

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年5月26日(2005.5.26)

【公開番号】特開2004-65264(P2004-65264A)

【公開日】平成16年3月4日(2004.3.4)

【年通号数】公開・登録公報2004-009

【出願番号】特願2003-292590(P2003-292590)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/68

// C 1 2 P 21/08

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/705

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/68 A

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月10日(2004.9.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

カルシウム-活性化されたカリウムチャネルのモノマーをコードする単離された核酸であって、前記モノマーが、

i . 40 ~ 80KDaの計算された分子量を有し；

ii. 前記モノマーが、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、2～60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii. 配列番号30又は42に対して生成された抗体に対して特異的に結合することを特徴とする単離された核酸。

【請求項2】

配列番号、1，2，3，4，19，20，32，43，47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列を有する、カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質からの少なくとも15個の隣接するアミノ酸をコードするが、但し、前記隣接するアミノ酸がグルタミン反復アミノ酸配列からは成らない単離された核酸。

【請求項3】

前記核酸が、2～60pSのコンダクタンス及び40～80kDaの分子量を有するカルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードし、そして前記核酸が、

i. 配列番号13，14，15，16，21，22，31，44及び48から成る群から選択された配列に対して、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズし、又は

ii. 配列番号13，14，15，16，21，22，31，44及び48から成る群から選択された配列に対して、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする核酸によりコードされたタンパク質をコードする請求項2に記載の単離された核酸。

【請求項4】

前記核酸が、配列番号1，19，20，32及び47から成る群から選択された配列を有するタンパク質をコードする請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項5】

前記核酸が、配列番号2，3，4及び43から成る群から選択された配列を有するタンパク質をコードする請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項6】

前記配列が天然に存在する配列と同一である請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項7】

配列番号31に示される配列を有する請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項8】

中間コンダクタンスのカルシウム-活性化されたカリウムチャネルのモノマーの少なくとも15個の隣接したアミノ酸をコードし、前記モノマーが、

i. 42～52kDaの計算された分子量を有し；

ii. 前記モノマーが、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、内部方向での30～60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii. 配列番号32に対して生成されたポリクローナル抗体に対して特異的に結合する請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項9】

前記配列が天然に存在する配列と同一である請求項8に記載の単離された核酸。

【請求項10】

下記配列：

VRGPPCVQDLGAPLTSPQPWPGFLQQGEAL (配列番号33)

からのいづれかの8個の隣接したアミノ酸をコードする請求項6に記載の単離された核酸。

【請求項11】

配列番号32から成る群から選択された、中間カルシウム-活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする少なくとも20個の長さのヌクレオチドの単離された核酸配列。

【請求項12】

配列番号1，2，3，4，19，20，32，43，47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列からの少なくとも15個の隣接したアミノ酸を有する、単離

されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質であって、ここで前記変異体が配列番号 1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 32 , 43及び47から成る群から選択されたタンパク質に対して反応性の抗体と、免疫学的に反応性の条件下で特異的に反応することを特徴とする単離されたタンパク質。

【請求項 1 3】

前記タンパク質が、キセノパス卵母細胞において発現される場合、2 ~ 80pSのコンダクタンス及び40 ~ 80KD<sub>a</sub> の分子量を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの形成を誘導する請求項12に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 4】

前記タンパク質が、配列番号 1 , 19 , 20 , 32又は47に示される配列を有する請求項12に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 5】

前記タンパク質が、配列番号 2 , 3 , 4 及び43から成る群から選択された配列を有する請求項12に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 6】

i . 42 ~ 52KD<sub>a</sub>の計算された分子量を有し；

ii . 前記モノマーが、カリウムチャネルの機能的ポリマー形で存在し、そしてキセノパス卵母細胞において発現される場合、内部方向での30 ~ 60pSの単位コンダクタンスを有し；そして

iii . 配列番号32に対して生成されたポリクローナル抗体に対して特異的に結合する、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質のモノマーからの少なくとも15個の隣接したアミノ酸を含んで成る請求項12に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 7】

天然に存在する配列に対して同一のアミノ酸配列を有する請求項16に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 8】

配列番号32で示される配列を有する請求項16に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 1 9】

下記配列：

VRGPPCVQDLGAPLTSPQPWPGFLGQGEAL (配列番号33)

からのいづれかの 8 個の隣接したアミノ酸をコードする請求項16に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 2 0】

核酸によりコードされる単離された中間コンダクタンスのカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質であって、その一部が、プライマー対により増幅される場合、配列番号31に対して、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズする増幅されたフラグメントを生成し、ここで前記プライマー対が、

5'GCCGTGCGTGCAGGATTAGG 3' (配列番号34) 、

5'CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC 3' (配列番号35) 、

5'TCCAAGATGCACATGATCCTG 3' (配列番号36) 、及び

5'GGACTGCTGGCTGGTTCTGG 3' (配列番号37)

から成る群から選択されることを特徴とする単離された核酸。

【請求項 2 1】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質に対して、免疫学的に反応性の条件下で、特異的に反応する抗体であって、前記タンパク質が配列番号 1 , 2 , 3 , 4 , 19 , 20 , 32 , 43及び47から成る群から選択された配列を有することを特徴とする抗体。

【請求項 2 2】

前記抗体が、配列番号 1 , 19 , 20 , 32及び47から成る群から選択されたタンパク質に対して特異的に反応する請求項21に記載の抗体。

【請求項 2 3】

前記タンパク質が、配列番号2，3，4及び43から成る群から選択された配列を有する請求項21に記載の抗体。

【請求項24】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項21に記載の抗体。

【請求項25】

前記モノクローナル抗体が、配列番号1，19，20，32及び47から成る群から選択されたタンパク質に対して特異的に反応する請求項24に記載の抗体。

【請求項26】

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸を含んで成る発現ベクターであって、前記チャネルタンパク質が配列番号1，2，3，19，20，32，32及び47、及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列を有し、前記保存的に修飾された変異体が、卵母細胞において発現される場合、2～80pSのコンダクタンス、40～80kDaの分子量を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルの形成を誘導し、そして免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1，2，3，4，19，20，32，43及び47から成る群から選択されたチャネルタンパク質に対して反応性の抗体と特異的に反応するタンパク質であることを特徴とする発現ベクター。

【請求項27】

請求項26に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項28】

配列番号1，2，3，4，19，20，32，43及び47から成る群から選択された、カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸に対して、緊縮条件下で特異的にハイブリダイズする、少なくとも20個の長さのスクレオチドの単離された核酸配列。

【請求項29】

生物学的サンプルにおけるカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の存在を検出するための方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと抗体とを接触せしめ、ここで前記抗体は、免疫学的に反応性の条件下で、配列番号1，2，3，4，19，20，32，43及び47から成る群から選択された配列を有するチャネルタンパク質に対して特異的に反応し；

(b) 免疫学的に反応性の条件下で、前記タンパク質への前記抗体の結合を可能にし、前記結合された抗体の検出が前記チャネルタンパク質の存在をますことを含んで成る方法。

【請求項30】

少なくとも25個の長さのアミノ酸のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする核酸の生物学的サンプルにおける存在を検出するための方法であって、

(a) 配列番号1，2，3，4，19，20，32，43及び47から選択された配列を有する前記チャネルタンパク質をコードする核酸に対して選択的にハイブリダイズする核酸セグメントを含んで成る核酸プローブと前記サンプルとを、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ；

(b) ハイブリダイゼーション複合体を形成するために、チャネルタンパク質をコードする前記核酸の前記プローブへの選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、前記ハイブリダイゼーション複合体の検出が前記サンプルにおける前記核酸配列の存在の表示であることを含んで成る方法。

【請求項31】

hSK1 のためには、

ATGCCGGGTCCCCGGGCAGGCTGC (配列番号5)

TCACCCCGCAGTCCGAGGGGGCAC (配列番号6)；

rSK2 のためには、

ATGAGCAGCTGCAGGTACAACGGG (配列番号7)

CTAGCTACTCTCAGATGAAGTTGG (配列番号8)；

rSK 3 のためには、

ATGAGCTCCTGCAAATACAGCGGT (配列番号9)  
TTAGCAACTCTGTGAACTTG (配列番号10)；

rSK 1 のためには、

TCAGGGAAAGCCCCGACCGTCAGT (配列番号11)  
TCACCCACAGTCTGATGCCGTGGT (配列番号12)；

hSK 2 のためには、

ATGAGCAGCTGCAGGTACAACG (配列番号23)  
CTAGCTACTCTGTGATGAAGTTG (配列番号24)；

hSK 3 のためには、

ATGAGCTCCTGCAAGTATAAGC (配列番号25)  
TTAGCAACTGCTTGAACTTGTG (配列番号26)；

hIK 1 のためには、

GCCGTGCGTGCAGGATTTAGG (配列番号34)  
CCAGAGGCCAAGCGTGAGGCC (配列番号35)；

及び

TCCAAGATGCACATGATCCTG (配列番号36)  
GGACTGCTGGCTGGTTCTGG (配列番号37)；

から成る群から選択されたプライマーと同じ配列に対して、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で選択的にハイブリダイズするプライマーにより増幅される核酸によりコードされる、単離されたカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質。

#### 【請求項32】

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

a) 配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47、及び保存的に修飾されたこれらの変異体から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質を発現されている真核宿主細胞又は細胞膜と前記化合物とを接触せしめ、ここで前記保存的に修飾された変異体は、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたアミノ酸配列を有し、2~80pSのコンダクタンスを有し、そして40~80kDaの分子量を有する抗原と特異的に反応する抗体に対して特異的に結合し；そして

b) 前記チャネルを発現する細胞又は細胞膜に対する化合物の機能的効果を決定する段階を含んで成る方法。

#### 【請求項33】

前記カリウムイオンの高められた又は低められた流れが、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される請求項32に記載の方法。

#### 【請求項34】

前記チャネルタンパク質が、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択された配列を有する請求項32に記載の方法。

#### 【請求項35】

前記チャネルタンパク質が組換え体である請求項32に記載の方法。

#### 【請求項36】

前記核酸が、配列番号13, 14, 15, 16, 21, 22, 31, 44及び48から成る群から選択された配列を有する請求項1に記載の単離された核酸。

#### 【請求項37】

少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質をコードする単離された真核細胞核酸であって、前記チャネルタンパク質が、配列番号1, 2, 3, 4, 19, 20, 32, 43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の少なくとも長さに対して少なくとも60%の類似性を有するアミノ酸配列を含んで成り、そして2~80pSのコンダクタンスを有することを特徴とする単離された核酸。

**【請求項 38】**

前記チャネルタンパク質が、前記コア領域内の少なくとも20個の隣接したアミノ酸残基の比較窓に対して少なくとも90%の配列類似性を有する請求項37に記載の単離された核酸。

**【請求項 39】**

請求項7に記載の単離された核酸を含んで成るベクター。

**【請求項 40】**

請求項39に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

**【請求項 41】**

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の製造方法であって、請求項40に記載の宿主細胞を、前記チャネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

**【請求項 42】**

カルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質の製造方法であって、請求項27に記載の宿主細胞を、前記チャネルタンパク質をコードする前記核酸の発現を可能にする条件下で培養することを含んで成る方法。

**【請求項 43】**

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

a ) 少なくとも400個の長さのアミノ酸残基のカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質を発現されている宿主細胞又は細胞膜と前記化合物を接触せしめ、ここで前記SKチャネルタンパク質が、配列番号1，2，3，4，19，20，32，43及び47から成る群から選択されたタンパク質のコア領域の長さに対して少なくとも60%の類似性を有するアミノ酸配列を有し、そして2～80pSのコンダクタンスを有し；そして

b ) 前記チャネルを発現する細胞又は細胞膜に対する前記化合物の機能的効果を決定する段階を含んで成る方法。

**【請求項 44】**

前記緊縮ハイブリダイゼーション条件が、中位の緊縮ハイブリダイゼーション条件である請求項30に記載の方法。

**【請求項 45】**

前記核酸配列が、少なくとも400個の長さのアミノ酸残基及び2～80pSのコンダクタンスを有するカルシウム - 活性化されたカリウムチャネルタンパク質をコードする請求項44に記載の方法。

**【請求項 46】**

前記核酸プローブが、前記チャネルタンパク質コア領域内の副配列をコードする少なくとも250個の隣接したヌクレオチドを含んで成る請求項45に記載の方法。

**【請求項 47】**

請求項37に記載の単離された核酸によりコードされるタンパク質。

**【請求項 48】**

前記カリウムイオンの高められた又は低められた流れが、前記真核宿主細胞の細胞膜を通しての電流を測定することによって決定される請求項43に記載の方法。

**【請求項 49】**

SK及びIK遺伝子の突然変異をコンピューターシステムにおいてスクリーニングするための方法であって、

( i ) 配列番号1，2，3，4，19，20，32，43，47及び保存的に修飾されたそれらの変異体から成る群から選択された配列を有するカルシウム - 活性化されたチャネルタンパク質をコードする第1核酸配列の入力を受け；

( ii ) 前記第1核酸配列に対して実質的な同一性を有する第2核酸配列と前記第1核酸配列とを比較し；そして

( iii ) 前記第1及び第2核酸配列間のヌクレオチド差異を同定する段階を含んで成る

方法。

【請求項 50】

前記第2核酸配列が疫病状態に関係している請求項49に記載の方法。