

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4138485号
(P4138485)

(45) 発行日 平成20年8月27日(2008.8.27)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A B
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-559678 (P2002-559678)	(73) 特許権者	505377201
(86) (22) 出願日	平成14年1月17日(2002.1.17)		ノイロサーチ アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2004-531227 (P2004-531227A)		デンマーク国 デイケイ - 2750
(43) 公表日	平成16年10月14日(2004.10.14)		バレラップ, ペレルストラップベユ 93
(86) 国際出願番号	PCT/DK2002/000038	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開番号	W02002/059612		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成14年8月1日(2002.8.1)	(74) 代理人	100072040
審査請求日	平成16年9月8日(2004.9.8)		弁理士 浅村 肇
(31) 優先権主張番号	101 02 977.2	(74) 代理人	100088926
(32) 優先日	平成13年1月23日(2001.1.23)		弁理士 長沼 暉夫
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬剤、特に骨粗しょう症を治療するための有効活性化合物を開発するための試験システム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

塩素チャンネルC1C-7を内因的に又は異種性に発現するが、それ以外の少なくとも一種のC1C塩素チャンネルを発現しない細胞を含む、試験システムであって、骨粗しょう症、ページェット病又はその他の骨分解疾病の治療に適した物質を同定するための物質の試験に使用するための該試験システムにおいて、前記試験が、

前記細胞を前記物質にさらすステップと、

どの物質が塩素チャンネルC1C-7の活性を阻害するかを決定するステップとを含むものである、上記試験システム。

【請求項2】

塩素チャンネルC1C-7に対する物質の阻害活性を測定することにより、骨粗しょう症、ページェット病又はその他の骨分解疾病の治療に適した物質を同定するための物質試験方法であって、

(i) C1C-7を発現するが、それ以外の少なくとも一種のC1C塩素チャンネルを発現しない細胞において塩素チャンネルの活性を測定することであって、下記：

a) C1C-7を発現するが、それ以外の少なくとも一種のC1C塩素チャンネルを発現しない細胞において、C1C-7を発現するコンパートメント内腔のpH及び/又はC1C-7を含む膜の内外電位差を測定し、

b) 該細胞を各試験物質と接触させ、

c) 再度C1C-7を発現するコンパートメント内腔のpH及び/又はC1C-7を含

む膜の内外電位差を測定し、

d) 各物質の添加の前後における pH 及び / 又は膜電位の変化により、塩素チャンネルの活性を決定する、

ステップを含む、塩素チャンネルの活性を測定すること、

(i i) 前記細胞に対応する C 1 C - 7 を発現しない C 1 C - 7 ノックアウト非ヒト動物の細胞において、上記ステップ a) ~ d) と同じ手法で塩素チャンネルの活性を測定すること、並びに

(i i i) 前記 C 1 C - 7 を発現するが、それ以外の少なくとも一種の C 1 C 塩素チャンネルを発現しない細胞と前記 C 1 C - 7 ノックアウト非ヒト動物の細胞との間での塩素チャンネルの活性の変化を比較することにより、試験物質の活性を決定すること、

を含む、上記物質試験方法。

10

【請求項 3】

特定の pH におけるコンパートメント内の物質への蓄積又は pH 依存性反応により形成される指示物質の検出によって pH を測定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

電位差感受性色素又はタンパク質にコードされる電位差センサーを用いて電位差を測定する、請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

20

本発明は、シナプス伝達に作用し（神経疾患を治療するための有効活性化合物）、細胞内取り込み/細胞外放出に影響を及ぼし、またタンパク質のプロセッシングに影響を及ぼす有効活性化合物、及び特に骨粗しょう症又はページェット病を治療するため及び神経疾患や神経筋肉疾患及びその他の神経疾患を治療するために使用することが出来る又は向精神医薬品として使用することが出来る有効活性化合物を同定した試験するための試験システムに係わる。本発明は、更には、C 1 C - 3、C 1 C - 4、C 1 C - 6 及び C 1 C - 7 から成る群から選択される一種又はそれ以上の塩素チャンネルが発現していないか又は非機能的に発現している、ヒト以外の哺乳動物、好ましくはげっ歯動物、及びかかる一種の動物から誘導される体細胞株、並びに塩素チャンネル類、特に C 1 C - 3、C 1 C - 4、C 1 C - 5、C 1 C - 6 及び C 1 C - 7 に活性において影響を及ぼし、特にこれを抑制・阻害するか又は活性化するのに適した物質を同定した試験するためにこれら哺乳動物や体細胞株を使用する方法にも係わる。

30

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

骨粗しょう症は、骨の劣化・破壊が増大した結果、脆弱化する疾患である。骨粗しょう症は、高齢者、特に高齢の女性（ホルモン由来）に多発する。このような理由により、性ホルモン類は、骨劣化・破壊を実際に停止させるものの、大半の症例では深刻な副作用をもたらすが、高齢の女性患者に頻繁に投与されている。特異的な骨粗しょう症薬は、これまでに開発されていない。

【特許文献 1】後記文献一覧参照。

40

【非特許文献 1】後記文献一覧参照。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 3 】

本発明の文脈において、驚くべきことに、C 1 C - 7 タンパク質（塩素チャンネル C 1 C - 7）タンパク質をコードする核酸配列において突然変異が生起すると、非機能的タンパク質が発現されることになるか、又はかかるタンパク質の発現が完全に抑制されるので、その結果マウスにおいて重篤な大理石骨病を惹起することが見出されたのである。これらの驚くべき結果に基づいて、重篤な若年性大理石骨病の患者もまた、C 1 C - 7 遺伝子の突然変異を持っていることが見出されたのである。

50

【 0 0 0 4 】

C1C-7塩素チャンネルは、リソソームの後期細胞内取り込みにおいて存在する圧倒的に細胞内にある塩素チャンネルである。C1C-7は、遍在的に発現し、特に、骨破壊細胞である破骨細胞において認められる。非機能的タンパク質の発現をもたらすか又は発現を完全に抑制する(“ロックアウト”と称され、以下においては“KO”と称する)突然変異によって、破骨細胞が骨を劣化・破壊する能力を発揮するのが防止される。さらに詳細な研究の結果、C1C-7が、プロトンポンプと共に所謂“波打ち膜”内に取り込まれることが判明している。この波打ち膜は、骨吸収小腔と境界を接し、酸当量が、プロトンポンプによってこの骨九州小腔内に輸送され、HClの小腔内への電気神経学的な輸送が、C1C-7が保持する平衡塩素コンダクタンスにより確保されている。小腔内の産生pHが、骨破壊には必須である。適当な塩素コンダクタンスが存在しない場合は、プロトンポンプは、有効にポンプ機能することが出来なくなり、その結果、破骨細胞は、骨吸収小腔を酸性化することが出来なくなりまた骨を破壊することが出来なくなる。

10

【 0 0 0 5 】

C1C-7をロックアウトすることによって、網膜の重篤な退化が生起し、更に中枢神経系(CNS)の変性が認められる。これらの観察結果は、後期エンドソーム(細胞内取り込み)及びリソソームの酸性化と退化が、C1C-7ロックアウトによって多くの組織内において障害される、という事実と帰結される。

【 0 0 0 6 】

本発明の文脈において、C1C遺伝子ファミリーの塩素チャンネルはまた、シナプシス小胞の酸性化にも関与していることが見出されたのである。このことは、例えばC1C-3チャンネルをロックアウトすることによっても証明されている。かかるロックアウトによって、中枢神経系におけるシナプス伝達の変化及び神経細胞の変性が生起するのである。さらには、その他の塩素チャンネル、例えばC1C-4やC1C-7などがシナプシス小胞に存在することが、見出されたのである。シナプシス小胞は、神経伝達物質を取り込むが、神経伝達物質は次いで細胞外放出によってシナプス間隙内に遊離・放出され、かくして後流(ダウンストリーム)神経細胞を調節する(刺激するか又は阻害する)のである。神経伝達物質のシナプシス小胞内への取り込みは、シナプシス小胞の膜を經由したpH勾配及び電位勾配とによって駆動され(参考文献(62)-(67)を参照)、その結果シナプシス小胞内における塩素チャンネルの活性が、神経経内のシグナル伝達を左右することになる。

