

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3600526号
(P3600526)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C O 7 K 14/47

C O 7 K 14/47

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 5/00

A

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数 7 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2000-528597(P2000-528597)

(86) (22) 出願日 平成11年1月20日(1999.1.20)

(86) 国際出願番号 PCT/JP1999/000190

(87) 国際公開番号 WO1999/037677

(87) 国際公開日 平成11年7月29日(1999.7.29)

審査請求日 平成15年7月3日(2003.7.3)

(31) 優先権主張番号 特願平10-11434

(32) 優先日 平成10年1月23日(1998.1.23)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願平10-346198

(32) 優先日 平成10年12月4日(1998.12.4)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(74) 代理人 100089200

弁理士 長井 省三

(74) 代理人 100098501

弁理士 森田 拓

(74) 代理人 100109357

弁理士 矢野 恵美子

(72) 発明者 三宅 哲

茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬
株式会社内

(72) 発明者 望月 忍

茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬
株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規カリウムチャネル蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列を有するカリウムチャネル蛋白質。

【請求項2】

ストリンジェントな条件下で、配列番号1もしくは5の遺伝子とハイブリダイズする遺伝子がコードするカリウムチャネル蛋白質。

【請求項3】

請求の範囲1乃至2記載のカリウムチャネル蛋白質をコードする遺伝子配列を有する遺伝子。

【請求項4】

配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を有する遺伝子。

【請求項5】

請求の範囲3乃至4記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項6】

請求の範囲5記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項7】

請求の範囲6記載の宿主細胞を用いる請求の範囲1乃至2記載のカリウムチャネル蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に脳に限定して発現している新規カリウムチャンネル蛋白質または同効物、当該蛋白質又は同効物をコードする遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該ベクターを含む宿主細胞等に関するものである。

背景技術

カリウムチャンネルは、細胞の表面膜に存在しカリウムイオンを選択的に通す蛋白質で、細胞の膜電位のコントロールにおいて重要な役割を担っていると考えられている。特に、神経・筋細胞においては活動電位の頻度や持続性などを調節することにより、中枢・末梢神経のニューロトランスミッション、心臓のペースメーカー、筋肉の収縮などに寄与している。また、ホルモンの分泌、細胞容量の調整、細胞の増殖などにも関与していることが示されている。 10

チャンネルの開閉機構から分類すると今までに膜電位依存性カリウムチャンネル、内向き整流性カリウムチャンネル、カルシウム依存性カリウムチャンネル、受容体カップル型カリウムチャンネルなどが同定されている。そのほか、ATP依存性カリウムチャンネル、pH依存性カリウムチャンネルなども報告されている。このうち、膜電位依存性カリウムチャンネルは、膜電位が脱分極した際に開口する特性を有している。通常、カリウムイオンは細胞外が約5mM、細胞内が約150mMと非平衡状態で存在する。このため、脱分極により膜電位依存性カリウムチャンネルが開口すると、細胞内から細胞外へとカリウムイオンが流出し、結果として膜電位の回復（再分極）を引き起こす。そのため、膜電位依存性チャンネルの開口に伴って、神経・筋細胞の興奮性の低下などが誘導されることになる。また、非興奮性細胞においても例えば Ca^{2+} に対する駆動力の増大し同イオンの細胞内への流入が増大するなどの細胞機能の変化を引き起こす。膜電位依存性チャンネルの開口を修飾する化合物は、神経・筋細胞の興奮性をはじめとして、さまざまな細胞の機能を調整できる可能性を持っている。 20

膜電位依存性カリウムチャンネルの幾つかはすでに脳や心臓からその遺伝子が単離されており、タンパクの一次構造が明らかにされている。その一次配列より膜電位依存性カリウムチャンネルは6箇所の膜貫通ドメイン（S1～S6）と1個のイオン透過領域（H5）を持っていることが示唆されている。また、第4番目の膜貫通ドメインS4は正荷電を持った塩基性アミノ酸が3から4塩基おきに存在し、電圧センサーとして機能していることが推測されている。 30

これらのチャンネルはアミノ酸配列の類似性によりShaker型とeag型に大きく2分することができる。Shaker型は非常に多様性の高いファミリーで、さらにKv1、Kv2、Kv3、Kv4の4群に分けることができる。一方、eag型はeag、eag-related gene、elkによって構成されており、その近縁遺伝子として過分極活性型のカリウムチャンネルであるKAT遺伝子群、サイクリック・ヌクレオチドによって活性化するカチオンチャンネルなどが存在する。 40

脳における膜電位依存性のカリウム電流の重要性については、これらのクローン化された膜電位依存性カリウムチャンネルを用いて幾つかの知見が得られている。例えば、Kv1.1については、アンチセンスを用いたin vivo実験により記憶や痛みとの関連性が示唆されている（Meiri, N. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4430-4434; Galeotti N. et al. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 941-949）。Kv3.1については、大脳皮質のGABA作動性介在ニューロンの興奮性に関与していることが示されている（Massengill, J. et al. (1997) *J. Neurosci.* 17, 3136-3147）。一方、膜電位依存性カリウムチャンネルの非選択的な阻害物質であるtetraethylammoniumや4-aminopyridineを用いた実験も幾つか報告されている。Tetraethylammoniumは大脳皮質由来の神経細胞の膜電位依存性カリウム電流を抑制するとともに、同神経細胞のアポトーシスも抑制することが示されている（Yu, S. P. et al. (1997) *Science* 278, 114-117）。また、4-aminopyridineの脳室内投与はてんかん発作を引き起こすことが知られている。これらのことは、脳の膜電位依存性カリウムチャンネルの活性を制御する薬剤が、記憶障害などによる痴呆、脳虚血に伴う神経細胞死、あるいは、てんかんなどの中枢性疾患の治療薬になる可能性を示唆している。 50

一方、今までにクローニングされている膜電位依存性カリウムチャンネルの多くは、全身の臓器の中で多数の組織に分布している。そのため、特定の膜電位依存性カリウムチャンネル

に選択的に作用する薬剤を見いだしても、その薬剤は多くの組織に作用してしまい本来期待していない薬効までも誘導してしまう可能性がある。カリウムチャネルを標的として副作用の少ない薬剤を見いだすためには、発現組織が限定されているカリウムチャネルのクローニングが必要である。

発明の開示

本発明は、脳に限定して発現している新規カリウムチャネル蛋白質を、痴呆、脳虚血障害、てんかんなどの中枢性疾患の治療薬剤の標的として提供すること、さらに、本発明は、中枢性疾患の治療薬剤として有用な同カリウムチャネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング方法、中枢に特異的に作用し副作用の少ない、新規な中枢性疾患の治療薬剤を提供することを課題とする。

10

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、脳に限定して発現している新規カリウムチャネル蛋白質をコードする遺伝子を単離した。さらに本発明者らは、脳に限定して発現している新規カリウムチャネル蛋白質を発現させ、同カリウムチャネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング方法を確認することに成功した。

本発明は、

1) 配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列、あるいは、該アミノ酸配列のアミノ酸を置換、欠失または挿入したアミノ酸配列を有し、かつ、脳に限定して発現しているカリウムチャネル蛋白質またはその同効物、

2) ヒト脳に限定して発現している1)記載のカリウムチャネル蛋白質またはその同効物

20

、
3) 配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列を有するカリウムチャネル蛋白質、

4) 1)乃至3)記載のカリウムチャネル蛋白質またはその同効物をコードする遺伝子配列を有する遺伝子、

5) 配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を有する遺伝子、

6) 配列番号1の6番目乃至3257番目の遺伝子配列及び5の4番目乃至3057番目の遺伝子配列の何れかから選ばれた遺伝子配列を有する遺伝子、又は当該遺伝子と縮重の関係にある遺伝子、

30

7) 4)乃至6)記載の遺伝子を含むベクター、

8) 7)記載のベクターを含む宿主細胞、または、

9) 8)記載の宿主細胞を用いる1)乃至3)記載のカリウムチャネル蛋白質の製造方法、
に関する。

以下、本発明で使用される用語に付き説明する。

「アミノ酸の置換、欠失もしくは挿入」とは、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列中の1もしくは複数個のアミノ酸を置換、欠失または挿入することを意味する。

「脳に限定して発現している」とは、脳には発達しているが、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球には発現していないことをいい、具体的には、実施例の条件で、ノーザンブロットを行ったときに、シグナルが脳にのみ検出され、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球には検出されないことをいう。

40

また、「同効物」とは脳には発現しているが、心臓、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球には発現していない蛋白質のアミノ酸配列中の1もしくは複数個のアミノ酸を置換、欠失、挿入または付加を行った配列を有する蛋白質であっても、アミノ酸配列の変更を行っていないものと比較し同一の機能を有する蛋白質のことをいう。

「ヒト由来」とは、ヒトで発現しているカリウムチャネル蛋白質と同一のアミノ酸配列で

50

あることをいう。

なお、カリウムチャンネルとカリウムチャンネル蛋白質は、同義として用いられる。

本発明の新規カリウムチャンネル蛋白質または同効物は、脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質または同効物なら何れでもよく、好ましくは、ヒト由来である。具体的には配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列、あるいは、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質またはその同効物であれば本発明に包含され、好ましくはヒト由来である。さらに好ましくは、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列を有するカリウムチャンネル蛋白質である。

10

また、本発明の新規カリウムチャンネル蛋白質またはその同効物をコードする遺伝子配列を有する遺伝子は、脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質またはその同効物をコードする遺伝子配列を有する遺伝子なら何れでもよく、好ましくは、ヒト由来のカリウムチャンネル蛋白質をコードする遺伝子である。具体的には配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列を有するカリウムチャンネル蛋白質をコードする遺伝子、あるいは、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があり、かつ、脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質またはその同効物をコードする遺伝子配列を有する遺伝子であれば本発明に包含され、好ましくは該遺伝子はヒト由来のカリウムチャンネル蛋白質またはその同効物をコードする遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列をコードする遺伝子である。最も好ましくは、配列番号：1記載の遺伝子配列の6番目から3257番目を有する遺伝子及び配列番号：5記載の遺伝子配列4番目から3057番目を有する遺伝子の何れかである。また、ストリンジェントな条件下で、配列番号1もしくは5の遺伝子とハイブリダイズする遺伝子も本発明に包含される。

20

ハイブリダイゼーションは、公知の方法(Maniatis,T. et al.(1982):"Molecular Cloning-A Laboratory Manual"Cold Spring Harbor Laboratory,NY)に従って実施することができる。ストリンジェントな条件下とは、ハイブリダイゼーション後2X SSC、0.1% SDSで2回洗浄し、さらに以下の洗浄操作を行った条件下のことをいう。

この洗浄操作とは0.5X SSC、0.1% SDS中で、好ましくは0.2X SSC、0.1% SDS中で、特に好ましくは0.1X SSC、0.1% SDS中で洗浄(65℃)を行うことをいう。本発明の新規カリウムチャンネル蛋白質をコードする遺伝子は、以下の方法によって得ることができる。

30

1) 新規カリウムチャンネル遺伝子の製造方法

a) 第1製造法

新規カリウムチャンネル蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からmRNAを抽出する。次いでこのmRNAを鋳型として該チャンネル蛋白質mRNAまたは一部のmRNA領域をはさんだ2種類のプライマーを用いる。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(以下RT-PCRという)を行うことにより、該チャンネル蛋白質cDNAまたはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規カリウムチャンネルcDNAまたはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該チャンネル蛋白質を製造することができる。

40

まず、本発明の新規カリウムチャンネル蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト大脳皮質、から該蛋白質をコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質に特異的な抗体を用いたWestern blotting法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。

50

また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。
次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする新規カリウムチャンネルDNAを増幅する。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法(Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell 7, 279-288)、Land法(Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1049-1053)、Okayama-Berg法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 161-170)などが挙げられる。

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5α株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580)、すなわちCaCl₂やMgCl₂またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

上記により得られる形質転換株から、目的の新規カリウムチャンネル蛋白質のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

▲1▼ 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

新規カリウムチャンネル蛋白質の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し(この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシシを含ませてその種類を減らすこともできる)、これをプローブ(³²P又は³³Pで標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

▲2▼ ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

新規カリウムチャンネル蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. K. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的の新規カリウムチャンネル蛋白質の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、新規カリウムチャンネル蛋白質を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を³²P又は³³Pで標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

▲3▼ 他の動物細胞で新規カリウムチャンネル蛋白質を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし(この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。新規カリウムチャンネル蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出することにより、又はチャンネル活性を指標として元の形質転換株より目的の新規カリウムチャンネル蛋白質をコードするcDNAを有する株を選択する。

▲4▼ 新規カリウムチャンネル蛋白質に対するチャンネル活性を指標として選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、チャ

10

20

30

40

50

ネル活性を指標に所望の新規カリウムチャネル蛋白質産生株を検出し、目的株を選択する。

▲5▼ 新規カリウムチャネル蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、新規カリウムチャネル蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望の新規カリウムチャネル蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。

▲6▼ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法
形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし新規カリウムチャネル蛋白質産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。新規カリウムチャネル蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より新規カリウムチャネル蛋白質をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Maniatis,T. et al.(1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

得られた目的の形質転換株より新規カリウムチャネル蛋白質をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Maniatis,T. et al.(1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

c) 第3製造法

配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAは、化学合成法によって製造した遺伝子断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman)、あるいは394 DNA/RNA Synthesizer(Applied Biosystems)など)を用いて合成することができる。

d) 第4製造法

本発明DNAを利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が脳に限定して発現している新規カリウムチャネル蛋白質機能を発現するためには、必ずしも配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く、例えばその一部の配列であって、それが脳に限定して発現している新規カリウムチャネル蛋白質の機能を示す限り、それらのアミノ酸配列もまた本発明のカリウムチャネル蛋白質に包含される。また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ(例えば、Nishi,T. et al.(1985)J.Biochem.97,153-159を参照)、この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。したがって、配列番号2及び6の何れかから選ばれたアミノ酸配列の中の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、または挿入されている蛋白質でもチャネル活性を有し、脳に限定して発現していることがありえる。これらの蛋白質を本発明においては、新規カリウムチャネル蛋白質の同効物と呼ぶ。

これらの新規カリウムチャネル蛋白質の同効物をコードする、同効の塩基配列を有する遺伝子はすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明のDNAは、上記新規カリウムチャネル蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller,M. et al.(1984)Nature 10,105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはその自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham,R. et al.(1981)Nucleic Acids Res.9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマ

10

20

30

40

50

ーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)(Mark,D.F. et al(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,5662-5666)等に従うことができる。以上、a)乃至d)により得られるDNAの配列決定は、例えばマキサム・ギルバートの化学修飾法(Maxam,A.M.and Gilbert,W.(1980): "Methods in Enzymology"65,499-559)やM13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing,J.and Vieira,J(1982)Gene 19,269-276)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のカリウムチャンネル蛋白質は、下記の方法によって得ることができる。

2) 新規カリウムチャンネルの組み換え蛋白質の製造方法

単離された新規カリウムチャンネル蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞(Gluzman,Y.(1981)Cell 23,175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub,G.and Chasin,L.A.(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77,4216-4220)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr(Subramani,S.et al.(1981)Mol.Cell.Biol.1,854-864)等を例示できるが、これに限定されない。

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama,K. and Takebe,Y. (1990)Med.Immunol. 20,27-32)、pEF-BOS(Mizushima,S. and Nagata,S. (1990)Nucleic Acids Res. 18, 5322)、pCDM8(Seed,B.(1987)Nature 329,840-842)等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman,H.and Magnusson,G.(1983)Nucleic Acids Res.11,1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham,F.L. and vander Ed,A.J.(1973)Virology 52,456-457)および電気パルス穿孔法(Neumann,E.et al.(1982)EMBO J.1,841-845)等によりCOS細胞に取り込ませることができる。かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook,J. et al.(1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory,NY)やpSV2-neo(Southern,P.J.and Berg,P.(1982)J.Mol.Appl.Genet.1,327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規カリウムチャンネル蛋白質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に新規カリウムチャンネル蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される新規カリウムチャンネル蛋白質は、該チャンネル蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えばチャンネル蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロ

マトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば新規カリウムチャンネル蛋白質を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤（CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等）でチャンネル蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もチャンネルの特性を保持することができる。

本発明にはカリウムチャンネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング法が包含されている。該スクリーニング法は、前記により構築された脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質を用いて、該カリウムチャンネル蛋白質の生理学的な特性に応じたカリウムチャンネル蛋白質の修飾の指標を測定する系に被験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は従来カリウムチャンネルリガンド活性を有することは知られているが脳に限定して発現しているカリウムチャンネル蛋白質の活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド（例えば特開平4-178375号公報記載の化合物等）、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のカリウムチャンネルリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

3) 新規カリウムチャンネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング方法

a) Voltage-clamp法を利用したスクリーニング方法

新規カリウムチャンネル蛋白質のチャンネル活性はwhole-cell voltage-clamp法により測定することが可能である。同チャンネル蛋白質を発現させた細胞をwhole-cell voltage-clamp法により膜電位固定し、全細胞電流を測定する。細胞外液には145mM NaCl、5.4mM KCl、2mM CaCl_2 、0.8mM MgCl_2 を含む溶液、細胞内液（パッチ電極液）は155mM KClを含む溶液などを用いる。脱分極刺激、すなわち、膜電位を保持電位（例えば-70mV）から脱分極側（例えば-80mV）にシフトさせることで生じる外向き電流を被験薬存在下と非存在下で比較することで、新規カリウムチャンネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。

b) Rb^+ イオンの放出を利用したスクリーニング方法

一般的にカリウムチャンネルは K^+ イオンと同様に Rb^+ イオンを通すことができるので、放射性同位元素 $^{86}\text{Rb}^+$ の放出を指標としてそのチャンネル活性を測定することができる。新規カリウムチャンネル蛋白質を発現させた細胞を $^{86}\text{RbCl}$ とインキュベート（例えば18hr、37°C）することにより、 $^{86}\text{Rb}^+$ を同細胞内に取り込ませることができる。細胞は、低濃度 K^+ 生理食塩水（例えば4.5mM K^+ ）で洗浄した後同様液に懸濁する。細胞懸濁液に高濃度 K^+ 溶液（例えば最終濃度100mM）を添加すると、細胞の膜電位が脱分極しカリウムチャンネルが活性化される。これに伴い、細胞内の $^{86}\text{Rb}^+$ が細胞外へ放出されるので、細胞外液の放射活性をチャンネル活性の指標とすることができる。被験薬存在下と非存在下で高濃度 K^+ 溶液を添加した際の細胞外へ放出された放射活性を比較することで、新規カリウムチャンネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドをスクリーニングすることが可能である。

c) 膜電位感受性色素や細胞内 K^+ 検出色素を利用したスクリーニング方法

膜電位感受性色素や細胞内 K^+ 検出色素は、カリウムチャンネルの開口に伴う膜電位あるいは細胞内 K^+ 濃度の変化を光学的に検出することが可能である。膜電位感受性色素として、RH155、WW781、Di-4-ANEPPS、あるいはそれらの誘導体などを用いることができる。また、Shaker型の膜電位依存性カリウムチャンネルのC末端細胞内領域にgreen fluorescent proteinのアミノ酸配列を挿入したキメラ蛋白質を膜電位の検出に用いることもできる(Siegel, M.S. and Isacoff, E.Y. (1997) Neuron 19, 735-741)。細胞内 K^+ 検出色素としては、 K^+ -bindi

10

20

30

40

50

ng benzofuran isophthalateなどを用いることができる。これらの色素を用いることにより新規カリウムチャネルのチャネル活性を測定することができ、被験薬存在下と非存在下で変化量を比較することで新規カリウムチャネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドをスクリーニングすることが可能である。

本発明には、前記スクリーニング法により選択された脳に限定して発現しているカリウムチャネル蛋白質の活性を有意に修飾する化合物またはペプチドを有効成分とする医薬が含まれる。

本発明医薬は、脳のカリウムチャネルの活性を選択的に制御する新規な薬理作用を有することを特徴としており、該医薬の用途としては脳のカリウムチャネル活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患、具体的には例えば痴呆、脳虚血障害、てんかんなどの中枢性疾患などが挙げられる。

10

本発明のカリウムチャネル蛋白質活性修飾化合物やペプチドを有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃酸によって消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与や下部消化管デリバリー投与等が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

20

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

30

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

40

【図面の簡単な説明】

図1は、配列番号：2（上段）及び配列番号：6（下段）カリウムチャネルのアミノ酸配列を示す。

図2は、新規カリウムチャネルに関するヒトの各臓器におけるノーザン解析の結果を示す。A、Bは配列番号：2のカリウムチャネル、C、Dは配列番号：6のカリウムチャネルの結果を表している。

図3は、新規カリウムチャネルに関するヒト脳の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。A、Bは配列番号：2のカリウムチャネル、C、Dは配列番号：6のカリウムチャネルの結果を表している。

図4 A、Bは、カリウムチャネル（配列番号：2）に関するin situ hybridizationの結

50

果を示す（DG，歯状回の顆粒細胞層；CA1、CA3，アンモン角CA1およびCA3錐体細胞層；Cx，大脳皮質）。C、Dは大脳皮質の拡大像を表している（矢印は典型的な錐体細胞におけるシグナルを示す）。Hybridizationにはantisense probe（A、C）あるいはsense probe（B、D）を用いた。Scale barは1.5mm（A、B）あるいは50 μ m（B、D）を表している。

図5は、脱分極刺激によるカリウムチャンネル（配列番号：2）のチャンネル活性検出結果を示す。

図6は、脱分極刺激によるカリウムチャンネル（配列番号：6）のチャンネル活性検出結果を示す。

図7は、配列番号：2に示すカリウムチャンネルのtail電流を示す。

10

図8は、配列番号：6に示すカリウムチャンネルの高カリウム細胞外液中での電流応答を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, N Y）に従って実施可能である。

（実施例1）新規カリウムチャンネル蛋白質をコードする遺伝子の単離

新規カリウムチャンネル蛋白質をコードする全長cDNAは、ヒト脳由来のpoly A⁺ RNA（Clontech）をtemplateとしてRT-PCRにより取得した。

20

配列番号：2に示すカリウムチャンネル蛋白質の遺伝子を単離する為に、Forward primerとして5'-GGAATTCC CTA AGA TGC CGG CCA TGC-3'（配列番号：3）、reverse primerとして5'-GCTCTAGAGC ACT CTG AGG TTG GGC CGA AC-3'（配列番号：4）を用いた（それぞれの5'末端にはEcoRI siteとXbaI siteが付加してある）。RT-PCRはPfu DNA polymerase（Stratagene）を用いて、Hot Start法で行った。最初に96℃（1分）で熱変性を行った後、96℃（10秒）／68℃（30秒）／72℃（7分）のサイクルを35回繰り返した。その結果、約3.3 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をEcoRIとXbaIで消化した後、pME18S plasmidを用いてクローニングした。pME18S plasmidは、動物細胞において強力なプロモーター活性を示すSR（プロモーター（Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472）を持っているので、動物細胞に組み換え蛋白質を発現させるのに使用できる。同plasmidは千葉大・斉藤より供与されたものを使用した（Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med. Immunol. 20, 27-32）。得られたクローンpME-E1の塩基配列はdideoxy terminator法によりABI337 DNA Sequencer（Applied Biosystems）を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号：1に示す。

30

同配列は3252 baseのopen reading frame（配列番号：1の第6番目から第3257番目）を持っている。Open reading frameから予測されるアミノ酸配列（1083アミノ酸）を配列表 配列番号：2に示す。

配列番号：6に示すカリウムチャンネル蛋白質の遺伝子を単離する為に、Forward primerとして5'-GCC ATG CCG GTC ATG AAG G-3'（配列番号：7）、reverse primerとして5'-GCC AGG GTC AGT GGA ATG TG-3'（配列番号：8）を用いた。RT-PCRはTaKaRa LA Taq（宝酒造）を用いて、Hot Start法で行った。最初に98℃（1分）で熱変性を行った後、98℃（15秒）／68℃（3分）のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間伸長反応を行った。その結果、約3.1 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をpCR2.1 plasmid（Invitrogen）を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列を配列表 配列番号：5に示す。同遺伝子は動物細胞で発現させるためpME18S plasmidにサブクローニングし、pME-E2とした。配列番号：5は3054 baseのopen reading frame（配列番号：5の第4番目から第3057番目）を持っている。Open reading frameから予測されるアミノ酸配列（1017アミノ酸）を配列表 配列番号：6に示す。

40

両カリウムチャンネルのアミノ酸配列は、膜電位依存性カリウムチャンネルの特徴である6個の膜貫通ドメイン（S1～S6）と思われる疎水性領域を有している。さらに、電圧センサー

50

と考えられているS4ドメインは塩基性アミノ酸が3アミノ酸毎に連続する特徴を持っており、S5とS6の間にはH5領域に相当する中程度の疎水性配列も存在する。さらに、両アミノ酸配列はお互いに高い相同性を持っている。両アミノ酸配列のアライメント結果を図1に示す。全体のアミノ酸配列では48%、疎水性領域（配列番号：2の227番目のTrpから508番目のTyrまで。配列番号：6の229番目のTrpから482番目のTyrまで）では70%の相同性を示した。なお、配列アライメントおよび相同性の解析には、解析ソフトLasergene（DNA STAR）のMegAlignプログラムを用いた。

（実施例2）ヒト組織における新規カリウムチャンネル遺伝子の発現分布

Northern blot hybridization法により新規カリウムチャンネル遺伝子の発現分布を解析した。ProbeにはC末端の細胞内領域に相当するcDNA断片（配列番号：2のカリウムチャンネルについては配列番号：1の第2105番目から第2956番目、配列番号：6のカリウムチャンネルについては配列番号：5の第2241番目から第2898番目）を用いた。ヒトの各臓器由来のpoly A⁺ RNA（2μg）をブロットしたメンブレンとprobeのhybridizationは50% formamide、5x SSPE、10x Denhardt's溶液、2% SDS、100 μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で、42°C（18時間）で行った。メンブレンは、最終的に0.1x SSC、0.1% SDSを含む溶液で2回（配列番号：2のカリウムチャンネルについては55°C、配列番号：6のカリウムチャンネルについては60°Cで、それぞれ30分間）洗浄した。

ヒトの各臓器（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球）についてNorthern解析を行ったところ、配列番号：2のカリウムチャンネルについては約4kbのシグナルが、配列番号：6のカリウムチャンネルについては約4.4kbと約7.5kbのシグナルが、脳にのみ検出された（図2）。すなわち、両新規カリウムチャンネルのmRNAは脳に限定して発現していることがわかった。なお、配列番号：6カリウムチャンネルmRNAの脳に選択的な発現は、RT-PCR解析によっても確認された。

さらに、ヒト脳の各領域（小脳、大脳皮質、延髄、脊髄、大脳皮質後頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、被殻、扁桃体、尾状核、脳梁、海馬、黒質、視床下核、視床）についてもNorthern解析を行った。配列番号：2に示すカリウムチャンネルのmRNAは大脳皮質、扁桃体、海馬、綿条体（被殻、尾状核）といった終脳に限定して発現していることがわかった（図3A、B）。一方、配列番号：6に示すカリウムチャンネルのmRNAは線条体、大脳皮質に多く発現していることがわかった（図3C、D）。また、弱い発現が海馬、扁桃体に認められた。両カリウムチャンネル遺伝子の分布はオーバーラップしていた。

（実施例3）中枢神経細胞における新規カリウムチャンネルの発現分布

中枢神経細胞における新規カリウムチャンネル遺伝子の発現を検証するために、ラット脳切片のin situ hybridization解析を行った。In situ hybridizationは、ジゴキシゲニン標識したantisense RNA probeを用いて既報（Okumura, K. et al.(1997)Oncogene 14,713-720）に従って実施した。コントロール実験にはsense probeを用いた。Probeは、以下の手順で明らかにしたラットのカリウムチャンネル遺伝子の配列を基に作成した。

ラットのカリウムチャンネル遺伝子の部分配列を取得するために、5'-ACC TTC CTG GAC ACC ATC GC-3'（配列番号：11）と5'-CCA AAC ACC ACC GCG TGC AT-3'（配列番号：12）をprimerとしたRT-PCRを行った。両primerはそれぞれ配列番号：2のアミノ酸配列14番から20番と493番から499番に相当している。ラット脳より単離したpoly A⁺ RNAをtemplateとしてRT-PCRを行った結果、配列番号：2と配列番号：6記載カリウムチャンネルのラット・オーソローガス遺伝子(orthologous gene)に相当するそれぞれ約1.5kbと約1.4kbの断片が得られた。次に、それぞれの断片から明らかになった塩基配列を基に、それぞれについてRACEを行い、全長配列を明らかにした。RACEはRat Brain Marathon-Ready cDNA (Clontech)を用い、指定された手順に従って実施した。配列番号：2記載カリウムチャンネルのラット・オーソローガス遺伝子(orthologous gene)の配列を配列番号：9に、配列番号：6記載カリウムチャンネルのラット・オーソローガス遺伝子(orthologous gene)の配列を配列番号：10に示す。

配列番号：2に記載カリウムチャンネルの前記ラット・オーソローガス遺伝子(orthologous

10

20

30

40

50

gene)用probeには、配列番号：9の2683番目から3204番目のantisense配列あるいはsense配列を用いた。In situ hybridizationの結果、antisense probeを用いた時だけ、海馬にシグナルが認められ、同部位における発現が確認できた（図4 A、B）。海馬での発現は、歯状回の顆粒細胞、アンモン角CA1およびCA3の錐体細胞などの神経細胞に認められた。特異的なシグナルは大腦皮質の神経細胞である錐体細胞にも認められた（図4 C、D）。以上のように、同カリウムチャンネルは中枢の神経細胞に発現していることが確認できた。

配列番号：6記載カリウムチャンネルの前記ラット・オーソローガス遺伝子(orthologous gene)用probeには、配列番号10の3140番目から3705番目の配列を用いた。同カリウムチャンネルは大腦皮質の神経細胞に強く発現していることがわかった。

10

（実施例4）新規カリウムチャンネル蛋白質の発現の誘導

新規カリウムチャンネル蛋白質のチャンネル活性を検出するために、動物細胞に同蛋白質の発現を誘導した。細胞には、膜電位の変化によって内在性のチャンネルによる電流を発生しないL929細胞を用いた。細胞の形質転換はpME-E1 plasmidあるいはpME-E2 plasmidを用いてリポフェクトアミン法により行った。

（実施例5）新規カリウムチャンネル蛋白質のチャンネル活性の検出

形質転換された細胞をwhole-cell voltage-clamp法により膜電位固定し、全細胞電流を測定した。細胞外は140mM NaCl、5.4mM KCl、2mM CaCl₂、0.8mM MgCl₂、15mM Glucose、10mM HEPES-Na (pH=7.4)を含む溶液、細胞内は125mM KCl、1mM CaCl₂、2mM MgCl₂、11mM EGT A、10mM HEPES-K (pH=7.2)を含む溶液を用いた。

20

pME-E1で形質転換された細胞については保持電位-70mVから200msec間、-40mVから+80mVまで20mV間隔で（図5）、pME-E2で形質転換された細胞については保持電位-120mVから200msec間、-60mVから+60mVまで20mV間隔で脱分極刺激した（図6）。その結果、両細胞で明らかな外向き電流が惹起された。このことから、配列番号：2に示した蛋白質、配列番号：6に示した蛋白質ともに膜電位依存性チャンネルであることがわかった。

（実施例6）新規カリウムチャンネル蛋白質におけるK⁺イオンの選択性

配列番号：2に示したカリウムチャンネルのK⁺イオンの選択性を検証するために、tail電流を測定した。電流は実施例5と同様な方法で検討した。Tail電流（保持電位-70mVから200msec間+80mVの脱分極刺激によりチャンネルを活性化させた後、-120mVから-20mVまで20mV間隔で再分極）から、この溶液下での反転電位は-80mVであった（図7）。この値はNernst

30

の式から得られるK⁺の平衡電位（-87mV, 25℃；[K]_{out}=5.4mM, [K]_{in}=158mM）とほぼ一致するため、このチャンネルはK⁺イオンに対する選択性が大きいと考えられた。配列番号：6に示したカリウムチャンネルのK⁺イオン選択性の検証には、155mM KCl、4.5mM N-methyl-D-glucamine、2mM CaCl₂、10mM Glucose、10mM HEPES (pH=7.4)を含む細胞外溶液を用いた。その他は実施例5と同様な方法で検討した。脱分極刺激（保持電位-120mVから200msec間、-20mVから+20mVまで10mV間隔）を行ったところ、電流応答は0mVを境に反転した（図8）。このことから、反転電位はおよそ0mVと見積もられた。この値がNernstの式から得られるK⁺の平衡電位（-5mV, 25℃；[K]_{out}=155mM, [K]_{in}=158mM）とほぼ一致することおよび実施例5において外向き電流が惹起されたことから、このチャンネルはK⁺イオンに対する選択性が大きいと考えられた。

40

産業上の利用可能性

本発明により、脳に限定して発現している新規なカリウムチャンネル蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該カリウムチャンネル蛋白質の製造方法が提供された。

また、本発明のカリウムチャンネル蛋白質と被験薬を接触させることにより、該カリウムチャンネル蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドをスクリーニングし、新たな医薬、特に、新たな中枢性疾患治療剤をスクリーニングする方法を提供した。

例えば実施例3の結果より配列番号：2に示す本発明のカリウムチャンネルの発現している組織の中で海馬は、記憶・学習との関連性が強く示唆されている領域である（Levitan, I. B. and Kaczmarek L. K. (1991) The Neuron: Cell and Molecular Biology, Oxford Univ

50

ersity Press, New York, NY.)。なかでも、当該カリウムチャネルの発現が確認された歯状回の顆粒細胞、CA1およびCA3錐体細胞は神経回路を形成しており、各種記憶入力歯状回の顆粒細胞からCA1錐体細胞を経てCA3錐体細胞へとグルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性シナプスを介して伝達される。それぞれのシナプスで認められる長期増強、長期抑圧といったシナプス伝達効率の長期変化は、記憶・学習に深く関わっていると考えられている。これらの長期変化が神経細胞の興奮頻度や興奮強度によって調節されていること、膜電位依存性カリウムチャネルは一般的に神経細胞の興奮性をコントロールできる可能性を持っていることなどより、膜電位依存性カリウムチャネルである本発明のカリウムチャネル蛋白質は、神経細胞の興奮性制御を介して記憶・学習の形成に関与している可能性が考えられる。

10

本発明のカリウムチャネル蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物およびペプチドを有効成分とする医薬は、中枢特異的に作用し、副作用の少ない、例えば痴呆、脳虚血障害、てんかんなどの中枢性疾患治療剤等としての有用性が期待できる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A novel potassium channel protein

<130> Y9903-PCT

<140>

<141>

<150> JP P1998-011434

<151> 1998-01-23

10

<150> JP P1998-346198

<151> 1998-12-04

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3323

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(3257)

<400> 1

ctaag atg ccg gcc atg cgg ggc ctc ctg gcg cct cag aac acc ttc ctg 50

Met Pro Ala Met Arg Gly Leu Leu Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu

1 5 10 15

gac acc atc gct acg cgc ttc gac ggc acg cac agt aac ttc gtg ctg 98

Asp Thr Ile Ala Thr Arg Phe Asp Gly Thr His Ser Asn Phe Val Leu

20 25 30

30

ggc aac gcc cag gtg gcg ggg ctc ttc ccc gtg gtc tac tgc tct gat 146

Gly Asn Ala Gln Val Ala Gly Leu Phe Pro Val Val Tyr Cys Ser Asp

35 40 45

ggc ttc tgt gac ctc acg ggc ttc tcc cgg gct gag gtc atg cag cgg 194

Gly Phe Cys Asp Leu Thr Gly Phe Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg

50 55 60

ggc tgt gcc tgc tcc ttc ctt tat ggg cca gac acc agt gag ctc gtc 242

30

Ala Ala Arg Gly Pro Pro Ser Val Cys Asp Leu Ala Val Glu Val Leu
260 265 270

ttc atc ctt gac att gtg ctg aat ttc cgt acc aca ttc gtg tcc aag 866
Phe Ile Leu Asp Ile Val Leu Asn Phe Arg Thr Thr Phe Val Ser Lys
275 280 285

tcg ggc cag gtg gtg ttt gcc cca aag tcc att tgc ctc cac tac gtc 914
Ser Gly Gln Val Val Phe Ala Pro Lys Ser Ile Cys Leu His Tyr Val
290 295 300

acc acc tgg ttc ctg ctg gat gtc atc gca gcg ctg ccc ttt gac ctg 962
Thr Thr Trp Phe Leu Leu Asp Val Ile Ala Ala Leu Pro Phe Asp Leu
305 310 315

cta cat gcc ttc aag gtc aac gtg tac ttc ggg gcc cat ctg ctg aag 1010
Leu His Ala Phe Lys Val Asn Val Tyr Phe Gly Ala His Leu Leu Lys
320 325 330 335

acg gtg cgc ctg ctg cgc ctg ctg cgc ctg ctt ccg cgg ctg gac cgg 1058
Thr Val Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Pro Arg Leu Asp Arg
340 345 350

tac tcg cag tac agc gcc gtg gtg ctg aca ctg ctc atg gcc gtg ttc 1106
Tyr Ser Gln Tyr Ser Ala Val Val Leu Thr Leu Leu Met Ala Val Phe
355 360 365

gcc ctg ctc gcg cac tgg gtc gcc tgc gtc tgg ttt tac att ggc cag 1154
Ala Leu Leu Ala His Trp Val Ala Cys Val Trp Phe Tyr Ile Gly Gln
370 375 380

cgg gag atc gag agc agc gaa tcc gag ctg cct gag att ggc tgg ctg 1202
Arg Glu Ile Glu Ser Ser Glu Ser Glu Leu Pro Glu Ile Gly Trp Leu
385 390 395

cag gag ctg gcc cgc cga ctg gag act ccc tac tac ctg gtg ggc cgg 1250
Gln Glu Leu Ala Arg Arg Leu Glu Thr Pro Tyr Tyr Leu Val Gly Arg
400 405 410 415

agg cca gct gga ggg aac agc tcc ggc cag agt gac aac tgc agc agc 1298
Arg Pro Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gly Gln Ser Asp Asn Cys Ser Ser
420 425 430

agc agc gag gcc aac ggg acg ggg ctg gag ctg ctg ggc ggc ccg tcg 1346
Ser Ser Glu Ala Asn Gly Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
435 440 445

ctg cgc agc gcc tac atc acc tcc ctc tac ttc gca ctc agc agc ctc 1394

10

20

30

```

Leu Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Ser Leu Tyr Phe Ala Leu Ser Ser Leu
    450                      455                      460

acc agc gtg ggc ttc ggc aac gtg tcc gcc aac acg gac acc gag aag 1442
Thr Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Ala Asn Thr Asp Thr Glu Lys
    465                      470                      475

atc ttc tcc atc tgc acc atg ctc atc ggc gcc ctg atg cac gcg gtg 1490
Ile Phe Ser Ile Cys Thr Met Leu Ile Gly Ala Leu Met His Ala Val
    480                      485                      490                      495

gtg ttt ggg aac gtg acg gcc atc atc cag cgc atg tac gcc cgc cgc 1538
Val Phe Gly Asn Val Thr Ala Ile Ile Gln Arg Met Tyr Ala Arg Arg
    500                      505                      510

ttt ctg tac cac agc cgc acg cgc gac ctg cgc gac tac atc cgc atc 1586
Phe Leu Tyr His Ser Arg Thr Arg Asp Leu Arg Asp Tyr Ile Arg Ile
    515                      520                      525

cac cgt atc ccc aag ccc ctc aag cag cgc atg ctg gag tac ttc cag 1634
His Arg Ile Pro Lys Pro Leu Lys Gln Arg Met Leu Glu Tyr Phe Gln
    530                      535                      540

gcc acc tgg gcg gtg aac aat ggc atc gac acc acc gag ctg ctg cag 1682
Ala Thr Trp Ala Val Asn Asn Gly Ile Asp Thr Thr Glu Leu Leu Gln
    545                      550                      555

agc ctc cct gac gag ctg cgc gca gac atc gcc atg cac ctg cac aag 1730
Ser Leu Pro Asp Glu Leu Arg Ala Asp Ile Ala Met His Leu His Lys
    560                      565                      570                      575

gag gtc ctg cag ctg cca ctg ttt gag gcg gcc agc cgc ggc tgc ctg 1778
Glu Val Leu Gln Leu Pro Leu Phe Glu Ala Ala Ser Arg Gly Cys Leu
    580                      585                      590

cgg gca ctg tct ctg gcc ctg cgg ccc gcc ttc tgc acg ccg ggc gag 1826
Arg Ala Leu Ser Leu Ala Leu Arg Pro Ala Phe Cys Thr Pro Gly Glu
    595                      600                      605

tac ctc atc cac caa ggc gat gcc ctg cag gcc ctc tac ttt gtc tgc 1874
Tyr Leu Ile His Gln Gly Asp Ala Leu Gln Ala Leu Tyr Phe Val Cys
    610                      615                      620

tct ggc tcc atg gag gtg ctc aag ggt ggc acc gtg ctc gcc atc cta 1922
Ser Gly Ser Met Glu Val Leu Lys Gly Gly Thr Val Leu Ala Ile Leu
    625                      630                      635

ggg aag ggc gac ctg atc ggc tgt gag ctg ccc cgg cgg gag cag gtg 1970

```

10

20

30

Gly Lys Gly Asp Leu Ile Gly Cys Glu Leu Pro Arg Arg Glu Gln Val
 640 645 650 655

 gta aag gcc aat gcc gac gtg aag ggg ctg acg tac tgc gtc ctg cag 2018
 Val Lys Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Leu Thr Tyr Cys Val Leu Gln
 660 665 670

 tgt ctg cag ctg gct ggc ctg cac gac agc ctt gcg ctg tac ccc gag 2066
 Cys Leu Gln Leu Ala Gly Leu His Asp Ser Leu Ala Leu Tyr Pro Glu
 675 680 685

 ttt gcc ccg cgc ttc agt cgt ggc ctc cga ggg gag ctc agc tac aac 2114
 Phe Ala Pro Arg Phe Ser Arg Gly Leu Arg Gly Glu Leu Ser Tyr Asn
 690 695 700

 ctg ggt gct ggg gga ggc tct gca gag gtg gac acc agc tcc ctg agc 2162
 Leu Gly Ala Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Asp Thr Ser Ser Leu Ser
 705 710 715

 ggc gac aat acc ctt atg tcc acg ctg gag gag aag gag aca gat ggg 2210
 Gly Asp Asn Thr Leu Met Ser Thr Leu Glu Glu Lys Glu Thr Asp Gly
 720 725 730 735

 gag cag ggc ccc acg gtc tcc cca gcc cca gct gat gag ccc tcc agc 2258
 Glu Gln Gly Pro Thr Val Ser Pro Ala Pro Ala Asp Glu Pro Ser Ser
 740 745 750

 ccc ctg ctg tcc cct ggc tgc acc tcc tca tcc tca gct gcc aag ctg 2306
 Pro Leu Leu Ser Pro Gly Cys Thr Ser Ser Ser Ser Ala Ala Lys Leu
 755 760 765

 cta tcc cca cgt cga aca gca ccc cgg cct cgt cta ggt ggc aga ggg 2354
 Leu Ser Pro Arg Arg Thr Ala Pro Arg Pro Arg Leu Gly Gly Arg Gly
 770 775 780

 agg cca ggc agg gca ggg gct ttg aag gct gag gct ggc ccc tct gct 2402
 Arg Pro Gly Arg Ala Gly Ala Leu Lys Ala Glu Ala Gly Pro Ser Ala
 785 790 795

 ccc cca cgg gcc cta gag ggg cta cgg ctg ccc ccc atg cca tgg aat 2450
 Pro Pro Arg Ala Leu Glu Gly Leu Arg Leu Pro Pro Met Pro Trp Asn
 800 805 810 815

 gtg ccc cca gat ctg agc ccc agg gta gta gat ggc att gaa gac ggc 2498
 Val Pro Pro Asp Leu Ser Pro Arg Val Val Asp Gly Ile Glu Asp Gly
 820 825 830

 tgt ggc tcg gac cag ccc aag ttc tct ttc cgc gtg ggc cag tct ggc 2546

10

20

30

Cys Gly Ser Asp Gln Pro Lys Phe Ser Phe Arg Val Gly Gln Ser Gly	
835	840
845	
ccg gaa tgt agc agc agc ccc tcc cct gga cca gag agc ggc ctg ctc	2594
Pro Glu Cys Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Pro Glu Ser Gly Leu Leu	
850	855
860	
act gtt ccc cat ggg ccc agc gag gca agg aac aca gac aca ctg gac	2642
Thr Val Pro His Gly Pro Ser Glu Ala Arg Asn Thr Asp Thr Leu Asp	
865	870
875	
aag ctt cgg cag gcg gtg aca gag ctg tca gag cag gtg ctg cag atg	2690
Lys Leu Arg Gln Ala Val Thr Glu Leu Ser Glu Gln Val Leu Gln Met	
880	885
890	895
cgg gaa gga ctg cag tca ctt cgc cag gct gtg cag ctt gtc ctg gcg	2738
Arg Glu Gly Leu Gln Ser Leu Arg Gln Ala Val Gln Leu Val Leu Ala	
900	905
910	
ccc cac agg gag ggt ccg tgc cct cgg gca tcg gga gag ggg ccg tgc	2786
Pro His Arg Glu Gly Pro Cys Pro Arg Ala Ser Gly Glu Gly Pro Cys	
915	920
925	
cca gcc agc acc tcc ggg ctt ctg cag cct ctg tgt gtg gac act ggg	2834
Pro Ala Ser Thr Ser Gly Leu Leu Gln Pro Leu Cys Val Asp Thr Gly	
930	935
940	
gca tcc tcc tac tgc ctg cag ccc cca gct ggc tct gtc ttg agt ggg	2882
Ala Ser Ser Tyr Cys Leu Gln Pro Pro Ala Gly Ser Val Leu Ser Gly	
945	950
955	
act tgg ccc cac cct cgt ccg ggg cct cct ccc ctc atg gca ccc tgg	2930
Thr Trp Pro His Pro Arg Pro Gly Pro Pro Pro Leu Met Ala Pro Trp	
960	965
970	975
ccc tgg ggt ccc cca gcg tct cag agc tcc ccc tgg cct cga gcc aca	2978
Pro Trp Gly Pro Pro Ala Ser Gln Ser Ser Pro Trp Pro Arg Ala Thr	
980	985
990	
gct ttc tgg acc tcc acc tca gac tca gag ccc cct gcc tca gga gac	3026
Ala Phe Trp Thr Ser Thr Ser Asp Ser Glu Pro Pro Ala Ser Gly Asp	
995	1000
1005	
ctc tgc tct gag ccc agc acc cct gcc tcc cct cct cct tct gag gaa	3074
Leu Cys Ser Glu Pro Ser Thr Pro Ala Ser Pro Pro Pro Ser Glu Glu	
1010	1015
1020	
ggg gct agg act ggg ccc gca gag cct gtg agc cag gct gag gct acc	3122

10

20

30

Gly Ala Arg Thr Gly Pro Ala Glu Pro Val Ser Gln Ala Glu Ala Thr
 1025 1030 1035

agc act gga gag ccc cca cca ggg tca ggg ggc ctg gcc ttg ccc tgg 3170
 Ser Thr Gly Glu Pro Pro Gly Ser Gly Gly Leu Ala Leu Pro Trp
 1040 1045 1050 1055

gac ccc cac agc ctg gag atg gtg ctt att ggc tgc cat ggc tct ggc 3218
 Asp Pro His Ser Leu Glu Met Val Leu Ile Gly Cys His Gly Ser Gly
 1060 1065 1070

aca gtc cag tgg acc cag gaa gaa ggc aca ggg gtc tga gtaccagccc 3267
 Thr Val Gln Trp Thr Gln Glu Glu Gly Thr Gly Val
 1075 1080

tagaactcag cgttgccagg tgtgctgcca tctgctgttc ggcccaacct cagagt 3323

<210> 2

<211> 1083

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ala Met Arg Gly Leu Leu Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu Asp
 1 5 10 15

Thr Ile Ala Thr Arg Phe Asp Gly Thr His Ser Asn Phe Val Leu Gly
 20 25 30

Asn Ala Gln Val Ala Gly Leu Phe Pro Val Val Tyr Cys Ser Asp Gly
 35 40 45

Phe Cys Asp Leu Thr Gly Phe Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Gly
 50 55 60

Cys Ala Cys Ser Phe Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Ser Glu Leu Val Arg
 65 70 75 80

Gln Gln Ile Arg Lys Ala Leu Asp Glu His Lys Glu Phe Lys Ala Glu
 85 90 95

Leu Ile Leu Tyr Arg Lys Ser Gly Leu Pro Phe Trp Cys Leu Leu Asp
 100 105 110

Val Ile Pro Ile Lys Asn Glu Lys Gly Glu Val Ala Leu Phe Leu Val
 115 120 125

10

20

30

Ser His Lys Asp Ile Ser Glu Thr Lys Asn Arg Gly Gly Pro Asp Arg
 130 135 140
 Trp Lys Glu Thr Gly Gly Gly Arg Arg Arg Tyr Gly Arg Ala Arg Ser
 145 150 155 160
 Lys Gly Phe Asn Ala Asn Arg Arg Arg Ser Arg Ala Val Leu Tyr His
 165 170 175
 Leu Ser Gly His Leu Gln Lys Gln Pro Lys Gly Lys His Lys Leu Asn
 180 185 190
 Lys Gly Val Phe Gly Glu Lys Pro Asn Leu Pro Glu Tyr Lys Val Ala
 195 200 205
 Ala Ile Arg Lys Ser Pro Phe Ile Leu Leu His Cys Gly Ala Leu Arg
 210 215 220
 Ala Thr Trp Asp Gly Phe Ile Leu Leu Ala Thr Leu Tyr Val Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Tyr Ser Val Cys Val Ser Thr Ala Arg Glu Pro Ser Ala
 245 250 255
 Ala Arg Gly Pro Pro Ser Val Cys Asp Leu Ala Val Glu Val Leu Phe
 260 265 270
 Ile Leu Asp Ile Val Leu Asn Phe Arg Thr Thr Phe Val Ser Lys Ser
 275 280 285
 Gly Gln Val Val Phe Ala Pro Lys Ser Ile Cys Leu His Tyr Val Thr
 290 295 300
 Thr Trp Phe Leu Leu Asp Val Ile Ala Ala Leu Pro Phe Asp Leu Leu
 305 310 315 320
 His Ala Phe Lys Val Asn Val Tyr Phe Gly Ala His Leu Leu Lys Thr
 325 330 335
 Val Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Pro Arg Leu Asp Arg Tyr
 340 345 350
 Ser Gln Tyr Ser Ala Val Val Leu Thr Leu Leu Met Ala Val Phe Ala
 355 360 365
 Leu Leu Ala His Trp Val Ala Cys Val Trp Phe Tyr Ile Gly Gln Arg
 370 375 380

10

20

30

Glu Ile Glu Ser Ser Glu Ser Glu Leu Pro Glu Ile Gly Trp Leu Gln
 385 390 395 400
 Glu Leu Ala Arg Arg Leu Glu Thr Pro Tyr Tyr Leu Val Gly Arg Arg
 405 410 415
 Pro Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gly Gln Ser Asp Asn Cys Ser Ser Ser
 420 425 430
 Ser Glu Ala Asn Gly Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Leu
 435 440 445
 Arg Ser Ala Tyr Ile Thr Ser Leu Tyr Phe Ala Leu Ser Ser Leu Thr
 450 455 460
 Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Ala Asn Thr Asp Thr Glu Lys Ile
 465 470 475 480
 Phe Ser Ile Cys Thr Met Leu Ile Gly Ala Leu Met His Ala Val Val
 485 490 495
 Phe Gly Asn Val Thr Ala Ile Ile Gln Arg Met Tyr Ala Arg Arg Phe
 500 505 510
 Leu Tyr His Ser Arg Thr Arg Asp Leu Arg Asp Tyr Ile Arg Ile His
 515 520 525
 Arg Ile Pro Lys Pro Leu Lys Gln Arg Met Leu Glu Tyr Phe Gln Ala
 530 535 540
 Thr Trp Ala Val Asn Asn Gly Ile Asp Thr Thr Glu Leu Leu Gln Ser
 545 550 555 560
 Leu Pro Asp Glu Leu Arg Ala Asp Ile Ala Met His Leu His Lys Glu
 565 570 575
 Val Leu Gln Leu Pro Leu Phe Glu Ala Ala Ser Arg Gly Cys Leu Arg
 580 585 590
 Ala Leu Ser Leu Ala Leu Arg Pro Ala Phe Cys Thr Pro Gly Glu Tyr
 595 600 605
 Leu Ile His Gln Gly Asp Ala Leu Gln Ala Leu Tyr Phe Val Cys Ser
 610 615 620
 Gly Ser Met Glu Val Leu Lys Gly Gly Thr Val Leu Ala Ile Leu Gly
 625 630 635 640

10

20

30

Lys Gly Asp Leu Ile Gly Cys Glu Leu Pro Arg Arg Glu Gln Val Val
 645 650 655
 Lys Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Leu Thr Tyr Cys Val Leu Gln Cys
 660 665 670
 Leu Gln Leu Ala Gly Leu His Asp Ser Leu Ala Leu Tyr Pro Glu Phe
 675 680 685
 Ala Pro Arg Phe Ser Arg Gly Leu Arg Gly Glu Leu Ser Tyr Asn Leu
 690 695 700
 Gly Ala Gly Gly Gly Ser Ala Glu Val Asp Thr Ser Ser Leu Ser Gly
 705 710 715 720
 Asp Asn Thr Leu Met Ser Thr Leu Glu Glu Lys Glu Thr Asp Gly Glu
 725 730 735
 Gln Gly Pro Thr Val Ser Pro Ala Pro Ala Asp Glu Pro Ser Ser Pro
 740 745 750
 Leu Leu Ser Pro Gly Cys Thr Ser Ser Ser Ser Ala Ala Lys Leu Leu
 755 760 765
 Ser Pro Arg Arg Thr Ala Pro Arg Pro Arg Leu Gly Gly Arg Gly Arg
 770 775 780
 Pro Gly Arg Ala Gly Ala Leu Lys Ala Glu Ala Gly Pro Ser Ala Pro
 785 790 795 800
 Pro Arg Ala Leu Glu Gly Leu Arg Leu Pro Pro Met Pro Trp Asn Val
 805 810 815
 Pro Pro Asp Leu Ser Pro Arg Val Val Asp Gly Ile Glu Asp Gly Cys
 820 825 830
 Gly Ser Asp Gln Pro Lys Phe Ser Phe Arg Val Gly Gln Ser Gly Pro
 835 840 845
 Glu Cys Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gly Pro Glu Ser Gly Leu Leu Thr
 850 855 860
 Val Pro His Gly Pro Ser Glu Ala Arg Asn Thr Asp Thr Leu Asp Lys
 865 870 875 880
 Leu Arg Gln Ala Val Thr Glu Leu Ser Glu Gln Val Leu Gln Met Arg
 885 890 895

10

20

30

Glu Gly Leu Gln Ser Leu Arg Gln Ala Val Gln Leu Val Leu Ala Pro
 900 905 910
 His Arg Glu Gly Pro Cys Pro Arg Ala Ser Gly Glu Gly Pro Cys Pro
 915 920 925
 Ala Ser Thr Ser Gly Leu Leu Gln Pro Leu Cys Val Asp Thr Gly Ala
 930 935 940
 Ser Ser Tyr Cys Leu Gln Pro Pro Ala Gly Ser Val Leu Ser Gly Thr
 945 950 955 960
 Trp Pro His Pro Arg Pro Gly Pro Pro Pro Leu Met Ala Pro Trp Pro
 965 970 975
 Trp Gly Pro Pro Ala Ser Gln Ser Ser Pro Trp Pro Arg Ala Thr Ala
 980 985 990
 Phe Trp Thr Ser Thr Ser Asp Ser Glu Pro Pro Ala Ser Gly Asp Leu
 995 1000 1005
 Cys Ser Glu Pro Ser Thr Pro Ala Ser Pro Pro Pro Ser Glu Glu Gly
 1010 1015 1020
 Ala Arg Thr Gly Pro Ala Glu Pro Val Ser Gln Ala Glu Ala Thr Ser
 1025 1030 1035 1040
 Thr Gly Glu Pro Pro Pro Gly Ser Gly Gly Leu Ala Leu Pro Trp Asp
 1045 1050 1055
 Pro His Ser Leu Glu Met Val Leu Ile Gly Cys His Gly Ser Gly Thr
 1060 1065 1070
 Val Gln Trp Thr Gln Glu Glu Gly Thr Gly Val
 1075 1080

10

20

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3
 ggaattccct aagatgccgg ccatgc

26

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4
 gctctagagc actctgaggt tgggccgaac 30

<210> 5
 <211> 3064
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(3057)

<400> 5
 gcc atg ccg gtc atg aag ggg ttg ctg gcc ccg caa aac acc ttc ctg 48
 Met Pro Val Met Lys Gly Leu Leu Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 gac acc atc gcc acc cgt ttt gac gga acg cac agc aac ttc ctg ctg 96
 Asp Thr Ile Ala Thr Arg Phe Asp Gly Thr His Ser Asn Phe Leu Leu
 20 25 30
 gcc aac gca cag ggc aca cgg ggc ttt ccc atc gtc tac tgc tcc gac 144
 Ala Asn Ala Gln Gly Thr Arg Gly Phe Pro Ile Val Tyr Cys Ser Asp
 35 40 45
 ggc ttc tgc gag ctc aca ggc tac ggt cgc acc gag gtc atg cag aag 192
 Gly Phe Cys Glu Leu Thr Gly Tyr Gly Arg Thr Glu Val Met Gln Lys
 50 55 60
 acc tgc agc tgc cgt ttc ctc tac ggc cca gag acc agt gag cca gcc 240
 Thr Cys Ser Cys Arg Phe Leu Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Glu Pro Ala
 65 70 75
 ctg cag cgt ctg cac aaa gcc ctg gag ggc cac cag gag cac cgg gct 288
 Leu Gln Arg Leu His Lys Ala Leu Glu Gly His Gln Glu His Arg Ala
 80 85 90 95
 gaa atc tgc ttc tac cgc aag gat ggc tca gcc ttt tgg tgc ctc ctg 336

10

20

30

Glu Ile Cys Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Ala Phe Trp Cys Leu Leu
 100 105 110

 gac atg atg ccc atc aag aat gag atg ggg gag gtc gtg ctg ttc ctc 384
 Asp Met Met Pro Ile Lys Asn Glu Met Gly Glu Val Val Leu Phe Leu
 115 120 125

 ttt tcc ttc aag gat atc act cag agt gga agc cca gga ctt ggc ccc 432
 Phe Ser Phe Lys Asp Ile Thr Gln Ser Gly Ser Pro Gly Leu Gly Pro
 130 135 140

 caa gga ggc cgc ggg gac agt aat cac gaa aac tcc ctt ggt aga agg 480
 Gln Gly Gly Arg Gly Asp Ser Asn His Glu Asn Ser Leu Gly Arg Arg
 145 150 155

 gga gcc acc tgg aaa ttt cgg tct gcc aga aga cgg agc cgt act gtc 528
 Gly Ala Thr Trp Lys Phe Arg Ser Ala Arg Arg Arg Ser Arg Thr Val
 160 165 170 175

 cta cac cga ctg acc ggc cac ttt ggc cgc cgg ggc cag gga ggc atg 576
 Leu His Arg Leu Thr Gly His Phe Gly Arg Arg Gly Gln Gly Gly Met
 180 185 190

 aag gcc aat aat aac gtg ttt gag cca aag cca tca gtg ccc gag tac 624
 Lys Ala Asn Asn Asn Val Phe Glu Pro Lys Pro Ser Val Pro Glu Tyr
 195 200 205

 aag gtg gcc tcc gtg ggg ggg tct cgc tgc ctc ctc ctc cac tac agc 672
 Lys Val Ala Ser Val Gly Gly Ser Arg Cys Leu Leu Leu His Tyr Ser
 210 215 220

 gtc tcc aag gcc atc tgg gac ggc ctt atc ctc ctt gcc acc ttc tac 720
 Val Ser Lys Ala Ile Trp Asp Gly Leu Ile Leu Leu Ala Thr Phe Tyr
 225 230 235

 gtt gcg gtc acc gtc ccc tac aat gtc tgt ttc tcg ggt gac gat gac 768
 Val Ala Val Thr Val Pro Tyr Asn Val Cys Phe Ser Gly Asp Asp Asp
 240 245 250 255

 acc ccc atc act tcg cga cac acc ctt gtc agc gac atc gcc gtg gaa 816
 Thr Pro Ile Thr Ser Arg His Thr Leu Val Ser Asp Ile Ala Val Glu
 260 265 270

 atg ctc ttc atc cta gat atc atc ctg aac ttc cgc acc acc tat gtg 864
 Met Leu Phe Ile Leu Asp Ile Ile Leu Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val
 275 280 285

 tcc cag tcc ggc cag gta atc tct gct cct cgt tcc att ggc ctc cac 912

10

20

30

```

Ser Gln Ser Gly Gln Val Ile Ser Ala Pro Arg Ser Ile Gly Leu His
    290                      295                      300

tac ctg gcc acc tgg ttc ttc atc gac ctt att gct gct ctg ccc ttt 960
Tyr Leu Ala Thr Trp Phe Phe Ile Asp Leu Ile Ala Ala Leu Pro Phe
    305                      310                      315

gac ctg ctt tac atc ttc aac atc acc gtg acc tcg ctg gtg cac cta 1008
Asp Leu Leu Tyr Ile Phe Asn Ile Thr Val Thr Ser Leu Val His Leu
    320                      325                      330                      335

ctg aag aca gtg cgg ctg ttg cgg ctg ctg cgg ctg ctg cag aag ctg 1056
Leu Lys Thr Val Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Gln Lys Leu
    340                      345                      350

gag cgg tac tct cag tgc agt gct gtg gtg ctc acg ctg ctc atg tcg 1104
Glu Arg Tyr Ser Gln Cys Ser Ala Val Val Leu Thr Leu Leu Met Ser
    355                      360                      365

gtc ttt gcg ctc ctt gcc cac tgg atg gcc tgc atc tgg tat gtc atc 1152
Val Phe Ala Leu Leu Ala His Trp Met Ala Cys Ile Trp Tyr Val Ile
    370                      375                      380

ggg cgc cgg gag atg gag gcc aat gac ccg ctg ctc tgg gac att ggc 1200
Gly Arg Arg Glu Met Glu Ala Asn Asp Pro Leu Leu Trp Asp Ile Gly
    385                      390                      395

tgg ttg cat gag ttg ggc aag cgt ctg gag gtg ccc tat gtc aat ggc 1248
Trp Leu His Glu Leu Gly Lys Arg Leu Glu Val Pro Tyr Val Asn Gly
    400                      405                      410                      415

tcg gtg ggc ggc cca tca cgg cgc agc gcc tac atc gcg gca ctg tac 1296
Ser Val Gly Gly Pro Ser Arg Arg Ser Ala Tyr Ile Ala Ala Leu Tyr
    420                      425                      430

ttc act cta agc agc ctc acc agt gtg ggc ttt ggc aac gtg tgt gcc 1344
Phe Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Cys Ala
    435                      440                      445

aac acc gac gcg gag aag atc ttc tcc atc tgc acg atg ctc ata ggc 1392
Asn Thr Asp Ala Glu Lys Ile Phe Ser Ile Cys Thr Met Leu Ile Gly
    450                      455                      460

gcc ctg atg cac gct gtg gtg ttc ggg aac gtg aca gcc atc atc cag 1440
Ala Leu Met His Ala Val Val Phe Gly Asn Val Thr Ala Ile Ile Gln
    465                      470                      475

cgc atg tac tcg cgc cgc tcg ctc tac cac agc cgc atg aag gac ctc 1488

```

10

20

30

Arg Met Tyr Ser Arg Arg Ser Leu Tyr His Ser Arg Met Lys Asp Leu
 480 485 490 495

 aag gac ttc atc cgt gtg cac cgc ctg ccg cgg ccg ctc aag cag cgc 1536
 Lys Asp Phe Ile Arg Val His Arg Leu Pro Arg Pro Leu Lys Gln Arg
 500 505 510

 atg ctc gaa tac ttc cag acc acg tgg gcc gtc aac agc ggc atc gac 1584
 Met Leu Glu Tyr Phe Gln Thr Thr Trp Ala Val Asn Ser Gly Ile Asp
 515 520 525

 gcc aac gag tta ctg cgt gac ttc cca gac gag ctg aga gct gac att 1632
 Ala Asn Glu Leu Leu Arg Asp Phe Pro Asp Glu Leu Arg Ala Asp Ile
 530 535 540

 gct atg cac ctg aat cgg gag atc ctg cag ctg ccg ttg ttc ggg gca 1680
 Ala Met His Leu Asn Arg Glu Ile Leu Gln Leu Pro Leu Phe Gly Ala
 545 550 555

 gcg agc agg ggc tgc ctg cgg gcc cta tcg ctg cac atc aag acc tcg 1728
 Ala Ser Arg Gly Cys Leu Arg Ala Leu Ser Leu His Ile Lys Thr Ser
 560 565 570 575

 ttc tgc gct ccg ggc gag tac ctg ttg cgc cgt ggg gat gcc ctg cag 1776
 Phe Cys Ala Pro Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Arg Gly Asp Ala Leu Gln
 580 585 590

 gca cat tac tat gtc tgc tcc ggc tcg ctt gag gtg ctc cga gac aac 1824
 Ala His Tyr Tyr Val Cys Ser Gly Ser Leu Glu Val Leu Arg Asp Asn
 595 600 605

 atg gtg ctg gcc atc ctg ggg aag ggg gac ctg att gga gca gat atc 1872
 Met Val Leu Ala Ile Leu Gly Lys Gly Asp Leu Ile Gly Ala Asp Ile
 610 615 620

 cct gag ccg ggg cag gag cct ggg ttg gga gca gac cca aac ttc gtg 1920
 Pro Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Leu Gly Ala Asp Pro Asn Phe Val
 625 630 635

 cta aag acc agt gct gat gtg aaa gct ctg acc tac tgt ggc ctg cag 1968
 Leu Lys Thr Ser Ala Asp Val Lys Ala Leu Thr Tyr Cys Gly Leu Gln
 640 645 650 655

 cag ctg agc agc cga ggg ctg gct gag gtc ctg agg ctc tat cct gag 2016
 Gln Leu Ser Ser Arg Gly Leu Ala Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Glu
 660 665 670

 tat ggg gct gcc ttc cgg gct ggc ctg ccc cgg gac ctc acc ttc aac 2064

10

20

30

Tyr Gly Ala Ala Phe Arg Ala Gly Leu Pro Arg Asp Leu Thr Phe Asn
 675 680 685
 ctg cgc cag ggc tct gac acc agt ggc ctc agc cgc ttt tcc cga tcc 2112
 Leu Arg Gln Gly Ser Asp Thr Ser Gly Leu Ser Arg Phe Ser Arg Ser
 690 695 700
 cct cgc ctc tcc cag ccc cgc tca gaa agc ctc ggc tcc tcc tca gac 2160
 Pro Arg Leu Ser Gln Pro Arg Ser Glu Ser Leu Gly Ser Ser Ser Asp
 705 710 715
 aag acg ctg cca tcc atc aca gag gcc gag agt ggc gcg gag cct ggg 2208
 Lys Thr Leu Pro Ser Ile Thr Glu Ala Glu Ser Gly Ala Glu Pro Gly
 720 725 730 735
 ggt ggt ccc agg ccc cga cgg ccc ctc ctg ctg ccc aac ctc agc cca 2256
 Gly Gly Pro Arg Pro Arg Arg Pro Leu Leu Leu Pro Asn Leu Ser Pro
 740 745 750
 gca cgg cct cgg ggc tcc ctg gtc agc ctt ttg ggc gag gag ctg ccc 2304
 Ala Arg Pro Arg Gly Ser Leu Val Ser Leu Leu Gly Glu Glu Leu Pro
 755 760 765
 cca ttc tca gcc ctt gtc tcc tct cct tcc tta tcc cca tcc ctg tcc 2352
 Pro Phe Ser Ala Leu Val Ser Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ser Leu Ser
 770 775 780
 cct gcc ctg gct ggc cag ggc cac agt gcc tcc cct cac ggc ccc ccc 2400
 Pro Ala Leu Ala Gly Gln Gly His Ser Ala Ser Pro His Gly Pro Pro
 785 790 795
 agg tgc tct gct gcc tgg aag ccc cct cag ctt ctc att ccc cca ctg 2448
 Arg Cys Ser Ala Ala Trp Lys Pro Pro Gln Leu Leu Ile Pro Pro Leu
 800 805 810 815
 gga acc ttt gga cct ccg gac ctc agt ccc cgg ata gtg gat ggc att 2496
 Gly Thr Phe Gly Pro Pro Asp Leu Ser Pro Arg Ile Val Asp Gly Ile
 820 825 830
 gag gac tct ggc agc aca gct gag gcc cct tca ttc cga ttc agc agg 2544
 Glu Asp Ser Gly Ser Thr Ala Glu Ala Pro Ser Phe Arg Phe Ser Arg
 835 840 845
 agg cct gaa ctg cca agg ccc cgc tcc cag gcg ccc cct aca ggg acc 2592
 Arg Pro Glu Leu Pro Arg Pro Arg Ser Gln Ala Pro Pro Thr Gly Thr
 850 855 860
 agg ccc agc cca gaa ttg gcc agt gag gct gag gag gtg aag gaa aag 2640

10

20

30

Arg Pro Ser Pro Glu Leu Ala Ser Glu Ala Glu Glu Val Lys Glu Lys
 865 870 875

 gtt tgc cgg ctg aac cag gag atc tct cgt ctc aat cag gag gtg tct 2688
 Val Cys Arg Leu Asn Gln Glu Ile Ser Arg Leu Asn Gln Glu Val Ser
 880 885 890 895

 cag ctt agc cgg gag ctg cgg cac atc atg ggc ctg ctg cag gcc agg 2736
 Gln Leu Ser Arg Glu Leu Arg His Ile Met Gly Leu Leu Gln Ala Arg
 900 905 910

 ctg ggt ccc cca ggc cac cca gca ggc tcc gct tgg acc cca gac cct 2784
 Leu Gly Pro Pro Gly His Pro Ala Gly Ser Ala Trp Thr Pro Asp Pro
 915 920 925

 cct tgt cca cag ctg agg cca cca tgc ctc tct cct tgt gcg tcc aga 2832
 Pro Cys Pro Gln Leu Arg Pro Pro Cys Leu Ser Pro Cys Ala Ser Arg
 930 935 940

 cca cca ccc agc ctc cag gat act acg ctt gct gaa gtt cac tgc cca 2880
 Pro Pro Pro Ser Leu Gln Asp Thr Thr Leu Ala Glu Val His Cys Pro
 945 950 955

 gcc agt gtg ggg acc atg gag aca ggg act gcg ctc ctg gac ttg aga 2928
 Ala Ser Val Gly Thr Met Glu Thr Gly Thr Ala Leu Leu Asp Leu Arg
 960 965 970 975

 cct tcc ata ttg ccc ccc tac ccc tca gag cct gac cct ctg gga ccc 2976
 Pro Ser Ile Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Glu Pro Asp Pro Leu Gly Pro
 980 985 990

 tct cca gtg cca gag gcc tca ccc cca acc cca agc ctc ttg agg cac 3024
 Ser Pro Val Pro Glu Ala Ser Pro Pro Thr Pro Ser Leu Leu Arg His
 995 1000 1005

 agt ttc cag tcc agg tca gac aca ttc cac tga cctggc 3064
 Ser Phe Gln Ser Arg Ser Asp Thr Phe His
 1010 1015

10

20

30

<210> 6

<211> 1017

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Val Met Lys Gly Leu Leu Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu Asp
 1 5 10 15

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

10

20

30

Leu Phe Ile Leu Asp Ile Ile Leu Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Ser
 275 280 285
 Gln Ser Gly Gln Val Ile Ser Ala Pro Arg Ser Ile Gly Leu His Tyr
 290 295 300
 Leu Ala Thr Trp Phe Phe Ile Asp Leu Ile Ala Ala Leu Pro Phe Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Tyr Ile Phe Asn Ile Thr Val Thr Ser Leu Val His Leu Leu
 325 330 335
 Lys Thr Val Arg Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Gln Lys Leu Glu
 340 345 350
 Arg Tyr Ser Gln Cys Ser Ala Val Val Leu Thr Leu Leu Met Ser Val
 355 360 365
 Phe Ala Leu Leu Ala His Trp Met Ala Cys Ile Trp Tyr Val Ile Gly
 370 375 380
 Arg Arg Glu Met Glu Ala Asn Asp Pro Leu Leu Trp Asp Ile Gly Trp
 385 390 395 400
 Leu His Glu Leu Gly Lys Arg Leu Glu Val Pro Tyr Val Asn Gly Ser
 405 410 415
 Val Gly Gly Pro Ser Arg Arg Ser Ala Tyr Ile Ala Ala Leu Tyr Phe
 420 425 430
 Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Cys Ala Asn
 435 440 445
 Thr Asp Ala Glu Lys Ile Phe Ser Ile Cys Thr Met Leu Ile Gly Ala
 450 455 460
 Leu Met His Ala Val Val Phe Gly Asn Val Thr Ala Ile Ile Gln Arg
 465 470 475 480
 Met Tyr Ser Arg Arg Ser Leu Tyr His Ser Arg Met Lys Asp Leu Lys
 485 490 495
 Asp Phe Ile Arg Val His Arg Leu Pro Arg Pro Leu Lys Gln Arg Met
 500 505 510
 Leu Glu Tyr Phe Gln Thr Thr Trp Ala Val Asn Ser Gly Ile Asp Ala
 515 520 525

10

20

30

Asn Glu Leu Leu Arg Asp Phe Pro Asp Glu Leu Arg Ala Asp Ile Ala
 530 535 540
 Met His Leu Asn Arg Glu Ile Leu Gln Leu Pro Leu Phe Gly Ala Ala
 545 550 555 560
 Ser Arg Gly Cys Leu Arg Ala Leu Ser Leu His Ile Lys Thr Ser Phe
 565 570 575
 Cys Ala Pro Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Arg Gly Asp Ala Leu Gln Ala
 580 585 590
 His Tyr Tyr Val Cys Ser Gly Ser Leu Glu Val Leu Arg Asp Asn Met
 595 600 605
 Val Leu Ala Ile Leu Gly Lys Gly Asp Leu Ile Gly Ala Asp Ile Pro
 610 615 620
 Glu Pro Gly Gln Glu Pro Gly Leu Gly Ala Asp Pro Asn Phe Val Leu
 625 630 635 640
 Lys Thr Ser Ala Asp Val Lys Ala Leu Thr Tyr Cys Gly Leu Gln Gln
 645 650 655
 Leu Ser Ser Arg Gly Leu Ala Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Glu Tyr
 660 665 670
 Gly Ala Ala Phe Arg Ala Gly Leu Pro Arg Asp Leu Thr Phe Asn Leu
 675 680 685
 Arg Gln Gly Ser Asp Thr Ser Gly Leu Ser Arg Phe Ser Arg Ser Pro
 690 695 700
 Arg Leu Ser Gln Pro Arg Ser Glu Ser Leu Gly Ser Ser Ser Asp Lys
 705 710 715 720
 Thr Leu Pro Ser Ile Thr Glu Ala Glu Ser Gly Ala Glu Pro Gly Gly
 725 730 735
 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Pro Leu Leu Leu Pro Asn Leu Ser Pro Ala
 740 745 750
 Arg Pro Arg Gly Ser Leu Val Ser Leu Leu Gly Glu Glu Leu Pro Pro
 755 760 765
 Phe Ser Ala Leu Val Ser Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ser Leu Ser Pro
 770 775 780

10

20

30

Ala Leu Ala Gly Gln Gly His Ser Ala Ser Pro His Gly Pro Pro Arg
785 790 795 800

Cys Ser Ala Ala Trp Lys Pro Pro Gln Leu Leu Ile Pro Pro Leu Gly
805 810 815

Thr Phe Gly Pro Pro Asp Leu Ser Pro Arg Ile Val Asp Gly Ile Glu
820 825 830

Asp Ser Gly Ser Thr Ala Glu Ala Pro Ser Phe Arg Phe Ser Arg Arg
835 840 845

Pro Glu Leu Pro Arg Pro Arg Ser Gln Ala Pro Pro Thr Gly Thr Arg
850 855 860

Pro Ser Pro Glu Leu Ala Ser Glu Ala Glu Glu Val Lys Glu Lys Val
865 870 875 880

Cys Arg Leu Asn Gln Glu Ile Ser Arg Leu Asn Gln Glu Val Ser Gln
885 890 895

Leu Ser Arg Glu Leu Arg His Ile Met Gly Leu Leu Gln Ala Arg Leu
900 905 910

Gly Pro Pro Gly His Pro Ala Gly Ser Ala Trp Thr Pro Asp Pro Pro
915 920 925

Cys Pro Gln Leu Arg Pro Pro Cys Leu Ser Pro Cys Ala Ser Arg Pro
930 935 940

Pro Pro Ser Leu Gln Asp Thr Thr Leu Ala Glu Val His Cys Pro Ala
945 950 955 960

Ser Val Gly Thr Met Glu Thr Gly Thr Ala Leu Leu Asp Leu Arg Pro
965 970 975

Ser Ile Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Glu Pro Asp Pro Leu Gly Pro Ser
980 985 990

Pro Val Pro Glu Ala Ser Pro Pro Thr Pro Ser Leu Leu Arg His Ser
995 1000 1005

Phe Gln Ser Arg Ser Asp Thr Phe His
1010 1015

<210> 7

10

20

30

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7
 gccatgccgg tcatgaagg 19

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8
 gccagggtca gtggaatgtg 20

<210> 9
 <211> 3715
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

<400> 9
 ctgctggggc ctacgaacct gggccgggca tagcccccg acggctactc tagggggcgc 60
 ggggcccggc gggggcgggc cgagccaggc gccctcccc ggcgctgagt ccccgcgccc 120
 cggagggatg gggcgggcgg tccccgccgc ctaagatgcc ggccatgcgg gggctccttg 180
 cgccgcagaa caccttcctg gacaccatcg ccacccgctt cgacgggacg cacagtaact 240
 tcgtcctggg caacgcccag gtggcagggc tcttcctgt ggtctactgc tccgatggct 300
 tctgtgacct cacgggtttc tccagagctg aggtcatgca gcgaggctgt gcctgctcct 360
 tcctctatgg gccagacacc agtgagttgg tccgccaaca gatccgaaa gccctggatg 420
 agcacaaga attcaaggct gaactgatcc tgtaccgaa gagcgggctt ccattctggt 480
 gtctcctgga tgtgatacct ataaaaaacg agaaggggga ggtggccctc ttctggtct 540
 ctcacaagga catcagttag accaagaacc gaggaggccc tgacaactgg aaggagagag 600

10

20

30

gtggtggccg acgcagatat ggtcgggcag gatccaaagg ctttaatgcc aatcggaggc 660
gcagccgggc ggttctctac cacctctctg gtcacctgca gaaacaaccc aagggaagc 720
acaaactcaa taagggtgtg ttggagaga agccaaattt gccgaatat aaagtcgctg 780
ctatccggaa gtcacccttt atcctgctgc actgtggggc tctgagagcc acctgggatg 840
gcttcatcct gctcgccacg ctctacgtgg ctgtcactgt gccatacagc gtgtgtgtga 900
gcacagcacg ggagcccagt gctgcccgtg gcccacctag tgtctgtgac ctggccgtgg 960
aagtcctctt catcttagat attgtgctga attttcttac tacatttgtg tccaagtcag 1020
gccagggtgt attcgcccca aagtcattt gcctccacta cgtcaccacc tggttcctgc 1080
tggatgtcat agcagcactg ccttttgacc tactacatgc cttcaaggtc aatgtgtacg 1140
ttggggctca cctactgaag accgtgcggc tgcttcggct gctgcgccta ctaccaagac 1200
tggaccggtg ctctcagtat agcgtgttg tgctcacctt gctcatggct gtgtttgcc 1260
tgctcgccca ctgggtggcc tgcgtttggt tctacatcgg ccagcaagag attgagaaca 1320
gcgagtcaga gctgcctgag atcggctggc tgcaggagct ggcacgcagg ctggagacgc 1380
cctattacct ggtgagccgg agtccagatg gaggaacag ctctggccag agtgaaaact 1440
gcagtagcag tggcgccggc agcgaagcca acgggactgg gctggagctg ctgggtggcc 1500
catccctacg cagcgcctac atcacctcct tgtacttcgc gctcagcagt ctcaccagtg 1560
tgggcttcgg caatgtgtcc gctaacacag aactgagaa gattttctcc atctgcacca 1620
tgcttattgg agctctgatg catgcagtgg tgtttgggaa tgtgacagcc atcatccagc 1680
gcatgtacgc tcgcgccttt ctgtaccaca gccgcacccg tgacctgcga gactacattc 1740
gcatccaccg catccccaag cccctcaagc agcgcagtct cgagtacttc caagccacct 1800
gggccgtgaa caacggcatc gataccactg agctgctgca gagccttccg gatgagcttc 1860
gagcagacat cgccatgcac ctgcacaagg aggtcctgca gctgccattg ttcgaggcag 1920
cgagccgtgg ctgcctgcgg gcaactgtctc tggccctgag gcccgccctc tgcacgccgg 1980
gcgagtacct cattaccaa ggcgatgctc tccaggctct ctactttgtg tgctcagggt 2040

10

20

30

ccatggaggt cctcaaaggt ggcaccgtcc tcgccattct agggaaggt gacctgatcg 2100
gctgtgagct gcccagcga gagcaagtag tgaaggccaa tgccgacgta aaggggctga 2160
catactgcgt cctacagtgc ctgcagctgg ctgggctgca cgagagcctc gcactgtacc 2220
ctgagtttgc cccacgcttt agccgtggcc tccgagggga gctcagctac aacctgggag 2280
ctggaggagt gtctgcagag gtggatacca gctcactgag tggtgacaac accctcatgt 2340
ccacactgga ggagaaggag acagatgggg agcaaggaca cacgatctca ccagccccag 2400
cagatgagcc ctccagcccc ctgctgtcac ctggctgtac ctctcctcc tcagcgcca 2460
aactactctc cccacgtcga actgcacccc ggccgaggct ggggtggcaga gggcgccaa 2520
gtagggcagg ggttttgaag cctgaggctg gtccttctgc tcatccacgg acaacttgatg 2580
ggttgcagct gcccccatg ccatggaatg tacctccaga cctgagcccc agggctcgtag 2640
atggcattga ggatggctgc ggctctgacc agcacaagtt ctctttccgg gtgggtcagt 2700
ctggcccaga atgtagcagc agcccctccc caggaacaga gagtggcctg ctcactgtcc 2760
ccttggtgcc cagtgaggca agaaacacag acacactgga caagctacgg caggcggtga 2820
cggagctgtc tgaacagggtg ctgcagatgc gagagggact gcagtcactt cgccaggctg 2880
tgcagctcat cctggtgccc caaggggaag gccagtgctc ccgggtatca ggagaggggc 2940
catgccagc cactgcctct gggctcctac aacctctcg tgtggacact ggggcatcat 3000
cctactgcct gcagcccca gcaggttcag tcttgagtgg gacctggcct ccccccgtc 3060
cagggcatcc ccctccctc atggcaccct ggccctgggg cccccagca tctcagagct 3120
ccccctggcc tcgagccaca gctttatgga cctccacctc agactcagag cccccggct 3180
ctggagacct ctgctctgag ccagcaccc cagcctcacc cctcctcct gaggaaggag 3240
ctaggactgg gactcctgca cctgtgagcc aggtgaggg taccagtact ggagagcccc 3300
ctccggggtc agggggcga gccttgccct gggatcccca cagcctagag atggtgctca 3360
tcggctgcca tggccctggc tcggctccagt ggacccagga ggagggcaca ggagtctgac 3420
cacaggcagg gagaggggtt ctgcaaacac ccgccacctg ctgaccgcc agcctcacag 3480

10

20

30

ggctgccctc tggctcaggg cagggaaacct aaggaaggag gaggggtgagc tggagcctca 3540
 ggccccaggc cagggatcca cgggttctgc tccactgacc tgacccaatg ggggcagagg 3600
 cctgaggacg aggaggggtt ctgccattcc ttgcatgtgc ccatctccac tgtcctctgt 3660
 cctcatgttt tttatattaa aaaacataaa aaaaaaccaa taaagaaact acttt 3715

<210> 10

<211> 3736

<212> DNA

<213> Rattus sp.

10

<400> 10

caggcagcgg cggcgagagg aggggaggag gcaggccggc gcatggggcg ccccgggccc 60
 gccggtagcg cgccccctcc ggccaggccg cgctgaacgc agcccgcgca acgcctcgaa 120
 ttcgtaccgg gggccatgcc ggtcatgaag gggttgctgg ccccgcaaaa cacctttctg 180
 gacaccatcg cactcgctt tgacggcacg cacagcaact ttcttctggc caatgcccag 240
 ggcccacggg gttttcccat cgtctactgc tctgacggct tctgtgagct cacaggctac 300
 ggccgcaccg aggtcatgca gaaaacctgt agctgccggt tcctctatgg ccagagacc 360
 agtgagccgg ccttgcaacg gttacaaaaa gccctggagg gccaccaaga acacagagct 420
 gaaatctgct ttaccgaaa ggaatggctcg gccttttggg gtcttctgga catgatgcc 480
 atcaaaaatg agctggggga ggtggtgctt ttctattttt cctttaagga catctctcag 540
 agtggaggcc caggacttgg ctaccaggg atccatgggg acaataataa tcatgaaaac 600
 tccottggga ggagaggagc tagctcaaga cttaggtcca cgaggaggca gaaccggaca 660
 gtctacacc ggttgactgg ccactttggg cgcggggacc agggaagcgt gaaagccaat 720
 agtaacgtgt ttgagccaaa gccatcagtg cctgagtaca aagtggcctc cgtggggggc 780
 tcccgctgcc tgctctcca ctacagcatc cccaaggctg tctgggacgg tctcatcctt 840
 ctcgctacgt tctacgtcgc ggtcacgctc cttacaacg tctgcttcgc tggatgatgac 900
 gacaccccca tcacgtcccg acacaccctt gtcagtgaca tcgctgtgga gatgctcttc 960

20

30

atcctggaca tcattctttaa cttccgcacc acctacgtgt ccagtcggg ccaggtggtt 1020
tctgctcctc ggtccattgg cctccactac ctggccacct ggttcttcgt ggacctcatt 1080
gctgctttgc cctttgacct gctgtatgtc ttcaacatca ctgtgacctc gctggtacat 1140
ctgctgaaaa ccgtgcggtt cctgcggttg ctgaggtgc tgcagaagct agagcggtag 1200
tctcagtga gcgcggtggt gctcacgtg ctcatgtccg tctttgacct ccttgccac 1260
tggatggcct gcgtctggtt tgtcatcggg cgcgggaga tggaggcaa tgacctgctg 1320
ctctgggaca ttggttggtt gcatgagctg ggtaagcggc tggaggagcc ttatgtcaat 1380
ggctcggcgg gtggaccatc tcggcgagc gcctacatcg ccgcgctgta cttcacgtg 1440
agcagcctca ccagtgtagg cttcggaac gtttgtgcca aactgacgc tgagaagatc 1500
ttctccatct gcacgatgct cataggcgcg ctgatgcacg cgggtggtgtt tgggaatgtc 1560
acagccatca tccagcgcat gtactccga cgctcgtct accacagccg catgaaggat 1620
ctcaaggact tcattccagt gcatcgtctg ccccgccac tcaagcagcg catgctcgag 1680
tacttccaga ctacatgggc cgtcaacagc ggcatcgatg ccaacgagtt actgctgac 1740
ttcccgatg agctgcgagc tgacatcgc atgcacctga atcgggagat cctgcagctg 1800
cctttgtttg gagcagcaag caggggctgc cttcgtgcc tctccctgca catcaagacc 1860
tcattttgtg ctctgggga gttcctgcta cgcgtggg atgccctgca ggcacactac 1920
tatgtctgct ctggctctct tgaggtgctc cgagacaaca cgggtgctggc catccttga 1980
aagggggact tgattgggga agacatccct gagggtggg aggagcctgg ggcaggggca 2040
ggctgcgtgc tgaagaccag cgctgatgtg aaagcactga cttactgagg cctgcagcag 2100
ctgagcagcc gagggctggc cgaggtcctt cggttgtatc cggaatatgt ggctgccttc 2160
agggctggcc taccgggga cctaaccttc aacctgcgc aaggctctga aaacaatggc 2220
ctcggcgcgt tctcagttc tctcagctc tcccaggcac gctccgacac tcttggttcc 2280
tcctcagaca agactctgcc atccatcaca gaaaccgagg gtggcatgga gcctggggct 2340
ggttccaagc ccgctcgcc cctcctgctg cccaacctca gtccagcacg acctcggggg 2400

10

20

30

tccctgggtca gccctttggg cgaagagctg cccccattct cagcccttgt ctccctctct 2460
 tccctgtccc caactccttc ccctgccctg gctggccggg gttcaagtcc ctccctgcac 2520
 gggcccccca ggggctctgc tgctggaag cccccccagc tcctcaccac cccactggga 2580
 acatttggaac ctccggacct cagtccccgg atcgtggatg gcattgagga ctccagtaac 2640
 acagctgagg ctctacatt ccggttcagc aagaggccgg agcccaccag aaccctgtca 2700
 caggctcccc tttagggccc taggctcagc cgggaactgg ccacagaggc agcagaggag 2760
 gtgaaggaaa aggtctgcag gctgaaccaa gagatttcca gactcaacca ggaagtgtct 2820
 cagctgagcc gggagcttcg ccaagtgatg ggcctcttac aggccaggct gggccccca 2880
 agtaccaccac ctgactccac ttggctocca gaccttctt gtcccatca gagaccgcca 2940
 tgcatctctc ctcatatgc tggacctcca cctggctctc agaatactac acttgctgta 3000
 gtccactgtc cagccagtgt tgggacagtg gagatagggg ccaccccctc agagctgagg 3060
 tcttccatgg tgccaccctt tccctcagaa cctgatcctc ttggaccctc tccagtcca 3120
 gaggtctctc ctctgacccc aagcctctg aagcacagct tccagtctgg gtcagacaca 3180
 ttccactgac cctggccttg gcccaggcc tgtctgggtt gggcttaatt acctgccatc 3240
 cagggaggag ctgggctcct tggcctcttg ccttggggtc agcagctgcc agctggctct 3300
 gttggctctg gattctctgg actttttaac aatgagtggc cacatctaac cccgttccat 3360
 tttctaaacc atcccccca cccgtcctac tcttgtgga ggggagtcac ctgaagccgt 3420
 ggaatccagc aggcataaaa tggaccatgg tgccctgttg ggctacgcag aggagatgtc 3480
 ttactttctc cccacgactt ggaggctgtc atgcaagggt gtcccttctg ctgccagcag 3540
 ctcaaagcat totagcttta ccttctgca gttccacac ccaaaccatca gtcatactct 3600
 cccccctccc tccaacatg gtctcgacct caatgaggat ctgggcaact cacaaccct 3660
 ctctggtttc cagctcccc tttcactaa acaccccagg ctcaactttg gatagaaaat 3720
 aaatccatat attttt 3736

10

20

30

```
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 11
accttctctgg acaccatcgc 20

```
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
```

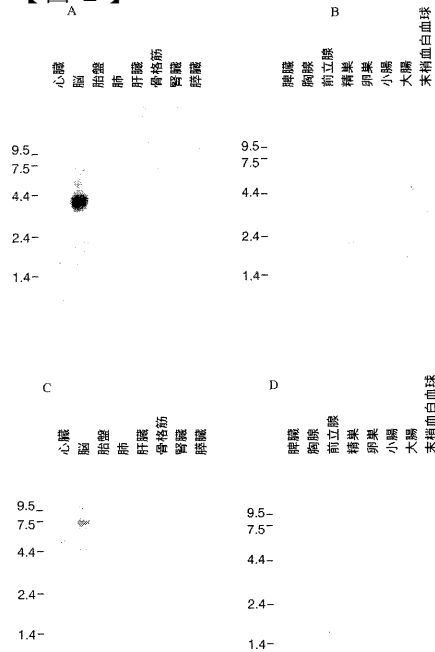
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:probe

```
<400> 12
ccaaacacca ccgcgtgcat                                     20
```

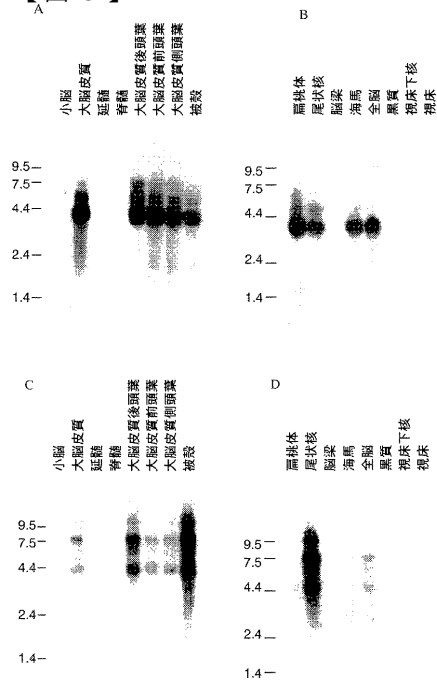
【 図 1 】

[illegible]

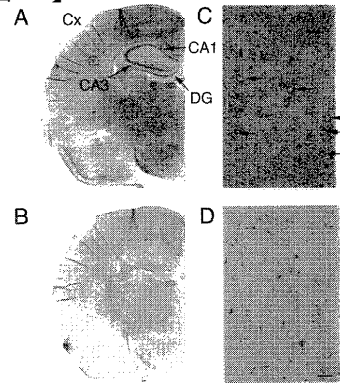
【図 2】



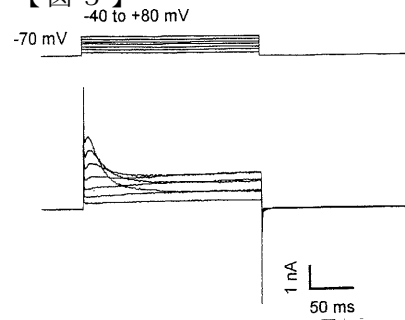
【図 3】



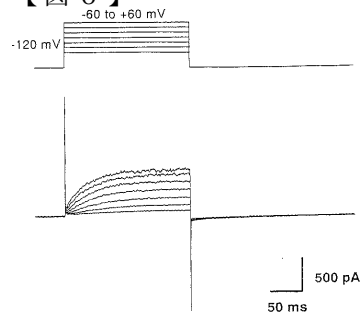
【図 4】



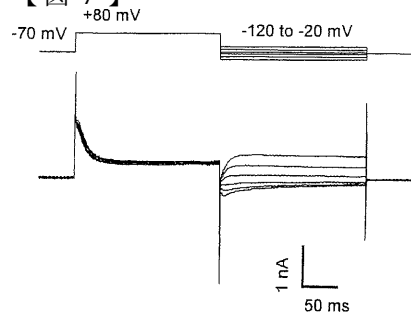
【図 5】



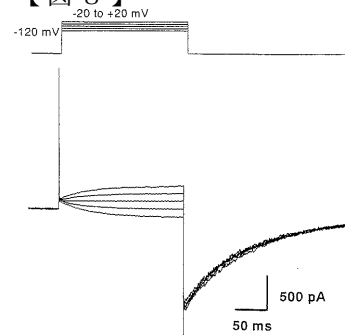
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

(72)発明者 横井 宏理
茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 国際公開第99/027677 (WO, A1)
J Neurosci.(1997),Vol.17,No.12,p.4652-4661
EMBO J.(1994),Vol.13,No.19,p.4451-4458
J Physiol.(1998 Sep),Vol.511, Pt 3,p.675-682

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N1/00-15/00
C07K14/00
C12P21/02
BIOSIS/WPI(DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq