

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4052525号  
(P4052525)

(45) 発行日 平成20年2月27日(2008.2.27)

(24) 登録日 平成19年12月14日(2007.12.14)

|              |                       |
|--------------|-----------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1                   |
| C07K 14/705  | (2006.01) C07K 14/705 |
| C07K 16/28   | (2006.01) C07K 16/28  |
| C12N 1/15    | (2006.01) C12N 1/15   |
| C12N 1/19    | (2006.01) C12N 1/19   |
| C12N 1/21    | (2006.01) C12N 1/21   |

請求項の数 18 (全 93 頁) 最終頁に続く

|               |                              |
|---------------|------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平10-513828                 |
| (86) (22) 出願日 | 平成9年9月10日(1997.9.10)         |
| (65) 公表番号     | 特表2000-514310(P2000-514310A) |
| (43) 公表日      | 平成12年10月31日(2000.10.31)      |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1997/016033            |
| (87) 国際公開番号   | W01998/011139                |
| (87) 国際公開日    | 平成10年3月19日(1998.3.19)        |
| 審査請求日         | 平成11年9月9日(1999.9.9)          |
| 審判番号          | 不服2005-18976(P2005-18976/J1) |
| 審判請求日         | 平成17年9月30日(2005.9.30)        |
| (31) 優先権主張番号  | 60/026,451                   |
| (32) 優先日      | 平成8年9月11日(1996.9.11)         |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                       |
| (31) 優先権主張番号  | 60/040,052                   |
| (32) 優先日      | 平成9年3月7日(1997.3.7)           |
| (33) 優先権主張国   | 米国(US)                       |

(73) 特許権者 301034359  
オレゴン ヘルス サイエンシーズ ユニバーシティ  
アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートランド エス.ダブリュー.サム.ジャクソン  
パーク ロード 3181

(73) 特許権者 502414600  
アイシーエージェン, インコーポレイティド  
アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27703, ダラム, エンペラー ブールバード 4222, スイート 350

(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低及び中間コンダクタンスのカルシウム活性化されたカリウムチャネル及びその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

カルシウム - 活性化されるカリウムチャネルのモノマーをコードし、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そして組み換えの前記モノマーが前記モノマーをコードする核酸で形質転換されたキセノパス卵母細胞において発現される場合、2 ~ 25 pSの単位コンダクタンスを有する、単離された核酸であって、

(a) 配列番号：1、2 又は 3 に記載のアミノ酸配列をコードする核酸；

(b) 配列番号：1 又は 2 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸；

(c) 配列番号：13、14 又は 15 に記載の塩基配列を有する核酸；

(d) 配列番号：13 又は 14 に記載の塩基配列を有する核酸に、高緊縮条件下でハイブリダイズする核酸；或いは

(e) 配列番号：13 又は 14 に記載の塩基配列に対して、少なくとも90%の同一性を有する塩基配列を有する核酸。

## 【請求項 2】

配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の核酸。

## 【請求項 3】

配列番号：2 又は 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の核酸。

10

20

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸を含んで成るベクター。

**【請求項 5】**

発現ベクターである、請求項 4 に記載のベクター。

**【請求項 6】**

請求項 4 又は 5 に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

**【請求項 7】**

請求項 1 に記載の核酸によってコードされ、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノバス卵母細胞において発現される場合、2 ~ 25 pSの単位コンダクタンスを有する、単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルのモノマータンパク質。  
10

**【請求項 8】**

配列番号：1 に記載のアミノ酸配列を有する請求項 7 に記載のタンパク質。

**【請求項 9】**

配列番号：2 又は 3 に記載のアミノ酸配列を有する請求項 7 に記載のタンパク質。

**【請求項 10】**

請求項 7 に記載のタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で、特異的に反応する抗体。

**【請求項 11】**

配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質に対して特異的に反応する請求項 1 20  
0 に記載の抗体。

**【請求項 12】**

配列番号：2 又は 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して特異的に反応する請求項 1 0 に記載の抗体。

**【請求項 13】**

モノクローナル抗体である請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

**【請求項 14】**

請求項 1 0 に記載の抗体を用いて生物学的サンプルにおけるカルシウム - 活性化されるカリウムチャネルタンパク質の存在を検出するための方法であって、

( a ) 前記生物学的サンプルと前記抗体とを接触させる工程；および  
30

( b ) 免疫学的に反応性の条件下で、前記タンパク質への前記抗体の結合を可能にする工程であって、前記結合された抗体の検出が前記チャネルタンパク質の存在を示す、工程を含んで成る方法。

**【請求項 15】**

請求項 7 に記載のカルシウム - 活性化されるカリウムチャネルを通してのカリウムイオン流を高め又は低める化合物を同定するための方法であって、

a ) 請求項 1 に記載された核酸によってコードされる、組み換えのカルシウム - 活性化されるカリウムチャネルタンパク質を発現されている、請求項 1 に記載された核酸によって形質転換された該宿主細胞又は細胞膜と前記化合物とを接触させる工程；および

b ) 前記チャネルを発現する細胞又は細胞膜に対する化合物の機能的効果を決定する工程であって、該機能的効果は、カリウムイオンの高められた又は低められた流れであり、該真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される、工程を含んで成る方法。  
40

**【請求項 16】**

前記チャネルタンパク質が、配列番号：1、2 又は 3 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 1 5 に記載の方法。

**【請求項 17】**

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のカルシウム - 活性化されるカリウムチャネルタンパク質の製造方法であって、当前記タンパク質をコードする核酸により形質転換された宿主細胞を、前記チャネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養  
50

する工程を含んで成る方法。

【請求項 1 8】

カルシウム - 活性化されるカリウムチャネルタンパク質の製造方法であって、請求項 6 に記載の宿主細胞を、前記チャネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養する工程を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、低コンダクタンス (SK) 及び中間コンダクタンス (IK) のカルシウム - 活性化された (calcium-activated) カリウムチャネルに関する組成物及びその同定方法に関する。本発明はさらに、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを通してカリウムイオン流 (flux) を高め又は低める化合物についてのアッセイ方法を提供する。10

発明の背景

カルシウム - 活性化されたカリウム流は、広範囲の種類の動物細胞、たとえば神経、筋肉、腺又は上皮組織において、及び免疫系から見出される。それらの流れを調節するチャネルは、内部カルシウム濃度が上昇するにつれて、開口し、そしてカリウムの排出を可能にする。カリウムイオンの外部流は、細胞の内部をより陰性にし、細胞に適用される脱分極化電圧を妨害する。

2種の別個の種類のカルシウム - 活性化された  $K^+$  チャネル ( $K_{Ca}$  チャネルが記載されている。高コンダクタンスのカルシウム - 活性化された  $K^+$  チャネル (BKチャネル) は、内部カルシウムイオン及び膜電位の協調された作用により閉じられ、そして 100 ~ 200 pS の単位コンダクタンスを有する。低 (SK) 及び中間 (IK) コンダクタンスのカルシウム - 活性化された  $K^+$  チャネルは、内部カルシウムイオンにより単独で閉じられ、それぞれ 2 ~ 20 及び 20 ~ 85 pS の単位コンダクタンスを有し、そして BKチャネルよりもカルシウムに対してより敏感である (総説として、Latorreなど . , 1989 , Ann Rev Phys , 51 : 385-399 を参照のこと)。さらに、個々のタイプの  $K_{CB}$  チャネルは異なった薬理学的プロフィールを示す。3種類すべてが広く発現され、そしてそれらの活性は膜電位を高分極化する。BK (Atkins onなど . , 1991 , Science , 253 : 551-555 ; Adelmanなど . , 1992 Neuron , 9 : 209-216 ; Butler , 1993 , Science , 261 : 221-224) 及び SK (Kohlerなど . , 1996 , Science , 273 : 1709-1714) サブファミリーのメンバーがクローニング化され、そして異種細胞型において発現され、そこでそれらの生来の対応物の基本的性質を再現する。20

脊椎動物のニューロンにおいては、活動電位に続いて、数秒間持続し、そしてニューロンの開始パターンのための絶大な因果関係を有する後高分極化 (afterhyperpolarization) (AHP) が存在する。AHPの変更は、発作活動 (Algerなど . , J. Physiol. 399 : 191-205 (1988))、並びに学習及び記憶 (de Jongeなど . , Exp. Br. Res. 80 : 456-462 (1990)) に関係している。AHPは、2つの顕著な成分、すなわちバースト (burst) の開始においてスパイク頻度 (spike frequency) を仲介する早い成分 (fAHP)、及びそれに続く遅い成分 (sAHP) であってスパイク - 頻度の適合をつかさどるものから構成される (Nicoll , Science 241 : 545-551 (1988))。

AHPの個々の成分は動能的に異なり、そして異なるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの活動によるものである。高コンダクタンス (100 ~ 200 ピコジ - メンス (pS)) の電圧 - 及びカルシウム - 活性化されたカリウムチャネル (BKチャネル) の活性化は fAHP の基礎となり、これは急速に進行し (1 ~ 2 ミリ秒)、そして 10 ミリ秒内に崩壊する (Lancasterなど . , J. Physiol. 389 : 187-203 (1987) ; Vianaなど . , J. Neurophysiol. 69 : 2150-2163 (1993))。sAHPの基礎となるチャネルは、BKチャネルとは異なり、よりカルシウム感受性であり、電圧 - 閉鎖されず、そして低い単位コンダクタンスを有する、低コンダクタンスのカルシウム活性化されたカリウムチャネル (SKチャネル) である (Lancasterなど . , J. Neurosci. 11 : 23-30 (1991) ; San , J. Neurophysiol. 74 : 1772-1776 (1995))。

fAHP 及び sAHP は、それらの薬理学においても異なる。fAHP は BKチャネルの薬理学によれば、低濃度の外部テトラエチルアンモニウム (TEA) 及びカリブドトキシン (CTX) によりブ40

ロックされる (Lancasterなど . , *J. Physiol.* 389 : 187-203 (1987) ; Vianaなど . , *J. Neurophysiol.* 69 : 2150-2163 (1993) ; Butlerなど . , *Science* 261 : 221-224 (1993) )。対照的に、sAHPはCTXに対して感受性ではないが、しかしハチ毒ペプチドトキシン、アパミンに対する感度に関して2つの種類に分類される。たとえば、海馬錐体ニューロンにおいては、sAHPはアパミンに対して感受性ではないが (Lancasterなど . , *J. Neurophysiol.* 55 : 1268-1282 (1986) )、海馬ニューロン間及び迷走神経性ニューロンにおいては、それはナノモル濃度のトキシンによりブロックされる (Sah, *J. Neurophysiol.* 74 : 1772-1776 (1995) ; Zhangなど . , *J. Physiol.* 488 : 661-672 (1995) )。

ニューロン細胞におけるその役割の他に、マイクロモルより低濃度のカルシウムにより活性化され、電圧閉鎖されていないアパミン - 感受性カリウムチャネルが、末梢細胞型、たとえば骨格筋 (Blatzなど . , *Nature* 323 : 718-720 (1986) )、腺細胞 (Tseなど . , *Science* 255 : 462-464 (1992) ; Park, *J. Physiol.* 481 : 555-570 (1994) ) 及びT - リンパ球 (Grissmerなど . , *J. Gen. Physiol.* 99 : 63-84 (1992) ) からも記載されている。たとえば、SKチャネルは、筋緊張性筋ジストロフィーを有する患者の筋膜に見出されるアパミン受容体を代表することが提案されている (Renaudなど . , *Nature* 319 : 678-680 (1986) )。また、Grissmerなど . , (*J. Gen. Physiol.* 99 : 63-84 (1992) ) は、CTX非感受性、アパミン感受性、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルがヒト白血病T細胞に同定されることを報じており、そしてカルシウム活性化されたカリウムチャネルがカルシウムシグナルの力学的パターンを維持することによってT - 細胞活性化の間、支持の役割を演じることを示唆する。さらに、多くの細胞において、SKチャネルは、神経伝達物質又はホルモン作用の結果として活性化される (Haylettなど . , *Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential* (Cook, N. S. , ed.) , pp. 71-95 , John Wiley and Sons , 1990)。中間チャネルは赤血球細胞の生理学において役割を演じる。

中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルは、それらの電気生理学により文献にこれまで記載されて来た。Gardosチャネルは、マイクロモルより低濃度の内部カルシウムにより開口され、そして -120mVでの50pS ~ 120mVでの13pSの範囲の整流単位コンダクタンスを有する (対称120mM K<sup>+</sup>; Christphersen , 1991 , *J. Membrane Biol.* , 119 : 75-83)。それはカリブドトキシン (CTX) によりブロックされるが、しかし構造的に関連するペプチドイベリオトキシン (IBX) によってはブロックされず、それらの両者はBKチャネルをブロックする (Brugnaraなど . , 1995a , *J. Membr. Biol.* , 147 : 71-82)。アパミン、ある生来の可能性あるブロッカー (Vincentなど . , 1975 , *J. Biochem.* , 14 , 2521 ; Blatz and Mayleby , 1986 , *Nature* , 323 : 718-720) 及びクローン化されたSKチャネルは、IKチャネルをブロックしない (de-Allieなど . , 1996 , *Br. J. Pharm.* , 127 : 479-487)。Gardosチャネルはまた、イミダゾール化合物、たとえばクロトリマゾールによりブロックされるが、しかしケトコナゾールによってはブロックされない (Bragnaraなど . , 1993 , *J. Clin. Invest.* , 92 : 520-526)。Gardosチャネルの電気生理学的及び薬理学的性質は、それが本発明のIKサブファミリーに属することを示す。

IKチャネルは、種々の他の細胞型において記載されている。ラット皮質収集管 (cortical collecting duct) の成分細胞 (principle cell) は、異なった種類のK<sup>+</sup>チャネルを管腔膜と基底外側 (basolateral) 膜とに分離する。IKチャネルは、それらがこの膜を通してのK<sup>+</sup>の再循環を促進し、Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> - ATPアーゼの活性を高め、そしてそれにより血液中のNa<sup>+</sup>再吸収を高める基底外側膜に存在する (Hirsch and Schlatter , 1995 , *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* , 449 : 338-344)。IKチャネルはまた、それらがプラジキニンの血管拡張効果を担当する腎臓の微小血管系に包含されている (Rapacconなど . , 1996)。脳細管内皮細胞においては、IKチャネルは、ニューロン及びグリアにより生成されるエンドセリンにより活性化され、過剰のK<sup>+</sup>を血液の方に向ける (Renterghemなど . , 1995 , *J. Neurochem.* , 65 : 1274-1281)。微生物侵入に対して防御する好中球性顆粒球、すなわち移動性ファゴサイト細胞は、アゴニスト刺激に続いて、大きな脱分極化を受け、そしてIKチャネルはその刺激された顆粒球の再分極化に関連する (Varnaiなど . , 1993 , *J.*

10

20

30

40

50

. Physiol. , 472 : 373-390)。IKチャネルはまた、体止及び活性化されたヒトT-リンパ球においても同定されている。Grissmerなど(1993, J. Gen. Physiol. 102 : 601-630)は、IKチャネルが低ナノモル濃度のカリブドトキシンによりブロックされ、少々の又はまったくの電圧依存性を示さず、そしてアパミンに対して非感受性であることを報告している。このチャネルはまた、それが細胞内容積ホメオスタシスにおいて(Joiner, C. H. ., 1993, Am. J. Physiol. 264 : C251-270)及び平滑筋において(Van Rentenem, C. など., 1996, J. Neurochemistry 65 : 1274-1281)、重要な役割を演じるヒト赤血球細胞においても同定されている。

従って、SK及びIKチャネルは、多くの細胞型において鍵となる生理学的役割を演じるカルシウム-活性化されたカリウムチャネルのサブファミリーを含むように思われる。従って、広範囲の種類の生理学的機能におけるSK及びIKチャネルの鍵となる役割を得る場合、当業界において必要とされること、新規SK及びIKチャネルタンパク質及びそれをコードする核酸の同定である。従って、必要とされること、学習及び記憶障害、発作、筋緊張性ジストロフィー、免疫応答、及び神経伝達物質又はホルモン分泌の処理又は調節への使用のためにSK及びIKチャネル流を高め又は低める化合物を同定する方法である。本発明はそれらの及び他の利点を提供する。

#### 発明の要約

第1の広い観点において、本発明は、カルシウム-活性化されたカリウムイオンチャネルの、モノマーとして定義される新規タンパク質類及びそれらの対応する核酸を供給する。前記モノマーは、40~80kDaの分子量を有し、そして前記モノマーがキセノパス(Xenopus)卵母細胞において発現されるようなポリマー形で存在する場合、2~80pSのコンダクタンスの単位を有する。さらに、前記モノマーは、配列番号30又は42に対して生成される抗体に対して特異的に結合する。

もう1つの観点において、本発明は、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質の少なくとも15個の隣接するアミノ酸をコードする単離された核酸に関する。SKチャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、並びに配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有する。

いくつかの態様においては、単離された核酸は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2pSのコンダクタンス、40~100kDaの分子量を有し、そして緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、SK又はIKコード核酸、たとえばヒトゲノムライブラリーにおける配列番号13又はラットゲノムライブラリーにおける配列番号14と選択的にハイブリダイズし、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする。他の態様においては、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有するタンパク質をコードする。好みの態様においては、核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44及び48から成る群から選択された配列を有する。

もう1つの観点において、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47, 1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列の少なくとも15個の隣接するアミノ酸を有する単離されたカルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質に関し、ここで前記変異体は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 30, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応する。

広い態様において、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、少なくとも2pSのコンダクタンス及び40~100kDaの分子量を有するものとして定義される。他の態様においては、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する。

もう1つの観点においては、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有する、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応する抗体に向けられる。好

10

20

30

40

50

ましい態様においては、前記抗体はモノクローナル抗体に制限される。

さらにもう1つの観点においては、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルのモノマーをコードする核酸を含んで成る発現ベクターに関し、ここで前記モノマーは配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、及び配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有し、そして前記修飾された変異体は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2pSのコンダクタンス、40~100Kdの分子量を有し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された十分な長さのタンパク質と反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質である。

もう1つの観点において、本発明は、配列番号1, 2, 3, 19, 20, 32, 43及び47、及び配列番号1, 2, 3, 19, 20, 32, 43又は47の保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質のモノマーをコードする核酸を含んで成るベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞に関し、ここで前記修飾された変異体は、キセノパス卵母細胞において発現される場合、少なくとも2pSのコンダクタンス、40~100Kdの分子量を有し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1, 2, 3, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された十分の長さのタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質である。典型的には、宿主細胞は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸の発現を可能にする条件下で培養される。

さらにもう1つの観点においては、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする少なくとも15個の長さのヌクレオチドの単離された核酸配列に関する。

さらなる観点においては、本発明は、生物学的サンプルにおけるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の存在を検出するための方法に向けられる。この方法は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応する抗体と生物学的サンプルとを接触せしめ、そして免疫学的に反応性の条件下で前記タンパク質への前記抗体の結合を可能にすることを含んで成り、ここで前記結合された抗体の検出がチャネルタンパク質の存在を示す。

さらにもう1つの観点においては、本発明は、少なくとも25個の長さのアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸配列の生物学的サンプルにおける存在を検出するための方法を提供する。この方法は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有するチャネルタンパク質をコードする核酸に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと生物学的サンプルとを緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；ハイブリダイゼーション複合体を形成するために前記プローブへの前記チャネルタンパク質をコードする核酸のハイブリダイゼーションを可能にすることを含んで成り、ここで前記ハイブリダイゼーション複合体の検出がサンプルにおける核酸配列の存在を示すものである。いくつかの態様において、ハイブリダイゼーション条件は、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件である。他の態様においては、カルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質は、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基であり、そして卵母細胞において発現される場合、少なくとも2pSのコンダクタンスを有する。さらなる態様においては、核酸プローブは、小さな又は中位のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質コア領域内の副配列をコードする少なくとも250個の隣接したヌクレオチドを含んで成る。

さらなる観点において、本発明は、hSK 1のために配列番号5、及び6；rSK 2のために配列番号7及び8；内因性rSK 3のために配列番号9及び10；rSK 1のために配列番号11及び12；hSK 2のために配列番号23及び24；hSK 3のために配列番号25及び26；及びhIKのために、ヒトゲノム又はcDNAライブラリーからhIK 1を同定するために選択的であるプローブを増幅するであろう次のプライマー対：約270個の塩基のプローブを生成する5' GCCGTGCG 50

TGCAGGATTTAGG 3' (配列番号34) 及び5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35)、又は約165個の塩基のプローブを生成する5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36) 及び5' GGACTGCTGGCTGGTCTGG 3' (配列番号37) から成る群から選択されたプライマーと同じ核酸配列に、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、選択的にハイブリダイズするプライマーにより増幅される核酸によりコードされる、単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルに関する。十分な長さのhIK1の増幅のためには、次の2種のプライマー対が作動するであろう：5' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTT 3' (配列番号38) 及び5' CTACTTGGACTGCTGGCTGGTTC 3' (配列番号39)、又は5' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTGG 3' (イニシエターメチオニンのコドンを含む) (配列番号40) 及び5' GGGTCCAGCTACTTGGACTGCTG 3' (翻訳の終結のための停止コドンを含む) (配列番号41)。

10

さらにもう1つの観点においては、本発明は、低又は中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを通してカリウムイオン束を高め又は低める、クロトリミゾールではない化合物を同定する方法に関する。この方法は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及びそれらの保存的に修飾された変異体から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルをコードする核酸を発現されている真核宿主細胞と前記化合物とを接触せしめ、ここで前記保存的に修飾された変異体は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたアミノ酸配列を有し、少なくとも2pSのコンダクタンス及び40~100KDの分子量を有する抗原と特異的に反応する抗体に対して特異的に結合し；そして前記チャネルを通しての高められた又は低められたカリウムイオン束を決定する段階を含んで成る。好みの態様においては、前記高められた又は低められたカリウムイオン流 (flux) は、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流又はイオン束を測定し、又は電流又はイオン束の変化により誘発される電圧の変化を直接的に測定することによって決定される。特に好みの態様においては、前記チャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有する。もう1つの好みの態様においては、チャネルタンパク質は、組換え体である。

20

さらなる観点においては、本発明は、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された真核核酸に関し、ここで前記カルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55~60%の類似性を有するアミノ酸を含んで成り、そして少なくとも2pSのコンダクタンスを有する。いくつかの態様においては、本発明は前記単離された真核核酸によりコードされるタンパク質に向けられる。他の態様においては、カルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、前記コア領域内の20個の隣接したアミノ酸残基の比較窓に対して少なくとも85%の配列類似性を有する。

30

さらなる観点においては、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成り、そして少なくとも2pSのコンダクタンスを有する、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された真核核酸を含んで成るベクターに向けられる。典型的には、前記ベクターは、チャネルタンパク質をコードする単離された真核核酸の発現を可能にする条件下で培養される宿主細胞中にトランスフェクトされる。

40

さらなる観点においては、本発明は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを通してのカリウムイオン束を高め又は低める化合物を同定するための方法に向けられる。この方法は、少なくとも400個の長さのアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質を発現している真核宿主細胞と前記化合物とを接触せしめ、ここでチャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも55%の類似性を有するアミノ酸配列、及び少なくとも2pSのコンダクタンスを有し；そしてチャネルタンパク質を通しての高められた又は低められたカリウムイオン束を決定する段階を含んで成る。いくつかの場合、

50

前記高められた又は低められたカリウムイオン束は、真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される。

もう1つの観点においては、本発明は、SK及びIK遺伝子の突然変異のためのスクリーニング方法をコンピューターシステムに供給し、ここで前記方法は、(i)配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から選択された配列を有するカルシウム-活性化されたチャネルタンパク質をコードする第1核酸配列を入力し：(ii)前記第1核酸配列に対して実質的な同一性を有する第2核酸配列と前記第1核酸配列とを比較し；そして(iii)前記第1及び第2核酸配列間のヌクレオチド差異を同定する段階を含んで成る。第1の態様においては、前記第2核酸配列は、疾病状態に関連している。

もう1つの観点においては、本発明はSK及びIKタンパク質の立体構造を同定するための方法のコンピューターシステムを提供し、ここで前記方法は、(i)配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から選択されたアミノ酸配列を有するカルシウム-活性化されたチャネルタンパク質、又は前記タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列のアミノ酸配列を入力し；そして(ii)前記アミノ酸配列によりコードされるタンパク質の立体構造を生成する段階を含んで成る。1つの態様においては、前記アミノ酸配列は、一次構造であり、そしてその生成段階は、前記一次構造によりコードされるエネルギー条件を用いて前記一次構造から二次構造を形成し、そして前記二次構造によりコードされるエネルギー条件を用いて前記二次構造から三次構造を形成する段階を包含する。もう1つの態様においては、生成段階は、前記三次構造によりコードされる異方性条件を用いて前記三次構造から四次構造を形成する段階も包含する。もう1つの態様においては、前記方法はさらに、リガンドに結合するタンパク質の立体構造の領域を同定し、そして前記タンパク質に結合するリガンドを同定するために前記領域を用いる段階を含んで成る。

#### 発明の特定の記載

本発明は、新規の単離された低コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(SK)チャネル、中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(IK)チャネル(集合的には、“カルシウム-活性化されたカリウムチャネル”)、及び単離された核酸コードSK及びIKチャネル(すなわち、SK及びIKチャネル核酸)を供給する。その分布、機能及び薬理学は、SK又はIKチャネルとしてのそれらの新規種類のチャネルを定義する。

宿主細胞における単離されたSK又はIKチャネルタンパク質コード核酸の発現は、それぞれ、低コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(SK)チャネル又は中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウム(IK)チャネルを通してのカリウムイオン束を高め又は低める化合物を同定するために使用され得る組成物を供給する。SKチャネルはニューロンの後高分極化(sAHP)の遅延成分に従がうので、ニューロンsAHPの変更はてんかん性発作を阻害し、又は学習又は記憶障害を調整するための手段を提供する。

カルシウム-活性化されたSKチャネルはまた、T-細胞活性化にも包含される。従って、上昇する又は低下するSKチャネル流は、免疫応答を阻害し又は強化するための手段を提供する。さらに、SKチャネルは、ホルモン及び神経伝達物質分泌に関係している。従って、SKチャネル流の変更は、細胞又は腺分泌を調節し、そしてそれにより、その不均衡を処理するための手段を提供する。

カルシウム-活性化された中間チャネル(IK)はまた、特に末梢組織において重要な生理学的役割を演じると思われる。たとえば、中間チャネルは、赤血球細胞において報告されており、そして一部、細胞脱水、すなわち鎌状赤血球貧血において悪化される工程に寄与する。

本発明はまた、単離された低コンダクタンス及び中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウムチャネルの、及びSK及びIKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸のための副配列にも関する。SK又はIKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、異常型転写生成物、又はSK又はIKチャネルをコードする高められた又は低められた転写レベルの遺伝子の同定のためのプローブとしての利用性を提供する。高められた又は

10

20

30

40

50

低められた転写についてのアッセイは、薬物スクリーニングプロトコールに使用され得る。同様にSK又はIKチャネルタンパク質は、薬物スクリーニングアッセイにおいて、高められた又は低められた、カルシウム・活性化されたカリウムチャネルの発現の免疫診断アッセイへの使用のための抗体を生成するための免疫原として使用され得る。

#### 定義

単位、接頭辞及び記号は、それらのSI許容された形で示され得る。特にことわらない限り、核酸は、5' 3'配向で左から右に書かれ；アミノ酸配列はアミノカルボキシ配向で左から右に書かれる。核酸の範囲は、その範囲を定義する数字も包含する。下記に定義される用語は、全体として明細書により十分に定義される。

用語“核酸”“プローブ”、又は“プライマー”は、一本鎖又は二本鎖形でのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーに対する関係を包含し、そして特にことわらない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似する態様で核酸に対してハイブリダイズする天然のヌクレオチドの既知類似体を包含する。特にことわらない限り、特定の核酸配列は、その完全な相補的配列を包含する。真核核酸は、真核細胞、好ましくは多細胞真核生物の細胞からの核酸である。10

用語“組換え”は、細胞、又はタンパク質、核酸、又はベクターに関して使用される場合、細胞に対して生来でない形に、異種核酸の導入又は生来の核酸の変更により修飾されているか、又はそのように修飾された細胞に由来する、細胞、又はタンパク質、核酸又はベクターの言及を包含する。従って、たとえば組換え細胞は、生来（非組換え）形の細胞内に見出されない遺伝子及びタンパク質を発現し、又は発現されるか又はまったく発現されない条件下で、異常に発現される生来の遺伝子を発現する。20

参照される核酸配列に関しての用語“副配列”とは、参照される核酸よりも長さにおいて短いヌクレオチドを有する核酸からの隣接した配列に関する言及を包含する。参照されるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチド配列（集合的には、“タンパク質”）に関しては、“副配列”とは、参照されるタンパク質よりも少ないアミノ酸を有する参照されるタンパク質からの隣接した配列を言及する。

2種の核酸又はポリペプチド配列に関しての用語“同一の”又は“配列同一性”とは、特定された比較窓に対して最大の対応のために整列される場合、同じである2種の配列における残基の言及を包含する。配列同一性の百分率がタンパク質に関して使用される場合、アミノ酸残基が類似する化学性質（たとえば電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基により置換され、そして従って、分子の機能的性質を変えない、保存性アミノ酸置換によって、同一でない残基位置がしばしば異なることが理解される。配列が保存性置換において異なる場合、%配列同一性は、置換の保存性質のためにより高い方に修正するよう調節され得る。この調節を行なうための手段は、当業者に良く知られている。典型的には、これは、完全なミスマッチよりもむしろ部分としての保存性置換の評点を包含する。従って、たとえば、同一のアミノ酸が1の評点を与えられ、そして非保存性置換がゼロの評点を与えられる場合、保存性置換は、ゼロ～1の間の評点を与えられる。保存性置換の評点は、たとえばプログラムPC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA) に従って実施されるような、Meyers and Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4: 11-17 (1988) のアルゴリズムに従って計算される。30

“比較窓”とは、本明細書において使用される場合、配列が、2種の配列が最適に一直線状に配置された後、同じ番号の隣接する位置の参照配列に比較され得る、20～600、通常約50～約200、より通常には約100～約150個から成る群から選択された隣接する位置の数のいづれか1つのセグメントの言及を包含する。比較のための配列の一列整列方法は、当業界において良く知られている。比較のための配列の最適な一列整列は、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482の局部相同アルゴリズムにより；Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同一列整列アルゴリズムにより；Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性方法のための研究により；それらのアルゴリズムのコンピューター記憶された実施により (Intelligenetics, Mountain View, CaliforniaによるPC/Geneプログラムでの (LUSTAL, Wisconsin Genetics So40

ftware Package , Genetics Computer Group ( GCG ) , 575 Science Dr . , Madison , Wisconsin , USAにおけるGAP , BESTFIT , BLAST , FASTA及びTFASTAを包含するが、但しそれらだけには限定されない) 、実施され得 ; ここで前記 ( LUSTAL プログラムは、 Higgins and Sharp ( 1988 ) Gene , 73 : 237-244 及び Higgins and Sharp ( 1989 ) CABIOS 5 : 151-153 ; Corp et. など . , ( 1988 ) Nucleic Acids Research 16 : 10881-90 ; Huang , など . , ( 1992 ) Computer Applications in the Biosciences 8 : 155-65 ; 及び Pearson 、など . , ( 1994 ) Methods in Molecular Biology 24 : 307-31 により十分に記載されている。一列配列はまた、検閲及び手動整合によってもしばしば実施される。

用語、ポリヌクレオチド配列の “ 実質的な同一性 ” 又は “ 類似性 ” とは、ポリヌクレオチドが、標準のパラメーターを用いての上記のプログラム ( 好ましくはBLAST ) を用いて対照配列に比較される場合、少なくとも 60% の配列同一性、好ましくは少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 90% 及び最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を有する配列を含んで成ることを意味する。 2 種の核酸配列が実質的に同一である 1 つの表示は、第 1 の核酸がコードするポリペプチドが、第 2 の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。

2 種の核酸配列が実質的に同一であるもう 1 つの表示は、それらの 2 種の分子が “ 中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件 ” ( 又は “ 中位の条件 ” ) 下でお互いに対してもハイブリダイズすることである。代表的な “ 中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件 ” とは、 40% のホルムアミド、 1 M の NaCl , 1 % の SDS の緩衝液における 37 °C でのハイブリダイゼーション、及び 45 °C での 1 × SSC による洗浄を包含する。陽性ハイブリダイゼーションは、少なくとも 2 倍のバックグラウンドである。当業者は、他のハイブリダイゼーション及び洗浄条件が類似する緊縮性の条件を付与するために利用され得ることを容易に理解するであろう。中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下でお互いに対してもハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一である場合、まだ実質的に同一である。これは、たとえば核酸のコピーが遺伝子コードにより可能にされる最大ゴドン縮重を用いて創造される場合に生じる。

ペプチドに関しての用語 “ 実質的な同一性 ” 又は “ 類似性 ” とは、ペプチドが、特定された比較窓に対する対照配列に対して、少なくとも 60% の配列同一性、通常少なくとも 70% 、好ましくは 80% 、より好ましくは 85% 、最も好ましくは少なくとも 90% 又は 95% の配列同一性を有する配列を含んで成ることを示す。好ましくは、最適な一列配列は、Needleman and Wunsch ( 1970 ) J . Mol . Biol . 48 : 443 の相同性一列配列アルゴリズムを用いて実施される。 2 種のペプチド配列が実質的に同一である表示は、 1 つのペプチドが第 2 ペプチドに対して生ぜしめられた抗体と免疫学的に反応することである。従って、 1 つのペプチドは、第 2 ペプチドに対して、それらの 2 種のペプチドが保存性置換によってのみ異なる場合、実質的に同一である。一般的に、類似性は、 20 の隣接した位置からのいづれかの番号から、十分な長さのコア領域配列 ( すなわちアミノ酸残基 135 ~ 462 までの rSK 2 との最適な一列配列の領域 ) における残基の番号までの長さを有する、コア配列内にある比較窓を用いて決定される。

用語 “ オリゴヌクレオチド ” 又は “ ポリヌクレオチド ” プローブは、二本鎖及び一本鎖の DNA 又は RNA の両者の言及を包含する。それらの用語はまた、非核酸汚染を実質的に有さない、合成的に又は組換え的に誘導された配列も言及する。

本明細書において使用される場合、“ 接触 ” 又は “ 接触する ” とは、直接的な物理的会合で配置することを意味する。

“ 生物学的サンプル ” とは、本明細書において使用される場合、IK 及び / 又は SK チャネルタンパク質、又はその対応する IK 及び / 又は SK チャネルタンパク質をコードする核酸を含む生物学的組織又は流体のサンプルである。そのようなサンプルは、唾液、羊水、血液、血液細胞 ( たとえば白血球細胞 ) 、又は組織を包含するが、但しそれらだけには限定されない。生物学的サンプルはまた、組織の断片、たとえば組織学的目的のために取られた凍結断片も包含する。生物学的サンプルの例は、神経、筋肉、腺又は上皮組織からの、又は免疫系 ( たとえば T 細胞 ) からの細胞サンプルを包含する。生物学的サンプルは典型的に

10

20

30

40

50

は、真核生物、好ましくは多細胞真核生物、たとえば昆虫、原生動物亜界、鳥、魚、ハ虫類、及び好ましくは哺乳類、たとえばラット、マウス、牛、犬、テンジクネズミ、又はウサギ、及び最も好ましくは、霊長類、たとえばマカーカザル、チンパンジー又はヒトから得られる。

用語“抗体”はまた、抗原結合形の抗体（たとえば、Fab, F(ab)<sub>2</sub>）も包含する。用語“抗体”とは、分析物（抗原）を特異的に結合し、そして認識する、免疫グロブリン遺伝子又は複数の免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされるポリペプチド、又はそのフラグメントを言及する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、<sub>10</sub>、<sub>2</sub>、<sub>3</sub>、<sub>4</sub>、<sub>5</sub>、<sub>6</sub>、<sub>7</sub>、<sub>8</sub>、<sub>9</sub>及びμ不变領域遺伝子、及び種々の免疫グロブリン可変領域遺伝子を包含する。L鎖は、

又はのいづれかとして分類される。H鎖は、それぞれ免疫グロブリン種類、IgG, IgM, IgA, IgD及びIgEを定義する、<sub>10</sub>、<sub>11</sub>、<sub>12</sub>、<sub>13</sub>、<sub>14</sub>、<sub>15</sub>、<sub>16</sub>、<sub>17</sub>、<sub>18</sub>、<sub>19</sub>又はとして分類される。

代表的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを含んで成る。個々のテトラマーは、同一の2対のポリペプチド鎖から成り、個々の対は1つの“L”鎖（約25KD）及び1つの“H”鎖（約50～70KD）を有する。個々の鎖のN-末端は、抗原認識を主に担当する約100～110又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語可変L鎖（V<sub>L</sub>）及び可変H鎖（V<sub>H</sub>）は、それぞれ、それらのL及びH鎖を言及する。