20

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明の文脈において設定された研究によって、C1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb、C1C-3、C1C-4、C1C-5、C1C-6及び/又はC1C-7から成る群から選択された一種又はそれ以上の塩素チャンネル 特に圧倒的に細胞内にある塩素チャンネルであるC1C-3、C1C-4、C1C-5、C1C-6及び/又はC1C-7を阻害するか、それ以外の態様でこれらの活性に影響を及ぼす、即ち例えばかかる塩素チャンネルを活性化するか若しくはその制御を調整する物質の同定及び試験を可能ならしめる試験システムを提供することが可能となったのである。具体的には、塩素チャンネルであるC1C-7を(部分的に又は完全に)阻害する物質、特に骨粗しょう症又はページット病を治療するに適した物質を同定した試験するための試験システム及びプロセスが提供されるのである。かかる試験システムによれば、神経細胞のシグナル伝達に影響を及ぼし、従って神経疾患を治療するために適した物質の同定を行うことが可能である。

40

【 0 0 0 8 】

本発明は、C1C-塩素チャンネルの(部分的)阻害が破骨細胞の機能を阻害し、従って骨劣化・破壊を妨げる、という考察に基くものである。これと同じ考えに沿った研究が現在、医薬品工業界において実施されているが、具体的にはプロトンポンプの有効な阻害剤が検索されているのである。現在の知識に因れば、特異的にC1C-7塩素チャンネル

50

に作用するか、これを部分的又は完全に阻害するか若しくはこれを活性化するか又はその制御を調整する物質を同定することが、初めて可能となったのである。C1C-7を完全にロックアウトすることによって、他の組織にも影響を及ぼし、また例えば網膜の退化やCNSの変性を起こさせる。従って、C1C-7を薬理的に阻害する(例えば、C1C-7阻害剤を投与することによって)ことは、潜在的に同様の効果・影響を持つことになり得るであろう。かかる問題・課題は、一方では当該チャンネルの部分的な阻害だけでも解決可能であり、また他方では所望しない標的器官(例えば目や脳)(例えば血液脳関門によって)に到達しない活性化合物又は医薬品によっても解決可能である。さらには、C1C-7は破骨細胞の膜内の骨劣化・破壊においてその役割を發揮するが、神経細胞の細胞内小胞に存在するので、細胞内に侵入することが無く、従って特異的に破骨細胞発現C1C-7に作用する医薬を設計すればよい。

10

【0009】

本発明はまた、神経系におけるシナプス伝達が塩素チャンネルの阻害又は刺激によって影響を受け得るという過程に基くものである。シナプス伝達への介入は、神経疾患及び神経筋肉疾患を治療するために広く用いられている薬理学の原理の一つである。トランスポーターのシナプス小胞内への相当した取り込みに影響を及ぼすか又はシナプス裂から当該細胞内への分泌神経伝達物質の再取り込みに影響を及ぼす医薬を使用するのである。神経伝達物質のシナプス小胞への取り込みは、その膜内に位置するトランスポーターを介して行われるのであるが、かかるトランスポーターは、通常は小胞膜を通過するプロトンの電気化学的勾配と結合し、かかる勾配によって駆動される(参考文献(81)及び(82)を参照のこと)。かかる勾配を変化させた場合、伝達物質の取り込みは、変更されることになり、而も場合によっては差別的に変更される。一方では、特殊なC1Cチャンネルは、神経細胞又はシナプス小胞の特別な副次集団においてのみ存在する可能性があり(例えば特別な伝達物質について)、他方ではプロトンの電気化学的勾配は、種々の伝達物質が結合する二つの成分(pH及び)から成る。かくしてアセチルコリンの取り込みは、主としてpH勾配によって駆動され、一方グルタミン酸の取り込みは、主として電氣的ポテンシャルによって駆動される。

20

【0010】

シナプス小胞におけるプロトンの電気化学的勾配は、プロトンポンプ及び塩素チャンネルとによって組み立てられる。塩素の伝導度が存在すると、勾配の電流成分が減少しまたpHは増加する。かくして、シナプス小胞内の塩素チャンネルを阻害することによって、pHが減少するが、デルタは増加する。その結果、例えば当該チャンネルが二つの型の小胞の双方に存在するとすれば、アセチルコリンの取り込みは減少するものの、グルタミン酸の取り込みは増加することになる。これとは逆に一つの具体的な実施態様に従えば、個別の塩素チャンネルを特異的に刺激することも見込まれるのである。このことによって、例えばグルタミン酸の取り込みが減少し且つアセチルコリンの取り込みが増加することになるであろう。

30

【0011】

シナプス小胞内における神経伝達物質の濃度を調節することが出来る可能性以外に、このような物質はまた、細胞内部における小胞の輸送に、例えば細胞内取り込み及び細胞外放出に影響を及ぼし得る。このことは、C1C-5 KOの場合、細胞内取り込み通過が大幅に減少するという観察結果及び細胞内取り込みと細胞外放出の経路が、小胞pHを下げることによって相当程度損傷され得るという事実とから当然に導かれる(報文(69)ないし(74)を参照)。

40

【発明の効果】

【0012】

C1C塩素チャンネルであるC1C-3、C1C-4、C1C-6及び/又はC1C-7の活性を左右し且つ特にこれを阻害する物質で、圧倒的に細胞内に存在する物質はかくして、神経疾患及び神経筋肉疾患並びにその他の神経疾患のための治療薬剤、またC1Cの場合は骨粗しょう症、ページェット病及びその他の骨劣化性疾患のための治療薬剤とし

50

て適している。本発明の文脈においては、これらのチャンネルタンパク質は従って、かかる疾患を治療するための物質を発見し且つ開発するために分子標的として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

幾つかの測定法が、かかる物質を発見し且つ試験するための方法として適している。本発明の一つの実施態様に従えば、当該物質と標的分子との結合は、当業者には公知の方法によって試験される。このために、チャンネルタンパク質は、内因により、例えば破骨細胞によって発現されるか又は非均質的に、例えば細菌類、酵母類又は哺乳動物細胞などにより発現されるものであり、精製される。適当なプロセスは、当業者にとっては公知である。本発明の一つの実施態様においては、当該物質と当該タンパク質との結合は、公知の方法である蛍光相関分光法及び蛍光強度分布分析法によって検討される（参考文献（85）ないし（88）を参照のこと）。又好ましい別の実施態様においては、かかる測定は、同様に公知の方法である、プラズモン共鳴測定法（参考文献（89）ないし（94）を参照のこと）によって実施される。また更なる別の実施態様においては、リガンドとC1CチャンネルであるC1C-3、C1C-4、C1C-6及び/又はC1C-7との結合が、標識化されたりリガンドを使用することによって行われるが、かかる標識は、放射性であるか、蛍光であるか又は、同一であるが、標識化されないリガンドと比較した場合特異的に同定することが出来る他の標識である。

