明細書に記載されたツール/方法で達成される。

【0079】

一つの態様において、試験細胞は、NFATが細胞質に通常局在している休止細胞である。休止試験細胞におけるNFAT-レポーター融合タンパク質の核局在、または未処理の対照細胞で観察されるものを超える部分的核局在は、試験作用物質がNFAT活性を首尾よく活性化したこと示す。

【0080】

一つの態様において、試験細胞は刺激細胞であり、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵が枯渇し、貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入が活性化され、NFATが核に局在する。 Ca^{2+} 貯蔵の枯渇は、例えば、試験細胞をタブシガルジンまたはイオノマイシンと接触させることによって、達成されうる。試験細胞は、試験細胞を試験作用物質と接触させる段階の前に、段階と同時に、または段階の後に、刺激されうる。刺激試験細胞におけるNFAT-レポーター融合タンパク質の細胞質局在、または対照細胞で観察されるものと比較した核局在の低下は、試験作用物質がNFAT活性を首尾よく阻害したこと示す。

【0081】

NFAT制御ドメインをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結する、レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子については、細胞におけるレポーター遺伝子の局在が融合タンパク質との関連において直接的かまたは間接的かのいずれかで評価されうるならば、一般的に用いる任意のレポーター遺伝子で十分である。例えば、レポーターは、局在が標識抗体で染色することにより検出されうる任意のタンパク質、または赤血球凝集素もしくはmycエピトープなどのタンパク質エピトープ、または緑色蛍光タンパク質(GFP)もしくはその変種の1つでありうる。一つの好ましい態様において、レポータータンパク質はGFPである。融合タンパク質におけるNFATタンパク質は完全長であってもよく、または制御ドメイン、特に、カルシニューリンおよびCK1のドッキング部位、ならびに保存されたセリンリッチ領域(SRR)およびセリン-プロリン(SP)リピートモチーフを含んでもよい。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明のもう一つの局面は、カルシウムシグナル伝達に関連した疾患または障害を処置または予防するための作用物質を同定するための方法に関する。一つの態様において、方法は、疾患もしくは障害を示す、または疾患もしくは障害に関連した少なくとも1つの表現型を示す生物体に対する試験作用物質の効果を評価する段階を含む。少なくとも1つのNFAT制御タンパク質、その断片もしくは誘導体の活性、相互作用、発現、または結合を試験作用物質が調節する場合には、その試験作用物質は、疾患または障害を処置または予防するための作用物質であると同定される。一つの態様において、NFAT制御タンパク質、その断片または誘導体は、生物体の細胞において内因的かまたは外因的かのいずれかで発現する。試験作用物質の投与および効果の評価の適切な方法は、当業者により決定されうる。

10

【0083】

カルシウムレベルを調節する作用物質についての試験アッセイ

本明細書に提供されたスクリーニング/同定方法のいずれかにおいて試験作用物質の細胞内カルシウムに対する効果をモニタリングする段階において、細胞カルシウム(サイトゾルおよび細胞内のオルガネラまたは区画を含む)および/または細胞、オルガネラ、もしくはそれらの部分(例えば、膜)の内側もしくは外側へのイオンの移動の、直接的または間接的な評価または測定が行われうる。カルシウムレベルおよびイオン移動または流束を評価するための様々な方法は、本明細書に記載されており、および/または当技術分野において公知である。使用される特定の方法および用いられる条件は、細胞内カルシウムの特定の局面をモニタリングするかどうかに依存しうる。例えば、本明細書に記載されているように、試薬および条件は、貯蔵量作動性カルシウム流入、休止サイトゾルカルシウムレベル、ならびに細胞内オルガネラのカルシウムレベルおよび細胞内オルガネラによるカルシウム取り込みまたは細胞内オルガネラからのカルシウム放出を特異的に評価するために用いることができ、公知である。細胞内カルシウムに対する試験作用物質の効果は、例えば、細胞、細胞内オルガネラもしくは貯蔵区画、膜(例えば、剥離した膜パッチまたは脂質二重層を含む)、または無細胞アッセイシステムを用いてモニタリングされうる。

20

【0084】

一般的に、細胞内カルシウムに対する試験作用物質の効果をモニタリングする段階は、(1)細胞内カルシウムを調節することに関与するタンパク質(および/またはタンパク質をコードする核酸もしくはその部分)(特に、本明細書に提供されたタンパク質)、および/または(2)細胞内カルシウムを調節することに関与するタンパク質(および/またはタンパク質をコードする核酸もしくはその部分)を含んでも含まなくてもよい細胞もしくはその部分(例えば、膜または細胞内構造もしくはオルガネラ)に、試験作用物質を接触させる事、または試験作用物質を曝露する事を含む。細胞は、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入などの細胞内 Ca^{2+} 調節の1つまたは複数の局面を示すものであります。試験作用物質の接触前、接触中、および/または接触後、細胞内カルシウムの直接的または間接的評価が行われうる。間接的評価は、例えば、イオン輸送タンパク質(例えば、貯蔵量作動性チャネルまたは Ca^{2+} 制御性イオンチャネル)を通しての電流、またはカルシウム感受性プロモーターに機能的に連結したレポータータンパク質の転写の評価または測定であります。直接的評価は、例えば、細胞内(サイトゾルおよび細胞内オルガネラを含む)カルシウムの評価または測定であります。

30

【0085】

細胞内カルシウムの評価は、細胞内カルシウムに対する作用物質の効果を測定することができるような方法で行われる。典型的には、これは、試験作用物質の存在下における細胞内カルシウムの、細胞内カルシウム対照との比較を含む。例えば、一つの対照は、試験作用物質の存在下と非存在下における、または様々な量の試験作用物質の存在下における、細胞内カルシウムの比較である。従って、細胞内カルシウムに対する効果をモニタリングするための一つの方法は、細胞内カルシウムを調節するタンパク質を含む試験細胞に試験作用物質を接触させる前と後の細胞内カルシウムを比較する段階、または試験作用物質に接触した試験細胞における細胞内カルシウムと試験作用物質に接触していない試験細胞

40

50

(すなわち、対照細胞)における細胞内カルシウムとを比較する段階を含む。一般的に、対照細胞は、それが試験作用物質の非存在下にある細胞であることを除いて、対照細胞と、同じではないにしても、実質的に同一である。試験作用物質の存在下と非存在下における試験細胞の細胞内カルシウムの差は、作用物質が細胞内カルシウムを調節するものであることを示す。

【0086】

細胞内カルシウムに対する効果をモニタリングするためのもう一つの方法は、試験細胞と、試験細胞と実質的に類似する対照細胞とで細胞内カルシウムを比較する段階(例えば、本明細書に提供されたタンパク質などの細胞内カルシウムシグナル伝達に関与するタンパク質(および/またはタンパク質をコードする核酸)を含む細胞と、細胞内カルシウムシグナル伝達を調節することに関与するその特定のタンパク質を含まない、またはより低いレベルを含む細胞を比較する段階)を含む。従って、例えば、細胞内カルシウム調節に関与するタンパク質を含む試験細胞が、タンパク質をコードする核酸を宿主細胞に移入することにより作製された組換え細胞である場合には、一つの可能な対照細胞は、そのタンパク質をコードする核酸をトランスフェクションされていない、ベクターのみをトランスフェクションされた宿主細胞である。そのような細胞は、試験細胞と実質的に類似しているが、タンパク質をコードする導入される核酸の非存在によってのみ本質的に試験細胞と異なる。従って、対照細胞は、細胞内カルシウムを調節することに関与する特定のタンパク質を、例えば、内因的に含みうるが、その場合、試験細胞は、その特定のタンパク質のより高いレベルを含む(または過剰発現する)。

10

20

【0087】

特定のタンパク質の内因性発現または機能性レベルを実験的に低下させる(例えば、タンパク質発現または機能の阻害により)こともまた、その特定のタンパク質を標的とすることにより細胞内カルシウムを調節する作用物質を同定するのに有用でありうる。核酸レベルで発現を標的とする、例えば、siRNAまたはshRNA処理によるなどの公知の実験方法により、NFAT制御タンパク質の発現を細胞において低下させることができ、それにより、機能性タンパク質の発現を低下させる。NFAT制御因子の発現を低下させた、または完全に阻害した細胞は、本発明に含まれる。そのようなシステムはさらに、1つもしくは複数の哺乳動物NFAT制御タンパク質、またはその部分をコードする外因性(例えば、相同性または異種性)核酸分子を発現可能な形で含みうる。

30

【0088】

特定のタンパク質の内因性発現/機能性レベルが細胞において低下している、上記の対照比較の型は、特定のタンパク質(および/または特定のタンパク質をコードする核酸もしくはその部分)に対する効果または特定のタンパク質の調節を介して細胞内カルシウムを特異的に調節する作用物質を同定しようと試みる場合、特に有用である。従って、例えば、作用物質の存在下、試験(非変更)細胞と、対照(低下した内因性発現/機能)細胞とで細胞内カルシウムの検出可能なまたは実質的な差がない場合には、作用物質はその特定のタンパク質(またはタンパク質をコードする核酸)を介した細胞内カルシウムに対するその効果を媒介しない可能性が高い。試験作用物質の存在下、試験細胞と対照細胞とにおける細胞内カルシウムの検出可能なまたは実質的な差は、試験作用物質が、特定のタンパク質に対する効果により、または特定のタンパク質の調節を介して、細胞内カルシウムを特異的に調節する候補作用物質でありうることを示す。候補作用物質は、試験作用物質の存在下および非存在下で試験細胞における細胞内カルシウムを比較するための、または試験作用物質の存在下および非存在下で対照細胞における細胞内カルシウムを比較するための、さらなる対照アッセイに供してもよく、これは、候補作用物質が細胞内カルシウムを調節する作用物質であるかどうかの決定を助けることになりうる。

40

【0089】

細胞内カルシウムに対する試験化合物の効果をモニタリングするために行われる細胞内カルシウムの評価は、様々な条件下でなされうる。条件は、細胞内カルシウムの特定の局面に対する試験化合物の効果を評価するために選択されうる。例えば、本明細書に記載さ

50

れているように、試薬および条件は、貯蔵量作動性カルシウム流入、休止サイトゾルカルシウムレベル、ならびに細胞内オルガネラのカルシウムレベルおよび細胞内オルガネラによるカルシウム取り込みまたは細胞内オルガネラからのカルシウム放出を特異的に評価するため用いることができ、公知である。例えば、本明細書に記載されているように、小胞体のカルシウムレベルおよび/または小胞体からのカルシウム放出は、mag-fura 2、小胞体標的エクオリンまたはカメレオン(cameleon)を用いて直接的に評価されうる。カルシウムレベルまたは放出の間接的評価のための一つの方法は、細胞外カルシウムの非存在下においてオルガネラからのカルシウム放出をもたらす作用物質(能動的には、例えば、IP₃、または受動的には、例えば、タブシガルジン)に細胞を曝露した後、細胞内細胞質カルシウムレベルをモニタリングする(例えば、蛍光に基づいた方法を用いて)ことである。細胞内の陽イオンもしくは二価陽イオンの濃度、または細胞へのイオン流入の濃度に対する試験作用物質/化合物の効果の評価もまた、試験作用物質を、細胞内カルシウムを調節する作用物質であると同定するために用いられうる。
10

【0090】

休止サイトゾルカルシウムレベル、細胞内オルガネラカルシウムレベル、および陽イオン移動は、本明細書に記載された、または当技術分野において公知の方法のいずれかを用いて評価されうる(例えば、fluo-3、mag-fura 2、ER標的エクオリン、標識カルシウム(⁴⁵Ca²⁺など)に基づいた測定、および電気生理学的測定の本明細書における記載参照)。評価されうるイオン流束の特定の局面には、限定されるわけではないが、イオン流束の量の減少(排出を含む)または増加、イオン電流の生物物理学的性質の変化、および、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入などの、カルシウム流束過程のアクチベーターまたはインヒビターに対する流束の感受性の変化が挙げられる。受容体媒介性カルシウム移動および二次メッセンジャー作動性カルシウム移動を特異的に評価するのに用いる試薬および条件もまた利用できる。
20

【0091】

細胞内カルシウムを調節する作用物質についてスクリーニングするための、または作用物質を同定するための特定の態様において、方法は、貯蔵量作動性カルシウム流入が起こるのを可能にする条件下で行われる。そのような条件は本明細書に記載されており、当技術分野において公知である。試験作用物質を、これらの適切な条件下で、細胞内カルシウムを調節するタンパク質および/もしくはタンパク質をコードする核酸(本明細書に提供されたタンパク質および核酸など)、ならびに/またはそのようなタンパク質(または核酸)を含む細胞(またはその部分)と接触させうる。例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入を評価するために選択された条件下で細胞内カルシウムを調節する作用物質についてスクリーニングするための一つの方法を行う際、試験細胞の細胞内カルシウムレベルは、蛍光カルシウム指示薬(例えば、FLUO-4)を用いて時間とともにモニタリングされる。細胞への貯蔵量作動性カルシウム流入は、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入が起こる条件に応答した、蛍光の増加、蛍光の減少、または2つの異なる波長の光を用いた励起により誘発される蛍光強度の比における変化として用いられる特異的指示薬に依存して検出される。特定のカルシウム指示薬について蛍光シグナルを誘発するための、および遊離カルシウム濃度における変化に対するそれの関係を解釈するための方法は、当技術分野において周知である。条件は、貯蔵枯渇作用物質、例えば、タブシガルジン(ERカルシウムポンプを阻害し、漏出を通してカルシウム貯蔵を放出させる)の、Ca²⁺を含まない緩衝液でインキュベートされた細胞の培地への添加、約5~15分間のタブシガルジンとのインキュベーション、培地への試験化合物(または媒体対照)の添加、および約5~15分間の試験作用物質と細胞とのインキュベーション、続いて、最終濃度約1.8mMの外液カルシウムの培地への添加を含む。外液カルシウムの非存在下において細胞へタブシガルジンを加えることにより、カルシウム貯蔵からのカルシウム放出による細胞内カルシウムレベルの一過性の増加、および外部媒体から細胞へのカルシウム流入(すなわち、カルシウムが培地へ加えられた場合に検出される原形質膜を通しての貯蔵量作動性カルシウム流入)による細胞内カルシウムレベルのより多い持続性増加を描くことが可能である。蛍光に基づいたアッセイは
30
40
50

、タブシガルジンの添加前からカルシウムの培地への添加後しばらくするまでの全期間中、細胞内カルシウムレベルの本質的に連続的なモニタリングを可能にするため、貯蔵量作動性カルシウム流入に起因する「ピーク」または最大カルシウムレベルが試験作用物質の存在下および非存在下において評価されうるだけでなく、カルシウム流入過程のいくつかの他のパラメーターもまた、本明細書に記載されているように、評価されうる。例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入の動力学は、ピーク細胞内カルシウムレベルに達するのに必要とされる時間の評価、カルシウムレベルの増加に関連した上り勾配および速度定数、ならびに貯蔵量作動性カルシウム流入が停止する時、カルシウムレベルの減少に関連した減衰勾配および速度定数により評価されうる。これらのパラメーターのいずれかは、評価され、かつ試験作用物質の存在下と非存在下において、作用物質が貯蔵量作動性カルシウム流入に対して、およびそれ故、細胞内カルシウムに対して効果を有するかどうかを決定するために比較されうる。他の態様において、貯蔵量作動性カルシウム流入は、例えば、貯蔵量作動性カルシウム流入電流の特徴を示す(例えば、細胞内貯蔵のカルシウムレベルの低下に対する応答性)膜を横断する、または細胞への電流を評価すること、またはカルシウム感受性プロモーターエレメントを含むレポーター構築物の転写を評価することにより、評価されうる。特定の態様において、試験作用物質は、統計学的に有意な差を生じるものであると同定される。例えば、対照(例えば、化合物の非存在、すなわち、媒体のみ)と比較して、貯蔵量作動性カルシウム流入の任意の局面またはパラメーターにおける少なくとも30%の差。10

【0092】

一般的に、試験作用物質は、試験作用物質の存在下におけるレベルまたは流束の検出可能な差などの、細胞内カルシウムレベルおよび/またはイオン移動もしくは流束に対する作用物質の検出可能な効果がある場合には、細胞内カルシウムを調節する作用物質または候補作用物質であると同定される。特定の態様において、効果または差は、実質的でありますか、または統計学的に有意であります。

【0093】

NFAT制御因子活性を調節する作用物質の試験アッセイ

一つの態様において、アッセイは、NFAT制御タンパク質またはその生物活性部分を発現する細胞を試験化合物と接触させ、NFAT制御因子活性を調節する試験化合物の能力を測定する、細胞に基づいたアッセイである。NFAT制御因子活性を調節する試験化合物の能力を測定する段階は、例えば、細胞におけるカルシウム流束の変化をモニタリングすることにより、またはIL-2発現の活性化などのカルシウム流束を調節する下流効果を試験することにより、達成されうる。そのような下流効果を試験する方法は、当技術分野において公知であり、細胞増殖および細胞成長の調節を含む。例えば、細胞におけるNFAT制御因子分子の数を減少させる、またはNFAT制御因子チャネルの機能に影響を及ぼす化合物は、細胞増殖を減少させうる。または、NFATトランス活性化を必要とする遺伝子の転写がモニタリングされうる。30

【0094】

米国特許出願公開第20040002117号は、NFATの公知の遺伝子標的を開示し、NFATの活性により転写されるさらなる遺伝子を同定するための方法を教示している。NFAT標的遺伝子の転写またはタンパク質発現の検出は、本発明の方法に有用であります。試験作用物質の存在下におけるNFAT標的遺伝子の発現の誘導の消失は、試験作用物質が、NFATの正の制御因子であるNFAT制御因子の活性を阻害するのに効果的であることを示す。逆に、試験作用物質の存在下における、他の点では刺激されていない条件での、基底レベルより上のNFAT標的遺伝子の発現は、試験作用物質が、NFATの負の制御因子を阻害するのに効果的であることを示す。40

【0095】

場合によっては、そのようなアッセイに用いられる細胞は、関心対象のNFAT制御因子(例えば、チャネルタンパク質)を通常には発現しない。非限定的な例として、アフリカツメガエル(Xenopus)卵母細胞または免疫系細胞もしくはその誘導体などの細胞が、組換えN50

FAT制御タンパク質、その生物活性部分もしくは誘導体を発現するように操作されうる。一般的に、組換えNFAT制御因子を発現しない対応する細胞と比較して、NFAT制御因子の発現の増加を生じる組換え発現は、NFAT制御因子の「過剰発現」と呼ばれる。または、細胞は哺乳動物起源でありうる。細胞はまた、関心対象のNFAT制御因子(例えば、カルシウムチャネル)を発現する細胞でありうるが、その細胞において、そのようなNFAT制御因子活性は、他のNFAT制御因子(例えば、カルシウムチャネル)活性と、例えば、対照との比較により、区別されうる。化合物、例えば、NFAT制御因子の基質へのNFAT制御因子の結合を調節する、またはNFAT制御因子に結合する、試験化合物の能力もまた評価されうる。これは、例えば、化合物、例えば基質を放射性同位元素または酵素標識と結合することにより、達成されることができ、それによって、化合物、例えばNFAT制御因子への基質の結合が、複合体における標識された化合物、例えば基質を検出することにより測定されうる。または、複合体におけるNFAT制御因子基質へのNFAT制御因子の結合を調節する試験化合物の能力をモニタリングするために、NFAT制御因子を放射性同位元素または酵素標識と結合させてもよい。例えば、化合物(例えば、NFAT制御因子基質)を、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで直接的かまたは間接的かのいずれかで標識することができ、放射性同位元素を、放射線放出の直接的カウンティングによりまたはシンチレーションカウンティングにより、検出する。または、化合物を、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識してもよく、酵素標識を、適切な基質の生成物への変換の測定により検出する。

【0096】

NFAT制御因子ポリペプチドの活性を特異的に調節する化合物についてのスクリーニングアッセイの例は以下のとおりである。関心対象のNFAT制御因子ポリペプチドを発現する細胞(例えば、ジャーカット細胞またはHEK293細胞)と試験化合物とを、化合物が転写または活性に効果を生じるのに十分な時間(例えば、少なくとも1分間、10分間、1時間、3時間、5時間、もしくは24時間、またはそれ以上の時間)インキュベートする。そのような時間は、経験的に決定されうる。試験化合物の濃度もまた、様々でありうる(例えば、1nM～100μM、10nM～10μM、または1nM～10μM)。試験化合物の存在下および非存在下におけるカルシウム流入の阻害を、その後、当技術分野において公知の方法を用いてアッセイする。例えば、fura-2、Indo-1、Fluo-3、またはRho-2がカルシウム流束をアッセイするため用いられうる。他の方法が阻害アッセイとして用いられうる。例えば、試験化合物は、以下の基準の任意の1つまたは複数が満たされる場合には、流入に対して有意な影響を与える、または与えることが疑われるものとみなされる：

- カルシウム指示薬により測定される場合、増加した[Ca²⁺]iの直接的な阻害がある；
- パッチクランプにより測定される場合、I_{CRAC}の直接的な阻害がある；
- カルシニューリン活性、NFAT細胞内局在、NFATリン酸化、および/もしくはサイトカイン、例えばIL-2の産生などの下流シグナル伝達機能の阻害がある；または
- 活性化誘導性細胞増殖、分化、および/もしくはアポトーシスシグナル伝達経路における改変がある。

【0097】

特定のNFAT制御因子ポリペプチドの活性に対する試験化合物の効果の直接試験は、例えば、I_{CRAC}を測定するためのパッチクランプを用いて達成されうる。この方法は、カルシウム流入に対する一般的効果について試験した後の二次段階として、またはNFAT制御因子mRNAまたはポリペプチドの発現に影響を及ぼすと試験化合物を同定した後の二次段階として、スクリーニングアッセイに用いられうる。または、直接試験が、多段階アッセイまたは単一段階アッセイにおける第一段階として用いられうる。

【0098】

反応体のいずれかの標識の有無に関わらず、NFAT制御因子と相互作用する化合物(例えばNFAT制御因子基質)の能力が評価されうる。例えば、マイクロフィジオメーター(microp hysiometer)が、化合物またはNFAT制御因子のいずれの標識も無しで、化合物とNFAT制御因子との相互作用を検出するために用いられうる(McConnell et al., 1992, Science 257

10

20

30

40

50

:1906-1912)。本明細書に用いられる場合、「マイクロフィジオメーター」(例えば、Cyto sensor)は、光アドレス可能電位差センサー(LAPS)を用いて、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析装置である。この酸性化速度における変化が、化合物とNFAT制御因子ポリペプチドの間の相互作用の指標として用いられる。

【0099】

さらにもう一つの態様において、無細胞アッセイが提供され、NFAT制御タンパク質またはその生物活性部分を試験化合物と接触させ、NFAT制御タンパク質またはその生物活性部分に結合する試験化合物の能力を評価する。本発明のアッセイに用いられるNFAT制御タンパク質の好ましい生物活性部分は、他のシグナル伝達分子との相互作用に関与する断片もしくは誘導体、またはNFATと直接相互作用する断片もしくは誘導体を含む。

10

【0100】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を、その2つの成分が相互作用し、結合するのを可能にするのに十分な条件下かつ十分な時間調製し、それ故、取り出されうるおよび/または検出されうる複合体を形成する段階を含む。

【0101】

2つの分子間の相互作用はまた、例えば、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて、検出されうる(例えば、Lakowicz et al., 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos et al., 米国特許第4,868,103号参照)。フルオロフォア標識は、第一の「ドナー」標識の発光スペクトルが第二の「アクセプター」分子の吸収スペクトルと重複するように選択され、標識が極めて近接している場合には、エネルギーの移動により、第二のアクセプター分子はドナーの励起で蛍光を発する。または、「ドナー」タンパク質分子は、単に、トリプトファン残基の自然蛍光エネルギーを利用するだけでもよい。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれと区別されうるように、異なる光の波長を放出する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は分子を隔てる距離に関連しているため、分子間の空間的関係が評価されうる。結合が分子間に生じている状況において、アッセイにおける「アクセプター」分子の蛍光発光は、結合が生じていない場合の、または例えば、結合が過剰の非標識競合タンパク質により妨げられている場合の発光を上回って増加する。FRET結合事象は、当技術分野において周知の標準蛍光定量的検出手段により(例えば、蛍光光度計を用いて)、対照と比較して、都合よく測定されうる。

20

【0102】

30

細胞において、または無細胞アッセイにおいて、タンパク質複合体の組み立てをモニタリングするアッセイもまた用いられる。

【0103】

もう一つの態様において、標的分子に結合するNFAT制御タンパク質の能力を測定する段階は、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)を用いて達成されうる(例えば、Sjolander and Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345およびSzabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705参照)。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」は、反応体のいずれの標識も無しで、リアルタイムに生体特異的相互作用を検出する(例えば、BIA core)。結合表面での質量における変化(結合事象を示す)が、結果として、表面の近くで光の屈折率の変化を生じ(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学的現象)、それが、結果として、生体分子間のリアルタイム反応の指標として用いられる検出可能なシグナルを生じる。

40

【0104】

一つの態様において、標的遺伝子産物、例えば、NFAT制御因子ポリペプチド、または試験物質を固相上へ固着させる。固相に固着した標的遺伝子産物/試験化合物複合体は、反応の終わりに検出されうる。一般的に、標的遺伝子産物を固体表面上に固着させてよく、試験化合物(固着していない)が、本明細書で考察された検出可能な標識で直接的または間接的かのいずれかで標識されうる。

【0105】

複合体形成型の非複合体形成型からの分離を容易にするために、加えてアッセイの自動

50

化に適合させるために、NFAT制御因子、抗NFAT制御因子抗体、またはその標的分子を固定化することが望ましい場合がある。NFAT制御タンパク質への試験化合物の結合、または候補化合物の存在下および非存在下におけるNFAT制御タンパク質と標的分子との相互作用は、反応物を含むのに適した任意の容器で達成されうる。そのような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。一つの態様において、タンパク質の一方または両方をマトリックスに結合させるのを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が提供されうる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/NFAT制御因子融合タンパク質、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオンSepharose(商標)ビーズ(Sigma Chemical, St, Louis, Mo)、またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上へ吸着させることができ、それを、その後、試験化合物と、または試験化合物および非吸着標的タンパク質もしくはNFAT制御タンパク質のいずれかと結合させ、混合物を複合体形成の助けとなる条件下で(例えば、塩およびpHについて生理学的状態で)インキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを、いかなる未結合の成分をも除去するために洗浄し、ビーズの場合、マトリックスを固定化し、複合体を、例えば、上記のように、直接的かまたは間接的かのいずれかで測定する。または、複合体を、マトリックスから解離させ、NFAT制御因子の結合または活性のレベルを標準技術を用いて測定できる。

【0106】

NFAT制御タンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上へ固定化するための他の技術には、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合を用いることが挙げられる。ビオチン化NFAT制御タンパク質または標的分子を、当技術分野において公知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL.)を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製し、ストレプトアビジンコーティング化96ウェルプレート(Pierce Chemicals)のウェルに固定化することができる。

【0107】

アッセイを行うために、非固定化成分を、固着した成分を含むコーティング表面に加える。反応が完了した後、未反応成分を、いかなる形成された複合体も固体表面上に固定化されたままであるような条件下で除去する(例えば、洗浄により)。固体表面上に固着した複合体の検出は、いくつかの方法で達成されうる。あらかじめ固定化されていない成分がプレ標識されている場合、表面上に固定された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。あらかじめ固定化されていない成分がプレ標識されていない場合、表面上に固着した複合体を検出するために間接的標識が用いられる；例えば、固定化成分に特異的な標識抗体を用いる(抗体もまた、直接標識してもよく、または、例えば、標識抗Ig抗体で間接的に標識してもよい)。

【0108】

このアッセイは、NFAT制御タンパク質または標的分子と反応性であるが、その標的分子へのNFAT制御タンパク質の結合に干渉しない抗体を利用して行われる。そのような抗体は、プレートのウェルへ誘導体化され、未結合の標的またはNFAT制御タンパク質が抗体結合によりウェルに捕捉されうる。GST固定化複合体について上で記載したものに加えて、そのような複合体を検出するための方法には、NFAT制御タンパク質または標的分子と反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、およびNFAT制御タンパク質または標的分子に関連した酵素活性を検出することに頼る酵素結合アッセイが挙げられる。

【0109】

または、無細胞アッセイが液相で行われうる。そのようなアッセイにおいて、反応生成物を、いくつかの標準技術のいずれかにより、未反応の成分から分離する。標準技術には、限定されるわけではないが、以下が挙げられる：濾過；分画遠心法(例えば、Rivas and Minton, 1993, Trends Biochem. Sci. 18:238-7参照)；クロマトグラフィー(ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー)；電気泳動(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York参照)；および免疫沈降(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology

10

20

30

40

50

1999, J. Wiley: New York参照)。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に公知である(例えば、Heegaard, 1998, J. Mol. Recognit. 11:141-8; Hage and Tweed, 1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 699:499-525参照)。さらに、蛍光共鳴エネルギー移動もまた、溶液からの複合体のさらなる精製を行うことなく、結合を検出するため、本明細書に記載されているように、都合よく利用されうる。

【0110】

アッセイは、NFAT制御タンパク質またはその生物活性部分を、NFAT制御因子を結合する既知の化合物と接触させてアッセイ混合物を形成する段階、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる段階、およびNFAT制御因子ポリペプチドと相互作用する試験化合物の能力を測定する段階を含んでよく、NFAT制御タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を測定する段階は、試験化合物の、NFAT制御因子もしくはその生物活性部分へ優先的に結合する能力、または標的分子の活性を調節する能力を、既知の化合物と比較して測定する事を含む。

【0111】

NFAT制御因子がインビボでタンパク質などの1つもしくは複数の細胞高分子または細胞外高分子と相互作用する範囲においては、そのような相互作用のインヒビターが有用である。そのような相互作用性分子は、カルシウムチャネル複合体のCa²⁺およびサブユニット、加えて、キナーゼ、ホスファターゼ、およびアダプタータンパク質などのチャネルと直接相互作用するシグナル伝達分子を含み、インヒビターを同定するために用いられる。例えば、標的遺伝子産物と相互作用性細胞または細胞外結合パートナー産物とのプレ形成(preformed)複合体は、標的遺伝子産物かまたはそれらの結合パートナーのいずれかが標識されるが、標識により発生するシグナルは複合体形成によりクエンチされるように調製される(例えば、イムノアッセイのためにこのアプローチを利用する米国特許第4,109,496号参照)。プレ形成複合体由来の種の1つと競合して置換する試験物質が、結果として、バックグラウンドより高いシグナルの発生を生じる。このようにして、標的遺伝子産物-結合パートナー相互作用を乱す試験物質が同定されうる。または、NFAT制御因子と結合または相互作用し(「NFAT制御因子-結合タンパク質」または「NFAT制御因子-bp」)、かつNFAT制御因子活性に関与する他のタンパク質を同定するために、NFAT制御因子ポリペプチドがツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイト(bait)タンパク質」として用いられる(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos et al., 1993, Cell 72:223-232; Madura et al., 1993, J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al., 1993, Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al., 1993, Oncogene 8:1693-1696; およびBrent W094/10300参照)。そのようなNFAT制御因子-bpは、例えば、NFAT標的遺伝子の発現または活性などのNFAT制御因子媒介性シグナル伝達経路の下流要素としての、NFAT制御タンパク質またはNFAT制御因子標的によるシグナルのアクチベーターまたはインヒビターでありうる。

【0112】

NFAT制御因子発現の調節因子もまた同定されうる。例えば、細胞または無細胞混合物を、候補化合物と接触させ、NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質の発現を、候補化合物の非存在下におけるNFAT制御因子mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較して評価する。発現を検出する、または発現レベルを評価するための方法は、当業者にとって周知である。NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下において、その非存在下においてより高い場合、候補化合物は、NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質発現の刺激物質であると同定される。または、NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の存在下において、その非存在下においてより低い(すなわち、統計学的に有意に低い)場合、候補化合物は、NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質発現のインヒビターであると同定される。NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質発現のレベルは、NFAT制御因子mRNAまたはタンパク質を検出するための本明細書に記載された方法により測定されうる。

【0113】

調節作用物質は、細胞に基づいたアッセイ、または無細胞アッセイを用いて同定するこ

10

20

30

40

50

とができ、NFAT制御タンパク質の活性を調節する作用物質の能力は、インビボで、例えば、疾患についての動物モデルなどの動物(例えば、白血病もしくは自己免疫疾患をもつ動物、または動物(例えば、ヒト)由来の異種移植片を有する動物)、または白血病もしくは他のリンパ球性障害に起因するガン由来の細胞、または白血病もしくはリンパ球性障害細胞株由来の細胞において、確認されうる。

【0114】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な作用物質に関する。従って、本明細書に記載されているように同定された作用物質(例えば、NFAT制御因子を調節する作用物質、アンチセンスNFAT制御因子核酸分子、NFAT制御因子特異的抗体、またはNFAT制御因子の結合パートナー)を適切な動物モデル(上記のものなど)にさらに用いて、そのような作用物質での処置の効力、毒性、副作用、または作用機構を測定することは、本発明の範囲内である。さらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な作用物質は、本明細書に記載された処置に用いられうる。

10

【0115】

有用な動物モデルには、白血病および自己免疫障害の動物モデルが挙げられる。そのような動物モデルの例は当技術分野において公知であり、商業的供給源、例えば、Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.)、から入手してもよく、または関連文献に記載されているように作製してもよい。そのような研究に有用な動物の例には、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウサギ、およびヤギが挙げられる。他の有用な動物モデルには、非限定的に、本文書の他の箇所で考察されているように、 Ca^{2+} -NFATシグナル伝達または Ca^{2+} シグナル伝達の他の障害について、例えば、心筋肥大、拡張型心筋症、過剰または病理的骨吸収、過剰脂肪細胞分化、肥満、および潜伏ヒトヘルペスウイルス-8または他のウイルスの再活性化についてのものが挙げられる。

20

【0116】

システム

以下の1つまたは複数を調節する作用物質を同定するのに用いるシステムもまた本明細書に提供される：NFATタンパク質、NFAT制御タンパク質、および細胞内または細胞質カルシウム。そのようなシステムは、1つもしくは複数のタンパク質、例えば、本発明のNFAT制御タンパク質、またはその断片もしくは誘導体、例えば、ORAIタンパク質、またはその断片もしくは誘導体を含む細胞またはその部分を含む。一つの態様において、タンパク質は、細胞に対して外因性(異種性または相同性)である。一つの態様において、細胞は、NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする外因性(例えば、異種性または相同性)核酸を含む。一つの態様において、システムはさらに、細胞の原形質膜を横断する電流をモニタリング、検出、または測定するために用いられるモニタリング剤を含む。多くのそのようなモニタリング剤は当技術分野において公知である。「モニタリング剤」という用語はまた、そのようなモニタリングに用いられる任意の装置を含むと意図される。

30

【0117】

システムの特定の態様において、細胞内カルシウムを調節することに関与するタンパク質が細胞に含まれる。細胞は、そのようなタンパク質を内因的に発現する単離された細胞または細胞培養物であってもよく、または作用物質を同定するための方法に関する上で記載されているように、そのようなタンパク質を組換え技術によって発現する単離された細胞または細胞培養物、例えば、少なくとも1つのNFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現する組換え細胞であってもよい。細胞が組換え技術によってタンパク質を発現するシステムは、細胞が、単離された細胞もしくは細胞培養物であるか、または動物、特に、非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物の内部に含まれている。

40

【0118】

システムのタンパク質(および/またはタンパク質をコードする核酸)または細胞(またはその部分)は、受動的もしくは能動的細胞内カルシウム貯蔵の低減もしくは枯渇をもたらす作用物質(例えば、タブシガルジン、および本明細書に記載された、または当技術分野

50

において公知の他の作用物質)を含む、ならびに/または細胞内カルシウムおよび/もしくはカルシウム移動のモニタリングもしくは測定を容易にする分子を含む培地に含まれうる。そのような分子には、蛍光(または他の方法で標識された)カルシウム指示薬、三価陽イオン、カルシウム以外の二価陽イオン、およびカルシウム緩衝剤、例えば、カルシウムキレート剤が挙げられる。

【0119】

組換え細胞

本発明の局面はさらに、本明細書で考察された方法に記載されたアッセイに用いられる組換え細胞に関する。一つの局面において、本発明はまた、本明細書に記載された任意の組換え細胞を含む。一つの態様において、組換え細胞は、少なくとも1つの外因性(異種性または相同性)NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を含む。組換え細胞はまた、さらに、NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体をコードする少なくとも1つの外因性(異種性または相同性)核酸を含む。NFAT制御タンパク質は哺乳動物起源でありうる。組換え細胞は、NFAT制御タンパク質またはその断片もしくは誘導体を過剰発現しうる。この過剰発現は、外因性(異種性または相同性)NFAT制御タンパク質(例えば、外因性核酸由来)の発現に起因しうるか、または天然/内因性NFAT制御タンパク質の過剰発現に起因しうる。

10

【0120】

トランスジェニック動物

本発明は、NFAT制御因子を過剰発現する、NFAT制御因子を異所的に発現する、低下したレベルのNFAT制御因子を発現する、突然変異体NFAT制御因子を発現する、またはNFAT制御因子の発現についてノックアウトされるように操作されている非ヒトトランスジェニック動物を提供する。そのような動物およびそのような動物由来の細胞株は、NFAT制御タンパク質の機能および/または活性を研究するために、ならびにNFAT制御因子活性の調節因子を同定および/または評価するために、有用である。NFAT制御因子ポリペプチドを過剰発現する動物は、例えば、NFAT制御因子ポリペプチドの活性を調節するための候補化合物の効果を試験する、および化合物の効果をインビボで評価するために有用である。

20

【0121】

本明細書に用いられる場合、「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物、一般的に、哺乳動物、例えば、ラットまたはマウスなどの齧歯類であり、動物の細胞の1つまたは複数が導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト靈長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、外因性DNA、または再編成、例えば、内因性染色体DNAの欠失であり、たいていの場合、トランスジェニック動物の細胞のゲノムへ組み込まれるか、または存在する。導入遺伝子は、トランスジェニック動物の1つもしくは複数の細胞型または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を指示することができる;他の導入遺伝子、例えば、ノックアウトは、発現を低下させる。従って、トランスジェニック動物は、例えば、動物の発生前に動物の細胞(例えば動物の胚細胞)に導入された外因性DNA分子と内因性遺伝子との間の相同組換えによって、内因性NFAT制御遺伝子が変化しているものでありうる。

30

【0122】

イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現の効率を増加させるために導入遺伝子に含まれうる。組織特異的制御配列は、特定の細胞にNFAT制御タンパク質の発現を指示するように本発明の導入遺伝子に機能的に連結しうる。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおけるNFAT制御因子導入遺伝子の存在、および/または動物の組織もしくは細胞におけるNFAT制御因子mRNAの発現に基づいて同定されうる。トランスジェニック創始動物は、その後、導入遺伝子を有するさらなる動物を作製するために用いられうる。さらに、NFAT制御タンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物はさらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物へ交配されうる。

40

【0123】

50

NFAT制御タンパク質またはポリペプチドは、トランスジェニック動物または植物に発現させることができ、例えば、タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸が動物のゲノムへ導入されうる。好ましい態様において、核酸は、組織特異的プロモーター、例えば、乳または卵特異的プロモーターの制御下に置かれ、動物により產生された乳または卵から回収される。適した動物は、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、およびヒツジである。

【0124】

一つの非限定的な例において、マウスは、当技術分野において公知の方法を用いて、LC KプロモーターなどのT細胞特異的プロモーターを用いてNFAT制御因子ポリペプチドを発現するように操作される(例えば、Zhang et al., 2002, *Nat. Immunol.* 3:749-755)。代替の例において、マウスは、NFAT制御因子mRNAおよびタンパク質の組織特異的ノックダウンにより、例えば、リコンビナーゼの発現が組織特異的プロモーターの制御下である、Cre-lox媒介型組換えにより、操作される。操作された動物は、細胞における導入遺伝子の存在を同定する公知の方法を用いて、およびNFAT制御因子の過剰発現もしくは過小発現について細胞試料(例えば、T細胞)を評価することにより(例えば、免疫細胞化学法を用いて)、または試料由来の細胞におけるカルシウム流束を評価することにより、同定されうる。そのようなトランスジェニック動物は、例えば、化合物を、NFAT制御因子媒介性細胞増殖を阻害するそれらの能力について試験するのに、有用である。

【0125】

本発明はまた、トランスジェニック動物由来の細胞の集団を含む。そのような動物から一次、二次、および不死化細胞株を発生させる方法は、当技術分野において公知である。

【0126】

薬学的組成物

治療的適用について、本発明のペプチドおよび核酸、NFAT制御因子に対する抗体、または本発明のスクリーニング方法により同定された作用物質、例えば、小分子、siRNA、shRNAは、哺乳動物、特にヒトなどの被験体に、単独で適切に投与されてもよく、または1つもしくは複数の許容される担体および任意で他の治療用成分と共にペプチド、核酸、抗体、もしくは作用物質を含む薬学的組成物の一部として、適切に投与されてもよい。担体は、製剤の他の成分と適合性であり、かつそのレシピエントに対して有害でないという意味で「許容され」なければならない。

【0127】

本発明の薬学的組成物には、経口、直腸、鼻腔内、例えば頬および舌下を含む局所、粘膜、または例えば皮下、筋肉内、静脈内、および皮内を含む非経口の投与に適したもののが挙げられる。製剤は、単位剤形、例えば、錠剤および徐放性カプセルで、ならびにリポソームで都合よく提供されてもよく、および薬学の分野において周知の任意の方法により調製されうる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa. (17th ed. 1985) 参照。

【0128】

そのような調製方法は、1つまたは複数の副成分を構成する担体などの投与される成分でありうる分子と会合させる段階を含む。一般的に、組成物は、活性成分を液体担体、リポソーム、もしくは微粉化した固体担体、または両方と均一かつ密接に会合させ、その後、必要に応じて、生成物を成形することにより調製される。

【0129】

経口投与に適した本発明の組成物は、例えば、所定量の活性成分をそれぞれ含むカプセル、カシェ剤、もしくは錠剤などの個別単位として；粉末もしくは顆粒として；水性液体もしくは非水性液体における溶液もしくは懸濁液として；または水中油液体乳濁液もしくは油中水液体乳濁液として、もしくはリポソームに詰め込まれて、およびボーラスとして、提供されうる。

【0130】

錠剤は、圧縮または成形により、任意で1つまたは複数の副成分と共に、作製されうる。圧縮錠剤は、適した機械において活性成分を粉末または顆粒などの易流動性の形に、任

10

20

30

40

50

意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、界面活性剤、または分散剤と混合して、圧縮することにより調製されうる。成形錠剤は、適した機械において、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を成形することにより作製されうる。錠剤を、任意で、コーティングしてもよく、または切れ目を入れてもよく、その中の活性成分の持続または制御放出を提供するように製剤化してもよい。

【0131】

局所投与に適した組成物は、フレーバー基剤、通常、スクロースおよびアラビアゴムまたはトラガカントゴム中に成分を含むロゼンジ；ならびにゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムなどの不活性基剤中に活性成分を含む香錠を含む。

【0132】

非経口投与に適した組成物には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および意図するレシピエントの血液に対して製剤を等浸透圧にする溶質を含みうる水性および非水性滅菌注射液；ならびに沈殿防止剤および濃化剤を含みうる水性および非水性滅菌懸濁液が挙げられる。製剤は、単位用量または複数回用量の容器、例えば、密閉アンプルおよびバイアルで提供されてもよく、ならびに使用直前に、滅菌液体担体、例えば、注射用蒸留水の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で貯蔵されてもよい。即時の注射液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製されうる。

【0133】

本治療用物質の適用は、しばしば、関心対象の部位に投与されるように、局所的である。注射、カテーテルの使用、トロカール、発射体、プルロニックゲル、ステント、持続性薬物放出ポリマー、または内部アクセスを与える他の装置などの様々な技術が、本組成物を関心対象の部位に供給するために用いられる。器官または組織が患者からの採取のためにアクセス可能である場合、そのような器官または組織を、本組成物を含む培地に浴させててもよく、本組成物を器官上に塗布してもよく、または本組成物を任意の都合の良い方法で適用してもよい。組織ターゲティング(例えば、抗体)を備えたリポフェクション、リポソームを用いる核酸の全身投与もまた用いられる。

【0134】

所定の治療に用いられる、所定の本発明のペプチドもしくは核酸の、または本発明のスクリーニング方法により同定された抗体もしくは作用物質の、実際の好ましい量は、利用する特定の活性ペプチドまたは核酸または作用物質、製剤化された特定の組成物、適用様式、特定の投与部位、患者の体重、全体的な健康状態、性別など、処置する特定の適応症など、および付添う医師または獣医師を含む当業者により認識されている他のそのような因子によって異なることは理解されていると思われる。所定の投与プロトコールについての最適な投与速度は、通常の用量決定試験を用いて当業者により容易に決定されうる。

【0135】

本発明の様々な態様は、以下の実施例においてさらに例証される。本文書を通して他の刊行物または開示についてなされたすべての言及は、本明細書に参照により組み入れられる。

【0136】

実施例1：SCID患者における Ca^{2+} 放出活性化 Ca^{2+} (CRAC)チャネル遺伝子ORAI1の同定
材料および方法：

症例報告

この研究において調べられた2人のSCID患者の詳細な症例報告が記載されている(Feske 1996, 2000)。

【0137】

細胞株および試薬

T細胞株を、2人の患者および21人の親族メンバーの末梢血リンパ球から樹立し、記載されているように⁴⁸増殖させた。新生児SCID患者2および健康な新生児(Hs27細胞株、ATCC、Manassas, VA)由来の包皮線維芽細胞を、テロメラーゼ発現プラスミド(hTERT、S. Lessnick, DFCI, Boston, MAの親切な贈与)のレトロウイルス形質導入により不死化した。マイ

10

20

30

40

50

クロファージ血球様ショウジョウバエ細胞株S2R⁺を、10%ウシ胎児血清を含むシュナイダー培地(Invitrogen)で標準プロトコールに従って増殖した。タブシガルジンを、LC Biochemicals(Woburn, MA)から、カルブドトキシン(CTX)および2-アミノエトキシジフェニルボレート(2-APB)をSigma(St. Louis, MO)から購入した。

【0138】

一塩基多型(SNP)アレイに基づいた連鎖解析

SCID患者および21人の親族のゲノムDNAを、ゲノムDNA Maxi prepキット(Qiagen)を用いて、末梢血単核細胞から調製した。遺伝子型決定を、SNP Genotyping Center(Broad Institute, Cambridge, MA)およびHarvard Partners Center for Genetics and Genomics(Boston, MA)で、「GeneChip」Human Mapping 10K Arrays(Xba 142 2.0, Affymetrix, Santa Clara, CA)を用いて行い、0.38の平均SNPヘテロ接合性および258kbの平均マーカー間密度であった。このプラットフォームは、ヒトゲノムにおける10,000個より多いSNPの同時的遺伝子決定を可能にした。パラメトリック連鎖解析について、データを、「比較連鎖」⁴⁹を用いて「連鎖」型式へ変換した。親遺伝子型と矛盾するメンデルの遺伝子型エラーを検出し、不明遺伝子型に設定した。多点パラメトリック連鎖解析を、Allegro⁵⁰を用いて各SNP位置におけるLODスコアを計算するよう行った。連鎖を確認するために、本発明者らは、Genehunter 2.1r6⁵¹およびMerlin⁵²を用いてSNPデータを再分析し、非常に類似した結果を得た。パラメトリック解析について、0.001の疾患対立遺伝子頻度、0.99の浸透度値、および0.01の表現型模写を全系図について用いた。パラメトリック連鎖解析を、遺伝の劣性および優性モデルのそれぞれを用いて行った。「劣性」モデルについて、両方の患者、彼らの親、罹患していない兄弟、および祖父母(図1Aにおける個体8、11、35、36、37、38、39、63、64)由来のハプロタイプを、SCID疾患についての遺伝の常染色体劣性型を仮定して解析し、両方のSCID患者は、一般的な疾患原因突然変異についてホモ接合性であった。この解析からの予想最大オッズ比の \log_{10} (LOD)スコアは~1.9(すなわち、 $-\log_{10}[0.25 \times 0.25 \times 0.25 \times 0.75]$)であった。「優性」モデルについて、貯蔵量作動性Ca²⁺流入の低下をもつ12人の親族メンバーが「罹患した」、すなわち、優性作用性突然変異の保因者として定義され、それらのSNPハプロタイプを、正常な貯蔵量作動性Ca²⁺流入をもつ8人の健康な親族メンバーのSNPハプロタイプと比較した。この解析からの予想最大LODスコアは~3.8(すなわち、 $-\log_{10}[0.5^{12}]$)であった。

【0139】

ゲノムDNA配列決定

2人の患者、21人の親族メンバー、および3人の独立した対照のゲノムDNAを、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて0rai1のエクソン1および2における突然変異について配列決定した。

0rai1 ex1 for1 5' ACAACAAACGCCACTTCTTGGTGG (SEQ ID NO: 22) (エクソン1); 0rai1 ex1 rev1 5' TGCTCACGTCCAGCACCTC (SEQ ID NO: 23) (エクソン1);
 0rai1 ex2 for1 5' TCTTGCTTCTGTAGGGCTTCTG (SEQ ID NO: 24) (エクソン2);
 0rai1 ex2 rev1 5' TCTCAAAGGAGCTGGAAGTGC (SEQ ID NO: 25) (エクソン2)。

DNAを、AmpliTaq Goldポリメラーゼを用いて増幅し、1%アガロースゲル上で分離した。PCR産物をゲル精製し、以下のプライマーを用いて直接配列決定した。

0rai1 ex1 for2

5' AGCATGCAAAACAGCCCAGG (SEQ ID NO: 26) (エクソン1); 0rai1 ex1 rev2 5' ACGGTTCTCCAGCTCTTC (SEQ ID NO: 27) (エクソン1); 0rai1 ex2 for2 5' TGACAGGAGGAGAGCTAGG (SEQ ID NO: 28) (エクソン2); 0rai1 ex2 rev2 5' AAGAGATCCTCCTGCCTTGG (SEQ ID NO: 29)。

配列決定は、DF/HCC DNA Resource Core(DFCI)において行い、DNA配列は、Xplorer Lite

10

20

30

40

50

(*dnaTools*, Ft. Collins, CO)を用いて分析した。

【0140】

HapMap DNAのSequenom分析

Orai1(NM_032790)のコード配列における271位におけるC>T点突然変異がSNPである可能性を排除するために、本発明者らは、International HapMapプロジェクト^{30,31}のために構築された多様な地理的起源の270個の個体のパネル由来のDNAを調べた。遺伝子決定は、以前に記載されているように⁵³、ハイスループットプライマー伸長方法を用いて、Sequenomプラットフォーム上での質量分析(MALDI-TOF)による検出と共に行った。この方法の詳細な説明は、「Sequenomプラットフォーム」下のhttp://www.hapmap.org/downloads/genotyping_protocols.htmlに見出される。試料の89%は遺伝子決定に成功し、すべてがCCホモ接合体として同定された。

【0141】

ショウジョウバエ細胞におけるdsRNA媒介性ノックダウン

PCR断片(最大600bpまでのサイズ)をインビトロ転写反応のための鑄型として用い、続いて、鑄型DNAを除去するためにDNアーゼI処理を行った。精製後、dsRNA(5 μg)を、8チャンバーのスライドにおいて(12ウェルプレートについては10 μg)、S2R+細胞へNFAT-GFP発現プラスミドと共に同時トランスフェクションした。インキュベーションの72時間後、局在性アッセイのために、細胞をCa²⁺流入誘導物質、1 μMイオノマイシンまたは1 μMタブシガルジンで処理し、[Ca²⁺]_iレベルの測定のためにトリプシン処理した。

【0142】

ゲノムワイドのRNAiスクリーニング

RNAiスクリーニングを記載されているように行った(Armknecht S. et al., 2005, Methods Enzymol 392, 55-73; Btros M. et al. 2004 Science 303, 832-835)。マクロファージ血球様ショウジョウバエ細胞株S2R+に、発現プラスミドpAc5.1(Invitrogen)へサブクローニングしたNFAT1(1~460位)-GFP融合タンパク質についてのコード配列を安定にトランスフェクションした。トランスフェクションは、Effectene(Qiagen)を用いて、比率19:1の発現プラスミド対pCoHygro(Invitrogen)(恒常的活性プロモーターの制御下でハイグロマイシン抵抗性遺伝子をコードする)で達成した。細胞を、300 μg/mlハイグロマイシンで3~4週間選択し、安定なクローンを目視検査によって選択した。NFAT1(1~460位)-GFPを発現する10⁴個のS2R+細胞を、0.25 μgのショウジョウバエmRNAに対するdsRNA(10 μlの無血清培地中)を含む384ウェルプレートの各ウェル上に加え、26℃で1時間インキュベートし、RNAiを達成するために26℃で48~72時間インキュベートした。S2R+細胞を、5mM CaCl₂を含むシュナイダー培地において1 μMタブシガルジンで、室温、10分間刺激し、固定し、DAPIで染色した。同時GFPおよびDAPI画像を、各ウェルにおいて3つの異なる位置から自動カメラにより取得し、目視検査によりスコアを付けた。個々のdsRNAがアレイされている合計21,884ウェルを含む、合計58個の384-プレートを分析した。この研究について、dstimおよびdOraiの両方についてのdsRNA単位複製配列は、19ヌクレオチドまたはそれ以上の完全な一致をもつ予想されるオフターゲットはなかったことを述べておく。

【0143】

プラスミドおよびレトロウイルス形質導入

*Orai1*についての完全長cDNA(BC015369)を、OpenBiosystems(Huntsville, AL)から購入し、pENTR11(「Gateway」system, Invitrogen, Carlsbad, CA)へmycエピトープをコードするN末端またはC末端の末端配列とインフレームでサブクローニングした。その後、*Orai1*を、バイシストロン性レトロウイルス発現ベクターpMSCV-CITE-eGFP-PGK-Puro(Masatsugu Oh-horaの親切な寄贈)へ移動させたが、それは、*Orai1*、GFP、およびピュロマイシン抵抗性遺伝子の同時発現を可能にする。gp293パッケージング細胞株に、*orai1*、gag-pol、およびenvをコードするプラスミドを同時トランスフェクションし、広宿主性複製無能レトロウイルスを產生した。ウイルス含有上清を24時間収集し、濾過し(0.45マイクロメートル、低いタンパク質結合性)、6000xgで16時間の遠心分離により濃縮した。T細胞および線維芽細胞に、それぞれ、4日間および1日間のウイルス上清の添加により、形質導入し

10

20

30

40

50

た。形質導入効率は、フローサイトメトリーを用いてGFP発現により評価し、myc-Orai1発現は、免疫プロッティングおよび免疫細胞化学法を用いて評価した。場合によっては、形質導入したT細胞をさらに、1 μg/mlピューロマイシンで3日間選択した。

【 0 1 4 4 】

膜トポロジーのバイオインフォマティック予測

Orai1のヒドロパシープロットを、Kyte-Doolittleアルゴリズム²⁹を用いて作成した。膜トポロジーをさらに、隠れマルコフモデルに基づいたPhobiusアルゴリズム²⁶を用いて評価した。配列アラインメントは、MegAlign(DNAStar, Madison, WI)を用いて行った。

【 0 1 4 5 】

共焦点イメージング

Orai1についての免疫細胞化学法を、記載されているように¹¹行った。簡単には、レトロウイルスで形質導入したT細胞および線維芽細胞を、3%パラホルムアルデヒドで固定し、非透過のままにしておく、または0.5%NP-40を含む水緩衝液で透過処理し、抗myc抗体(9E10)およびCy3標識二次抗体とインキュベートした。免疫蛍光を、63×水浸対物レンズを用いるBX50BWI Olympus顕微鏡上で、Radiance 2000レーザースキャニング共焦点システム(Bio-Rad Laboratories)を用いる共焦点イメージングにより分析した。

【 0 1 4 6 】

単一細胞Ca²⁺イメージング

T細胞に、負荷培地(RPMI + 10%FBS)中の1 μM fura-2/AM(Molecular Probes)を 1×10^6 細胞/mlで22~25℃で30分間負荷し、それらを負荷培地に再懸濁し、ポリ-L-リジンコーティング化カバースリップに15分間付着させた。線維芽細胞を、UV滅菌したカバースリップ上で直接増殖させ、それらに3 μM fura-2/AMを22~25℃で45分間負荷した。[Ca²⁺]_i測定について、細胞をRC-20閉鎖槽フローチャンバー(Warner Instrument Corp., Hamden, CT)に載せ、OpenLabイメージングソフトウェア(Improvision)を用いてAxiovert S200エピ蛍光顕微鏡(Zeiss)上で分析した。細胞を、Ca²⁺を含まないリンガー液に灌流し、Ca²⁺貯蔵を、1 μMタブシガルジンで受動的に枯渇させた。貯蔵の能動的枯渇は、10 μg/ml抗CD3抗体(OKT3, eBioscience, San Diego, CA)とのインキュベーションにより10分間22~25℃で誘導した。Fura-2発光を、340nmおよび380nmで励起して、510nmで検出し、Fura-2発光比(340/380)を、バックグラウンドの引き算後、各5分間隔について計算した。各実験について、約100個の個々の細胞を、Igor Pro(Wavemetrics, Lake Oswego, OR)分析ソフトウェアを用いて340/380比について分析した。[Ca²⁺]_iは、比較式 $[Ca^{2+}]_i = K^* (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ から推定した。K*、R_{min}、およびR_{max}は、以前に記載されているように⁵⁴、インサイチューで対照ヒトT細胞において測定した。Ca²⁺流入比は、0.2mM細胞外Ca²⁺の再添加後のCa²⁺濃度における上昇(d[Ca²⁺]_i/dt)の最大比から計算した。

【 0 1 4 7 】

S2R+細胞におけるCa²⁺流入を、トリプシン(CellGro, Herndon, VA)で細胞をディッシュから剥離した後にフローサイトメトリーにより測定した。細胞に、Ca²⁺指示薬色素Fluo4-AMおよびFura-Red(それぞれ、2 μM, Molecular Probes, Eugene, OR)を室温で45分間負荷し、その後、負荷培地(シュナイダー培地 + 10%FCS)に再懸濁した。フローサイトメトリーのCa²⁺測定の直前に、細胞を、2mM Ca²⁺を含むリンガー液に再懸濁し、FACSCalibur(BD Biosciences, San Jose, CA)上で分析した。細胞内Ca²⁺貯蔵を枯渇させるためのCa²⁺を含まないリンガー中のタブシガルジン(3 μM)の30秒後、4mM Ca²⁺リンガー液を加え、細胞Ca²⁺レベルを300秒間モニタリングした。Fluo-4とFura-Red発光の比は、FloJoソフトウェア(Tree Star, Inc., Ashland, OR)を用いて分析した。

【 0 1 4 8 】

溶液および化学物質

標準細胞外リンガー液は以下を含んだ(mM単位)：155 NaCl、4.5 KCl、20 CaCl₂、1 MgCl₂、10 D-グルコース、および5 Na-Hepes(pH 7.4)。二価を含まない(DVF)標準リンガー液は以下を含んだ(mM単位)：155 Na、10 HEDTA、1 EDTA、および10 Hepes(pH 7.4)。カリブドトキシン(CTX)は、Kv1.3チャネルを遮断して、DVF溶液におけるI_{CRAC}記録の混入を防止

10

20

30

40

50

するために全外液に含めた。標準内部溶液は以下を含んだ(mM単位) : 150 Cs-アスパラギン酸、8 MgCl₂、8 BAPTA、および10 Cs-Hepes(pH 7.2)。

【 0 1 4 9 】

タブシガルジン(LC Biochemicals, Woburn, MA)は、DMSO中の1mMストックから希釈し、CTX(Sigma, St. Louis, MO)は、水中の50 μMストック溶液から1:1000に希釈した。2-アミノエトキシジフェニルボレート(2-APB, Sigma)は、DMSO中のストック溶液から希釈した。薬物を、説明文に示された濃度まで希釈し、一般的な送達ポートを有するマルチバレル局所灌流ピペットを用いて細胞へ適用した。90%溶液交換についての時間は、外部[K⁺]が2mMから150mMへ切り替わった時のK⁺電流逆転電位が変化する速度に基づき、<1 sであると測定した。

10

【 0 1 5 0 】

パッチクランプ測定

パッチクランプ実験は、ITC-16入力/出力ボード(Instrutech, Port Washington, NY)およびMacintosh G3コンピューターにインターフェイスで接続したAxopatch 2000増幅器(Axon Instruments, Foster City, CA)を用いて22 ~ 25 で標準ホールセル記録構成で行った。記録電極を100 μlピペットから引き抜き、Sylgardでコーティングし、先端を熱加工して2 ~ 5M の最終抵抗にした。刺激およびデータ獲得および分析は、Igor Proプラットフォーム(Wavemetrics, Lake Oswego, OR)で開発された施設内の慣例を用いて行った。保持電位は、他に規定がない限り、+30mVであった。電圧刺激は、通常、1.3sごとに加えられる、-100mVまでの100-msステップ、続いて-100mVから+100mVまでの100-ms傾斜からなる。電流は、4極のBesselフィルターを用いて2kHzで濾過し、5kHzでサンプリングした。データは、槽のリンガー液に対するピペット溶液の液間電位について(-10mV)、および槽接地寒天橋のリンガー液に対する槽DVF溶液について(+5mV)、補正する。ノイズ分析について、200-msスイープを-100mVの保持電位において3Hzの速度で得、5kHzにおいてデジタル化し、2kHzにおいてAxopatch 200増幅器の内部Besselフィルターを用いて低域フィルタリングした。平均および分散は、デジタル化データの100-msセグメントから計算した。

20

【 0 1 5 1 】

データ解析

特に断りのない限り、全データは、2 μM La³⁺か、またはBAPTAによる受動的透析中のI_{CRAC}誘導前に収集されたトレースかのいずれかで、収集した漏洩電流について補正した。透過性比(P_{Cs}/P_{Na})は、以下の方程式を用いて2イオン性逆転電位(biionic reversal potential)から計算した：

$$\frac{P_{Cs}}{P_{Na}} = \left(\frac{[Na]_o}{[Cs]_i} \right) e^{\left(\frac{E_{rev} F}{RT} \right)}$$

R、T、およびFはそれらの通常の意味をもち、E_{rev}は逆転電位である。

【 0 1 5 2 】

序論

Ca²⁺は、ほとんどすべての細胞型における必須の二次メッセンジャーである。特に、原形質膜を横断する持続性Ca²⁺流入は、リンパ球活性化および適応免疫応答にとって重大である¹。Tリンパ球およびBリンパ球の表面抗原受容体による抗原認識は、複数のチロシンキナーゼの活性化、ならびに多様なアダプターおよびシグナル伝達タンパク質を含む大きな足場複合体の構築を含む、精巧なシグナル伝達カスケードを誘発する。初期の生化学的結果は、PLC の活性化であり、それは、IP₃を生成することにより小胞体(ER)からCa²⁺を放出する；結果として生じる内腔ER Ca²⁺における減少は、Ca²⁺放出活性化Ca²⁺(CRAC)チャネルと呼ばれている、非常に特異的な電気生理学的性質をもつ「貯蔵量作動性」Ca²⁺チャネルの類を開く¹⁻³。CRACチャネル開口は、結果として、原形質膜を横断するCa²⁺イオンの持続性流入を生じ、細胞内遊離Ca²⁺([Ca²⁺]i)レベルの持続性上昇を促進し、タンパク質ホスファターゼ、カルシニューリンを含む多様なCa²⁺/カルモジュリン依存性酵素を

40

50

活性化する；最終的結果は、増殖およびエフェクター免疫機能に必要とされるCa²⁺依存性転写経路の活性化である^{4,5}。主要なCa²⁺制御性転写因子の一つは、休止細胞の細胞質に存在する高度リン酸化タンパク質のファミリーである、NFATである⁵。持続性Ca²⁺流入は、結果として、カルシニューリンによるNFATの脱リン酸化を生じ、その核への移行を促進し、そこで、それは、多数の活性化関連遺伝子の発現を作動させる^{4,6}。

【0153】

大量の薬理学的、電気生理学的、および遺伝学的証拠が、CRACチャネルは発達中および成熟T細胞の両方におけるCa²⁺流入の主要な経路であり、それに従って、リンパ球発達および機能の本質的にすべての局面をうまく調整するという概念を支持している^{1,7}。細菌およびウイルス感染の顕著な性向を有する幼児として示される、遺伝性重症複合型免疫不全症(SCID)をもつ患者の2つの親族の分析により、主な欠陥が、患者のリンパ球における貯蔵量作動性Ca²⁺流入の欠如であることが明らかにされた⁸⁻¹⁰。患者の1親族由来のT細胞株の詳細な分析により、そのT細胞受容体を通して活性化された細胞、またはSERCA Ca²⁺ポンプのインヒビターであるタブシガルジンで処理された細胞における、貯蔵量作動性Ca²⁺流入の相応じての重度の障害に続発する、NFAT脱リン酸化、核移行、およびNFAT依存性遺伝子の活性化の重度の障害が明らかにされた¹⁰。患者のT細胞の電気生理学的分析により、CRACチャネル機能のほとんど完全な欠如が確認された¹¹。合わせると、これらのデータは、リンパ球活性化および免疫防御のためのCRACチャネルおよび貯蔵量作動性Ca²⁺流入の決定的な重要性を浮き彫りにしている。

【0154】

CRACチャネルの薬理学的および電気生理学的性質は、かなり詳細に記載されているが^{1,12,13}、その分子同定は、現在まで捕らえどころがないままであった。チャネルの重要な生物物理学的に顕著な特徴は、一価陽イオンを超えるCa²⁺への高選択性、低い单一チャネルコンダクタンス(<1 pS)、内向き整流性I-V関係、有意な電圧依存性開閉の欠如、細胞内Ca²⁺による迅速な非活性化、μM以下のLa³⁺による細胞外遮断、および2-APBによるチャネル性質の調節を含む^{1,13,14}。イオンチャネルのTRPファミリーに属するいくつかの候補遺伝子がCRACチャネルをコードすると提唱されており、TRPC1¹⁵、TRPC3¹⁶、およびTRPV6^{17,18}、加えて電圧依存性Ca²⁺(Ca_V)チャネル^{19,20}を含む。しかしながら、TRPが、いくつかの細胞株において異種性発現後、貯蔵量依存性であるという証拠は矛盾しており^{21,22}、候補はいずれも、CRACチャネルの生物物理学的性質の全部を示すわけではない。以前のSCID患者の細胞における配列分析および補完研究は、CRACチャネル機能の欠陥における、TRPC3、TRPV5、およびTRPV6を含むいくつかのTRPファミリーメンバーについての役割を確立することができなかった¹¹。最近になって、I型膜タンパク質STIM1およびSTIM2が、貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびCRACチャネル機能に必須であることが示された^{23,24}。STIM1は、ER Ca²⁺貯蔵の充満状態をそのEFハンドドメインを介して「感じ」、それに従って、貯蔵枯渇をCRACチャネルの開口に共役させることができ²⁵。しかしながら、STIM1もSTIM2もいずれも、SCID患者において突然変異しておらず、SCID T細胞におけるSTIM1の発現は、結果として、Ca²⁺流入欠陥の補完を生じなかった¹¹。

【0155】

ここで、本発明者らは、貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびCRACチャネル機能にとって重大な新規なタンパク質の同定を記載する。本明細書でOrai1と名付けられたタンパク質が、以下の2つの不偏性の遺伝的アプローチを用いて同定された：SCID患者において突然変異した遺伝子を同定するための変異連鎖解析、ならびに貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびNFAT核内への輸送の制御因子を同定するためのショウジョウバエにおけるゲノムワイドなRNAiスクリーニング。これらの2つのアプローチの組み合わせは、单一の候補遺伝子を突きとめた。本発明者らは、ショウジョウバエOraiのRNAi媒介性枯渇が、ショウジョウバエStimに対するRNAiと同じくらい効果的に貯蔵量作動性Ca²⁺流入を抑止することを示す。本発明者らはさらに、Orai1における点突然変異がSCID患者におけるCa²⁺流入欠陥の原因であること、およびSCID T細胞および線維芽細胞の野生型Orai1での補完が貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびCRACチャネル電流(I_{CRAC})を再構成することを示す。再構成された電流の薬理学的お

10

20

30

40

50

より電気生理学的性質は、対照T細胞における内因性 I_{CRAC} のそれらと区別できない。Orai1の一次配列は、4つの膜貫通ドメインを予測し、エピトープタグ付きOrai1の免疫細胞化学法は、そのタンパク質が原形質膜に、または近くに局在していることを示している。

【0156】

結果

ヘテロ接合性疾患保因者の表現型同定

2人のSCID患者は同族の両親の下に生まれ、SCID患者の親もSCID患者の親族のいずれの他のメンバーも免疫不全の臨床症状を示さなかつたため、常染色体劣性遺伝様式を示唆した(図1A)。さらに、SCID患者の両親由来のT細胞は、2mM細胞外 Ca^{2+} の存在下においてほとんど正常な貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入を示した¹⁰。親のT細胞における Ca^{2+} 流入の潜在的欠陥の仮面をはぐために、本発明者らは、タブシガルジン媒介性貯蔵枯渇後、 Ca^{2+} 流入の初速度(本明細書では、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化の初速度として定義される、 $d[Ca^{2+}]_i/dt$)を測定したが、2mMから0.2~0.5mMへ $CaCl_2$ の細胞外 Ca^{2+} 濃度を低下させることにより Ca^{2+} 流入の原動力を減少させた。これらの条件下で、両方の両親由来のT細胞におけるピーク Ca^{2+} レベルおよび Ca^{2+} 流入速度は、野生型対照T細胞に観察されたものの~50%またはそれ未満であった(図1B)。本発明者らは、この所見が、両親がSCID患者における原因突然変異のヘテロ接合性保因者であったという事実に起因する、潜在的遺伝子量効果を反映していると仮定した。

【0157】

本発明者らは、より拡大した系図においてそのような突然変異の他の潜在的ヘテロ接合性保因者を同定するためにこのアッセイを用いた。血液試料を19人の追加の親族メンバー(図1A)から入手し、T細胞株を作製し、 Ca^{2+} 流入表現型を、インビトロの表現型分析により評価した。13人の親族メンバーは、一貫して、8人の他の親族メンバーおよび親族でない対照由来のT細胞と比較して、ピーク Ca^{2+} 流入の低下および Ca^{2+} 流入の初速度の減少を示した(図1C)。2nM/s未満の Ca^{2+} 流入速度の任意のカットオフを、潜在的ヘテロ接合性疾患保因者と非罹患(ホモ接合性野生型)個体を区別するために用いた(図1C)。このカットオフでの、親族内の推定ヘテロ接合性保因者の分布は、常染色体優性遺伝様式と完全に適合するように思われる(図1A)。

【0158】

ゲノムワイドなSNPアレイスクリーニングによる連鎖マッピング

SCIDファミリーの23個のメンバー由来のゲノムDNAを、ゲノムワイドなSNPアレイを用いる遺伝子型決定に用いた。SNPデータは、2つの独立した連鎖解析を用いて評価した。第一の解析は、臨床表現型に基づいて常染色体劣性遺伝様式を仮定し、2人の患者、彼らの両親、彼らの罹患していない兄弟、および彼らの祖父母由来のDNAを解析した(図1Aにおいて灰色斜線部分により示された、系図A)。対照的に、第二の解析は、系図の残りを完全に独立した解析において利用した。ここでは、インビトロでの表現型解析による疾患突然変異のヘテロ接合性保因者を同定する本発明者らの能力に基づいて、常染色体優性遺伝様式を仮定した(図1Aにおいて緑色四角形により示された、系図B)。重要なことには、第一解析は、個体のヘテロ接合性表現型状態を考慮せずに(親35および36の親族は独立して処理する)、これらの2つの解析の結果が完全に独立しているように行った。従って、これらの2つの実行の分析を、3つの独立した系図(1つのホモ接合性マッピング実行および2つの非関連優性系図)から出たとみなし、これらからのパレメトリックLODスコアを単に加えるだけで統計学的にロバストな複合LODスコアを得ることができる(材料および方法参照)。

【0159】

劣性形質(系図A)のパラメトリック連鎖解析は、1.5~1.9のLODスコアをもつ6つの染色体上に6つの領域を同定した - これらのうちの1つはその遺伝子を含むことがほぼ確実であるが、この最大LODスコアが偶然、数倍に達することは十分に予想され、従って、ホモ接合性マッピングはこの遺伝子をマッピングするだけでは十分ではない。十分には、優性解析は、~3.8のLODスコアをもつ、ホモ接合性マッピング解析において同定された6つの

10

20

30

40

50

領域の1つと重複する、染色体12q24上に固有の領域を同定した。これらの2つの連鎖解析の組み合わせは、連鎖を支持する~500,000:1のオッズを表す5.7の高度に有意な累積LODスコアをもつ重複する~9.8Mb候補領域を限定した。この領域は、SNP_A-1514003およびSNP_A-1510776(115.49Mb~125.27Mb)の間に位置する。この結論の裏付けとして、ゲノムのいずれの他の領域もゼロを超える累積LODスコアを有しなかった。表現型解析に基づいたヘテロ接合性疾患保因者状態の間違った割当はこの大きさの偽陽性を生じるよりむしろ総合LODスコアを減少させるため、本発明者らの新規な劣性および優性解析の組み合わせは、突然変異体遺伝子への連鎖の非常に高い確率をもつゲノム領域を同定することに成功している。

【0160】

10

Ca^{2+} シグナル伝達または Ca^{2+} 結合における潜在的役割をもつこの領域における6つの既知の遺伝子(PLA2G1B、CABP1、P2RX7、P2RX4、CAMKK2、PITPNM2)のゲノム配列決定によって、エクソンまたは直接隣接したゲノム領域においていかなる突然変異も明らかにされなかった。しかしながら、それは、患者がヘテロ接合性であるPITPNM2における数個のSNPに基づいて、~9.8Mbから~6.5Mbまで候補ホモ接合性領域の範囲を絞り込むことを可能にした。~6.5Mb区間は~74個の遺伝子を含み、そのうちの16個は、「仮定上のタンパク質」または可能性のある遺伝子座として注釈を付けられていた(ヒトゲノムアセンブリー、NCBI build 35.1)。これらのうち、2つは、TMHMMおよびPhobiusアルゴリズムを用いて膜貫通ドメインを含むことが予想された(KIAA0152およびFLJ14466)^{25,26}。

【0161】

20

ショウジョウバエにおけるゲノムワイドなRNAiスクリーニングは貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入の新規な制御因子としてolif186F(dOrai)を同定する

位置クローニングの試みと並行して、本発明者らは、CRACチャネルの構成要素およびCRAC活性化へ導くシグナル伝達経路を同定する独立した方法として、ショウジョウバエにおいてNFAT制御因子についてのゲノムワイドなRNAiスクリーニングを行った。NFAT-GFP融合タンパク質を安定に発現するショウジョウバエS2R+細胞を、遺伝子発現のノックダウンに達するように~21,000個のショウジョウバエ遺伝子のそれぞれに対するアレイdsRNAと共に3日間インキュベートした。その後、細胞を、 Ca^{2+} 貯蔵を枯渇させるためにタブシガルジンで10分間刺激し、それに従って、貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入およびNFAT-GFPの核移行を活性化させた。その後、細胞を固定し、細胞を含むウェルをロボットにより写真撮影し、NFAT-GFPの細胞内分布を目視検査で評価した。枯渇がNFAT核移行に干渉する陽性候補の中に、いくつかの予想される Ca^{2+} /カルシニューリン/NFATシグナル伝達経路の制御因子があり、カルシニューリンB(CanB)、カルシニューリンA(CanA-14F)、およびショウジョウバエStimを含んだ^{24,27}。

【0162】

30

一つの陽性候補、olif186Fは、その3つのヒト相同体の1つをコードする遺伝子が、12q24におけるSCID突然変異に結びつけられる6.5Mbホモ接合性ゲノム領域内に位置したため(仮定上のタンパク質FLJ14466、NM_032790、NP_116179)、注目に値した。下記で考察する理由により、olif186Fおよび12q24におけるそのヒト相同体は、それぞれ、ショウジョウバエOrai(dOrai)およびヒトOrai1と名付けられた;他の2つのヒト相同体、第7染色体上に位置するC7orf19および第16染色体上に位置するMGC13024は、Orai2およびOrai3と名付けられた(図3A)。ショウジョウバエS2R+細胞において、dStimまたはdOraiのいずれかのRNAi媒介性枯渇は、NFAT-GFPの核移行および脱リン酸化を遮断した(図2B)。同様に、dSTIMまたはdOraiのいずれかのノックダウンは、S2R+細胞においてタブシガルジン誘導性 Ca^{2+} 流入を完全に阻害した(図2B)。これらのデータは、dSTIMおよびヒトSTIM1が、ショウジョウバエおよび哺乳動物細胞において、貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入およびCRACチャネル活性化にとって必須であるという以前の報告を確認し^{23,24,28}、dOraiをショウジョウバエ細胞における貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入の第二の新規な制御因子として同定する。

【0163】

40

Orai1はSCID患者において突然変異している

50

本発明者らのデータはdOraiを貯蔵量作動性Ca²⁺流入の第二の新規な制御因子として関係づけたため(図2)、およびヒトOrai1についての遺伝子がSCID患者においてホモ接合性である12q24領域に位置していたため、本発明者らは、SCID欠陥がヒトOrai1における突然変異と関連しているかどうかを求めた(図3)。図1Aに示された23人の個体(患者および彼らの親族)由来のゲノムDNAを配列決定することにより、本発明者らは、両方のSCID患者がOrai1のエクソン1におけるミスセンスの突然変異についてホモ接合性であることを見出した。Orai1のコード配列の271位(NM_032790の444位)の突然変異、C>T転移は、そのタンパク質(NP_116179、図3B)の91位において、高度に保存されたアルギニン残基の代わりにトリプトファンへの置換(R91W)をもたらす。突然変異した残基は、Kyte-Doolittle方法²⁹を用いてOrai1の疎水性を計算することにより予想される、Orai1における4つの可能性のある膜貫通セグメントの第一の最初に位置している(図3B、3C)。すべての13個の表現型的に予想されたヘテロ接合性疾患保因者(図1)は遺伝子型的には突然変異についてヘテロ接合性であるが(C/T)、健康な対照および非罹患親族メンバーは野生型対立遺伝子についてホモ接合性であった(C/C)。この位置における突然変異は、注釈付きSNPではなく(dbSNP Build 124)、これが単によくある多型であるという可能性はなくなる。この仮説を確認するために、本発明者らは、HapMapパネル(ユタ、イバダン(ナイジェリア)、東京、および北京からの合計270個体)全体においてこの多型をタイピングし、このパネルにおいて推定上の原因の「T」対立遺伝子の1つのコピーも見出さなかった(材料および方法、データ未提示)^{30, 31}。これらのデータは、C>T転移が一般的な集団においてよくある配列変異体ではないことを明白に示している；従って、その突然変異は、SCID患者の祖先において自発的に生じた可能性が高く、疾患に強く関連している。
10
20

【0164】

Orai1の発現はSCID T細胞における貯蔵量作動性Ca²⁺流入を回復させる

本発明者らは、Orai1が、SCID患者由来のT細胞および線維芽細胞において野生型および突然変異体Orai1のN末端およびC末端エピトープタグ付き型を発現することによりSCID T細胞(および線維芽細胞)におけるCa²⁺流入欠陥を補完するかどうかを求めた。バイリストロン性IRES-GFPベクターを用いるSCID T細胞または線維芽細胞におけるMyc-Orai1^{WT}のレトロウイルス発現は、GFP陽性細胞においてタブシガルジン処理に応答してCa²⁺流入を回復させたが、GFP陰性細胞においては回復させず、一方、突然変異体R91>W Orai1(Myc-Orai1^{R>W})のレトロウイルス発現はCa²⁺流入を回復させなかった。Myc-Orai1^{R>W}の、SCID T細胞および線維芽細胞においてCa²⁺流入を回復させる能力の欠如は、突然変異体および野生型タンパク質が等価レベルで存在し、かつ免疫プロッティング(データ未提示)および免疫細胞化学により判定される場合、原形質膜に、または近くに類似して位置しているようと思われるため、Myc-Orai1^{WT}と比較した、Myc-Orai1^{R>W}の異常発現のせいではなかった。本発明者らは、N末端およびC末端の両方が細胞質に配向し、そのため、抗体に近づきにくいというトポロジーと一致して、抗myc抗体で非透過性細胞を染色することができなかつた(図3C)。
30

【0165】

顕著には、Myc-Orai1^{WT}で再構築されたSCID T細胞(および線維芽細胞)におけるCa²⁺流入は、2~20mM細胞外Ca²⁺が存在する場合、刺激されていないT細胞(または線維芽細胞)において生じなかつたが、タブシガルジンでの貯蔵枯渇後のみ観察された(図5A~5D)。CRACチャネルを通しての貯蔵量作動性Ca²⁺流入の決定的な特徴である、Orai1発現細胞におけるCa²⁺流入の回復が貯蔵枯渇に依存すること、および恒常に開いたCa²⁺チャネルの発現または活性化のせいではないことを実証しているため、これは重要な所見である。Myc-Orai1^{WT}もまた、TCR架橋に応答してのSCID T細胞における貯蔵量作動性Ca²⁺流入を回復させた。Orai1で補完された、SCID T細胞および線維芽細胞におけるタブシガルジン誘導性およびTCR誘導性Ca²⁺流入の薬理学的特性は、まさしく、CRACチャネルを通してのCa²⁺流入について予想されたものであった^{12, 32}。75 μM 2-APBまたは2 μM La³⁺での処理は、Ca²⁺流入を阻害し(図5A、5C、5D)、一方、低用量の2-APB(3 μM)での処理は、[Ca²⁺]_iの明瞭なさらなる増加を引き起こしたが(図5B)、Orai1^{WT}発現SCID T細胞における増加は、対照T細
40
50

胞におけるものよりわずかに低かった(～15%対～23%)。まとめて考えると、これらの結果は、Orai1が、SCID患者のT細胞および線維芽細胞におけるCa²⁺流入欠陥の原因となる遺伝子であるということを明らかに示している。

【0166】

Orai1の発現はSCID T細胞におけるI_{CRAC}を回復させる

前の実験で見られたCa²⁺流入の回復は、患者の細胞における活性CRACチャネルの再構成を反映することができた、またはCRACとは異なる、貯蔵量作動性Ca²⁺透過性イオンチャネルの発現(または活性化)から起こることができた。これらの可能性の間を区別するために、本発明者らは、ホールセルパッチクランプ構造を用いて、野生型または突然変異(R91W)Orai1で再構成されたSCID細胞における貯蔵枯渇から生じる電流を詳細に特徴付けた。SCID T細胞に、バイリストロン性IRES-GFPベクターにおけるOrai1をレトロウイルスで形質導入し、上記のように、Orai1を発現する細胞を、GFP蛍光により同定した。本明細書に示された実験において、貯蔵枯渇は、パッチピペットに8mM BAPTAを含むことによるか、またはタブシガルジンでの処理によるかのいずれかにより達成させた。

【0167】

野生型Orai1で再構成されたSCID細胞において、パッチピペットにおける8mM BAPTAの包含は、20mM Ca²⁺における内向き電流のゆっくりした発生、続いて、細胞全体の侵入を引き起こし、貯蔵枯渇に応答したI_{CRAC}の発生を連想させる(図4A)^{2,3}。対照的に、Orai1のR91W突然変異体を発現するSCID T細胞は、この突然変異体タンパク質の貯蔵量作動性Ca²⁺流入を再構成する能力の欠如から予想されるように、BAPTA(図4C)またはタブシガルジン(データ未提示)のいずれの貯蔵枯渇後にもいかなる内向きCa²⁺電流を出現させることができなかった。Orai1再構成SCID T細胞において観察された電流は、I_{CRAC}の多くの重要な顕著な特徴を示した^{11,33,34}。第一に、唯一の電流キャリアがNa⁺である、Ca²⁺およびMg²⁺を欠く二価を含まない溶液(DVF)を、20mM Ca²⁺における電流の完全発生後に加えた場合、最初はCa²⁺電流よりずっと大きいが数十秒間に渡って減少する、内向きNa⁺電流が観察された(図4A)。脱増強(depotentiation)として知られたこのNa⁺電流の減少は、ジャーカットT細胞、RBL細胞、およびヒトT細胞株におけるCRACチャネルの特徴を示す^{11,33,34}。第二に、Ca²⁺およびNa⁺電流の両方は、内向き整流性電流-電圧(I-V)関係を示した(図4B)。20mM Ca²⁺における内向き電流の逆転電位は>+90mVであり、公知のCa²⁺に対するCRACチャネルの高選択性と一致したが、二価を含まない溶液における逆転電位は49±2mV(n=4細胞)であり、チャネルはパッチピペットにおいてCs⁺イオンに対して弱い透過性であるのみで(P_{Cs}/P_{Na}=0.14)、一価イオンに対するCRACチャネルの選択性と一致した^{33,35}。第三に、Orai1補完電流のノイズ特性は、野生型T細胞におけるCRACチャネルのそれらと一致した(図4D)³³。Na⁺電流の脱増強中、分散は、29±4 fA(n=4細胞)の平均傾きで平均電流と線形に減少し、I_{CRAC}の以前の測定のそれと類似して単位電流の下限推定値を提供した。さらに、Orai1での補完に起因するCa²⁺電流は、20mM Ca²⁺において高速不活性化を示した(図4E)；不活性化の程度および時間経過は、ジャーカットT細胞におけるCRACチャネルについて以前に報告されたそれと類似した(電流は200ms内に-100mVにおいて54±5%不活性化する； fast: 9±2ms； slow: 84±12ms)³⁶。そして最後に、再構成された電流の薬理学的な顕著な特徴は、2 μM La³⁺による完全な遮断(図4F)、高用量の2-APBによる阻害(図4G)、および低用量の2-APBによる増強(図4G)を含んだ；さらに、高用量の2-APBで観察された遮断は、高速不活性化の損失により達成された³²。Orai1の発現によるCRAC電流の完全補完(図4H)とCa²⁺イメージングにより観察されたCa²⁺流入の部分的補完の間の不一致は、I_{CRAC}の測定について、本発明者らは高GFP/Orai1レベルをもつT細胞を選択したが、単一細胞Ca²⁺イメージングについて、本発明者らはすべてのGFP/Orai1陽性細胞の応答(明るいおよび薄暗いの両方)を平均したという事実により説明されうる。

【0168】

要約すれば、Orai1でのSCID T細胞の再構成は、貯蔵量作動性Ca²⁺流入だけでなく、貯蔵依存性、イオン選択性および単位コンダクタンス、開閉の性質、および薬理学的プロファイルに関してI_{CRAC}と同一である電流も回復させる。従って、本発明者らは、Orai1がT

10

20

30

40

50

細胞におけるCRACチャネルに必須であると結論する。Orai1で補完された、SCID T細胞に観察されるチャネルの細孔性質および薬理学的特性は、真正のCRACチャネルのそれらと区別できない。

【 0 1 6 9 】

考察

本明細書で、本発明者らは、貯蔵量作動性Ca²⁺流入の進化的に保存された構成要素およびI_{CRAC}の必須貢献因子であるとOrai1を同定する。本発明者らは、Orai1における点突然変異が、重症複合型免疫不全症(SCID)のまれな型をもつ2人の患者における貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびICRAC機能の遺伝的欠陥の原因であることを示す^{10,11}。欠陥のある遺伝子としてのOrai1の同定は、2つの独立した遺伝分析の相乗的組み合わせを通して達成され、両方の分析は不偏のゲノムワイドなスクリーニングを含んだ。

【 0 1 7 0 】

本発明者らの第一のスクリーニングは、SCID疾患に結びつけられた染色体領域を同定するゲノムワイドなSNP分析を用いた。たった2人の罹患個体が存在するだけのため、伝統的連鎖解析から理論的に到達できるLODスコアは~1.9であり、連鎖を確立するために必要な3.0値より有意に低い。実際、2人のSCID患者、彼らの両親、および彼らの祖父母を含む小さな系図の解析は、1.9の最大LODスコアを以て、6つの別々の染色体上に6つの領域を同定した(系図A)。利用できる遺伝的情報量を拡大するために、本発明者らは、突然変異体対立遺伝子のヘテロ接合性保因者を同定する方法を考案した。これは、貯蔵量作動性Ca²⁺流入を測定する本発明者らのインビトロ方法の簡単な改変を通して達成され、Ca²⁺流入の作動力が、細胞外Ca²⁺濃度を低下させることにより減少した。このアッセイがSCID患者の21人の追加の親族メンバー(系図B)に由来するT細胞株に適用された場合、13人のメンバーは、Ca²⁺流入の初速度の有意な低下を示し、本発明者らは、突然変異体対立遺伝子についてのヘテロ接合性と一致した遺伝子量効果を反映していると解釈する。第二に、これらの13人の推定ヘテロ接合性個体のハプロタイプが残りの8人のホモ接合性の健康な親族メンバーのそれと比較される、完全に独立した連鎖解析は、実験的LODスコアを生じ、3.8のLODスコアを有する12q24上の固有の領域を同定した。この領域は、系図Aの連鎖解析により同定された領域の1つと重複した。各解析に用いられた個体およびそれらを分類するために用いられた表現型は異なったため、対立遺伝子の共有およびそれに従っての連鎖結果はこれらの解析において完全に独立していた；このゆえに、本発明者らは、2つの解析からのLODスコアを組み合わせて、12q24における~9.8Md領域について~5.7の不偏累積かつ高有意性のLODスコアを得ることができた。原理上は、この連鎖マッピングアプローチの新規かつ強力な組み合わせは、ほんのわずかな罹患個体が利用可能であるだけで、通常のホモ接合性マッピングが連鎖を確立できない場合でさえも、他のまれな常染色体劣性疾患の遺伝子的原因を解明するために適用されうる。必要条件は、他の親族メンバーが利用できること、および1つの対立遺伝子の突然変異がインビトロで定量化可能な形質として検出されうることである。

【 0 1 7 1 】

貯蔵量作動性Ca²⁺流入に関する12q24における遺伝子を迅速に同定することを期待して、本発明者らは、ショウジョウバエS2R細胞がCRACと非常に類似した特性をもつ貯蔵量作動性Ca²⁺チャネルを含むという事実をうまく利用して、ショウジョウバエにおいて並列ゲノムワイドなRNAiスクリーニングを行った³⁷。Ca²⁺流入にもっぱら焦点を合わせるというよりむしろ、本発明者らは、Ca²⁺制御性転写因子NFATの進化的に保存された制御因子を同定するようにスクリーニングを設計した；Ca²⁺制御性NFATタンパク質はそれ自体、ショウジョウバエにおいて示されていないが、Ca²⁺ホメオスタシス、貯蔵量作動性Ca²⁺流入、カルシニューリン活性、およびキナーゼ-ホスファターゼバランスに対する効果を通してのその核-細胞質往復を制御する経路の強い進化的保存がある²⁷。スクリーニングは、RNAi媒介性枯渇が、タブシガルジンでの刺激に応答したNFAT-GFP融合タンパク質の核局在化に干渉をもたらした候補を同定するために用いられた。陽性候補の中に、olf186F(本明細書では、ショウジョウバエOraiと新たに命名された)があり、それは3つのヒト相同体、FLJ1

10

20

30

40

50

4466、C7Orf19、およびMGC13024を有する。これらは機能不明の新規なタンパク質であるため、本発明者らはそれをそれぞれ、Orai1~3と名付けた。ギリシャ神話において、Oraiは天国の門の番人である：Eunomia(秩序または調和)、Dike(正義)、およびEirene(平和)³⁸⁻⁴⁰；日本においては、Oraiは、英語での「all right」の音に一部由来し、日本語での行ったり来たりすること、通信、通り、および交通も指す。本発明者らの二重ストラテジーの確証に達するにおいて、Orai1(仮定上のタンパク質FLJ14466)をコードする遺伝子は、染色体12q24、正確には、SCID症候群に遺伝学的に結びつけられる、本発明者らのSNP分析により同定された領域に位置する。DNA配列決定により、Orai1のエクソン1における点突然変異(C>T)としてのSCID欠陥の遺伝的根拠が速やかに明らかにされ、その点突然変異は、結果として、残基91位におけるアルギニンからトリプトファンへの置換を生じた。この突然変異は、国際HapMapプロジェクトのために構築された混合民族的背景の270個体由来のDNAを配列決定することにより確認されたように、既知の多型ではない³¹。この試料の数は、ほとんど全部のハロタイプを5%またはそれ以上の頻度で見出すのに十分である。C>T突然変異が小さな民族集団に限定したSNPであり、HapMapパネルにおいては示されないという小さな偶然があるが、この可能性は、Orai1での補完がSCID患者細胞において貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびI_{CRAC}を回復させるという事実に基づく合理的な確信をもって排除されうる。さらに、SCID患者において突然変異しているアルギニン91位は、種にまたがって高度に保存されている推定膜貫通領域に位置しており(図3A)、Orai1の機能におけるその潜在的重要性を浮かび上がらせている。

【0172】

Orai1補完SCID T細胞におけるCa²⁺流入およびCa²⁺電流の特性は、対照T細胞において観察されるそれらと区別できなかった。特に、両方の過程は、貯蔵枯渇により厳密に制御され、回復した電流の電気生理学的および薬理学的性質は、I_{CRAC}のそれらと完全に一致した。これらの性質には以下が挙げられる：一価陽イオンを超えるCa²⁺に対する極めて高い選択性、内向き整流性I-V関係、二価を含まない条件下での脱増強、電流ノイズ特性、急速なCa²⁺依存性不活性化、低マイクロモル濃度La³⁺による遮断、ならびに2-APBによる正および負の調節。それゆえに、本発明者らは、Orai1がSCID患者のT細胞においてI_{CRAC}を再構成したこと、ならびに従って、Orai1コード領域およびタンパク質におけるC>T転移および結果として生じるR91W突然変異がSCID欠陥の原因であることを結論づける。その特定の役割はまだ決定されていないが、入手できるデータは、Orai1が原形質膜におけるチャネルサブユニットまたは密接に関連したチャネル制御因子をコードするという可能性と一致している。第一に、Orai1のヒドロパシープロフィールは、3つ、または場合によっては4つの疎水性膜ドメインを有する膜タンパク質を予想する(図3B)。第二に、mycタグ付きOrai1の免疫細胞化学は、休止条件下の原形質膜における局在と一致している；この分布はSTIM1のそれと異なる。STIM1は、主にERに位置し、その内腔EFハンドドメインを介してCa²⁺貯蔵枯渇を感知すると考えられている(Feske 2005, Liou 2005, Ref)。顯著には、Orai1上のN末端およびC末端エピトープタグの両方は、非透過性細胞において抗体染色に近づきにくい；この所見は、4つの膜貫通ドメインの予測と一致し、N末端およびC末端の両方が細胞質に配向しているチャネルサブユニットと矛盾しないトポロジーを予測する(図3C)。Orai1がCRACチャネル自体の一部であるかどうか、またはそれがチャネルの制御因子をコードするかどうかを決定するために、さらなる研究が必要である。

【0173】

Orai1は、mRNAレベルで広く発現しており、SCID患者由来のT細胞だけでなくB細胞および線維芽細胞も貯蔵量作動性Ca²⁺流入において実質的欠陥を示すという本発明者らの以前の観察を説明する可能性がある。しかしながら、驚くべきことに、SCID患者の臨床表現型は、主に免疫不全のものであり、一人の生存患者において、外胚葉性形成異常無汗症(EDA)および軽度先天性非進行性筋疾患を伴う。EDAは、歯のエナメル質および毛包機能の欠陥、ならびに汗腺の完全な欠如により特徴付けられ、多くの以前の研究は、それをNF-Bの低活性化に結びつけている⁴¹⁻⁴⁵。Ca²⁺動員は、T細胞および他の細胞型において特定の刺激条件下でNF-B活性化に寄与すると考えられ⁴⁶、従って、EDA症候群は、特定の細胞型に

10

20

30

40

50

おいて発達中かまたは急性にかのいずれかで、欠陥のあるNF-B活性化をよく反映している可能性がある。対照的に、筋疾患は、NFATが骨格筋発達および機能の特定の局面において果たす役割が大きいことを考慮すれば、欠陥のあるNFAT活性化の直接的結果である可能性がありうる(7,47に概説されている)。

【0174】

結論として、本発明者らの研究は、T細胞機能およびインビボの免疫応答におけるOrai1の重要な役割を確立している。線虫(*C. elegans*)からヒトまで保存された新規なタンパク質である、Orai1における单一の点突然変異は、遺伝性免疫不全症をもつ患者において貯蔵量作動性Ca²⁺流入およびCRACチャネル機能を乱す。さらなる研究は、Oraiタンパク質とStimタンパク質の間の関係、および貯蔵枯渇がCRACチャネル開口と共に役する機構に取り組む。

【0175】

参考文献

1. Lewis, R. S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521 (2001).
2. Hoth, M. & Penner, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-6 (1992).
3. Zweifach, A. & Lewis, R. S. Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6295-9 (1993).
4. Feske, S., Okamura, H., Hogan, P. G. & Rao, A. Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1117-32 (2003).
5. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5, 472-84 (2005).
6. Winslow, M. M., Neilson, J. R. & Crabtree, G. R. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 15, 299-307 (2003).

10

20

30

7. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-32 (2003).
8. Partisani, M. et al. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269, 32327-35 (1994).
9. Le Deist, F. et al. A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 85, 1053-62 (1995).
10. Feske, S., Giltnane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. & Rao, A. Gene regulation by calcium influx in T lymphocytes. *Nature Immunology* 2, 316-324 (2001).
11. Feske, S., Prakriya, M., Rao, A. & Lewis, R. S. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202, 651-62 (2005).
12. Parekh, A. B. & Putney, J. W., Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85, 757-810 (2005).
13. Parekh, A. B. & Penner, R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77, 901-930 (1997).
14. Prakriya, M. & Lewis, R. S. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33, 311-21 (2003).
15. Mori, Y. et al. Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med* 195, 673-81 (2002).
16. Philipp, S. et al. TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J Biol Chem* 278, 26629-38 (2003).
17. Yue, L., Peng, J. B., Hediger, M. A. & Clapham, D. E. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410, 705-9 (2001).
18. Cui, J., Bian, J. S., Kagan, A. & McDonald, T. V. CaT1 contributes to the store-operated calcium current in Jurkat T-lymphocytes. *J Biol Chem* 277, 47175-83 (2002).
19. Badou, A. et al. Requirement of voltage-gated calcium channel beta4 subunit for T lymphocyte functions. *Science* 307, 117-21 (2005).
20. Kotturi, M. F., Carlow, D. A., Lee, J. C., Ziltener, H. J. & Jefferies, W. A. Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem* 278, 46949-60 (2003).

21. Voets, T. et al. CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem* 276, 47767-70. (2001).

22. Venkatachalam, K., Van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Ma, H. T. & Gill, D. L. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4, E263-72 (2002).

23. Liou, J. et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-41 (2005).

24. Roos, J. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-45 (2005). 10

25. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-80 (2001).

26. Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338, 1027-36 (2004).

27. Gwack, Y. S., S. et al. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK as a novel regulator of NFAT. *Nature* (submitted; see example 2) (2005). 20

28. Zhang, S. L. et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-5 (2005).

29. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-32 (1982).

30. Altshuler, D. et al. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-320 (2005).

31. Consortium, T. I. H. The International HapMap Project. *Nature* 426, 789-96 (2003).

32. Prakriya, M. & Lewis, R. S. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 536, 3-19 (2001). 30

33. Prakriya, M. & Lewis, R. S. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg(2+)-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol* 119, 487-507 (2002).

34. Hermosura, M. C., Monteith-Zoller, M. K., Scharenberg, A. M., Penner, R. & Fleig, A. Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM. *J Physiol* 539, 445-58 (2002). 40

35. Lepple-Wienhues, A. & Cahalan, M. D. Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca^{2+} channels (ICRAC) in Jurkat T cells. *Biophys J* 71, 787-94 (1996).

36. Zweifach, A. & Lewis, R. S. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* 105, 209-26 (1995).

37. Yeromin, A. V., Roos, J., Stauderman, K. A. & Cahalan, M. D. A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells. *J Gen Physiol* 123, 167-82 (2004).

38. Stewart, M. "The Hours", Greek Mythology: From the Iliad to the Fall of the Last Tyrant. <http://messagenet.com/myths/bios/hours.html> (2005). 10

39. Homer. *Iliad* (Book 5) pp.749-50.

40. Homer. *Iliad* (Book 8), pp. 393-394.

41. Doffinger, R. et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet* 27, 277-85 (2001).

42. Courtois, G. et al. A hypermorphic $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 112, 1108-15 (2003). 20

43. Schmidt-Ullrich, R. et al. Requirement of NF- κ B/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* 128, 3843-53 (2001).

44. Puel, A., Picard, C., Ku, C. L., Smahi, A. & Casanova, J. L. Inherited disorders of NF- κ B-mediated immunity in man. *Curr Opin Immunol* 16, 34-41 (2004).

45. Smahi, A. et al. The NF- κ B signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 11, 2371-5 (2002).

46. Kanno, T. & Siebenlist, U. Activation of nuclear factor- κ B via T cell receptor requires a Raf kinase and Ca^{2+} influx. Functional synergy between Raf and calcineurin. *J Immunol* 157, 5277-83 (1996). 30

47. Horsley, V. & Pavlath, G. K. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 156, 771-4 (2002).

48. Feske, S., Draeger, R., Peter, H.H., Eichmann, K. and Anjana Rao. The Duration of Nuclear Residence of NFAT Determines the Pattern of Cytokine Expression in human SCID T Cells. *J Immunol* 165, 297-305 (2000).

49. Leykin, I. et al. Comparative linkage analysis and visualization of high-density oligonucleotide SNP array data. *BMC Genet* 6, 7 (2005). 40

50. Gudbjartsson, D. F., Jonasson, K., Frigge, M. L. & Kong, A. Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25, 12-3 (2000).

51. Markianos, K., Daly, M. J. & Kruglyak, L. Efficient multipoint linkage analysis through reduction of inheritance space. *Am J Hum Genet* 68, 963-77 (2001).

52. Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O. & Cardon, L. R. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30, 97-101 (2002).

53. Gabriel, S. B. et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225-9 (2002). 10

54. Zweifach, A. & Lewis, R. S. Calcium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 107, 597-610 (1996).

【0176】

実施例2: ゲノムワイドなショウジョウバエRNAiスクリーニングはDYRKを新規NFAT制御因子であると同定する

材料および方法

ゲノムワイドな一次スクリーニング

20

方法は参考文献^{12, 13}から適合させた。10⁴個のS2R⁺細胞を、10 μlの無血清培地中0.25 μgのdsRNAを含む各ウェルへ加え、26 ℃で1時間インキュベートした。その後、細胞に、シューナイダー培地(Invitrogen)(30 μl)においてNFAT1(1~460)-GFP発現プラスミド^{9, 17}(10ng)を一過性にトランスフェクションした。26 ℃で48~72時間のインキュベーション後、細胞を固定し、DAPIで染色し、同時発生的GFPおよびDAPI画像を自動カメラにより各ウェルにおける3つの異なる位置から得た。個々のdsRNAがアレイされている合計21,884個のウェルを含む合計58個の384プレートを分析した。

【0177】

対照ウェル(dsRNA無し、GFPに対するdsRNA、および細胞死を引き起こす遺伝子(thread抗アポトーシス(thread-anti-apoptotic))に対するdsRNA)は各プレートに存在し、各プレートのノックダウン効率についての内部対照としての役割を果たす。各アッセイウェルにおけるGFP蛍光の全3枚の写真に、MetaMorph 6.1 Software(Universal Imaging Corporation)を用いて手作業でスコアを付けた。NFAT局在性の弱いエフェクターまでも同定するために、3つのフィールドのそれぞれにおける1個の細胞のみがNFAT-GFPの完全な核局在化を示した場合でさえも、ウェルに陽性のスコアを付けるように、非ストリンジエントの基準を一次スクリーニングに用いた。RNAiライブラリーは、ショウジョウバエゲノムが完全に注釈を付けられる前に構築されたため、738個の陽性のうちの39個は、既知の遺伝子に対応しておらず、除去された。別の37個の候補は、それらを同定するために用いたdsRNAが、21ヌクレオチド(nt)の完全な一致をもつ10個より多くの予想される「オフターゲット」を有したため、除去された(下記のバイオインフォマティクスおよび分類を参照)。 30

【0178】

確証的スクリーニング

一次スクリーニングからの699個の陽性の可能性のある候補における確証的スクリーニングは、NFAT1(1~460)-GFPを安定にトランスフェクションしたS2R⁺細胞を用い、かつ候補を、それらの枯渇が休止細胞および刺激されたS2R⁺細胞の両方におけるNFAT細胞内局在を変化させるかどうかについて試験したこと以外、本質的には、一次スクリーニングについて記載されているように行った。全細胞が細胞質NFAT-GFPを含むウェルは最低スコア(0)を得、細胞の>90%が核NFAT-GFPを示すウェルには最高のスコア(3)が付けられた。すべての3つの実験から総計されたスコアは表1に提示されている。最高の可能なスコアは9であるが、本発明者らは確証的スクリーニングにおいて控えめにスコアを付けたため、任意の 40

40

50

候補により得られる最高の実際のスコアは6であることに留意されたい。全候補はまた、それらが、タブシガルジン(1 μM、30分間)で処理された細胞におけるNFAT核局在化を阻止するかどうかについて試験した；ショウジョウバエSTIM(dSTIM)のみがこのアッセイにおいて陽性のスコアを付けた。

【0179】

安定に発現する細胞株を作製するために、NFAT1(1～460)-GFP融合タンパク質のコード配列を、発現プラスミドpAc5.1(Invitrogen)へサブクローニングし、マクロファージ-血球様ショウジョウバエ細胞株S2R⁺に、比率19:1の発現プラスミド対pCoHygro(Invitrogen)(恒常的活性プロモーターの制御下でハイグロマイシン抵抗性遺伝子をコードする)をEffectene(Qiagen)を用いて6ウェル型式においてトランスフェクションした。細胞を300 μg/m²ハイグロマイシンで3～4週間選択し、安定なクローンを目視検査によって選択した。 10

【0180】

バイオインフォマティクスおよび分類

スコアを、DRSC(Drosophila RNAi Screening Center at Harvard Medical School)への提出のために整理統合して、書式設定し、その後、アッセイされた遺伝子の独自性(identity)(FlyBase識別子；既知の場合、ショウジョウバエ遺伝子名；いくつかの遺伝子オントロジー(Gene Ontology)(GO)識別子；およびいくつかのヒト相同体)を提供した。遺伝子オントロジー(GO)アノテーションは2つの方向で検索された。第一に、本発明者らは、各遺伝子についてのFlyBase識別子を使用するEnsembl's EnsMartツールを用いてGO記載を得た。第二に、本発明者らは、スクリーニングセンターにより提供されたGO識別子を用いて、遺伝子オントロジーコンソーシアム(Gene Ontology Consortium)から「GO用語およびID」ファイルからの記載を得た。遺伝子の機能能力テゴリーは、陽性のキーワード検索、続いて手作業のキュレーション(curation)により構築した。陽性遺伝子はまた、KEGG経路データベースにおけるものなどのツールを用いて一般的な経路への関与について調べた。 20

【0181】

一次スクリーニングにおいて陽性であった各候補について、オフターゲットの数を、DRSCウェブサイト(http://www.flyrnai.org/RNAi_primer_design.html)上のオフターゲット配列検索ツールを用いて決定した。このバイオインフォマティクスのツールは、それが一体型プライマー設計構成要素を有しないこと以外、参考文献³⁷におけるそれと類似したアルゴリズムに基づいている(Flockhart et al., 投稿済み)。単位複製配列(dsRNA)配列は、リリース4.0におけるハエ転写産物の配列に完全に一致する、21bpのデフォルト値をもつ長さ16～50bpのすべての可能性のある断片を検討することにより、予想されるオフターゲットについて検索される。理想的には、標的とされたmRNAに対応する1つの一致のみが見出されるべきであるが、いくつかの単位複製配列は、意図された標的ではない他のmRNAとの一致を有する。表Iにおける遺伝子について、21ntのデフォルトの長さを、各陽性候補についてのオフターゲットの数を計算するために用い、>10個のオフターゲットを有する候補を除去した。表II(カルシニューリン)およびIII(追加の実験に用いられる候補)における遺伝子について、19ntおよび20ntのより短い断片を同様に検討した。オフターゲットの独自性は、ショウジョウバエNCBI RefSeqデータベースに対してBLASTNを用いて決定した。表Iにおけるキイロショウジョウバエタンパク質の哺乳動物オルソログは、NCBI Homologeneデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=homologene>)から検索した。ハエのキナーゼのヒト相同体は、記載されているように^{38, 39}、BLASTP(Altschul, et al. 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)を用いた相互blast方法により得た。系統発生解析は、TCoffee⁴⁰を用いて行い、オルソログ割当の信頼性は、Orthostrapper⁴¹により実行されるブートストラップ方法で評価した。 30 40

【0182】

ショウジョウバエ細胞におけるdsRNA媒介性ノックダウン

PCR断片(最高600bpまでのサイズ)を、インビトロ転写反応のための鑄型として用い、続いて、鑄型DNAを除去するためにDNアーゼI処理を行った。精製後、dsRNA(5 μg)を、8チャンバースライドにおいて(12ウェルプレートについては10 μg)、NFAT-GFP発現プラスミド 50

と共にS2R⁺細胞へ同時トランスフェクションした。インキュベーションの72時間後、局在性アッセイのために、細胞を未処理のままにしておくか、またはCa²⁺流入誘導物質、1 μM イオノマイシンもしくは1 μMタブシガルジンで処理し、そして、[Ca²⁺]_iレベルの測定のためにトリプシン処理した。

【 0 1 8 3 】

インビトロキナーゼアッセイ

FLAGタグ付きヒトキナーゼを、抗FLAG抗体結合型プロテインGビーズ(Sigma)を用いて一過性にトランスフェクションしたHEK293細胞の細胞全体の可溶化物から免疫沈降させ、免疫沈降物を、細菌細胞に発現させたNFAT1制御ドメイン全体(GST-NFAT1[1-415])か、またはNFAT1のSRR-1(アミノ酸149～183位)、SP-2(アミノ酸206～237位)、およびSP-3(アミノ酸264～295位)モチーフに対応するGST融合ペプチドのいずれかのリン酸化について分析した(野生型、およびインビボでリン酸化されるセリンにおけるSer Ala突然変異体の両方)¹⁰。免疫複合体を、溶解緩衝液(1.0%NP-40、50mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、5mM EDTA、5mM EGTA、1mMジチオスレイトール[DTT]、20mM -グリセロール-リン酸、10mMピロリン酸ナトリウム、0.1mMオルトバナジウム酸ナトリウム、10mM NaF、1mMフッ化フェニルメチルスルホン酸[PMSF]、10 μg/mlアプロチニン、10 μg/mlロイペプチド)で2回、およびキナーゼ緩衝液(20mM HEPES、pH7.4、20mM MgCl₂、1mM DTT、0.1mMオルトバナジウム酸ナトリウム、20mM -グリセロール-リン酸)で2回洗浄し、20 μM ATP、2 μCi[³²P]-ATP、および10 μgの野生型または突然変異体GST-ペプチド基質の存在下、最終容量40 μlのキナーゼ緩衝液において30 で20分間インキュベートした。ペプチドは、グルタチオン-セファロース上で単離し、リン酸化はSDSゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーにより評価した。

【 0 1 8 4 】

GST-NFAT1融合ペプチドをリン酸化するDYRK1AおよびDYRK2の能力を、20 μM ATP、2 μCi[-³²P]-ATP、および10 μgのGST-ペプチド基質の存在下、最終容量40 μlのキナーゼ緩衝液において20ngの組換えタンパク質キナーゼ(Upstate Biotechnology)を用いて調べた。NFAT1をリン酸化するGSK3の能力を、1Uの組換えタンパク質キナーゼA(PKA)(New England Biolabs [NEB])、20ng DYRK1AまたはDYRK2を用いてグルタチオンセファロースビーズにあらかじめ結合したGST融合タンパク質を1mM非放射性ATPの存在下で30 で16時間、まずプレリン酸化することにより調べた。非放射性プライミング後、融合タンパク質を、組換えキナーゼおよびATPを除去するために繰り返し洗浄した。その後、リン酸化融合タンパク質を、最終容量40 μlのキナーゼ緩衝液において、20 μM ATP、2 μCi[-³²P]-ATPの存在下、45分間、1UのGSK3(NEB)とインキュベートした。

【 0 1 8 5 】

レポーターアッセイおよびIL-2発現アッセイ

pOZベクター⁴²においてHAタグ付き完全長NFAT1を安定に発現する指數関数的に増加中(10⁷個)のジャーカットT細胞に、250Vおよび960 μFにおけるエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。ルシフェラーゼ実験について、細胞に、0.5 μg pRLTKレポーター(内部対照としてレニラ(Renilla)ルシフェラーゼ)、5.0 μg pGL3レポーター(ホタルルシフェラーゼ、実験プロモーター)、および空ベクター、野生型DYRK2、またはキナーゼ不活性型(kinase dead)DYRK2をコードする発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後、未処理のままにしておいた細胞、またはPMA(20nM)、イオノマイシン(1 μM)、および2mM CaCl₂で6時間刺激した細胞を、Dual-Luciferase Reporter Assay(Promega)を用いて製造会社により推奨されるとおり、レポーター遺伝子活性について測定した。細胞内サイトカイン染色について、細胞に、GFPをコードしたプラスミド、および空ベクタープラスミド、野生型DYRK2、またはキナーゼ不活性型DYRK2を同時トランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後、未処理のままにしておいた細胞、またはPMA(20nM)、イオノマイシン(1 μM)、および2mM CaCl₂で6時間、最後の4時間についてはブレフェルジンA(2 μg/ml)の存在下で刺激した細胞を、PBS中4%パラホルムアルデヒドで25 で20分間固定し、PBSで2回洗浄し、サポニン緩衝液(PBS、0.5%サボ

10

20

30

40

50

ニン[Sigma]、1%BSA、および0.1%アジ化ナトリウム)において透過処理し、フィコエリトリン結合ラット抗ヒトIL-2(PharMingen)で25度30分間染色した。細胞をPBSにおいて2回洗浄し、FACSCaliburフローサイトメトリー(Becton Dickinson)およびFlowJoソフトウェアで分析した。

【0186】

DYRK1AのsiRNA媒介性ノックダウン

NFAT1(1~460)-GFPを安定に発現する 0.5×10^6 個のHeLa細胞を、6ウェルプレートに播種し、翌日、リポフェクタミン2000トランスフェクション試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて製造会社のプロトコールに従い、対照siRNAまたはヒトDYRK1A siRNAに対応するsiRNA(Dharmacon, Inc., Lafayette, CO)をトランスフェクションした。細胞を再播種し、ノックダウンの効率を増加させるためにトランスフェクション手順を24時間後に繰り返した。細胞を、免疫プロット分析または免疫細胞化学法のためにトランスフェクションから4日後に収集した。DYRK転写産物レベルをリアルタイムRT-PCRにより測定した。DYRK1Aについての閾値サイクル(C_T)を、GAPDHハウスキーピング遺伝子発現レベルに対して標準化し(C_T)、 $0.5^{C_T-10^4}$ (任意の単位)としてプロットした。siRNA配列は、

DYRK1A: AGGUGGAGGUGCAAUUAUUA (SEQ ID NO:

31); スクランブル対照: CUUUAAGCCUCGAGAUUAUUA (SEQ ID NO: 32)

に対応する。RT-PCRプライマー配列は

DYRK1A センス: AGTTCTGGGTATTCCACCTGCTCA

(SEQ ID NO: 10), DYRK1A アンチセンス: TGAAGTTACGGGTTCCCTGGTGGT (SEQ ID NO: 11)

に対応する。

【0187】

微速度撮影ビデオイメージングによる細胞内カルシウム測定

HEK 293T細胞を、UV滅菌カバースリップ上で直接増殖させ、 Ca^{2+} 指示薬色素Fura-2 AM(3 μM 、Molecular Probes, Eugene, OR)を室温で45分間負荷し、洗浄し、負荷培地(RPMI + 10%FCS)に再懸濁した。レシオメトリック Ca^{2+} ビデオイメージングについて、カバースリップを閉鎖型槽RC-20フローチャンバー(Warner Instrument Corp., Hamden, CT)上に載せ、2mMカルシウムリンガー液(155mM NaCl、4.5mM KCl、10mM D-グルコース、5mM Hepes(pH 7.4)、1mM MgCl_2 、2mM CaCl_2)において灌流した。 Ca^{2+} を含まないリンガー液(2mM Ca^{2+} が2mM MgCl_2 で置換された)への切り換え後、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵を1 μM タブシガルジンで枯渇させ、貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入を、2mM CaCl_2 を含むリンガー液で細胞を灌流した後、測定した。単一細胞ビデオイメージングを、OpenLabイメージングソフトウェア(Improvision, Lexington, MA)を用いてS200倒立エピ蛍光顕微鏡(Zeiss, Thornwood, NY)で行った。Fura-2発光を、340nmおよび380nmでの励起後、それぞれ、510nmで検出し、340/380の比をバックグラウンド引き算後、5秒間隔ごとに計算した。較正值(R_{\min} 、 R_{\max} 、 S_f)は、以前に記載されているように⁴³、キュベット測定から導いた。各実験について、約50~100個の細胞を分析した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ およびDYRK2発現の同時測定について、ジャーカットT細胞に、1:0:1の比率でDYRK2 cDNAおよびeGFPを同時トランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後、細胞を、上記のように Ca^{2+} イメージングに用いた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、GFP⁻(すなわち、DYRK2⁻)、およびGFP⁺(すなわち、DYRK2⁺)の単一細胞分析について、細胞をゲーティングし、別々にプロットした。

【0188】

フローサイトメトリーによる細胞内カルシウム測定

S2R+細胞をトリプシン(CellGro, Herndon, VA)でディッシュから脱離させ、 Ca^{2+} 指示薬色素Fluo4-AM(2 μM Molecular Probes, Eugene, OR)を室温で45分間負荷し、その後、負荷培地(RPMI + 10%FCS)に再懸濁した。フローサイトメトリーの Ca^{2+} 測定直前に、細胞を Ca^{2+} を含まないリンガー液に再懸濁し、FACSCalibur(BD Biosciences, San Jose, CA)で分

10

20

30

40

50

析した。細胞内Ca²⁺貯蔵を枯渇させるための、Ca²⁺を含まないリンガーにおけるタブシガルジン(3 μM)の添加から180秒後、2mM Ca²⁺の最終濃度に達するように4mM Ca²⁺リンガー液を細胞へ加えた。その後、細胞Ca²⁺レベルをFloJoソフトウェア(Tree Star, Inc., Ashland, OR)を用いて分析した。

【0189】

候補キナーゼのヒトオルソログのサブクローニング

キナーゼ候補のヒトオルソログをコードする完全長cDNAを、Flexgene Kinase Repository(Harvard Institute of Proteomics)^{3,6}またはMammalian Gene Collection(MGC, Open Biosystems)から得、N末端にFlagタグの挿入を含むpENTRY.11(Invitrogen)ベクターへサブクローニングし、その後、pDEST12.2(Invitrogen)へ再結合させた。キナーゼ不活性型DYRK2は、PCRに基づいた方法(QuikChange Site-Directed Mutagenesis, Stratagene)を用いて活性部位のATP結合ポケットにK251R点突然変異を導入することにより構築し、ポリメラーゼ忠実性を保証するために配列決定した。

【0190】

序論および結果

NFATの細胞内局在性は、多様なシグナル伝達経路からの入力を含むシグナル積分の複雑な過程により測定される³⁻⁵。休止細胞において、NFATタンパク質は、高度にリン酸化され、細胞質に存在する；細胞内遊離Ca²⁺([Ca²⁺]i)レベルを上昇させる刺激に曝された細胞において、それらは、カルモジュリン依存性ホスファターゼカルシニューリンにより脱リン酸化され、核へ移行する^{3,6}。カルシニューリンによるNFATの脱リン酸化は、別個のNFATキナーゼ、中でも、CK1、GSK3、およびMAPキナーゼファミリーの様々なメンバーにより相殺される^{3,7-10}。NFATの転写活性は、N末端トランス活性化ドメインのリン酸化、共アクトベーターおよび共リプレッサーの補充、および核におけるパートナータンパク質の選択を含む追加の入力により制御される^{3,9,11}。

【0191】

本発明者らは、細胞内遊離Ca²⁺([Ca²⁺]i)レベル、カルシニューリン活性化、および細胞におけるNFAT局在性の制御因子を同定するために、ショウジョウバエS2R+細胞においてゲノムワイドなRNAiスクリーニングに基づく¹²⁻¹⁴ストラテジーを用いた。ストラテジーは、Ca²⁺制御性NFATタンパク質がショウジョウバエにおいて示されていないが、NFAT局在性を制御する、Ca²⁺ホメオスタシス、Ca²⁺流入、およびカルシニューリン活性の経路は進化的に保存されている^{15,16}。この点を確証するために、本発明者らは、GFP融合タンパク質NFAT1(1~460)-GFP(本明細書では、NFAT-GFPと呼ばれる)を用いた¹⁷。NFAT-GFPは、カルシニューリンおよびCK1のドッキング部位、核局在化シグナル(NLS)、ならびにNFAT1細胞内局在性およびDNA結合親和性を調節する保存されたセリンリッチ領域(SRR)およびセリン-プロリンリピート(SP)モチーフを含む、NFAT制御ドメイン全体を含む^{3,9,10,17}(図6A)。NFAT-GFPは、ショウジョウバエS2R+細胞において正しく制御された：それは、休止状態下でリン酸化され、適切に細胞質へ局在し、SERCAインヒビタタブシガルジンでのCa²⁺貯蔵枯渇に応答して脱リン酸化し、核へ移行した(図6B)；それは、S2R+細胞および哺乳動物HeLa細胞において類似した動力学で核へ移入した。限界量のタブシガルジンで処理されたS2R+細胞は、NFAT-GFPのリン酸化中間型を示し、制御ドメインの個々の保存されたモチーフ内のセリンの進行性脱リン酸化を反映している可能性が最も高い^{9,10}。最後に、S2R+細胞におけるRNAiによる主なNFAT制御因子、カルシニューリンの枯渇は、NFAT-GFPのタブシガルジン依存性脱リン酸化および核移行を阻害した(表II)。合わせると、これらの実験は、NFATリン酸化および細胞内局在性を制御する主要な経路--貯蔵量作動性Ca²⁺流入、カルシニューリン活性化、およびNFATリン酸化--がショウジョウバエにおいて保存され、適切に脊椎動物NFATを制御することを確認した。

【0192】

本発明は、刺激されていないS2R+細胞でゲノムワイドなRNAiスクリーニング^{12,13}を行い、NFAT-GFPの異常な核局在化について視覚的にスコアを付けた(方法および実施例3参照)。21,884個のスクリーニングされたウェルのうち、662個が、非ストリンジエントな基準

10

20

30

40

50

を用いて陽性の可能性があるとしてスコアを付けられた；確認スクリーニングにおいて、271/325(83%)の再試験された候補は、陽性として確認され、NFAT核局在化の本発明者らの最初の評価の再現性を証明した(図6C)。陽性候補は、そのノックダウンが基底[Ca²⁺]_iを増加させることが予想されるNa⁺/Ca²⁺交換体およびSERCA Ca²⁺ ATPアーゼ、ならびにCa²⁺流入およびCa²⁺ホメオスタシスに結びつけられている足場タンパク質Homer^{18, 19}を含んだ(表I)。スクリーニングはまた、貯蔵量作動性Ca²⁺流入の最近同定された制御因子であるS^{tim}²⁰⁻²²を、休止S2R+細胞においてNFAT-GFPの核局在化を引き起こすと同定したが、おそらく、その枯渇が、結果としてNFATキナーゼのわずかな調節不全または基底[Ca²⁺]_iの微増を生じるためと思われる(図9A～9C)。最後に、スクリーニングは、基底[Ca²⁺]_iレベルまたはカルシニューリン活性に影響を及ぼしうる、NFAT制御ドメインを直接的にリン酸化しうる、または直接のNFATキナーゼの活性に間接的に影響を及ぼしうる、多数のタンパク質キナーゼを同定した(表I)。

【 0 1 9 3 】

本発明者らは、NFAT制御ドメインを直接的にリン酸化するキナーゼに関心をもった。ファミリーメンバーNFAT1において、制御ドメインは、>14個のリン酸化セリンを有し、そのうちの13個はカルシニューリンにより脱リン酸化される⁹(図6A)。これらのセリンのうちの5個は、NLSの露出を調節し、かつCK1によるリン酸化の標的である、SRR-1モチーフに位置する^{3, 10}；3個は、タンパク質キナーゼA(PKA)によるプライミングリン酸化後、GSK3によりリン酸化されうるSP-2モチーフに位置する^{7, 10}；および4個は、関連キナーゼがこの研究が開始された時点でまだ同定されていなかった、SP-3モチーフに位置する。SP-2およびSP-3モチーフは、NFAT1の細胞内局在性を直接には制御しないが、それらの脱リン酸化は、NLS露出の可能性およびNFATのDNAに対する親和性の両方を増加させる^{3, 10, 23}。どのようにして、別個のSRR-1、SP-2、およびSP-3キナーゼがいっしょに作用して、NFATの完全リン酸化を促進するのかは知られていなかった；それにもかかわらず、本発明者らは、S2R+細胞における個々のNFATキナーゼの枯渇が、結果として、キナーゼ発現レベルに、リン酸化された特定のモチーフに、および他の関連キナーゼが重複して発現しているかどうかに依存して、様々な程度のNFAT核蓄積を生じることを予想した。それゆえに、本発明者らは、二次スクリーニングにおけるそれらのスコアに関わらず、スクリーニングで同定したすべての恒常的活性のあるキナーゼのうちの少なくとも1つの哺乳動物相同体(入手可能な場合)を試験した。いくつかの誘導性キナーゼを含んだが、その他(例えば、タンパク質キナーゼCおよびD)は別の研究の一部として研究される予定である。

【 0 1 9 4 】

選択したショウジョウバエキナーゼのFLAGタグ付き哺乳動物相同体を、HEK293細胞に発現させ、抗FLAG免疫沈降物を、GST-NFAT1(1～415)融合タンパク質をリン酸化するそれらの能力についてインピトロのキナーゼアッセイにおいて試験した(図7A)。3つの新規な候補--PRKG1、DYRK2、およびIRAK4--はこのアッセイにおいて強い活性を示した(図7A、レーン8、13、および15；CK1アイソフォーム、CK1 およびCK1 は、レーン1および2に陽性対照として含まれた)。PRKG1はDYRK2の同等以上のレベルで発現したが(図7A、下部パネル、レーン8および13)、DYRK2のみがカルシニューリンによるNFAT-GFPの脱リン酸化を阻止できた(図7B、レーン3、4；7、8；11、12)。IRAK4はあまり発現しなかった(図7A、下部パネル、レーン15)；しかしながら、IRAK4-/-マウスから単離されたCD4+ Th1細胞は、対照細胞と比較して、正常なNFAT1脱リン酸化、再リン酸化、および核輸送を示した。これらの理由によって、PRKG1もIRAK4もさらに調査しなかった。

【 0 1 9 5 】

本発明者らは、NFATの直接的制御因子としてのDYRKファミリーキナーゼの役割に焦点を合わせた。DYRK2の過剰発現は、イオノマイシン処理後、NFAT-GFPをそのリン酸化型に維持した(図7B、レーン5～8)；同様に、野生型(WT)DYRK2の過剰発現は、タブシガルジン処理細胞においてNFAT核局在化を阻止したが、DYRK2のキナーゼ不活性型(KD)突然変異体は阻止しなかった。DYRK過剰発現は、NFATの低移動性型を生じ(図7B、レーン7、8)、DYRK(セリン/プロリン指向性キナーゼ²⁴)が、NFAT1上のカルシニューリンドッキング配列であ

10

20

30

40

50

るSPRIEIT(SEQ ID NO:33)をリン酸化し^{3,6}、NFAT：カルシニューリン相互作用を阻止するということに導いた。しかしながら、DYRK2は、DYRKにより標的とされうるSPおよびTP配列を除去するSPRIEITPS(SEQ ID NO:53)>HPVIVITGP(SEQ ID NO:54)(VIVIT)(SEQ ID NO:30)置換を含むNFAT-GFPのイオノマイシン誘導性脱リン酸化を阻害した¹⁷。VIVIT(SEQ ID NO:30)置換NFAT-GFPの脱リン酸化を阻害するDYRKの能力は、野生型SPRIEIT(SEQ ID NO:33)ドッキング部位の親和性と比較してカルシニューリンに対するVIVIT(SEQ ID NO:30)ドッキング部位のより高い親和性(~40倍から50倍)を考慮すれば、特に強い印象を与える¹⁷。NFATの直接的なリン酸化と一致して、タブシガルジンに応答したCa²⁺動員は、S2R+細胞においてDYRKファミリー候補CG40478の枯渇による影響は受けず、ジャーカットT細胞におけるDYRK2過剰発現によってほんのわずか減少した。

10

【0196】

DYRKは、サイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinases)(CKD)、マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinases)(MAPK)、グリコーゲンシンテターゼキナーゼ(glycogen synthetase kinases)(GSK)、およびCDK様(CDK-like)(CLK)キナーゼ(CMGCキナーゼ)に遠い関連性のあるプロリンまたはアルギニン指向性タンパク質キナーゼの進化的に保存されたファミリーを構成する²⁴。DYRKファミリーは、それらの細胞内局在性に依存して、クラスI(核、DYRK1AおよびDYRK1B)またはクラスII(細胞質、DYRK2~6)と名付けられている複数メンバー(図11A)を有する^{25,26}。RT-PCRおよびウェスタンプロットティングは、DYRK1AおよびDYRK2は、それぞれ、ジャーカットT細胞において核および細胞質DYRKの主要な代表であった(図11B)。NFAT-GFPを安定に発現するHeLa細胞におけるDYRK1A特異的siRNAを用いた内因性DYRK1Aの枯渇は、NFAT1脱リン酸化および核内移行の速度ならびに程度を増加させたが、10分間のタブシガルジンでの処理(脱リン酸化および核内移行を誘導するために)、続いて5~30分間のCsA添加(カルシニューリンを不活性化し、核外移行のためのNFATキナーゼによる再リン酸化を可能にするために)に応答しての再リン酸化および核外移行を遅らせた(図10C、左パネル)。mRNAレベルの約70%のノックダウン効率を反映する(図10C、右パネル)、内因性DYRK1A枯渇を用いて得られた結果は、DYRKが細胞におけるNFAT活性化の生理学的に負の制御因子を表すことを示している。

20

【0197】

さらなる実験は、DYRKがNFAT1のSP-3モチーフを特異的に標的とすることを示した。FLAGタグ付きDYRK2はHEK293細胞に発現し、抗FLAG抗体で免疫沈降され、インビトロでNFAT制御ドメインの保存SP-3モチーフに対応するペプチドをリン酸化したが、SP-2モチーフをリン酸化しなかった。NFATキナーゼがDYRK自体ではなく、むしろDYRK関連キナーゼであるという可能性を排除するために、本発明者らは、細胞においてリン酸化されるNFAT1の3つの保存されたセリンリッチモチーフ(SRR-1、SP-2、およびSP-3モチーフ⁹)に対応するペプチドのインビトロでのリン酸化について細菌に発現した組換えDYRK1AおよびDYRK2を試験した。DYRK2およびDYRK1Aの両方は、NFAT1のSP-3モチーフへ強くかつ選択的なキナーゼ活性を示したが、どちらのキナーゼも、細胞においてリン酸化されることが知られた特定のセリン残基におけるSer>Ala置換を有するSP-3ペプチドをリン酸化しなかった⁹。SP-3モチーフ

30

(SPQRSPRSPQPSPHVAPQDD)(SEQ ID NO: 34)

40

における少なくとも2つのセリン残基(太字かつ下線)は、-2位または-3位にアルギニン、および+1位にプロリン(またはバリン)を有するセリン/スレオニン残基に対するDYRKキナーゼの公知の配列選択性に一致し^{27~29}、どちらも細胞においてリン酸化されることが知られている⁹(図6A参照)。SP-3モチーフにおける2つの他のリン酸化セリン残基(下線)が、インビトロでDYRKまたは他のNFATキナーゼについての標的であるかどうかを確立するためにさらなる研究が必要とされると思われる。

【0198】

SP-2およびSP-3モチーフでのリン酸化は、リン酸化NFAT1の上方移動度シフトの一次決定因子であり、本発明者らは、それらがそれぞれ、GSK3およびDYRKによりリン酸化される

50

ことを本明細書で、および以前に示している⁹。DYRKキナーゼは、タンパク質合成開始因子eIF2B および微小管関連タンパク質tauのGSK3媒介性リン酸化をプライムすることが報告されているため²⁹、本発明者らは、DYRKキナーゼが、NFATのGSK3媒介性リン酸化を同様にプライムすることができるかどうかを求めた。NFAT1のSP2モチーフはGSK3によりリン酸化される可能性があり¹⁰、標的配列のGSK3認識は、PKAにより媒介されうるプライミングリン酸化を必要とする。PKAによる強いプライミングとは対照的に、DYRK2もDYRK1Aも、GSK3によるSP-2モチーフのリン酸化を効率的にプライムすることができなかった。

【 0 1 9 9 】

DYRK2はインビトロでNFATのSP-3モチーフのみをリン酸化したため、かつそれはSP-2モチーフにおけるGSK3についてのプライミングキナーゼではなかったため、本発明者らは、それは、細胞において発現する場合、NFAT1の予想される移動度シフトの半分のみを引き起こすだろうと予想した。しかしながら、DYRK2の過剰発現は、結果として、NFAT1の完全なリン酸化を生じた(図7B)。このパラドックスを解決するために、本発明者らは、DYRKによるNFAT制御ドメイン全体の事前リン酸化がGSK3によるさらなるリン酸化を促進するかどうかを求めた。GST-NFAT1(1～415)融合タンパク質を、組換えキナーゼを用いてPKAまたはDYRK2により完了まで事前リン酸化し、その後、洗浄し、組換えGSK3および放射標識[³²P]ATPの非存在下または存在下において短時間(45分間)、インキュベートした。以前に示されているように、GSK3は、プライミングなしにGST-NFAT1(1～415)をリン酸化しないが、PKAまたはDYRK2のいずれかでの事前リン酸化後、リン酸化する。DYRK2での事前リン酸化は、DYRK2はSP-3モチーフをリン酸化するという事実から予想されるように、クーマシーブルー染色により判定される場合、GST-NFAT1(1～415)の上方移動度シフトを引き起こした；さらに、DYRK2での事前リン酸化は、PKAでの事前リン酸化後に観察されるバンドと比較して、より低い移動度の放射性GSK3リン酸化バンドを生じた。これらの結果は、PKAが、SP-2モチーフ

(SPRTSPIMSPRTSLAED) (SEQ ID NO: 35)

における4番目のセリン(太字)をリン酸化することによりGSK3についてプライムし、GSK3による下線の引かれたセリンの発展的なN末端リン酸化を可能にするが、一方で、DYRK2は、別のモチーフであるSP-3モチーフをリン酸化することにより制御ドメインモチーフのGSK3媒介性リン酸化を増強することを示唆している。実際、SP-2モチーフにおけるPKAにより標的とされるセリンは、細胞においてリン酸化されているのを見出されず¹⁰、DYRKによるNFATの生理学的制御についてのさらなる証拠を提供している。

【 0 2 0 0 】

本発明者らは、DYRK発現がNFATの転写活性を制御するかどうかを、細胞におけるDYRK活性のインヒビターとしてのDYRK2のキナーゼ不活性型突然変異体^{30, 31}を利用して求めた。ジャーカットT細胞に、IL-2プロモーター作動性ルシフェラーゼレポータープラスミドおよび増加量の野生型(WT)かまたはキナーゼ不活性型(KD)DYRK2のいずれかについての発現プラスミドを同時トランスフェクションした；1日後、細胞をPMAおよびイオノマイシンで6時間刺激し、レポーター活性を測定した。WT DYRK2はNFAT依存性活性を強く減少させたが、KD突然変異体は、より高い濃度でNFAT依存性ルシフェラーゼ活性を増加させることにより、インヒビターのような挙動をした(図8A)。IL-2プロモーターのARRE2 NFAT:AP-1部位³²、およびTNF プロモーターの 3部位³³のタンデムコピーを含むルシフェラーゼレポーターを用いて同様の結果を得た。関連実験において、発現WT DYRK2はまた、刺激されたジャーカットT細胞による内因性IL-2の産生を用量依存的様式で減少させたが、KD DYRK2は再び、高濃度で発現する場合、これらの条件下でIL-2産生を増加させることにより、阻害効果を生じた(図8B、8C)。さらに、本発明者らは、ジャーカット細胞株において低い内因性レベルで安定に発現したHA-NFAT1で免疫共沈降する内因性DYRK2を検出した；この点において、DYRKはSRR-1キナーゼCK1と似ている可能性があるが、CK1は休止状態下でNFATと安定な複合体を形成するが、活性化後解離する¹⁰。DYRK-NFAT相互作用は、DYRKが生理学的NFATキナーゼであるという仮説を支持している：この型のキナーゼ-基質相互作用は

10

20

30

40

50

、多くの他のシグナル伝達経路において極めて重要であることが知られているが、それらはしばしば、一過性であり、内因性の発現レベルで検出することは困難である³⁴。

【0201】

考察

本発明者らは、ショウジョウバエにおけるゲノムワイドなRNAiスクリーニングが、シグナル伝達経路の重要なメンバーが進化的に保存され、かつショウジョウバエゲノムにおいて表されているとの条件で、哺乳動物細胞におけるシグナル伝達の新規な局面を探索するための妥当かつ強力なストラテジーであることを示している。本発明者らは、純粹に脊椎動物の転写因子であるNFATの保存された制御因子を同定するための方法を用いている；本発明者らの知る限りでは、これは、このように進化的境界を交差するゲノムワイドなRNAiスクリーニングの最初の例である。ストラテジーは、脊椎動物に出現した時、Ca²⁺制御性NFATタンパク質により最近用いられた進化的ニッチをショウジョウバエが発展させたため、成功した。このアプローチを用いて、本発明者らは、DYRKをNFATの新規な生理学的制御因子、および最初のSP-3モチーフ指向性キナーゼであると同定している。他の哺乳動物の過程の制御の保存された局面もまた、ショウジョウバエ細胞における発展したアッセイにより首尾よく定義されると考えられる。

【0202】

本発明者らのデータは、DYRKが保存SP-3モチーフ内のNFAT制御ドメインをリン酸化し、それにより、GSK3によるNFAT制御ドメインのさらなるリン酸化を促進する機構により、DYRKがNFATリン酸化を制御することを示唆している。類似した逐次機構は、NFATの進行性脱リン酸化を制御することができ、それにより、SRR-1モチーフの脱リン酸化が、それらのカルシニューリンへの接触性を増加させることによりSP-2およびSP-3モチーフの脱リン酸化を促進する⁹。細胞質に局在しているクラスII DYRK(DYRK2、3および4)²⁵は、休止細胞において細胞質NFATのリン酸化状態を持続する「維持」キナーゼとして主に機能するが、核に局在しているクラスI DYRK(DYRK1Aおよび1B)²⁵は、核NFATを再リン酸化し、その核外移行を促進する。顕著には、DYRK1Aおよび内因性カルシニューリン制御因子RCN/DSCR1/カルシプレシン-1は、両方とも、第21染色体上のダウン症候群の重要領域(Down Syndrome Critical Region)に局在している。従って、ダウン症候群におけるNFATのこれらの負の制御因子の過剰発現は、NFAT活性化を阻害することにより、第21染色体トリソミーに関連した重症の神経学的および免疫発達的欠陥に寄与しうる³⁵。

【0203】

参考文献

10

20

30

1. Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-47 (1997).
2. Crabtree, G. R. & Olson, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl, S67-79 (2002).
3. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-32 (2003).
4. Salazar, C. & Hofer, T. Allosteric regulation of the transcription factor NFAT1 by multiple phosphorylation sites: a mathematical analysis. *J Mol Biol* 327, 31-45 (2003). 10
5. Salazar, C. & Hofer, T. Activation of the transcription factor NFAT1: concerted or modular regulation? *FEBS Lett* 579, 621-6 (2005).
6. Feske, S., Okamura, H., Hogan, P. G. & Rao, A. Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1117-32 (2003).
7. Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. & Crabtree, G. R. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-4 (1997).
8. Zhu, J. et al. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93, 851-61 (1998). 20
9. Okamura, H. et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6, 539-50 (2000).

10. Okamura, H. et al. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* 24, 4184-95 (2004).
11. Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. & Rao, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-89 (2001).
12. Boutros, M. et al. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. *Science* 303, 832-5 (2004).
13. Kiger, A. A. et al. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* 2, 27 (2003). 10
14. Echard, A., Hickson, G. R., Foley, E. & O'Farrell, P. H. Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr Biol* 14, 1685-93 (2004).
15. Yeromin, A. V., Roos, J., Stauderman, K. A. & Cahalan, M. D. A store-operated calcium channel in Drosophila S2 cells. *J Gen Physiol* 123, 167-82 (2004).
16. Myers, E. W. et al. A whole-genome assembly of Drosophila. *Science* 287, 2196-204 (2000).
17. Aramburu, J. et al. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285, 2129-33 (1999). 20
18. Roderick, H. L. & Bootman, M. D. Calcium influx: is Homer the missing link? *Curr Biol* 13, R976-8 (2003).
19. Kim, E. & Sheng, M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-81 (2004).
20. Roos, J. et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-45 (2005).
21. Liou, J. et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-41 (2005). 30
22. Zhang, S. L. et al. STIM1 is a Ca(2+) sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca(2+) store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-5 (2005).
23. Clipstone, N. A., Fiorentino, D. F. & Crabtree, G. R. Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J Biol Chem* 269, 26431-7 (1994).
24. Kannan, N. & Neuwald, A. F. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* 13, 2059-77 (2004). 40

25. Becker, W. & Joost, H. G. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 1-17 (1999).

26. Lochhead, P. A., Sibbet, G., Morrice, N. & Cleghon, V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 121, 925-36 (2005).

27. Himpel, S. et al. Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275, 2431-8 (2000). 10

28. Campbell, L. E. & Proud, C. G. Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett* 510, 31-6 (2002).

29. Woods, Y. L. et al. The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355, 609-15 (2001).

30. Kentrup, H. et al. Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271, 3488-95 (1996). 20

31. Wiechmann, S. et al. Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 403-8 (2003).

32. Macian, F., Garcia-Rodriguez, C. & Rao, A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *Embo J* 19, 4783-95 (2000).

33. Esensten, J. H. et al. NFAT5 binds to the TNF promoter distinctly from NFATp, c, 3 and 4, and activates TNF transcription during hypertonic stress alone. *Nucleic Acids Res* 33, 3845-54 (2005). 30

34. Johnson, S. A. & Hunter, T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* 2, 17-25 (2005).

35. Bhattacharyya, A. & Svendsen, C. N. Human neural stem cells: a new tool for studying cortical development in Down's syndrome. *Genes Brain Behav* 2, 179-86 (2003).

36. Brizuela, L., Richardson, A., Marsischky, G. & Labaer, J. The FLEXGene repository: exploiting the fruits of the genome projects by creating a needed resource to face the challenges of the post-genomic era. *Arch Med Res* 33, 318-24 (2002). 40

37. Arziman, Z., Horn, T. & Boutros, M. E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res* 33, W582-8 (2005).

38. Yu, H. et al. Annotation transfer between genomes: protein-protein interologs and protein-DNA regulogs. *Genome Res* 14, 1107-18 (2004).

39. Remm, M. & Sonnhammer, E. Classification of transmembrane protein families in the *Caenorhabditis elegans* genome and identification of human orthologs. *Genome Res* 10, 1679-89 (2000).

40. Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302, 205-17 (2000). 10

41. Storm, C. E. & Sonnhammer, E. L. Automated ortholog inference from phylogenetic trees and calculation of orthology reliability. *Bioinformatics* 18, 92-9 (2002).

42. Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M. & Nakatani, Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-6 (2002).

43. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-50 (1985). 20

【0204】

実施例3

表I

表Iにおいてカテゴリーへ分類された、二次スクリーニングにおいて陽性であった候補のリスト。1番目の列は、候補が確認スクリーニングにおいて再試験されたかどうかを示す(NT、試験せず)；試験された場合には、3つの別々の実験からの積算局在性スコアが示されている(方法参照)。他の列は、遺伝子名、Flybase番号、およびHomologeneから得られるヒトオルソログ(キナーゼカテゴリーについて、方法に記載された系統発生解析が加えて用いられた)、ならびに21ntの完全な一致をもつ予想されるオフターゲットの数を列挙し、>10個のオフターゲットをもつ37個の候補は掲載していない。

30

【0205】

表II

発現の解析、タブシガルジン処理細胞におけるRNAi表現型、ならびにカルシニューリンサブユニットおよび関連タンパク質についての単位複製配列オフターゲット。S2R+細胞におけるサブユニットの発現レベルは、RT-PCR分析により推定され、タブシガルジン(TG)処理細胞におけるNFAT核局在化に対するそれらの枯渇の効果が評価された(+++、強い阻害；-阻害なし)。サブユニットのそれぞれを標的とするDRSC単位複製配列は、方法に記載されているように、21nt、20nt、または19ntの完全な一致をもつ予想されるオフターゲットについて分析された。オフターゲットの記載は表IIIに提供されている。赤色は、主要標的と同じファミリーに属するオフターゲットを示す。

40

【0206】

カルシニューリンAの3つのアイソフォームのうち、CanA-1についての単位複製配列ならびにPp2b-14DおよびCanA-14Fについてのそれぞれ1つの単位複製配列は、予想されるオフターゲットを示さない。CanA-1はあまり発現せず、その枯渇はNFAT核転位置を阻害しないが、Pp2b-14DおよびCanA-14Fは両方とも発現し、いずれかのアイソフォームの枯渇は、結果として、NFAT核転位置の強い阻害を生じる。

【0207】

なぜ、中程度に発現したアイソフォームCanA-14Fの枯渇は、より高度に発現したアイソフォームPp2b-14Dの枯渇と類似した阻害を与えるか？異なる方法は異なる感度を有し、NF

50

ATの核局在化における微妙な変化を目で識別することができるが、そのような視覚的推定は、(例えば)ウェスタンプロッティングにより脱リン酸化の程度を推定するほど定量的ではない。

【 0 2 0 8 】

カルシニューリンBの3つのアイソフォームのうち、2つ(CanBおよびCanB2)は哺乳動物カルシニューリンBに強く関連しているが、CG32812はより遠い関連性であり、哺乳動物CHPに似ている。CanBまたはCanB2のいずれかに対するRNAiは、CanBがほとんど発現していないのに対して、CanB2は高レベルで発現しているにもかかわらず、NFAT核局在化の同等の阻害(~70%)を与えた。これは、CanBおよびCanB2が相互のオフターゲットであり、それらのそれぞれの単位複製配列DRSC18449およびDRSC07355において20ntの重複を有するという事実による可能性が最も高い。

10

【 0 2 0 9 】

表IV

追加の実験において評価された、選択された候補についての単位複製配列オフターゲット。休止細胞におけるNFAT核蓄積に対するRNAi媒介性枯渇の効果を評価する、確認スクリーニングにおける候補のスコアが示されている(表Iから採られた)。陽性DRSC単位複製配列を有する各候補について、21nt、20nt、または19ntの完全な一致をもつ予想されるオフターゲットが列挙されている。オフターゲットの記載は下に提供されている。赤色は、最初のスクリーニングにおいて陽性であった主要標的と同じファミリーに属するオフターゲットを示す。

20

【 0 2 1 0 】

GSK3相同体sgg(DRSC18832)に対応する単位複製配列は、最高スコアを与えたが、また多数のオフターゲットも有する。これらのオフターゲットのいずれも、一次スクリーニングにおいて1の低スコアを与えたgskt(DRSC14056)に対応しない。

【 0 2 1 1 】

最高スコアリングCK1ファミリーメンバー gishに対応する単位複製配列は、予想されるオフターゲットをもたず、それがNFATの真正の制御因子を表すことを示している。明らかな交差不活性化が、CK1アイソフォームdco、CK1 /CG2028およびCG2577(それぞれは、1の陽性局在性スコアをもつ)に対応する、単位複製配列DRSC16929、DRSC20231、およびDRSC19863について存在する。他のアイソフォームに関連したスコアが、アイソフォームの発現レベル、オフターゲット効果、または両方を反映するかどうかを決定するためにさらなる研究が必要である。

30

【 0 2 1 2 】

幸運にも、この研究について本発明者らが焦点を合わせた2つの候補--DYRKおよびSTIM-に關して、21nt、20nt、または19ntのいずれの完全な一致についても予想されるオフターゲットはない。

【 0 2 1 3 】

【表 I】

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
ホスファターゼ					
5	Pip	FBgn0039111	0	PTPMT1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1
3	CanA1	FBgn0010015	0	PPP3CC	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform
3	fw	FBgn0000711	1	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
3	PpD6	FBgn0005779	1		
3	wdb	FBgn0027492	0	PPP2R5E	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform
1	CanB	FBgn0010014	0	PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, 19kDa, alpha isoform
1	CanB2	FBgn0015614	0	PPP3R1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, 19kDa, alpha isoform
1	CG32812	FBgn0025642	0	LOC63928	hepatocellular carcinoma antigen gene 520 / related to mammalian CHP
0	Pp2B-14D	FBgn0011826	1	PPP3CB	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, beta isoform
タンパク質キナーゼ					
6	sgg	FBgn0003371	3	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
5	CG7125	FBgn0036503	0	PRKD	protein kinase D
4	CG31640	FBgn0051640	0	DDR	
4	gish	FBgn0011253	0	CSNK1G	casein kinase 1, gamma
4	inaC	FBgn0004784	0	PRKCBI	protein kinase C, beta 1
3	CG12147	FBgn0037325	0	CSNK1	casein kinase 1 family
3	CkIIalpha	FBgn0000258	0	CSNK2A1.2	casein kinase 2, alpha
3	pII	FBgn0010441	0	IRAK	
2	CG2805, Nipped-A	FBgn0004661	0	TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein
2	aPKC	FBgn0022131	0	PRKCI	protein kinase C, iota
2	CG11489	FBgn0025702	0	SRPK1	SFRS protein kinase 1
2	CG32687	FBgn0052687	0	LOC116064	hypothetical protein LOC116064
2	CG6498	FBgn0036511	0	MAST2	microtubule associated serine/threonine kinase 2
2	CG7097	FBgn0034421	0	MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
2	I(1)G0148	FBgn0028360	0	CDC7	CDC7 cell division cycle 7
2	Pkc53E	FBgn0003091	3	PRKCA	protein kinase C, alpha

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある 2Int オフターゲット の数	ヒトオルソログ (NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載 (NCBI 遺伝子)
2	Pkcdelta	FBgn0030387	0	PRKCD	protein kinase C, delta
2	polo	FBgn0003124	0	PLK1	polo-like kinase 1
2	trc	FBgn0003744	0	STK38, STK38L	serine/threonine kinase 38 like dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase
1	CG40478	FBgn0069975	0	DYRK	
1	CG2577	FBgn0030384	3	CSNK1	casein kinase 1 family
1	CG4168	FBgn0028888	0		
1	CG5483	FBgn0038816	0		
1	CG7094	FBgn0032650	0	CSNK1	casein kinase 1 family
1	Ckalpha	FBgn0015024	3	CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1
1	Cks	FBgn0010314	0	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
1	dco	FBgn0002413	0	CSNK1D, E	casein kinase 1, delta/ epsilon
1	for	FBgn0000721	2	PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I
1	gsk3	FBgn0046332	0	GSK3A	
1	phl	FBgn003079	2	BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
1	Pk61C	FBgn0020386	0	PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase 1
1	Pkc98E	FBgn0003093	0	PRKCE	protein kinase C, epsilon
1	Tie	FBgn0014073	4		
0	CG11533	FBgn0039908	0		
0	CG9962	FBgn0031441	0	CSNK1	casein kinase 1 family
0	CG10579	FBgn0005640	0	ALS2CR7, PFTK1	PFTAIRE protein kinase 1
0	png	FBgn0000826	0		
NT	CG17698	FBgn0040056	0	CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta
NT	gek	FBgn0023081	0	CDC42BPA, B	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
その他のキナーゼ/ キナーゼ関連					
1	Pi3K59F	FBgn0015277	0	PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3
0	CG8298	FBgn0033673	0		
0	Pdk	FBgn0017558	0	PDK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3
NT	CG3809	FBgn0037995	0		
NT	CG6218	FBgn0038321	0	NAGK	N-acetylglucosamine kinase
NT	CG5364	FBgn0039179	0	UCK2	uridine-cytidine kinase 2
NT	dlg	FBgn0001624	8	DLG1	discs, large homolog 1

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
雑多/カルシウム関連					
5	CG14387	FBgn0038089	0		
4	TpnC4	FBgn0033027	0		
4	TpnC73F	FBgn0010424	0		
3	Stim	FBgn0045073	0	STIM1	stromal interaction molecule 1
3	Cam	FBgn0000253	0	CALM2	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)
3	CG11165	FBgn0033238	2		
3	CG13898	FBgn0035161	0		
2	norpA	FBgn004625	0	PLCB4	phospholipase C, beta 4
2	TpnC41C	FBgn0013348	0		
2	TpnC47D	FBgn0010423	0		
1	CG13526	FBgn0034774	0		
1	CG31345	FBgn0051345	0	CAPSL	calcyphosine-like
1	CG31650	FBgn0031673	0	RCN2	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain
1	CG31958	FBgn0051958	2		
1	CG31960	FBgn0051960	2		
1	TpnC25D	FBgn0031692	1		
膜シグナル伝達					
5	CG6919	FBgn0038980	0	HTR4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4
4	CG30340	FBgn0050340	0		
4	DopR	FBgn0011582	4	DRD1	dopamine receptor D1
4	Gr47a	FBgn0041242	0		
4	Or85d	FBgn0037594	0		
4	Su(fu)	FBgn0005355	0	SUFU	suppressor of fused homolog (Drosophila)
3	Ac3	FBgn0023416	0	ADCY3	adenylate cyclase 3
3	Gyc-89D6	FBgn0038436	0		
3	homer	FBgn0025777	0	HOMER2	homer homolog 2
3	mav	FBgn0039914	0	TGFB3	transforming growth factor, beta 3
3	PGRP-LE	FBgn0030695	0	PGLYRP3	peptidoglycan recognition protein 3
2	cenB1A	FBgn0039056	0	CENTB2	centaurin, beta 2
2	CG10823	FBgn0038880	0		
2	CG11319	FBgn0031835	0	DPP10	dipeptidylpeptidase 10
2	CG6989	FBgn0038063	0		
2	fz3	FBgn0027343	0		
2	N	FBgn0004647	0	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated
2	Ptc21C	FBgn0004611	0	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)
2	pxtB	FBgn0053207	1		
2	sog	FBgn0034653	0	CHRD	chordin
2	spz	FBgn0003495	0		
1	fbw	FBgn0004364	0		
1	CG16752	FBgn0029768	0		
1	CG17262	FBgn0031499	0		
1	Crag	FBgn0025864	0	MYCPBP	c-myc promoter binding protein
1	Grip	FBgn0040917	0	GRIP1	glutamate receptor interacting protein 1
1	nkd	FBgn0002945	0		
1	sl	FBgn0003416	0	PLCG1	phospholipase C, gamma 1

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2Intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
0	bm	FBgn0000221	0	B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2
0	CG10747	FBgn0032845	0	PLCXD2	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2
0	CG31350	FBgn0051350	2		
0	fz2	FBgn0016797	0	FZD8	frizzled homolog 8
0	Rab-RP1	FBgn0015788	0	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family
0	skf	FBgn0050021	0	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7
NT	Alg10	FBgn0052076	0		
NT	CG30361	FBgn0050361	4	GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4
NT	rho-5	FBgn0041723	0		
NT	Sema-1a	FBgn0011259	0	SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
NT	sif	FBgn0019652	0		
NT	Syxt1A	FBgn0013343	0	STX1A-	syntaxin 1A
NT	finc	FBgn0038554	0		
陽イオンチャネルおよび輸送体					
5	CG13223	FBgn0033599	0	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
5	CG14741	FBgn0037989	0	ATP8B2	ATPase, Class I, type 8B, member 2
4	CG10465	FBgn0033017	0	KCTD10	potassium channel tetramerisation domain containing 10
4	CG6737	FBgn0032294	0		
4	Cng	FBgn0014462	0	CNGA3	cyclic nucleotide gated channel alpha 3
4	GluRIIA	FBgn0004620	0		
4	mx6	FBgn0027107	0		
4	lrk3	FBgn0032706	0		
3	Ca-beta	FBgn0015608	4		
3	Ca-P60A	FBgn0004551	0	ATP2A1	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1
3	CG11155	FBgn0039927	0	GRIN3	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3
3	CG2165	FBgn0025704	0	ATP2B3	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3
3	CG32792	FBgn0052792	0		
3	CG3367	FBgn0029871	2		
3	CG4450	FBgn0032113	0		
3	CG6812	FBgn0036843	0	SFXN2	sideroflexin 2
3	KaiRIA	FBgn0028422	1	GRIN4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4
3	ppk21	FBgn0039675	0		
3	trp	FBgn0003861	0		
2	Ca-alpha1D	FBgn0001991	0	CACNA1D	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
2	Catx	FBgn0013995	0	SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 3

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある 2int オフターゲット の数	ヒトオルソログ (NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載 (NCBI遺伝子)
2	CG12376	FBgn0033323	0	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
2	CG12904	FBgn0033510	0	KCNT2	potassium channel, subfamily T, member 2
2	CG1698	FBgn0033443	1		
2	CG31284	FBgn0051284	0		
2	CG31729	FBgn0051729	0	ATP9B	ATPase, Class II, type 9B
2	CG3822	FBgn0036837	0	GRIK1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
2	CG4536	FBgn0029904	5		
2	CG9361	FBgn0037690	0	KCNK9	potassium channel, subfamily K, member 9
2	elk	FBgn0011589	0	KCNH8	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8
2	GluClalpha	FBgn0024963	0	GLRA3	glycine receptor, alpha 3
2	GluRIII	FBgn0031293	0		
2	Irk2	FBgn0039081	0	KCNJ9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9
2	KCNQ	FBgn0033494	3	KCNQ5	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5
2	nAcAlpha-34E	FBgn0028875	0	CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7
2	nAcAlpha- 96Aa	FBgn0000036	0	CHRNA3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3
2	Nmdar1	FBgn0010399	1	GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D- aspartate 1
2	Ork1	FBgn0017561	0	KCNK4	potassium channel, subfamily K, member 4
2	sei	FBgn0033533	0	KCNH6	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8
1	Ca-alpha1T	FBgn0029846	0		
1	cac	FBgn0005563	0	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
1	CG10830	FBgn0038839	0	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12
1	CG31201	FBgn0051201	1	GRIA4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4
1	CG32770	FBgn0052770	0		
1	CG33298	FBgn0032120	0	ATP10A	ATPase, Class V, type 10A
1	CG40146	FBgn0039941	0		
1	CG5621	FBgn0038840	0		
1	CG8743	FBgn0036904	0	MCOLN3	mucolipin 3
1	CG9935	FBgn0039916	1	GRIA1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
1	eag	FBgn0000535	0	KCNH11	potassium voltage-gated channel, subfamily H
1	GluRIB	FBgn0028431	1	GRIA2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2
1	GlurIIB	FBgn0020429	0		
1	Ir	FBgn0039061	0	KCNJ5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5
1	I(2)01810	FBgn0010497	0		
1	nAcAlpha- 96Ab	FBgn0000039	1	CHRNA2	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
1	nAcRbeta-64B	FBgn0000038	0	CHRNA4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4
1	nAcRbeta-96A	FBgn0004118	0	CHRN4	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide
1	Nmndar2	FBgn0014432	0	GRIN2B	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
1	nonpC	FBgn0016920	0		
1	pain	FBgn0060296	0		
1	Pkd2	FBgn0041195	0	PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1
1	Shal	FBgn0005564	0	KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3
1	Sip1	FBgn0010620	0	TFIP11	tufelin interacting protein 11
1	slo	FBgn0003429	0	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
0	Anktn1/TrpA1	FBgn0035934	0	TRPA1	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
0	CG12455	FBgn0028859	0	CACNA2D3	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit
0	CG13762	FBgn0040333	1	PKD2L1	polycystic kidney disease 2-like 1
0	CG14647	FBgn0037244	0	KCTD9	potassium channel tetramerisation domain containing 9
0	CG17922	FBgn0034656	0	CNGB1	cyclic nucleotide gated channel beta 1
0	CG32704	FBgn0052704	0		
0	CG32810	FBgn0025394	0	KCTD5	potassium channel tetramerisation domain containing 5
0	CG4301	FBgn0030747	0	ATP11B	ATPase, Class VI, type 11B
0	CG9472	FBgn0036874	0	PKD1L3	polycystic kidney disease 1-like 3
0	clumsy	FBgn0026255	0	GRIK2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
0	cngl	FBgn0029090	3		
0	Glu-RI	FBgn0004619	0	GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3
0	Necto30C	FBgn0028704	0	SLC24A2	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2
0	Rya-r44F	FBgn0011288	0	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)
0	Shab	FBgn0003383	0	KCNB1	potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1
0	SK	FBgn0029761	0	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
0	tpl	FBgn0005614	0		
NT	CG2196	FBgn0039872	1		
NT	nAcRalpha-80B	FBgn0037212	0		
その他の輸送体					

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
3	ATPsyn-C16	FBgn0016119	0		
3	CG1599	FBgn0033452	0	SYBL1	synaptobrevin-like 1
3	CG31116	FBgn0051116	0	CLCN2	chloride channel 2
3	CG31158	FBgn0051158	0		
3	CG31305	FBgn0051305	0	SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1
3	CG6901	FBgn0038414	0		
3	Mst184Db	FBgn0004173	0		
2	CG3860	FBgn0034951	0	OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A
2	CG3902	FBgn0036824	1	ACADS	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain
2	CG5127	FBgn0039335	0		
2	CG7442	FBgn0037140	0		
2	CG7578	FBgn0028538	0	ARFGEF1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1
2	CG9270	FBgn0032908	0	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
1	CG31731	FBgn0028539	0		
1	CG8389	FBgn0034063	0		
1	rdgB	FBgn0003218	0	PTPNM2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2
1	w	FBgn0003896	0		
0	CG33214	FBgn0053214	0	GLG1	golgi apparatus protein 1
0	CG7458	FBgn0037144	0		
NT	Beach1	FBgn0043362	0	WDFY3	WD repeat and FYVE domain containing 3
NT	CG12539	FBgn0030586	0		
NT	CG14482	FBgn0034245	0		
NT	CG14691	FBgn0037829	0	SV2A	synaptic vesicle glycoprotein 2A
NT	CG17119	FBgn0039045	0	CTNS	cystinosis, nephropathic
NT	CG18324	FBgn0033905	0	SLC25A34	solute carrier family 25, member 34
NT	CG3071	FBgn0023527	0	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein
NT	CG32230	FBgn0052230	0		
NT	CG6142	FBgn0039415	0		
NT	CG7181	FBgn0037097	0		
NT	CG7630	FBgn0032015	0	TUSC3	tumor suppressor candidate 3
NT	CG9990	FBgn0039594	0		
NT	Cyp49a1	FBgn0033524	0	CYP27A1	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
NT	didum	FBgn0015933	0	MYO5A	myosin VA (heavy polypeptide 12, myoxin)
NT	ERp60	FBgn0033663	1	PDIA3	protein disulfide isomerase-associated 3
NT	Fpprp2	FBgn0011280	0		
NT	Syx8	FBgn0037084	3	STX10	syntoon 10
雑多/その他					
6	Proalpha7	FBgn0023175	0	PSMA3	proleasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3
5	CG3812	FBgn0030421	0	AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)
4	bf	FBgn0014133	3		
4	CG11727	FBgn0030299	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある 21nt オフターゲット の数	ヒトオルソログ (NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載 (NCBI遺伝子)	
4	CG2781	FBgn0037534	0	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids	
4	CG4960	FBgn0039371	0	C19orf32	chromosome 19 open reading frame 32	
4	CG7304	FBgn0036527	0	GALNT11	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc T11)	10
4	CG8258	FBgn0033342	0	CCT8	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	
4	CRMP	FBgn0023023	0	DPYS	dihydropyrimidinase	
4	Ep63F-1	FBgn0004910	0			
3	Ac57B	FBgn0000044	5	ACTB	actin, beta	
3	CG11299	FBgn0034897	0	SESN3	sestrin 3	
3	CG6509	FBgn0032363	0	DLG5	discs, large homolog 5	
3	CG9342	FBgn0032904	0	MTP	microsomal triglyceride transfer protein (large polypeptide, 88kDa)	
3	CG9467	FBgn0037758	0	KCTD3	potassium channel tetramerisation domain containing 3	
3	eIF-2beta	FBgn0004926	0	EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa	20
3	fzo	FBgn0011596	0	MFN1	mitofusin 1	
3	pros	FBgn0004595	0	PROX1	prospero-related homeobox 1	
3	Su(var)3-9	FBgn0003600	0	EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	
2	14-3-3epsilon	FBgn0020238	0	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptid	
2	ac	FBgn0000022	3	ASCL2	achaete-scute complex-like 2	
2	Arp66B	FBgn0011744	0	ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog	
2	CG10069	FBgn0034611	0	SLC37A2	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	
2	CG11600	FBgn0038068	1			
2	CG11608	FBgn0038069	0	LIPL3	lipase-like, ab-hydrolase domain containing 3	30
2	CG14625	FBgn0040358	4			
2	CG2678	FBgn0014931	0			
2	CG3074	FBgn0034709	0	TINAGL1	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	
2	CG32635	FBgn0052635	1			
2	CG4448	FBgn0039057	0			
2	CG5278	FBgn0038986	3			
2	CG5802	FBgn0038863	0	SLC35B1	solute carrier family 35, member B1	
2	CG7140	FBgn0037147	0			
2	Rad51D	FBgn0030931	0	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	
1	cer	FBgn0034443	0			
1	CG6330	FBgn0039464	0	UPP2	uridine phosphorylase 2	
1	CG7568	FBgn0039673	0	WDR69	WD repeat domain 69.	
1	CG9326	FBgn0032885	0	MPP6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
1	CG9784	FBgn0030761	0	PIB5PA	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
1	cnc	FBgn0000338	0		
1	eIF2B-beta	FBgn0024996	0	EIF2B2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa
1	gammaTub23C	FBgn0004176	0	TUBG1	tubulin, gamma 1
1	Hn	FBgn0001208	0	PAH	phenylalanine hydroxylase
1	Pgan25A	FBgn0001970	0	GALNT11	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc T11)
1	pgan14	FBgn0051956	0		
1	skpA	FBgn0025637	1	LOC401713	organ of Corti protein 2; RNA polymerase II elongation factor-like protein OCP2; cyclin A/CDK2-associated p19
0	CG15408	FBgn0031523	0		
0	CG4500	FBgn0028519	0	ACSBG1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1
0	CG7348	FBgn0036940	0		
0	CG3647	FBgn0035729	0		
0	D	FBgn0000411	1		
0	nahoda	FBgn0034797	0		
0	Pde6	FBgn0038237	0	PDE11A	phosphodiesterase 11A
0	sdt	FBgn0003349	1	MPP5	membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)
0	TSG101	FBgn0036666	0	TSG101	tumor susceptibility gene 101
NT	Aats-cys	FBgn0027091	0	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase
NT	Aats-met	FBgn0027083	0	MARS2	methionine-tRNA synthetase 2
NT	Acp70A	FBgn0003034	0		
NT	Act179B	FBgn0000045	5	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
NT	Ahcy13	FBgn0014455	0	AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase
NT	amon	FBgn0023179	0	PCSK2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
NT	asparagine-synthetase	FBgn0041607	0		
NT	ATbp	FBgn0039945	5		
NT	BEAF-32	FBgn0015602	0		
NT	beat-1c	FBgn0028644	8		
NT	beat-Vb	FBgn0038092	0		
NT	Bin1	FBgn0024491	0	SAP18	sin3-associated polypeptide, 18kDa
NT	BM-40-SPARC	FBgn0026562	0	SPARCL1	SPARC-like 1 (mefin)
NT	btsz	FBgn0010940	0		
NT	bwa	FBgn0045064	0	ASAHI3L	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like
NT	CG10168	FBgn0039087	0		
NT	CG11107	FBgn0033160	0	DHX15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15
NT	CG12162	FBgn0037329	0	POLDIP2	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2
NT	CG13643	FBgn0040601	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)	
NT	CG13779	FBgn0040954	0			
NT	CG14869	FBgn0038341	0			
NT	CG15105	FBgn0034412	0			
NT	CG1571	FBgn0029993	0	DNAI2	dynein, axonemal, intermediate polypeptide 2	
NT	CG16710	FBgn0039101	0			
NT	CG16857	FBgn0028482	0			
NT	CG17294	FBgn0032032	0	HDHD2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	10
NT	CG17826	FBgn0036227	0	FBN2	fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly)	
NT	CG18493	FBgn0038701	0			
NT	CG2051	FBgn0037376	0	HAT1	histone acetyltransferase 1	
NT	CG3066	FBgn0037515	0			
NT	CG31115	FBgn0051115	0	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase	
NT	CG31159	FBgn0051159	0	GFM2	G elongation factor, mitochondrial 2	
NT	CG31224	FBgn0051224	0			
NT	CG31287	FBgn0051287	0			
NT	CG31453	FBgn0051453	0	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	
NT	CG31716	FBgn0051716	0			
NT	CG32284	FBgn0062284	0			
NT	CG3231	FBgn0027522	0	RBBP6	retinoblastoma binding protein 6	20
NT	CG32557	FBgn0052557	0			
NT	CG32700	FBgn0052700	0			
NT	CG32727	FBgn0052727	0	DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	
NT	CG33100	FBgn0053100	0	EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E member 2	
NT	CG3356	FBgn0034989	0	UBE3C	ubiquitin protein ligase E3C	
NT	CG3605	FBgn0031493	0	SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa	
NT	CG3654	FBgn0036004	0			
NT	CG3700	FBgn0034796	1	TMRSS9	transmembrane protease, serine 9	
NT	CG3940	FBgn0037788	0			
NT	CG4017	FBgn0032143	0	CPB1	carboxypeptidase B1	
NT	CG4030	FBgn0034585	0	RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	30
NT	CG4090	FBgn0038492	1			
NT	CG4281	FBgn0031287	0	WBP4	WW domain binding protein 4 (fomin binding protein 21)	
NT	CG4302	FBgn0027073	0	UGT2B10, UGT2B11, UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B10, B11, B28	
NT	CG4653	FBgn0030776	0			
NT	CG4747	FBgn0043456	0	N-PAC	cytokine-like nuclear factor n-pac	
NT	CG4851	FBgn0032358	0	PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2	
NT	CG4901	FBgn0032194	0	DHD33	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	
NT	CG5103	FBgn0036784	0	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	40
NT	CG5122	FBgn0032471	0			
NT	CG5191	FBgn0038803	0			

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
NT	CG5567	FBgn0036760	0	LOC283871	hypothetical protein LOC283871
NT	CG5715	FBgn0039180	0		
NT	CG6041	FBgn0029826	1	TMPRSS9	transmembrane protease, serine 9
NT	CG6556	FBgn0038912	0		
NT	CG6717	FBgn0031924	0	SERPINSB	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
NT	CG6763	FBgn0039069	1		
NT	CG6764	FBgn0037899	0	C15orf15	chromosome 15 open reading frame 15
NT	CG6841	FBgn0036828	0	C20orf14	chromosome 20 open reading frame 14
NT	CG6906	FBgn0036261	0		
NT	CG6937	FBgn0038988	0	MKI67IP	MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein
NT	CG7017	FBgn0036951	0		
NT	CG7290	FBgn0036948	0		
NT	CG7928	FBgn0039740	0		
NT	CG8117	FBgn0030683	0	TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2
NT	CG9220	FBgn0030682	0	CHSY1	carbohydrate (chondroitin) synthase 1
NT	CG9363	FBgn0037697	0		
NT	CG9520	FBgn0032078	0	C1GALT1	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1
NT	CG9535	FBgn0027501	0	UAP1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1
NT	CG9550	FBgn0029939	2		
NT	CG9643	FBgn0037237	0		
NT	CG9947	FBgn0030752	0	TMEM30A	transmembrane protein 30A
NT	comm3	FBgn0053209	0		
NT	CIBP	FBgn0020496	1	CTBP1	C-terminal binding protein 1
NT	dbo	FBgn0040230	0	KLHL20	kelch-like 20 (Drosophila)
NT	Dhfr	FBgn0004087	0	DHFR	dihydrofolate reductase
NT	dmr111E	FBgn0030477	2		
NT	drm	FBgn0024244	0		
NT	east	FBgn0010110	1		
NT	ec	FBgn0025376	1		
NT	Ef1alpha100E	FBgn0000557	1	EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
NT	faf	FBgn0005632	0	USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked (faf facets-like, Drosophila)
NT	fbp	FBgn0032820	0	FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1
NT	fred	FBgn0051774	0		
NT	Gs1D5	FBgn0010041	5		
NT	Gs1E2	FBgn0053498	0		
NT	Hand	FBgn0032209	0	HAND2	heart and neural crest derivatives expressed 2
NT	HGTX	FBgn0040318	0	NKX6-1	NK6 transcription factor related, locus 1
NT	Hsp60B	FBgn0011244	0		
NT	I(2)k05713	FBgn0022160	0	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
NT	I(3)IX-14	FBgn0002478	0	LMLN	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologe)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
NT	lota	FBgn0005630	2	LOC441636	similar to submaxillary epomucin
NT	Map60	FBgn0010342	0		
NT	Mes-4	FBgn0039559	0	WHSC	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
NT	Mga12	FBgn0039738	0	MGAT2	mannosyl (alpha-1,6-)glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
NT	mol	FBgn0028528	0	NIP	homolog of Drosophila Numb-interacting protein
NT	mre11	FBgn0020270	0	MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A
NT	mRpL15	FBgn0036990	1	MRPL15	mitochondrial ribosomal protein L15
NT	mRpL2a	FBgn0037833	0	MRPL37	mitochondrial ribosomal protein L37
NT	nbs	FBgn0026198	1	NBN	nibrin
NT	Nfl	FBgn0042696	0	NFIA	nuclear factor I/A
NT	nos	FBgn0002962	2	NOS1	nitric oxide synthase 1
NT	Odc1	FBgn0013307	0	ODC1	ornithine decarboxylase 1
NT	Peb	FBgn0004181	0	PRB1, PRB2	proline-rich protein BstNI subfamily 1, proline-rich protein BstNI subfamily 2
NT	PH4alphaEFB	FBgn0039776	0	P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide 1
NT	Phex	FBgn0033380	0	RNUXA	RNA U, small nuclear RNA export adaptor
NT	ple	FBgn0005626	0	TH	tyrosine hydroxylase
NT	Rb97D	FBgn0004903	2	LOC144983	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 like
NT	Rbp2	FBgn0010256	0	WBSCR1	Williams-Beuren syndrome chromosome region 1
NT	Rpl11	FBgn0019938	0	POLR1A	polymerase (RNA) I polypeptide A
NT	Rpl10Aa	FBgn0038281	0	RPL10A	ribosomal protein L10a
NT	Rps10b	FBgn0031035	0	RPS10	ribosomal protein S10
NT	Rrp1	FBgn0004584	0	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
NT	sdx	FBgn000287	0	SALL3	sal-like 3
NT	sda	FBgn0015541	1	ARTS-1	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator
NT	SF1	FBgn0025571	0	SF1	splicing factor 1
NT	shn	FBgn0003396	0		
NT	Sirt2	FBgn0038788	0	SIRT2	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2
NT	snRNP69D	FBgn0016940	0	SNRNP1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa
NT	Spn43Ab	FBgn0024293	0		
NT	Spi3	FBgn0037981	1		
NT	sqd	FBgn0003498	0		
NT	ST6Gal	FBgn0035050	0	ST6GAL2	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2
NT	stau	FBgn0003520	0	STAU	staufen, RNA binding protein
NT	stich1	FBgn0016941	1		
NT	svf	FBgn0004648	0	CPD	carboxypeptidase D

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2Intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
NT	T3dh	FBgn0017482	1	ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
NT	Tdp1	FBgn0051953	0	TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
NT	tth	FBgn0030502	5		
NT	UgB6Dd	FBgn0040256	0		
新規					
5	CG17142	FBgn0035112	0		
4	CG14076	FBgn0036829	0		
4	CG14870	FBgn0038342	0	EPPB9	B9 protein
4	CG31145	FBgn0051145	0	FAM20C	family with sequence similarity 20, member C
4	CG31203	FBgn0051203	0		
4	CG31288	FBgn0051288	0		
4	CG4585	FBgn0025335	0		
4	CG7708	FBgn0038640	0	SLC4A1AP	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein
4	Osi10	FBgn0037417	0		
3	CG14084	FBgn0036855	0		
3	CG14556	FBgn0039413	0		
3	CG14744	FBgn0033324	0	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
3	CG14945	FBgn0032402	0		
3	CG17005	FBgn0032109	0		
3	CG1968	FBgn0033401	0	COG6	component of oligomeric golgi complex 6
3	CG1971	FBgn0039881	0		
3	CG3566	FBgn0029854	0	CYB5-M	outer mitochondrial membrane cytochrome b5
3	CG4786	FBgn0037012	0		
3	CG8740	FBgn0027585	0		
3	CG9264	FBgn0032911	0		
3	CG9525	FBgn0032080	0		
2	CG10946	FBgn0029974	0		
2	CG11113	FBgn0037304	0		
2	CG11381	FBgn0029568	3		
2	CG12688	FBgn0029707	0		
2	CG12958	FBgn0034018	0		
2	CG14314	FBgn0038581	0		
2	CG14854	FBgn0039376	0		
2	CG15897	FBgn0029857	0	WDR4	WD repeat domain 4
2	CG16785	FBgn0034974	0		
2	CG30389	FBgn0050389	0	TMEM57	transmembrane protein 57
2	CG32224	FBgn0036950	0		
2	CG3704	FBgn0040346	0	XAB1	XPA binding protein 1, GTPase
2	CG4098	FBgn0036648	0	NUDT9	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9
2	CG4643	FBgn0043010	0	FBXO45	F-box protein 45
2	CG5308	FBgn0037908	3		
2	CG5348	FBgn0034156	0	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
2	CG9205	FBgn0035181	0		
2	CG9752	FBgn0034614	0	C9orf64	chromosome 9 open reading frame 64
2	nes	FBgn0026630	0	C3F	putative protein similar to nessy
1	CG10514	FBgn0039312	0		
1	CG13659	FBgn0039319	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある2Intオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
1	CG14160	FBgn0036066	0	SLC2A5	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5
1	CG14515	FBgn0039648	0		
1	CG14629	FBgn0040398	1		
1	CG14743	FBgn0033326	0	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
1	CG18679	FBgn0040663	0		
1	CG2879	FBgn0025834	0	LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member 8
1	CG2921	FBgn0034689	1		
1	CG3106	FBgn0030148	0		
1	CG31410	FBgn0051410	0		
1	CG32159	FBgn0052159	0		
1	CG32637	FBgn0052637	0	LGR8	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8
1	CG3634	FBgn0037026	0	ST7	suppression of tumorigenicity 7
1	CG8858	FBgn0033698	0	KIAA0368	KIAA0368
1	mars	FBgn0033845	0	DLG7	discs, large homolog 7
1	Osi16	FBgn0051561	0		
1	spip2	FBgn0031878	0		
0	CG10095	FBgn0037993	2		
0	CG10183	FBgn0039093	2		
0	CG13188	FBgn0033668	8		
0	CG14162	FBgn0040823	0		
0	CG14471	FBgn0033049	0		
0	CG2185	FBgn0037358	0	CHP	calcium binding protein P22
0	CG2656	FBgn0037478	0	ATPB01C	ATP binding domain 1 family, member C
0	CG31189	FBgn0051189	0		
0	CG32432	FBgn0052432	0		
0	CG3536	FBgn0050267	0	CNGA1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1
0	I(1)G0331	FBgn0029944	8		
0	Osi18	FBgn0037428	0		
0	ppk13	FBgn0032912	0		
NT	CG10200	FBgn0033968	0		
NT	CG10424	FBgn0036848	0	FLJ10769	hypothetical protein FLJ10769
NT	CG10589	FBgn0037035	0		
NT	CG11073	FBgn0034693	0		
NT	CG11113	FBgn0033165	0		
NT	CG11130	FBgn0037067	0		
NT	CG11576	FBgn0039882	0	C20orf54	chromosome 20 open reading frame 54
NT	CG11634	FBgn0032968	0		
NT	CG11672	FBgn0037563	0		
NT	CG11699	FBgn0030311	0		
NT	CG11750	FBgn0030294	0		
NT	CG11839	FBgn0039271	0	CCDC16	coiled-coil domain containing 16
NT	CG11847	FBgn0039281	0	SDCCAG1	serologically defined colon cancer antigen 1
NT	CG11875	FBgn0039301	0	NUP37	nucleoporin 37 kDa
NT	CG11881	FBgn0039638	0		
NT	CG11926	FBgn0031640	0	MON1A	MON1 homolog A
NT	CG12508	FBgn0040965	0		
NT	CG12584	FBgn0037257	0		
NT	CG12608	FBgn0030630	1	PAK1IP1	PAK1 interacting protein 1
NT	CG12672	FBgn0030886	1		
NT	CG12985	FBgn0030881	0	RDBP	RD RNA binding protein
NT	CG13014	FBgn0030759	1		
NT	CG13021	FBgn0029669	0		
NT	CG13075	FBgn0036563	0		
NT	CG13086	FBgn0032770	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある 2int オフターゲット の数	ヒトオルソログ (NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載 (NCBI遺伝子)
NT	CG13088	FBgn0032047	0	PGDS	prostaglandin D2 synthase, hematopoietic
NT	CG13169	FBgn0033704	0		
NT	CG13239	FBgn0037197	0		
NT	CG13364	FBgn0026879	0	HSPC016	hypothetical protein HSPC016
NT	CG13538	FBgn0034820	0		
NT	CG13552	FBgn0034864	0		
NT	CG13599	FBgn0039128	0		
NT	CG13615	FBgn0039199	2		
NT	CG13623	FBgn0039205	0		
NT	CG13654	FBgn0039290	0		
NT	CG13785	FBgn0031901	0		
NT	CG13836	FBgn0039060	0		
NT	CG1394	FBgn0030277	9		
NT	CG13984	FBgn0031795	0		
NT	CG14017	FBgn0031721	0	MGC35043	hypothetical protein MGC35043
NT	CG14047	FBgn0040380	0		
NT	CG14082	FBgn0036851	1		
NT	CG14131	FBgn0036205	0		
NT	CG14252	FBgn0039462	0		
NT	CG14423	FBgn0029646	3		
NT	CG14448	FBgn0037191	0		
NT	CG14453	FBgn0037179	2		
NT	CG14550	FBgn0039405	1	DSCR5	Down syndrome critical region gene 5
NT	CG14563	FBgn0037139	0		
NT	CG14564	FBgn0037131	0		
NT	CG14565	FBgn0037129	0		
NT	CG14574	FBgn0037104	0		
NT	CG14609	FBgn0037483	0	KIAA1212	KIAA1212
NT	CG14659	FBgn0037284	0		
NT	CG14662	FBgn0037291	0		
NT	CG14843	FBgn0038230	0		
NT	CG14850	FBgn0038239	0		
NT	CG14931	FBgn0032374	0		
NT	CG15059	FBgn0030906	0		
NT	CG15133	FBgn0032619	0		
NT	CG15152	FBgn0032665	0		
NT	CG15278	FBgn0032554	0		
NT	CG1529	FBgn0031144	1	ZNF569	zinc finger protein 569
NT	CG15366	FBgn0030080	0		
NT	CG15376	FBgn0029692	5		
NT	CG15432	FBgn0031603	2		
NT	CG15471	FBgn0029726	0		
NT	CG15488	FBgn0032440	0		
NT	CG15513	FBgn0039705	0	ATG16L	ATG16 autophagy related 16-like haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 4
NT	CG15771	FBgn0029801	0	HDHD4	
NT	CG15784	FBgn0029766	1		
NT	CG15888	FBgn0038131	0		
NT	CG1578	FBgn0031176	0		
NT	CG16865	FBgn0028919	0	FLJ22965	hypothetical protein FLJ22965
NT	CG16964	FBgn0032385	0		
NT	CG17281	FBgn0031501	0		
NT	CG17267	FBgn0038821	0		
NT	CG17282	FBgn0038857	0		
NT	CG17382	FBgn0039080	0		
NT	CG17786	FBgn0039167	1	CNOT6	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6
NT	CG17807	FBgn0034748	0	LOC91801	hypothetical protein BC015183
NT	CG17952	FBgn0034657	0		
NT	CG18145	FBgn0032189	0		
NT	CG18275	FBgn0029523	2		
NT	CG18368	FBgn0033864	0		
NT	CG18600	FBgn0038601	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある21ntオフターゲットの数	ヒトオルソログ(NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載(NCBI遺伝子)
NT	CG1896	FBgn0039870	0		
NT	CG2016	FBgn0037289	0		
NT	CG2124	FBgn0030217	0	FLJ13149	hypothetical protein FLJ13149
NT	CG2889	FBgn0030206	0		
NT	CG30010	FBgn0050010	0	MGC70857	similar to RIKEN cDNA C030006K11 gene
NT	CG30101	FBgn0050101	1		
NT	CG30109	FBgn0050109	0	P53CSV	p53-inducible cell-survival factor
NT	CG30363	FBgn0050363	0		
NT	CG30419	FBgn0050419	0		
NT	CG31093	FBgn0051093	0		
NT	CG31389	FBgn0051389	0		
NT	CG31407	FBgn0051407	0		
NT	CG31825	FBgn0051825	1		
NT	CG31989	FBgn0051989	0		
NT	CG31998	FBgn0051998	0		
NT	CG32021	FBgn0052021	1		
NT	CG32345	FBgn0052345	3		
NT	CG32436	FBgn0052436	0		
NT	CG32639	FBgn0052639	0		
NT	CG32783	FBgn0029686	0		
NT	CG33109	FBgn0053109	0		
NT	CG33267	FBgn0053267	2		
NT	CG3330	FBgn0039511	0		
NT	CG33301	FBgn0053301	3		
NT	CG33340	FBgn0053340	0		
NT	CG3408	FBgn0036008	0	PRO1855	hypothetical protein PRO1855
NT	CG3501	FBgn0034791	0	C14orf122	chromosome 14 open reading frame 122
NT	CG3546	FBgn0029716	4		
NT	CG3598	FBgn0026645	0		
NT	CG3713	FBgn0040343	0		
NT	CG3764	FBgn0036684	0		
NT	CG3800	FBgn0034802	0	ZNF9	zinc finger protein 9 (a cellular retroviral nucleic acid binding protein)
NT	CG3805	FBgn0031665	0		
NT	CG3973	FBgn0029881	0		
NT	CG40402	FBgn0058402	0		
NT	CG4627	FBgn0033808	0	C16orf51	chromosome 16 open reading frame 51
NT	CG4820	FBgn0037876	0	ZNF136	zinc finger protein 136
NT	CG5237	FBgn0038893	1	KIAA1409	KIAA1409
NT	CG5323	FBgn0034362	0		
NT	CG5386	FBgn0038945	10		
NT	CG5457	FBgn0039433	3		
NT	CG5468	FBgn0039434	0		
NT	CG5538	FBgn0038052	0		
NT	CG5855	FBgn0036997	0		
NT	CG6018	FBgn0034736	0		
NT	CG6073	FBgn0039417	0	LOC51236	brain protein 16
NT	CG6195	FBgn0038723	1	DRG2	developmentally regulated GTP binding protein 2
NT	CG6301	FBgn0034161	0		
NT	CG6480	FBgn0036964	0	FRG1	FSHD region gene 1
NT	CG6569	FBgn0038909	0	MYH2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult
NT	CG6614	FBgn0032369	0	TTC18	tetratricopeptide repeat domain 18
NT	CG6631	FBgn0039206	0		
NT	CG7053	FBgn0030960	0	FLJ11773	hypothetical protein FLJ11773
NT	CG7200	FBgn0032671	1	JMD4	jumonji domain containing 4
NT	CG7242	FBgn0040494	0		
NT	CG7381	FBgn0038098	0		
NT	CG7567	FBgn0039670	0		

10

20

30

40

二次スクリーニングにおけるスコア	遺伝子	FBGN	可能性のある 21nt オフターゲット の数	ヒトオルソログ (NCBI Homologene)	ヒトオルソログの記載 (NCBI遺伝子)
NT	CG8031	FBgn0038110	0	C2orf4	chromosome 2 open reading frame 4
NT	CG8420	FBgn0037664	0		
NT	CG8538	FBgn0038223	0		
NT	CG8852	FBgn0031548	1	LRRTM4	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4
NT	CG9328	FBgn0032886	0		
NT	CG9380	FBgn0035094	0		
NT	CG9773	FBgn0037609	0		
NT	CR32205	FBgn0052205	1		
NT	Edg78E	FBgn0000551	0		
NT	I(1)G0196	FBgn0027279	0	KIAA0433	KIAA0433 protein
NT	I(1)G0222	FBgn0028343	0		
NT	Mkm1	FBgn0029152	1	MKRN1	makorin, ring finger protein, 1
NT	msb1I	FBgn0027949	0		
NT	MTA1-like	FBgn0027951	4	MTA1	metastasis associated 1
NT	ntf6	FBgn0027548	0	RBM15	RNA binding motif protein 15
NT	olf186-M	FBgn0015522	0		
NT	Osi13	FBgn0037422	0		
NT	Osi17	FBgn0037427	0		
NT	Osi19	FBgn0037429	0		
NT	Pop	FBgn0003046	0		
NT	sano	FBgn0034406	0		
NT	T48	FBgn0004359	0		
NT	yellow-d2	FBgn0034856	0		

【 0 2 1 4 】

【表 I I 】

遺伝子	記載 Cq	単位複製 配列番号	発現	TG 処理細胞 における NFAT 核局在化 の阻害	21ntの 可能性 のある オフ ターゲット の数	21ntの 可能性 のある オフ ターゲット の数	20ntの 可能性 のある オフ ターゲット の数	20ntの 可能性 のある オフ ターゲット の数	19ntの 可能性 のある オフ ターゲット の数	19ntの 可能性のある オフターゲット の数	コメント
CanA1	Calmodulin A1	CG1455	DRSC16800 +/-	-	0	0	0	0	0	0	
Pp2B-14D	Protein phosphatase 2B A1 14D	CG3942	DRSC22316 ++	++	0	0	0	0	0	0	
			DRSC2270	+++	1	CG12238 2	CG12238, CG32223	CG32223 3	CG12238, CG32223, CG32225	CG12238	
CanA14F	Calmodulin A14F	CG3819	DRSC2239 +	+++	0	0	0	0	0	0	
			DRSC2211	+++	13	陽性なし	56	陽性なし	163	陽性なし	CG3942 (Pp2B-14D) はこの単位複製配列と 18の一一致を有する。
CanB	Calmodulin B	CG4209	DRSC16849 +/-	++	0	0	1	1	CC11217 (CanB2)	2	CC11217/CanB2, CG3559
CanB2	Calmodulin B2	CG1127	DRSC07355 ++	++	0	0	1	1	CG3200 (CanB1)	2	CG3200 (CanB), CG5744
CG32812	CG32812	CG32812	DRSC16473 +	-	0	0	0	0	0	0	

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

【表 III】

追補表IIIにおける分子	可能性のあるオフターゲット	可能性のあるオフターゲットの記載(NCBI遺伝子)
I. 直接的なNFATキナーゼ		
<i>Snuggy</i> (sgg, CG2621)	CG13772 (neuroligin)	ニューレキシン結合；外胚葉発生および神経発生；
	CG4771	NA
	CG12199 (kek5)	ペルオキシダーゼ活性、細胞接着、防御反応；活性酸素種代謝；神経インパルスの伝達；
	CG1049 (cc11)	コリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ活性；
	CG5907 (frq)	カルシウム感受性グアニル酸シクラーゼアクチベーター活性；カルモジュリン結合；神経伝達物質分泌；シナプス伝達；
	CC32538 (nAcRalpha-18C)	ニコチン性アセチルコリン活性化陽イオン選択性チャネル活性；筋収縮；神経-神経シナプス伝達；
	CG9176 (cngr1)	細胞内環状ヌクレオチド活性化陽イオンチャネル活性；カリウムチャネル活性；感覺認知；シグナルトランスダクション；
	CG3427 (epac)	cAMP依存性タンパク質キナーゼ制御因子活性；低分子量GTPase媒介性シグナルトランスダクション；
	CG33513 (nmdar2)	N-メチル-D-アスパラギン酸選択性グルタミン酸受容体活性；陽イオン輸送；神経-神経シナプス伝達；
	CG13290	NA
	CG12708	NA
	CG4136	スクレオペース、スクレオシド、スクレオチド、および核酸の代謝；RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の制御；リガンド依存性核内受容体活性；
<i>Gasket</i> (gsk, CG11338, CG31003)	CG12212 (peb)	転写因子活性；リーディングエッジ細胞運命決定；外胚葉発生；光受容体細胞形態形成；気管上皮完全性の維持；INKカスケードの負の制御；
CG12147	CG6205 (por)	アシルトランスフェラーゼ活性；細胞接着；Wnt受容体シグナル伝達経路の制御；
	CG14895 (pak3)	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；MAPKKKカスケード；アクチンフィラメント組織化；細胞増殖；細胞骨格組織化およびバイオジェネシス；
	CG18214 (trio)	Rhoグアニル-ヌクレオチド交換因子活性；アクチン細胞骨格組織化およびバイオジェネシス；軸索誘導；中枢および末梢神経系発生；神経インパルスの伝達。
<i>Disc overgrown</i> (dco, CG2048)	CG2028	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；Wnt受容体シグナル伝達経路；smoothenedシグナル伝達経路の負の制御；タンパク質分解およびペプチド分解の制御；
<i>CK1 alpha</i> (CG2028)	CG2048 (ck1alpha)	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；Wnt受容体シグナル伝達経路；smoothenedシグナル伝達経路の負の制御；タンパク質分解およびペプチド分解の制御；
	CG2577	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；カゼインキナーゼ活性；
	CG9102 (bab2)	転写因子活性；クロマチン構築または分解；複眼-触角原基変態；性決定；雌生殖腺発生；脚形態形成；神経インパルスの伝達。
	CG7838 (bab1)	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；染色体分離；有糸分裂紡錘体チェックポイント；有糸分裂からの出口の制御。
	CG7892 (nmo)	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；抗アボトーシス；細胞増殖；平面極性の確立；眼形態形成；翅形態形成；Wnt受容体シグナル伝達経路の負の制御；frizzledシグナル伝達経路の負の制御；
	CG16973 (msn)	JUNキナーゼキナーゼキナーゼ活性；低分子量GTPase制御因子活性；卵形成；光受容体細胞形態形成；細胞形態の制御；
CG2577	CG2048	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；カゼインキナーゼ活性；細胞間情報伝達；概日リズム；成虫原基成長；エクジストロイド分泌の制御；タンパク質-核内移行の制御；
	CG2028	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；Wnt受容体シグナル伝達経路；smoothenedシグナル伝達経路の負の制御；タンパク質分解およびペプチド分解の制御；
	CG7838 (bab1)	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；染色体分離；有糸分裂紡錘体チェックポイント；有糸分裂からの出口の制御
	CG7236	受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；細胞質分裂；細胞周期進行の制御；
	CG3228 (kurz)	ATP依存性ヘリカーゼ活性；スプライセオソームによる核mRNAスプライシング；タンパク質分解およびペプチド分解。
CG7094	CG9135	グアニルヌクレオチド交換因子活性；タンパク質分解およびペプチド分解。
CG9962	CG5621	グルタミン酸開口型イオンチャネル活性；カイニン酸選択性グルタミン酸受容体活性；カリウムチャネル活性；神経-神経シナプス伝達。
II. その他のキナーゼ		
CG31640	CG33531 (ddr)	膜貫通受容体タンパク質チロシンキナーゼ活性；細胞-細胞接着；外胚葉発生；中胚葉発生；神経系発生；
	CG2699	ホスホイノシチド3-キナーゼ制御因子活性；インスリン受容体シグナル伝達経路；細胞サイズの正の制御；

10

20

30

(P13K21B)	成長の正の制御；細胞増殖の制御；細胞サイズの制御；
Pelle (pdl, CG5974)	CG5263 mRNA 3'-UTR結合；翻訳抑制因子活性；
Id1(G0148 (CG32742)	CG9463 α -マンノシダーゼ活性；N-グリコシル化合物を加水分解する加水分解酵素活性。
Pole hole (phl, CG2845)	CG8522 (HLH106) 脂肪酸生合成；転写の正の制御；RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写；
	CG11073 NA
	CG3634 NA
	CG15105 転写制御因子活性；ユビキチン-タンパク質リガーゼ活性；
	CG3198 スプライセオソームによる核mRNAスプライシング
	CG17299 受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；防御反応；脂肪酸代謝；リン酸代謝の制御；ストレスに対する反応
	CG8465 NA
Foraging (for, CG10033)	CG7826 (mnrb) 受容体シグナル伝達タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性；神経系発生；外胚葉発生；嗅覚学習；細胞増殖；概日リズム；アポトーシスの誘導；学習および/または記憶；
	CG32629 NA
	CG13472 NA
	CG18389 (Elp93F) 転写因子活性；自己食食；唾液腺細胞死のエクジソン媒介性誘導；ホルモンによるアポトーシスの誘導；幼稚中腸組織融解；
	CG9310 (hmf4) ステロイドホルモン受容体活性；RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の制御；内胚葉発生；中胚葉発生；
	CG16902 (Hr4) ステロイドホルモン受容体活性；変態；RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の制御
	CG4013 (smr) 補助抑制因子活性；RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の制御。
	CG8949 NA
	CG14447 (grifp) グルタミン酸受容体結合；筋肉付着部の決定；
	CG5683 (Aef1) RNAポリメラーゼII転写因子活性；細胞増殖；
	CG32180 (elp74EF) 特異的RNAポリメラーゼII転写因子活性；自己食食；細胞死；唾液腺細胞死；中胚葉発生；卵形成；
	CG32423 mRNAプロセシング；
	CG3696 (kds) ATP依存性ヘリカーゼ活性；胞胚葉分割；クロマチン構築または分解；
	CG3695 (MED23) RNAポリメラーゼII転写媒介物質活性；媒介物質複合体；
	CG14023 NA
	CG13109 (taf) 転写活性化補助因子活性；シグナルトランスデューサー活性；境界滲胞細胞移動；
	CG9381 (mura) 学習および/または記憶；嗅覚学習；
	CG5466 NA
	CG12254 (MED25) RNAポリメラーゼII転写媒介物質活性；
	CG9354 (Rpl34b) 核酸結合；リボソームの構造成分；
	CG6575 (glee) 炭水化物結合；細胞接着；ヘテロ親和性細胞接着；神経系発生。
	CG14366 NA
	CG1161 NA
	CG10732 NA
	CG7368 NA
	CG12432 NA
	CG17888 (Pdp1) 転写因子活性；概日リズム；中胚葉発生；
P13K59F (CG5373)	CG3856 (Oamb) オクトバミン受容体活性；オクトバミン/チラミンシグナル伝達経路；排卵；
	CG14619 システイン型エンドペプチダーゼ活性；ユビキチンチオールエステラーゼ活性；ユビキチン特異的プロテアーゼ活性
	CG10989 NA
III. OTHER	
CG6919	CG18208 Gタンパク質共役受容体タンパク質シグナル伝達経路；神経インパルスの伝達。
CG31288	CG15415 NA
	CG32381 (unc-13-4A) 神経伝達物質分泌；シナプス小胞プライミング。

追補表IIにおける分子	可能性のあるオフターゲット	可能性のあるオフターゲットの記載(NCBI遺伝子)
CanA1 (CG1455)	CG7952 (giant)	RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の負の制御；頭部後方分節化(segmentation)；末端領域決定；軸椎前方/後方の接合体決定(zygotic determination)；環状膜発生；唾液腺発生；胴部シグナル伝達経路。
Pp2B-14D (CG9842)	CG12238 (I(I)G0084)	クロマチン結合；転写制御因子活性；遺伝子サイレンシング；卵形成。
	CG32223	NA
	CG32025	NA
CanA-14F (CG9819)	掲載なし	
CanB (CG4209)	CG11217 (CanB2)	カルシウム依存性タンパク質セリン/スレオニンホスファターゼ活性；細胞ホメオスタシス；神経伝達物質分泌；小胞媒介性輸送。
	CG15859	NA
CG11217 (CanB2)	CG4209 (CanB)	カルシウム依存性タンパク質セリン/スレオニンホスファターゼ活性；細胞ホメオスタシス；神経伝達物質分泌；小胞媒介性輸送。
	CG5744	カルシウム媒介性シグナル伝達；感覚認知；シグナルトランスタクション；視覚認知。

【表 I V】

	一次 スクリー ニング における スコア 遺伝子	ヒト相同体 の記載	ca	FBgn	単位複製 配列番号	2intの 可能性 のある オフ ターデット の数	2intの 可能性 のある オフ ターデット の数	20ntの 可能性 のある オフ ターデット の数	20ntの 可能性 のある オフ ターデット の数	19ntの 可能性 のある オフ ターデット の数	19ntの 可能性 のある オフ ターデット の数
I. 直接的NAT キナーゼ											
GRK3	6	FBgn0003371	GSN08	CG2221	FBgn0003371	DRSC18932	4	CG5507, CG13772, CG12199, CG1049, CG32538, CG3178, CG34271, CG12020, CG31705, CG31536	7	CG4771, CG5507, CG13772, CG12199, CG12199, CG1049, CG32538, CG3178, CG34271, CG12020, CG31705,	12
	1	FBgn0003340	GSK3A	CG11338	CG11338	FBgn0046332	DRSC14056	0	0	1	CG12212
CK1	4	FBgn0003341	CSNK1G	CG3985	FBgn0011253	DRSC16154	0	0	0	0	
	3	CG12147	CSNK1	CG12147	FBgn0007255	DRSC12182	0	2	CG6205, CG14935	3	CG6205, CG14935, CG16214
	1	data overgrown (dec)	CSNK1E	CG2248	FBgn0024113	DRSC16228	0	1	CG2028	1	CG2028
	1	SK188	CSNK1A1	CG2226	FBgn0015224	DRSC20231	3	CG038, CG2577, CG1873	4	CG2577, CG338, CG1873	6
	1	CG2577	CSNK1	CG2577	FBgn0003064	DRSC19863	3	CG038, CG2577, CG338	4	CG2577, CG338, CG1873	5
	1	CG3794	CSNK1	CG3794	FBgn0022650	DRSC30005	0	1	CG315	1	CG315
	0	CG3962	CSNK1	CG3962	FBgn0031441	DRSC00739	0	0	1	CG5621	
DYK	1	CG40478	DYK	CG40478	FBgn000373	DRSC20555	0	0	0		
II. その他の キナーゼ											
DDR	4	CG31840	DDR	CG31840	FBgn001840	DRSC2504	0	2	CG3331, CG2299	2	CG3331, CG2299
RIK	3	FB (dec)	IRAK	CG5574	FBgn0010441	DRSC17226	0	1	CG3253	1	CG3253
CK2	3	CK2alpha	CSNK2A	CG17520	FBgn000256	DRSC11946	0	0	0	0	

CD67	2	1110149	CD67	CG32742	FB#00026350	DRSC0429	0	CG9463	1	CG9463	1	CG9463	
TRAP	2	1123464	TRAP	CG32855	FB#0004661, FB#00053554, FB#00059068	DRSC4032	0	CG9463	0	CG9463	0	CG9463	
RAF	1	111 (polo head)	RAF	CG32845	FB#0003978	DRSC18821	2	CG11073, CG32822	4	CG11073, CG32822, CG32845, CG11073, CG3198, CG11073, CG32822, CG32845, CG3198, CG11073, CG32822, CG32845	5105	7	CG3198, CG11073, CG32822, CG32845, CG3198, CG11073, CG32822, CG32845
PRKQ1	1	111 (torso)	PRKQ1	CG310033	FB#0000721	DRSC00185	2	CG32829, CG11073, CG32828, CG32810	4	CG32829, CG11073, CG32828, CG32810	27	CG32829, CG11073, CG32828, CG32810	
PRK	1	111459F	PRK3C3	CG5373	FB#00014277	DRSC04840	0	CG14419, CG10989	2	CG14419, CG10989	3	CG14419, CG10989	
HTH	5	CG6918	HTH4	CG6919	FB#00039590	DRSC16134	0	CG18206	1	CG18206	1	CG18206	
FAN20	4	CG31145	FAN20C	CG31145	FB#00051145	DRSC14671	0	CG15415	0	CG15415	0	CG15415	
		CG31268		CG31268	FB#00051268	DRSC14687	0	CG32351	1	CG32351	1	CG32351	
	69	CG31420		CG31420	EPPE8	CG14670	FB#00038342	DRSC14693	0	CG15415, CG32351	2	CG15415, CG32351	
POLYAP	3	CG4585		CG4585	FB#00023335	DRSC4475	0		0		0		
	37	CG3074		CG3074	FB#00045970	DRSC20159	0		0		0		
	2	CG3074	C158	CG3074	FB#00034709	DRSC4334	0		0		0		
		CG3074											

【図面の簡単な説明】

【0217】

(図1) 図1A～1Cは、貯蔵量作動性Ca²⁺流入(SOCE)における遺伝子量効果を示す。図1Aは、SOCEおよびCRACチャネル機能に欠陥を有する患者の系図を示す。2人の男性SCID患者(被験体ID番号8および11；塗りつぶした黒色四角形)は、同族の両親(被験体ID番号35および36)の下に生まれた。機能的および遺伝的分析について、DNAおよび血液試料を、黄色および黒色に示された全個体から採取した。半分黒色四角形または丸は、表現型分析により測定されるヘテロ接合性疾患保因者を示す。二重水平バーは血族結婚、黒色四角形はSCID疾患、対角線バーは個体の死を示す。図1Bは、疾患形質のヘテロ接合性保因者として定義するCRAC欠損性SCID患者の両親のT細胞におけるSOCEの低下を示す。T細胞を、細胞外Ca

10

20

30

40

50

Ca^{2+} の非存在下でタブシガルジン(TG)で刺激した。 Ca^{2+} 流入のピーク(上部パネル)および速度(下部パネル)を、0.5mM細胞外 Ca^{2+} の再添加後、測定した。図1Cは、12人/21人のSCID患者の親族メンバーをヘテロ接合性疾患形質保因者であると表現型的に同定するSOCEの低下を示す。 Ca^{2+} 流入を、0.2mM細胞外 Ca^{2+} を用いること以外、Bに記載されているように測定した。4~5つの実験からの Ca^{2+} 流入速度の平均が示されている。個々のID番号は、図1Aに示されたものに対応する。星は、2nM/s(赤色点線)未満の流入速度により定義される場合のヘテロ接合性保因者を示す。Co、健康な対照；P、患者。

(図2) 図2A~2Bは、ゲノムワイドなRNAiスクリーニングがショウジョウバエOraiをNFAT転位置および貯蔵量作動性 Ca^{2+} 流入を制御するタンパク質であると同定することを示す。図2Aは、dSTIMまたはdOraiのRNAiがNFATの脱リン酸化を阻害することを示す。NFAT1(1~460)-GFPを安定にトランスフェクションしたS2R+細胞を、dSTIM、dOrai、または関連性のないDNA配列(擬似)に対する二本鎖(ds)RNAiと4日間インキュベートした。細胞を、刺激しないままにしておく(-TG)か、またはタブシガルジンで10分間刺激し(+TG)、その後、TGでの刺激後に溶解し、そして、細胞抽出物を、SDS-PAGEにより分離し、NFAT1に対する抗体でイムノプロッティングした。NFATの脱リン酸化は、SDS-PAGE上のより速い移動(より低いバンド)により証明される。図2Bは、dSTIMまたはdOraiのいずれかのRNAiがS2R+細胞において Ca^{2+} 流入を阻害することを示す。細胞を、刺激しないままにしておく(-TG)か、またはタブシガルジンで10分間刺激し(+TG)、その後、Fluo-4およびFura-Redを負荷し、フローサイトメトリーにより Ca^{2+} 流入について分析した。1 μM タブシガルジンを示された時点で加えた。各パネルにおける上部線はGfpについてのRNAiを示し、下部線はdSTIMまたはdOraiについてのRNAiを示す。 Ca^{2+} 流入の減少は、タブシガルジンの添加後の排出率における大きく低下した変化により示される。

(図3) 図3A~3Cは、Orai1が膜貫通タンパク質であることを示す。図3Aは、Orai1が真核生物において高度に保存されていることを示す。Orai1の4つの推定の膜貫通領域の1番目における配列保存(M1、下線)が示されており、SCID患者において見出されるR>W突然変異(太字)を含む。図3Bは、Orai1の膜トポロジーを示す。ヒドロパシープロットは、Kyt e-Doolittleアルゴリズムを用いて19アミノ酸のウインドウサイズでヒトOrai1(301アミノ酸、NP_116179)の完全長アミノ酸配列から計算した。3つの膜貫通ドメイン(M2~M4)は、スコア>1.8をもつと予想される；M1は~1.3のスコアをもつ。図3Cは、ヒドロパシープロットおよび免疫細胞化学データに基づいたOrai1の推定の膜トポロジーの概略図を示す。SCID患者におけるR>W突然変異の部位は暗色の囲みにより示されている。

(図4) 図4A~4Hは、Orai1の発現がSCID T細胞においてCRACチャネル機能を回復させることを示す。図4Aは、8mM BAPTAを含むピペット溶液での受動的貯蔵枯渇によるOrai^{WT}補完SCID T細胞における内向き電流の活性化を示す。示された時点において、20mM Ca^{2+} 溶液を二価を含まない(DVF)溶液と交換した。二価陽イオンの非存在下における電流の増加は、CRACチャネルおよび特定の他の Ca^{2+} 選択性チャネルの特性である。図4Bは、-100mVから+100mVまでの電圧傾斜間に測定した20mM Ca^{2+} 中(左)およびDVF溶液中(右)の電流-電圧(I-V)関係を示す。データは、4Aにおける矢印により示された時点で収集した。 Ca^{2+} 電流I-V関係は、逆転電位>+90mVで内向きに整流していることに留意されたい。DVF溶液において、電流は~+50mVで逆転した。図4Cは、突然変異体Orai1^{R>W}を発現するSCID T細胞において、内向き Ca^{2+} および Na^+ 電流が8mM BAPTAによる受動的貯蔵枯渇中に発生できないことを示す。図4Dは、脱増強する Na^+ 電流のノイズ特性を示す。上部グラフは、-100mVの一定保持電位における平均電流を示す。点線は、ゼロ電流レベル(20mM Ca^{2+} + 2 μM La³⁺において測定した)を示す。分散は、 Na^+ 電流の100-msセグメントから計算し、下部パネルにおいて平均電流に対してプロットした。データは、下限値を単位電流に割り当て、26fAの傾きをもつ直線にフィットしている。図4Eは、Orai^{WT}を発現するSCID T細胞における Ca^{2+} 電流の高速不活性化を示す。高速不活性化は、20mM Ca^{2+} で、+30mVの保持電気から-100mVへの300-msステップ中に測定した。図4Fは、2 μM La³⁺による Ca^{2+} 電流の遮断を示す。Orai^{WT}を発現するSCID T細胞における内向き電流の受動的誘導後、2 μM La³⁺を添加した。

点線は、実験の始めの細胞全体の侵入直後に収集したトレースから決定したゼロ電流レベ

10

20

30

40

50

ルを示す。図4Gは、2-APBの低用量(5 μ M)および高用量(40 μ M)の、それぞれ、適用による I_{CRAC} の増強および遮断を示す。図4Hは、示された細胞カテゴリーにおけるピーク電流密度の要約を示す。ピーク電流は、-100mVへのステップ中に測定した。野生型Orai1での再構成は、このように、天然のCRACチャネルの予想される特性をもつ電流を再構成する。Orai1^{WT}またはOrai1^{R>W}を形質導入した細胞は、GFP蛍光に基づいて視覚的に選択した；形質導入していない細胞はGFP陰性であった。

(図5)図5A～5Dは、SCID患者由来の線維芽細胞におけるOrai1の発現が貯蔵量作動性Ca²⁺流入を回復させることを示す。図5Aは、75 μ M 2-APBによる、Orai1^{WT}発現SCID線維芽細胞におけるCa²⁺流入の阻害を示す。図5Bは、3 μ M 2-APBによる、Orai1^{WT}発現SCID線維芽細胞におけるCa²⁺流入の増強を示す。図5C～5Dは、20mM Ca²⁺の再添加前(図5C)または後(図5D)に、加えられた2 μ M La³⁺によるOrai1^{WT}発現SCID線維芽細胞におけるCa²⁺流入の阻害を示す。各実験について、～15個から20個までのGFP陽性線維芽細胞を分析した。実験は、各プロトコールについて少なくとも3回、繰り返した。

(図6)図6A～6Cは、NFAT制御ドメイン、およびショウジョウバエにおけるゲノムワイドなRNAiスクリーニングの結果を示す。図6Aは、刺激で脱リン酸化される保存されたリン酸化セリンモチーフ(丸)を示すNFAT1のN末端制御ドメインの概略図を示す。インビトロキナーゼアッセイに用いられたSRR1、SP2、およびSP3モチーフに対応するペプチドが表されている。下線で示されたセリン残基は、インビトロでNFAT1においてリン酸化されていることが同定されており、これらは、突然変異体SP2およびSP3モチーフにおいてアラニンに突然変異している残基である。図6Bは、異種性に発現したNFATがショウジョウバエS2R+細胞においてCa²⁺およびカルシニューリンにより正しく制御されることを示す。ショウジョウバエS2R+細胞にNFAT1-GFP発現ベクターをトランスフェクションした。48時間後、細胞を未処理のままにしておく(Untr)、またはタブシガルジン(TG、1 μ M)で30分間処理し、そして、細胞由来の可溶化物を抗NFAT1での免疫プロッティング(IB)により分析した。PおよびdePは、それぞれ、リン酸化および脱リン酸化のNFAT-GFPの移動位置を指す。図6Cは、一次スクリーニングの結果の作表を示す。

(図7)図7A～7Cは、NFATリン酸化についてのショウジョウバエS2R+細胞RNAiスクリーニングにおいて同定した候補キナーゼのスクリーニング、およびNFATの負の制御因子としてのDYRKの同定を示す。図7Aは、候補キナーゼの過剰発現した哺乳動物相同体のNFAT制御ドメインを直接的にリン酸化する能力を示す。選択したショウジョウバエキナーゼのFLAGタグ付き哺乳動物の相同体をHEK293細胞において発現させ、免疫精製したキナーゼをGST-NFAT1(1～415)のリン酸化についてのインビトロのキナーゼアッセイを用いて試験した。リン酸化レベルは、短時間(上部パネル)または長時間(中央パネル)曝露のいずれかでのオートラジオグラフィーにより評価した。各キナーゼの発現は、抗FLAG抗体を用いる免疫プロッティング(IB)により検証した。試験したキナーゼは以下のとおりである；レーン1、CK1；レーン2、CK1；レーン3、Bub1；レーン4、STK38；レーン5、STK38L；レーン6、CDC42BPA；レーン7、ARAF；レーン8、PRKG1；レーン9、SGK；レーン10および11、CSNKA1およびCSNKA2(CKIIアイソフォーム)；レーン12、SRPK1；レーン13、DYRK2；レーン14、ALS2CR7；レーン15、IRAK4。Bub1は、後で、>10個の予想されるオフターゲットのため、本発明者らの候補リストから除外した(実施例3)。図7Bは、DYRK2の過剰発現がNFAT1のカルシニューリン媒介性脱リン酸化を遮断することを示す。各キナーゼを、NFAT-GFPと共にHEK293細胞へ同時トランスフェクションした；18時間後、細胞を、2mM CaCl₂の存在下で1 μ Mイオノマイシンで刺激した。可溶化液をNFAT1抗体を用いて免疫プロットした。キナーゼの相対的発現レベルは、抗FLAG抗体を用いる免疫プロットにより測定し、図6A(下部パネル)に示したものと同一であった。図7Cは、内因性DYRK1Aの枯渇がNFAT活性化を増強することを示す。Haタグ付きNFAT1-GFPを安定に発現するHeLa細胞に、対照siRNAまたはDYRK1A特異的siRNAをトランスフェクションした。4日後、細胞を、1 μ Mタブシガルジン(TG)、または1 μ Mタブシガルジン(TG)、続いて、示された時点について20nM CsAで刺激した；可溶化液を抗HA抗体を用いてNFAT-GFPについて免疫プロットした(左)。DYRK1A mRNAレベル(右)を3日および4日後、リアルタイムPCRにより評価した。si対照、スクランブル対照siRNA

10

20

30

40

50

; siDYRK1A、DYRK1A特異的siRNA。結果は3つの独立した実験の平均および標準偏差を示す。

(図8) 図8A～8Cは、DYRK2がNFAT依存性レポーター活性および内因性IL-2発現を阻害することを示す。図8Aは、DYRK2の過剰発現が刺激されたジャーカットT細胞においてIL-2プロモーター作動性ルシフェラーゼ活性を阻害することを示す。(IL2プロモーターは、活性化がNFATへの強い要求を示すサイトカインプロモーターの例である。)指数関数的に増殖中のジャーカットT細胞に、pRLTK(レニラのルシフェラーゼ、内部対照)、IL-2-pGL3(IL-2プロモーター作動性ホタルのルシフェラーゼ、実験的プロモーター)、および空ベクターまたは増加量の野生型(WT)もしくはキナーゼ不活性型(KD)DYRK2発現プラスミド(5、10、15、および20 μg)を同時トランスフェクションした。24時間後、処理していない細胞、またはPMAおよびイオノマイシンで6時間刺激した細胞を、IL-2プロモーター作動性ルシフェラーゼ活性について分析した。ホタルのルシフェラーゼは、レニラのルシフェラーゼに対して標準化し、誘導の倍数を、未処理細胞において測定したIL-2プロモーター活性に対して計算した。結果は、3つの独立した実験の平均および標準偏差を示す。図8Bは、DYRK2の過剰発現が、刺激されたジャーカットT細胞において内因性IL-2発現を阻害することを示す。指数関数的に増殖中のジャーカットT細胞に、GFP、および空のベクターまたは増加量の野生型(WT)もしくはキナーゼ不活性型(KD)DYRK2発現プラスミド(10、20、および30 μg)を同時トランスフェクションした。24時間後、処理していない細胞、またはPMAおよびイオノマイシンで6時間刺激した細胞を、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリーによりGFP+細胞におけるIL-2発現について評価した。図8Cは、8Bに示した結果の定量化を示す。結果は、3つの独立した実験の平均および標準偏差を示す。

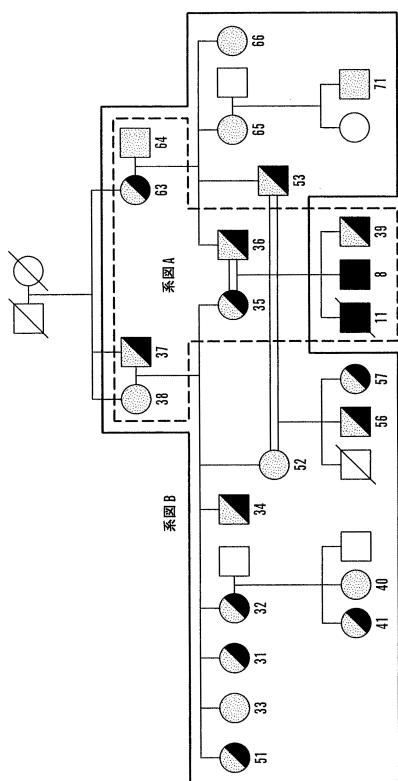
(図9) 図9A～9Cは、STIMタンパク質が、貯蔵量作動性Ca²⁺流入を変化させることによりNFAT局在性に影響を及ぼすことを示す。図9Aは、核NFATを含む細胞のパーセントを、擬似処理またはdSTIMに対するdsRNAでの処理後、3つの独立した実験において定量化したことを示す。平均および標準偏差をプロットする。50～100個の細胞を各実験について分析した。図9Bは、ショウジョウバエSTIM(dSTIM)のRNAi媒介性枯渇のNFATリン酸化状態に対する効果を示す。刺激していない、またはタブシガルジン(TG)刺激S2R+細胞から作製した可溶化液を、NFAT1に対する抗体での免疫プロッティングにより調べた。細胞を、擬似処理した、またはdSTIMを標的とするdsRNAで4日間処理した。図9Cは、dSTIMまたは確認スクリーニングからの新規な遺伝子候補に関して枯渇したS2R+細胞において、フローサイトメトリーにより分析した、細胞内Ca²⁺レベルを示す。GFP dsRNAが、dsRNA処理により引き起こされる非特異的効果についての対照として用いられた。基底[Ca²⁺]_i測定の30秒後、1 μMタブシガルジンを加え(矢印)、[Ca²⁺]_i測定をさらに5分間継続した。dSTIMの枯渢は、ほとんど完全に、タブシガルジン誘導性、すなわち、貯蔵量作動性のCa²⁺流入を消失させる。

(図10) 図10A～10Bは、ショウジョウバエにおける、およびヒトにおけるDYRKファミリーの異なるメンバー間の系統発生的関係、ならびにジャーカットT細胞におけるヒトDYRKの発現パターンを示す。図10Aは、距離に基づいた方法(近隣連結)を用いるDYRKファミリー-キナーゼの系統樹を示す。左側図は、プログラムTcoffeeにより計算した、ショウジョウバエCG40478とヒトDYRK2、3；ショウジョウバエCG4551(smi35A)とヒトDYRK4；ショウジョウバエCG7826(mnb)とヒトDYRK1 A、B(上部)の間の相同性関係を示す。右側の図において、CG40478-DYRK2についてのオルソログブートストラップ値は、CG40478-DYRK3についてより高い(上部)。それゆえに、DYRK2は、CG40478のオルソログ(種分化事象により分岐した遺伝子)であるが、DYRK3はパラログ(重複事象により分岐した遺伝子)である可能性がある。オルソログブートストラップ値の計算は、Orthotrappreで行った。図10Bは、ジャーカットT細胞においてDYRKファミリーメンバーの発現を示す。哺乳動物DYRK mRNAs inジャーカットT細胞の発現レベルはRT-PCR分析により推定した。プライマーは以下に対応する：

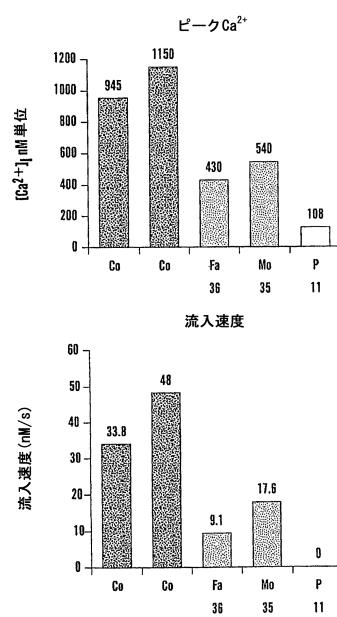
DYRK1A センス: AGTTCTGGGTATTCCACCTGCTCA (SEQ ID NO: 10)
DYRK1A アンチセンス: TGAAGTTACGGGTCCTGGTGGT (SEQ ID NO: 11);
DYRK2 センス: TCCACCTTCTAGCTCAGCTTCAA (SEQ ID NO: 12),
DYRK2 アンチセンス: TGGCAACACTGTCCTCTGCTGAAT (SEQ ID NO: 13);
DYRK1B センス: GCCAGCTCCATCTCCAGTTCT (SEQ ID NO: 14),
DYRK1B アンチセンス: CACAATATCGGTTGCTGTAGCGGT (SEQ ID NO: 15);
DYRK3 センス: TGCAATCCTTCTGAACCACCTCCA (SEQ ID NO: 16),
DYRK3 アンチセンス: GCTGTTCTACCTTCATCTCACCTCCA (SEQ ID NO: 17);
DYRK4 センス: AGGCTGTCATCACTCGAGCAGAAA (SEQ ID NO: 18),
DYRK4 アンチセンス: AGTCCTGCTGATCACCTGAATGCT (SEQ ID NO: 19);
DYRK6 センス: GCCGATGAGCATATGGCAAACACA (SEQ ID NO: 20),
DYRK6 アンチセンス: TACCCACTGCAGAAGGCTGGTTA (SEQ ID NO: 21)。

(図11)図11A～11IはNFAT制御遺伝子についてのヌクレオチド配列を示す。図11Aは、ヌクレオチド配列ORAI1(NM_032790 ; SEQ ID NO:1)を示す。図11Bは、ORAI2のヌクレオチド配列(BC069270 ; SEQ ID NO:2)を示す。図11Cは、ORAI3のヌクレオチド配列(NM_152 20 288 ; SEQ ID NO:3)を示す。図11Dは、DYRK1Aのヌクレオチド配列(NM_001396 ; SEQ ID NO: 4)を示す。図11Eは、DYRK1Bのヌクレオチド配列(NM_004714 ; SEQ ID NO:5)を示す。図11Fは、DYRK2のヌクレオチド配列(NM_003583 ; SEQ ID NO:6)を示す。図11Gは、DYRK3のヌクレオチド配列(NM_003582 ; SEQ ID NO:7)を示す。図11Hは、DYRK4のヌクレオチド配列(NM_003845 ; SEQ ID NO:8)を示す。図11Iは、DYRK6のヌクレオチド配列(NM_005734 ; SEQ ID N 0:9)を示す。

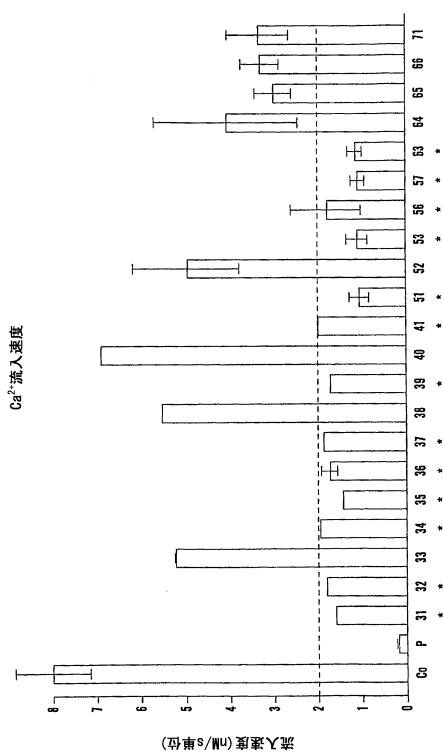
【図1A】



【図1B】



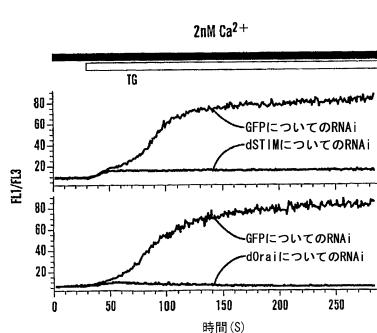
【図1C】



【図2A】



【図2B】



【図3 A】

Orail

91 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD 111

101 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

111 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

121 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

131 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

141 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

151 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

161 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

171 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

181 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

191 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

201 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

211 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

221 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

231 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

241 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

251 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

261 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

271 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

281 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

291 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

301 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

311 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

321 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

331 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

341 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

351 LKASSRTSALLSGFAMVANVEVQLDAD

361 NP_116179 (SEQ ID NO: 36)

371 NP_780632 (SEQ ID NO: 37)

381 XP_0222118 (SEQ ID NO: 38)

391 XP_393862 (SEQ ID NO: 39)

401 XP_043396 (SEQ ID NO: 40)

411 NP_097231 (SEQ ID NO: 41)

421 RE_001025629 (SEQ ID NO: 42)

431 CF099270 (SEQ ID NO: 43)

441 NP_991163 (SEQ ID NO: 44)

451 ENSEMBLE0000016651 (SEQ ID NO: 45)

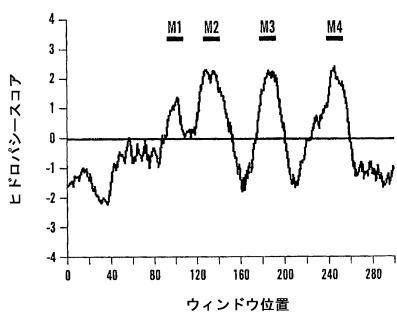
461 NP_011273 (SEQ ID NO: 46)

471 XP_080791 (SEQ ID NO: 47)

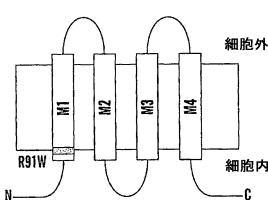
481 NP_116220 (SEQ ID NO: 48)

491 NP_089501 (SEQ ID NO: 49)

【図3 B】

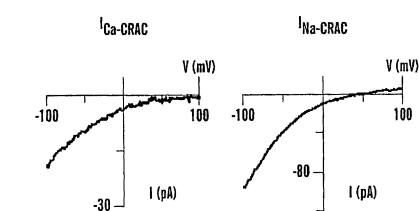


【図3 C】

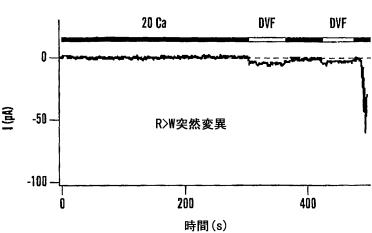


【図4 A】

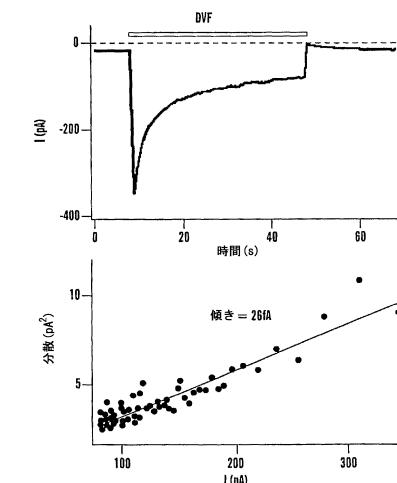
【図4 B】



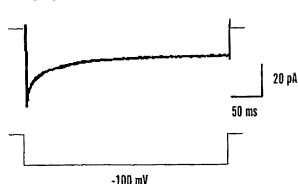
【図4 C】



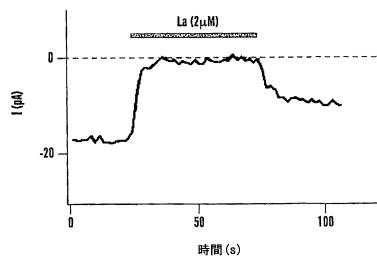
【図4 D】



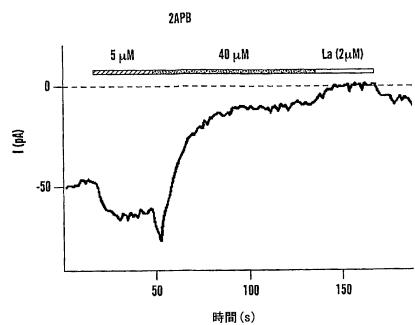
【図4 E】



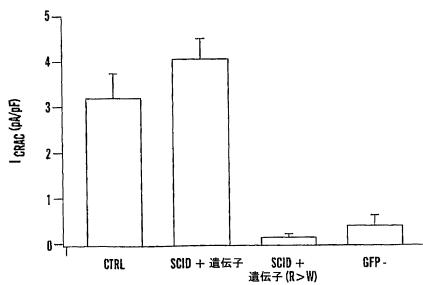
【図4 F】



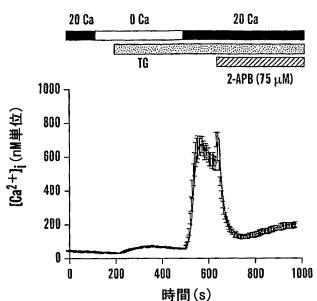
【図4 G】



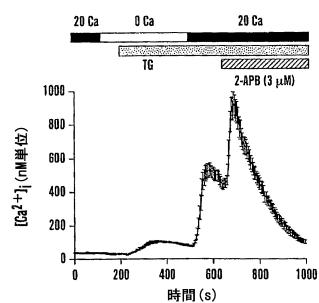
【図4 H】



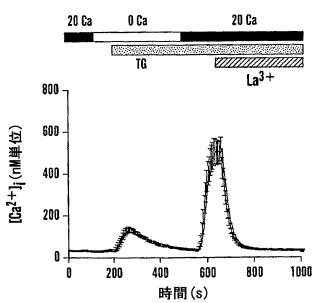
【図5 A】



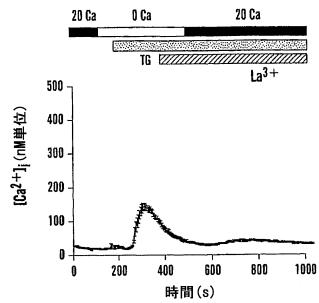
【図5 B】



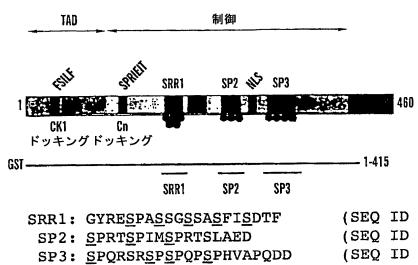
【図5 D】



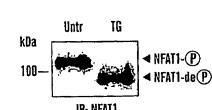
【図5 C】



【図6 A】



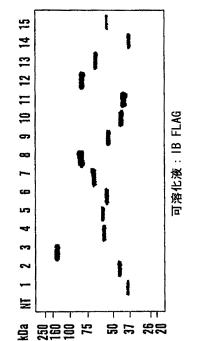
【図6 B】



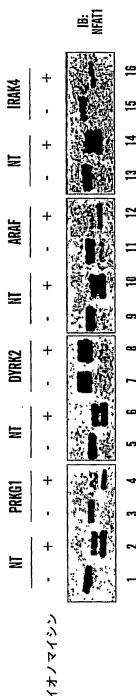
【図 6 C】

ウェルの数	
スクリーニング総数(293個の内部対照を除く)	21,884
技術的理由により未試験	813
陰性としてスコア付けされた	19,844
生存度/経過スクリーニングにおいて死滅またはヒットとして視覚的にスコア付けされた	489
陽性としてスコア付けされた	738
誤って注釈された	39
オフターゲット10	37
推定陽性総数	662 (3%)
再試験での陽性のパーセント	272/326 (83%)

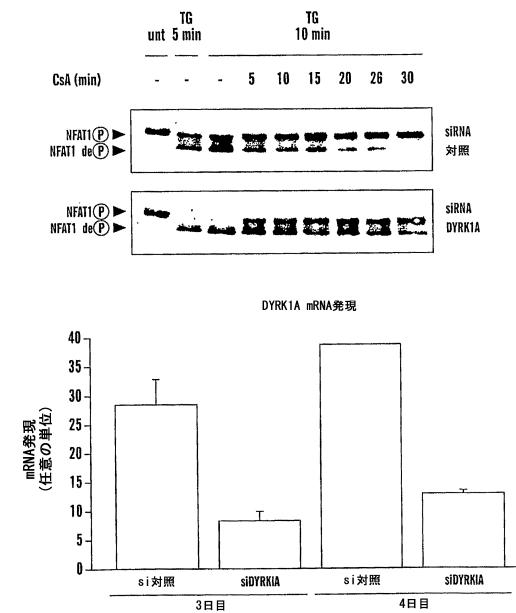
【図 7 A】



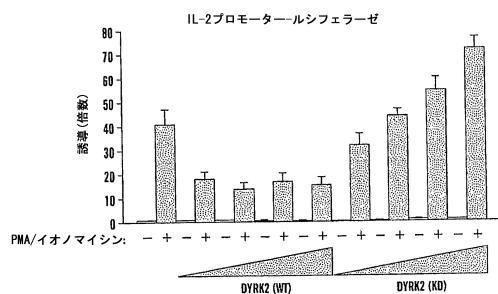
【図 7 B】



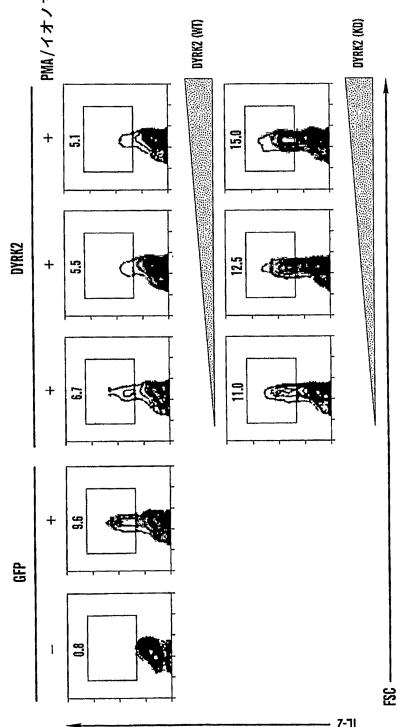
【図 7 C】



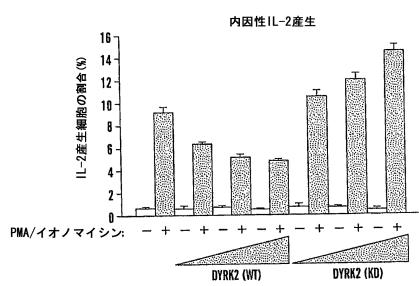
【図 8 A】



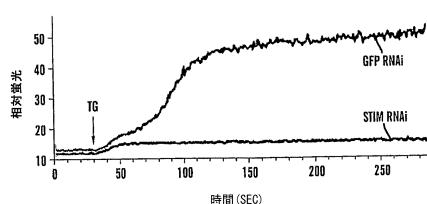
【図 8 B】



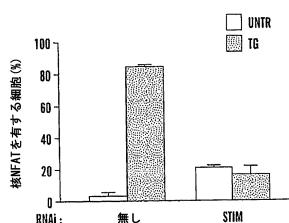
【図 8 C】



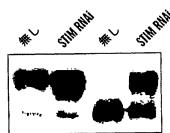
【図 9 C】



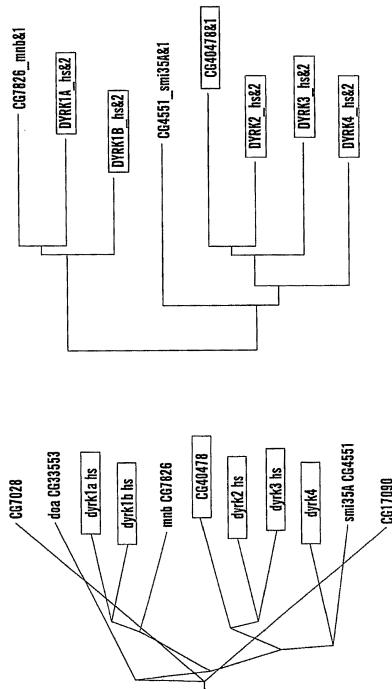
【図 9 A】



【図 9 B】

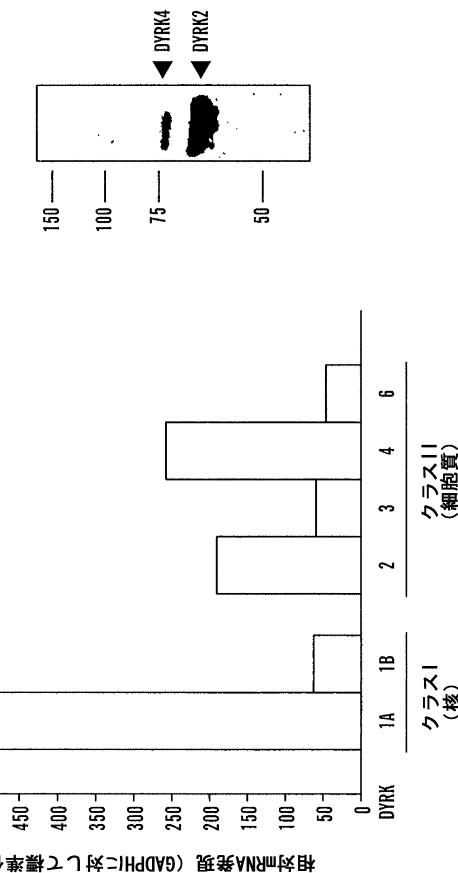


【図 10A】



【 义 1 1 A 】

【図10B】



【 义 1 1 B 】

【図11C】

【図 1 1 D - 1】

【図11D-2】

【図11E】

AGATGTTTCACAAA

【図 1 1 F】

【図11G】

【図1-1】

【図11-I-2】

【配列表】

000588127000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q	1/02	
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q	1/68	Z
G 01 N 33/15 (2006.01)	G 01 N	33/15	Z
G 01 N 33/53 (2006.01)	G 01 N	33/53	D

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ラオ アンジャナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ アガシー ストリート 19
(72)発明者 フェスク ステファン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン パーキンス ストリート 241 アパートメント 503ディー
(72)発明者 ホーガン パトリック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ アガシー ストリート 19
(72)発明者 グォーク ユサン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ワージントン ストリート 44 アパートメント 813

合議体

審判長 鈴木 恵理子
審判官 郡山 順
審判官 高 美葉子

(56)参考文献 国際公開第2003/048305 (WO, A1)
国際公開第2002/070539 (WO, A1)
国際公開第2003/052049 (WO, A1)
国際公開第2005/016962 (WO, A1)
国際公開第2005/019258 (WO, A1)
欧州特許出願公開第1074617 (EP, A1)
欧州特許出願公開第1293569 (EP, A1)
中国特許出願公開第1329064 (CN, A)
米国特許出願公開第2004/0219521 (US, A1)
TANG Y.T. et al., Viewing Sequence(s): 58, 1
82 of 412 for Document # 20040219521, Publication Site for Issued and Published Sequence

ces (PSI-PS) [online], Nov 2004; United States Patent and Trademark Office, Alexandria VA, USA, [retrieved on 06 Jun 2012] Retrieved from the Internet:<URL:<http://seqdata.uspto.gov/?pageRequest=viewSequence&DocID=20040219521&seqID=58%2C182>>, SEQ ID No. 58, 182 J. Biol. Chem., 2007/Jun, Vol. 282, No. 22, p. 16232-16243

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/12 - 15/28

C12N 5/10, 5/16

UniProt/GenSeq