

(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 I
C O 7 K 14/705 (2006.01) C O 7 K 14/705
C O 7 K 16/28 (2006.01) C O 7 K 16/28
C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 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	(73) 特許権者	301034359
(86) (22) 出願日	平成9年9月10日(1997.9.10)		オレゴン ヘルス サイエンス ユニ バーシティ
(65) 公表番号	特表2000-514310(P2000-514310A)		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
(43) 公表日	平成12年10月31日(2000.10.31)	(73) 特許権者	502414600
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/016033		アイシーエージェン, インコーポレイティ ド
(87) 国際公開番号	W01998/011139		アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27 703, ダラム, エンペラー ブールバー ド 4222, スイート 350
(87) 国際公開日	平成10年3月19日(1998.3.19)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成11年9月9日(1999.9.9)		弁理士 山本 秀策
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)		最終頁に続く
(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)		

(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。

【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、単離されたカルシウム - 活性化される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 10 に記載の抗体。

20

【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 10 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 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

請求項 10 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 15 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 18】

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 (Kca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

30

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))。

40

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

50

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^+ ; Christophersen, 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-Allelie など, 1996, Br. J. Pharm., 177: 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 (Brugnara 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^+ 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^+ の再循環を促進し、 $Na^+ + K^+ - ATP$ アーゼの活性を高め、そしてそれにより血液への Na^+ 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、それらがブ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 (Rapacon 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^+ 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 Renterghem, 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は、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、必要とされることは、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、40~100Kd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。好ましい態様においては、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40~100Kd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2 pS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2 pS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な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2 pS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

10

20

30

40

50

TGCAGGATTTAGG 3' (配列番号34) 及び5' CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35)、又は約165個の塩基のプロープを生成する5' TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36) 及び5' GGACTGCTGGCTGGGTTCTGG 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ンネルに関する。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' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTTG 3' (配列番号38) 及び5' CTACTTGGACTGCTGGCTGGGTTC 3' (配列番号39)、又は5' ATGGGCGGGGATCTGGTGCTTG 3' (イニシエー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ン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ン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2 pS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；そして前記チャン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。好ましい態様においては、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。特に好ましい態様においては、前記チャンネルタンパク質は、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つの好ましい態様においては、チャンネルタンパク質は、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ン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 - 活性化されたチャンネルタンパク質は、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2 pS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 - 活性化されたチャン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2 pS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ン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、チャン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ン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ン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、ここでチャンネルタンパク質は、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2 pSのコンダクタンスを有し；そしてチャン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。

10

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。

20

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。

30

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連している。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。

40

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

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チャンネルタンパク質は、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ン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。

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。

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（集会的には、“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。

“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ずれか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例整列方法は、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例整列は、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 So

10

20

30

40

50

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; Corpet、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、1MのNaCl, 1%のSDSの緩衝液における37℃でのハイブリダイゼーション、及び45℃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ずれかの番号から、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rSK2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、八虫類、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、たとえばマカークザル、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)₂）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、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ 不変領域遺伝子、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、 κ 又は λ のいず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、 α ， μ ， δ ， ϵ 、又は λ 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_L）及び可変H鎖（V_H）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)₂、すなわちそれ自体、ジスルフィド結合によりV_H-C_H1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)₂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)₂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_v、キメラ抗体（すなわち、異なった種からの不変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。

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ずれかにより、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ず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ず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

10

20

30

40

50

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)。

10

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も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。

20

チャン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、チャンネルの影響下で間接的に又は直接的に存在するいず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つの最適に系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つの配列の最適な系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。

30

40

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

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、1 M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、1 M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ー下で異なる。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 / ohm = 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ルを用いて単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単一のホモマータ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例、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ン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ン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。

10

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、インピボ又はエキスピボで存在する。“エキスピボ”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。エキスピボトランスフェクションに続いて、好ましくは、生物中への細胞の再注入が伴う。対照的に、“インピボ”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。

20

“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、インピボで、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。

30

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、対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対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。

40

“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ンネル”、又は“SKチャンネル”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ンネルを意味する。SKチャンネルは、サブユニットとして複数のSKチャンネルタンパク質、典型的には4個のSKチャンネルタンパク質(たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのSKチャンネルタンパク質)を含んで成る。

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

50

タンパク質”とは、SKチャン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チャンネルのモノマーとして作用する。従って、SKチャンネルタンパク質は、SKチャン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rSK 3（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ンネル”、又は“IKチャンネル”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ンネルを意味する。IKチャンネルは、サブユニットとして複数のIKチャンネルタンパク質、典型的には4個のIKチャンネルタンパク質（たとえば十分な長さ又は実質的に十分な長さのIKチャンネルタンパク質）を含んで成る。

“中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたチャンネルタンパク質”又は“IKチャンネルタンパク質”とは、IKチャン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チャンネルのモノマーとして作用する。従って、IKチャンネルタンパク質は、IKチャン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ンネル”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）チャン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）チャンネルを意味する。

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、鋳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, Cengage, 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

体のいずれか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ずれか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ずれか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。

10

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ずれか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”の配列とは、それぞれ、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43又は47の配列を意味する。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”の配列とは、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。

20

30

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ずれか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ずれか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、八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。

40

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

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、ウェスタンブロット、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%の類似性の値のいずれか1つを有するアミノ酸配列を含んで成るであろう。

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%の類似性の値のいずれか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、そして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ずれか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。

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-末端の両方で異なるけれども、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、しかしもっともらしい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關与した。

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

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 mambrane Channels, *Experientia*, 42 (6): 589-594 (1986); 及びSakmannなど, Patch clamb 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チャネルの徴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 μ M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、蛍光色素により）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又はアパミンによっ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 Peptids 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'-ジシクロヘキシルカルボジイミドの使用による）は

、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ン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チャンネルタンパク質（“SKチャンネルタンパク質核酸”）又はカルシウム - 活性化されたIKチャンネルタンパク質（“IKチャン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チャン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チャンネルタンパク質の組換え発現のために、プローブ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ン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チャン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., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Methods in Enzymology, Vol. 152: 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 (1987))。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. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Invitrogen, San Diego, CA、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チャン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ずれにせよ、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、いずれかの適切な方法、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、又は鋳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チャンネルタンパク質をコードする核酸は、次の配列：ATGCCGGGTCCCCGGCGGCGCTGC（配列番号5）及びTCACCCGCGAGTCCGAGGGGGCCAC（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チャン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チャン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TTAGCAACTGCTTGAAGTTG(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チャン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チャン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CTAGCTACTCTCTGATGAAGTTG(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チャン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TTAGCAACTGCTTGAAGTTGTG(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チャン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脾臓cDNAライブラリーの増幅により得られる。

10

本発明の単離された核酸は、クローン化され、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。

20

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; Lomell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。

30

SKチャン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チャン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チャン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。

40

IKチャンネルタンパク質をコードする単離された核酸は、IKチャン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は、IKチャン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

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ン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ン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ン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ン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チャンネルタンパク質をコードする核転写体を含んで成る。

SK又はIKチャン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増幅段階の間、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。

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。

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トア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、蛍光色素(たとえば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン蛍光タンパク質、及び同様のもの)、放射性ラベル(たとえば、 ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 、又は ^{32}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。

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、蛍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、脾臓)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ニング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

10

20

30

40

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パ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再考は、Methods of Cell Biology Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Ed, DJ Asai pp. 369-382, 1993に見出され得る。

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)、ARKLELTKAIEKHVHNFMMDTQLTKR (配列番号30) 又はARKLELTKAIEKHVHNFMMDTQLTK (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。

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、そしてノ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のいずれか) は、当業者に良く知られている多くの方法のいずれかに従って、サンプルから単離される。

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。

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。

SKチャン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チャン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チャン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チャンネルタンパク質の検出は、配列番号32のIKチャン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。

10

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チャン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ずれか1つである。IKチャン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チャン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。核酸プローブの好ましい長さは、24～200個の長さのヌクレオチドである。

20

特に好ましい態様においては、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、最も好ましくは、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ず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チャン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チャン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チャンネルタンパク質核酸”又は“IKチャン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、しかし好ましくは、少なくとも30個の長さのヌクレオチドである。

30

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, Burnsteil 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

40

50

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つかの方法のいずれか1つによりラベルされ得る。最も通常の検出方法は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 又は ^{32}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、蛍光団、化学発光剤、酵素、及びラベルされたり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、抗体に蛍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ず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、いずれか特定集団、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チャンネルタンパク質を有する生物) を同定し、そしてSK又はIKチャン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チャン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チャン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チャン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

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ンネルタンパク質核酸へのプロープ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ず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チャン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チャン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。

10

当業者は、SK又はIKチャン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まいであろう。

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ン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ずれかである）にDNA又はcDNAを操作可能に連結し、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ず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チャン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は、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チャン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ず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。

20

30

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。

40

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チャン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 (Palva、など, Gene 22: 229-235 (1983); Mosbach、など, Nature 302: 543-545 (19

50

83))。

S・チピムリウム (S. typhimarium) 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、フランキング配列と染色体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ア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⁺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、ウェスタンブ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。下記に手短か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、ウェスタンブロット技法、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ため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、細胞の単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TA_g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は必要である。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。

30

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。組換え的に生成された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チャン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ンネルタンパク質の対する抗体

抗体は、本発明のSK又はIKチャンネルタンパク質、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チャン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チャンネルタンパク質が、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ン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ン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: GHRRALFEKRRLSDY (配列番号28)、FTDASSRSIGAL (配列番号29)、ARKLELTKAIEKHVHNFMMDTQLTKR (配列番号30)、及びARKLELTKAIEKHVHNFMMDTQLTK (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チャンネルタンパク質はまた、純粋な形又は不純な形のいずれかで使用される。

次に、SK又はIKチャンネルタンパク質が、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ン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チャンネルタンパク質、適切なキャリアー(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チャンネルタンパク質、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チャンネルタンパク質(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ン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チャン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チャン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ア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チャンネルタンパク質である。より典型的には、SK又はIKチャンネルタンパク質は、10個の長さ、好ましくは15個の長

10

20

30

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、キャリアタンパク質（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 μ M、及び最も好ましくは少なくとも約1 μ M又はそれ以上の K_D 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、霊長類、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、ここで細胞は骨髓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）宿主の腹腔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、蛍光成分、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ク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チャン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チャン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チャン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チャン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変領域 (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チャン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チャン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)。

好ましい態様においては、本発明のヒト抗 - SKチャン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ン化され、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の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、クローン化される (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す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。

10

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認するために、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。

20

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状況においては、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。

30

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ず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

40

50

れたカリウムチャン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チャン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ず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チャンネルタンパク質又はラベルされた抗-SK又は抗-IKチャン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チャン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。

10

好ま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チャン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チャン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トアビジ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。

免疫グロブリン不変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、ストレプトコカール（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変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）。

20

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、好ましくは約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チャン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チャン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チャン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。

30

A．非競争アッセイ形式

本発明のSK又はIKチャン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チャンネルタンパク質）の量が直接的に測定されるアッセイである。好ましい“サンドイッチ”アッセイにおいては、捕獲剤（抗-SK又は抗-IKチャン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チャン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チャンネルタンパク質が、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チャン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チャン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トアビジ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。

40

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チャンネルタンパク質）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チャンネルタンパク質抗

50

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チャンネルタンパク質)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チャンネルタンパク質が、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チャン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チャンネルタンパク質の量が、サンプルに存在するSK又はIKチャン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チャンネルタンパク質の量は、その対応するSK又はIKチャンネルタンパク質/抗体複合体に存在するSK又はIKチャン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チャン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チャンネルタンパク質の量は、ラベルされたSK又はIKチャン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。

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チャンネルタンパク質が、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チャン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チャン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チャンネルタンパク質に結合される抗-SK又は抗-IKチャン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チャン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ず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。

C. 他のアッセイ形式

特に好ましい態様においては、ウェスタンブロット(イムノブロット)分析は、サンプルにおけるSK又はIKチャン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チャン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チャン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チャン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チャン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を開放するよう企画されたりリボソームを使用するリボ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)。

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ず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ず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ず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。

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。

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、蛍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（たとえばストレプトアビジン）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、いず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、たとえば酵素又は蛍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。蛍光化合物は、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 号を参照のこと。

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としての写真フィルムを包含する。ラベルが蛍光ラベルである場合、それは、光の適切な波長を有する蛍光色素を励起せしめ、そしてその得られる蛍光を検出することによって検出され得る。蛍光は、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_s）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⁺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

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の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); Daniel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。

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、いずれかの適切な生理学的変化は、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てい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。

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の間の整数のいずれか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。

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

10

20

30

40

50

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ずれか1つ～300個の隣接するアミノ酸残基のいず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ずれか1つ～300個の隣接するアミノ酸残基のいず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、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ず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。チャン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ン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、チャン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ン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。

10

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ン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。

20

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チャン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ず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チャン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-活性化されたチャンネルタンパク質核酸を発現し、それにより、SK又はIKチャン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。

30

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、癌及びウイ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病、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病の予防及び/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 Feigler (1993) TIBTECH 11: 211-217; Mitani and Caskey (1993) TIBTECH 11: 162-166; Mulligan (1993) Sciences 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。

40

細胞中への遺伝子又は遺伝子材料の供給は、疾病の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Feiglerなど. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

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、(1990) J. Virol. 65: 2220-2224 (1991); Wong - Staalなど、(1990) 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、(1994) Gene Therapy (1994) 前記を参照のこと。

10

AA.V-に基づくベクターはまた、核酸及びペプチドのインビトロ生成において、及びインビボ及びエクスピボ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. Invest. 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 Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6466-6470; McLaughlinなど、(1985) 及びSamulskiなど、(1989) J. Virol., 63: 03822-03828。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。

20

A. 細胞のエクスピボ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ボ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。エクスピボ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、(1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley - Liss, New York) 及びそこに引用される引例を参照のこと)。

30

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ボ方法に使用される。幹細胞を用いる利点は、それらが他の細胞型にインビトロで分化され得、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- γ 及びTNF- α のようなサイトカインを用いて、臨床学的重要な免疫細胞型にインビトロで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)。

40

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、そして脚の骨を一对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

50

）を結合する抗体により骨髓細胞をパンニングすることによって骨髓細胞から単離される。このプロトコルの例に関しては、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髓吸入が、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。骨髓吸入は、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 2×10^8 / 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髓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。骨髓が収穫された後、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、軽く撹拌しながら、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。200 U / mlの最終濃度でのキモパライン（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 Hematotherapy 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、レトロウイルスベクターを用いてヒト胎児コード血液からCD34⁺細胞をトランスダ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（たとえばレトロウイルス、アデノウイルス、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ず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アーと共に、いず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アーは、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に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、コーンスターチ、ポテトスターチ、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

、保存剤、風味剤、顔料、砕解剤、及び医薬的に適合できるキャリア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ア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。適切な坐剤基材は、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。エキ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 $1 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 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徴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。リユーコフェレーシス（leuko pheresis）、トランスダクション、及び再注入が2 ~ 3ヵ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 ; Aebersold 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) Trans fusion 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ら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リウム - 依存性カリウムチャネルをコードするクローンの単離及び配列決定を記載する。

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 FXSIPXXXWAXVTMTTVGYGDMXP (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 32 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 ; 1 M の NaCl、1% SDS , 37 ; $1 \times$ 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 中にサブクローン化し、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) を含むクローンのフラグメントを、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、1 M の NaCl、1% の SDS , 37 ; $2 \times$ 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。

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 (Genebank # 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、hSK 1 (配列番号 13) を単離し、そして読み取り枠、Kozak コンセンサス配列、可能性あるトランスメ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、1 M の NaCl、1% の SDS、及び 100 μ g / 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 $0.5 \times$ 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 種のクローンを単離し、そして分析した : rSK 2 (配列番号 15) 及び rSK 3 (配列番号 16)。さらに、hSK 1 のラット相同体 (rSK 1 (配列番号 14)) を示す部分的クローンを同定した。

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、他のクローン化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)、hSK 1 のための 561 個のアミノ酸 (配列番号 1)、rSK 2 のための 580 個のアミノ酸 (配列番号 2)、及び rSK 3 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

10

20

30

40

50

びC - 末端を有する6個のトランスメンブランセグメントを予測する。それらの配列は、それらのトランスメンブ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

rSK2MS	SCRYNNGVHR	PLSNLSSSR	NLHEMDSEAO
rSK3MS	SCXYSGGVMK	PLSRLSASRR	NLIEAEPEGO
rSK1
hSK1	MFGPRAACSE	PNPCTQVVMN	SHSYNGSVGR	P...LGSGPG ALGRDPPOPE
rSK2	PLQPPASVVG	GGGGASSPSA	AAAASSSAPE	IVVSKPEHNN SNNLALYGTG
rSK3	PLQLF.....	...SPSNPPE	IIISSREDNH	AHOTLLHHPN
rSK1
hSK1	AGHPPQPPHS	PGLQVVVAKS	EPARPSPGSP	RGQPQDQDDD EDDEEDEAGR
rSK2	GGGSTGGGGG	GGGGGGGSGH	GSSSGTKSSK	KKNQONIGYKL GHRRALFEKR
rSK3	ATHNHQHAGT	TAGSTTFP..KANK	RKNONIGYKL GHRRALFEKR
rSK1S	GKPPTVSHRL GHRRALFEKR
hSK1	QR.....AS	GKPSNVGHRL GHRRALFEKR
rSK2	KRLSDYALIF	GMFGIVVMVI	ETELSHGAYD	KASLYSLALK CLISLSTIIL
rSK3	KRLSDYALIF	GMFGIVVMVI	ETELSHGLYS	KDSHFSLALK CLISLSTIIL
rSK1	KRLSDYALIF	GMFGIVVMVT	ETELSHGVYT	KESLCSFALK CLISLSTVIL
hSK1	KRLSDYALIF	GMFGIVVMVT	ETELSHGVYT	KESLYSFALK CLISLSTAIL
rSK2	LGLIIVYHAR	EIQLFMVDNG	ADDWRIAMTY	ERIFFICLEI LVCAIHPIPG
rSK3	LGLIAYHTR	EVOLFVIDNG	ADDWRIAMTY	ERILYISLEH LVCAIHPIPG
rSK1	LGLVILYHAR	EIQLFLVDNG	ADDWRIAMTW	ERVSLISLEL AVCAIHPVPG
hSK1	LGLVVLYHAR	EIQLFMVDNG	ADDWRIAMTC	ERVFLISLEL AVCAIHPVPG
rSK2	NYTFTWTARL	AFSYAPSTTT	ADVDIILSIP	MFLRLYLIAR VMLLHSKLFT
rSK3	EYKFFWTARL	AFSYTPSRAE	ADVDIILSIP	MFLRLYLIAR VMLLHSKLFT
rSK1	HYRFTWTARL	AFSLVPSAAE	ADVDVLLSIP	MFLRLYLLAR VMLLHSRIFT
hSK1	HYRFTWTARL	AFTYAPVAE	ADVDVLLSIP	MFLRLYLLGR VMLLHSKIFT
rSK2	DASSRSIGAL	NKINFNTRFV	MKTLMTICPG	TVLLVFSISL WIIAAWTVRA
rSK3	DASSRSIGAL	NKINFNTRFV	MKTLMTICPG	TVLLMFSISL WIIAAWTVRV
rSK1	DASSRSIGAL	NRVTFNTRFV	TKTLMTICPG	TVLLVFSISS WIVAAWTVRV
hSK1	DASSRSIGAL	NKITFNTRFV	MKTLMTICPG	TVLLVFSISS WIIAAWTVRV
rSK2	CERYHDQQDV	TSNFLGAMWL	ISITFLSIGY	GDMVPNTYCG KGVCLLTGIM
rSK3	CERYHDQQDV	TSNFLGAMWL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG KGVCLLTGIM
rSK1	CERYHDKQEV	TSNFLGAMWL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG KGVCLLTGIM
hSK1	CERYHDKQEV	TSNFLGAMWL	ISITFLSIGY	GDMVPHTYCG KGVCLLTGIM
rSK2	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNFMM	DTQTKRVKN AAANVLRETH
rSK3	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNFMM	DTQTKRIKN AAANVLRETH
rSK1	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNFMM	DTQTKRVKN AAANVLRETH
hSK1	GAGCTALVVA	VVARKLELTK	AEKHVHNFMM	DTQTKRVKN AAANVLRETH
rSK2	LIYKNTKLVK	KIDHAKVRKH	QRKFLOAIHQ	...LRSVKME QRKLNDQANT
rSK3	LIYKHTKLLK	KIDHAKVRKH	QRKFLOAIHQ	...LRGVKME QRKLSQDQANT
rSK1	LIYKHTRLVK	KPDQSRVRKH	QRKFLOAIHQ	AQKLRTVKIE QGKVNDQANT
hSK1	LIYKHTRLVK	KPDQARVRKH	QRKFLOAIHQ	AQKLRSVKIE QGKLNDQANT
rSK2	LVDLAKTONI	MYDHISDLNE	RSEDFEKRIV	TLETKLETLI GSIHALPGLI
rSK3	LVDLSKMONV	MYDLITELND	RSEDLKQIG	SLESKLEHLT ASFNSLPPLI
rSK1	LADLAKAQSI	AYEVVSELOA	QOEELARLA	ALESRLDVLG ASLOALPSLI
hSK1	LTDLAKTOTV	MYDLVSELHA	QHEELARLA	TLESRLDVLG ASLOALPGLI
rSK2	SQTI...RQ	QORDFIETOM	ENYDKHVTYN	AERSRSSRR RRSSTAPPT
rSK3	ADTLRQQQQQ	LLTAFVEARG	ISVAVG....	...TSHAPPS
rSK1	AOAICPLPPP	W...PGPSHL	TAAQSPQSH	WLPTTASDCG *.....

10

20

30

40

```

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

```

4番目の予測されるメンブ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、すべてのクローンに見出される。しかしながら、個々のクローンは、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 - 結合グリコシル化部位 (NXXS/T) (配列番号46) は存在せず、そしてコンセンサ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ブロットは、それらの組織からのrSK3転写体が、rSK3クローン配列番号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ン化し、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⁺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個の塩基のプロープを生成する配列番号34及び35、及び約165個の塩基のプロープ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、クローン化された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、たとえば膵臓からのcDNAライブラリーに基づいて、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プ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プを用いて、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 °でのhyb / 1 × SSC, 55 °での洗浄) で、ライブ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、膵臓cDNAライブ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チャネルクローン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時間一晩、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 (pH8) の溶液において37 °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

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、³⁵S - 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10⁷cpm/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によりソーキングし、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で）。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 1850 S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。

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。rSK 1 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。rSK 1 mRNAはまた、支柱、嗅結節及び新皮質にも検出される。rSK 2 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。rSK 2 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。rSK 2 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パミン結合のパターンと一致する（Gelhart, Neuroscience, 52: 191-205 (1993)）。rSK 3 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。

rSK 1 及びrSK 2 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)⁺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3 µg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、³²P - 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NaPO₄、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、Phosphorimager 445 S 1（Molecular Dynamics）を用いて可視化した。

rSK 1 mRNAはラット脳及び心臓において検出されたが、ところがrSK 2 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rSK 1 mRNAが脳（3.2kb）及び心臓（4.4kb）に存在することを示す。rSK 2 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。rSK 1 mRNAもrSK 2 mRNAも、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓又は骨格筋には検出されなかった。

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、キセノパス卵母細胞におけるrSK 2 及びhSK 1 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

10

20

30

40

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CaCl₂, 1 mMのMgCl₂, 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⁻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⁻ - 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。 - 80 mV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ので (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 - 120 mV ~ 60 mVの電圧ランプは、Cl⁻逆電位近くの - 25 mV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 ~ 60 mVの電圧ランプは、K⁺逆電位に近い - 95 mV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、クローン化されたサブユニットの個々により得られ、そしてこれは、クローン化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、50 nL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⁺を含むCl⁻ - 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CaCl₂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⁺により変化しなかった。

注入の2日後、卵母細胞を、Cl⁻流を最少にするためにCl⁻フリーND96溶液に24時間以上ソークした。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CaCl₂の注入により活性化し、約1 mMのCa²⁺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⁺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⁺]。に対してプロットされた平均逆電位 ± S.D. は、55.4 mV / [K⁺]。における10倍の変化の傾斜及び1 mMの[K⁺]。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、CaCl₂ 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、CaCl₂ を前記槽溶液に添加し、1 ~ 10 μ 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 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 μ M 以下の Ca²⁺ 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 CaCl₂ 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 など, , J. Physiol. , 75 : 463-505 (1979))。Mg²⁺ が槽溶液に添加される実験のために、MgCl₂ 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 Mg²⁺ の結合は無視できる (安定性定数 1.7 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 Ω 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 Elektronik) 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 のインクレメントでの - 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 μ M の Ca²⁺ の添加は、実質的な流れを引き起こした。対称 120mM の K⁺ 及び内部 Mg²⁺ 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 μ M の Ca²⁺ 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エ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 μ M の遊離カルシウム濃度を付与するために CaCl₂ 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 M^{-1} の Ca^{2+} グルコン酸のための安定性定数を仮定して、コンピュータプログラム(CaBuf)により決定した(Dawsonなど., 1969)。 $1 \mu\text{M}$ 以下の Ca^{2+} 濃度を得るために、 1 mM のEGTAを槽溶液に添加し、そして 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繊維の珪硼酸ガラス(World Precision Instruments)から製造し、そして 116 mM のグルコン酸カリウム、 4 mM のKCl、 10 mM のHEPES(pH7.2)により充填した。電極抵抗は典型的には $2 \sim 5 \text{ M}$ 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 200A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 Elektronik)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 0 mV の維持電位から、室温で実施された。 $-100 \sim 60$ 又は 100 mV の 2.5 秒電圧ランプを、 500 Hz のサンプリング周波数で獲得した。値は、平均 $\pm \text{SD}$ 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。

単一チャネルの記録のためには、卵母細胞を、遊離 Ca^{2+} の報告された濃度を得るために、 CaCl_2 により調整された、 116 mM のグルコン酸カリウム、 4 mM のKCl、 10 mM のHEPES、 5 mM のEGTA、pH7.2の槽溶液に添加した。すべての記録は、 116 mM のグルコン酸カリウム、 4 mM のKCl、 10 mM のHEPES、pH7.2を含む、厚壁の石英電極($13 \sim 15 \text{ M}$)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 Elektronik)を用いて 10 KHz で獲得し、そしてMacintosh Quadra 650上に直接的に保存した。単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 秒続く現象のみが包含され、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 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 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、 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 K^+ 濃度の変更(Na により置換された)は、 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($57 \text{ mV} / \text{K}^+$ 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、SK2チャネルに類似して、膜の内面に適用される Ca^{2+} の濃度に依存した。

例 4

例 4 は、rSK2 及びhSK1 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rSK2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 ± 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包含されることを示唆する。hSK1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 ± 0.45 のHill係数を生成した。

hIK1 及びSK2 を比較するために、標準化された流れを、 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 $\text{K}_{0.5}$ (最大の半分の活性化のための濃度、hIK1 に関しては $0.32 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ($n = 7$)及びSK2 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 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 ± 0.4 ($n = 4$) のHill係数を有し、ところがhIK 1は 1.7 ± 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 ($5 \mu\text{M}$) 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^{2+} 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^{2+} 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^{2+} 及び $10 \mu\text{M}$ の Ca^{2+} 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^{2+} ($0.1 \sim 3 \text{mM}$) 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^{2+} 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^{2+} 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、 $0 \sim 100\text{mV}$ の電位での外部方向流の比を、異なった濃度の内部 Mg^{2+} の関数としてプロットした。複数の実験から、異なった Mg^{2+} 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 ± 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^{2+} 阻止が電圧 - 依存性であることを示す。 Mg^{2+} 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 $K_d(0\text{mV}) \exp(zFE/RT)$ により適合せしめ、ここで前記式中、 $K_d(0\text{mV})$ は 6mM であり、 z は Mg^{2+} 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^{2+} 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、卵母細胞からの単一チャネルの記録を記載する。

6 A. 例 6 A は、単一チャネルが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。 μM 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 $0.2 \mu\text{M}$ のカルシウムが複数の開口部を単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、 $0.6 \mu\text{M}$ 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。 $0.4 \mu\text{M}$ 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、単一チャネル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 7052ガラス (Garner) から製造し、そしてそれは $9 \sim 13 \text{M}$ の抵抗を有した。データを 1kHz (Bessel) で濾過し、Pulse (HEKA Elektronik) 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。単一チャネルを、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、そして単一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 \times レベル数) の合計として計算した。Nは、 $0.4 \mu\text{M}$ 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のいず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 $9.9 \pm 0.9\text{pS}$ 及び $9.2 \pm 0.3\text{pS}$ の平均単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 μ M 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 Ca^{2+} の再適用の後、戻った。持続性チャネル活性が - 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プルし、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 ± 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 μ M 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 μ M の 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: 1834-1841 (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種類のカリウム - 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hSK1 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 μ M の K_d によりrSK2 流をブロックし、ところがhSK1 は、76.2 μ M 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 Gardas 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リウム - 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 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_i 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

ト IK 1 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 わ ず か 24 ± 6 % が 10 μ M 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、 hIK 1 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 (hSK 1) ”

(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

30

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

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
 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
 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
 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 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

10

20

30

40

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
 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

10

(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
チャンネルタンパク質 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 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
 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Thr 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
 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
 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
 Ser Leu Trp Ile Ile Ala Ala Trp Thr Val Arg Ala Cys Glu Arg Tyr
 325 330 335

10

20

30

40

His Asp Gln 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 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

10

20

30

(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

40

(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
 チャンネルタンパク質 3 (rSK 3) 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 = “ rSK 3 のコア領域 ”

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

50

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

10

20

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
 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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

(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
チャンネルタンパク質 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	20
			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	30
145					150					155					160	

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
 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 Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr
 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
 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

10

20

30

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) 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 5 :

ATGCCGGGTC CCCGGGCGGC CTGC

(2) 配列番号 6 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 6 :		
TCACCCGCAG TCCGAGGGGG CCAC	24	
(2) 配列番号 7 についての情報 :		
(i) 配列の特徴 :		10
(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		
(B) 型 : 核酸		30
(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		
(B) 型 : 核酸		
(C) 鎖の数 : 一本鎖		40
(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 CTTGAACTTG	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		
(B) 型 : 核酸		
(C) 鎖の数 : 一本鎖		
(D) トポロジー : 直鎖状		50

- (ii) 配列の種類 : DNA
- (xi) 配列 : 配列番号11 :
TCAGGGAAGC CCCCACCCT 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
- (ii) 配列の種類 : DNA 10
- (xi) 配列 : 配列番号12 :
TCACCCACAG TCTGATGCCG TGGT 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
- (ii) 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 CCCAACCCTT GCACCCAGGT AGTCATGAAC	60	
AGCCACAGCT ACAATGGCAG CGTGGGGCGG CCGCTGGGCA GCGGGCCGGG CGCCCTGGGA	120	
CGAGACCCTC CGGACCCTGA GGCCGGCCAC CCCCCACAAC CCCCACACAG CCCGGGCCTC	180	
CAGGTGGTAG TGGCCAAGAG TGAGCCAGCC CGGCCCTCAC CCGGCAGCCC CCGGGGGCAG	240	
CCCCAGGACC AGGACGATGA CGAGGATGAT GAGGAAGATG AGGCCGGCAG GCAGAGAGCC	300	
TCGGGGAAAC CCTCAAATGT GGGCCACCGC CTGGGCCACC GCGGGGCGCT CTTCGAGAAG	360	
CGGAAGCGCC TCAGCGACTA TGCCCTCATT TTCGGCATGT TTGGCATCGT CGTCATGGTG	420	10
ACGGAGACCG AGCTGTCTTG GGGGGTGTAC ACCAAGGAGT CTCTGTACTC ATTCGCACTC	480	
AAATGCCTCA TGAGCCTCTC CACGGCCATC CTGCTGGGTC TCGTTGTCCT CTACCATGCC	540	
CGGGAGATCC AGCTGTTTAT GGTGGACAAC GGGGCTGATG ACTGGCGCAT CGCCATGACC	600	
TGCGAGCGCG TGTTCCTCAT CTCGCTAGAG CTGGCAGTGT GCGCCATTCA CCCGGTGCCC	660	
GGCCACTACC GCTTCACGTG GACGGCGCGG CTGGCCTTCA CGTACGCGCC CTCGGTGCGC	720	
GAGGCCGACG TGGACGTGCT GCTGTCCATC CCCATGTTCC TGCGCCTCTA CCTGCTGGGC	780	
CGGGTGATGC TACTGCACAG CAAAATCTTC ACGGACGCCT CGAGCCGCAG CATCGGGGCC	840	20
CTCAACAAGA TCACCTTCAA CACGCGCTTC GTCATGAAGA CACTCATGAC CATCTGCCCC	900	
GGCACCGTGC TGCTGGTCTT CAGCATCTCC TCCTGGATCA TCGCAGCCTG GACCGTGCGC	960	
GTCTGCGAGA GGTACCACGA CAAGCAGGAA GTGACCAGCA ACTTCCTGGG GGCCATGTGG	1020	
CTGATTTCCA TCACCTTCCT CTCCATTGGC TACGGCGACA TGGTGCCCCA CACCTACTGC	1080	
GGGAAGGGTG TGTGCCTGCT CACTGGCATC ATGGGAGCTG GCTGTACCGC GCTCGTGGTG	1140	
GCTGTGGTGG CTCGGAAGCT GGAGCTCACC AAGGCTGAGA AGCACGTGCA CAACTTCATG	1200	
ATGGACACTC AGCTCACCAA GCGGGTAAAA AACGCCGCTG CTAACGTTCT CAGGGAGACG	1260	
TGGCTCATCT ACAAACATAC CAGGCTGGTG AAGAAGCCAG ACCAAGCCCG GGTTCGGAAA	1320	30
CACCAGCGTA AGTTCCTCCA AGCCATCCAT CAGGCTCAGA AGCTCCGGAG TGTGAAGATC	1380	
GAGCAAGGGA AGCTGAACGA CCAGGCTAAC ACGCTTACCG ACCTAGCCAA GACCCAGACC	1440	
GTCATGTACG ACCTTGATAT GGAGCTGCAC GCTCAGCACG AGGAGCTGGA GGCCCGCCTG	1500	
GCCACCCTGG AAAGCCGCTT GGATGCGCTG GGTGCCTCTC TACAGGCCCT GCCTGGCCTC	1560	
ATCGCCCAAG CCATACGCCC ACCCCCGCCT CCCCTGCCTC CCAGGCCCGG CCCCAGCCCC	1620	
CAAGACCAGG CAGCCCGGAG CTCCCCCTGC CCGTGGACGC CCGTGGCCCC CTCGGACTGC	1680	
GGG	1683	40

(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) 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..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
チャンネルタンパク質 1 (rSK 1) cDNA ”

(xi) 配列 : 配列番号14 :

TCAGGGAAGC CCCCAGACCGT CAGTCACCGC CTGGGCCACC GTAGGGCCCT CTTCGAGAAG	60	
CGTAAACGAC TCAGTGAATA TGCATCATC TTTGGCATGT TCGGGATTGT CGTCATGGTG	120	
ACAGAAACAG AGCTGTCTTG GGGTGTGTAC ACCAAGGAGT CTCTGTGCTC ATTCGCCCTG	180	
AAATGCCTAA TCAGCCTCTC CACTGTCATC CTGCTTGGCC TTGTCATCCT CTACCACGCC	240	
CGAGAGATCC AGCTGTTCTT GGTGGACAAT GGTGCCGATG ACTGSCGCAT TGCCATGACG	300	10
TGGGAGCGAG TGTCCCTGAT CTCGCTGGAG TTGGCTGTGT GTGCCATCCA CCCAGTGCCCT	360	
GGCCACTACC GCTTCACATG GACGGCGCGG CTGGCCTTCT CCCTGGTGCC GTCAGCAGCC	420	
GAGGCGGATG TGGATGTGCT TCTGTCCATC CCCATGTTTC TGCGCCTCTA TCTGCTGGCT	480	
CGGGTCATGC TCCTGCACAG CCGCATCTTC ACGGACGCAT CCAAGTCGAG CATCGGAGCC	540	
CTGAACCGTG TCACCTTCAA CACACGCTTT GTCACCAAGA CACTCATGAC CATCTGCCCT	600	
GGCACCGTGC TGTGGTCTT CAGCATCTCC TCCTGGATCG TCGCTGCATG GACAGTGCGC	660	
GTGTGTGAGA GGTACCATGA TAAACAGGAA GTGACCAGCA ACTTCCTGGG GGCCATGTGG	720	20
CTCATCTCCA TTACCTTCCT GTCCATCGGC TACGGGGACA TGGTGCCGCA CACCTACTGT	780	
GGGAAGGGCG TGTGTCTGCT CACCGGCATC ATGGGAGCAG GCTGCACTGC ACTCGTGGTG	840	
GCCGTCGTGG CCCGCAAGTT GGAACCTACC AAGGCTGAGA AACACGTGCA CAACTTCATG	900	
ATGGACACAC AGCTCACCAA GCGGGTTAAA AACGCCGCTG CAAACGTTCT CAGGGAGACA	960	
TGGCTCATCT ACAAACACAC CAGGCTAGTG AAGAAGCCAG ACCAAAGCCG GGTTCGGAAA	1020	
CACCAGCGTA AGTTCCTTCA GGCCATCCAT CAGGCGCAGA AGCTCCGGAC TGTGAAGATT	1080	
GAACAAGGGA AGGTGAATGA TCAGGCCAAC ACGCTGGCTG ACCTGGCCAA GGCACAGAGC	1140	30
ATCGCATATG AGGTGGTGTC GGAGCTGCAG GCCCAGCAGG AGGAGTTGGA GGCCCGTCTG	1200	
GCTGCCCTGG AGAGCCGCCT GGATGTCTTA GGCGCCTCCC TGCAGGCCCT ACCAAGTCTC	1260	
ATAGCCCAAG CCATATGCCC TCTACCACCA CCCTGGCCCC GGCCCAGTCA CCTGACCACA	1320	
GCCGCCCAGA GCCCACAAAG CCACTGGCTG CCCACCACGG 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) 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..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
チャンネルタンパク質 2 (rSK 2) cDNA ”

(xi) 配列 : 配列番号15 :

ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CGGGGGCGTC ATGCGTCCGC TCAGCAACTT GAGCTCGTCC 60
 CGCCGGAACC TGCACGAGAT GGAATCAGAG GCTCAGCCCC TGCAGCCCCC AGCGTCGGTT 120
 GTAGGAGGAG GTGGTGGTGC GTCCTCCCCG TCTGCTGCCG CCGCCGCCCTC ATCCTCAGCC 180
 CCAGAGATCG TGGTGTCTAA GCCGGAGCAC AACAAATCTA ACAACCTGGC GCTCTACGSA 240
 ACTGGCGGCG GAGGCAGCAC CGGAGGCGGC GCGGGCGGCG GCGGCGGCGG CGGCGGCAGC 300
 GGGCATGGCA GCAGCAGCGG CACTAAGTCC AGCAAAAAGA AGAACCAGAA CATCGGCTAT 360
 AAGCTGGGCC ATCGGCGTGC CCTGTTTGGAG AAGCGCAAGC GGCTCAGCGA CTATGCGCTC 420
 ATCTTCGGCA TGTTCGGCAT CGTGGTTCATG GTCATCGAGA CCGAGCTGTC GTGGGGCGCC 480
 TACGACAAGG CGTCGCTGTA TTCTTTAGCT CTGAAATGCC TTATCAGTCT CTCCACGATC 540
 ATCCTGCTTG GTCTGATCAT CGTATACCAC GCCAGGGAAA TACAGTTATT CATGGTGGAC 600
 AATGGAGCAG ATGACTGGAG AATAGCCATG ACTTATGAAC GTATTTTCTT CATCTGCTTG 660
 GAAATACTGG TGTGTGCTAT TCATCCCATC CCTGGGAATT ATACGTTTAC ATGGACAGCC 720
 CGGCTTGCCCT TCTCCTATGC CCCTTCCACA ACCACTGCAG ACGTGGATAT TATTTTATCT 780
 ATACCAATGT TCTTAAGACT CTATCTGATT GCCAGAGTCA TGCTATTACA TAGCAAACCT 840
 TTCACCGATG CCTCCTCTAG AAGCATTGGG GCACTTAATA AGATAAACTT CAATACGCGT 900
 TTTGTTATGA AGACTTTAAT GACTATCTGC CCAGGAACTG TGCTCTTGGT TTTTAGTATC 960
 TCGTTATGGA TAATTGCCGC ATGGACTGTC CGAGCTTGTG AAAGGTACCA TGATCAACAG 1020
 GATGTCACTA GCAACTTCCT TGGAGCAATG TGGTTGATAT CAATAACTTT TCTCTCCATT 1080
 GGTATGGTG ACATGGTACC TAACACATAC TGTGGGAAAG GAGTCTGCTT GCTTACCGGA 1140
 ATAATGGGTG CAGGTTGCAC AGCCTTGGTG GTAGCCGTAG TGGCAAGGAA GCTAGAACTT 1200
 ACCAAAGCAG AAAAGCATGT GCACAATTTT ATGATGGATA CTCAGCTGAC CAAAAGAGTA 1260
 AAAAAGCAG 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 AATTAGAAAC TTTGATTGGT 1560
 AGCATTCATG CCCTCCCTGG GCTTATCAGC CAGACCATCA GACAGCAGCA AAGGGACTTC 1620
 ATAGAGACAC AGATGGAGAA CTATGACAAG CATGTACCTT ACAATGCTGA GCGTTCCCGG 1680
 TCCTCGTCCA GGAGGCGGCG GTCCTCCTCC ACAGCGCCAC CAACTTCATC TGAGAGTAGC 1740

10

20

30

40

(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

50

チャンネルタンパク質 3 (rSK 3) の N - 末端切断された cDNA "

(xi) 配列 : 配列番号16 :

ATGAGCTCCT	GCAAATACAG	CGGTGGGGTC	ATGAAGCCCC	TCAGCCGCCT	CAGCGCCTCT	60	
CGGAGAAACC	TTATCGAGGC	CGAGCCTGAG	GGCCAACCCC	TCCAGCTCTT	CAGTCCCAGC	120	
AACCCCCCAG	AGATTATCAT	CTCCTCCAGG	GAGGATAACC	ATGCCCACCA	GA CTCTGCTC	180	
CATCACCCCA	ACGCTACCCA	CAACCACCAG	CATGCCGGCA	CCACTGCTGG	CAGCACCACC	240	
TTCCCCAAAG	CCAACAAGCG	GAAAAACCAA	AACATTGGCT	ATAAGCTGGG	GCACAGGAGG	300	
GCCCTGTTTG	AAAAGAGAAA	GCGACTGAGT	GACTATGCTC	TGATTTTGGG	GATGTTTGGA	360	10
ATTGTTGTTA	TGGTGATAGA	GACCGAACTG	TCTTGGGGTT	TGTA CTCAA	GGATTCCATG	420	
TTTTCGTTGG	CCCTGAAATG	CCTTATCAGT	TTATCCACCA	TCATCCTGCT	TGGTTTGATC	480	
ATCGCCTACC	ACACAAGGGA	AGTACAGCTC	TTTGTGATCG	ACAATGGTGC	AGATGACTGG	540	
CGGATAGCCA	TGACCTATGA	GCGCATCCTC	TACATCAGCC	TGGAGATGCT	GGTGTGCGCC	600	
ATCCACCCCA	TTCCTGGAGA	GTACAAGTTC	TTCTGGACGG	CACGCCTGGC	CTTCTCCTAC	660	
ACCCCTCTC	GGGCAGAGGC	TGACGTGGAC	ATTATTCTGT	CCATCCCAT	GTTCTTGCGC	720	
CTATACCTGA	TCGCCCCGAGT	CATGCTGCTA	CATAGCAAGC	TCTTCACGGA	TGCCTCATCC	780	
CGAAGCATCG	GGGCCCTCAA	CAAGATCAAC	TTCAACACCC	GATTTCGTCAT	GAAGACGCTC	840	20
ATGACCATCT	GCCCGGGCAC	GGTGCTGCTA	ATGTTTCAGCA	TCTCTCTGTG	GATCATCGCT	900	
GCCTGGACTG	TGAGAGTCTG	TGAAAGGTAC	CATGACCAGC	AGGACGTAAC	TAGTAACTTT	960	
CTGGGTGCCA	TGTGGCTCAT	CTCCATCACG	TTCCTTTCCA	TTGGCTATGG	GGACATGGTG	1020	
CCCCACACAT	ACTGTGGGAA	AGGTGTCTGT	CTTCTCACTG	GCATCATGGG	TGCAGGCTGC	1080	
ACTGCCCTCG	TGGTAGCTGT	GGTTGCCCCG	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	TTCCCTGCCC	1500	
CTGCTCATCG	CAGACACCCT	GCGCCAACAG	CAGCAGCAGC	TGCTCACTGC	CTTCGTGGAG	1560	
GCCCCGGGCA	TCAGTGTGGC	TGTGGGAACT	AGCCACGCCC	CTCCCTCTGA	CAGCCCTATC	1620	
GGGATCAGCT	CCACCTCTTT	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

50

(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 Gly Ala Ser Ser
 35 40 45
 Pro Ser Ala 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
 Leu Tyr Gly Thr Gly Gly 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
 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

10

20

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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 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 Ala Asn Val Leu Arg Glu Thr Trp Leu
 420 425 430
 Ile Tyr Lys Asn Thr Lys Leu Val Lys 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
 465 470 475 480
 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 Gln Arg Asp Phe Ile Glu Ala Gln Met
 530 535 540
 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 Arg Ser Ser Ser Thr Ala Pro Pro Thr Ser Ser
 565 570 575

10

20

30

40

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) 鎖の数 :

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

(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		

10

20

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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

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
 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
 530 535 540
 Thr Ser Phe Pro Thr Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Ser Cys
 545 550 555

10

(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 (hSK 2) cDNA "

(xi) 配列 : 配列番号21 :

ATGAGCAGCT GCAGGTACAA CGGGGGCGTC ATGCGGCCGC TCAGCAACTT GAGCGCGTCC	60	
CGCCGGAACC TGCACGAGAT GGAATCAGAG GCGCAGCCCC TGCAGCCCCC CGCGTCTGTC	120	
GGAGGAGGTG GCGGCGCGTC CTCCCCGTCT GCAGCCGCTG CCGCCGCCGC CGCTGTTTCG	180	
TCCTCAGCCC CCGAGATCGT GGTGTCTAAG CCCGAGCACA ACAACTCCAA CAACCTGGCG	240	
CTCTATGGAA CCGGCGGCGG AGGCAGCACT GGAGGAGGCG GCGGCGGTGG CGGGAGCGGG	300	
CACGGCAGCA GCAGTGGCAC CAAGTCCAGC AAAAAGAAAA ACCAGAACAT CGGCTACAAG	360	
CTGGGCCACC GCGCGCCCCT GTTCGAAAAG CGCAAGCGGC TCAGCGACTA CGCGCTCATC	420	10
TTCGGCATGT TCGGCATCGT GGTTCATGGT ATCGAGACCG AGCTGTCTGT GGGCGCCTAC	480	
GACAAGGCGT CGTGTATTTC CTTAGCTCTG AAATGCCTTA TCAGTCTCTC CACGATCATC	540	
CTGCTCGGTC TGATCATCGT GTACCACGCC AGGGAAATAC AGTTGTTTCAT GGTGGACAAT	600	
GGAGCAGATG ACTGGAGAAT AGCCATGACT TATGAGCGTA TTTTCTTCAT CTGCTTGAA	660	
ATACTGGTGT GTGCTATTCA TCCCATACCT GGGAAATTATA CATTACATG GACGGCCCCG	720	
CTTGCCCTCT CCTATGCCCC ATCCACAACC ACCGCTGATG TGGATATTAT TTTATCTATA	780	
CCAATGTTCT TAAGACTCTA TCTGATTGCC AGAGTCATGC TTTTACATAG CAACTTTTC	840	20
ACTGATGCCT CCTCTAGAAG CATTGGAGCA CTTAATAAGA TAAACTTCAA TACACGTTTT	900	
GTTATGAAGA CTTTAATGAC TATATGCCCA GGAAGTGTAC TCTTGGTTTT TAGTATCTCA	960	
TTATGGATAA TTGCCGCATG GACTGTCCGA GCTTGTGAAA GGTACCATGA TCAACAGGAT	1020	
GTTACTAGCA ACTTCCTTGG AGCGATGTGG TTGATATCAA TAACTTTTCT CTCCATTGGT	1080	
TATGGTGACA TGGTACCTAA CACATACTGT GGAAAAGGAG TCTGCTTACT TACTGGAATT	1140	
ATGGGTGCTG GTTGACACAGC CCTGGTGGTA GCTGTAGTGG CAAGGAAGCT AGAACTTACC	1200	
AAAGCAGAAA AACACGTGCA CAATTTTCATG ATGGATACTC AGCTGACTAA AAGAGTAAAA	1260	
AATGCAGCTG CCAATGTACT CAGGGAAAACA TGGCTAATTT ACAAAAATAC AAAGCTAGTG	1320	30
AAAAAGATAG ATCATGCAAA AGTAAGAAAA CATCAACGAA AATTCCTGCA AGCTATTTCAT	1380	
CAATTAAGAA GTGTAAAAAT GGAACAGAGG AACTGAATG ACCAAGCAAA CACTTTGGTG	1440	
GACTTGGCAA AGACCCAGAA CATCATGTAT GATATGATTT CTGACTTAAA CGAAAGGAGT	1500	
GAAGACTTCG AGAAGAGGAT TGTTACCCTG GAAACAAAAT TAGAGACTTT GATTGGTAGC	1560	
ATCCACGCCC TCCCTGGGCT CATAAGCCAG ACCATCAGGC AGCAGCAGAG AGATTTTCATT	1620	
GAGGCTCAGA TGGAGAGCTA CGACAAGCAC GTCACCTACA ATGCTGAGCG GTCCCGGTCC	1680	
TCGTCCAGGA GCGGCGGGTC CTCTCCACA GCACCACCAA CTTTCATCAGA 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) 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..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 GSCCAACCCC TCCAGCTTTT CAGCCCTAGC	120	
AACCCCCCGG AGATCGTCAT CTCCTCCCGG GAGGACAACC ATGCCCACCA GACCCTGCTC	180	
CATCACCCTA ATGCCACCCA CAACCACCAG CATGCCGGCA CCACCGCCAG CAGCACCACC	240	
TTCCCCAAAG CCAACAAGCG GAAAAACCAA AACATTGGCT ATAAGCTGGG ACACAGGAGG	300	10
GCCCTGTTTG AAAAGAGAAA GCGACTGAGT GACTATGCTC TGATTTTGGG GATGTTTGGG	360	
ATTGTTGTGA TGGTGATAGA GACCGAGCTC TCTTGGGGTT TGTACTCAAA GGACTCCATG	420	
TTTTCGTTGG CCCTGAAATG CCTTATCAGT CTGTCCACCA TCATCCTTTT GGGCTTGATC	480	
ATCGCCTACC ACACACGTGA AGTCCAGCTC TTCGTGATCG ACAACGGCGC GGATGACTGG	540	
CGGATAGCCA TGACCTACGA GCGCATCCTC TACATCAGCC TGGAGATGCT GGTGTGCGCC	600	
ATCCACCCCA TTCCTGGCGA GTACAAGTTC TTCTGGACGG CACGCCTGGC CTTCTCCTAC	660	
ACACCCTCCC GGGCGGAGGC CGATGTGGAC ATCATCCTGT CTATCCCCAT GTTCCTGCGC	720	
CTGTACCTGA TCGCCGAGT CATGCTGCTG CACAGCAAGC TCTTCACCGA TGCCTCGTCC	780	20
CGCAGCATCG GGGCCCTCAA CAAGATCAAC TTCAACACCC GCTTTGTCAT GAAGACGCTC	840	
ATGACCATCT GCCCTGGCAC TGTGCTGCTC GTGTTGAGCA TCTCTCTGTG GATCATTGCT	900	
GCCTGGACCG TCCGTGTCTG TGAAAGGTAC CATGACCAGC AGGACGTAAC TAGTAACTTT	960	
CTGGGTGCCA TGTGGCTCAT CTCCATCACA TTCCTTTCCA TTGGTTATGG GGACATGGTG	1020	
CCCCACACAT ACTGTGGGAA AGGTGTCTGT CTCCTCACTG GCATCATGGG TGCAGGCTGC	1080	
ACTGCCCTTG TGGTGGCCGT GGTGGCCCCG AAGCTGGAAC TCACCAAAGC GGAGAAGCAC	1140	
GTTCATAACT TCATGATGGA CACTCAGCTC ACCAAGCGGA TCAAGAATGC TGCAGCCAAT	1200	30
GTCCCTTCGGG AAACATGGTT AATCTATAAA CACACAAAGC TGCTAAAGAA GATTGACCAT	1260	
GCCAAAGTGA GGAAACACCA GAGGAAGTTC CTCCAAGCTA TCCACCAGTT GAGGAGCGTC	1320	
AAGATGGAAC AGAGGAAGCT GAGTGACCAA GCCAACACTC TGGTGGACCT TTCCAAGATG	1380	
CAGAATGTCA TGTATGACTT AATCACAGAA CTCAATGACC GGAGCGAAGA CCTGGAGAAG	1440	
CAGATTGGCA GCCTGGAGTC GAAGCTGGAG CATCTCACCG CQAGCTTCAA CTCCCTGCCG	1500	
CTGCTCATCG CCGACACCCT GCGCCAGCAG CAGCAGCAGC TCCTGTCTGC CATCATCGAG	1560	
GCCCCGGGTG TCAGCGTGCC AGTGGGCACC ACCCACACCC CAATCTCCGA TAGCCCCATT	1620	40
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 :

10

CTAGCTACTC TCTGATGAAG TTG

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 :

20

ATGAGCTCCT GCAAGTATAG C

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 :

30

TTAGCAACTG CTTGAAGTTG TG

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

40

(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 :

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
 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
 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
 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
 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) 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) 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) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

20

(ii) 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

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

30

(ii) 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
チャンネルタンパク質 1 (hIK1) cDNA ”

(xi) 配列：配列番号31：

ATGGGCGGGG ATCTGGTGCT TGGCCTGGGG GCCTTGAGAC GCCGAAAGCG CTTGCTGGAG	60	
CAGGAGAAGT CTCTGGCCGG CTGGGCACTG GTGCTGGCAG GAACTGGCAT TGGACTCATG	120	
GTGCTGCATG CAGAGATGCT GTGGTTCGGG GGGTGCTCGT GGGCGCTCTA CCTGTTCTTG	180	
GTTAAATGCA CGATCAGCAT TTCCACCTTC TTA CTCTCTCT GCCTCATCGT GGCCTTTCAT	240	
GCCAAAGAGG TCCAGCTGTT CAGTACCGAC AACGGGCTGC GGGACTGGCG CGTGGTGCTC	300	
CTGACCGGGC GGCAGGCGGC GCAGATCGTG CTGGAGCTGG TGGTGTGTGG GCTGCACCCG	360	
GCGCCCGTGC GGGGCCCCGCC GTGCGTG CAG GATTTAGGGG CGCCGCTGAC CTCCCCG CAG	420	
CCCTGGCCGG GATTCTCTGGG CCAAGGGGAA GCGCTGCTGT CCCTGGCCAT GCTGCTGCGT	480	10
CTCTACCTGG TGCCCCGCGC CGTGCTCTCTG CGCAGCGGCG TCCTGCTCAA CGCTTCCTAC	540	
CGCAGCATCG GCGCTCTCAA TCAAGTCCGC TTCCGCCACT GGTTCGTGGC CAAGCTTTAC	600	
ATGAACACGC ACCCTGGCCG CCTGCTGCTC GGCTTCACGC TTGGCCTCTG GCTGACCACC	660	
GCCTGGGTGC TGTCCGTGGC CGAGAGGCAG GCTGTTAATG CCACTGGGCA CTTTCAGAC	720	
ACACTTTGGC TGATCCCCAT CACATTCCTG ACCATCGGCT ATGGTGACGT GGTGCCGGGC	780	
ACCATGTTGG GCAAGATCGT CTGCCTGTGC ACTGGAGTCA TGGGTGTCTG CTGCACAGCC	840	
CTGCTGGTGG CCGTGGTGGC CCGGAAGCTG GAGTTTAACA AGGCAGAGAA GCACGTGCAC	900	20
AACTTCATGA TGGATATCCA GAATACCAA GAGATGAAGG AGTCCGCTGC CCGAGTGCTA	960	
CAAGAAGCCT GGATGTTCTA CAAACATACT CGCAGGAAGG AGTCTCATGC TGCCCGCAGG	1020	
CATCAGCGCA AGCTGCTGGC CGCCATCAAC GCGTTCCGCC AGGTGCGGCT GAAACACCGG	1080	
AAGCTCCGGG AACAAAGTGAA CTCCATGGTG GACATCTCCA AGATGCACAT GATCCTGTAT	1140	
GACCTGCAGC AGAATCTGAG CAGCTCACAC CGGGCCCTGG AGAAACAGAT TGACACGCTG	1200	
GCGGGGAAGC TGGATGCCCT GACTGAGCTG CTTAGCACTG CCCTGGGGCC GAGGCAGCTT	1260	
CCAGAACCCA GCCAGCAGTC CAAGTAG	1287	30

(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ンネルタンパク質 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 :

Met Gly Gly Asp Leu Val Leu Gly Leu Gly Ala Leu Arg Arg Arg Lys
1 5 10 15
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	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			
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			
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		
Val	Met	Gly	Val	Cys	Cys	Thr	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Val	Ala	Arg
			275				280					285			
Lys	Leu	Glu	Phe	Asn	Lys	Ala	Glu	Lys	His	Val	His	Asn	Phe	Met	Met
						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		
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
						375					380				
Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	His	Arg	Ala	Leu	Glu	Lys	Gln	Ile	Asp	Thr	Leu
385					390					395		</			

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

(i) 配列の特徴：

(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33 :

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

(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34 :

21

(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35 :

21

(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36 :

21

(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 : ATGGGCGGGG 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 : ATGGGCGGGG 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 :		

Met Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys
20

- 10

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 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 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln 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 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

10

20

30

40

Lys Cys Leu Ile Ser Leu Ser Thr Ile Ile Leu Leu Gly Leu 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
 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
 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
 545 550 555 560
 Met Asp Thr Gln Leu Thr Lys Arg Ile Lys Asn Ala 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
 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

10

20

30

40

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 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
 チャンネルタンパク質 3 (rSK 3) の十分な長さのcDNA ”

20

(xi) 配列 : 配列番号44 :

CATGGACACT TCTGGGCACT TCCATGAGTC GGGGGTGGGG GATCTGGATG AAGACCCCAA	60
GTGTCCCTGT CCATCTTCTG GGGACGAGCA ACAGCAGCAA CAGCAACCGC CACCACCGTC	120
AGCGCCACCA GCAGTCCCCC AGCAGCCTCC GGGACCCTTG CTGCAGCCTC AGCCTCCGCA	180
GCTTCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA	240
GGCTCCACTG CACCCCTGTC CTCAGCTTGC CCAACTCCAG AGCCAGGTTG TCCATCCTGG	300
TCTGTTGCAC TCTTCTCCCA CGGCTTTCAG GGCTCCCAAT TCAGCCAACT CCACCGCCAT	360
CCTCCACCCT TCCTCCAGGC AAGGCAGCCA GCTAAATCTC AATGACCACT TGGTTGSCCA	420
CTCTCCAAGT TCCACAGCCA CAAGTGGGCC TGSTGGAGGC AGCCGGCACC GGCAGGCCAG	480
CCCCGTGGTG CACCGGCGGG ACAGCAATCC CTTACGGAG ATAGCTATGA GTCCTGCAA	540
ATACAGCGGT GGGGTCATGA AGCCCCTCAG CCGCCTCAGC GCCTCTCGGA GAAACCTTAT	600

30

CGAGGCCGAG CCTGAGGGCC AACCCCTCCA GCTCTTCAGT CCCAGCAACC CCCCAGAGAT 660
TATCATCTCC TCCAGGGAGG ATAACCATGC CCACCAGACT CTGCTCCATC ACCCCAACGC 720
TACCCACAAC CACCAGCATG CCGGCACCAC TGCTGGCAGC ACCACCTTCC CCAAAGCCAA 780
CAAGCGGAAA AACCAAAACA TTGGCTATAA GCTGGGGCAC AGGAGGGCCC TGTTTGAAAA 840
GAGAAAGCGA CTGAGTGACT ATGCTCTGAT TTTTGGGATG TTTGGAATTG TTGTTATGGT 900
GATAGAGACC GAACTGTCTT GGGGTTTGTA CTCAAAGGAT TCCATGTTTT CGTTGGCCCT 960
GAAATGCCTT ATCAGTTTAT CCACCATCAT CCTGCTTGGT TTGATCATCG CCTACCACAC 1020
AAGGGAAGTA CAGCTCTTTG TGATCGACAA TGGTGCAGAT GACTGGCGGA TAGCCATGAC 1080
CTATGAGCGC ATCCTCTACA TCAGCCTGGA GATGCTGGTG TGCGCCATCC ACCCCATTCC 1140
TGGAGAGTAC AAGTTCTTCT GGACGGCACG CCTGGCCTTC TCCTACACCC CCTCTCGGGC 1200
AGAGGCTGAC GTGGACATTA TTCTGTCCAT CCCCATGTTT TTGCGCCTAT ACCTGATCGC 1260
CCGAGTCATG CTGCTACATA GCAAGCTCTT CACGGATGCC TCATCCCGAA GCATCGGGGC 1320
CCTCAACAAG ATCAACTTCA ACACCCGATT CGTCATGAAG ACGCTCATGA CCATCTGCCC 1380
GGGCACGGTG CTGCTAATGT TCAGCATCTC TCTGTGGATC ATCGCTGCCT GGA CTGTGAG 1440
AGTCTGTGAA AGGTACCATG ACCAGCAGGA CGTAACTAGT AACTTTCTGG GTGCCATGTG 1500
GCTCATCTCC ATCACGTTCC TTTCCATTGG CTATGGGGAC ATGGTGCCCC ACACATACTG 1560
TGGGAAAGGT GTCTGTCTTC TCACTGGCAT CATGGGTGCA GGCTGCACTG CCTCTGTGGT 1620
AGCTGTGGTT GCCCGGAAGC TCGAACTCAC CAAAGCAGAG AAGCATGTGC ACAACTTCAT 1680
GATGGACACT CAGCTCACCA AACGGATCAA GAACGCTGCC GCCAATGTCC TCCGGGAAAC 1740
ATGGCTGATC TACAAACACA CAAAGCTGCT AAAGAAGATT GACCACGCCA AAGTCAGGAA 1800
ACACCAGAGG AAGTTCTCTC AAGCTATTCA CCAACTGAGG GGTGTCAAGA TGAACAAAG 1860
GAAGCTGAGT GACCAAGCCA ACACCCTGGT GGACCTTTCC AAGATGCAGA ACGTCATGTA 1920
TGA CTTGATC ACGGAGCTCA ACGACCGGAG TGAAGACCTG GAAAAGCAGA TTGGCAGCCT 1980
GGAATCCAAG CTGGAGCACC TCACAGCCAG CTTCAATTCC CTGCCCCCTGC TCATCGCAGA 2040
CACCCTGCGC CAACAGCAGC AGCAGCTGCT CACTGCCTTC GTGGAGGCCC GGGGCATCAG 2100
TGTGGCTGTG GGAAGTAGCC ACGCCCCCTCC CTCTGACAGC CCTATCGGGA TCAGCTCCAC 2160
CTCTTTCCCA ACCCCATACA CAAGTTCAAG CAGTTGCTAA ATAAACTCC CCACTCCAGA 2220
AGCA 2224

10

20

30

(2) 配列番号45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) 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

40

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 ” / 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

(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 (hSK 3) ”

(xi) 配列 : 配列番号47 :

20

Met Asp Thr Ser Gly His Phe His Asp 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 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 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 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
 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
 225 230 235 240

10

20

30

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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 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
 465 470 475 480
 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
 Ala Val Val Ala Arg Lys Leu Glu Leu Thr Lys Ala Glu Lys His Val
 545 550 555 560
 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

10

20

30

40

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

10

(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 CCCCCTCTTC TTTCTCCAAG CTCCCCTCCT GCTCTCCCTC CCTGCCCAAT 60

ACAATGCATT CTTGAGTGGC AGCGTCTGGA CTCCAGGCAG CCCCAGAGAA CCGAAGCAAG 120

CCAAAGAGAG	GACTGGAGCC	AAGATACTGG	TGGGGGAGAT	TGGATGCCTG	GCTTTCTTTG	180
AGGACATCTT	TGGAGCGAGG	GTGGCTTTGG	GGTGGGGGCT	TGTGCTGCAG	GGAATACAGC	240
CAGGCCCCAA	GATGGACACT	TCTGGGCACT	TCCATGACTC	GGGGGTGGGG	GACTTGGATG	300
AAGACCCCCA	GTGCCCCTGT	CCATCCTCTG	GGGATGAGCA	GCAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	360
AACAGCAGCA	GCAGCCACCA	CCGCCAGCGC	CACCAGCAGC	CCCCCAGCAG	CCCCTGGGAC	420
CCTCGCTGCA	GCCTCAGCCT	CCGCAGCTTC	AGCAGCAGCA	GCAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	480
AGCAGCAGCA	GCAGCAGCAG	CAGCAGCCAC	CGCATCCCCCT	GTCTCAGCTC	GCCCCAACTCC	540
AGAGCCAGCC	CGTCCACCCT	GGCCTGCTGC	ACTCCTCTCC	CACCGCTTTC	AGGGCCCCCC	600
CTTCGTCCAA	CTCCACCGCC	ATCCTCCACC	CTTCCTCCAG	GCAAGGCAGC	CAGCTCAATC	660
TCAATGACCA	CTTGCTTGCC	CACTCTCCAA	GTTCCACAGC	TACAAGTGGG	CCTGGCGGAG	720
GCAGCCGGCA	CCGACAGGCC	AGCCCCCTGG	TGCACCGGCG	GGACAGCAAC	CCCTCCACGG	780
AGATCGCCAT	GAGCTCCTGC	AAGTATAGCG	GTGGGGTCAT	GAAGCCCCCTC	AGCCGCCTCA	840
GCGCCTCCCG	GAGGAACCTC	ATCGAGGCCG	AGACTGAGGG	CCAACCCCTC	CAGCTTTTCA	900
GCCCTAGCAA	CCCCCGGAG	ATCGTCATCT	CCTCCCGGGA	GGACAACCAT	GCCCACCAGA	960
CCCTGCTCCA	TCACCCTAAT	GCCACCCACA	ACCACCAGCA	TGCCGGCACC	ACCGCCAGCA	1020
GCACCACCTT	CCCCAAAGCC	AACAAGCGGA	AAAACCAAAA	CATTGGCTAT	AAGCTGGGAC	1080
ACAGGAGGGC	CCTGTTTGAA	AAGAGAAAGC	GACTGAGTGA	CTATGCTCTG	ATTTTTGGGA	1140
TGTTTGGAAT	TGTTGTTATG	GTGATAGAGA	CCGAGCTCTC	TGGGGGTTTG	TACTCAAAGG	1200
ACTCCATGTT	FTCGTTGGCC	CTGAATGCCC	TTATCAGTCT	GTCCACCATC	ATCCTTTTGG	1260
GCTTGATCAT	CGCCTACCAC	ACACGTGAAG	TCCAGCTCTT	CGTGATCGAC	AACGGCGCGG	1320
ATGACTGGCG	GATAGCCATG	ACCTACGAGC	GCATCCTCTA	CATCAGCCTG	GAGATGCTGG	1380
TGTGCGCCAT	CCACCCCATT	CCTGGCGAGT	ACAAGTTCTT	CTGGACGGCA	CGCCTGGCCT	1440
TCTCCTACAC	ACCCTCCCGG	GCGGAGGCCG	ATGTGGACAT	CATCCTGTCT	ATCCCCATGT	1500
TCCTGCGCCT	GTACCTGATC	GCCCCAGTCA	TGCTGCTGCA	CAGCAAGCTC	TTCACCGATG	1560
CCTCGTCCCG	CAGCATCGGG	GCCCTCAACA	AGATCAACTT	CAACACCCGC	TTTGTCATGA	1620
AGACGCTCAT	GACCATCTGC	CCTGGCACTG	TGCTGCTCGT	GTTCAGCATC	TCTCTGTGGA	1680
TCATTGCTGC	CTGGACCGTC	CGTGTCTGTG	AAAGGTACCA	TGACCAGCAG	GACGTAACCTA	1740
GTAACCTTCT	GGGTGCCATG	TGGCTCATCT	CCATCACATT	CCTTTCCATT	GGTTATGGGG	1800
ACATGGTGCC	CCACACATAC	TGTGGGAAAG	GTGTCTGTCT	CCTCACTGGC	ATCATGGGTG	1860
CAGGCTGCAC	TGCCCTTGTC	GTGGCCGTGG	TGGCCCGAAA	GCTGGAACTC	ACCAAAGCGG	1920
AGAAGCACGT	TCATAACTTC	ATGATGGACA	CTCAGCTCAC	CAAGCGGATC	AAGAATGCTG	1980
CAGCCAATGT	CCTTCGGGAA	ACATGGTTAA	TCTATAAACA	CACAAAGCTG	CTAAAGAAGA	2040
TTGACCATGC	CAAAGTGAGG	AAACACCAGA	GGAAGTTCCT	CCAAGCTATC	CACCAGTTGA	2100
GGAGCGTCAA	GATGGAACAG	AGGAAGCTGA	GTGACCAAGC	CAACACTCTG	GTGGACCTTT	2160

10

20

30

40

CCAAGATGCA GAATGTCATG TATGACTTAA TCACAGAACT CAATGACCGG AGCGAAGACC	2220
TGGAGAAGCA GATTGGCAGC CTGGAGTCGA AGCTGGAGCA TCTCACCGCC AGCTTCAACT	2280
CCCTGCCGCT GCTCATCGCC GACACCCTGC GCCAGCAGCA GCAGCAGCTC CTGTCTGCCA	2340
TCATCGAGGC CCGGGGTGTC AGCGTGGCAG TGGGCACCAC CCACACCCCA ATCTCCGATA	2400
GCCCCATTGG GGTGAGCTCC ACCTCCTTCC CGACCCCGTA CACAAGTTCA AGCAGTTGCT	2460
AA	2462

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		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 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェストミッチェル ストリート 2 4 3 3

(72)発明者 メイリー, ジェイムス

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェストウエストウッド ドライブ 1 4 4 5

(72)発明者 ボンド, クリス ティー.

アメリカ合衆国, オレゴン 9 7 2 0 1, ポートランド, サウス ウェストミッチェル ストリート 2 4 3 3

(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 2 7 7 1 2, ダーハム, ブルームセッジ ウェイ 3 1 0 5

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