10

【0014】

塩素チャンネルであるC1C-3、C1C-4、C1C-6及び/又はC1C-7に作用する物質の同定を行うための、本発明に従った好ましい別の方法は、相当する塩素チャンネルタンパク質が、内因的に又は異種の態様のいずれかで機能的に発現される試験システムからなる。かかるシステムはまた、上記結合プロセスにおいて見出された物質を機能的な作用・効果に関して試験するために適している。この場合、測定は、当該チャンネルタンパク質が有する機能を介して行われるのであるが、かかる機能は、独特のシステムにおいて電流、電位差又はpH値を変化させるものであり、次にこれらの何れかを直接的に測定するか、又は検出システムに及ぼすこれらの影響・効果を測定するのである。本発明の好ましい別の実施態様においては、上記した測定は、当該チャンネルの野生型については行わず、例えばより研究し易い別のコンパートメント（例えば原形質膜）に存在していればよい変異型チャンネルタンパク質について行われるのである。

20

30

【0015】

本発明の好ましいまた別の実施態様においては、C1C-3、C1C-4、C1C-6及び/又はC1C-7の構造を使用して、分子模型作成によって当該チャンネルタンパク質に結合する物質を同定するか又は最適化してもよい。

【0016】

塩素チャンネルであるC1C-3、C1C-4、C1C-6及び/又はC1C-7に作用する物質の同定を行うための本発明に従った又好ましい別の実施態様は、相当するチャンネルタンパク質を機能的に発現させるが、他のチャンネルタンパク質は僅かな程度しか存在しないか又は全く存在しない試験システムから成る。かかるシステムは、上記結合プロセスで見出された物質を機能的な作用・効果について試験するために適している。この場合、測定は、当該チャンネルタンパク質の機能を介して行われ、かかる機能は、独特のシステムにおいて電流、電位差又はpH値の何れかを変化させるものであり、次にこれらの何れかを直接測定するか又は検出システムに及ぼす影響を測定するのである。

40

【0017】

本発明の好ましい一つの実施態様においては、当該物質がチャンネルC1C-X（X=3, 4, 6又は7である）に対して有する活性は、専ら又は好ましくは（圧倒的に）当該チャンネルC1C-X（例えば、C1C-7は目下骨粗しょう症医薬品について研究探索中である）のみを発現する細胞又はその調製物（例えば膜調製物又は小胞）について測定するのである。

【0018】

50

特異性は、例えば専ら又は好ましくは(圧倒的に)C1C-7チャンネルのみを発現する細胞に対する試験物質の活性を測定することによって試験する。かかる細胞又は細胞株は、例えば塩素チャンネルをコードする核酸配列を含有する生殖細胞及び体細胞をヒト以外の哺乳動物、好ましくはげっ歯動物(特にマウス)から分離することによって得る。これらの細胞においては、当該塩素チャンネルをコードする核酸遺伝子の可能な限り多くのものを一特異的阻害剤を探索中である塩素チャンネルは除く一特定の塩素チャンネルが発現しないか又は非機能的に発現するように突然変異、切断、完全欠失及び/又は部分欠失によって修飾・変成させるのである。この文脈における非機能的とは、当該塩素チャンネルタンパク質が、塩素チャンネルの輸送機能が低減するか又は完全に抑制されるように発現せしめられることを意味する。かかる遺伝子修飾又は遺伝子工学的修飾はまた、ノックアウトとも称される。相当する遺伝子修飾されたマウス(ヒト以外の哺乳動物の一例として)はまた、ノックアウトマウス又はKOマウスと称される。天然の変異体は例えば、マウス及びヒトにおいてC1C-1チャンネルノックアウト生物として存在し、即ちC1C-1チャンネルの非機能的発現又は欠損発現が人口の一定の百分率で自然に存在し、その結果先天性筋緊張症が生じる。C1C-K1チャンネル又はC1C-KBチャンネルのノックアウト生物の場合、尿崩症(マウスにおける)又はバーター(Barter's)症候群(ヒトにおける)が生起する。ヒトにおけるC1C-5のノックアウトは、デント病(Dent's disease)の原因となる。

【0019】

C1Cチャンネルに結合するか又はこれらを修飾する物質の特異性は、勿論その他の方法、例えば過剰発現によって得られるチャンネルタンパク質を単離したものをを用いて測定することも出来る。相当するチャンネルタンパク質をコードする核酸配列のクローニング及び発現を行うための方法は、当業者には極めて詳細に公知となっている。更にはかかる特異性は、適当な測定法、例えば当業者には公知である“pit assay”(下記を参照)を使用することによって直接測定することが出来る。

【0020】

イオンチャンネル類及び特に塩素チャンネル類の実験的作成ノックアウトは、当業者には公知であり、例えば付属書類において引用した報文(1)乃至(8)において記載されている。更には、塩素チャンネルをコードする核酸配列についての多くの修飾を行うことによって、当該タンパク質の機能又は発現が欠如することになることも知られている(報文(9)ないし(24)を参照)。かかる塩素チャンネルの一般的構造構成及びトランスメンブラントポロジーは、図1の略図に示してある。例えば、ドメインD3及びD5におけるそれぞれの点変異によって、発現がかく乱されるか又は発現が欠如するに到るか、又は塩素チャンネルとしての特性を一切有さないタンパク質が発現されるに到る。同一の作用・影響が、ドメインD10乃至D12の領域での切断、又は一般的にはトランスメンブラン貫通ドメインでの切断によって実現することが出来る。塩素チャンネルをコードする遺伝子、即ち核酸配列も完全に欠失させるか又は別のタンパク質をコードする核酸配列によって置換する事も勿論行うことが出来、又は遺伝子発現を制御するプロモーター領域を変異させることが出来る。かかる遺伝子修飾の目的は、当該リボプローブ発現を抑制するか又は当該タンパク質の非機能的発現に影響を及ぼすことである。又はその代わりに、遺伝子工学による修飾によって、トランスポート機能は全く抑制することなくただ単に塩素チャンネル機能の制限をもたらすに過ぎない、所謂ノックダウンもまた可能である。かかるノックダウンストラテジーは、当業者には充分公知であって、例えばアンチセンスストラテジ又はリボザイムストラテジー、即ちアンチセンスオリゴヌクレオチッドリボザイムを用いたノックダウンを包含するが、これらに限定されるわけではない。かかるノックダウンにおいて使用する方法は、さらに詳細には付属書類において挙げた報文(25)ないし(36)において記載されており、ここで明白に言及しておく。

【0021】

本発明の文脈において、遺伝子修飾したヒト以外の哺乳動物(げっ歯動物、特にマウス)から製作した体細胞株、及び相当する塩素チャンネルC1Cxxxの発現がその後体細

10

20

30

40

50

胞株のゲノム変異によって低減されるか又は廃棄されている細胞株及び/又は当該チャンネルの発現が例えばアンチセンス技術又はリボザイム若しくはRNA iストラテジーなどその他の方法によってダウンレギュレーションされたものである細胞株を使用することが可能である。かかるダウンレギュレーション又は発現の減少もまた特に誘導可能であり、かくして細胞の生存に係わる種々の問題や同時に幾つかの塩素チャンネルをスイッチすることから派生するその他の問題を防止し又は低減させることが出来る。

【0022】

塩素チャンネルに特異的な作用を目的として種々の物質を同定した試験することは、好ましくは遺伝子修飾したヒト以外の哺乳動物又は好ましくは二つ又は三つの塩素チャンネルが発現していないか又は非機能的にしか発現していない細胞株を用いて行う。塩素チャンネルC1C-7の場合は、この塩素チャンネルの発現は、障害されるべきではなく、その結果例えばC1C-3、C1C-4、C1C-5及びC1C-6から成る群から選択される一種又はそれ以上の塩素チャンネルのロックアウト又はロックダウンが生起しなければならない。相当する条件も、特異的に別のチャンネルに作用する物質を同定し又試験する場合にも適用される。即ち、C1C-4に関する試験の場合、C1C-4チャンネルのみを発現する細胞株を確立しなければならない。かかる物質の試験は、そのままかかる細胞又はかかる細胞から得られた調製物、例えば小胞、膜調製物、特にシナプス小胞調製物又は未精製のタンパク質について行うことが出来る。かかる調製物の単離方法は、当業者にとっては充分公知である。

【0023】

特定の塩素チャンネルに対する作用の特異性を試験するには、一方では当該物質を発見する目的のために上記したように、試験する細胞間コンパートメント内にかかる特定の塩素チャンネルを主として又は専ら含む細胞株を使用するか、又はかかる細胞株から誘導した上記調製物を使用する。これらの細胞株又は誘導させた調製物で期待通利の作用を示した物質は、次いで当該チャンネルを有さない細胞株又はその誘導調製物について試験する。かかる物質が特異的である場合は、この細胞株には影響を一切及ぼさない。さらに特異性の高い測定法を、対象チャンネルに応じて引き続いて行う。例えばC1C-7チャンネルに及ぼす影響・効果が骨粗しょう症に関連する場合、培養した野生型(WT)の破骨細胞を“pit assay”(報文(52)乃至(58)を参照)明確な、ぞうげ質、骨又はその他の適当な基質について試験し、また例えば基質内での孔の形成について検討を行うか、又は吸収骨小腔の酸性化について適当な色素(例えば、アクリジンオレンジなど)を用いて検討すればよい(報文(59)乃至(61)を参照)。

【0024】

シナプス小胞の塩素チャンネル(例えばC1C-3など)の阻害が目的であれば、精製した懸濁状態のシナプス小胞の酸性化を次の工程で色素を用いて測定すればよい(報文(62)乃至(64)を参照)。当該チャンネルの阻害は、酸性化速度の抑制として現れるので、その特異性は、相当するKOマウスからシナプス小胞を単離することによってチェックすることが出来る。当該物質は、これらマウスから単離したシナプス小胞の酸性化速度には一切影響を及ぼすべきではない。更なる別の工程においては、特定タイプのシナプス小胞に対する特異性は、当該物質の存在下又は不存在下でシナプス小胞における神経伝達物質(例えば放射性標識化した)の取り込みを測定することによって試験すればよい。相当する方法は、当業者にとっては充分に公知である(例えば報文(66)乃至(68)を参照)。

【0025】

体細胞株は、KOマウスの種々の組織から単離することが出来るが、当該材料は、可能な限り無菌状態として、天然状態又は酵素消化を行った後、栄養培地(例えばダルベッコMEM, 好ましくは少なくとも当初は抗生物質を添加して)を入れた適当な細胞培養容器(例えば、皿など)内にいれて、37、5%CO₂として培養する。これらの細胞を細胞培養の標準技法を用いて増殖させるが、本発明のある具体的な実施態様に従えば、当該細胞株は、適当な遺伝子(例えば、SV40 large T抗原、又はテロメラーゼ)でトラ

10

20

30

40

50

ンスフェクションすることによって不死化する（例えば、報文（37）乃至（39）を参照）。又はその代替法として、KOマウスを適当な不死化遺伝子（例えば、immorto mouse、例えば報文（40）乃至（42）を参照、やこれらの遺伝子を可能ならば誘導プロモータの制御下で発現するその他のマウス（報文（43）を参照））を発現するマウス系と交雑させればよい。

【0026】

具体的には、これらの細胞株はさらに、直接的又は間接的に当該測定法の指示薬として機能するタンパク質を発現する適当な遺伝子構築物をトランスフェクトさせることによって試験システムとして開発することが出来る。例えば、特定のタンパク質配列シグナルに基いて特異的に特定のコンパートメント内に移動させられるキメラタンパク質を発現させることも可能である。かかるキメラユニットの他の部分は、例えば特定のGFP変異物（例えば報文（44）乃至（46）を参照）などpH感受性の蛍光タンパク質などの適当な指示薬タンパク質か、又は指示薬物質、例えば抗体（報文（49）を参照）、又はビオチン結合色素（報文（47）を参照）などをこれらのコンパートメント内に移動させるための結合部位を含有する（報文（44）乃至（51）を参照）。

10

【0027】

かくして本発明の一つの具体的な実施態様は、上記したヒト以外の哺乳動物又は体細胞株（ヒト又はヒト以外の由来の）をシナプス伝達に作用する物質を同定するために使用する方法に係わる。塩素チャンネルであるCLC-3、CLC-4、CLC-6及び/又はCLC-7の活性を阻害するか又はその他の態様で影響を及ぼす（例えば、その制御・調節作用を活性化するか又は修飾する）物質、特に神経疾患又は神経筋肉疾患及びその他の神経疾患を治療する又は向精神薬として適している物質を同定し又試験するための試験システム及び方法が、提供されるのである。

20

【0028】

骨粗しょう症の治療に有用である化合物は、CLC-7に影響を及ぼす有効性においてその他の化合物とは識別・区別される。即ち、例えば、CLC-3（これは、シナプス小胞に存在する）に対して活性な化合物は、骨粗しょう症の細胞外酸性化には干渉しないはずである。他方では、CLC-7に作用する物質は、選択的には、脳血液関門を通過出来ず、従ってCNSにおいて作用を発揮しないように修飾することが出来る。かかる方法は、当業者にとっては充分公知となっている。当該物質は、特異的にある種の神経細胞群に向かわせる（配向させるか又は篩い分ける）か又は当該物質は先ず神経細胞の特異的サブセット内に存在する特異的酵素によって活性物質に代謝させることも考えられる。

30

【0029】

特異性に関する試験は、上記したように特定の塩素チャンネル型のみを発現する適当な細胞株を用いて、その細胞由来の調製物（上記を参照）について実施するか、又は例えば培養中の破骨細胞など特異的試験システムにおいて若しくはWT又はKO動物由来のシナプス小胞調製物について実施することが出来る。

【0030】

本発明は、具体的には塩素チャンネルであるCLC-3、CLC-4、CLC-6及びCLC-7から成る群から選択される一種のタンパク質をコードする核酸配列であって、突然変異、切断又は完全な若しくは部分的な欠失によって修飾される該核酸配列に係わる。

40

【0031】

本発明は更には、塩素チャンネルであるCLC-1、CLC-2、CLC-Ka、CLC-Kb、CLC-3、CLC-4、CLC-6及び/又はCLC-7から成る群から選択される一種のタンパク質をコードする核酸配列を含む遺伝子修飾された、ヒト以外の哺乳動物、その配偶子又は体細胞であって、CLC-3、CLC-4、CLC-6及び/又はCLC-7をコードする該核酸配列が、突然変異、切断及び/又は完全な若しくは部分的な欠失によって修飾される（天然に存在する核酸配列を基準として）ことを特徴とする、前記哺乳動物、その配偶子又は体細胞に係わる。

50

【 0 0 3 2 】

本発明の一つの好ましい実施態様に従えば、該遺伝子修飾された、ヒト以外の哺乳動物は、更にC1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb及び/又はC1C-5をコードする核酸配列であって、突然変異、切断及び/又は完全な若しくは部分的な欠失によって修飾される前記核酸配列を含むのである。

【 0 0 3 3 】

本発明に従えば、C1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb、C1C-3、C1C-4、C1C-6及びC1C-7から成る群から選択される一種又はそれ以上の塩素チャンネルを発現しない体細胞株は、具体的にはげっ歯動物また特に好ましくはマウスである哺乳動物から樹立されるか又は誘導される。既述したように、これらのヒト以外 10
の哺乳動物からは、例えば小胞やその他の膜調製物、特にシナプス小胞調製物などの、当該塩素チャンネルに関連して適当な発現パターンを有し、従ってKO動物又は細胞株そのものと同様に適している調製物を誘導することも可能である。

【 0 0 3 4 】

本発明は更には、体細胞株であって、塩素チャンネルであるC1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb、C1C-3、C1C-4、C1C-6及びC1C-7、特にC1C-3、C1C-4、C1C-6及びC1C-7から成る群から選択される塩素チャンネルの発現が、当該体細胞株のゲノム修飾によって低減されている、及び/又は当該チャンネルの発現が、例えばアンチセンス技術又はリボザイムストラテジーなどの他の方法によってダウンレギュレーションされる、前記体細胞株にも係わる。かかるダウンレギュレーションは、当該細胞の生命力に関する諸問題及び幾つかの塩素チャンネルを同時に 20
スイッチすることによって生じる諸問題を防止するか又は低減するために誘導可能である。

【 0 0 3 5 】

上記下細胞株は、またヒト由来であってもよい。

【 0 0 3 6 】

本発明は更には、生殖細胞及び体細胞が、塩素チャンネルC1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb、C1C-3、C1C-4、C1C-5、C1C-6及び/又はC1C-7から成る群から選択される一種のタンパク質をコードする核酸配列 該核酸配列の一種又はそれ以上が、突然変異、切断、又は完全な若しくは部分的な欠失によって 30
修飾される（天然の核酸配列を基準として）を含有する、遺伝子修飾された、ヒト以外の哺乳動物を、該塩素チャンネルの一種又はそれ以上を阻害するのに適している物質を同定し且つ試験するために使用する方法にも係わる。

【 0 0 3 7 】

塩素チャンネルC1C-1、C1C-2、C1C-Ka、C1C-Kb、C1C-3、C1C-4、C1C-5、C1C-6及び/又はC1C-7から成る群から選択されるタンパク質をコードする核酸配列の一種又はそれ以上が、突然変異、切断、又は完全な若しくは部分的な欠失によって修飾される（天然の核酸配列を基準として）が、何れの場合もC1C-7、C1C-3、C1C-4又はC1C-6をコードする配列の一種が修飾されず、その結果当該塩素チャンネルが通常に、即ち機能的に発現されるようにした哺乳動物 40
である。

【 0 0 3 8 】

哺乳動物の代わりに、上記した細胞株（ヒト及びヒト以外の）又はかかる細胞株から誘導した調製物もまた使用することが出来る。

【 0 0 3 9 】

最後に本発明は、塩素チャンネルC1C-3、C1C-4、C1C-5、C1C-6及びC1C-7から成る群から選択される一種又はそれ以上の塩素チャンネルの活性について阻害するか又はその他の態様で影響を及ぼす、即ち例えばその調節を活性化するか又は変更修飾するのに適している物質を同定し且つ試験するための方法に係わる。この方法において、C1C-3、C1C-4、C1C-6及びC1C-7から成る群から選択される 50

一種の塩素チャンネルのみを発現する細胞株又は細胞（又はこれらから誘導される調製物、特に例えば小胞などの膜調製物；上記を参照）について、当該チャンネルを発現するコンパートメントの内腔 pH 及び/又は該塩素チャンネルを囲繞する膜の内外電位差を測定するのである。これらの細胞株又は細胞を試験すべき物質と接触させ、次いで当該チャンネルを発現するコンパートメントの内腔 pH 及び/又は該塩素チャンネルを囲繞する膜の内外電位差を再度測定する。これら物理的パラメーターの一つ又はその双方における変化が、当該試験物質が対象とするチャンネルに影響を及ぼすことを意味する。pH の増加は、当該塩素チャンネルを（部分的に）障害するか又は（部分的に）阻害することを意味する。pH 値の低下は、コンパートメントの酸性化を示し、従って当該塩素チャンネルを活性化する物質を示すのである。電位差の上昇を測定した場合は同様に、当該塩素チャンネルを（部分的に）障害するか又は（部分的に）阻害することを意味する。pH 値の降下は、当該塩素チャンネルを活性化する物質を示すのである。対象とする塩素チャンネルに影響を及ぼす能力に関するある物質の活性は、これらの一つ又は二つの物理パラメーターを変化させるために添加した物質の濃度が低ければ低いほど、それだけ高くなる。

【0040】

本発明の方法は、塩素チャンネルの活性の変化が、当該塩素チャンネルを発現するコンパートメントの内腔 pH 及び/又は当該塩素チャンネルを囲繞する膜の内外電位差を変化させることが出来る、という原理に基くものである。塩素チャンネルは、プロトンポンプの電荷補償を同一小胞内で生起させることが出来（例えば細胞内取り込みや細胞外放出について）、かくしてポンプ出力を高め、従って当該コンパートメントの酸性化を大きくするという効果を有する。同時に、膜の内外電位差を低くする。塩素チャンネルの阻害又はスイッチオフが生起すると、酸性化が低下した電位差は大きくなるが、塩素チャンネルの活性を刺激することによって、酸性化は高くなりまた電位差は低下することになる。本発明においては、試験すべき物質が相当する塩素チャンネルに及ぼす影響は、細胞内コンパートメントの酸性化及び/又は電位差の変化という一つ又はそれ以上の効果・影響によって間接的に測定するのである。好ましい使用方法においては、ある特定の塩素チャンネルに対する特異的物質を同定するために、測定を行うコンパートメントは、試験の対象となる塩素チャンネルを可能な限り種類だけ含むものとするべきである。塩素チャンネル特異性は、別の塩素チャンネルを発現する細胞株を用いて対照試験を行うことによって証明される。コンパートメントが種類以上の塩素チャンネルを発現する場合は、上記したように別の KO 細胞株又はマウスについて行う必要がある。

【0041】

塩素チャンネル C1C-3, C1C-4, C1C-5, C1C-6 及び C1C-7 から成る群から選択される一種又はそれ以上の塩素チャンネルを阻害するのに適している物質を同定し且つ試験するための、本発明に係わる方法は、下記を特徴とするものである：

a) 上記した塩素チャンネルの内的一种のみ又は主として若しくは圧倒的に一種のみを発現する細胞について、当該チャンネルを発現するコンパートメントの内腔 pH 及び/又は該チャンネルを囲繞する膜の内外電位差を測定すること、

b) 該細胞を一種の物質と接触させること、及び

c) 当該チャンネルを発現するコンパートメントの内腔 pH 及び/又は該チャンネルを囲繞する膜の内外電位差を測定すること、

かくして該物質の添加の前後における該 pH 及び/又は膜電位差の差によって、該物質の有効活性度を測定し、求めること。

【0042】

既述したように、一つの変法は、細胞内小器官の pH を直接測定するか又は pH の変化の結果生じる細胞影響を測定することから成る。幾つかの方法が、pH 測定を行うために実行可能である。例えば、色素の蛍光が pH 依存性であるか又は細胞を色素又はその前駆体と一緒に培養した場合特定の pH 値でコンパートメント内に選択的に濃縮されるような色素がいくつかある（例：アクリジンオレンジ、Lysotracker やその他の色素、Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA から販売）。特定のコンパートメントに対する特異性を上

10

20

30

40

50

げるのは、例えば色素の細胞内取り込みによって実現することが出来る（取り込み時間、速いか又は遅いかに応じて、リソソームコンパートメントに到るまで細胞内取り込みコンパートメントを染色すること；例えば報文（71）、（75）、（76）を参照）。更に特異性を上げることは、色素を結合分子基（例えば特異的抗体又はビオチンなど）を介して特定の標的分子に結合させることによって実現出来るが、かかる標的分子は、大量に又は専ら特定のコンパートメント内において存在する、即ち該細胞株において発現されている（例えば永久トランスフェクションによって）ものであり、かかる細胞株を当該色素と接触させるのである。これらの標的分子は、分子細胞生物学の方法によって、例えば分子を細胞のある適当な装置を経由して特定のコンパートメント内に指向させる標的制御シグナルを分子生物学的方法によって相当する結合モチーフに融合させ、次いで当該物質を試験するために使用した相当する細胞株内においてかかる遺伝子構築物を発現させることによって調製することも出来る。かかる技法を用いて、検討対象のチャンネルを含むコンパートメントのみを重点的に又は極めて特異的に検査し且つ測定することが可能である。特定のpHである（例えば、アクリジンオレンジ又はMolecular Probes社製のLysotracker）コンパートメント内に特定物質が集積すること又はコンパートメント内でのpH依存性反応を利用して指示薬物質（例えばpH依存性タンパク質分解切断により）を生成させて、検出し易くした（例えば色素を用いて（報文（95）及び（96）を参照。尤も検出はこれにのみ限定されない）間接的試験方法もまた、更なるpH測定方法として使用することが出来る。

10

【0043】

20

又はその代わりに又は更には、これらコンパートメント内の膜電位は、例えば電位感受性色素（例えば報文（67）を参照）により測定することが出来る。又はその代わりに、特異的に配向させるか又はふるい分けすることが可能である、タンパク質をコードする電位センサーもこの場合使用可能である。

【0044】

本発明は、骨粗しょう症又はページェット病を治療するための医薬を製造するため、及び神経疾患、神経筋疾患及びその他の疾患を治療するための医薬を製造するため並びに向精神薬を製造するために適している活性化化合物を同定し且つ試験することが出来る試験システムを始めて提供するものである。本発明は従って、骨粗しょう症又はページェット病を治療するための医薬を製造するために塩素チャンネルClC-7を完全に又は部分的に阻害する物質を使用する方法、及び神経疾患、神経筋疾患及びその他の疾患を治療するための医薬又は向精神薬を製造するために塩素チャンネルClC-3、ClC-4、ClC-6及び/又はClC-7を完全に又は部分的に阻害する物質を使用する方法にも係わるのである。本発明は、更には、塩素チャンネルClC-7を完全に又は部分的に阻害する物質を一種類又はそれ以上含んで成る、骨粗しょう症又はページェット病を治療するための医薬組成物（医薬品）、及び塩素チャンネルClC-3、ClC-4、ClC-6及び/又はClC-7を完全に又は部分的に阻害する物質を一種類又はそれ以上含んで成る、神経疾患、神経筋疾患及びその他の疾患を治療するための医薬及び向精神薬にも係わるのである。これらの医薬は、薬学的に許容される担体物質と共に経口又は静脈内投与するために適当な製剤中にかかる活性化化合物を含んで成る。

30

40

本発明を、実施例を記載してさらに詳細に説明する。

【実施例1】

【0045】

ClC-7を例としたノックアウト動物を作製するためのプロトコール

ClC-7ノックアウトマウスを当業者にとっては公知でありまた特に方法記載の成書（例えば、報文（78）を参照）に詳細に記載されている標準方法によって作製した。この技法は、幾つかの工程を必要とする。第一の工程においては、標的遺伝子（この場合、ClC-7チャンネルをコードする遺伝子を含んだ、マウスのゲノム配列）以外に、適当な選択マーカーを含むDNA構築物を作製。第二の工程においては、標的遺伝子の対立遺伝子をマウスの多能性胚幹細胞においてこのDNA構築物を用いて相同組換え法により修

50

飾するのであるが、この際対立遺伝子が最早や機能タンパク質をコードしないように修飾する。第三の工程においては、これらの組換え胚幹細胞をマウスのマウスの胞胚内に注入し、次いで擬似妊娠中の養育母（マウス）の子宮内に移植する。養育母マウスは子孫を産むが、これらはキメラである。即ち注入された幹細胞から生じた遺伝学的に修飾された細胞以外に通常の、遺伝学的操作を受けていない注入胞胚の細胞をも含むものである。これらのキメラマウスは、通常の“野生型”（WT）マウスとペアリングさせる。生まれた子孫は、遺伝学的に修飾された、即ち機能的に破壊された遺伝子が、生殖系統を介して遺伝されているか否かについて試験（例えばサザンブロットニング又はPCR技法によって）を行う。ポジティブである場合は、これらは、二つの染色体の一方にある当該チャンネル遺伝子が破壊されている、ヘテロ接合動物である。ヘテロ接合動物は、相互に交雑させて、最終的に相当するチャンネル遺伝子が染色体双方において破壊されているホモ接合ノックアウト動物が得られる。

【0046】

CIC-7ノックアウトマウスの場合は、当該遺伝子構築物は、以下のようにして作製した：ラットcDNAプローブ（報文（79）において報告されたタンパク質配列）；タンパク質及びcDNAに対するAccession No.: Z267744 GenBank)を用いて、マウス系統129/SvのベクターFIXII(Strategene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA92037, USA)における市販のゲノムファージをプレートアウト、フィルターのストリップオフ及び放射性標識cDNAプローブでハイブリダイゼーションから成る標準方法によって走査した。ハイストリンジェンシー条件下でハイブリダイズさせた幾つかのファージクローンを単離し、精製し次いで制限地図作成、部分配列決定及びPCRによる選択断片の増幅から成る標準方法によって解析した。エクソン2（報文（80）を参照）を含む、CIC-7のゲノム配列のうちサイズがほぼ14kbである一断片を含んだゲノムクローンを、この遺伝子構築物を作製するために選択した。この目的のために、かかるゲノムクローンを二種類の制限酵素、BglII及びBsrGI、を用いて消化したところ、コードエクソン3, 4, 5, 6及び7を含む配列の一部が除去された。この一部分は、ホスホグリセリン酸塩プロモータで駆動されるネオマイシン耐性カセットを含むサイズがほぼ1.6kbのDNA断片で、標準操作方法を用いて適当な酵素反応により当該カセットをゲノム配列内に結合することによって置換した。この遺伝子構築物を含む相応したベクターで細菌を形質変換した後、正しい遺伝子構築物を有する細菌コロニーを単離し、次いでDNAを抽出し、HindIIIで消化した後で、チミジンキナーゼカセットをこの遺伝子構築物の5'末端に接続し、ネガティブ選択を行った。再度形質変換を行い、改めて作製した遺伝子構築物を単離してチェックした後、多能性胚性幹細胞（マウス）遺伝子構築物でエレクトロポレーションによりトランスフェクトし、プレートアウトして、適当な培養条件下（分化を防止するため白血病阻害因子（LIF）の存在下での“feeder layers”培養）で増殖させた。得られた細胞をG418（ネオマイシン耐性カセットの存在で選別）及びガンシクロビル（チミジンキナーゼカセットの欠落で選別）で選別した。耐性クローンを単離し、引き出しして、サザンブロット解析法によってCIC-7遺伝子座上の相同組換えについて解析した。染色体上のCIC-7遺伝子が破壊された（即ち、エクソン3-7が、ネオマイシンカセットで置換された）正しいクローンを増殖させて、次に上記したようにマイクロマニピュレータによる顕微鏡コントロール下でマウス胚胞内に注入することによってエキスパンドさせた。それ以降の操作は、上記した通りであった。この遺伝子修飾は生殖系列を介して遺伝されたので、かくしてCIC-7ノックアウトマウスが作製されたのである。CIC-7チャンネルタンパク質の欠落は、CIC-7のアミノ末端ペプチドに対して産生・確立させた特異的抗体を用いて証明した。かかるCIC-7KOマウスは、思いがけなくも網膜変性及び中枢神経系における幾つかの退化性変化の徴候を伴う強力な大理石骨病の表現型を示した。

【実施例2】

【0047】

CIC-3KOマウスの作製

実施例 1 において記載したと同様の方法で、第一のトランスメンブラン領域（報文（83）乃至（84）を参照）における配列をコードするエクソン 3 を欠失させた CLC - 3 KO マウスを作製した。この遺伝子構築物によって更には翻訳において時期尚早の停止が行われ、その結果極めて小型の切断タンパク質が予測された。CLC - 3 タンパク質は、CLC - 3 のアミノ末端ペプチドにたして産生させた特異的抗体を用いてもこの KO マウスには最早や検出されることは無かった。この CLC - 3 KO マウスは、海馬の変性及び網膜の変性を示した。この CLC - 3 塩素チャンネルは、細胞内の、エンドソームコンパートメント及びシナプス小胞内において存在することを証明することも可能である。pH 測定の結果、CLC - 3 の欠落によってシナプス小胞の酸性化が低下したことが明らかとなった。

10

参考文献

【 0 0 4 8 】

(1) Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC (1992) Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* 257:1125-1128.