抗体はたとえば、損なわれていない免疫グロブリンとして、又は種々のペプチダーゼによる消化により生成された多くの十分に特徴づけられたフラグメントとして存在する。従って、たとえば、ペプシンは、F(ab)'<sub>2</sub>、すなわちそれ自体、ジスルフィド結合によりV<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1に連結されるL鎖であるFabのダイマーを生成するために、ヒンジ領域におけるジスルフィド連鎖以下に抗体を消化する。F(ab)'<sub>2</sub>は、ヒンジ領域におけるジスルフィド連鎖を破壊するために温和な条件下で還元され得、それによりF(ab)'<sub>2</sub>ダイマーをFab'モノマーに転換する。Fab'モノマーは実質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである（Fundamental Immunology, Third Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. 1993を参照のこと）。種々の抗体フラグメントは、損なわれていない抗体の消化により定義されるが、当業者は、そのようなフラグメントが化学的に又は組換えDNA方法を用いることによって、新たに合成され得ることを認識するであろう。従って、用語抗体は、本明細書において使用される場合、また抗体フラグメント、たとえば一本鎖F<sub>V</sub>、キメラ抗体（すなわち、異なる種からの不变及び可変領域を含んで成る）、ヒト適合された抗体（すなわち、非ヒト源からの相補性決定領域（CDR）を含んで成る）、及びヘテロ接合抗体（たとえば二元特異的抗体）も包含する。<sub>20</sub><sub>30</sub>

アミノ酸は、それらの通常知られている3文字記号又はIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推薦される一文字記号のいづれかにより、本明細書において言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、それらの通常許容される一文字コードにより言及され得る。

“保存的に修飾された変異体”は、アミノ酸及び核酸配列の両者に適用する。特定の核酸配列に関しては、保存的に修飾された変異体は、同一の又は実質的に同一のアミノ酸配列をコードするか、又は実質的に同一のアミノ酸配列をコードしないそれらの核酸を言及する。遺伝子コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸はいづれかの一定のタンパク質をコードする。たとえば、コドンGCA, GCC, GCG及びGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。従って、アラニンがコドンにより特定されるあらゆる位置で、そのコドンは、コードされるポリペプチドの変更を伴わないで、記載されるその対応するコドンのいづれかに変更され得る。そのような核酸変動は、保存的に修飾された変動の1つの種である“サイレント変動”である。ポリペプチドをコードする本明細書におけるあらゆる核酸配列はまた、核酸のあらゆる可能なサイレント変動を説明する。当業者は、核酸における個々のコドン（但し、通常、メチオニンのための唯一のコドンであるAUGを除く）が機能的に同一の分子を生成するために修飾され得ることを理解するであろう。従って、ポリペプチドをコードする核酸の個々のサイレント変動は、個々の記載される配列に内在する。アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列における単一のアミノ酸又は低%のアミノ酸を変更し、付加し、又は欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク<sub>40</sub><sub>50</sub>

質の配列への個々の置換、欠失又は付加は、変更が化学的に類似するアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす“保存的に修飾された変異体”であることを認識するであろう。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存性置換表は、当業界において良く知られている。次の6つのグループはそれぞれ、お互いのための保存性置換であるアミノ酸を含む：

- 1 ) アラニン ( A ) 、セリン ( S ) 、トレオニン ( T ) ;
- 2 ) アスパラギン酸 ( D ) 、グルタミン酸 ( E ) ;
- 3 ) アスパラギン ( N ) 、グルタミン ( Q ) ;
- 4 ) アルギニン ( R ) 、リシン ( K ) ;
- 5 ) イソロイシン ( I ) 、ロイシン ( L ) 、メチオニン ( M ) 、バリン ( V ) ; 及び
- 6 ) フェニルアラニン ( F ) 、チロシン ( Y ) 、トリプトファン ( W ) 。

また、Creighton (1984) Proteins W. H. Freeman and Companyも参照のこと。

用語“生物学的に純粋な”または“単離された”とは天然に存在する環境で発見される時に、通常伴うかまたは相互作用する構成成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。

核酸に関しての句“～から成る群から選択された配列に対して中位の緊縮性ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする核酸によりコードされるタンパク質をコードする”とは、天然に存在するタンパク質又は天然タンパク質の誘導体をコードするが、しかし言及された条件下で、天然起源のタンパク質に対してはやハイブリダイズしないように故意に修飾され、又は構築されるそれらの核酸を意味する。

“発現ベクター”は、宿主細胞において特定の核酸の転写を可能にする一連の特定された核酸要素により組換え的に又は合成的に生成された核酸構造体である。発現ベクターは、プラスミド、ウィルス、又は核酸フラグメントの一部であり得る。典型的には、発現ベクターは、転写されるべき核酸、及びプロモーターを含む。

チャネルに影響を及ぼす化合物を試験するためのアッセイに関しての句“機能的効果”とは、チャネルの影響下で間接的に又は直接的に存在するいづれかのパラメーターの決定を包含する。それは、イオン束及び膜電位の変化を包含すると共に、また他の生理学的効果、たとえば転写又はホルモン開放の増強又は低下も包含する。

“選択的にハイブリダイズする”又は“選択的ハイブリダイゼーション”とは、特定された核酸標的配列に対して、核酸配列が、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、非-標的核酸配列へのそのハイブリダイゼーションよりも検出的に高い程度に、又は非-標的核酸の実質的な排除までハイブリダイズすることを意味する。選択的にハイブリダイズする配列は、お互い、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、及び最とも好ましくは100%の配列同一性（すなわち、相補的な）を有する。“配列同一性の%”は、比較窓に対して2つの最適に一列配列された配列を比較することによって決定され、ここで比較窓におけるポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適な一列配列のための対照配列（付加又は欠失を含まない）に比較される場合、付加又は欠失（すなわちギャップ）を含むことができる。その%は、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が適合された位置の数を生成するために両配列において生じる位置の数を決定し、比較窓における位置の合計数により前記適合された位置の数を割り算し、そして配列同一性の%を生成するために100を前記結果に掛け算することによって計算される。

用語“緊縮条件”又は“緊縮ハイブリダイゼーション条件”とはプローブがその標的配列に対して、他の配列よりも検出的に高い程度にハイブリダイズするであろう条件を言及する。緊縮条件は、配列-依存性であり、そして異なった環境において異なるであろう。長い配列ほど、高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のために熱溶融点 ( $T_m$ ) よりも約5℃低くあるように選択される。 $T_m$ は、相補的標的配列の50%が完全に適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度及びpH下で）である。典型的には、緊縮条件は、塩濃度がpH7.0～8.3で、約1.0M以下のNaイオン濃度、典型的には約0.01～1.0MのNaイオン濃度（又は他の塩）であり、そして温度が短いプローブ（たとえば10～50個のヌクレオチド）のために少なくとも約30℃及び長いプローブ（たとえば50個以上の、ヌクレオチド）

10

20

30

40

50

チド)のために少なくとも約60である条件であろう。緊縮条件はまた、不安定化剤、たとえばホルムアミドの添加によっても達成され得る。典型的な低緊縮条件は、30%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDSの緩衝溶液(37)によるハイブリダイゼーション、及び2×SSC(50)での洗浄を包含する。典型的な高緊縮条件は、50%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS溶液(37)によるハイブリダイゼーション及び0.1×SSC(60)での洗浄を包含する。

核酸ハイブリダイゼーションアッセイ型における“緊縮ハイブリダイゼーション条件”又は“緊縮条件”は、配列依存性であり、そして異なった環境パラメータ下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションに関する多数のガイドが、Tijssen(1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes Part 1, Chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays"*, Elsevier, New Yorkに見出される。緊縮条件は、配列-依存性であり、そして異なった環境下で異なるであろう。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。

“ハイブリダイゼーション複合体”とは、2つの一本鎖核酸配列のお互いとの選択的ハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖核酸配列を意味する。

“宿主細胞”とは、発現ベクターを含み、そしてその発現ベクターの複製又は発現を支持する細胞を意味する。宿主細胞は、原核細胞、たとえばE.コリ、又は真核細胞、たとえば酵母、昆虫、両性類、又は哺乳類細胞であり得る。

“コンダクタンス”とは、電気的コンダクタンスを意味する。電気的コンダクタンスは、便利には、ジ-メンス( $1/\text{ohm} = \text{mho}$ )で測定される。単位コンダクタンスは、120mMの対称カリウムイオン濃度を用いて例6(たとえば卵母細胞)に示される条件下でパッチクランププロトコールを用いて单一のチャネル流を測定することによって決定される。一般的には、Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MAを参照のこと。本発明においては、“コンダクタンス”とは、言及されたSK又はIKチャネルタンパク質の单一のホモマーテンパク質の単位電気的コンダクタンスを意味する。

“卵母細胞において発現される場合、SKチャネルの形成を導びく”とは、多くの言及されたSKタンパク質が、SKチャネルを形成するために、単独で又は他の内因性キセノパス卵母細胞分子と共にアセンブリーされる言及されたSKタンパク質の発現を包含する。キセノパス卵母細胞内での発現は、本明細書に提供される例、たとえば例3に開示される。

“卵母細胞において発現される場合、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルの形成を導びく”とは、多くの言及されたIK及び/又はSKタンパク質が、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルを形成するために、単独で又は他の内因性キセノパス卵母細胞分子と共にアセンブリーされる言及されたIK及び/又はSKタンパク質の発現を包含する。キセノパス卵母細胞内での発現は、本明細書に提供されるれい、たとえば例3に開示される。

“免疫学的に反応性の条件”とは、特定のエピトープに対して生成される抗体のそのエピトープへの結合を、その抗体が実質的にすべての他のエピトープに結合するよりも検出的に高い程度まで可能にする条件を意味する。免疫学的に反応性の条件は、抗体結合反応の形式に依存し、そして典型的には、イムノアッセイプロトコールに利用される条件である。イムノアッセイ形式及び条件の記載については、Harlow and Lane(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。

“タンパク質に対して反応性の抗体”とは、タンパク質が“抗体と特異的に免疫反応する”ことを意味する。

タンパク質又はペプチドを言及する場合、用語“抗体と特異的に免疫反応する”、又は“抗体に対して特異的に結合する”とは、抗体と、その抗体の抗原結合部位により認識されるエピトープを有するタンパク質との間の結合反応を言及する。この結合反応は、タンパク質及び他の生物学的物質の異種集団の存在間での認識されるエピトープを有するタンパク質の存在の決定因子である。従って、企画されたイムノアッセイ条件下で、特定された抗体は、認識されるエピトープを有するタンパク質に結合し、そしてあったとしても、サ

10

20

30

40

50

ンプルに存在する、エピトープを欠いている他のタンパク質に対して、検出的に低い程度、結合する。

そのような条件下での抗体に対する特異的結合は、特定タンパク質に対するその特異性のために選択される抗体を必要とする。たとえば、配列番号 1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 32 , 43及び47に示されるアミノ酸配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して生ぜしめられた抗体は、低及び / 又は中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質と特異的に免疫反応するが、しかし他のタンパク質とは免疫反応しない抗体を得るために選択され得る。免疫原として使用されるタンパク質は、線状エピトープを供給するために生来のコンホメーションで存在するか又は変性され得る。

種々のイムノアッセイ形式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために使用され得る。たとえば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を選択するために通常使用される。特定の免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイ形式及び条件の記載については、Harlow and Lane ( 1988 ) Antibodies , A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Publications , New Yorkを参照のこと。

“トランスフェクトされた”とは、真核細胞中への核酸の導入を意味し、ここで核酸が細胞のゲノム（すなわち、染色体、プラスミド、又はミトコンドリアDNA）中に導入され、自己レプリコン中に転換され、又は過渡的に発現される（たとえば、トランスフェクトされたmRNA）。トランスフェクションは、インビボ又はエクスピボで存在する。“エクスピボ”とは、細胞又は複数細胞が得られ、又は細胞系が単離される生物の身体外を意味する。エクスピボトランスフェクションに統いて、好ましくは、生物中への細胞の再注入が伴う。対照的に、“インビボ”とは、細胞が得られ、又は細胞系が単離される生物の身体内を意味する。

“抗原”とは、抗体が生成され得、そして抗体が特異的に免疫反応する物質を意味する。特定抗原と免疫学的に反応する抗体は、インビボで、又は組換え方法、たとえばファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーの選択により生成され得る。たとえば、Huseなど . ( 1989 ) Science 246 : 1275-1281 ; 及びWard , など . ( 1989 ) Nature 341 : 544-546 ; 及びVaughanなど . ( 1996 ) Nature Biotechnology , 14 : 309-314を参照のこと。

特定された核酸に関しての“コードする”又は“コードされる”とは、その特定されたタンパク質中への翻訳のための情報を含んで成ることを意味する。その情報は、コドンの使用により特定される。典型的には、アミノ酸配列が“普遍的”遺伝子コードを用いて核酸によりコードされる。しかしながら、いくつかの植物、動物及び菌類ミトコンドリア、細菌性マイコプラズマカプリコラム (Mycoplasma capricolum) ( Proc . Natl . Acad . Sci . , 82 : 2306-2309 ( 1985 ) ) 又は纖毛虫マクロヌクレウス (Macronucleus) に存在するような普遍的コードの変異体が、核酸がそれらの生物を用いて発現される場合、使用され得る。

特定された配列からの特定された数のアミノ酸残基に関しての、“～からの隣接するアミノ酸”とは、对照配列におけるのと同じアミノ酸に直接的に隣接する個々のアミノ酸の同一の順序を有する特定された对照配列内からの特定された数のアミノ酸の配列を意味する。

“低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネル”、又は“SKチャネル”とは、電圧 - 閉鎖されておらず、約30nM ~ 10 μ M のカルシウムにより活性化され、そして例 6 に特定される条件を用いて、120mMの対称カリウム濃度下で測定される場合、約 2 ~ 60pS、しばしば 2 ~ 25pS の単位コンダクタンスを有する膜チャネルを意味する。SKチャネルは、サブユニットとして複数のSKチャネルタンパク質、典型的には 4 個のSKチャネルタンパク質（たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのSKチャネルタンパク質）を含んで成る。

“低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質”又は“SKチャネル”

10

20

30

40

50

タンパク質”とは、SKチャネルを製造するアミノ酸配列からの少なくとも10個の長さの隣接するアミノ酸のペプチドを意味する。それらのタンパク質は、十分な長さである場合、SKチャネルのモノマーとして作用する。従って、SKチャネルタンパク質は、SKチャネルの機能的特徴を有するヘテロマー又はホモマータンパク質を形成する機能的特徴を有し、又はそのペプチドフラグメントであり得る。たとえば、N-末端延長されたrsk 3（配列番号43）及び切断されたrSK3（配列番号3）の両者は、実質的に同一の機能的特徴を示す。

“中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネル”、又は“IKチャネル”とは、電圧 - 閉鎖されておらず、約30nM～10 μ Mのカルシウムにより活性化され、そして例6に特定される条件を用いて、120mMの対称カリウム濃度下で測定される場合、約20～80pS、より通常とは30～70pS、40～60pS又は最も好ましくは35～40pSの単位内部コンダクタンスを有する膜チャネルを意味する。IKチャネルは、サブユニットとして複数のIKチャネルタンパク質、典型的には4個のIKチャネルタンパク質（たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのIKチャネルタンパク質）を含んで成る。

“中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質”又は“IKチャネルタンパク質”とは、IKチャネルを製造するアミノ酸配列からの少なくとも10個の長さの隣接するアミノ酸のペプチドを意味する。それらのタンパク質は、十分な長さである場合、IKチャネルのモノマーとして作用する。従って、IKチャネルタンパク質は、IKチャネルの機能的特徴を有するヘテロマー又はホモマータンパク質を形成する機能的特徴を有し、又はそのペプチドフラグメントであり得る。

“カルシウム - 活性化されたカリウムチャネル”とは、低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム（SK）チャネル及び中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム（IK）チャネルを意味する。

用語“ポリペプチド”，“ペプチド”、及び“タンパク質”は、アミノ酸残基のポリマーを言及するために、本明細書においては、互換的に使用される。それらの用語は、1又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学的類似体であるアミノ酸ポリマー、及び天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。

“特異的に反応する”又は“特異的反応性の”とは、抗体とその抗体と“特異的に結合する”タンパク質との間の反応により示される特異性の反応を意味する。

“ヒトゲノムライブラリー”とは、ヒトの完全なゲノムを実質的に表わす単離されたDNA分子の収集を意味す。ゲノムライブラリーの構成は、次の標準の分子生物学文献に教授されている：Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookなど. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3; 及びCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelなど. , eds. , Current Protocols, & joint venture between Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc. , (1994 Supplement) (Ausubel)。

“増幅された”とは、鑄型として少なくとも1つの核酸配列を用いての核酸配列の複数コピー又は核酸配列に対して相補的な複数コピーの構成を意味する。増幅システムは、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）システム、リガーゼ鎖反応（LCR）システム、核酸配列に基づく増幅（NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario），Q-Beta Replicaseシステム、転写に基づく増幅システム（TAS）及び鎖置換増幅（SDS）を包含する。たとえば、Diagnostic Molecular Microbiology; Principles and Applications, Ed. D. H. Persingなど. , American Society for Microbiology, Washington, D.C. を参照のこと。

用語“残基”又は“アミノ酸残基”又は“アミノ酸”とは、本明細書において使用される場合、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド（集合的には“ペプチド”）中に組込まれるアミノ酸を言及する。前記アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸であり、そして特にことわらない限り、天然に存在するアミノ酸と類似する態様で機能することができる天然のアミノ酸の既知類似体を包含する。

“核酸のセグメント”とは、15～約1500個の長さのヌクレオチド、又はヌクレオチド類似

10

20

30

40

50

体のいづれか1つの核酸配列、又はそのような配列のコンカテマーを意味する。

“機能的効果の決定”とは、細胞及び細胞膜機能により、細胞又は細胞膜に対するカリウムイオン流を高め又は低める化合物の効果を試験することを意味する。好ましくは、前記用語は、SK及びIKチャネル活性に対する化合物の機能的効果、たとえばコンダクタンスの変更、電圧閉鎖、及び同様のことを言及する。

#### 低及び中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質

本発明は、中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された（IK）カリウムチャネルタンパク質、及び低コンダクタンスのカルシウム - 活性化された（SK）チャネルタンパク質（集合的には、“カルシウム - 活性化されたカリウムチャネル”）を提供する。本発明の単離された低コンダクタンスのカルシウム - 活性化された（SK）チャネルタンパク質は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列のいづれか1つからの少なくともN個のアミノ酸を含んで成り、ここで前記Nは10～600から成る群から選択された整数のいづれか1つであり、そして前記配列は起源のタンパク質に対してユニークである。

同様に、本発明の単離された中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された（IK）チャネルタンパク質は、配列番号32及び保存的に修飾されたその変異体からの少なくともN個のアミノ酸を含んで成り、ここでNは10～600から成る群から選択された整数のいづれか1つであり、そして前記配列は、起源のタンパク質に対してユニークである。

典型的には、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質及び特異的ペプチドは、少なくとも15, 25, 35又は50個の長さのアミノ酸、より好ましくは、少なくとも100, 200, 300, 400又は500個の長さのアミノ酸、及び最とも好ましくは、十分な長さの配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47、又は保存的に修飾されたそれらの変異体である。従って、本発明は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47の十分な長さの配列及び副配列、及び配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47の保存的に修飾された変異体の十分な長さの配列及び副配列を提供する。配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の“十分な長さ”的配列とは、それぞれ、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の保存的に修飾された変異体の“十分な長さ”的配列とは、それぞれ、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の保存的に修飾された変異体の配列を意味する。本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質及びペプチドは、薬物スクリーニングアッセイにおいて、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの高められた又は低められた発現を評価するための免疫診断プローブの調製のための免疫原として使用され得る。

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質はまた、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列のいづれか1つの配列からの少なくともN個のアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対しての実質的な同一性（すなわち類似性）を有するタンパク質を包含し、ここで前記Nは10～600から成る群から選択された整数のいづれか1つである。一般的に、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、少なくとも50個、典型的には少なくとも100個、好ましくは少なくとも200個、より好ましくは少なくとも300個、及び最とも好ましくは少なくとも400個の長さのアミノ酸残基である。典型的には、カルシウム - 活性化されたカリウムSK又はIKチャネルタンパク質の実質的に類似する又は保存的に修飾された変異体は、好ましくは、多細胞真核生物、たとえば昆虫、原生動物、鳥、魚、両生類、ハ虫類又は哺乳類からの真核タンパク質である。配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から選択された配列を有するSKチャネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるSKチャネルタンパク質は、免疫学的に反応する条件下で、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたSKチャネルタンパク質に対して反応性の免疫グロブリンと特異的に反応するであろう。

同様に、配列番号32からの選択された配列を有するIKチャネルタンパク質に対して実質的

10

20

30

40

50

に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるIKチャネルタンパク質は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号32のIKチャネルタンパク質に対して反応性の免疫グロブリンと特異的に反応するであろう。種々のイムノアッセイ形式が、そのような免疫学的に特異的な反応、たとえばELISA、競争イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンプロット、間接的免疫蛍光アッセイ及び同様のものを評価するために使用され得る。

他方では、配列番号1，2，3，4，19，20，43及び47から選択された配列を有するSKチャネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるSKチャネルタンパク質は、配列番号1，2，3，4，19，20，43及び47から成る群から選択されたSKチャネルタンパク質のコア配列（又は“コア領域”）内の比較窓に対して60%～100%の類似性の値のいづれか1つを有するアミノ酸配列を含んで成るであろう。  
10

配列番号32の配列を有するIKチャネルタンパク質に対して実質的に同一であるか、又はその保存的に修飾された変異体であるIKチャネルタンパク質は、IKチャネルタンパク質hIK1のコア配列（又は“コア領域”）内の比較窓に対して60%～100%の類似性の値のいづれか1つを有するアミノ酸配列を含んで成るであろう。

従って、類似性は、コア領域又はその副配列への参照により決定される。hSK1（配列番号1）のコア領域は、アミノ酸残基124～451（配列番号27）である。rSK2（配列番号2）のコア領域は、アミノ酸残基135～462である。切断されたrSK3（配列番号3）のコア領域は、アミノ酸残基109～436である。N-末端延長されたrSK3（配列番号43）のコア領域は、288～615である。rSK1（配列番号4）のコア領域は、前述の領域と整合する領域により定義される。hSK2（配列番号19）のコア領域は、アミノ酸残基134～461である。切断されたhSK3（配列番号20）のコア領域は、アミノ酸残基109～436である。N-末端延長されたhSK3（配列番号47）のコア領域は238～465である。従って、配列番号1～4，19，20，43及び47のコア領域は、アミノ近位端でアミノ酸残基副配列LSDYALIFGM（配列番号17）及びカルボキシル近位端でQRKFLQAIHQ（配列番号18）を含み、それらにより定義される。hIK1（配列番号32）のコア領域は、アミノ酸残基25～351である。前記コア領域の副配列は、10～配列番号1，2，3，4，19，20，32，43又は47のコア配列の長さまでの数のいづれか1つの長さを有する。好ましくは、SK又はIKチャネルタンパク質は、コア配列内からの20の隣接したアミノ酸の比較窓に対して少なくとも90%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成る。  
20

類似性はまた、カルシウム-活性化されたチャネルタンパク質の機能的特徴によっても決定される。たとえば、本発明は、発現される場合、実質的に同一の流れを有するいくつかのSK3アミノ酸配列を供給する。rSK3をコードするcDNAは、2種の異なった形で単離されて来た。第1の配列番号43をコードする配列番号44は、内因性rSK3又はN-末端延長されたrSK3である。第2の配列番号3をコードする配列番号16は、そのN-末端で配列番号43に対して切断される。切断されたrSK3タンパク質（配列番号3）はまた、異なったC-末端を有し、ここで配列番号43の最後の9個のアミノ酸が5個の異なったアミノ酸により置換されている。それらの配列はN-及びC-末端の両者で異なるけれども、それらは実質的に同一の流れを発現する。N-末端延長され、そして切断されたSK3はその同じ、流れを発現するので、それ自体チャネル機能に必須ではないが、しかしましょもらしいN-末端延長は、細胞における特定の位置へのタンパク質の標的化に関与した。  
30

同様に、hSK3のための次の2種のcDNAが同定されている：N-末端延長されたhSK3（配列番号47をコードする配列番号48）及び切断されたhSK3（配列番号20をコードする配列番号22）。さらに、類似するN-末端延長がSK2に関して存在する。SK2及びSK3の両者に関するマウスからのゲノム配列は、両者が、機能的流れの発現が示されているアミノ酸配列と隣接する延長された読み取り枠を有することを示す。従って、実質的に同一のSKチャネルタンパク質、又は保存的に修飾されたその変異体はまた、機能的特徴に基づいても同定される。

本発明は、機能的SK及びIKチャネルタンパク質及びその副配列を提供する。本発明の機能的SKチャネルは、2～60pS、より通常には5～25pSの単位コンダクタンス、及びSKチャネ  
40

10

20

30

40

50

ルを製造するSKチャネルタンパク質の個々に関して、40～100Kd、より通常には50～80KDの分子量を有する。機能的IKチャネルは、20～80pS、及びしばしば30～60pSの単位コンダクタンスを有する。単位コンダクタンスは便利には、裏がえし（inside-out又はoutside-out）パッチクランプ形状を用いて決定され得る。それらの形状は、イオンチャネルの生物物理（運動学、導電率、選択性、透過及びブロックの機構）の研究のために特に示される。パッチクランプ方法は当業界において良く知られている。たとえば、Franciolini, Patch Clamp technique and biophysical study of membrane Channels, Experientia, 42 (6) : 589-594 (1986)；及びSakmannなど., Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes, Annual Review of Physiology, 46 : 455-472 (1984) を参照のこと。

本発明の範囲内の単離されたSK及びIKタンパク質は、十分な長さであり、そして通常系からの細胞において発現される場合、それぞれ、SKチャネル又はIKチャネルの徵候である機能性及び薬理学を定義するタンパク質を包含する。通常系は、その生来の状態において（たとえば、組換えSK又はIKチャネルを発現しない）、低いか又は興味ない電気活動を有する細胞系、たとえばCHO細胞系である。たとえば、対照細胞（本発明の推定上のSKチャネルの発現を有さない）及び実験細胞（推定上のSKチャネルを発現する）が、本明細書に開示される実施例に供給されるように、電気生理学的パラメーターの測定のための標準である条件下で維持される。個々の細胞が、カルシウムイオノフォアにより処理される。典型的なイオノフォアは、イオノマイシン（Sigma Chemical Co.）又はA23187（Sigma Chemical Co.）のような標準の化合物を包含するが、但しそれらだけには限定されない。細胞はしばしば、約1 μMの濃度でイオノフォアにより処理される。

続いて、細胞の電気生理学測定が、カリウム流の誘発（たとえば、ラジオトレーサーにより）、又は細胞のコンダクタンスの変化（たとえばパッチクランプにより）、又は電圧の変化（たとえば、螢光色素により）を検出するために取られる。存在するなら、イオンチャネルは、カルシウム誘発された変化により示され、続いての試験が、本発明のSKチャネルとしてチャネルを特徴づけるために使用される。好ましくは、少なくとも2種の特徴が決定され、より好ましくは少なくとも3又は4種の特徴が決定される。本発明のSKチャネルの特徴は、本明細書に十分に開示されている。

たとえば、本発明のSKチャネルを発現する細胞は、2～30pS、しばしば2～25pSのコンダクタンスを有することができ、しかし必ずしも必要ではないが、10pM～約100nMの範囲でアパミンによるブロックを示すことができ、約40～80KDのSKチャネルタンパク質を含んで成ることができ、本明細書に開示される典型的なSKチャネルタンパク質のコア領域との一列配列において、少なくとも60%、及びより好ましくは少なくとも70%，80%，90%又は95%の配列類似性を示すことができ、そして本明細書に開示される典型的なSK又はIKチャネル（たとえば、配列番号1～4, 19, 20, 32, 43及び47）に対して生ぜしめられた抗体と、免疫学的に反応する条件下で特異的に反応することができる。そのような標準の方法は、本発明のSKタンパク質の同定を助ける。IKチャネルを発現する細胞は、同じ機能的特徴を有するが、但しそれらはCTXによりブロックされるが、しかしIBX又はアパミンによつてはブロックされず、そして20～80pS、しばしば35～40pSの単位コンダクタンスを有する。

約50個以下の長さのアミノ酸のSK又はIKチャネルタンパク質の固相合成は、不溶性支持体への配列のC-末端アミノ酸の結合、配列における残るアミノ酸の続く連続的な付加により達成され得る。固相合成のための技法は、Burany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptides Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963)、及びStewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)により記載されている。より長い長さのSK又はIKチャネルタンパク質は、短いフラグメントのアミノ及びカルボキシ末端の縮合により合成され得る。カルボキシ末端の活性化によるペプチド結合の形成方法（たとえば、カップリング試薬N,N'-ジシクロヘキシリカルボジイミドの使用による）は

10

20

30

40

50

、当業者に知られている。

### カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸の獲得

本発明は、上記でより十分に論じられたように、カルシウム - 活性化されたSKチャネルタンパク質（“SKチャネルタンパク質核酸”）又はカルシウム - 活性化されたIKチャネルタンパク質（“IKチャネルタンパク質核酸”）をコードする、RNA, DNA又はそれらのキメラの単離された核酸を供給する。本発明の核酸は、たとえばmRNAのレベルでの欠損の検出において、遺伝子における突然変異（たとえば、置換、欠失又は付加）の検出において、薬物スクリーニングアッセイにおけるSK又はIKチャネルのアップレギュレーションのモニターのために、又は抗体の調製において免疫原として使用するためのSK又はIKチャネルタンパク質の組換え発現のために、プロープとして使用され得る。

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸は、標準の組換え又は合成技法を用いて製造され得る。本発明において供給されるSK又はIKチャネルタンパク質のアミノ酸配列により、当業者は、機能的に等しい核酸、たとえば同じタンパク質をコードする核酸を含む種々のクローンを容易に構成することができる。それらの目的を達成するためのクローニング方法、及び核酸の配列を確かめるための配列決定方法は、当業界において良く知られている。適切なクローニング及び配列決定技法の例、及び多くのクローニング実験を通して当業者を方向づけるのに十分な説明が、次の文献に見出される：Sambrook、など．，Molecular Cloning : A Laboratory Manual (2nd Ed. , Vol. 1-3 , Cold Spring Harbor Laboratory (1989) ) , Methods in Enzymology , Vol. 15 10  
2 : Guide to Molecular Cloning Techniques (Berger and Kimmel (eds. ) , San Diego ; Academic Press , Inc. (1987) ) 、又はCurrent Protocols in Molecular Biology , (Ausubel , など．(eds) , Greene Publishing and Wiley-Interscience , New York (19 20  
87) ) 。生物学的試薬及び実験装置の製造業者からの製品情報はまた、既知の生物学的方法において有用な情報も提供する。そのような製造業者は次の通りである：SIGMA Chemical Company (Saint Louis , MO) , R & D Systems (Minneapolis , MN) , Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway , NJ) , CLONTECH Laboratories , Inc. (Palo Alto , CA) , Chem Genes Corp. , Aldrich Chemical Company (Milwaukee , WI) , Glen Research , Inc. , GIBCO BRL Life Technologies , Inc. (Gaithersberg , MD) , Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG , Buchs , Switzerland) , Invitrogen , San Diego , CA 30  
、及びApplied Biosystems (Foster City , CA) 、並びに、当業者に知られている多くの他の広告源。

### 1. 核酸ハイブリダイゼーションによるSK及びIKチャネルタンパク質の単離

本発明の単離された核酸組成物は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、又は種々の組合せのハイブリッドのいづれにせよ、生物学的源から単離され、又はインビトロで合成される。デオキシヌクレオチドは、いづれかの適切な方法、たとえば適切な配列のクローニング及び制限方法、又は次の方法による直接的な化学合成により調製され得る：Narangなど．, Meth. Enzymol. 68 : 90-99 (1979) のホスホトリエステル方法；Brownなど．, Meth. Enzymol. 68 : 109-151 (1979) のホスホジエステル方法；Beaucageなど．, Tefra. Lett. , 22 : 1859-1862 (1981) のジエチルホスホラミジット方法；Needham-Van Devanterなど．(1984) Nucleic Acids Res. , 12 : 6159-6168に記載されるような自動合成機を用いての、Beaucage and Caruthers (1981) , Tetrabedron Letts. , 22 (20) : 1859-1862により記載される固相ホスホラミジットトリエステル方法；及びアメリカ特許第4,458,066号の固相支持方法。化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、相補的配列によるハイブリダイゼーションにより、又は鑄型として一本鎖を用いてのDNAポリメラーゼによる重合により二本鎖に転換され得る。当業者は、DNAの化学合成は約100個の塩基の配列に限定されるが、より長い配列が短い配列の連結により得られることを認識するであろう。

配列番号1のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGCCGGTCCCCGGGCG GCCTGC (配列番号5) 及びTCACCCGCAGTCCGAGGGGGCCAC (配列番号6) を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号2のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCAGCTGCAGGTACAACGGG (配

10

20

30

40

50

列番号7)及びCTAGCTACTCTCAGATGAAGTTGG(配列番号8)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号43のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCTCCTGCAAATACAGCGGT(配列番号9)及びTTAGCAACTGCTTGAACCTTG(配列番号10)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号4のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：TCAGGGAAGCCCCGACCGTCAGT(配列番号11)及びTCACCCACAGTCTGATGCCGTGGT(配列番号12)を有する単離された核酸プライマーを用いてのラット脳cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号19のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCAGCTGCAGGTACAACG(配列番号23)及びCTAGCTACTCTGATGAAGTTG(配列番号24)を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号20(hSK3)のSKチャネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGAGCTCCTGCAAGTATAGC(配列番号25)及びTTAGCAACTGCTTGAACTTGTG(配列番号26)を有する単離された核酸プライマーを用いてのヒト海馬cDNAライブラリーの増幅により得られる。配列番号32のIKチャネルタンパク質をコードする核酸は、配列：(配列番号38及び39)及び(配列番号40及び41)を有する単離された核酸プライマー対を用いてのヒト臍cDNAライブラリーの増幅により得られる。

本発明の単離された核酸は、クローニングされ、又はインビトロ方法、たとえばポリメラーゼ鎖反応(PCR)、リガーゼ鎖反応(LCR)、転写に基づく増幅システム(TAS)、自己維持された配列複製システム(SSR)により増幅され得る。広範囲の種類のクローニング及びインビトロ増幅方法は、当業者に良く知られている。多くのクローニング試験を通して当業者を方向づけるのに十分なそれらの技法及び説明の例は、次のものに見出される：Berger and Kimmel. Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookなど. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook et al.); Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelなど., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Cashionなど., アメリカ特許第5,017,478号；及びCarr. ヨーロッパ特許第0,246,864号。

インビトロ増幅方法を通して当業者を方向づけるのに十分な技法の例は、次のものに見出される：Berger, Sambrook, and Ausubel, as well as Mullisなど., (1987) アメリカ特許第4,683,202号、PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innisなど. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Amheim & Levinson (October 1, 1990) C & EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwohなど. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelliなど. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomeliなど. (1998) J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegrenなど., (1988) Science. 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology, 8: 291-294; Wu and Wallace, (1989) Gene, 4: 560; 及びBarringerなど. (1990) Gene, 89: 117。

SKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20及びそれらの副配列から成る群から選択されたSKチャネルタンパク質をコードする核酸配列を含んで成る。好ましい態様においては、SKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22及びそれらの副配列から成る群から選択される。

IKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、IKチャネルタンパク質をコードする核酸配列、たとえば配列番号32及びその副配列を含んで成る。好ましい態様において、IKチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、配列番号31及びその副配列である。

本明細書において同定される単離された核酸の他に、本発明はまた、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43、及び47及びそれらの副配列から成る群から選択されたタンパク質

10

20

30

40

50

をコードする核酸に対して、緊縮条件下で選択的にハイブリダイズする、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする他の単離された核酸も包含する。一般的に、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、コア領域をコードする配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44又は48又はその副配列からの核酸配列に対して、少なくとも中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするであろう。他方では、又はさらに、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする単離された核酸は、コア領域の長さに対して少なくとも60%, 70%, 80%又は90%の類似性のアミノ酸配列をコードするであろう。便利には、コア領域の副配列をコードする核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 32, 44又は48から得られ、そして15~400個の長さのヌクレオチド、及び一般的には少なくとも250又は300個の長さのヌクレオチドの少なくともいづれか1つであり；好ましくは核酸は完全なコア配列をコードするであろう。カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸配列又はその副配列は、少なくともN'個の長さのヌクレオチドを含んで成り、ここでN'は18~2000から成る群から選択された整数のいづれか1つである。従って、本発明の核酸は、ゲノムDNA、及びSK及びIKチャネルタンパク質をコードする核転写体を含んで成る。  
10

SK又はIKチャネルタンパク質をコードする核酸が核酸プローブとして使用される予定である場合、検出できるラベルにより核酸をラベルすることがしばしば所望される。ラベルは、当業者に良く知られている多くの手段により組込まれ得る。しかしながら、好ましい態様においては、ラベルは、核酸の調製における增幅段階の間、同時に組込まれる。従って、たとえば、ラベルされたプライマー又はラベルされたヌクレオチドによるポリメラーゼ鎖反応（PCR）は、ラベルされた増幅生成物を提供するであろう。もう1つの好ましい態様においては、ラベルされたヌクレオチド（たとえばフルオレセイン - ラベルされたUTP及び/又はCTP）を用いての転写増幅は、転写された核酸中にラベルを組込む。  
20

他方では、ラベルは、元の核酸サンプル（たとえば、mRNA、ポリA mRNA, cDNA、等）に対して、又は増幅が完結された後、増幅生成物に対して直接的に付加され得る。核酸にラベルを結合する手段は、当業者に良く知られており、そしてたとえば核酸のリン酸化、及びサンプル核酸をラベル（たとえば蛍光団）に連結する核酸リンカーの続く結合（連結）によるニックトランスレーション又は末端 - ラベリング（たとえば、ラベルされたRNAによる）を包含する。  
30

本発明への使用のための適切な検出できるラベルは、分光、放射性同体、光化学、生化学、免疫化学、電気、光学又は化学的手段により検出できるいづれかの組成物を包含する。本発明における有用なラベルは、ラベルされたストレプタビジン接合体により染色するためのビオチン、磁気ビーズ、螢光色素（たとえば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン螢光タンパク質、及び同様のもの）、放射性ラベル（たとえば、<sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C、又は<sup>32</sup>P）、酵素（たとえば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びELISAに通常使用される他のもの）、及び比色ラベル、たとえばコロイド状金又は着色されたガラス又はプラスチック（たとえば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、等）ビーズを包含する。そのようなラベルの使用を教授する特許は、アメリカ特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号及び第4,366,241号を包含する。  
40

そのようなラベルを検出するための手段は、当業者に良く知られている。従って、たとえば、放射性ラベルは、写真フィルム又はシンチレーションカウンターを用いて検出され得、螢光マーカーは放された光を検出するために光検出器を用いて検出され得る。酵素ラベルは典型的には、酵素に基質を供給し、そして基質に対する酵素の作用により生成される反応生成物を検出することによって検出され、そして比色ラベルは着色されたラベルを単純に可視化することによって検出される。

プローブは、特定の組織（たとえば、心臓、脳、肺）を包含する興味あるいづれかの源、及び動物源、たとえばラット、ヒト、鳥、等からゲノム又はcDNAライブラリーをスクリーンするために使用される。スクリーニング技法は、当業界において知られており、そし  
50

て上記で引用された一般的テキスト、たとえばSambrook and Ausubelに記載されている。

## 2. イムノスクリーニングによるSK及びIKチャネルタンパク質の単離

本明細書において請求されるタンパク質の新規形を同定するために核酸プローブを用いる他に、発現ライブラリーをプローブするために抗体を使用することが可能である。これは、良く知られている技法である (Young and Davis, 1982 Efficient isolation of genes using antibody probes Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 1194-1198を参照のこと)。一般的に、cDNA発現ライブラリーは、市販のキットから、又は容易に入手できる成分を用いて調製され得る。ファージベクターは好ましいが、しかし種々の他のベクターがタンパク質の発現のために利用できる。そのようなベクターは、酵母、動物細胞及びキセノバス卵母細胞を包含するが、但しそれらだけには限定されない。標的タンパク質により富化された源からmRNAを選択し、そして次にベクター中に連結され、そしてイムノスクリーニングのためにライブラリー宿主細胞を形質転換するcDNAを創造する。スクリーニングは、細胞上の特定のタンパク質に結合され、又は固体支持体、たとえばニトロセルロース又はナイロン膜上に固定される抗体の結合及び可視化を包含する。陽性クローンが、均質に精製するために選択され、そして単離されたcDNAが所望する宿主細胞における発現のために調製される。この技法の一般的な参考は、Methods of Cell Biology Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Ed., DJ Asai pp. 369-382, 1993に見出され得る。10

カルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質を得るために選択する場合、完全なタンパク質又はその一部を選択するための抗体が使用され得る。適切なペプチドは、GHRRALFEKR KRLSDY (配列番号28)、FTDASSRSIGAL (配列番号29)、ARKLELTKAEKHVHNFMMMDTQLTKR (配列番号30) 又はARKLELTKAEKHVHNFMMMDTQLTK (配列番号42) を包含するが、但し、それらだけには限定されない。20

## 核酸アッセイ

本発明はまた、遺伝子転写物（たとえば核RNA, mRNA）についてアッセイすることによってSK又はIKチャネルタンパク質発現を検出し、そして / 又は定量化するための方法も提供する。このアッセイは、正常な遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在について、異常遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在について、又は正常又は異常SK又はIKチャネルタンパク質遺伝子生成物の転写レベルの定量化のために存在することができる。

好ましい態様において、核酸アッセイは、試験されるべき生物から単離された核酸のサンプルにより実施される。最も単純な態様においては、そのような核酸サンプルは、生物学的サンプルから単離された全mRNAである。核酸（たとえば、ゲノムDNA又はmRNAのいづれか）は、当業者に良く知られている多くの方法のいづれかに従って、サンプルから単離される。30

中でも核酸アッセイに使用するための全DNA又はmRNAを単離するための方法は、当業者に良く知られている。たとえば、核酸の単離及び精製方法は、Chapter 3 of Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part 1, Theory and Nucleic Acid Preparation, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993) に詳細に記載される。当業者は、SK又はIKチャネルタンパク質をコードする遺伝子のコピー数の変更が検出される場合、ゲノムDNAが好ましくは、単離されることを認識するであろう。逆に言えば、遺伝子又は複数遺伝子の発現レベルが検出される場合、好ましくは、RNA (mRNA) が単離される。40

時おり、ハイブリダイゼーションの前、核酸サンプルを増幅することが所望される。当業者は、どんな増幅方法が使用されても、定量結果が所望される場合、増幅された核酸の相対的頻度を維持し又は調節する方法を使用することに注意が払わられるべきであることを認識するであろう。“定量”増幅の方法は当業者に良く知られている。たとえば、定量PCRは、同じプライマーを用いて、既知量の対照配列を同時に同時増幅することを包含する。これは、PCR反応を検量するために使用され得る内部標準を提供する。次に、高密度アレイは、増幅された核酸の定量化のために内部標準に対して特異的なプローブを包含する。定量PCRのための詳細なプロトコールは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innisなど., Academic Press, Inc. N.Y. (1990) に供給されている。50

SKチャネルタンパク質をコードする核酸配列の存在を検出するための方法は一般的に：(a) 配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 43及び47から成る群から選択されたSKチャネルタンパク質をコードする核酸配列に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと生物学的サンプルとを、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；(b) ハイブリダイゼーション複合体を形成するために、SKチャネルタンパク質をコードする核酸への前記プローブの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることを含んで成り、ここで前記ハイブリダイゼーション複合体の検出がサンプルにおけるSK核酸配列の存在の徴候である。IKチャネルタンパク質の検出は、配列番号32のIKチャネルタンパク質をコードする核酸配列に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを用いて類似する態様で達成される。

プローブの核酸セグメントは、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 44及び48、並びにそれらの相補的配列から成る群から選択されたSKチャネルをコードする核酸からの少なくともN'の長さの隣接するヌクレオチドの副配列である。前記N'は、15～1500の個々の整数から成る群から選択された整数のいづれか1つである。IKチャネルタンパク質の存在を検出するためには、核酸セグメントは、配列番号31のIKチャネルをコードする核酸からの少なくともN'の長さの隣接するヌクレオチドの副配列である。参照核酸からの“隣接するヌクレオチド”とは、参照核酸におけるのと同じ順序を有し、且つ同じヌクレオチドに直接的に隣接する（すなわち、付加又は欠失を伴わない）ヌクレオチドの配列を意味する。典型的には、核酸セグメントは、少なくとも18個の長さのヌクレオチドである。核酸プローブの好み長い長さは、24～200個の長さのヌクレオチドである。

特に好み長い態様においては、核酸セグメントは、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質からのコア領域をコードする核酸に由来する。便利には、コア領域をコードする核酸は、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44, 48及びそれらの相補的配列から成る群から選択された核酸の副配列である。通常、及び特に、交差-種ハイブリダイゼーションに関しては、核酸セグメントは、コア領域内からのアミノ酸配列をコードし、そして少なくとも250個の長さのヌクレオチドであり、最も好みしくは、コア領域のすべてをコードし、そして/又は中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下で標的配列に対してハイブリダイズするであろう。

当業者は、プローブの核酸配列が、標的物へのその核酸セグメントの選択的ハイブリダイゼーションを妨害しないように選択されるであろうことを認識するであろう。従って、たとえば、核酸セグメントに結合されるいづれかの追加のヌクレオチドは一般的に、緊縮条件下で、核酸標的物（可能性ある誤った陰性）にも、SK又はIKチャネルタンパク質又はペプチドをコードしない核酸（可能性ある誤った陽性）にも、選択的にハイブリダイズしないように選択されるであろう。選択性及び特異性を確かめるために負及び正の対照の使用は、当業者に知られている。一般的に、プローブの長さは、所望する結果を達成するためには必要な最少の長さに維持されるべきである。SK又はIKチャネルタンパク質又はペプチドをコードする核酸（すなわち、それぞれ“SKチャネルタンパク質核酸”又は“IKチャネルタンパク質核酸”）の長さは、前記で十分に論ぜられたが、しかし好みしくは、少なくとも30個の長さのヌクレオチドである。

種々の核酸ハイブリダイゼーション形式が当業者に知られている。たとえば、通常の形式は、サンドイッチアッセイ及び競争又は置換アッセイを包含する。ハイブリダイゼーション技法は一般的に、Bergen and Kimmel, (1987)、前記；“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach” (Hames, B. D. and Higgins, S. J. (eds.), IRL Press, 1985; Gall and Pardue, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 63: 378-383 (1969))；及びJohn, Burnstein and Jones (Nature, 223: 582-587 (1969))に記載されている。

サンドイッチアッセイは、核酸配列を検出し、又は単離するために商業的に有用なハイブリダイゼーションアッセイである。そのようなアッセイは、固体支持体に共有固定される“捕獲”核酸、及び溶液における、ラベルされた“シグナル”核酸を用いる。生物学的サンプルは、標的核酸を供給するであろう。“捕獲”核酸プローブ及び“シグナル”核酸プローブは、標的核酸とハイブリダイズし、“サンドイッチ”ハイブリダイゼーション複合

体を形成する。効果的であるためには、シグナル核酸は、捕獲核酸とハイブリダイズすることができない。

現場ハイブリダイゼーションにおいては、標的核酸は、続く解釈及び分析のために細胞形態を保持しながら、細胞内でのハイブリダイゼーションのために利用できるように、その細胞周囲から遊離される。次の文献が、現場ハイブリダイゼーションの技術の概観を提供する：Singerなど．，Biotechniques 4(3) : 230-250 (1986) ; Haaseなど．，Methods in Virology , Vol . VII , pp . 189-226 (1984) ; Wilkinson , "The theory and practice of in situ hybridization" In : In situ Hybridization , Ed . D . G . Wilkinson , IRL Press , Oxford University Press , Oxford ; 及びNucleic Acid Hybridization : A Practical Approach , Ed . Hames , B . D . and Higgins , S . J . , IRL . Press (1987)。

典型的には、ラベルされたシグナル核酸は、ハイブリダイゼーションを検出するために使用される。相補的核酸又はシグナル核酸は、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドの存在を検出するために典型的に使用されるいくらかの方法のいづれか1つによりラベルされ得る。最とも通常の検出方法は、<sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C又は<sup>32</sup>P - ラベルされたプローブ又は同様のものによるオートラジオグラフィーの使用である。他のラベルは、ラベルされた抗体に結合するリガンド、螢光団、化学発光剤、酵素、及びラベルされたリガンドのための特異的結合対メンバーとして作用することができる抗体を包含する。

ラベルはまた、ハイブリダイゼーション複合体の間接的検出も可能にする。たとえば、ラベルがハプテン又は抗原である場合、サンプルは抗体を用いることによって検出され得る。それらのシステムにおいては、シグナルは、抗体に螢光又は酵素分子を結合することによって、又は多くの場合、放射性ラベルへの結合により生成される。(Tijssen , "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays , " Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology " (Burdon , van Knippenberg (eds . ) , Elsevier , PP . 9-20 (1985) ) )。

本発明の核酸に使用される検出可能ラベルは、前記で論ぜられたように、当業者に知られている多くの手段のいづれかにより組込まれ得る。そのようなラベルを検出する手段は、当業者に良く知られている。

ハイブリダイゼーションアッセイの感度は、検出される標的核酸を増幅する核酸増幅システムの使用により増強され得る。そのようなシステムの例は、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) システム及びリガーゼ鎖反応 (LCR) システムを包含する。当業者において知られている他の方法は、核酸配列に基づく増幅 (NASBA , Cangene , Mississauga , Ontario) 及びQ - Beta Replicaseシステムである。

当業者は、異常な発現レベル又は異常な発現生成物（たとえば、突然変異誘発された転写体、切断された又はナンセンスタンパク質）が、正常な発現レベル及び正常な発現生成物への比較により同定されることを認識するであろう。正常な発現レベル又は正常な発現生成物は、当業者に知られている標準方法に従って、いづれか特定集団、副集団、又は生物グループに関して決定され得る。典型的には、これは、健康な生物（すなわち、コンダクタンス及びカルシウム感受性のような性質により示されるような機能的SK又はIKチャネルタンパク質を有する生物）を同定し、そしてSK又はIKチャネルタンパク質遺伝子（本明細書に記載されるような）の発現レベルを測定し、又は典型的な（正常な）配列変動を得るために、遺伝子、mRNA又は逆転写されたcDNAを配列決定することを包含する。分子遺伝学に使用される標準の統計学的方法の適用は、発現の基線レベル、及び正常な遺伝子生成物、並びにそのような基線レベルからの有意な偏差の決定を可能にする。

#### 核酸アッセイキット

本発明の核酸は、本発明のSK又はIKチャネルをコードする正常な遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在を、SK又はIKチャネルをコードする異常な遺伝子又は遺伝子生成物の存在又は不在について、又は正常又は異常なSK又はIKチャネルタンパク質遺伝子生成物の転写レベルの定量化を、生物学的サンプルにおいて決定するために使用され得るキットに含まれ得る。キットは典型的には、本発明のアッセイを実施するための核酸プローブの安定した調製物を含む。さらに、キットはまた、標的のカルシウム - 活性化されたカリウムチャ

10

20

30

40

50

ネルタンパク質又はカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質核酸へのプローブのハイブリダイゼーションのための、乾燥形又は液体形のいづれかでのハイブリダイゼーション溶液、所望しない及びハイブリダイズされなかった核酸の洗浄及び除去のための溶液、ハイブリダイゼーションを検出するための基質、及び / 又はアッセイを実施し、そして解釈するための説明書を包含することができる。

#### 核酸の発現

本発明のSK又はIKチャネルタンパク質をコードする核酸が単離され、そしてクローン化されると、組換え的に構築された細胞、たとえば細菌、酵母、昆虫（特に、バキュロウィルスベクターを用いる）、及び哺乳類細胞において所望するタンパク質を発現することができる。“組換えタンパク質”は、タンパク質を発現することができるDNAの内因性コピーを、それらの生来の形で有さない細胞を用いて生成されたタンパク質である。細胞は、それらが適切な単離された核酸配列（たとえば、SK又はIKチャネルタンパク質核酸を含んで成るベクター）の導入により遺伝的に変更されているので、組換えタンパク質を生成する。

当業者は、SK又はIKチャネルタンパク質をコードするDNAの発現のために利用できる多くの発現システムに知識があることが予測される。原核生物又は真核生物におけるタンパク質の発現について知られている種々の方法を詳細に記載する試みは行なわれないのであろう。

簡単に要約すると、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする天然又は合成核酸の発現は典型的には、プロモーター（構成的又は誘発性のいづれかである）にDNA又はcDNAを操作可能的に連結し、続いて発現ベクター中に組込むことによって達成されるであろう。ベクターは、原核生物又は真核生物のいづれかにおける複製及び組込みのために適切である。典型的な発現ベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、及びSK又はIKチャネルタンパク質をコードするDNAの発現の調節のために有用なプロモーターを含む。クローン化された遺伝子の高いレベルの発現を得るために、転写を方向づけるための強いプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位、及び転写 / 翻訳ターミネーターを少なくとも含む発現ベクターを構成することが所望される。当業者は、修飾がその生物学的活性を低めないで、SK又はIKチャネルタンパク質に対して行なわれ得ることを認識するであろう。いくつかの修飾が、クローニング、発現、又は融合タンパク質中への標的分子の組込みを促進するために実施され得る。そのような修飾は、当業者に良く知られており、そしてたとえば、開始部位を供給するためにアミノ末端で付加されるメチオニン、又は便利に配置された制限部位、又は終結コドン、又は精製配列を創造するためにいづれかの末端上に配置される追加のアミノ酸（たとえばポリHis）を含む。

#### 1. 原核生物における発現

E. コリにおいてこの目的のために適切な調節領域の例は、Yanofsky, Bacteriol. 158 : 1018-1024 (1984) により記載されるような E. コリトリプトファン生合成路のプロモーター及びオペレーター領域、及びHerskowitz and Hagen, Ann. Rev. Genet. , 14 : 399-445 (1980) により記載されるようなファージ の左方向プロモーター ( $P_L$ ) である。E. コリにおいてトランスフェクトされたDNAベクターにおける選択マーカーの包含はまた有用である。そのようなマーカーの例は、アンピシリン、テトラサイクリン又はクロラムフェニコールに対する耐性を特定する遺伝子を包含する。E. コリにおいて使用するための選択マーカーに関する詳細については、Sambrook、など。を参照のこと。

ベクターは、適切な宿主細胞中への導入を可能にするよう選択される。細菌ベクターは典型的には、プラスミド又はファージ起源のものである。適切な細菌細胞は、ファージベクター粒子により感染され、又は裸のファージベクターDNAによりトランスフェクトされる。プラスミドベクターが使用される場合、細菌細胞はプラスミドベクターDNAによりトランスフェクトされる。SKチャネルタンパク質を発現するための発現システムは、E. コリ、バシラスsp. (Bacillus sp.) 及びサルモネラ (Salmonella) を用いて入手できる (P alva、など。, Gene 22 : 229-235 (1983) ; Mosbach、など。, Nature 302 : 543-545 (19

10

20

30

40

50

83) )。

S . チピムリウム ( *S . typhimurium* ) においてSK又はIKチャネルタンパク質を発現する場合、プラスミドベクターの固有の不安定性を気づくべきである。これを回避するためには、外来性遺伝子が、宿主染色体の非必須領域中に組込まれ得る。これは、まず、遺伝子をプラスミド中に、それがサルモネラ染色体において挿入部位に対して相同のDNAの領域を端に有するように、挿入することによって達成される。S . チピムリウム中へのプラスミドの導入の後、外来性遺伝子は、フランкиング配列と染色体DNAとの間での相同組換えにより染色体中に組込まれる。

これがいかにして達成され得るかの例は、サルモネラのhisオペロンに基づかれている。  
2つの段階がこの工程に包含される。第1においては、hisオペロンのセグメントがキャリヤーとして選択されるサルモネラ株において欠失されるべきである。第2においては、SK又はIKチャネルタンパク質をコードする遺伝子の下流に欠失されたhis領域を担持するプラスミドを用いて、hisサルモネラ株がトランスフェクトされる。his配列及びSK又はIKチャネルタンパク質をコードする遺伝子の両者の組込みが生じ、his<sup>+</sup>として選択され得る組換え株をもたらす。

発現されたタンパク質の検出は、当業界において知られている方法により達成され、そしてたとえば、ラジオイムノアッセイ、ウェスターントロット技法又は免疫沈殿法を包含する。E . コリからの精製は、アメリカ特許第4,511,503号に記載される方法に従って達成され得る。

## 2 . 真核生物における発現

種々の真核発現システム、たとえば酵母、昆虫細胞系、鳥、魚、カエル、及び哺乳類細胞が当業者に知られている。下記に手短に説明されるように、本発明のSK又はIKチャネルタンパク質は、それらの真核システムにおいて発現され得る。真核生物におけるSK又はIKチャネルの発現は特に好ましい。

酵母における異種タンパク質の合成は良く知られている。Methods in Yeast Genetics , Sherman , F . , など . , Cold Spring Harbor Laboratory , ( 1982 ) は、酵母においてタンパク質を生成するために利用できる種々の方法を記載する十分に認識された研究である。適切なベクターは通常、発現制御配列、たとえばプロモーター、たとえば3' - ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素、及び複製の起点、終結配列、及び同様のものを有する。たとえば、適切なベクターは、文献に記載されている ( Botstein , など . , 1979 , Gene , 8 : 17-24 ; Broach , など . , 1979 , Gene , 8 : 121-133 ) 。

2種の方法が、酵母細胞のトランスフェクションに使用される。第1の場合、酵母細胞がまず、チモリアーゼ、リチカーゼ、又はグルスラーゼを用いてプロトプラスト中に転換され、続いて、DNA及びポリエチレングリコール ( PEG ) が添加される。次に、PEG - 処理されたプロトプラストは、選択条件下で、3 % 寒天培地において再生される。この方法の詳細は、J . D . Beggs , 1978 , Nature ( London ) , 275 : 104-109 ; 及びHinnen , A . , など . , 1978 , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 75 : 1929-1933による文献に与えられている。第2の方法は、細胞壁の除去を包含しない。代わりに、細胞は、塩化リチウム、又はアセテート及びPEGにより処理され、そして選択プレート上に置かれる ( Ito , H . , など . , 1983 , J . Bact . , 153 : 163-168 ) 。

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、発現されると、細胞を溶解し、そしてその溶解物に標準のタンパク質単離技法を適用することによって、酵母から単離され得る。精製工程のモニターリングは、ウェスターントロット技法、又は他の標準イムノアッセイ技法のラジオイムノアッセイを用いて達成され得る。

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする配列はまた、たとえば哺乳類、昆虫、鳥、両性類又は魚起源の細胞培養物をトランスフェクトすることに使用するために種々の発現ベクターに連結され得る。ペプチドの生成のために有用な細胞培養物の実例は、哺乳類細胞である。哺乳類細胞システムはしばしば、細胞の单層の形で存在するが、但し、哺乳類細胞懸濁液もまた用いられ得る。損なわれていないタンパク質を発現できる多くの適切な宿主細胞系は、当業界において開発されており、そしてHEK293 , BH

10

20

30

40

50

K21、及びCHO細胞系、並びに種々のヒト細胞、たとえばCOS細胞系、HeLa細胞、骨髓細胞系、Jurkat細胞を包含する。いくつかの態様においては、キセノパス卵母細胞が使用される。当業者は、SK又はIKチャネルを発現するための好ましい細胞系は、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルにより供給される細胞系（すなわち、“静止系”）と競争するコンダクタンスを実質的に欠いている。それらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、たとえば複製の起点、プロモーター（たとえば、CMVプロモーター、HSV tkプロモーター又はpgk（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーター）、エンハンサー（Queenなど。, (1986) *Immunol. Rev.* 89 : 49）、及び必要なプロセッシング情報部位、たとえばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位（たとえばSV40大TAGポリA付加部位）、及び転写ターミネーター配列を含むことができる。SKチャネルタンパク質の生成のために有用な他の動物細胞は、たとえばAmerican Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (7th edition, 1992) から入手できる。  
10。

昆虫細胞においてSK又はIKチャネルタンパク質を発現するための適切なベクターは通常、SF9バキュロウィルスに由来する。適切な昆虫細胞系は、蚊幼虫、蚕、アワヨトウの幼虫、蛾及びショウジョウバエ細胞系、たとえばSchneider細胞系を包含する (Schneider, J. *Embryol. Exp. Morphol.* 27 : 353-365 (1987) を参照のこと)。

上記に示されるように、宿主細胞をトランスフェクトするために使用されるベクター、たとえばプラスミドは好ましくは、転写を開始するためのDNA配列、及びタンパク質の翻訳を制御するための配列を含む。それらの配列は、発現制御配列として言及される。  
20

酵母に関して、高等動物宿主細胞が使用される場合、既知の哺乳類遺伝子からのポリアデニル化又は転写ターミネーター配列が、ベクター中に組込まれるために必要である。ターミネーター配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列もまた含まれ得る。スプライシング配列の例は、SV40からのVP1イントロンである (Sprague, J. など。, 1983, *J. Virol.* 45 : 773-781)。

さらに、宿主細胞における複製を制御するための遺伝子配列が、ベクター、たとえばウシ乳頭腫ウィルス型 - ベクターに見出されるベクター中に組込まれ得る。Saveria - Campo, M. , 1985, "Bovine Papilloma virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector" in DNA Cloning Vol. II a Practical Approach Ed. D. M. Glover, IRL Press, Arlington, Virginia pp. 213-238を参照のこと。

宿主細胞は、コンピテントであり、又は種々の手段により、トランスフェクションのためにコンピテントにされる。動物細胞中にDNAを導入するためのいくつかの良く知られている方法が存在する。それらは次のものを包含する：リン酸カルシウム沈殿、DNAを含む細菌性プロトプラストと受容体細胞との融合、DNAを含むリボソームによる受容体細胞の処理、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション及び細胞中へのDNAの直接的なマイクロインジェクション。トランスフェクトされた細胞は、当業界において良く知られている手段により培養される。Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. , (1977) を参照のこと。発現されたタンパク質は、良く知られている機械的、化学的又は酵素的手段により回収される。  
40

#### 発現されたペプチドの精製

組換えDNA技法により生成される本発明のSK又はIKチャネルタンパク質は、当業者に良く知られている標準の技法により精製され得る。組換えて生成されたSK又はIKチャネルタンパク質は、直接的に発現され、又は融合タンパク質として発現され得る。本発明の組換えカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、細胞溶解（たとえば、音波処理）及びアフィニティークロマトグラフィーの組合せにより精製される。融合生成物に関しては、適切なタンパク質分解酵素による融合タンパク質の続く消化は、所望する組換えカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質を開放する。

本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質（組換え又は合成）は、当業界において良く知られている標準技法、たとえば硫酸アンモニウムのような物質によ  
50

る選択沈殿、カラムクロマトグラフィー、免疫精製法、及び他の方法により実質的な純粋性に精製され得る。たとえば、R. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer - Verlag : New York (1982) ; Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press, 1990を参照のこと。たとえば、本発明のタンパク質は、本明細書に記載されるようなSK又はIKチャネルタンパク質に対して生ぜしめられた抗体を用いてイムノアフィニティーカラムにより精製され得る。

#### カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の対する抗体

抗体は、本発明のSK又はIKチャネルタンパク質、たとえば個々の対立遺伝子、株、又は種変異体、及びそれらのフラグメントに対して、それらの天然に存在する（十分な長さ）形で及び組換え形で生ぜしめられる。さらに、抗体は、それらの生来の形状又は非生来の形状で、それらのタンパク質に対して生ぜしめられる。抗 - イジオタイプ抗体がまた生成され得る。抗体を製造する多くの方法が当業者に知られている。次の議論が利用できる技法の一般的な概観として存在するが、しかしながら、当業者は、次の方法に基づく多くの変法が知られていることを認識するであろう。

#### A . 抗体生成

多くの免疫原が、SK又はIKチャネルタンパク質と特異的に反応する抗体を生成するために使用される。5個の長さ又はそれ以上の長さの、及び配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の副配列から選択された、単離された組換え、合成又は生来のSK又はIKチャネルタンパク質が、モノクローナル又はポリクローナル抗体の生成のための好ましい免疫原（抗原）である。当業者は、本発明のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質が典型的には、発現ライブラリーをスクリーニングするために、又は本発明の推定上のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質が非生来の二次、三次、又は四次構造で発現され又は変性される他のアッセイのために、抗体の形成の前に変性されることを容易に理解するであろう。免疫原として使用するための典型的なタンパク質は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：GHRRALFEKRKRLSDY（配列番号28）、FTDASSRSIGAL（配列番号29）、ARKLELTKAEEKHVHNFMMMDTQLTKR（配列番号30）、及びARKLELTKAEKHVHNFMMMDTQLTK（配列番号42）。1つの種類の好ましい態様においては、免疫原性タンパク質接合体がまた、免疫原とに包含される。天然に存在するSK又はIKチャネルタンパク質はまた、純粋な形又は不純な形のいづれかで使用される。

次に、SK又はIKチャネルタンパク質が、抗体を生成できる動物中に注入される。モノクローナル又はポリクローナル抗体が、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の存在及び量を測定するためにイムノアッセイへの続く使用のために生成され得る。ポリクローナル抗体を生成するための方法は、当業者に知られている。手短には、免疫原（抗原）、好ましくは精製されたSK又はIKチャネルタンパク質、適切なキャリヤー（たとえば、GST、キーホールリンペットヘマノシアニン、等）に結合されたSK又はIKチャネルタンパク質、免疫化ベクター、たとえば組換えワクシニアウィルス中に組込まれたSK又はIKチャネルタンパク質（アメリカ特許第4,722,848号を参照のこと）が、アジュバントと共に混合され、そして動物がその混合物により免疫化される。免疫原調製物に対する動物の免疫応答が、試験採血を取り、そして興味あるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対する反応性の力価を決定することによってモニターされる。免疫原に対する適切に高い力価の抗体が得られる場合、血液が動物から採血されて、そして抗血清が調製される。SK又はIKチャネルタンパク質に対して反応性の抗体を富化するために抗血清のさらなる分別が、所望の場合、実施される（たとえば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY；及びHarlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NYを参照のこと）。

SK又はIKチャネルタンパク質の前もって決定されたフラグメントに対する抗体、たとえばその結合フラグメント及び一本鎖組換え型は、上記のようなキャリヤータンパク質と前記フラグメントとの接合体により動物を免疫化することによって生ぜしめられる。典型的には、興味ある免疫原は、少なくとも約5個のアミノ酸のSK又はIKチャネルタンパク質である。より典型的には、SK又はIKチャネルタンパク質は、10個の長さ、好ましくは15個の長

10

20

40

50

さのアミノ酸であり、そしてより好ましくは、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質は、20個又はそれ以上の長さのアミノ酸である。ペプチドは典型的には、キャリヤータンパク質（たとえば、融合タンパク質として）に結合され、又は免疫化ベクターに組換え的に発現される。抗体が結合するペプチドに基づく抗原決定基は、典型的には、3 ~ 10個の長さのアミノ酸である。

モノクローナル抗体は、所望する抗体を分泌する細胞から調製される。モノクローナル抗体は、免疫原が由来するSK又はIKチャネルタンパク質に対する結合についてスクリーンされる。特異的モノクローナル及びポリクローナル抗体は通常、少なくとも約0.1mM、より通常には少なくとも約50 μM、及び最とも好ましくは少なくとも約1 μM又はそれ以上のK<sub>D</sub>を伴って結合するであろう。

多くの場合、種々の哺乳類宿主、たとえばマウス、ゲッ歯動物、靈長類、ヒト、等からモノクローナル抗体を調製することが所望される。そのようなモノクローナル抗体を調製するための技法の記載は、たとえば次の文献に見出される：Stitesなど。（eds.）Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA、及びそこに引用される文献；Harlow and Lane、前記；Goding (1986) Monoclonal Antibodies : Principle and Practice (2d ed.) Academic Press, New York, NY；及びKohler and Milstein (1975) Nature 256 : 495-497。手短に要約すると、この方法は、SK又はIKチャネルタンパク質を含んで成る免疫原を動物に注射することによって進行する。次に、動物が殺され、そして細胞がその脾臓から取られ、ここで細胞は骨髄腫細胞により融合されている。その結果物は、インビトロで再生できるハイブリッド細胞又は“ハイブリドーマ”である。次に、ハイブリドーマの集団がスクリーンされ、個々のクローンが単離され、その個々のクローンが免疫原に対する単一の抗体種を分泌する。この態様においては、得られる個々の抗体種は、免疫原性物質上に認識される特異的部位に応答して生成される免疫動物からの不滅化され、そしてクローン化された単一のB細胞の生成物である。

不滅化の方法は、Epstein Barrウィルス、腫瘍遺伝子、又はレトロウィルスによるトランスフェクション、又は当業界において知られている他の方法を包含する。単一の不滅化された細胞から生じるコロニーが、抗原のための所望する特異性及び親和性の抗体の生成のためにスクリーンされ、そしてそのような細胞により生成されるモノクローナル抗体の収量は、種々の技法、たとえば脊椎動物（好ましくは哺乳類）宿主の腹膜腔中への注射により増強される。本発明のSK又はIKチャネルタンパク質及び抗体は、修飾なしに、又は修飾を伴って使用され、そしてキメラ抗体、たとえばヒト適合されたネズミ抗体を包含する。他の適切な技法は、ファージ又は類似するベクターにおける組換え抗体のライブラリーの選択を包含する（たとえば、Huseなど。（1989）Science 246 : 1275-1281；及びWardなど。（1989）Nature 341 : 544-546；及びVaughanなど。（1996）Nature Biotechnology 14 : 309-314を参照のこと）。他方では、高い結合活性のヒトモノクローナル抗体が、転位されていないヒトH鎖及びL鎖Ig遺伝子座のフラグメントを含んで成るトランスジェニックマウス（すなわち、ミニ遺伝子座トランスジェニックマウス）から得られる。Fishwildなど. , Nature Biotech. , 14 : 845-851 (1996)。

時おり、SK又はIKチャネルタンパク質及び抗体は、検出できるシグナルを提供する物質を、共有又は非共有結合することによってラベルされるであろう。広範囲の種類のラベル及び接合技法が知られており、そして科学及び特許文献の両者に広く報告されている。適切なラベルは、放射性ヌクレオチド、酵素、基質、補因子、インヒビター、螢光成分、化学発光成分、磁気粒子、及び同様のものを包含する。そのようなラベルの使用を教授する特許は、アメリカ特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；及び第4,366,241号を包含する。また、組換え免疫グロブリンが生成され得る。Cabilly、アメリカ特許第4,816,567号；及びQueenなど. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86 : 10029-10033を参照のこと。

本発明の抗体はまた、SK又はIKチャネルタンパク質タンパク質を単離することにおいてアフィニティーコロマトグラフィーのためにも使用される。カラムは、たとえば固体支持体、たとえば粒子、たとえばアガロース、Sephadex又は同様のものに連結される抗体により

10

20

30

40

50

調製され、ここで細胞溶解物がカラムに通され、洗浄され、そして高まる濃度のマイルドな変性剤により処理され、それにより、精製されたSK又はIKチャネルタンパク質が放される。

抗体は、特定の発現生成物、たとえば正常又は異常ヒトSK又はIKチャネルタンパク質のための発現ライブラリーをスクリーンするために使用され得る。通常、そのような方法における抗体は、抗体結合により抗原の存在の容易な検出を可能にする成分によりラベルされる。

SK又はIKチャネルタンパク質に対して生ぜしめられる抗体はまた、抗 - イディオタイプの抗体を生ぜしめるためにも使用され得る。それらは、それぞれの抗原の存在に関連する種々の病理学的状態を検出し、又は診断するために有用である。

#### B . ヒト又はヒト適合された（キメラ性）抗体生成

本発明の抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗体はまた、治療目的のために哺乳類（たとえばヒト患者）に投与され得る（たとえば、エフェクター分子、たとえばラベル、細胞毒素、酵素、成長因子、薬物、等に接合され、又は融合される場合、標的化分子として）。抗体が生ぜしめられる種以外の生物に投与される抗体はしばしば、免疫原性である。従って、たとえば、ヒトに投与されるネズミ抗体はしばしば、複数回の投与に基づいて、抗体に対する免疫応答（たとえば、ヒト抗 - マウス抗体（HAMA）応答）を誘発する。抗体の免疫原性質は、抗体の一部又はすべてを、特徴的なヒト配列に変更することによって低められ、それにより、それぞれ、キメラ又はヒト抗体が生成される。

##### i ) ヒト適合された（キメラ性）抗体

ヒト適合された（キメラ性）抗体は、ヒト及び非ヒト部分を含んで成る免疫グロブリン分子である。より特定には、ヒト適合されたキメラ抗体の抗原組合せ領域（又は可変領域）は、非ヒト源（たとえばネズミ）に由来し、そしてキメラ抗体の不变領域（免疫グロブリンに生物学的エフェクター機能を付与する）は、ヒト源に由来する。ヒト適合されたキメラ抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性、及びヒト抗体分子により付与されるエフェクター機能を有すべきである。キメラ抗体を生成するための多くの数の方法が当業者に良く知られている（たとえば、アメリカ特許第5,502,167号；第5,500,362号；第5,491,088号；第5,482,856号；第5,472,693号；第5,354,847号；第5,292,867号；第5,231,026号；第5,204,244号；第5,202,238号；第5,169,939号；第5,081,235号；第5,075,431号及び第4,975,369号を参照のこと）。キメラ（ヒト適合された）抗体の調製のための詳細な方法は、アメリカ特許第5,482,856号に見出され得る。

##### ii ) ヒト抗体

もう1つの態様において、本発明は十分なヒト抗 - SKチャネルタンパク質抗体を供給する。ヒト抗体は、特徴的なヒトポリペプチド配列から完全に成る。本発明のヒト抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗体は、広範囲の種類の方法を用いて生成され得る（たとえば、Larrickなど、アメリカ特許第5,001,065号を参照のこと）。

好みの態様においては、本発明のヒト抗 - SKチャネルタンパク質抗体は通常、トリオーマ（trioma）細胞において始め生成される。次に、その抗体をコードする遺伝子が他の細胞、特に非ヒト哺乳類細胞においてクローニングされ、そして発現される。トリオーマ技法によりヒト抗体を生成するため的一般的なアプローチは、Ostbergなど（1983），Hybridoma 2 : 361-367，Ostberg、アメリカ特許第4,634,664号及びEngelmanなど、アメリカ特許第4,634,666号により記載されている。この方法により得られる抗体 - 産生細胞系は、それらが3種の細胞、すなわち2種のヒト細胞及び1種のマウス細胞から由来するので、トリオーマと呼ばれる。トリオーマは、ヒト細胞から製造される通常のハイブリドーマよりもより安定して抗体を生成することが見出された。

トリオーマ細胞系により分泌される免疫グロブリンのH及びL鎖をコードする遺伝子は、当業界において知られている、ポリメラーゼ鎖反応を包含する方法に従って、クローニングされる（たとえば、Sambrookなど、Molecular Cloning : A Laboratory Manual , 2nd ed . , Cold Spring Harbor , N.Y. , 1989 ; Berger & Kimmel , Methods in Enzymology , Vol. 152 : Guide to Molecular Cloning Techniques , Academic Press , Inc. , San Diego

10

20

30

40

50

, Calif. , 1987 ; Coなど . , ( 1992 ) J. Immunol. , 148 : 1149 を参照のこと)。たとえば、H及びL鎖をコードする遺伝子は、トリオーマのRNAの逆転写により生成されるトリオーマDNA又はcDNAからクローン化される。クローニングは、クローン化される遺伝子又は遺伝子のセグメントを端に有するか又はそれをオーバーラップする配列に対してハイブリダイズするPCRプライマーの使用を包含する従来の技法により達成される。

#### カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質イムノアッセイ

SK及びIKチャネルタンパク質についてのイムノアッセイは、少なくとも2種の異なった目的のために使用され得る。それらは、免疫学的に交差反応できることによりタンパク質の関連性を決定するために、又はチャネルタンパク質の存在又は不在の検出のために使用され得る。

未知のタンパク質が本発明のチャネルタンパク質に関連するかどうかを決定する場合、種々のアッセイが使用され得る。たとえば、交差 - 反応性について試験するために競争イムノアッセイが好ましい。たとえば、配列番号2又は32のタンパク質が固体支持体に固定され得る。タンパク質又はペプチドが、前記固定された抗原に対する抗血清の結合と競争するアッセイに添加される。固定されたタンパク質への抗血清の結合と競争する上記タンパク質の能力が、試験タンパク質に関連すると思われるタンパク質に比較される。

試験される抗血清が特定のタンパク質に対して特異的であるか又はそれに対して選択的に結合することを確かめるために、それが、他の密接に関連するタンパク質に対する交差反応性について試験されるであろう。これは、低、中間及び高いコンダクタンスのチャネル間を区別するであろう血清の生成を可能にする。上記タンパク質についての%交差反応性が、標準の計算を用いて計算され得る。上記に列挙される個々のタンパク質と10%以下の交差反応性を有する。それらの抗血清が選択され、そしてプールされる。交差反応する抗体は、任意には、上記列挙されたタンパク質による免疫吸着によりプールされた抗血清から除去される。

次に、免疫吸着され、そしてプールされた抗血清は、請求された又はプロトタイプの免疫原タンパク質に第2タンパク質を比較するために、上記競争結合イムノアッセイに使用される。この比較を行なうために、2種のタンパク質が、広範囲の濃度でそれぞれアッセイされ、そして固定されたタンパク質に対しての抗血清の結合の50%を阻害するために必要とされる個々のタンパク質の量が決定される。必要とされるタンパク質の量がプロトタイプタンパク質の量の2倍以下である場合、その第2タンパク質は、プロトタイプ免疫原に対して生成される抗体に特異的に結合すると言われる。抗体が短いペプチドに対して生成される場合、試験タンパク質は任意には、選択結合について十分に試験するために変性される。標的ペプチドが、大きなペプチドの一部であるので、抗体に容易に接近できない情況においては、類似するサイズのプロトタイプタンパク質に対する試験タンパク質の関連性を測定することが適切であり、たとえば抗血清がプロトタイプのモノマーのペプチドに対して生成されても、プロトタイプの十分な長さのモノマーに対する十分な長さのモノマーを試験することができる。これは、試験結果の読み取りを単純にし、そして競争イムノアッセイから生成されるデータの決定におけるコンホメーション問題及び分子量 / モル濃度の考慮を回避する。

本発明のSK又はIKチャネルタンパク質を検出するための手段は、本発明の決定的観点ではない。好ましい態様において、SK又はIKチャネルタンパク質は、多くの十分に認識される免疫学的結合アッセイのいづれかを用いて検出され、そして / 又は定量化される(たとえば、アメリカ特許第4,366,241号；第4,376,110号；第4,517,288号；及び第4,837,168号を参照のこと)。一般的なイムノアッセイの再考のためには、また、Methods in Cell Biology Volume 37 : Antibodies in Cell Biology , Asai , ed . Academic Press , Inc . New York ( 1993 ) ; Basic and Clinical Immunology 7th Edition , Sites & Terr , eds . ( 1991 ) を参照のこと。免疫学的結合アッセイ(又はイムノアッセイ)は典型的には、分析物(この場合、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質)を特異的に結合し、そしてしばしば固定するために“捕獲剤”を用いる。前記捕獲剤は、分析物を特異的に結合する成分である。好ましい態様においては、捕獲剤は、本発明のカルシウム - 活性化さ

10

20

30

40

50

れたカリウムチャネルタンパク質を特異的に結合する抗体である。前記抗体（抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗体）は、本明細書に記載されるように当業者に知られている多くの手段のいづれかにより生成され得る。

イムノアッセイはまたしばしば、捕獲剤及び分析物により形成される結合複合体に特異的に結合し、そしてそれをラベルするためのラベリング剤を利用する。そのラベリング剤は、それ自体、抗体／分析物複合体を含んで成る成分の1つであり得る。従って、ラベリング剤は、ラベルされたSK又はIKチャネルタンパク質又はラベルされた抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗体であり得る。他方では、ラベリング剤は、第三成分、たとえば抗体／SK又は抗体／IKチャネルタンパク質複合体に対して特異的に結合するもう1つの抗体であり得る。

好みしい態様においては、ラベリング剤は、ラベルを担持する第2のSK又はIKチャネルタンパク質抗体である。他方では、前記第2のSK又はIKチャネルタンパク質抗体は、ラベルを欠くことができるが、しかしそれは、第2抗体が由来する種の抗体に対して特異的なラベルされた第3抗体により結合され得る。前記第2抗体は、第3のラベルされた成分；たとえば酵素 - ラベルされたストレプタビシンが特異的に結合し得る検出可能成分、たとえばビオチンにより修飾され得る。

免疫グロブリン不变領域を特異的に結合できる他のタンパク質、たとえばプロテインA又はプロテインGはまた、ラベリング剤としても使用され得る。それらのタンパク質は、ストレプトコーカル (Streptococcal) 細菌の細胞壁の通常の構成成分である。それらは、種々の種からの免疫グロブリン不变領域と強い非免疫原性反応性を示す（一般的に、Kronval、など。 (1973) J. Immunol. , 111 : 1401-1406；及びAkerstrom、など。 (1985) J. Immunol. , 135 : 2589-2542を参照のこと）。

アッセイを通して、インキュベーション及び／又は洗浄段階は、試薬の個々の組合せの後に必要とされる。インキュベーション段階は、約5秒～数時間まで、好みしくは約5分～約24時間まで変化し得る。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイ形式、分析物、溶液の体積、濃度、及び同様のものに依存するであろう。通常、アッセイは周囲温度で実施されるが、但しそれらは、広範囲の温度、たとえば10～40にわたって実施され得る。

本発明のイムノアッセイの詳細は使用される特定の形式により変化し得るが、生物学的サンプルにおけるSK又はIKチャネルタンパク質を検出するための方法は一般的に、生物学的サンプルと、SK又はIKチャネルタンパク質に対して特異的に反応する抗体とを、免疫学的に反応する条件下で接触せしめる段階を含んで成る。抗体は、免疫学的に反応する条件下でSK又はIKチャネルタンパク質への結合を可能にし、そして結合された抗体の存在が直接的に又は間接的に検出される。

#### A. 非競争アッセイ形式

本発明のSK又はIKチャネルタンパク質を検出するためのイムノアッセイは、競争及び非競争形式を包含する。非競争イムノアッセイは、捕獲された分析物（この場合、SK又はIKチャネルタンパク質）の量が直接的に測定されるアッセイである。好みしい“サンドイッチ”アッセイにおいては、捕獲剤（抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗体）が、それらが固定される固体支持体に直接的に結合され得る。次に、それらの固定された抗体が、試験サンプルに存在するSK又はIKチャネルタンパク質を捕獲する。次に、このようにして固定されたSK又はIKチャネルタンパク質が、ラベリング剤、たとえばラベルを担持する第2のヒトSK又はIKチャネルタンパク質抗体により結合される。他方では、第2のSK又はIKチャネルタンパク質抗体は、ラベルを欠いているが、しかしそれは第2抗体が由来する種の抗体に対して特異的なラベルされた第3抗体により結合され得る。前記第2抗体は、第3のラベルされた成分、たとえば酵素 - ラベルされたストレプタビシンが特異的に結合する検出可能成分、たとえばビオチンにより修飾され得る。

#### B. 競争アッセイ形式

競争アッセイにおいては、サンプルに存在する分析物（SK又はIKチャネルタンパク質）の量は、サンプルに存在する分析物により捕獲剤（抗 - SK又は抗 - IKチャネルタンパク質抗

体)から置換される(又は競争される)添加された(外因性の)分析物(SK又はIKチャネルタンパク質)の量を測定することによって、間接的に測定される。1つの競争アッセイにおいては、この場合、既知量のSK又はIKチャネルタンパク質が、サンプルに添加され、そして次に、そのサンプルが、捕獲剤、この場合、SK又はIKチャネルタンパク質を特異的に結合する抗体と接触される。抗体に結合されるSK又はIKチャネルタンパク質の量が、サンプルに存在するSK又はIKチャネルタンパク質の濃度に反比例する。

特に好ましい態様においては、抗体は固体支持体上に固定される。抗体に結合されるSK又はIKチャネルタンパク質の量は、その対応するSK又はIKチャネルタンパク質/抗体複合体に存在するSK又はIKチャネルタンパク質の量を測定し、又は他方では、残る複合体化されていないSK又はIKチャネルタンパク質の量を測定することによって、決定され得る。SK又はIKチャネルタンパク質の量は、ラベルされたSK又はIKチャネルタンパク質分子を供給することによって検出され得る。10

ハプテン阻害アッセイは、もう1つの好ましい競争アッセイである。このアッセイにおいては、既知の分析物、この場合、SK又はIKチャネルタンパク質が、固体支持体上に固定される。それぞれ、既知量の抗-SK又は抗-IKチャネルタンパク質抗体がサンプルに添加され、そして次に、そのサンプルが固定されたSK又はIKチャネルタンパク質と接触せしめられる。この場合、固定されたSK又はIKチャネルタンパク質に結合される抗-SK又は抗-IKチャネルタンパク質抗体の量が、サンプルに存在するSK又はIKチャネルタンパク質の量に反比例する。再び、固定された抗体の量は、抗体の固定された画分、又は溶液に残る抗体の画分のいづれかを検出することによって検出され得る。検出は、抗体がラベルされる場合、直接的であり、又は上記のような抗体に特異的に結合するラベルされた成分の続く添加によりラベルされる場合、間接的であり得る。20

#### C. 他のアッセイ形式

特に好ましい態様においては、ウェスターントロット(イムノプロット)分析は、サンプルにおけるSK又はIKチャネルタンパク質の存在を検出し、そして定量化するために使用される。その技術は一般的に、分子量に基づいてゲル電気泳動によりサンプルタンパク質を単離し、適切な固体支持体(たとえば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター又は誘導体化されたナイロンフィルター)に前記調製されたタンパク質を移し、そして前記サンプルを、SKチャネルタンパク質を特異的に結合する抗体と共にインキュベートすることを含んで成る。抗-SK又は抗-IKチャネルタンパク質抗体は、それぞれ、固体支持体上のSK又はIKチャネルタンパク質に特異的に結合する。それらの抗体は間接的にラベルされ得、又は他方では、抗-SK又は抗-IKチャネルタンパク質に対して特異的に結合するラベルされた抗体(たとえば、ラベルされた羊抗マウス抗体)を用いて検出され得る。他のアッセイ形式は、特定分子(たとえば抗体)を結合し、そして封入された試薬又はマーカーを開放するよう企画されたリポソームを使用するリポソームイムノアッセイ(LIA)を包含する。次に、その開放された化学物質が標準の技法に従って検出される(Monroeなど。(1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41を参照のこと)。30

#### D. ラベル

アッセイに使用される特定のラベル又は検出できるグループは、それがアッセイに使用される抗体の特異的結合を有意に妨害しない限り、本発明の決定的観点ではない。検出できるグループは、検出できる物理的又は化学的性質を有するいづれかの材料であり得る。そのような検出できるラベルはイムノアッセイの分野においては十分に開発されており、そして一般的に、そのような方法において有用なほとんどのいづれかのラベルが本発明に適用され得る。従って、ラベルは、分光、光化学、生化学、免疫化学、放射性同位体、電気、光学又は化学的手段により検出できるいづれかの組成物である。本発明における有用なラベルは、前記で論ぜられたような核酸のラベリングに使用されるものを包含する。40

ラベルは、当業界において良く知られている方法に従って、アッセイの所望する成分に直接的に又は間接的に結合され得る。上記のように、広範囲の種類のラベルが使用され得、そしてラベルの選択は、必要とされる感度、化合物との接合の容易性、安定性の必要条件、利用できる装置及び捨棄規定に依存する。50

非放射性ラベルはしばしば、間接的手段により結合される。一般的に、リガンド分子（たとえばビオチン）は分子に共有結合される。次に、リガンドが、本来検出できるか、又はシグナルシステム、たとえば検出できる酵素、螢光化合物又は化学発光化合物に共有結合される抗-リガンド（たとえばストレプタビジン）分子に結合する。多くの数のリガンド及び抗-リガンドが使用され得る。リガンドが天然の抗-リガンド、たとえばビオチン、チロキシン及びコルチゾールを有する場合、それはラベルされた、天然に存在する抗-リガンドと接合して使用され得る。他方では、いづれかのハプテン性又は抗原性化合物が、抗体と組合して使用され得る。

分子はまた、たとえば酵素又は螢光団との接合により、シグナル生成化合物に直接的に接合され得る。ラベルとしての興味ある酵素は、主にヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ、又はオキシレダクターゼ、特にペルオキシダーゼであろう。螢光化合物は、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、等を包含する。化学発光化合物は、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタルアジンジオン、たとえばルミノールを包含する。使用され得る種々のラベリング又はシグナル生成システムの再考のためには、アメリカ特許第4,391,904号を参考のこと。

ラベルを検出する手段は、当業者に良く知られている。従って、たとえば、ラベルが放射性ラベルである場合、検出のための手段は、シンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィーとしての写真フィルムを包含する。ラベルが螢光ラベルである場合、それは、光の適切な波長を有する螢光色素を励起せしめ、そしてその得られる螢光を検出することによって検出され得る。螢光は、可視的に、写真フィルムにより、電子検出機、たとえば電荷結合の装置 (CCD<sub>S</sub>) 又は光増幅機、及び同様のものにより検出され得る。同様に、酵素ラベルは、酵素のために適切な基質を供給し、そしてその得られる反応生成物を検出することによって検出され得る。最終的に、単純な比色ラベルは、ラベルに関連する色彩を観察することによって、単純に検出され得る。従って、種々のディップスティックアッセイにおいては、接合された金がしばしばピンク色に見え、そして種々の接合されたビーズがビーズの色を現わす。

いくつかのアッセイ形式は、ラベルされた成分の使用を必要としない。たとえば、凝集アッセイは標的抗体の存在を検出するために使用され得る。この場合、抗原-被覆された粒子が、標的抗体を含んで成るサンプルにより凝集される。この形式においては、どの成分もラベルする必要はなく、そして標的抗体の存在は、単純な眼での調査により検出される。

#### イムノアッセイ検出キット

本発明はまた、発現されるSK又はIKチャネルタンパク質のレベルにおいて不完全な生物（たとえば患者）の診断のためのキットを提供する。キットは好ましくは、動物におけるSK又はIKチャネルタンパク質の量を検出するための1又は複数の試薬を含む。好ましい試薬は、正常なSK又はIKチャネルタンパク質又はその副配列に対して特異的に結合する抗体を包含する。抗体は自由であるか、又は固体支持体、たとえば試験管、マイクロウェルプレート、ディップスティック及び同様のもの上に固定され得る。キットはまた、SK又はIKチャネルタンパク質の検出のためのアッセイにおける抗体の使用を教授する説明材料を含むこともできる。キットは、ラベルの検出のための適切な試薬、正及び負の対照、洗浄溶液、希釈緩衝液及び同様のものを含むことができる。

#### K<sup>+</sup>流を高めるか又は低める化合物についてのアッセイ

細胞において発現される本発明の単離されたSK又はIKチャネル核酸は、それぞれ、SK又はIKチャネルを通しこのカリウムの流れ（すなわち、流入又は流出）を高めるか又は低める化合物を検出するために種々のアッセイに使用され得る。一般的に、カリウムイオン流を低める化合物は、少なくとも10%又は20%、より好ましくは少なくとも30%，40%又は50%、及び最も好ましくは少なくとも70%，80%，90%又は100%の低下を引き起こすであろう。カリウムイオン流を高める化合物は、SK又はIKチャネルの開口の可能性を高め、そしてカリウムイオンの通過を可能にすることによって、カリウムイオン流密度の検出でき

10

20

30

40

50

る上昇を引き起こすであろう。典型的には、その流れは、少なくとも20% , 50% , 100% 又は200%、しばしば少なくとも400% , 600% , 1,000% , 5,000%、又は10,000%上昇するであろう。高められた又は低められたカリウム流は、SK又はIKチャネルを発現する細胞の分極化（すなわち、電位）の変化を決定することによって評価され得る。細胞分極化の変化を決定するため特に好ましい手段は、電圧 - クランプ技法である。全細胞流は便利には、例3に示される条件を用いて決定される。他の既知のアッセイは、放射性ラベルされたルビジウム流アッセイ、及び電圧感受性色素を用いての蛍光アッセイを包含する。たとえば、Vestergaard - Bogindなど . , J. Membrane Biol. , 88 : 67-75 (1988) ; Danie Iなど . , J. Pharmacol. Meth. , 25 : 185-193 (1993) ; Holevinskyなど . , J. Membrane Biology , 137 : 59-70 (1994) を参照のこと。SKチャネルタンパク質を通してのカリウム流を阻害し又は高めることができる化合物についてのアッセイは、本発明のSK又はIKチャネルを有する細胞と接触して存在し、そしてそれを含んで成る槽溶液への前記化合物の適用により実施され得る。たとえば、Blatzなど . , Nature , 323 : 718-720 (1986) ; Park , J. Physiol. , 481 : 555-570 (1994) を参照のこと。一般的に、試験されるべき化合物は、1 pM ~ 100mMの範囲で存在する。チャネルの機能の変化は、電流又はイオン流で、又は電流及びイオン流の変化の結果により測定され得る。10

チャネルの機能に対する試験化合物の効果は、電流又はイオン流の変化により、又は電流及びイオン流の変化の結果により測定され得る。電流又はイオン流の変化は、カチオン、たとえばカリウム又はルビジウムイオンの流れの上昇又は低下により測定される。カチオンは種々の標準手段により測定され得る。それらは、イオンの濃度変化により直接的に、又は膜電位又はイオンの放射性ラベリングにより間接的に測定され得る。イオン流に対する試験化合物の結果は非常に多様であり得る。従って、いづれかの適切な生理学的变化は、本発明のチャネルに対する試験化合物の影響を評価するために使用され得る。チャネル機能の変化は、リガンド置換、たとえばCTX開放により測定され得る。機能結果が損なわれていない細胞又は動物を用いて決定される場合、種々の効果、たとえば伝達物質（たとえばドーパミン）開放、ホルモン（たとえばインシュリン）開放、既知の及び特徴づけられない遺伝子マーカーに対する転写変化（たとえばノザンプロット）、細胞体積変化（たとえば赤血球細胞における）、免疫応答（たとえば、T細胞活性化）細胞代謝、たとえば細胞成長の変化又はpH変化を測定することができる。20

好ましくは、アッセイのSKチャネルは、配列番号1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 43又は47又は保存的に修飾されたその変異体のチャネルタンパク質から選択されるであろう。アッセイのIKチャネルは、好ましくは配列番号32又は保存的に修飾されたその変異体に示されるような配列を有するであろう。他方では、アッセイのSKチャネルは、真核生物に由来し、そして配列番号1 ~ 4 , 19 , 20 , 43及び / 又は47のSKチャネルタンパク質のコア領域に対して配列類似性を有するアミノ酸副配列を含むであろう。IKは典型的には、真核生物に由来し、そして配列番号32のIKチャネルタンパク質のコア領域に対して配列類似性を有するアミノ酸副配列を含むであろう。一般的に、機能的なSK又はIKチャネルタンパク質は、少なくとも400 , 450 , 500又は550個の長さのアミノ酸であろう。配列番号1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 32 , 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域との配列類似性の % は、60 ~ 100の間の整数のいづれか1つであろう。一般的に、配列類似性は、少なくとも60%、典型的には少なくとも70%、一般的には少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも90%及びしばしば少なくとも95%であろう。従って、SKチャネル相同体は、中位のハイブリダイゼーション条件下で、配列番号13 , 14 , 15 , 16 , 21 , 22及びその相補的配列から成る群から選択された核酸のコア領域からの少なくとも300個の長さのヌクレオチドの核酸に対してハイブリダイズするであろう。IKチャネル相同体は、中位のハイブリダイゼーション条件下で、配列番号31の核酸のコア領域からの少なくとも300個の長さのヌクレオチドの核酸に対してハイブリダイズするであろう。30

配列番号13 ~ 16 , 21 , 22 , 44及び48の“コア領域”又は“コア配列”は、配列番号1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 43及び47とrSK 2（配列番号2）アミノ酸残基135 ~ 462との間の一列40

配列のコードされた領域に対応する。hIK1のコア領域は、アミノ酸残基25～351である。好ましい態様においては、SKチャネルは、コア領域内の20個の隣接するアミノ酸残基のいづれか1つ～300個の隣接するアミノ酸残基のいづれかの比較窓に対して、配列番号1，2，3，4，19，20，43又は47の配列からのコア配列に比較して、少なくとも90%の配列類似性を有するであろう。好ましい態様においては、IKチャネルは、コア領域内の20個の隣接するアミノ酸残基のいづれか1つ～300個の隣接するアミノ酸残基のいづれかの比較窓に対して、配列番号32のコア配列に比較して、少なくとも90%の配列類似性を有するであろう。

SKチャネル相同体は一般的に、実質的に類似するコンダクタンス特性（たとえば2～60pS）及びカルシウム感受性（30nM～10μM）を有するであろう。IKチャネル相同体は同様に、IKチャネルと類似するSKチャネルコンダクタンス特性（たとえば20～80pS）及びカルシウム感受性（30nM～10μM）を有するであろう。配列番号1，2，3，4，19，20、又は32の少なくとも2つの配列の発現により形成されるキメラがまた使用され得る。好ましい態様においては、カリウム流を高め又は低めることについてアッセイされる化合物と接触して配置される細胞は、真核細胞、より好ましくはキセノパス（たとえば、キセノパスラエビス（*Xenopus laevis*））の卵母細胞である。

カルシウム活性化されたカリウムチャネルにおいてカリウム流を高め又は低める化合物についてのもう1つのアッセイは、コンピューターシステムがアミノ酸配列によりコードされる構造情報に基づいてSK及びIKタンパク質の立体構造を生成するために使用される“バーチャル遺伝学（virtual genetics）”を包含する。アミノ酸配列は、タンパク質の二次、三次及び四次構造モデルを生成するためにコンピュータープログラムにおける予定されたアルゴリズムと直接的及び活性的に相互作用する。次に、タンパク質構造のモデルが、リガンドに結合する能力を有する構造の領域を同定するために試験される。

タンパク質の立体構造モデルは、コンピューターシステム中に、チャネルタンパク質をコードするチャネルタンパク質アミノ酸又は核酸配列を入力することによって生成される。チャネルタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1，2，3，4，19，20，32，43，47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択される。アミノ酸配列は、タンパク質の構造情報をコードする、タンパク質の一次配列を表わす。アミノ酸配列は、電子貯蔵媒体（たとえば、磁気ディスクケット、テープ、カートリッジ、及びチップス）、光媒体（たとえば、CD ROM、電話線）、インターネット部位へのアドレス及びRAMを包含する（但しそれらだけには限定されない）コンピューター読み取り媒体からのコンピューターシステム中に入力される。次にチャネルタンパク質の立体構造モデルがアミノ酸配列及びコンピューターシステムの相互作用により生成される。ソフトウェアは、市販のプログラム、たとえばBiopolymer, Quanta及びInsightである。

アミノ酸配列は、タンパク質の二次、三次及び四次構造を形成するために必要な情報をコードする一次構造を表わす。ソフトウェアは、その構造モデルを生成するために一次配列によりコードされる一定のパラメーター調べる。それらのパラメーターは、“エネルギー項”として言及され、そして主に、静電位、疎水性電位、溶媒接近性表面及び水素結合を包含する。第2のエネルギー項は、der Waals電位を包含する。生物学的分子は、累積態様でエネルギー項を最少にする構造を形成する。従って、コンピュータープログラムは、二次構造モデルを創造するために、一次構造又はアミノ酸配列によりコードされるそれらの項を用いる。

次に、二次構造によりコードされるタンパク質の三次構造は、二次構造のエネルギー項に基づいて形成される。この点での使用者は、タンパク質が膜結合されるか又は可溶性であるかの追加の変数、身体におけるその位置、及びそれが細胞質性、表面性又は核性のいづれかであるかの変数を入力することができる。二次構造のエネルギー項と共にそれらの変数は、三次構造のモデルを形成するために使用される。三次構造を形成する場合、コンピュータープログラムは、二次構造の疎水性タンパク質面と同様のものとを、及び親水性二次構造と同様のものとを適合せしめる。

最終的に、複数 - サブユニットタンパク質の四次構造は、異方性項を用いて、類似する態

10

20

30

40

50

様で調節される。それらの項は、サブユニットの相互作用をエネルギー的に最少にするために異なったタンパク質サブユニットを調整する。チャネルタンパク質の場合、典型的には4つの同一のサブユニットがチャネルの四次構造を組立てる。

構造が生成されると、可能性あるリガンド結合領域が、コンピューターシステムにより同定される。可能性あるリガンドのための立体構造は、上記のように、化合物のアミノ酸及びヌクレオチド配列又は化学式を入力することによって生成される。次に、可能性あるリガンドの立体構造が、チャネルタンパク質に結合するリガンドを同定するためにチャネルタンパク質の立体構造と比較される。タンパク質とリガンドとの間の結合親和性が、リガンドがタンパク質の結合の増強された可能性を有するかどうかを決定するために、エネルギー項を用いて決定される。

コンピューターシステムはまた、SK及びIK遺伝子の突然変異についてスクリーンするためにも使用される。そのような突然変異は、疾病状態と関係している。突然変異が同定されると、診断アッセイが、疾病状態と関連するそのような突然変異誘発された遺伝子を有する患者を同定するために使用され得る。突然変異誘発されたSK及びIK遺伝子の同定は、配列番号1, 2, 3, 4, 20, 32, 43, 47及び保存的に修飾されたその変異体から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するカルシウムチャネルタンパク質をコードする第1核酸配列の入力を受けることを包含する。前記配列は、上記のようなコンピューターシステム中に入力されている。次に、第1核酸配列が、第1核酸配列に対して実質的な同一性を有する第2核酸配列に比較される。第2核酸配列は、上記態様でコンピューターシステム中に入力される。第1及び第2配列が比較されると、配列間のヌクレオチド差異が同定される。そのような配列は、SK及びIK遺伝子における対立遺伝子差異、及び疾病状態との突然変異の関連性を示すことができる。

#### 細胞トランスフェクション及び遺伝子療法

本発明は、インビトロ及びインビボでの細胞のトランスフェクションのためのパッケージ可能なSK及びIKチャネルタンパク質核酸(cDNA)を供給する。それらのパッケージ可能な核酸は、下記に記載されるように、標的細胞及び生物のトランスフェクションのために多くの良く知られているベクターのいづれか中に挿入され得る。核酸は、ベクター及び標的細胞の相互作用を通して、エクスピボ又はインビボで細胞中にトランスフェクトされる。次に、SK又はIKチャネルタンパク質核酸は、プロモーターの制御下で、本発明のカルシウム-活性化されたチャネルタンパク質核酸を発現し、それにより、SK又はIKチャネルタンパク質遺伝子の不在の、一部不活性化の、又は異常な発現の効果を弱める。

そのような遺伝子療法は、多くの状況において、獲得され、そして伝達された遺伝子欠損、癌及びウィルス感染を補正するために使用されて来た。ヒトにおける人工遺伝子を発現する能力は、多くの重要なヒト疾患、たとえば他の治療による処理に対して影響されない多くの疾患の予防及び/又は治癒を促進する。例として、コレステロール-調節遺伝子、HIVの複製を選択的に阻止する遺伝子及びヒト患者における腫瘍-抑制遺伝子のインビボ発現は、それぞれ心臓疾患AIDS及び癌の処理を劇的に改良する。遺伝子療法の再考のためには、次の文献を参照のこと。  
Anderson, Science (1992) 256 : 803-813 ; Nabel and Felgner (1993) TIBTECH 11 : 211-217 ; Mitani and Caskey (1993) TIBTECH 11 : 162-166 ; Mulligan (1993) Sciencs 262 : 926-932 ; Dillon (1993) TIBTECH 11 : 167-175 ; Miller (1992) Nature 357 : 455-460 ; Van Brunt (1988) Biotechnology 6 (10) : 1149-1154 ; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neurosciences 8 : 35-36 ; Kremer and Perricaudet (1995) British Medical Bulletin 51 (1) 31-44 ; Haddadaなど。(1995) Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohn (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany ; 及びYnなど., Gene Therapy (1994) 1 : 13-26。

細胞中への遺伝子又は遺伝子材料の供給は、疾病的遺伝子療法処理において最初の決定的段階である。多くの供給方法が当業者に良く知られている。そのような方法は、たとえばリポソームに基づく遺伝子供給(Debs and Zhu (1993) WO 93/24640, Mannino and Gould-Fogerite (1988) Bio Techniques 6 (7) : 682-691; Roseアメリカ特許第5,279,833号; Brigham (1991) WO 91/06309; 及びFelgnerなど。(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

10

20

30

40

50

84 : 7413-7414)、及びレトロウィルスゲノムの一部として治療ポリヌクレオチド配列を有する複製欠損レトロウィルスベクター(たとえば、Millerなど。(1990) Mol. Cell. Biol., 10: 4239 (1990); Kolberg (1992) J. NIH Res. 4: 43、及びCornettaなど。Hum. Gene Ther. 2: 215 (1991))を包含する。広く使用されるレトロウィルスベクターは、ネズミ白血病ウィルス(MuLV)、テナガザル白血病ウィルス(GaLV)、Simian免疫欠損ウィルス(SIV)、ヒト免疫欠損ウィルス(HIV)、及びそれらの組合せに基づくベクターを包含する。たとえば、Buchscherなど。(1992) J. Virol. 66 (5) 2731-2739; Johannなど。(1992) J. Virol. 66 (5) : 1635-1640 (1992); Sommerfeltなど。, (1990) Virology 176 : 58-59; Wilsonなど。(1989) J. Virol. 63 : 2374-2378; Millerなど。, J. Virol. 65 : 2220-2224 (1991); Wong - Staalなど。, PCT/US94/05700、及びRosenburg and Fauci (1993) Fundamental Immunology, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York and そこに引用される引例、及びYuなど。, Gene Therapy (1994) 前記を参照のこと。

AA.V-に基づくベクターはまた、核酸及びペプチドのインピトロ生成において、及びインビオ及びエクスピオ遺伝子療法において、標的核酸により細胞をトランスダクトするために使用される。AA.Vベクターの概観については、Westなど。(1987) Virology 160 : 38-47; Carterなど。(1989) アメリカ特許第4,797,368号; Carterなど。WO 93 / 24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5 : 793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invst. 94 : 1351及びSamulski(前記)を参照のこと。組換えAA.Vベクターの構成は、次の多くの文献に記載されている: Lebkowski、アメリカ特許第5,173,414号; Tratschinなど。(1985) Mol. Cell. Biol. 5 (11) : 3251-3260; Tratschin、など。(1984) Mol. Cell. Biol., 4 : 2072-2081; Hermonat and Muzychka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 : 6466-6470; McLaughlinなど。(1985) 及びSamulskiなど。(1989) J. Virol., 63 : 0 3822-3828。rAAVによりトランスフェクトされ得る細胞系は、Lebkowskiなど。(1988) Mol. Cell. Biol., 8 : 3988-3996に記載される細胞系を包含する。

#### A. 細胞のエクスピオトランスフェクション

診断、研究又は遺伝子療法のためのエクスピオ細胞トランスフェクション(たとえば、宿主生物中へのトランスフェクトされた細胞の再注入による)は、当業者に良く知られている。好ましい態様においては、細胞が対象生物から単離され、SK又はIKチャネルタンパク質核酸(遺伝子又はcDNA)によりトランスフェクトされ、そして対象生物(たとえば患者から細胞をいかにして単離し、そして培養するかについては、患者)中に再注入される。エクスピオトランスフェクションのために適切な種々の細胞型は、当業者に良く知られている(たとえば、Freshneyなど。, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley - Liss, New York (1994) 及びそこに引用される引例を参照のこと)。

上記のようにして、好ましい態様においては、SK又はIKチャネルタンパク質をコードするパッケージ可能核酸は、活性化された又は構成的プロモーターの制御下にある。トランスフェクトされた細胞は、欠失する又は異常なSK又はIKチャネルタンパク質遺伝子発現の効果を弱める機能的SK又はIKチャネルを発現する。

1つの特に好ましい態様においては、幹細胞が、細胞トランスフェクション及び遺伝子療法のためのエクスピオ方法に使用される。幹細胞を用いる利点は、それらが他の細胞型にインピトロで分化され得、又はそれらが骨髄に移植するであろう哺乳類(たとえば細胞のドナー)中に導入され得ることである。GM-CSF, IFN- $\gamma$  及びTNF- $\alpha$  のようなサイトカインを用いて、臨床学的に重要な免疫細胞型にインピトロでCD34 $^{+}$ 細胞を分化するための方法は知られている( Inabaなど。, (1992) J. Exp. Med. 176, 1693-1702及びSzabolcsなど。(1995) 154 : 5851-5861を参照のこと)。

幹細胞は、既知方法を用いて、トランスダクション及び分化のために単離される。たとえば、マウスにおいては、骨髄細胞が、マウスを殺害し、そして脚の骨を一対のハサミにより切断することによって分離される。幹細胞は、所望しない細胞、たとえばCD4 $^{+}$ 及びCD8 $^{+}$ (T細胞)、CD45 $^{+}$ (pan B細胞)、GR-1(顆粒球)及びIa $^d$ (分化された抗原表示細胞

)を結合する抗体により骨髄細胞をパンニングすることによって骨髄細胞から単離される。このプロトコールの例に関しては、Inabaなど。(1992) J. Exp. Med. 176: 1693-1702を参照のこと。

ヒトにおいては、腸骨付近の稜からの骨髄吸入が、たとえば手術室においての一般的な麻酔下で実施される。骨髄吸入は、約1,000mlの量であり、そして後部腸骨及び稜から集められる。集められた細胞の合計数が約 $2 \times 10^8 / \text{kg}$ 以下である場合、後部稜の他に、胸骨及び前方腸骨稜を用いての第2の吸入が行われる。手術の間、2単位の照射された、パックされた赤血球細胞が、吸収により採取される骨髄の体積を置換するよう投与される。ヒト造血前駆体及び幹細胞が、CD34表面膜抗原の存在により特徴づけられる。この抗原は、精製、たとえばCD34を結合する親和性カラムに使用される。骨髄が収穫された後、単核細胞が他の成分からフィコールグラジエント遠心分離により分離される。これは、細胞分離機(たとえば、Baxter Fenwal CS3000+又はTerumo機械)を用いて半自動方法により実施される。ほとんど単核細胞から構成される低密度細胞が集められ、そしてその細胞がプラスチックフラスコにおいて、37℃で1.5時間インキュベートされる。付着細胞(単球、マクロファージ及びB-細胞)が捨てられる。次に、非付着細胞が集められ、そしてモノクローナル抗-CD34抗体(たとえばネズミ抗体9C5)と共に、軽く搅拌しながら、4℃で30分間インキュベートされる。抗-CD34抗体のための最終濃度は、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ である。2回の洗浄の後、羊抗-マウスIgG(Fc)抗体により被覆された常磁性微小球(Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Californiaにより供給されるDyna Beads)が、2細胞/ビーズの割合で細胞懸濁液に添加される。49℃で30分間のさらなるインキュベーションの後、磁気ビーズによるロゼット形成された細胞が磁気により集められる。200U/mlの最終濃度でのキモパパイン(Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, Californiaにより供給される)が、CD34+細胞からビーズを放すために添加される。他方では、及び好ましくは、CD34、又はCD34に結合される抗体に結合する親和性カラム単離方法が使用され得る(下記を参照のこと)。Hoなど。(1995) Stem Cells 13(Suppl.3): 100-105、及びまた、Brenner(1993) Journal of Hematology 2: 7-17を参照のこと。

もう1つの態様においては、造血幹細胞は、胎児コード血液から単離される。Yuなど。(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 699-703は、レトロウィルスベクターを用いてヒト胎児コード血液からCD34+細胞をトランスタクトするための好ましい方法を記載する。

#### B. インビボトランスフェクション

治療核酸を含むベクター(たとえばレトロウィルス、アデノウィルス、リポソーム、等)が、インビボでの細胞のトランスフェクションのために生物に直接的に投与され得る。投与は、血液又は組織細胞と究極的に接触して分子を導入するために通常使用される経路のいづれかによるものである。パッケージされた核酸は、好ましくは医薬的に許容できるキャリヤーと共に、いづれかの適切な態様で投与される。そのようなパッケージされた核酸を投与するための適切な方法は、入手でき、そして当業者に良く知られており、そして1つ以上の経路が特定の組成物を投与するために使用され得るが、特定の経路はしばしば、他の経路よりもより早く且つより効果的な反応を提供することができる。

医薬的に許容できるキャリヤーは、投与される特定の組成物により、及び組成物を投与するための使用される特定の方法により一部決定される。従って、本発明の医療組成物の広範囲の種類の適切な配合物が存在する。

経口投与のために適切な配合物は、(a)液体溶液、たとえば希釈剤、たとえば水、塩溶液又はPEG400に懸濁されるパッケージされた有効量の核酸；(b)予定された量の活性成分を液体、固体、顆粒又はゼラチンとして含む、カプセル、サケット又は錠剤；(c)適切な液体における懸濁液；及び(d)適切なエマルジョンから成る。錠剤形は、1又は複数のラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスター、ポテトスター、トラガカント、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化珪素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤

10

20

30

40

50

、保存剤、風味剤、顔料、碎解剤、及び医薬的に適合できるキャリヤーを含むことができる。トローチ形は、風味剤、通常スクロース及びアカシア又はトラガカントにおける活性成分を含んで成り、そしてパステルは不活性基材、たとえばゼラチン及びグリセリン又はスクロース、及びアカシアエマルジョン、ゲル、及び活性成分の他に、当業界において知られているキャリヤーに活性成分を含んで成る。

パッケージされた核酸は、単独で又は他の適切な成分と組合して、吸入により投与されるエアゾール配合物（すなわち、それらは“噴霧され”得る）に製造され得る。エアゾール配合物は、加圧された許容できる推進剤、たとえば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素及び同様のものに配合され得る。

直腸投与のための適切な配合物は、たとえばパッケージされた核酸及び坐剤基材から成る坐剤を含む。適切な坐剤基剤は、天然又は合成のトリグリセリド又はパラフィン炭化水素を包含する。さらに、パッケージされた核酸と基材、たとえば液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール及びパラフィン炭化水素との組合せから成るゼラチン性直腸カプセルを用いることもまた可能である。

関節内（関節における）、静脈内、筋肉内、経皮内、腹腔内、及び皮下経路による非経口投与のために適切な配合物は、酸化防止剤、緩衝剤、制細菌剤、及び意図された受容体の血液により配合物を等張性にする溶質を含むことができる、水性及び非水性、等張性滅菌注射用溶液、及び懸濁剤、溶解剤、増粘剤、安定剤及び保存剤を含むことができる、水性及び非水性滅菌懸濁液を包含する。本発明の実施においては、組成物は、たとえば静脈内注入、経口、局所、腹腔内、ノウ胞内又は包膜内投与され得る。非経口投与及び静脈内投与が好ましい投与方法である。パッケージされた核酸の配合物は、単位 - 投与又は複数 - 投与の密封された容器、たとえばアンプル及びバイアルに供給され得る。

注射溶液及び懸濁液は、前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。エクスピボ治療に関して上記のようにパッケージされた核酸によりトランスダクトされた細胞がまた、上記のように、静脈内又は非経口投与され得る。

本発明に関して、患者に投与される用量は、時間にわたって患者における有益な治療応答をもたらすのに十分であるべきである。用量は、使用される特定のベクターの効能、及び患者の状態、並びに処理される患者の体重又は表面積により決定されるであろう。用量のサイズはまた、特定の患者における特定のベクター又はトランスダクトされた細胞型の投与に伴ういづれかの悪い副作用の存在、性質及び程度により決定されるであろう。

SK又はIKチャネルタンパク質の減じられた又は異常な発現による状態の処理又は予防において投与されるべきベクターの有効量を決定する場合、医者は、ベクターの循環血漿レベル、ベクター毒性、疾病の進行、及び抗 - ベクター抗体の生成を評価する。一般的に、ベクターからの裸の核酸の用量は、典型的な70kgの患者に対して約  $1 \mu g \sim 100 \mu g$  であり、そしてレトロウィルス粒子を含むベクターの用量は、治療核酸の等量を生成するよう計算される。

投与に関しては、本発明のインヒビター及びトランスダクトされた細胞は、患者の集団及び全体の健康に適用される場合、インヒビター、ベクター又はトランスダクトされた細胞型のLD - 50、及びインヒビター、ベクター又は細胞型の種々の濃度での副作用により決定される割合で投与され得る。投与は、一回の用量又は分割された用量で投与され得る。

好ましい態様においては、注入の前、血液サンプルが得られ、そして分析のために保存される。 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$  個のトランスダクトされた細胞が、60 ~ 200分にわたって静脈内注入される。パルス酸素濃度計による生命徵候及び酸素飽和が密接してモニターされる。血液サンプルが、注入に続いて5分及び1時間後に得られ、そして続く分析のために保存される。リューコフェレーシス (leuko pheresis)、トランスダクション、及び再注入が2 ~ 3ヶ月ごとにくり返えされる。最初の処理の後、注入が臨床医の自由に外来患者に対して実施され得る。再注入が外来患者として与えられる場合、関係者は、治療に続いて少なくとも4及び好ましくは8時間、モニターされる。

トランスダクトされた細胞が、確立された方法に従って、再注入のために調製される。Abrahamsenなど . , (1991) J. Clin. Apheresis , 6 : 48-53 ; Carterなど . (1988) J. Cli

10

20

30

40

50

n. Arpheresis, 4: 113-117; Aehersoldなど. (1988) J. Immunol. Meth., 112; 1-7; Muulなど. (1987) J. Immunol. Methods, 101: 171-181及びCarterなど. (1987) Transfusion 27: 362-365を参照のこと。培養での約2~4週間後、細胞は $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 個の数になるべきである。これに関して、細胞の増殖特徴は、患者から患者に、及び細胞型から細胞型に異なる。トランスダクトされた細胞の再注入の約72時間前、アリコートが表現型の分析、及び治療剤を発現する細胞の百分率についての分析のために採取される。本発明は、明確に理解するために例示的且つ例的にいくつか詳細に記載されて来たが、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で実施され得ることは明白である。

#### 例 1

例1は、低及び中間コンダクタンスのカルシウム-依存性カリウムチャネルをコードするクローニング単離及び配列決定を記載する。 10

A. 低コンダクタンスのカリウムチャネル(但し、minkタンパク質(Takumiなど. , Science, 242: 1042-1045 (1988)を除く)は、一価カチオンのための特徴的選択性配列を指図する配列を包含するコア領域内の構造モチーフを共有する(Heginbothamなど. , Biophys. J., 66: 1061-1067 (1994))。

ミスマッチを可能にする問題の配列FXSIPXXXWWAXVTMTTVGYGDMXP(配列番号45)を用いてのESTデータベースのBLAST研究は、既知のカリウムチャネル配列及びGenbank # M62043を再生した。# M62043のヌクレオチド6-36(センス)及び258-287(アンチセンス)に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(Genosys, The Woodlands, TX)、ポリヌクレオチドキナーゼ(BRL)及び<sup>32</sup>P-ATP(NEN)を用いて放射性ラベルし、そしてヒト海馬cDNAライブラリーからの約 $10^6$ 個の組換えファージをスクリーンするために使用した(40%ホルムアミド; 1MのNaCl、1%SDS, 37; 1×SSC, 50での洗浄)。二重の陽性ハイブリダイズファージを、低められた密度で再スクリーンすることによって精製した。cDNA挿入体をM13中にサブクローニングし、そしてそのヌクレオチド配列を、ジデオキシ鎖終結方法及びT7 DNAポリメラーゼを用いて決定した(Sequenase, UBI)。ポア(pore)ドメイン(アミノ酸325-522)を含むクローニングのフラグメントを、ランダムプライマー(Boehringer)を用いて放射性ラベルし、そしてラット脳cDNAライブラリーをスクリーンするために使用した(30%ホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS, 37; 2×SSC, 50での洗浄)。陽性のハイブリダイズするファージを精製し、そして挿入体のヌクレオチド配列を決定した。コンピューター分析を、GCGソフトウェアスイート(Genetics Computer Group; version 8.1)を用いて、実施した。 20

既知のカリウムチャネルの他に、ヒト海馬からの検出された配列の1つは、それがコンセンサスモチーフを含むが、しかしいくつかのあいまい性を含むことを示唆した(Genbank # M62043)。この配列に基づいて、センス鎖のヌクレオチド6~36及びアンチセンス鎖のヌクレオチド258~287により示される配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。そのオリゴヌクレオチドを用いて、ヒト海馬cDNAライブラリーをプローブした。

十分な長さのコード配列、hSK1(配列番号13)を単離し、そして読み取り枠、Kozakコンセンス配列、可能性あるトランスマンブランドメイン及び予測されるタンパク質構造について分析した。推定上のコア領域を含むフラグメントを、ランダムプライミングにより放射性ラベルし、そして40%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDS、及び $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の酵母RNAのハイブリダイゼーション溶液を用いて37でラット脳cDNAライブラリーをプローブするために使用し、そして $0.5 \times \text{SSC}$ を用いて55で洗浄した。異なった十分の長さのコード配列を含む次の2種のクローニングを単離し、そして分析した:rSK2(配列番号15)及びrSK3(配列番号16)。さらに、hSK1のラット相同体(rSK1(配列番号14))を示す部分的クローニングを同定した。 40

前記配列は、推定上のコア領域における12個のアミノ酸配列は別として、他のクローニングされたカリウムチャネルとの相同性の範囲を含まない(すなわち、低い緊縮条件下でバックグラウンド以上のシグナルを含まない)、hSK1のための561個のアミノ酸(配列番号1)、rSK2のための580個のアミノ酸(配列番号2)、及びrSK3のための553個のアミノ酸(配列番号3)のタンパク質を予測する。疎水性の分析は、細胞の内部に存在するN-及 50

び C - 末端を有する 6 個のトランスマンプランセグメントを予測する。それらの配列は、それらのトランスマンプランコアを通して高く保存されるが（80～90% の同一性）、しかしそれらの N - 及び C - 末端ドメイン内の配列及び長さで異なる。

表 1

MS SCRNGGVMR PLSNLSSRR NLHEMDSEAQ  
MS SCXYSGGVMK PLSRLSASRR NLIEAEPEGQ  
MPGPRAACSE PNPCTQVVMN SHSYNGSVGR P...LGSGPG ALGRDPPDPE

PLQPPASVVG GGGGASSPSA AAAASSSAPE IVVSKPEHNN SNNIALYGTG  
PLQLF.... .SPSNPPE IIISSREDNH AHOTLLHHPN

AGHPPQPPhS PGLQVVVAKS EPARPSPGSP RGQPQDQDDD EDDEEDEAGR

GGGSTGGGGG GGGGGGGSGH GSSSGTKSSK KKNQNIGYKL GHRRALFEKR  
ATHNHQHAGT TAGSTTFP.. .KANK RKNQNIGYKL GHRRALFEKR  
..... .S GKPPPTVSKRL GHRRALFEKR  
QR..... .AS GKPSNVGHRL GHRRALFEKR

KRLSDYALIF GMFGIVVMVI ETELSWGAYD KASLYSLALK CLISLSTIIL  
KRLSDYALIF GMFGIVVMVI ETELSHGLYS KDSMFSLALK CLISLSTIIL  
KRLSDYALIF GMFGIVVMVT ETELSWGVYT KESLCSFALK CLISLSTVIL  
KRLSDYALIF GMFGIVVMVT ETELSWGVYT KESLYSFALK CLISLSTAIL

LGLIIVYHAR EIQLFMVDNG ADDWRIAMTY ERIFFICLEI LVCAIHPIPG  
LGLIIAYHTR EVOLFVIDNG ADDWRIAMTY ERILYISLEM LVCAIHPIPG  
LGLVILYHAR EIQLFLVDNG ADDWRIAMTW ERVSLISLEL AVCAIHPIVPG  
LGLVVLYHAR EIQLFMVDNG ADDWRIAMTC ERVFLISLEL AVCAIHPIVPG

NYTFTWTARL AFSYAPSTT ADVDIILSIP MFLRLLYLIAR VMLLHSKLF  
EYKFFWTARL AFSYTPSRAE ADVDIILSIP MFLRLLYLIAR VMLLHSKLF  
HYRFTWTARL AFSLVPSAAE ADVDVLLSIP MFLRLLYLLAR VMLLHSRIFT  
HYRFTWTARL AFTYAPSVAE ADVDVLLSIP MFLRLLYLLGR VMLLHSKIFT

DASSRSIGAL NKFNFNTRFV MKTLMTICPG TVLLVFSIISL WIIAAWTVRV  
DASSRSIGAL NKFNFNTRFV MKTLMTICPG TVLLMFSIISL WIIAAWTVRV  
DASSRSIGAL NRVTNFNTRFV TKTLMTICPG TVLLVFSIIS WIVAAWTVRV  
DASSRSIGAL NKITFNTRFV MKTLMTICPG TVLLVFSIIS WIVAAWTVRV

CERYHDQQDV TSNFLGAMWL ISITFLSIGY GDMVPNTYCG KGVLCLTGIM  
CERYHDQQDV TSNFLGAMWL ISITFLSIGY GDMVPHTYCG KGVLCLTGIM  
CERYHKQEV TSNFLGAMWL ISITFLSIGY GDMVPHTYCG KGVLCLTGIM  
CERYHKQEV TSNFLGAMWL ISITFLSIGY GDMVPHTYCG KGVLCLTGIM

GAGCTALVVA VVARKLELTK AEKHVNFM DTOLTKRVKN AAANVLRETH  
GAGCTALVVA VVARKLELTK AEKHVNFM DTOLTKRIKN AAANVLRETH  
GAGCTALVVA VVARKLELTK AEKHVNFM DTOLTKRVKN AAANVLRETH  
GAGCTALVVA VVARKLELTK AEKHVNFM DTOLTKRVKN AAANVLRETH

LIYKNTKLVK KIDHAKVRKH QRKFLOAIHQ ... LRSVKME QRKLNDQANT  
LIYKHTKLLK KIDHAKVRKH QRKFLOAIHQ ... LRGVKME QRKLSDQANT  
LIYKHTRLVK KPDQSRVRKH QRKFLOAIHQ AOKLRTVKIE QGVNDQANT  
LIYKHTRLVK KPDQARVRKH QRKFLOAIHQ AOKLRSVKIE QGVNDQANT

LVDLAKTQNI MYDHISDLNE RSEDFEKRIV TLETKLETLI GSIALPGLI  
LVDSLXMQNV MYDLITELND RSEDELEKQIG SLESKLEHLT ASFNSLPLLI  
LADLAKAQSII AYEVVSLOA QEELEARLA ALESRLDVLG ASLQALPSLI  
LTDLAKTOTV MYDLVSELHA QHEELEARLA TLESRLDALG ASLQALPGLI

SOTI...RQ QORDFIETOM ENYDKHVTYN AERSRSSRR RRSSSTAPPT  
ADTLRQQQQQ LLTAFVEARG ISVAVG... . . . . . TSAPP  
AOAICPLPPP W...PGPSHL TTAAQSPQSH WLPTTASDCG

```

hSK1  AQAIRPPPPP LPPRPGPGPQ DQAAARSSPCR WTPVAPSDCG *.....
rSK2  SSESS..... .....
rSK3  DSPIGISSTS FPEFLIF*
rSK1  ..... .....
hSK1  ..... .....

```

4番目の予測されるメンプラン延長ドメインは、電圧 - 依存性カリウムチャネル (Durell など . , Biophys. J. , 62 : 238-250 (1992) ) におけるようにあらゆる第3位置を占めるとは限らないが、しかし6及び7個の残基により分離される3つの陽性電荷の残基を含む。種々のタンパク質キナーゼによるリン酸化のための複数のコンセンサン標準的が存在する。それらの部位のいくつかは、すべてのクローニングに見出される。しかしながら、個々のクローニングは、すべてのメンバー間には保存されない可能性あるリン酸化部位を含む。予測される細胞外ドメインには保存されたN - 結合グリコシリ化部位 (NXXS/T) (配列番号46) は存在せず、そしてコンセンサスヌクレオチド又はカルシウム結合ドメイン (E - F バンド) にもそれらは存在しない。

ラット脳及び骨格筋のノザンプロットは、それらの組織からのrSK3転写体が、rSK3クローニング配列番号16に対してN - 末端延長されたタンパク質をコードすることを示した。rSK3 N - 末端延長をコードする核酸をクローニング化し、そして配列決定し、そしてN - 末端延長されたrSK3をコードするcDNAを配列番号44により表わす。さらに、内因性rSK3は、配列番号43の最後の9個のアミノ酸により置換された配列番号3の最後の5個のアミノ酸を有するC - 末端を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有することが示された。同様に、hSK3は、N - 末端延長を有することが示され、そしてこのN - 末端延長をコードするcDNAが配列番号48により示される。

B . 中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたK<sup>+</sup>タンパク質を単離するために、PCRを標準条件下で用いることができる。適切なプライマーは、約270個の塩基のプローブを生成する配列番号34及び35、及び約165個の塩基のプローブを生成する配列番号36及び37である。それらのプライマーは、クローニングされたhIK1を含んで成るプラスミドDNAを、又はhIK1を発現する組織からの逆転写されたRNA、たとえば臍臓からのcDNAライプラリーに基づいて、増幅するために使用され得る。PCR反応は、hIK1及び関連する遺伝子に対して特異的な配列を含む、特定されたサイズのDNAフラグメントを生成するであろう。続いて、それらのDNAフラグメントを、標準のランダム - プライミングプロトコールによりハイブリダイゼーションプローブとして使用するためにラベルする。次に、そのラベルされたプローブを用いて、hIK1配列のみを単離するために高い緊縮性で、又は推定上、関連する配列を単離するために適度に低い緊縮性 (30 ~ 40% のホルムアミド、37 °Cでのhyb / 1 × SSC, 55 °Cでの洗浄) で、ライプラリーをスクリーンする。他方では、PCRプライマー対、配列番号38及び39又は40及び41を用いて、臍臓cDNAライプラリーからの損なわれていないhIK1遺伝子を増幅することができる。

## 例 2

例 2 は、ラットSKチャネルクローニングの個々とは異なる配列を用いてのラット脳断片の現場ハイブリダイゼーション、及び種々の末梢組織からの転写物サイズの決定を記載する。

雌の成熟したSprague - Dawleyの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。ラットを、ペントバルビタールにより深く麻酔をかけ、そして氷冷却された塩溶液、続いて氷冷却された0.1Mの硼酸ナトリウム (pH9.5) 中、4 % パラホルムアルデヒドにより心臓を通して灌流した。脳をすばやく除去し、そして10%スクロースを含む硼酸塩緩衝液 (pH9.5) 中、4 % パラホルムアルデヒドに4 °Cで一晩、後固定した。低温ミクロトーム断片 (25mm) を、ゼラチン - 及びポリ - L - リシン - 被覆されたガラススライド上に固定し、そして0.1MのPBS中、4 % パラホルムアルデヒドにおいて15分間、インキュベートし、0.1MのPBSにより2度洗浄し、そして100mMのトリス中、10mg/mlのプロテイナーゼK、50mMのEDTA (pH 8) の溶液において37 °Cで30分間、続いて、0.1Mのトリエタノールアミン中、0.0025%無水酢酸において室温で処理した。次に、断片を、2 × SSCにより洗浄し、上昇する濃度のエタノールにより脱水し、そして室温で真空

10

20

30

40

50

乾燥せしめた。

プローブ合成のための鋳型は、個々のクローンに対してユニークなC-末端及び3'翻訳配列を表わし、そしてpKS中にサブクローン化した。線状化された鋳型DNAを用いて、<sup>35</sup>S-ラベルされたアンチセンスcDNAプローブを65℃に5分間加熱し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液：66%のホルムアミド、260mMのNaCl、1.3×Denhardt溶液（13mMのトリス、pH8.0、1.3mMのEDTA、13%の硫酸デキストラン）により10<sup>7</sup>cpm/mlに希釈した。ハイブリダイゼーション混合物中の断片を、シリコン処理されたガラスカバースリップにより被覆し、そしてDPX封入剤を用いて密封した。58℃で20時間のインキュベーションの後、スライドを4×SSCによりソーキし、カバースリップを除き、次に、4×SSCによりすすぎ（4度、それぞれ5分間）、続いて、リボヌクレアゼA処理した（37℃で30分間、20mg/ml）。次にスライドを、1mMのDTTを含む、下降する濃度のSSC溶液から最終緊縮性の0.1×SSC、1mMのDTT溶液までの溶液により65℃で30分間すすいだ。上昇する濃度のエタノールによる断片の脱水の後、それらを真空乾燥せしめ、そしてDuPont Cronex-4 X-線フィルムに7日間暴露した。フィルムを、Microtek Scan Maker 1850Sにより728ピクセル/cmの解像度で走査し、そして像を、Image V1.55ソフトウェア（NIH）及びPhotoshop（Adobe）を用いて分析した。  
10

その結果は、ラット配列に対するmRNAがCNSを通して、特徴的であるが、しかしオーバーラップするパターンで広く分布されることを示す。rSK1は、海馬及び歯状回、小脳の顆粒層、及び前方嗅核に発現される。rSK1 mRNAはまた、支柱、嗅結節及び新皮質にも検出される。rSK2 mRNAは最も広く発現され、そして海馬において最高の発現が生じ、そしてより低いレベルでの発現が歯状回、嗅球及び前方嗅核に生じる。rSK2 mRNAはまた、小脳の顆粒層、視床の網様核、及び橋核にも検出される。rSK2 mRNAのための現場ハイブリダイゼーションのパターンは、ラット脳における放射性ラベルされたアバミン結合のパターンと一致する（Gelhart, Neuroscience, 52: 191-205 (1993)）。rSK3 mRNAは、嗅結節及び嗅球、視床じゅう、外側中隔、復側被蓋部分、及び黒質細胞層に検出された。中位のレベルが海馬、尾状被殻、及び中隔側坐核じゅうに検出された。  
20

rSK1及びrSK2のための同じ明確な配列が、全体の脳及びいくつかの末梢組織から単離されたmRNAにより調製されたノザンプロットをプローブするために使用された。全RNAを、生後3週目のSprague-Dawleyラットの脳、副腎、胸腺、脾臓、骨格筋、心臓、腎臓、肝臓、及び肺から抽出した（Chirgawinなど., Biochem., 18: 5294-5300 (1979)）。ポリ(A)<sup>+</sup>mRNAをオリゴd(T)セルロースクロマトグラフィー（Collaborative Research）により精製し、そして個々の組織からの3μgを、1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルを通しての電気泳動によりノザンプロットとして調製し、そしてGenescreen（NEN）ナイロン膜に移した。現場ハイブリダイゼーションのために使用されるのと同じ配列のアンチセンスリボプローブを、<sup>32</sup>P-UTP（NEN）を用いて、線状化されたDNA鋳型から合成した。プロットを、50%ホルムアミド、5%SDS、400mMのNaPO<sub>4</sub>、1mMのEDTAにおいて60℃で12時間ハイブリダイズせしめ、続いて、0.05×SSCにより65℃で洗浄し、そして15時間後、Phosphor imager 445 S 1（Molecular Dynamics）を用いて可視化した。  
30

rSK1 mRNAはラット脳及び心臓において検出されたが、ところがrSK2 mRNAは脳及び副腎において検出された。その結果は、異なったサイズのrSK1 mRNAが脳（3.2kb）及び心臓（4.4kb）に存在することを示す。rSK2 mRNAは、脳、及び副腎において2.2及び2.4kbの2つのバンドとして検出された。rSK1 mRNAもrSK2 mRNAも、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓又は骨格骨には検出されなかった。  
40

### 例3

例3は、SK及びIKチャネルタンパク質のインビトロ発現を記載する。

3 A. 例3 Aは、キセノバス卵母細胞におけるrSK2及びhSK1 mRNAのインビトロ発現、及び電気コンダクタンスの測定を記載する。

インビトロmRNA合成及び卵母細胞注入を、Adelman、など., Neuron, 9: 209-216 (1992)に記載のようにして行なった。キセノバスの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。カエルはわずか2回の手術を受け、少なくとも3  
50

週までに分離され、そして手術は十分に確立された技法を用いて行なわれた。カエルに、3 - アミノ安息香酸エチルエステルの通気された溶液により麻酔をかけた。

卵母細胞は、2 ngのmRNAの注入の後2 ~ 5日で研究された。全細胞流を、Macintosh Quadra 650コンピューターに接続されるCA - 1増幅機により、2つの電極電圧クランプを用いて、mRNA注入の後に測定した。データを、500HzでのPulse (Heka, Germany) 及び10HzでのChart (AD Instruments, Australia) を通して同時に得た。記録の間、卵母細胞は、96 mMのNaCl, 2 mMのKCl, 1.8 mMのCaCl<sub>2</sub>, 1 mMのMgCl<sub>2</sub>, 5 mMのHEPES (NaOHによりpH7.5にされる) を含むND - 96溶液により室温で連続して洗い流された。Cl<sup>-</sup>流を最少にするために、いくつかの卵母細胞をソークし、そしてCl<sup>-</sup> - フリーのND96溶液 (96 mMのグルコン酸ナトリウム、2 mMのグルコン酸カリウム、2.7 mMのグルコン酸カルシウム、1 mMのグルコン酸マグネシウム、5 mMのHEPES, NaOHによりpH7.5にされる) において研究した。- 80mVの保持電位からの電圧プロトコールは、対照卵母細胞とは異なる電流の発生に失敗した。

rSK 2 の発現パターンは、mGlu R1a、すなわち代謝向性グルタミン酸受容体の発現パターンに類似する (Houamedなど., Science, 252: 1318-1321 (1991); Masuなど., Nature, 349: 760-765 (1991))、mGlu R1a mRNAをSK mRNAと共に又はそれを伴わないで注入した。mGlu R1a mRNAのみにより注入された卵母細胞を含んで成る槽へのグルタミン酸 (1 mM) の添加は、細胞内カルシウムの開放に続いての内因性カルシウム - 活性化された塩化物チャネルの活性化のために過渡的な内部方向への流れを引き起こした (Houamedなど., Science, 252: 1318-1321 (1991); Masuなど., Nature, 349: 760-765 (1991))。類似する結果が、mGlu R1aにより注入された6個の他の卵母細胞に得られた。内部方向応答のピーク近くで適用された- 120mV ~ 60mVの電圧ランプは、Cl<sup>-</sup>逆電位近くの- 25mVで逆転された外部方向に整流する流れを引き起こした。mGlu R1a及びrSK 2 mRNAにより同時注入された卵母細胞へのグルタミン酸 (1 mM) の添加は、mGlu R1a注入された卵母細胞に観察される過渡的なカルシウム - 活性化された塩化物流を引き起こし、続いて、大きな過渡的な外部方向への流れを引き起こした。類似する結果が、mGlu R1a及びrSK 2 により同時注入された14個の他の卵母細胞に観察された。外部方向応答のピーク近くで適用される- 120 ~ 60mVの電圧ランプは、K<sup>+</sup>逆電位に近い- 95mV近くで逆転された大きな内部方向に整流する流れを引き起こした。この結果は、クローニングされたサブユニットの個々により得られ、そしてこれは、クローニングされた配列がカリウムチャネルをコードすることを示唆した。

2 - 電極電圧クランプの確立に続いて、卵母細胞を、KOHにより7.2のpHに調整された200 mMのEGTAを含む第3電極により突き刺した。入力耐性を、卵母細胞の生存性を確かめるために突き刺しの間モニターした。示された時間で、50nLのEGTA溶液を卵母細胞中に注入した。1 μlの卵母細胞体積を仮定して、EGTAの予定された最終濃度は10 mMであった。EGTAの細胞内注入は、グルタミン酸の続く適用により引き起こされる両流れ応答を完全に破壊し、このことは、両成分がカルシウム - 活性化されたことを示唆する。mGlu R1a及びrSK 2 を同時注入した他の3つの卵母細胞から類似の結果が得られた。2.6又は20 mMのK<sup>+</sup>を含むCl<sup>-</sup> - フリー外部溶液中、rSK 2 mRNAにより注入された卵母細胞に流れ - 電圧関連性が存在した。流れは、約1 mMの最終濃度までのCaCl<sub>2</sub>の注入により活性化された (Adelmanなど., Neuron, 9: 209-216 (1992))。バックグラウンド流を、100 nMのアパミンの適用により決定した。アパミン - 非感受性バックグラウンド流は、外部K<sup>+</sup>により変化しなかった。

注入の2日後、卵母細胞を、Cl<sup>-</sup>流を最少にするためにCl<sup>-</sup> - フリーND96溶液に24時間以上ソーカーした。2 - 電極記録モードにおいては、チャネルを、第3電極を通して5 nL ~ 200 mMのCaCl<sub>2</sub>の注入により活性化し、約1 mMのCa<sup>2+</sup>の最終細胞内濃度をもたらした。この方法は、mGlu R1a及びrSK 2 により同時注入された卵母細胞においてグルタミン酸により活性化された流れよりもK<sup>+</sup>流のより長く持続する活性化をもたらした。それらの卵母細胞においては、逆電位が100 nMのアパミンにおけるバックグラウンド流に対して決定された。[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>に対してプロットされた平均逆電位 ± S.D. は、55.4 mV / [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>における10倍の変化の傾斜及び1 mMの[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>で- 110 mVのy - 切片をもたらす。

肉眼で見える流れをまた、摘出されたパッチから記録した。流れは、rSK 2 を発現する卵母細胞からの摘出された裏がえしパッチにおいて - 100 ~ 100mVの2.5秒電圧ランプにより誘発された。適用されるカルシウム槽なしでは、流れは対照の卵母細胞と異ならなかった。卵母細胞を、2 - 電極電圧クランプ記録のために記載のようにして注入した。

注入の2 ~ 9日後、裏がえしのマクロパッチを、 $\text{CaCl}_2$ 及び/又はEGTAにより補充された、116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES ( KOHにより調節されたpH7.25 ) を含む槽溶液中に摘出した。公称Ca - フリー溶液を得るために、1 mMのEGTAを添加した。他方では、 $\text{CaCl}_2$ を前記槽溶液に添加し、1 ~ 10  $\mu\text{M}$  の遊離カルシウム濃度を付与した。この場合、グルコン酸に結合するカルシウムの割合を、 $15.9\text{ M}^{-1}$  のグルコン酸カルシウムの安定性定数を仮定して、コンピュータープログラム ( CaBuf ) により決定した ( Dawson など . , Data for Biochemical Research ( Oxford University Press , New York , ( 1969 ) ) 。1  $\mu\text{M}$  以下の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を得るために、5 mMのEGTAを、前記槽溶液に添加し、そして $\text{CaCl}_2$ を、CaBuf プログラム及び公開された安定性定数を用いて計算して添加した ( Fabiat など . , J . Physiol . , 75 : 463-505 ( 1979 ) ) 。 $\text{Mg}^{2+}$ が槽溶液に添加される実験のために、 $\text{MgCl}_2$ を、テキストに言及された全濃度に添加した。それらの条件下で、グルコン酸への $\text{Mg}^{2+}$ の結合は無視できる ( 安定性定数 $1.7\text{ M}^{-1}$  ) 。

電極を薄い壁のフィラメント繊維の珪硼酸ガラス ( World Precision Instruments ) から製造し、そして116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES ( pH7.25 ) により充填した。電極抵抗は典型的には2 ~ 5 M であった。膜パッチを、Axopatch 200 A 増幅機 ( Axon Instruments ) を用いて電圧クランプした。データは、2 kHzで低 - 通過Bessel濾過され、そしてPulseソフトウェア ( HEKA Electronik ) を用いて獲得した。分析は、Pulse, Kaleidograph ( Abelbeck ) 又はIGOR ( Wavemetrics ) ソフトウェアを用いて実施された。すべての実験は - 80mVの維持電位から、室温で実施された。- 100 ~ 100mVの2.5秒電圧ランプを、500Hzのサンプリング周波数で獲得した。他方では、流れ - 電圧の関係を、5 kHzでサンプリングされた、20mVのインクリメントでの - 100 ~ 100mV間の電圧に対しての500msのコマンドの間の平均流から得た。

細胞内 ( 槽 ) 溶液への5  $\mu\text{M}$  の $\text{Ca}^{2+}$ の添加は、実質的な流れを引き起こした。対称120mMの $\text{K}^+$ 及び内部 $\text{Mg}^{2+}$ の不在における電圧ランプは、わずかな内部方向への整流の流れ - 電圧関係を示した。- 80mVの維持電位からの - 100 ~ 100mV間の電圧段階は、時間 - 依存性流れを引き起こした。誘導されたI - V関係は、電圧ランプから明らかな内部方向整流に影響を及ぼす。流れは、rSK 2 を発現する卵母細胞から摘出された裏がえしのマクロパッチから電圧段階により引き起こされた。槽における5  $\mu\text{M}$  の $\text{Ca}^{2+}$ により、膜を - 80mVの維持電位から - 100 ~ 100mVの間の試験電位まで進め、そして次に、- 50mVに再分極化した。流れは即時に活性化し、そして500msの試験パルスの間、不活性化を示さなかった。類似する結果が、hSK 1 に関して得られ、但し、内部方向整流は言明されなかった。それらの結果は、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルとしてこの新しいファミリーを同定する。

3 B . 例 3 B は、hIK 1 チャネルの電気生理学を記載する。すべてのhIK 1 チャネルサブユニットを、複数の制限部位を含むポリリンカーを端に有するキセノパス - グロビン遺伝子からの5' 及び3' 翻訳領域を供給する卵母細胞発現ベクターpBF ( 未公開、Dr . B . Faklerにより親切に供給される ) 中にサブクローン化した。インビトロ mRNAをSP 6 ポリメラーゼ ( GibcoBRL ) を用いて生成し；合成に続いて、mRNAを分光学的に、及びアガロースゲル電気泳動の後の臭化工チジウム染色により評価した。

上記のように、キセノパスの世話及び取扱いは、制度化されたガイドラインの最高の基準に従って行なわれた。カエルは、わずか2回の手術を受け、少なくとも3週までに分離され、そしてすべての手術は十分に確立された技法を用いて実施された。カエルに、3 - アミノ安息香酸エチルエステルの通気された溶液により麻酔をかけた。卵母細胞は、0.5 ~ 5 ngのmRNAの注入の2 ~ 14日で研究された。

裏がえしのマクロパッチを、5  $\mu\text{M}$  の遊離カルシウム濃度を付与するために $\text{CaCl}_2$ により補充された、116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES ( pH7.2 , KOHにより

10

20

30

40

50

調節された)を含む細胞内溶液中に摘出し; グルコン酸へのカルシウム結合の割合を、 $15.9\text{ M}^{-1}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  グルコン酸のための安定性定数を仮定して、コンピュータープログラム (CaBuf) により決定した (Dawsonなど., 1969)。1  $\mu\text{M}$  以下の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を得るために、1 m MのEGTAを槽溶液に添加し、そして  $\text{CaCl}_2$  を、CaBufプログラム及び公開された安定性定数を用いて計算して、添加した (Fabiato and Fabiato, 1979)。電極を薄い壁のフィラメント纖維の珪硼酸ガラス (World Precision Instruments) から製造し、そして116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES (pH7.2) により充填した。電極抵抗は典型的には2~5 M であった。裏がえしのマクロパッチのためには、溶液を逆にした。膜パッチを、Axopatch 200 A 増幅機 (Axon Instruments) を用いて電圧クランプした。データは、1 kHzで低-通過Bessel濾過され、そしてPulseソフトウェア (HEKA Electronik) を用いて獲得した。分析は、Pulse, Kaleidagraph (Abelbeck) 又はIGOR (Wavemetrica) ソフトウェアを用いて実施された。特にことわらない限り、すべての実験は0mVの維持電位から、室温で実施された。-100~60又は100mVの2.5秒電圧ランプを、500Hzのサンプリング周波数で獲得した。値は、平均±SDとして表わされた。統計学的差異は、無対のt-テストを用いて決定され; 0.05以下のp値が有意として見なされた。

单一チャネルの記録のためには、卵母細胞を、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の報告された濃度を得るために、 $\text{CaCl}_2$  により調整された、116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES, 5 mMのEGTA, pH7.2の槽溶液に添加した。すべての記録は、116mMのグルコン酸カリウム、4 mMのKCl, 10mMのHEPES, pH7.2を含む、厚壁の石英電極 (13~15 M ) を用いて、裏がえしパッチ形状で実施された。膜パッチを、Axopatch 200増幅機 (Axon Instruments) により電圧クランプした。連続した記録は、1 kHzで低通過Bessel濾過され、Pulseソフトウェア (Heka Electronik) を用いて10kHzで獲得し、そしてMacintosh Quadra 650上に直接的に保存した。单一チャネルの記録を、現象の振幅を評価するために“50%閾値”技法を用いて、Mac Tac (SKALAR Instruments) により分析し、そして個々の遷移を、許容される前、眼により調べた。振幅ヒストグラムを、Mac Tacfit (SKALAR Instruments) を用いて構成した。少なくとも1 m秒続く現象のみが含まれ、そして振幅ヒストグラムを単一のGaussian分布により適合せしめた。すべての実験は、室温で実施された。

キセノパス卵母細胞におけるhIK1の発現は容易に検出できた。5  $\mu\text{M}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  中に摘出された裏がえしのパッチに付与される電圧ランプ命令は、注入されていない卵母細胞からのパッチ(示されていない)又は  $\text{Ca}^{2+}$ -フリーの媒体に浸された裏がえしのパッチに存在しない、強い内部方向整流の肉眼で見える流れ応答を引き起こした。電圧段階命令は、 $\text{Ca}^{2+}$  が(槽)内部溶液に含まれる場合のみ、高い時間-無関係流れを引き起こす。外部  $\text{K}^+$  濃度の変更 (Naにより置換された)は、 $\text{K}^+$ -選択性コンダクタンスについてのネルンスト予測に従って逆電位をシフトした (57mV /  $\text{K}^+$ における10倍の変化)。電圧ランプ命令により引き起こされた流れは、SK 2 チャネルに類似して、膜の内面に適用される  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に依存した。

#### 例 4

例 4 は、rSK 2 及びhSK 1 チャネルのカルシウム感度を記載する。

上記のような裏がえしのミクロパッチを用いて、電圧ランプにより引き起こされたrSK 2 流れは、内部(槽)溶液におけるカルシウムの濃度に依存することが示された。逆電位での傾斜コンダクタンスを、カルシウム濃度の関数として、プロットし、そしてデータ点をHill等式により適合せしめる。8個のパッチからのカルシウムについての平均Kdは、 $0.63 \pm 0.23 \mu\text{M}$  である。そのプロットが見出されるカルシウムに対する急勾配の依存性は、 $4.81 \pm 1.46$  のHill係数により影響され、このことは、少なくとも2つのカルシウムがチャネルゲートに含まれることを示唆する。hSK 1 により実施された類似する実験は、 $0.70 \pm 0.06 \mu\text{M}$  のKd及び $3.90 \pm 0.45$  のHill係数を生成した。

hIK 1 及びSK 2 を比較するために、標準化された流れを、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関数としてプロットし、そしてそれらのデータ点をHill等式により適合せしめる。両チャネルは、同じ  $K_{0.5}$  (最大の半分の活性化のための濃度、hIK 1 に関しては $0.32 \pm 0.03 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ ) 及びSK 2 に関しては $0.31 \pm 0.05 \mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) ;  $p = 0.68$ ) を示したが、しかし  $\text{Ca}^{2+}$ -依存性の

急勾配においては異なっており、すなわちSK 2 は $3.5 \pm 0.4$  ( $n = 4$ ) のHill係数を有し、ところがhIK 1 は $1.7 \pm 0.3$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ) のHill係数を有した。それらの結果は、hIK 1 がまた、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルであることを示す。

#### 例 5

例 5 は、rSK 2 チャネルについてのマグネシウム誘発された内部方向整流を記載する。

上記に記載されるrSK 2 についての内部方向整流を、カリウム及びカルシウム ( $5 \mu M$ ) 以外の内部カチオンの不在下で観察した。生来のSKチャネルは、内部Mg<sup>2+</sup>イオンにより誘発された内部方向整流を示す (Lancasterなど., J. Neurosci., 11: 23-30 (1991))。海馬において、SKチャネルは内部Mg<sup>2+</sup>の存在下で有意な内部方向整流を示す。流れは、種々の濃度の内部Mg<sup>2+</sup>及び $10 \mu M$ のCa<sup>2+</sup>の存在下で、rSK 2 を発現する卵母細胞から摘出された裏がえしのマクロパッチから誘導された。異なった濃度のMg<sup>2+</sup> ( $0.1 \sim 3 mM$ ) が裏がえしのパッチを浸している溶液に添加される場合、外部方向流が有意に減じられた。

Mg<sup>2+</sup>誘発された内部方向整流の濃度 - 及び電圧 - 依存性を試験した。高まるMg<sup>2+</sup>に従っての内部方向流のわずかな低下が観察された。従って、-100mVでの内部方向流に対する、20 ~ 100mVの電位での外部方向流の比を、異なった濃度の内部Mg<sup>2+</sup>の関数としてプロットした。複数の実験から、異なったMg<sup>2+</sup>濃度及び電圧で得られたデータをHill等式により適合せしめ、 $0.94 \pm 0.27$  ( $n = 24$ ) の平均Hill係数を生成した。続いて、そのHill係数を1で固定し、そして平均Kdを試験電位の関数としてプロットした。上昇する電圧と共に低下するKdは、Mg<sup>2+</sup>阻止が電圧 - 依存性であることを示す。Mg<sup>2+</sup>のためのKdを、20, 40, 60, 80 及び100mVでパネルBにおいて示されるように5個のパッチから得た。個々の電位での値を平均し、電圧の関数としてプロットし、そしてWoodhull等式、すなわちKd (0mV)  $\exp(-zFE/RT)$  により適合せしめ、ここで前記式中、Kd (0mV) は $6 mM$ であり、 $z$ はMg<sup>2+</sup>により検知される電場率0.30であり、Zはこの原子価2であり、そしてF, E, R、及びTはそれらの有用な意味を有する (Woodhull, J. Gen. Physiol., 61: 687-708 (1973))。Woodhull等式の適用は、Mg<sup>2+</sup>イオンが約0.30の膜電場を検知することを示した。

#### 例 6

例 6 は、卵母細胞からの單一チャネルの記録を記載する。

6 A . 例 6 A は、單一チャネルがrSK 2 を発現する卵母細胞から摘出された裏がえしのパッチを用いて試験されることを記載する。 $\mu M$ 以下の濃度でのカルシウムの添加は、対照には見出されないチャネル活性を誘発した。代表的なパッチは、槽溶液に適用される $0.2 \mu M$ のカルシウムが複数の開口部を單一の開口に誘発したことを示した。チャネル活性は、カルシウム濃度が高められるにつれて、上昇し、その結果、 $0.6 \mu M$ のカルシウムにおいて、単位開口部はもはや分解され得ない。カルシウムの洗い流しに基づいて、チャネル活性は消出した。 $0.4 \mu M$ のカルシウムの存在下でのチャネル活性を、いくつかの電圧で記録した。肉眼で見えるランプ記録に類似して、チャネル開口確立は、電圧に対して明らかに依存しなかった。

いくつかの電圧で測定された単位開口部を用いて、單一チャネルI - V関係を構成した。使用される溶液はマクロパッチ記録に関してと同じであった(例5)。電極をCorning 70 52ガラス (Garner) から製造し、そしてそれは $9 \sim 13 M$  の抵抗を有した。データを1 kHz (Bessel) で濾過し、Pulse (HEKA Electronik) を用いて10kHzで獲得し、そしてMacintosh Quadra 650上に直接的に貯蔵した。單一チャネルを、Mac Tac (SKALAR Instruments) を用いて分析した。“50%閾値”技法を用いて、現象の振幅を評価した。閾値を個々の開口のために調整し、そして個々の遷移を、許容される前、眼により調べた。振幅ヒストグラムを、Mac Tacfit (SKALAR Instruments) を用いて構成し、そして單一Gaussian分布により最良に適合せしめる。チャネル開口確立をNP (0); すなわちチャネルの数により掛け算された開口確立の生成物として評価した。NP (0)を、合計時間により割り算される(滞留時間 × レベル数)の合計として計算した。Nは、 $0.4 \mu M$ のカルシウムでの同時開口チャネルの数として評価された。rSK 2 又はhSK 1 のいづれかを発現する卵母細胞からの3個のパッチに対する線状回帰分析は、それぞれ $9.9 \pm 0.9 pS$ 及び $9.2 \pm 0.3 pS$ の平均單一チャネルコンダクタンスを生成した。

10

20

30

40

50

6 B . 例 6 B は、 hIK1 の単一チャネルコンダクタンスを記載する。この方法は、例 3 B に記載されている。0.2~1.0 μM の遊離カルシウムを含む槽溶液中に摘出された裏がえしのパッチからの定常記録は、カルシウムの不在下で見出されなかった短 - 持続期間の開口部を示した。代表的な痕跡は、 -60mV で記録された。チャネル活性の程度は、内部カルシウムの濃度に依存した。細胞内カルシウムの低減はチャネル活性を低め、そして内部カルシウムの除去は、チャネル活性を破壊し、これは  $\text{Ca}^{2+}$  の再適用の後、戻った。持効性チャネル活性が -100mV ~ +100mV の範囲の膜電圧で見うけられ、そして開口確立は明らかに、電圧依存性ではなかった。選択パッチに関しては、開口部の振幅を測定し、ヒストグラム中にアセンブルし、そして Gaussian 分布により適合せしめる。その得られる平均振幅を用いて、流れ - 電圧の関係を構成した。単一チャネルの流れ - 電圧関係は、肉眼で見える流れ - 電圧関係に類似する内部方向整流を示す。このパッチのための、内部方向流れ - 電圧関係の線状回帰分析は、35pS の単一チャネルコンダクタンスを生成し；4 個のパッチからの結果は、 $38 \pm 4$  pS の単位コンダクタンスを付与した。外部方向コンダクタンスの測定はより変動的であり、5 ~ 12pS の範囲である。

#### 例 7

例 7 は、新規ラット及びヒトカリウムチャネルの薬理学を記載する。

7 A . 肉眼で見える rSK2 流が、例 3 に記載されるパッチ用ピペットにより 0 又は 60pM のアパミン、又は 0 又は 2 μM の d - ツボクレートを注入することにより裏がえしのマクロパッチからの 5 μM の  $\text{Ca}^{2+}$  で記録された。クローン化されたチャネルの機能的特徴は、ニューロン (Lancaster and Adams, J. Neurophysiol., 55: 1268-1282 (1986) ; Lancaster など . , J. Neurosci., 11: 23-30 (1991) ; Sah など . , J. Neurophysiol., 68: 18 20 34-1841 (1992) ) 、骨格筋 (Blatz and Magleby, Nature, 323: 718-720 (1986) ) 、副腎クロム親和性細胞 (Park, J. Physiol., 481: 555-570 (1994) ; Artalejo など . , Pflugers Archiv., 423: 97-103 (1993) ) 、及び T - リンパ球 (Grissmer など . , J. Gen. Physiol., 99: 63-84 (1992) ) に記載される SK 種類のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルを暗示する。生来の SK チャネルは、明確な薬理学を表わす。それらは、サソリペプチドカリブドトキシン (CTX) 、すなわち BK カリウムチャネルの有能なブロッカーによりブロックされない (Miller など . , Nature, 313: 361-318 (1985) ) 。しかしながら、すべてではないが、多くの SK チャネルは、ハチ毒物トキシン、アパミン及び植物アルキロイド、すなわち d - ツボクラレによりブロックされる (dTC; Zhang and McBain, J. Physiol., 488: 661-672 (1995) ; Park, J. Physiol., 481: 555-570 (1994) ; Dun など . , J. Physiol., 375: 499-511 (1986) ) 。500nM の CTX の適用は、rSK2 又は hSK1 をブロックしないが、しかし hS1o BK 流の活性を破壊した。rSK2 流は、63pM の  $K_d$  を有するピコモル濃度のアパミンにより効果的にブロックされた。対照的に、100nM のアパミンの適用は hSK - 1 流に影響を及ぼさなかった ( $n = 8$ ) 。dTC はまた、2.4 μM の  $K_d$  により rSK2 流をブロックし、ところが hSK1 は、76.2 μM の  $K_d$  に対して、約 30 倍低い感度であった。

7 B . hIK1 の薬理学的試験に関して、クロトリマゾールは Sigma からであり、ケトコナゾール及びイベリオトキシンは RP1 からであり、アパミンは Calbiochem からであり、カリブドトキシンは Dr. Chris Miller の親切な贈与であった。hIK1 の機能的特徴は、赤血球細胞 (The Gardos channel; Gardos, 1958) 及び他の組織から記載される中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化された  $K^+$  チャネルを暗示する。生来の IK チャネルは識別する薬理学を提供し、カリブドトキシン (CTX) によりブロックされるが、しかし高コンダクタンスの電圧 - 及び  $\text{Ca}^{2+}$  - 活性化された  $K^+$  チャネル (BK チャネル) とは異なり、イベリオトキシンによってはブロックされない。また、IK チャネルは、ハチ毒物ペプチドトキシンアパミン、すなわち生来の及びクローン化された SK チャネルのブロッカーに対して敏感ではない。さらに、いくつかの IK チャネル、著しくは Gardos チャネルは、いくつかのイミダゾール誘導体、たとえばクロトリマゾールに対して敏感であるが、しかし他のもの、たとえばケトコナゾールに対して敏感ではない。hIK1 流は、2.5nM の  $K_1$  を有する CTX により効果的にブロックされ ( $n = 4$ ) 、そして 50nM の IBX はわずか  $15 \pm 3\%$  をブロックした。ヒ

10

20

30

40

50

トIK1は24.8nMのKiをもってクロトリマゾールに対して敏感であるが、しかしづか24±6%が10μMのケトコナゾールによりプロックされた。100nMのアパミンは、hIK1流をわずか12±5%減じた。

本明細書に言及されるすべての出版物及び特許は、個々の出版物又は特許が引用により本明細書に組込まれることを特異的且つ個々に示されるかのように同じ程度に明細書中に引用により組込まれる。

#### 配列表

( 1 ) 一般情報 :

( ii ) 発明の名称 : 低及び中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネル及びその使用

10

( iii ) 配列の数 : 48

( 2 ) 配列番号 1 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 561個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

20

( B ) 位置 : 1..561

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 1 ( hSK1 ) ”

( xi ) 配列 : 配列番号 1 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Gly | Pro | Arg | Ala | Ala | Cys | Ser | Glu | Pro | Asn | Pro | Cys | Thr | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Met | Asn | Ser | His | Ser | Tyr | Asn | Gly | Ser | Val | Gly | Arg | Pro | Leu |
|     |     |     |     |     |     |     | 20  |     | 25  |     |     | 30  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Gly | Pro | Gly | Ala | Leu | Gly | Arg | Asp | Pro | Pro | Asp | Pro | Glu | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     | 35  |     | 40  |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | His | Pro | Pro | Gln | Pro | Pro | His | Ser | Pro | Gly | Leu | Gln | Val | Val | Val |
|     |     |     |     |     |     |     | 50  |     | 55  |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Lys | Ser | Glu | Pro | Ala | Arg | Pro | Ser | Pro | Gly | Ser | Pro | Arg | Gly | Gln |
|     |     |     |     |     |     |     | 65  |     | 70  |     | 75  |     | 80  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gln | Asp | Gln | Asp | Asp | Asp | Glu | Asp | Asp | Glu | Glu | Asp | Glu | Ala | Gly |
|     |     |     |     |     |     |     | 85  |     | 90  |     |     | 95  |     |     |     |

30

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| Arg Gln Arg Ala Ser Gly Lys Pro Ser Asn Val Gly His Arg Leu Gly |     |     |
| 100   | 105 | 110 |
| His Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr Ala |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
| Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met Val Thr Glu Thr Glu |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
| Leu Ser Trp Gly Val Tyr Thr Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Phe Ala Leu |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| 160   |     |     |
| Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ala Ile Leu Leu Gly Leu Val Val |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| 10  |     |     |
| Leu Tyr His Ala Arg Glu Ile Gln Leu Phe Met Val Asp Asn Gly Ala |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Cys Glu Arg Val Phe Leu Ile Ser |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Leu Glu Leu Ala Val Cys Ala Ile His Pro Val Pro Gly His Tyr Arg |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Phe Thr Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Thr Tyr Ala Pro Ser Val Ala |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| 240   |     |     |
| Glu Ala Asp Val Asp Val Leu Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg Leu |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| 20  |     |     |
| Tyr Leu Leu Gly Arg Val Met Leu Leu His Ser Lys Ile Phe Thr Asp |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile Thr Phe Asn Thr |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val Leu |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Leu Val Phe Ser Ile Ser Ser Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val Arg |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| 320   |     |     |
| Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Lys Gln Glu Val Thr Ser Asn Phe Leu |     |     |
| 325   | 330 | 335 |
| 30  |     |     |
| Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr Gly |     |     |
| 340   | 345 | 350 |
| Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu Thr |     |     |
| 355   | 360 | 365 |
| Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val Ala |     |     |
| 370   | 375 | 380 |
| Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met |     |     |
| 385   | 390 | 395 |
| 400   |     |     |
| Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Val Lys Asn Ala Ala Asn Val     |     |     |
| 405   | 410 | 415 |
| Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Arg Leu Val Lys Lys |     |     |
| 420   | 425 | 430 |
| Pro Asp Gln Ala Arg Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala |     |     |
| 435   | 440 | 445 |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Ile His Gln Ala Gln Lys Leu Arg Ser Val Lys Ile Glu Gln Gly Lys |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |
| Leu Asn Asp Gln Ala Asn Thr Leu Thr Asp Leu Ala Lys Thr Gln Thr |     |     |     |
| 465   | 470 | 475 | 480 |
| Val Met Tyr Asp Leu Val Ser Glu Leu His Ala Gln His Glu Glu Leu |     |     |     |
| 485   | 490 | 495 |     |
| Glu Ala Arg Leu Ala Thr Leu Glu Ser Arg Leu Asp Ala Leu Gly Ala |     |     |     |
| 500   | 505 | 510 |     |
| Ser Leu Gln Ala Leu Pro Gly Leu Ile Ala Gln Ala Ile Arg Pro Pro |     |     |     |
| 515   | 520 | 525 | 10  |
| Pro Pro Pro Leu Pro Pro Arg Pro Gly Pro Gly Pro Gln Asp Gln Ala |     |     |     |
| 530   | 535 | 540 |     |
| Ala Arg Ser Ser Pro Cys Arg Trp Thr Pro Val Ala Pro Ser Asp Cys |     |     |     |
| 545   | 550 | 555 | 560 |
| Gly   |     |     |     |

( 2 ) 配列番号 2 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 580 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

20

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..580

( C ) 他の情報 : / 注 = “ ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 2 ( rSK 2 ) ”

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

30

( B ) 位置 : 135..462

( C ) 他の情報 : / 注 = “ rSK 2 のコア領域 ”

( xi ) 配列 : 配列番号 2 :

|   |  |    |
|---|--|----|
| Met Ser Ser Cys Arg Tyr Asn Gly Gly Val Met Arg Pro Leu Ser Asn |  |    |
| 1 5 10 15   |  |    |
| Leu Ser Ser Ser Arg Arg Asn Leu His Glu Met Asp Ser Glu Ala Gln |  |    |
| 20 25 30  |  |    |
| Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ser Val Val Gly Gly Gly Gly Ala Ser     |  |    |
| 35 40 45  |  |    |
| Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ala Pro Glu Ile Val     |  |    |
| 50 55 60  |  |    |
| Val Ser Lys Pro Glu His Asn Asn Ser Asn Asn Leu Ala Leu Tyr Gly |  |    |
| 65 70 75 80   |  | 10 |
| Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly     |  |    |
| 85 90 95  |  |    |
| Gly Gly Gly Ser Gly His Gly Ser Ser Ser Gly Thr Lys Ser Ser Lys |  |    |
| 100 105 110   |  |    |
| Lys Lys Asn Gln Asn Ile Gly Tyr Lys Leu Gly His Arg Arg Ala Leu |  |    |
| 115 120 125   |  |    |
| Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly Met |  |    |
| 130 135 140   |  |    |
| Phe Gly Ile Val Val Met Val Ile Glu Thr Glu Leu Ser Trp Gly Ala |  |    |
| 145 150 155 160   |  | 20 |
| Tyr Asp Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Ala Leu Lys Cys Leu Ile Ser |  |    |
| 165 170 175   |  |    |
| Leu Ser Thr Ile Ile Leu Leu Gly Leu Ile Ile Val Tyr His Ala Arg |  |    |
| 180 185 190   |  |    |
| Glu Ile Gln Leu Phe Met Val Asp Asn Gly Ala Asp Asp Trp Arg Ile |  |    |
| 195 200 205   |  |    |
| Ala Met Thr Tyr Glu Arg Ile Phe Phe Ile Cys Leu Glu Ile Leu Val |  |    |
| 210 215 220   |  |    |
| Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Thr Trp Thr Ala |  |    |
| 225 230 235 240   |  | 30 |
| Arg Leu Ala Phe Ser Tyr Ala Pro Ser Thr Thr Thr Ala Asp Val Asp |  |    |
| 245 250 255   |  |    |
| Ile Ile Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg Leu Tyr Leu Ile Ala Arg |  |    |
| 260 265 270   |  |    |
| Val Met Leu Leu His Ser Lys Leu Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg Ser |  |    |
| 275 280 285   |  |    |
| Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile Asn Phe Asn Thr Arg Phe Val Met Lys |  |    |
| 290 295 300   |  |    |
| Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val Leu Leu Val Phe Ser Ile |  |    |
| 305 310 315 320   |  | 40 |
| Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val Arg Ala Cys Glu Arg Tyr |  |    |
| 325 330 335   |  |    |

His Asp Gln Asp Val Thr Ser Asn Phe Leu Gly Ala Met Trp Leu  
 340 345 350

Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Asn  
 355 360 365

Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu Thr Gly Ile Met Gly Ala  
 370 375 380

Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu Leu  
 385 390 395 400

Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met Met Asp Thr Gln Leu  
 405 410 415

Thr Lys Arg Val Lys Asn Ala Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr Trp  
 420 425 430

Leu Ile Tyr Lys Asn Thr Lys Leu Val Lys Lys Ile Asp His Ala Lys  
 435 440 445

Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala Ile His Gln Leu Arg  
 450 455 460

Ser Val Lys Met Glu Gln Arg Lys Leu Asn Asp Gln Ala Asn Thr Leu  
 465 470 475 480

Val Asp Leu Ala Lys Thr Gln Asn Ile Met Tyr Asp Met Ile Ser Asp  
 485 490 495

Leu Asn Glu Arg Ser Glu Asp Phe Glu Lys Arg Ile Val Thr Leu Glu  
 500 505 510

Thr Lys Leu Glu Thr Leu Ile Gly Ser Ile His Ala Leu Pro Gly Leu  
 515 520 525

Ile Ser Gln Thr Ile Arg Gln Gln Gln Arg Asp Phe Ile Glu Thr Gln  
 530 535 540

Met Glu Asn Tyr Asp Lys His Val Thr Tyr Asn Ala Glu Arg Ser Arg  
 545 550 555 560

Ser Ser Ser Arg Arg Arg Ser Ser Ser Thr Ala Pro Pro Thr Ser  
 565 570 575

Ser Glu Ser Ser  
 580

( 2 ) 配列番号 3 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 553 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..553

( C ) 他の情報 : / 注 = “ ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 3 ( rSK3 ) の N - 末端切断された形 ”

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

( B ) 位置 : 109..436

( C ) 他の情報 : / 注 = “ rSK3 のコア領域 ”

( xi ) 配列 : 配列番号 3 :

Met Ser Ser Cys Lys Tyr Ser Gly Gly Val Met Lys Pro Leu Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Ser Arg Arg Asn Leu Ile Glu Ala Glu Pro Glu Gly Gln  
 20 25 30

Pro Leu Gln Leu Phe Ser Pro Ser Asn Pro Pro Glu Ile Ile Ile Ser  
 35 40 45

Ser Arg Glu Asp Asn His Ala His Gln Thr Leu Leu His His Pro Asn  
 50 55 60

Ala Thr His Asn His Gln His Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ser Thr Thr  
 65 70 75 80 10

Phe Pro Lys Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Ile Gly Tyr Lys Leu  
 85 90 95

Gly His Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr  
 100 105 110

Ala Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met Val Ile Glu Thr  
 115 120 125

Glu Leu Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Lys Asp Ser Met Phe Ser Leu Ala  
 130 135 140

Leu Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ile Ile Leu Leu Gly Leu Ile  
 145 150 155 160 20

Ile Ala Tyr His Thr Arg Glu Val Gln Leu Phe Val Ile Asp Asn Gly  
 165 170 175

Ala Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Tyr Glu Arg Ile Leu Tyr Ile  
 180 185 190

Ser Leu Glu Met Leu Val Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Gly Glu Tyr  
 195 200 205

Lys Phe Phe Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Ser Tyr Thr Pro Ser Arg  
 210 215 220  
 Ala Glu Ala Asp Val Asp Ile Ile Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Tyr Leu Ile Ala Arg Val Met Leu Leu His Ser Lys Leu Phe Thr  
 245 250 255  
 Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile Asn Phe Asn  
 260 265 270  
 Thr Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val 10  
 275 280 285  
 Leu Leu Met Phe Ser Ile Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val  
 290 295 300  
 Arg Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Gln Gln Asp Val Thr Ser Asn Phe  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr  
 325 330 335  
 Gly Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu  
 340 345 350  
 Thr Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val 20  
 355 360 365  
 Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe  
 370 375 380  
 Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Ile Lys Asn Ala Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Lys Leu Leu Lys  
 405 410 415  
 Lys Ile Asp His Ala Lys Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln  
 420 425 430  
 Ala Ile His Gln Leu Arg Gly Val Lys Met Glu Gln Arg Lys Leu Ser 30  
 435 440 445  
 Asp Gln Ala Asn Thr Leu Val Asp Leu Ser Lys Met Gln Asn Val Met  
 450 455 460  
 Tyr Asp Leu Ile Thr Glu Leu Asn Asp Arg Ser Glu Asp Leu Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Gln Ile Gly Ser Leu Glu Ser Lys Leu Glu His Leu Thr Ala Ser Phe  
 485 490 495  
 Asn Ser Leu Pro Leu Leu Ile Ala Asp Thr Leu Arg Gln Gln Gln Gln  
 500 505 510 515  
 Gln Leu Leu Thr Ala Phe Val Glu Ala Arg Gly Ile Ser Val Ala Val  
 515 520 525  
 Gly Thr Ser His Ala Pro Pro Ser Asp Ser Pro Ile Gly Ile Ser Ser  
 530 535 540  
 Thr Ser Phe Pro Glu Phe Leu Ile Phe  
 545 550

( 2 ) 配列番号 4 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 458 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

50

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..458

( C ) 他の情報 : / 注 = “ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 1 ( rSK1 ) ”

( xi ) 配列 : 配列番号 4 :

|   |    |
|---|----|
| Ser Gly Lys Pro Pro Thr Val Ser His Arg Leu Gly His Arg Arg Ala | 10 |
| 1 5 10 15   |    |

|   |  |
|---|--|
| Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly |  |
| 20 25 30  |  |

|   |  |
|---|--|
| Met Phe Gly Ile Val Val Met Val Thr Glu Thr Glu Leu Ser Trp Gly |  |
| 35 40 45  |  |

|   |  |
|---|--|
| Val Tyr Thr Lys Glu Ser Leu Cys Ser Phe Ala Leu Lys Cys Leu Ile |  |
| 50 55 60  |  |

|   |  |
|---|--|
| Ser Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Gly Leu Val Ile Leu Tyr His Ala |  |
| 65 70 75 80   |  |

|   |  |
|---|--|
| Arg Glu Ile Gln Leu Phe Leu Val Asp Asn Gly Ala Asp Asp Trp Arg |  |
| 85 90 95  |  |

|   |  |
|---|--|
| Ile Ala Met Thr Trp Glu Arg Val Ser Leu Ile Ser Leu Glu Leu Ala |  |
| 100 105 110   |  |

|   |  |
|---|--|
| Val Cys Ala Ile His Pro Val Pro Gly His Tyr Arg Phe Thr Trp Thr |  |
| 115 120 125   |  |

|   |  |
|---|--|
| Ala Arg Leu Ala Phe Ser Leu Val Pro Ser Ala Ala Glu Ala Asp Val |  |
| 130 135 140   |  |

|   |  |
|---|--|
| Asp Val Leu Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg Leu Tyr Leu Leu Ala |  |
| 145 150 155 160   |  |

10

20

30

Arg Val Met Leu Leu His Ser Arg Ile Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg  
 165 170 175  
 Ser Ile Gly Ala Leu Asn Arg Val Thr Phe Asn Thr Arg Phe Val Thr  
 180 185 190  
 Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val Leu Leu Val Phe Ser  
 195 200 205  
 Ile Ser Ser Trp Ile Val Ala Ala Trp Thr Val Arg Val Cys Glu Arg  
 210 215 220  
 Tyr His Asp Lys Gln Glu Val Thr Ser Asn Phe Leu Gly Ala Met Trp 10  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro  
 245 250 255  
 His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu Thr Gly Ile Met Gly  
 260 265 270  
 Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu  
 275 280 285  
 Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met Met Asp Thr Gln  
 290 295 300  
 Leu Thr Lys Arg Val Lys Asn Ala Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr 20  
 305 310 315 320  
 Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Arg Leu Val Lys Lys Pro Asp Gln Ser  
 325 330 335  
 Arg Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala Ile His Gln Ala  
 340 345 350  
 Gln Lys Leu Arg Thr Val Lys Ile Glu Gln Gly Lys Val Asn Asp Gln  
 355 360 365  
 Ala Asn Thr Leu Ala Asp Leu Ala Lys Ala Gln Ser Ile Ala Tyr Glu  
 370 375 380  
 Val Val Ser Glu Leu Gln Ala Gln Gln Glu Glu Leu Glu Ala Arg Leu 30  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Leu Glu Ser Arg Leu Asp Val Leu Gly Ala Ser Leu Gln Ala  
 405 410 415  
 Leu Pro Ser Leu Ile Ala Gln Ala Ile Cys Pro Leu Pro Pro Pro Trp  
 420 425 430  
 Pro Gly Pro Ser His Leu Thr Thr Ala Ala Gln Ser Pro Gln Ser His  
 435 440 445  
 Trp Leu Pro Thr Thr Ala Ser Asp Cys Gly  
 450 455

40

( 2 ) 配列番号 5 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎮の数 : 一本鎮

( D ) トポロジー : 直鎮状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 5 :

ATGCCGGGTC CCCGGCGGGC CTGC

24

( 2 ) 配列番号 6 についての情報 :

50

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 6 :

TCACCCGCAG TCCGAGGGGG CCAC

24

( 2 ) 配列番号 7 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 7 :

ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CGGG

24

( 2 ) 配列番号 8 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の 塩基対

20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 8 :

CTAGCTACTC TCAGATGAAG TTGG

24

( 2 ) 配列番号 9 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の 塩基対

30

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 9 :

ATGAGCTCCT GCAAATACAG CGGT

24

( 2 ) 配列番号 10 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20 個の 塩基対

40

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号 10 :

TTAGCAACTG CTTGAACCTTG

20

( 2 ) 配列番号 11 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24 個の 塩基対

50

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号11 :

TCAGGGAAGC CCCCCACCGT CAGT

24

( 2 ) 配列番号12についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号12 :

TCACCCACAG TCTGATGCCG TGTT

10

24

( 2 ) 配列番号13についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1683個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 配列の種類 : cDNA

20

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1683

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 1 ( hSK 1 ) cDNA ”

( xi ) 配列 : 配列番号13 :

|  |      |
|--|------|
| ATGCCGGGTC CCCGGGCGGC CTGCAGCGAG CCCAACCCCT GCACCCAGGT AGTCATGAAC  | 60   |
| AGCCCACAGCT ACAATGGCAG CGTGGGGCGG CGCTGGCA GCGGGCCGGG CGCCCTGGGA   | 120  |
| CGAGACCCTC CGGACCCTGA GGCGGCCAC CCCCCACAAC CCCCACAG CCCGGCCTC      | 180  |
| CAGGTGGTAG TGGCCAAGAG TGAGCCAGCC CGGCCCTCAC CGGCAGCCC CGGGGGCAG    | 240  |
| CCCCAGGACC AGGACGATGA CGAGGATGAT GAGGAAGATG AGGCCGGCAG GCAGAGAGCC  | 300  |
| TCGGGGAAAC CCTCAAATGT GGGCCACCGC CTGGGCCACC GCGGGCGCT CTTGAGAAG,   | 360  |
| CGGAAGCGCC TCAGCGACTA TGCCCTCATT TTGGCATGT TTGGCATCGT CGTCATGGTG   | 420  |
| ACGGAGACCG AGCTGTCTG GGGGGTGTAC ACCAAGGAGT CTCTGTACTC ATTGCACTC    | 480  |
| AAATGCCTCA TGAGCCTCTC CACGGCCATC CTGCTGGTC TCGTTGTCT CTACCATGCC    | 540  |
| CGGGAGATCC AGCTGTTCAT GGTGGACAAC GGGGCTGATG ACTGGCGAT CGCCATGACC   | 600  |
| TGCGAGCGCG TGTTCTCAT CTGGCTAGAG CTGGCAGTGT GCGCCATTCA CCCGGTGGCC   | 660  |
| GCCCACCTACC GTTACACGTG GACGGCGCGG CTGGCCTTCA CGTACGCGCC CTGGTGGCC  | 720  |
| GAGGCCGACG TGGACGTGCT GCTGTCCATC CCCATGTTCC TGCGCTCTA CCTGCTGGC    | 780  |
| CGGGTGATGC TACTGCACAG CAAAATCTTC ACGGACGCCT CGAGCCGAG CATCGGGGCC   | 840  |
| CTCAACAAGA TCACCTTCAA CACGCGCTTC GTCATGAAGA CACTCATGAC CATCTGCC    | 900  |
| GGCACCGTGC TGCTGGTCTT CAGCATCTCC TCCTGGATCA TCGCAGCCTG GACCGTGC    | 960  |
| GTCTGCGAGA GGTACCAACGA CAAGCAGGAA GTGACCAGCA ACTTCCTGGG GGCCATGTGG | 1020 |
| CTGATTTCCA TCACCTTCTT CTCCATTGGC TACGGCGACA TGGTGCCCA CACCTACTGC   | 1080 |
| GGGAAGGGTG TGTGCCTGCT CACTGGCATE ATGGGAGCTG GCTGTACCGC GCTCGTGGTG  | 1140 |
| GCTGTGGTGG CTCGGAAAGCT GGAGCTCACC AAGGCTGAGA AGCACGTGCA CAACTTCATG | 1200 |
| ATGGACACTC AGCTCACCAA GCGGGTAAGA AACGCCGCTG CTAACGTTCT CAGGGAGACG  | 1260 |
| TGGCTCATCT ACAAAACATAC CAGGCTGGTG AAGAAGCCAG ACCAACGCCG GGTCGGAAA  | 1320 |
| CACCAGCGTA AGTTCTTCCA AGCCATCCAT CAGGCTCAGA AGCTCCGGAG TGTGAAGATC  | 1380 |
| GAGCAAGGGA AGCTGAACGA CCAGGCTAAC ACGCTTACCG ACCTAGCCAA GACCCAGACC  | 1440 |
| GTCATGTACG ACCTTGTATC GGAGCTGCAC GCTCAGCACG AGGAGCTGGA GGCCCGCCTG  | 1500 |
| GCCACCCCTGG AAAGCCGCTT GGATGCGCTG GGTGCCTCTC TACAGGCCCT GCCTGGCCTC | 1560 |
| ATCGCCCAAG CCATACGCC ACCCCCCGCTT CCCCTGCCTC CCAGGGCCGG CCCCCGGCCCC | 1620 |
| CAAGACCAGG CAGCCCGGAG CTCCCCCTGC CGGTGGACGC CCGTGGCCCC CTCGGACTGC  | 1680 |
| GGG  | 1683 |

( 2 ) 配列番号14についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1374 個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎮の数 : 一本鎮

( D ) トポロジー : 直鎮状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1374

( C ) 他の情報 : / 注 = “ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 1 ( rSK 1 ) cDNA ”

( xi ) 配列 : 配列番号14 :

|             |             |            |             |            |            |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| TCAGGGAAAGC | CCCCGACCGT  | CAGTCACCGC | CTGGGCCACC  | GTAGGGCCCT | CTTCGAGAAG | 60   |
| CGTAAACGAC  | TCAGTGACTA  | TGCACTCATC | TTTGGCATGT  | TCGGGATTGT | CGTCATGGTG | 120  |
| ACAGAAACAG  | AGCTGTCCTG  | GGGTGTGTAC | ACCAAGGAGT  | CTCTGTGCTC | ATTGCCCTG  | 180  |
| AAATGCCTAA  | TCAGGCTCTC  | CACTGTCATC | CTGCTTGGCC  | TTGTCATCCT | CTACCACGCC | 240  |
| CGAGAGATCC  | AGCTGTTCCCT | GGTGGACAAT | GGTGGCGATG  | ACTGGCGAT  | TGCCATGACG | 300  |
| TGGGAGCGAG  | TGTCCCTGAT  | CTCGCTGGAG | TTGGCTGTGT  | GTGCCATCCA | CCCAGTGCCT | 360  |
| GGCCACTACC  | GCTTCACATG  | GACGGCGCGG | CTGGCCTTCT  | CCCTGGTGCC | GTCAGCAGCC | 420  |
| GAGGC GGATG | TGGATGTGCT  | TCTGTCCATC | CCCATGTTTC  | TGCGCCTCTA | TCTGCTGGCT | 480  |
| CGGGTCATGC  | TCCTGACACAG | CCGCATCTTC | ACGGACGCAT  | CCAGTCGCAG | CATCGGAGCC | 540  |
| CTGAACCGTG  | TCACCTTCAA  | CACACGCTTT | GTCACCAAGA  | CACTCATGAC | CATCTGCCCT | 600  |
| GGCACCGTGC  | TGTTGGTCTT  | CAGCATCTCC | TCCTGGATCG  | TCGCTGCATG | GACAGTGCAG | 660  |
| GTGTGTGAGA  | GGTACCATGA  | TAAACAGGAA | GTGACCAGCA  | ACTTCCTGGG | GGCCATGTGG | 720  |
| CTCATCTCCA  | TTACCTTCCT  | GTCCATCGGC | TACGGGGACA  | TGGTGCAGCA | CACCTACTGT | 780  |
| GGGAAGGGCG  | TGTGTCTGCT  | CACCGGCATC | ATGGGAGCAG  | GCTGCACTGC | ACTCGTGGTG | 840  |
| GCCGTCGTGG  | CCCGCAAGTT  | GGAACTCACC | AAGGCTGAGA  | AACACGTGCA | CAACTTCATG | 900  |
| ATGGACACAC  | AGCTCACCAA  | CGGGGTTAAA | AACGCCGCTG  | CAAACGTTCT | CAGGGAGACA | 960  |
| TGGCTCATCT  | ACAAACACAC  | CAGGCTAGTG | AAGAAGCCAG  | ACCAAAGCCG | GGTTCGGAAA | 1020 |
| CACCAGCGTA  | AGTTCTTCA   | GGCCATCCAT | CAGGCGCAGA  | AGCTCCGGAC | TGTGAAGATT | 1080 |
| GAACAAGGGA  | AGGTGAATGA  | TCAGGCCAAC | ACGCTGGCTG  | ACCTGGCCAA | GGCACAGAGC | 1140 |
| ATCGCATATG  | AGGTGGTGTC  | GGAGCTGCAG | GCCCAGCAGG  | AGGAGTTGGA | GGCCCGTCTG | 1200 |
| GCTGCCCTGG  | AGAGCCGCCT  | GGATGTCCTA | GGCGCCTCCC  | TGCAGGCCCT | ACCAAGTCTC | 1260 |
| ATAGCCCAAG  | CCATATGCC   | TCTACCACCA | CCCTGGCCCG  | GGCCCAGTCA | CCTGACCACA | 1320 |
| GCCGCCAGA   | GCCCACAAAG  | CCACTGGCTG | CCCACCAACGG | CATCAGACTG | TGGG       | 1374 |

( 2 ) 配列番号15についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1740 個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎮の数 : 一本鎮

( D ) トポロジー : 直鎮状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1740

( C ) 他の情報 : / 注 = “ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 2 ( rSK 2 ) cDNA ”

( xi ) 配列 : 配列番号15 :

30

40

|  |      |
|--|------|
| ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CGGGGGCGTC ATGCGTCCGC TCAGCAACTT GAGCTCGTCC  | 60   |
| CGCCCGAACCG TGCACGAGAT GGACTCAGAG GCTCAGCCCC TGCAGCCCC AGCGTCGGTT  | 120  |
| GTAGGAGGAG GTGGTGGTGC GTCTCTCCCCG TCTGCTGCCG CGCGCGCCTC ATCTCAGCC  | 180  |
| CCAGAGATCG TGGTGTCTAA GCCGGAGCAC AACAAATTCTA ACAACCTGGC GCTCTACGGA | 240  |
| ACTGGCGGCC GAGGCAGCAC CGGAGGCGGC GGCAGGCAGCG GCGGCGGCCG CGGGCGCAGC | 300  |
| GGGCATGGCA GCAGCAGCGG CACTAAGTCC AGCAAAAAGA AGAACCGAGAA CATCGGCTAT | 360  |
| AAGCTGGCC ATCGGGTGC CCTGTTGAG AAGCGCAAGC GGCTCAGCGA CTATGCGCTC     | 420  |
| ATCTTCGGCA TGTCGGCAT CGTGGTCATG GTCATCGAGA CCGAGCTGTC GTGGGGCGCC   | 480  |
| TACGACAAGG CGTCGCTGTA TTCTTAGCT CTGAAATGCC TTATCAGTCT CTCCACGATC   | 540  |
| ATCCTGCTTG GTCTGATCAT CGTATAACCAC GCCAGGGAAA TACAGTTATT CATGGTGGAC | 600  |
| AATGGAGCAG ATGACTGGAG AATAGCCATG ACTTATGAAC GTATTTCTT CATCTGCTTG   | 660  |
| GAAATACTGG TGTGTGCTAT TCATCCCAC CCTGGGAATT ATACGTTCAC ATGGACAGCC   | 720  |
| CGGCTTGCCT TCTCCTATGC CCCTTCCACA ACCACTGCAG ACGTGGATAT TATTTATCT   | 780  |
| ATACCAATGT TCTTAAGACT CTATCTGATT GCCAGAGTCA TGCTATTACA TAGCAAACCTT | 840  |
| TTCAACGATG CCTCCTCTAG AAGCATTGGG GCACCTAATA AGATAAAACTT CAATACGCGT | 900  |
| TTTGTATGAGA AGACTTAAT GACTATCTGC CCAGGAAC TGCTCTGGT TTTTAGTATC     | 960  |
| TCGTTATGGA TAATTGCCGC ATGGACTGTC CGAGCTTGTG AAAGGTACCA TGATCAACAG  | 1020 |
| GATGTCACTA GCAACTTCCT TGGAGCAATG TGGTTGATAT CAATAACTTT TCTCTCCATT  | 1080 |
| GGTTATGGTG ACATGGTACC TAACACATAC TGTGGAAAG GAGTCTGTT GCTTACCGGA    | 1140 |
| ATAATGGGTG CAGGTTGCAC AGCCTTGGTG GTAGCCGTAG TGGCAAGGAA GCTAGAACTT  | 1200 |
| ACCAAAGCAG AAAAGCATGT GCACAAATTTC ATGATGGATA CTCAGCTGAC CAAAAGAGTA | 1260 |
| AAAAACGCAG CCGCCAATGT ACTCAGGGAA ACGTGGTTAA TCTACAAAAA CACAAAGCTA  | 1320 |
| GTGAAAAAGA TCGACCATGC AAAAGTAAGG AAGCATCAAC GGAAATTCTT ACAAGCTATT  | 1380 |
| CATCAATTAA GAAGTGTGAA GATGGAACAG AGGAAACTGA ATGACCAAGC GAATACGCTA  | 1440 |
| GTGGATCTGG CAAAGACCCA AGATATCATG TATGATATGA TTTCCGACTT AAATGTAAGG  | 1500 |
| AGTGAAGACT TTGAGAAAAG GATCGTCACC CTGGAAACAA ATTAGAAC TTTGATTGGT    | 1560 |
| AGCATTCTATG CCCTCCCTGG GCTTATCAGC CAGACCATCA GACAGCAGCA AAGGGACTTC | 1620 |
| ATAGAGACAC AGATGGAGAA CTATGACAAG CATGTCACCT ACAATGCTGA GCGTTCCGG   | 1680 |
| TCCTCGTCCA GGAGGGCGCG GTCTCTCC ACAGCGCCAC CAACTTCATC TGAGAGTAGC    | 1740 |

( 2 ) 配列番号16についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1659 個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1659

( C ) 他の情報 : / 注 = " ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウム "

10

20

30

40

50

チャネルタンパク質3(rSK3)のN-末端切断されたcDNA"

(xi)配列:配列番号16:

|   |      |    |
|---|------|----|
| ATGAGCTCCT GCAAATACAG CGGTGGGTC ATGAAGCCCC TCAGCCGCCT CAGCGCCTCT    | 60   |    |
| CGGAGAAACC TTATCGAGGC CGAGCCTGAG GGCCAACCCC TCCAGCTCTT CAGTCCCAGC   | 120  |    |
| AACCCCCCAG AGATTATCAT CTCCCTCCAGG GAGGATAACC ATGCCACCA GACTCTGCTC   | 180  |    |
| CATCACCCCA ACGCTACCCA CAACCACCAAG CATGCCGGCA CCAGTGCTGG CAGCACCCACC | 240  |    |
| TTCCCCAAAG CCAACAAGCG GAAAAACCAA AACATTGGCT ATAAGCTGGG GCACAGGAGG   | 300  |    |
| GCCCTGTTG AAAAGAGAAA GCGACTGAGT GACTATGCTC TGATTTTGG GATGTTGGA      | 360  | 10 |
| ATTGTTGTTA TGGTGATAGA GACCGAACIG TCTTGGGTT TGTACTCAAA GGATTCCATG    | 420  |    |
| TTTCGTTGG CCCTGAAATG CCTTATCAGT TTATCCACCA TCATCCTGCT TGGTTGATC     | 480  |    |
| ATCGCCTACC ACACAAGGGA AGTACAGCTC TTTGTGATCG ACAATGGTGC AGATGACTGG   | 540  |    |
| CGGATAGCCA TGACCTATGA GCGCATCCTC TACATCAGCC TGGAGATGCT GGTGTGCGCC   | 600  |    |
| ATCCACCCCA TTCCTGGAGA GTACAAGTTC TTCTGGACGG CACGCCCTGGC CTTCTCCTAC  | 660  |    |
| ACCCCCCTCTC GGGCAGAGGC TGACGTGGAC ATTATTCTGT CCATCCCCAT GTTCTTGC    | 720  |    |
| CTATACTGA TCGCCCGAGT CATGCTGCTA CATAGCAAGC TCTTCACGGA TGCCTCATCC    | 780  | 20 |
| CGAACGCATCG GGGCCCTCAA CAAGATCAAC TTCAACACCC GATTGTCAT GAAGACGCTC   | 840  |    |
| ATGACCATCT GCCCGGGCAC GGTGCTGCTA ATGTTCAGCA TCTCTCTGTG GATCATCGCT   | 900  |    |
| GCCTGGACTG TGAGAGTCTG TGAAAGGTAC CATGACCAGC AGGACGTAAC TAGTAAC      | 960  |    |
| CTGGGTGCCA TGTGGCTCAT CTCCATCACG TTCCCTTCCA TTGGCTATGG GGACATGGTG   | 1020 |    |
| CCCCACACAT ACTGTGGAA AGGTGCTGT CTTCTCACTG GCATCATGGG TGCAGGCTGC     | 1080 |    |
| ACTGCCCTCG TGGTAGCTGT GGTTGCCCGG AAGCTCGAAC TCACCAAAGC AGAGAAGCAT   | 1140 |    |
| GTGCACAAC TCATGATGGA CACTCAGCTC ACCAAACGGA TCAAGAACGC TGCCGCCAAT    | 1200 |    |
| GTCCTCCGGG AAACATGGCT GATCTACAAA CACACAAAGC TGCTAAAGAA GATTGACCAC   | 1260 | 30 |
| GCCAAAGTCA GGAAACACCA GAGGAAGTTC CTCCAAGCTA TTCACCAACT GAGGGGTGTC   | 1320 |    |
| AAGATGGAAC AAAGGAAGCT GAGTGACCAA GCCAACACCC TGGTGGACCT TTCCAAGATG   | 1380 |    |
| CAGAACGTCA TGTATGACTT GATCACGGAG CTCAACGACC GGAGTGAAGA CCTGGAAAAG   | 1440 |    |
| CAGATTGGCA GCCTGGAATC CAAGCTGGAG CACCTCACAG CCAGCTTCAA TTCCCTGCC    | 1500 |    |
| CTGCTCATCG CAGACACCCCT GCGCAACACAG CAGCAGCAGC TGCTCACTGC CTTCGTGGAG | 1560 |    |
| GCCCGGGGCA TCAGTGTGGC TGTGGGAAC AGCCACGCC CTCCTCTGA CAGCCCTATC      | 1620 |    |
| GGGATCAGCT CCACCTCTT CCCGGAATTC CTAATATTC                           | 1659 | 40 |

(2)配列番号17についての情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:10個のアミノ酸

(B)型:アミノ酸

(C)鎖の数:

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:ペプチド

(xi)配列:配列番号17:

Leu Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly Met

1

5

10

( 2 ) 配列番号18についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号18 :

Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala Ile His Gln  
1                5                            10

10

( 2 ) 配列番号19についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 579個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..579

20

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 2 ( hSK 2 ) ”

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

( B ) 位置 : 134..461

( C ) 他の情報 : / 注 = “ hSK 2 のコア領域 ”

( xi ) 配列 : 配列番号19 :

|   |     |     |     |    |
|---|-----|-----|-----|----|
| Met Ser Ser Cys Arg Tyr Asn Gly Gly Val Met Arg Pro Leu Ser Asn |     |     |     |    |
| 1   | 5   | 10  | 15  |    |
| Leu Ser Ala Ser Arg Arg Asn Leu His Glu Met Asp Ser Glu Ala Gln |     |     |     |    |
| 20  | 25  | 30  |     |    |
| Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ser Val Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser     |     |     |     |    |
| 35  | 40  | 45  |     |    |
| Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ser Ser Ala Pro         |     |     |     |    |
| 50  | 55  | 60  |     |    |
| Glu Ile Val Val Ser Lys Pro Glu His Asn Asn Ser Asn Asn Leu Ala |     |     |     |    |
| 65  | 70  | 75  | 80  | 10 |
| Leu Tyr Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly         |     |     |     |    |
| 85  | 90  | 95  |     |    |
| Gly Gly Ser Gly His Gly Ser Ser Ser Gly Thr Lys Ser Ser Lys Lys |     |     |     |    |
| 100   | 105 | 110 |     |    |
| Lys Asn Gln Asn Ile Gly Tyr Lys Leu Gly His Arg Arg Ala Leu Phe |     |     |     |    |
| 115   | 120 | 125 |     |    |
| Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly Met Phe |     |     |     |    |
| 130   | 135 | 140 |     |    |
| Gly Ile Val Val Met Val Ile Glu Thr Glu Leu Ser Trp Gly Ala Tyr |     |     |     |    |
| 145   | 150 | 155 | 160 | 20 |
| Asp Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Ala Leu Lys Cys Leu Ile Ser Leu |     |     |     |    |
| 165   | 170 | 175 |     |    |
| Ser Thr Ile Ile Leu Leu Gly Leu Ile Ile Val Tyr His Ala Arg Glu |     |     |     |    |
| 180   | 185 | 190 |     |    |
| Ile Gln Leu Phe Met Val Asp Asn Gly Ala Asp Asp Trp Arg Ile Ala |     |     |     |    |
| 195   | 200 | 205 |     |    |
| Met Thr Tyr Glu Arg Ile Phe Phe Ile Cys Leu Glu Ile Leu Val Cys |     |     |     |    |
| 210   | 215 | 220 |     |    |
| Ala Ile His Pro Ile Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Thr Trp Thr Ala Arg |     |     |     |    |
| 225   | 230 | 235 | 240 | 30 |

|   |     |     |           |
|---|-----|-----|-----------|
| Leu Ala Phe Ser Tyr Ala Pro Ser Thr Thr Thr Ala Asp Val Asp Ile |     |     |           |
| 245   | 250 | 255 |           |
| Ile Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg Leu Tyr Leu Ile Ala Arg Val |     |     |           |
| 260   | 265 | 270 |           |
| Met Leu Leu His Ser Lys Leu Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile |     |     |           |
| 275   | 280 | 285 |           |
| Gly Ala Leu Asn Lys Ile Asn Phe Asn Thr Arg Phe Val Met Lys Thr |     |     |           |
| 290   | 295 | 300 |           |
| Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val Leu Leu Val Phe Ser Ile Ser |     |     |           |
| 305   | 310 | 315 | 10<br>320 |
| Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val Arg Ala Cys Glu Arg Tyr His |     |     |           |
| 325   | 330 | 335 |           |
| Asp Gln Gln Asp Val Thr Ser Asn Phe Leu Gly Ala Met Trp Leu Ile |     |     |           |
| 340   | 345 | 350 |           |
| Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Asn Thr |     |     |           |
| 355   | 360 | 365 |           |
| Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu Thr Gly Ile Met Gly Ala Gly |     |     |           |
| 370   | 375 | 380 |           |
| Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr |     |     |           |
| 385   | 390 | 395 | 20<br>400 |
| Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met Met Asp Thr Gln Leu Thr |     |     |           |
| 405   | 410 | 415 |           |
| Lys Arg Val Lys Asn Ala Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu     |     |     |           |
| 420   | 425 | 430 |           |
| Ile Tyr Lys Asn Thr Lys Leu Val Lys Ile Asp His Ala Lys Val     |     |     |           |
| 435   | 440 | 445 |           |
| Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala Ile His Gln Leu Arg Ser |     |     |           |
| 450   | 455 | 460 |           |
| Val Lys Met Glu Gln Arg Lys Leu Asn Asp Gln Ala Asn Thr Leu Val |     |     |           |
| 465   | 470 | 475 | 30<br>480 |
| Asp Leu Ala Lys Thr Gln Asn Ile Met Tyr Asp Met Ile Ser Asp Leu |     |     |           |
| 485   | 490 | 495 |           |
| Asn Glu Arg Ser Glu Asp Phe Glu Lys Arg Ile Val Thr Leu Glu Thr |     |     |           |
| 500   | 505 | 510 |           |
| Lys Leu Glu Thr Leu Ile Gly Ser Ile His Ala Leu Pro Gly Leu Ile |     |     |           |
| 515   | 520 | 525 |           |
| Ser Gln Thr Ile Arg Gln Gln Arg Asp Phe Ile Glu Ala Gln Met     |     |     |           |
| 530   | 535 | 540 | 40        |
| Glu Ser Tyr Asp Lys His Val Thr Tyr Asn Ala Glu Arg Ser Arg Ser |     |     |           |
| 545   | 550 | 555 | 560       |
| Ser Ser Arg Arg Arg Ser Ser Ser Thr Ala Pro Pro Thr Ser Ser     |     |     |           |
| 565   | 570 | 575 |           |
| Glu Ser Ser   |     |     |           |
| ( 2 ) 配列番号20についての情報 :   |     |     |           |
| ( i ) 配列の特徴 :   |     |     |           |
| ( A ) 長さ : 557個のアミノ酸  |     |     |           |
| ( B ) 型 : アミノ酸  |     |     |           |
| ( C ) 鎮の数 :   |     |     | 50        |

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..557

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 3 ( hSK3 ) の N - 末端切断された形”

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

( B ) 位置 : 109..436

10

( C ) 他の情報 : / 注 = “ hSK3 のコア領域 ”

( xi ) 配列 : 配列番号20 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Ser | Cys | Lys | Tyr | Ser | Gly | Gly | Val | Met | Lys | Pro | Leu | Ser | Arg |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Ala | Ser | Arg | Arg | Asn | Leu | Ile | Glu | Ala | Glu | Thr | Glu | Gly | Gln |
|     |     |     |     |     | 20  |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Gln | Leu | Phe | Ser | Pro | Ser | Asn | Pro | Pro | Glu | Ile | Val | Ile | Ser |
|     |     |     |     |     | 35  |     |     | 40  |     |     | 45  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Arg | Glu | Asp | Asn | His | Ala | His | Gln | Thr | Leu | Leu | His | His | Pro | Asn |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Thr | His | Asn | His | Gln | His | Ala | Gly | Thr | Thr | Ala | Ser | Ser | Thr | Thr |
|     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Lys | Ala | Asn | Lys | Arg | Lys | Asn | Gln | Asn | Ile | Gly | Tyr | Lys | Leu |
|     |     |     |     |     | 85  |     |     | 90  |     |     | 95  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | His | Arg | Arg | Ala | Leu | Phe | Glu | Lys | Arg | Lys | Arg | Leu | Ser | Asp | Tyr |
|     |     |     |     |     | 100 |     |     | 105 |     |     | 110 |     |     |     |     |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Ala Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met Val Ile Glu Thr |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| Glu Leu Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Lys Asp Ser Met Phe Ser Leu Ala |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Leu Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ile Ile Leu Leu Gly Leu Ile |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Ile Ala Tyr His Thr Arg Glu Val Gln Leu Phe Val Ile Asp Asn Gly |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Ala Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Tyr Glu Arg Ile Leu Tyr Ile |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 | 10  |
| Ser Leu Glu Met Leu Val Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Gly Glu Tyr |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Lys Phe Phe Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Ser Tyr Thr Pro Ser Arg |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Ala Glu Ala Asp Val Asp Ile Ile Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Leu Tyr Leu Ile Ala Arg Val Met Leu Leu His Ser Lys Leu Phe Thr |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile Asn Phe Asn |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 | 20  |
| Thr Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Leu Leu Val Phe Ser Ile Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| Arg Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Gln Gln Asp Val Thr Ser Asn Phe |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Leu Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr |     |     |     |
| 325   | 330 | 335 |     |
| Gly Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu |     |     |     |
| 340   | 345 | 350 | 30  |
| Thr Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val |     |     |     |
| 355   | 360 | 365 |     |
| Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe |     |     |     |
| 370   | 375 | 380 |     |
| Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Ile Lys Asn Ala Ala Ala Asn |     |     |     |
| 385   | 390 | 395 | 400 |
| Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Lys Leu Leu Lys |     |     |     |
| 405   | 410 | 415 | 40  |
| Lys Ile Asp His Ala Lys Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln |     |     |     |
| 420   | 425 | 430 |     |
| Ala Ile His Gln Leu Arg Ser Val Lys Met Glu Gln Arg Lys Leu Ser |     |     |     |
| 435   | 440 | 445 |     |
| Asp Gln Ala Asn Thr Leu Val Asp Leu Ser Lys Met Gln Asn Val Met |     |     |     |
| 450   | 455 | 460 |     |

Tyr Asp Leu Ile Thr Glu Leu Asn Asp Arg Ser Glu Asp Leu Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Gln Ile Gly Ser Leu Glu Ser Lys Leu Glu His Leu Thr Ala Ser Phe  
 485 490 495  
 Asn Ser Leu Pro Leu Leu Ile Ala Asp Thr Leu Arg Gln Gln Gln  
 500 505 510  
 Gln Leu Leu Ser Ala Ile Ile Glu Ala Arg Gly Val Ser Val Ala Val  
 515 520 525  
 Gly Thr Thr His Thr Pro Ile Ser Asp Ser Pro Ile Gly Val Ser Ser 10  
 530 535 540  
 Thr Ser Phe Pro Thr Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Ser Cys  
 545 550 555

( 2 ) 配列番号21についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1740個の核酸

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

20

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1740

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 ( hSK2 ) cDNA ”

( xi ) 配列 : 配列番号21 :

|  |      |
|--|------|
| ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CGGGGGCGTC ATGCAGCCGC TCAGCAACTT GAGCGCGTCC  | 60   |
| CGCCGGAAACC TGCACGAGAT GGACTCAGAG GCGCAGCCCC TGCAGCCCC CGCGTCTGTC  | 120  |
| GGAGGAGGTG GCGGCGCGTC CTCCCCGTCT GCAGCCGCTG CCGCCGCCGC CGCTGTTCG   | 180  |
| TCTCTAGCCC CCGAGATCGT GGTGTCTAAG CCCGAGCACA ACAACTCAA CAACCTGGCG   | 240  |
| CTCTATGGAA CGGGCGCGG AGGCAGCACT GGAGGAGGCG GCGGCGGTGG CGGGAGCGGG   | 300  |
| CACGGCAGCA GCAGTGGCAC CAAGTCCAGC AAAAAAGAAAA ACCAGAACAT CGGCTACAAG | 360  |
| CTGGGCCACC GGCGCGCCCT GTTCGAAAAG CGCAAGCGGC TCAGCGACTA CGCGCTCATC  | 420  |
|  | 10   |
| TTCGGCATGT TCGGCATCGT GGTCTGGTC ATCGAGACCG AGCTGTCGTG GGGCGCCTAC   | 480  |
| GACAAGGGCGT CGCTGTATTC CTTAGCTCTG AAATGCCTTA TCAGTCTCTC CACGATCATC | 540  |
| CTGCTCGGTG TGATCATCGT GTACCACGCC AGGGAAATAC AGTTGTTCAT GGTGGACAAT  | 600  |
| GGAGCAGATG ACTGGAGAAT AGCCATGACT TATGAGCGTA TTTTCTTCAT CTGCTTGGAA  | 660  |
| ATACTGGTGT GTGCTATTCA TCCCATAACCT GGGAAATTATA CATTACATG GACGGCCCGG | 720  |
| CTTGCTTCT CCTATGCCCG ATCCACAACC ACCGCTGATG TGGATATTAT TTTATCTATA   | 780  |
| CCAATGTTCT TAAGACTCTA TCTGATTGCC AGAGTCATGC TTTTACATAG CAAACTTTTC  | 840  |
| ACTGATGCCT CCTCTAGAAG CATTGGAGCA CTTAATAAGA TAAACCTCAA TACACGTTTT  | 900  |
| GTTATGAAGA CTTTAATGAC TATATGCCCA GGAACGTGAC TCTTGGTTTT TAGTATCTCA  | 960  |
| TTATGGATAA TTGCCGCATG GACTGTCCGA GCTTGTGAAA GGTACCATGA TCAACAGGAT  | 1020 |
| GTTACTAGCA ACTTCCTTGG AGCGATGTGG TTGATATCAA TAACTTTCT CTCCATTGGT   | 1080 |
| TATGGTGACA TGGTACCTAA CACATACTGT GGAAAAGGAG TCTGCTTACT TACTGGAATT  | 1140 |
| ATGGGTGCTG GTTGCACAGC CCTGGTGGTA GCTGTAGTGG CAAGGAAGCT AGAACTTACC  | 1200 |
| AAAGCAGAAA AACACGTGCA CAATTCATG ATGGATACTC AGCTGACTAA AAGAGTAAA    | 1260 |
| AATGCAGCTG CCAATGTACT CAGGGAAACA TGGCTAATT ACACAAATAC AAAGCTAGTG   | 1320 |
| AAAAAGATAG ATCATGCAA AGTAAGAAA CATCAACGAA AATTCTGCA AGCTATTCT      | 1380 |
| CAATTAAGAA GTGTAAAAT GGAACAGAGG AACTGAATG ACCAAGCAA CACTTTGGTG     | 1440 |
| GACTTGGCAA AGACCCAGAA CATCATGTAT GATATGATTCT GACTCTAAA CGAAAGGAGT  | 1500 |
| GAAGACTTCG AGAAGAGGAT TGTTACCTG GAAACAAAAT TAGAGACTTT GATTGGTAGC   | 1560 |
| ATCCACGCCCT CCCCTGGCT CATAAGCCAG ACCATCAGGC AGCAGCAGAG AGATTCATT   | 1620 |
| GAGGCTCAGA TGGAGAGCTA CGACAAGCAC GTCACCTACA ATGCTGAGCG GTCCCGGTCC  | 1680 |
| TCGTCCAGGA GGCGCGGTGCTCTTCCACA GCACCAACAA CTTCATCAGA GAGTAGCTAG    | 1740 |
|  | 40   |

( 2 ) 配列番号22についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1674個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎮の数 : 一本鎮

( D ) トポロジー : 直鎮状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1674

( C ) 他の情報： / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 3 ( hSK3 ) の N - 末端切断された cDNA ”

( xi ) 配列：配列番号22：

|  |      |
|--|------|
| ATGAGCTCCT GCAAGTATAG CGGTGGGGTC ATGAAGCCCC TCAGCCGCCT CAGCGCCTCC  | 60   |
| CGGAGGAACC TCATCGAGGC CGAGACTGAG GGCCAAACCCC TCCAGCTTT CAGCCCTAGC  | 120  |
| AACCCCCCGG AGATCGTCAT CTCCTCCCGG GAGGACAACC ATGCCACCA GACCCTGCTC   | 180  |
| CATCACCCCA ATGCCACCCA CAACCACCAAG CATGCCGGCA CCACCGCCAG CAGCACCACC | 240  |
| TTCCCCAAAG CCAACAAGCG GAAAAACCAA AACATTGGCT ATAAGCTGGG ACACAGGAGG  | 300  |
| GCCCTGTTG AAAAGAGAAA GCGACTGAGT GACTATGCTC TGATTTTGG GATGTTTGGA    | 360  |
| ATTGTTGTTA TGGTGATAGA GACCGAGCTC TCTTGGGGTT TGTACTCAA GGACTCCATG   | 420  |
| TTTCGTTGG CCCTGAAATG CCTTATCAGT CTGTCCACCA TCATCCTTT GGGCTTGATC    | 480  |
| ATCGCCTACC ACACACGTGA AGTCCAGCTC TTCGTGATCG ACAACGGCGC GGATGACTGG  | 540  |
| CGGATAGCCA TGACCTACGA GCGCATCCTC TACATCAGCC TGGAGATGCT GGTGTGCGCC  | 600  |
| ATCCACCCCA TTCTGGCGA GTACAAGTTC TTCTGGACGG CACGCCTGGC CTTCTCCTAC   | 660  |
| ACACCCCTCCC GGGCGGAGGC CGATGTGGAC ATCACCTGT CTATCCCCAT GTTCTGCGC   | 720  |
| CTGTACCTGA TCGCCCGAGT CATGCTGCTG CACAGCAAGC TCTTCACCGA TGCCTCGTCC  | 780  |
| CGCAGCATCG GGGCCCTCAA CAAGATCAAC TTCAACACCC GCTTTGTCAT GAAGACGCTC  | 840  |
| ATGACCACATC GCCCTGGCAC TGTGCTGCTC GTGTTCAAGCA TCTCTGTG GATCATTGCT  | 900  |
| GCCTGGACCG TCCGTGTCTG TGAAAGGTAC CATGACCAGC AGGACGTAAC TAGTAAC     | 960  |
| CTGGGTGCCA TGTGGCTCAT CTCCATCACA TTCCCTTCCA TTGGTTATGG GGACATGGTG  | 1020 |
| CCCCACACAT ACTGTGGAA AGGTGTCTGT CTCCTCACTG GCATCATGGG TGCAGGCTGC   | 1080 |
| ACTGCCCTTG TGGTGGCCGT GGTGGCCGA AAGCTGGAAC TCACCAAAGC GGAGAACAC    | 1140 |
| GTTCAAACT TCATGATGGA CACTCAGCTC ACCAAGCGGA TCAAGAATGC TGCAGCCAAT   | 1200 |
| GTCCTTCGGG AAACATGGTT AATCTATAAA CACACAAAGC TGCTAAAGAA GATTGACCAT  | 1260 |
| GCCAAAGTGA GGAAACACCA GAGGAAGTTC CTCCAAGCTA TCCACCAGTT GAGGAGCGTC  | 1320 |
| AAGATGGAAC AGAGGAAGCT GAGTGACCAA GCCAACACTC TGGTGGACCT TTCCAAGATG  | 1380 |
| CAGAAATGTCA TGTATGACTT AATCACAGAA CTCAATGACC GGAGCGAAGA CCTGGAGAAG | 1440 |
| CAGATTGGCA GCCTGGAGTC GAAGCTGGAG CATCTCACCG CQAGCTTCAA CTCCCTGCCG  | 1500 |
| CTGCTCATCG CCGACACCCCT GCGCCAGCAG CAGCAGCAGC TCCTGTCTGC CATCATCGAG | 1560 |
| GCCCCGGGTG TCAGCGTGGC AGTGGGCACC ACCCACACCC CAATCTCCGA TAGCCCCATT  | 1620 |
| GGGGTCAGCT CCACCTCCTT CCCGACCCCG TACACAAGTT CAAGCAGTTG CTAA        | 1674 |

( 2 ) 配列番号23についての情報：

( i ) 配列の特徴：

( A ) 長さ：22個の塩基対

( B ) 型：核酸

( C ) 鎖の数：一本鎖

( D ) トポロジー：直鎖状

( ii ) 配列の種類：DNA

( xi ) 配列：配列番号23：

ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CG

22

( 2 ) 配列番号24についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号24 :

CTAGCTACTC TCTGATGAAG TTG

10

23

( 2 ) 配列番号25についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号25 :

ATGAGCTCCT GCAAGTATAG C

20

21

( 2 ) 配列番号26についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 22個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号26 :

TTAGCAACTG CTTGAACCTG TG

30

22

( 2 ) 配列番号27についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 328個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

( B ) 位置 : 1..328

( C ) 他の情報 : / 注 = “アミノ酸位置124~451からのhSK 1 のコア領域”

( xi ) 配列 : 配列番号27 :

40

Leu Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met  
 1 5 10 15  
 Val Thr Glu Thr Glu Leu Ser Trp Gly Val Tyr Thr Lys Glu Ser Leu  
 20 25 30  
 Tyr Ser Phe Ala Leu Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ala Ile Leu  
 35 40 45  
 Leu Gly Leu Val Val Leu Tyr His Ala Arg Glu Ile Gln Leu Phe Met  
 50 55 60  
 Val Asp Asn Gly Ala Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Cys Glu Arg 10  
 65 70 75 80  
 Val Phe Leu Ile Ser Leu Glu Leu Ala Val Cys Ala Ile His Pro Val  
 85 90 95  
 Pro Gly His Tyr Arg Phe Thr Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Thr Tyr  
 100 105 110  
 Ala Pro Ser Val Ala Glu Ala Asp Val Asp Val Leu Leu Ser Ile Pro  
 115 120 125  
 Met Phe Leu Arg Leu Tyr Leu Leu Gly Arg Val Met Leu Leu His Ser  
 130 135 140  
 Lys Ile Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys 20  
 145 150 155 160  
 Ile Thr Phe Asn Thr Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys  
 165 170 175  
 Pro Gly Thr Val Leu Leu Val Phe Ser Ile Ser Ser Trp Ile Ile Ala  
 180 185 190  
 Ala Trp Thr Val Arg Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Lys Gln Glu Val  
 195 200 205  
 Thr Ser Asn Phe Leu Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu  
 210 215 220  
 Ser Ile Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly 30  
 225 230 235 240  
 Val Cys Leu Leu Thr Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val  
 245 250 255  
 Val Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His  
 260 265 270  
 Val His Asn Phe Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Val Lys Asn  
 275 280 285  
 Ala Ala Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr  
 290 295 300  
 Arg Leu Val Lys Lys Pro Asp Gln Ala Arg Val Arg Lys His Gln Arg 40  
 305 310 315 320  
 Lys Phe Leu Gln Ala Ile His Gln  
 325

( 2 ) 配列番号28についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 16個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎮の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号28 :

Gly His Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr  
 1                   5                   10                   15

( 2 ) 配列番号29についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 12個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎮の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( iii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号29 :

Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu  
 1                   5                   10

( 2 ) 配列番号30についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 25個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎮の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

20

( iii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号30 :

Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe  
 1                   5                   10                   15

Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg  
 20                   25

( 2 ) 配列番号31についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 1287個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

30

( C ) 鎮の数 : 一本鎮

( D ) トポロジー : 直鎖状

( iii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..1287

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 1 ( hIK 1 ) cDNA ”

( xi ) 配列 : 配列番号31 :

|  |      |
|--|------|
| ATGGGCAGGGG ATCTGGTGCT TGGCCTGGGG GCCTTGAGAC GCCGAAAGCG CTTGCTGGAG | 60   |
| CAGGAGAAAGT CTCTGCCCG CTGGGCAGT GTGCTGGCAG GAACTGGCAT TGGACTCATG   | 120  |
| GTGCTGCATG CAGAGATGCT GTGGTCGGG GGGTGCCTGT GGGCGCTCTA CCTGTTCCCTG  | 180  |
| GTTAAATGCA CGATCAGCAT TTCCACCTTC TTACTCCCTCT GCCTCATCGT GGCCCTTCAT | 240  |
| GCCAAAGAGG TCCAGCTGTT CAGTACCGAC AACGGGCTGC GGGACTGGCG CGTGGTGCCTC | 300  |
| CTGACCGGGC GGCAGGGCGC GCAGATCGT CTGGAGCTGG TGTTGTGTGG GCTGCACCCG   | 360  |
| GCGCCCGTGC GGGGCCCGCC GTGCGTGCAG GATTAGGGG CGCCGCTGAC CTCCCCGCAG   | 420  |
| CCCTGGCCGG GATTCCCTGGG CCAAGGGGAA GCGCTGCTGT CCCTGGCCAT GCTGCTGCCT | 480  |
| CTCTACCTGG TGCCCCGCGC CGTGCTCCTG CGCAGCGGCG TCCTGCTCAA CGCTTCCTAC  | 540  |
| CGCAGCATCG GCGCTCTCAA TCAAGTCCGC TTCCGCCACT GGTCGTGGC CAAGCTTTAC   | 600  |
| ATGAACACGC ACCCTGGCCG CCTGCTGCTC GGCCCTCACGC TTGGCCTCTG GCTGACCACC | 660  |
| GCCTGGGTGC TGTCCGTGGC CGAGAGGCAG GCTGTTAATG CCACTGGGCA CCTTCAGAC   | 720  |
| ACACTTTGGC TGATCCCCAT CACATTCTG ACCATCGGCT ATGGTGACGT GGTGCCGGGC   | 780  |
| ACCATGTTGG GCAAGATCGT CTGCCTGTGC ACTGGAGTCA TGGGTGTCTG CTGCACAGCC  | 840  |
| CTGCTGGTGG CCGTGGTGGC CCGGAAGCTG GAGTTAACCA AGGCAGAGAA GCACGTGCAC  | 900  |
| AACTTCATGA TGGATATCCA GAATACAAA GAGATGAAGG AGTCCGCTGC CCGAGTGCTA   | 960  |
| CAAGAAGCCT GGATGTTCTA CAAACATACT CGCAGGAAGG AGTCTCATGC TGCCCGCAGG  | 1020 |
| CATCAGCGCA AGCTGCTGGC CGCCATCAAC GCGTTCCGCC AGGTGCGGCT GAAACACCGG  | 1080 |
| AAGCTCCGGG AACAAAGTGA CTCCATGGTG GACATCTCCA AGATGCACAT GATCCTGTAT  | 1140 |
| GACCTGCAGC AGAATCTGAG CAGCTCACAC CGGGCCCTGG AGAAACAGAT TGACACGCTG  | 1200 |
| GCGGGGAAGC TGGATGCCCT GACTGAGCTG CTTAGCACTG CCCTGGGCC GAGGCAGCTT   | 1260 |
| CCAGAACCCA GCCAGCAGTC CAAAGTAG                                     | 1287 |

( 2 ) 配列番号32についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 428個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..428

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質1 (hIK1) ”

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 領域

( B ) 位置 : 25..351

( C ) 他の情報 : / 注 = “hIK1 のコア領域 ”

( xi ) 配列 : 配列番号32 :

10

30

40

Arg Leu Leu Glu Gln Glu Lys Ser Leu Ala Gly Trp Ala Leu Val Leu  
20 25 30

Ala Gly Thr Gly Ile Gly Leu Met Val Leu His Ala Glu Met Leu Trp  
35 40 45

Phe Gly Gly Cys Ser Trp Ala Leu Tyr Leu Phe Leu Val Lys Cys Thr  
 50 55 60  
 Ile Ser Ile Ser Thr Phe Leu Leu Leu Cys Leu Ile Val Ala Phe His  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Glu Val Gln Leu Phe Ser Thr Asp Asn Gly Leu Arg Asp Trp  
 85 90 95  
 Arg Val Val Leu Leu Thr Gly Arg Gln Ala Ala Gln Ile Val Leu Glu  
 100 105 110  
 Leu Val Val Cys Gly Leu His Pro Ala Pro Val Arg Gly Pro Pro Cys  
 115 120 125 10  
 Val Gln Asp Leu Gly Ala Pro Leu Thr Ser Pro Gln Pro Trp Pro Gly  
 130 135 140  
 Phe Leu Gly Gln Gly Glu Ala Leu Leu Ser Leu Ala Met Leu Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Tyr Leu Val Pro Arg Ala Val Leu Leu Arg Ser Gly Val Leu Leu  
 165 170 175  
 Asn Ala Ser Tyr Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Gln Val Arg Phe Arg  
 180 185 190  
 His Trp Phe Val Ala Lys Leu Tyr Met Asn Thr His Pro Gly Arg Leu  
 195 200 205 20  
 Leu Leu Gly Leu Thr Leu Gly Leu Trp Leu Thr Thr Ala Trp Val Leu  
 210 215 220  
 Ser Val Ala Glu Arg Gln Ala Val Asn Ala Thr Gly His Leu Ser Asp  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Trp Leu Ile Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ile Gly Tyr Gly Asp  
 245 250 255  
 Val Val Pro Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Val Cys Leu Cys Thr Gly  
 260 265 270 30  
 Val Met Gly Val Cys Cys Thr Ala Leu Leu Val Ala Val Ala Arg  
 275 280 285  
 Lys Leu Glu Phe Asn Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met Met  
 290 295 300  
 Asp Ile Gln Asn Thr Lys Glu Met Lys Glu Ser Ala Ala Arg Val Leu  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Trp Met Phe Tyr Lys His Thr Arg Arg Lys Glu Ser His  
 325 330 335  
 Ala Ala Arg Arg His Gln Arg Lys Leu Leu Ala Ala Ile Asn Ala Phe  
 340 345 350 40  
 Arg Gln Val Arg Leu Lys His Arg Lys Leu Arg Glu Gln Val Asn Ser  
 355 360 365  
 Met Val Asp Ile Ser Lys Met His Met Ile Leu Tyr Asp Leu Gln Gln  
 370 375 380  
 Asn Leu Ser Ser Ser His Arg Ala Leu Glu Lys Gln Ile Asp Thr Leu  
 385 390 395 400

Ala Gly Lys Leu Asp Ala Leu Thr Glu Leu Leu Ser Thr Ala Leu Gly  
 405 410 415

Pro Arg Gln Leu Pro Glu Pro Ser Gln Gln Ser Lys  
 420 425

( 2 ) 配列番号33についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 30個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号33 :

Val Arg Gly Pro Pro Cys Val Gln Asp Leu Gly Ala Pro Leu Thr Ser  
 1 5 10 15

Pro Gln Pro Trp Pro Gly Phe Leu Gly Gln Gly Glu Ala Leu  
 20 25 30

( 2 ) 配列番号34についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

20

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号34 :

GCCGTGCGTG CAGGATTAG G

21

( 2 ) 配列番号35についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

30

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号35 :

CCAGAGGCCA AGCGTGAGGC C

21

( 2 ) 配列番号36についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

40

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号36 :

TCCAAGATGC ACATGATCCT G

21

( 2 ) 配列番号37についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 21個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

50

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号37 :

GGACTGCTGG CTGGGTTCTG G

21

( 2 ) 配列番号38についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 22個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号38 :

ATGGGCAGGG ATCTGGTGCT TG

22

( 2 ) 配列番号39についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

20

( xi ) 配列 : 配列番号39 :

CTACTTGGAC TGCTGGCTGG GTTC

24

( 2 ) 配列番号40についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号40 :

ATGGGCAGGG ATCTGGTGCT TGG

23

30

( 2 ) 配列番号41についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA

( xi ) 配列 : 配列番号41 :

GGGTCCAGCT ACTTGGACTG CTG

23

40

( 2 ) 配列番号42についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 24個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号42 :

Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe  
1 5 10 15

Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys  
20

( 2 ) 配列番号43についての情報 :

( i ) 配列の特徴

( A ) 長さ : 732個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

10

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..732

( C ) 他の情報 : / 注 = “十分な長さのラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質3 ( rSK3 ) ”

( xi ) 配列 : 配列番号43 :

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| Met Asp Thr Ser Gly His Phe His Glu Ser Gly Val Gly Asp Leu Asp |     |     |     |
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Glu Asp Pro Lys Cys Pro Cys Pro Ser Ser Gly Asp Glu Gln Gln Gln |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ser Ala Pro Pro Ala Val Pro Gln Gln     |     |     |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Pro Pro Gly Pro Leu Leu Gln Pro Gln Pro Pro Gln Leu Gln Gln Gln |     |     |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Gln |     |     |     |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Ala Pro Leu His Pro Leu Pro Gln Leu Ala Gln Leu Gln Ser Gln Val |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Val His Pro Gly Leu Leu His Ser Ser Pro Thr Ala Phe Arg Ala Pro |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 |     |
| Asn Ser Ala Asn Ser Thr Ala Ile Leu His Pro Ser Ser Arg Gln Gly |     |     |     |
| 115   | 120 | 125 |     |
| Ser Gln Leu Asn Leu Asn Asp His Leu Val Gly His Ser Pro Ser Ser |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 |     |
| Thr Ala Thr Ser Gly Pro Gly Gly Ser Arg His Arg Gln Ala Ser     |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Pro Val Val His Arg Arg Asp Ser Asn Pro Phe Thr Glu Ile Ala Met |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| Ser Ser Cys Lys Tyr Ser Gly Gly Val Met Lys Pro Leu Ser Arg Leu |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 |     |
| Ser Ala Ser Arg Arg Asn Leu Ile Glu Ala Glu Pro Glu Gly Gln Pro |     |     |     |
| 195   | 200 | 205 |     |
| Leu Gln Leu Phe Ser Pro Ser Asn Pro Pro Glu Ile Ile Ile Ser Ser |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| Arg Glu Asp Asn His Ala His Gln Thr Leu Leu His His Pro Asn Ala |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Thr His Asn His Gln His Ala Gly Thr Thr Ala Gly Ser Thr Thr Phe |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| Pro Lys Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Ile Gly Tyr Lys Leu Gly |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| His Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu Ser Asp Tyr Ala |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met Val Ile Glu Thr Glu |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| Leu Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Lys Asp Ser Met Phe Ser Leu Ala Leu |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |

|   |     |     |     |    |
|---|-----|-----|-----|----|
| Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ile Ile                         |     |     |     |    |
| 325   | 330 | 335 |     |    |
| Ala Tyr His Thr Arg Glu Val Gln Leu Phe Val Ile Asp Asn Gly Ala |     |     |     |    |
| 340   | 345 | 350 |     |    |
| Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Tyr Glu Arg Ile Leu Tyr Ile Ser |     |     |     |    |
| 355   | 360 | 365 |     |    |
| Leu Glu Met Leu Val Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Gly Glu Tyr Lys |     |     |     |    |
| 370   | 375 | 380 |     |    |
| Phe Phe Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Ser Tyr Thr Pro Ser Arg Ala |     |     |     | 10 |
| 385   | 390 | 395 | 400 |    |
| Glu Ala Asp Val Asp Ile Ile Leu Ser Ile Pro Met Phe Leu Arg Leu |     |     |     |    |
| 405   | 410 | 415 |     |    |
| Tyr Leu Ile Ala Arg Val Met Leu Leu His Ser Lys Leu Phe Thr Asp |     |     |     |    |
| 420   | 425 | 430 |     |    |
| Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile Asn Phe Asn Thr |     |     |     |    |
| 435   | 440 | 445 |     |    |
| Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro Gly Thr Val Leu |     |     |     |    |
| 450   | 455 | 460 |     |    |
| Leu Met Phe Ser Ile Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val Arg |     |     |     | 20 |
| 465   | 470 | 475 | 480 |    |
| Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Gln Gln Asp Val Thr Ser Asn Phe Leu |     |     |     |    |
| 485   | 490 | 495 |     |    |
| Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser Ile Gly Tyr Gly |     |     |     |    |
| 500   | 505 | 510 |     |    |
| Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val Cys Leu Leu Thr |     |     |     |    |
| 515   | 520 | 525 |     |    |
| Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val Ala Val Val Ala |     |     |     |    |
| 530   | 535 | 540 |     |    |
| Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val His Asn Phe Met |     |     |     | 30 |
| 545   | 550 | 555 | 560 |    |
| Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Ile Lys Asn Ala Ala Asn Val     |     |     |     |    |
| 565   | 570 | 575 |     |    |
| Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Lys Leu Leu Lys Lys |     |     |     |    |
| 580   | 585 | 590 |     |    |
| Ile Asp His Ala Lys Val Arg Lys His Gln Arg Lys Phe Leu Gln Ala |     |     |     |    |
| 595   | 600 | 605 |     |    |
| Ile His Gln Leu Arg Gly Val Lys Met Glu Gln Arg Lys Leu Ser Asp |     |     |     |    |
| 610   | 615 | 620 |     |    |
| Gln Ala Asn Thr Leu Val Asp Leu Ser Lys Met Gln Asn Val Met Tyr |     |     |     | 40 |
| 625   | 630 | 635 | 640 |    |
| Asp Leu Ile Thr Glu Leu Asn Asp Arg Ser Glu Asp Leu Glu Lys Gln |     |     |     |    |
| 645   | 650 | 655 |     |    |
| Ile Gly Ser Leu Glu Ser Lys Leu Glu His Leu Thr Ala Ser Phe Asn |     |     |     |    |
| 660   | 665 | 670 |     |    |

Ser Leu Pro Leu Leu Ile Ala Asp Thr Leu Arg Gln Gln Gln Gln Gln  
 675 680 685

Leu Leu Thr Ala Phe Val Glu Ala Arg Gly Ile Ser Val Ala Val Gly  
 690 695 700

Thr Ser His Ala Pro Pro Ser Asp Ser Pro Ile Gly Ile Ser Ser Thr  
 705 710 715 720

Ser Phe Pro Thr Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Cys  
 725 730

( 2 ) 配列番号44についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

10

( A ) 長さ : 2224個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..2224

( C ) 他の情報 : / 注 = “ラット低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質3 (rSK3) の十分な長さのcDNA”

20

( xi ) 配列 : 配列番号44 :

CATGGACACT TCTGGCACT TCCATGAGTC GGGGGTGGGG GATCTGGATG AAGACCCCAA 60

GTTGTCCTGT CCATCTTCTG GGGACGAGCA ACAGCAGCAA CAGCAACCAG CACCACCGTC 120

AGCGGCCACCA GCAGTCCCCC AGCAGCCTCC GGGACCCCTTG CTGCAGCCTC AGCCTCCGCA 180

GCTTCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA 240

GGCTCCACTG CACCCCTGC CTCAGCTTGC CCAACTCCAG AGCCAGGTTG TCCATCCTGG 300

TCTGTTGCAC TCTTCTCCC CGGCTTTCAAG GGCTCCCAAT TCAGCCAACT CCACCGCCAT 360

CCTCCACCCCT TCCTCCAGGC AAGGCAGCCA GCTAAATCTC AATGACCACT TGGTTGGCCA 420

30

CTCTCCAAGT TCCACAGCCA CAAGTGGGCC TGGTGGAGGC AGCCGGCACC GGCAGGCCAG 480

CCCCGTGGTG CACCGGCAGGG ACAGCAATCC CTTCACGGAG ATAGCTATGA GCTCCTGCAA 540

ATACAGCGGT GGGGTCAATGA AGCCCCCTCAG CCGCCTCAGC GCCTCTCGGA GAAACCTTAT 600

CGAGGCCGAG CCTGAGGGCC AACCCCTCCA GCTCTTCAGT CCCAGCAACC CCCCAGAGAT 660  
 TATCATCTCC TCCAGGGAGG ATAACCATGC CCACCAAGACT CTGCTCCATC ACCCCAACGC 720  
 TACCCACAAC CACCAGCATG CCGGCACCAC TGCTGGCAGC ACCACCTTCC CCAAAGCCAA 780  
 CAAGCGGAAA AACCAAAACA TTGGCTATAA GCTGGGGCAC AGGAGGGCCC TGTGAA 840  
 GAGAAAGCGA CTGAGTGACT ATGCTCTGAT TTTTGGGATG TTTGGAATTG TTGTTATGGT 900  
 GATAGAGACC GAACTGTCTT GGGTTTGTA CTCAAAGGAT TCCATGTTT CGTTGGCCCT 960  
 GAAATGCCTT ATCAGTTTAT CCACCACAT CCTGCTTGGT TTGATCATCG CCTACCAACAC 1020 10  
 AAGGGAAAGTA CAGCTCTTG TGATCGACAA TGGTGCAGAT GACTGGCGGA TAGCCATGAC 1080  
 CTATGAGCGC ATCCTCTACA TCAGCCTGGA GATGCTGGT TGCGCCATCC ACCCCATTCC 1140  
 TGGAGAGTAC AAGTTCTTCT GGACGGCACG CCTGGCCTTC TCCTACACCC CCTCTCGGGC 1200  
 AGAGGCTGAC GTGGACATTA TTCTGTCCAT CCCCATGTTT TTGCGCCTAT ACCTGATCGC 1260  
 CCGAGTCATG CTGCTACATA GCAAGCTCTT CACGGATGCC TCATCCCGAA GCATCGGGC 1320  
 CCTCAACAAG ATCAACTTCA ACACCCGATT CGTCATGAAG ACGCTCATGA CCATCTGCC 1380  
 GGGCACGGTG CTGCTAATGT TCAGCATCTC TCTGTGGATC ATCGCTGCCT GGACTGTGAG 1440  
 AGTCTGTGAA AGGTACCATG ACCAGCAGGA CGTAACTAGT AACTTTCTGG GTGCCATGTG 1500 20  
 GCTCATCTCC ATCACGTTCC TTTCCATTGG CTATGGGAC ATGGTGCCCC ACACATACTG 1560  
 TGGGAAAGGT GTCTGTCTTC TCACTGGCAT CATGGTGCA GGCTGCCTG CCGCTCGGGT 1620  
 AGCTGTGGTT GCCCGGAAGC TCGAACTCAC CAAAGCAGAG AAGCATGTGC ACAACTTCAT 1680  
 GATGGACACT CAGCTCACCA AACGGATCAA GAACGCTGCC GCCAATGTCC TCCGGAAAC 1740  
 ATGGCTGATC TACAAACACA CAAAGCTGCT AAAGAAGATT GACCACGCCA AAGTCAGGAA 1800  
 ACACCAGAGG AAGTTCTCC AAGCTATTCA CCAACTGAGG GGTGTCAAGA TGGAACAAAG 1860  
 GAAGCTGAGT GACCAAGCCA ACACCCCTGGT GGACCTTCC AAGATGCAGA ACGTCATGTA 1920 30  
 TGACTTGATC ACGGAGCTCA ACGACCGGAG TGAAGACCTG GAAAAGCAGA TTGGCAGCCT 1980  
 GGAATCCAAG CTGGAGCACC TCACAGCCAG CTTCAATTCC CTGCCCCCTGC TCATCGCAGA 2040  
 CACCCCTGCAGC CAACAGCAGC AGCAGCTGCT CACTGCCTTC GTGGAGGGCC GGGGCATCAG 2100  
 TGTGGCTGTG GGAACTAGCC ACGCCCCCTCC CTCTGACAGC CCTATCGGGA TCAGCTCCAC 2160  
 CTCTTCCCAC ACCCCATACA CAAGTTCAAG CAGTTGCTAA ATAAAACCTCC CCACCTCCAGA 2220  
 AGCA 2224

( 2 ) 配列番号45についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

40

( A ) 長さ : 25個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列 : 配列番号45 :

Phe Xaa Ser Ile Pro Xaa Xaa Xaa Trp Trp Ala Xaa Val Thr Met Thr  
 1 5 10 15

Thr Val Gly Tyr Gly Asp Met Xaa Pro  
 20 25

50

( 2 ) 配列番号46についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 4 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : 修飾された部位

( B ) 位置 : 4

( C ) 他の情報 : / 生成物 = “他のもの” / 注 = “Xaa = Ser 又はThe”

( xi ) 配列 : 配列番号46 :

Asn Xaa Xaa Xaa

1

10

( 2 ) 配列番号47についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 736 個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 :

( D ) トポロジー : 直鎖状

20

( ii ) 配列の種類 : タンパク質

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : タンパク質

( B ) 位置 : 1..736

( C ) 他の情報 : / 注 = “十分な長さのヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 3 ( hSK3 ) ”

( xi ) 配列 : 配列番号47 :

|   |  |    |
|---|--|----|
| Met Asp Thr Ser Gly His Phe His Asp Ser Gly Val Gly Asp Leu Asp     |  |    |
| 1 . . . . . S 10 15   |  |    |
| Glu Asp Pro Lys Cys Pro Cys Pro Ser Ser Gly Asp Glu Gln Gln Gln     |  |    |
| 20 25 30  |  |    |
| Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro         |  |    |
| 35 40 45  |  |    |
| Ala Ala Pro Gln Gln Pro Leu Gly Pro Ser Leu Gln Pro Gln Pro Pro     |  |    |
| 50 55 60  |  |    |
| Gln Leu Gln |  | 10 |
| 65 70 75 80   |  |    |
| Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro His Pro Leu Ser Gln Leu Ala Gln Leu     |  |    |
| 85 90 95  |  |    |
| Gln Ser Gln Pro Val His Pro Gly Leu Leu His Ser Ser Pro Thr Ala     |  |    |
| 100 105 110   |  |    |
| Phe Arg Ala Pro Pro Ser Ser Asn Ser Thr Ala Ile Leu His Pro Ser     |  |    |
| 115 120 125   |  |    |
| Ser Arg Gln Gly Ser Gln Leu Asn Leu Asn Asp His Leu Leu Gly His     |  |    |
| 130 135 140   |  |    |
| Ser Pro Ser Ser Thr Ala Thr Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ser Arg His     |  | 20 |
| 145 150 155 160   |  |    |
| Arg Gln Ala Ser Pro Leu Val His Arg Arg Asp Ser Asn Pro Ser Thr     |  |    |
| 165 170 175   |  |    |
| Glu Ile Ala Met Ser Ser Cys Lys Tyr Ser Gly Gly Val Met Lys Pro     |  |    |
| 180 185 190   |  |    |
| Leu Ser Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Asn Leu Ile Glu Ala Glu Thr     |  |    |
| 195 200 205   |  |    |
| Glu Gly Gln Pro Leu Gln Leu Phe Ser Pro Ser Asn Pro Pro Glu Ile     |  |    |
| 210 215 220   |  |    |
| Val Ile Ser Ser Arg Glu Asp Asn His Ala His Gln Thr Leu Leu His     |  | 30 |
| 225 230 235 240   |  |    |

|   |     |     |           |
|---|-----|-----|-----------|
| His Pro Asn Ala Thr His Asn His Gln His Ala Gly Thr Thr Ala Ser |     |     |           |
| 245   | 250 | 255 |           |
| Ser Thr Thr Phe Pro Lys Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Ile Gly |     |     |           |
| 260   | 265 | 270 |           |
| Tyr Lys Leu Gly His Arg Arg Ala Leu Phe Glu Lys Arg Lys Arg Leu |     |     |           |
| 275   | 280 | 285 |           |
| Ser Asp Tyr Ala Leu Ile Phe Gly Met Phe Gly Ile Val Val Met Val |     |     |           |
| 290   | 295 | 300 |           |
| Ile Glu Thr Glu Leu Ser Trp Gly Leu Tyr Ser Lys Asp Ser Met Phe |     |     |           |
| 305   | 310 | 315 | 10<br>320 |
| Ser Leu Ala Leu Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ile Ile Leu Leu |     |     |           |
| 325   | 330 | 335 |           |
| Gly Leu Ile Ile Ala Tyr His Thr Arg Glu Val Gln Leu Phe Val Ile |     |     |           |
| 340   | 345 | 350 |           |
| Asp Asn Gly Ala Asp Asp Trp Arg Ile Ala Met Thr Tyr Glu Arg Ile |     |     |           |
| 355   | 360 | 365 |           |
| Leu Tyr Ile Ser Leu Glu Met Leu Val Cys Ala Ile His Pro Ile Pro |     |     |           |
| 370   | 375 | 380 |           |
| Gly Glu Tyr Lys Phe Phe Trp Thr Ala Arg Leu Ala Phe Ser Tyr Thr |     |     |           |
| 385   | 390 | 395 | 20<br>400 |
| Pro Ser Arg Ala Glu Ala Asp Val Asp Ile Ile Leu Ser Ile Pro Met |     |     |           |
| 405   | 410 | 415 |           |
| Phe Leu Arg Leu Tyr Leu Ile Ala Arg Val Met Leu Leu His Ser Lys |     |     |           |
| 420   | 425 | 430 |           |
| Leu Phe Thr Asp Ala Ser Ser Arg Ser Ile Gly Ala Leu Asn Lys Ile |     |     |           |
| 435   | 440 | 445 |           |
| Asn Phe Asn Thr Arg Phe Val Met Lys Thr Leu Met Thr Ile Cys Pro |     |     |           |
| 450   | 455 | 460 |           |
| Gly Thr Val Leu Leu Val Phe Ser Ile Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala |     |     |           |
| 465   | 470 | 475 | 30<br>480 |
| Trp Thr Val Arg Val Cys Glu Arg Tyr His Asp Gln Gln Asp Val Thr |     |     |           |
| 485   | 490 | 495 |           |
| Ser Asn Phe Leu Gly Ala Met Trp Leu Ile Ser Ile Thr Phe Leu Ser |     |     |           |
| 500   | 505 | 510 |           |
| Ile Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro His Thr Tyr Cys Gly Lys Gly Val |     |     |           |
| 515   | 520 | 525 |           |
| Cys Leu Leu Thr Gly Ile Met Gly Ala Gly Cys Thr Ala Leu Val Val |     |     |           |
| 530   | 535 | 540 | 40<br>560 |
| Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val |     |     |           |
| 545   | 550 | 555 |           |
| His Asn Phe Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Ile Lys Asn Ala |     |     |           |
| 565   | 570 | 575 |           |
| Ala Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu Ile Tyr Lys His Thr Lys |     |     |           |
| 580   | 585 | 590 |           |

Leu Leu Lys Lys Ile Asp His Ala Lys Val Arg Lys His Gln Arg Lys  
 595 600 605

Phe Leu Gln Ala Ile His Gln Leu Arg Ser Val Lys Met Glu Gln Arg  
 610 615 620

Lys Leu Ser Asp Gln Ala Asn Thr Leu Val Asp Leu Ser Lys Met Gln  
 625 630 635 640

Asn Val Met Tyr Asp Leu Ile Thr Glu Leu Asn Asp Arg Ser Glu Asp  
 645 650 655

Leu Glu Lys Gln Ile Gly Ser Leu Glu Ser Lys Leu Glu His Leu Thr  
 660 665 670

Ala Ser Phe Asn Ser Leu Pro Leu Leu Ile Ala Asp Thr Leu Arg Gln  
 675 680 685

Gln Gln Gln Gln Leu Leu Ser Ala Ile Ile Glu Ala Arg Gly Val Ser  
 690 695 700

Val Ala Val Gly Thr Thr His Thr Pro Ile Ser Asp Ser Pro Ile Gly  
 705 710 715 720

Val Ser Ser Thr Ser Phe Pro Thr Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Ser Cys  
 725 730 735

( 2 ) 配列番号48についての情報 :

20

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 2462個の塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : cDNA

( iv ) 特徴 :

( A ) 名称 / キー : -

( B ) 位置 : 1..2462

( C ) 他の情報 : / 注 = “ヒト低コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質 3 ( hSK3 ) の十分な長さのcDNA ”

30

( xi ) 配列 : 配列番号48 :

AGTTCTTTCA CCCCTCTTC TTTCTCCAAG CTCCCCCTCCT GCTCTCCCTC CCTGCCAAT

60

ACAATGCATT CTTGAGTGGC AGCGTCTGGA CTCCAGGCAG CCCCAGAGAA CCGAAGCAAG

120

|  |      |
|--|------|
| CCAAAGAGAG GACTGGAGCC AAGATACTGG TGGGGGAGAT TGGATGCCTG GCTTTCTTG   | 180  |
| AGGACATCTT TGGAGCGAGG GTGGCTTGG GGTGGGGCT TGTGCTGCAG GGAATACAGC    | 240  |
| CAGGCCCAA GATGGACACT TCTGGCACT TCCATGACTC GGGGGTGGGG GACTTGGATG    | 300  |
| AAGACCCAA GTGCCCTGT CCATCCTCTG GGGATGAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC    | 360  |
| AACAGCAGCA GCAGCCACCA CCGCCAGCGC CACCAGCAGC CCCCCAGCAG CCCCTGGAC   | 420  |
| CCTCGCTGCA GCCTCAGCCT CGCGAGCTTC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC  | 480  |
| AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAC CGCATCCCCT GTCTCAGCTC GCCCAACTCC   | 540  |
| AGAGCCAGCC CGTCCACCCCT GGCCTGCTGC ACTCCTCTCC CACCGCTTTC AGGGCCCCCC | 600  |
| CTTCGTCCAA CTCCACCGCC ATCCTCCACC CTTCTCCAG GCAAGGCAGC CAGCTCAATC   | 660  |
| TCAATGACCA CTTGCTTGGC CACTCTCAA GTTCCACAGC TACAAGTGGG CCTGGGGAG    | 720  |
| GCAGCCGGCA CCGACAGGCC AGCCCCCTGG TGCAACGGCG GGACAGCAAC CCCTCCACGG  | 780  |
| AGATGCCAT GAGCTCCTGC AAGTATAGCG GTGGGGTCAT GAAGCCCCCTC AGCCGCCTCA  | 840  |
| GCGCCTCCCG GAGGAACCTC ATCGAGGCCG AGACTGAGGG CCAACCCCTC CAGCTTTCA   | 900  |
| GCCCTAGCAA CCCCCGGAG ATCGTCATCT CCTCCCGGGA GGACAACCCT ACCCACCAGA   | 960  |
| CCCTGCTCCA TCACCTTAAT GCCACCCACA ACCACCAGCA TGCCGGCACC ACCGCCAGCA  | 1020 |
| GCACCACCTT CCCCCAAAGCC ACAAGCGGA AAAACCAAAA CATTGGCTAT AAGCTGGAC   | 1080 |
| ACAGGAGGGC CCTGTTGAA AAGAGAAAGC GACTGAGTGA CTATGCTCTG ATTTTGGA     | 1140 |
| TGTTTGAAT TGTTGTTATG GTGATAGAGA CCGAGCTCTC TTGGGGTTTG TACTCAAAGG   | 1200 |
| ACTCCATGTT TTCGTTGGCC CTGAAATGCC TTATCAGTCT GTCCACCATC ATCCTTTGG   | 1260 |
| GCTTGATCAT CGCCTACAC ACACGTGAAG TCCAGCTCTT CGTGATCGAC AACGGCGCGG   | 1320 |
| ATGACTGGCG GATAGCCATG ACCTACGAGC GCATCCTCTA CATCAGCCTG GAGATGCTGG  | 1380 |
| TGTGCGCCAT CCACCCATT CCTGGCGAGT ACAAGTTCTT CTGGACGGCA CGCCTGGCCT   | 1440 |
| TCTCCTACAC ACCCTCCCG GCGGAGGCCG ATGTGGACAT CATCCTGTCT ATCCCCATGT   | 1500 |
| TCCTGCGCCT GTACCTGATC GCCCGAGTCA TGCTGCTGCA CAGCAAGCTC TTCACCGATG  | 1560 |
| CCTCGTCCCG CAGCATCGGG GCCCTCAACA AGATCAACTT CAACACCCGC TTTGTATGA   | 1620 |
| AGACGCTCAT GACCATCTGC CCTGGCACTG TGCTGCTCGT GTTCAGCATC TCTCTGTGGA  | 1680 |
| TCATTGCTGC CTGGACCGTC CGTGTCTGTG AAAGGTACCA TGACCAGCAG GACGTAACCA  | 1740 |
| GTAACTTCT GGGTGCCATG TGGCTCATCT CCATCACATT CCTTTCCATT GGTTATGGGG   | 1800 |
| ACATGGTGCC CCACACATAC TGTGGGAAAG GTGTCTGTCT CCTCACTGGC ATCATGGGTG  | 1860 |
| CAGGCTGCAC TGCCCTTGTG GTGGCCGTGG TGGCCGAAA GCTGGAACTC ACCAAAGCGG   | 1920 |
| AGAACGACGT TCATAACTTC ATGATGGACA CTCAGCTCAC CAAGCGGATC AAGAATGCTG  | 1980 |
| CAGCCAATGT CCTTCGGGAA ACATGGTAA TCTATAAACCA CACAAAGCTG CTAAAGAAGA  | 2040 |
| TTGACCATGC CAAAGTGAGG AAACACCAGA GGAAGTTCTT CCAAGCTATC CACCAGTTGA  | 2100 |
| GGAGCGTCAA GATGGAACAG AGGAAGCTGA GTGACCAAGC CAACACTCTG GTGGACCTTT  | 2160 |

|  |      |
|--|------|
| CCAAGATGCA GAATGTCATG TATGACTTAA TCACAGAACT CAATGACCGG AGCGAAGACC  | 2220 |
| TGGAGAACGA GATTGGCAGC CTGGAGTCGA AGCTGGAGCA TCTCACCGCC AGCTTCAACT  | 2280 |
| CCCTGCCGCT GCTCATCGCC GACACCCCTGC GCCAGCAGCA GCAGCAGCTC CTGTCTGCCA | 2340 |
| TCATCGAGGC CGGGGGTGTG AGCGTGGCAG TGGGCACCCAC CCACACCCCA ATCTCCGATA | 2400 |
| GCCCCATTGG GGTCAGCTCC ACCTCCTTCC CGACCCCCGTA CACAAGTTCA AGCAGTTGCT | 2460 |
| AA   | 2462 |

## フロントページの続き

| (51) Int.CI.            | F I                   |
|-------------------------|-----------------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00 A        |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 C       |
| C 1 2 Q 1/00 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/00 Z        |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/68 A        |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01) | G 0 1 N 33/15 Z       |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01) | G 0 1 N 33/50 Z       |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 D       |

(31)優先権主張番号 60/045,233

(32)優先日 平成9年4月17日(1997.4.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

## 早期審理対象出願

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 アデルマン,ジョン ピー.

アメリカ合衆国,オレゴン 97201,ポートランド,サウス ウエストミッチャル ストリー  
ト 2433

(72)発明者 メイリー,ジェイムス

アメリカ合衆国,オレゴン 97201,ポートランド,サウス ウエストウエストウッド ドラ  
イブ 1445

(72)発明者 ボンド,クリス ティー.

アメリカ合衆国,オレゴン 97201,ポートランド,サウス ウエストミッチャル ストリー  
ト 2433

(72)発明者 シルビア,クリストファー ピー.

アメリカ合衆国,ノースカロライナ 27712,ダーハム,ブルームセッジ ウェイ 3105

## 合議体

審判長 鵜飼 健

審判官 松波 由美子

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 Science, Vol. 273, p. 1709 - 1714, 1996

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

MEDLINE(STN)

EMBASE(STN)

BIOSIS(STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq