

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514909

(P2005-514909A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 M 1/40	C 1 2 M 1/40 B	4 B O 2 4
C 1 2 M 3/00	C 1 2 M 3/00 A	4 B O 2 9
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 128 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-511906 (P2003-511906)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成14年7月12日 (2002. 7. 12)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月8日 (2004. 3. 8)		MERCK & COMPANY INC OPERATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/022161		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/006103	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003. 1. 23)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/304, 955	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001. 7. 12)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核生物細胞の電場による刺激

(57) 【要約】

電位依存性イオンチャネルの活性化因子および阻害剤を同定する様々な方法が提供される。これらの方法では、細胞の電場刺激が、電位依存性イオンチャネルの開/閉状態の移行を操作するために用いられる。これら方法は、これら開/閉状態の移行の、より簡便かつより精密な実験操作を可能にし、そして、チャネルを通過するイオン流動の結果を検出する効率的な方法と組み合わせられたとき、高処理能スクリーニングのために特に好適である様々な方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞の膜の少なくとも一部分の膜横断電位を、電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって変化させること；

(b) 工程(a)における細胞を物質にさらし、電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターすること；

(c) 工程(a)および工程(b)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流を比較すること

を含み、

工程(a)および工程(b)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流の違いにより、該物質が電位依存性イオンチャンネルの調節因子であることが示される、電位依存性イオンチャンネルの活性の調節因子を同定するための方法。

10

【請求項 2】

(a) 電位依存性イオンチャンネルを発現する多数の細胞を対照部分と試験部分とに分けること；

(b) 電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって、対照部分の細胞の膜横断電位を変化させること；

(c) 電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、物質の存在下、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって、試験部分の細胞の膜横断電位を変化させること；

(d) 工程(b)および工程(c)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流を比較すること

を含み、

工程(b)および工程(c)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流の違いにより、該物質が電位依存性イオンチャンネルの調節因子であることが示される、電位依存性イオンチャンネルの活性の調節因子を同定するための方法。

20

【請求項 3】

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が上に置かれた基体を提供すること；

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が閉じるように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

(c) 事前に選択された電圧を、正極および負極を介して加えること；

(d) 工程(c)における細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である場合、閉じている電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が開口し、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を可能にするような十分な期間および条件下で工程(c)の細胞を物質にさらすこと；

(f) 工程(e)の細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること

を含み、

対照値が試験値よりも小さい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子を同定する方法。

40

【請求項 4】

基体がガラスまたはマルチウエル組織培養プレートであり、ケイ素または電界効果トランジスタではない、請求項 3 に記載の方法。

50

【請求項 5】

基体が、細胞が存在するウエルを含有する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ウエルの数が、12、24、96、384、1,536 または 3,456 である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ウエルが実質上のウエルである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも 50,000 個の物質が 24 時間の期間で試験される、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 9】

電位依存性イオンチャンネルが、電位依存性ナトリウムチャンネル、電位依存性カリウムチャンネルまたは電位依存性カルシウムチャンネルである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性ナトリウムチャンネルである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性カリウムチャンネルである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性カルシウムチャンネルである、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 13】

細胞が、L細胞 L-M (TK⁻) (ATCC CCL1.3)、L細胞 L-M (ATCC CCL1.2)、HEK293 (ATCC CRL1573)、Raji (ATCC CCL86)、CV-1 (ATCC CCL70)、COS-1 (ATCC CRL1650)、COS-7 (ATCC CRL1651)、CHO-K1 (ATCC CCL61)、3T3 (ATCC CCL92)、NIH/3T3 (ATCC CRL1658)、HeLa (ATCC CCL2)、C127I (ATCC CRL1616)、BS-C-1 (ATCC CCL26)、MRC-5 (ATCC CCL171)、CPAE (ATCC CCL209)、Saos-2 (ATCC HTB-85)、ARPE-19 ヒト網膜色素上皮 (ATCC CRL-2302)、GH3 細胞および初代心筋細胞からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 14】

細胞が HEK293 (ATCC CRL1573) または GH3 細胞または初代心筋細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

細胞が蛍光指示薬化合物を含有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 16】

蛍光指示薬化合物が、fluo-3、fura-2、fluo-4、fluo-5、カルシウムグリーン-1、オレゴングリーン、488BAPTA、SNARF-1 および indo-1 からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

正極および負極が交互にかみ合っている、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 18】

基体が、1つの正極および1つの負極を含有する多数のウエルを有するマルチウエル組織培養プレートである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 19】

基体が、正極または負極の一方がウエルの底部を形成し、かつ正極または負極のもう一方が上方からウエルに進入する多数のウエルを有するマルチウエル組織培養プレートであ

50

る、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 20】

基体が、多数の実質上のウエルを有するマルチウエル組織培養プレートである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 21】

各ウエルが 10^3 個から 10^7 個の細胞を含有し、細胞が蛍光指示薬化合物または蛍光性の電圧感知色素を含有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 22】

細胞は、電位依存性イオンチャンネルを生来的には発現せず、しかし、電位依存性イオンチャンネルをコードする発現ベクターでトランスフェクションされている、請求項 3 に記載の方法。 10

【請求項 23】

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が開口するように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

(c) 事前に選択された電圧を、正極および負極を介して加えること；

(d) 工程 (c) における細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること； 20

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である場合、開口している電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が閉じ、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を制限するような十分な期間および条件下で工程 (c) の細胞を物質にさらすこと；

(f) 工程 (e) の細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること

を含み、

対照値が試験値よりも大きい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である、電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を同定する方法。 30

【請求項 24】

基体がガラスまたはマルチウエル組織培養プレートであり、ケイ素または電界効果トランジスタではない、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

基体が、細胞が存在するウエルを含有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

ウエルの数が、12、24、96、384、1,536 または 3,456 である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 40

ウエルが実質上のウエルである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

少なくとも 50,000 個の物質が 24 時間の期間で試験される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

電位依存性イオンチャンネルが、電位依存性ナトリウムチャンネル、電位依存性カリウムチャンネルまたは電位依存性カルシウムチャンネルである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性ナトリウムチャンネルである、請求項 29 に記載の方法。 50

【請求項 3 1】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性カリウムチャンネルである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

電位依存性イオンチャンネルが電位依存性カルシウムチャンネルである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

細胞が、L細胞 L - M (TK⁻) (ATCC CCL 1 . 3)、L細胞 L - M (ATCC C CCL 1 . 2)、HEK 2 9 3 (ATCC CRL 1 5 7 3)、Raji (ATCC CCL 8 6)、CV - 1 (ATCC CCL 7 0)、COS - 1 (ATCC CRL 1 6 5 0)、COS - 7 (ATCC CRL 1 6 5 1)、CHO - K 1 (ATCC CCL 6 1)、3 T 3 (ATCC CCL 9 2)、NIH / 3 T 3 (ATCC CRL 1 6 5 8)、HeLa (ATCC CCL 2)、C 1 2 7 I (ATCC CRL 1 6 1 6)、BS - C - 1 (ATCC CCL 2 6)、MRC - 5 (ATCC CCL 1 7 1)、CPAE (ATCC CCL 2 0 9)、Saos - 2 (ATCC HTB - 8 5)、ARPE - 1 9 ヒト網膜色素上皮 (ATCC CRL - 2 3 0 2)、GH 3 細胞および初代心筋細胞からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 4】

細胞が HEK 2 9 3 (ATCC CRL 1 5 7 3) または GH 3 細胞または初代心筋細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

細胞が蛍光指示薬化合物を含有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

蛍光指示薬化合物が、fluo - 3、fura - 2、fluo - 4、fluo - 5、カルシウムグリーン - 1、オレングリーン、488 BAPTA、SNARF - 1 および indo - 1 からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

正極および負極が交互にかみ合っている、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 8】

基体が、1つの正極および1つの負極を含有する多数のウェルを有するマルチウェル組織培養プレートである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 9】

基体が、正極または負極の一方がウェルの底部を形成し、かつ正極または負極のもう一方が上方からウェルに進入する多数のウェルを有するマルチウェル組織培養プレートである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 0】

基体が、多数の実質上のウェルを有するマルチウェル組織培養プレートである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 1】

各ウェルが 10^3 個から 10^7 個の細胞を含有し、細胞が蛍光指示薬化合物または蛍光性の電圧感知色素を含有する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 4 2】

細胞は、電位依存性イオンチャンネルを生来的には発現せず、しかし、電位依存性イオンチャンネルをコードする発現ベクターでトランスフェクションされている、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 3】

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が閉じ

るように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；
 (c) 事前に選択された電圧を、細胞の対照サンプルに正極および負極を介して加えること；

(d) 工程(c)における細胞の対照サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である場合、試験サンプルにおいて閉じている電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が開口し、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を可能にするような十分な期間および条件下で細胞の試験サンプルを物質にさらしながら、事前に選択された電圧を、細胞の試験サンプルに正極および負極を介して加えること；

(f) 工程(e)の細胞の試験サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること
 を含み、

対照値が試験値よりも小さい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子を同定する方法。

【請求項44】

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が開口するように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

(c) 事前に選択された電圧を、細胞の対照サンプルに正極および負極を介して加えること；

(d) 工程(c)における細胞の対照サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である場合、試験サンプルにおいて開口している電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が閉じ、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を制限するような十分な期間および条件下で細胞の試験サンプルを物質にさらしながら、事前に選択された電圧を、細胞の試験サンプルに正極および負極を介して加えること；

(f) 工程(e)の細胞の試験サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること
 を含み、

対照値が試験値よりも大きい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である、電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を同定する方法。

【請求項45】

目的とする電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に有する少なくとも 10^3 個の生存している真核生物細胞が存在する上部表面を有する基体；

事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位が制御されるように基体上または基体近くのいずれかに配置された多数の正極および多数の負極；

電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤であることが疑われる少なくとも1つの物質

を含み、

細胞が蛍光指示薬化合物を含有する、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤を同定する際に使用される装置。

【請求項46】

10

20

30

40

50

目的とする電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に有する、ウエルあたり少なくとも 10^3 個の生存している真核生物細胞が存在する多数のウエル；

事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位が変化するように配置された多数の正極および多数の負極；

多数のウエルの少なくとも1つにおける、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤であることが疑われる少なくとも1つの物質を有し、

細胞が蛍光指示薬化合物または電圧感受性膜色素を含有する、マルチウエル組織培養プレート。

【請求項47】

10

プレートの多数のウエルが、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように配置された1対の電極を含有する、マルチウエル組織培養プレート。

【請求項48】

1対の電極の一方がウエルの底部に含有され、1対の電極のもう一方がウエルの側面に含有される、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項49】

1対の電極の両方がウエルの底部に含有される、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項50】

20

1対の電極の一方が、ウエルの底部を形成する導電性材料の層であり、1対の電極のもう一方が上方からウエルに進入する、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項51】

1対の電極の両方が絶縁体に埋め込まれ、かつ上方からウエルに進入する、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項52】

上方からウエルに進入する電極が、絶縁体によって囲まれている中心の導電性材料部分を有する、請求項50に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項53】

30

電極対により、正極および負極の交互パターンがウエルにおいて形成される、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項54】

ウエルの底部を形成する導電性材料の層が、ガラス基体を覆うインジウムスズ酸化物の層である、請求項50に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項55】

導電性材料の層およびガラス基体が透明である、請求項54に記載のマルチウエル組織培養プレート。

【請求項56】

プレートの多数のウエルが、交互にかみ合う電極を含有する、請求項47に記載のマルチウエル組織培養プレート。

40

【請求項57】

事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように、第1の電極および第2の電極が配置されているマルチウエル組織培養プレートであって、

ウエルの底部が、細胞を増殖させることができるフィルターメンブランであり、

ウエルが、流体を含有するために好適なトラフに配置され、

トラフには、第1の電極が含有され、

第2の電極が上方からウエルに進入する、

マルチウエル組織培養プレート。

50

【請求項 58】

蛍光画像化装置によりマルチウエル組織培養プレートのウエルからの蛍光読み取りを得ることができるように、マルチウエル組織培養プレートおよび蛍光画像化装置が互いに配置されている、請求項 46 から 57 に記載されるマルチウエル組織培養プレートと、蛍光画像化装置との組合せ。

【請求項 59】

上部基体および底部基体のそれぞれが、
多数の実質上のウエル、および
実質上のウエルの底部を形成する導電性材料の層
を含有し、

10

導電性材料の層が電極として機能し、その結果、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、実質上のウエルにおける細胞の膜横断電位が変化するように、上部基体および底部基体における導電性材料の層がパルス発生器に接続されている、上部基体および底部基体の組合せ。

【請求項 60】

多数の全体に平行する正極および負極と、電極に対して全体に直角に配置された多数のスペーサーとによって形成された正方形または矩形のウエルを有し、
ウエルの 1 つの壁が正極により形成され、ウエルの反対側の壁が負極により形成され、
スペーサーは、電極により形成される壁に対して直角であるウエルの壁を形成し、
事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化
するように電極が配置されている、基体。

20

【請求項 61】

ウエルの底部が細胞を増殖させることができる光学的に透明なフィルターメンブランから構成されている、マルチウエル組織培養プレート；

流体を含有するために好適であり、かつ前記マルチウエル組織培養プレートをその中に入れることができるように設計されたトラフ；

前記トラフに配置された少なくとも 1 つの電極；および

前記マルチウエル組織培養プレートにおけるウエルの数に対応する量で多数の第 2 の電極を含む電極ヘッド（ただし、前記電極ヘッドおよび前記多数の前記第 2 の電極は、前記電極ヘッドを前記マルチウエル組織培養プレートに配置したとき、前記多数の第 2 の電極がマルチウエル組織培養プレートのウエルに配置されるように設計されている）

30

を含み、

事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように、前記少なくとも 1 つの第 1 の電極および前記多数の前記第 2 の電極が配置されている、細胞に電場刺激を加えるためのシステム。

【請求項 62】

前記少なくとも 1 つの電極または前記多数の第 2 の電極またはそれらの両方と電氣的に連絡している波形発生器をさらに含み、それにより、電気パルスシグナルが前記波形発生器によって発生させられる、請求項 61 に記載のシステム。

【請求項 63】

前記波形発生器と電氣的に接続されたコンピューターをさらに含み、前記コンピューターは、前記波形発生器によって作製された前記パルスシグナルを調整するためのソフトウェアを含む、請求項 62 に記載のシステム。

40

【請求項 64】

前記波形発生器は、前記パルスシグナルによって刺激されるウエルのアドレスを表す二進値を作製する、請求項 62 に記載のシステム。

【請求項 65】

前記多数の第 2 の電極の上流に電氣的中継器をさらに含む、請求項 62 に記載のシステム。

【請求項 66】

50

前記波形発生器および前記電気的中継器と電氣的に連絡しているマイクロコントローラをさらに含み、マイクロコントローラは、前記波形発生器からのトリガーパルスおよび特定の二進値を受け取ったとき、適切な中継器のスイッチを入れ、それにより、前記特定の二進値に対応する特定の電極にパルスを導くように配置されている、請求項 65 に記載のシステム。

【請求項 67】

前記トラフが 1 つの第 1 の電極を含む、請求項 61 に記載のシステム。

【請求項 68】

ウエルの底部が、細胞を増殖させることができる光学的に透明なフィルターメンブランから構成されているマルチウエル組織培養プレート；

10

流体を含有するために好適な多数の個々のトラフを含み、前記多数のトラフの数は、前記マルチウエル組織培養プレートに含まれるウエルの量に対応し、前記多数のトラフは、前記マルチウエル組織培養プレートの各ウエルを個々に含有するように配置され、ならびに前記多数のトラフは、前記マルチウエル組織培養プレートに規定され、および各ウエルに対して側方に配置されたポートによってアクセスすることができる、トレー；

前記マルチウエル組織培養プレートの上方に載せられるように設計され、前記マルチウエル組織培養プレートのウエルが前記導電性電極プレートを通り抜けることを可能にするように設計された多数の開口部を含み、前記導電性電極プレートと一体化されているかまたは前記導電性電極プレートに取り付けられた多数の導電性ピンを含み、前記多数の導電性ピンの個々のピンは、前記マルチウエル組織培養プレートの上部に前記電極プレートを

20

載せたとき、前記ポートを通り抜け、個々のトラフに配置される導電性電極プレート；および前記マルチウエル組織培養プレートにおけるウエルの数に対応する量で多数の第 2 の電極を含む電極ヘッド（ただし、前記電極ヘッドおよび前記多数の前記第 2 の電極は、前記電極ヘッドを前記マルチウエル組織培養プレートに配置したとき、前記多数の電極がマルチウエル組織培養プレートのウエルに配置されるように設計されている）

を含み、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように、前記少なくとも 1 つの第 1 の電極および前記多数の前記第 2 の電極が配置されている、細胞に電場刺激を加えるためのシステム。

30

【請求項 69】

誘電性材料から構成される誘電性ディスクと、前記誘電性ディスクの 1 つの面に配置された第 1 の導電性ディスクと、前記誘電性ディスクの反対側の面に配置された第 2 の導電性ディスクとを含む新規な電極。

【請求項 70】

少なくとも 1 つの内側リード線および少なくとも 1 つの外側リード線を含む同軸リード線をさらに含み、それにより、前記内側リード線が前記第 1 のディスクおよび前記誘電性ディスクを通り抜け、前記第 2 のディスクに電氣的に接続される、請求項 69 に記載の電極。

【請求項 71】

40

前記第 1 のディスクに電氣的に接続された第 1 のリード線と、前記第 2 のディスクに電氣的に接続された第 2 のリード線とをさらに含む、請求項 69 に記載の電極。

【請求項 72】

事前に選択された電圧が、電場を確立するために、前記第 1 の導電性ディスクと前記第 2 の導電性ディスクとの間に加えられる、請求項 69 に記載の電極。

【請求項 73】

前記電極が、処理される細胞の非常に近いところに前記電極を近づけることができるようなレベルに抵抗発熱を減らしながら、実質的に均一な電場を提供することができる、請求項 72 に記載の電極。

【請求項 74】

50

前記電極と前記細胞との間が10mmの距離から、前記電極を前記細胞と接触させることなく前記細胞に対してより近い距離まで、前記電極を前記細胞に近づけることができる、請求項73に記載の電極。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電場を加えることによって真核生物細胞を刺激するための方法および関連する装置に関する。電場は、細胞の環境において電氣的電位差を生じさせ、それにより、細胞の膜電位の変化をもたらすある種の電極配置によってもたらされる。膜電位の変化は、電位依存性イオンチャンネルの開閉を含む、細胞内の様々な生理学的プロセスに影響を及ぼす。本明細書中に記載されるような電場の適用により電位依存性イオンチャンネルの開/閉移行を変化させることができることは、電位依存性イオンチャンネルの活性を調節する能力について化合物をスクリーニングする新規な方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

真核生物細胞におけるいくつかの分子事象は、細胞の形質膜(すなわち、外膜)にかかる電氣的電位勾配の存在または大きさに依存している。そのような事象のより重要なものの1つが、電位依存性イオンチャンネルを通して形質膜を横断するイオンの動きである。電位依存性イオンチャンネルは、細胞膜電位の変化に応答して開口し、イオンが膜を通過することを可能にする膜貫通孔を形成する。電位依存性イオンチャンネルは多くの生理学的役割を有している。電位依存性イオンチャンネルは、多くのタイプの細胞において、細胞膜電位を維持し、かつ活動電位の再分極を制御することに関与することが示されている(Bennettら、1993、Cardiovascular Drugs & Therapy、7:195~202; Johnsonら、1992、J. Gen. Physiol.、113:565~580; Bennett & Shin、「電位依存性ナトリウムチャンネルの生物物理学」、Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside(第3版、D. Zipes & J. Jalife編、2000年、W. B. Saunders Co.)、67頁~86頁; Bennett & Johnson、「心臓イオンチャンネルの分子生理学」、第2章、Basic Cardiac Electrophysiology and Pharmacology(第1版、A. Zaza & M. Rosen編、2000年、Harwood Academic Press)、29頁~57頁)。さらに、不完全なチャンネルタンパク質をもたらす、ナトリウムまたはカルシウムまたはカリウムの電位依存性イオンチャンネル遺伝子における変異が、少数の例を挙げれば、先天性の長QT症候群、運動失調症、片頭痛、筋肉麻痺、難聴、発作および心臓伝導疾患を含む様々な障害に関係している(Bennettら、1995、Nature、376:683~685; Rodenら、1995、J. Cardiovasc. Electrophysiol.、6:1023~1031; Korsら、1999、Curr. Opin. Neurol.、12:249~254; Lehmannら、1999、Physiol. Rev.、79:1317~1372; Holbauer & Heufelder、1997、Eur. J. Endocrinol.、136:588~589; Naccarelli & Antzelevitch、2000、Am. J. Med.、110:573~581)。

20

30

40

【0003】

数タイプの電位依存性イオンチャンネルが存在する。電位依存性カリウムチャンネルは、ニューロン、筋肉細胞および分泌細胞において、静止膜電位を規定し、活動電位の振動数および持続時間を調節する。膜電位が脱分極した後、電位依存性カリウムチャンネルは開口し、これによりカリウムの流出を可能にし、従って、膜の再分極を可能にする。この挙動により、電位依存性カリウムチャンネルは、様々な疾患に関連して薬物発見に対する重要な標的になっている。正常に機能しない電位依存性カリウムチャンネルが多数の疾患および障害に関係している。Wangら(1998、Science、282:1890

50

~ 1893) は、電位依存性カリウムチャンネルの KCNQ2 および KCNQ3 が、「M チャンネル」として知られているヘテロマーのカリウムイオンチャンネルを形成することを示している。M チャンネルにおける KCNQ2 および KCNQ3 での変異は、てんかんに生じさせる原因である (Biervertら、1998、Science、279: 403~406; Singhら、1998、Nature Genet.、18: 25~29; Schroederら、Nature、1998、396: 687~690)。

【0004】

電位依存性ナトリウムチャンネルは、興奮性細胞における活動電位の生成に不可欠な膜貫通タンパク質である (Catterall、1993、Trends Neurosci.、16: 500~506)。哺乳動物では、電位依存性ナトリウムチャンネルは、サブユニットおよびサブユニットの巨大分子アセンブリからなり、サブユニットが孔形成成分である。様々なサブユニットが、関連する遺伝子の大きなファミリーによってコードされ、いくつかのサブユニットが中枢神経系に存在し (Nodaら、1986、Nature、322: 826~828; Auldら、1988、Neuron、1: 449~461; Kayanoら、1988、FEBS Lett.、228: 187~194)、いくつかは筋肉に存在する (Rogartら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86: 8170~8174; Trimmerら、1989、Neuron、3: 33~49)。

【0005】

電位依存性カルシウムチャンネルは、開口した形態では形質膜を横断する Ca^{2+} イオンの能動的な流動を可能にし、電気化学的勾配を下げる膜貫通タンパク質である。電位依存性カルシウムチャンネルにより、興奮-収縮の共役、シグナル伝達、および神経伝達物質の放出を含む様々な細胞機能が媒介される。

【0006】

現在の薬物発見方法では、多くの場合、所望する活性を有する少数のそのような化合物を同定するために、数万または数十万の化合物の生物学的活性を評価 (すなわち、スクリーニング) することを伴う。多くの高処理能スクリーニングプログラムでは、1日あたり50,000~100,000もの多くの化合物を試験することが望ましい。残念なことではあるが、電位依存性イオンチャンネルの活性を評価する現在の方法は、高処理能スクリーニングプログラムの要求には十分に適していない。現在の方法は、多くの場合、電気生理学的技術に頼っている。標準的な電気生理学的技術では、ガラスピペットを用いて細胞膜に対する「パッチ処理」または締め付け処理を行い、その後、ガラスピペットで吸引し、膜パッチの破裂を生じさせることを伴う (Hamillら、1981、Pflügers Arch.、391: 85~100)。これには、様々な制約および欠点がある。細胞内部への操作は細胞の応答特性を変化させることがある。細胞およびピペットを顕微操作するために必要な高精度の光学装置では、一度に多くの細胞からの同時の読み取りが不可能である。これらの難点を考えた場合、電気生理学的技術を用いて達成され得る処理能は、高処理能スクリーニングのために必要な処理能にははるかに及ばない。

【0007】

様々な技術が、電気生理学の標準的な方法に対する代替法として開発されている。例えば、細胞に放射性トレーサー (例えば、 $^{86}Rb^+$ 、 $^{22}Na^+$ 、 $[^{14}C]$ -グアニジニウム) が負荷され、色素の流出がモニターされる放射性流束アッセイが使用されている。トレーサーが負荷された細胞は様々な化合物にさらされ、そして、トレーサーの流出の増強または減少のいずれかをもたらすそのような化合物が、細胞の膜におけるイオンチャンネルの考えられる活性化因子または阻害剤として同定される。

【0008】

イオンチャンネルの活性の変化による細胞の膜電位の変化を測定するアッセイが開発されている。そのようなアッセイでは、多くの場合、膜電位の変化に基づいて細胞外の環境と細胞の内部との間で再分布し、および、細胞の内側または外側に存在するかに依存して異なる蛍光スペクトルを有する電圧感受性色素が用いられる。関連するアッセイ方法では

10

20

30

40

50

、膜電位の変化を検知するために蛍光共鳴エネルギー転移が可能な1対の蛍光性色素が使用される。この技術の説明については、Gonzalez & Tsien、1997、*Chemistry & Biology*、4:269~277を参照のこと。Gonzalez & Tsien、1995、*Biophys. J.*、69:1272~1280；米国特許第5,661,035もまた参照のこと。他の方法では、カルシウムチャンネルの開口時および閉鎖時における Ca^{2+} 流入の変化をモニターするために、カルシウム依存性の蛍光色素などのイオン選択的な指示薬が用いられる。

【0009】

理想的には、電位依存性イオンチャンネルに対するスクリーニング方法では、アッセイ中の細胞の膜横断電位を制御すること、および/または研究されているイオンチャンネルを開口した状態と閉じた状態との間で循環させることが要求される。これは様々な方法で行われている。標準的な電気生理学的技術では、実験設定により、膜電位の直接的な操作が、電圧固定法(Hodgkin & Huxley、1952、*J. Physiol. (Lond.)*、153:449~544)によって、例えば、印加電圧を変化させるか、または様々なイオンを細胞に注入することによって可能になる。他の方法では、細胞外の K^+ 濃度を低い値(例えば、5mM)からより高い値(例えば、70mMから80mM)に変化させることにより、細胞内カリウムおよび細胞外カリウムの相対的な割合が変化するために、 K^+ に対する電気化学的電位の変化が生じる。これは、より脱分極した状態に向かう膜横断電位的電位の変化をもたらす。この脱分極は多くの電位依存性イオンチャンネル(例えば、電位依存性のカルシウムチャンネルまたはナトリウムチャンネルまたはカリウムチャンネル)を活性化することができる。選択的に、 Na^+ チャンネルを、ベラトリジンまたはサソリ毒などのトキシンの使用によって開口した立体配座に誘導することができる(Strichartzら、1987、*Ann. Rev. Neurosci.*、10:237~267；Narahashi & Harman、1992、*Meth. Enzymol.*、207:620~643)。ときには効果的であるが、そのような実験操作は、チャンネルの薬理学を変化させることがあり、実施するためには熟練を要し得るし、そして研究中のシステムにおいて人為的な乱れを生じさせ得る。

【0010】

細胞の電場刺激が、ガラス微小電極を細胞膜にシールすることによって1個の細胞に対して行われる。細胞膜のシールされたパッチの破裂は、ガラス微小電極の内部液と細胞内の流体との電気的接続をもたらし、これは、電子パルス発生器によって細胞を刺激するために使用された。細胞の電気生理学的応答が高感度の電子増幅器によって測定された。この技術の欠点は、一度に1個の細胞のみが試験されるだけであり、そして個々の細胞に微小電極をシールすることは冗長かつ時間のかかる操作であるということである。

【0011】

HEK293細胞が、電界効果トランジスタのアレイから構成されるケイ素チップの表面で増殖させられている。細胞の一部がトランジスタのゲート領域を覆って存在し、従って、その形質膜の一部がソースおよびドレインに重なっていた。そのような細胞におけるパッチピペットにより、細胞内電圧が操作されたとき、細胞の形質膜における $Maxi-K$ カリウムチャンネルが開口した。これは、細胞の膜とトランジスタとの間の領域における電流の流れをもたらした。この電流の流れにより、適切なデバイスによって検出することができるソース-ドレイン電流が調節された。このチップ+細胞は、センサとしての可能性、および神経補綴デバイスに対する原型体としての可能性を有すると言われた。Straubら、2001、*Nature Biotechnol.*、19:121~124；Neher、2001、*Nature Biotechnol.*、19:114を参照のこと。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子および阻害剤を同定するための方

法に関する。この場合、本発明の方法では、電位依存性イオンチャンネルの開／閉状態の移行を操作するために、細胞外の電極による細胞の電場刺激が用いられる。これは、これらの移行のより簡便かつより精密な実験操作を可能にし、そして、イオン流動または膜電位を検出する効率的な方法と組み合わせられたとき、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子および阻害剤である物質を同定するための高処理能スクリーニングのために特に好適である様々な方法をもたらす。

【0013】

本発明はまた、上記に記載される方法において使用される装置を提供する。特に、標準的なマルチウエル組織培養プレートの様々な改変が提供され、この場合、改変されたマルチウエル組織培養プレートは、プレートのウエルにおける細胞の膜横断電位的電位を変化させることができ、従って、細胞における電位依存性イオンチャンネルの開／閉状態の比率を変化させることができる電極を有する。

10

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明は、細胞の生物学的応答をモニターしながら細胞の電場刺激(EFS)を行うための装置および技術を提供する。好ましくは、生物学的応答は蛍光検出によってモニターされる。細胞は、例えば、好ましくは透明な電気伝導性の電極を含有するガラス製スライドガラス、または事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、マルチウエル組織培養プレートのウエルにおける細胞の膜横断電位が変化するように配置された電極を含有するマルチウエル組織培養プレートなどの特別に設計された基体において増殖し、かつ/またはそのような基体に付着する。

20

【0015】

全般に、本発明は、電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞(好ましくは、哺乳動物細胞)が存在する基体を提供することに関する。正極および負極が基体上または基体近くのいずれかに配置され、その結果、電圧が電極間に加えられたとき、電位依存性イオンチャンネルは、開口または閉鎖され、それにより、細胞の形質膜を通過する少なくとも1つのタイプのイオンの流れを調節する。イオン流のこの調節、またはイオン流の調節からもたらされる膜電位の変化は、直接的または間接的のいずれかで、好ましくは、細胞内における蛍光指示薬化合物の使用によって検出される。物質の収集物、例えば、有機小分子のコンビナトリアルライブラリー、天然産物、ファージディスプレイペプチドライブラリーなどが、細胞の形質膜内の電位依存性イオンチャンネルと接触させられ、そしてイオン流の調節に影響を及ぼすことができるそのような化合物が同定される。このようにして、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子および阻害剤に対するスクリーニングの方法を提供する。そのような活性化因子および阻害剤は、医薬品として、または、医薬品が薬物開発の通常的なプロセス(例えば、医薬化学)によって開発され得るリード化合物として有用であることが期待される。

30

【0016】

細胞外の電場を加えられている間、細胞膜の電気キャパシタンスは、極性および電場に対する細胞の配向に依存して充電または放電する。この結果、膜の所与パッチにおける膜横断電位の一時的な変化が生じる。膜横断電位のこれらの一時的な変化は、加えられた電場に対する膜の各パッチの配向、および存在する膜横断電位に依存してそれぞれの細胞の周りで連続的に変化する。それぞれの膜パッチにおいて、膜電位は、加えられた外部電場によって静止値から乱れる。膜電位のこの変化は、次に、膜のそれぞれの局所的パッチにおける開口している電位依存性イオンチャンネルおよび閉じている電位依存性イオンチャンネルの割合に影響を及ぼし、これにより、電位依存性イオンチャンネルのコンダクタンスが影響を受け、従って、膜電位がさらに変化する。このプロセスは、任意の所与細胞において、膜の異なるパッチおよび埋め込まれた電位依存性イオンチャンネルが異なる膜電位を受けるように、それぞれの細胞の周りで異なることが予想される。一般に、膜の所与パッチにおける膜電位は、 $dV/dt = I/C_m$ (式中、 I は膜のパッチの両端における総電流の流れ($I = V/R$)である)であるようにその抵抗($1/\text{コンダクタンス}$)およ

40

50

びそのキャパシタンス (Cm) に比例する割合で変化する。

【0017】

図14は、これらの概念を例示する。簡略化のために、図14に示される細胞の形質膜は、左、上部、右および底部の4つのパッチに分けられている。電位差が加えられると、電流が電極の間に流れる。これにより、細胞の膜電位が変化する。電極1が正であり、電極2が負である場合、細胞の底部における膜パッチが過分極するが、上部パッチは脱分極する。左パッチおよび右パッチは膜電位の変化を「認識」しない。極性が逆になった場合、逆のことが生じる。

【0018】

実際には、当然のことではあるが、細胞の形質膜は、図14に示される4つのパッチの単純化された系ではなく、個々のパッチの連続体である。加えられた電圧は様々なパッチの膜電位を多くの異なる値に変化させ、その結果、埋もれた電位依存性イオンチャンネルが多くの異なる電位を「サンプルリング」し、それらの様々な立体配置状態によって駆動させられるようになる。これらには、開口した状態、閉じた状態、高親和性薬物が結合した状態、および低親和性薬物が結合した状態が含まれる。

【0019】

従って、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの活性の調節因子を同定するための方法であって、

(a) 電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞の膜の少なくとも一部分の膜横断電位を、電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって変化させること；

(b) 工程(a)における細胞を物質にさらし、電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターすること；

(c) 工程(a)および工程(b)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流を比較すること

を含み、

工程(a)および工程(b)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流の違いにより、該物質が電位依存性イオンチャンネルの調節因子であることが示される、方法を提供する。

【0020】

この方法の変形は、

(a) 電位依存性イオンチャンネルを発現する多数の細胞を対照部分と試験部分とに分けること；

(b) 電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって、対照部分の細胞の膜横断電位を変化させること；

(c) 電位依存性イオンチャンネル通過イオン流をモニターしながら、物質の存在下、細胞外の電極を介して細胞に電圧を加えることによって、試験部分の細胞の膜横断電位を変化させること；

(d) 工程(b)および工程(c)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流を比較すること

を含み、

工程(b)および工程(c)における電位依存性イオンチャンネル通過イオン流の違いにより、該物質が電位依存性イオンチャンネルの調節因子であることが示される、方法である。

【0021】

簡略化のために、上記の方法は、「1つ」の電位依存性イオンチャンネルに関して記載されている。だが、当業者は、実際の実施では、細胞が、その調節因子が探し求められる電位依存性イオンチャンネルの多数を発現することを理解する。一般に、それぞれの細胞は、少なくとも 10^2 分子、 10^3 分子、 10^4 分子、 10^5 分子、 10^6 分子またはそ

10

20

30

40

50

れ以上の電位依存性イオンチャンネルを発現する。また、イオン流は、1個の電位依存性イオンチャンネルではなく、多数の電位依存性イオンチャンネルによってモニターされる。同様に、これらの方法は、方法が「1個」の細胞に関して記載されているとしても、一般には、多数の細胞を用いることによって実施される。

【0022】

一般に、本発明の方法は、標準的なマルチウエル組織培養プレートまたはマイクロタイタープレートの改変体である基体において実施される。そのような基体は、細胞が試験される場所（一般にはマルチウエル組織培養プレートまたはマイクロタイタープレートのウエル）を有し、そして、細胞内の電位依存性イオンチャンネルの開/閉状態における変化を生じさせる電氣的電位が電極により送達され得るような、細胞に関する方位で、（プレート内または近くのいずれかに組み込まれた）正極および負極を有する。電極は細胞外である。すなわち、電極は、いくつかの実施形態では形質膜の外側に接触し得るが、細胞の形質膜の内部に、または細胞の形質膜を越えて突き抜けない。細胞外の電極には、細胞の内部との連続した接続を形成する電極（例えば、パッチ/クランプ電極）は含まれない。

10

【0023】

従って、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子を同定する方法であって、

（a）多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

（b）事前を選択された電位が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が閉じるように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

20

（c）事前を選択された電圧を、正極および負極を介して加えること；

（d）工程（c）における細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

（e）該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である場合、閉じている電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が開口し、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を可能にするような十分な期間および条件下で工程（c）の細胞を物質にさらすこと；

（f）工程（e）の細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

30

（g）対照値を試験値と比較すること

を含み、

対照値が試験値よりも小さい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である、方法を提供する。

【0024】

上記に記載された方法は、電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を同定するための方法を提供するために容易に改変することができる。電極を介して加えられる電圧は、細胞の周りの電場を変化させ、その結果として、膜横断の電氣的電位を変化させるように事前を選択される。これは、その後、電位依存性イオンチャンネルが閉じる代わりに、電位依存性イオンチャンネルが開口し得るように、埋め込まれた電位依存性イオンチャンネルの状態を変化させる。次いで、様々な物質が、チャンネルを閉じさせるか、または阻害する能力についてスクリーニングされる。

40

【0025】

従って、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を同定する方法であって、

（a）多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

（b）事前を選択された電位が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が開口するように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること

50

;

(c) 事前に選択された電圧を、正極および負極を介して加えること；

(d) 工程(c)における細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である場合、開口している電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が閉じ、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を制限するような十分な期間および条件下で工程(c)の細胞を物質にさらすこと；

(f) 工程(e)の細胞の電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること
を含み、

対照値が試験値よりも大きい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である、方法を提供する。

【0026】

活性化因子を同定するための上記に記載された方法において、用語「電位依存性イオンチャンネルの一部が閉じている」および用語「検出可能な数」は関連しており、絶対値ではなく、相対値を有する。同様に、阻害剤を同定するための上記に記載された方法において、用語「電位依存性イオンチャンネルの一部が開口している」および用語「検出可能な数」もまた関連しており、絶対値ではなく、相対値を有する。意図されることは、物質がチャンネルに対して作用したとき、十分な数のチャンネル（すなわち、「検出可能な数」）の開/閉状態における変化が生じ、その結果、用いられた検出システムによって測定されるためには十分に大きいイオン流の差が生じるように、電位依存性イオンチャンネルの一部が開口したり、または閉じたりするということである。イオン流の差が測定され得る限り、閉じているか、または開口している電位依存性イオンチャンネルの「一部」を構成するイオンチャンネルの実際の数または「検出可能な数」を測定する必要はない。方法が実施されるための、開口しているチャンネルまたは閉じているチャンネルの実際の部分、ならびに「検出可能な数」の実際の値は、研究中のチャンネル、試験される物質の濃度、イオン流に対する検出システムの性質などの変数に依存する。そのような変数を考慮に入れて、その結果、対照値および試験値を得ることができるよう、電極を介して加えられる電圧を調節することは、例えば、研究中の電位依存性イオンチャンネルの開/閉移行の知られている電圧依存性、イオン流をモニターするために用いられた検出システムの性質および感度、細胞におけるイオンチャンネルの発現レベルなどのこの分野における知識によって当業者が導かれる日常的な実験の範囲内である。

【0027】

電極は、適正な刺激を規定するために様々な方法で配置することができる。多数の配置が本明細書中に記載され、添付された図面に例示される。これらには、細胞が基体におけるウエルに存在し、そして

(a) 正極および負極の両方が各ウエルに存在する配置；

(b) 一方の電極がウエルに存在し、もう一方の電極が、ウエルの側面または底部と接触することなく、上方からウエル内の流体培地に進入する配置；

(c) 電極がウエルの側面または底部の一部を形成する配置；

(d) 互いにかみ合う電極のパターンが基体の表面に形成されており、細胞の少なくとも一部が正極および負極の互いにかみ合う支線の間配置される配置
が含まれる。

【0028】

当業者は、本明細書中に記載される様々な方法と一緒に対照を操作することが一般には有益であることを認識する。例えば、当該細胞が目的とする電位依存性イオンチャンネルを発現しないことを除いて、好ましくはこれらの方法において、使用される細胞と本質的には同一である細胞に対して物質がこれらの方法において試験される対照を有することは

、通常有用である。このようにして、これらの方法によって同定される物質が、何らかの予想されない非特異的な機構によるのではなく、目的とする電位依存性イオンチャンネルによりその作用を実際に発揮していることを決定することができる。そのような対照細胞に対する1つの可能性は、実際の実験の細胞が、目的とする電位依存性イオンチャンネルを、目的とするそのような電位依存性イオンチャンネルの組換え発現のために発現する非組換えの親細胞を使用することである。

【0029】

他のタイプの対照には、目的とする電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤として本発明の方法によって同定される物質を採用し、そして、これら物質を、先行技術の方法で試験されたとき、活性化因子および阻害剤であることを確認するための、先行技術の方法で試験することが含まれる。

10

【0030】

当業者は、本発明が、イオン流に対する対照値をイオン流に対する試験値と比較して、対照値が試験値よりも大きいか、または小さいかを決定することを含むとき、小さい差が探し求められていることを認識する。例えば、阻害剤を同定する方法において、対照値が試験値よりも1%大きいことが見出された場合、このことは、その物質が阻害剤であることを示していない。むしろ、当業者は、そのような小さい差を正常な実験的変動のためであると考え。探し求められているものは、対照値と試験値との間における有意な差である。本発明のためには、有意な差は、生物学的シグナルの統計学的に有効な測定値に対する通常条件に従う。例えば、実験構成の細部に依存して、有意な差は、少なくとも10%の差であり、好ましくは少なくとも20%の差であり、より好ましくは少なくとも50%の差であり、最も好ましくは少なくとも100%の差であり得る。

20

【0031】

当業者は、対照値をもたらす細胞が、試験値をもたらす細胞と物理的に同じである必要がないこと、だが、そうすることは可能であることを理解する。必要なことは、対照値をもたらす細胞が、試験値をもたらす細胞と実質的に同じタイプの細胞であるということである。特定の電位依存性イオンチャンネルでトランスフェクションされ、それを発現する細胞株を、対照細胞および試験細胞の両方のために使用することができる。多数のそのような細胞を増殖させることができ、そしてそのような細胞の一部を物質にさらすことができ、従って、イオン流に対する試験値をもたらす細胞として使用することができ、その一方で、一部は物質にさらされず、従って、イオン流に対する対照値をもたらす細胞として役立つ。個々の細胞それ自体が、対照細胞および試験細胞の両方ではなくとも、細胞株におけるすべての細胞が事実上同一であるということにより、この方法はそれにもかかわらず信頼できることが保証される。

30

【0032】

従って、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子を同定する方法であって

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること；

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が閉じるように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

40

(c) 細胞の対照サンプルに事前に選択された電位を正極および負極を介して加えること；

(d) 工程(c)における細胞の対照サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である場合、試験サンプルにおいて閉じている電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が開口し、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流が可能であるような十分な期間および条件下で細胞の試験サンプルを物質にさらしながら、事前に選択された電圧を、細胞

50

の試験サンプルに正極および負極を介して加えること；

(f) 工程 (e) の細胞の試験サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること
を含み、

対照値が試験値よりも小さい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの活性化因子である、方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

同様に、本発明は、電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を同定する方法であって、

(a) 多数の電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に発現する生存している真核生物細胞が存在する基体を提供すること； 10

(b) 事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電氣的電位が変化して、その結果、電位依存性イオンチャンネルの少なくとも一部が開口するように基体上または基体近くのいずれかに配置された正極および負極を提供すること；

(c) 事前に選択された電圧を、細胞の対照サンプルに正極および負極を介して加えること；

(d) 工程 (c) における細胞の対照サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する対照値を測定すること；

(e) 該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である場合、試験サンプルにおいて開口している電位依存性イオンチャンネルの一部の検出可能な数が閉じ、検出可能な数の電位依存性イオンチャンネルを通過するイオン流を制限するような十分な期間および条件下で細胞の試験サンプルを物質にさらしながら、事前に選択された電圧を、細胞の試験サンプルに正極および負極を介して加えること； 20

(f) 工程 (e) の細胞の試験サンプルの電位依存性イオンチャンネル通過イオン流に対する試験値を測定すること；

(g) 対照値を試験値と比較すること
を含み、

対照値が試験値よりも大きい場合、該物質が電位依存性イオンチャンネルの阻害剤である、方法を提供する。 30

【 0 0 3 4 】

「物質」は、薬物開発プロセス時に製薬企業において一般にスクリーニングされる任意の物質であり得る。例えば、物質は、低分子量の有機化合物（例えば、分子量が約 1 , 0 0 0 ダルトン未満である有機化合物）；RNA、DNA、抗体、ペプチドまたはタンパク質であり得る。

【 0 0 3 5 】

細胞が、本明細書中に記載される方法において物質にさらされる条件は、タンパク質 - リガンド相互作用の研究のためにこの分野で典型的に使用されている条件である：例えば、生理学的 pH；PBS のような一般的に使用されている緩衝液によって、または組織培養培地において表される塩条件；約 4 から約 5 5 の温度；数秒から数時間のインキュベーション時間。一般に、細胞は基体におけるウェルに存在し、物質は、場合によりウェル内の培地を先ず洗い流した後、ウェルに直接加えられる。 40

【 0 0 3 6 】

本発明の方法でイオン流の値を測定することは、蛍光指示薬化合物の使用によって達成され得る。蛍光指示薬化合物の 1 つのタイプは、本発明において使用される細胞における細胞内カルシウムイオンのレベルに対して感受性があるものである。このタイプの蛍光指示薬化合物は、方法がその活性が細胞内カルシウムレベルの変化を生じさせるような電位依存性イオンチャンネルに対するものであるときに、使用することができる。そのような電位依存性イオンチャンネルには、電位依存性カルシウムチャンネルだけでなく、それらのチャンネルの活性が、細胞内カルシウムレベルの変化に生来的に共役するか、または細 50

胞内カルシウムレベルの変化に共役し得る他のタイプの電位依存性イオンチャンネルも含まれる。多くのタイプの電位依存性カリウムチャンネルが上のように共役させることができる。電位依存性カルシウムチャンネルでない目的とする電位依存性イオンチャンネルを研究するためにこの方法を使用するとき、目的とする電位依存性イオンチャンネルに共役する電位依存性カルシウムチャンネルを組換え発現させるように、用いられる細胞を操作することが望ましいであろう。

【0037】

細胞内カルシウムレベルを測定するために好適な蛍光指示薬化合物には、様々なカルシウム指示薬色素（例えば、fura-2、fluo-3、indo-1、カルシウムグリーン；Velicel et al., 1999, Meth. Enzymol., 294: 20 ~ 47を参照のこと）が含まれる。 10

【0038】

カルシウム指示薬色素は、カルシウムと結合したとき、蛍光特性の変化、例えば、非常に増大した蛍光強度および/または蛍光スペクトルの変化（すなわち、放射極大または励起極大の変化）を示す物質である。fluo-3、fura-2およびindo-1が、非常に選択的なカルシウムキレーターであるエチレングリコール-ビス（-アミノエチルエーテル）-N,N,N',N'-四酢酸（EGTA）および1,2-ビス（2-アミノフェノキシ）エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）の構造的アナログとして設計された一般に使用されているカルシウム指示薬色素である。fluo-3から得られる蛍光強度は、カルシウムが結合したとき、100倍以上増大する。非結合の色素はほとんど蛍光を示さないが、カルシウムと結合したfluo-3は526 nmにおける強い蛍光放射を示す。fura-2は、カルシウムが結合したとき、その蛍光スペクトルの変化を示す色素の例である。非結合の状態では、fura-2は362 nmの励起極大を有する。この励起極大は、カルシウムが結合したとき、335 nmに変化する。だが、放射極大は全く変化しない。カルシウムのfura-2に対する結合を、この2つの励起極大における励起、そして335 nmにおける励起後の蛍光放射量と比較して、362 nmにおける励起後の蛍光放射量の比率を求めることによってモニターすることができる。低下した比率（すなわち、362 nmにおける励起後の放射が小さくなること）により、より多くのfura-2がカルシウムに結合していることが示され、従って、細胞におけるより大きい内部カルシウム濃度が示される。 20 30

【0039】

カルシウム指示薬色素の使用には、細胞に色素を負荷すること、すなわち、細胞を色素の膜透過性アセトキシメチルエステルにさらすことによって達成することができるプロセスを伴い得る。細胞の形質膜の内部に入ると、細胞内エステラーゼにより、上のエステルが切断され、遊離色素中の負荷電が露出する。これにより、遊離色素が形質膜を横断することが妨げられ、従って、遊離色素が細胞内に留められる。次いで、色素からの蛍光の測定が行われる。すなわち、（例えば、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤に細胞をさらすことによって）内部カルシウム濃度が変化するような方法で細胞が処理され、蛍光測定が再び行われる。

【0040】

指示薬色素からの蛍光は、ルミノメーターまたは蛍光画像化装置を用いて測定することができる。1つの好ましい検出装置が蛍光測定画像化プレート読み取り装置（FLIPR）（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）である。FLIPRは、マイクロタイプレート（96ウェルまたは384ウェル）において同時にピペット操作することが可能な一体化された液体取扱いと、電荷結合デバイスによる画像化カメラに結合されたアルゴンレーザーを使用する迅速な速度論的検出とを含むので、本発明の方法を使用する高処理能スクリーニングには十分に適する。 40

【0041】

カルシウム指示薬色素を使用するための典型的なプロトコルでは、目的とする電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞を適切な基体（例えば、正極および負極の好適な配置 50

を有する透明なかつ平底の黒色壁96ウエルプレート)に入れて、細胞を標準的な組織培養条件(例えば、5%CO₂、37℃)で一晩増殖させることを伴う。細胞は、一般には、適切な増殖培地において約10,000細胞/ウエルから100,000細胞/ウエルの密度で置床される。アッセイ当日に、増殖培地が除かれ、色素負荷培地がウエルに加えられる。

【0042】

例えば、カルシウム指示薬色素がfluo-3である場合、色素負荷培地は、50µgのfluo-3-AMエステル(Molecular Probes F-1242)を22µlのDMSOに可溶化して、2mMの色素ストック液を得ることによって調製することができる。細胞への負荷の直前に、22µlの20%プルロニック酸(Molecular Probes P-3000)が色素に加えられる。色素を含有するチューブがボルテックスミキサーで混合され、42mlの色素/プルロニック酸溶液が、20mMのHEPES(Gibco/BRLカタログ番号1560-080)、2.5mMのプロベネシド(Sigmaカタログ番号P-8761)および1%ウシ胎児血清(Gibco/BRLカタログ番号26140-087;BSAではない)を含む10.5mlのハンクス平衡塩溶液(Gibco/BRLカタログ番号14025-076)に加えられる。色素および負荷培地は、繰り返し反転することによって混合される(最終的な色素濃度は約4µMである)。

10

【0043】

増殖培地は、洗浄(洗浄培地は、20mMのHEPES(Gibco/BRLカタログ番号1560-080)、2.5mMのプロベネシド(Sigmaカタログ番号P-8761)および0.1%ウシ血清アルブミン(Sigmaカタログ番号A-9647;FBSではない)を含むハンクス平衡塩溶液(Gibco/BRLカタログ番号14025-076)である)を3回行い、4回目の洗浄の後、ウエルに100µlの残留培地を残すことによって細胞から除くことができる。その後、負荷培地における100µlの色素が各ウエルに加えられる。その後、細胞は、色素の負荷を行わせるために60分間インキュベーションされる。

20

【0044】

色素を負荷した後、細胞の蛍光測定が、試験される物質に細胞がさらされる前に測定される。その後、細胞は物質にさらされ、色素の蛍光特性の変化を生じさせるような物質が同定される。測定装置は、FLIPR(Molecular Devices)などの蛍光プレート読み取り装置であり得る。対照細胞ではなく、試験細胞において蛍光特性の変化を生じさせる物質が、電位依存性イオンチャンネルの考えられる活性化因子または阻害剤である。

30

【0045】

上記に概略された手順の正確な詳細は例示であることが意図される。当業者は、特定の関連する実験変数(例えば、使用される細胞タイプ、使用された色素の本質)に依存して日常的な実験によって様々な実験パラメーター(細胞数、色素濃度、色素負荷時間、インキュベーション温度、細胞洗浄条件、浴溶液のイオン組成、および装置設定など)を最適化することができる。使用され得る実験プロトコルのいくつかの例が、Velicellebira、1999、Meth. Enzymol.、294:20~47に記載される。光学的方法により膜横断電位の変化を測定するための他の好適な装置計測および方法には、顕微鏡、マルチウエルプレート読み取り装置、および迅速かつ高感度な蛍光検出が可能である他の装置計測が含まれる。例えば、VIPR(Aurora Biosciences、San Diego、CA)は、96ウエルおよびより大規模なマルチウエルプレートに対する一体化された液体操作装置および速度論的蛍光読み取り装置である。VIPR読み取り装置には、8チャンネルの液体操作装置、マルチウエル配置ステージ、ならびに光ファイバー照明および検出システムが一体化されている。このシステムは、別のマイクロタイタープレートまたはトラフから得られる液体サンプルの導入前、導入時および導入後、8ウエルの縦列からの蛍光を同時に測定するように設計されている。VIPR読み取

40

50

り装置は励起させ、そして、8個の三叉光学束（各ウエルに対して1つの束）を用いることによってマルチウエルの底部から放射シグナルを検出する。三叉ファイバーの1つの脚部が励起源として使用され、三叉ファイバーのそれ以外の2つの脚部が、蛍光放射を検出するために使用される。ファイバーの端部に位置する球レンズは、光の励起効率および収集効率を増大させる。二叉放射ファイバーは、読み取り装置が2つの放射シグナルを同時に検出することを可能にし、FRET型電圧色素によって生じる迅速なシグナルとの適合性がある。

【0046】

その場合、光電子増倍管により、放射蛍光が検出され、サブ秒の放射比検出が可能になる。

10

【0047】

いくつかの実施形態において、カルシウム指示薬色素は、fluo-3、fura-2、fluo-4、fluo-5、カルシウムグリーン-1、オレゴングリーン、488BAPTA、SNARF-1およびindo-1からなる群から選択される。

【0048】

いくつかの実施形態において、蛍光特性の変化は蛍光放出極大の強度の増大である。他の実施形態において、蛍光特性の変化は吸収極大の波長の変化である。

【0049】

いくつかの実施形態において、細胞は、目的とする電位依存性イオンチャンネルおよび/またはカルシウムチャンネルを生来的に発現する。他の実施形態において、細胞は、目的とする電位依存性イオンチャンネルおよび/またはカルシウムチャンネルを生来的に発現しないが、代わりに、目的とする電位依存性イオンチャンネルおよび/またはカルシウムチャンネルをコードする発現ベクターでトランスフェクションされており、その結果、細胞は、目的とする電位依存性イオンチャンネルおよび/またはカルシウムチャンネルを組換え発現する。トランスフェクションは、発現ベクターを細胞に導入するためにこの分野で知られている任意の方法を含むことが意図される。例えば、トランスフェクションには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムにより媒介されるトランスフェクション、リポフェクション、レトロウイルス構築物を用いた感染、およびエレクトロポレーションが含まれる。