(2) Dorin JR, Dickinson P, Alton EW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber W L, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, et al (1992) Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359:211-215

20

(3) Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Wainwright BJ, Williamson R, Colledge WH (1992) Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res.* 1:177-181.

(4) Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993) Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genet.* 4:354-1.

(5) Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genet.* 21:959-8.

30

(6) Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:870-876.

(7) Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litzi TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Arganini P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000) Targeted disruption of the kv1 qt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106:1447-1455.

40

(8) Pivon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ (2000) CIC5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-373.

(9) Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Multimeric structure of CIC1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J* 13:7377-743.

50

- (10) Gronemeier M, Condie A, Prosser J, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H (1994) Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene *Clc1* of myotonic mice. *J Biol Chem* 269:59635967.
- (11) Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Genomic organization of the human muscle chloride channel *CIC1* and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet* 3:941946.
- (12) Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC. (1995) Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (*CLCN1*) leading to myotonia. *Am J Hum Genet.* 57:13251334. 10
- (13) Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. (1995) Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the *CIC1* chloride channel. *Neuron* 15:14551463.
- (14) Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379:445449. 20
- (15) Lloyd SE, Pearce SH, Gunther W, Kawaguchi H, Igarashi T, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (*CLCN5*). *J Clin Invest.* 99:967974.
- (16) Lloyd SE, Gunther W, Pearce SH, Thomson A, Bianchi ML, Bosio M, Craig IW, Fisher SE, Scheinman SJ, Wrong O, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Characterisation of renal chloride channel, *CLCN5*, mutations in hypercalciuric nephrolithiasis (kidney stones) disorders. *Hum Mol Genet* 6:12331239. 30
- (17) Schmidt-Rose T, Jentsch TJ. (1997) Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of *CLC1*. *J Biol Chem* 272:2051520521.
- (18) Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast *CLC* putative chloride channel *Gef1p*. *J Biol Chem* 273:1511015118. 40
- (19) Kubisch C, Schmidt-Rose T, Fontaine B, Bretag AH, Jentsch TJ. (1998) *CIC1* chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum Mol Genet.* 7:17531760.
- (20) Igarashi T, Gunther W, Sekine T, Inatomi J, Shiraga H, Takahashi S, Suzuki J, Tsuru N, Yanagihara T, Shimazu M, Jentsch TJ, Thakker RV. (1998) Functional characterization of renal chloride channel, *CLCN5*, mutations associated with Dent's Japan disease. *Kidney Int.* 54:18501856.
- (21) Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. (1999) Mutational analysis demonstra 50

tes that ClC4 and ClC5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274:896902.

(22) Yamamoto K, Cox JP, Friedrich T, Christie PT, Bald M, Houtman PN, Lapsley M J, Patzer L, Tsimaratos M, Van'T Hoff WG, Yamaoka K, Jentsch TJ, Thakker RV. (2000) Characterization of renal chloride channel (CLCN5) mutations in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 11:14601468.

(23) Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ. (2000) ClC5 Cl-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369373.

10

(24) Fahlke C. (2000) Molecular mechanisms of ion conduction in ClC-type chloride channels: lessons from disease-causing mutations. *Kidney Int* 57:780786.

(25) Jen KY, Gewirtz AM. (2000) Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* 18:307319.

(26) Marschall P, Thomson JB, Eckstein F. Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell Mol Neurobiol.* 14:523538.

20

(27) Lewalle P, Martiat P (1993) Inhibition of P210 expression in chronic myeloid leukaemia: oligonucleotides and/or transduced antisense sequences. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1:13943.

(28) Montrose-Rafizadeh C, Kole J, Bartkowski LM, Lee LH, Blackmon DL, Behnken S E, Gearhart JD, Cohn JA, Montrose MH (1997). Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells. *J Cell Physiol* 170:299-308

30

(29) Luyckx VA, Leclercq B, Dowland LK, Yu AS (1999) Diet-dependent hypercalcaemia in transgenic mice with reduced ClC5 chloride channel expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1217412179

(30) Liu R, Li W, Karin NJ, Bergh JJ, Adler-Storthz K, Farach-Carson MC (2000) Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage-sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25-dihydroxyvitamin D3-stimulated calcium influx in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 275:87118718

(31) Nakao M, Furukawa K, Satoh E, Ono K, Iijima T (2000) Inhibition by antisense oligonucleotides of plasma membrane Ca²⁺ ATPase in vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 387:273277.

40

(32) Tottene A, Volsen S, Pietrobon D (2000) alpha1E subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci* 20:171178.

(33) Brussaard AB (1997) Antisense oligonucleotides induce functional deletion of ligand gated ion channels in cultured neurons and brain explants. *J Neurosci Methods.* 71:5564.

50

- (34) Vincent A, Lautermilch NJ, Spitzer NC (2000) Antisense suppression of potassium channel expression demonstrates its role in maturation of the action potential. *J Neurosci* 20:60876094.
- (35) Wang L, Chen L, Jacob TJ (2000) The role of CIC3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J Physiol*. 524: 6375.
- (36) Leconte L, Barnstable CJ.(2000) Impairment of rod cGMP-gated channel alpha-subunit expression leads to photoreceptor and bipolar cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:917926. 10
- (37) Gokhan S, Song Q, Mehler MF (1998) Generation and regulation of developing immortalized neural cell lines. *Methods* 16:345358.
- (38) Katakura Y, Alam S, Shirahata S. (1998) Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol* 57:6991.
- (39) Yeager TR, Reddel RR (1999) Constructing immortalized human cell lines. *Current Opin Biotechnol* 10:465-469. 20
- (40) Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5096-5100.
- (41) Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, Jat PS. (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H2Kb-tsA58 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:587591. 30
- (42) D'Abaco GM, Whitehead RH, Burgess AW (1996) Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas. *Mol Cell Biol* 16:884891.
- (43) Vandewalle A.(1999) Immortalized kidney cells derived from transgenic mice harboring L-type pyruvate kinase and vimentin promoters. *Exp Nephrol* 7:386393.
- (44) Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394: 192195. 40
- (45) Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:68036808.
- (46) Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* 74:15911599.
- (47) Wu MM, Llopis J, Adams SR, McCaffery JM, Teter K, Kulomaa MS, Machen TE, Mo 50

ore HP, Tsien RY. (2000) Studying organelle physiology with fusion protein-targeted avidin and fluorescent biotin conjugates. *Methods Enzymol.* 327:546564.

(48) Schapiro FB, Grinstein S. (2000) Determinants of the pH of the Golgi complex. *J Biol Chem* 275:2102521032.

(49) Demaurex N, Furuya W, D'Souza S, Bonifacino JS, Grinstein S (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem* 273:20442051. 10

(50) Diwu Z, Chen CS, Zhang C, Klaubert DH, Haugland RP. (1999) A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chem Biol* 6:411418.

(51) Overly CC, Lee KD, Berthiaume E, Hollenbeck PJ. (1995) Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:31563160.

(52) Boyde A, Ali NN, Jones SJ. (1984) Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 156:216220 20

(53) Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA. (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci.* 1984 Mar;66:383399.

(54) Sun L, Adebajo OA, Moonga BS, Corisdeo S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Arakawa T, Hakeda Y, Koval A, Sodam B, Bevis PJ, Moser AJ, Lai FA, Epstein S, Troen BR, Kumegawa M, Zaidi M (1999) CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 146:11611172 30

(55) Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi Y (1999) Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 140:50605065

(56) Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999) Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25:517523 40

(57) Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G (1999) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 45:140147

(58) Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J (2000) Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin43. *J Bone Miner Res* 15:919926.

(59) Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. (1985) Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and 50

and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at osteoclast ruffled border. *J Cell Biol.* 101:22102222.

(60) Inoue M, Yoshida H, Akisaka T (1999) Visualization of acidic compartments in cultured osteoclasts by use of an acidotrophic amine as a marker for low pH. *Cell Tissue Res* 298:527537.

(61) Laitala-Leinonen T, Lowik C, Papapoulos S, Vaananen HK (1999) Inhibition of intravacuolar acidification by antisense RNA decreases osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *J Cell Sci* 112:36573666. 10

(62) Shioi J, Naito S, Ueda T. (1989) Glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem J.* 258:499504.

(63) Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, Ueda T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem.* 267:1541215418.

(64) Hartinger J, Jahn R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 268:2312223127. 20

(65) Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem.* 263:1542315428.

(66) Hell JW, Maycox PR, Stadler H, Jahn R.(1988) Uptake of GABA by rat brain synaptic vesicles isolated by a new procedure. *EMBO J.* 7:30233029.

(67) Hell JW, Maycox PR, Jahn R.(1990) Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 265:21112117 30

(68) Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, Walch-Solimena C, Jahn R, De Camilli P. (1993) A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:53175321.

(69) Mellman I (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J. exp. Biol.* 172: 3945. 40

(70) Presley JF, Mayor S, Dunn KW, Johnson LS, McGraw TE, Maxfield FR. (1993) The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J Cell Biol* 122: 12311241.

(71) Presley JF, Mayor S, McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR. (1997) Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem.* 272:1392913936.

- (72) Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE. (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell* 4:1251-1266.
- (73) Chapman RE, Munro S. (1994) Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* 13:2305-2312.
- (74) Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem.* 269:2124. 10
- (75) Tycko B, Maxfield FR (1982) Rapid acidification of endocytotic vesicles containing α_2 -macroglobulin. *Cell* 28: 643-651.
- (76) Zen K, Bowers J, Periasamy N, Verkman AS (1992) Second messengers regulate endosomal acidification in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 119: 99-110.
- (77) Siegel MS, Isacoff EY (1997) A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19:735-741.
- (78) Gene Targeting. A Practical Approach. Editor: Joyner, A.L. IRL Press at Oxford University Press (Oxford, New York, Tokyo) (1993). 20
- (79) Brandt S, Jentsch TJ (1995) CLC6 and CLC7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters* 377:1520.
- (80) Kornak U, Bosl MR, Kubisch C. (1999) Complete genomic structure of the CLCN6 and CLCN7 putative chloride channel genes. *Biochim Biophys Acta* 1447:100-106.
- (81) Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. (1998) Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr Opin Neurobiol.* 8:405-412. 30
- (82) Gasnier B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327-337.
- (83) Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F, Sasaki S. (1994) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron.* 12:597-604.
- (84) Borsani G, Rugarli EI, Tagliabue M, Wong C, Ballabio A. (1995) Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics.* 27:131-141. 40
- (85) Sterner S, Henco K. (1997) Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) - a highly sensitive method to analyze drug/target interactions. *J Recept Signal Transduct Res.* 17:511-520
- (86) Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13756-13561. 50

(87) Palo K, Mets U, Jager S, Kask P, Gall K (2000) Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophys J* 79:2858-2866.

(88) Schaertl S, Meyer-Almes FJ, Lopez-Calle E, Siemers A, Kramer J (2000) A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. *J Biomol Screen* 5:227-238.

(89) Karlsson R. (1994) Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface-immobilized receptors. *Anal Biochem.* 221:142-151. 10

(90) Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE. (1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Natl Cancer Inst.* 91:1211-1220.

(91) Deckert F, Legay F. (2000) Development and validation of an IL-6 immunoreceptor assay based on surface plasmon resonance. *J Pharm Biomed Anal.* 23:403-412. 20

(92) Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, Andersson K, Borg P, Hamalainen M, Karlsson R. (2000) Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. *J Med Chem.* 43:1986-1992.

(93) Markgren PO, Hamalainen M, Danielson UH. (2000) Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal Biochem.* 2000 Mar 1;279(1):71-8.

(94) Williams C. (2000) Biotechnology match making: screening orphan ligands and receptors. *Curr Opin Biotechnol* 11:42-46. 30

(95) Van Noorden CJ, Vogels IM, Everts V, Beertsen W. (1987) Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. *Histochem J* 19:483-487.

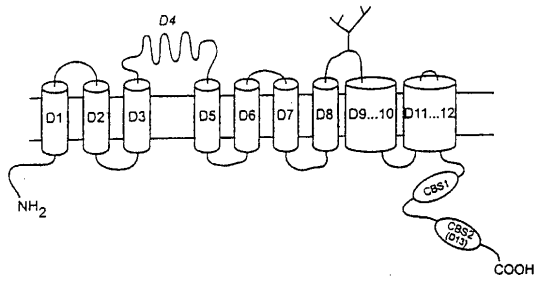
(96) Xia L, Kilb J, Wex H, Li Z, Lipyansky A, Breuil V, Stein L, Palmer JT, Dempster DW, Bromme D (1999) Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol Chem.* 1999 Jun;380(6):679-87. 40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 9 】

【図1】 Schmidt-Rose及びJentsch (T. Schmidt-Rose及びT.J. Jentsch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (1997): 7633-7638)の生化学研究に従ったトランスメンブラントポロジ-モデル。N - 及びC - 末端は、細胞内に位置する。C I C - Oの当初のHydropathy analysisの結果、13個までの膜貫通領域(D1 - D13)が存在することが明らかとなっている。幾つかの原核細胞のC I Cは別として、既知の全てのC I Cタンパク質は、C末端上に二つのC B S領域を有する(A. Bateman, *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) 12-13 及びC.P. Ponting, *Mol. Med.* 75 (1997) 160-163)。 50

【 図 1 】



【 配列表 】

0004138485000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 K 67/027 (2006.01) A 0 1 K 67/027

(72)発明者 イエンチュ、トーマス・ヨット
ドイツ国、2 0 2 5 1 ハンブルク、ファルケンリート 9 4 番、ウニヴェルジテート・ハンブルク、ツェントルム・フュア・モレキュラーレ・ニューロビオロジ

審査官 中村 正展

(56)参考文献 Nature Genet. , 1 9 9 9 年 , Vol. 21 , 95-98
Nature , 2 0 0 0 年 , Vol. 408 , 369-373
J. Physiol. , 2 0 0 0 年 , Vol. 524 , 63-75
FEBS Lett. , 1 9 9 5 年 , vol. 377 , 15-20
Biochim. Biophys. Acta , 1 9 9 9 年 , Vol. 1447 , 100-106
Genomics , 1 9 9 5 年 , Vol. 27 , 131-141
Nature , 1 9 9 7 年 , Vol. 390 , 417-421

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12Q 1/02
C12N 5/00-5/10
C12N 15/00-15/90
A01K 67/027
G01N 33/15
G01N 33/50
PubMed
MEDLINE/EMBASE(STN)
BIOSIS/CA(STN)
SCISEARCH/CONFSCI(STN)
WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq