

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 19 年 11 月 29 日 (2007.11.29)

【公表番号】特表 2003-522522(P2003-522522A)

【公表日】平成 15 年 7 月 29 日 (2003.7.29)

【出願番号】特願 2001-511485(P2001-511485)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/559 (2006.01)

G 0 1 N 33/561 (2006.01)

G 0 1 N 33/58 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/559

G 0 1 N 33/561

G 0 1 N 33/58 A

C 1 2 N 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 10 月 12 日 (2007.10.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードするヌクレオチドを含んでなる単離された核

酸。

【請求項 2】 配列番号 4、セリンの代わりにアスパラギンを 163 位に有する配列番号 4、配列番号 6、アスパラギンの代わりにセリンを 143 位に有する配列番号 6、配列番号 8、セリンの代わりにアスパラギンを 161 位に有する配列番号 8、配列番号 10、アスパラギンの代わりにセリンを 165 位に有する配列番号 10 および配列番号 6 の 2 - 246 位よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む、請求項 1 記載の核酸。

【請求項 3】 配列番号 3、5、7、9 および 20 よりなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載の核酸。

【請求項 4】 配列番号 3 の 341 - 1171 位、配列番号 5 の 796 - 1566 位、配列番号 7 の 869 - 1693 位および配列番号 9 の 457 - 1293 位よりなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 記載の核酸。

【請求項 5】 ストリンジェントな条件下で請求項 2 記載の核酸にハイブリダイズする単離された核酸。

【請求項 6】 請求項 1 記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

【請求項 7】 請求項 1 記載の核酸を含んでなる組換え宿主細胞。

【請求項 8】 単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質。

【請求項 9】 配列番号 4、セリンの代わりにアスパラギンを 163 位に有する配列番号 4、配列番号 6、アスパラギンの代わりにセリンを 143 位に有する配列番号 6、配列番号 8、セリンの代わりにアスパラギンを 161 位に有する配列番号 8、配列番号 10、アスパラギンの代わりにセリンを 165 位に有する配列番号 10 および配列番号 6 の 2 - 246 位よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する、請求項 8 記載のタンパク質。

【請求項 10】 単一のアミノ酸置換を含有する、請求項 8 記載のタンパク質。

【請求項 11】 保存された位置には存在しない 2 以上のアミノ酸置換を含有する、請求項 8 記載のタンパク質。

【請求項 12】 BLAST または FASTA により測定した場合に請求項 9 記載のタンパク質に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するポリペプチド。

【請求項 13】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質に特異的に結合する、または保存されたコアへの結合により 3 サブユニットファミリーのタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 14】 配列番号 3、5、7、9 および 20 よりなる群から選ばれる配列の少なくとも 1 つの少なくとも 15 個の連続的ヌクレオチドを含む DNA または RNA オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項 15】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合する物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質に、該細胞をさらし、

(c) 該細胞への該物質の結合の量を測定し、

(d) 工程 (c) における結合の量を、対照細胞 (該対照細胞は、該対照細胞がヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユニットタンパク質を発現しないこと以外は、工程 (a) の細胞と実質的に同一である) への該物質の結合の量と比較することを含んでなり、

工程 (c) における結合の量が対照細胞への該物質の結合の量より多い場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3a、3b、3c または 3d サブユ

ニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合するものであることを特徴とする方法。

【請求項 16】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合し従ってヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうる物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られている化合物に、該細胞をさらし、

(c) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質の存在下および不存在下、該細胞への該化合物の結合の量を測定することを含んでなり、

該物質の存在下の該化合物の結合の量が該物質の不存在下の場合と異なる場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合しヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうることを特徴とする方法。

【請求項 17】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターの同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質または突然変異ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を宿主細胞内で組換え的に発現させ、それにより、その組換え的に発現したヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質に、他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットタンパク質とのヘテロマーを形成させることにより、カルシウム感受性カリウムチャンネルを形成させ、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであると疑われる物質の存在下および不存在下、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性を測定することを含んでなり、

該物質の不存在下と比較した場合の該物質の存在下の、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性の変化が、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであることを示すことを特徴とする方法。

【請求項 18】 遺伝子の転写を促進、増強または抑制する 3 遺伝子内の DNA 配列の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化 c DNA 配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17 , 436) の断片が先行するように、プロモーター - レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定し、

(c) 工程 (b) の細胞内のレポータータンパク質の存在量を、該 3 遺伝子のプロモ

ーター領域の断片を有さないベクターでトランスフェクトされた細胞内のレポータータンパク質の存在量と比較することを含んでなり、

3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットを内因的に発現する細胞内でのみ、他のプロモーター要素の不存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる 3 遺伝子のプロモーター領域の断片が、プロモーター要素であり； 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットを内因的に発現しない細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、レポータータンパク質の存在量を減少させる配列が、リプレッサー要素であり； 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットを内因的に発現させる細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる配列が、エンハンサー要素であることを特徴とする方法。