20

【0050】

カルシウム指示薬色素の使用に対する代替法には、エクオリンシステムの使用がある。エクオリンシステムでは、タンパク質アポエクオリンが使用され、この場合、アポエクオリンが、アポエクオリンと、エクオリンとして知られているセレンテラジンとの組合せ体を形成する親油性の発色団セレンテラジンに結合する。エクオリンは3つのカルシウム結合部位を有しており、カルシウムが結合したとき、エクオリンのアポエクオリン部分はその立体配置を変化させる。立体配置のこの変化により、セレンテラジンは、セレンテラミド、CO₂ および青色光（466nm）の光子に酸化される。この光子を、好適な装置計測を用いて検出することができる。

30

【0051】

アポエクオリンをコードする遺伝子はクローン化されている（米国特許第5,541,309号；米国特許第5,422,266号；米国特許第5,744,579号；Inouyeら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3154~3158；Prasherら、1985、Biochem. Biophys. Res. Comm.、126:1259~1268）ので、アポエクオリンを、細胞内カルシウム濃度を測定することが所望される細胞において組換え発現することができる。あるいは、組換えアポエクオリンを安定に発現する既存の細胞を使用することができる。HEK293細胞およびCHO-K1細胞に由来するそのような細胞が、Button & Brownstein、1993、Cell Calcium、14:663~671に記載されている。例えば、HEK293/a eq 17細胞株を下記のように使用することができる。

40

【0052】

50

HEK293/aeg17細胞が、10%ウシ胎児血清(熱不活性化)、1mMピルビン酸ナトリウム、500 μ g/mlのジェネティシン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、100ユニット/mlのペニシリンを含むダルベッコ改変培地(DMEM、GIBCO-BRL、Gaithersburg、MD、米国)において増殖させられる。目的とする電位依存性イオンチャンネル、ならびに必要な場合には、所望する電位依存性カルシウムチャンネルサブユニット(1A、1B、1C、1D、1E、1G、1H、1I、2、1、2、3、4など)をコードする発現ベクターを、所望する電位依存性イオンチャンネルサブユニットおよび電位依存性カルシウムチャンネルサブユニットをHEK293/aeg17細胞において発現させるために、標準的な方法によってHEK293/aeg17細胞にトランスフェクションすることができる。細胞はDMEM+0.1%ウシ胎児血清で1回洗浄され、その後、8 μ Mのセレンテラジンcp(Molecular Probes、Eugene、OR、米国)および30 μ Mのグルタチオンを含有するDMEMに37/5%CO₂において1時間入れられる。その後、細胞はVersene(GIBCO-BRL、Gaithersburg、MD、米国)で1回洗浄され、ECB(0.3mMのCaCl₂、25mMのHEPES(pH7.3)、0.1%のウシ胎児血清を含むハムF12栄養混合物(GIBCO-BRL)に希釈された酵素非含有細胞解離緩衝液(GIBCO-BRL、Gaithersburg、MD、米国)を使用して剥離される。細胞懸濁物は500 \times gで5分間遠心分離される。上清が除かれ、ペレットが10mlのECBで再懸濁される。細胞密度が、血球計を用いて計数することによって測定され、ECBにおいて500,000細胞/mlに調節される。試験される物質は、所望する濃度にECBで希釈され、好ましくは三連で、0.1ml/ウエルでアッセイプレートに分注される。細胞懸濁物が0.1ml/ウエルで注入され、読み取りが行われ、積算が、ルミノメーター(Luminoskan Ascent、Labsystems Oy、Helsinki、フィンランド)を使用して合計で400個の読み取り値について行われる。選択的に、細胞を最初にアッセイプレートに入れることができ、その後、物質を加えることができる。データが、ソフトウェアGraphPad Prismバージョン3.0(GraphPad Software、Inc.、San Diego、CA、米国)を使用して分析される。

【0053】

上記に概略された手順は、行なわれることが望まれる特定のアッセイの具体的な細部を考慮に入れて様々な工程および変数を少し改変することができる一般的な指針であることが、当業者によって理解される。例えば、半合成されたセレンテラジンを使用することができる(Shimomura、1989、Biochem. J.、261:913~920; Shimomuraら、1993、Cell Calcium、14:373~378); セレンテラジンとの細胞のインキュベーション時間を少し変化させることができる; ウエルあたり少し大きい細胞数または少し少ない細胞数を使用することができる; その他。

【0054】

エクオリンの使用に関する総説については、Cretonら、1999、Microscopy Research and Technique、46:390~397; Briniら、1995、J. Biol. Chem.、270:9896~9903; Knight & Knight、1995、Meth. Cell. Biol.、49:201~216を参照のこと。米国特許第5,714,666号もまた注目することができ、これには、アポエクオリンを発現する哺乳動物細胞にセレンテラジン補因子を加えることによって哺乳動物細胞における細胞内カルシウムを測定する方法が記載されている。

【0055】

イオン流を測定するための別の方法は、電位依存性イオンチャンネルの活性から生じる転写の変化を転写型アッセイによってモニターすることである。転写型アッセイでは、電位依存性イオンチャンネルの活性によって引き起こされる特定の細胞内事象(例えば、細胞内カルシウムレベルの変化)によってその活性が調節される誘導性プロモーターにより

その転写が駆動されるレポーター遺伝子の使用を含む。様々な転写型アッセイが、Ruttenら、1998、Chemistry & Biology、5：R285～R290に総説されている。本発明の転写型アッセイは、活性化因子または阻害剤が電位依存性イオンチャンネルと相互作用することによって引き起こされる細胞内事象の結果としてその転写が活性化または抑制されるレポーター遺伝子の発現に依存する。

【0056】

極めて高感度な転写型アッセイが、Zlokarnikら、1998、Science、279：84～88（Zlokarnik）に、そしてまた米国特許第5,741,657号に開示されている。Zlokarnikおよび米国特許第5,741,657号に開示されているアッセイでは、誘導性プロモーターの制御下に -ラクタマーゼをコードするプラスミドが用いられる。このプラスミドは、そのアゴニストを同定することが望まれる受容体をコードするプラスミドと一緒に細胞内にトランスフェクションされる。 -ラクタマーゼにおける誘導性プロモーターは、アゴニストが受容体に結合したときに生じる少なくとも1つの細胞内シグナルにプロモーターが応答するように選ばれる。従って、受容体に対するアゴニストの結合の後、トランスフェクションされた細胞における -ラクタマーゼのレベルが増大する。 -ラクタマーゼのこの増大が、 -ラクタマーゼによる切断に対する基質である細胞透過性色素で細胞を処理することによって測定される。この色素は2つの蛍光性成分を含有している。無傷の色素では、2つの蛍光性成分が物理的に連結されており、従って、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）がそれらの間で生じ得るように互いに十分に接近している。 -ラクタマーゼによって色素が2つの部分に切断された後、2つの蛍光性成分は異なる部分に存在し、従って、離れるように拡散し得る。これは、これらの蛍光性成分の間の距離を増大させ、従って、それらの間で生じ得るFRETの量を減少させる。アッセイで測定されるのは、FRETにおけるこの減少である。

【0057】

Zlokarnikおよび米国特許第5,741,657号に記載されているアッセイは、 -ラクタマーゼを駆動させる、電位依存性イオンチャンネルの開閉により生じる細胞内シグナルによってプロモーターが活性化される誘導性プロモーターを使用することによって、本発明の方法における使用のために改変することができる。電位依存性イオンチャンネルと、誘導性プロモーターにより駆動される -ラクタマーゼとを発現する細胞が、電位依存性イオンチャンネルの開口した状態または閉じた状態を制御することができる本発明の装置に入れられる。細胞は細胞透過性色素にさらされ、その後、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤であることが疑われる物質にさらされる。電位依存性イオンチャンネルの開口した状態または閉じた状態の変化を生じさせるこれら物質は、誘導性プロモーターにより駆動される -ラクタマーゼに対する影響によって、従ってFRETに対する影響によって同定される。誘導性プロモーターにより駆動される -ラクタマーゼは、アッセイの性質に依存して物質が活性化因子または阻害剤のいずれかであるときに -ラクタマーゼが誘導されるように、好適なプロモーターを用いて作成される。

【0058】

電位依存性イオンチャンネル通過イオン流はまた、蛍光性の電圧感受性色素を使用して膜電位の変化を測定することによって測定することができる。膜電位の変化は、細胞膜におけるイオンチャンネルに依存する。生じる膜電位は、チャンネルすべての正味の性質、および目的とする電位依存性イオンチャンネルを（阻害剤もしくはアンタゴニストである物質により）阻害することによって、または目的とする電位依存性イオンチャンネルを（活性化因子もしくはアゴニストである物質により）活性化することによって生じる変化に依存する。細胞および膜の生物物理学および電気生理学における1つの知見により、膜電位の変化の方向が理解される。そのような変化は、存在するイオンチャンネルに、および試験物質によるこれらチャンネルの阻害または活性化に依存するからである。蛍光性の電圧感受性色素が使用される多くの場合において、実験システムは、目的とするイオンチャンネルの知られている活性化因子または阻害剤を使用することによって較正することができ

る。

【0059】

従って、本発明には、第1の蛍光色素と第2の蛍光色素との間におけるFRETに基づく、電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤により引き起こされるイオン流の変化をモニターするアッセイが含まれる。この場合、第1の色素が、目的とする電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞の形質膜の一方の側に結合し、第2の色素が、膜電位の変化に応答して、膜の一方の面から反対側の面に自由に移動する。いくつかの実施形態において、第1の色素は細胞の形質膜を突き抜けることができず、形質膜の細胞外表面に主に結合している。第2の色素は形質膜内に捕捉されるが、膜内を自由に拡散する。膜の正常（すなわち、負）の静止電位の際、第2の色素は形質膜の細胞外面の内側表面に主に結合しており、従って、第2の色素は第1の色素の非常に近いところに位置する。このように非常に近いことは、2つの色素の間における大きいFRET量の生成を可能にする。膜が脱分極した後、第2の色素は膜の細胞外面から細胞内面に移動し、従って、色素間の距離が増大する。この増大した距離はFRETの減少をもたらし、このため、第1の色素に由来する蛍光放射がそれに従って増大し、第2の色素に由来する蛍光放射がそれに従って減少する。Gonzalez & Tsien、1997、Chemistry & Biology、4：269～277の図1を参照のこと。また、Gonzalez & Tsien、1995、Biophys. J.、69：1272～1280；および米国特許第5,661,035号も参照のこと。

10

【0060】

いくつかの実施形態において、第1の色素は、蛍光ドナーとして作用する蛍光性のレクチンまたは蛍光性のリン脂質である。そのような第1の色素の例には、クマリンで標識されたホスファチジルエタノールアミン（例えば、N-（6-クロロ-7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボキサミドアセチル）-ジミリストイルホスファチジルエタノールアミンまたはN-（7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾル-4-イル）-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン）；蛍光標識されたレクチン（例えば、フルオレセインで標識されたコムギ胚芽アグルチニン）がある。いくつかの実施形態において、第2の色素は、蛍光アクセプターとして作用するオキソノールである。そのような第2の色素の例には、ビス（1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート）トリメチンオキソノール（例えば、ビス（1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート）トリメチンオキソノール）またはペンタメチンオキソノールアナログ（例えば、ビス（1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート）ペンタメチンオキソノール；もしくはビス（1,3-ジブチル-2-チオバルビツラート）ペンタメチンオキソノール）がある。本発明における使用のために好適な様々な色素を合成する方法については、Gonzalez & Tsien、1997、Chemistry & Biology、4：269～277を参照のこと。いくつかの実施形態において、アッセイは、一重状態酸素による光学的損傷を減少させるために、天然カロテノイド（例えば、アスタキサンチン）を含むことができる。

20

30

【0061】

形質膜の一方の面から反対側の面に移動することができるそのような蛍光色素の使用は、本発明の方法が、内向き整流カリウムチャンネルに対するものであるときには特に適している。内向き整流カリウムチャンネルの活性化は、形質膜を横断する増大したカリウム電流の流れをもたらす。この増大した電流の流れは細胞膜の過分極をもたらすが、そのような過分極は、より大きいFRETをもたらすので、上記に記載される技術の使用によって検出することができる。

40

【0062】

様々なタイプの基体および電極の、非常に多くの可能な組合せ；電極の物理的配置；細胞を保持するためのウエルの数および形状および配置が、本発明における使用のために好適である。

【0063】

50

図1には、電極が、金などの導電性材料の一般に平行したワイヤまたは細片である本発明の実施形態が例示される。電極はガラス基体の表面に存在し、スパーサーと一緒にあって、ウエルの壁を形成する。分かりやすくするために、ウエルの一列のみが図1には示される。一般に、ガラス基体の実質的に表面全体が、示された様式で形成されたウエルによって覆われる。細胞がウエルに入れられ、そして適切な数の細胞がウエルに存在するまで、好適な培地において増殖させられる。あるいは、適切な数の細胞をウエルに入れて、さらに増殖させることなく使用することができる。

【0064】

図2Bには、ウエルが、典型的なマルチウエル組織培養プレートの場合のような基体の表面におけるへこみまたはくぼみである本発明の実施形態が例示される。各ウエルは、ウエルの底部における1つの電極と、ウエルの側面に沿って配置されたもう1つの電極とを有する。細胞が、図2Bではウエルの底部に付着しているとして示されているが、いくつかの実施形態では、細胞は、ウエル内の流体に分散された懸濁細胞であってもよい。

10

【0065】

図2Cには、図2Cでは、両方の電極がウエルの底部に存在することを除いて、図2Bに示される実施形態と類似する本発明の実施形態が例示される。

【0066】

図3には、交互にかみ合う透明な電極のアレイがガラス基体の表面に化学的にエッチングされている本発明の実施形態が例示される。正極および負極の櫛状体を構成する電極アレイが、インジウムスズ酸化物(ITO)被覆のガラスプレートに化学的にエッチングされている。ITOの薄い層(約200から2,000または500から1,500、好ましくは1,200の厚さ)により、ガラスプレートの表面における透明な導電性被覆が形成される。必須ではないが、ITO層は、透明であるために十分に薄いことが好ましい。化学的エッチングプロセスにより、選択された領域からITOが除かれ、ガラスプレートに結合した透明なITO電極のアレイが得られる。多数の反応ウエルを、異なる電極アレイ部位に流体保持ウエルを形成することによって1枚のガラスプレートに含有させることができる。ウエルは、ウエルフレームをガラスプレートに取り付けること(例えば、接着すること)によって、または疎水性インクによりプレート上を覆うことなどの方法によりガラスプレートに実質上のウエルを形成することによって形成させることができる。

20

30

【0067】

図4Aおよび図4Bには、ウエルが、ウエルフレームを基体に取り付けることによって形成される実施形態が例示される。

【0068】

図6には、電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞を含有する液体液滴が2つのプレートの間に挟まれる実施形態が例示される。ガラスプレートであり得るプレートはそれぞれが、インジウムスズ酸化物(ITO)などの導電性材料の薄い層でコーティングされる。導電性材料の層は、一方の層が正極として機能し、もう一方の層が負極として機能するようにパルス発生器に接続される。

【0069】

図7および図8には、電極の一方が上方からウエルに進入する実施形態が例示される。図9および図10では、両方の電極が上方から進入する。

40

【0070】

本発明において使用される基体は実質上のウエルを含有することができる。実質上のウエルは、表面が、比較的疎水性の場の内部に比較的親水性のドメインを有するようにパターン化されたときに形成され、その結果、水性サンプルが、より疎水性の場の端により、より親水性のドメインに対する表面張力によって物理的に拘束される。親水性のドメインは、従来のマイクロタイタープレートのウエルに類似するパターンを形成する小さい円形であり得る。実質上のウエルは、従来のマイクロタイタープレートに見出される深いくぼみを伴うことなくサンプルを閉じ込めることができる位置を提供する。図5には、実質上

50

のウエルが形成され、かつ交互にかみ合う電極のパターンもまた形成されている修飾されたガラス表面である、本発明において使用される表面が例示される。図3には、この表面からの個々のウエルが示されている。国際特許出願公開W O 9 9 / 3 9 8 2 9 には、実質上のウエルおよびそれらの作製方法が記載されている。

【0071】

「交互にかみ合う」は、正極および負極が、1つの直線が正極の1つの支線からその正極の隣の支線にまで引かれた場合、この直線が負極の支線と交差するように配置されている支線を含むような、正極および負極の配置を示す。同様に、1つの直線が負極の1つの支線からその負極の隣の支線にまで引かれた場合、直線は正極の支線と交差する。一般に、交互にかみ合うそれぞれの正極または負極は、少なくとも2つ、または少なくとも4つ、または少なくとも10、または少なくとも20の交互にかみ合う支線を有する。交互にかみ合う電極の一例が図3に示される。

10

【0072】

ガラス基体上の導電性材料から形成される電極の様々なさらなる配置が可能である。1つの配置は、2つの平行したガラス基体の表面に形成された正極および負極を有する。例えば、1枚のガラス基体に正極および負極を有する代わりに、2つのITO被覆ガラス基体を、ガラス基体を互いに平行して置き、細胞を含む生物学的流体をガラス基体間の隙間に置くことによって利用することができる。この配置では、一方の導電性ガラス基体が正極として役立ち、その一方で、第2のガラス基体が負極として役立つ。電極場が、プレートの表面に対して直角に形成される。この配置により、細胞を含む流体をプレート間に分配させるか、または毛管作用によって隙間に引き込むことのいずれかが可能になる。検出器の光ビームがガラス基体に対して直角に進入し、ガラス基体間の隙間に入り、流体および細胞を照らす。細胞からの蛍光送出が、類似する様式で検出器によって集められる。図6には、この配置の1つの形式が例示される。別の形式が、多数の実質上のウエルをそれぞれが含む2つのITO被覆プレートを含む実施形態が示されている図13に示される。ITOは、電極だけでなく、ウエルの底部を形成する。

20

【0073】

別の配置は、1枚のガラス基体によって形成される正極および負極と、参照電極とを有する。この配置では、一方の電極としてITOなどの導電性材料でコーティングされた1枚のガラス基体を利用される。生物学的流体および細胞を保持するウエルが、ガラス基体をコーティングする導電性材料の表面に形成される。ウエル内に設置されたワイヤまたは類似する導電性部材が第2の電極として役立つ。図7には、この配置の形式の1個のウエルが例示される。図12には、マルチウエル形式で通常実施されるようなこのタイプの配置が示される。図15には、一方の電極が、ITO層と接触している高導電性の金属グリッドであるこの配置の改変が示される。

30

【0074】

別の配置は、隣接ウエルに設置された正極と負極との対によってもたらされた電流に対する導電体として作用する1枚の導電性ガラス基体を有する。図16Aから図16Dを参照のこと。この配置では、接地グリッドが使用されない。電流は、第1のウエルにおける第1の電極から、第1のウエルのITO底部を通過して、隣接する第2のウエルのITO底部に、および第2のウエルにおける第2の電極を通過して、流れる。隣接する電極は交互に正極および負極である。図16Aおよび図16Cを参照のこと。

40

【0075】

交互にかみ合う電極を使用するいくつかの実施形態において、電極の支線の間隔および幅は、個々の細胞のサイズと同じ程度の大きさである。細胞は、細胞が1対の正極支線と負極支線との間に付着する場合、より低い加えられた刺激パルスが利用できるような様式で、増殖させ、基体に付着させることができる。この近い電極間隔の利点は、流体培地を通る刺激電流パルスのより少ない分流および流体のより少ない発熱が、細胞を刺激している間において生じるということである。透明な交互にかみ合う電極の使用は、蛍光放射光源からの光を、好ましくはガラス基体および透明な電極を通過して、細胞に伝えるという利

50

点、そして光検出器に戻る蛍光シグナルの光通過を提供する。電極をインジウムスズ酸化物（ITO）などの透明な材料から作製することは、いくつかの実施形態では様々な利点を有しているが、電極はまた、白金、銀または金などの、透明でない導電性材料から作製することができる。電極材料が透明でない場合、光が電極間のガラスを通過することができるので、蛍光測定は依然として可能である。

【0076】

電極の配置とは関係なく、刺激パルスがパルス発生器によって作製され、単ウエル電極アレイまたは多ウエル電極アレイのいずれかに加えられる。波形発生および振幅調節を可能にする様々な市販のパルス発生器を利用することができる。定電圧または定電流の波形を電極に加えることができる。本発明において使用され得る市販の電源装置には、STG 1004もしくはSTG 1008の刺激発生器、またはNational InstrumentsのPCI 6713の8チャンネルpcbが含まれる。

10

【0077】

細胞を刺激するためにパルス発生器を使用する際には、使用される振幅およびパルス幅および極性には特に注意を払わなければならない。いくつかの極端な電場強度の場合、生物学的膜のエレクトロポレーションが生じることがあり、これは避けなければならない。外部電場を変化させるとき、所望する目標は、膜横断電場（Vm）の変化をおよそ±100mV未満にすることである。そのため、細胞膜のキャパシタンスに加えられるか、または細胞膜のキャパシタンスから除かれる電荷の量が重要である。パルスの振幅および持続時間を調節することが、細胞のエレクトロポレーションを伴わないVmの変化を保証するために必要である。典型的には、電極間の電圧変化は±10ボルト程度であり得るが、好ましくは±5ボルト未満であり、可能な場合には±1ボルト未満である。これらの値は、細胞膜のエレクトロポレーションを伴わない細胞の膜電位変化を最適化するために、日常的な実験によって経験的に調節することができる。一般に、細胞膜における電荷変化の量は、電気的電流に依存する局所的な電場変化に依存する。外部電場の変化によって決定されるような印加電流の面積（電流・時間の積分）を調節することは、経験的に容易に最適化することができる。一般に、目標が、細胞の活動電位を刺激することである場合、パルスの持続時間は短時間に保たれ、振幅が、活動電位生成のための閾値を超える点にまで増大される。これは、細胞で発現するイオンチャンネルの相対的なレベルによって影響を受け、それに従って変化し、そのため、経験的な調節を必要とする。典型的な値は1ミリ秒のパルス持続時間および5ボルトのパルス振幅であり得る。しかしながら、これは、例えば、持続時間を2ミリ秒に増大させ、振幅を2.5ボルトに低下させるために、または持続時間を減少させ、振幅を増大させるために変化させることができる。一般に、加えられたパルスの持続時間と振幅との間には、印加電流・時間積分の面積が一定のままである逆放物線関係が存在する。イオンチャンネルの速度論および活動電位は迅速かつ短時間であり得るので、パルスの持続時間を最小限にすることが有用である。これらのパラメータはまた、製造された電極、そのキャパシタンスおよび抵抗、細胞に対する幾何学的関係、使用される溶液のイオン強度および組成、ならびに細胞に対する電気的結合に依存する。これらの多くの変数のために、上記の指針に基づく経験的な取扱いが最良である。

20

30

【0078】

電極配置は、12ウエル、24ウエル、96ウエル、384ウエル、1,536ウエル、3,456ウエルおよび他のプレート形式に適合化させることができ、これにより、本発明を高処理能スクリーニング適用において使用することが可能になる。

40

【0079】

多数のウエルが基体に存在し、各ウエルが、それと結合した電極を有する図12に例示される実施形態などの本発明の実施形態において、電極を介してそれぞれのウエルに送達される刺激は、パルス発生器を調節する好適なソフトウェアを適用することによって個々に制御することができる。そのようなソフトウェアは、この分野では広く知られているか、または当業者によって容易に設計することができる。

【0080】

50

本発明のいくつかの実施形態では、基体が、高処理能スクリーニングのために使用される典型的なマルチウエル組織培養プレート（例えば、96ウエルプレート）と同じ形態因子を有するように、基体における電極およびウエルの配置が用いられる。基体におけるウエルの間隔は、基体におけるウエルの中心間距離が、高処理能スクリーニングのために使用される典型的な96ウエルプレートにおけるウエル間の典型的な中心間距離と同じであるようにすることができる。これにより、プレート取扱い装置、検出器、自動分注器などの、高処理能スクリーニングにおいて使用される現在の装置と一緒に本発明の使用が容易になる。基体は、本明細書中に開示される電極の様々な形状の少なくとも1つに従ってプレートに電極を加えることにより、マルチウエル組織培養プレートを作製するために一般に使用されている広く知られている製造プロセスを改変することによって製造することができる。

10

【0081】

本発明のいくつかの実施形態において、基体はケイ素または電界効果トランジスタではない。

【0082】

本発明のいくつかの実施形態において、電位依存性イオンチャンネルをコードするDNAを含む発現ベクターでトランスフェクションされている細胞が利用される。好ましくは、細胞は、対応する電位依存性イオンチャンネルを生来的に発現しない。例えば、発現ベクターにより、電位依存性カルシウムチャンネルの発現が行われる場合、細胞は電位依存性カルシウムチャンネルを生来的に発現しない。あるいは、細胞が、対応する電位依存性イオンチャンネルを生体的に発現する場合、それらの対応する電位依存性イオンチャンネルは、トランスフェクションされている電位依存性イオンチャンネルから、何らかの様式で、例えば、適切な阻害剤の使用によって、膜電位の操作によって区別することができる。本発明において使用される好ましい細胞株には、HEK293細胞株(ATCC1573)がある。これは、この細胞が、膜電位の脱分極を生じさせるチャンネル（例えば、ナトリウムチャンネルまたはカルシウムチャンネル）を用いた電場刺激実験のために有益であり得る内因性のカリウムチャンネルを生来的に発現するからである。

20

【0083】

細胞は、一般には真核生物細胞であり、好ましくは哺乳動物細胞である。細胞は、基体上で適切な数に増殖させることができ、または基体に置き、さらに増殖させることなく使用することができる。細胞を基体に付着させることができ、または、細胞がウエルに入れられるか、もしくはウエル内で増殖されるそのような実施形態では、細胞は、ウエル内の流体に懸濁されている懸濁細胞であり得る。一次細胞または樹立された細胞株を使用することができる。

30

【0084】

電位依存性イオンチャンネルの発現を行わせる発現ベクターを用いたトランスフェクションのための好適な細胞には、ヒト起源、ウシ起源、ブタ起源、サル起源および齧歯類起源の細胞株が含まれるが、これらに限定されない。細胞は接着性または非接着性であり得る。好適であり、かつ広範囲に入手可能である細胞および細胞株には、L細胞L-M(TK⁻)(ATCC CCL1.3)、L細胞L-M(ATCC CCL1.2)、HEK293(ATCC CRL1573)、Raji(ATCC CCL86)、CV-1(ATCC CCL70)、COS-1(ATCC CRL1650)、COS-7(ATCC CRL1651)、CHO-K1(ATCC CCL61)、3T3(ATCC CCL92)、NIH/3T3(ATCC CRL1658)、HeLa(ATCC CCL2)、C127I(ATCC CRL1616)、BS-C-1(ATCC CCL26)、MRC-5(ATCC CCL171)、CPAE(ATCC CCL209)、Saos-2(ATCC HTB-85)、ARPE-19ヒト網膜色素上皮(ATCC CRL-2302)、GH3細胞および初代心筋細胞が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0085】

50

様々な電位依存性イオンチャンネルを本発明において使用することができる。例えば、電位依存性ナトリウムチャンネル、電位依存性カリウムチャンネルおよび電位依存性カルシウムチャンネルが好適である。

【0086】

本発明のいくつかの実施形態において、使用される細胞は、目的とする電位依存性イオンチャンネルを生来的に発現しない。代わりに、電位依存性イオンチャンネルをコードするDNAが、電位依存性イオンチャンネルを細胞の形質膜に発現させるために、細胞にトランスフェクションされる。電位依存性イオンチャンネルをコードするDNAは、この分野で広く知られている方法によって得ることができる。例えば、電位依存性イオンチャンネルをコードするcDNAフラグメントを、好適なプライマー対を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用することによって好適なcDNAライブラリーから単離することができる。電位依存性イオンチャンネルをコードするcDNAフラグメントは、その後、好適な発現ベクターにクローン化することができる。プライマー対は、得ることが所望される電位依存性イオンチャンネルの知られているDNA配列に基づいて選択することができる。好適なcDNAライブラリーを、電位依存性イオンチャンネルをコードするmRNAを含有することが知られている細胞源または組織源から作製することができる。

10

【0087】

当業者は、いくつかの電位依存性イオンチャンネルについて、機能的な電位依存性イオンチャンネルを得るために、2つ以上のサブユニットをトランスフェクションし、それにより、2つ以上のサブユニットを発現させることが望ましいことを知っている。例えば、N型カルシウムチャンネルは、1Bサブユニット、2サブユニットおよび1サブユニットを少なくとも含有する多サブユニット複合体から構成される。他方で、T型カルシウムチャンネルは、1個のサブユニット(例えば、1G、1Hまたは1I)だけで機能的である。目的とする電位依存性イオンチャンネルのサブユニット組成のこの分野での共通する知識により、当業者は、トランスフェクションされた細胞において正しいサブユニットを発現させることができる。

20

【0088】

当業者は、電位依存性イオンチャンネルをコードするDNAを得るために、発表された電位依存性イオンチャンネルの配列を使用して、PCRプライマーを設計することができ、そして電位依存性イオンチャンネルの発現の発表された研究を使用して、cDNAライブラリーを作製するための適切な供給源を選択することができる。下記の刊行物は、これに関して有用であり得る：

30

米国特許第5,380,836号には、ラット心臓の電位依存性ナトリウムチャンネルをコードする核酸配列が記載されている。

【0089】

米国特許第6,030,810号には、多数の電位依存性かつテトロドトキシン感受性のナトリウムチャンネルが記載されている。

【0090】

米国特許第6,184,349号B1には、PN3として知られている、ヒトのテトロドトキシン抵抗性の末梢神経電位依存性ナトリウムチャンネルが開示されている。GenBankアクセション番号AF117907もまた参照のこと。

40

【0091】

Isomら、1994、Neuron、12:1183~1194には、ラットの電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニットが開示されている。

【0092】

MacLatcheyら、1993、Hum.Molec.Gen.、2:745~749には、ヒトの電位依存性ナトリウムチャンネル1サブユニット(hSCN1)が開示されている。

【0093】

Isomら、Science、1992、256:839~842には、ラット脳の電

50

位依存性ナトリウムチャンネル 1サブユニット (r S C N 1) が開示されている。

【 0 0 9 4 】

Misgeldら、1995、Prog. Neurobiol.、46:423~462; North、1989、Br. J. Pharmacol.、98:13~23; Gahwilerら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:1558~1562; Andradeら、1986、Science、234:1261~1265には、本発明の方法における使用のために好適である内向き整流性の電位依存性カリウムチャンネルが開示されている。

【 0 0 9 5 】

米国特許第5,874,236号および米国特許第5,429,921号には、ヒト電位依存性カルシウムチャンネルの様々な 1サブユニットおよび サブユニットが記載されている。 10

【 0 0 9 6 】

米国特許第5,407,820号および米国特許第5,710,250号には、ヒト電位依存性カルシウムチャンネルの 2サブユニットが開示されている。

【 0 0 9 7 】

国際特許出願公開WO98/13490には、家族性片麻痺性片頭痛に關与する脳特異的なP/Q型ヒト電位依存性カルシウムチャンネルが記載されている。

【 0 0 9 8 】

表1には、本発明における使用のために好適であるイオンチャンネル遺伝子の一覧が示される。 20

【 0 0 9 9 】

【表 1】

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
SCN1	シンボル省略、SCN1A を参照のこと			
SCN1A	ナトリウムチャネル、電位依存性、I 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q24	182389	8062593
SCN1B	ナトリウムチャネル、電位依存性、I 型、 β ホリハ ^o フ ^o ト ^o	19	600235	8394762
SCN2A1	ナトリウムチャネル、電位依存性、II 型、 $\alpha 1$ ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q22-q23	182390	1317301
SCN2A2	ナトリウムチャネル、電位依存性、II 型、 $\alpha 2$ ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q23-q24	601219	1317301
SCN2A	シンボル省略、SCN2A1 を参照のこと	-		
SCN2B	ナトリウムチャネル、電位依存性、II 型、 β ホリハ ^o フ ^o ト ^o	11q22-qter	601327	10198179
SCN3A	ナトリウムチャネル、電位依存性、III 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q24	182391	9589372
SCN4A	ナトリウムチャネル、電位依存性、IV 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	17q23-q25.3	603967	1654742
SCN4B	ナトリウムチャネル、電位依存性、IV 型、 β ホリハ ^o フ ^o ト ^o	留保		
SCN5A	ナトリウムチャネル、電位依存性、V 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o (長い(心電計)QT 症候群 3)	3p21	600163	
SCN6A	ナトリウムチャネル、電位依存性、VI 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q21-q23	182392	10198179
SCN7A	シンボル省略、SCN6A を参照のこと	-		
SCN8A	ナトリウムチャネル、電位依存性、VIII 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	12q13.1	600702	7670495
SCN9A	ナトリウムチャネル、電位依存性、IX 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	2q24	603415	7720699

10

20

30

40

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
SCN10A	ナトリウムチャネル、電位依存性、X 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	3p21-p22	604427	9839820
SCN11A	ナトリウムチャネル、電位依存性、XI 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	3p21-p24	604385	10444332
SCN12A	ナトリウムチャネル、電位依存性、XII 型、 α ホリハ ^o フ ^o ト ^o	3p23-p21.3		10623608
SCNN1	シンボル省略、SCNN1A を参照のこと			
SCNN1A	ナトリウムチャネル、電位非依存性 1、 α	12p13	600228	7896277
SCNN1B	ナトリウムチャネル、電位非依存性 1、 β (リトル症候群)	16p12.2-p12.1		600760
SCNN1D	ナトリウムチャネル、電位非依存性 1、 δ	1p36.3-p36.2	601328	8661065
SCNN1G	ナトリウムチャネル、電位非依存性 1、 γ	16p12	600761	7490094
CACNA1A	カルシウムチャネル、電位依存性、P/Q 型、 α 1A サブユニット	19p13	601011	8825650
CACNA1B	カルシウムチャネル、電位依存性、L 型、 α 1B サブユニット	9p34	601012	8825650
CACNA1C	カルシウムチャネル、電位依存性、L 型、 α 1C サブユニット	12pter-p13.2	114205	1650913
CACNA1D	カルシウムチャネル、電位依存性、L 型、 α 1D サブユニット	3p14.3	114206	1164412
CACNA1E	カルシウムチャネル、電位依存性、 α 1E サブユニット	1q25-q31	601013	8388125
CACNA1F	カルシウムチャネル、電位依存性、 α 1F サブユニット	Xp11.23-p11.22	300110	9344658
CACNA1G	カルシウムチャネル、電位依存性、 α 1G サブユニット	17q22	604065	9495342

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
CACNA1H	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 1H$ サブユニット	16p13.3		9670923
CACNA1I	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 1I$ サブユニット	22q12.3-13.2		10454147
CACNA1S	カルシウムチャネル、電位依存性、L型、 $\alpha 1S$ サブユニット	1q31-q32	114208	7916735
CACNA2	シンボル省略、CACNA2D1を参照のこと	-		
CACNA2D1	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 2/\delta$ サブユニット1	7q21-q22	114204	8188232
CACNA2D2	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\alpha 2/\delta$ サブユニット2	留保		
CACNB1	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\beta 1$ サブユニット	17q21-q22	114207	8381767
CACNB2	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\beta 2$ サブユニット	10p12	600003	9254841
CACNB3	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\beta 3$ サブユニット	12q13	601958	8119293
CACNB4	カルシウムチャネル、電位依存性、 $\beta 4$ サブユニット	2q22-q31	601949	9628818
CACNG1	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット1	17q24	114209	8395940
CACNG2	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット2	留保	602911	
CACNG3	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット3	留保		
CACNG4	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット4	17q24		10613843
CACNG5	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット5	17q24		10613843

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
CACNG6	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット6	19q13.4		11170751
CACNG7	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット7	19q13.4		11170751
CACNG8	カルシウムチャネル、電位依存性、 γ サブユニット8	19q13.4		11170751
KCNA1	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-1(ミヤマアを伴うレトリクト的運動失調症)	12p13	176260	1349297
KCNA1B	文献での別名、KCNAB1 を参照のこと	-		
KCNA2	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-2	12	176262	
KCNA2B	文献での別名、KCNAB2 を参照のこと	-		
KCNA3	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-3	1p13.3 または 13	176263	2251283
KCNA3B	文献での別名、KCNAB3 を参照のこと	-		
KCNA4	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-4	11p14	176266	2263489
KCNA4L	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-4 様	11q14		8449523
KCNA5	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-5	12	176276	
KCNA6	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-6	留保	176257	
KCNA7	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-7	19	176268	
KCNA8	文献での別名、KCNQ1 を参照のこと	-		

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNA9	シンボル省略、KCNQ1 を参照のこと	-		
KCNA10	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、メンバー-10	留保	602420	
KCNAB1	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、 β メンバー-1	3q26.1	601141	8838324
KCNAB2	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、 β メンバー-2	1p36.3	601142	8838324
KCNAB3	カリウム電位依存性チャネル、shaker 関連サブファミリー、 β メンバー-3	17p13.1	604111	9857044
KCNB1	カリウム電位依存性チャネル、Shab 関連サブファミリー、メンバー-1	20q13.2	600397	7774931
KCNB2	カリウム電位依存性チャネル、Shab 関連サブファミリー、メンバー-2	8		9612272
KCNC1	カリウム電位依存性チャネル、Shaw 関連サブファミリー、メンバー-1	11p15	176258	8449507
KCNC2	カリウム電位依存性チャネル、Shaw 関連サブファミリー、メンバー-2	12 および 19q13.4	176256	8111118
KCNC3	カリウム電位依存性チャネル、Shaw 関連サブファミリー、メンバー-3	19	176264	1740329
KCNC4	カリウム電位依存性チャネル、Shaw 関連サブファミリー、メンバー-4	1p21	176265	1920536
KCND1	カリウム電位依存性チャネル、Shal 関連サブファミリー、メンバー-1	Xp11.23- p11.3	300281	10729221
KCND2	カリウム電位依存性チャネル、Shal 関連サブファミリー、メンバー-2	7q31-32	605410	10551270
KCND3	カリウム電位依存性チャネル、Shal 関連サブファミリー、メンバー-3	1p13.2	605411	10942109
KCNE1	カリウム電位依存性チャネル、Isk 関連ファミリー、メンバー-1	21q22.1- q22.2	176261	8432548

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNE1L	カリウム電位依存性チャネル、Isk 関連ファミリー、 $M\alpha^+$ -1 様	Xq22.3	300328	10493825
KCNE2	カリウム電位依存性チャネル、Isk 関連ファミリー、 $M\alpha^+$ -2	21q22.1	603796	10219239
KCNE3	カリウム電位依存性チャネル、Isk 関連ファミリー、 $M\alpha^+$ -3	留保	604433	10219239
KCNE4	カリウム電位依存性チャネル、Isk 関連ファミリー、 $M\alpha^+$ -4	留保		10219239
KCNF1	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー F、 $M\alpha^+$ -1	2p25	603787	9434767
KCNF2	文献での別名、KCNG2 を参照のこと	-		
KCNF	シンボル省略、KCNF1 を参照のこと	-		
KCNG1	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー G、 $M\alpha^+$ -1	20q13	603788	9434767
KCNG2	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー G、 $M\alpha^+$ -2	18q22-18q23	605696	10551266
KCNG	シンボル省略、KCNG1 を参照のこと	-		
KCNH1	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー H(eag 関連)、 $M\alpha^+$ -1	1q32-41	603305	9738473
KCNH2	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー H(eag 関連)、 $M\alpha^+$ -2	7q35-q36	152427	7842012
KCNH3	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー H(eag 関連)、 $M\alpha^+$ -3	12q13	604527	10455180
KCNH4	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー H(eag 関連)、 $M\alpha^+$ -4	留保	604528	10455180
KCNH5	カリウム電位依存性チャネル、 $S\alpha^+$ ファミリー H(eag 関連)、 $M\alpha^+$ -5	14	605716	9738473
KCNIP1	Kv チャネル相互作用タンパク質 1	留保		10676964
KCNIP2	Kv チャネル相互作用タンパク質 2	10		10676964

10

20

30

40

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNIP3	文献での別名、CSEN を参照のこと	-		
KCNJ1	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.1	11q24	600359	7680431
KCNJ2	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.2	17q23.1-q24.2	600681	7696590
KCNJ3	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.3	2q24.1	601534	8088798
KCNJ4	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.4	22q13.1	600504	8016146
KCNJ5	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.5	11q24	600734	
KCNJ6	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.6	21q22.1	600877	7796919
KCNJ7	シンボル省略、KCNJ6 を参照のこと	-		
KCNJ8	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.8	12p11.23	600935	8595887
KCNJ9	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.9	1q21-1q23	600932	8575783
KCNJ10	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.10	1q	602208	9367690
KCNJ11	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.11	11p15.1	600937	7502040
KCNJ12	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.12	17p11.1	602323	7859381
KCNJ13	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.13	2q37	603208	9878260
KCNJ14	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、Kv1.14	19q13	603953	9592090

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNJ15	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、メンバー-15	21q22.2	602106	9299242
KCNJ16	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-J、メンバー-16	17q23.1-q24.2	605722	11240146
KCNJN1	チャネル、サフファミリー-J、阻害剤 1	17p11.2-p11.1	602604	8647284
KCNK1	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-1(TWIK-1)	1q42-q43	601745	8661042
KCNK2	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-2(TREK-1)	1q41	603219	9721223
KCNK3	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-3(TASK-1)	2p23	603220	9312005
KCNK4	カリウム内向き整流チャネル、サフファミリー-K、メンバー-4	11q13	605720	10767409
KCNK5	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-5(TASK-2)	6p21	603493	9812978
KCNK6	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-6(TWIK-2)	19q13.1	603939	10075682
KCNK7	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-7	11q13	603940	10206991
KCNK9	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-9(TASK-3)	8	605874	10734076
KCNK10	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-10	留保	605873	
KCNK12	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-12	2p22-2p21		
KCNK13	カリウムチャネル、サフファミリー-K、メンバー-13	14q24.1-14q24.3		11060316

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNK14	カリウムチャネル、サウファミリー-K、メンバー-14	2p22-2p21		11060316
KCNK15	カリウムチャネル、サウファミリー-K、メンバー-15	留保		
KCNMA1	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-M、 α メンバー-1	10	600150	7987297
KCNMB1	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-M、 β メンバー-1	5q34	603951	8799178
KCNMB2	シンボル省略、KCNMB3を参照のこと	-		
KCNMB2	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-M、 β メンバー-2	留保	605214	10097176
KCNMB2L	シンボル省略、KCNMB3Lを参照のこと	-		
KCNMB3	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-M、 β メンバー-3	3q26.3-q27	605222	10585773
KCNMB3L	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-M、 β メンバー-3様	22q11		10585773
KCNMB4	カリウムの大コンタクトナトリウム活性化型チャネル、サウファミリー-M、 β メンバー-4	留保	605223	
KCNMBL	シンボル省略、KCNMB3を参照のこと	-		
KCNMBLP	シンボル省略、KCNMB3Lを参照のこと	-		
KCNN1	カリウムの中間/小コンタクトナトリウム活性化チャネル、サウファミリー-N、メンバー-1	19p13.1	6022982	8781233

10

20

30

EFS 実験のために注目されるいくつかのイオンチャネル遺伝子				
記号	完全な名称	細胞遺伝学的位置	NIM 番号	PubMed ID
KCNN2	カリウム中間/小コンタックスカルシウム活性化チャネル、サブファミリー-N、メンバー-2	留保	605879	
KCNN3	カリウム中間/小コンタックスカルシウム活性化チャネル、サブファミリー-N、メンバー-3	22q11-q13.1	602983	9491810
KCNN4	カリウム中間/小コンタックスカルシウム活性化チャネル、サブファミリー-N、メンバー-4	19q13.2	602754	9380751
KCNQ1	カリウム電位依存性チャネル、KQT 様サブファミリー、メンバー-1	11p15.5	192500	8528244
KCNQ1OT1	KCNQ1 重複性転写物 1	11p15.5	604115	10220444
KCNQ2	カリウム電位依存性チャネル、KQT 様サブファミリー、メンバー-2	20q13.3-22q13.3	121200	9425895
KCNQ3	カリウム電位依存性チャネル、KQT 様サブファミリー、メンバー-3	8q24	121201	9425900
KCNQ4	カリウム電位依存性チャネル、KQT 様サブファミリー、メンバー-4	1p34	603537	10025409
KCNQ5	カリウム電位依存性チャネル、KQT 様サブファミリー、メンバー-5	6q14		10787416
KCNS1	カリウム電位依存性チャネル、遅延型整流、サブファミリー-S、メンバー-1	留保	602905	9305895
KCNS2	カリウム電位依存性チャネル、遅延型整流、サブファミリー-S、メンバー-2	Sq22	602906	9305895
KCNS3	カリウム電位依存性チャネル、遅延型整流、サブファミリー-S、メンバー-3	留保	603888	10484328

10

20

30

40

50

【0100】

PCR 反応は、Ampli Taq、Ampli Taq Gold または Vent ポリメラーゼ（これらに限定されない）を含む様々な熱安定性酵素を用いて行うことができる。Ampli Taq の場合、反応を、10 mM の Tris - Cl (pH 8.3)、2.0 mM の MgCl₂、200 μM の各 dNTP、50 mM の KCl、0.2 μM の各プライマー、10 ng の DNA テンプレート、0.05 ユニット/μl の Ampli Taq において行うことができる。反応液は 95 で 3 分間加熱され、その後、95 で 20 秒間、62 で 20 秒間、72 で 3 分間（これらに限定されない）を含む好適なサイクル処理パラメーターを使用して 35 回サイクル処理される。これらの条件に加えて、様々な好適な PCR プロトコルを、PCR Primer, A Laboratory Manual (編集: C. W. Dieffenbach および G. S. Dveksler, 1995 年、Cold Spring Harbor Laboratory Press) または PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Michael ら編、1990 年、Academic Press) に見出すことができる。

【0101】

所望する電位依存性イオンチャネルが実際に得られていることを確認し、予想外の変化が PCR 反応によって配列に導入されていないことを確認するために、本明細書中に記載される方法によって得られる、電位依存性イオンチャネルをコードする DNA を配列決定することが望ましい。DNA は、好適なクローニングベクターまたは発現ベクターに

クローン化することができ、例えば、哺乳動物発現ベクター p c D N A 3 . 1 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C A)、またはこの分野で知られているか、もしくは本明細書中に記載される他の発現ベクターにクローン化することができる。

【 0 1 0 2 】

様々な発現ベクターを、本発明において使用される電位依存性イオンチャンネルをコードする DNA を組換え発現させるために使用することができる。好適である市販の発現ベクターには、p M C 1 n e o (S t r a t a g e n e)、p S G 5 (S t r a t a g e n e)、p c D N A I および p c D N A I a m p、p c D N A 3、p c D N A 3 . 1、p C R 3 . 1 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C A)、E B O - p S V 2 - n e o (A T C C 3 7 5 9 3)、p B P V - 1 (8 - 2) (A T C C 3 7 1 1 0)、p d B P V - M M T n e o (3 4 2 - 1 2) (A T C C 3 7 2 2 4)、p R S V g p t (A T C C 3 7 1 9 9)、p R S V n e o (A T C C 3 7 1 9 8)、p C I . n e o (P r o m e g a)、p T R E (C l o n t e c h , P a l o A l t o , C A)、p V 1 J n e o、p I R E S n e o (C l o n t e c h , P a l o A l t o , C A)、p C E P 4 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C A)、p S C 1 1、ならびに p S V 2 - d h f r (A T C C 3 7 1 4 6) が含まれるが、これらに限定されない。ベクターの選択は、電位依存性イオンチャンネルを発現させることが所望される細胞タイプ、ならびに所望される発現レベルなどに依存する。

10

【 0 1 0 3 】

発現ベクターは、電位依存性イオンチャンネルの一過性発現または安定発現を行わせるために使用することができる。トランスフェクションされている DNA の一過性発現または安定発現はこの分野では広く知られている。例えば、A u s u b e l ら、1995年、「哺乳動物細胞への DNA の導入」、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、9 . 5 . 1 節から 9 . 5 . 6 節 (J o h n W i l e y & S o n s , I n c .) を参照のこと。

20

【 0 1 0 4 】

上記に記載された PCR 法に対する代替法として、イオンチャンネルをコードする c D N A クローンを、所望する電位依存性イオンチャンネルに対して特異的なオリゴヌクレオチドをプローブとして使用し、そしてオリゴヌクレオチドプローブを用いて c D N A ライブラリーをスクリーニングすることに関してこの分野で広く知られている方法を使用して c D N A ライブラリーから単離することができる。そのような方法は、例えば、S a m b r o o k ら、1989年、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k) ; G l o v e r , D . M . (編)、1985年、D N A C l o n i n g : A P r a c t i c a l A p p r o a c h (M R L P r e s s , L t d . , O x f o r d , U . K . , 第 I 巻、第 I I 巻) に記載されている。特定の電位依存性イオンチャンネルに対して特異的であり、かつ c D N A ライブラリーをスクリーニングするために使用することができるオリゴヌクレオチドは、電位依存性イオンチャンネルの知られている DNA 配列に基づいて容易に設計することができ、そしてこの分野で広く知られている方法によって合成することができる。

30

40

【 0 1 0 5 】

本発明はまた、本明細書中に開示される方法とともに使用される装置を提供する。例えば、本発明は、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように配置された 1 対の電極がプレートの多数のウエルに含有されるマルチウエル組織培養プレートを提供する。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態において、マルチウエル組織培養プレートは、1 対の電極の一方をウエルの底部に、そして 1 対の電極のもう一方をウエルの側面に含有する。この実施形態が図 2 B に示される。

【 0 1 0 7 】

50

他の実施形態において、マルチウエル組織培養プレートは1対の電極の両方をウエルの底部に含有する。この実施形態が図2Cに示される。

【0108】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、1対の電極の一方が、ウエルの底部を形成する導電性材料の層であり、1対の電極のもう一方が上方からウエルに進入する。この実施形態が、図7、図12および図16に示される。

【0109】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、1対の電極の両方が絶縁体に埋め込まれ、上方からウエルに進入する。この実施形態が図9および図10に示される。

【0110】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、上方からウエルに進入する電極は、絶縁体により囲まれた中心の導電性材料部分を有する。この実施形態が図8に示される。

【0111】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、1対の電極の一方がウエルの底部を形成し、1対の電極のもう一方が上方からウエルに進入する。この実施形態が図7および図10に示される。

【0112】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、電極の対により、正極および負極の交互パターンがウエルにおいて形成される。この実施形態が図16に示される。

【0113】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、ウエルの底部を形成する導電性材料の層が、ガラス基体を覆うインジウムスズ酸化物の層である。好ましくは、導電性材料の層およびガラス基体は透明である。

【0114】

マルチウエル組織培養プレートの他の実施形態において、プレートの多数のウエルが、交互にかみ合う電極を含有する。この実施形態が図3および図5に示される。

【0115】

本発明は、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように、第1の電極および第2の電極が配置されているマルチウエル組織培養プレートであって、

ウエルの底部が、細胞を増殖させることができるフィルターメンブランであり、
ウエルが、流体を含有することができるトラフに位置し、
トラフには、第1の電極が含有され、
第2の電極が上方からウエルに進入する、
マルチウエル組織培養プレートを提供する。この実施形態が図8に示される。

【0116】

本発明はまた、本明細書中に開示されたマルチウエル組織培養プレートと、蛍光画像化装置との組合せで、蛍光画像化装置により、マルチウエル組織培養プレートのウエルからの蛍光読み取りを得ることができるように、マルチウエル組織培養プレートおよび蛍光画像化装置が互いに配置されている組合せを提供する。

【0117】

本発明はまた、上部基体および底部基体のそれぞれが、
多数の実質上のウエル、および
実質上のウエルの底部を形成する導電性材料の層
を含有する上部基体および底部基体の組合せで、
導電性材料の層が電極として機能し、その結果、事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、実質上のウエルにおける細胞の膜横断電位が変化するように、上部基体および底部基体における導電性材料の層がパルス発生器に接続されている、上部基体および底部基体の組合せを提供する。そのような組合せが図6および図13に示される。

10

20

30

40

50

【0118】

本発明はまた、多数の一般には平行する正極および負極と、電極に対して一般には直角に配置された多数のスペーサーとによって形成される正方形または矩形のウエルを有する基体であって、

ウエルの1つの壁が正極により形成され、ウエルの反対側の壁が負極により形成され、スペーサーが、電極により形成される壁に対して直角であるウエルの壁を形成し、

事前に選択された電圧が電極間に加えられたとき、ウエル内の細胞の膜横断電位が変化するように電極が配置されている、基体を提供する。そのような基体が図1に示される。

【0119】

本発明の別の実施形態の一例は、

目的とする電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に有する少なくとも 10^3 個の生存している真核生物細胞が存在する上部表面を有する基体：

電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位が変化するように基体上または基体近くのいずれかに配置された多数の正極および多数の負極；

電位依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤であることが疑われる少なくとも1つの物質

を含み、

この場合、細胞が蛍光指示薬化合物を含有する。

【0120】

本発明の別の実施形態の一例は、

目的とする電位依存性イオンチャンネルをその形質膜に有する、ウエルあたり少なくとも 10^3 個の生存している真核生物細胞が存在する多数のウエルを有するマルチウエル組織培養プレート；

事前に選択された電圧が正極および負極を介して加えられたとき、細胞の膜横断電位が変化するように基体上または基体近くのいずれかに配置された多数の正極および多数の負極；

多数のウエルの少なくとも1つにおける、電圧依存性イオンチャンネルの活性化因子または阻害剤であることが疑われる少なくとも1つの物質

を含み、

細胞が蛍光指示薬化合物または電位感受性膜色素を含有する。

【0121】

下記の非限定的な実施例は、本発明をより良く例示するために示される。

【実施例1】

【0122】

図24に、EFS刺激を使用して高処理能スクリーニングを行うための好ましいシステムを示す。このシステムは、コンピューター2402と電氣的に結合する任意波形発生器カード2404を含むコンピューター2402から構成される。この目的のために作られたソフトウェアが、任意波形発生器カード2404に適切な電氣的刺激のパルス電圧波形(2406)を発生させるコンピューター2402に書き込まれていた。電圧波形(2406)が8個の定電流増幅器2408への入力に使用される。それぞれの定電流増幅器2408は96ウエルサンプルフィルタープレート2410上の横列に出力する。増幅器2412からの出力は、電流パルスを電極2416に加えることができる電氣的中継器2414の接点を通す。

【0123】

波形発生器カード2404はまた、刺激によって刺激されることになるウエルのアドレスを表す7ビットの二進トランジスタ-トランジスタ論理TTL値(2418)を生じさせる。さらに、トリガーパルス2420が発生させられる。マイクロプロセッサコントローラー2422はトリガーパルス2420を待ち、この二進値(2418)を解釈して、サンプルウエルにおける電極接続ワイヤ2417を介して定電流パルス(2424)を特定の電極2416(1つまたは複数)に向かわせる適切な中継器2414に切り換える

10

20

30

40

50

。電流は、増幅器の出力(2424)から、中継器接点2414を通過して、ウエル2428内の電極2416および液体を通り、そしてウエルのメンブラン2430を通過して、メンブラン2430下側の流体2432および帰還ワイヤ2434を介して戻る。1つの大きい共通する電流帰還トラフ2436が96個の電極すべてにつながる。各サンプルウエルがそれ自身の隔離された電流帰還トラフおよび電流帰還ワイヤを有する他の配置が可能である。下記の実施例2を参照のこと。

【0124】

メンブラン2430下側の電流帰還トラフ2436は、光源2442からの励起光(2440)が透明なメンブラン2430を通過してガラス底部2438を通過し、メンブラン2430に接着した細胞2444を照らすことを可能にする透明なガラス底部2438を有する。細胞2444からの蛍光光(2446)がメンブラン2430およびガラス底部2438を通過して戻り、検出器2448に進入する。好適な検出器には、上記で記載された検出器が含まれる。好ましい検出器には、FLIPR(Molecular Devices)蛍光画像化装置またはVIPR(Aurora Biosciences)がある。

10

【0125】

パルス列が完了したとき、マイクロプロセッサコントローラ2422は中継器2414を切り、定電流増幅器のパルス(2424)を電極2416から切離す。

【0126】

図25および図26を参照すると、図25には、上部電極2516および第1の電極接続ワイヤ2517を含む電極ヘッド2500の実施形態の写像が示されている。電極ヘッドは接地接点ロッド2510を含む。図26には、図25に示される電極ヘッド2500の実施形態と一緒に使用されるトラフ実施形態2600の写像が示されている。トラフ2600は、電極ヘッド2500における開口部2520を通る、電極ヘッドの整列および取り付けを助けるための支持ポスト2610を含む(図28を参照のこと)。底部電極ワイヤ(隠されている)が、EFSシステムが組み立てられたとき(図28を参照のこと)、塩/緩衝液の溶液に浸されると、ウエルのそれぞれに対する底部電極として作用するトラフに配置されている。底部電極ワイヤは位置2630において帰還接続ワイヤ2620と電気的に連絡している。帰還接続ワイヤは、EFSシステムが組み立てられたとき、接地接点パッド2510に固定される。トラフ2600はまた、好ましくはガラスから作製された透明な底部部分2640を含む。

20

30

【0127】

図27は、96ウエル2710を有するMultiscreen(商標)-BlackCM96ウエルプレート2700がトラフ2600に配置されるトラフ実施形態2600の写像を表す。Milliporeのマルチスクリーンプレートおよびバイオポアメンブランに関する情報が、例えば、<http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C7781>および<http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/tn062>において見出される。

【0128】

図28は、ウエルプレート2700を所定位置に有するトラフ2600を含む組み立てられたEFSシステム2800の写像である。電極ヘッド2500が、電極2416がウエルあたり1つの電極でウエル2710の中に挿入されるようにトラフ2600の上部に固定される。電極ヘッド2500は、留め具2810によって支持ポスト2610(隠されている)に固定される。留め具は、好ましくはねじ込みナットである。好ましくは、組み立てに先立って、各ウエル2710(隠されている)には、ウエル2710(隠されている)の底部を覆うまでに培養された細胞が負荷されている。細胞が標準的かつ知られている条件のもとで培養された後、そしてEFSユニット2800が組み立てられる前に、それぞれの細胞は、好ましくは、細胞培地を除くために洗浄され、その後、細胞には、上記で議論されたように所定の緩衝液溶液が負荷される。

40

50

【0129】

図29には、図28に示される実施形態に類似する本発明の実施形態から得られたデータのグラフ表示が示されている。データは、ヒトPN1電位依存性ナトリウムチャンネルを発現させるためにトランスフェクションされているHEK293細胞における膜電位の変化を表している。各プロットは96ウエルプレートの横列(12ウエル)AからHを表している。96ウエルプレートの各縦列データはVIPR(商標)で15秒間取得された。刺激パルスプロトコルが下記のようにデータ取得時に加えられた: 2sのベースラインの後、2msの方形パルス、振幅=20mA、振動数=10Hz、持続時間=5s。当業者は、当該システムが1μsから1sの間のパルスを発生させ得ることを、本明細書中の教示を考慮して、容易に理解する。好ましくは、発生させられるパルスは約0.1msから約100msの間である。

10

【0130】

図30は、図29に示されているデータの最大比率変化の棒グラフ表示である。1μMのTTX(テトロドトキシン(TTX)感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルの特異的かつ強力な阻害剤)が、E1、F1、G1、H1、A12、B12、C12およびD12のウエルに存在する。さらに、ウエルA11には、TTX感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルを阻止するための内部標準物が含有される。Zスコアは、非阻害シグナルおよび阻害シグナルの標準偏差の和により除された非阻害シグナルおよび阻害シグナルの差の尺度である。

【0131】

図31には、HEK293/PN1細胞におけるEFS刺激による脱分極シグナルに対するTTX(上パネル)および化合物A(下パネル)の濃度を増大したときの影響が示されている。これらの実験で得られたIC₅₀は、他の技術により得られたIC₅₀と匹敵する。大きいヒル係数(nH)が、刺激プロトコルの閾値性質およびイオンチャンネル活性と膜電位との間における非線形的関係から得られる。

20

【実施例2】

【0132】

図32は、別のEFSシステム配置に関するEFS実施形態3200の写真を表す。電極ヘッド2500は、図25において上記に記載された電極ヘッドと類似する。しかし、電極、ウエルおよびトラフの配置は、電場をさらに離すために異なって設計されている。これにより、ウエル間の混線および干渉が減少する。この実施形態のために、本発明者らは、EFSシステムとしての使用のためにMilliporeのMultiscreen(商標)Caco-2アッセイシステムを改造した。Multiscreen(商標)Caco-2アッセイシステムに関する情報を<http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/PF1780EN00>において見出すことができる。標準的な市販のCaco-2プレートシステムは、2つのプレート、すなわち、メンブラン底部の細胞増殖プレートと、96ウエルの受容トレーを含む。Caco-2システムの他にない特徴の1つは、各ウエルが、各ウエルに底部側面からつながる個々の対応するトラフを有するという点である。従って、そのことは、ウエルのすべてが置かれる共通トラフが必要であることに取って代わる。この実施形態により、上部電極2516が、メンブラン底部の細胞増殖プレート(隠されている)におけるウエルのそれぞれに配置される。各ウエルに対する底部電極を確立するために、導電性電極プレート3220が提供される。導電性電極プレート3220は一連のウエル開口部3230を含み、これにより、個々のウエルの中への上部電極2410のアクセスが組立て時にもたらされる。導電性電極プレート3220はまた、それに固定され、かつ位置3240において下方向に延びる一連の導電性のピン(隠されている)を含む。これらの導電性ピンは、メンブラン底部の細胞増殖プレート(示されず)の底部側面のアクセスポートを介して挿入される。

30

40

【0133】

図33は、導電性電極プレート3220の底部を示すものであり、頁から読者の方に向

50

かって延びている導電性ピン3310を示している。図34は、メンブタン底部の細胞増殖プレート3410および96ウエル受器トレイ3420の上に正しく配置された導電性電極プレート3220の側面図を示す。導電性電極プレート3220がメンブタン底部の細胞増殖プレート3410の上に正しく配置されたとき、導電性ピン3310が、底部側面のアクセスポート（示されず）を介して96ウエル受器トレイの個々のトラフ領域（示されず）に挿入される。個々のトラフ領域が適切な溶液で満たされたとき、個々のトラフ領域は各ウエルの底部および個々のピンと接触する。従って、ウエルおよびトラフ領域が溶液で満たされたとき、電流が、操作時に上部電極から下部電極に流れることができる。図35は、組み立てられたEFSシステムの側面図である。組み立てられたシステムは、96ウエルトレイ3420に配置されたメンブタン底部の細胞増殖プレート3410を含む。電極プレート3220がメンブタン底部のウエルプレート3410の上に載せられる。電極ヘッド2500が、電極プレート3220の上に載せられて示される。

10

【0134】

上記の実施例1および実施例2ならびに本明細書のどこかに記載されるEFSシステムに対する1つの明らかな利点は、細胞に対して接線方向とは対照的に、細胞を横断する均一な電場を生じさせることができることである。細胞を横断する電場を発生させることは、マルチウエル形式での電極の新規な「上部から底部への」設置によって可能になる。

【実施例3】

【0135】

図36には、新規な電極実施形態3600が示されている。図36Aは電極3600の拡大図を示す。電極3600は、プレート間に低誘電性のプレートまたはディスク3620を有する2つの平行するプレート3610およびプレート3630を含む。任意に、電極は絶縁性材料でコーティングされ得る。この設計の潜在的な利点は、特別なマルチウエルプレートを必要としないということである。すなわち、細胞が付着し、かつ刺激光および放射光が通過する任意のプレートを使用することができる。長いインキュベーションのとき、化合物を吸収し得るか、または化合物を通過させ得るフィルターがウエルには存在しない。コーティングされた電極の場合、dc電流の場合でさえ、そして長期間の刺激の場合でさえ、ほとんど電流が使用されず、そして抵抗発熱が減少する。キャパシタンス電流は十分に低いので、この利点はac電流にも適用される。シールされた電極は、より均一な刺激のために、細胞層の非常に近いところへの設置を可能にする。

20

30

【0136】

何らかの理論によってとられるものではないが、細胞に与えられる電場が均一であるほど、細胞に対する電位調節のより正確な指示が達成されることが考えられる。すなわち、電場が均一であるほど、本明細書中に示される方法のいずれかによって、例えば、蛍光によって観測されるような電位調節は、細胞膜におけるイオンチャンネルの実際の調節とより直接的に相関し、そして、交差干渉、交差照明、色素効果、色素溶出、またはシステムにおける任意の他の妨害によって引き起こされるシステムにおけるバックグラウンドノイズとの相関がより小さくなる。細胞に加えられる電場の均一性を増大させるための1つの方法は、電極の1つ以上を、細胞の非常に近いところに置くか、または細胞と接触させて置くことである。しかし、これは、システムにおける機能停止をもたらす有害な方法で細胞に影響を及ぼし得る。電極を細胞に非常に接近させること、または電極を細胞と接触させることに関連する問題のいくつかは、例えば、電極における抵抗発熱および酸化および気泡形成が原因である。図8、図11、図24から図28および図32から図35に教示されるような本発明の実施形態は、電極を細胞と接触させることなく、または電極を細胞の非常に近いところに置くことなく、細胞を横断する均一な電場を達成するので、特に好ましい。さらに、図36に示される新規な電極設計は、細胞の抵抗発熱、酸化または気泡形成の問題を生じさせることなく、電極を細胞の非常に近いところに置くことを可能にすることによって、均一な電場を達成する。

40

【0137】

本発明のEFSシステム実施形態は、1つ以上の電場が、観測領域について、任意の時

50

間における平均電場から約30%以下変化する実質的に均一な電場をもたらすと考えられる。割合は二次元での測定によって求められ、または好ましくは、変動が三次元で計算される。より好ましい実施形態において、1つ以上の電場は、観測領域について、任意の時間における平均電場から約15%以下変化する。さらにより好ましい実施形態において、1つ以上の電場は、観測領域について、任意の時間における平均電場から約10%以下変化する。最適な実施形態において、変動は平均から5%以下である。

【0138】

コンデンサとの類似性が明らかであるが、プレート3610とプレート3630との間における低誘電体3620は、これらのプレート間に電荷を維持するために必要とされるだけの小さい電流でこれらのプレートを先ず充電させるために必要とされる電流の量を減少させる。細胞を脱分極させるために使用することができる外部電場が作製される。外部電場密度は、本物のコンデンサに関して使用されるようなプレート間の高誘電体によって低下し、そしてテフロンもしくはマイラーなどの低誘電体で、または誘電体の非存在下で最大になる。外部電場密度は、これらのプレートを非常に接近させて緊密に設置することによってさらに高まるが、最適な分離は経験的に決定することができる。

10

【0139】

図36Bには、並行リード線のデザインを含む実施形態が示される。並行リード線は内側ワイヤ3655および外側ワイヤ3650を含む。内側ワイヤは上部プレート3610および誘電性プレート3620を通り抜け、底部プレート3630に取り付けられるか、または底部プレート3630と一体化される。外側ワイヤは上部プレート3610に取り付けられるか、または上部プレート3610と一体化される。当業者は、リード線の前記配置が逆にできることを理解する。図36Cには、端部リード線3660および3665を含む実施形態が示される。端部リード線3660は上部プレート3610に取り付けられるか、または上部プレート3610と一体化され、端部リード線3665は底部プレート3630に取り付けられるか、または底部プレート3630と一体化される。

20

【0140】

本発明の実施形態のいくつかには、下記が含まれる：

候補化合物の生物学的活性を特徴づける方法であって、

1個以上の細胞を前記化合物にさらすこと；前記1個以上の細胞を1つ以上の電場に繰り返しさらして、前記1個以上の細胞の膜横断電位の制御された変化を生じさせるようにすること；およびパッチクランプを使用することなく、前記1個以上の細胞の膜横断電位の変化をモニターすること、を含む方法。

30

【0141】

モニターすることが、前記1個以上の細胞を含有する観測領域からの蛍光放射を検出することを含む、上記方法。

【0142】

電場が二相性である、上記方法。

【0143】

不可逆的な細胞のエレクトロポレーションを最小限に抑えるように電場強度の空間的変動を制限することをさらに含む、上記方法。

40

【0144】

1つ以上の電場が、目的とするイオンチャンネルを異なる電位依存性状態の間で循環させることができる、上記方法。

【0145】

1つ以上の電場が目的とするイオンチャンネルを開口させる、上記方法。

【0146】

1つ以上の電場が目的とするイオンチャンネルを不活性化から解放させる、上記方法。

【0147】

1つ以上の細胞が、FRETに基づく電圧センサ、エレクトロクロミック性膜横断電位色素、膜横断電位再分配色素、イオン感受性の蛍光分子または発光分子、および放射性イ

50

オンからなる群から選択される電圧センサを含む、上記方法。

【0148】

1つ以上の細胞が電位調節型イオンチャンネルを含む、上記方法。

【0149】

電位調節型イオンチャンネルが、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、塩素イオンチャンネルおよびナトリウムチャンネルからなる群から選択される、上記方法。

【0150】

電場が、観測領域において、その領域における平均強度から約25%未満の、強度の制限された空間変動を示す、上記方法。

【0151】

1つ以上の電場が、観測領域について、任意の時間における平均電場から大きくても約15%変化する、上記方法。

【0152】

1つ以上の電場が、観測領域について、任意の時間における平均電場から大きくても約5%変化する、上記方法。

【0153】

1つ以上の電場が、方形波形、正弦波形または鋸波形のいずれかによる刺激を含む、上記方法。

【0154】

1つ以上の電場が約10V/cmから約100V/cmの範囲内の振幅を有する、上記方法。

【0155】

1つ以上の電場が約20V/cmから約80V/cmの範囲内の振幅を有する、上記方法。

【0156】

1つ以上の電場が、前記1個以上の細胞の膜横断時定数の逆数よりも大きいか、またはそのような逆数と等しい刺激振動数で繰り返される、上記方法。

【0157】

1つ以上の電場が0kHzから1kHzの範囲内の刺激振動数で繰り返される、上記方法。

【0158】

1つ以上の電場が約100マイクロ秒から約20ミリ秒の範囲内のパルス持続時間を有する、上記方法。

【0159】

膜横断電位が前記1個以上の細胞の形質膜全体に現れる、上記方法。

【0160】

標的イオンチャンネルに対する化合物の生化学的活性をアッセイする方法であって、前記標的イオンチャンネルの選択された電位依存性状態に対応する正常な静止膜横断電位を有する細胞株を選択すること；前記選択された細胞株の細胞集団において前記標的イオンチャンネルを発現させること；前記細胞集団を前記化合物にさらすこと；前記細胞集団を1つ以上の電場にさらして、前記1個以上の細胞の膜横断電位の制御された変化を生じさせるようにすること；および、前記1個以上の細胞の膜横断電位の変化をモニターすること、を含む方法。

【0161】

標的イオンチャンネルが前記細胞株において外因的に発現させられる、上記方法。

【0162】

細胞株が、前記標的イオンチャンネルをコードする核酸でトランスフェクションされる、上記方法。

【0163】

細胞株が意味のないレベルの他のイオンチャンネルを発現する、上記方法。

10

20

30

40

50

【0164】

細胞株が、CUL、LTK(-)およびCHO-Mからなる群から選択される、上記方法。

【0165】

標的イオンチャンネルがナトリウムチャンネルであり、前記細胞集団が、CHL細胞、LTK(-)細胞およびCHO-K1細胞からなる群から選択される、上記方法。

【0166】

標的イオンチャンネルがナトリウムチャンネルであり、前記細胞集団が、HEK-293細胞、RBL細胞、F11細胞およびHL5細胞からなる群から選択される、上記方法。

10

【0167】

標的イオンチャンネルがカリウムチャンネルであり、前記細胞集団が、CHL細胞、LTK(-)細胞およびCHO-K1細胞からなる群から選択される、上記方法。

【0168】

標的イオンチャンネルがカルシウムチャンネルであり、前記細胞集団が、CHL細胞、LTK(-)細胞およびCHO-K1細胞からなる群から選択される、上記方法。

【0169】

イオンチャンネルの活性をアッセイする方法であって、
少なくとも1個の細胞を多数の電場パルスにさらして、膜横断電位の制御された変化を生じさせるようにし、かつ目的とするイオンチャンネルを活性化させるようにすること；
およびパッチクランプを使用することなく、膜横断電位における1つ以上の変化を検出することによってイオンチャンネルの活性を検出すること、を含む方法。

20

【0170】

少なくとも1個の細胞が、FRETに基づく電圧センサ、エレクトロクロミック性膜横断電位色素、膜横断電位再分配色素、イオン感受性の蛍光分子または発光分子、および放射性イオンからなる群から選択される電圧センサを含む、上記方法。

【0171】

電圧センサが、FRETに基づく電圧センサを含む、上記方法。

【0172】

目的とするイオンチャンネルが電位調節型イオンチャンネルである、上記方法。

30

【0173】

多数の電場パルスにより、目的とする前記イオンチャンネルが異なる電位依存性状態の間で循環させられる、上記方法。

【0174】

少なくとも1個の細胞が真核生物細胞である、上記方法。

【0175】

少なくとも1個の細胞が非興奮性細胞である、上記方法。

【0176】

少なくとも1個の細胞が原核生物細胞である、上記方法。

【0177】

少なくとも1個の細胞が組織培養細胞である、上記方法。

40

【0178】

少なくとも1個の細胞が初代細胞株である、上記方法。

【0179】

少なくとも1個の細胞が無傷の生存生物の一部である、上記方法。

【0180】

イオンチャンネルの活性をアッセイする方法であって、
選択された標的イオンチャンネルを少なくとも1個の細胞において発現させること；
選択された対向イオンチャンネルを前記少なくとも1個の細胞において発現させること；
前記少なくとも1個の細胞を多数の電場パルスにさらして、膜横断電位の制御された変化を

50

生じさせるようにし、かつ前記対向イオンチャンネルを活性化させるようにすること；および前記少なくとも1個の細胞の膜横断電位をモニターすること、を含む方法。

【0181】

膜横断電位の変化が、目的とする前記イオンチャンネルが阻止されたときに検出される、上記方法。

【0182】

目的とするイオンチャンネルがリガンド依存性イオンチャンネルを含む、上記方法。

【0183】

対向チャンネルがナトリウムチャンネルを含む、上記方法。

【0184】

細胞の膜横断電位を変化させる方法であって、

二相性の電場パルスを実記細胞に繰り返し加えることを含み、前記パルスが約90V/cm未満の最大振幅を有し、前記パルスが少なくとも約1個/秒の割合で加えられ、各パルスの総持続時間が少なくとも約1ミリ秒である、方法。

【0185】

最大振幅が約20V/cmから40V/cmである、上記方法。

【0186】

パルス持続時間が相あたり約2ミリ秒から10ミリ秒である、上記方法。

【0187】

パルスが約20パルス/秒から100パルス/秒の割合で加えられる、上記方法。

【0188】

候補化合物の生物学的活性を特徴づける方法であって、

1個以上の細胞をサンプルウエル内の観測領域に入れること；前記1個以上の細胞を前記化合物にさらすこと；前記1個以上の細胞を一連の二相性電場に約20パルス/秒から100パルス/秒の割合で繰り返しさらすこと、ここにおいて、前記電場は、観測領域において、その領域における平均強度から約25%未満の、強度の制限された空間的変動を示し、および前記電場により、前記1個以上の細胞の膜横断電位の制御された変化をもたらされる；および、前記1個以上の細胞を含有する観測領域からの、FRETに基づく電圧センサの蛍光放射を検出することによって、前記1個以上の細胞の膜横断電位の変化をモニターすること、を含む方法。

【0189】

1つ以上の電場パルスが目的とするイオンチャンネルを開口させる、上記方法。

【0190】

1つ以上の電場パルスが目的とするイオンチャンネルを不活性化から解放させる、上記方法。

【0191】

1個以上の細胞が電位調節型イオンチャンネルを含む、上記方法。

【0192】

電位調節型イオンチャンネルが、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、塩素イオンチャンネルおよびナトリウムチャンネルからなる群から選択される、上記方法。

【0193】

1つ以上の電場が、観測領域について、任意の時間における平均電場から多くても約15%変化し得る、上記方法。

【0194】

1つ以上の電場が、観測領域について、任意の時間における平均電場から多くても約5%変化する、上記方法。

【0195】

1つ以上の電場が、方形波形、正弦波形または鋸波形から選択される、上記方法。

【0196】

ウエルに存在する細胞が観測領域において光学的に測定可能である高透過率部分を有す

10

20

30

40

50

る多数のウエル；前記多数のウエルのそれぞれにおける2つの電極；前記高透過率部分を介して前記ウエルから発する光を検出するように設計された光学検出器；前記電極に接続された電源装置、ただし、前記電源装置および前記電極は、一連の電場を前記観測領域内の細胞に加えるために設計され、この場合、前記電場は、前記観測領域内の平均電場強度の約25%未満の空間的変動を有し、前記電場は、前記細胞の一部の膜横断電位を制御可能に変化させるために効果的であり；前記高透過率部分を介して前記ウエルから発する前記光を、前記膜横断電位変化から生じるイオンチャンネル活性として解釈するために設計されたデータ処理ユニット、を含む、高処理能スクリーニングシステム。

【0197】

多数のウエルがマルチウエルプレートに設置される、上記高処理能スクリーニングシステム。 10

【0198】

前記高透過率部分が、ガラス、石英、シクロオレフィン、アクラ（Acclar）、ポリプロピレン、ポリエチレンおよびポリスチレンからなる群から選択される材料から作製される、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0199】

前記高透過率部分が、250nmから400nmの範囲のUV光で励起されたとき、ポリスチレンよりも少ない蛍光を示す、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0200】

電極が前記多数のウエルのウエルに設置される、上記高処理能スクリーニングシステム 20

【0201】

電極が前記多数のウエルの底部層に設置される、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0202】

マルチウエルプレートが96個までのウエルを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0203】

マルチウエルプレートが96個よりも多くのウエルを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。 30

【0204】

マルチウエルプレートが384個よりも多くのウエルを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0205】

電極が、金、白金、パラジウム、クロム、モリブデン、イリジウム、タングステン、タantalおよびチタンからなる群から選択される材料から作製される、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0206】

マルチウエルプレートが、光の透過を低下させるための光学的に不透明な材料または色素を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。 40

【0207】

電極が約1mmから4mmの範囲内の隙間によって隔てられる、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0208】

電極が約0.1mmから1mmの範囲内の隙間によって隔てられている、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0209】

電極が約0.01mmから0.1mmの範囲内の隙間によって隔てられている、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0210】

電極が、 5 V/cm から 100 V/cm の間の電場強度を前記隙間を横切って生じさせるために充電され、ウエルの内部と流体的に接続されている電気導電性材料の表面領域を横断して移された総電荷が $100\text{ }\mu\text{C/mm}^2$ 以下である、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0211】

多数のウエルが、前記ウエル内に観測領域を生じさせるように配置および設計された絶縁体をさらに含み、ただし、電気導電性材料の前記少なくとも2つの細片が、 5 V/cm から 100 V/cm の間の電場強度を前記隙間を横切って生じさせるために充電されたとき、電場強度が平均電場強度から多くても10%未満変化し、そしてウエルの内部と流体的に接続されている電気導電性材料の表面領域を横断して移された総電荷が $100\text{ }\mu\text{C/mm}^2$ 以下である、上記高処理能スクリーニングシステム。

10

【0212】

多数のウエルが少なくとも2つのサテライト電気導電体をさらに含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0213】

高処理能スクリーニングシステムであって、

サンプルウエル；試薬および/または細胞を前記サンプルウエルに加えるための液体取扱い装置；およびイオンチャンネルの活性を選択的に生じさせるように前記サンプルウエル内の細胞の膜横断電位を制御するための手段；前記膜横断電位の変化を光学的にモニターするための手段、を含むシステム。

20

【0214】

前記手段が、観測領域内の平均電場強度の約25%未満の空間的変動を有する電場を生じさせるように設計された電極を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0215】

膜横断電位を制御するための手段が電極アレイアセンブリを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0216】

電極アセンブリアレイが8個の電極アセンブリを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0217】

電極アセンブリアレイが96個の電極アセンブリを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

30

【0218】

電極アセンブリアレイが96個よりも多くの電極アセンブリを含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0219】

前記電極アセンブリをマルチウエルプレートのウエルの中に入れて、またはマルチウエルプレートのウエルから出したりするための手段をさらに含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0220】

膜横断電位を制御するための手段が、2つの実質的に平行する平面状表面を有する電気導電体を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

40

【0221】

電気導電体が 1 mm から 4 mm の範囲内の隙間によって隔てられている、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0222】

電気導電体が 0.1 mm から 1 mm の範囲内の隙間によって隔てられている、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0223】

電気導電体が第1の絶縁体をさらに含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

50

【0224】

第1の絶縁体が、前記電気導電体の前記実質的に平行する平面状表面に対して直角に配置され、かつ互いに関して実質的に平行する2つの平面状表面を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0225】

電気導電体が、前記少なくとも2つの電気伝導体に取り付けられた第2の絶縁体をさらに含み、前記第2の絶縁体が前記少なくとも2つの電気伝導体の間における前記隙間に置かれて、前記少なくとも2つの電気伝導体の間における前記水溶液の深さを規定する、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0226】

第1の絶縁体が低蛍光性材料から構成され、前記低蛍光性材料が、250 nmから400 nmの範囲のUV光で励起されたとき、匹敵するサイズのポリスチレンよりも少ない蛍光を示す、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0227】

第2の絶縁体が低蛍光性材料から構成され、前記低蛍光性材料が、250 nmから400 nmの範囲のUV光で励起されたとき、匹敵するサイズのポリスチレンよりも少ない蛍光を示す、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0228】

第1の絶縁体が、プラスチック、ガラスおよびセラミックからなる群から選択される絶縁体を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0229】

プラスチックが、ナイロン、ポリスチレン、テフロン(テトラフルオロエチレン)、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニルおよびシクロオレフィンからなる群から選択される、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0230】

電気導電体が、金、白金、チタン、タングステン、モリブデン、イリジウム、バナジウム、Nb、Ta、ステンレススチール、およびグラファイトからなる群から選択される導電体を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0231】

電気導電体が、電気分解を減少させるための表面処理物を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0232】

電気分解を減少させるための表面処理物が、白金ブラック、金ブラック、イリジウム/酸化イリジウム、チタン/窒化チタンまたはポリピロール薄膜を含む、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0233】

前記少なくとも2つの電気導電体が、5 V/cmから100 V/cmの間の電場強度を前記隙間を横切って生じさせるために充電されたとき、電場強度が平均電場強度から多くても10%変化し、そして前記水溶液と接触している電気導電体の表面領域を横断して移された総電荷が100 $\mu\text{C}/\text{mm}^2$ 以下である、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0234】

前記少なくとも2つの電気導電体が、5 V/cmから100 V/cmの間の電場強度を前記隙間を横切って生じさせるために充電されたとき、電場強度が平均電場強度から多くても5%変化し、そして前記水溶液と接触している電気導電体の表面領域を横断して移された総電荷が100 $\mu\text{C}/\text{mm}^2$ 以下である、上記高処理能スクリーニングシステム。

【0235】

標的イオンチャンネルに対して多数の薬物候補化合物をスクリーニングする方法であって、

前記標的イオンチャンネルを宿主細胞集団において発現させること；多数の前記宿主細胞を多数のサンプルウエルのそれぞれに入れること；候補薬物化合物を前記多数のサン

10

20

30

40

50

ルウエルの少なくとも1つに加えること；および前記標的イオンチャンネルの事前を選択された電位依存性状態に対応するレベルに前記膜横断電位を設定するように電場を繰り返し加えることによって前記多数のサンプルウエルにおける宿主細胞の膜横断電位を調節すること、を含む方法。

【0236】

前記標的イオンチャンネルの第2の事前を選択された電位依存性状態に対応する正常な静止膜横断電位を有する宿主細胞株を選択することをさらに含む、上記方法。

【0237】

電場が二相性である、上記方法。

【0238】

電場が、目的とするイオンチャンネルを異なる電位依存性状態の間で循環させる、上記方法。

10

【0239】

電場が、目的とするイオンチャンネルを開口させる、上記方法。

【0240】

電場が、目的とするイオンチャンネルを不活性化から解放させる、上記方法。

【0241】

1個以上の細胞が、FRETに基づく電圧センサ、エレクトロクロミック性膜横断電位色素、膜横断電位再分配色素、イオン感受性の蛍光分子または発光分子、および放射性イオンからなる群から選択される電圧センサを含む、上記方法。

20

【0242】

標的イオンチャンネルが、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、塩素イオンチャンネルおよびナトリウムチャンネルからなる群から選択される、上記方法。

【0243】

1つ以上の電場が、方形波形、正弦波形または鋸波形のいずれかによる刺激を含む、上記方法。

【0244】

1つ以上の電場が約10V/cmから約100V/cmの範囲内の振幅を有する、上記方法。

【0245】

1つ以上の電場が約20V/cmから約80V/cmの範囲内の振幅を有する、上記方法。

30

【0246】

電極がその中に置かれている少なくとも1つのウエルを含むアッセイプレートと電極とのアセンブリであって、前記電極がウエルの底部表面に対して配置されて、前記底部表面の面積の少なくとも約20%にわたって、平均電場強度から約10%未満変化する電場が前記底部表面に隣接して提供される、アセンブリ。

【0247】

電極が、前記電極の底部端が前記底部表面に隣接するが、前記底部表面と接触しないように、前記ウエル中に下方に延びるプレート電極を含む、上記アセンブリ。

40

【0248】

サンプルウエルあたり2つの電極を含む上記アセンブリ。サンプルウエルあたり3つ以上の電極を含む上記アセンブリ。

【0249】

電極が前記ウエルの前記底部表面に置かれる上記アセンブリ。底部表面が大きい光学的透過率部分を含む上記アセンブリ。

【0250】

高透過率部分が、ガラス、石英、シクロオレフィン、アクリル(Acclar)、ポリプロピレン、ポリエチレンおよびポリスチレンからなる群から選択される材料から作製される、上記アセンブリ。

50

【0251】

高透過率部分が、250nmから400nmの範囲のUV光で励起されたとき、ポリスチレンよりも少ない蛍光を示す、上記アセンブリ。

【0252】

電極が前記多数のウエルの壁に配置される、上記アセンブリ。

【0253】

プレートが96個までのウエルを含む、上記アセンブリ。

【0254】

プレートが96個よりも多くのウエルを含む、上記アセンブリ。

【0255】

プレートが384個よりも多くのウエルを含む、上記アセンブリ。

10

【0256】

電極が、金、白金、パラジウム、クロム、モリブデン、イリジウム、タングステン、 tantalumおよびチタンからなる群から選択される材料から作製される、上記アセンブリ。

【0257】

電極が約1mmから4mmの範囲内の隙間によって隔てられる、上記アセンブリ。

【0258】

電極が約0.1mmから1mmの範囲内の隙間によって隔てられている、上記アセンブリ。

【0259】

電極が約0.01mmから0.1mmの範囲内の隙間によって隔てられている、上記アセンブリ。

20

【0260】

マルチウエルプレート用の底部パネルであって、ウエル存在位置に対応する位置にある少なくとも1つの横列の高透過率領域；前記横列に沿って広がり、前記ウエル存在位置の第1の部分と重なる導電性材料の第1の細片；および前記横列に沿って広がり、前記ウエル存在位置の第2の部分と重なる導電性材料の第2の細片、を含む底部パネル。

【0261】

前記第1の細片の一方の端部に近い第1の電気的接点と、前記第2の細片の一方の端部に近い第2の電気的接点とをさらに含む、上記底部パネル。

30

【0262】

サンプルウエル；前記サンプルウエル内に配置された第1の1対の電極；前記サンプルウエル内に配置された少なくとも1つのさらなるサテライト電極、を含むアッセイ装置。

【0263】

少なくとも1つのさらなるサテライト電極が第2および第3の1対の電極を含む、上記アッセイ装置。

【0264】

サテライト電極が、第1の1対の電極の電位よりも低い電位に充電される、上記アッセイ装置。

40

【0265】

電極がウエルの底部表面に対して配置されて、前記底部表面の表面積の少なくとも約20%について、平均電場強度から約10%未満変化する電場が前記底部表面に隣接して提供される、上記アッセイ装置。

【0266】

本発明は、本明細書中に記載される具体的な実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際、本明細書中に記載される改変に加えて、本発明の様々な改変が、前記の記載から当業者には明らかになる。そのような改変は、添付された請求項の範囲に含まれるものとする。

【0267】

50

様々な刊行物が本明細書中に引用されているが、それらの開示はその全体が参照して組み込まれる。さらに、一般的な情報のために、PCT公開番号PCT/US01/21652は、正確であり、かつ本明細書中の教示と矛盾しない限りにおいてその全体が本明細書中に組み込まれる。本明細書中で議論されているか、または本明細書中に引用されている特許、特許出願、刊行物、書籍および参考文献はすべて、個々の刊行物または特許出願のそれぞれが具体的かつ個々にその全体が示されているかのようにそれと同じ程度に参照して組み込まれることが理解される。さらに、発明の開示宣言、引用参考文献の審査官による要約において引用されているか、またはそれ以外の場合には、本出願のファイル履歴に入れられる参考文献、特許、特許出願および他の文書はすべて、本出願に対する優先権を主張する後願の利益のために、本出願に参照して組み込まれるために採用される。最後に、具体的に定義されていない用語はすべて、この開示における使用により示される意味を有することが最初に理解され、そしてそのような意味が推測できない場合には、それらの通常の意味を有することが理解される。

10

【図面の簡単な説明】

【0268】

【図1】図1Aは、本発明の1つの実施形態の上面図を示す。この実施形態は、約25 μ mから100 μ mの隙間4が電極間に存在するように間隔が置かれた金の正極2および金の負極3がその内部またはその表面に存在するガラス製スライドガラス1を含む。電極に対して一般に直角に配置されたスペーサー5（この場合にはプラスチック細片として示される）と一緒に、電極は、細胞を入れ、かつ/または増殖させることができる、深さが約100 μ mである一連のウエル6を規定する。図1Bは、図1Aの実施形態の断面側面図を示す。この実施形態では、正極および負極の実体は、所望する場合には互いに入れ替えることができる。電極は金から作製される必要はなく、他の導電性材料を使用することができる。また、スペーサーはプラスチックである必要はなく、他の非導電性材料を使用することができる。

20

【図2A】図2Aは、典型的な96ウエルプレートが電極を各ウエル内に含有する本発明の実施形態の上面図を示す。ウエルは、ウエルの側面2における第1の電極1（この場合には正極として示される）と、ウエルの底部4における第2の電極3（この場合には負極として示される）と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料5の細片と、ウエルの底部での細胞6とを有する。1個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面2は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物（ITO）などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部4における細胞6および第2の電極3を完全に覆うために、そしてウエルの側面2における第1の電極1に達するために十分な流体レベル7とともに示される。ウエルは、図2Aに関して実際の大きさ比率で描かれていない。この実施形態では、正極1および負極2の両方がウエルの底部3に存在する。この実施形態では、ウエルの側面4および底部3が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル5は、細胞6ならびに正極1および負極2を覆うようにされる。

30

【図2B】図2Bは、図2Aにおけるウエルの1つの断面側面図を示す。ウエルは、ウエルの側面2における第1の電極1（この場合には正極として示される）と、ウエルの底部4における第2の電極3（この場合には負極として示される）と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料5の細片と、ウエルの底部での細胞6とを有する。1個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面2は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物（ITO）などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部4における細胞6および第2の電極3を完全に覆うために、そしてウエルの側面2における第1の電極1に達するために十分な流体レベル7とともに示される。ウエルは、図2Aに関して実際の大きさ比率で描かれていない。この実施形態では、正極1および負極2の両方がウエルの底部3に存在する。この実施形態では、ウエルの

40

50

側面 4 および底部 3 が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル 5 は、細胞 6 ならびに正極 1 および負極 2 を覆うようにされる。

【図 2 C】図 2 C は、ウエルにおける別の電極配置を示す。ウエルは、ウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 (この場合には正極として示される) と、ウエルの底部 4 における第 2 の電極 3 (この場合には負極として示される) と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料 5 の細片と、ウエルの底部での細胞 6 とを有する。1 個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面 2 は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物 (ITO) などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部 4 における細胞 6 および第 2 の電極 3 を完全に覆うために、そしてウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 に達するために十分な流体レベル 7 とともに示される。ウエルは、図 2 A に関して実際の大きさ比率で描かれていない。この実施形態では、正極 1 および負極 2 の両方がウエルの底部 3 に存在する。この実施形態では、ウエルの側面 4 および底部 3 が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル 5 は、細胞 6 ならびに正極 1 および負極 2 を覆うようにされる。

10

【図 3】図 3 は、第 1 の電極 2 および第 2 の電極 3 が交互にかみ合い、ガラス基体 4 の表面における導電性材料の層に化学的にエッチングされている本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 1 を示す。ウエルは、一般には、直径が 3 mm の円形である。電極は、幅が 10 μm であり、160 μm の間隔を有する。第 1 の電極 2 または第 2 の電極 3 のいずれかが正極として機能し得る。電極の幅および電極間隔は変化させることができる。幅は、好ましくは 1 μm から 10 μm の間であり、電極間隔は、好ましくは 5 μm から 160 μm である。特に好ましい実施形態では、電極間隔は、少なくとも、真核生物細胞の典型的な直径と同じくらい大きさである (すなわち、約 40 μm から 50 μm) 。

20

【図 4 A】図 4 A および図 4 B は、ウエルフレームを基体を取り付けることによってウエルが形成される実施形態を例示する。図 4 A は、開口部 2 が基体 3 におけるウエルを形成するウエルフレーム 1 (この場合、ウエルフレーム 1 が (例えば、所定位置に接着することによって) 基体 3 に取り付けられる) と、パネ押し接点 6 を有する接触ガイドプレート 5 と、印刷回路ボード (PCB) 7 とを含有する実施形態の分解図を示す。基体ホルダー 4 が、組み立てられたデバイスを顕微鏡または蛍光プレート読み取り装置などの測定装置 (示されず) において所定位置に保持するために使用される。PCB 7 は、電極 (示されず) がパルス発生器 (示されず) に連結され得る接続部を含有する。

30

【図 4 B】図 4 A および図 4 B は、ウエルフレームを基体を取り付けることによってウエルが形成される実施形態を例示する。図 4 B は組み立て後の図を示す。

【図 5】図 5 は、実質上のウエルを含有する基体に形成された交互にかみ合う電極の配置を示す。実質上のウエルは本明細書中においてさらに説明される。

【図 6】図 6 は、2 つの実質的に平行するプレート 1 が、試験される細胞 3 を含有する流体液滴がその間に挟まれる導電性層 2 でコーティングされたそれらの向き合う表面を有する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエルを示す。一方の導電性層が正極 (この場合には上部導電層 4) であり、一方、反対側の導電性層が負極 (この場合には下部導電層 5) である。当然のことではあるが、これらの電極特性は逆にすることができ、この場合、上部の導電性層が負極であり、下部の導電性層が正極である。この実施形態のいくつかの変形では、プレートはガラスであり、導電性層はインジウムスズ酸化物 (ITO) である。導電性層は、好ましくは、厚さが約 200 から 2,000 であるか、または約 500 から 1,500 であるか、または約 800 から 1,200 である。

40

【図 7】図 7 は、電極の一方が、平坦な基体 1 の表面における導電性材料の薄い被覆物 2 であり、ウエルの底部 10 を形成する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 3 を示す。もう一方の電極 7 が上方からウエル 3 に進入し、ウエル 3 内の流体 5 と接触する。電極 7 は切開図で示される。電極 7 は、絶縁体 6 によって囲われている中心の導電性材料部分 8 を含有する。簡略化のために、1 個の細胞 4 がウエル内に示される。一般には、少なく

50

とも 10^5 個の細胞がウエルに存在する。導電性層は、好ましくは、厚さが約 200 から 2,000 であるか、または約 500 から 1,500 であるか、または約 800 から 1,200 である。

【図 8】図 8 は、ウエル 4 の底部が、細胞を増殖させることができるフィルターメンブロン 12 である本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 4 を示す。簡略化のために、1 個の細胞 8 がフィルターメンブロン 12 の上に示される。ウエル 4 は、ガラスの底部 1 を有し、かつ第 1 の流体 3 で満たされるトラフ 2 に設置される。一方の電極 7 が上方からウエル 4 に進入し、ウエル 4 内の第 2 の流体 5 と接触する。電極 7 は、絶縁体 6 によって囲まれ、パルス発生器（示されず）に第 1 のリード線 9 によって接続される中心の導電性材料部分を含む。第 2 の電極 11 が、第 1 の流体 3 内に配置され、パルス発生器に第 2 のリード線 10 によって接続される。第 2 の電極 11 は切開図で示される。第 2 の電極 11 は、実際には、ウエル 4 の底部に円を形成する。第 1 の電極 7 が正極であり、一方、第 2 の電極 11 が負極であるか、または第 1 の電極 7 が負極であり、一方、第 2 の電極 11 が正極であるかのいずれかである。

【図 9 A】図 9 A は、正極 5 および負極 8 の両方が上方からウエル 2 に進入する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 2 を示す。ウエル 2 は、1 個の細胞 9 が示される流体 3 を含む。一般には多数の細胞がウエル 2 に存在する。正極 5 はパルス発生器（示されず）に正極リード線 6 によって接続される。負極 8 はパルス発生器に負極リード線 7 によって接続される。両方の電極は絶縁体 4 に埋め込まれる。正極 5 および負極 8 は、正極 5 および負極 8 が、ウエル 2 の底部を形成するガラスプレート 1 に対して一般には直角であるように、絶縁体 4 の内部を横切る。しかし、正極 5 および負極 8 が絶縁体 4 の底部 10 から出るとき、正極 5 および負極 8 は、正極 5 および負極 8 が絶縁体 4 の底部 10 に存在し、かつ平行するように 90° の角度にそれぞれが曲げられる。

【図 9 B】図 9 B は、ウエル 2 の底部を形成するガラスプレート 1 から上を見た図であり、絶縁体 4 の底部にある正極 5 および負極 8 の曲げられた部分の配置を示す。

【図 10 A】図 10 A は、正極 5 および負極 8 の両方が上方からウエル 2 に進入し、正極 5 および負極 8 が同軸ケーブルの様式と類似する様式で配置される本発明の実施形態を示す。正極 5 が絶縁体 4 に埋め込まれ、負極 8 が絶縁体 4 の外側を覆っている。正極 5 はパルス発生器（示されず）に正極リード線 6 によって接続される。負極 8 はパルス発生器に負極リード線 7 によって接続される。ウエル 2 は、1 個の細胞 9 が示される流体 3 を含む。だが、一般には多数の細胞がウエル 2 に存在する。ガラスプレート 1 はウエル 2 の底部を形成する。

【図 10 B】図 10 B は、正極 5 および負極 8 の下から上を見た図を示す。

【図 11】図 11 は、図 8 に示される実施形態に類似する本発明の実施形態を示すが、図 11 では、上方からウエルに進入する電極 7 が絶縁体によって囲まれず、代わりに、ピペットチップ 6 内に存在し、ウエル 4 内の第 1 の流体 5 に関して同時に存在するピペットチップ 6 内の第 1 の流体 5 とともに接触する。この配置は、電極 7 の端部での領域において第 1 の流体 5 における気泡の形成を最小限に抑えるという利点を有する。ウエル 4 の底部は、細胞を増殖させることができるフィルターメンブロン 12 である。簡略化のために、1 個の細胞 8 がフィルターメンブロン 12 の上に示される。ウエル 4 が、ガラスの底部 1 を有し、かつ第 2 の流体 3 で満たされるトラフ 2 に位置する。電極 7 がパルス発生器（示されず）に第 1 のリード線 9 によって接続される。第 2 の電極 11 が、第 2 の流体 3 の中に配置され、パルス発生器に第 2 のリード線 10 によって接続される。第 2 の電極 11 は切開図で示される。第 2 の電極 11 は、実際には、ウエル 4 の底部に円を形成する。いずれかの電極が正極または負極であり得る。

【図 12 A】図 12 A から B は、一方の電極が上方から進入し、その一方で、もう一方の電極がウエルの底部を形成するという点で、図 7 の実施形態に類似する実施形態を示す。図 12 A は、一方の電極 1 が、ウエル 2 の底部を形成する導電性材料（ITO など）の層である、96 ウエルマイクロタイタープレートである基体を示す側面断面図である。もう一方の電極 3 が上方からウエルに進入し、ウエル内の流体と接触する（流体は示されず）

。電極は電氣的パルス発生器 4 にリード線 5 によって接続される。いずれかの電極が正極または負極であり得る。別の実施形態は、示されている実施形態に類似するが、標準的な 9 6 ウエルプレート、3 8 4 ウエルプレート、1 5 3 6 ウエルプレートまたは 3 4 5 6 ウエルプレートの底部を、一方の電極を形成する導電性材料 (ITO など) で置き換えることである。第 2 の電極が上方から各ウエルの中に下げられる。ITO 電極に対する接触を、電気伝導性の銀エポキシドによって、または ITO の底部から白金ワイヤへの接触としての 1 つ置きウエルに 3 M K C l (もしくは類似する塩溶液) を入れることによって行うことができる。

【図 1 2 B】図 1 2 B は基体の上面図を示す。

【図 1 3 A】図 1 3 A から B は、実質上のウエルを含有する 2 つのマルチウエル基体を含む実施形態を示す。図 1 3 A は、底部基体 2 に近づく上部基体 1 を示す側面断面図である。上部電極 3 は、ITO などの導電性材料から作製され、上部基体 1 の実質上のウエル 4 の底部を形成する。同様に、底部電極 5 は、ITO などの導電性材料から作製され、底部基体 2 の実質上のウエル 6 の底部を形成する。テフロン (登録商標) または類似する疎水性材料の薄い層 1 1 が基体上の導電性材料の表面を覆う。テフロン (登録商標) を有しない基体の表面の円形領域は比較的親水性であり、実質上のウエルを形成する。テフロン (登録商標) 層は厚さが約 0.5 μm から 100 μm である。上部電極 3 および底部電極 5 は電氣的パルス発生器 6 にリード線 7 によって接続される。装置の最も左側のウエルが、液体の液滴を含有して示される。上部液滴 8 は、試験される薬物または化合物などの物質を含有することができ、一方、底部液滴 9 は、電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞を含有することができる。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、上部基体 1 および底部基体 2 が十分に近くに移動して、その結果、上部液滴 8 および底部液滴 9 が混合された後の装置を示す。10 は、上部基体 1 および底部基体 2 を整列するために役立ち、かつ液滴を混合するために適切な距離を離して基体を保つスペーサー (図 1 3 A では示されず) である。

【図 1 4】細胞の電場刺激の原理を例示する。

【図 1 5】図 1 5 は、一方の電極が上方 1 からウエルに進入し、一方、第 2 の電極が、高導電性の金属接地グリッド 4 と接触している透明な基体 3 の透明な ITO 被覆底部 2 から形成される実施形態に由来する 2 つのウエルを示す。矢じりを伴う破線は、電流が、どのように、上方 1 から進入する電極から、緩衝化塩溶液 5 および細胞 6 を通って、そして ITO 層 2 および金属接地グリッド 4 を通って流れるかを例示する。基体 3 内の矢 7 は、検出システム (示されず) において使用される光源からの光が、どのように、上方向に、透明な基体 3 および ITO 層 2 を通って細胞 6 に入り、その後、蛍光として細胞 6 によって再放射され、下方向に通過して検出器 (示されず) に至るかを例示する。ウエルを ITO 被覆基体 3 に取り付けるために使用することができる、必要に応じて使用される接着シール 8 が示される。ITO 層の厚さは、好ましくは、約 200 から 2,000、約 500 から 1,500、または約 800 から 1,200 である。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、ウエルの底部を形成する ITO などの導電性層 1 を有するマルチウエル実施形態の 2 つのウエルを示す。正極 2 が上方から左ウエル 3 に進入し、一方、負極 4 が上方から右ウエル 5 に進入する。ITO などの導電性材料の透明な層 1 が、ガラスなどの透明な基体 7 を覆う。矢じりを伴う点線は、電流が流れる経路を示す。当然のことではあるが、正極および負極の実体は逆にすることができる。細胞 8 がウエル内の流体 9 の中に示される。ウエルを ITO 被覆基体 7 に取り付けるために使用することができる、必要に応じて使用される接着シール 10 が示される。光路が基体内の矢によって示される。

【図 1 6 B】図 1 6 B は、正極 2 および負極 4 がどのようにパルス発生器 11 に接続されるかを例示する、この実施形態の側面切開図を示す。透明な基体 7 を覆う透明な導電性の層 6 もまた示される。

【図 1 6 C】図 1 6 C は、正極および負極の交互パターンを例示する実施形態の上面図を示す。

【図16D】図16Dは、一部が解体されているこの実施形態の写真である。ウエルが、ITOでコーティングされているガラス基体13に取り付けられるウエルフレーム12によって形成される。通常の操作時には、基体により、すべてのウエルが覆われる。例示目的のために、この図では、基体の一部のみが示されている。

【図17】図17は、図16に示される実施形態に類似する本発明の実施形態から得られたデータのグラフ表示を示す。データは、ヒト1H T型電位依存性カルシウムチャンネル(GenBankアクセション番号AF073931)を発現させるためにトランスフェクションされているHEK293細胞内へのCa²⁺の流入を表す。Ca²⁺の流入が、T型チャンネルが開いたときに生じ、そして480nmで励起されたカルシウム指示薬色素Fluo4の520nmから560nmにおける蛍光放射を検出することによって測定された。示された時点で、事前に選択された電圧が電極を介して加えられた。これはT型チャンネルの一部を開口させ、Ca²⁺の流入を可能にした。これは、カルシウム指示薬色素Fluo4による520nmから560nmにおける蛍光放射の急激な上昇を生じさせた。この急激な上昇は、示されるように徐々に減衰した。

【図18A】図18AからBは、ヒトPN3ナトリウムチャンネルをコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図18B】図18AからBは、ヒトPN3ナトリウムチャンネルをコードするヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図18C】図18Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号2)を示す。GenBankアクセション番号AF117907に由来する。

【図19A】図19AからBは、ヒトT型カルシウムチャンネルの1Hサブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

【図19B】図19AからBは、ヒトT型カルシウムチャンネルの1Hサブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号3)を示す。

【図19C】図19Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号4)を示す。GenBankアクセション番号AF073931に由来する。

【図20A】図20AからBは、ヒトN型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットのスプライス変化体をコードするヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。

【図20B】図20AからBは、ヒトN型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットのスプライス変化体をコードするヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。

【図20C】図20Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号6)を示す。GenBankアクセション番号M94172に由来する。

【図21A】図21AからBは、ヒトN型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットのスプライス変化体をコードするヌクレオチド配列(配列番号7)を示す。

【図21B】図21AからBは、ヒトN型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットのスプライス変化体をコードするヌクレオチド配列(配列番号7)を示す。

【図21C】図21Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号8)を示す。GenBankアクセション番号M94173に由来する。

【図22A】図22AからBは、ヒトカルシウムチャンネル1Aイソ型の1A-1サブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号9)を示す。

【図22B】図22AからBは、ヒトカルシウムチャンネル1Aイソ型の1A-1サブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号9)を示す。

【図22C】図22Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号10)を示す。GenBankアクセション番号AF004884に由来する。

【図23A】図23AからBは、ヒトカルシウムチャンネル1Aイソ型の1A-2サブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号11)を示す。

【図23B】図23AからBは、ヒトカルシウムチャンネル1Aイソ型の1A-2サブユニットをコードするヌクレオチド配列(配列番号11)を示す。

【図23C】図23Cはその対応するアミノ酸配列(配列番号12)を示す。GenBankアクセション番号AF004883に由来する。

10

20

30

40

50

【図 2 4】図 2 4 は、とりわけ、コンピューター、電圧発生器、増幅器、メンブラン底部ウエル、共通トラフおよび蛍光検出器を用いる E F S システムの 1 つの実施形態の概略図を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、9 6 ウエルトレーとの使用のために特に適合化された電極ヘッド実施形態を示す写真である。

【図 2 6】図 2 6 は、図 2 5 に示される電極ヘッド実施形態と組み合わせて使用されるトラフ実施形態を示す写真である。

【図 2 7】図 2 7 は、マルチスクリーンウエルトレーがその間に配置される図 2 6 のトラフ実施形態を示す写真である。

【図 2 8】図 2 8 は、組み立てられた電極ヘッド、トラフおよびマルチスクリーンを示す写真である。 10

【図 2 9】図 2 9 は、図 2 8 に示される実施形態に類似する本発明の実施形態から得られたデータのグラフ表示を示す。データは、ヒト P N 1 電位依存性ナトリウムチャンネルを発現させるためにトランスフェクションされている H E K 2 9 3 細胞の膜電位変化を表す。各プロットは 9 6 ウエルプレートの横一列 (1 2 ウエル) A から H を表す。9 6 ウエルプレートのデータの各縦列は V I P R (商標) で 1 5 秒間取得された。刺激パルスプロトコルがデータ取得時に下記のように加えられた：2 秒のベースラインの後、2 m s の方形パルス、振幅 = 2 0 m A、振動数 = 1 0 H z、持続時間 = 5 s。

【図 3 0】図 3 0 は、図 2 9 に示されるデータの最大比率変化の棒グラフ表示である。1 μ M の T T X (テトロドトキシン (T T X) 感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルの特異的かつ強力な阻害剤) が、E 1、F 1、G 1、H 1、A 1 2、B 1 2、C 1 2 および D 1 2 のウエルに存在する。さらに、ウエル A 1 1 には、T T X 感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルを阻止するための内部標準物が含有される。Z スコアは、標準偏差の和により除された非阻害シグナルおよび阻害シグナルの差の尺度である。 20

【図 3 1】図 3 1 は、H E K 2 9 3 / P N 1 細胞における E F S 刺激による脱分極シグナルに対する T T X (上パネル) および化合物 A (下パネル) の濃度を増大したときの影響を示す。これらの実験で得られた $I C_{50}$ は、他の技術により得られた $I C_{50}$ と匹敵する。大きいヒル係数 (n H) が刺激プロトコルの閾值的性質から得られる。

【図 3 2】図 3 2 は、別の実施形態を示す写真である。図 3 2 には、図 2 5 に示される電極ヘッドに類似する電極ヘッド、および銅電極プレートが示される。この実施形態は、C a c o - 2 マルチスクリーン (M i l l i p o r e、B e d f o r d、M A) との使用のために特に適合化されている。 30

【図 3 3】図 3 3 は、銅電極プレートが、導電性ピンを示すために裏返しにされていることを除いて、図 3 2 に示される写真に類似する写真である (注：ピンは頁から読者の方に向かって延びている)。

【図 3 4】図 3 4 は、組み立てられた C a c o - 2 メンブラン底部ウエルおよび受器トレーに置かれた銅電極プレートを示す写真である。

【図 3 5】図 3 5 は、図 3 4 の組み立てられた実施形態 (すなわち、電極ヘッド、ピンを伴う銅電極プレート、C a c o - 2 メンブラン底部ウエル、および C a c o - 2 受器トレー) を示す写真である。 40

【図 3 6 A】図 3 6 は、2 つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 A はこの新規な電極実施形態の拡大図を示す。

【図 3 6 B】図 3 6 は、2 つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 B は、同心状のリード線に電氣的に接続された新規な電極実施形態を示す。

【図 3 6 C】図 3 6 は、2 つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 C は、端リード線に電氣的に接続された新規な電極実施形態を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kath, Gary S.
 McManus, Owen
 Garyantes, Tina
 Bennett, Paul B., Jr.
 Imredy, John P.
 Augustine, Paul R.
 Bugianesi, Randal M.

<120> ELECTRICAL FIELD STIMULATION OF
 EUKARYOTIC CELLS

<130> 20794-PCT

10

<150> 60/304,955

<151> 2001-07-12

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5874

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

```

atggaattcc ccattggatc cctcgaaact aacaacttcc gtcgctttac tccggagtca      60
ctgggtggaga tagagaagca aattgctgcc aagcaggaa caaagaaagc cagagagaag      120
catagggagc agaaggacca agaagagaag cctcggcccc agctggactt gaaagcctgc      180
aaccagctgc ccaagttcta tgggtagctc ccagcagaac tgatcgggga gccctgggag      240
gatctagatc cgttctacag cacacaccgg acatttatgg tgctgaaca aggaggacc      300
atctcccggt ttagtgccac tcgggccctg tggctattca gtcttttcaa cctgatcaga      360
agaacggcca tcaaagtgtc tgtccactcg tggttcagtt tatlatttac ggtcactatt      420
ttggttaatt gtgtgtgcat gaccocgaact gaccttccag agaaaattga atatgtcttc      480
actgtcattt acacctttga agccttgata aagatactgg caagaggatt ttgtctaaat      540
gagttcacgt acctgagaga tccttggaaac tggctggatt ttaccgtcat taccctggca      600
tatgtttgca cagcaataga tctccgtggg atctcaggcc tcgggacatt cagagttctt      660
agagcattaa aaacagtttc tgtgatccca ggcctgaagg tcattgtggg ggcctgatt      720
cactcagtga agaaactggc tgatgtgacc atcctcacca tcttctgcct aagtgttttt      780
gccttgggtg ggctgcaact cttcaagggc aacctcaaaa ataaatgtgt caagaatgac      840
atggctgtca atgagacaac caactactca tctcacagaa aaccagatat ctacataaat      900
aagcagggca cttctgacct cttactgtgt ggcaatggat ctgactcagg ccactgccct      960
gatggttata tctgccttaa aacttctgac aaccocggatt ttaactacac cagctttgat     1020
tcttttgctt gggctttcct ctcactgttc cgctcatga cacaggattc ctgggaacgc     1080
ctctaccagc agacctgag gacttctggg aaaatctata tgatcttttt tgtgctcgta     1140
atcttctctg gatctttcta cctggtaaac ttgatcttgg ctgtagtcac catggcgtat     1200
gaggagcaga accaggcaac cactgatgaa attgaagcaa aggagaagaa gttccaggag     1260
gccctcgaga tgctccggaa ggagcaggag gtgctagcag cactagggat tgacacaacc     1320
tctctccact cccacaatgg atcaccttca acctcaaaa atgccagtga gagaaggcat     1380
agaataaagc caagagtgtc agagggtctc acagaagaca acaaatcacc ccgctctgat     1440
ccttacaacc agcgcaggat gtcttttcta ggcctcgct ctggaaaacg ccgggctagt     1500
catggcagtg tgttccattt ccgggtccct ggccgagata tctcactccc tgaggaggct     1560
acagatgatg gactctttcc tggagaccac gaaagccatc ggggctctct gctgctgggt     1620
gggggtgctg gccagcaagg cccctccct agaagccctc tctctcaacc cagcaacct     1680
gactccaggc atggagaaga tgaacaccaa ccgcccacca ctagttagct tgcccctgga     1740
gctgtogatg tctcggcatt cgatgcagga caaaagaaga ctttcttgtc agcagaatac     1800
ttagatgaac ctttccgggc ccaaagggca atgagtgttg tcagtatcat aacctccgtc     1860
cttgaggaac tcgaggagtc tgaacagaag tgcccacct gcttgaccag cttgtctcag     1920

```

20

30

```

aagtatctga tctgggattg ctgccccatg tgggtgaagc tcaagacaat tctctttggg 1980
cttgtgacgg atccctttgc agagctcacc atcaccttgt gcatecgtggt gaacaccatc 2040
ttcatggcca tggagcacca tggcatgagc cctaccttcg aagccatgct ccagataggc 2100
aacatcgtct ttaccatatt ttttactgct gaaatggtct tcaaaatcat tgccctcgac 2160
ccatactatt atttccagaa gaagtggaaat atctttgact gcatacatcgt cactgtgtgag 2220
ctgctagagg tgggcgttgg caagaaggga agccctgtctg tgctgctggag ctcccgcttg 2280
ctgctgctat tcaagctggc caaatcctgg cccaccttaa acacactcat caagatcatc 2340
ggaaactcag tgggggact gggaacctc accatcatcc tggccatcat tbtctttgtc 2400
tttgcctcgg ttggcaagca gctcctaggg gaaaactacc gtaacaaccg aaaaaatate 2460
tcccgcccc atgaagactg gccccgctgg cccacttcca acttcttcca ctctttcctc 2520
attgtcttcc gtatcctctg tggagagtgg attgagaaca tgtgggcctg catggaagtt 2580
ggccaaaaat ccatatgcct catccttttc ttgacggtga tgggtgctagg gaacctggtg 2640
tccgcttaacc tgttcatcgc cctgctattg aactctttca gtgctgacaa cctcacagcc 2700
ccggaggagc atggggaggt gaacaacctg cagggtggccc tggcacggat ccaggtcttt 2760
ggccatcgta ccaaacaggc tctttgcagc ttcttcagca ggtcctgccc attccccag 2820
cccaaggcag agctcagct ggtggtgaaa ctccactct ccagctccaa ggctgagaac 2880
cacattgctg ccaaacctgc cagggggagc tctggagggc tccaagctcc cagaggcccc 2940
agggatgagc acagtgcatt catcgctaatt ccgactgtgt gggctctctgt gccatttgt 3000
gagggatgaa ctgatcttga tgacttggag gatgatggtg ggaagatgc tcagagcttc 3060
ctgacagcag tgatcccaa aggacagcag gaccagctgc agcaagtcca gaggtgtggg 3120
gaccacctga caccaggag ccaggcact ggaacatctt ctgaggacct ggtccatcc 3180
ctgggtgaga cgtggaaga tgagtctgtt cctcaggccc ctgctgagg agtggaagc 3240
acaagctccc ctgagggcag cacggtggac tgcctagatc ctgaggaat cctgaggaag 3300
atccctgagc tggcagatga cctggaagaa ccagatgact gottcacaga aggatgcatt 3360
cgccactgtc cotgctcaaa actggatacc accaagatgc catgggatgt gggctggcag 3420
ctgcgcaaga cttgctaccg tatcgtggag cacagctggg tgagagctt catcatctt 3480
atgatcctgc tcagcagtg atctctggcc tttgaagact attacctgga ccagaagccc 3540
acggtgaaag ctttgcctga gtacactgac aggtctctca cctttatctt tgtgttcgag 3600
atgctgctta tttgggtggc ctatggcttc tctatgctca tcaccaatgc ctgggtgctg 3660
ctggacttcc tcattgtgaa tatctcactg ataagtctca cagcgaagat tctggaatat 3720
tctgaagtgg ctccccataa agcccttoga acccttcggg ctctcggccc actgccccct 3780
ctttctcgat ttgaaggcat gcgggtggtg gtggatgccc tgggtgggccc catcccattc 3840
atcatgaatg tctcctcctg tctgctcabc tctggctca tcttcagcat catgggtgtg 3900
aacctcttct cagggaaagt ttggagggtc atcaactata ccgatggaga gttttccctt 3960
gtacctttgt cgattgtgaa taacaagtct gactgcaaga ttcaaaactc cactggcagc 4020
ttctctctgg tcaatgtgaa agtcaacttt gataatggtt caatgggta ccttgcaact 4080
ctgcaggtgg caacctttaa aggtcggatg gacattatgt atgcagctgt tgattccccg 4140
gaggtcaaca tgcaacccaa gtggggaggc aacgtgtaca tgtatttga ctttgtcatc 4200
ttcatcattt ttggaggctt cttcacactg aatctctttg ttggggtcat aattgacaac 4260
ttcaatcaac agaaaaaaaaa gttagggggc caggacatct tcatgacaga ggagcagaag 4320
aaatactaca atgccatgaa gaagtggggc tccaagaagc ccagaaagcc catccccagg 4380
ccctgaaca agttccaggg ttttgtcttt gacatcgtga ccagacaagc ttttgacatc 4440
accatcatgg tctctatctg cctcaacatg atcaccatga tgggtggagc tgatgaccaa 4500
agtgaagaaa agacgaaaat tctgggcaaa atcaaccagt tctttgtggc cgtcttcaca 4560
ggcgaatggt tcatgaagat gttcgctttg aggcagctac acttcacaaa tggctggaat 4620
gtgtttgact tcaattgtgt ggttctctcc attgcgagcc tgattttttc tgcaattctt 4680
aagtcaactc aaagttaact ctccccaaag ctcttcagag tcatccgctt ggccccgaat 4740
ggccgcaccc tcagactgat ccgagcggcc aaggggatcc gcacactgct ctttgcctc 4800
atgatgtccc ctccctgccct cttcaacatc gggctgttgc tattccttgt catgttcac 4860
tactccatct tcggtatgtc cagctttccc catgtgaggt gggaggtctg catcgacgac 4920
atgttcaact tccagacctt cgccaacagc atgctgtgcc tcttcagat taccacgtc 4980
gocgctggg atggootcct cagccccatc ctcaacacag ggcccccta ctgtgaccc 5040
aatctgcccc acagcaatgg caccagaggg gactgtggga gccagccgt aggcacatc 5100
ttcttcacca cctacatcat catctccttc ctcatcgtgg tcaacatgta cattgcagtg 5160
attctggaga acttcaatgt ggccacggag gagagcactg agcctctgag tgaggacgac 5220
tttgacatgt tctatgagac ctgggagaag tttgaccag aggccactca gtttataacc 5280
ttttctgctc tctcggactt tgcagacact ctctctggtc ccctgagaat cccaaaaacc 5340
aatcgaaata tactgatcca gatggacctg cctttggtcc ctggagataa gatccactgc 5400
ttggacatcc tttttgcttt caccaagaat gtcctaggag aatccgggga gttggattct 5460
ctgaaggcaa atatggagga gaagtttatg gcaactaatc tttcaaatc atcctatgaa 5520
ccaatagcaa ccactctccg atggaagcaa gaagacattt cagccactgt cattcaaaag 5580
gcctatcgga gctatgtgct gcaccgctcc atggcactct ctaaacaccc atgtgtgccc 5640

```

10

20

30

```

agagctgagg aggaggctgc atcactccca gatgaaggtt ttgttgcatc cacagcaaat 5700
gaaaattgtg tactcccaga caaatctgaa actgcttctg ccacatcatt cccaccgtcc 5760
tatgagagtg tcaactagagg ccttagtgat agagtcaaca tgaggacatc tagctcaata 5820
caaatgaag atgaagccac cagtatggag ctgattgcc  ctgggccccta gtga 5874

```

```

<210> 2
<211> 1956
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```
<400> 2
```

```

Met Glu Phe Pro Ile Gly Ser Leu Glu Thr Asn Asn Phe Arg Arg Phe
 1          5          10          15
Thr Pro Glu Ser Leu Val Glu Ile Glu Lys Gln Ile Ala Ala Lys Gln
 20          25          30
Gly Thr Lys Lys Ala Arg Glu Lys His Arg Glu Gln Lys Asp Gln Glu
 35          40          45
Glu Lys Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Lys Ala Cys Asn Gln Leu Pro
 50          55          60
Lys Phe Tyr Gly Glu Leu Pro Ala Glu Leu Ile Glu Gly Glu Pro Leu Glu
 65          70          75
Asp Leu Asp Pro Phe Tyr Ser Thr His Arg Thr Phe Met Val Leu Asn
 85          90          95
Lys Gly Arg Thr Ile Ser Arg Phe Ser Ala Thr Arg Ala Leu Trp Leu
100          105          110
Phe Ser Pro Phe Asn Leu Ile Arg Arg Thr Ala Ile Lys Val Ser Val
115          120          125
His Ser Trp Phe Ser Leu Phe Ile Thr Val Thr Ile Leu Val Asn Cys
130          135          140
Val Cys Met Thr Arg Thr Asp Leu Pro Glu Lys Ile Glu Tyr Val Phe
145          150          155
Thr Val Ile Tyr Thr Phe Glu Ala Leu Ile Lys Ile Leu Ala Arg Gly
165          170          175
Phe Cys Leu Asn Glu Phe Thr Tyr Leu Arg Asp Pro Trp Asn Trp Leu
180          185          190
Asp Phe Ser Val Ile Thr Leu Ala Tyr Val Gly Thr Ala Ile Asp Leu
195          200          205
Arg Gly Ile Ser Gly Leu Arg Thr Phe Arg Val Leu Arg Ala Leu Lys
210          215          220
Thr Val Ser Val Ile Pro Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Ala Leu Ile
225          230          235
His Ser Val Lys Lys Leu Ala Asp Val Thr Ile Leu Thr Ile Phe Cys
245          250          255
Leu Ser Val Phe Ala Leu Val Gly Leu Gln Leu Phe Lys Gly Asn Leu
260          265          270
Lys Asn Lys Cys Val Lys Asn Asp Met Ala Val Asn Glu Thr Thr Asn
275          280          285
Tyr Ser Ser His Arg Lys Pro Asp Ile Tyr Ile Asn Lys Arg Gly Thr
290          295          300
Ser Asp Pro Leu Leu Cys Gly Asn Gly Ser Asp Ser Gly His Cys Pro
305          310          315
Asp Gly Tyr Ile Cys Leu Lys Thr Ser Asp Asn Pro Asp Phe Asn Tyr
325          330          335
Thr Ser Phe Asp Ser Phe Ala Trp Ala Phe Leu Ser Leu Phe Arg Leu
340          345          350
Met Thr Gln Asp Ser Trp Glu Arg Leu Tyr Gln Gln Thr Leu Arg Thr
355          360          365
Ser Gly Lys Ile Tyr Met Ile Phe Phe Val Leu Val Ile Phe Leu Gly
370          375          380
Ser Phe Tyr Leu Val Asn Leu Ile Leu Ala Val Val Thr Met Ala Tyr

```

10

20

30

Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Glu	Asp	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Val
			900					905					910		
Ala	Leu	Ala	Arg	Ile	Gln	Val	Phe	Gly	His	Arg	Thr	Lys	Gln	Ala	Leu
		915					920					925			
Cys	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Ser	Cys	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Lys	Ala	Glu
	930					935					940				
Pro	Glu	Leu	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Glu	Asn
	945				950					955					960
His	Ile	Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Gln	Ala
				965					970					975	
Pro	Arg	Gly	Pro	Arg	Asp	Glu	His	Ser	Asp	Phe	Ile	Ala	Asn	Pro	Thr
			980					985					990		
Val	Trp	Val	Ser	Val	Pro	Ile	Ala	Glu	Gly	Glu	Ser	Asp	Leu	Asp	Asp
		995					1000					1005			
Leu	Glu	Asp	Asp	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Gln	Glu	Val
	1010					1015						1020			
Ile	Pro	Lys	Gly	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Gln	Val	Glu	Arg	Cys	Gly
	1025				1030						1035				1040
Asp	His	Leu	Thr	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Glu	Asp
				1045					1050					1055	
Leu	Ala	Pro	Ser	Leu	Gly	Glu	Thr	Trp	Lys	Asp	Glu	Ser	Val	Pro	Gln
			1060					1065					1070		
Ala	Pro	Ala	Glu	Gly	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Glu	Gly	Ser	Thr
		1075					1080					1085			
Val	Asp	Cys	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Ile	Pro	Glu	Leu
	1090					1095					1100				
Ala	Asp	Asp	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Asp	Cys	Phe	Thr	Glu	Gly	Cys	Ile
	1105				1110					1115					1120
Arg	His	Cys	Pro	Cys	Cys	Lys	Leu	Asp	Thr	Thr	Lys	Ser	Pro	Trp	Asp
				1125					1130					1135	
Val	Gly	Trp	Gln	Val	Arg	Lys	Thr	Cys	Tyr	Arg	Ile	Val	Glu	His	Ser
			1140					1145					1150		
Trp	Phe	Glu	Ser	Phe	Ile	Ile	Phe	Met	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Ser
	1155						1160						1165		
Leu	Ala	Phe	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Gln	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Ala
	1170					1175					1180				
Leu	Leu	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Phe	Ile	Phe	Val	Phe	Glu
	1185				1190					1195					1200
Met	Leu	Leu	Lys	Trp	Val	Ala	Tyr	Gly	Phe	Lys	Lys	Tyr	Phe	Thr	Asn
				1205					1210					1215	
Ala	Trp	Cys	Trp	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Val	Asn	Ile	Ser	Leu	Ile	Ser
			1220					1225					1230		
Leu	Thr	Ala	Lys	Ile	Leu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Val	Ala	Pro	Ile	Lys	Ala
		1235					1240					1245			
Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Phe
	1250				1255						1260				
Glu	Gly	Met	Arg	Val	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Ile	Pro	Ser
	1265				1270					1275				1280	
Ile	Met	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Phe	Trp	Leu	Ile	Phe	Ser
				1285					1290					1295	
Ile	Met	Gly	Val	Asn	Leu	Phe	Ala	Gly	Lys	Phe	Trp	Arg	Cys	Ile	Asn
			1300					1305					1310		
Tyr	Thr	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Ile	Val	Asn	Asn
		1315					1320					1325			
Lys	Ser	Asp	Cys	Lys	Ile	Gln	Asn	Ser	Thr	Gly	Ser	Phe	Phe	Trp	Val
	1330					1335						1340			
Asn	Val	Lys	Val	Asn	Phe	Asp	Asn	Val	Ala	Met	Gly	Tyr	Leu	Ala	Leu
	1345				1350					1355					1360
Leu	Gln	Val	Ala	Thr	Phe	Lys	Gly	Trp	Met	Asp	Ile	Met	Tyr	Ala	Ala
				1365					1370					1375	
Val	Asp	Ser	Arg	Glu	Val	Asn	Met	Gln	Pro	Lys	Trp	Glu	Asp	Asn	Val

10

20

30

Tyr Met Tyr 1380 Phe Val Ile 1385 Phe Gly 1390 Phe Phe
 1395 1400 1405
 Thr Leu Asn Leu Phe Val Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln
 1410 1415 1420
 Lys Lys Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys
 1425 1430 1435
 Lys Tyr Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Ser Lys Lys Pro Gln Lys
 1445 1450 1455
 Pro Ile Pro Arg Pro Leu Asn Lys Phe Gln Gly Phe Val Phe Asp Ile
 1460 1465 1470
 Val Thr Arg Gln Ala Phe Asp Ile Thr Ile Met Val Leu Ile Cys Leu
 1475 1480 1485
 Asn Met Ile Thr Met Met Val Glu Thr Asp Asp Gln Ser Glu Glu Lys
 1490 1495 1500
 Thr Lys Ile Leu Gly Lys Ile Asn Gln Phe Phe Val Ala Val Phe Thr
 1505 1510 1515
 Gly Glu Cys Val Met Lys Met Phe Ala Leu Arg Gln Tyr Tyr Phe Thr
 1525 1530 1535
 Asn Gly Trp Asn Val Phe Asp Phe Ile Val Val Val Leu Ser Ile Ala
 1540 1545 1550
 Ser Leu Ile Phe Ser Ala Ile Leu Lys Ser Leu Gln Ser Tyr Phe Ser
 1555 1560 1565
 Pro Thr Leu Phe Arg Val Ile Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu
 1570 1575 1580
 Arg Leu Ile Arg Ala Ala Lys Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu
 1585 1590 1595
 Met Met Ser Leu Pro Ala Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu
 1605 1610 1615
 Val Met Phe Ile Tyr Ser Ile Phe Gly Met Ser Ser Phe Pro His Val
 1620 1625 1630
 Arg Trp Glu Ala Gly Ile Asp Asp Met Phe Asn Phe Gln Thr Phe Ala
 1635 1640 1645
 Asn Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp
 1650 1655 1660
 Gly Leu Leu Ser Pro Ile Leu Asn Thr Gly Pro Pro Tyr Cys Asp Pro
 1665 1670 1675
 Asn Leu Pro Asn Ser Asn Gly Thr Arg Gly Asp Cys Gly Ser Pro Ala
 1685 1690 1695
 Val Gly Ile Ile Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile Ser Phe Leu Ile
 1700 1705 1710
 Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Val Ile Leu Glu Asn Phe Asn Val Ala
 1715 1720 1725
 Thr Glu Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Glu Asp Asp Phe Asp Met Phe
 1730 1735 1740
 Tyr Glu Thr Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu Ala Thr Gln Phe Ile Thr
 1745 1750 1755
 Phe Ser Ala Leu Ser Asp Phe Ala Asp Thr Leu Ser Gly Pro Leu Arg
 1765 1770 1775
 Ile Pro Lys Pro Asn Arg Asn Ile Leu Ile Gln Met Asp Leu Pro Leu
 1780 1785 1790
 Val Pro Gly Asp Lys Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Phe Ala Phe Thr
 1795 1800 1805
 Lys Asn Val Leu Gly Glu Ser Gly Glu Leu Asp Ser Leu Lys Ala Asn
 1810 1815 1820
 Met Glu Glu Lys Phe Met Ala Thr Asn Leu Ser Lys Ser Ser Tyr Glu
 1825 1830 1835
 Pro Ile Ala Thr Thr Leu Arg Trp Lys Gln Glu Asp Ile Ser Ala Thr
 1845 1850 1855
 Val Ile Gln Lys Ala Tyr Arg Ser Tyr Val Leu His Arg Ser Met Ala
 1860 1865 1870
 Leu Ser Asn Thr Pro Cys Val Pro Arg Ala Glu Glu Glu Ala Ala Ser

10

20

30

1875 1880 1885
 Leu Pro Asp Glu Gly Phe Val Ala Phe Thr Ala Asn Glu Asn Cys Val
 1890 1895 1900
 Leu Pro Asp Lys Ser Glu Thr Ala Ser Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser
 1905 1910 1915 1920
 Tyr Glu Ser Val Thr Arg Gly Leu Ser Asp Arg Val Asn Met Arg Thr
 1925 1930 1935
 Ser Ser Ser Ile Gln Asn Glu Asp Glu Ala Thr Ser Met Glu Leu Ile
 1940 1945 1950
 Ala Pro Gly Pro
 1955

<210> 3
 <211> 7898
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

10

<400> 3
 cgaggccgcc gccgtgcct ccgcccggcg agcccggagcc ggagtogagc cgcggcccggg 60
 agcccggcgg gctggggacg cgggcccggg gcccggggcgc tgggggcccgg ggcccggggcc 120
 gggggcggag gcgctggggg ccggggcccgg gcccggggcgc cgagcgggggt ccgcggtgac 180
 cgcgcccgcc gggcgatgcc cgcggggacg ccgcccggcca gcagagcgag gtgctgcccgg 240
 ccgcccaccat gaccgagggc gcacggggccg ccgacgaggt ccgggtgccc ctgggcccgcg 300
 cgcccctcgg ccctgcccgg ttggtggggg cgtccccgga gagcccggg ggcgcccggac 360
 gcgagggcga gcccgggtcc gagctcggcg tgtaccctc cgagagccc ggggcccggc 420
 gcccggcgga gctgggtgcc gacgaggagc agcgggtccc gtaccggcc ttggcggcca 480
 cggtcttctt ctgcccggg cagaccacgc ggcggcgag ctgggtgctc cggctggtct 540
 gcaacccatg gttcggagcac gtgagcatgc tggtaaatcat gctcaactgc gtgaccctgg 600
 gcatgtttccg gccctgtgag gacgttgagt gcggtccga gcgctgcaac atcctggagg 660
 cctttgacgc ctccattttc gccttttttg cgggtggagat ggtcatcaag atggtggcct 720
 tgggctgttt cgggcagaag tgttacctgg gtgacacgtg gaacaggetg gatttctca 780
 tcgctcgtggc gggcatgatg gactactcgt tggacggaca caactgagc ctctcggcta 840
 tcaggaccgt cggggtgctg cggcccctcc gcgccatcaa ccgctgccc agcatgcccga 900
 tcttggtcac tctgctgctg gatacgtgac ccatgctcgg gaactcctt ctgctgtgct 960
 tcttcgtctt ctccattttc ggcactgctg gcgtccagct ctgggctggc ctccctgcccga 1020
 accgctgctt cctggacagt gcctttgtca ggaacaacaa cctgacctc ctgcccggct 1080
 actaccagac ggaggagggc gaggagaacc cgttcactct ctccctacgc cgagacaacg 1140
 gcatgcagaa gtgctcgcac atcccggccc gccgagagct gcgcatgccc tgcaccctgg 1200
 gctggggaggc ctacacgcag ccgaggccc agggggtggg cgtcgcacgc aacgctgca 1260
 tcaactggaa ccagtaactac aacgtgtgcc gctcgggtga ctccaacccc cacaacggtg 1320
 ccatacaact cgacaacatc ggctacgctt ggtatgccc cttccagggt atcacgctgg 1380
 aaggctgggt ggacatcatg tactacgtca tggacgccc ctcatctac aacttcatot 1440
 atttcatcct gctcatcacc gtgggtcct tcttcatgat caacctgtgc ctgggtggtga 1500
 ttgccacgca gttctcggag acgaagcagc gggagagtca gctgatgccc gagcagcggg 1560
 cacgcccact gccaacgac agcagcctgg ccagcttctc cgagcctggc agctgctacg 1620
 aagagctgct gaagtaactg ggcacacat tccgcaaggt caagcgggc agcttggccc 1680
 tctacgcccg ctggcagagc cgtcggcga agaaggtgga ccccagtgct gtgcaaggcc 1740
 agggctcccg gcaccgccc cgcggggcag gcagggcac agcctcgggt caccacctgg 1800
 tctaccacca ccatcaccac caccaccacc actaccattt cagccatggc agccccgca 1860
 ggcccggccc cgagcccagg gcctgcgaca ccaggctggt ccgagctggc ggcccccct 1920
 cgccacctc cccaggccc ggacccccg acgcagagtc tgtgcacagc atctaccatg 1980
 ccgactgcca catagagggg ccgaggaga gggcccgggt ggcacatgcc gcagccactg 2040
 ccgctgccag cctcaggctg gccacagggc tgggcacat gaactacccc acgatcctgc 2100
 cctcaggggt gggcagcggc aaaggcagca ccagcccgg acccaagggg aagtggcccg 2160
 gtggaccgccc aggcaccggg gggcacggcc cgttgagctt gaacagccct gatccctacg 2220
 agaagatccc gcatgtggtc ggggagcatg gactgggcca ggcccctggc catctgtcgg 2280
 gctcagtggt gccctgcccc ctgcccagcc ccccagcggg cacactgacc tgtgagctga 2340
 agagctgccc gtaactgcacc cgtgcccctg aggaccgga ggggtgagctc agcggctcgg 2400
 aaagtggaga ctcagatggc cgtggcgtct atgaattcac gcagggagctc cggcacgggtg 2460
 accgctggga ccccacgcca ccaccccgtg ccagggacac accagggcca ggcccaggca 2520
 gccccagcg cggggcacag cagagggcag ccccgggcca gccaggtgg atggcccgc 2580
 tctgggttac cttcagcggc aagctgcgcc gcatcgtgga cagcaagtac ttcagccgtg 2640

20

30

```

gcatcatgat  ggccatcctt  gtcaacacgc  tgagcatggg  cgtggagtac  catgagcagc  2700
ccgaggagct  gactaatgct  ctggagatca  gcaacatcgt  gttcaccagc  atgtttgccc  2760
tggagatgct  gctgaagctg  ctggcctgcg  gccctctggg  ctacatccgg  aaccogtaca  2820
acatcttoga  cggcatcctc  gtgggtatca  gcgtctggga  gatcgtgggg  cagggcggacg  2880
gtggccttgc  tgtgctgcgc  accttccggc  tgcctgcctg  gctgaagctg  gtgcgccttc  2940
tgccagccct  gcggcgcagc  ctctgtgtgc  ctctgtgtgc  catggacaac  gtggctacct  3000
tctgcacgct  gctcatgctc  ttcattttca  tcttcagcat  cctgggcatg  caccttttcg  3060
gctgcaagtt  cagcctgaag  acagacaccc  gagacaccgt  gccctgacag  aagaacttcg  3120
actccctgct  gtgggccatc  gtcaccctgt  tccagatcct  gaccagggag  gactggaacg  3180
tggctctgta  caacggcatg  gccctcaact  cctcctgggc  cgccctctac  ttcgtggccc  3240
tcatgacctt  cggcaactat  gtgctcttca  acctgctggt  ggccatcctc  gtggagggct  3300
tccaggcggg  gggcgatgcc  aacagatccg  acacggacga  ggacaagacg  tcggctccact  3360
tcgaggagga  cttccacaag  ctcaagaaac  tccagaccac  agagctgaag  atgtgttccc  3420
tggccgtgac  ccccaacggg  cacctggagg  gacgaggcag  cctgtccctc  cccctcatca  3480
tgtgcacagc  tgccacgccc  atgcctaccc  ccaagagctc  accattcctg  gatgcagccc  3540
coagcctccc  agactctcgg  gcctccacct  gcagctccgg  ggaccgcgca  ctgggagacc  3600
agaagcctcc  ggccagcctc  cgaagtcttc  cctgtgcccc  ctggggcccc  agtggcgctc  3660
ggagcagccg  gcgctccagc  tggagcagcc  tgggcccgtg  ccccagcctc  aagcgcgcg  3720
gccagtgctg  ggaacgtgag  tccctgctgt  ctggcgaggg  caagggcagc  accgacgacg  3780
aagctgagga  cggcagggcc  gcgcccgggc  cccgtgccc  cccactgccc  cgggcccagc  3840
ccttgaccct  acggcccctg  cggcccggcc  cctcccggcc  taccagtgcc  cgcgatcgcg  3900
acgggcaggt  ggtggccctg  cccagcgact  tcttctctgc  catcgacagc  caccgtgagg  3960
atgcagccga  gactcggagg  acagctgctg  acagctgctg  cctccgctg  cataaagtgc  4020
tggagcccta  caagcccagc  tgggtccgga  gcccgagggc  ctgggcccct  tacctcttct  4080
ccccacagaa  cccgttccgc  gtctcctgcc  agaaggtcat  cacacacaag  atgtttgatc  4140
acgtggctct  cgtcttcact  ttcctcaact  gcgtcaocat  cgccttggag  aggcctgaca  4200
ttgaccccgg  cagcaccgag  cgggtcttcc  tcagcgtctc  caattacatc  ttcacggcca  4260
tcttcgtggc  ggagatgatg  gtgaagtggt  tggcccctgg  gctgctgtcc  ggcgagcagc  4320
cctacagcga  gagcctggg  aacctgctgg  atgggctgct  ggtgctgggt  tcctgtgtgt  4380
acattgtcgt  ggccatggcc  tcggctgggt  cggccaagat  cctgggtggt  ctgcgcgtgc  4440
tgctgtctct  gcggaccctg  cggcctctaa  gggctcatcag  ccgggcccgg  ggcctcaagc  4500
tgggtgggga  gacgtgata  tctctgctca  ggcccattgg  gaacatcgct  ctcatctgct  4560
ggccttctt  ggcattctgg  gctgtgagct  gtgtgagct  cttcaagggt  aagttctact  4620
actgcgaggg  ccccgacacc  aggaacatct  ccaccaaggc  acagtgcggg  gccgcccact  4680
accgctgggt  gcgacgcaag  tacaacttgc  acaacctggg  ccaggcccct  atgtcgtgct  4740
tcgtgtctgt  atccaaggat  ggatgggtga  acatcatgta  cgcaggggct  gatgcccgtg  4800
gtgtcgacca  gcagcctgtg  cagaaccaca  acccctggat  gctgctgtac  ttcactcctc  4860
tccctgctcat  cgtcagcttc  ttcgtgctca  acatgttctg  gggcgtcgtg  gtcgagaact  4920
tcacacaagt  cccgagcagc  caggagggcg  aggagggcgg  cgggcccagc  gagaagcggc  4980
tgccgcccct  agagaggagg  cgcaggagca  ctttcccagc  cccagaggcc  cagcgcgggc  5040
cctactatgc  cactactctg  cccacgcgcc  gctccattca  ctgctgtgct  accagccact  5100
atctcgacct  cttcatcacc  ttcattatct  ggttcaactg  catcaccatg  tccatggagc  5160
actataacca  acccaagtgc  ctggaagagg  cctcaagta  ctgcaactac  gtcttaccca  5220
tcgtgtttgt  cttcgaggct  gcaactgaag  tggtagcatt  tgggttccgt  cggttcttca  5280
aggacaggtg  gaaccagctg  gacctggcca  tcgtgtgctg  gtcactcatg  ggcatcacgc  5340
tggaggagat  agagatgagc  gccgcgctgc  ccatcaacc  caccatcctc  cgcactatgc  5400
gcgtgcttgc  cattgcccct  gtgctgaagc  tgctgaagat  ggctacgggc  atgcccggcc  5460
tgctggacac  tbtgggtgca  gctctcccc  aggtggggaa  cctgggccc  ctttctcatg  5520
tcctgttttt  tatctatgct  ggcctgggag  tggagctggt  cgggaggctg  gagtgcagtg  5580
aagacaaccc  ctgagagggc  ctgagcaggg  acgccacctt  cagcaacttc  ggcatggcct  5640
tctcagcct  gttccgcgtg  tccacggggg  acaactggaa  cgggatcatg  aaggacacgc  5700
tggcagagtg  ctcccgtgag  gacaagcact  gccctgagct  cctgcccggc  ctgtcggccc  5760
tctacttctg  gacctctgtg  ctgggtggcc  agttcgtgct  ggtgaactgt  gtgggtggcc  5820
tgctcatgaa  gcacctggag  gagagcaaca  aggaggcagc  ggaggatgag  gagctggagc  5880
ccgagatoga  gctggagatg  gcgcagggcc  ccgggagtg  acgcccgggt  gacgcccaca  5940
ggcctccctt  gccccaggag  agtccggggc  ccagggatgc  cccaaacctg  gttgcacgca  6000
aggtgtccgt  gtcaggatg  ctctcgtctc  ccaacgcagc  ctacatgttc  agcccctgg  6060
tcctgctctc  ggcccccacc  ccccccggcc  gttgctctct  gtaggaggt  ggagatggag  6120
cggcaccctc  cttgggctcc  gttgctctct  tgcactctcc  gcccgcagag  tccctgtgct  6180
cctccagat  cccactggct  gtgtcgtccc  cagccaggag  cggcggagcc  ctccacgccc  6240
tgtcccctcg  gggcacagcc  cgctccccc  gtctcagccc  gctgctctgc  agacaggagg  6300
ctgtgcacac  cgattccttg  gaagggaaga  ttgacagccc  tagggacacc  ctggatcctg  6360

```

10

20

30

```

cagagcctgg tgagaaaacc cgggtgaggg cggtgacca ggggggctcc ctgcagtccc 6420
caccacgctc ccacagggccc gccagcgtcc gcaactcgtaa gcataccttc ggacagcact 6480
gcgtctccag ccggccggcg gccccagggc gagaggaggc cgaggcctcg gaccagcccg 6540
acgaggaggt cagccacatc accagctccg cctgccccctg gcagcccaca gccgagcccc 6600
atggcccoga agcctctccg gtggccggcg gcgagcggga cctgcgcagg ctctacagcg 6660
tggagaagtc ggcttccg gacaagccgg gccgggcaga cagcagtggg cggccctcgg 6720
cggagctggg cagcggggag cctggggagg cgaaggcctg gggccctgag gccgagcccc 6780
ctctgggtgc gcgcagaaag aagaagatga gccccccctg catctcggtg gaacccctcg 6840
cggaggacga gggctctgcg cggccctccg cggcagaggg cggcagcacc aactgagggc 6900
gcaggacccc gtctctgtgag gccacgcctc acagggactc cctggagccc acagagggct 6960
caggcgccgg gggggaccct gcagccaagg gggagcgtg gggccaggcc tcctgccggg 7020
ctgagcacct gaccgtcccc agctttgcct ttgagccgt ggacctcggg gtccccagtg 7080
gagacccttt cttggacggg agccacagtg tgaccccaga atccagagct tcctcttcag 7140
gggcatagtg gccctggaa cccccagaat cagagcctcc catgcccgtc ggtgaccccc 7200
cagagaagag gcgggggctg tacctcacag tccccagtg tcctctggag aaaccagggt 7260
ccccctcagc cagccctgcc ccagggggtg gtgcagatga cctcgtgtag ctcggggctt 7320
ggtgccgccc acggcttttg ccctggggtc tgggggcccc gctggggtg agggccaggc 7380
agaacctgac atggacctg acttgggtcc cgtcgtgagc agaaaggccc ggggaggatg 7440
acggcccagc cctggttct ctgcccagcg aagcaggagt agctgccggg ccccacgagc 7500
ctccatcgt tctggttegg gtttctccga gttttgtac cagccgaggg tgtgcgggca 7560
actgggtcag cctcccgtca ggagagaagc cgcgtctgtg ggacgaagac cgggaccccg 7620
ccagagaggg gaaggtacca ggttgctgccc ttccagggccc cgcgttggtta caggacactc 7680
gctggggggc cgtgcccctt gccggcgcca ggttgcaacc accgcccggc aatgtcacct 7740
tcactcacag tctgagttct tgtccgctg tcacgcccctc accaccctcc ccttccagcc 7800
accacccttt ccgttccgct cgggccttcc cagaagcgtc ctgtgactct gggagagggt 7860
acacctcact aaggggcccga ccccatggag taacgcgc 7898

```

10

```

<210> 4
<211> 2353
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

20

```

<400> 4
Met Thr Glu Gly Ala Arg Ala Ala Asp Glu Val Arg Val Pro Leu Gly
1 5 10 15
Ala Pro Pro Pro Gly Pro Ala Ala Leu Val Gly Ala Ser Pro Glu Ser
20 25 30
Pro Gly Ala Pro Gly Arg Glu Ala Glu Arg Gly Ser Glu Leu Gly Val
35 40 45
Ser Pro Ser Glu Ser Pro Ala Ala Glu Arg Gly Ala Glu Leu Gly Ala
50 55 60
Asp Glu Glu Gln Arg Val Pro Tyr Pro Ala Leu Ala Ala Thr Val Phe
65 70 75 80
Phe Cys Leu Gly Gln Thr Thr Arg Pro Arg Ser Trp Cys Leu Arg Leu
85 90 95
Val Cys Asn Pro Trp Phe Glu His Val Ser Met Leu Val Ile Met Leu
100 105 110
Asn Cys Val Thr Leu Gly Met Phe Arg Pro Cys Glu Asp Val Glu Cys
115 120 125
Gly Ser Glu Arg Cys Asn Ile Leu Glu Ala Phe Asp Ala Phe Ile Phe
130 135 140
Ala Phe Phe Ala Val Glu Met Val Ile Lys Met Val Ala Leu Gly Leu
145 150 155 160
Phe Gly Gln Lys Cys Tyr Leu Gly Asp Thr Trp Asn Arg Leu Asp Phe
165 170 175
Phe Ile Val Val Ala Gly Met Met Glu Tyr Ser Leu Asp Gly His Asn
180 185 190
Val Ser Leu Ser Ala Ile Arg Thr Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Arg
195 200 205
Ala Ile Asn Arg Val Pro Ser Met Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu

```

30

210						215						220							
Asp	Thr	Leu	Pro	Met	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Phe	Val				
225					230						235								240
Phe	Phe	Ile	Phe	Gly	Ile	Val	Gly	Val	Gln	Leu	Trp	Ala	Gly	Leu	Leu				
				245						250									255
Arg	Asn	Arg	Cys	Phe	Leu	Asp	Ser	Ala	Phe	Val	Arg	Asn	Asn	Asn	Leu				
			260					265											270
Thr	Phe	Leu	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Gln	Thr	Glu	Glu	Gly	Glu	Glu	Asn	Pro				
		275					280						285						
Phe	Ile	Cys	Ser	Ser	Arg	Arg	Asp	Asn	Gly	Met	Gln	Lys	Cys	Ser	His				
	290					295					300								
Ile	Pro	Gly	Arg	Arg	Glu	Leu	Arg	Met	Pro	Cys	Thr	Leu	Gly	Trp	Glu				
305					310					315									320
Ala	Tyr	Thr	Gln	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Val	Gly	Ala	Ala	Arg	Asn	Ala				
				325						330									335
Cys	Ile	Asn	Trp	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Asn	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	Asp	Ser				
			340					345						350					
Asn	Pro	His	Asn	Gly	Ala	Ile	Asn	Phe	Asp	Asn	Ile	Gly	Tyr	Ala	Trp				
		355					360							365					
Ile	Ala	Ile	Phe	Gln	Val	Ile	Thr	Leu	Glu	Gly	Trp	Val	Asp	Ile	Met				
	370					375					380								
Tyr	Tyr	Val	Met	Asp	Ala	His	Ser	Phe	Tyr	Asn	Phe	Ile	Tyr	Phe	Ile				
385					390					395									400
Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Gly	Ser	Phe	Phe	Met	Ile	Asn	Leu	Cys	Leu	Val				
				405					410					415					
Val	Ile	Ala	Thr	Gln	Phe	Ser	Glu	Thr	Lys	Gln	Arg	Glu	Ser	Gln	Leu				
			420					425						430					
Met	Arg	Glu	Gln	Arg	Ala	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Asp	Ser	Thr	Leu	Ala				
		435					440							445					
Ser	Phe	Ser	Glu	Pro	Gly	Ser	Cys	Tyr	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Val				
	450					455					460								
Gly	His	Ile	Phe	Arg	Lys	Val	Lys	Arg	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Tyr	Ala				
465					470					475					480				
Arg	Trp	Gln	Ser	Arg	Trp	Arg	Lys	Lys	Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Gln				
				485					490						495				
Gly	Gln	Gly	Pro	Gly	His	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Arg	His	Thr	Ala				
			500					505						510					
Ser	Val	His	His	Leu	Val	Tyr	His	His	His	His	His	His	His	His	His				
		515					520							525					
Tyr	His	Phe	Ser	His	Gly	Ser	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Gly				
	530					535					540								
Ala	Cys	Asp	Thr	Arg	Leu	Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro				
545					550					555					560				
Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Pro	Asp	Ala	Glu	Ser	Val	His	Ser	Ile	Tyr				
				565					570					575					
His	Ala	Asp	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Pro	Gln	Glu	Arg	Ala	Arg	Val	Ala				
		580					585							590					
His	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu				
		595					600							605					
Gly	Thr	Met	Asn	Tyr	Pro	Thr	Ile	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Gly				
	610					615								620					
Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Lys	Trp	Ala	Gly	Gly	Pro				
625					630					635					640				
Pro	Gly	Thr	Gly	Gly	His	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Ser	Pro	Asp	Pro				
				645						650				655					
Tyr	Glu	Lys	Ile	Pro	His	Val	Val	Gly	Glu	His	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala				
			660					665						670					
Pro	Gly	His	Leu	Ser	Gly	Leu	Ser	Val	Pro	Cys	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro				
		675					680							685					
Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Leu	Lys	Ser	Cys	Pro	Tyr	Cys	Thr				
	690					695								700					
Arg	Ala	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Gly	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Glu	Ser	Gly				

10

20

30

1205 1210 1215
 Arg Asp Gly Gln Val Val Ala Leu Pro Ser Asp Phe Phe Leu Arg Ile
 1220 1225 1230
 Asp Ser His Arg Glu Asp Ala Ala Glu Leu Asp Asp Asp Ser Glu Asp
 1235 1240 1245
 Ser Cys Cys Leu Arg Leu His Lys Val Leu Glu Pro Tyr Lys Pro Gln
 1250 1255 1260
 Trp Cys Arg Ser Arg Glu Ala Trp Ala Leu Tyr Leu Phe Ser Pro Gln
 1265 1270 1275 1280
 Asn Arg Phe Arg Val Ser Cys Gln Lys Val Ile Thr His Lys Met Phe
 1285 1290 1295
 Asp His Val Val Leu Val Phe Ile Phe Leu Asn Cys Val Thr Ile Ala
 1300 1305 1310
 Leu Glu Arg Pro Asp Ile Asp Pro Gly Ser Thr Glu Arg Val Phe Leu
 1315 1320 1325
 Ser Val Ser Asn Tyr Ile Phe Thr Ala Ile Phe Val Ala Glu Met Met
 1330 1335 1340
 Val Lys Val Val Ala Leu Gly Leu Leu Ser Gly Glu His Ala Tyr Leu
 1345 1350 1355 1360
 Gln Ser Ser Trp Asn Leu Leu Asp Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Leu
 1365 1370 1375
 Val Asp Ile Val Val Ala Met Ala Ser Ala Gly Gly Ala Lys Ile Leu
 1380 1385 1390
 Gly Val Leu Arg Val Leu Arg Leu Leu Arg Thr Leu Arg Pro Leu Arg
 1395 1400 1405
 Val Ile Ser Arg Ala Pro Gly Leu Lys Leu Val Val Glu Thr Leu Ile
 1410 1415 1420
 Ser Ser Leu Arg Pro Ile Gly Asn Ile Val Leu Ile Cys Cys Ala Phe
 1425 1430 1435 1440
 Phe Ile Ile Phe Gly Ile Leu Gly Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe
 1445 1450 1455
 Tyr Tyr Cys Glu Gly Pro Asp Thr Arg Asn Ile Ser Thr Lys Ala Gln
 1460 1465 1470
 Cys Arg Ala Ala His Tyr Arg Trp Val Arg Arg Lys Tyr Asn Phe Asp
 1475 1480 1485
 Asn Leu Gly Gln Ala Leu Met Ser Leu Phe Val Leu Ser Ser Lys Asp
 1490 1495 1500
 Gly Trp Val Asn Ile Met Tyr Asp Gly Leu Asp Ala Val Gly Val Asp
 1505 1510 1515 1520
 Gln Gln Pro Val Gln Asn His Asn Pro Trp Met Leu Leu Tyr Phe Ile
 1525 1530 1535
 Ser Phe Leu Leu Ile Val Ser Phe Phe Val Leu Asn Met Phe Val Gly
 1540 1545 1550
 Val Val Val Glu Asn Phe His Lys Cys Arg Gln His Gln Glu Ala Glu
 1555 1560 1565
 Glu Ala Arg Arg Arg Glu Glu Lys Arg Leu Arg Arg Leu Glu Arg Arg
 1570 1575 1580
 Arg Arg Ser Thr Phe Pro Ser Pro Glu Ala Gln Arg Arg Pro Tyr Tyr
 1585 1590 1595 1600
 Ala Asp Tyr Ser Pro Thr Arg Arg Ser Ile His Ser Leu Cys Thr Ser
 1605 1610 1615
 His Tyr Leu Asp Leu Phe Ile Thr Phe Ile Ile Cys Val Asn Val Ile
 1620 1625 1630
 Thr Met Ser Met Glu His Tyr Asn Gln Pro Lys Ser Leu Asp Glu Ala
 1635 1640 1645
 Leu Lys Tyr Cys Asn Tyr Val Phe Thr Ile Val Phe Val Phe Glu Ala
 1650 1655 1660
 Ala Leu Lys Leu Val Ala Phe Gly Phe Arg Arg Phe Phe Lys Asp Arg
 1665 1670 1675 1680
 Trp Asn Gln Leu Asp Leu Ala Ile Val Leu Leu Ser Leu Met Gly Ile
 1685 1690 1695
 Thr Leu Glu Glu Ile Glu Met Ser Ala Ala Leu Pro Ile Asn Pro Thr

10

20

30

1700				1705				1710							
Ile	Ile	Arg	Ile	Met	Arg	Val	Leu	Arg	Ile	Ala	Arg	Val	Leu	Lys	Leu
			1715				1720								1725
Leu	Lys	Met	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Ala	Leu	Leu	Asp	Thr	Val	Val	Gln
			1730				1735								1740
Ala	Leu	Pro	Gln	Val	Gly	Asn	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	Phe
			1745				1750								1760
Phe	Ile	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Leu	Phe	Gly	Arg	Leu	Glu	Cys
			1765				1770								1775
Ser	Glu	Asp	Asn	Pro	Cys	Glu	Gly	Leu	Ser	Arg	His	Ala	Thr	Phe	Ser
			1780				1785								1790
Asn	Phe	Gly	Met	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Phe	Arg	Val	Ser	Thr	Gly	Asp
			1795				1800								1805
Asn	Trp	Asn	Gly	Ile	Met	Lys	Asp	Thr	Leu	Arg	Glu	Cys	Ser	Arg	Glu
			1810				1815								1820
Asp	Lys	His	Cys	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Phe
			1825				1830								1840
Val	Thr	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Gln	Phe	Val	Leu	Val	Asn	Val	Val	Val
			1845				1850								1855
Ala	Val	Leu	Met	Lys	His	Leu	Glu	Glu	Ser	Asn	Lys	Glu	Ala	Arg	Glu
			1860				1865								1870
Asp	Ala	Glu	Leu	Asp	Ala	Glu	Ile	Glu	Leu	Glu	Met	Ala	Gln	Gly	Pro
			1875				1880								1885
Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	Val	Asp	Ala	Asp	Arg	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu
			1890				1895								1900
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Asp	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Arg	Lys	Val	Ser
			1905				1910								1920
Val	Ser	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp	Ser	Tyr	Met	Phe	Arg	Pro
			1925				1930								1935
Val	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	His	Pro	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Val	Glu
			1940				1945								1950
Met	Glu	Thr	Tyr	Gly	Ala	Gly	Thr	Pro	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Ser	Val
			1955				1960								1965
His	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Ile	Pro	Leu	Ala
			1970				1975								1980
Val	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Gly	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Leu	Ser	Pro
			1985				1990								2000
Arg	Gly	Thr	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Gln
			2005				2010								2015
Glu	Ala	Val	His	Thr	Asp	Ser	Leu	Glu	Gly	Lys	Ile	Asp	Ser	Pro	Arg
			2020				2025								2030
Asp	Thr	Leu	Asp	Pro	Ala	Glu	Pro	Gly	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Arg	Pro
			2035				2040								2045
Val	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln	Ser	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Arg	Pro
			2050				2055								2060
Ala	Ser	Val	Arg	Thr	Arg	Lys	His	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Cys	Val	Ser
			2065				2070								2080
Ser	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Ser	Asp	Pro
			2085				2090								2095
Ala	Asp	Glu	Glu	Val	Ser	His	Ile	Thr	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Trp	Gln
			2100				2105								2110
Pro	Thr	Ala	Glu	Pro	His	Gly	Pro	Glu	Ala	Ser	Pro	Val	Ala	Gly	Gly
			2115				2120								2125
Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Tyr	Ser	Val	Asp	Ala	Gln	Gly	Phe	Leu
			2130				2135								2140
Asp	Lys	Pro	Gly	Arg	Ala	Asp	Glu	Gln	Trp	Arg	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu
			2145				2150								2160
Gly	Ser	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Ala	Lys	Ala	Trp	Gly	Pro	Glu	Ala	Glu
			2165				2170								2175
Pro	Ala	Leu	Gly	Ala	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys	Met	Ser	Pro	Pro	Cys	Ile
			2180				2185								2190
Ser	Val	Glu	Pro	Pro	Ala	Glu	Asp	Glu	Gly	Ser	Ala	Arg	Pro	Ser	Ala

10

20

30

2195 2200 2205
Ala Glu Gly Gly Ser Thr Thr Leu Arg Arg Arg Thr Pro Ser Cys Glu
2210 2215 2220
Ala Thr Pro His Arg Asp Ser Leu Glu Pro Thr Glu Gly Ser Gly Ala
2225 2230 2235 2240
Gly Gly Asp Pro Ala Lys Gly Glu Arg Trp Gly Gln Ala Ser Cys
2245 2250 2255
Arg Ala Glu His Leu Thr Val Pro Ser Phe Ala Phe Glu Pro Leu Asp
2260 2265 2270
Leu Gly Val Pro Ser Gly Asp Pro Phe Leu Asp Gly Ser His Ser Val
2275 2280 2285
Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ser Ser Ser Gly Ala Ile Val Pro Leu Glu
2290 2295 2300
Pro Pro Glu Ser Glu Pro Pro Met Pro Val Gly Asp Pro Pro Glu Lys
2305 2310 2315 2320
Arg Arg Gly Leu Tyr Leu Thr Val Pro Gln Cys Pro Leu Glu Lys Pro
2325 2330 2335
Gly Ser Pro Ser Ala Thr Pro Ala Pro Gly Gly Gly Ala Asp Asp Pro
2340 2345 2350
Val

10

<210> 5
<211> 7364
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<400> 5
gcggcggcgg ctgcggcggt ggggcggcgc gaggtccgct gcgggtcccgg cggtccggtg 60
gctgtcccgc tctgagcgcc tggcgcgcc cgcgccctcc ctgcccgggg cgctgggccc 120
gggatgcacg cggggcccgg gagccatggt ccgcttgggg gacgagctgg gcggccgcta 180
tggaggcccc ggcggcggag agcgggcccg gggcggcggg gccggcgggg cggggggccc 240
gggtcccggg gggctgcagc ccggccagcg ggtcctctac aagcaatcga tcggcagcg 300
cgcgcggacc atggcgctgt acaaccccat cccggtcaag cagaactgct tcaccgtcaa 360
ccgctcgctc ttcgtcttca gcgaggacaa cgtcgtccgc aaatacgcga agcgcatac 420
cgagtggcct ccattcgagt atatgatcct ggccaccatc atcgccaact gcatacgtgt 480
ggccctggag cagcacctcc ctgatgggga caaaacgccc atgtccgagc ggctgggaca 540
cacggagccc tatttcattg ggcatttttg cttcgaggca gggatcaaaa tcatacgtct 600
ggcctttgtc ttcacaaagg gctcttacct gcggaacggc tggaaactga tggacttctg 660
ggctcgtcctc acagggatcc ttgccacggc tggaaactgac ttcgacctgc gaacactgag 720
ggctgtgctg gtgctgagc cctgaagct ggtgtctggg attccaagtt tgcaggtggt 780
gctcaagtcc atcatgaagg ccattggtcc actcctgcag attgggctgc ttctcttctt 840
tgccatcctc atgtttgcca tcatggcct ggagtcttac atgggcaagt tccacaaggc 900
ctgtttcccc aacagcacag atgcccagcc cgtgggtgac ttcccctgtg gcaaggaggc 960
cccagcccgg ctgtgcgagg gcgacactga gtgcggggag tactggccag gacccaactt 1020
tggcatcaacc aactttgaca atatacctgt tgccatcttg acgggtgtcc agtgcatac 1080
catggagggc tggactgaca tcctctataa tacaacgat gcggccggca acacctggaa 1140
ctggtctctac ttcacccctc tcatcatcat cggctccttc ttcatactca acctgggtct 1200
ggcgtgctc tcgggggagt ttgccaagga gcgagagagg gtggagaacc gccgcgctt 1260
cctgaagctg cgcggcagc agcagatcga gcgagagctc aacgggtacc tggagtggat 1320
cttcaaggcg gaggaagtca tgctggccga ggaggacagg aatgcagagg agaagtcccc 1380
tttggacgtg ctgaagagag cggccaccaa gaagagcaga aatgacctga tccacgcaga 1440
ggaggggag gaccggtttg cagatctctg tctgttggga tccccttcg cccgcgcccag 1500
cctcaagagc gggaagacag agagctctc atacttcgg aggaaggaga agatgttccc 1560
gttttttatc cggcgcatgg tgaaggctca gagctctac tgggtggtgc tgtgcgtggt 1620
ggccctgaac acactgtgtg tggccatggt gcattacaac cagcccgggc ggcttaccac 1680
gacctgtat tttgcagagt ttgttttctt ggtctctctc ctcacagaga tgtccctgaa 1740
gatgtatggc ctggggccca gaagctaact cggctcctcc ttcaactgct tcgactttgg 1800
ggctatcgtg gggagcgtct ttgaagtggc ctggcgggac atcaagccgg gaagctcctt 1860
tgggatcagt gtgctcggg cctccgcct gctgaggatc ttcaaagtca cgaagtactg 1920
gagctccctg cggaacctgg tgggtctcct gctgaactcc atgaagtcca tcatcagct 1980
gctcttcttg ctcttctctg tcatgtggt cttgcctctg ctggggatgc agctgtttgg 2040

20

30

gggacagttc	aacttccagg	atgagactcc	cacaaccac	ttcgacacct	tccctgccgc	2100
catcctcact	gtcttccaga	tcctgacggg	agaggactgg	aatgcagtga	tgtatcacgg	2160
gatcogaatcg	caaggcggcg	tcagcaaagg	catgttctcg	tccttttact	tcattgtcct	2220
gacactgttc	ggaaactaca	ctctgctgaa	tgtctttctg	gccatcgctg	tggacaacct	2280
ggccaacgcc	caagagctga	ccaaggatga	agaggagatg	gaagaagcag	ccaatcagaa	2340
gcttgctctg	caaaaaggcca	aagaagtggc	tgaagtccgc	cccatgtctg	ccgcgaacat	2400
ctccatcgcc	gccaggcagc	agaactcggc	caaggcgcgc	tcgggtgtgg	agcagcgggc	2460
cagccagcta	cggtcgcaga	acctgcgggc	cagctgcgag	gcgctgtaca	gcgagatgga	2520
ccccgaggag	cggtcggcgt	tcgccactac	gcgccacctg	cgcccgaca	tgaagacgca	2580
cctggaccgg	ccgctgggtg	tggagctggg	ccgcgacggc	cgccgggggc	ccgtggggag	2640
caaagcccga	cctgaggctg	cggaggcccc	cgagggcgct	gacctccgc	gcaggcacca	2700
ccggcaccgc	gacaaggaca	agacccccgc	ggcgggggac	caggaccgag	cagagggccc	2760
gaaggcggag	agcgggggag	ccgggtcccc	ggaggagcgg	ccgcggccgc	accgcagcca	2820
cagcaaggag	gccgcggggc	ccccggaggc	gcggagcggg	ccgcggccgag	gcccaggccc	2880
cgaggggcgg	cggcggcacc	accgcgcggg	ctccccggag	gagggcggcg	agcgggagcc	2940
ccgaccgcac	cgccgcacc	ggcaccagga	tcggagcaag	gagtgcgcgc	gcgccaaggg	3000
cgagcggcgc	gcgcggcacc	ggggcggccc	ccgagcgggg	ccccgggag	cggagagcgg	3060
ggaggagccg	gcgcggcggc	accgggcccc	gcacaaggcg	cagcctgtct	acgaggtgt	3120
ggagaaggag	accacggaga	aggaggccac	ggagaaggag	gctgagatag	tggaaaccga	3180
caaggaaaag	gagctccgga	accaccagcc	ccgggagcca	cactgtgacc	tggagaccag	3240
tgggactgtg	actgtgggtc	ccatgcacac	actgccagc	acctgtctcc	agaaggtgga	3300
ggaacagcca	gaggtatgcag	acaatcagcg	gaacgtcact	cgcatgggca	gtcagcccc	3360
agaccggaac	actattgtac	atatccagat	gatgctgacg	ggccctcttg	gggaagccac	3420
ggctcgttccc	agtgtgtaacg	tggacctgga	aagccaagca	gaggggaaga	aggaggtgga	3480
agcggatgac	gtgatgagga	gcccccccg	gcctatcgct	ccatacagct	ccatgttctg	3540
tttaagcccc	accaaacctgc	tcgcccgctt	ctgccactac	atcgtgacca	tgaggtactt	3600
cgaggtggtc	attctcgtgg	tcatcgctt	gagcagcacc	gccttggtg	ctgaggacc	3660
agtgcgcaca	gactcgccca	ggaaacaacgc	tctgaaatac	ctggattaca	tttctactgg	3720
tgtctttacc	tttgagatgg	tgataaagat	gatcgaacttg	ggactgtctg	ttcaccttgg	3780
agcctatttc	cgggacttgt	ggaacattct	ggacttcatt	gtggtcagtg	gccccttgg	3840
ggcgtttgct	ttctcaggat	ccaaaaggaa	agacatcaat	accatcaagt	ctctgagagt	3900
ccttcgtgtc	tcagaccat	tcaagaccat	caaaccgctg	cccaggctca	aggctgtgtt	3960
tgactgtgtg	gtgaactccc	tgaagaatgt	cctcaacatc	ttgattgtct	acatgtctct	4020
catgttcata	tttgccgtca	ttgcccgtgca	gctcttcaaa	gggaagtttt	tctactgcac	4080
agatgaatcc	aaggagctgg	agagggactg	caggggtcag	tatttggatt	atgagaagga	4140
ggaagtggaa	gctcagcccc	ggcagtgga	gaaatacagac	tttccactacg	acaatgtgct	4200
ctgggctctg	ctgacgctgt	tcacagtgct	cacgggagaa	ggctggccca	tggctgtgaa	4260
acactccgtg	gatgccacct	atgaggagca	gggtccaagc	ccctgggtacc	gcattggagct	4320
gtccactctc	tcagtggtct	actttgtggt	acttcccttc	ttcttcgtca	acatctttgt	4380
ggctttgatc	atcatcacct	tcagggagca	gggggacaag	gtgatgtctg	aatgcagcct	4440
ggagaagaac	gagagggcct	gcatttgactt	cgccatcagc	gccccacc	tgacacggta	4500
catgccccaa	aaccggcagt	cgttccagta	taagacgtgg	acattttgtg	tctcccgc	4560
ctttgaatac	ttcatcatgg	ccatgatagc	cctcaacact	gtggtgctga	tgatgaagt	4620
ctatgatgca	ccctatgagt	acgagctgat	gctgaaatgc	ctgaacatcg	tgttcacatc	4680
catgttctcc	atggaatgcg	tgctgaagat	catcgcttt	gggggtgctga	actatltcag	4740
agatgcctgg	aatgtctttg	actttgtcac	tgtgttggga	agtattactg	atattttagt	4800
aacagagatt	gcggaaaacy	acaatttcat	caacctcagc	ttcctccg	tcttccgagc	4860
tgccgctgct	atcaagctgc	tcgccaggg	ctacaccatc	cgcatcctgc	tgtggacctt	4920
gttccagtc	ttcaaggccc	tgccctacgt	gtgtctgctc	attgcccagc	tgttcttcat	4980
ctacgccatc	atcggcatgc	agggttttgg	gaatatgtcc	ctggatgatg	acaccagcat	5040
caaccgccac	aacaacttcc	ggacgttttt	gcaagccctg	atgctgtctg	tcaggagcgc	5100
cacgggggag	gcttggcacg	agatcatgct	gtcctgcctg	agcaaccagg	ccgtgtatga	5160
gcaggccaat	gccaccgagt	gtggaagtga	ctttgcctac	ttctacttcg	tctccttcat	5220
cttctctgtg	tcctttctga	tgttgaacct	ctttgtggct	gtgatcatgg	acaattttga	5280
gtacctcaag	cgggactctt	ccatcctagg	tcctcaccac	ttggatgagt	tcatccgggt	5340
ctgggctgaa	tacgaccogg	ctgcgtgtgg	gcgcatacgt	tacaatgaca	tgtttgagat	5400
gctgaaacac	atgtccccgc	ctctggggct	ggggaagaaa	tgccctgctc	gagttgctta	5460
caagcgcctg	gttcgcatag	acatgcccat	ctccaacgag	gacatgactg	ttcacttcac	5520
gtccacgctg	atggccctca	tcgggacggc	actggagatc	aagctggccc	cagctgggac	5580
aaagcagcat	cagtggtgacg	cggagttgag	gaaggagatt	tccgttgtgt	gggccaatct	5640
gccccagaag	actttggact	tgctgggtacc	acccataag	cctgatgaga	tgacagtggt	5700
gaaggtttat	gcagctctga	tgatatttga	cttctacaag	cagaacaaaa	ccaccagaga	5760

10

20

30

```

ccagatgcag caggctcctg gaggcctctc ccagatgggt cctgtgtccc tgttccacc 5820
tctgaaggcc acctgggagc agacacagcc ggtgtgtctc cgaggagccc gggttttcct 5880
tcgacagaag agttccacct coctcagcaa tggcggggcc atacaaaacc aagagagtgg 5940
catcaaagag tctgtctcct ggggcaacta aaggaccagc gatgcacccc atgaggccag 6000
gccacccttg gagcgtggcc actccacaga gatccctgtg ggcgggtcag gagcactggc 6060
tgtggacgtt cagatgcaga gcataaccgg gagggccctt gatggggagc cccagcctgg 6120
gctggagagc cagggtcgag cggcctccat gccccgctt gcggcggaga ctcagcccgt 6180
cacagatgcc agcccatga agcgtcccat ctccacgctg gccagcggc cccgtgggac 6240
tcacttttgc agcaccacc cggaccgccc accccctagc caggcgtgt cgcaccacca 6300
ccaccaccgc tgcaccgcc gcagggacag gaagcagagg tcctgggaga aggggcccag 6360
cctgtctgcc gatatggatg gcgcaccaag cagtgtgtgt gggccggggc tgccccggg 6420
agaggggccc acagcgtgcc ggcgggaacg agagcgcggc caggagcggg gccggtccca 6480
ggagcggagg cagccctcat cctcctcctc ggagaagcag cgcttctact cctgcgaccg 6540
ctttgggggc cgtgagcccc cgaagcccaa gccctcctc agcagccacc caacgtcggc 6600
aacagctggc caggagccgg gacccaccac acagggcagt ggttccgtga atgggagccc 6660
cttgctgtca acatctggtg ctagcaccac cggcccggtt gggcggaggc agctcccca 6720
gagcccccct actccccgcc ccagcatcac ctacaagacg gccaaactct caccatcca 6780
cttcgcccgg gctcagacca gcctcctctc cttctcccca ggcgggtcga gccctgggct 6840
ttccgaacac aacgcacctg tgcagagaga cccctcagc cagccctgg cccctggctc 6900
tcgaattggc tctgaccctt acctggggca gcgtctggac agtgaggcct ctgtccacgc 6960
cctgcctgag gacacgctca ctttcgagga ggctgtggcc accaaactcg gccgctcctc 7020
caggacttcc tacgtgtcct cctgacctc ccagtctcac cctctccgcc gcggtcccaa 7080
cggttaccac tgcaccctgg gactcagctc ggggtggcga gcacggcaca gctaccacca 7140
ccctgaccaa gaccactggg gctagctgca ccgtgaccgc tcagacgcct gcctgagca 7200
ggogtgtgtt ccagtggatg agttttatca tccacacggg gcagtcggcc ctcgggggag 7260
gccttgccca ccttgggtgag gctcctgtgg cccctcctc cccctcctc cctcttttac 7320
tctagacgac gaataaagcc ctgttgcttg agtgtacgta ccgc 7364

```

10

```

<210> 6
<211> 2339
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

20

```

<400> 6
Met Val Arg Phe Gly Asp Glu Leu Gly Gly Arg Tyr Gly Gly Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Glu Arg Ala Arg Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Pro
20 25 30
Gly Pro Gly Gly Leu Gln Pro Gly Gln Arg Val Leu Tyr Lys Gln Ser
35 40 45
Ile Ala Gln Arg Ala Arg Thr Met Ala Leu Tyr Asn Pro Ile Pro Val
50 55 60
Lys Gln Asn Cys Phe Thr Val Asn Arg Ser Leu Phe Val Phe Ser Glu
65 70 75 80
Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Arg Ile Thr Glu Trp Pro Pro
85 90 95
Phe Glu Tyr Met Ile Leu Ala Thr Ile Ile Ala Asn Cys Ile Val Leu
100 105 110
Ala Leu Glu Gln His Leu Pro Asp Gly Asp Lys Thr Pro Met Ser Glu
115 120 125
Arg Leu Asp Asp Thr Glu Pro Tyr Phe Ile Gly Ile Phe Cys Phe Glu
130 135 140
Ala Gly Ile Lys Ile Ile Ala Leu Gly Phe Val Phe His Lys Gly Ser
145 150 155 160
Tyr Leu Arg Asn Gly Trp Asn Val Met Asp Phe Val Val Val Leu Thr
165 170 175
Gly Ile Leu Ala Thr Ala Gly Thr Asp Phe Asp Leu Arg Thr Leu Arg
180 185 190
Ala Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Leu Val Ser Gly Ile Pro Ser
195 200 205

```

30

Leu Gln Val Val Leu Lys Ser Ile Met Lys Ala Met Val Pro Leu Leu
 210 215 220
 Gln Ile Gly Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ile Leu Met Phe Ala Ile Ile
 225 230 235 240
 Gly Leu Glu Phe Tyr Met Gly Lys Phe His Lys Ala Cys Phe Pro Asn
 245 250 255
 Ser Thr Asp Ala Glu Pro Val Gly Asp Phe Pro Cys Gly Lys Glu Ala
 260 265 270
 Pro Ala Arg Leu Cys Glu Gly Asp Thr Glu Cys Arg Glu Tyr Trp Pro
 275 280 285
 Gly Pro Asn Phe Gly Ile Thr Asn Phe Asp Asn Ile Leu Phe Ala Ile
 290 295 300
 Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp Thr Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Asn Asp Ala Ala Gly Asn Thr Trp Asn Trp Leu Tyr Phe
 325 330 335
 Ile Pro Leu Ile Ile Ile Gly Ser Phe Phe Met Leu Asn Leu Val Leu
 340 345 350
 Gly Val Leu Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn
 355 360 365
 Arg Arg Ala Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu
 370 375 380
 Leu Asn Gly Tyr Leu Glu Trp Ile Phe Lys Ala Glu Glu Val Met Leu
 385 390 395 400
 Ala Glu Glu Asp Arg Asn Ala Glu Glu Lys Ser Pro Leu Asp Val Leu
 405 410 415
 Lys Arg Ala Ala Thr Lys Lys Ser Arg Asn Asp Leu Ile His Ala Glu
 420 425 430
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Ala Asp Leu Cys Ala Val Gly Ser Pro Phe
 435 440 445
 Ala Arg Ala Ser Leu Lys Ser Gly Lys Thr Glu Ser Ser Ser Tyr Phe
 450 455 460
 Arg Arg Lys Glu Lys Met Phe Arg Phe Phe Ile Arg Arg Met Val Lys
 465 470 475 480
 Ala Gln Ser Phe Tyr Trp Val Val Leu Cys Val Val Ala Leu Asn Thr
 485 490 495
 Leu Cys Val Ala Met Val His Tyr Asn Gln Pro Arg Arg Leu Thr Thr
 500 505 510
 Thr Leu Tyr Phe Ala Glu Phe Val Phe Leu Gly Leu Phe Leu Thr Glu
 515 520 525
 Met Ser Leu Lys Met Tyr Gly Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Phe Arg Ser
 530 535 540
 Ser Phe Asn Cys Phe Asp Phe Gly Val Ile Val Gly Ser Val Phe Glu
 545 550 555 560
 Val Val Trp Ala Ala Ile Lys Pro Gly Ser Ser Phe Gly Ile Ser Val
 565 570 575
 Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys Val Thr Lys Tyr Trp
 580 585 590
 Ser Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu Asn Ser Met Lys Ser
 595 600 605
 Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Leu Phe Ile Val Val Phe Ala
 610 615 620
 Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe Asn Phe Gln Asp Glu
 625 630 635 640
 Thr Pro Thr Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala Ala Ile Leu Thr Val
 645 650 655
 Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Ala Val Met Tyr His Gly
 660 665 670
 Ile Glu Ser Gln Gly Gly Val Ser Lys Gly Met Phe Ser Ser Phe Tyr
 675 680 685
 Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Asn Val Phe
 690 695 700

10

20

30

Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala Gln Glu Leu Thr Lys
 705 710 715 720
 Asp Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln
 725 730 735
 Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val Ser Pro Met Ser Ala Ala Asn Ile
 740 745 750
 Ser Ile Ala Ala Arg Gln Gln Asn Ser Ala Lys Ala Arg Ser Val Trp
 755 760 765
 Glu Gln Arg Ala Ser Gln Leu Arg Leu Gln Asn Leu Arg Ala Ser Cys
 770 775 780
 Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Met Asp Pro Glu Glu Arg Leu Arg Phe Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Arg His Leu Arg Pro Asp Met Lys Thr His Leu Asp Arg Pro
 805 810 815
 Leu Val Val Glu Leu Gly Arg Asp Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Gly
 820 825 830
 Lys Ala Arg Pro Glu Ala Ala Glu Ala Pro Glu Gly Val Asp Pro Pro
 835 840 845
 Arg Arg His His Arg His Arg Asp Lys Asp Lys Thr Pro Ala Ala Gly
 850 855 860
 Asp Gln Asp Arg Ala Glu Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly Glu Pro Gly
 865 870 875 880
 Ala Arg Glu Glu Arg Pro Arg Pro His Arg Ser His Ser Lys Glu Ala
 885 890 895
 Ala Gly Pro Pro Glu Ala Arg Ser Glu Arg Gly Arg Gly Pro Gly Pro
 900 905 910
 Glu Gly Gly Arg Arg His His Arg Arg Gly Ser Pro Glu Glu Ala Ala
 915 920 925
 Glu Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Ala His Arg His Gln Asp Pro Ser
 930 935 940
 Lys Glu Cys Ala Gly Ala Lys Gly Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Gly
 945 950 955 960
 Gly Pro Arg Ala Gly Pro Arg Glu Ala Glu Ser Gly Glu Glu Pro Ala
 965 970 975
 Arg Arg His Arg Ala Arg His Lys Ala Gln Pro Ala His Glu Ala Val
 980 985 990
 Glu Lys Glu Thr Thr Glu Lys Glu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Glu Ile
 995 1000 1005
 Val Glu Ala Asp Lys Glu Lys Glu Leu Arg Asn His Gln Pro Arg Glu
 1010 1015 1020
 Pro His Cys Asp Leu Glu Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gly Pro Met
 1025 1030 1035 1040
 His Thr Leu Pro Ser Thr Cys Leu Gln Lys Val Glu Glu Gln Pro Glu
 1045 1050 1055
 Asp Ala Asp Asn Gln Arg Asn Val Thr Arg Met Gly Ser Gln Pro Pro
 1060 1065 1070
 Asp Pro Asn Thr Ile Val His Ile Pro Val Met Leu Thr Gly Pro Leu
 1075 1080 1085
 Gly Glu Ala Thr Val Val Pro Ser Gly Asn Val Asp Leu Glu Ser Gln
 1090 1095 1100
 Ala Glu Gly Lys Lys Glu Val Glu Ala Asp Asp Val Met Arg Ser Gly
 1105 1110 1115 1120
 Pro Arg Pro Ile Val Pro Tyr Ser Ser Met Phe Cys Leu Ser Pro Thr
 1125 1130 1135
 Asn Leu Leu Arg Arg Phe Cys His Tyr Ile Val Thr Met Arg Tyr Phe
 1140 1145 1150
 Glu Val Val Ile Leu Val Val Ile Ala Leu Ser Ser Ile Ala Leu Ala
 1155 1160 1165
 Ala Glu Asp Pro Val Arg Thr Asp Ser Pro Arg Asn Asn Ala Leu Lys
 1170 1175 1180
 Tyr Leu Asp Tyr Ile Phe Thr Gly Val Phe Thr Phe Glu Met Val Ile
 1185 1190 1195 1200

10

20

30

Lys Met Ile Asp Leu Gly Leu Leu Leu His Pro Gly Ala Tyr Phe Arg
 1205 1210 1215
 Asp Leu Trp Asn Ile Leu Asp Phe Ile Val Val Ser Gly Ala Leu Val
 1220 1225 1230
 Ala Phe Ala Phe Ser Gly Ser Lys Gly Lys Asp Ile Asn Thr Ile Lys
 1235 1240 1245
 Ser Leu Arg Val Leu Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Thr Ile Lys Arg
 1250 1255 1260
 Leu Pro Lys Leu Lys Ala Val Phe Asp Cys Val Val Asn Ser Leu Lys
 1265 1270 1275 1280
 Asn Val Leu Asn Ile Leu Ile Val Tyr Met Leu Phe Met Phe Ile Phe
 1285 1290 1295
 Ala Val Ile Ala Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe Phe Tyr Cys Thr
 1300 1305 1310
 Asp Glu Ser Lys Glu Leu Glu Arg Asp Cys Arg Gly Gln Tyr Leu Asp
 1315 1320 1325
 Tyr Glu Lys Glu Glu Val Glu Ala Gln Pro Arg Gln Trp Lys Lys Tyr
 1330 1335 1340
 Asp Phe His Tyr Asp Asn Val Leu Trp Ala Leu Leu Thr Leu Phe Thr
 1345 1350 1355 1360
 Val Ser Thr Gly Glu Gly Trp Pro Met Val Leu Lys His Ser Val Asp
 1365 1370 1375
 Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Gly Pro Ser Pro Gly Tyr Arg Met Glu Leu
 1380 1385 1390
 Ser Ile Phe Tyr Val Val Tyr Phe Val Val Phe Pro Phe Phe Val
 1395 1400 1405
 Asn Ile Phe Val Ala Leu Ile Ile Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp
 1410 1415 1420
 Lys Val Met Ser Glu Cys Ser Leu Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile
 1425 1430 1435 1440
 Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro Leu Thr Arg Tyr Met Pro Gln Asn
 1445 1450 1455
 Arg Gln Ser Phe Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe Val Val Ser Pro Pro
 1460 1465 1470
 Phe Glu Tyr Phe Ile Met Ala Met Ile Ala Leu Asn Thr Val Val Leu
 1475 1480 1485
 Met Met Lys Phe Tyr Asp Ala Pro Tyr Glu Tyr Glu Leu Met Leu Lys
 1490 1495 1500
 Cys Leu Asn Ile Val Phe Thr Ser Met Phe Ser Met Glu Cys Val Leu
 1505 1510 1515 1520
 Lys Ile Ile Ala Phe Gly Val Leu Asn Tyr Phe Arg Asp Ala Trp Asn
 1525 1530 1535
 Val Phe Asp Phe Val Thr Val Leu Gly Ser Ile Thr Asp Ile Leu Val
 1540 1545 1550
 Thr Glu Ile Ala Glu Thr Asn Asn Phe Ile Asn Leu Ser Phe Leu Arg
 1555 1560 1565
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly Tyr Thr
 1570 1575 1580
 Ile Arg Ile Leu Leu Trp Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala Leu Pro
 1585 1590 1595 1600
 Tyr Val Cys Leu Leu Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Ile Ile
 1605 1610 1615
 Gly Met Gln Val Phe Gly Asn Ile Ala Leu Asp Asp Asp Thr Ser Ile
 1620 1625 1630
 Asn Arg His Asn Asn Phe Arg Thr Phe Leu Gln Ala Leu Met Leu Leu
 1635 1640 1645
 Phe Arg Ser Ala Thr Gly Glu Ala Trp His Glu Ile Met Leu Ser Cys
 1650 1655 1660
 Leu Ser Asn Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Asn Ala Thr Glu Cys Gly
 1665 1670 1675 1680
 Ser Asp Phe Ala Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile Phe Leu Cys Ser
 1685 1690 1695

10

20

30

Phe Leu Met Leu Asn Leu Phe Val Ala Val Ile Met Asp Asn Phe Glu
 1700 1705 1710
 Tyr Leu Thr Arg Asp Ser Ser Ile Leu Gly Pro His His Leu Asp Glu
 1715 1720 1725
 Phe Ile Arg Val Trp Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Ala Cys Gly Arg Ile
 1730 1735 1740
 Ser Tyr Asn Asp Met Phe Glu Met Leu Lys His Met Ser Pro Pro Leu
 1745 1750 1755 1760
 Gly Leu Gly Lys Lys Cys Pro Ala Arg Val Ala Tyr Lys Arg Leu Val
 1765 1770 1775
 Arg Met Asn Met Pro Ile Ser Asn Glu Asp Met Thr Val His Phe Thr
 1780 1785 1790
 Ser Thr Leu Met Ala Leu Ile Arg Thr Ala Leu Glu Ile Lys Leu Ala
 1795 1800 1805
 Pro Ala Gly Thr Lys Gln His Gln Cys Asp Ala Glu Leu Arg Lys Glu
 1810 1815 1820
 Ile Ser Val Val Trp Ala Asn Leu Pro Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu
 1825 1830 1835 1840
 Val Pro Pro His Lys Pro Asp Glu Met Thr Val Gly Lys Val Tyr Ala
 1845 1850 1855
 Ala Leu Met Ile Phe Asp Phe Tyr Lys Gln Asn Lys Thr Thr Arg Asp
 1860 1865 1870
 Gln Met Gln Gln Ala Pro Gly Gly Leu Ser Gln Met Gly Pro Val Ser
 1875 1880 1885
 Leu Phe His Pro Leu Lys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Gln Pro Ala Val
 1890 1895 1900
 Leu Arg Gly Ala Arg Val Phe Leu Arg Gln Lys Ser Ser Thr Ser Leu
 1905 1910 1915 1920
 Ser Asn Gly Gly Ala Ile Gln Asn Gln Glu Ser Gly Ile Lys Glu Ser
 1925 1930 1935
 Val Ser Trp Gly Thr Gln Arg Thr Gln Asp Ala Pro His Glu Ala Arg
 1940 1945 1950
 Pro Pro Leu Glu Arg Gly His Ser Thr Glu Ile Pro Val Gly Arg Ser
 1955 1960 1965
 Gly Ala Leu Ala Val Asp Val Gln Met Gln Ser Ile Thr Arg Arg Gly
 1970 1975 1980
 Pro Asp Gly Glu Pro Gln Pro Gly Leu Glu Ser Gln Gly Arg Ala Ala
 1985 1990 1995 2000
 Ser Met Pro Arg Leu Ala Ala Glu Thr Gln Pro Val Thr Asp Ala Ser
 2005 2010 2015
 Pro Met Lys Arg Ser Ile Ser Thr Leu Ala Gln Arg Pro Arg Gly Thr
 2020 2025 2030
 His Leu Cys Ser Thr Thr Pro Asp Arg Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser
 2035 2040 2045
 Ser His His His His His Arg Cys His Arg Arg Arg Asp Arg Lys Gln
 2050 2055 2060
 Arg Ser Leu Glu Lys Gly Pro Ser Leu Ser Ala Asp Met Asp Gly Ala
 2065 2070 2075 2080
 Pro Ser Ser Ala Val Gly Pro Gly Leu Pro Pro Gly Glu Gly Pro Thr
 2085 2090 2095
 Gly Cys Arg Arg Glu Arg Glu Arg Arg Gln Glu Arg Gly Arg Ser Gln
 2100 2105 2110
 Glu Arg Arg Gln Pro Ser Ser Ser Ser Ser Glu Lys Gln Arg Phe Tyr
 2115 2120 2125
 Ser Cys Asp Arg Phe Gly Gly Arg Glu Pro Pro Lys Pro Lys Pro Ser
 2130 2135 2140
 Leu Ser Ser His Pro Thr Ser Pro Thr Ala Gly Gln Glu Pro Gly Pro
 2145 2150 2155 2160
 His Pro Gln Gly Ser Gly Ser Val Asn Gly Ser Pro Leu Leu Ser Thr
 2165 2170 2175
 Ser Gly Ala Ser Thr Pro Gly Arg Gly Gly Arg Arg Gln Leu Pro Gln
 2180 2185 2190

10

20

30

Thr Pro Leu Thr Pro Arg Pro Ser Ile Thr Tyr Lys Thr Ala Asn Ser
 2195 2200 2205
 Ser Pro Ile His Phe Ala Gly Ala Gln Thr Ser Leu Pro Ala Phe Ser
 2210 2215 2220
 Pro Gly Arg Leu Ser Arg Gly Leu Ser Glu His Asn Ala Leu Leu Gln
 2225 2230 2235 2240
 Arg Asp Pro Leu Ser Gln Pro Leu Ala Pro Gly Ser Arg Ile Gly Ser
 2245 2250 2255
 Asp Pro Tyr Leu Gly Gln Arg Leu Asp Ser Glu Ala Ser Val His Ala
 2260 2265 2270
 Leu Pro Glu Asp Thr Leu Thr Phe Glu Glu Ala Val Ala Thr Asn Ser
 2275 2280 2285
 Gly Arg Ser Ser Arg Thr Ser Tyr Val Ser Ser Leu Thr Ser Gln Ser
 2290 2295 2300
 His Pro Leu Arg Arg Val Pro Asn Gly Tyr His Cys Thr Leu Gly Leu
 2305 2310 2315 2320
 Ser Ser Gly Gly Arg Ala Arg His Ser Tyr His His Pro Asp Gln Asp
 2325 2330 2335
 His Trp Cys

10

<210> 7
 <211> 7177
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<400> 7
 ggggccccgg ctgccccggt ggggccccgg gaggtccgct ggggtcccgg cggctccgtg 60
 gctgctccgc tctgagcgcc tggcgcgccc cgcgccctcc ctgccggggc cgtgggcccg 120
 gggatgcaag cggggccccg gagccatggt ccgcttcggg gacgagctgg ggggcccgta 180
 tggagggccc gggcgccgag agcgggcccc gggcgccggg gccggcgggg cggggggccc 240
 ggggtcccgg gggctgcagc ccggccagcg ggtcctctac aagcaatcga tcggcgagcg 300
 cgcgcgggacc atggcgctgt acaaccccat cccgggtcaag cagaactgct tcaccgtcaa 360
 ccgctcgtct ttcgtcttca gcgaggacaa cgtcgtccgc aaatacggga agcgcatac 420
 cgagtggcct ccattcgagt atatgatcct ggccaccat atcgccaact gcatacgtct 480
 ggcctggag cagcacctcc ctgatgggga caaaacgcc atgtccgagc gctgggacga 540
 cacggagccc tatttcacg ggatcttttg cttcgaggca gggatcaaaa tcatacgtct 600
 gggctttgtc ttccacaagg gctcttacct gcggaacggc tggaaactca tggacttcgt 660
 ggtcgtctct acagggatcc ttgccacggc tggaaactgac ttcgacctgc gaacctgag 720
 ggctgtgctg gtgctgaggc cctgaagct ggtgtctggg attccaagtt tgcagggtgt 780
 gctcaagtcc atcatgaagg ccattggtcc actcctgcag attgggctgc ttctcttctt 840
 tgccatcctc atgttttgca tcattggcct ggagttctac atgggcaagt tcacaaggc 900
 ctgtttcccc aacagcacag atgcggagcc cgtgggtgac ttcccctgtg gcaaggaggc 960
 cccagccccg ctgtgagagg gcgacactga gtgcccggag tactggccag gaccacaact 1020
 tggcatcacc aactttgaca abatacctgt tgccatcttg acgggtgtcc agtgcatac 1080
 catggagggc tggactgaca tcctctataa tacaacgat gcggccggca acacctgga 1140
 ctggctctac ttcatacctc tcatacatcat cggctccttc ttcatacctc acctgggtgt 1200
 gggcgtgctc tcgggggagt ttgccaagga gcgagagagg gtgggagaacc gcccgccctt 1260
 cctgaagctg cgcggcgagc agcagatcga gcgagagctc aacgggtacc tggagtggat 1320
 cttaaggcgc gaggaagtca tgcggccga ggaggacagg aatgcagagg agaagtcccc 1380
 tttgagctg ctgaagagag cggccaccaa gaagagcaga aatgacctga tccacgcaga 1440
 ggagggagag gaccggttg cagatctctg tgetgttggg tccccttcg ccccgccag 1500
 cctcaagagc ggggaagacag agagctcgtc atacttcggg aggaaggaga agatgttccg 1560
 gttttttatc cggcgcatgg tgaaggctca gagcttctac tgggtgtgtg tgtgcgtgtg 1620
 ggcctgaac acactgtgtg tggccatggt gcattacaac cagcccgccg ggcctaccac 1680
 gaccctgtat tttgcagagt ttgttttctt gggctctctc ctcacagaga tgtcccgtaa 1740
 gatgtatggc ctggggccca gaagctactt ccggtcctcc tccaactget tcgactttgg 1800
 ggtcatcgtg gggagcgtct ttgaagtggc ctgggcccgc atcaagccgg gaagctcctt 1860
 tgggatcagt gtgctcgggg cctccgcct gctgaggatc ttcaaagtea cgaagtactg 1920
 gagctcccct cggaaacctg tgggtctcct gctgaactcc atgaagtcca tcatcagcct 1980
 gctcttcttg ctcttctctg tcattgtgtt cttcgccctg ctggggatgc agctgtttgg 2040
 gggacagttc aacttccagg atgagactcc cacaaaccaac ttcgacacct tccctgcccg 2100

20

30

```

catcctcaact gtcttccaga tcctgacggg agaggactgg aatgcagtga tgtatcacgg 2160
gatcgaatcg caaggcggcg tcagcaaaagg catgtttctcg tccttttact tcattgtcct 2220
gacactgttc ggaaactaca ctctgctgaa tgtctttctg gccatcgtcg tggacaacct 2280
ggccaacgcc caagagctga ccaaggatga agaggagatg gaagaagcag ccaatcagaa 2340
gtctgtctcg caaaaaggcca aagaagtggc tgaagtcagc cccatgtctg ccgcgaacat 2400
ctccatcgcc gccaggcagc agaactcggc caaggcggcg tcggtgtggg agcagcgggc 2460
cagccagcta cggctgcaga acctcggggc cagctgcgag gcgctgtaca gcgagatgga 2520
ccccgaggag cggctgcgct tcgccactac gcgccacctg cggccccaca tgaagacgca 2580
cctggaccgg ccgctgggtg tggagctggg ccgacacggc gcgccccggc ccgtgggagg 2640
caaaagcccg cctgaggctg tggagctggg ccgacacggc gcgccccggc gacctccgc gcaggcacca 2700
ccggcaccgc gacaaggaca agacccccgc ggcgggggac caggaccgag cagaggcccc 2760
gaaggcggag agcgggggag ccggtgcccc ggaggagcgg ccgccccgc accgcagcca 2820
cagcaaggag gccgcggggc ccccgagggc gcggagcgg cgcggccgag gccaggccc 2880
cgaggcgggc cggcggcacc accggcggcg ctccccggag gaggcggccg agcgggagcc 2940
ccgacgccac cgcggcacc gccaccagga tcggagcaag gactgcccgc gcgccaaggg 3000
cgagcggcg gcggggcacc ccgacggggc cggagcgggg gagtgcccgc ccccgggagg cggagagcgg 3060
ggaggagccg gcggggcggc accgggcccc gcacaaggcg cagcctgctc acgaggctgt 3120
ggagaaggag accacgggga aggagggcac ggagaaggag gctgagatag tggaaagcga 3180
caaggaaaag gactcccga accaccagcc ccgggagcca cactgtgacc tggagaccag 3240
tggaactgtg actgtgggtc ccattgcacac actgcccagc acctgtctcc agaagggtga 3300
ggaacagcca gaggatgcag acaatcagcg gaactcact cgcattggca gtcagcccc 3360
agaccggaac actattgtac atatcccagt gatgtgacg ggcctcttg gggaaagcca 3420
ggtcgttccc atctcgtggg tggacctgga aagccaagca gagggggaga aggaggtgga 3480
agcggatgac gtgatgagga gccgccccgc gcctatcgtc ccatacagct ccattgtctg 3540
tttaagcccc accaacctgc tcgcccgtt cggcagcacc ggcagcacc atcgtgacca tggagtactt 3600
cgaggtggtc atctcgtggg tcactgcctt gagcagcatc gccctggctg ctgaggacc 3660
agtgcgcaca gactcgcca ggaacaacgc tctgaaatac ctggattaca tttcactgg 3720
tgtctttacc tttgagatgg tgaataagat gatcgacttg ggactgctgc ttaccctgg 3780
agcctatttc cgggacttgt ggaacattct ggaactcoatt gggatcagtg gcgcccgtgt 3840
ggcgtttgct ttctcaggat ccaaaaggaa agacatcaat accatcaagt ctctgagagt 3900
ccttcgtgtc ctgcccgc tcaagaccat caaacggctg cccaagctca aggctgtgtt 3960
tgcagtgtg gtgaactccc tgaagaatgt tgaactcact ttgatgtct acatgctctt 4020
catgttcata tttgcccga ttgcccgtca gctcttcaaa gggaaagttt tctactgca 4080
agatgaatcc aaggagctgg agagggactg cagggtcag tatttggatt atgagaagga 4140
ggaagtggaa cctcagccca ggcagtgga gaaatacgac tttcactacg acaatgtgt 4200
ctgggctctg ctgacgctgt tcacagtgtc caccgggagaa ggctggccca tgggtctgaa 4260
acactccgtg gatgccaact atgaggagca gggctcaagc cctgggtacc gcattggagt 4320
gtccatcttc tacgtgtct accttgtggt ctttcccttc ttctctgca acatctttgt 4380
ggccttgatc atcatcact tccaggagca gggggacaag gtgatgtctg aatgcagct 4440
ggagaagaac gagagggtt gcattgactt cggccatcag gccaaacccc tgacacggta 4500
catgccccaa aaccggcagt cgttccagta taagacgtgg acatttggg tctccccgcc 4560
ctttgaatac ttcatcatgg ccatgatagc cctcaaacct ggggtgctga tgatgaagt 4620
ctatgatgca cctatgagt acgagctgat gctgaaatgc ctgaacatg tgttcacatc 4680
catgtttctc atggaatgag tctgtaagat catgcctttt ggggtgctga actatttcag 4740
agatgcctgg aatgtctttg accttgtcac tgtgttggga agtattactg atattttagt 4800
aacagagatt ggggaaaacg acaatttcat caacctcagc ttcctccgc tctttcgagc 4860
tgccgggctg atcaagctgc tccgccaggc ctacaccatc cgcactctgc tgtggacctt 4920
tgtccagctc tcaaggccc tgcctactg gtgtctgctc attgcccagc atgtccatgc 4980
ctagccatc atcgccatg aggtgtttgg gaatattgcc ctggatgatg acaccagcat 5040
caaccgccac aacaacttcc ggaagctttt gcaagcccct atgctgctgt tcaggagcgc 5100
cacgggggag gctggcaag agatcatgct gtctgcctg agcaaccagg cctgtgatga 5160
gcaggccaat gccaccyagt gtggaagtga ctttgcctac ttctacttgc tctccttcat 5220
cttctgtgct cctttctgga tgttgaacct ctttgtggct gttgatcatg acaattttga 5280
gtacctcag cgggactcct ccatcctagg tccaccac ttggatgagt tcatccgggt 5340
ctgggctgaa tacgacccgg ctgctgtgag gcgcatcagt tacaatgaca tgtttgagat 5400
gctgaaacac atgtccccgc ctctggggct ggggaagaaa tgccctgctc gagttgctta 5460
caagcgcctg gttcgcatga acatgcccac ctccaacgag gacatgactg ttcacttca 5520
gtccacgctg atggccctca tccggacggc actggagatc aagctggccc cagctgggac 5580
aaagcagcat cagtggtgac cggaggtgag gaaggagatt tccgtgtgtg gggccaactc 5640
gcccagaag actttggact tctgtgtacc acccataag cctgatgaga tgacagtggt 5700
gaaggtttat gcagctctga tgatatttga cttotacaag cagaacaaaa ccaccagaga 5760
ccagatgcag caggctcctg gaggcctctc ccagatgggt cctgtgtccc tgttccaccc 5820

```

10

20

30

```

tctgaaggcc accctggagc agacacagcc ggctgtgctc cgaggagccc gggttttcct 5880
tcgacagaag agttccacct cctcagcaa tggcggggcc atacaaaacc aagagagtgg 5940
catcaaagag totgtctcct ggggcactca aaggaccagc gatgcacccc atgaggccag 6000
gccaccacct gagcgtggcc actccacaga gatccctgtg gggcggtcag gagcactggc 6060
tgtggagcgtt cagatgcaga gcataaccgc gaggggccct gatggggagc cccagcctgg 6120
gctggagagc cagggctcag cggcctccat gccccgcctt gggcccgaga ctccagcccg 6180
cacagatgcc agccccatga agcgcctccat ctccacgctg gccccagcggc cccgtgggac 6240
tcactctttgc agcaccaccc cggaccgccc acccctagc caggcgtcgt cgcaccacca 6300
ccaccaccgc tgccaccgac gcagggacag gaagcagagg tccctggaga aggggcccag 6360
cctgtctgccc gatatggatg gcgcaccaag cagtgctgtg gggccggggc tgccccggg 6420
agaggggcct acaggctgcc gcgggaacg agagcgccgg caggagcggg gccggtccca 6480
ggagcggagg cagccctcat cctcctctc ggagaagcag cgcttctact cctgcgaccg 6540
ctttgggggc cgtgagcccc cgaagcccaa gccctocctc agcagccacc caacgtcggc 6600
aacagctggc caggagccgg gacccaccc acaggccggc tcagccgtgg gctttccgaa 6660
cacaacgccc tgctgcagag agacccccctc agccagcccc tggcccctgg ctctcgaatt 6720
ggctctgacc cttacctggg gcagcgtctg gacagtgagg cctctgtcca gccctgctc 6780
gaggacacgc tcactttcga ggaggctgtg gccaccaact cgggcccgtc ctccaggact 6840
tctactgctgt cctccctgac ctcccagctc caccctctcc gcccgctgcc caacggttac 6900
caactgcacc tgggactcag ctcggtggc cgagcagggc acagctacca ccaccctgac 6960
caagaccact ggtgctagct gcaccgtgac cgctcagacg cctgcatgca gcaggcgtgt 7020
gttccagtggt atgagtttta tcattccacac ggggcagtcg gccctcgggg gaggccttgc 7080
ccaccttggt gaggctcctg tggcccctcc ctcccctcc tcccctcttt tactctagac 7140
gacgaataaa gccctgttgc ttgagtgtac gtaccgc 7177

```

10

```

<210> 8
<211> 2237
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 8
Met Val Arg Phe Gly Asp Glu Leu Gly Gly Arg Tyr Gly Gly Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Pro
20 25 30
Gly Pro Gly Gly Leu Gln Pro Gly Gln Arg Val Leu Tyr Lys Gln Ser
35 40 45
Ile Ala Gln Arg Ala Arg Thr Met Ala Leu Tyr Asn Pro Ile Pro Val
50 55 60
Lys Gln Asn Cys Phe Thr Val Asn Arg Ser Leu Phe Val Phe Ser Glu
65 70 75 80
Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Arg Ile Thr Glu Trp Pro Pro
85 90 95
Phe Glu Tyr Met Ile Leu Ala Thr Ile Ile Ala Asn Cys Ile Val Leu
100 105 110
Ala Leu Glu Gln His Leu Pro Asp Gly Asp Lys Thr Pro Met Ser Glu
115 120
Arg Leu Asp Asp Thr Glu Pro Tyr Phe Ile Gly Ile Phe Cys Phe Glu
130 135 140
Ala Gly Ile Lys Ile Ile Ala Leu Gly Phe Val Phe His Lys Gly Ser
145 150 155 160
Tyr Leu Arg Asn Gly Trp Asn Val Met Asp Phe Val Val Val Leu Thr
165 170 175
Gly Ile Leu Ala Thr Ala Gly Thr Asp Phe Asp Leu Arg Thr Leu Arg
180 185 190
Ala Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Leu Val Ser Gly Ile Pro Ser
195 200 205
Leu Gln Val Val Leu Lys Ser Ile Met Lys Ala Met Val Pro Leu Leu
210 215 220
Gln Ile Gly Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ile Leu Met Phe Ala Ile Ile
225 230 235 240

```

20

30

Gly Leu Glu Phe Tyr Met Gly Lys Phe His Lys Ala Cys Phe Pro Asn
 245 250
 Ser Thr Asp Ala Glu Pro Val Gly Asp Phe Pro Cys Gly Lys Glu Ala
 260 265 270
 Pro Ala Arg Leu Cys Glu Gly Asp Thr Glu Cys Arg Glu Tyr Trp Pro
 275 280 285
 Gly Pro Asn Phe Gly Ile Thr Asn Phe Asp Asn Ile Leu Phe Ala Ile
 290 295 300
 Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp Thr Asp Ile Leu
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Asn Asp Ala Ala Gly Asn Thr Trp Asn Trp Leu Tyr Phe
 325 330 335
 Ile Pro Leu Ile Ile Ile Gly Ser Phe Phe Met Leu Asn Leu Val Leu
 340 345
 Gly Val Leu Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu Arg Val Glu Asn
 355 360 365
 Arg Arg Ala Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln Ile Glu Arg Glu
 370 375 380
 Leu Asn Gly Tyr Leu Glu Trp Ile Phe Lys Ala Glu Glu Val Met Leu
 385 390 395 400
 Ala Glu Glu Asp Arg Asn Ala Glu Glu Lys Ser Pro Leu Asp Val Leu
 405 410 415
 Lys Arg Ala Ala Thr Lys Lys Ser Arg Asn Asp Leu Ile His Ala Glu
 420 425 430
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Ala Asp Leu Cys Ala Val Gly Ser Pro Phe
 435 440 445
 Ala Arg Ala Ser Leu Lys Ser Gly Lys Thr Glu Ser Ser Ser Tyr Phe
 450 455 460
 Arg Arg Lys Glu Lys Met Phe Arg Phe Phe Ile Arg Arg Met Val Lys
 465 470 475 480
 Ala Gln Ser Phe Tyr Trp Val Val Leu Cys Val Val Ala Leu Asn Thr
 485 490 495
 Leu Cys Val Ala Met Val His Tyr Asn Gln Pro Arg Arg Leu Thr Thr
 500 505 510
 Thr Leu Tyr Phe Ala Glu Phe Val Phe Leu Gly Leu Phe Leu Thr Glu
 515 520 525
 Met Ser Leu Lys Met Tyr Gly Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Phe Arg Ser
 530 535 540
 Ser Phe Asn Cys Phe Asp Phe Gly Val Ile Val Gly Ser Val Phe Glu
 545 550 555 560
 Val Val Trp Ala Ala Ile Lys Pro Gly Ser Ser Phe Gly Ile Ser Val
 565 570 575
 Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys Val Thr Lys Tyr Trp
 580 585 590
 Ser Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu Asn Ser Met Lys Ser
 595 600 605
 Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe Ile Val Val Phe Ala
 610 615 620
 Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe Asn Phe Gln Asp Glu
 625 630 635 640
 Thr Pro Thr Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala Ala Ile Leu Thr Val
 645 650 655
 Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Ala Val Met Tyr His Gly
 660 665 670
 Ile Glu Ser Gln Gly Gly Val Ser Lys Gly Met Phe Ser Ser Phe Tyr
 675 680 685
 Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Asn Val Phe
 690 695 700
 Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala Gln Glu Leu Thr Lys
 705 710 715 720
 Asp Glu Glu Glu Met Glu Glu Ala Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln
 725 730 735

10

20

30

Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val Ser Pro Met Ser Ala Ala Asn Ile
 Ser Ile Ala Ala Arg Gln Gln Asn Ser Ala Lys Ala Arg Ser Val Trp
 Glu Gln Arg Ala Ser Gln Leu Arg Leu Gln Asn Leu Arg Ala Ser Cys
 Glu Ala Leu Tyr Ser Glu Met Asp Pro Glu Glu Arg Leu Arg Phe Ala
 Thr Thr Arg His Leu Arg Pro Asp Met Lys Thr His Leu Asp Arg Pro
 Leu Val Val Glu Leu Gly Arg Asp Gly Ala Arg Gly Pro Val Gly Gly
 Lys Ala Arg Pro Glu Ala Ala Glu Ala Pro Glu Gly Val Asp Pro Pro
 Arg Arg His His Arg His Arg Asp Lys Asp Lys Thr Pro Ala Ala Gly
 Asp Gln Asp Arg Ala Glu Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly Glu Pro Gly
 Ala Arg Glu Glu Arg Pro Arg Pro His Arg Ser His Ser Lys Glu Ala
 Ala Gly Pro Pro Glu Ala Arg Ser Glu Arg Gly Arg Gly Pro Gly Pro
 Glu Gly Gly Arg Arg His His Arg Arg Gly Ser Pro Glu Glu Ala Ala
 Glu Arg Glu Pro Arg Arg His Arg Ala His Arg His Gln Asp Pro Ser
 Lys Glu Cys Ala Gly Ala Lys Gly Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Gly
 Gly Pro Arg Ala Gly Pro Arg Glu Ala Glu Ser Gly Glu Glu Pro Ala
 Arg Arg His Arg Ala Arg His Lys Ala Gln Pro Ala His Glu Ala Val
 Glu Lys Glu Thr Thr Glu Lys Glu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Glu Ile
 Val Glu Ala Asp Lys Glu Lys Glu Leu Arg Asn His Gln Pro Arg Glu
 Pro His Cys Asp Leu Glu Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gly Pro Met
 His Thr Leu Pro Ser Thr Cys Leu Gln Lys Val Glu Glu Gln Pro Glu
 Asp Ala Asp Asn Gln Arg Asn Val Thr Arg Met Gly Ser Gln Pro Pro
 Asp Pro Asn Thr Ile Val His Ile Pro Val Met Leu Thr Gly Pro Leu
 Gly Glu Ala Thr Val Val Pro Ser Gly Asn Val Asp Leu Glu Ser Gln
 Ala Glu Gly Lys Lys Glu Val Glu Ala Asp Asp Val Met Arg Ser Gly
 Pro Arg Pro Ile Val Pro Tyr Ser Ser Met Phe Cys Leu Ser Pro Thr
 Asn Leu Leu Arg Arg Phe Cys His Tyr Ile Val Thr Met Arg Tyr Phe
 Glu Val Val Ile Leu Val Val Ile Ala Leu Ser Ser Ile Ala Leu Ala
 Ala Glu Asp Pro Val Arg Thr Asp Ser Pro Arg Asn Asn Ala Leu Lys
 Tyr Leu Asp Tyr Ile Phe Thr Gly Val Phe Thr Phe Glu Met Val Ile
 Lys Met Ile Asp Leu Gly Leu Leu Leu His Pro Gly Ala Tyr Phe Arg
 Asp Leu Trp Asn Ile Leu Asp Phe Ile Val Val Ser Gly Ala Leu Val
 740 745 750 755 760 765 770 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230

10

20

30

Ala Phe Ala Phe Ser Gly Ser Lys Gly Lys Asp Ile Asn Thr Ile Lys
 1235 1240 1245
 Ser Leu Arg Val Leu Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Thr Ile Lys Arg
 1250 1255 1260
 Leu Pro Lys Leu Lys Ala Val Phe Asp Cys Val Val Asn Ser Leu Lys
 1265 1270 1275 1280
 Asn Val Leu Asn Ile Leu Ile Val Tyr Met Leu Phe Met Phe Ile Phe
 1285 1290 1295
 Ala Val Ile Ala Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe Phe Tyr Cys Thr
 1300 1305 1310
 Asp Glu Ser Lys Glu Leu Glu Arg Asp Cys Arg Gly Gln Tyr Leu Asp
 1315 1320 1325
 Tyr Glu Lys Glu Glu Val Glu Ala Gln Pro Arg Gln Trp Lys Lys Tyr
 1330 1335 1340
 Asp Phe His Tyr Asp Asn Val Leu Trp Ala Leu Leu Thr Leu Phe Thr
 1345 1350 1355 1360
 Val Ser Thr Gly Glu Gly Trp Pro Met Val Leu Lys His Ser Val Asp
 1365 1370 1375
 Ala Thr Tyr Glu Glu Gln Gly Pro Ser Pro Gly Tyr Arg Met Glu Leu
 1380 1385 1390
 Ser Ile Phe Tyr Val Val Tyr Phe Val Val Phe Pro Phe Phe Val
 1395 1400 1405
 Asn Ile Phe Val Ala Leu Ile Ile Ile Thr Phe Gln Glu Gln Gly Asp
 1410 1415 1420
 Lys Val Met Ser Glu Cys Ser Leu Glu Lys Asn Glu Arg Ala Cys Ile
 1425 1430 1435 1440
 Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro Leu Thr Arg Tyr Met Pro Gln Asn
 1445 1450 1455
 Arg Gln Ser Phe Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe Val Val Ser Pro Pro
 1460 1465 1470
 Phe Glu Tyr Phe Ile Met Ala Met Ile Ala Leu Asn Thr Val Val Leu
 1475 1480 1485
 Met Met Lys Phe Tyr Asp Ala Pro Tyr Glu Tyr Glu Leu Met Leu Lys
 1490 1495 1500
 Cys Leu Asn Ile Val Phe Thr Ser Met Phe Ser Met Glu Cys Val Leu
 1505 1510 1515 1520
 Lys Ile Ile Ala Phe Gly Val Leu Asn Tyr Phe Arg Asp Ala Trp Asn
 1525 1530 1535
 Val Phe Asp Phe Val Thr Val Leu Gly Ser Ile Thr Asp Ile Leu Val
 1540 1545 1550
 Thr Glu Ile Ala Glu Thr Asn Asn Phe Ile Asn Leu Ser Phe Leu Arg
 1555 1560 1565
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly Tyr Thr
 1570 1575 1580
 Ile Arg Ile Leu Leu Trp Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala Leu Pro
 1585 1590 1595 1600
 Tyr Val Cys Leu Leu Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Ile Ile
 1605 1610 1615
 Gly Met Gln Val Phe Gly Asn Ile Ala Leu Asp Asp Asp Thr Ser Ile
 1620 1625 1630
 Asn Arg His Asn Asn Phe Arg Thr Phe Leu Gln Ala Leu Met Leu Leu
 1635 1640 1645
 Phe Arg Ser Ala Thr Gly Glu Ala Trp His Glu Ile Met Leu Ser Cys
 1650 1655 1660
 Leu Ser Asn Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Asn Ala Thr Glu Cys Gly
 1665 1670 1675 1680
 Ser Asp Phe Ala Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile Phe Leu Cys Ser
 1685 1690 1695
 Phe Leu Met Leu Asn Leu Phe Val Ala Val Ile Met Asp Asn Phe Glu
 1700 1705 1710
 Tyr Leu Thr Arg Asp Ser Ser Ile Leu Gly Pro His His Leu Asp Glu
 1715 1720 1725

10

20

30

Phe Ile Arg Val Trp Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Ala Cys Gly Arg Ile
 1730 1735 1740
 Ser Tyr Asn Asp Met Phe Glu Met Leu Lys His Met Ser Pro Pro Leu
 1745 1750 1755
 Gly Leu Gly Lys Lys Cys Pro Ala Arg Val Ala Tyr Lys Arg Leu Val
 1765 1770 1775
 Arg Met Asn Met Pro Ile Ser Asn Glu Asp Met Thr Val His Phe Thr
 1780 1785 1790
 Ser Thr Leu Met Ala Leu Ile Arg Thr Ala Leu Glu Ile Lys Leu Ala
 1795 1800 1805
 Pro Ala Gly Thr Lys Gln His Gln Cys Asp Ala Glu Leu Arg Lys Glu
 1810 1815 1820
 Ile Ser Val Val Trp Ala Asn Leu Pro Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu
 1825 1830 1835
 Val Pro Pro His Lys Pro Asp Glu Met Thr Val Gly Lys Val Tyr Ala
 1845 1850 1855
 Ala Leu Met Ile Phe Asp Phe Tyr Lys Gln Asn Lys Thr Thr Arg Asp
 1860 1865 1870
 Gln Met Gln Gln Ala Pro Gly Gly Leu Ser Gln Met Gly Pro Val Ser
 1875 1880 1885
 Leu Phe His Pro Leu Lys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Gln Pro Ala Val
 1890 1895 1900
 Leu Arg Gly Ala Arg Val Phe Leu Arg Gln Lys Ser Ser Thr Ser Leu
 1905 1910 1915
 Ser Asn Gly Gly Ala Ile Gln Asn Gln Glu Ser Gly Ile Lys Glu Ser
 1925 1930 1935
 Val Ser Trp Gly Thr Gln Arg Thr Gln Asp Ala Pro His Glu Ala Arg
 1940 1945 1950
 Pro Pro Leu Glu Arg Gly His Ser Thr Glu Ile Pro Val Gly Arg Ser
 1955 1960 1965
 Gly Ala Leu Ala Val Asp Val Gln Met Gln Ser Ile Thr Arg Arg Gly
 1970 1975 1980
 Pro Asp Gly Glu Pro Gln Pro Gly Leu Glu Ser Gln Gly Arg Ala Ala
 1985 1990 1995 2000
 Ser Met Pro Arg Leu Ala Ala Glu Thr Gln Pro Val Thr Asp Ala Ser
 2005 2010 2015
 Pro Met Lys Arg Ser Ile Ser Thr Leu Ala Gln Arg Pro Arg Gly Thr
 2020 2025 2030
 His Leu Cys Ser Thr Thr Pro Asp Arg Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser
 2035 2040 2045
 Ser His His His His Arg Cys His Arg Arg Arg Asp Arg Lys Gln
 2050 2055 2060
 Arg Ser Leu Glu Lys Gly Pro Ser Leu Ser Ala Asp Met Asp Gly Ala
 2065 2070 2075 2080
 Pro Ser Ser Ala Val Gly Pro Gly Leu Pro Pro Gly Glu Gly Pro Thr
 2085 2090 2095
 Gly Cys Arg Arg Glu Arg Glu Arg Arg Gln Glu Arg Gly Arg Ser Gln
 2100 2105 2110
 Glu Arg Arg Gln Pro Ser Ser Ser Ser Glu Lys Gln Arg Phe Tyr
 2115 2120 2125
 Ser Cys Asp Arg Phe Gly Gly Arg Glu Pro Pro Lys Pro Lys Pro Ser
 2130 2135 2140
 Leu Ser Ser His Pro Thr Ser Pro Thr Ala Gly Gln Glu Pro Gly Pro
 2145 2150 2155 2160
 His Pro Gln Ala Gly Ser Ala Val Gly Phe Pro Asn Thr Thr Pro Cys
 2165 2170 2175
 Cys Arg Glu Thr Pro Ser Ala Ser Pro Trp Pro Leu Ala Leu Glu Leu
 2180 2185 2190
 Ala Leu Thr Leu Thr Trp Gly Ser Val Trp Thr Val Arg Pro Leu Ser
 2195 2200 2205
 Thr Pro Cys Leu Arg Thr Arg Ser Leu Ser Arg Arg Leu Trp Pro Pro
 2210 2215 2220

10

20

30

Thr Arg Ala Ala Pro Pro Gly Leu Pro Thr Cys Pro Pro
2225 2230 2235

<210> 9
<211> 7808
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

<400> 9
gatgtcccga gctgctatcc ccggctcggc ccgggcagcc gccttctgag cccccgacc 60
gagggcgcga gccgcgcgcg ccgatgggc tgggcccgtg agcgtctccg cagtctgagc 120
tccagccgcc gcgctcccag ccccgccagc ctcagcatca gggcgggcgg cggcgggcgg 180
ggcgtcttcc gcctcgttcc ccgcagcgtc acccgagcc ctttgcctct tgcagaatgg 240
ccgctctcgg agacgagatg ccggcccgtc acgggggagg aggcctccgg gcagccgccg 300
gggtggctcg gggcagcggg ggcggcggag gagccggggg cagccggcag ggcgggcagc 360
ccggggcgca aaggatgtac aagcagtcaa tggcgcagag agcgcggacc atggcactct 420
acaaccccat cccgctccga cagaactgcc tcacgggtaa ccggtctctc tctctcttca 480
gcgaagacaa cgtggtgaga aaatacgcca aaaagatcac cgaatggcct ccctttgaat 540
atatgatctt agccaccatc atagcgaatt gcactgtcct cgactggag cagcatctgc 600
ctgatgatga caagaccccg atgtctgaac ggtctggatg cacagaacca tacttcattg 660
gaattttttg tttcgaggct ggaattaaaa tcattgccct tggglttgcc tcccaaaag 720
gctcctactt gaggaatggc tggaatgtca tggactttgt ggtggtgcta acgggcatct 780
tggcgacgtt tgggacggag tttgacctac ggcagctgag ggcagttcga gtgctgcggc 840
cgctcaagct ggtgtctgga atcccaagtt tacaagtcgt cctgaagtcg atcatgaagg 900
cgatgatccc tttgctgcag atcggcctcc tcctatcttt tgcactcctt atttttgcaa 960
tcatagggtt agaattttat atgggaaaaa ttcataccac ctgctttgaa gaggggacag 1020
atgacattca gggtgagtct ccggctccat gtgggacaga agagcccgcc cgcacctgcc 1080
ccaatgggac caaatgtcag ccctactggg aagggcccaa caacgggatc actcagttcg 1140
acaacatcct gtttgcatg ctgactgttt tccagtcgat aaccatggaa ggggtggactg 1200
atctcctcta caatagcaac gatgcctcag ggaacacttg gaactgggtg tacttcatcc 1260
ccctcatcat catcggctcc ttttttatgc tgaaccttgt gctgggtgtg ctgtcagggg 1320
agtttgccaa agaaagggaa ccgggtggaga accggcgggc tttctgaag ctgagggcgg 1380
aacaacagat tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg 1440
tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg agcagaggca tccctttgat ggagctctgc 1500
ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgtctaa ccccgaagag gctgaggatc 1560
agctggctga tatagcctct ccttcgcccg agccagcatt aaaagtgcc 1620
agctggagaa ctogaccttt tttcaaaaaa agggagaggag gatgcgtttc tacatccgcc 1680
gcatggtoaa aactcaggcc ttctactgga ctgtactcag tttggtagct ctcaacacgc 1740
tgtgtgttgc tattgttcac tacaaccagc ccgagtggtc ctccgacttc ctttactatg 1800
cagaattcat tttottagga ctctttatgt ccgaaatggt tataaaaaatg tacgggcttg 1860
ggacgcggcc ttaactccac tcttctctca actgcttnga ctgtggggtt atcattggga 1920
gcatactcga ggtcatctgg gctgtcataa aacctggcac atcctttgga atcagcgtgt 1980
tacgagccct caggttattg cgtatcttca aagtcacaaa gtactgggca tctctcagaa 2040
acctggctgt ctctctctc aactccatga agtccatcat cagcctggtg tttctccttt 2100
tctgttcoat tgtctctctt gcccttttgg gaatgcaact cctcggcggc cagtttaatt 2160
tcgatgaagg gactcctccc accaactctg atacttttc agcagcaata atgacggtgt 2220
ttcagatcct gacgggcgaa gactggaacg aggtcatgta cgacgggatc aagtctcagg 2280
ggggcgtgca gggcggcatg gtgtctctca tctatctcat tgtactgacg ctctttggga 2340
actacacct cctgaaatgtg ttcttggcca tcgctgtgga caatctggcc aacgccagg 2400
agctcaccaa ggtggaggcg gacgagcaag aggaagaaga agcagcgaac cagaacttg 2460
ccctacagaa agccaaggag gtggcagaag tgagtctct gtccgcgcc aacatgtcta 2520
tagctgtgaa agagcaacag aagaatcaaa agccagccaa gtccgtgtgg gagcagcga 2580
ccagtggatg gcgaaagcag aacttgctgg ccagccggga ggcctgtat aacgaaatgg 2640
acccggacga gcgctggaag gctgcctaca cggcgacct gcggccagac atgaagacgc 2700
acttggaccg gccgctggtg gtggaccocg aggagaaccg caacaacaac accaacaaga 2760
gccggggcgg ccgagcccacc gtggaccagc gcctcggcca gcagcgcgcc gaggacttcc 2820
tcaggaaaca ggcccgtctac cacgatccgg cccgggaccc cagcggctcg gcgggcttg 2880
acgcacggag gccctggcgg ggaagccagg agcccgagct gagccggag ggaccctacg 2940
gccgcgagtc ggaccaccac gcccgggagg gcagcctgga gcaaccggg ttctgggag 3000
gcgagggcca gcgaggaag gccggggacc cccaccggag gcacgtgcac cggcaggggg 3060
gcagcagggg gagccgcagc ggttccccgc gcacggggcc ggacggggag catcgacgtc 3120
atcgcgcgca ccgacggccc ggggaggagg gtcgggagga caaggcggag cggagggcgc 3180

```

10

20

30

```

ggcaccgcgga gggcagccgg cgggcccggg gcggcgaggg cgagggcgag ggccccgacg 3240
ggggcgagcg caggagaagg caccggcatg gcgctccagc cacgtacgag ggggacgagc 3300
ggagggaagg caaggagcgg aggcabcgga ggaggaagga gaaccagggc tccggggctc 3360
ctgtgtcggg ccccaacctg tcaaccaccc ggccaatcca gcaggacctg ggccgccaag 3420
accacccctt ggccagaggat attgacaaca tgaagaacaa caagctggcc acccgggagt 3480
cggccgcctc ccacggcagc cttggccacg ccggcctgcc ccagagccca gccaaagatgg 3540
gaaacagcac cgaccccggc cccatgctgg ccatecctgc catggccacc aacccccaga 3600
acgcccgcag ccgcccggag cccaacaacc cggggaaacc atccaatccc ggccccccca 3660
agacccccga gaatagcctt atcgtcacca accccagcgg caccagacc aattcagcta 3720
agactgcag gaaaccgac cacaccacag tggacatccc ccagcctgc ccaccccccc 3780
toaaccacac cgtcgtacaa gtgaacaaaa acgccaaacc agaccactg ccaaaaaaag 3840
aggaagagaa gaaggaggag gaggaagacg accgtgggga agacggccct aagccaatgc 3900
ctccctatag ctccatgttc atccctgtcca cgaccaaccc ccttcgcccg ctgtgccatt 3960
acatcctgaa cctcgcctac tttgagatgt gcatecctcat ggtcattbgc atgagcagca 4020
tcgcccctgg cgcggaggac cctgtgcagc ccaacgcacc tcggaacaac gtgctgcgat 4080
actttgacta cgtttttaca ggcgctctca cctttgagat ggtgatcaag atgattgacc 4140
tggggctcgt cctgcacag ggtgcctact tccgtgacct ctggaatatt ctgcacttca 4200
tagtggctag tggggccctg gttagcctttg ccttcactgg caatagcaaa ggaaaagaca 4260
tcaacacgag taaatccctc cgagtcctcc ggggtctacg acctttaa accatcaagc 4320
ggctgcacaa getcaaggct gtgtttgact gttgtgtgaa ctcaacttaa aacgtcttca 4380
acatcctcat cgtctacatg ctatcctatgt tcoatctcgc cgtgggtggc gtgcagctct 4440
tcaaggggaa atcttccac tgcactgacg agtccaaaga gtttgagaaa gattgtcgag 4500
cgaatccct gtacctagc aagaatgagg tgaaggcgg agaccgggag tggaaagaag 4560
atgaattcca ttacgacaat gtgctgtggg ctctgtctgac cctcttcacc gtgtccaccg 4620
gagaaggctg gccacaggtc ctcaagcatt cgggtggacgc cacctttgag aaccagggcc 4680
ccagcccag gtaccgcag gagatgtcca tttctacgt cgtotacttt ttggtgttcc 4740
ccttctctct tgtcaatata tttgtggcct tgatcatcat caccttccag gagcaagggg 4800
acaagatgat ggaggaatac agcctggaga aaaatgagag ggcttgcatt gatttcgcca 4860
tcagcccaaa cccctgacc cgcacacatgc ccgcaacaa gcagagcttc cagtaccgca 4920
tgtggcagtt cgtgggtgtc cggcctttcg agtacacgat catggccatg atcgccctca 4980
acaccctcgt gcttatgatg aagttctatg gggctctctg tgccttatgaa aatgcctcgc 5040
gggtgttcaa catcctctc acctcctctc tctctctgga atgtgtgctg aaagtcatgg 5100
cttttgggat tctgaattat ttccgcatg cctggaacat cttcgacttt gtgactgttc 5160
tgggacagcat caccgatata ctcgtgactg agtttgggaa tccgaataac ttcatacaacc 5220
tgagctttct cggcctcttc cggctgccc agtctctcaa acttctccgt cagggttaca 5280
ccatccgcat tcttctctgg accttctggt cggccttccat gatgtctgtc 5340
tgctgatcgc catgctcttc ttcctctatg ccatcatigg gatgcaggtg tttggtaaca 5400
ttggcatoga cgtggaggac gaggacagtg atgaagatga gttccaaatc actgagcaca 5460
ataactccg gacctcttc caggcctca cctctctctt ccggagtgcc accggggaag 5520
cttggcacia catcatgctt tccctgctca ggggaaacc gtgtgataag aactctggca 5580
tctgactcgc agagtgtgyc aatgaatttg cttattttta ctttgtttcc ttcactctcc 5640
tctgctcgtt tctgatgctg aatctctttg tcccgctcat catggacaac tttgagtaac 5700
tcacccgaga ctctccatc ctgggcccc accacctgga tgagtacgtg cgtgtctggg 5760
ccgagtatga ccccgcatg tggggccgca tgccttacct ggacatgtat cagatgtctga 5820
gacacatgtc tccgcccctg ggtctgggga agaagtgtcc ggccagatg gcttacaagc 5880
ggcttctcgc gatggacctg ccctgcgag atgacaacac cgtccacttc aattccacc 5940
tcatggctct gatccgcaca gcctgggaca tcaagattgc caagggagga gccgacaaac 6000
agcagatgga cgtgagctg cggaaaggaga tgatggcgat ttggcccaat ctgtcccaga 6060
agacgctaga cctgctggtc acacctcaca cctcacggt cctcacggt gggaaagatc 6120
acgcagccat gatgatcatg gactactacc ggcagagcaa ggccaagaag ctgcaggcca 6180
tgccgagga gcaggaccgg acacccctca tgttccagcg catggagccc ccgtcccaa 6240
cgcaggaagg gggacctgyc cagaacgccc tcccctccac ccagctggac ccaggaggag 6300
ccctgatggc tcacgaaagc ggcctcaagg agagcccgtc ctgggtgacc cagcgtgcc 6360
aggagatggt ccagaagacg ggcacatgga gtccggaaca agggcccccct accgacatgc 6420
ccaacagcca gcttaactct cagtccgtgg agatgcgaga gatggcaga gatggctact 6480
ccgacagcga gcactacctc cccatggaag gccagggccg ggtgctctcc atgccccgc 6540
tccctgcaga gaaccagagg agaaggggcc ggccaactgc gaataacctc agtaccatct 6600
cagacaccag cccatgaag cgttcagcct ccgtgtcggg cccaaggcc cgaccctgg 6660
acgattactc gctggagcgg gtcccgcgg aggagaacca ggggcaccac cagggcgcc 6720
gcgaccgcag ccaccgcgcc tctgagcct ccctgggccc ctacaccgat gttgacacag 6780
gcttggggac agacctgagc atgaccacc aatccgggga cctgcctcg aaggagcggg 6840
accagagcgc gggccggccc aaggatcgga agcatcgaca gaccaccac caccaccac 6900

```

10

20

30

```

accaccacca tccccgcgcc cccgacaagg accgctatgc ccaggaacgg cgggaccacg 6960
gccccggcacg ggctcggggac cagcgctggt cccgctcgcc cagcgagggc cgagagcaca 7020
tggcgcaccc gcagggcagc agttccgtaa gtggaagccc agccccctca acatctggta 7080
ccagcactcc gggcgggggc cgccgcagc tccccagac cccctccacc cccccggcac 7140
acgtgtccta ttcccctgtg atccgtaagg cggcgcgctc ggggcccccg cagcagcagc 7200
agcagcagca gcagcagcag cagggcggtg ccagggccgg ccggggcgcc accagcgggc 7260
ctcggaggta cccaggcccc acggccgagc ctctggccgg agatcggccg cccacggggg 7320
gccacagcag cggcgcgctc cccaggatgg agagggcggg cccaggcccg gcccgaggcg 7380
agtccccacc ggctgtcga cagcgcgggg cccgggtggc ggcatctggc ccgcacgtgt 7440
ccgagggggc cccgggtccc cggcaccatg gctactaccg gggctccgac tacgacgagg 7500
ccgatggccc gggcagcggg ggcggcgagg aggccatggc cggggcctac gacgcgccac 7560
cccccgtaac acacgcgtcc tcgggcgcca cggggcgctc gccaggact cccccggcct 7620
cgggccccggc ctgcgcctcg ccttctcggc acggccggcg actcccacac ggctactacc 7680
cggcgcacgg actggccagg ccccgcgggc cgggctccag gaagggcctg cacgaacct 7740
acagcgagag tgacgatgat tgggtgctaag cccggcgag gtggcgccc cccggcccc 7800
cagcacc 7808

```

10

```

<210> 10
<211> 2510
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 10
Met Ala Arg Phe Gly Asp Glu Met Pro Ala Arg Tyr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val Val Val Gly Ser Gly Gly Gly Arg Gly
20 25 30
Ala Gly Gly Ser Arg Gln Gly Gly Gln Pro Gly Ala Gln Arg Met Tyr
35 40 45
Lys Gln Ser Met Ala Gln Arg Ala Arg Thr Met Ala Leu Tyr Asn Pro
50 55 60
Ile Pro Val Arg Gln Asn Cys Leu Thr Val Asn Arg Ser Leu Phe Leu
65 70 75 80
Phe Ser Glu Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Lys Ile Thr Glu
85 90 95
Trp Pro Pro Phe Glu Tyr Met Ile Leu Ala Thr Ile Ile Ala Asn Cys
100 105 110
Ile Val Leu Ala Leu Glu Gln His Leu Pro Asp Asp Asp Lys Thr Pro
115 120 125
Met Ser Glu Arg Leu Asp Asp Thr Glu Pro Tyr Phe Ile Gly Ile Phe
130 135 140
Cys Phe Glu Ala Gly Ile Lys Ile Ile Ala Leu Gly Phe Ala Phe His
145 150 155 160
Lys Gly Ser Tyr Leu Arg Asn Gly Trp Asn Val Met Asp Phe Val Val
165 170 175
Val Leu Thr Gly Ile Leu Ala Thr Val Gly Thr Glu Phe Asp Leu Arg
180 185 190
Thr Leu Arg Ala Val Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Leu Val Ser Gly
195 200 205
Ile Pro Ser Leu Gln Val Val Leu Lys Ser Ile Met Lys Ala Met Ile
210 215 220
Pro Leu Leu Gln Ile Gly Leu Leu Leu Phe Phe Ala Ile Leu Ile Phe
225 230 235 240
Ala Ile Ile Gly Leu Glu Phe Tyr Met Gly Lys Phe His Thr Thr Cys
245 250 255
Phe Glu Glu Gly Thr Asp Asp Ile Gln Gly Glu Ser Pro Ala Pro Cys
260 265 270
Gly Thr Glu Glu Pro Ala Arg Thr Cys Pro Asn Gly Thr Lys Cys Gln
275 280 285
Pro Tyr Trp Glu Gly Pro Asn Asn Gly Ile Thr Gln Phe Asp Asn Ile

```

20

30

290 295 300
 Leu Phe Ala Val Leu Thr Val Phe Gln Cys Ile Thr Met Glu Gly Trp
 305 310 315
 Thr Asp Leu Leu Tyr Asn Ser Asn Asp Ala Ser Gly Asn Thr Trp Asn
 325 330 335
 Trp Leu Tyr Phe Ile Pro Leu Ile Ile Ile Gly Ser Phe Phe Met Leu
 340 345 350
 Asn Leu Val Leu Gly Val Leu Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Arg Glu
 355 360 365
 Arg Val Glu Asn Arg Arg Ala Phe Leu Lys Leu Arg Arg Gln Gln Gln
 370 375 380
 Ile Glu Arg Glu Leu Asn Gly Tyr Met Glu Trp Ile Ser Lys Ala Glu
 385 390 395 400
 Glu Val Ile Leu Ala Glu Asp Glu Thr Asp Gly Glu Gln Arg His Pro
 405 410 415
 Phe Asp Gly Ala Leu Arg Arg Thr Thr Ile Lys Lys Ser Lys Thr Asp
 420 425 430
 Leu Leu Asn Pro Glu Glu Ala Glu Asp Gln Leu Ala Asp Ile Ala Ser
 435 440 445
 Val Gly Ser Pro Phe Ala Arg Ala Ser Ile Lys Ser Ala Lys Leu Glu
 450 455 460
 Asn Ser Thr Phe Phe His Lys Lys Glu Arg Arg Met Arg Phe Tyr Ile
 465 470 475 480
 Arg Arg Met Val Lys Thr Gln Ala Phe Tyr Trp Thr Val Leu Ser Leu
 485 490 495
 Val Ala Leu Asn Thr Leu Cys Val Ala Ile Val His Tyr Asn Gln Pro
 500 505 510
 Glu Trp Leu Ser Asp Phe Leu Tyr Tyr Ala Glu Phe Ile Phe Leu Gly
 515 520 525
 Leu Phe Met Ser Glu Met Phe Ile Lys Met Tyr Gly Leu Gly Thr Arg
 530 535 540
 Pro Tyr Phe His Ser Ser Phe Asn Cys Phe Asp Cys Gly Val Ile Ile
 545 550 555 560
 Gly Ser Ile Phe Glu Val Ile Trp Ala Val Ile Lys Pro Gly Thr Ser
 565 570 575
 Phe Gly Ile Ser Val Leu Arg Ala Leu Arg Leu Leu Arg Ile Phe Lys
 580 585 590
 Val Thr Lys Tyr Trp Ala Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu
 595 600 605
 Asn Ser Met Lys Ser Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe
 610 615 620
 Ile Val Val Phe Ala Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe
 625 630 635 640
 Asn Phe Asp Glu Gly Thr Pro Pro Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala
 645 650 655
 Ala Ile Met Thr Val Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Glu
 660 665 670
 Val Met Tyr Asp Gly Ile Lys Ser Gln Gly Gly Val Gln Gly Gly Met
 675 680 685
 Val Phe Ser Ile Tyr Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr
 690 695 700 30
 Leu Leu Asn Val Phe Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala
 705 710 715 720
 Gln Glu Leu Thr Lys Val Glu Ala Asp Glu Gln Glu Glu Glu Ala
 725 730 735
 Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val
 740 745 750
 Ser Pro Leu Ser Ala Ala Asn Met Ser Ile Ala Val Lys Glu Gln Gln
 755 760 765
 Lys Asn Gln Lys Pro Ala Lys Ser Val Trp Glu Gln Arg Thr Ser Glu
 770 775 780
 Met Arg Lys Gln Asn Leu Leu Ala Ser Arg Glu Ala Leu Tyr Asn Glu

10

20

30

785 790 795 800
 Met Asp Pro Asp Glu Arg Trp Lys Ala Ala Tyr Thr Arg His Leu Arg
 805 810 815
 Pro Asp Met Lys Thr His Leu Asp Arg Pro Leu Val Val Asp Pro Gln
 820 825 830
 Glu Asn Arg Asn Asn Asn Thr Asn Lys Ser Arg Ala Ala Glu Pro Thr
 835 840 845
 Val Asp Gln Arg Leu Gly Gln Gln Arg Ala Glu Asp Phe Leu Arg Lys
 850 855 860
 Gln Ala Arg Tyr His Asp Arg Ala Arg Asp Pro Ser Gly Ser Ala Gly
 865 870 875 880
 Leu Asp Ala Arg Arg Pro Trp Ala Gly Ser Gln Glu Ala Glu Leu Ser
 885 890 895
 Arg Glu Gly Pro Tyr Gly Arg Glu Ser Asp His His Ala Arg Glu Gly
 900 905 910
 Ser Leu Glu Gln Pro Gly Phe Trp Glu Gly Glu Ala Glu Arg Gly Lys
 915 920 925
 Ala Gly Asp Pro His Arg Arg His Val His Arg Gln Gly Gly Ser Arg
 930 935 940
 Glu Ser Arg Ser Gly Ser Pro Arg Thr Gly Ala Asp Gly Glu His Arg
 945 950 955 960
 Arg His Arg Ala His Arg Arg Pro Gly Glu Gly Pro Glu Asp Lys
 965 970 975
 Ala Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Glu Gly Ser Arg Pro Ala Arg Gly
 980 985 990
 Gly Glu Gly Glu Gly Glu Gly Pro Asp Gly Gly Glu Arg Arg Arg Arg
 995 1000 1005
 His Arg His Gly Ala Pro Ala Thr Tyr Glu Gly Asp Ala Arg Arg Glu
 1010 1015 1020
 Asp Lys Glu Arg Arg His Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser Gly
 1025 1030 1035 1040
 Val Pro Val Ser Gly Pro Asn Leu Ser Thr Thr Arg Pro Ile Gln Gln
 1045 1050 1055
 Asp Leu Gly Arg Gln Asp Pro Pro Leu Ala Glu Asp Ile Asp Asn Met
 1060 1065 1070
 Lys Asn Asn Lys Leu Ala Thr Ala Glu Ser Ala Ala Pro His Gly Ser
 1075 1080 1085
 Leu Gly His Ala Gly Leu Pro Gln Ser Pro Ala Lys Met Gly Asn Ser
 1090 1095 1100
 Thr Asp Pro Gly Pro Met Leu Ala Ile Pro Ala Met Ala Thr Asn Pro
 1105 1110 1115 1120
 Gln Asn Ala Ala Ser Arg Arg Thr Pro Asn Asn Pro Gly Asn Pro Ser
 1125 1130 1135
 Asn Pro Gly Pro Pro Lys Thr Pro Glu Asn Ser Leu Ile Val Thr Asn
 1140 1145 1150
 Pro Ser Gly Thr Gln Thr Asn Ser Ala Lys Thr Ala Arg Lys Pro Asp
 1155 1160 1165
 His Thr Thr Val Asp Ile Pro Pro Ala Cys Pro Pro Leu Asn His
 1170 1175 1180
 Thr Val Val Gln Val Asn Lys Asn Ala Asn Pro Asp Pro Leu Pro Lys
 1185 1190 1195 1200
 Lys Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Asp Arg Gly Glu Asp
 1205 1210 1215
 Gly Pro Lys Pro Met Pro Pro Tyr Ser Ser Met Phe Ile Leu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Thr Asn Pro Leu Arg Arg Leu Cys His Tyr Ile Leu Asn Leu Arg Tyr
 1235 1240 1245
 Phe Glu Met Cys Ile Leu Met Val Ile Ala Met Ser Ser Ile Ala Leu
 1250 1255 1260
 Ala Ala Glu Asp Pro Val Gln Pro Asn Ala Pro Arg Asn Asn Val Leu
 1265 1270 1275 1280
 Arg Tyr Phe Asp Tyr Val Phe Thr Gly Val Phe Thr Phe Glu Met Val

10

20

30

1285 1290 1295
 Ile Lys Met Ile Asp Leu Gly Leu Val Leu His Gln Gly Ala Tyr Phe
 1300 1305 1310
 Arg Asp Leu Trp Asn Ile Leu Asp Phe Ile Val Val Ser Gly Ala Leu
 1315 1320 1325
 Val Ala Phe Ala Phe Thr Gly Asn Ser Lys Gly Lys Asp Ile Asn Thr
 1330 1335 1340
 Ile Lys Ser Leu Arg Val Leu Arg Val Leu Arg Pro Leu Lys Thr Ile
 1345 1350 1355
 Lys Arg Leu Pro Lys Leu Lys Ala Val Phe Asp Cys Val Val Asn Ser
 1365 1370 1375
 Leu Lys Asn Val Phe Asn Ile Leu Ile Val Tyr Met Leu Phe Met Phe
 1380 1385 1390
 Ile Phe Ala Val Val Ala Val Gln Leu Phe Lys Gly Lys Phe Phe His
 1395 1400 1405
 Cys Thr Asp Glu Ser Lys Glu Phe Glu Lys Asp Cys Arg Gly Lys Tyr
 1410 1415 1420
 Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Glu Val Lys Ala Arg Asp Arg Glu Trp Lys
 1425 1430 1435
 Lys Tyr Glu Phe His Tyr Asp Asn Val Leu Trp Ala Leu Leu Thr Leu
 1445 1450 1455
 Phe Thr Val Ser Thr Gly Glu Gly Trp Pro Gln Val Leu Lys His Ser
 1460 1465 1470
 Val Asp Ala Thr Phe Glu Asn Gln Gly Pro Ser Pro Gly Tyr Arg Met
 1475 1480 1485
 Glu Met Ser Ile Phe Tyr Val Val Tyr Phe Val Val Phe Pro Phe Phe
 1490 1495 1500
 Phe Val Asn Ile Phe Val Ala Leu Ile Ile Ile Thr Phe Gln Glu Gln
 1505 1510 1515
 Gly Asp Lys Met Met Glu Glu Tyr Ser Leu Glu Lys Asn Glu Arg Ala
 1525 1530 1535
 Cys Ile Asp Phe Ala Ile Ser Ala Lys Pro Leu Thr Arg His Met Pro
 1540 1545 1550
 Gln Asn Lys Gln Ser Phe Gln Tyr Arg Met Trp Gln Phe Val Val Ser
 1555 1560 1565
 Pro Pro Phe Glu Tyr Thr Ile Met Ala Met Ile Ala Leu Asn Thr Ile
 1570 1575 1580
 Val Leu Met Met Lys Phe Tyr Gly Ala Ser Val Ala Tyr Glu Asn Ala
 1585 1590 1595
 Leu Arg Val Phe Asn Ile Val Phe Thr Ser Leu Phe Ser Leu Glu Cys
 1605 1610 1615
 Val Leu Lys Val Met Ala Phe Gly Ile Leu Asn Tyr Phe Arg Asp Ala
 1620 1625 1630
 Trp Asn Ile Phe Asp Phe Val Thr Val Leu Gly Ser Ile Thr Asp Ile
 1635 1640 1645
 Leu Val Thr Glu Phe Gly Asn Pro Asn Asn Phe Ile Asn Leu Ser Phe
 1650 1655 1660
 Leu Arg Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly
 1665 1670 1675
 Tyr Thr Ile Arg Ile Leu Leu Trp Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala
 1685 1690 1695
 Leu Pro Tyr Val Cys Leu Leu Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala
 1700 1705 1710
 Ile Ile Gly Met Gln Val Phe Gly Asn Ile Gly Ile Asp Val Glu Asp
 1715 1720 1725
 Glu Asp Ser Asp Glu Asp Glu Phe Gln Ile Thr Glu His Asn Asn Phe
 1730 1735 1740
 Arg Thr Phe Phe Gln Ala Leu Met Leu Leu Phe Arg Ser Ala Thr Gly
 1745 1750 1755
 Glu Ala Trp His Asn Ile Met Leu Ser Cys Leu Ser Gly Lys Pro Cys
 1765 1770 1775
 Asp Lys Asn Ser Gly Ile Leu Thr Arg Glu Cys Gly Asn Glu Phe Ala

10

20

30

			1780					1785				1790							
Tyr	Phe	Tyr	Phe	Val	Ser	Phe	Ile	Phe	Leu	Cys	Ser	Phe	Leu	Met	Leu				
		1795					1800					1805							
Asn	Leu	Phe	Val	Ala	Val	Ile	Met	Asp	Asn	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Arg				
		1810					1815					1820							
Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Gly	Pro	His	His	Leu	Asp	Glu	Tyr	Val	Arg	Val				
1825					1830					1835					1840				
Trp	Ala	Glu	Tyr	Asp	Pro	Ala	Ala	Trp	Gly	Arg	Met	Pro	Tyr	Leu	Asp				
				1845					1850						1855				
Met	Tyr	Gln	Met	Leu	Arg	His	Met	Ser	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys				
			1860						1865						1870				
Lys	Cys	Pro	Ala	Arg	Val	Ala	Tyr	Lys	Arg	Leu	Leu	Arg	Met	Asp	Leu				
		1875					1880							1885					
Pro	Val	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Val	His	Phe	Asn	Ser	Thr	Leu	Met	Ala				
		1890					1895					1900							
Leu	Ile	Arg	Thr	Ala	Leu	Asp	Ile	Lys	Ile	Ala	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp				
1905					1910					1915					1920				
Lys	Gln	Gln	Met	Asp	Ala	Glu	Leu	Arg	Lys	Glu	Met	Met	Ala	Ile	Trp				
				1925						1930					1935				
Pro	Asn	Leu	Ser	Gln	Lys	Thr	Leu	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Lys				
			1940					1945							1950				
Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ala	Ala	Met	Met	Ile	Met				
		1955					1960							1965					
Glu	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Ser	Lys	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Ala	Met	Arg	Glu				
		1970					1975						1980						
Glu	Gln	Asp	Arg	Thr	Pro	Leu	Met	Phe	Gln	Arg	Met	Glu	Pro	Pro	Ser				
1985					1990					1995					2000				
Pro	Thr	Gln	Glu	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Asn	Ala	Leu	Pro	Ser	Thr	Gln				
				2005						2010					2015				
Leu	Asp	Pro	Gly	Gly	Ala	Leu	Met	Ala	His	Glu	Ser	Gly	Leu	Lys	Glu				
			2020					2025							2030				
Ser	Pro	Ser	Trp	Val	Thr	Gln	Arg	Ala	Gln	Glu	Met	Phe	Gln	Lys	Thr				
		2035					2040								2045				
Gly	Thr	Trp	Ser	Pro	Glu	Gln	Gly	Pro	Pro	Thr	Asp	Met	Pro	Asn	Ser				
		2050					2055								2060				
Gln	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Met	Arg	Glu	Met	Gly	Arg	Asp	Gly				
2065					2070					2075					2080				
Tyr	Ser	Asp	Ser	Glu	His	Tyr	Leu	Pro	Met	Glu	Gly	Gln	Gly	Arg	Ala				
			2085							2090					2095				
Ala	Ser	Met	Pro	Arg	Leu	Pro	Ala	Glu	Asn	Gln	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg				
			2100					2105							2110				
Pro	Arg	Gly	Asn	Asn	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Thr	Ser	Pro	Met	Lys				
		2115						2120							2125				
Arg	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Leu	Asp	Asp	Tyr				
		2130					2135								2140				
Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Arg	His	His	Gln	Arg				
2145					2150					2155					2160				
Arg	Arg	Asp	Arg	Ser	His	Arg	Ala	Ser	Glu	Arg	Ser	Leu	Gly	Arg	Tyr				
			2165							2170					2175				
Thr	Asp	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Leu	Ser	Met	Thr	Thr	Gln				
			2180						2185						2190				
Ser	Gly	Asp	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu	Arg	Asp	Gln	Glu	Arg	Gly	Arg	Pro				
		2195					2200								2205				
Lys	Asp	Arg	Lys	His	Arg	Gln	His	His	His	His	His	His	His	His	His				
		2210					2215								2220				
His	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	Lys	Asp	Arg	Tyr	Ala	Gln	Glu	Arg	Pro	Asp				
2225					2230					2235					2240				
His	Gly	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg	Asp	Gln	Arg	Trp	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser				
			2245							2250					2255				
Glu	Gly	Arg	Glu	His	Met	Ala	His	Arg	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Ser				
			2260					2265							2270				
Gly	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Arg	Arg	Gly				

10

20

30

```

2275          2280          2285
Arg Arg Gln Leu Pro Gln Thr Pro Ser Thr Pro Arg Pro His Val Ser
2290          2295          2300
Tyr Ser Pro Val Ile Arg Lys Ala Gly Gly Ser Gly Pro Pro Gln Gln
2305          2310          2315          2320
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Val Ala Arg Pro Gly Arg
2325          2330          2335
Ala Ala Thr Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Pro Gly Pro Thr Ala Glu Pro
2340          2345          2350
Leu Ala Gly Asp Arg Pro Pro Thr Gly Gly His Ser Ser Gly Arg Ser
2355          2360          2365
Pro Arg Met Glu Arg Arg Val Pro Gly Pro Ala Arg Ser Glu Ser Pro
2370          2375          2380
Arg Ala Cys Arg His Gly Gly Ala Arg Trp Pro Ala Ser Gly Pro His
2385          2390          2395          2400
Val Ser Glu Gly Pro Pro Gly Pro Arg His His Gly Tyr Tyr Arg Gly
2405          2410          2415
Ser Asp Tyr Asp Glu Ala Asp Gly Pro Gly Ser Gly Gly Gly Glu Glu
2420          2425          2430
Ala Met Ala Gly Ala Tyr Asp Ala Pro Pro Val Arg His Ala Ser
2435          2440          2445
Ser Gly Ala Thr Gly Arg Ser Pro Arg Thr Pro Arg Ala Ser Gly Pro
2450          2455          2460
Ala Cys Ala Ser Pro Ser Arg His Gly Arg Arg Leu Pro Asn Gly Tyr
2465          2470          2475          2480
Tyr Pro Ala His Gly Leu Ala Arg Pro Arg Gly Pro Gly Ser Arg Lys
2485          2490          2495
Gly Leu His Glu Pro Tyr Ser Glu Ser Asp Asp Asp Trp Cys
2500          2505          2510

```

10

```

<210> 11
<211> 7791
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

```

20

```

<400> 11
gatgtcccga gctgctatcc ccggctcggc ccggggcagcc gccttctgag cccccgacc 60
gaggcgccga gccgcgcgcg ccgatagggc tgggcctgtg agcgtctccg cagtcgtagc 120
tccagccgcc gcgctcccag cccgggcagc ctcagcatca gcggcggcgg cggcggcggc 180
ggcgtcttcc gcctcgttcg ccgcagcgta acccggagcc ctttgcctct tgcagaatgg 240
cccgtctcgg agacgagatg ccggcccgcct acgggggagg aggctccggg gcagccgcgc 300
gggtggctcg gggcagcggg ggcgggcgag gagccggggg cagccggcag ggcgggcagc 360
ccggggcgca aaggatgtac aagcagtcaa tggcgcagag agcgcggacc atggcactct 420
acaacccccat ccccgctcga cagaactgcc tcacgggttaa ccggtctctc ttctcttcca 480
gcgaagacaa cgtgggtgaga aaatacgcca aaaagatcac cgaatggcct ccctttgaat 540
atatgatatt agccaccatc atagcgaatt gcctcgtcct cgcactggag cagcatctgc 600
ctgatgatga caagaccccc atgtctgaac ggctggatga cacagaacca tacttcattg 660
gaattttttg tttcagaggt ggaattaaaa tcattgccct tgggtttgca ttccacaaag 720
gctcctactt gaggaatggc tggaatgtca tggactttgt ggtggtgcta acgggcatct 780
tggcgacagt tgggacggag tttgacctac ggaagctgag ggcagttcga gtgctgcggc 840
cgctcaagct ggtgtctgga atcccgaagt tacaagtcgt cctgaaagtc atcatgaagg 900
cgatgatccc tttgctgcag atcggcctcc tcctattttt tgcaatcctt atttttgcaa 960
tcataggggtt agaattttat atgggaaaat ttcataccac ctgctttgaa gaggggacag 1020
atgacattca gggtagtct cccgctccat gtgggacaga agagcccgcc cgcacctgcc 1080
ccaatgggac caaatgtcag cctactggg aagggcccaa caacgggatc actcagttcg 1140
acaacatcct gtttgacgtg ctgactgttt tccagtgcac aacctgggaa gggtgactg 1200
atctcctcta caatagcaac gatgcctcag ggaacacttg gaactggttg tacttcattc 1260
ccctcatcat catcggctcc ttttttatgc tgaaccttgt gctgggtgtg ctgtcagggg 1320
agtttgccaa agaaagggaa cgggtggaga accggcgggc ttttctgaag ctgagggcggc 1380
aacaacagat tgaacgtgag ctcaatgggt acatggaatg gatctcaaaa gcagaagagg 1440
tgatcctcgc cgaggatgaa actgacgggg agcagaggca tccctttgat ggagctctgc 1500
ggagaaccac cataaagaaa agcaagacag atttgcctcaa ccccgaaagag gctgaggatc 1560

```

30


```

agctggctga tatagcctct gtgggttttc ccttcgcccc agccagcatt aaaagtgcca 1620
agctggagaa ctgcaccttt tttaacaaaa aggagaggag gatgcgtttc tacatccgcc 1680
gcattggtcaa aactcagggc ttctactgga ctgtactcag ttggtagct ctcaacaagc 1740
tgtgtgttgc tattgtttcac tacaaccagc cggagtggct ctccgacttc ctttactatg 1800
cagaattcat ttctcttagga ctctttatgt ccgaaatggt tataaaaaatg tacgggcttg 1860
ggacggggcc ttactttcac tcttctttca actgccttga ctgtggggtt atcattggga 1920
gcattcttga ggtcatctgg gctgtcataa aacctggcac atcctttgga atcagcgtgt 1980
tacgagccct caggtttatg cgtattttca aagtcacaaa gtactgggca tctctcagaa 2040
acctggtcgt ctctctcctc aactccatga agtccatcat cagcctgttg tttctccttt 2100
tcctgttcat tgtcgtcttc gcccttttgg gaatgcacct cttcggcggc cagttaatt 2160
tcgatgaagg gactcctccc accaacttcc atacttttcc agcagcaata atgacgggtg 2220
ttcagatcct gagggggcaa gactggaacg aggtcatgta cgacgggatc aagtctcagg 2280
ggggcggtgca gggcgccatg gtgttctcca tctatttcat tgtactgacg ctctttggga 2340
actacaccct cctgaatgtg ttcttggcca tcgctgtgga caatctggcc aacgcccagg 2400
agctcaccaa ggtggaggcg gacgagcaag aggaagaaga agcagcgaac cagaaaactg 2460
ccctacagaa agccaaggag gtggcagaag tgagtctctc gtccgcggcc aacatgtcta 2520
tagctgtgaa agagcaacag aagaatcaaa agccagccaa gtccgtgtgg gagcagcgga 2580
ccagtgtgag gcgaaagcag aacttgctgg ccagccggga gggcctgtat aacgaaatgg 2640
acctggacga gcgctggaag gctgcctaca ccgcgcaact gggcgacagc atgaagacgc 2700
acttggaccg gccgctgtg gtggaccgca aggagaaccg caacaacaac accaacaaga 2760
gccggggcgc cgagcccacc gtggaccagc gcctcggcca gcagcgcgcc gagacttcc 2820
tcaggaaaaa ggcccgtac cacgatcggg cccgggaccc cagcggctcg gccggcctgg 2880
acgcacggag gccctgggcy ggaagccagc agcccgagct gagccgggag ggaacctacg 2940
gccgcgagtc ggaccaccac gcccgggagg gcagcctgga gcaaccggg tctctggagg 3000
gcgagggcca gcgaggcaag gccggggacc ccacccggag gcacgtgcac cggcaggggg 3060
gcagcagggga gagccgcagc ggtccccgc ccaaggggcy ggaaggggag catcgacgtc 3120
atcgcgcgca ccgcaaggccc ggggaggagg gtccggaggga caagggcgag cggagggcgc 3180
ggcacccgca gggcagccgg ccggcccggg gcgcccaggg cgagggcgag ggccccgacg 3240
ggggcgagcg caggagaagc caccggcatg cgcgtccagc cactgacgag ggggacgcy 3300
ggagggagga caaggagcgg aggcctcgga ggaggaaaga gaaccagggc tccgggggtc 3360
ctgtgtcggg ccccaactct tcaaccacc gcccaatcca gcaggacct caagctggcc 3420
acctaccctt ggcagaggat attgacaaca tgaagaacaa caagctggcc accgoggagt 3480
cggccgctcc ccacgggagc ctggccacy ccggtctgcc ccagagccca gccaaagtgg 3540
gaaacagcac cgaccocggc cccatgctgg ccatccctgc catggccacc aacccccaga 3600
acgcccgcag ccgcccggag ccaacaacc cggggaacc atccaatccc ggccccccc 3660
agaccccoga gaatagcctt atcgtacca caccagacc aatccageta 3720
agactgcccag gaaaccogac cacaccacag tggacatccc cccagcctgc ccaccccc 3780
tcaaccacac cgtcgtacaa gtgaacaaaa acgccaacc agaccactg ccaaaaaaa 3840
aggaagagaa gaaggaggag gaggaagacy agacggccct aagccaatgc 3900
ctccctatag ctccatgttc atcctgtcca cgaccaacc ccttcgccc ctgtgccatt 3960
acatcctgaa cctgcgttac tttagatgt gcatcctcat ggtcattgcc atgagcagca 4020
tcgcccctgg ccgcaaggac cctgtgcagc ccaacgcacc toggaacaac gtgctgcgat 4080
actttgacta cgtttttaca ggcgtcttca cctttgagat ggtgatcaag atgattgacc 4140
tggggtcgt cctgcatcag ggtgcctact tccgtgacct ctggaatatt ctgcacttca 4200
tagtggtcag tggggccctg gtagccttgg ccttcactgg caatagcaaa ggaaaagaca 4260
tcaaacagat taaatccctc cyagtccctc ggggtctacg acctcttaaa accatcaagc 4320
ggctgcccata gctcaaggct gtgtttgact gtgtggtgaa ctcacttaaa aacgtcttca 4380
acatcctcat cgtctacatg ctattcatgt tcatcttcgc cgtgggtggc gtgcagctct 4440
tcaaggggaa attcttccac tgcactgacg agtccaaaga gtttgagaaa gattgtcgag 4500
gcaaatacct cctctacgag aagaatgagg tgaagggcgc agaccgggag tggagaagt 4560
atgaattcca ttacgacaat gtgctgtggg ctctgctgac cctcttcacc gtgtccacgg 4620
gagaaggctg gccacaggte ctcaagcatt cgggtggacg cacctttgag aaccagggcc 4680
ccagcccggg gtaccgcatg gagatgtcca tttctacgt cgtctacttt gtggtgttcc 4740
ccttcttctt tgtcaatate ttgtggcct tgatcatcat caccttccag gagcaagggg 4800
acaagatgat ggaggaaata agcctggaga aaaatgagag ggcctgcatt gatctcgca 4860
tcagcgccaa gccgctgacc cgacacatgc cgcagaaca gcagagcttc cagtaccgca 4920
tgtggcagtt cgtgtgtctc ccgcctttcg agtacacgat catggccatg atcgccctca 4980
acaccatcgt gcttatgatg aagtctctat gggcttctgt tgcttatgaa aatgccctgc 5040
gggtgttcaa catcgtcttc acctccctct tctctctgga atgtgtgctg aaagtcatgg 5100
cttttgggat tctgaattat ttccgcgat cctggaacat cttcgacttt gtgactgttc 5160
tgggcagcat caccgatctc ctctgtactg agtttgggaa tccgaataac ttcatcaacc 5220
tgagctttct ccgcctcttc cgactcgcgc ggtcatcaa acttctcgt cagggttaca 5280

```

10

20

30

```

ccatocgcat tcttctctgg acctttgtgc agtccctcaa ggccttgcct tatgtctgtc 5340
tgctgatcgc catgctcttc ttcatctatg ccacatttgg gatgcaggty tttggtaaca 5400
ttggcatcga cgtggaggac gaggacagtg atgaagatga gttccaaatc actgagcaca 5460
ataacttccg gacctctctc caggccctca tgcttctctt ccggagtggc accggggaag 5520
cttggcacia catcatgctt tcctgcctca ggggaaacc gtgtgataag aactctggca 5580
tctgactcag agagtgtggc aatgaatttg ctattttta ctttgtttcc ttcatcttcc 5640
tctgctcgtt tctgatgctg aatctctttg tcgccgtcat catggacaac tttgagtacc 5700
tcacccgaga ctctccatc ctggggcccc accacctgga tgagtacgtg cgtgtctggg 5760
ccgagtatga cccgcagct tggggccgca tgcttaoct ggacatgtat cagatgctga 5820
gacacatgct tccgccccg ggtctgggga agaagtgtcc ggccagagtg gcttacaagc 5880
ggcttctcgg gatggacctg cccgtcgcag atgacaacac cgtccacttc aattccacco 5940
tcatggctct gatccgcaca gccctggaca tcaagattgc caaggaggga gccgacaaac 6000
agcagatgga cgtcagctg cgggaaggaga tgatggcgat ttggcccaat ctgtcccaga 6060
agacgctaga cctgctggtc acacctcaca agtccacgga cctcacctg gggaaagatct 6120
accgagccat gatgatcat gagtactacc ggcagagcaa ggccaagaag ctgcagggca 6180
tcgcgagaga gcaggaccgg acacccctca tgttccagcg catggagccc ccgtcccaga 6240
cgaggaagg gggacctggc cagaacgccc tccctccac ccagctggac ccaggaggag 6300
ccctgatggc tcacgaaagc ggcctcaagg agagcccgtc ctgggtgacc cagcctgccc 6360
aggagatggt ccagaagacc ggcacatgga gtccggaaca agccccctc accgacatgc 6420
ccaacagcca gcctaactct cagtccgtgg agatgcgaga gatgggcaga gatggctact 6480
ccgacagcga gcactacctc cccatggaag gccaggggcg ggtgcctcc atgccccgcc 6540
tcctgcaaga gaaccagagg agaaggggcc ggcacgtgg gaataacctc agtaccatct 6600
cagacaccag ccccatgaag cgttcagcct ccgtgctggg ccccaaggcc cgacgctgg 6660
acgattactc gctggagcgg gtcccccccg aggagaacca ggcgcaccac cagcggcgcc 6720
gogagcgcag ccaccgccc tctgagcgt cctgggccc ctacaccgat gtggacacag 6780
gcttggggac agacctgagc atgaccacc aatccggga cctgcccgtc aaggagcggg 6840
accaggagcg gggccggccc aaggatcggg agcatcgaca gcaccaccac caccaccacc 6900
accaccacca tccccgccc cccgacaagg accgctatgc ccaggaacgg ccggaccacg 6960
gcccggcacc ggctcgggac cagcgtgggt cccgtcggc cagcggggc cgagagcaca 7020
tgggcaccg gcagtagttc cgtaatgga agcccagccc cctcaacatc tggtagcagc 7080
actccgccc gggcccggc ccagctcccc cagaccccct ccaccccccg gccacacgtg 7140
tctattccc ctgtgatccg taaggccggc ggctcggggc ccccgagca gcagcagcag 7200
cagcagggcg tggccaggcc gggccggggc gccaccagcg gcctcggag gtaccaggc 7260
cccacggcgg agctctggc cgggatcgg ccgcccacgg ggggcccacag cagcggcccg 7320
tcgcccagga tggagagcgg ggtcccaggg ccggcccggg cggagtccc cagggcctgt 7380
cgacacggcg gggcccggg ccgggcactt ggcccgcacg tgtccgagg gccccgggt 7440
ccccggcacc atggctaacta cggggctcc gactacgacg aggcccgatg cccgggcagc 7500
ggggcgggcg aggaggccat ggcgggggccc taagacgcgc cccccccgt acgacacgcg 7560
tctcggggcg ccaccggggc ctcccaggg actccccgg cctcggggcc ggccctggcc 7620
tcgcttctc ggcacggccg ggcactcccc aacggctact accgggcga cggactggcc 7680
aggccccgcg ggcggggctc caggaagggc ctgcacgaac cctacagcga gagtgcagat 7740
gattgggtcct aagccccggc gaggtggcgc ccgcccggcc ccccacgcac c 7791

```

10

20

```

<210> 12
<211> 2266
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 12
Met Ala Arg Phe Gly Asp Glu Met Pro Ala Arg Tyr Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gly Ala Ala Ala Gly Val Val Val Gly Ser Gly Gly Gly Arg Gly
20 25 30
Ala Gly Gly Ser Arg Gln Gly Gly Gln Pro Gly Ala Gln Arg Met Tyr
35 40 45
Lys Gln Ser Met Ala Gln Arg Ala Arg Thr Met Ala Leu Tyr Asn Pro
50 55 60
Ile Pro Val Arg Gln Asn Cys Leu Thr Val Asn Arg Ser Leu Phe Leu
65 70 75 80
Phe Ser Glu Asp Asn Val Val Arg Lys Tyr Ala Lys Lys Ile Thr Glu

```

30

				85					90				95		
Trp	Pro	Pro	Phe	Glu	Tyr	Met	Ile	Leu	Ala	Thr	Ile	Ile	Ala	Asn	Cys
			100					105					110		
Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Gln	His	Leu	Pro	Asp	Asp	Asp	Lys	Thr	Pro
		115					120					125			
Met	Ser	Glu	Arg	Leu	Asp	Asp	Thr	Glu	Pro	Tyr	Phe	Ile	Gly	Ile	Phe
		130				135					140				
Cys	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Lys	Ile	Ile	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	His
145						150				155				160	
Lys	Gly	Ser	Tyr	Leu	Arg	Asn	Gly	Trp	Asn	Val	Met	Asp	Phe	Val	Val
				165				170						175	
Val	Leu	Thr	Gly	Ile	Leu	Ala	Thr	Val	Gly	Thr	Glu	Phe	Asp	Leu	Arg
			180					185					190		
Thr	Leu	Arg	Ala	Val	Arg	Val	Leu	Arg	Pro	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Gly
		195					200					205			
Ile	Pro	Ser	Leu	Gln	Val	Val	Leu	Lys	Ser	Ile	Met	Lys	Ala	Met	Ile
		210				215					220				
Pro	Leu	Leu	Gln	Ile	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Ile	Leu	Ile	Phe
225						230				235				240	
Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Glu	Phe	Tyr	Met	Gly	Lys	Phe	His	Thr	Thr	Cys
			245						250					255	
Phe	Glu	Glu	Gly	Thr	Asp	Asp	Ile	Gln	Gly	Glu	Ser	Pro	Ala	Pro	Cys
			260					265					270		
Gly	Thr	Glu	Glu	Pro	Ala	Arg	Thr	Cys	Pro	Asn	Gly	Thr	Lys	Cys	Gln
		275					280					285			
Pro	Tyr	Trp	Glu	Gly	Pro	Asn	Asn	Gly	Ile	Thr	Gln	Phe	Asp	Asn	Ile
						295				300					
Leu	Phe	Ala	Val	Leu	Thr	Val	Phe	Gln	Cys	Ile	Thr	Met	Glu	Gly	Trp
305				310					315					320	
Thr	Asp	Leu	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asn	Asp	Ala	Ser	Gly	Asn	Thr	Trp	Asn
				325					330					335	
Trp	Leu	Tyr	Phe	Ile	Pro	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Ser	Phe	Phe	Met	Leu
			340					345					350		
Asn	Leu	Val	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu
		355				360						365			
Arg	Val	Glu	Asn	Arg	Arg	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Gln	Gln
		370				375					380				
Ile	Glu	Arg	Glu	Leu	Asn	Gly	Tyr	Met	Glu	Trp	Ile	Ser	Lys	Ala	Glu
385					390					395					400
Glu	Val	Ile	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu	Thr	Asp	Gly	Glu	Gln	Arg	His	Pro
			405						410					415	
Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Ile	Lys	Lys	Ser	Lys	Thr	Asp
			420				425						430		
Leu	Leu	Asn	Pro	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser
		435					440					445			
Val	Gly	Ser	Pro	Phe	Ala	Arg	Ala	Ser	Ile	Lys	Ser	Ala	Lys	Leu	Glu
		450				455					460				
Asn	Ser	Thr	Phe	Phe	His	Lys	Lys	Glu	Arg	Arg	Met	Arg	Phe	Tyr	Ile
465					470					475				480	
Arg	Arg	Met	Val	Lys	Thr	Gln	Ala	Phe	Tyr	Trp	Thr	Val	Leu	Ser	Leu
			485						490					495	
Val	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Cys	Val	Ala	Ile	Val	His	Tyr	Asn	Gln	Pro
			500					505					510		
Glu	Trp	Leu	Ser	Asp	Phe	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Phe	Ile	Phe	Leu	Gly
		515					520					525			
Leu	Phe	Met	Ser	Glu	Met	Phe	Ile	Lys	Met	Tyr	Gly	Leu	Gly	Thr	Arg
		530				535					540				
Pro	Tyr	Phe	His	Ser	Ser	Phe	Asn	Cys	Phe	Asp	Cys	Gly	Val	Ile	Ile
545					550					555					560
Gly	Ser	Ile	Phe	Glu	Val	Ile	Trp	Ala	Val	Ile	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser
			565					570						575	
Phe	Gly	Ile	Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Lys

10

20

30

580 585 590
 Val Thr Lys Tyr Trp Ala Ser Leu Arg Asn Leu Val Val Ser Leu Leu
 595 600 605
 Asn Ser Met Dys Ser Ile Ile Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Phe
 610 615 620
 Ile Val Val Phe Ala Leu Leu Gly Met Gln Leu Phe Gly Gly Gln Phe
 625 630 635
 Asn Phe Asp Glu Gly Thr Pro Pro Thr Asn Phe Asp Thr Phe Pro Ala
 645 650 655
 Ala Ile Met Thr Val Phe Gln Ile Leu Thr Gly Glu Asp Trp Asn Glu
 660 665 670
 Val Met Tyr Asp Gly Ile Lys Ser Gln Gly Gly Val Gln Gly Gly Met
 675 680 685
 Val Phe Ser Ile Tyr Phe Ile Val Leu Thr Leu Phe Gly Asn Tyr Thr
 690 695 700
 Leu Leu Asn Val Phe Leu Ala Ile Ala Val Asp Asn Leu Ala Asn Ala
 705 710 715 720
 Gln Glu Leu Thr Lys Val Glu Ala Asp Glu Gln Glu Glu Glu Ala
 725 730 735
 Ala Asn Gln Lys Leu Ala Leu Gln Lys Ala Lys Glu Val Ala Glu Val
 740 745 750
 Ser Pro Leu Ser Ala Ala Asn Met Ser Ile Ala Val Lys Glu Gln Gln
 755 760 765
 Lys Asn Gln Lys Pro Ala Lys Ser Val Trp Glu Gln Arg Thr Ser Glu
 770 775 780
 Met Arg Lys Gln Asn Leu Leu Ala Ser Arg Glu Ala Leu Tyr Asn Glu
 785 790 795 800
 Met Asp Pro Asp Glu Arg Trp Lys Ala Ala Tyr Thr Arg His Leu Arg
 805 810 815
 Pro Asp Met Lys Thr His Leu Asp Arg Pro Leu Val Val Asp Pro Gln
 820 825 830
 Glu Asn Arg Asn Asn Asn Thr Asn Lys Ser Arg Ala Ala Glu Pro Thr
 835 840 845
 Val Asp Gln Arg Leu Gly Gln Gln Arg Ala Glu Asp Phe Leu Arg Lys
 850 855 860
 Gln Ala Arg Tyr His Asp Arg Ala Arg Asp Pro Ser Gly Ser Ala Gly
 865 870 875 880
 Leu Asp Ala Arg Arg Pro Trp Ala Gly Ser Gln Glu Ala Glu Leu Ser
 885 890 895
 Arg Glu Gly Pro Tyr Gly Arg Glu Ser Asp His His Ala Arg Glu Gly
 900 905 910
 Ser Leu Glu Gln Pro Gly Phe Trp Glu Gly Glu Ala Glu Arg Gly Lys
 915 920 925
 Ala Gly Asp Pro His Arg Arg His Val His Arg Gln Gly Gly Ser Arg
 930 935 940
 Glu Ser Arg Ser Gly Ser Pro Arg Thr Gly Ala Asp Gly Glu His Arg
 945 950 955 960
 Arg His Arg Ala His Arg Arg Pro Gly Glu Gly Pro Glu Asp Lys
 965 970 975
 Ala Glu Arg Arg Ala Arg His Arg Glu Gly Ser Arg Pro Ala Arg Gly
 980 985 990
 Gly Glu Gly Glu Gly Glu Gly Pro Asp Gly Gly Glu Arg Arg Arg Arg
 995 1000 1005
 His Arg His Gly Ala Pro Ala Thr Tyr Glu Gly Asp Ala Arg Arg Glu
 1010 1015 1020
 Asp Lys Glu Arg Arg His Arg Arg Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser Gly
 1025 1030 1035 1040
 Val Pro Val Ser Gly Pro Asn Leu Ser Thr Thr Arg Pro Ile Gln Gln
 1045 1050 1055
 Asp Leu Gly Arg Gln Asp Pro Pro Leu Ala Glu Asp Ile Asp Asn Met
 1060 1065 1070
 Lys Asn Asn Lys Leu Ala Thr Ala Glu Ser Ala Ala Pro His Gly Ser

10

20

30

	1075					1080						1085			
Leu	Gly	His	Ala	Gly	Leu	Pro	Gln	Ser	Pro	Ala	Lys	Met	Gly	Asn	Ser
	1090					1095						1100			
Thr	Asp	Pro	Gly	Pro	Met	Leu	Ala	Ile	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	Asn	Pro
	1105					1110					1115				1120
Gln	Asn	Ala	Ala	Ser	Arg	Arg	Thr	Pro	Asn	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Ser
															1135
Asn	Pro	Gly	Pro	Pro	Lys	Thr	Pro	Glu	Asn	Ser	Leu	Ile	Val	Thr	Asn
															1150
Pro	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Ser	Ala	Lys	Thr	Ala	Arg	Lys	Pro	Asp
															1165
His	Thr	Thr	Val	Asp	Ile	Pro	Pro	Ala	Cys	Pro	Pro	Pro	Leu	Asn	His
	1170					1175									1180
Thr	Val	Val	Gln	Val	Asn	Lys	Asn	Ala	Asn	Pro	Asp	Pro	Leu	Pro	Lys
	1185					1190					1195				1200
Lys	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Arg	Gly	Glu	Asp
						1205									1215
Gly	Pro	Lys	Pro	Met	Pro	Pro	Tyr	Ser	Ser	Met	Phe	Ile	Leu	Ser	Thr
															1230
Thr	Asn	Pro	Leu	Arg	Arg	Leu	Cys	His	Tyr	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Tyr
															1245
Phe	Glu	Met	Cys	Ile	Leu	Met	Val	Ile	Ala	Met	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu
	1250					1255									1260
Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Gln	Pro	Asn	Ala	Pro	Arg	Asn	Asn	Val	Leu
	1265					1270					1275				1280
Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Val	Phe	Thr	Gly	Val	Phe	Thr	Phe	Glu	Met	Val
						1285					1290				1295
Ile	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	His	Gln	Gly	Ala	Tyr	Phe
						1300									1310
Arg	Asp	Leu	Trp	Asn	Ile	Leu	Asp	Phe	Ile	Val	Val	Ser	Gly	Ala	Leu
						1315									1325
Val	Ala	Phe	Ala	Phe	Thr	Gly	Asn	Ser	Lys	Gly	Lys	Asp	Ile	Asn	Thr
	1330					1335									1340
Ile	Lys	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Arg	Val	Leu	Arg	Pro	Leu	Lys	Thr	Ile
	1345					1350					1355				1360
Lys	Arg	Leu	Pro	Lys	Leu	Lys	Ala	Val	Phe	Asp	Cys	Val	Val	Asn	Ser
						1365					1370				1375
Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Ile	Leu	Ile	Val	Tyr	Met	Leu	Phe	Met	Phe
						1380					1385				1390
Ile	Phe	Ala	Val	Val	Ala	Val	Gln	Leu	Phe	Lys	Gly	Lys	Phe	Phe	His
	1395					1400									1405
Cys	Thr	Asp	Glu	Ser	Lys	Glu	Phe	Glu	Lys	Asp	Cys	Arg	Gly	Lys	Tyr
	1410					1415					1420				1425
Leu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Asn	Glu	Val	Lys	Ala	Arg	Asp	Arg	Glu	Trp	Lys
	1425					1430					1435				1440
Lys	Tyr	Glu	Phe	His	Tyr	Asp	Asn	Val	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu
						1445					1450				1455
Phe	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Glu	Gly	Trp	Pro	Gln	Val	Leu	Lys	His	Ser
						1460									1470
Val	Asp	Ala	Thr	Phe	Glu	Asn	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Tyr	Arg	Met
						1475									1485
Glu	Met	Ser	Ile	Phe	Tyr	Val	Val	Tyr	Phe	Val	Val	Phe	Pro	Phe	Phe
	1490					1495									1500
Phe	Val	Asn	Ile	Phe	Val	Ala	Leu	Ile	Ile	Ile	Thr	Phe	Gln	Glu	Gln
	1505					1510					1515				1520
Gly	Asp	Lys	Met	Met	Glu	Glu	Tyr	Ser	Leu	Glu	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala
						1525					1530				1535
Cys	Ile	Asp	Phe	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Pro	Leu	Thr	Arg	His	Met	Pro
						1540					1545				1550
Gln	Asn	Lys	Gln	Ser	Phe	Gln	Tyr	Arg	Met	Trp	Gln	Phe	Val	Val	Ser
						1555									1565
Pro	Pro	Phe	Glu	Tyr	Thr	Ile	Met	Ala	Met	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Ile

10

20

30

1570 1575 1580
Val Leu Met Met Lys Phe Tyr Gly Ala Ser Val Ala Tyr Glu Asn Ala
1585 1590 1595 1600
Leu Arg Val Phe Asn Ile Val Phe Thr Ser Leu Phe Ser Leu Glu Cys
1605 1610 1615
Val Leu Lys Val Met Ala Phe Gly Ile Leu Asn Tyr Phe Arg Asp Ala
1620 1625 1630
Trp Asn Ile Phe Asp Phe Val Thr Val Leu Gly Ser Ile Thr Asp Ile
1635 1640 1645
Leu Val Thr Glu Phe Gly Asn Pro Asn Asn Phe Ile Asn Leu Ser Phe
1650 1655 1660
Leu Arg Leu Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ile Lys Leu Leu Arg Gln Gly
1665 1670 1675 1680
Tyr Thr Ile Arg Ile Leu Leu Trp Thr Phe Val Gln Ser Phe Lys Ala
1685 1690 1695
Leu Pro Tyr Val Cys Leu Leu Ile Ala Met Leu Phe Phe Ile Tyr Ala
1700 1705 1710
Ile Ile Gly Met Gln Val Phe Gly Asn Ile Gly Ile Asp Val Glu Asp
1715 1720 1725
Glu Asp Ser Asp Glu Asp Glu Phe Gln Ile Thr Glu His Asn Asn Phe
1730 1735 1740
Arg Thr Phe Phe Gln Ala Leu Met Leu Leu Phe Arg Ser Ala Thr Gly
1745 1750 1755 1760
Glu Ala Trp His Asn Ile Met Leu Ser Cys Leu Ser Gly Lys Pro Cys
1765 1770 1775
Asp Lys Asn Ser Gly Ile Leu Thr Arg Glu Cys Gly Asn Glu Phe Ala
1780 1785 1790
Tyr Phe Tyr Phe Val Ser Phe Ile Phe Leu Cys Ser Phe Leu Met Leu
1795 1800 1805
Asn Leu Phe Val Ala Val Ile Met Asp Asn Phe Glu Tyr Leu Thr Arg
1810 1815 1820
Asp Ser Ser Ile Leu Gly Pro His His Leu Asp Glu Tyr Val Arg Val
1825 1830 1835 1840
Trp Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Ala Trp Gly Arg Met Pro Tyr Leu Asp
1845 1850 1855
Met Tyr Gln Met Leu Arg His Met Ser Pro Pro Leu Gly Leu Gly Lys
1860 1865 1870
Lys Cys Pro Ala Arg Val Ala Tyr Lys Arg Leu Leu Arg Met Asp Leu
1875 1880 1885
Pro Val Ala Asp Asp Asn Thr Val His Phe Asn Ser Thr Leu Met Ala
1890 1895 1900
Leu Ile Arg Thr Ala Leu Asp Ile Lys Ile Ala Lys Gly Gly Ala Asp
1905 1910 1915 1920
Lys Gln Gln Met Asp Ala Glu Leu Arg Lys Glu Met Met Ala Ile Trp
1925 1930 1935
Pro Asn Leu Ser Gln Lys Thr Leu Asp Leu Leu Val Thr Pro His Lys
1940 1945 1950
Ser Thr Asp Leu Thr Val Gly Lys Ile Tyr Ala Ala Met Met Ile Met
1955 1960 1965
Glu Tyr Tyr Arg Gln Ser Lys Ala Lys Lys Leu Gln Ala Met Arg Glu
1970 1975 1980
Glu Gln Asp Arg Thr Pro Leu Met Phe Gln Arg Met Glu Pro Pro Ser
1985 1990 1995 2000
Pro Thr Gln Glu Gly Pro Gly Gln Asn Ala Leu Pro Ser Thr Gln
2005 2010 2015
Leu Asp Pro Gly Gly Ala Leu Met Ala His Glu Ser Gly Leu Lys Glu
2020 2025 2030
Ser Pro Ser Trp Val Thr Gln Arg Ala Gln Glu Met Phe Gln Lys Thr
2035 2040 2045
Gly Thr Trp Ser Pro Glu Gln Gly Pro Pro Thr Asp Met Pro Asn Ser
2050 2055 2060
Gln Pro Asn Ser Gln Ser Val Glu Met Arg Glu Met Gly Arg Asp Gly

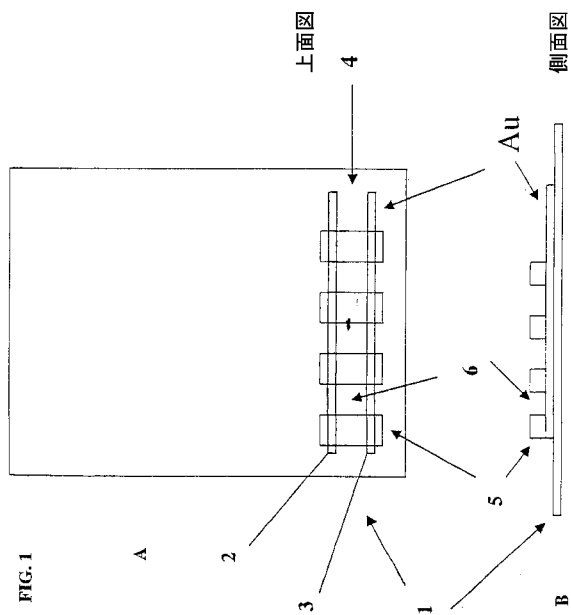
10

20

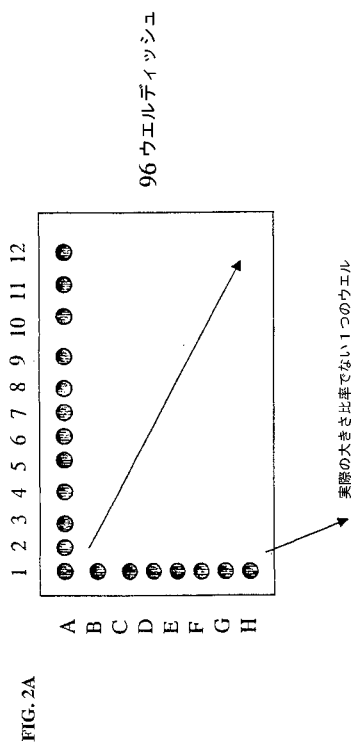
30

2065					2070					2075					2080
Tyr	Ser	Asp	Ser	Glu	His	Tyr	Leu	Pro	Met	Glu	Gly	Gln	Gly	Arg	Ala
					2085				2090						2095
Ala	Ser	Met	Pro	Arg	Leu	Pro	Ala	Glu	Asn	Gln	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg
				2100				2105						2110	
Pro	Arg	Gly	Asn	Asn	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Thr	Ser	Pro	Met	Lys
			2115					2120						2125	
Arg	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Arg	Arg	Leu	Asp	Asp	Tyr
			2130			2135							2140		
Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Arg	His	His	Gln	Arg
			2145			2150				2155					2160
Arg	Arg	Asp	Arg	Ser	His	Arg	Ala	Ser	Glu	Arg	Ser	Leu	Gly	Arg	Tyr
				2165					2170						2175
Thr	Asp	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Leu	Ser	Met	Thr	Thr	Gln
				2180				2185						2190	
Ser	Gly	Asp	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu	Arg	Asp	Gln	Glu	Arg	Gly	Arg	Pro
			2195				2200						2205		
Lys	Asp	Arg	Lys	His	Arg	Gln	His	His	His	His	His	His	His	His	His
			2210			2215				2220					
His	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	Lys	Asp	Arg	Tyr	Ala	Gln	Glu	Arg	Pro	Asp
				2225		2230				2235					2240
His	Gly	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg	Asp	Gln	Arg	Trp	Ser	Arg	Ser	Pro	Ser
				2245					2250						2255
Glu	Gly	Arg	Glu	His	Met	Ala	His	Arg	Gln						
			2260					2265							

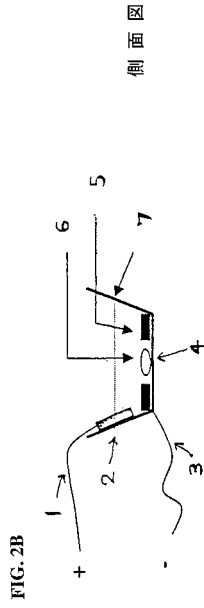
【 図 1 】



【 図 2 A 】

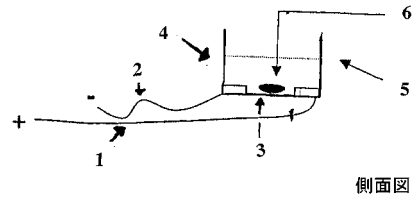


【 図 2 B 】



側面図

【 図 2 C 】



側面図

FIG. 2C

【 図 3 】

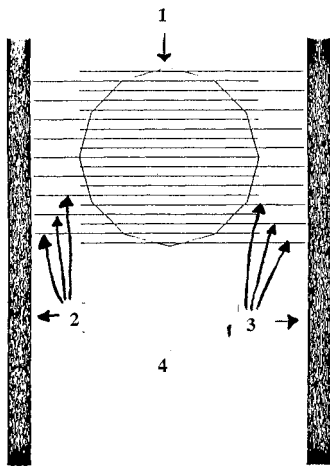


FIG. 3

【 図 4 A 】

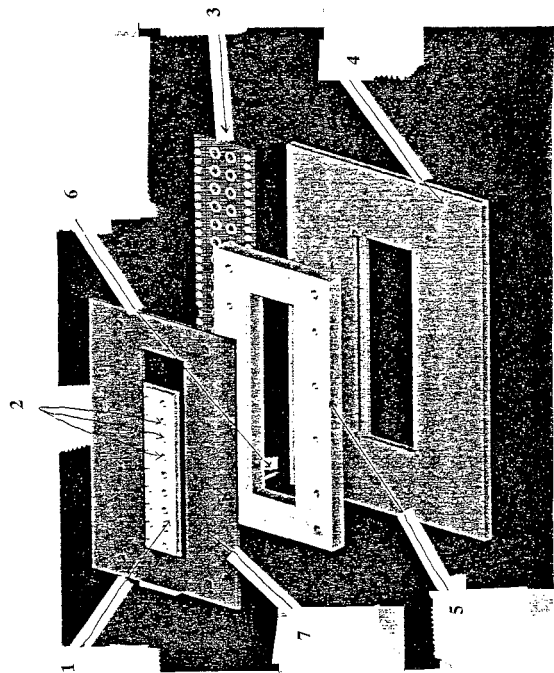


FIG. 4A

【 図 4 B 】

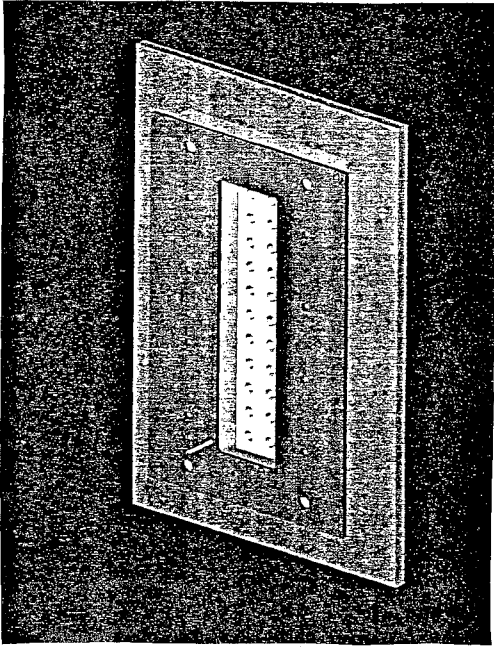


FIG. 4B

【 図 5 】

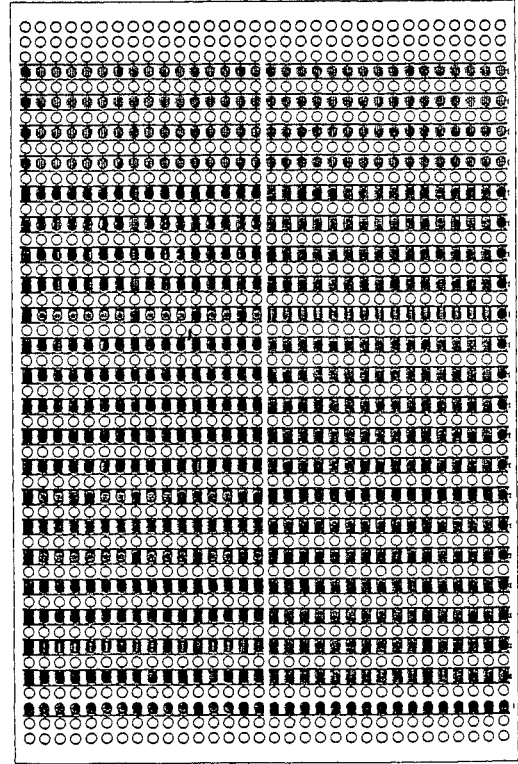


FIG. 5

【 図 6 】

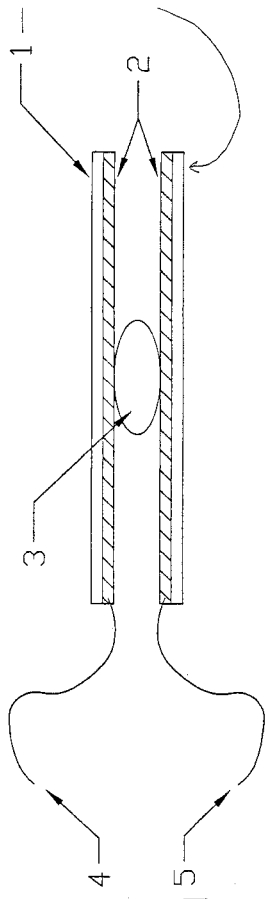


FIG. 6

【 図 7 】

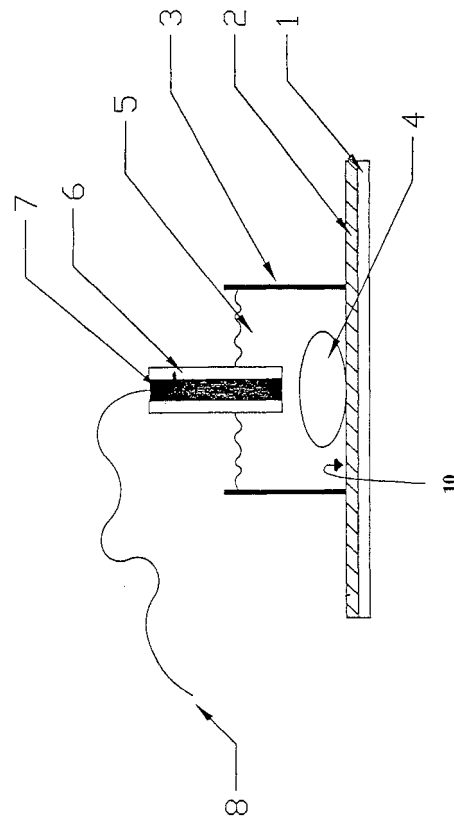


FIG. 7

【 図 8 】

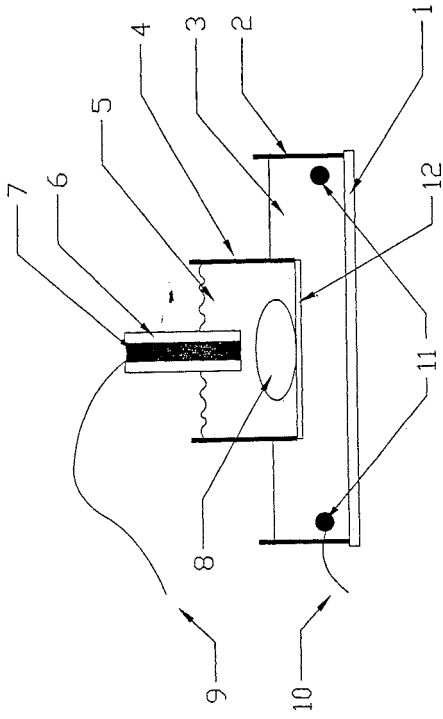


FIG. 8

【 図 9 A 】

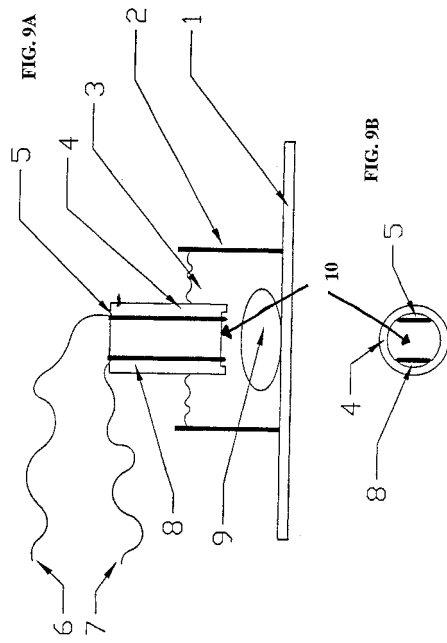


FIG. 9A

FIG. 9B

【 図 9 B 】

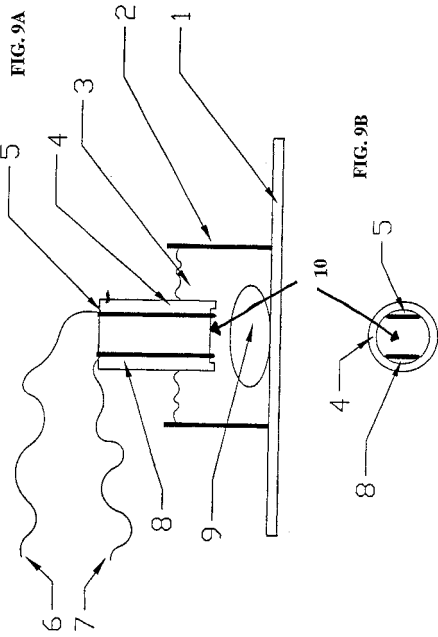


FIG. 9A

FIG. 9B

【 図 10 A 】

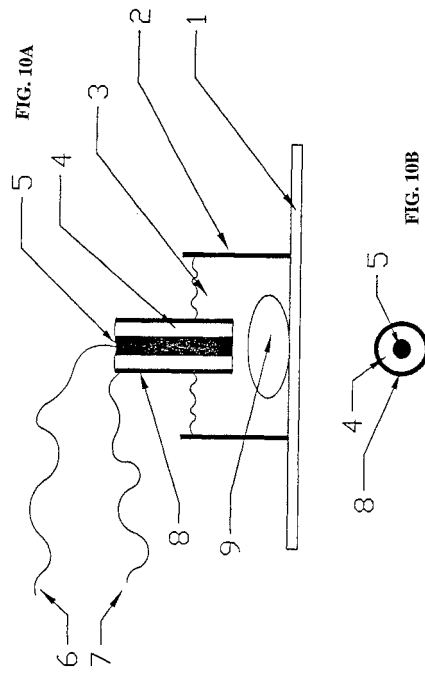
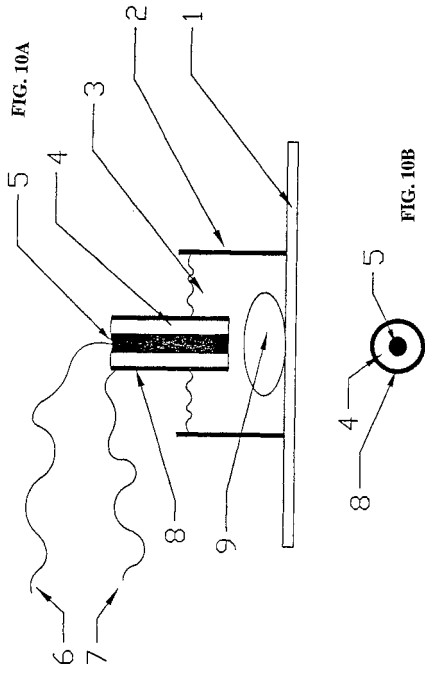


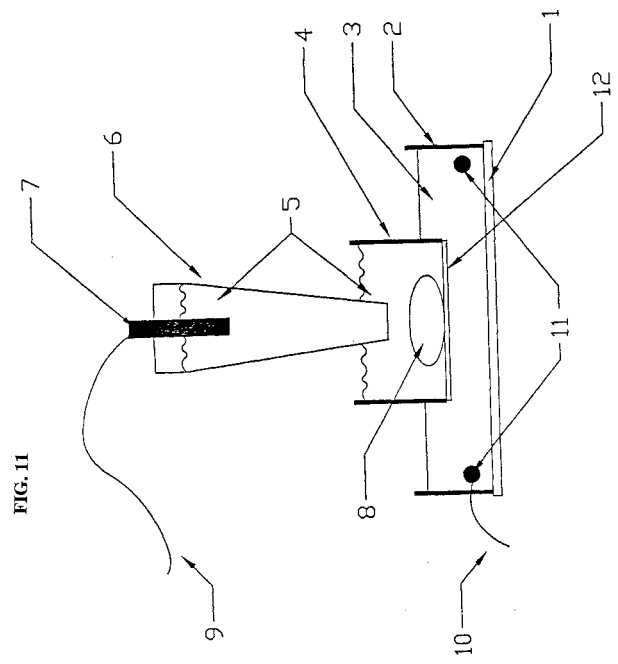
FIG. 10A

FIG. 10B

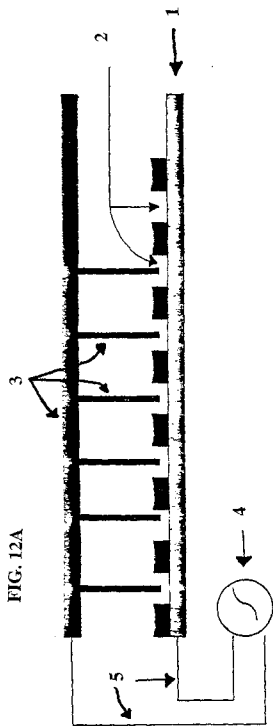
【 図 1 0 B 】



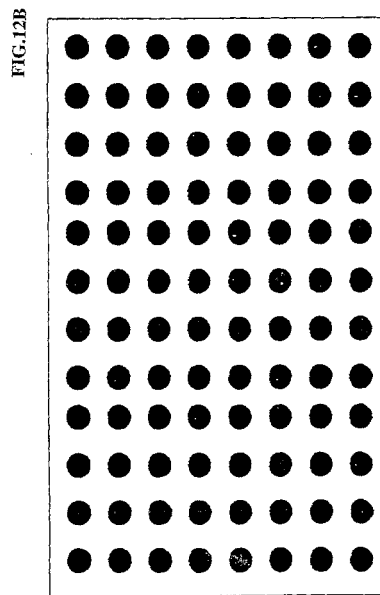
【 図 1 1 】



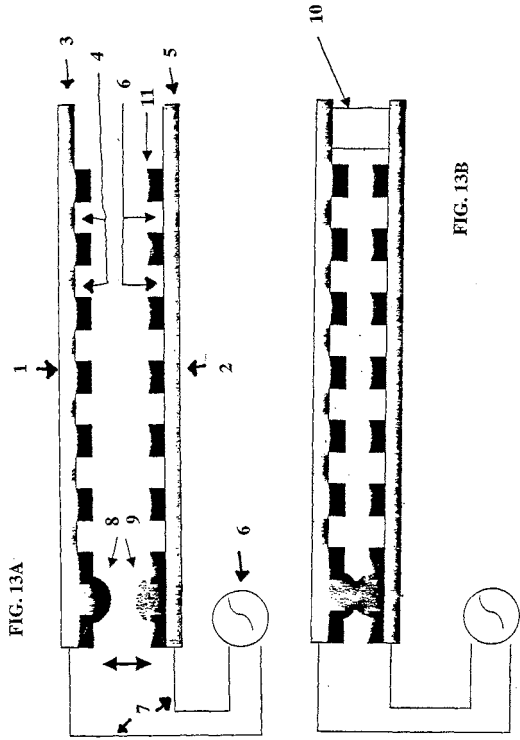
【 図 1 2 A 】



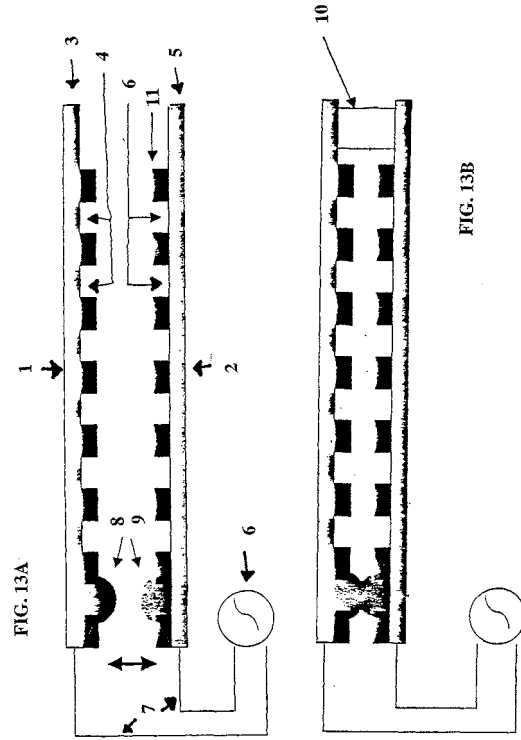
【 図 1 2 B 】



【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】



【 図 1 4 】

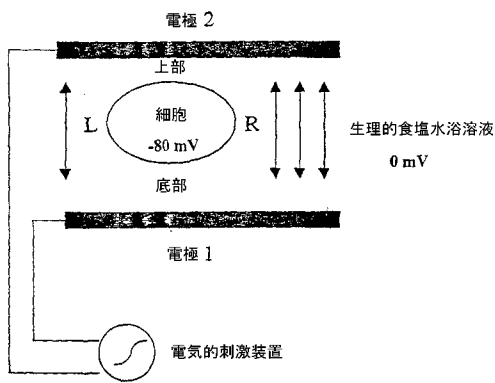
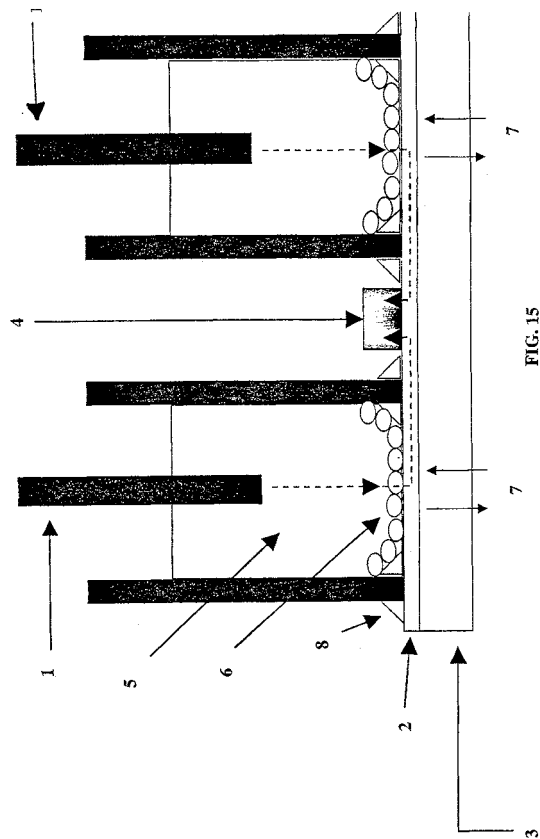
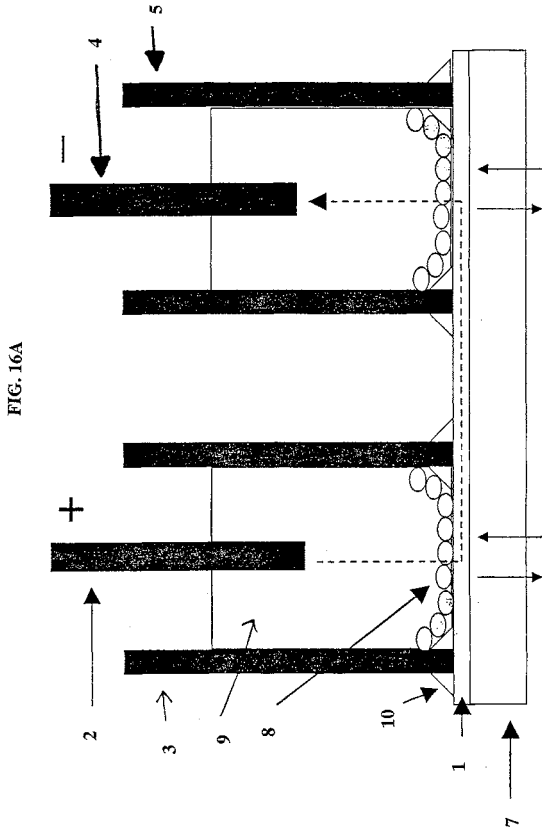


FIG. 14

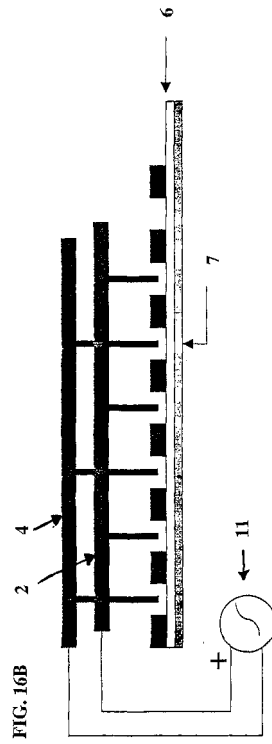
【 図 1 5 】



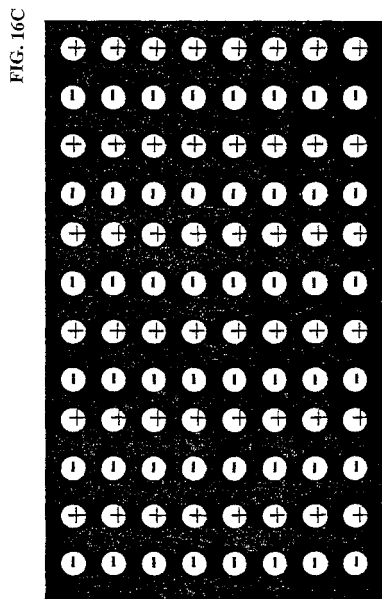
【 図 1 6 A 】



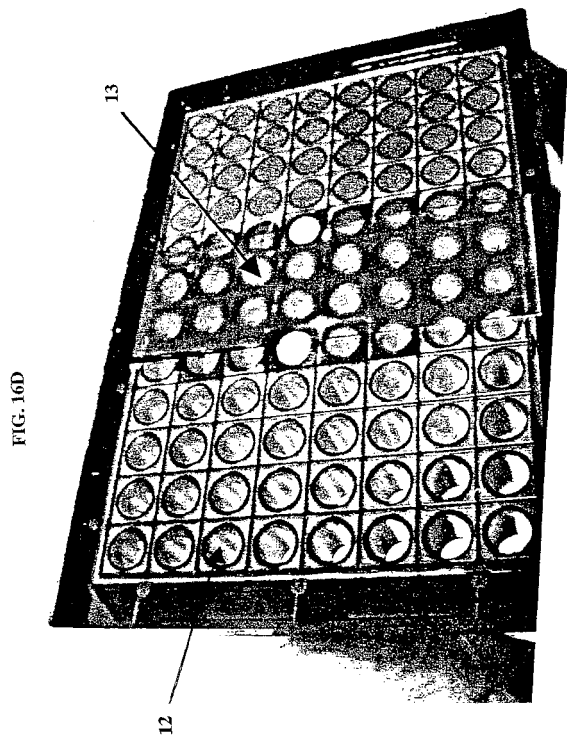
【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C 】



【 図 1 6 D 】



【 図 19 A 】

FIGURE 19A

1 cgaagccggc cggctggc ccggccggcc agccggggcc ggggtcggc cggccggc
61 agccggggc cttggggcc cggccggcc gggggggc tggggggc gggggggc
121 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
181 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
241 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
301 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
361 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
421 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
481 cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc cggccggc
541 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
601 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
661 ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
721 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
781 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
841 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
901 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
961 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1021 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1081 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1141 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1201 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1261 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1321 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1381 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1441 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1501 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1561 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1621 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1681 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1741 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1801 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
1861 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1921 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
1981 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2041 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2101 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2161 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2221 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2281 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2341 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2401 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2461 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2521 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2581 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
2641 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2701 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2761 gaaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2821 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc

【 図 19 B 】

FIG. 19B

2881 ggggttctt gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
2941 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3001 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3061 gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3121 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3181 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3241 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3301 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3361 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3421 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3481 tggggcgtt cggccggc gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
3541 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3601 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3661 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3721 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3781 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3841 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3901 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
3961 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4021 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4081 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4141 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4201 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4261 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4321 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4381 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4441 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4501 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4561 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4621 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4681 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4741 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4801 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4861 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4921 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
4981 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5041 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5101 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5161 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5221 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5281 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5341 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5401 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5461 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5521 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5581 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc
5641 aacccgctt ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc ctttggcc

【 図 19 C 】

FIG. 19C

5761 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
5821 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
5881 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
5941 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6001 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6061 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6121 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6181 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6241 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6301 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6361 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6421 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6481 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6541 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6601 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6661 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6721 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6781 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6841 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6901 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
6961 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7021 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7081 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7141 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7201 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7261 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7321 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7381 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7441 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7501 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7561 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7621 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7681 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7741 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7801 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac
7861 taaacccat gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac gttgagcac

【 図 19 D 】

FIG. 19D

MTEGARAADDEVVPLGAPPVPAALVGSAPSPGAPGREAESR
ELGVSPSESPA AERGAELGADEBQRVPYPALAAVTFVCLGQTRPRSRWCLRLVNCNPF
EHSVMLVMLNCVTLGMFRPCEDVEGSEKCNLEAFDAFFAFAVEMVIMKVALG
FGQCYLGDITWNRDLFFVIVAGMMMEYSLDGHNVSLASARTVRLRPLRRAINRVPMSRI
LVTLTDLTLMPLGNVLLCFVFFVFFVIGVQVQLWAGLLRNRKFLDFAVRNNLFTLR
PYQTEBEGEENPFICSSRRDNGMQKCSHPHGRRLRMPCTLGWEAYTPQAEVGAAR
NACINWVYIVNCRSDSNPHNAINFNIDNIGYAWLAFVITLGGVWVDMYVYMDAHS
FYNFYHLLIYVHSHHHHHHHYHSHSHPRRPGRPGPAGCACTRLVRAAGPSPGRRG
PDAEYVHSIYHADCHIEGPOERARVAHAATAAASRLATLGTIMNYFTLPSGVGSG
KQSTSPGPKGWAGGPPGTGGHGLPLSLNSPDPYKPKHVPYVGHGLGQAPGLHSLGSLV
PCLPSPAGTLCLEKSCPCYTRALEDEPELGSSESGSDGRGVYFTQDVRHGRDW
DTPRPRATDTPGPGPSPORRAQRAAPGEPGWMLRWVIFSGKLRRLVLRVLRVLRVLRV
IMMALLVNTLSMGEVYHEQPEELNNALEISNVTSMFAELMLKLLACPLGYRNP
YNIFFDGVVIVSWEVIGQADGGLSVLRTFRLLRVLKLRVLRVLRVLRVLRVLRVLRVLRV
VATFTCLLMLFIFISILGMHFGCKFSKLTDTGDTVPKRNKFDLSLWAVIVFQILT
QEDWNVVLYNGMASTSSWAALYFVALMTFNGYVLFNLLVAILVEFGQAEGRDNRSDT
EDKTVHFHEDFHKLRELQITTELKMSCLA VTPNGHLEGRSISPLMCTAATPMPPT
KSSPLDAAPSLPDSRRGSSSDPPLDQKPPASLRSSPCAPWPGSPGAWSSRRSSWS
SLGRAPSLKRRGQGERESLISGEGKSTDDAEEDGRAAPGPRAPLRLRRESLDRPLR
RPAALPPTKCRDRDQVVALPSDFLFRIDSHREDAELDDSDSDSCLRLHKVLEPK
PWQRSREAWALYFSPQRNFRVSCQKVIHMKMFDHVLVFIPLNCTVIALERFDIDP
GSTERVFLSVSNYIFTAIFVAENMVKVVALGLDSGEHAALYQSSWNLLDGLVLSVLDV
IVYMASAGGAKILGVLRLRLRLRLRVLVSRAPGLKLVVETLISLRLPIGNVIL
CAAFHIFLIGVQLFRKGFYCEBGPDMRNMSTKAQCRALHYRWRVRRKYNFNDLGOAL
MVLFLSSKDGWVNMVMDGLDAVGVDPQVQVQNNHNPWMLLYRSLFLVIFVLMFVGV
VYVNFHFKRQHQAEAEARRREKRLRLRLRRLRRLRRLRRLRRLRRLRRLRRLRRLRRLR
HSLTCSHYLLDITFITICNVITMSMEHYNQPKSLDEALKYCNVYVTFVFEALKL
VAFGRFRFKDRWNQLDLAIVLLSMGHTLEEMSAALPNPFRMLRRLRRLRRLRRLRRLR
KLLKMATGMRALLDVYVQALPQVGNLGLLPMLLFFHAYALGVLEFORLESEDNPCFEG
LSRHATSNFNGMAFLTLFRVSTGDNWNGIMKDTLRECSREDEKHLVSLPALSPVYFVT
FLVAQVFLVNVVAVLMLKHEESKEAREDEALDEALEMAAQGFSARRVDADRPP
LQESFGARDAPNVLARKVSVSRMLSLPNDYMYMFRVPAASAPHRFLQFVEMETVGA
FTPLGVSASVHSPAESASLQPLAVSSPARSGEPLHLSFRGTARFSLRSLRLCRQ
EAVHTDSLEKIGSPDRLDPAPEKPTVPRVTPQGGSLQSPRSPRSPASVRLRKHRT
GQHVSSRPAAPGEGEAEASDPDAEVEVSHVTSVCPWQPTAEHPGPEASPVVAGGERDL
RLVYSDAQGLDKPGRADQWRPSELGSGEPGAEKAWGPEALPAGLAKKMKMSP
CISVEPDAEEDGARSAPAEAGSTLRLRRTTPEATPHRSLDLETPSGSAGDPAKRG
ERWQASCRAEHLVPSFAPELDDLGVSPGDFLDDGSHVTPESRASSGAIVPLEPP
ESEPPMPVDPPEKRRGLVLYVPCQPLEKPGSPSAPAPAGGADSSV

【 20 A 】

FIGURE 20A

1 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
61 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
121 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
181 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
241 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
301 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
361 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
421 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
481 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
541 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
601 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
661 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
721 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
781 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
841 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
901 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
961 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1021 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1081 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1141 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1201 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1261 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1321 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1381 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1441 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1501 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1561 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1621 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1681 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1741 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1801 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1861 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1921 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1981 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2041 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2101 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2161 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2221 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2281 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2341 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2401 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2461 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2521 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2581 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2641 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2701 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2761 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2821 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

【 20 B 】

FIGURE 20B

2881 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2941 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3001 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3061 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3121 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3181 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3241 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3301 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3361 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3421 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3481 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3541 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3601 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3661 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3721 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3781 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3841 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3901 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3961 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4021 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4081 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4141 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4201 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4261 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4321 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4381 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4441 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4501 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4561 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4621 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4681 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4741 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4801 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4861 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4921 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4981 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5041 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5101 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5161 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5221 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5281 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5341 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5401 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5461 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5521 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5581 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

【 20 C 】

FIG. 20C

5641 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5701 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5761 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5821 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5881 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5941 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6001 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6061 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6121 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6181 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6241 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6301 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6361 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6421 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6481 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6541 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6601 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6661 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6721 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6781 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6841 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6901 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
6961 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7021 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7081 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7141 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7201 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7261 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
7321 gggggggggg cggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

【 20 D 】

FIG. 20D

MVRFDELGGRYGGPGGGERARGGGAGGAGGPGGLQPGQVRL
YKQSLAQRARTMALYNPPVKQNCFTVNRSLFVSEDNVVRKYAKRITWPPFEYML
ATTIANCVLALAEQLHPDGDKTPMSERLDDTEPYFIFGCFEAGKIALGFVFKHS
YLRGNWVMDVFPVVLTGILATAGTDFDLRLTRAVRFLRPLKLVSGIFSLVGLKSMK
AMVPLLIQIGLFFAILMFAIIGLEFYMGKFKHACFPNSDIAEPVDFPCKEAPARL
CEGDTECREYWPGPFGITNFDNLIFAILTVPCITMEGWDILYINTDAAAGTWNWNL
YFDLIIIGSFFMLNLVGLVSGEFAKERERVENRFAFLKWRDRQMLNGYLEWY
FKAEVYMLAEEDRNAAEKSLDVLKRAATKSRNDLIHAEBEGDRFADLCAVSPFAR
ASLKSQKTESSYFRKKEKMFRRFIRMVKAQSFYVWVLCVVALNTLCVAMVHYNQPR
RLTTLYFAEFVFLGLFLTEMLSKMYGLGPRYSFRSFFCFDFGIVGVSVFVWAAI
KPGSSFGISVLRALRLLRIFKVTKYWSSLRNLVSSLNSMKSIISLLFLYLVFA
LLGMQLFGQFNQDTEPTTTFDTPFAAILTVFQILTGEDWNAVYHGESQGGVSKG
MFSSFYVILTLFNGYVTLNLVFLAIAVDNLANAQELTKDEEEMEEANQKIALQKAKE
VAVESPMASANISIAARQNSAKARSVVEQRASQLRQLNLRASCEALYSEMDEERLR
FATTRHLRFDPMKTHLDRPLVVELGRDARGPVGGKARPEAAEAPEGVDPDRHRHRD
KDKTPAAGDQDRAEAPKAESEPEGAREREPRPHRSISKEAARPEARSERGRGPGE
GRHRHRGSPPEAAEREPRRHRHRHQPDSKCEAGAKGKEARHRGRPRGPREAESG
EPPARRHRARHKAQPAHEAVEKETTEKEATEKEAEVEADKEKELRNHQPREPHCDLE
TSGVTVTPMHTLPSTCLQVKEFPEDADNQNRVTRMGSQPPDPNTHIVVMLTGLP
GEATVPSGNVDLESQAEKKEVEADVMRSRPRVIVYSMFCPSPTNLRRCFH7Y
VTMRVYFVVVLVVALSSIALAEDPVRTDPSRPNALKYLDYFTGVFTFEMVIKMD
LGLLLHFGA YFRDLWNLDFTVVS GALVAFAPFSGSKGKDINIKSLRVLRLPLKTI
KRLPKLKA VFDVNVSLKNVNLNLVYMLFMFIVAVIAVQLFKGKPFYCTDESKELE
DRGQVYLDYKKEVEAQRQWKKYDFHYDNLVWALLTLFTVSTGEGWPMVLKHSVDA
YEEQVSPSGYRMELSIFYVYVYVFPFFVNVFVLIITFQEGQDVMSECSLEKNE
RACIDFAISAKPLTRYMPQNRQSFQYKTWTFVSPFFYFIMAMIALNTVLMKFDY
APYEBELMLKCLNVFTSMFMECVLKIAPGVNLVFRDAWNVDFVTVLGSITDLV
TEIAETNNFINFLRLFRARLKLRLRQGYTRILLWTFVQSFKALPYVCLLAMLF
FIYAIGMQVFGNIALDDTDSINRHNRFTLQALMLLFRSATGEAWHEDMLSCLSNQ
ACDEQANATECGSDFAFYFVSHFLCSHMLNLVAVIMDNFVYLRDSSILGPHHLL
DEFIRVWAEYDPAACGRISYNDMFMELKHMSPPLGLGKCPARVAKYRLVRMNMPSIN
EDMTVHTSTLMAIRATALEIKAPAGTKHQHQDAELRKLGSQMGVPSLHPLKATLEQT
PQAVLRRVFLRQKSSLSLNGGAIQNSGKESVSWGTQRTPDAPHEARPLER
HSTEIPVGRSGALVAVDQMQRTRRQPDGEPQGLSQRGAASMPRLAETQPTDAS
PMKRISITLAVQPRGTHLSTTDRPSPSQAASSHHHHRCHRRDRKQRSLKQPSL
ADMDGAPSSAVGQPLPPEGGPTGCRERERQRGRSQRERRQPSSSSEKQRFYSCDR
FGREPPKPKPLSSHPTSPTAGQEPGHPQGSVNSPLSSTSGASTPGRGRRQL
PQTLTPRPSIYKTAANSPIHFAQATSLPAFSPGRLSRGLSEHNALLQRDPLSQP
APGSRISDPPYLGQRLDSEASVHALPEDILTFEAVATNSGRSSRYSVSSLSQSH
LRRVPGYHCTLGLSSGGRARHSYHHPDQHWAC

【 2 1 A 】

FIGURE 21A

1 gggggggggg ctgggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
61 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
121 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
181 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
241 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
301 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
361 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
421 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
481 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
541 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
601 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
661 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
721 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
781 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
841 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
901 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
961 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1021 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1081 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1141 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1201 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1261 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1321 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1381 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1441 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1501 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1561 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1621 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1681 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1741 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1801 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1861 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1921 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
1981 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2041 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2101 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2161 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2221 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2281 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2341 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2401 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2461 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2521 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2581 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2641 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2701 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2761 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

【 2 1 B 】

FIGURE 21B

2821 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2881 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
2941 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3001 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3061 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3121 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3181 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3241 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3301 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3361 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3421 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3481 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3541 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3601 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3661 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3721 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3781 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3841 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3901 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
3961 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4021 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4081 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4141 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4201 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4261 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4321 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4381 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4441 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4501 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4561 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4621 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4681 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4741 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4801 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4861 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4921 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
4981 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5041 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5101 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5161 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5221 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5281 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5341 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5401 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5461 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg
5521 cagcagaggg gggggggggg ccccgggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg

【 2 1 C 】

FIG. 21C

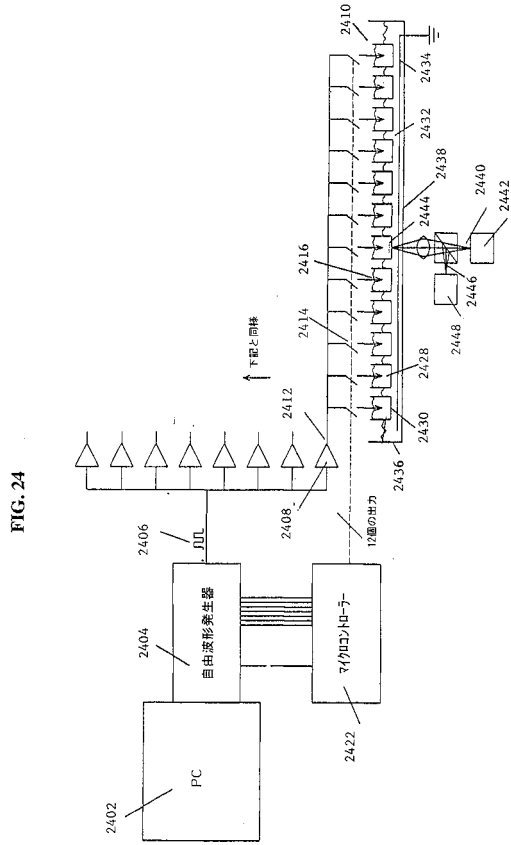
5581 aaagcagcact cagctgtgac cggagtgag gaagagatg tccgttgtt gggccaact
5641 gcccagaag acitggagc tgcctgtacc accccataag ccctgatgaa ccacagtgag
5701 gaaggttat gcagctgtca tgatattga cttctacaag cagaacaaaa ccaccagaga
5761 ccagatgac cagctgtgac ggggccttcc ccagatgggt cctgtgtccc ttttccacc
5821 tctgaagcc acccttgagc agacacagcc ggcctgtgct cagagagccc gggttttct
5881 tctgaagag agttccacc cctcagcaga tgcggggcc atacaaaacc aagagagtg
5941 catcaaaag tctgtctct ggggcaacc aagccacagc gatcaccacc atgagggcag
6001 gccaccctg gagctgtgccc atccaccaga gatccctgtg gggcgctcag gacagctgg
6061 tctgagcgt cagatgaca gcataacccc gaggggccc gatggggag ccagcctgg
6121 gctgagagc caggtgtgag cggctctcat gcccgctt cggcccgaga ctcagccgt
6181 cacagatgc agcccataga agcctctat ctcaccgtg gccaccgccc cccgtgggac
6241 tcatcttgc agcaccacc cggagcggcc accccctagc cagcgtgct cgcaccacca
6301 ccaccaccgc tgcaccgcc gaaaggagc gaagcagagc tccctggaga aggggcccag
6361 cctgtctgc gatattgat gcgaccaca cagctgtgt gggcggggg tgcggggg
6421 agaggggccc caggtgtgc gggcggaac agagcggc gagcagagc gggcgctgg gccgtgcca
6481 gggcgaggg cagctctcat cctctctc ggaagagagc cgttctact cctgagacc
6541 cttgggggc cgtgagccc cgaagcccaa gccctctctc agcagacc ccacgtgccc
6601 aacagctgc cagagagccc gaccaccacc acagccggcc tcaagctgg gctttcgaa
6661 cacaagccc tgcctcagag agacccttcc agcagccc tggccctgag cctcgaatt
6721 gctcctgacc ctactctgag agagctgtg gacagttag cctcttcca cgcctgact
6781 gaggacagc tcaatttga ggaagctgtg gccaccact cggggcctc ctcaggact
6841 tctactgct cctcctgac cctcactgt cctcctctc gccgctgccc caagctgac
6901 cactgaccct tgggactagc ctcgggtgccc agagcagccc acagctacca ccaccctgac
6961 caagaccact ggtgtagct gacactgac cgtcagagc cctgactgca gaggcgtgt
7021 gtccagtgat atgatttta tcaaccac gggagcagc gccctcctgc gggctgtg
7081 ccacttgtt gaggctcctg tggccctccc cctccctccc tccctctt tactctagc
7141 gacgaataa gccctgttc tgaagtgtac gtaccgc

【 2 1 D 】

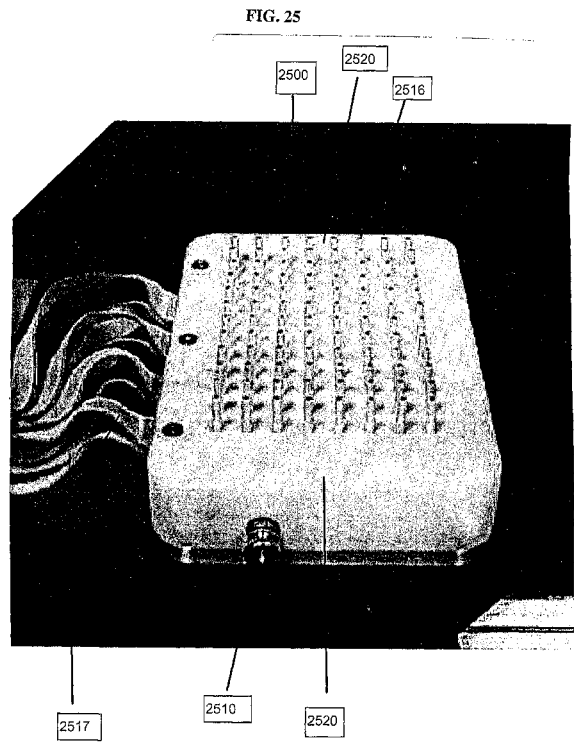
FIG. 21D

MVRFGDELGGRYGGPPGGGERARGGGAGGAGGGPGLQPGQRVL
YKQVSIQRARIMALYNIPVKQNCFTVNSRLVFVSEDNVRVKYAKRITWPPFPFYMIL
ATIIANCIVLLEQLHPDGDKTPMSERLDDTEPYFIFGCFEAAGKIALGKIVFHKGS
AMRVGNWNVMDVFFVLLTGLATAGTDFDLRLRAVRVLRPLRDLVSGPSQLVVLKSMK
YLNLNQLJQLLFLAILMFAJGLEFYMGKFKACFPNSRDLAEPLVDFPCGKEAPARL
CEGDTCECRYWPGNPGFTNFDNLIFAILTTFQCTIMEGWTDILYNTNDAAGNTWNWL
YFPLILGWSFMLNLVLGVLGSEFAKERERVENRRAFLKLRQQQIERGLYLEWY
FKAEVMLAEEDRNEAEKSPDLVKRAATKSRNDLHAEEDGFRADLCAVGSPPAR
ASLSKGTKESSYFRRRKEKMRFRHRRMVKAFSFWVLLVLCVAVLNLCVAMVYQPR
RLITTLTYFAEFVLGLFTEMSLKMYGLGPRYSYRFSNCFDFGVIVGVSVEVWAAI
KPGSFGISVLRALRLLRIFKVTKYVWSSRLNLVSVLLNSMKSIISLLELFLFVVA
LLQMQLFGGQFNFDTEPTTDFPFAAILTVFQLTGEDWNAVMYHGIESQGGVSKG
MFSFYFVILTLFQNYTLNLVFLAIVDNLANAQELTKDEEMEBEAAQKALQKAKE
VAEVSMPMAANISIAARQNSAKARSVWEQASQLRQLNLRASCEALYSEMDPEERLR
FATTRHLRPMKTHLDRPLVVELGRDARGPVGKARPEAAEAPGVDPRRHHRRHD
KDKTPAAGQDRAEAPKAESEGPAREERPRRHRSHKEAAGPPEARSRGRGPGPEG
GRRHRHRGSPPEAAERERPRRHRHRHQDPKKECAGAKGERRARHRGGPRAOPREAESG
EEPARRHRARHKAQPAHEAVEKETTEKEATEKEAIEVEADKEKELRNHQPREPHCDLE
TSGVTVGMHILPSTCLQVEEQPEDADNRQNVTRMGSQPPDPNNTVHIPVMLTGPL
EATVVPNSGVDLESQAEGKKEVEADDVMSRGPRTVPSYSSMFLSPTNLLRFCHYI
VTMRVFEVVLVVIALSSIALAEADPVR TDSPRNALKYLDFYFTGVTFEMVIKMD
LGLLLHPGAYFRDLWNLDLFTVSGALVAFVAFSGSKGKINDITKSLRVLRLPLKTI
KRLPKLKA VFDVNVSLKLVNLVNLVYMLFMFFVAIVVQLFKGKFFVCTDESKELR
DCRQOYLDEYEKEVEAQPRQWKKYDFHYDNLVNLVAVLTLFTVSTGEGWPMVLLKHSVDAT
YEEQGPSGYRMELESIFVYVVFVFFFVNFVAVLIITFQEQDQKVMSECSLEKNE
RACIDFAISKPLTRVMPQNRQSQYKTVFVVSPPFHMAMFVNLVLMKFDYD
APYELNMLKCLNIVFTSMFMECVLKHAFVNLNRYFRDANVDFVLGSLTDLV
ATTIANNFNINLSFLRFRARLKLRLQGYTRILLWTFVQSFKALPHYVCLLIAMLF
FYAIIGMVFQVGNALDDDTINRHNNRFTFLQALMLLFRSATGEAWHEMLMSCLSNQ
ACDEQANATECGSDFAFYFVFIPLCSFLMLNLVAVIMDNFEYLRDSSILGPHIL
DEFIVWAYEYDPAACGRISYNDMFMFLKHMSPPLGLGKCPARVAYKRLVRNMNMPISN
EDMTVHTSTLMAIRLAEIKLAPAGTKQHQCDALRKEISVVAWNLPKQKTLTLLVP
PHKPDENTVSKLVYALMIFDFYKQNKTRDQMQQAPGLSQQMPVSLFHPKATLQET
QAVLRLGARVFLRQSSTLSLNGGAIQNESGIKESVSWGTQRTQDAPHEARPLER
HSTIEPVGRSGALAVDVMQMSITRRGDPGPQGLSEQGRASMPRLAETQVDTAS
PMKRSISTLAPQPRGTHLCTTPDRPPSPASSHHHHHRCHRRRDRKQKSLKSPSLS
ADMDGAPSSAVPGPLPPGEGPTGRERRRERGRSRQRSPSSSSEKQRFVSCDR
FGREPPKPKPSSSHTSPTAQEPGPHPOAGSAGVFNPTTCCRERTPSASPWPLAL
ELALLTLWGSVWTVRPLSTPLRTRLSRRLWPPTRAAPPGLTCCP

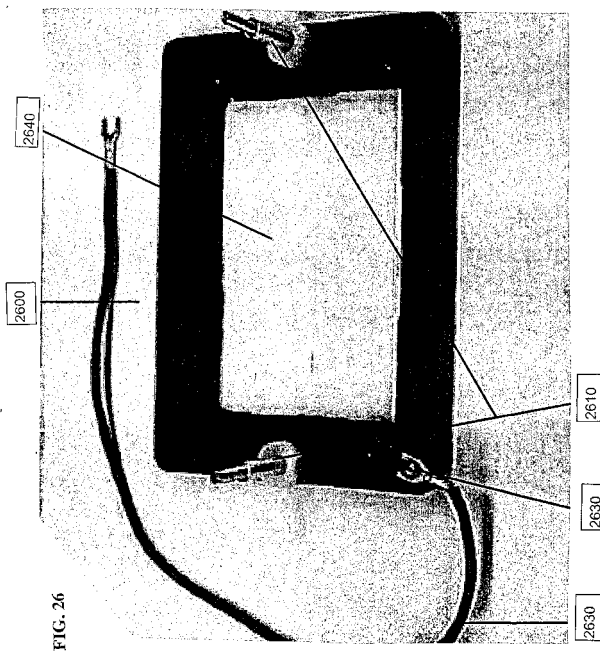
【 図 2 4 】



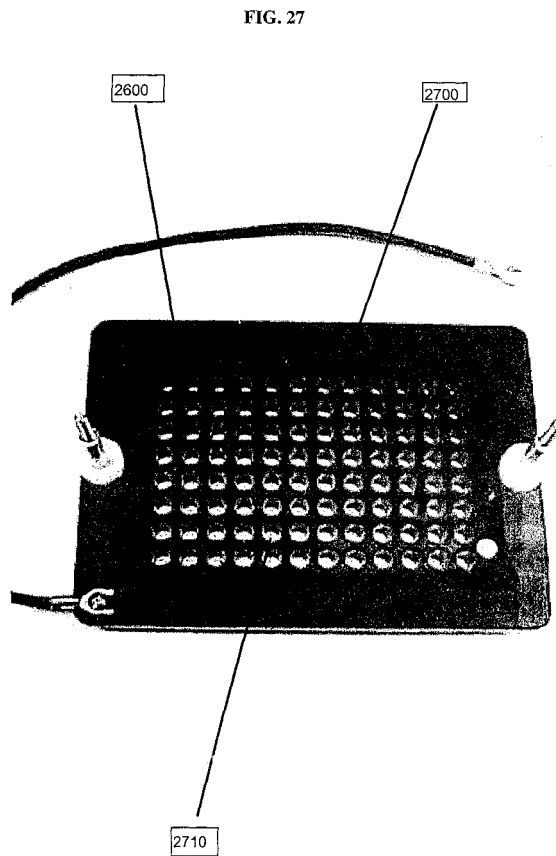
【 図 2 5 】



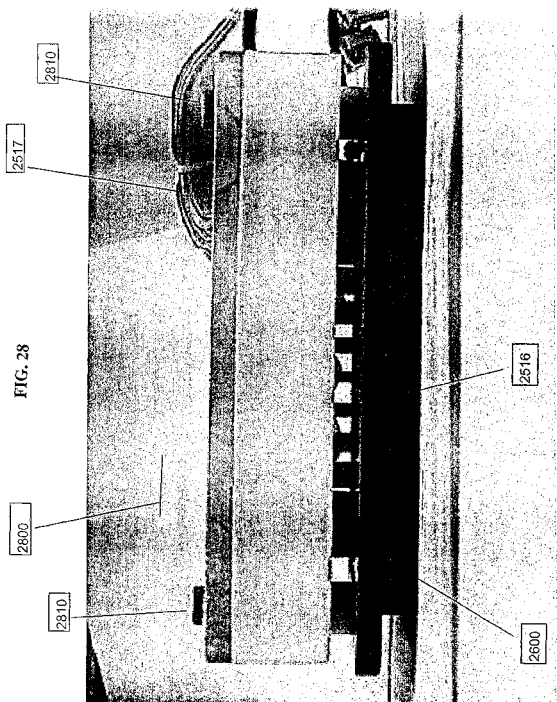
【 図 2 6 】



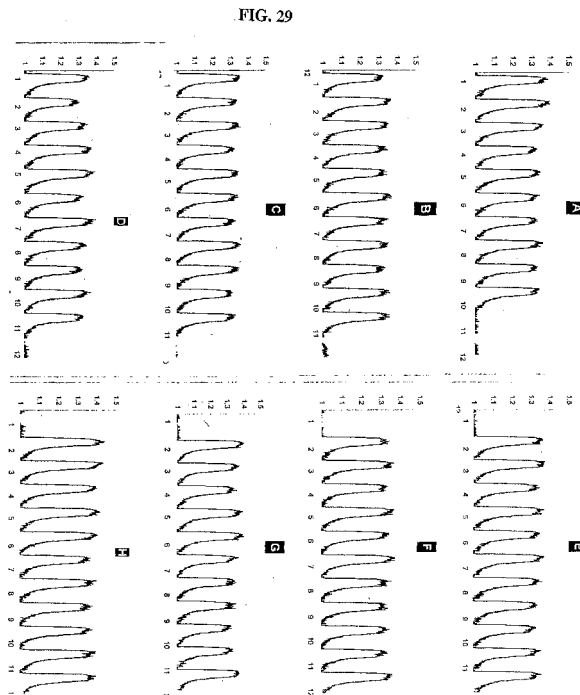
【 図 2 7 】



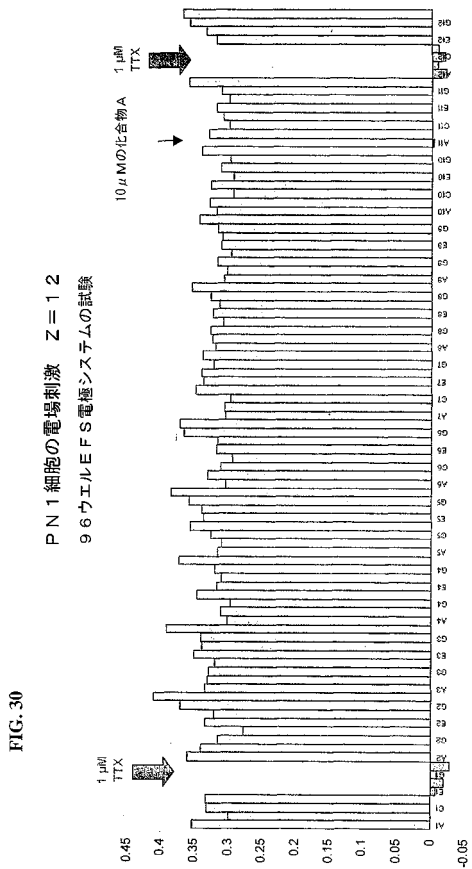
【 図 28 】



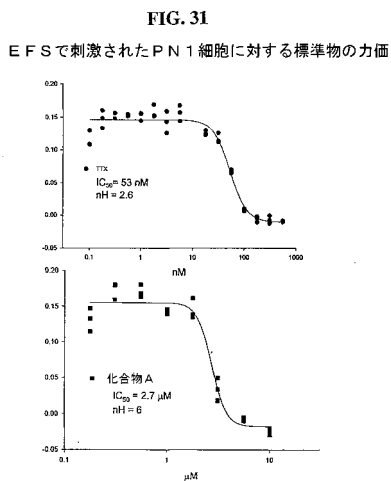
【 図 29 】



【 図 30 】

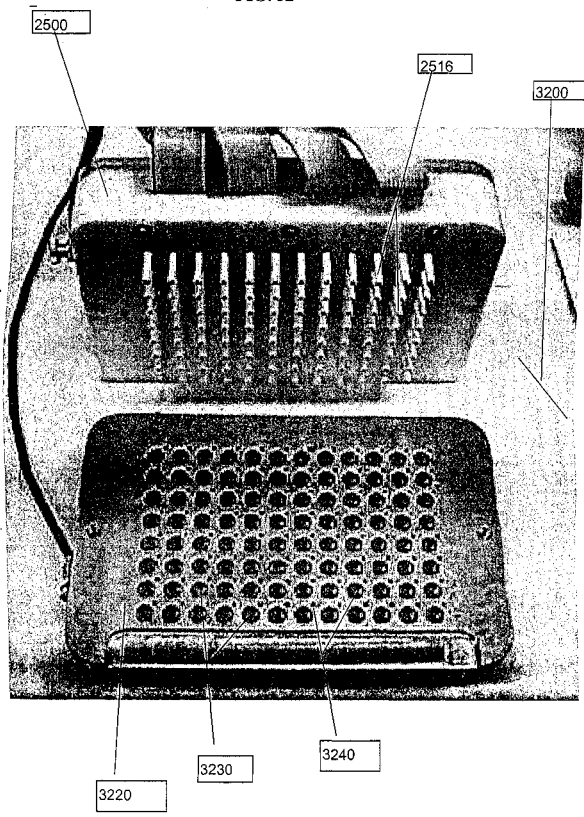


【 図 31 】



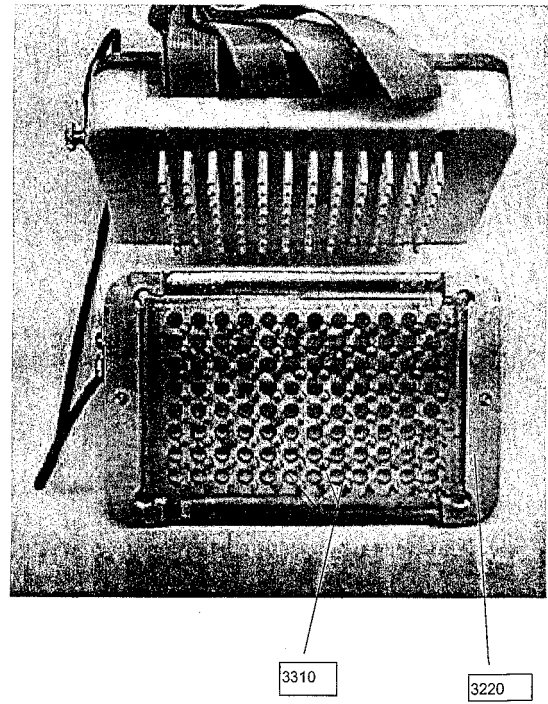
【 図 3 2 】

FIG. 32



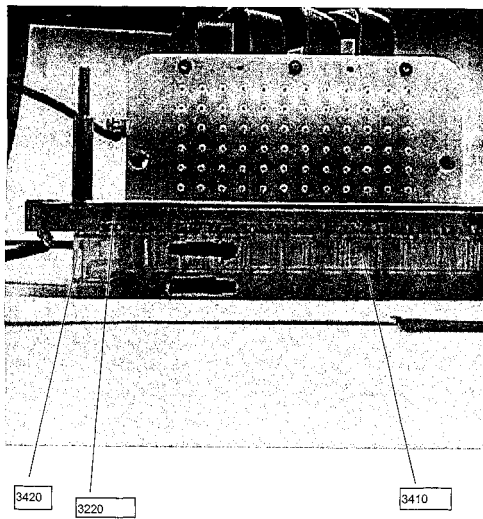
【 図 3 3 】

FIG. 33



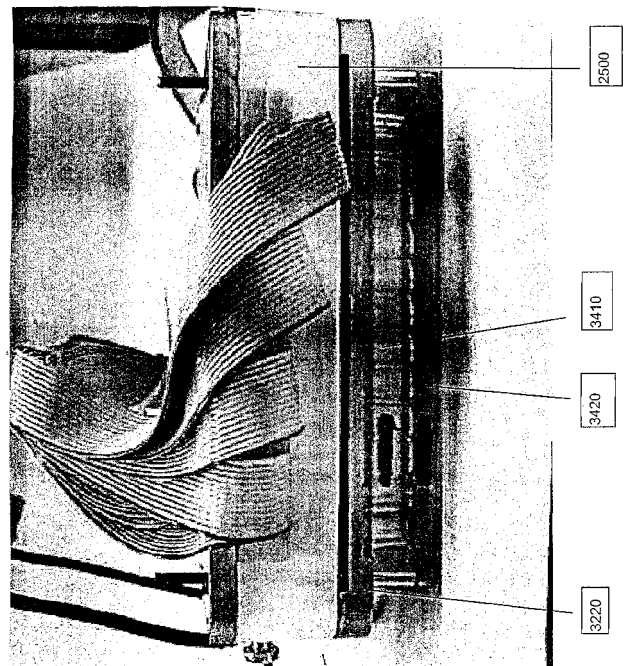
【 図 3 4 】

FIG. 34



【 図 3 5 】

FIG. 35



【手続補正書】
【提出日】平成15年2月12日(2003.2.12)
【手続補正1】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図36A
【補正方法】追加
【補正の内容】
【図36A】

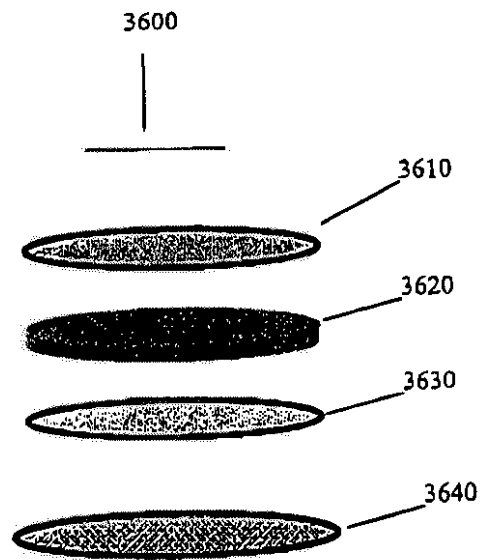


Figure 36A

【手続補正2】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図36B
【補正方法】追加
【補正の内容】
【図36B】

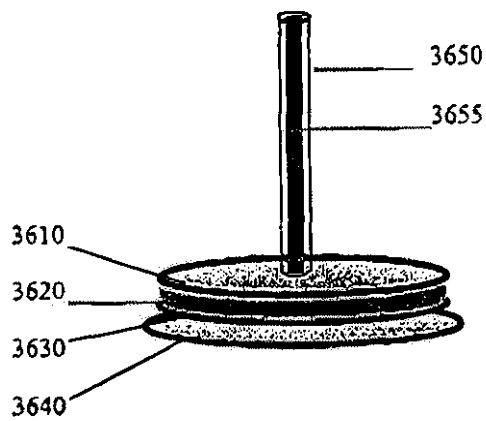


Figure 36B

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 6 C

【補正方法】追加

【補正の内容】

【図 3 6 C】

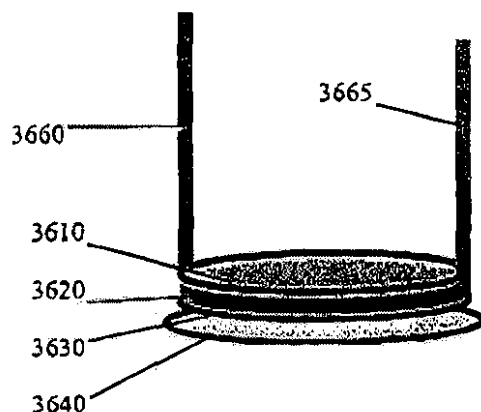


Figure 36C

【手続補正書】

【提出日】平成 16 年 3 月 10 日 (2004.3.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 6 8】

【図 1】図 1 A は、本発明の 1 つの実施形態の上面図を示す。この実施形態は、約 $25 \mu\text{m}$ から $100 \mu\text{m}$ の隙間 4 が電極間に存在するように間隔が置かれた金の正極 2 および金の負極 3 がその内部またはその表面に存在するガラス製スライドガラス 1 を含む。電極に対して一般に直角に配置されたスペーサー 5 (この場合にはプラスチック細片として示される) と一緒になって、電極は、細胞を入れ、かつ / または増殖させることができる、深さが約 $100 \mu\text{m}$ である一連のウエル 6 を規定する。図 1 B は、図 1 A の実施形態の断面側面図を示す。この実施形態では、正極および負極の実体は、所望する場合には互いに入れ替えることができる。電極は金から作製される必要はなく、他の導電性材料を使用することができる。また、スペーサーはプラスチックである必要はなく、他の非導電性材料を使用することができる。

【図 2 A】図 2 A は、典型的な 9 6 ウエルプレートが電極を各ウエル内に含有する本発明の実施形態の上面図を示す。ウエルは、ウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 (この場合には正極として示される) と、ウエルの底部 4 における第 2 の電極 3 (この場合には負極として示される) と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料 5 の細片と、ウエルの底部での細胞 6 とを有する。1 個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面 2 は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物 (ITO) などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部 4 における細胞 6 および第 2 の電極 3 を完全に覆うために、そしてウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 に達するために十分な流体レベル 7 とともに示される。ウエルは、図 2 A に関して実際の大き

さ比率で描かれていない。この実施形態では、正極 1 および負極 2 の両方がウエルの底部 3 に存在する。この実施形態では、ウエルの側面 4 および底部 3 が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル 5 は、細胞 6 ならびに正極 1 および負極 2 を覆うようにされる。

【図 2 B】図 2 B は、図 2 A におけるウエルの 1 つの断面側面図を示す。ウエルは、ウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 (この場合には正極として示される) と、ウエルの底部 4 における第 2 の電極 3 (この場合には負極として示される) と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料 5 の細片と、ウエルの底部での細胞 6 とを有する。1 個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面 2 は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物 (ITO) などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部 4 における細胞 6 および第 2 の電極 3 を完全に覆うために、そしてウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 に達するために十分な流体レベル 7 とともに示される。ウエルは、図 2 A に関して実際の大きさ比率で描かれていない。この実施形態では、正極 1 および負極 2 の両方がウエルの底部 3 に存在する。この実施形態では、ウエルの側面 4 および底部 3 が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル 5 は、細胞 6 ならびに正極 1 および負極 2 を覆うようにされる。

【図 2 C】図 2 C は、ウエルにおける別の電極配置を示す。ウエルは、ウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 (この場合には正極として示される) と、ウエルの底部 4 における第 2 の電極 3 (この場合には負極として示される) と、ウエルの底部における必要に応じて使用される絶縁性材料 5 の細片と、ウエルの底部での細胞 6 とを有する。1 個の細胞が単に例示の便宜のために示されており、ほとんどの場合には多数の細胞がウエルの底部に存在する。ウエルの側面 2 は、プラスチックなどの非導電性材料から作製され、ウエルの底部は、インジウムスズ酸化物 (ITO) などの導電性材料から作製される。ウエルは、ウエルの底部 4 における細胞 6 および第 2 の電極 3 を完全に覆うために、そしてウエルの側面 2 における第 1 の電極 1 に達するために十分な流体レベル 7 とともに示される。ウエルは、図 2 A に関して実際の大きさ比率で描かれていない。この実施形態では、正極 1 および負極 2 の両方がウエルの底部 3 に存在する。この実施形態では、ウエルの側面 4 および底部 3 が、プラスチックなどの非導電性材料から作製される。流体レベル 5 は、細胞 6 ならびに正極 1 および負極 2 を覆うようにされる。

【図 3】図 3 は、第 1 の電極 2 および第 2 の電極 3 が交互にかみ合い、ガラス基体 4 の表面における導電性材料の層に化学的にエッチングされている本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 1 を示す。ウエルは、一般には、直径が 3 mm の円形である。電極は、幅が 10 μm であり、160 μm の間隔を有する。第 1 の電極 2 または第 2 の電極 3 のいずれかが正極として機能し得る。電極の幅および電極間隔は変化させることができる。幅は、好ましくは 1 μm から 10 μm の間であり、電極間隔は、好ましくは 5 μm から 160 μm である。特に好ましい実施形態では、電極間隔は、少なくとも、真核生物細胞の典型的な直径と同じくらいの大きさである (すなわち、約 40 μm から 50 μm) 。

【図 4 A】図 4 A および図 4 B は、ウエルフレームを基体を取り付けることによってウエルが形成される実施形態を例示する。図 4 A は、開口部 2 が基体 3 におけるウエルを形成するウエルフレーム 1 (この場合、ウエルフレーム 1 が (例えば、所定位置に接着することによって) 基体 3 に取り付けられる) と、バネ押し接点 6 を有する接触ガイドプレート 5 と、印刷回路ボード (PCB) 7 とを含有する実施形態の分解図を示す。基体ホルダー 4 が、組み立てられたデバイスを顕微鏡または蛍光プレート読み取り装置などの測定装置 (示されず) において所定位置に保持するために使用される。PCB 7 は、電極 (示されず) がパルス発生器 (示されず) に連結され得る接続部を含有する。

【図 4 B】図 4 A および図 4 B は、ウエルフレームを基体を取り付けることによってウエルが形成される実施形態を例示する。図 4 B は組み立て後の図を示す。

【図 5】図 5 は、実質上のウエルを含有する基体に形成された交互にかみ合う電極の配置

を示す。実質上のウエルは本明細書中においてさらに説明される。

【図 6】図 6 は、2つの実質的に平行するプレート 1 が、試験される細胞 3 を含有する液体液滴がその間に挟まれる導電性層 2 でコーティングされたそれらの向き合う表面を有する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエルを示す。一方の導電性層が正極（この場合には上部導電層 4）であり、一方、反対側の導電性層が負極（この場合には下部導電層 5）である。当然のことではあるが、これらの電極特性は逆にすることができ、この場合、上部の導電性層が負極であり、下部の導電性層が正極である。この実施形態のいくつかの変形では、プレートはガラスであり、導電性層はインジウムスズ酸化物（ITO）である。導電性層は、好ましくは、厚さが約 200 から 2,000 であるか、または約 500 から 1,500 であるか、または約 800 から 1,200 である。

【図 7】図 7 は、電極の一方が、平坦な基体 1 の表面における導電性材料の薄い被覆物 2 であり、ウエルの底部 10 を形成する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 3 を示す。もう一方の電極 7 が上方からウエル 3 に進入し、ウエル 3 内の流体 5 と接触する。電極 7 は切開図で示される。電極 7 は、絶縁体 6 によって囲まれている中心の導電性材料部分 8 を含有する。簡略化のために、1 個の細胞 4 がウエル内に示される。一般には、少なくとも 10^5 個の細胞がウエルに存在する。導電性層は、好ましくは、厚さが約 200 から 2,000 であるか、または約 500 から 1,500 であるか、または約 800 から 1,200 である。

【図 8】図 8 は、ウエル 4 の底部が、細胞を増殖させることができるフィルターメンブラン 12 である本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 4 を示す。簡略化のために、1 個の細胞 8 がフィルターメンブラン 12 の上に示される。ウエル 4 は、ガラスの底部 1 を有し、かつ第 1 の流体 3 で満たされるトラフ 2 に設置される。一方の電極 7 が上方からウエル 4 に進入し、ウエル 4 内の第 2 の流体 5 と接触する。電極 7 は、絶縁体 6 によって囲まれ、パルス発生器（示されず）に第 1 のリード線 9 によって接続される中心の導電性材料部分 8 を含有する。第 2 の電極 11 が、第 1 の流体 3 内に配置され、パルス発生器に第 2 のリード線 10 によって接続される。第 2 の電極 11 は切開図で示される。第 2 の電極 11 は、実際には、ウエル 4 の底部に円を形成する。第 1 の電極 7 が正極であり、一方、第 2 の電極 11 が負極であるか、または第 1 の電極 7 が負極であり、一方、第 2 の電極 11 が正極であるかのいずれかである。

【図 9 A】図 9 A は、正極 5 および負極 8 の両方が上方からウエル 2 に進入する本発明の実施形態に由来する 1 個のウエル 2 を示す。ウエル 2 は、1 個の細胞 9 が示される流体 3 を含有する。一般には多数の細胞がウエル 2 に存在する。正極 5 はパルス発生器（示されず）に正極リード線 6 によって接続される。負極 8 はパルス発生器に負極リード線 7 によって接続される。両方の電極は絶縁体 4 に埋め込まれる。正極 5 および負極 8 は、正極 5 および負極 8 が、ウエル 2 の底部を形成するガラスプレート 1 に対して一般には直角であるように、絶縁体 4 の内部を横切る。しかし、正極 5 および負極 8 が絶縁体 4 の底部 10 から出るとき、正極 5 および負極 8 は、正極 5 および負極 8 が絶縁体 4 の底部 10 に存在し、かつ平行するように 90° の角度にそれぞれが曲げられる。

【図 9 B】図 9 B は、ウエル 2 の底部を形成するガラスプレート 1 から上を見た図であり、絶縁体 4 の底部にある正極 5 および負極 8 の曲げられた部分の配置を示す。

【図 10 A】図 10 A は、正極 5 および負極 8 の両方が上方からウエル 2 に進入し、正極 5 および負極 8 が同軸ケーブルの様式と類似する様式で配置される本発明の実施形態を示す。正極 5 が絶縁体 4 に埋め込まれ、負極 8 が絶縁体 4 の外側を覆っている。正極 5 はパルス発生器（示されず）に正極リード線 6 によって接続される。負極 8 はパルス発生器に負極リード線 7 によって接続される。ウエル 2 は、1 個の細胞 9 が示される流体 3 を含有する。だが、一般には多数の細胞がウエル 2 に存在する。ガラスプレート 1 はウエル 2 の底部を形成する。

【図 10 B】図 10 B は、正極 5 および負極 8 の下から上を見た図を示す。

【図 11】図 11 は、図 8 に示される実施形態に類似する本発明の実施形態を示すが、図 11 では、上方からウエルに進入する電極 7 が絶縁体によって囲まれず、代わりに、ピペ

ットチップ 6 内に存在し、ウエル 4 内の第 1 の流体 5 に関して同時に存在するピペットチップ 6 内の第 1 の流体 5 とも接触する。この配置は、電極 7 の端部での領域において第 1 の流体 5 における気泡の形成を最小限に抑えるという利点を有する。ウエル 4 の底部は、細胞を増殖させることができるフィルターメンブラン 1 2 である。簡略化のために、1 個の細胞 8 がフィルターメンブラン 1 2 の上に示される。ウエル 4 が、ガラスの底部 1 を有し、かつ第 2 の流体 3 で満たされるトラフ 2 に位置する。電極 7 がパルス発生器（示されず）に第 1 のリード線 9 によって接続される。第 2 の電極 1 1 が、第 2 の流体 3 の中に配置され、パルス発生器に第 2 のリード線 1 0 によって接続される。第 2 の電極 1 1 は切開図で示される。第 2 の電極 1 1 は、実際には、ウエル 4 の底部に円を形成する。いずれかの電極が正極または負極であり得る。

【図 1 2 A】図 1 2 A から B は、一方の電極が上方から進入し、その一方で、もう一方の電極がウエルの底部を形成するという点で、図 7 の実施形態に類似する実施形態を示す。図 1 2 A は、一方の電極 1 が、ウエル 2 の底部を形成する導電性材料（ITO など）の層である、9 6 ウエルマイクロタイタープレートである基体を示す側面断面図である。もう一方の電極 3 が上方からウエルに進入し、ウエル内の流体と接触する（流体は示されず）。電極は電気的パルス発生器 4 にリード線 5 によって接続される。いずれかの電極が正極または負極であり得る。別の実施形態は、示されている実施形態に類似するが、標準的な 9 6 ウエルプレート、3 8 4 ウエルプレート、1 5 3 6 ウエルプレートまたは 3 4 5 6 ウエルプレートの底部を、一方の電極を形成する導電性材料（ITO など）で置き換えることである。第 2 の電極が上方から各ウエルの中に下げられる。ITO 電極に対する接触を、電気伝導性の銀エポキシドによって、または ITO の底部から白金ワイヤへの接触としての 1 つ置きウエルに 3 M K C l（もしくは類似する塩溶液）を入れることによって行うことができる。

【図 1 2 B】図 1 2 B は基体の上面図を示す。

【図 1 3 A】図 1 3 A から B は、実質上のウエルを含有する 2 つのマルチウエル基体を含む実施形態を示す。図 1 3 A は、底部基体 2 に近づく上部基体 1 を示す側面断面図である。上部電極 3 は、ITO などの導電性材料から作製され、上部基体 1 の実質上のウエル 4 の底部を形成する。同様に、底部電極 5 は、ITO などの導電性材料から作製され、底部基体 2 の実質上のウエル 6 の底部を形成する。テフロン（登録商標）または類似する疎水性材料の薄い層 1 1 が基体上の導電性材料の表面を覆う。テフロン（登録商標）を有しない基体の表面の円形領域は比較的親水性であり、実質上のウエルを形成する。テフロン（登録商標）層は厚さが約 0.5 μm から 100 μm である。上部電極 3 および底部電極 5 は電気的パルス発生器 6 にリード線 7 によって接続される。装置の最も左側のウエルが、液体の液滴を含有して示される。上部液滴 8 は、試験される薬物または化合物などの物質を含有することができ、一方、底部液滴 9 は、電位依存性イオンチャンネルを発現する細胞を含有することができる。

【図 1 3 B】図 1 3 B は、上部基体 1 および底部基体 2 が十分に近くに移動して、その結果、上部液滴 8 および底部液滴 9 が混合された後の装置を示す。1 0 は、上部基体 1 および底部基体 2 を整列するために役立ち、かつ液滴を混合するために適切な距離を離して基体を保つスペーサー（図 1 3 A では示されず）である。

【図 1 4】細胞の電場刺激の原理を例示する。

【図 1 5】図 1 5 は、一方の電極が上方 1 からウエルに進入し、一方、第 2 の電極が、高導電性の金属接地グリッド 4 と接触している透明な基体 3 の透明な ITO 被覆底部 2 から形成される実施形態に由来する 2 つのウエルを示す。矢じりを伴う破線は、電流が、どのように、上方 1 から進入する電極から、緩衝化塩溶液 5 および細胞 6 を通って、そして ITO 層 2 および金属接地グリッド 4 を通って流れるかを例示する。基体 3 内の矢 7 は、検出システム（示されず）において使用される光源からの光が、どのように、上方向に、透明な基体 3 および ITO 層 2 を通って細胞 6 に入り、その後、蛍光として細胞 6 によって再放射され、下方向に通過して検出器（示されず）に至るかを例示する。ウエルを ITO 被覆基体 3 に取り付けのために使用することができる、必要に応じて使用される接着シ-

ル 8 が示される。ITO 層の厚さは、好ましくは、約 200 から 2,000、約 500 から 1,500、または約 800 から 1,200 である。

【図 16 A】図 16 A は、ウエルの底部を形成する ITO などの導電性層 1 を有するマルチウエル実施形態の 2 つのウエルを示す。正極 2 が上方から左ウエル 3 に進入し、一方、負極 4 が上方から右ウエル 5 に進入する。ITO などの導電性材料の透明な層 1 が、ガラスなどの透明な基体 7 を覆う。矢じりを伴う点線は、電流が流れる経路を示す。当然のことではあるが、正極および負極の実体は逆にすることができる。細胞 8 がウエル内の流体 9 の中に示される。ウエルを ITO 被覆基体 7 に取り付けるために使用することができる、必要に応じて使用される接着シール 10 が示される。光路が基体内の矢によって示される。

【図 16 B】図 16 B は、正極 2 および負極 4 がどのようにパルス発生器 11 に接続されるかを例示する、この実施形態の側面切開図を示す。透明な基体 7 を覆う透明な導電性の層 6 もまた示される。

【図 16 C】図 16 C は、正極および負極の交互パターンを例示する実施形態の上面図を示す。

【図 16 D】図 16 D は、一部が解体されているこの実施形態の写真である。ウエルが、ITO でコーティングされているガラス基体 13 に取り付けられるウエルフレーム 12 によって形成される。通常の実験時には、基体により、すべてのウエルが覆われる。例示目的のために、この図では、基体の一部のみが示されている。

【図 17】図 17 は、図 16 に示される実施形態に類似する本発明の実施形態から得られたデータのグラフ表示を示す。データは、ヒト 1H T 型電位依存性カルシウムチャンネル (GenBank アクセション番号 AF073931) を発現させるためにトランスフェクションされている HEK293 細胞内への Ca^{2+} の流入を表す。 Ca^{2+} の流入が、T 型チャンネルが開口したときに生じ、そして 480 nm で励起されたカルシウム指示薬色素 Fluo4 の 520 nm から 560 nm における蛍光放射を検出することによって測定された。示された時点で、事前に選択された電圧が電極を介して加えられた。これは T 型チャンネルの一部を開口させ、 Ca^{2+} の流入を可能にした。これは、カルシウム指示薬色素 Fluo4 による 520 nm から 560 nm における蛍光放射の急激な上昇を生じさせた。この急激な上昇は、示されるように徐々に減衰した。

【図 18 A】図 18 A から B は、ヒト PN3 ナトリウムチャンネルをコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【図 18 B】図 18 A から B は、ヒト PN3 ナトリウムチャンネルをコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1) を示す。

【図 18 C】図 18 C はその対応するアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。GenBank アクセション番号 AF117907 に由来する。

【図 19 A】図 19 A から C は、ヒト T 型カルシウムチャンネルの 1H サブユニットをコードするヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。

【図 19 B】図 19 A から C は、ヒト T 型カルシウムチャンネルの 1H サブユニットをコードするヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。

【図 19 C】図 19 A から C は、ヒト T 型カルシウムチャンネルの 1H サブユニットをコードするヌクレオチド配列 (配列番号 3) を示す。

【図 19 D】図 19 D はその対応するアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。GenBank アクセション番号 AF073931 に由来する。

【図 20 A】図 20 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1B サブユニットのスパイス変化体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。

【図 20 B】図 20 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1B サブユニットのスパイス変化体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。

【図 20 C】図 20 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1B サブユニットのスパイス変化体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。

【図 20 D】図 20 D はその対応するアミノ酸配列 (配列番号 6) を示す。GenBank

k アクセション番号 M 9 4 1 7 2 に由来する。

【図 2 1 A】図 2 1 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1 B サブユニットの スプライス変化体をコードするヌクレオチド配列（配列番号 7）を示す。

【図 2 1 B】図 2 1 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1 B サブユニットの スプライス変化体をコードするヌクレオチド配列（配列番号 7）を示す。

【図 2 1 C】図 2 1 A から C は、ヒト N 型カルシウムチャンネルの 1 B サブユニットの スプライス変化体をコードするヌクレオチド配列（配列番号 7）を示す。

【図 2 1 D】図 2 1 D はその対応するアミノ酸配列（配列番号 8）を示す。G e n B a n k アクセション番号 M 9 4 1 7 3 に由来する。

【図 2 2 A】図 2 2 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 1 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 9）を示す。

【図 2 2 B】図 2 2 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 1 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 9）を示す。

【図 2 2 C】図 2 2 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 1 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 9）を示す。

【図 2 2 D】図 2 2 D はその対応するアミノ酸配列（配列番号 10）を示す。G e n B a n k アクセション番号 A F 0 0 4 8 8 4 に由来する。

【図 2 3 A】図 2 3 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 2 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 11）を示す。

【図 2 3 B】図 2 3 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 2 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 11）を示す。

【図 2 3 C】図 2 3 A から C は、ヒトカルシウムチャンネル 1 A イソ型の 1 A - 2 サブ ユニートをコードするヌクレオチド配列（配列番号 11）を示す。

【図 2 3 D】図 2 3 D はその対応するアミノ酸配列（配列番号 12）を示す。G e n B a n k アクセション番号 A F 0 0 4 8 8 3 に由来する。

【図 2 4】図 2 4 は、とりわけ、コンピューター、電圧発生器、増幅器、メンブタン底部 ウエル、共通トラフおよび蛍光検出器を用いる E F S システムの 1 つの実施形態の概略図 を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、9 6 ウェルトレーとの使用のために特に適合化された電極ヘッド実 施形態を示す写真である。

【図 2 6】図 2 6 は、図 2 5 に示される電極ヘッド実施形態と組み合わせて使用される トラフ実施形態を示す写真である。

【図 2 7】図 2 7 は、マルチスクリーンウェルトレーがその間に配置される図 2 6 のトラ フ実施形態を示す写真である。

【図 2 8】図 2 8 は、組み立てられた電極ヘッド、トラフおよびマルチスクリーンを示す 写真である。

【図 2 9】図 2 9 は、図 2 8 に示される実施形態に類似する本発明の実施形態から得られ たデータのグラフ表示を示す。データは、ヒト P N 1 電位依存性ナトリウムチャンネルを 発現させるためにトランスフェクションされている H E K 2 9 3 細胞の膜電位変化を表す。 各プロットは 9 6 ウェルプレートの横一列（12 ウェル）A から H を表す。9 6 ウェル プレートのデータの各縦列は V I P R（商標）で 1 5 秒間取得された。刺激パルスプロト コルがデータ取得時に下記のように加えられた：2 秒のベースラインの後、2 m s の方形 パルス、振幅 = 2 0 m A、振動数 = 1 0 H z、持続時間 = 5 s。

【図 3 0】図 3 0 は、図 2 9 に示されるデータの最大比率変化の棒グラフ表示である。1 μ M の T T X（テトロドトキシン（T T X）感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルの 特異的かつ強力な阻害剤）が、E 1、F 1、G 1、H 1、A 1 2、B 1 2、C 1 2 および D 1 2 のウェルに存在する。さらに、ウェル A 1 1 には、T T X 感受性の電位依存性ナト リウムチャンネルを阻止するための内部標準物が含有される。Z スコアは、標準偏差の和 により除された非阻害シグナルおよび阻害シグナルの差の尺度である。

【図 3 1】図 3 1 は、H E K 2 9 3 / P N 1 細胞における E F S 刺激による脱分極シグナ

ルに対する T T X (上パネル) および化合物 A (下パネル) の濃度を増大したときの影響を示す。これらの実験で得られた IC_{50} は、他の技術により得られた IC_{50} と匹敵する。大きいヒル係数 (nH) が刺激プロトコルの閾值的性質から得られる。

【図 3 2】図 3 2 は、別の実施形態を示す写真である。図 3 2 には、図 2 5 に示される電極ヘッドに類似する電極ヘッド、および銅電極プレートが示される。この実施形態は、C a c o - 2 マルチスクリーン (M i l l i p o r e、B e d f o r d、M A) との使用のために特に適合化されている。

【図 3 3】図 3 3 は、銅電極プレートが、導電性ピンを示すために裏返しにされていることを除いて、図 3 2 に示される写真に類似する写真である (注: ピンは頁から読者の方に向かって延びている)。

【図 3 4】図 3 4 は、組み立てられた C a c o - 2 メンブラン底部ウエルおよび受器トレイに置かれた銅電極プレートを示す写真である。

【図 3 5】図 3 5 は、図 3 4 の組み立てられた実施形態 (すなわち、電極ヘッド、ピンを伴う銅電極プレート、C a c o - 2 メンブラン底部ウエル、および C a c o - 2 受器トレイ) を示す写真である。

【図 3 6 A】図 3 6 は、2つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 A はこの新規な電極実施形態の拡大図を示す。

【図 3 6 B】図 3 6 は、2つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 B は、同心状のリード線に電氣的に接続された新規な電極実施形態を示す。

【図 3 6 C】図 3 6 は、2つの導電性ディスクに挟まれた誘電性ディスクを含む新規な電極実施形態を示す。図 3 6 C は、端リード線に電氣的に接続された新規な電極実施形態を示す。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/22161																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																						
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 5/00, 15/00; C12P 1/06; G01N 33/53, 33/554, 35/00; G01R 27/00 US CL : 324/600; 422/50, 55, 67; 435/69.1, 320.1, 325; 436/43, 519, 800, 807, 809; 536/23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
B. FIELDS SEARCHED																						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 324/600; 422/50, 55, 67; 435/69.1, 320.1, 325; 436/43, 519, 800, 807, 809; 536/23.5																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPT, PGFB, JPAB, EPAB, DWPI, REGISTRY, HCAPLUS																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
Y	US 6,057,114 A (AKONG et al.) 02 May 2000 (02.05.2000), Abstract, Column 1, Lines 12-15; Column 4, Lines 4-22; Column 9, Lines 63-68; Column 17, Lines 22-40; Column 17, Line 63 to Column 18, Line 15; Column 20, Lines 32-54; Column 22, Line 57 to Column 23, Line 30; Column 23, Line 54 to Column 24, Line 9; Column 26, Lines 9-20; Column 27, Lines 14-22; Column 33, Line 61 to Column 34 Line 27; Column 41, Line 43 to Column 42, Line 9; Column 42, Lines 28-67; Column 43, Lines 35-56.	1-16 and 20-60																				
Y	CONNOLLY, P. et al. An Extracellular Microelectrode Array for Monitoring Electrogenic Cells in Culture. Biosensors and Bioelectronics, 1990, Vol. 5, Pages 223-	17-19 and 61-74																				
Y, P	US 6,377,057 B1 (BORKHOLDER) 23 April 2002 (23.04.2002), entire document.	17-19 and 61-74																				
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																						
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*X</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*&</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			*A	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E	earlier application or patent published on or after the international filing date	*X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&	document member of the same patent family	*P	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*A	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
*E	earlier application or patent published on or after the international filing date	*X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
*L	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
*O	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&	document member of the same patent family																			
*P	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 27 August 2003 (27.08.2003)		Date of mailing of the international search report 11 DEC 2003																				
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer: Dr. Kailash C. Srivastava Telephone No. (703)-308-0196																				

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
 G 0 1 N 37/00 G 0 1 N 37/00 1 0 2
 // C 1 2 N 15/09 C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

- (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真
- (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
- (72) 発明者 オーガスチン, ポール・アール
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07008、カータレット、ステイマ・アベニュー・8
- (72) 発明者 ベネット, ポール・ビー
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18901、ドイルズタウン、ハンコック・レイン・3679
- (72) 発明者 ブジアネツシイ, ランダル・エム
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・09907、ブリツジウオーター、ミルクリップ・ロード
 ・475
- (72) 発明者 ゲイリヤンツ, テイナ・エイ
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07059、ウオーレン、ロバーツ・ロード・18
- (72) 発明者 イムレーデイ, ジョン・ピー
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19446、ランズデイル、ヨークタウン・ストリート・86
 1
- (72) 発明者 ケイス, ギャリー・エス
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07076、スコッチ・プレインズ、スカイ・トップ・ド
 ライブ・2671
- (72) 発明者 マクマナス, オウエン・パイ
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・08558、スキルマン、ロビン・ドライブ・34

F ターム (参考) 2G045 BB20 CB01 FA29 FB12 GC15
 4B024 AA11 BA80 CA04 DA02 EA04 GA11
 4B029 AA07 AA08 BB11 CC02 FA15
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ20 QR59 QR66 QR77 QR80 QS24
 QS38 QS39 QX04