【請求項 19】 該ベクターが、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片から独立して機能するプロモーターまたはエンハンサー配列要素を含有する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】 該レポータータンパク質の存在量をトランスフェクト化細胞の割合に関して正規化する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 21】 遺伝子の転写を促進、増強または抑制する 3 遺伝子内の DNA 配列の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域（配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436）内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、

(b) 該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

細胞からの核抽出物と共にインキュベートした後にゲル内で異なって移動する（「シフトを受ける」） 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片が、 3 遺伝子の発現を促進、増強または抑制する核因子に結合する DNA 配列であることを特徴とする方法。

【請求項 22】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 記載の方法により同定する、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】 該細胞が 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットを発現する、請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】 該細胞が 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットを発現しない、請求項 21 記載の方法。

【請求項 25】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域（配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436）内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片を、クローニングまたは精製された転写因子と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

3 遺伝子のプロモーター配列要素に結合する因子が、該放射能標識 DNA 断片の移動におけるシフトを誘導し、該 3 遺伝子の転写調節に関与することと特徴とする方法。

【請求項 26】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】 3 遺伝子の転写調節に関与する転写因子の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域（配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436）内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離すること、

(b) 単一の転写因子または転写因子のファミリーを特異的に認識する抗体を工程 (a) のインキュベーション物に加え、ついで該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

工程 (a) と比較した場合の工程 (b) の二本鎖 DNA の移動度におけるスーパーシフトが、該抗体により認識される転写因子が該二本鎖 DNA に結合することを示すことを特

徴とする方法。

【請求項 28】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をコードするクローンをクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片で、発現ライブラリーをスクリーニングし、

(b) 該ライブラリーのいずれのクローンが二本鎖 DNA の放射能標識断片に結合するのかを判定し、

(c) 工程 (b) のクローンを増幅し、配列決定することを含んでなる方法。

【請求項 29】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を安定なマトリックスに結合させ、

(b) cDNA にコードされる融合タンパク質を表面に発現するファージを該マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該マトリックスに結合しないファージを洗浄により除去し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の過剰の断片で、該マトリックスに結合したファージを溶出することを含んでなり、

工程 (d) で溶出されたファージが、3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をコードすることを特徴とする方法。

【請求項 31】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する DNA を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】 工程 (d) で溶出されたファージを増幅し、配列決定する、請求項 30 記載の方法。

【請求項 33】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を安定なマトリックスに結合させ、

(b) 細胞からの核抽出物を該マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該核抽出物からの非結合タンパク質を該マトリックスから洗浄し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する過剰の二本鎖 DNA で、結合タンパク質を該マトリックスから溶出することを含んでなり、

工程 (d) からの溶出されたタンパク質が、3 遺伝子の転写調節に関与する核因子であることを特徴とする方法。

【請求項 34】 工程 (d) からの溶出されたタンパク質をゲル上で分離し、該ゲルを染色して、該溶出タンパク質の純度を試験することを更に含む、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】 該ゲル上で分離されたタンパク質を配列決定することを更に含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】 ウェスタンブロットまたは免疫沈降により、該溶出タンパク質を同定するために、該ゲル上で分離されたタンパク質を公知転写因子に対する抗体で免疫学的に分析することを更に含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 37】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する、請求項 33 記載の方法。

【請求項 38】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をクローニングにより同定

する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片の少ないしは幾つかのコピーをレポータータンパク質コード化 cDNA に先行して含有する酵母株を構築し、

(b) 該挿入 cDNA および転写活性化ドメインにコードされる融合タンパク質の形成を可能にするベクター中、細胞からの cDNA ライブラリーを構築し、

(c) (b) のライブラリーを (a) の酵母株内に形質転換し、該レポータータンパク質の発現を示す酵母のコロニーを単離することを含んでなる方法。

【請求項 39】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】 単離されたコロニーからベクターを精製し、該ベクター内の cDNA を配列決定することを更に含む、請求項 38 記載の方法。

【請求項 41】 該 3 遺伝子の転写速度を増強または抑制する物質の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化 cDNA 配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) の断片が先行するように、プロモーター - レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、化合物の存在下および不存在下、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定することを含んでなり、

(1) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を減少させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を抑制する物質であり、(2) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を増加させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を増強する物質であることを特徴とする方法。

【請求項 42】 該方法が、対照細胞内の該レポータータンパク質の存在量に対する該化合物の効果が測定される対照を更に含み、該対照細胞が、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片を欠くベクターで該対照細胞がトランスフェクトされている以外は工程 (b) の細胞と実質的に同じ細胞である、請求項 41 記載の方法。