

(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2007-503210

(P2007-503210A)

(43) 公表日 平成19年2月22日(2007.2.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
CO7K 16/18 (2006.01)	CO7K 16/18	4B064
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-524467 (P2006-524467)	(71) 出願人	501358068 アンテグラジャン INTEGRAGEN フランス国、エフー91000 エヴリ、 リュ・アンリ・デブリュエール 5、ジェ ノポール・カンピュス 1、ジュナヴェニ ール 8
(86) (22) 出願日	平成16年8月20日 (2004.8.20)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月24日 (2006.4.24)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/IB2004/002995	(72) 発明者	ハーガー, ヨルク フランス国、エフー91540 メネシ、 リュ・ドゥ・ジャン 27
(87) 国際公開番号	W02005/019474		
(87) 国際公開日	平成17年3月3日 (2005.3.3)		
(31) 優先権主張番号	60/496, 900		
(32) 優先日	平成15年8月22日 (2003.8.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/496, 917		
(32) 優先日	平成15年8月22日 (2003.8.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト自閉症感受性遺伝子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、自閉症および関連疾患の診断、予防および治療、ならびに治療的に活性な薬物のスクリーニングに用いることができる、ヒト自閉症感受性遺伝子の同定を開示する。本発明は、さらに具体的には、第5染色体上のSLC6A7遺伝子およびその所定の対立遺伝子が自閉症への感受性に関連しており、かつ、治療的介入のための新規な標的となることを開示する。本発明はSLC6A7遺伝子および発現産物における特定の突然変異、ならびにそれらの突然変異に基づく診断ツールに関する。本発明は、アスペルガー症候群、広汎性発達障害、智恵遅れ、不安症、うつ、注意欠陥多動障害、言語の遅れ、癲癇、代謝障害、免疫障害、双極性障害および他の精神医学および神経疾患の、素因の診断、検出、予防および/または治療に用いることができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害の存在または素因を検出する方法であって、対象からの試料において S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含む、方法。

【請求項 2】

対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害の治療に対する対象の反応を検出する方法であって、対象からの試料において S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含む、方法。

【請求項 3】

S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在が、シーケンシング、選択的ハイブリダイゼーションおよび/または選択的増幅によって検出される、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

S L C 6 A 7 遺伝子座における変異が、S L C 6 A 7 遺伝子または対応する発現生成物における、点突然変異、欠失および挿入より、より好ましくは点突然変異および欠失より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

S L C 6 A 7 遺伝子座における変異が、表 1 に報告された S N P 3、S N P 4、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8、S N P 9、S N P 10、S N P 12 および S N P 14 からなる群より選択される、S L C 6 A 7 遺伝子における S N P であるか、または、該 S N P s の一つ以上を含むハプロタイプである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドの存在を検出することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

試料を該変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的な抗体と接触させ、免疫複合体の形成を測定することを含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害の治療または予防のための医薬組成物の製造における、機能的 S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそれをコードする核酸の使用。

【請求項 9】

(i) S L C 6 A 7 ポリペプチド、S L C 6 A 7 ポリペプチドをコードする核酸、S L C 6 A 7 ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターまたは S L C 6 A 7 ポリペプチドをコードする核酸を含む組換え宿主細胞、および (i i) 薬学的に許容可能な担体またはベヒクル、を含む医薬組成物。

【請求項 10】

核酸プローブであって、該核酸が変異した S L C 6 A 7 遺伝子に相補的であり、かつ特異的にハイブリダイズし、好ましくは S L C 6 A 7 遺伝子における変異が表 1 に報告された S N P 3、S N P 4、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8、S N P 9、S N P 10、S N P 12 および S N P 14 からなる群より選択される、S L C 6 A 7 遺伝子における S N P であるか、または、該 S N P s の一つ以上を含むハプロタイプである、核酸プローブ。

【請求項 11】

配列番号 3 ~ 12 から選択される配列の全てまたは特有の部分を含む、請求項 10 記載のプローブ。

【請求項 12】

核酸プライマーであって、該核酸が変異した S L C 6 A 7 遺伝子に相補的であり、かつ特異的にハイブリダイズし、好ましくは S L C 6 A 7 遺伝子における変異が表 1 に報告された S N P 3、S N P 4、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8、S N P 9、S N P

10

20

30

40

50

10、SNP 12およびSNP 14からなる群より選択される、SLC6A7遺伝子におけるSNPであるか、または、該SNPsの一つ以上を含むハプロタイプである、核酸プライマー。

【請求項13】

配列番号13～50から選択される配列の全てまたは特有の部分を含む、請求項12記載のプライマー。

【請求項14】

変異したSLC6A7ポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項15】

対象からの試料において、SLC6A7遺伝子またはポリペプチドの変異の存在を検出するためのキットであって、請求項10または11記載の核酸プローブ、請求項12または13記載のプライマーまたは請求項14記載の抗体、およびハイブリダイゼーション、増幅または抗原-抗体免疫反応を行うためのプロトコルを含む、キット。 10

【請求項16】

自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害についての生物学的活性化合物を選択する方法であって、被験化合物をSLC6A7ポリペプチド、遺伝子またはその断片と接触させ、該被験化合物がSLC6A7ポリペプチド、遺伝子またはその断片と結合する能力を測定することを含む、方法。

【請求項17】

自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害についての生物学的活性化合物を選択する方法であって、SLC6A7を発現する組換え宿主細胞を被験化合物と接触させ、被験化合物が、SLC6A7ポリペプチドと結合する能力、およびSLC6A7ポリペプチドの活性をモジュレートする能力を測定することを含む、方法。 20

【請求項18】

自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害についての生物学的活性化合物を選択する方法であって、被験化合物をSLC6A7遺伝子と接触させ、該被験化合物が該SLC6A7遺伝子の発現をモジュレートする能力を測定することを含む、方法。

【請求項19】

自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害についての生物学的活性化合物を選択する方法であって、SLC6A7遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含むレポーター構築物、を含む組換え宿主細胞を被験化合物と接触させ、レポーター遺伝子の発現をモジュレート（例えば刺激または低減）する被験化合物を選択することを含む、方法。 30

【請求項20】

請求項16～19のいずれか1項記載の方法であって、該SLC6A7遺伝子またはポリペプチドまたはその断片が、変異したまたは突然変異したSLC6A7遺伝子またはポリペプチドまたはその変異または突然変異を含む断片である、方法。

【請求項21】

SLC6A7遺伝子における変異が表1に報告されたSNP 3、SNP 4、SNP 5、SNP 6、SNP 7、SNP 8、SNP 9、SNP 10、SNP 12およびSNP 14からなる群より選択される、SLC6A7遺伝子におけるSNPであるか、または、該SNPsの一つ以上を含むハプロタイプである、請求項20記載の方法。 40

【請求項22】

該モジュレーションが活性化である、請求項17～21のいずれか1項記載の方法。

【請求項23】

該モジュレーションが阻害である、請求項17～21のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】

対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または関連障害の治療または予防のための医薬組成物の製造における、SLC6A7のアゴニストまたはアンタゴニスト、SLC6A7のアンチセンスまたはRNAi、SLC6A7ポリペプチドに特異的な抗体または 50

その変異体からなる群より選択される化合物の使用。

【請求項 25】

該化合物が、エンケファリンまたはピペコリン塩酸 (PIP) もしくはこれらの誘導体である、請求項 24 記載の使用。

【請求項 26】

該化合物が、Ca²⁺依存性キナーゼの作用のモジュレーターである、請求項 24 記載の使用。

【請求項 27】

Ca²⁺依存性キナーゼが、ホスホキナーゼ C または Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II である、請求項 26 記載の使用。

10

【請求項 28】

該化合物がタブシガルギンまたはその誘導体である、請求項 27 記載の使用。

【請求項 29】

該化合物がホスファターゼのモジュレーターである、請求項 24 記載の使用。

【請求項 30】

該ホスファターゼが、PKC、CAMK2A または PKC もしくは CAMK2A の標的の一つ、の活性をモジュレートする、請求項 29 記載の使用。

【請求項 31】

配列番号 51、または配列番号 51 の少なくとも 5 つの連続するアミノ酸残基を含むその部分を含むポリペプチド。

20

【請求項 32】

請求項 31 記載のポリペプチドに結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に遺伝学および医学の分野に関するものである。本発明は、さらに詳しくはヒト自閉症感受性遺伝子の同定を開示し、その遺伝子は、自閉症および関連障害の診断、予防および治療、ならびに治療学的活性薬物のスクリーニングに使用できる。本発明は、さらに具体的には自閉症に対する感受性に関係し、治療的介入のための新規な標的となる溶質キャリアファミリー 6 (solute carrier family 6) (神経伝達物質輸送体、L-プロリン)メンバー 7、言い換えると脳特異的 L-プロリン輸送体 (SLC6A7) 遺伝子のある対立遺伝子を開示する。本発明を、アスペルガー症候群、広汎性発達障害、精神薄弱、不安、抑うつ、注意欠陥多動障害、言語の遅れ、てんかん、代謝障害、免疫障害、双極性疾患、統合失調症ならびに他の精神医学的および神経学的疾患の素因の診断、検出、予防ならびに/または治療に使用できる。

30

【背景技術】

【0002】

自閉症は、相互の社会的相互作用と言語および非言語伝達とにおける欠陥、限定された常同パターンの興味および活動、ならびに年齢 3 歳までの発達異常の存在を特徴とする神経精神医学上の発達障害である (Baileyら、1996)。Kanner (1943) は、先駆的な幼児自閉症の記載に以下の症状：言語障害、視線を合わせないこと、社会的相互作用の欠如、反復性の行動、および常同 (行為) の厳格な必要性を含めた。彼は、大部分の場合小児の行動は乳児期から異常であることに注目した。彼は、これに基づいて先天性のおそらく遺伝的な欠陥が存在することを示唆した。その翌年、ドイツの Hans Asperger は、類似の患者について記載し、その状態を「自閉症精神病質」と名付けた。

40

【0003】

自閉症は、これまでこの疾患を診断するための特異的生物マーカーが公知ではないことから、行動基準を使用して定義される。自閉症の臨床像は、重症度が多様であり、教育、能力および気質を含めた多くの要因によって修飾されている。さらに、個体での発達過程にわたって臨床像は変化する。自閉症は、追加的に注意欠陥障害、協調運動不能のような

50

他の障害、ならびに不安および抑うつのような精神医学症状に関連することが多い。自閉症は、てんかん障害、代謝障害および免疫障害も包含するという証拠もいくつかある。変異性の臨床的な認識と一致して、自閉症障害のスペクトルが存在するという今や一般的な合意がある。そのスペクトルは、全ての知能レベルおよび言語能レベルならびに全ての重症度に及ぶ個体を包含する。

【0004】

自閉症スペクトルの一部であるが特別な亜群とみなされているのは、アスペルガー症候群（AS）である。ASは、自閉症スペクトル障害（ASD）を特徴づける社会的相互作用の障害ならびに限定された反復性の行動、興味および活動が存在する状態で、臨床的に顕著な言語発達の遅れが欠如していることから、自閉症障害と区別される。

10

【0005】

広汎性発達障害（PPD）は、ASDの一部でもある。PPDは、自閉症に関する厳密な基準を満たさないが、非定型自閉症を表すこと、または主な領域のうち二つもしくは三つで診断基準をほぼ満たすことのいずれかで自閉症に近い小児を分類するために使用される。

【0006】

自閉症の診断を標準化するために、世界保健機関（International Classification of Diseases, 10th Revision (ICD-10), 1992）およびアメリカ精神医学会（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV), 1994）によって診断基準が定められている。自閉症診断面接（ADI）が開発された（Le Couteurら、1989 ; Lordら、1994）。ADIは、ASDの診断に利用できる唯一の診断ツールであり、標準化され、厳しく検査され、一般に承認されている。ADIは、両親に対するスコア付き半構造化面接であり、自閉症の診断のためのICD-10およびDSM-IV基準に基づいている。これは、三つの主領域での行動に焦点を当てており、それらの領域は：反復性の社会的相互作用の質、コミュニケーションと言語、ならびに限定された反復性の常同性的興味および行動である。自閉症は、これらの基準を使用してもはや稀少障害とみなされていない。Kannerの基準に基づき個体10000人あたり患者4～5人という以前に報告された有病率（FolsteinおよびRosen-Sheidley、2001）に比べて、個体10000人あたり10～12例というより高い比率がより最近の研究で報告された（GillbergおよびWing、1999）。全スペクトルの自閉症障害の有病率に関する推定値は1.5～2.5倍高い。女性に比べて男性に4倍高く発生するという報告は一貫している。ASDを有する症例の25%から40%の間に精神遅滞が存在する（Bairdら、2000 ; ChakrabartiおよびFombonne、2001）。集団の約10%に脳が関係する追加の医学的状態がみられる（GillbergおよびColeman、2000）。

20

30

【0007】

自閉症の報告症例の増加の根本となるメカニズムは知られていない。この差異が、自閉症の有病率の増加、診断基準の緩やかな変化、疾患の発現がより大きく変動しているという認識、または障害の意識の増加を反映しているかどうかは、大いに議論されている。さらに、みかけの増加が主に環境要因が原因であるという、広く知られた一般的な認識がある（Nelson、1991 ; RodierおよびHyman、1998）。しかし、有病率の増加の大部分は、診断基準の幅の広がり、これらの基準をより幅広く適用することの組み合わせによって説明できるように思われる。

40

【0008】

疾患を改善するための有効な治療があるが、利用できる療法はなく、治療の恩恵はあまり大きくない傾向にある。多様な行動戦略および発達戦略を利用するいくつかのプログラムに対して有望な結果が得られた。最も有望なものの中には、応用行動分析（ABA）に基づくプログラムがある。いくつかの投薬は、自閉症に関連する多様な症状を改善することによって、個体が教育的および行動的介入から恩恵を受ける能力を高めるようであった。最も広く研究された薬剤は、ドーパミンアンタゴニストである。いくつかの研究は、多様な選択的セロトニン再取込みインヒビターの有用性を示唆している。

50

【0009】

自閉症の遺伝率を推定するために双生児の研究三つが行われた (FolsteinおよびRutter、1977; Baileyら、1995; Steffenburgら、1989)。地理的に規定された集団中で生活する全ての双生児が探し出された。組合わせたデータの中で一卵性双生児 (MZ) 36人および二卵性双生児 (DZ) 30人が研究された。DZの平均合致率が0%であるのに比べ、MZでは70%である。MZからDZへの合致率および約2%~4%と推定された同胞再発リスクから、90%を超える遺伝率が計算された (Jorde et al., 1991; Szatmari et al., 1998)。非自閉症親族の研究から、対照の両親よりも自閉症の小児の両親で、人づきあいにおける無口、コミュニケーション困難、常同行為の嗜好および変化困難を含めたASDのいくつかの特徴がより高頻度にみられることがはっきりと示された (FolsteinおよびRutter、1977)。反復性の抑うつ、不安障害、血小板セロトニンの上昇および頭囲の増加と同様に、話し始めの遅れおよび読解困難も自閉症を有する個体の家族に共通していることが多い (FolsteinおよびRosen-Sheidley、2001)。

10

【0010】

自閉症の発生率は、罹患した個体との血縁度が減少するにつれて低下する。これは、単一遺伝子モデルで自閉症の大部分の症例を説明できそうにないことを示している (Jordeら、1990)。報告された分離比分析は、ポリジーンモードの遺伝と最もよく一致した (Jordeら、1991) 最も儉約した遺伝子モデルは、いくつかの遺伝子が互いに相互作用して自閉症の表現型を生成するというものである (FolsteinおよびRosen-Sheidley、2001)。

【0011】

かなりの間接的な証拠が、自閉症に自己免疫が役割を果たしている可能性を示した。ある研究は、対照発端者にくらべ自閉症発端者を有する家族には自己免疫疾患を有する家系員が多いことを発見した (Comiら、1999)。2、3の報告は、自閉症を有する数人の小児またはその母親に存在する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 遺伝子座のハプロタイプが自閉症の小児に自己免疫の素因を与えているおそれがあると報告した (BurgerおよびWarren、1998)。二つの研究では、ミエリン塩基性タンパク質、ニューロフィラメントタンパク質および血管上皮を含めたある脳組織およびタンパク質に対する自己抗体が、対照に比べて自閉症の小児により多くみられた (Singhら、1993; Connollyら、1999; Weizmanら、1982)。

20

【0012】

大部分の自閉症の症例は、オリゴジーン性およびエピスタシスという提案されたメカニズムと一致するが、少数は染色体の異常および特異的原因を有する障害に関連してみられた。Smalley (1997) は、自閉症の症例の約15~37%が、公知の遺伝障害または染色体の異常を伴う5~14%を含めた共存する医学的状態を有すると述べた。ほぼ全てのヒト染色体が関係する染色体異常が報告されている。これらには、常染色体異数体、性染色体異常、欠失、重複、転座、環状染色体、逆位およびマーカー染色体がある (Gillberg、1998)。最もよくみられるのは、第15染色体上のプラダーウィリ/アンゲルマン症候群領域の異常である。自閉症とメンデル状態または遺伝症候群との関連には、未治療のフェニルケトン尿症、脆弱X症候群、結節性硬化症および神経線維腫症がある。最近、Carneyら (2003) は、レット症候群の出現を有さない、自閉症を有する女性2人からMECP2 (メチルCpG結合タンパク質2) 遺伝子の突然変異を同定した。レット症候群は、80%の症例でMECP2遺伝子における突然変異によって引き起こされる。

30

40

【0013】

種々のグループが、自閉症またはASDのより広い表現型に関するゲノムスキャンを実施している。この取組みは、体系的でありモデルが不要という両方の理由から非常に有望と思われる。さらに、この取組みがうまくいくことは、すでに示されている。このように、比較的小さな研究群を分析しても正の連鎖という結果が得られた。さらに重要なことには、いくつかの研究結果がすでに反復されている。最も一貫する結果は、染色体7qについて得られたが、染色体2qおよび16pにもかなりの重複がある (FolsteinおよびRosen-Sheidley、2001)。染色体領域の同定でのかなりの進歩が、第15染色体およびX染色

50

体にもなされた。ニューロリジン (neuroigin) N L G N 3 および N L G N 4 をコードする 2 つの X 連鎖遺伝子における突然変異が、自閉症スペクトル障害を有する同胞から同定された (Jamainら、2003)。いくつかの証拠は、ニューロリジンにおける突然変異が自閉症障害に関与しているという事実を支持している。第一に、報告された突然変異は、予測されたタンパク質構造の激しい変異を引き起こす。第二に、N L G N 4 を含む X p 2 2 . 3 での欠失が数人の自閉症の小児に報告されている。第三に、N L G N 4 での突然変異が罹患した個体の母親 1 人に新たに出現した。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

10

本発明は、今やヒト自閉症感受性遺伝子の同定を開示し、その遺伝子は、自閉症および関連障害の診断、予防および治療に、ならびに治療学的活性薬物のスクリーニングに使用できる。本発明は、さらに具体的には第 5 染色体上の S L C 6 A 7 遺伝子のある対立遺伝子が自閉症に対する感受性に関係し、治療的介入のための新規な標的となることを実証している。C A M K 2 のような S L C 6 A 7 の活性の調節に関与する任意の遺伝子またはタンパク質も、自閉症および関連障害に対する治療的介入のための新規な標的となる。

【0015】

本発明は、さらに具体的には自閉症に対する感受性に関係し治療的介入のための新規な標的となる溶質キャリアファミリー 6 (神経伝達物質輸送体、L-プロリン)メンバー 7、言い換えると脳特異的 L-プロリン輸送体 (S L C 6 A 7) 遺伝子のある対立遺伝子を

20

【0016】

開示する。本発明は、S L C 6 A 7 遺伝子および発現生成物における特定の突然変異、ならびにこれらの突然変異に基づく診断ツールおよびキットに関するものである。

自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の素因の診断または防御、検出、予防および/または治療に本発明を使用でき、その方法は、対象の試料から S L C 6 A 7 遺伝子またはポリペプチドにおける変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の存在または素因を示す。該変異の存在は、自閉症からの防御も示しうる。

【0017】

本発明の特定の目的は、対照における自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の存在または素因を検出する方法にあり、その方法は、対象の試料から S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の存在または素因を示す。

30

【0018】

本発明の追加的な特定の目的は、対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害からの防御を検出する方法にあり、その方法は、対象の試料から S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害からの防御を示す。

【0019】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の治療に対する対象の反応を評価する方法にあり、その方法は、対象の試料中から S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、該治療に対する特定の反応を示す。

40

【0020】

本発明のさらなる特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の治療に対する対象における有害作用を評価する方法にあり、その方法は、対象の試料から S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、該治療に対する有害効果を示す。

【0021】

本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害を予防

50

するための方法にも関するものであり、その方法は、対象の試料中から S L C 6 A 7 遺伝子座における変異の存在を検出すること、および自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害に対する予防的治療を投与することを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害に対する素因を示す。

【 0 0 2 2 】

本発明は、患者の S L C 6 A 7 遺伝子座における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害に関連する変異のスクリーニングにさらに関するものである。そのようなスクリーニングは、自閉症、自閉症スペクトルおよび関連障害の存在、リスクもしくは素因を診断するために、ならびに / またはそのような障害の治療の効果を評価するために有用である。

【 0 0 2 3 】

好ましい態様において、該変異は、自閉症に関連する 1 つまたは数個の S N P または S N P の一ハプロタイプである。より好ましくは、自閉症に関連する該ハプロタイプは、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8 および S N P 1 0 からなる群より選択される数個の S N P を含むか、またはそれらからなる。尚より好ましくは、該ハプロタイプは、表 4 および 5 に開示されるハプロタイプより選択される。より好ましくは、自閉症に関連する該 S N P は、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8 および S N P 1 0 でありうる。

10

【 0 0 2 4 】

好ましくは、S L C 6 A 7 遺伝子座における変異は、ハイブリダイゼーションアッセイ、シーケンシングアッセイ、マイクロシーケンシングアッセイ、または対立遺伝子特異的増幅アッセイを行うことによって決定される。

20

【 0 0 2 5 】

本発明の特定の局面は、S L C 6 A 7 遺伝子を含むゲノム領域から自閉症に関連する少なくとも 1 つの S N P もしくはハプロタイプ、またはそれらの組み合わせを特異的に検出するように設計されたプライマー、プローブ、および / またはオリゴヌクレオチドを含む物質の組成物にある。より好ましくは、自閉症に関連する該ハプロタイプは、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8 および S N P 1 0 からなる群より選択される数個の S N P を含むか、またはそれらからなる。尚より好ましくは、該ハプロタイプは、表 4 および 5 に開示されるハプロタイプより選択される。より好ましくは、自閉症に関連する該 S N P は、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8 および S N P 1 0 でありうる。

【 0 0 2 6 】

本発明は、S L C 6 A 7 の発現または活性のモジュレーションにより、対象における自閉症、自閉症スペクトルおよび / または関連障害を治療する方法にもある。そのような治療は、例えば S L C 6 A 7 ポリペプチド、(S L C 6 A 7 遺伝子座に向けたアンチセンス配列を含めた) S L C 6 A 7 D N A 配列、抗 S L C 6 A 7 抗体または S L C 6 A 7 の発現もしくは活性をモジュレートする薬物を使用する。

30

【 0 0 2 7 】

本発明は、遺伝子療法、タンパク質置換療法によるような、または S L C 6 A 7 タンパク質の模倣体および / またはインヒビターの投与によるような発症前治療または併用療法を含めた、S L C 6 A 7 遺伝子の有害対立遺伝子を有する個体を治療する方法にも関するものである。

40

【 0 0 2 8 】

本発明のさらなる局面は、自閉症、自閉症スペクトル障害もしくは関連障害に関連する S L C 6 A 7 遺伝子の対立遺伝子、またはその遺伝子生成物のモジュレーションまたはそれとの結合に基づく、自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の治療法のための薬物のスクリーニングにある。

【 0 0 2 9 】

本発明の追加の局面は、S L C 6 A 7 の活性の調節に関与する任意の遺伝子またはタンパク質、好ましくは C A M K 2 のモジュレーションまたはそれとの結合に基づく、自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の治療法のための薬物のスクリーニングにある。

【 0 0 3 0 】

50

本発明のさらなる局面は、変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的の抗体、そのような抗体のフラグメントおよび誘導体、そのような抗体を分泌するハイブリドーマ、ならびにそれらの抗体を含む診断キットを含む。より好ましくは該抗体は、変異を含む S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的であり、該変異は S L C 6 A 7 の活性を修飾する。

【 0 0 3 1 】

本発明は、変異を含む S L C 6 A 7 遺伝子またはそのフラグメントにも関するものであり、該変異は S L C 6 A 7 の活性を修飾する。本発明はさらに、変異を含む S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそのフラグメントに関するものであり、該変異は S L C 6 A 7 の活性を修飾する。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 2 】

本発明は、ヒト自閉症感受性遺伝子としての S L C 6 A 7 の同定を開示する。自閉症を有する 1 1 4 家族からの多様な核酸試料に特定の GenomeHIP プロセスを受けさせた。このプロセスは、自閉症の対象において変異している、該集団中の特定の同祖 (identical-by-descent) フラグメントの同定をもたらした。我々は、すぐ隣の領域を含めた I B D フラグメントのスクリーニングによって、自閉症および関連表現型に対する候補として染色体 5 q 3 1 ~ 3 2 遺伝子上の溶質キャリアファミリー 6 (神経伝達物質輸送体、L-プロリン) メンバー 7 (S L C 6 A 7) を同定した。この遺伝子は、その区間に実際に存在し、自閉症の遺伝的調節に一致する機能的表現型を発現する。

20

【 0 0 3 3 】

このように本発明は、自閉症、自閉症スペクトルおよび関連障害の診断、予防および治療のために、ならびに治療学的活性薬物のスクリーニングのために、S L C 6 A 7 遺伝子ならびに対応する発現生成物を使用することを提案する。

【 0 0 3 4 】

定義

自閉症および自閉症スペクトル障害 (A S D) : 自閉症は、アスペルガー症候群 (A S) および他の広汎性発達障害 (P P D) を含めた障害のスペクトル (A S D) の一部として典型的には特徴づけられる。健康障害のおそれがある範囲で 3 歳以前に存在する限定された反復性および常同パターンの行動、興味および活動を伴う社会的相互作用およびコミュニケーションの障害の任意の状態として、自閉症を解釈するものとする。A S は、自閉症スペクトル障害 (A S D) を特徴づける社会的相互作用の障害および限定された反復性の行動、興味、および活動が存在する状態で、言語の発達の臨床的に有意な遅れが欠如していることから自閉症障害と区別される。P P D は、自閉症の厳密な基準を満たさないが、非定型自閉症が現れること、または主な領域のうち二つまたは三つで診断基準をほぼ満たすことのいずれかで自閉症に近い小児を分類するために使用される。

30

【 0 0 3 5 】

自閉症に関連する障害、疾患または病理には、さらに具体的には任意の代謝および免疫障害、てんかん、不安、抑うつ、注意欠陥多動障害、言語の遅れおよび協調運動不能がある。

40

【 0 0 3 6 】

多様な対象、特に成人、小児および出生前段階を含めたヒトに本発明を使用できる。

【 0 0 3 7 】

本発明に関連して S L C 6 A 7 遺伝子座は、細胞または生物における全ての S L C 6 A 7 配列または生成物を表し、それらには S L C 6 A 7 コード配列、S L C 6 A 7 非コード配列 (例えばイントロン)、転写および / または翻訳を制御している S L C 6 A 7 調節配列 (例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど)、ならびに S L C 6 A 7 R N A (例えば m R N A) および S L C 6 A 7 ポリペプチド (例えばプレタンパク質および成熟タンパク質) のような全ての対応する発現生成物がある。S L C 6 A 7 遺伝子座は、S L C 6 A 7 遺伝子に位置する S N P と連鎖不平衡にある S N P を含めた S L C 6 A

50

7 遺伝子の周辺配列も含む。例えば、S L C 6 A 7 遺伝子座は、S N P 3、S N P 4、S N P 5 および S N P 1 4 を含む周辺配列を含む。

【0038】

本出願に使用するように用語「S L C 6 A 7 遺伝子」は、ヒト第5染色体上の溶質キャリアファミリー6（神経伝達物質輸送体、L-プロリン）メンバー7または脳特異的L-プロリン輸送体遺伝子、ならびにその対立遺伝子（例えば生殖細胞系突然変異）を含めたその変異体、アナログおよびフラグメントを表し、それらは、自閉症、自閉症スペクトル障害および自閉症関連障害に対する感受性に関係する。S L C 6 A 7 遺伝子はP R O T と称されることもある。

【0039】

用語「遺伝子」は、ゲノムDNA（gDNA）、相補DNA（cDNA）、合成または半合成DNAを含めた任意の種類のコッド核酸、ならびに任意の形の対応するRNAを含むと解釈するものとする。用語、遺伝子は、特にS L C 6 A 7 をコードする組換え核酸、すなわち例えば配列を集合、切断、連結または増幅することによって人工的に創造された任意の非天然核酸分子を含む。S L C 6 A 7 遺伝子は、典型的には二本鎖であるが、一本鎖のような他の形を考えてもよい。多様な供給源から当技術分野において公知の多様な手法に従って、例えばDNAライブラリーのスクリーニングまたは多様な天然起源からの増幅によって、S L C 6 A 7 遺伝子を得ることができる。化学合成、遺伝子工学、酵素法またはそれらの組み合わせを含めた通常的手法によって組換え核酸を調製できる。適切なS L C 6 A 7 遺伝子配列をS L C 6 A 7 に関するUnigene Cluster（Hs.241597）またはNCBI参照配列（NM_014228）のような遺伝子バンクから見出すことができる。S L C 6 A 7 遺伝子の特定の例は、配列番号：1を含む。

10

20

【0040】

用語「S L C 6 A 7 遺伝子」は、配列番号：1または前記同定された任意のコッド配列の任意の変異体、フラグメントまたはアナログを含む。そのような変異体には、例えば個体間の対立遺伝子の変異性（例えば多型）が原因の天然変異体、自閉症に関係する突然変異対立遺伝子、オルタナティブスプライシング形などがある。用語、変異体は、他の供給源または生物からのS L C 6 A 7 遺伝子配列も含む。変異体は、好ましくは配列番号：1と実質的に均一であり、すなわち配列番号：1と少なくとも約65%、典型的には少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約95%のヌクレオチド配列同一性を示す。S L C 6 A 7 遺伝子の変異体およびアナログは、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件で上に定義するような配列（またはその相補鎖）とハイブリダイズする核酸配列も含む。

30

【0041】

典型的なストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、30 を超える、好ましくは35 を超える、より好ましくは42 を上回る温度、および/または約500mM未満、好ましくは200mM未満の塩分を含む。当業者は、温度、塩分および/またはSDS、SSCなどのような他の試薬の濃度を修飾することによってハイブリダイゼーション条件を調整できる。

【0042】

S L C 6 A 7 遺伝子のフラグメントは、上記に開示するような配列の少なくとも約8個の連続するヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15個、より好ましくは少なくとも約20個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約30個のヌクレオチドの任意の部分を表す。フラグメントは、8から100個のヌクレオチドの間、好ましくは15から100個の間、より好ましくは20から100個の間の全ての可能なヌクレオチド長を含む。

40

【0043】

S L C 6 A 7 ポリペプチドは、上記に開示するようなS L C 6 A 7 遺伝子によってコードされる任意のタンパク質またはポリペプチドを表す。用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のストレッチを含む任意の分子を指す。この用語は、ペプチドおよびタンパク質のような多様な長さの分子を含む。例えばグリコシル化および/またはアセチル化および/また

50

は化学反応もしくはカップリングによりそのポリペプチドを修飾できるし、そのポリペプチドは、一つまたは数個の非天然または合成アミノ酸を含有しうる。SLC6A7ポリペプチドの特定の例は、配列番号：2の全てまたは一部を含む。

【0044】

本出願に使用するように、用語「CAMK2A遺伝子」は、ヒト第5染色体上のカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKキナーゼ)IIアルファ遺伝子、ならびにその変異体、アナログおよびフラグメントを表す。CAMK2A遺伝子は、CAMKA、KIAA0968とも称されることがある。用語「遺伝子」は、ゲノムDNA(gDNA)、相補DNA(cDNA)、合成または半合成DNAを含めた任意の種類のコード核酸、ならびに任意の形の対応するRNAを含むと解釈するものとする。用語、遺伝子は、CAMK2Aをコードする組換え核酸、すなわち例えば配列を集合、切断、連結または増幅することにより人工的に創造された任意の非天然核酸分子を特に含む。CAMK2A遺伝子は、典型的には二本鎖であるが、一本鎖のような他の形を考えてもよい。多様な供給源から当技術分野において公知の多様な手法に従って、例えばDNAライブラリーのスクリーニングまたは多様な天然供給源からの増幅によって、CAMK2A遺伝子を得ることができる。化学合成、遺伝子工学、酵素法またはそれらの組み合わせを含めた通常的手法によって組換え核酸を調製できる。適切なCAMK2A遺伝子配列をCAMK2Aに関するUnigene Cluster(Hs.143535)またはNCBI参照配列(NM_015981およびNM_171825)のような遺伝子バンクから見出すことができる。

10

【0045】

CAMK2A遺伝子のフラグメントは、上記に開示されるような配列の少なくとも約8個の連続するヌクレオチド、好ましくは少なくとも約15個、より好ましくは少なくとも約20個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも30個のヌクレオチドの任意の部分を表す。フラグメントは、8から100個のヌクレオチドの間、好ましくは15から100個の間、より好ましくは20から100個の間の全ての可能なヌクレオチド長を含む。

20

【0046】

CAMK2Aポリペプチドは、上記に開示されるCAMK2A遺伝子によってコードされる任意のタンパク質またはポリペプチドを表す。用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のストレッチを含む任意の分子を指す。この用語は、ペプチドおよびタンパク質のような多様な長さの分子を含む。例えばグリコシル化および/またはアセチル化および/または化学反応もしくはカップリングによってそのポリペプチドを修飾できるし、そのポリペプチドは、一つまたは数個の非天然または合成アミノ酸を含有しうる。CAMK2Aポリペプチドの特定の例は、配列NP_057065またはその変異体の全てもしくは一部を含む。

30

【0047】

用語「治療に対する反応」は、個体での治療用化合物を代謝する能力、プロドラッグを活性薬物に変換する能力、ならびに薬物の薬物動力学(吸収、分布、排泄)および薬力学(受容体関連)を含むがそれに限定されるわけではない治療の効能を指す。

【0048】

用語「治療の有害作用」は、薬物の主薬理作用の広がり起因する治療法の有害作用、または薬物と独特の宿主要因との相互作用に起因する特異体質有害反応を指す。「治療に対する副作用」には、皮膚毒性、血液毒性または肝毒性のような有害反応を含むがそれに限定されるわけではなく、さらに胃潰瘍および腸潰瘍形成、血小板機能の攪乱、腎損傷、全身じんま疹、気管支収縮、低血圧症、ならびにショックがある。

40

【0049】**診断**

本発明は、今や対象におけるSLC6A7遺伝子座の監視に基づく診断方法を提供する。本発明に関連して、用語「診断」は、成人、小児および出生前における早期、発症前の時期、および後期を含めた多様な時期での検出、監視、投薬、比較などを含む。診断には、典型的には予後、素因または発達リスクの評価、最も適切な治療(薬理遺伝学)を定め

50

るための対象のキャラクタリゼーションなどがある。

【0050】

本発明の特定の目的は、対象における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の存在または素因を検出する方法にあり、その方法は、対象の試料から該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在を検出することを含む。該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の存在または素因を示す。好ましくは該変異は、その遺伝子中のSNPまたはそれらの組合わせからなる群より選択される。場合により該方法は、対象の試料を提供するという先行する段階を含む。好ましくは該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在は、試料の遺伝子型決定により検出される。

【0051】

本発明の別の特定の目的は、対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害からの防御を検出する方法にあり、その方法は、対象の試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在を検出することを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害からの防御を示す。

【0052】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の治療に対する対象の反応を評価する方法にあり、その方法は、対象の試料から該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在を検出することを含む。該変異の存在は、該治療に対する特定の反応を示す。好ましくは該変異は、その遺伝子中のSNPまたはそれらの組合わせからなる群より選択される。場合により該方法は、対象から試料を提供するという先行する段階を含む。好ましくは、該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在は、試料の遺伝子型を決定することにより検出される。

【0053】

本発明のさらなる特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の治療に対する対象の有害作用を評価する方法にあり、その方法は、対象の試料から該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在を検出することを含む。該変異の存在は、該治療に対する有害効果を示す。好ましくは該試料中のSLC6A7遺伝子座における変異の存在は、試料の遺伝子型を決定することにより検出される。

【0054】

追加の態様において本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害を予防するための方法に関するものであり、その方法は、対象の試料からSLC6A7遺伝子座における変異の存在を検出すること、および自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害に対する予防的治療を施すことを含み、該変異の存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害の素因を示す。該予防的治療は薬物投与でありうる。

【0055】

本発明の診断/検出方法において、SLC6A7遺伝子座における任意の変異を、他の任意の遺伝子またはタンパク質における他の変異のような他のマーカーと組合わせて評価してもよい。

【0056】

個体を特定の治療薬で治療すべきかどうかを決定するために、治療もしくは薬物に対する反応、または治療もしくは薬物に対する副作用を分析し予測する診断学を使用できる。例えば、もしも個体が特定の薬物を用いた治療に対して正の反応をするという公算を診断が示すならば、その薬物をその個体に投与できる。逆にもしも個体が特定の薬物を用いた治療に対して負の反応をする公算を診断が示すならば、代替の治療クールを処方できる。有効な反応の不在または有毒副作用の存在のいずれかとして負の反応を定義できる。

【0057】

薬物の臨床試験は、本発明に関する別の適用となる。薬物に対する反応または薬物に対する副作用を示す1つまたは複数のSLC6A7 SNPを、上記の方法を使用して同定できる。その後、そのような薬剤の臨床試験への潜在的参加者をスクリーニングして、そ

10

20

30

40

50

の薬物に対して有利に反応する公算が最も高い個体を同定し、副作用を経験する公算を示す参加者を除外できる。このように、正の反応をしそうにない個体を研究に算入する結果として、測定を低下させることなく、かつ望ましくない安全性の問題のリスクを冒すことなく、薬物に正の反応をする個体から薬物治療の有効性を測定できる。

【0058】

S L C 6 A 7 の g D N A、R N A またはポリペプチドのレベルで変異を決定できる。場合により S L C 6 A 7 遺伝子の全てもしくは一部の配列決定によって、または S L C 6 A 7 遺伝子の全てもしくは一部の選択的ハイブリダイゼーションもしくは増幅によって検出は行われる。より好ましくは、変異を同定する段階の前に S L C 6 A 7 遺伝子に特異的な増幅を実施する。

10

【0059】

S L C 6 A 7 遺伝子座における変異は、その遺伝子座のコード領域および/または非コード領域における単独または多様な組み合わせでの任意の形の突然変異、欠失、再配列、および/または挿入でありうる。突然変異は、さらに具体的には点突然変異を含む。欠失は、2つの残基から遺伝子または遺伝子座全体までのような遺伝子座のコード部分または非コード部分における2つ以上の残基の任意の領域を包含しうる。典型的な欠失は、約50個未満の連続する塩基対のドメイン(イントロン)または繰り返し配列またはフラグメントのような比較的小さな領域に影響するが、同様に比較的大きな欠失も生じうる。挿入は、遺伝子座のコード部分または非コード部分における一つまたは数個の残基の付加を包含しうる。挿入は、典型的には遺伝子座への1から50個の間の塩基対の付加を含みうる。再配列は、配列の逆位を含む。S L C 6 A 7 遺伝子座の変異の結果、停止コドンの創造、フレームシフト突然変異、アミノ酸置換、R N A の特定スプライシングまたはプロセッシング、生成物の不安定性、短縮ポリペプチドの生成などがもたらされることがある。その変異の結果、変異した機能、安定性、ターゲティングまたは構造を有する S L C 6 A 7 ポリペプチドの生成がもたらされることがある。その変異は、タンパク質発現の減少、またはその代わりに該生成の増加も引き起こすことがある。

20

【0060】

本発明による方法の特定の態様において、S L C 6 A 7 遺伝子座における変異は、S L C 6 A 7 遺伝子または対応する発現生成物における点突然変異、欠失および挿入より、より好ましくは点突然変異および欠失より選択される。その変異は、S L C 6 A 7 の g D N A、R N A またはポリペプチドのレベルで決定されうる。

30

【0061】

これに関して本発明は、S L C 6 A 7 遺伝子およびあるハプロタイプにおける S N P を今や開示し、その S N P には、自閉症に関連する S N P 3、S N P 4、S N P 5、S N P 6、S N P 7、S N P 8、S N P 9、S N P 10、S N P 12 および S N P 14 からなる群より選択される S N P がある。S N P を以下の表1に報告する。

【0062】

【表 1】

表 1

第 5 染色体のゲノム配列(Build34)におけるヌクレオチド位置	SNP の同一性	dbSNP の参照	多型	遺伝子座における位置およびアミノ酸変化の型	配列番号 1 における位置
149023175	SNP3	rs1531236	C/T	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149037031	SNP4	rs3733660, rs1135093	A/G	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149594018	SNP5	rs6890699	C/G	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149598218	SNP6	rs3764886	A/G	5' UTR	289
149599057	SNP7	rs758590	C/T	イントロン	1128
149601459	SNP8	rs917585	C/G	イントロン	3530
149604212	SNP9	rs2240784	C/T	イントロン	5421
149606429	SNP10	rs758593	A/G	イントロン	8500
149613943	SNP12	rs3815375	A/G	イントロン	16014
149659923	SNP14	rs2288799	A/G	SLC6A7 遺伝子座の 3'	

10

20

【 0 0 6 3 】

好ましい態様においてその変異は、自閉症に関連する一つもしくは数個の SNP または SNP の一ハプロタイプである。より好ましくは、自閉症に関連する該ハプロタイプは、SNP 5、SNP 6、SNP 7、SNP 8 および SNP 10 からなる群より選択される数個の SNP を含むか、またはそれらからなる。尚より好ましくは、該ハプロタイプは、表 4 および表 5 に開示されるハプロタイプから選択される。より好ましくは、自閉症に関連する該 SNP は、SNP 5、SNP 6、SNP 7、SNP 8 および SNP 10 でありうる。

30

【 0 0 6 4 】

好ましくは S L C 6 A 7 遺伝子座における変異は、ハイブリダイゼーションアッセイ、シーケンシングアッセイ、マイクロシーケンシングアッセイ、または対立遺伝子特異的増幅アッセイを行うことによって決定される。

【 0 0 6 5 】

本発明による任意の方法において、S L C 6 A 7 遺伝子中の 1 つまたは数個の SNP および S L C 6 A 7 遺伝子中の SNP、さらに詳細には SNP 5、SNP 6、SNP 7、SNP 8 および SNP 10 を含むあるハプロタイプを、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害に関連する他の SNP またはハプロタイプと組合わせて使用できる。これらの SNP を他の遺伝子に局在する SNP とも組合わせることができる。

40

【 0 0 6 6 】

第一の変形において本発明の方法は、変異した S L C 6 A 7 遺伝子配列の存在を検出することを含む。例えば選択的ハイブリダイゼーションまたは選択的増幅により S L C 6 A 7 遺伝子、ポリペプチドまたは RNA の全てまたは一部を配列決定することによって、これを行うことができる。

【 0 0 6 7 】

より具体的な態様は、対象の S L C 6 A 7 遺伝子配列中の少なくとも一つの SNP またはそれらの任意の組合わせの存在を検出することを含む。

【 0 0 6 8 】

50

別の変形において本方法は、変異した S L C 6 A 7 R N A の発現の存在を検出することを含む。変異した R N A の発現には、変異した R N A 配列の存在、変異した R N A スプライシングまたはプロセシングの存在、変異した量の R N A の存在などがある。例えば S L C 6 A 7 R N A の全てまたは一部を配列決定すること、または該 R N A の全てまたは一部の選択的ハイブリダイゼーションもしくは選択的増幅を含めた当技術分野で公知である多様な手法によって、これらを検出できる。

【0069】

さらなる変形において本方法は、変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドの発現の存在を検出することを含む。変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドの発現には、変異したポリペプチド配列の存在、変異した量の S L C 6 A 7 ポリペプチドの存在、変異した組織分布の存在などがある。例えば配列決定および/または(抗体のような)特異的リガンドとの結合を含めた当技術分野で公知の多様な手法によって、これらを検出できる。

10

【0070】

上に述べたように、シーケンシング、ハイブリダイゼーション、増幅および/または(抗体のような)特異的リガンドとの結合を含めた当技術分野で公知の多様な手法を、変異した S L C 6 A 7 の遺伝子または R N A の発現または配列を検出または定量するために使用できる。他の適切な方法には、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(A S O)、対立遺伝子特異的増幅、(D N A に対する)サザンプロット、(R N A に対する)ノーザンプロット、一本鎖コンホメーション分析(S S C A)、P F G E、蛍光インジツハイブリダイゼーション(F I S H)、ゲル泳動、固定変性ゲル電気泳動、ヘテロ二本鎖分析、R N A アーゼプロテクション、化学的ミスマッチ開裂、E L I S A、ラジオイムノアッセイ(R I A)および免疫酵素アッセイ(I E M A)がある。

20

【0071】

これらの取組みのいくつか(例えば S S C A および C G G E)は、変異した配列の存在の結果としての核酸の電気泳動移動度の変化に基づく。これらの手法により、変異した配列はゲル上の移動度の偏位によって可視化される。次に、そのフラグメントを配列決定して変異を確認できる。

【0072】

他のいくつかは、対象の核酸と、野生型または変異した S L C 6 A 7 の遺伝子または R N A に特異的なプローブとの間の特異的ハイブリダイゼーションに基づく。そのプローブは、懸濁状態であっても基板に固定化されていてもよい。そのプローブは、ハイブリッドの検出を可能にするために典型的には標識されている。

30

【0073】

これらの取組みのいくつかは、ノーザンプロット、E L I S A および R N A のようなポリペプチド配列または発現レベルを評価するために特に適している。これら後者は、ポリペプチドに特異的なリガンド、より好ましくは特異的抗体の使用を必要とする。

【0074】

特定の好ましい態様においてその方法は、対象の試料中の変異した S L C 6 A 7 遺伝子発現プロファイルの存在を検出することを含む。上に述べたように、より好ましくは該試料中に存在する核酸の配列決定、選択的ハイブリダイゼーションおよび/または選択的増幅によってこれを果たすことができる。

40

【0075】

配列決定

自動シーケンサーを使用して当技術分野で周知の手法を使用して配列決定を実施できる。完全な S L C 6 A 7 遺伝子、またはより好ましくはその特異的ドメイン、典型的には有害な突然変異もしくは他の変異を有することが公知であるか、またはそう疑われるドメインについて配列決定を行うことができる。

【0076】

増幅

増幅は、核酸の再生成を開始するように働く相補核酸配列の間での特異的ハイブリッド

50

の形成に基づく。

【0077】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）および核酸配列増幅（NASBA）のような当技術分野で公知の多様な手法により増幅を行える。これらの手法を商業的に入手できる試薬およびプロトコルを使用して行える。好ましい手法は、対立遺伝子特異的PCRまたはPCR-SSCPを使用する。増幅は、普通は反応の開始に特異的核酸プライマーの使用を必要とする。

【0078】

SLC6A7 遺伝子または遺伝子座からの配列を増幅するために有用な核酸プライマーは、SLC6A7 遺伝子座の標的領域に隣接する該遺伝子座の部分と特異的にハイブリダイズでき、該標的領域は、自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害を有するある対象では変異している。

10

【0079】

SLC6A7 標的領域を増幅するために使用できるプライマーを、SLC6A7 のゲノムまたはRNA配列、特に配列番号：1の配列に基づいて設計できる。

【0080】

本発明の別の特定の目的は、周辺領域を含めたSLC6A7 遺伝子または遺伝子座から配列を増幅するために有用な核酸プライマーにある。そのようなプライマーは、SLC6A7 遺伝子座中の核酸配列に好ましくは相補性であり、それと特異的にハイブリダイズする。特定のプライマーは、SLC6A7 遺伝子座の標的領域に隣接する該遺伝子座の部分と特異的にハイブリダイズでき、該標的領域は、自閉症、自閉症スペクトル障害、または自閉症関連障害を有するある対象では変異されている。

20

【0081】

本発明は、核酸プライマーにも関するものであり、該プライマーは、自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害を有するある対象では変異したSLC6A7 コード配列（例えば遺伝子またはRNA）の部分に相補性であり、それと特異的にハイブリダイズする。これに関して、本発明の特定のプライマーは、SLC6A7 遺伝子またはRNA中の変異した配列に特異的である。そのようなプライマーを使用することによって、増幅生成物が検出されることは、SLC6A7 遺伝子座に変異が存在することを示す。対照的に増幅生成物の不在であることは、試料中に特異的変異が存在しないことを示す。

30

【0082】

本発明の典型的なプライマーは、長さ約5～60個のヌクレオチド、より好ましくは長さ約8～約25個のヌクレオチドの一本鎖核酸分子である。SLC6A7 遺伝子座の配列から配列を直接得ることができる。高い特異性を確実にするために完全な相補性が好ましい。しかし、一定のミスマッチは許容できる。

【0083】

本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトル障害もしくは関連障害の存在もしくは素因を検出する方法、または自閉症、自閉症スペクトル障害もしくは関連障害の治療に対する対象の反応を評価する方法に、上記のような一核酸プライマーまたは一对の核酸プライマーを使用することにも関するものである。

40

【0084】

選択的ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションによる検出方法は、核酸配列の変異を検出するように働く相補核酸配列の間の特異的ハイブリッドの形成に基づく。

【0085】

特定の検出法は、野生型または変異したSLC6A7 遺伝子またはRNAに特異的な核酸プローブの使用に続く、ハイブリッドの存在の検出を伴う。プローブは、懸濁状態であっても、（核酸アレイまたはチップ法におけるような）基板または支持体上に固定化されていてもよい。プローブは、ハイブリッドの検出を促進するために典型的には標識されている。

50

【0086】

これに関して本発明の特定の態様は、対象の試料を、変異したSLC6A7遺伝子座に特異的な核酸プローブと接触させること、およびハイブリッドの形成を評価することを含む。特定の好ましい態様において本方法は、その試料を、野生型SLC6A7遺伝子座およびその多様な変異型にそれぞれ特異的なプローブのセットと同時に接触させることを含む。この態様において試料中のSLC6A7遺伝子座における多様な形の変異の存在を直接検出することが可能である。また、多様な対象からの多様な試料を並行して処理できる。

【0087】

本発明に関連してプローブは、SLC6A7遺伝子またはRNAに相補性で、それ（の標的部分）と特異的にハイブリダイゼーション可能であり、かつSLC6A7対立遺伝子に関連するポリヌクレオチド多型を検出するのに適したポリヌクレオチド配列を指す。その対立遺伝子は、自閉症、自閉症スペクトル障害もしくは関連障害の素因をもつか、またそれに関連している。プローブは、好ましくはSLC6A7の遺伝子、RNA、またはその標的部分に完全に相補性である。プローブは、典型的には長さ8～1000個の間の、例えば10～800個の間の、より好ましくは15～700個の間の、典型的には20～500個の間のヌクレオチドの一本鎖核酸を含む。より長いプローブも同様に使用できるものとする。本発明の好ましいプローブは、長さ8～500個のヌクレオチドの一本鎖核酸分子であり、その核酸分子は、変異を有するSLC6A7の遺伝子またはRNAの領域に特異的にハイブリダイズできる。

10

20

【0088】

本発明の特定の態様は、変異した（例えば突然変異した）SLC6A7の遺伝子またはRNAに特異的な核酸プローブ、すなわち変異した該SLC6A7の遺伝子またはRNAに特異的にハイブリダイズし、該変異を欠くSLC6A7遺伝子またはRNAと本質的にハイブリダイズしない核酸プローブである。特異性は、標的配列とのハイブリダイゼーションが非特異的ハイブリダイゼーションにより発生したシグナルと区別できる特異的シグナルを発生することを示す。完全に相補性の配列は、本発明によるプローブを設計するのに好ましい。しかし、特異的シグナルを非特異的ハイブリダイゼーションと区別できる限り、一定のミスマッチは許容できるものとする。

【0089】

そのようなプローブの特定の例は、上記の表1に挙げるような点突然変異を有するSLC6A7の遺伝子またはRNAの標的部分に相補性の核酸配列である。さらに詳細にはプローブは、SNPを含む配列番号：3～12もしくはそれらのフラグメント、またはそれらの相補配列からなる群より選択される配列を含みうる。

30

【0090】

本出願に提供するように、プローブの配列をSLC6A7の遺伝子およびRNAの配列から得ることができる。ヌクレオチド置換およびプローブの化学修飾を行ってもよい。ハイブリッド（例えば介在基）の安定性を増加させるために、またはプローブを標識するために、そのような化学修飾を果たすことができる。標識の典型的な例には、放射能、蛍光、ルミネセンス、酵素標識などがあるが、それに限定されるわけではない。

40

【0091】

本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトルもしくは関連障害の存在を検出する方法、または自閉症、自閉症スペクトルもしくは関連障害の治療に対する対象の反応を評価する方法に上記のような核酸プローブを使用することにも関するものである。

【0092】

特異的リガンドの結合

以上に述べたように、SLC6A7のポリペプチド配列または発現レベルにおける変異をスクリーニングすることによっても、SLC6A7遺伝子座における変異を検出できる。これに関して本発明の具体的な態様は、試料をSLC6A7ポリペプチドに特異的なリガンドと接触させることおよび複合体の形成を決定することを含む。

50

【0093】

特異的抗体のような種々の種類のリガンドを使用できる。具体的な態様において試料を S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的な抗体と接触させ、免疫複合体の形成を決定する。E L I S A、ラジオイムノアッセイ (R I A) および免疫酵素アッセイ (I E M A) のような免疫複合体を検出するための多様な方法を使用できる。

【0094】

本発明に関連して抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および同様の抗原特異性を実質的に有するそのフラグメントまたは誘導体を表す。フラグメントには、F a b、F a b ' 2、C D R 部などがある。誘導体には、一本鎖抗体、ヒト化抗体、多機能性抗体などがある。

10

【0095】

S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的な抗体は、S L C 6 A 7 ポリペプチドに選択的に結合する抗体、すなわち S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそのエピトープ含有フラグメントに対して作製された抗体を表す。他の抗原に対する非特異的結合が生じるおそれがあるが、標的 S L C 6 A 7 ポリペプチドに対する結合の方が高い親和性で生じ、確実に非特異的結合と区別できる。

【0096】

具体的な態様において本方法は、対象の試料を、変異型の S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的な抗体 (をコーティングした支持体) と接触させること、および免疫複合体の存在を測定することを含む。特定の態様において、試料を同時または並行してまたは連続的に、野生型およびその多様な変異型のような S L C 6 A 7 ポリペプチドの種々の形に特異的な多様な抗体 (でコーティングされた支持体) と接触させることができる。

20

【0097】

本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトルもしくは関連障害の存在もしくは素因を検出する方法、または自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害の治療に対する対象の反応を評価する方法への、上記のようなリガンド、好ましくは抗体、そのフラグメントまたは誘導体の使用にも関するものである。

【0098】

本発明は、対象の試料から S L C 6 A 7 の遺伝子もしくはポリペプチド、S L C 6 A 7 の遺伝子またはポリペプチドの発現、および / または S L C 6 A 7 の活性における変異の存在を検出するための生成物および試薬を含む診断キットにも関するものである。本発明による該診断キットは、本発明に記載される任意のプライマー、任意のプライマー対、任意の核酸プローブおよび / または任意のリガンド、好ましくは抗体を含む。本発明による該診断キットは、ハイブリダイゼーション、増幅または抗原抗体免疫反応を行うための試薬および / またはプロトコルをさらに含む。

30

【0099】

インビトロ、エックスピボ、またはインピボで、好ましくはインビトロまたはエックスピボで診断方法を行える。それらの方法は、対象の試料を使用して S L C 6 A 7 遺伝子座の状態を評価する。試料は、核酸またはポリペプチドを含有する、対象から得られた任意の生体試料でありうる。そのような試料の例には、液体、組織、細胞試料、器官、生検などがある。最も好ましい試料は、血液、血漿、唾液、尿、精液などである。例えば胎児細胞または胎盤細胞を検査することによって出生前診断も行える。非観血的手法を含めた通常的手法により試料を採集して診断に直接使用するか保存できるし、また試料を任意の試料コレクションから得ることができる。検査のための核酸もしくはポリペプチドを入手するか、またはその入手性を改善するために、この方法を行う前に試料を処理できる。処理には、例えば溶解 (例えば機械的、物理的、化学的など)、遠心分離などがある。また、核酸および / もしくはポリペプチドを通常的手法によって予備精製もしくは濃縮でき、かつ / または複雑性を減らすことができる。核酸およびポリペプチドを酵素または他の化学処理もしくは物理処理を用いて処理してそのフラグメントを生成させることもできる。請求している方法が高い感受性であることを考慮すると、アッセイを行うには非常に少量の

40

50

試料で十分である。

【0100】

指摘したように、変異したSLC6A7遺伝子座の存在を評価するために、試料をプローブ、プライマーまたはリガンドのような試薬と好ましくは接触させる。平板、試験管、ウェル、ガラスなどのような任意の適切な装置に入れて接触を行える。具体的な態様においてその接触は、核酸アレイまたは特異的リガンドアレイのような、試薬をコーティングした基板上で行われる。基板は、ガラス、プラスチック、ナイロン、紙、金属、ポリマーなどを含む任意の支持体のような固形または半固形の基板でありうる。基板は、スライド、膜、ビーズ、カラム、ゲルなどのような多様な形および大きさでありうる。試薬と試料の核酸またはポリペプチドとの間に複合体が形成するのに適した任意の条件で接触を実施

10

【0101】

試料中に変異したSLC6A7のポリペプチド、RNAまたはDNAが見出されることは、対象に変異したSLC6A7遺伝子座が存在することを示し、その存在は、自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害の存在、素因または進行段階と相関しうる。例えば、生殖細胞系SLC6A7突然変異を有する個体は、自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害を発現するリスクの増加を有する。対象に変異したSLC6A7遺伝子座が存在すると決定することは、さらに有効で特別注文の適切な治療的介入の設計も可能にする。また、発症前のレベルでこの決定を下すことで、予防方式を適用することが可能になる。

20

【0102】

さらに以上に指摘したようにこれらの診断方法は、SLC6A7と組合わせて他の標的遺伝子またはタンパク質を使用して、アッセイまたはキットの信頼性、予測可能性または疾患スペクトルをさらに増加することもできる。

【0103】

薬物のスクリーニング

本発明は、薬物候補のスクリーニングのための新規な標的および方法も提供し、また自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害を予防または治療することをもたらす。その方法には結合アッセイおよび/または機能的アッセイがあり、インビトロ、細胞系、動物などでその方法を行える。

30

【0104】

本発明の第一の特定の目的は、生物学的活性化合物、さらに詳細には自閉症、自閉症スペクトルおよび関連障害に活性な化合物を選択する方法にあり、該方法は、インビトロで被験化合物を本発明によるSLC6A7の遺伝子またはポリペプチドと接触させること、および該被験化合物が該SLC6A7の遺伝子またはポリペプチドと結合する能力を決定することを含む。該遺伝子またはポリペプチドとの結合は、その化合物が該標的の活性をモジュレートし、よって対象における自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害に至る経路に影響する能力に関する指標を提供する。好ましい態様においてその方法は、被験化合物をインビトロで本発明によるSLC6A7のポリペプチドまたはそのフラグメントと接触させること、および該被験化合物が該SLC6A7ポリペプチドまたはフラグメントと結合する能力を決定することを含む。そのフラグメントは、好ましくはSLC6A7ポリペプチドの結合部位を含む。好ましくは、該SLC6A7の遺伝子もしくはポリペプチドまたはそのフラグメントは、変異または突然変異したSLC6A7遺伝子もしくはポリペプチドまたは変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。

40

【0105】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に対して活性な化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで本発明によるSLC6A7ポリペプチドまたは結合部位を含有するそのフラグメントと接触させること、および該被験化合物が該SLC6A7ポリペプチドまたはそのフラグメントと結合する能力を決定することを含む。好ましくは該SLC6A7ポリペプチドまたはそのフラグメン

50

トは、変異もしくは突然変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドまたは変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。

【 0 1 0 6 】

さらなる特定の態様において本方法は、本発明による S L C 6 A 7 ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を被験化合物と接触させること、および該被験化合物が該 S L C 6 A 7 と結合し S L C 6 A 7 ポリペプチドの活性をモジュレートする能力を決定することを含む。好ましくは S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそのフラグメントは、変異もしくは突然変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドまたは変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。

【 0 1 0 7 】

被験化合物を標識すること、標識した基準リガンドとの競合などのような多様な手法によって、結合の決定を行える。

【 0 1 0 8 】

本発明のさらなる目的は、生物学的活性化合物、より詳細には自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性な化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで本発明による S L C 6 A 7 ポリペプチドと接触させること、および該被験化合物が該 S L C 6 A 7 ポリペプチドの活性をモジュレートする能力を決定することを含む。好ましくは該 S L C 6 A 7 ポリペプチドまたはそのフラグメントは、変異もしくは突然変異した S L C 6 A 7 ポリペプチドまたは変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。

【 0 1 0 9 】

本発明のさらなる目的は、生物学的活性化合物、さらに詳細には自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性な化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで本発明による S L C 6 A 7 遺伝子と接触させること、および該被験化合物が該 S L C 6 A 7 遺伝子の発現をモジュレートする能力を決定することを含む。好ましくは該 S L C 6 A 7 遺伝子もしくはそのフラグメントは、変異もしくは突然変異した S L C 6 A 7 遺伝子または変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。

【 0 1 1 0 】

他の態様において本発明は、活性化合物、特に自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害に活性な化合物をスクリーニング、選択または同定する方法に関するものであり、その方法は、被験化合物を、 S L C 6 A 7 遺伝子プロモーターの制御下のレポーター遺伝子を含むレポーターコンストラクトを含む組換え宿主細胞と接触させること、およびそのレポーター遺伝子の発現をモジュレート（例えば刺激または低減する）被験化合物を選択することを含む。好ましくは該 S L C 6 A 7 遺伝子プロモーターまたはそのフラグメントは、変異もしくは突然変異した S L C 6 A 7 遺伝子プロモーターまたは変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントである。 S L C 6 A 7 遺伝子プロモーターの配列は、例えば N M _ 0 1 4 2 2 8 に開示されている。また、最初または 2 番目の A T G コドンまでの配列番号： 1 は、 S L C 6 A 7 遺伝子プロモーター配列の部分を含む。

【 0 1 1 1 】

スクリーニング方法の特定の態様において、モジュレーションは阻害である。スクリーニング方法の他の特定の態様において、モジュレーションは活性化である。

【 0 1 1 2 】

S L C 6 A 7 遺伝子はアミノ酸輸送体をコードすることから、特定の態様においてスクリーニングアッセイは、特にニューロンにおいて膜を通過して輸送されるアミノ酸の検出または測定を含み、該輸送をモジュレートする化合物が選択される。

【 0 1 1 3 】

本発明の第二の局面は、生物学的活性化合物、より詳細には自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性な化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで S L C 6 A 7 の活性の調節に関する遺伝子またはポリペプチド、好ましくは C A M K 2 A 遺伝子またはポリペプチドと接触させること、および該被験化合物が該遺伝子

10

20

30

40

50

またはポリペプチドと結合する能力を決定することを含む。該遺伝子またはポリペプチドとの結合は、その化合物が該標的の活性をモジュレートし、よって対象における自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害に至る経路に影響する能力に関する指標を提供する。好ましい態様においてその方法は、被験化合物をインビトロで S L C 6 A 7 の活性の調節に關与するポリペプチドまたはそのフラグメント、好ましくは C A M K 2 A ポリペプチドまたはそのフラグメントと接触させること、および該被験化合物が該ポリペプチドまたはそのフラグメントと結合する能力を測定することを含む。そのフラグメントは、好ましくはそのポリペプチドの結合部位を含む。

【0114】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性化化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで S L C 6 A 7 の活性の調節に關与するポリペプチド、好ましくは C A M K 2 A ポリペプチド、またはその結合部位含有フラグメントと接触させること、および該被験化合物が該ポリペプチドまたはそのフラグメントと結合する能力を測定することを含む。

10

【0115】

さらなる特定の態様においてその方法は、S L C 6 A 7 の活性の調節に關与するポリペプチド、好ましくは C A M K 2 A ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を被験化合物と接触させること、および該被験化合物が該ポリペプチドと結合し、該ポリペプチドの活性をモジュレートする能力を測定することを含む。

【0116】

本発明のさらなる目的は、生物学的活性化化合物、より詳細には自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性化化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで S L C 6 A 7 の活性の調節に關与するポリペプチド、好ましくは C A M K 2 A ポリペプチドと接触させること、および該被験化合物が該ポリペプチドの活性をモジュレートする能力を測定することを含む。

20

【0117】

本発明のさらなる目的は、生物学的活性化化合物、より詳細には自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害に活性化化合物を選択する方法にあり、該方法は、被験化合物をインビトロで S L C 6 A 7 の活性の調節に關与する遺伝子、好ましくは C A M K 2 A 遺伝子と接触させること、および該被験化合物が該遺伝子の発現をモジュレートする能力を測定

30

【0118】

他の態様において本発明は、活性化化合物、特に自閉症、自閉症スペクトル障害または関連障害に活性化化合物をスクリーニング、選択または同定する方法に関するものであり、その方法は、被験化合物を、S L C 6 A 7 の活性の調節に關与する遺伝子、好ましくは C A M K 2 A 遺伝子のプロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含むレポーター構築物を含む組換え宿主細胞と接触させること、およびそのレポーター遺伝子の発現をモジュレート（例えば刺激または低減）する被験化合物を選択することを含む。

【0119】

スクリーニング方法の特定の態様において、モジュレーションは阻害である。スクリーニング方法の他の特定の態様において、モジュレーションは活性化である。

40

【0120】

上記のスクリーニングアッセイを、平板、試験管、皿、フラスコなどのような任意の適切な装置中で行える。典型的にはアッセイは、マルチウェル平板中で行われる。数個の被験化合物を並行してアッセイできる。さらに被験化合物は、多様な供給源、性質および組成でありうる。被験化合物は、単離された状態または他の物質と混合した状態の脂質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、低分子などのような任意の有機または無機物でありうる。その化合物は、例えば生成物のコンビナトリアルライブラリーの全てまたは一部でありうる。

【0121】

50

薬学的組成物、治療

本発明のさらなる目的は、(i) S L C 6 A 7ポリペプチド、S L C 6 A 7ポリペプチドをコードする核酸、上記のようなベクターまたは組換え宿主細胞、および(ii)薬学的に許容可能な担体またはベヒクルを含む薬学的組成物である。

【0122】

本発明は、対象における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害を治療または予防する方法にも関するものであり、その方法は、該対象に機能的(例えば野生型)S L C 6 A 7ポリペプチドまたは同ポリペプチドをコードする核酸を投与することを含む。

【0123】

本発明の別の目的は、(i) S L C 6 A 7活性の調節に関与するポリペプチド、好ましくはC A M K 2 Aポリペプチド、同ポリペプチドをコードする核酸、上記のようなベクターまたは組換え宿主細胞、および(ii)薬学的に許容可能な担体またはベヒクルを含む薬学的組成物である。

10

【0124】

本発明はさらに、対象における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害を治療または予防する方法に関するものであり、その方法は、該対象にS L C 6 A 7活性の調節に関与する機能的(例えば野生型)S L C 6 A 7ポリペプチドまたは同ポリペプチドをコードする核酸を投与することを含む。好ましくは該ポリペプチドは、C A M K 2 Aポリペプチドである。

【0125】

本発明の他の態様は、対象における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害を治療または予防する方法にあり、その方法は、該対象に本発明によるS L C 6 A 7の遺伝子またはタンパク質の発現または活性をモジュレートする化合物を投与することを含む。該化合物は、S L C 6 A 7のアゴニストもしくはアンタゴニスト、S L C 6 A 7のアンチセンスもしくはR N A i、本発明によるS L C 6 A 7ポリペプチドに特異的な抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体でありうる。例えば該化合物は、エンケファリンまたはその誘導体の一つ、さらに具体的にはL e u - およびM e t - エンケファリンおよびそれらのデス - チロシル誘導体でありうる。該化合物は、ピペコリン酸塩(P I P)またはその等価物もしくは誘導体でもありうる。該化合物は、さらにC a (2 +)依存性キナーゼのモジュレーター(アクチベーターまたはインヒビター)でありうる。例えば該化合物は、P K CモジュレーターまたはタブシガルギンのようなC a 2 + /カルモジュリン依存性キナーゼI I (C A M K 2)の作用を仲介するモジュレーターでありうる。該化合物は、C A M K 2 Aのアゴニストもしくはアンタゴニスト、C A M K 2 AのアンチセンスもしくはR N A i、本発明によるC A M K 2 Aポリペプチドに特異的な抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体でありうる。例えば該化合物は、オートカムチド(autocamtide) - 2、オートカムチド - 3、もしくはC A M K 2の残基273 ~ 302を含むペプチドのように自己阻害性ドメインをモデル化したペプチド、またはK N 6 2およびK N 9 3のような膜透過インヒビターでありうる。そのような化合物は、プロテインホスファターゼ1(P P 1)およびプロテインホスファターゼ2A(P P 2 A)のようなC A M K 2 Aの活性をモジュレートするホスファターゼまたはC A M K 2 Aの標的でもありうる。治療は、P K CモジュレーターとC a 2 + /カルモジュリン依存性キナーゼI I (C A M K 2)モジュレーターとの組み合わせの投与も含みうる。または該化合物は、C a (2 +)依存性キナーゼの活性をモジュレートするホスファターゼまたはその標的のモジュレーター(アクチベーターまたはインヒビター)でありうる。この方法の特定の態様においてモジュレーションは阻害である。この方法の他の特定の態様において、モジュレーションは活性化である。

20

30

40

【0126】

本発明は、一般に対象における自閉症、自閉症スペクトルまたは関連障害を治療または予防するための薬学的組成物の製造への、機能的S L C 6 A 7ポリペプチド、同ポリペプチドをコードする核酸、または本発明によるS L C 6 A 7の遺伝子もしくはタンパク質の発現もしくは活性をモジュレートする化合物の使用にも関するものである。該化合物は、

50

S L C 6 A 7 のアゴニストもしくはアンタゴニスト、S L C 6 A 7 のアンチセンスもしくは R N A i、本発明による S L C 6 A 7 ポリペプチドに特異的な抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体でありうる。例えば該化合物は、エンケファリンまたはその誘導体の一つ、さらに具体的には L e u - および M e t - エンケファリンおよびそれらのデス - チロシル誘導体でありうる。該化合物は、ピペコリン酸塩 (P I P) またはその等価物もしくは誘導体でもありうる。該化合物は、さらに C a (2 +) 依存性キナーゼのモジュレーター (アクチベーターまたはインヒビター) でありうる。例えば該化合物は、P K C モジュレーターまたはタプシガルギンのような C a 2 + / カルモジュリン依存性キナーゼ I I (C A M K 2) の作用を仲介するモジュレーターでありうる。該化合物は、C A M K 2 A のアゴニストもしくはアンタゴニスト、C A M K 2 A のアンチセンスもしくは R N A i、本発明による C A M K 2 A ポリペプチドに特異的な抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体でありうる。例えば該化合物は、オートカムチド - 2、オートカムチド - 3、もしくは C A M K 2 の残基 2 7 3 ~ 3 0 2 を含むペプチドのように自己阻害性ドメインをモデル化したペプチド、または K N 6 2 および K N 9 3 のような膜透過インヒビターでありうる。そのような化合物は、プロテインホスファターゼ 1 (P P 1) およびプロテインホスファターゼ 2 A (P P 2 A) のような C A M K 2 A の活性をモジュレートするホスファターゼまたは C A M K 2 A の標的でもありうる。化合物は、P K C モジュレーターと C a 2 + / カルモジュリン依存性キナーゼ I I (C A M K 2) モジュレーターとの組み合わせでもありうる。または該化合物は、C a (2 +) 依存性キナーゼの活性をモジュレートするホスファターゼまたはその標的のモジュレーター (アクチベーターまたはインヒビター) でありうる。この使用の特定の態様において、該化合物はアクチベーターである。この使用の他の特定の態様において該化合物は、インヒビターである。

10

20

【 0 1 2 7 】

本発明は、自閉症 (自閉症スペクトルおよび関連障害) と S L C 6 A 7 遺伝子座との間の相関を実証している。このように本発明は、治療的介入の新たな標的を提供する。対象、特に変異した S L C 6 A 7 遺伝子座を有する対象における S L C 6 A 7 の活性または機能を回復またはモジュレートするために多様な取組みを考えることができる。そのような対象に野生型の機能を供給することは、病的細胞または病的生物における自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害の表現型の発現を抑制すると期待される。そのような機能の供給を遺伝子療法もしくはタンパク質療法により、または S L C 6 A 7 ポリペプチドの活性をモジュレートもしくは模倣する化合物 (例えば上記のスクリーニングアッセイで同定されたアゴニスト) を投与することによって果たすことができる。

30

【 0 1 2 8 】

野生型 S L C 6 A 7 遺伝子またはその機能的部分を、上記のようなベクターを使用してそれを必要とする対象の細胞に導入できる。そのベクターは、ウイルスベクターまたはプラスミドでありうる。その遺伝子は、裸の D N A としても導入できる。その遺伝子をレシピエントの宿主細胞のゲノムに組込むように、または染色体外のままであるようにその遺伝子を提供できる。組込みは、ランダムにまたは相同組換えのような正確に定められた部位に生じうる。特に、S L C 6 A 7 遺伝子の機能的コピーを相同組換えにより変異版と置換して細胞に挿入できる。さらなる手法には、遺伝子ガン、リボソーム介在性トランスフェクション、陽イオン脂質介在性トランスフェクションなどがある。遺伝子の直接注入によって、または機能的 S L C 6 A 7 ポリペプチドを発現するエクスピボで調製した遺伝子修飾細胞を投与することによって、遺伝子治療を果たすことができる。

40

【 0 1 2 9 】

S L C 6 A 7 活性をモジュレートする他の分子 (例えばペプチド、薬物、S L C 6 A 7 アゴニストもしくはアンタゴニスト、S L C 6 A 7 抗体もしくはその誘導体または有機化合物) も対象における機能的 S L C 6 A 7 活性を回復するために、または細胞における有害な表現型を抑制するために使用できる。例えば S L C 6 A 7 活性をモジュレートする分子は、S L C 6 A 7 活性の調節に関与するポリペプチドまたは遺伝子のモジュレーターでありうる。例えばその分子は、C A M K 2 A 活性のモジュレーター (例えばペプチド、薬

50

物、CAMK2Aアゴニストもしくはアンタゴニスト、CAMK2A抗体もしくはその誘導体または有機化合物)でもありうる。

【0130】

細胞中での機能的SLC6A7遺伝子の機能の回復を、自閉症、自閉症スペクトル障害もしくは関連障害の発現を予防するために、または該疾患の進行を低減するために使用できる。そのような治療は、細胞、特に有害な対立遺伝子を有する細胞の異常な表現型を抑制しうる。

【0131】

当業者に公知の任意の方法によって、好ましくは経口経路または注射によって、典型的には腹腔内、大脳内、静脈内、動脈内または筋肉内経路によって投与を行える。当業者は、投与する用量を適合させることができる。典型的には性質が化学的である化合物について約0.01mg~100mg/kgが注射される。核の化合物について用量は、例えば単位用量あたり0.01mg~100mgまで変動しうる。他の活性薬剤または任意の薬学的に許容可能な賦形剤(例えば緩衝剤、等張食塩水溶液、安定化剤の存在下など)と場合により組み合わせ、反復注射を行えるものとする。

10

【0132】

遺伝子、ベクター、組換え細胞およびポリペプチド

本発明のさらなる局面は、診断、治療法またはスクリーニングに使用するための新規な生成物にある。これらの生成物は、SLC6A7ポリペプチド、同ポリペプチドを含むベクター、組換え宿主細胞および発現されたポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

20

【0133】

さらに詳細には本発明は、変異もしくは突然変異したSLC6A7遺伝子、または該変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントに関するものである。本発明は、変異もしくは突然変異したSLC6A7ポリペプチドまたは該変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントをコードする核酸分子にも関するものである。該変異または突然変異は、SLC6A7活性を修飾する。修飾された活性は、増加または減少しうる。本発明は、さらに変異もしくは突然変異したSLC6A7遺伝子または該変異もしくは突然変異を含むそのフラグメント、あるいは変異もしくは突然変異したSLC6A7ポリペプチドまたは該変異もしくは突然変異を含むそのフラグメントをコードする核酸分子を含むベクター、組換え宿主細胞および発現したポリペプチドに関するものである。

30

【0134】

本発明のさらなる目的は、本発明によるSLC6A7ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターである。そのベクターは、クローニングベクター、またはより好ましくは発現ベクター、すなわちコンピテント宿主細胞中に該ベクターからのSLC6A7ポリペプチドの発現を引き起こす調節配列を含むベクターでありうる。

【0135】

インビトロ、エクスビボ、またはインビボでSLC6A7ポリペプチドを発現させるために、トランスジェニックまたは「ノックアウト」の非ヒト動物を創造するために、核酸を増幅させるために、アンチセンスRNAを発現させるためなどに、これらのベクターを使用できる。

40

【0136】

本発明のベクターは、典型的には調節配列、例えばプロモーター、ポリAなどに「作動可能に連結している」本発明によるSLC6A7コード配列を含む。用語「作動可能に連結している」は、コード配列および調節配列が機能的に関連して、その調節配列がコード配列の発現(例えば転写)を引き起こすことを示す。ベクターは、さらに一つまたは数個の複製起点および/または選択マーカを含みうる。プロモーター領域は、コード配列に関して相同または非相同でありえ、インビボ使用を含めた、任意の適切な宿主細胞における遍在性構成性に調節され、かつ/または組織特異的である発現を提供する。プロモーターの例には、細菌プロモーター(T7、pTAC、Trpプロモーターなど)、ウイルスプロモーター(LTR、TK、CMV-IEなど)、哺乳動物遺伝子プロモーター(アル

50

ブミン、PGKなど)、その他がある。

【0137】

ベクターは、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、BAC、YACなどでありうる。プラスミドベクターを、pBluescript、pUC、pBRなどのような商業的に入手可能なベクターから調製できる。ウイルスベクターを、当技術分野で公知の組換えDNA法によりパキウウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAVなどから生成させることができる。

【0138】

これに関連して本発明の特定の目的は、上に定義するSLC6A7ポリペプチドをコードする組換えウイルスにある。組換えウイルスは、好ましくは複製を欠損し、尚より好ましくはE1-および/またはE4-欠損アデノウイルス、Gag-、pol-および/またはenv-欠損レトロウイルスならびにRep-および/またはCap-欠損AAVより選択される。そのような組換えウイルスを、パッケージング細胞にトランスフェクトすることまたはヘルパープラスミドもしくはウイルスの一過性トランスフェクションによるような当技術分野で公知の手法によって生成させることができる。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例には、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などがある。そのような複製欠損組換えウイルスを生成させるための詳細なプロトコルを、例えばWO95/14785、WO96/22378、US5882877、US6013516、US4861719、US5278056およびWO94/19478に見出すことができる。

【0139】

本発明のさらなる目的は、上に定義されるような組換えSLC6A7遺伝子またはベクターを含む組換え宿主細胞にある。適切な宿主細胞には(細菌のような)原核細胞および(酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などのような)真核細胞があるが、それに限定されるわけではない。具体的な例には大腸菌(E. coli)、クルイベロミセス(Kluyveromyces)もしくはサッカロミセス(Saccharomyces)酵母、哺乳動物細胞系(例えばVero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など)、または(例えば線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから作成した)初代培養もしくは樹立哺乳動物細胞培養物がある。

【0140】

本発明は、本発明によるSLC6A7ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を生成させる方法にも関するものである。該方法は、(i)上記のような組換え核酸またはベクターをコンピテント宿主細胞にインビトロまたはエクスビボで導入すること、(ii)得られた組換え宿主細胞をインビトロまたはエクスビボで培養することおよび(iii)場合によりSLC6A7ポリペプチドを発現する細胞を選択することを含む。

【0141】

SLC6A7ポリペプチドまたはそのようなポリペプチドを含む膜調製物の作製、および上記のような活性分子のスクリーニングにそのような組換え宿主細胞を使用できる。自閉症、自閉症スペクトル障害および関連障害を研究するモデル系としても、そのような細胞を使用できる。任意の適切な培養装置(平板、フラスコ、皿、試験管、パウチなど)に入れたDMEM、RPMI、HAMなどのような適切な培地中で、これらの細胞を維持できる。

【0142】

本発明のさらなる局面および利点を以下の実験の部に開示する。この実験の部は、例示であり、本出願の範囲を限定するものではないとみなすべきである。

【0143】

実施例

1. ヒト第5染色体上の自閉症感受性遺伝子座の同定

A. 第5染色体感受性遺伝子を同定するためのGenomeHIPプラットフォーム

自閉症感受性遺伝子の迅速同定を可能にするためにGenomeHIPプラットフォームを使用

10

20

30

40

50

した。その手法は、簡潔には血縁の個体のDNAから対を形成させることからなる。各DNAは、特異的標識でマークされ、同定可能となっている。次に、2つのDNAの間でハイブリッドを形成させる。それから多段階手順で2つのDNAから全ての同祖(IBD)フラグメントを選択する特定のプロセス(W000/53802)を適用する。次に、残ったIBD濃縮DNAをDNAマイクロアレイから得られたBACクローンに対してスコアする。そのクローンは、染色体上のIBDフラクションの位置決定を可能にする。

【0144】

多数の異なる家族にこのプロセスを適用した結果、各家族からの各対についてIBDフラクションのマトリックスがもたらされる。次に、検査された全ての家族に共通する最小IBD領域を統計解析から計算する。有意な結果(p値)は、対象となる形質(ここでは自閉症)を有する正の領域が連鎖している証拠である。有意なp値を示す2つの最も距離の大きいクローンによって、連鎖した区間の境界を定めることができる。

【0145】

本研究において(A DI - Rに定義されるような)厳密な自閉症に一致する米国の114家族(114組の同胞対)にGenomeHIPプロセスを受けさせた。結果としてもたらされたIBD濃縮DNAフラクションを次にCy5蛍光色素で標識し、1.2メガ塩基対の平均間隔でヒトゲノム全体に及ぶ2263個のクローンからなるDNAアレイに対してハイブリダイズさせた。シグナル値を標準化し、各クローンについての比を計算するためにCy3で標識された未選択のDNAを使用した。次に、比率の結果のクラスタリングを行って各クローンおよび対についてのIBD状態を決定した。

【0146】

この手順を適用することによって、第5染色体上の約148キロ塩基(塩基149772850から149921225)にわたるクローンFE0DBACA28ZH06(p値 1.6×10^{-4})を同定した。このクローンは、 $< 7.0 \times 10^{-4}$ のp値によって規定されるように自閉症との連鎖を示唆する証拠を示した(LanderおよびKruglyak, 1995)。

【0147】

表2: SCL6A7遺伝子座を含有する領域における第5染色体に関する連鎖の結果。連鎖についての証拠を有する一つのBACクローンに対応する領域および隣接領域を示す。クローンの開始—および停止位置は、染色体の開始(p末端)に対するNCBI Build34に基づいたゲノムの局在位置に対応する。

【0148】

【表2】

表2

ヒト染色体	クローン	開始	停止	情報を与える対の比率	p値
5	FE0DBACA19ZG04	149586232	149711662	0.78	3.60E-01
5	FE0DBACA28ZA07	149720856	149851785	0.81	1.80E-01
5	FE0DBACA28ZH06	149772850	149921225	0.92	1.60E-04
5	FE0DBACA28ZC08	149773035	149773128	0.76	4.80E-01
5	FE0DBACA16ZA06	150001931	150170529	0.84	2.40E-02

【0149】

B. 第5染色体上の自閉症感受性遺伝子の同定

前記の連鎖する染色体領域の148キロ塩基および正のクローンに隣接する領域の200 kbをスクリーニングすることによって、我々は、自閉症および関連表現型についての候補として溶質キャリアファミリー6(神経伝達物質輸送体、L-プロリン)メンバー7(

S L C 6 A 7) 遺伝子およびカルシウム / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (C a M キナーゼ) I I アルファ (C A M K 2 A) 遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、上に概略を述べたクローンによって境界を定められた連鎖の証拠を有して、隣接区間に実際に存在する。

【 0 1 5 0 】

S L C 6 A 7 遺伝子は、予測されるアミノ酸 6 3 6 個のポリペプチド (m R N A 1 . 9 kb) をコードし、2 1 . 9 kb のゲノム配列に分散している。この遺伝子がコードするタンパク質は、神経伝達物質、オスモライト (osmolite)、代謝生成物およびアミノ酸であるプロリンに対する N a - および C l - 依存性原形質膜キャリアを含む、ガンマ - アミノ酪酸 (G A B A) 神経伝達物質遺伝子ファミリーのメンバーである。このタンパク質は、ナトリウム : 神経伝達物質同伴輸送ドメインを有する。この輸送体は、シナプス前終末への高親和性のナトリウム依存性再取込みによりプロリンの作用を直接終止できる。L - プロリンは、シナプトソーム中でオルニチンから合成される、中枢神経系における推定上のシナプス調節分子である。

10

【 0 1 5 1 】

最も重要なことに、この輸送体は、シナプス前軸索終末のサブセットに選択的に局在し、グルタミン酸作動性シナプスに典型的な非対称型の興奮性シナプスを形成する (Renick ら、1999)。

【 0 1 5 2 】

さらに最近の研究の成果は、S L C 6 A 7 がグルタミン酸作動性終末の分子不均一性に寄与していることを示し、特異的グルタミン作動性シナプスでの興奮伝播に S L C 6 A 7 が新規なシナプス前調節を果たしている役割が示唆されている (Cramp ら、1999)。

20

【 0 1 5 3 】

S L C 6 A 7 の生理学的役割を研究するための L - プロリンの特異的取込みインヒビターの探索は、L - プロリン輸送体タンパク質との直接相互作用を介して高親和性の L - プロリン取込みを競合阻害するエンケファリンの同定をもたらした。L e u - および M e t - エンケファリンならびにそれらのデス - チロシル誘導体、例えばデス - チロシル - L e u - エンケファリンは、ラット海馬シナプトソームおよび S L C 6 A 7 をトランスフェクトした H e L a 細胞における L - プロリンの取込みを強力に選択的に阻害した (Fremea u ら、1996)。Galli ら (1999) は、S L C 6 A 7 が電気発生性であり、L - プロリン、L - ピペコリン酸塩 (P I P)、L - ノルロイシンおよびサルコシンが S L C 6 A 7 の基質であることを示した。P I P は、輸送体に対する基質または神経伝達物質の取込みの稀少なアンタゴニストのいずれかであることを示した。

30

【 0 1 5 4 】

Jayanthi ら (2000) は、S L C 6 A 7 のモジュレーションに果たす [C a 2 +] I および C a (2 +) 依存性キナーゼの役割を検討した。彼らは、プロテインキナーゼ C (P K C) のアクチベーターであるベータ - P M A (ホルボール 1 2 - ミリステート 1 3 - アセテート) が L - プロリンの取込みを阻害することを示した。ベータ - P M A を用いた慢性治療による P K C の下方制御は、S L C 6 A 7 の機能を増強し、これは P K C の持続性活性により S L C 6 A 7 が調節されることを示している。C a (2 +) - A T P アーゼを阻害することにより [C a 2 +] I レベルを増加させるタブシガルギンは、S L C 6 A 7 を阻害し、ベータ - P M A と同時治療した場合に相加性の阻害を示す。B I M (P K C インヒビター) ではなく、C a 2 + / カルモジュリン依存性キナーゼ I I (C A M K 2) インヒビターは、タブシガルギンによる阻害を防止する。これらのデータは、P K C および C A M K 2 が S L C 6 A 7 をモジュレートし、タブシガルギンが C A M K 2 を介してその作用を仲介することを示唆している。C a 2 + は、S L C 6 A 7 を分別的に調節しているようである。C a 2 + は、最初にプロリン輸送を増強するが、結局 C A M K 2 経路を介して輸送機能を阻害する。

40

【 0 1 5 5 】

C A M K 2 A 遺伝子は、アイソフォーム 1 についてアミノ酸 4 8 9 個のポリペプチド (

50

mRNA 4836 bp、cDNA 1470 bp) が予測され、アイソフォーム 2 についてアミノ酸 478 個のポリペプチド (mRNA 4803 bp、cDNA 1437 bp) が予測される 2 つのアイソフォームをコードする。CAMK2A 遺伝子は、70.3 kb のゲノム配列に分散している。この遺伝子がコードするタンパク質は、セリン/トレオニンプロテインキナーゼファミリーで Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼサブファミリーのメンバーである。Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ 2 (CAMK2) は、4 つの遺伝子 (アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ) から得られる異なるアイソフォームのファミリーを含む。アルファおよびベータサブユニットは、脳における主要なアイソフォームであり、脳で一方または両方の型のサブユニットのいずれかからなる十二量体ホロ酵素を形成する。CAMK2 はシナプスで豊富であり、シナプス後肥厚 (PSD) の主タンパク質である。CAMK2 は、グルタミン酸作動性シナプスの調節に中心的である。CAMK2 遺伝子がコードするアルファ鎖は、ある形式の学習および記憶の根底にあると考えられている活性に依存したシナプスの強化である、海馬の長期増強 (LTP) に必要である。最も重要なことには、このキナーゼはシナプスに移行し、そこで PSD 内のグルタミン酸受容体サブタイプである NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体に直接結合する。結合の結果、NMDA 受容体のリン酸化がもたらされる。移行は、グルタミン酸塩によって誘導されるようである (Bayerら、2001)。CAMK2 は、PSD 中の少なくとも 2 つの他のタンパク質であるデンシン-180 および a-アクチニン 4 と結合する (Stackら、2000; Walikonisら、2001)。

10

【0156】

20

Ca²⁺シグナルの強度およびキナーゼを脱リン酸するホスファターゼの性質に依存した崩壊時間で、CAMK2 を種々の程度に活性化できる。CAMK2 は、細胞質においてプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) によって主に脱リン酸され、一方でこのキナーゼは、PSD ではプロテインホスファターゼ 1 (PP1) によってほぼ独占的に脱リン酸される (Strackら、1997)。CAMK2 を脱リン酸する能力は、PP1 がスピノフィリン、ニューラビン、ヨチアオ (yotiao) および中間径フィラメントを含めた骨格タンパク質によって PSD に固定化されているという事実依存すると思われる (Watanabeら、2001)。

【0157】

30

LTP が、AMPA (a-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸) 受容体介在性伝達を選択的に増強するシナプス後プロセスを伴うという強力な証拠がある (Malenka および Nicoll, 1999)。CAMK2 は、シナプスにすでに局在する AMPA 受容体をリン酸化し、それらのコンダクタンスを増強する。AMPA 受容体は、他のグルタミン酸塩サブタイプの受容体である。

【0158】

CAMK2A は、LTP の持続を直接担い、よって学習および記憶の機能を有するおそれがある。Silvaら (1992a、1992b) は、Camk2a 遺伝子に突然変異を有するマウスが LTP および海馬依存性空間学習の課題を欠損していることを示し、CAMK2A が学習および記憶に関与していることを示した。これらのマウスは、てんかん性発作も患った。

40

【0159】

Camk2a のヌル突然変異にヘテロ接合性であるマウスは、正常な海馬 LTP を示すが、皮質 LTP を示さない。これらの動物は、行動課題において正常に学習するが、おそらく海馬から皮質への情報の正常な輸送が不可能であることが原因でその後忘却する (Franklandら (2001)。

【0160】

トレオニン-286 残基での自己リン酸化は、カルモジュリン依存性状態からカルモジュリン非依存性状態に切り換える能力を CAMK2A に授ける。Gieseら (1998) は、CAMK2A の thr286 で自己リン酸化を遮断する thr286 から ala への突然変異を導入した。この突然変異は、カルモジュリン非依存性状態への切り換えが不可能である

50

キナーゼをもたらしたが、カルモジュリン依存性活性には影響しなかった。Thr 286 のリン酸化の除去はLTPを遮断するだけでなく、インビボの経験依存性可塑性も妨害する。行動検査は、記憶がこの突然変異によって強力に損傷することを示す。このようにCAMK2Aは、行動に関連する情報を貯蔵するシナプスの基本プロセスに参与する。

【0161】

さらに、Camk2a遺伝子を欠損したマウスは行動異常を示したことが示されている(Chenら、1994)。ヘテロ接合性マウスは、認知の不足が全く測定されずに恐れ反応の減少および防御性攻撃の増加から主としてなる境界明瞭な症候群を表す。

【0162】

CAMK2がLTP誘導に必要であるかどうかを検査するための特異的インヒビターの探索から、このキナーゼの特異的インヒビターの同定に至った(Malinowら、1989)。自己阻害性領域をモデル化したペプチド(例えばオートカムチド-2またはCAMK2の残基273~302を含むペプチド)は、他のカルモジュリン依存性プロセスを妨害せずにその酵素のCa²⁺依存性活性を遮断する(Lismanら、2002)。シナプス後細胞へのオートカムチド-3由来ペプチドインヒビター(AC3-I)の導入は、対形成により生成したLTPの誘導を完全に遮断するが、LTPの維持には影響しない(Otmakhovら、1997)。KN62およびKN93のようなCAMK2の膜透過性インヒビターは、カルモジュリンの結合を妨害することによって、その酵素のCa²⁺依存性活性を遮断し、標準的なLTP誘導プロトコルであるチタン短時間刺激によるLTP誘導を防止する(Otmakhovら、1997)。

【0163】

Jayanthiら(2000)は、[Ca²⁺]IおよびCa(2+)依存性キナーゼがL-プロリン神経伝達物質輸送体であるSLC6A7のモジュレーションに果たす役割を検討した。Ca²⁺は分別的にSLC6A7を調節しているようである。Ca²⁺は、最初プロリンの輸送を増強するが、結局CAMK2経路を介した輸送機能を阻害する。

【0164】

CAMK2は、抗けいれん薬、ベンゾジアゼピン、および抗うつ薬の作用に関係があるとされている。最近、Celanoら(2003)は、CAMK2が精神疾患の治療に採用される種々の薬物の作用にも役割を果たすことを示した。

【0165】

自閉症に観察される重度の破壊がGABA作動性阻害に連鎖する結果、グルタミン酸塩を専門にするニューロンの過剰刺激および感覚ゲーティングの欠如がもたらされるおそれがあるという仮説が立てられた(Hussman、2001)。

【0166】

低グルタミン酸作動性げっ歯類モデルにおいて、自閉症にみられる認識障害と関連性を有するおそれがある、ある行動が観察された(Nilssonら、2001)。

【0167】

グルタミン酸デカルボキシラーゼの65および67kDaレベルの減少から、自閉症対象の血液および血小板中のグルタミン酸塩の報告された増加を説明できる(Fatemiら、2002)。グルタミン酸デカルボキシラーゼ欠損は、自閉症の脳におけるグルタミン酸/アミノ酪酸レベル、または輸送体/受容体密度の異常が原因であるか、またはそれらと関連しているおそれがある。さらに、グルタミン酸受容体密度の減少が、自閉症患者の小脳で観察されている(Purcellら、2001)。

【0168】

第5染色体上の自閉症に連鎖した遺伝子変異の区間のごく近傍にヒトSLC6A7遺伝子を同定した本出願で提供された連鎖の結果と、グルタミン酸作動性シナプスでの調節的な役割とを総合して、我々は、SLC6A7遺伝子またはその調節配列における変異(例えば突然変異および/または多型)が、ヒト自閉症の発現に参与しているおそれがあり、その変異が診断または治療的介入のための新規な標的となりうると結論する。

【0169】

10

20

30

40

50

3. 関連の研究

連鎖の研究に使用したのと同じ家族を、伝搬不均衡テスト (TDT) を使用して問題となる特定の表現型 (ここでは自閉症) と、遺伝子マーカー対立遺伝子または特異的マーカー対立遺伝子を含むハプロタイプとの間の関連を検査するためにも使用した。TDT は、被験試料における集団層別問題に非感受性であることから、関連の強力な検査である。簡潔には、ヘテロ接合性の親から、罹患した子孫への対立遺伝子の分離を検査する。伝搬しなかった対立遺伝子に比べて罹患した子孫に伝搬した対立遺伝子の部分を、ランダム分布で期待される比率と比較する。期待値よりも対立遺伝子の伝搬が有意に過剰であることは、それぞれの対立遺伝子またはハプロタイプと、検討された自閉症表現型とが関連している証拠である。

10

【0170】

この分析の結果は、SLC6A7 遺伝子のある対立遺伝子が自閉症と正の関連性もち、よって疾患に対する感受性が増加させることを示している。被験集団において、SNP5 の対立遺伝子 G、SNP6 の対立遺伝子 A、SNP7 の対立遺伝子 T、SNP8 の対立遺伝子 C および SNP10 の対立遺伝子 G は、TDT によって決定されるように自閉症と相関する (p 値は 0.03 ~ 0.006 の範囲)。対照的に、これら SNP の反対側の対立遺伝子は、自閉症の個体に過少伝搬しており、これらの対立遺伝子がこの疾患の防御を助けていることを示す。

【0171】

自閉症患者への SNP5 ~ SNP10 の対立遺伝子の伝搬の例を表3に示す。

20

【0172】

【表3】

表3

SNP	対立 遺伝子	自閉症患者に伝搬	自閉症患者に伝搬せず	p 値
SNP5	C	59	85	0.03
SNP5	G	85	59	0.03
SNP6	A	86	60	0.03
SNP6	G	60	86	0.03
SNP7	C	53	81	0.016
SNP7	T	81	53	0.016
SNP8	C	85	53	0.006
SNP8	G	53	85	0.006
SNP10	A	59	88	0.017
SNP10	G	88	59	0.017

30

【0173】

さらに、SNP3、SNP4、SNP5、SNP6、SNP7、SNP8、SNP9、SNP10、SNP12、およびSNP14についてのハプロタイプを構築し、全てのSNPについての位相を同定した。

40

【0174】

被験集団におけるこの分析の結果は、全てSNP8の対立遺伝子Cが存在することを特徴とするあるハプロタイプが、自閉症と強力に関連しているが、一方SNP8に対立遺伝子Gを欠如するあるハプロタイプは、自閉症に優先的に伝搬されないことを示した。例は、SNP4 - SNP7 - SNP8 についてのハプロタイプ G - T - C、 $p = 0.009741$ および、SNP8 - SNP9 - SNP14 についてのハプロタイプ C - C - G、 $p = 0.00235$ である。SNP8 に対立遺伝子Gの代わりに対立遺伝子Cを有するハプロタイプは、自閉症対象において実際以下に見積もられている証拠を示す。一例は、SNP5 - SNP6 - SNP8 についてのハプロタイプ C - G - G、 $p = 0.02742$ である。

50

【 0 1 7 5 】

自閉症患者への SNP 8 の優先的な伝搬および非伝搬を伴うハプロタイプの例を表 4 および表 5 に示す。

【 0 1 7 6 】

【表 4】

表 4

ハプロタイプを構築するために使用した SNP	ハプロタイプ	自閉症患者に伝搬したハプロタイプの頻度	自閉症患者に伝搬しなかったハプロタイプの頻度	p 値
SNP3-SNP5-SNP8	T-G-C	0.3838	0.2629	0.0157
SNP4-SNP5-SNP8	G-G-C	0.3865	0.2632	0.01226
SNP5-SNP6-SNP8	C-G-G	0.4615	0.5769	0.02742
SNP5-SNP6-SNP8	G-A-C	0.522	0.4066	0.02714
SNP5-SNP7-SNP8	C-C-G	0.4775	0.5899	0.03341
SNP5-SNP7-SNP8	G-T-C	0.5056	0.3933	0.0329
SNP5-SNP8-SNP9	G-C-C	0.4311	0.3247	0.0433
SNP5-SNP8-SNP10	C-G-A	0.4739	0.582	0.04201
SNP5-SNP8-SNP12	G-C-A	0.4066	0.2847	0.01758
SNP2-SNP7-SNP8	G-T-C	0.2243	0.1395	0.05133
SNP3-SNP7-SNP8	T-T-C	0.38	0.2551	0.01382
SNP4-SNP7-SNP8	G-T-C	0.3838	0.2548	0.00974
SNP5-SNP7-SNP8	C-C-G	0.4775	0.5899	0.03341
SNP5-SNP7-SNP8	G-T-C	0.5056	0.3933	0.0329
SNP6-SNP7-SNP8	A-T-C	0.523	0.408	0.03141
SNP6-SNP7-SNP8	G-C-G	0.4598	0.5747	0.03172
SNP7-SNP8-SNP9	T-C-C	0.4433	0.3306	0.038
SNP7-SNP8-SNP10	C-G-A	0.4792	0.5858	0.04927
SNP7-SNP8-SNP12	T-C-A	0.3991	0.2848	0.02686

10

20

30

【 0 1 7 7 】

【表 5】

表 5

ハプロタイプを構築するために使用した SNP	ハプロタイプ	Z スコア	被験集団に伝搬したハプロタイプの頻度	p 値
SNP5-SNP8-SNP14	G-C-G	2.836	0.1066	0.00456
SNP6-SNP8-SNP14	A-C-G	2.893	0.1095	0.00381
SNP7-SNP8-SNP14	T-C-G	2.808	0.1049	0.00498
SNP8-SNP9-SNP14	C-C-G	3.041	0.1269	0.00235

40

【 0 1 7 8 】

50

4 . ヌクレオチド変化の同定

突然変異の選別に96人の血縁のない罹患した個体を含めた。プライマーを設計してSCL6A7遺伝子のコード領域を増幅させた。各プライマーは、それぞれ大文字でマークしたM13FおよびM13R配列を含む尾部を含有し、M13プライマーを使用してPCR生成物を直接配列決定するのを容易にした。プライマーの配列を以下提供する：

【0179】

【表 6】

Pro-01-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT agtgttccttgcccaactgt	配列番号 13	
Pro-01-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC ctctccaaccctcctccag	配列番号 14	
Pro-02-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tctggcctcagtcttctccc	配列番号 15	
Pro-02-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gccttgcccatcac	配列番号 16	
Pro-03-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tctagagctgggcttttggg	配列番号 17	
Pro-03-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC cctcagcagtcagggtc	配列番号 18	
Pro-04-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tgactccatgtctgtggagc	配列番号 19	10
Pro-04-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gccttctccaggaagcct	配列番号 20	
Pro-05-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tggcactgagtcaaggtcc	配列番号 21	
Pro-05-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC ctctttccactctccagctca	配列番号 22	
Pro-06-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tgccttccttctctgtcctt	配列番号 23	
Pro-06-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC ctaccaacacacatgctca	配列番号 24	
Pro-07-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tctgagtgctgctatgggag	配列番号 25	
Pro-07-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gccagagatctcgttcgag	配列番号 26	20
Pro-08-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT gtagcagagaacgaggccc	配列番号 27	
Pro-08-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gaactcccgtttcaattctg	配列番号 28	
Pro-09-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT cgggccttaagcagtttaga	配列番号 29	
Pro-09-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC ggtcaggaaggctgagagtg	配列番号 30	
Pro-10-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT cgtctgctgtttcctgtt	配列番号 31	
Pro-10-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC aagaagggactgtgaggtcc	配列番号 32	30
Pro-11-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT ggccatagatagccaggtgagt	配列番号 33	
Pro-11-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gccagagatctcgttcgag	配列番号 34	
Pro-12-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT gctgttagtgcttccttgccc	配列番号 35	
Pro-12-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC GAATGCCTTGTCTGTCCCTG	配列番号 36	
Pro-13-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT TCTGTCTGGGTGTCTATGCG	配列番号 37	
Pro-13-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC ggggtgcatcctcagacctt	配列番号 38	
Pro-14-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT atctgcaggccaggggag	配列番号 39	
Pro-14-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC gcagctatctgggcttact	配列番号 40	40
Pro-15-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT agctccccagaagccact	配列番号 41	
Pro-15-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC tacatgctgagactgtgggg	配列番号 42	
Pro-16-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT tgagtgtaagtggccgtgtg	配列番号 43	
Pro-16-Rt	CAGGAAACAGCTATGACC cctgctgccacagacgag	配列番号 44	
Pro-17-Ft	TGTA AAAACGACGGCCAGT gatagaattctgacccccagc	配列番号 45	

Pro-17-Rt	CAGGAAACAGCTATGACCcagagatctcgttcaggc	配列番号 46
Pro-18-Ft	TGTA AACGACGGCCAGTcacttcttgccaggagaagg	配列番号 47
Pro-18-Rt	CAGGAAACAGCTATGACCgctccccagggtagactcc	配列番号 48
Pro-19-Ft	TGTA AACGACGGCCAGTcccagttacgtgggtccct	配列番号 49
Pro-19-Rt	CAGGAAACAGCTATGACCgactccccgtttcaattctg	配列番号 50

【0180】

色素 - ターミネーター配列決定化学反応を使用して、結果としてもたらされた増幅生成物を両方向で直接配列決定して、遺伝子における稀少ヌクレオチド変化（突然変異）および多型（対立遺伝子頻度 > 1%）を同定した。 10

【0181】

この遺伝子のコード領域およびスプライス部位にすぐ近接した隣接イントロン領域に合計 12 個のヌクレオチド変化を検出した（位置については表 6 を参照されたい）。これらのうち三つの結果として、表 6 に例示するようにそれぞれのコドンにおけるアミノ酸の変化がもたらされた。さらに、追加の ATP（開始コドン、配列番号：1 の位置 229）も公共データベースのコード領域の開始についての基準として使用される ATG と同フレーム内の上流にも同定された（配列番号：1 の位置 472 に局在）。この代替 ATG は、わずかに長いタンパク質をもたらすと考えられる。したがって、変異体に関する位置は、2 つの代替タンパク質について示してあり、ここで配列番号：2 の基準配列に基づく位置をまず挙げる。 20

【0182】

【表 7】

表 6:

ID	遺伝子中の局在位置	配列番号:1 における ヌクレオチド位置	ヌクレオチド 変化	配列番号:2 または、以下 に示す延長したタンパク質 における変動および位置	頻度
Mut1	エクソン 1	289	A/G	5' UTR 変動または I21V	48%
Mut2	イントロン 2~3、3' スプライス部位から-5bp	6,854	C/T	スプライス部位の変動	48%
Mut3	エクソン 5	9,477	C/T	L230L または L311L	0.5%
Mut4	エクソン 8	12,772	G/A	G338S または G419S	0.5%
Mut5	エクソン 9	13,881	T/C	F386F または F467F	31%
Mut6	エクソン 9	13,917	T/C	D398D または D479D	29%
Mut8	イントロン 11~12、5' スプライス部位から-3bp	14,778	G/A	スプライス部位の変動	19%
Mut9	イントロン 12~13、から-16bp	15,087	G/A	S582S または S663S	4%
Mut10	エクソン 14	19,607	C/T	R587T または R668T	0.5%
Mut11	エクソン 14	19,707	C/T	T620M または T701M	0.5%
Mut12	エクソン 14、停止コドンから+2bp	19,761	G/A	3' UTR 変異体	0.5%

【0183】

エキソン1のMut1は、関連の研究に使用したSNP6と同一である。SNP6は、自閉症に独立して関連し、偶然から期待されるよりも高頻度で自閉症患者に伝搬したハプロタイプSNP5 - SNP6 - SNP8、SNP6 - SNP7 - SNP8およびSNP6 - SNP8 - SNP14の部分でもあった。

【0184】

Mut2およびMut8は、スプライシング部位近くに生じ、よってこれらの部位でスプライシングに影響できた。

【0185】

コドン338でのCからTへの突然変異は、第7膜貫通ドメインに生じ、グリシンからセリンへの非同義アミノ酸変化をもたらした。コドン587および620における突然変異は、細胞質ドメインに生じ、それぞれアルギニンからトレオニン、およびトレオニンからメチオニンへの非同義アミノ酸変化をもたらした。これらの突然変異の全ては、本出願に開示されるようにスクリーニングまたは診断目的のための価値ある標的となる。さらに、これらの突然変異および対応するポリペプチド配列は、特異的抗体を発生させるための価値あるエピトープとなる。さらに、本発明の特定の目的は、以下のような延長したN末端アミノ酸配列を含むSLC6A7ポリペプチドである：MRAQQCTLPQ PRA
LRRDRQG IRSALPALHA RSRQTAAPAS VPAPAGAREP
RGQRRSGQRT ISRALALCAP GQLSPGHPLS K(配列番号
: 51)。

10

20

【0186】

本配列は、本発明者らによって発見されたように上流のATG開始コドンの使用に起因する。結果としてもたらされた完全長SLCA6A7ポリペプチドは、717個のアミノ酸残基を含む。また、配列番号: 51の全てまたは一部を含むポリペプチドは、本発明の特定の目的となる。そのようなポリペプチドは、より好ましくは配列番号: 51の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、尚より好ましくは少なくとも7、8、9、10、12、15または20個を含む。そのポリペプチドは、典型的には一つのエピトープを含む。

【0187】

配列1~12に関する情報

【0188】

30

【表 8】

配列番号:1 位置突然変異の基準として使用したSCL6A7遺伝子(ゲノムDNA)の配列

GCACAGCAAAGACGACGCAGGGGGTGGGCTGTTAGTGTTCCCTTGCCCAA
 CTGTGGAAAGGGAGTCCCAGAGAGGGCAGGTCGCTTGCCCAAGGTCACGC
 AGAAAGCCGAGGGTTTCCGTGCGAACCCTCCCACTCGCTCAGGGC
 TCTCCAATCCGACGCTCTGCGTGGGGGGCGCGCATCCCCCGCGTC
 CGTCCGTCAGCTGTCTGTCTGGGTGTCT**ATG**CGGGCGCAGCAGTGCACCC
 TTCCCCAGCTCGGGCGCTGCGCAGGGACAGACAAGGCATTGCGAGCGCC
 CTGCCCCGCTCCACGCCCGCAGCCGCCAGACGGCAGCGCTGCGTCCGT
 GCGCGCCAGCCGGTGCAGCGGGAGCCGCGGGGGCAAAGGCAGTGGCC
 AGCGGACCATCTCTCGTGCCCTCGCTCTCTGCGCTCCGGGGCAGCTGAGC
 CCCGGCCACCCGCTCTCCAAG**ATGA**AGAAGCTCCAGGGAGCTCACCTCCG
 CAAGGTAGGGCACGAGGGCGGGGGCGCTGGGGGTGCACCTGGAGGAGGGT
 TGGAGAGACCCGCCCAACGAGGCCCTGGGGAAGGTCTGAGGATGCAC
 CCAGACTCAGTTCCGGCTCTGGGGAAGGCCCGACTCAGCTGGATAACAGG
 GAGGTCAGGGTACGGTCTGCGCCCCACCTCTGCCCTGCCATCTGGG
 GTTCGGGATGTAGTATGAGGGGAGTCTGGTTCACTGGGCCAGGCCTATG
 AACAGGTGTCTGCAGTCCCCGAGGCGGGGTAGGGGCGCCGGGGCCA
 GGCACCCACCTCTTCCCCAATTCACCCTGCTGCTCCCCGCCAGGAGCTG
 ATTGCCGGGTGTGGGGGTATTGGAATACCTGAGCGTTGAGCTGGACTCA
 TCTGAGGGGTGGGAGTGGGAGCGGTCATCCATACTGAAGCCGGCTCCC
 TGAGCCTGCGGGAAGACTCTCCTCTTTCTGCTGCTCCCTCCCCGCCCC
 CTTAGCTTGCTGCTGAGACCCAGGCTGCCCTCAGCAGGGCTGAAGGG
 AGGCAAAGACAGGGAGGGGGCTATCGGAGGCAGGAGGATATGATCAATGA
 AGATGGAAGCTGGTATGGGAGAGTGGCTGTGGGCCAGACCTCAGGCTCT
 CCCTACCTTGCCCTGTGGGATTTGGACCTCTCAGCCAAGCTGTCAGGATAT
 GGGGAGGGGGAATACTGGGGGACGTTTTCTGGCTGTACCAGTCTAACT
 AAGGAGTCAGATCTCCTGAATACTATTTCTGCCGCTGCCACTTGCTGGT
 GACTTTGGACAAGTCTATTCTTAACCTGAACCTCCTCTGGCTAAGCCCT
 AGCCTGGAGGCACCAAACAGGCCCACTGGGTGTGTGAGGTGTGGGGAA
 GAATGCTAAAGGGCTGGTAGATGTGAGAAGACTGTTCTCAGGGGCTGGTG
 TTATCAACCTCCCTACATACACACATTACACTCACACTCACTCACAC
 ACACACTCATTCAAGTTCTCTGCTCTGGGGCAGCTGGGCTTGGAAC
 CACTGTGGTGTGTCTTTTTCTTTTTCTGTTTTTTTTTTTGGAGCGGA
 GTCTCGCTCTGTCACCCAGTTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGCTCAC
 TGCAAGCTCTGCCTCCCGGTTACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCG
 AGTAGCTGGGACTATAGGCGCCGCCACCACGCTGGCTAATGTTTTGTA
 TTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCCTGTAGCCAGGATGGTCTTGATCT
 TCTGACCTCGTGATCCGCCCGCTCGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACA
 GGTGTGAGTCACTGCGCCAGCTGGTATGTCTTTTTTATTCACTGACATG
 AGTGACTTCTTGAGACCATTTGTGAGTCTCTGGGTCCTGTTCCATTCT
 TTTCCACTCTCCTCTCTTCCCTCTGCCCCCTCCCAAGAGGCC
 CTGCCCCCTTGTGGTGTGGGCTGGGGGTAGCAAGCTTTATCTCA
 TTTAATCCTTTAACACTTCCAGGGGCTAGGTCTTAGTAGCCCCACTTTAT
 AAATAAGGCAACTGAGGCACAGAGGGGTGAGACTCACTGCTTACCTGCTG
 GCAGGCTAGGCAACCTAGAGCCAACAGGGCAGAGGGTTGGTTCTAGGTTG
 CTACCTCCTCTCAGGGTCTTTCCCTTTTCTCAAGCAGAATTGGGCGGGA
 ATGAGAAAATGCCAGATTTCCGCAAAGGAGCAGCATTGCTCAGAGATGAA
 CACTGGACTTAGAGTCAGGGGATCTAGGTCCAAGTCTTGCTGTGCCTTTA
 ACTTGCTGTTTACCTTGGGCTCATCCCTCTTCTGAAACTTGGTTTCC
 TAATCTGCACAATGATGAAGCTGGACCCAGATTCCTATTGTCTCTCTCT
 GTCCTGAAGAGTCTTGGCTTGGGCAGTCTGAGTCTCCAGCCCCCTGCTG
 TGAGTCCCTAAAGGCGAGCATGCAGGTCTGACAACTCAGCTGTGTGTTT
 CTGCATGCCCCGGGGTAGGGAGTGGGAGATTCAAGGAGTGGGAGGCTTAC
 ACCCAGGAAGAAGTATGAAGCAACTCATTCACTTCCAGCCCTGCCCCAG
 CTATTTGATTGCTTTCTTCCATCTCCAACCAGCCCCATCCTCACTGTGC

10

20

30

40

CAGCCTCCTGGGATTACCCCATGGTGGGGTTGGGAACTCCAGTTGGGCT
 CCTGATTGGCTCAGCTTTGGAGGACCCTATCTCCTGCCCTGGAGCAGAA
 GCAGGCTTCCCTCTGATTGGGGGAGGAGGGGGACGAGCTGGCAGCATCCT
 GCTCTTGGAACTCTAGTCACCATGGAAACAGAGAACCGGGACCGCTCCAT
 GAGCATGGAAAGGGCAGCTTCTCTGGAGGGATCAGAGGATCCTCATTACT
 GGGACCTCCTGCTAACTGGCCTGAATGGTGTGGGATGGGCGGGGGTGT
 CTCAGGGTAACAGGCTGCTCACCACCCAACACCAGGAACAGTGGCAACC
 ATTCCTCCCGGAGCTCACCCTGGGGTGAGAGGTTGCTGAAGGCTGATGCTC
 ACCCAGCTGGAGAGGCAGCCTCAGGGAACGGGGCATTGGAGGGGAAGGGT
 GGGTTTCACTTAAGTCTGGGATCTGCTGCTCCTGTCACCTCAGCATGTCC
 ATGATCACAGCTAAAGAACTTCCAGGCATGTATTTGTTTCAACCCCTTGCA
 GCCTAGTTACTTTAAAAACAGCTCTTCATGCTCTGTCAATTGTCAATCGTCA
 CCCATAATAATGTCTGGCTGTTCCTGTACACCACGGCCCTGTGGCCAATA
 GCCAGTTTCTGGCAAAATCACCACGTGGTACCACACTGAGGGTCTCC
 TAAGGGAGAATGCCCATGGACCTCTCACCACCTTTGAAGCATGAAAGGA
 GACCTTAGGAACAGCTGGCCTCCGCTCCCTCTGGGCATGCATCTCCTCT
 CCAGGGACAGCAAGATTATGACTTCTGACACAGATCACGGCTTAAGTAC
 CTTCTTCCCTGCTCATGAGCCAAAATTCACAAAATTCACCCAGCCCTCAGG
 CTCTCCCTACCTTGCCTGGTGGGGTTTGACCCCCCAGCCAAGCTGTCAG
 CATGCGGGGAGGGGAGTATTGGGGAAGTTTTCTGGCTTGTGACTGAAAA
 GTACCAGTCTTAACCAAGGAGTCAGATCTCCTTGGTTCTTAGTAGGCCCC
 ATTTGAGCCACGGAGCATCAGTGGATTCCCTCCCTCAGGGGAACCCCCAG
 GTCCCTCCAAGTCTCTCCTTTCTATGCTGAGGGCTCCAGCTTCTTTCT
 GTTGTCTCCTATCACCTCTTTTCTGAACACCCCTCCAGCCTGGCCACCT
 GCCCTTTGGACATGCTCCATATTGTCTGCATCTTTCTTAAAATATGGTGC
 CCGGAACGGAGGAACAAAACCTCCAGCAC'TGGTGGGTGAAGGAGACCTGGC
 TTTTCGCATCAGGAAGCCTTGGGCTCCAGACCTAGTTCTTCCACTCACCAA
 CCTGGTAGAAACCTCGGGTATGTCAATGACACCTCTTTGAGCCTCAGTTTT
 CCTCATGACGAAAATGGAGCTTAGATGAATACTGAGCTCAAAAAGTTGTT
 CTGAGAATGAAATCAGGTAATGTGAGTGAGATGTCTAGTGCAGTGGGCAC
 ATAGTAAGTGCTCAATATACAGTAACCTACTAAGATCATCATCATGCTCT
 TCATCTTCGTCACTCATCTCATCTCATCAAAAATAGGACCATCCAGCCGGCCA
 CGGTGGCTCATGCCTGTAATCCAGCAC'TTTGGGAGGCCGAGGGCGGGTGG
 ATCACGAGGTCAGGAGACCAAGACCATCCTGGCTAACACGGTGAACCCCT
 GTCTCTACTAAAAATACAAAACAT'TAGCCGGGCGTGGTGGTGGGCGCCTG
 TAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGACGGGAGAATTGCTTGAACCCGGG
 AGGTGGAGGTTGCGGTGTGCTGAGGTTGTACCACTGCACTCCAGGCTGGG
 CAACAGAGGGGAGACTCTTTCTCAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGACTAT
 CCCTTGATTTGGCATCTGTGTTAGCCAGACTAAGGTGAGGGTAGCTTTGT
 TAGTGCCTAAGCTACCCTGCTGGCCAGTAAGTTTTGGTGCCTAAAATC
 CTGAGGCTCTCCTGCATATGACAAGGTTAGTCCAGTTGAGAGCACTTGAT
 TATCTGGACTGAGAATGTCTTTTCAATTTAGCCCTGTTCAATTCAGAGTC
 TTGCTTGGAGTACATTTCTGGCCTGGCCTCAGTCTTCTCCCCAACCTC
 TTTGGTCTCTCTCATTGGCAGCCTGTACCCCCAGACCTGCTGATGACCCC
 CAGTGACCAGGGCGATGTGACCTGGATGTGGACTTTGCTGCACACCGGG
 GGAAC'TGGACAGGCAAGCTGGACTTCTGCTGTCTGCATTGGCTACTGT
 GTAGGCCTGGGGAATGTCTGGCGCTTCCCTATCGAGCGTACACCAATGG
 AGGAGGTATGGGCCTGAGGTCCTGTGCGAGGGTGTCTGGGGTATGGGCC
 AAGCCCTGGGGTACAGTGAGCTTTTAGGTGGCCTCAGCCACTGTCTCCT
 AGGCGACCTTGGGCAGAATCATTGAAAGTGGTTTATAGTAACCTGGGGC
 TGGGAGGAAGGAGTTACCCTGTCTTGTCTTCTCATCACCCAAGCCCTT
 CCTTCTCCCTCTCATCCCCAGGAAGGATACCCACATGGTTCCCTCTCTA
 AGGCTGGCCACCCACGCCCTGCACGGTGGGAGAGGGAGCTGCCTCTGC
 TTCGTGATAAGGAGCTGTATCTGCCTGCCGATGATCACTGCACTTTCAGT
 GTTCTCCCCACCCCTCCTTCCCTCCACCTCCTCCTGAGCTGTGCTCCATC
 AATCATTCCTCTCTTGGAGTCTCCAATCTTTCTCCTCTCTTGGTTCCCT
 CCATTCAGGCTGCAAAACACAAAGTCTCTCCCATCTTAAACAAATTTCCCTT
 TCATCCCTGCTTCTCCATCAAGTGACGGTTCCAAGTCTCATTAGCAAAAAG
 CTGGGGCTGAGCGCTACCACCTGTGAGGCCCTGGGCTTGGTGTGCTGCTG
 TGCCCATCTCATTTAACCTGGTGTGACCCATTTGGGTAGGCACCATGG
 ATACGATGAGGTAGCTGAAACTTGAAGACACCAGCGTCTTTGCCCAAGGT

10

20

30

40

CACAGGGTGGCAGACCCAACATTCCAACCCAGGACTATCTCCTCCCTAGC
CAGTGTGCTCTCACCAGTACTCGTATCTCCTTCTGTCTCTAGCAAACCTCT
GAAGGAAGCATATATTGAGAAAGTGAGAGAAATCCAAATAAAGCTAGATG
AAGCAAAGAAAGGATAAAATTTACATGACTAGGATGTGTGGGACTGGAGCT
GGCCTCTGAAGCTCTAGGACCTTGATGACACCCATGGTGTCTCTCGGCAA
GCACTCTCCCCATGTCCCTACTCTTCCCTCTCTGTGTGCTGACCTCATTTT
GTCCTGAGACAGGCTTCCCTCCCGCAGTTGGTGGGGGACAGGCCCTGGGG
GGAGGTGGCCACAGACAACCTCTGCAATGACTTCATCCCTCCAATGGGTTTA
GCAACCCAAGAGCTTTGCAGAACCTGCTCTGTCTGAATGAATCTATACAGA
ATTGCAGGGAAGGCCTCTGATAGGCCTGGCTTTGGATAGGTGCCACGGG
GGAAGGAGGAGAGGGCGGTGAACCCCTCCTTCCAGCCCCAGGTTATGAT
AAAACACTTCCAACATAATCTGCCAAGGTCGCCTAGGAGGGGGTTGGTT
GATGTGACTGGCAGCCCTTCCAGAGTCATATGGTGGTGGGCAGTTCTCTA
AAGAAGTACTGCCAATGTGAGAACCAAAGGGGAAGGGCTATTGGGCCCCA
CGGAACCACAGGTGGCAGTCACAAGTGTCTGAGGCGGCATGGTGGGGAGG
GGCAGGCAGATAGAGGGGAGCCGGATTCTGAAGGGTGTGGTTTCTGTAC
TGAGGAGTCTGCACTTTCTTCCAGCAGGAAATTCACACATCTCTCCCTCA
TTCATTCACTCCCTCAGCAGGCGTTTCTCAGCGTCTGCGCTGAGCC
CAGCACTGTTCTGGGCACTGGGGCTCCAGAGGTGAGTAAATCCCTGCTGG
CCACTCTGGCCCTCAGCAGTCTGGTATAGAAGAAAAGAAACCTACAGTGT
TCCATCAGGTCTGAGGGGGCATCTGCAGGCCAGGGGAGGGGCGGGGCTAG
AGCTGGGCTTTTGGGGGAGCTGCCCCAAGGCCCTTGCTGACCACCCCGC
TCCCGGCAGGCCCTTCCCTCGTGCCCTACTTCCCTCATGCTGGCCATCTGT
GGCATCCCCCTTCTTCCCTGGAGCTCTCCCTGGGCCAGTTCTCCAGCCT
AGGGCCCTGGCTGTCTGGAAAATCAGCCCTCTCTCAAAGGTGAGGCCCT
CAGTGGTCCCCAGGGAGGGGAAGGGCTCAGGGTCTGGGGGAGGCAGGGAGG
TTGCCCCAGAACCCCTGCCAGCTCCAGGCAGAGGTGGAAGTGAAGCCCA
GATAGCTGCCAGCTCCCCAGAAGCCACTCCACCCGGCTGGCAGAGAGCTT
GGCCTGGGCAGCCAGCAGCTCTCCCCACACCAGGCGCCGGCGCAGCCA
TGCTGCTCATCGTGGGCTTGGTGGCCATCTACTACAACATGATCATCGCC
TACGTGCTCTTCTACCTCTTCGCTCCCTCACCAGCGACCTACCCTGGGA
GCACTGTGGCAACTGGTGGAACACAGAACCTTGCTGGAGCACAGAGTCT
CCAAGGACGGCAACGGGGCCCTGCCCTCAACCTCACCTGCACCGTCTCAGC
CCCAGCGAGGAGTACTGGAGGTGAGGCAGCTGCTGGCCCCGCGGCATCTG
AGGGGACCTGCACTGCTGAGGGTGGCCAGAGGGCATCCCCACAGTCTC
AGCATGTACCGCCAAGATGAGCTCAGGTGGTGTGATGGCAGGTGGACTCTGG
CTTCTAATCCCAGCTCTTACCTGACCAGCTGTGTGGCCTCAAACAATTT
ATTTGGCTTCTGTGCTTTATCTGTAGCATGAGGGCAATAATACTAGGTA
TCTCAGAAAAGTTGTGTGAAGATTAAGGAGAGAAAAGCATATATTAATA
AATTGTGCAGTCCAGTCTGGTGGATAGTAAGTGTCTCAATAAATACTAGCT
GAGAATGATGATGATGATGATAACAGTAATAGTAACATATGAGTCTCA
GTTTCTCCTCTGTAAACAGGGGTTGGTAAACAGTACCTGCTTCATAAGGTG
TTATCCAGTTAGTCAATTTACCCACTCATTCAATCTTTTAAATAAATATTTA
TTGAGCAACTGCTATATCATAGGTAAAGCACTTAGCATAAGGCCAGGACG
TACATAGTAAGGACCATCTCAGACTCCTCTAATAGAGATAGGACTATAAT
AGAGTAAGGGACTGTCATCAGAATTAACAACATAATGCAGGTGAAACCA
TTATCACGGTCTGGGCACACAGTGGTCTGGGAATGGTGGGTGTGCGA
AGGACGTTGCACTCATCAGCCTATCCCAATGCCCATTTTATGGTCAATA
AAACAAAGCCTTGTCATGCAATCTGCCTTTAAAAGAAAGAAAGAGAAAGA
AAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA
GAAAGAAAGAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA
TGCTCAGTATTGCTCAGTAATTAGTGACAGAGATGGTATTGACACTAAGG
ACTCCTGAGTCTGATCCTGTTCTGGAACATCTAAAATAGCCTGGTCCC
TAGGTGGGACTGTTGGCTGGCCAGAGAACACAGACCCATAAACCCCATC
CCTTACCTATAAAGGACTGCTGTTAGGAGATTTCTCCAGATAGGCTCCG
TGCTTTGAAATGTTTTGGTCTTTAACCTGCCTGTAGTACATAGTTCAATC
ATTTGTCCACTTCAAGTCCATCTGAAGTGTCCGCACCTGCTGAAGAGTTT
ATCTGACCAGTGGGAAAGAATCAGCCTGAGTTTGCAGCTTAAAGCCAAAG
GATTTGATACAATCACTGGCAGCTGCCAGGGTGGTTCTCCATGGCCATGC
CACAGCCACTGCATCAGTCAAGATGCAGGCAGGAGGCCGATGGATTGTC
AGAGGGTTTCACTGAAGGGAGTTAGTGAAGGGACTTTTCAGAGGGTCAT

10

20

30

40

50

CCAGATTTGTGTGACTGTAAACCCCAAGGAGGGCATTAGTGACAATGGTG
 ATAACAATGGTACTGACAGCTAATGTTAATATTTATTGACTGGGGACTGT
 GCCTGACCTTGCCCTAGTGTTTTACATGCATGTGTGTAGTGATTTAACCC
 ACCCTCCTCCCATGAAGTAGGCACTATTCCTATCCCCTCGTTACAGATAG
 GGATCCTGCGGTCCAGAGGGGTGACCTGGCTTGTTCAGGCTGCACAGCTA
 GAAAATGGTGAAGCTGGGGTCCAAATCCAGGTGCCAGGATTCAGAAAGG
 AAGTAAAGGGTTATGCAGGCTTACTGCCAATACAAATCTCCTGCACACT
 TTACATTAGGCTCTGTGTCTTCCAGAACTGGACCAAGCTTAGAGACCATC
 TTCTAGATCCTGGGTGGGAACTGAAGCCCGCAGAGGGGAAGGGACTTGC
 CCATGTCCCACCGTGTAAATGTTGGGGGAGGCTTGTCTCCTGGTCCACGT
 CACTTGTGAGCCAGGCTCATGACCACGCCATCCCTCGTGACCACGCCATC
 CCTGGAGCTGTCACACCATCTTCATCACTGCCTTCTTCTCTGTCTTGT
 ACCATCCGCACACCCCTCCCTTCCATCCTTCCCGGCACAGGTGTGGATTG
 AAGCTGCTCTTCAGATCTTCTATTCCCTGGGTGTGGGCTTCGGGGGGCTC
 CTCACCTTTGCTCCTACAACACGTTTCACCAGAACATCTATAGGTGAGT
 GTCCACAGCCTCCAGACCCCTGGGGTCCAAAGCAGGGAGGAGAGTGGCT
 GGCCAGGGAGGGCCTCAGAGGCTGAAAGGAAGGCCACTCACCCCTGGCCC
 GCACCTGGACTTCTTCTGGTAGAGACACTTTCATCGTCACTCTGGGCAAC
 GCCATCACCAGCATCCTGGCTGGCTTGGCCATCTTCTCCGTGCTGGGCTA
 CATGTCTCAGGAGCTGGGCGTGCCTGTGGACCAAGTAGCCAAAGCAGGTG
 GGCAGGCTGCCAGGCTCAGTGGGGTGGGAGTGTGTGTTGGGTAGAGATG
 GCTCATGCCCTGTGATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCGGATCGC
 TTGAGGTGAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGTCAACCTGGTGAGTCCCAGTG
 TCTACTAAAATAACAAAAGTAGCCGGGCGTGGTGGCACATGCCGTGAAT
 CCCAGTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGTG
 GAGGTTGCAATGAGCCAAGATTGGGTCACTGCCCTCTAGCATGGGCAACA
 GAGCAAGACTCTGCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATTGTGGATGGGTATG
 TCATGTGTGTGCATATGCACACATGTACGTGCAAAGGAACATGTCTTAGC
 TGGTCTCTGGTGGTCCATGTGCAAGGGGATGGGTGAGCAAACGAGTGTGC
 ATTAACCCATGTCTGGAGGCCAATGAGTTTCTGTGCAAGATTGTCACATT
 TTGTGCTTTGGTTGCACAAATAAGTCATATTGTGTGTGGAGGTGTCTATG
 TGCAAGTGAAGGGGTGAGAATGATCTTGTGAATCACTGTGTCTTTTGCC
 AGTGGATGCATGTAAATGTGTGTGTAGTGGGGTTATTTGTACCAATAAT
 TGTATACATAAGTATATTTCAATGAGGTTTTATATTGGGGTCTTGTGTTT
 GTTTATCAACCTATGTTTATCGAGCACCTACAATGTGCTGGTGTAGGTCC
 TGGGAGTTAAGGAAGTATCAGAGGGTGCATTTAAGTGGGCATCTCTGGGT
 TAGGCTAAACAAATGGCCAAATGAGTGTAAAGTGGCCGTGTGTGTCTGAG
 TGTGCGTATGGGAGCCACCCGATGACCCAAGCTGCTGACCCCGTGTGCC
 CCTGGCCCAGGCCCTGGCCTGGCCTTTGTGCTTACCCACAGGCCATGAC
 CATGCTGCCTCTGTACCCTTCTGGTCTTCTCTTCTTCTTCTCATGCTTC
 TGACTCTCGGCCCTAGATAGCCAGGTGAGTCTCGTCTGTGGCAGCAGGCAC
 CCCGTGTGTGTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GTGTGTGTGGGATAGAATTCTGACCCCCAGCCCCCTCCTCTCTCCTCAG
 TTTGCTTTTCTGGAGACCATTGTGACAGCTGTGACAGATGAGTTCCATA
 CTACCTGCGGCCAAGAAGGCGGTGTTCTCAGGGCTCATCTGCGTGGCCA
 TGTACCTGATGGGGCTGATCCTCACCCTGATGTGAGTGGCGCTACAGGG
 AGGATGGCAGGTGGGCGGGACAAGGGCAGACGCTGCAACGAGATCTCTG
 GCCAGCTGAGCAGTTGCTGGGCCCCCTCCATCTTCTCTTTGCAAGGAA
 CCCAGTCCCTCCCCGGCCCTATCTCCAAGGGAGGCAGTTTGGCCTTGTG
 ATCCAGAGTCTGGCTGTGGAGATTTAGTCTGCAAGATCTGGGTTCAAAC
 CTGACTCCTGCCTTGTGAGGGGGCTTCAGGATAAATGATTTCCCCTCC
 TGTCTTGGGACTCAGATAAGACAAGGCCTAGAAGGGCTGGGCTGGCAGCC
 AGTGGTACCCTGTCACTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TTCTTGGCAGGAGAAGGGGCTGTAGCAGAGAACGAGGCCCAAGGAGGGGA
 CACCAGAAGTGTGCTTGTGTTTTAGGGGGGCATGTACTGGCTGGTCTTCT
 TGGATGACTACAGCGCCAGCTTCGGGCTGATGGTGGTGGTTATCACCAG
 TGCCTTGGCGTGACACGGGTGTATGGTGAGAAGAGCCGTGGGAAGTGGAG
 TCGAGCTCTCCGAGTGGGAGAATGGGAGTCTACCCTGGGGAGCCCCAGT
 ACCTGGGTCCCTGGTCCAAGGGCCAGGGTTTTCCAGTGGGGGACGCTGGG

10

20

30

40

50

GTAGAGGAGGGGCTGCTGGCGTTTGTGGGGCCGGCGGGTGGGGCCATTCC
 TCCTCCCCCTCCCCGTGTCAGGCATTCAGAGGTTCTGCCGAGACATCCACA
 TGATGCTGGGCTTCAAGCCGGGCTCTACTTCAGGGCTGCTGGCTGTTT
 CTGTCCCCAGCCACGCTCTTGGTAACTGGGGAGGGCGGGAGGGTTCTGG
 CTGGGGCCCCAGAATTGAAAGCGGGAGTCCCCTCTGCACGTTCACTCTGG
 TAGGGCCACCCTGGCCCCGAGTGGAGGGCTGTGGGGTGGCCACCAGAATC
 CTAGTCCATCCCCCTCCCCGTGATGTTCCCAGCTTCTGTAGCTGTGCTGGGC
 CTGGCCCTAGTTCAGTTGGTTAAATGCGTGGGTCTTTCCCAGGCCCCAGG
 GCCTCAGGATTGGAGCCTTTAGGCTGTGATTTCTGTCTTGGGGTTAGAGC
 AGCTAAGGGTCTGGGGTGCCTCAGAAATGGCTTGTGCAGGCCCTGGTGT
 GGGTCAGCTTCAAGATGGGCTGGCTAAACCCTCAAAGGCTCCAAAGATGG
 CCCACTTCAGGGTTTCGGTACAGCTTAGGATCCTGGGTAGCTCTGGGCTGG
 ACTGTCTCAGGCCCTTGGGCTGGCACTAGGCTGGGCTACCTCGGGCCTTAA
 GCAGTTTATAGACAAAAGCCCGCAGTGTGCTGGGAGTCCCACCTCTGCAGG
 CCCTCATGGTGTATAGCATCGTCAAGTACCAGCCCTCGGAGTATGGCAGT
 TACCGCTTCCC GCCCTGGGCTGAGCTGCTGGGCATCCTGATGGGCCCTGCT
 GTCCTGCCTCATGATCCCAGCTGGCATGCTGGTGGCTGTGCTTCGAGAAG
 AGGGCTCACTCTGGGAGGTGAGTCTGCCACCCTGTCCACTCTCAGCCTT
 CCTGACCTGTGGCCTGACCCTAGGTCCCCCTGCTAGAACAGAAAACATAT
 GCACCCACCCCTTATCCAGCTTCTTTTAGCCTGAGGAGACTTGCCTGGGC
 TGAGGCAGATTACAGGGCTGGAGTCTGCCCTGTGGCACTTTGTACCACA
 TGAAGCCTTAGGGGAGTGGGTGGCACAATCTAAAGACCCTGTTAACCAG
 GAACTGGCCCCAGGTCCCACCGTGGGTTGGGGGTGTGTCAGGTCTTGAAC
 TCAGGTCAACCAGCCCAGAGCTTGCTTCTGGAACCTCAGGGTCAAATGGCGA
 CAGTGAGGGACCCAGAGGGCAGGCTATCACCTACTCCCGTGGCCAGGA
 GTCTGTGTGTCCCCTGGTGGCCCGGATAGAATGATGGTGTGAGCCC
 TGCCACGCCTAGGGTTTTGGGGAGGGACTCAGACAAACAGAGAGAGTGC
 ACTCTGCCACAGGGTCTGAGGCCTTGAAGAGAGGAGTAGTGACCCTTTG
 TGGCCAGCAGAAGTGGTGTGGTCTGAGCCTCATTGCACCCTCTGAACAC
 TGAGGCCAGCACTTCTGCCGCCGCTGGTGTGGAGTCTCCGGTGGCAAGA
 GACCATCATCATGAATGCAGCTTTAGTGAGCCCCGATGGATGGCATCCAGA
 GAGAGCCTGGAGGACCCACAACATACACATCCCACCAGAAGTGTGCTGG
 AGCCAGCTAGCACTGGTTCATCCTTAAATATTAGGAATGTGTGAGCTAG
 GTGTTCAACCATTTGGTAGCTAGGAATTTGGCAATGGTGGAGATATTTACAC
 CACAGAAAATGGCTACAAAGCGGGCCTCCCTTGCACCCACCCACAGTC
 TGCTTACCAGCACACTACTGCCTCTCCTCCACTTCCCCCGTGTAGCTCCT
 GCCCCCTAGCTCCCCACCACAAGGCTCCACCTGCAGGGGTTGCTCAGGA
 GGCAGAAGTGGTTTTATGCCTCCCCATCCTGCTGCCAGACCACAGGGGCA
 CCCTGGAGTCTAGCCTCTGCCTGCTCCAATTGCTGTGTGACTTGGGGC
 AAACCTCCTTCCCTTCTCTGAACCTCAGGAGCTCCACCTCTGCTCCTTGT
 TGAGAGCCAGGGTACCTGCAAAGGGAGGGAAGAGAGGGGAGTTGCTTAGG
 GGGGAGGCTCCAGCTCCCAGGAAGCTCATGGTCCCAAGCCTTGTAAATG
 AGCCACTAGGAGTGTGGGCTCTCCAGCAGTACCACCGCCCCGCTGCC
 TGCTGCCCTGCTGCCCTGTCCACAGCCAGGTGGAAGGGGCATGTTTTGG
 GGGGCTCGAGAGCTGTGGTGTGAGCACTGCGGAAGAGGCATTCCCCAGCTCA
 GGAATGCCAGCTTCCAGAGGCCAGGGCTTCCAGCACTGACCCTAGGATCAG
 AATCCTGCCTCTGCCATTTGCCAGCCTCGCGGCCCTAAGCAAGTTACTGC
 ACTTCCCTGAACCTCAGCTTCTGTCTTTATTTTATTTTATTTATTT
 ATTTTTTTTGTGAGACAGAGTGTGCTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCA
 GTGCAGTGGAGACAGTAAGCATAGTATCCAATAGGCAGGTTTTTTTGTCT
 TTTTTTGTGTTGTGTTTTGAGACAGAGTTTCACTTTTGTACCCAGGCTGGG
 GTGCAGTGACGCCATCTGGGCTCACTGCAACCTCCGCCCTCCGGGTTCAA
 GTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATGACAAGCACCTGC
 CACCACGTCCAGCTAATTTCTGTATTTTTAGTAGAAACAGGACCAGGCTG
 GTCTTAAACTCCTGGCCTCAAGTGTATCCGCGCACTTCGGCCTCCCAAAGT
 GCTGGGATTAAGTGTCTTTGTCTTTAAAATGGAGAGAGTGATACCTACTT
 TTAGGCCTGTTATGAGAAGAAAAGAAGTTTATCAATATAGTCTGCATTGT
 GAAAGGCAGAAAAGCAAAATATTTTAAAGGTTTCAAGGATGGAGTCAAGGACG
 GGTTCAAATCCCAACGCCACCCTTCCACCTGTGTGACCTTGGCCAACCT
 TAACTGATCTCTCTGAGCTTTAATACTCAGATAATATCAGTGGGGCGGA
 TGGTAAAAGTACTAATACCCCTCTCATTAGGACACTGTAAAGATTAATTT

10

20

30

40

50

AGCCAATGCTTAGCACAGAGCTGGAGTGCAC TGGGTGCTCAATTTTAGGC
 CAGGGGTTCTCACAGGGGTGATTTTGCCCTTGGGGGACATTTGGCAATG
 TCTGGAGACATTGTTGGTTGTCTGGAGGGGAGAGGGATACAAGGAGGGG
 TGCTCCTGTCTAGTGGGCAGAGTTCAGAGATGCTGCTAAACAACCTT
 CCATGCGCAGGACAGCCCCATAACACAGAATCCTCTAGACCGAAATGTC
 AGGAGCACTCAGGTTAAGAACTGGTCTGAGCACCCCGTTTTTCAGCTGG
 AAACAAACCTAAGTCCTTGTCTCAGGGAGCTTGTATTTATTGTGGGGG
 ACAGGCAATAAAGAAATATGTAAAGGTAAGTTCGCAC'TAAAAA
 GGAGTACAGGAATAAATGGAGAGTGGTACTTTGGCCAGGATGGTCAGAGA
 AGACCTCTCTGAGGAGGTGGCACCTGACTAACCGGACAGGGTGATCCATG
 TAGGTATCTAGGGTAAGAGCATTCCAGGCAGAAAGGCAACACGTGCAAAG
 GCCCTGAGGCTGGGGGCTGGCATGTTTAAGAACAGCATGGAGGCCAGTGC
 TGCGGCTGGAGCAGAGGGGGTGGAGAGAACTGGTGGAGCTGATATCAGGG
 AGGTAGGCAGGGGCCAGGAGCTGGAGGCCCTGGTGCACACTTTGGATTTC
 ATTTCCAGTGAGATGTGCAGCCATTGGCAGGCTTCTGAGCAGTGGGGTAG
 CATCGTTCAACACATCTTCTAAGTATCAC'TGTGCTGTGAGTACCGAGC
 TGTGGGAGACCCCGCTAAAGGCATCACACATGGTATCTCCCTCGGAACC
 TGCCCAGTGGGCTGCCCAAATGTTAATTGCCCTCCTTTCTTTAAGGACACA
 GGGGCTCCCTCTTCTCCCTGGCATGACAGGCAGAGGGATTGGGAATGTG
 GTTGAGGAAGAAGGAACCTGGAATCTCCAGGCTTAGTCATTATCTTAGT
 CACCCCGACTCCGTCCATGGAACTGGGGCTCTACAAGGGAAAGGTCAGA
 GGCAGAAGGAGGCAGGTCGGGGCTGGAAGAAACCGGAAAGCCAGCTGCA
 AGCCCACCGCAGTTCTCCCGGTTTATGGCTCTTTTCCAAAAGCCCCAGC
 TCCTTAAGATTAGCATTTAGGGGAAGGCTCCCGGATTGGCATTAGACA
 CTCTGAGGAGGGGGCCCGCGCTAATTATAGCAACAGCCGCCACTTCCCA
 GGCCTTACCCTGTTCCAGCACCCTGCTAAGTGCCTCATCTCAGTGCCTT
 CACAACAACCCTGTGACAGGACTGGGATTCCCGAATTACAGACCAGGAAG
 CAGAGCACCCAGAGCCGAGCGGCATTGCCAAGAGCCATCCAGCTTGCAAG
 TGGTAGAACAGGATTCTCACCCAGGCAGGTGGATCCCTCCCTGGGGAAG
 TCATAGTGGCCCCACTTCCCCGCCAGGGGGCTGTGGCCAGGACTCCCC
 AGTGTGTGGTCAAGTGTGCTGGGTGTCTGGCCACAGTGAACCTTCCA
 CCAGCGCTGCCTGTTTCTGTTTTCTACTGCTCTCGTTGCTTTGCTGCAGC
 GGCTCCAACAGGCCAGCCGGCCGGCCATGGACTGGGGACCATCGCTGGAG
 GAGAACCAGGACGGGCATGTATGTGGCCACGCTGGCTGGGAGCCAGTCACC
 AAAGCCACTGATGGTGCACATGCGCAAGTACGGGGGCATCACCAGCTTCG
 AGAACACGGCCATCGAGGTGGACCGTGAGATTGCAGAGGAGGAGGAGTCG
 ATGATGTGAGGCAGGAGGCAGGCGGGCAGAAGGCCCTGCCCGGGACCTCA
 CAGTCCCTTCTTAGAAGCCTGCAAAGGTGAGCTGTGCCCTCTGGGATTCT
 GAGAGGCT

10

20

30

配列番号:2 SCL6A7タンパク質の配列(NP_055043)

1 mkkllqgahlr kpvtpdllmt psdqgdvld vdfaahrgnw tgkldflsc igycvglgnv 61
 wrfpyraytn gggaflvpyf lmlaicgipl fflslslgqf sslgplavwk isplfkaga 121
 amllivglva iyynmiaiyv lfylfaslts dlpwehcgw wntelclehr vskdngalp 181
 lnlctvsvs eeywsryvlh iqgsqgigsp geirwnlcll lllawvivfl cilkgvkssg 241
 kvvyftatfp ylillmllvr gvtlpgawkg iqfyltpqfh hllsskvwie aalqifyslg 301
 vqfgglltfa syntfhqniy rdtfivtlgn aitsilagfa ifsvlgymsq elgvpvdqva 361
 kagpglafvv ypqamtmlpl spfwsflfff mlltlgltdsq fafletivta vtdefpylr 421
 pkkavfsgli cvamylmgli lttddgmywl vliddysasf glmvvvittc lavtrvygiq 481
 rfcrdihmml gfkpglyfra cwlflspatl lallvysivk yqpseygsyr fppwaellgi 541
 lmgllsclmi pagmlvavlr eegslwerlq qasrpamdwg psleenrtgm yvatlagsqs 601
 pkplmvhmrk yggitsfent aievdreiae eeesmm

40

配列番号:3 SNP3の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

ATGTTCTTAA AATCACGGGA Acttaatttt tagagattta tttaaagat ttaggggtaa
 aaagtcataa tatctataat ttccttcaaa ttagcataaa aatagataaa gcaaacagca
 aatggttaac acttgттаат tttaggtggg gggatgtat ctatcacatt atagtatttt
 tctatagttt tgaaactttt tatgaaaaaa aGTTAAAAAA AATgattgct tgaggccagg
 agttcaagac cagcctgggc aacatagcat gacctctgct tcaaaaaaaaa aaaaaaatta
 actaggcatg gtgggtggcta ctcaggaggc taaggcagga ggattgctta agcccaggag
 tacgaggata cactgagcta tgatcatgcc actgtactcc agcctgggca acaaagcaag
 acctcatctt tttaaaaaaaa gtgaaaacaa aaaaaaCTCT GGAACTAATG GTGCCAAGGT
 CCCTTCCAGA TACACCACTG

10

R

TGCATGGATG ACTAGTTATA GTCTCCTTCT TAAGGATGTC TGGAATTTCA TCCAGAGTCC
 CCAAGTCAAT AGCATCCGGG AAGGGGCTCC ACAGTCTTTT CTGATTATG ACCAGTAGCC
 CCTAGGCCCA GATTGGAGAA AGCCACAAAG GTTCAAATC TCAGCCATCT AAGTGTGCC
 TCTCCTTGAA GACTCAACCA

配列番号:4 SNP4の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

20

GGGTGGGAGG CCCCTTCTT CAGGTCCCAC TCCTGGCTGG GACACTGGCA TGGCCATTGA
 TCAAGGCCTT GGTCACAG AGTGGCAGCC CCACCAGACA GGAGGGGCAT AGACTTTGAG
 AGAGAAGGAA AATCCAAGCC ACAGTCCGGA TGGCCGATGG GAGGCAAGCC CCCAGCCCTC
 TCCTATACTC ACCTGGTTCA

Y

GGTGGGAATA GAGGGCACTA GAGCTGGGCT GGGCTCCGGT GTTAGACATC GGGGGTCTTT
 GTTCAGCCCC GCCTGCCTTC TGAGCTCCTC TGCCTGGGG ACCACATGGT ACAGCTGTAG
 TTTCCAGCC GGCACATACC CACGATGTCC TAGGGAGCAT GCAGAAGGTT AGCAGGCTGC
 GGGCCACCTT CCCGTCCCTT

30

配列番号:5 SNP5の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

GTGGCCTGGG AGACAGCGGG CATTATTAG TAATGGTGGG CACCTGAGGC TTGGGAAAGA
 ACCAGGGTTC CAAGAGTAGA GGGGGAGGGG CTGGTGAAAA GGCGGCTGGC CCGGACTGAA
 TAGAGTTTTT TGATCTTCAA AAAAATATgc tctgtgacc tagggtaact gcttcccctc
 tttgggcccg cattgcccga tctgtaaact tggggaagtt gTCTACCAGA AAGAAATAAC
 TCTGGTCAAG TAAGTTTGGG AAATCCTGCT GAAGCCACTT CTCTGATAGA GTCACAGTGG
 GCCATTAGCA CATCAAAGTC TCTGACAAGC CCCACAGCAA AGAAACCCCT TGAATTTTCT
 TTCATCTGGC CTTCCCCGTG CTTTGCTACC TAGGAGGCC CTACTCACAC CTCC

40

S

AGCATCCCAC TGAACTCCAC AACTCTGCA GTGCTGGGAT GTTCAGGCTG GAGGGCCTCA
 CCTTCTCTGT GTCTCagtat ttagcagcag gttttgtcgt caaatggcct ggatttcagc
 gtgactactt ccaaactgca agacttcagg caagttactt agcttcttgg agcctcggcc

50

tccgcatgtg tcaaatggaa ataaaatagt ctaactgagc ttagaattgt GTTTCGCTCA
 GGGCCAGCA CATAAGAAGT GCCTGTTTTT GAGCCACCTG CTCACGGGGC TGCTGCTGCA
 TCCCAGTGTG AGAGGCTGGC AGGCGTGGCT GATGTTCTAC CCACCTGAAG GAGGA

配列番号:6 SNP6の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

GTCGCACAGC AAAGACGACG CAGGgggggtg ggctgttagt gttccttgcc caactgtgga
 aagggagtcc cagagagggc aggtcgttg cccaaggtca cgcagAAAGC CGAGGGTTTC
 CGTCGCGAAC CCCCCTCCCC ACTCGCTCAG GGCTCTCCAA TCCGCAGCTC TGCGTGCGGG
 GGCGCGCGCA TCCCCCGCC GTCCGTCCGT CAGCTGTCTG TCTGGGTGTC TATGCGGGCG
 CAGCAGTGCA CCCTTCCCCA GCCTCGGGCG CTGCGCAGGG ACAGACAAGG C

10

R

TTCGCAGCGC CCTGCCCGCG CTCCACGCC GCAGCCGCCA GACGGCAGCG CCTGCGTCCG
 TGCCCGCCCC AGCCGGTGCG CGGGAGCCGC GGGGGCAAAG GCGCAGTGGC CAGCGGACCA
 TCTCTCGTGC CCTCGCTCTC TGCGTCCGG GGCAGCTGAG CCCC GGCCAC CCGCTCTCCA
 AGATGAAGAA GCTCCAGGGA

20

配列番号:7 SNP7の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

GCCAGGAGCT GATTGCCGGG TGTGGGGGGT ATTGGAATAC CTGAGCGTTG AGCTGGACTC
 ATCTGAGGGG TGGGGAGTGG GAGGCGGTCA TCCATACTGA AGCCGGCTCC CTGAGCCTGC
 GGAAGACTC TCCCTTTTCC TGCTGCTCC CTCCCCGCC CTTAGCTTG CCTGCTGAGA
 CCCCAGGCTG CCCCTCAGCA GGGCTGAAGG GAGGCAAAGA CAGGGAGGGG GCTATCGGAG
 GCAGGAGGAT ATGATCAATG AAGATGGAAG CTGGTATGGG AGAGTGGC

Y

GTGGGCCAG ACCTCAGGCT CTCCCTACCT TGCCTTGTGG GATTGGACCT CTCAGCCAAG
 CTGTCAGGAT ATGGGGAGGG GGAATACTGG GGGACGTTTT CTGGCTTGTA CCAGTCCTAA
 CTAAGgagtc agatctcctg aatactatth ctgccgctgc cacttgccctg gtgactttgg
 acaagttCAT TCTCTAACCT GAACCTCCTC TGGCTAAGCC CTAGCCTGGA GGCACCAAAA
 CAGGCCCCAC TGGGTGTGTG AGGTGTGGGG AAGAATGCTA AAGGGCTGGT AGATGTGAGA
 AGACTGTTCT CAGGGGCTGG TGTTATCAAC CTCCCTacat acacacacat tcacactcac
 actcactcac acacacacTC ATTCATTCAA GTTCTCTGCT CTGGGGCA

30

配列番号:8 SNP8の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

TGGCCTCCGC TCCCCTCTGG GCATGCATCT CCTCTCCAGG GACAGCAAGA TTATGACTTT
 CTGA

S

ACAGATCACG GCTTAAGTAC CTTCTTCTG CTCATGAGCC AAAATTCACA AAATTCACCC
 AGCCCTCAGG CTCTCCCTAC CTTGCCTGGT GGGGTTTGAC CCCCCAGCC AAGCTGTCAG
 CATGCGGGGA GGGGGAGTAT TGGGGAAGTT TTCTGGCTTG TGAAGTAAAA GTACCAGTCC

40

TAACCAAGGA GTCAGATCTC CTTGGTTCTT AGTAGGCCCC ATTTGAGCCA CGGAGCATCA
 GTGGATTCCC TCCCTCAGGG GAACCCCCAG GTCCCTCCAA GTCCCTCCTT TTCTATGCTG
 AGGGCTCCCA GCTTCTTTCT GTTGTCTCC TATCACCTCT TTTCCTGAAC ACCCTCCAGC
 CTGGCCACCT GCCCTTTGGA CATGCTCCAT ATTTGTCTGCA TCTTTCTTAA AATATGGTGC
 CCGGAACGGA GGAACAAAAC TCCAGCACTG GTGGGTGAAG GAGACCTGGC TTTCGCATCA
 GGAAGCCTTG GGCTCCAGAC CTAGTTCTTC CACTCACCAA CCTGGTAGAA ACCTCGG

配列番号:9 SNP9の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

10

GGCCTGGCTT TGGATAGGTG CCCACGGGGG AAGGAGGAGA GGGCGGTGAA CCCCTCCTT
 Y
 CAGCCCAGG TTATGATAAA ACACTTCCAA CTAATTCTGC CCAAGGTCGC CTAGGAGGGG

配列番号:10 SNP10の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

AGAGATAGGA CTATAATAGA GTAAGGGACT GTCATCAGAA TTAAACAACA TAATGCAGGT
 GAAACCATTA TCACGGTGCT GGGCACACAG TGGGTCCTGG GAATGGTGGG TGTCGGAAGG
 ACGTTGCACT CATCAGCCTA TCCCAATGCC CCATTTTATG GTCAATAAAA CAAAGCCTTG
 TCACTGCATT CTGCCTTTaa aagaagaaag agaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag
 aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaagaa agaaagagaa agaaagaaag aaagaaagaa
 agCAAAGCCC AGAGGCTTGC TCAGTATTGC TCAGTAATTA GTGACAGAGA TGGTATTGAC
 ACTAAGGACT CCTGAGTCCT GATCCTGTTT TGGAACATTC TAAAATAGCC TGGTCCCTAG
 GTGGGACTGT TGGCTGGCCA GAGAACACAG ACCCTATAAC CCCCATCCCT TACCTATAAA
 GGACTGCTGT TAGGAGATTT CTCCCAGATA GGCTCC

20

R

30

TGTCTTGAAA TGTTTTGGTC TTTAACCTGC CTGTAGTACA TAGTTCATTC ATTTGTCCAC
 TTCAAGTCCA TCTGAAGTGT CCGCACCTGC TGAAGAGTTT ATCTGACCAG TGGGAAAGAA
 TCAGCCTGAG TTTGCAGCTT AAAGCCAAAG GATTTGATAC AATCACTGGC A

配列番号:11 SNP12の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

TTCTGACCT GTGGCCTGAC CCTAGGTCCC CCTGCTAGAA CAGAAAACAT ATGCACCCAC
 CCCTTATCCA GCTTCTTTTA GCCTGAGGAG ACTTGCCTGG GCTGAGGCAG ATTCAGGGGC
 TGGAGTCTTG CCCTGTGGCA CTTTGTACCA CATGAAGCCT TAGGGGAGTG GGTGGCACAA
 TCTAAAGACC ACTGTTAACC AGGAACTGGC CCCAG

40

R

TCCCACCGTG GGTGGGGGT GTGTCAGGTC TTGAACTCAG GTCACCAGCC CAGAGCTTGC
 TTCTGGAAC CAGGGTCAA TGGCGACAGT GAGGGACCCC AGAGGGCAGG CTATCACCCCT
 ACTCCCGTGC CCAGGAGTCC TGCTGTGTCC CACTGGTGGC CCGGGATAGA ATGATGGTGT
 GAGCCCTGCC CACGCCTAGG GTTTTGGGGA GGGACTCAGA CAAACAGAGA GAGTGCCTC

TGCCACAGGG TCTGAGGCCT T

配列番号:12 SNP14の遺伝子型決定に使用したプローブの配列

GGGTTACCCC CTGTGCCAGA ACTAGAGAGT GGCTTGGCGC TGGCTTTCAC TGGAAAGGGCA
CCAGAGGATG ATGGGAGCTG AAGAGAGGAG CGACACTCAC ATCATAGGCG CCGGCTTTGA
TCTGCTGGTA CAGGCGGTGC TGGTCCTCAT CCCAGAACGG GGGGTACCCA ACCAGCAGGA
TGTACAGGAT GACCCCTGGA

R

AGAGGACCAG AGAACCTTCA ACCCCCTGTG GGGAGGAGAC ATGGGGGGAG GGGAGTGATG
GGAAAGGAGA GAGGGGGCCC CAGAGGCCGG GGTGCAGCCA GGGGCACAAA AGGGCCTTAG
GATGAACTCA CCACAAGCCC ACAGGTCCAC AGGCTTCCCG TACGGGTCCT TCCGCAGCAC
TTCTGGGGAG AGATATCCAG

10

【 0 1 8 9 】

【表 9】
参考文献

Asperger (1944) Die autistischen Psychopathen im Kindesalter. Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, 2:217-250.

Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, et al. (1995) Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. Psychol Med, 25:63-77. 10

Bailey A, Phillips W, Rutter M (1996) Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. J Child Psychol Psychiatry 37(1):89-126.

Baird G, Charman T, Baron-Cohen S et al. (2000) A screening instrument for autism at 18 months of age: a 6-year follow-up study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 39(6):694-702. 20

Burger R and Warren R (1998) Possible immunogenetic basis for autism. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 4:137-141.

Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA et al. (2003) Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. Pediatr Neurol, 28(3):205-211.

Chakrabarti S and Fombonne E (2001) Pervasive developmental disorders in preschool children. JAMA, 285(24):3093-9 30

Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH et al. (1999) Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. J Child Neurol, 14(6):388-394.

Connolly AM, Chez MG, Pestronk A et al. (1999) Serum autoantibodies to brain in Landau-Kleffner variant, autism, and other neurologic disorders. J Pediatr, 134(5):607-613. 40

Crump FT, Fremeau RT, Craig AM (1999) Localization of the brain-specific high-affinity l-proline transporter in cultured hippocampal neurons: molecular heterogeneity of synaptic terminals. Mol Cell Neurosci, 13(1):25-39.

Fatemi SH, Halt AR, Stary JM et al. (2002) Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. Biol Psychiatry, 52(8):805-810.

- Folstein S and Rutter M (1977) Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry Allied Disciplines*, 18:297-321.
- Folstein SE and Rosen-Sheidley BR (2001) *Nat Rev Genet*, 2:943-955.
- Freneau RT, Velaz-Faircloth M, Miller JW et al. (1996) A novel nonopioid action of enkephalins: competitive inhibition of the mammalian brain high affinity L-proline transporter. *Mol Pharm* 10 49(6):1033-1041.
- Galli A, Jayanthi LD, Ramsey IS et al. (1999) L-proline and L-pipecolate induce enkephalin-sensitive currents in human embryonic kidney 293 cells transfected with the high-affinity mammalian brain L-proline transporter. *J Neurosci*, 19(15):6290-6297.
- Gillberg C (1998) Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord*, 28(5):415-425. 20
- Gillberg C and Wing L (1999) Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatr Scand*, 99:339-406.
- Gillberg C and Coleman M (2000) *The biology of the autistic syndromes*, 3rd edn London: MacKeith Press.
- Hussman JP (2001) Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies 30 of autism. *J Autism Dev Disord*, 31(2):247-248.
- Jamain S, Quach H, Betancur C et al. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34(1):27-29.
- Jayanthi LD, Wilson JJ, Montalvo J et al. (2000) Differential regulation of mammalian brain-specific proline transporter by calcium and calcium-dependent protein kinases. *Br J Pharmacol*, 40 129(3):465-470.
- Jorde LB, Mason-Brothers A, Waldmann R et al. (1990) The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism: genealogical analysis of familial aggregation. *Am J Med Genet*, 36(1):85-88.

Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo ER et al. (1991) Complex segregation analysis of autism. *Am J Hum Genet*, 49(5):932-938.

Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2:217-250.

Lander E and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11(3):241-247.

10

Le Couteur A, Rutter M, Lord C et al. (1989) Autism diagnostic interview: a standardized investigator-based instrument. *J Autism Dev Disord*, 19(3):363-387.

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 24(5):659-685.

20

Nelson KB (1991) Prenatal and perinatal factors in the etiology of autism. *Pediatrics*, 87(5 Pt 2):761-766.

Nilsson M, Waters S, Waters N et al. (2001) A behavioural pattern analysis of hypoglutamatergic mice--effects of four different antipsychotic agents. *J Neural Transm*, 108(10):1181-1196.

Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW et al. (2001) Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology*, 57(9):1618-1628.

30

Renick SE, Kleven DT, Chan J et al. (1999) The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. *J Neurosci*, 19(1):21-33.

Rodier P and Hyman S (1998) Early environmental factors in autism. *Mental Retard Dev Disord Res Rev*, 4:121-128.

40

Singh VK, Warren RP, Odell JD et al. (1993) Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. *Brain Behav Immun*, 7(1):97-103.

Smalley SL (1997) Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet*, 60(6):1276-1282.

Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L et al. (1989) A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry*, 30(3):405-416.

Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L et al. (1998) Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord*, 28(5):351-368.

10

Weizman A, Weizman R, Szekely GA et al. (1982) Abnormal immune response to brain tissue antigen in the syndrome of autism. *Am J Psychiatry*, 139(11):1462-1465.

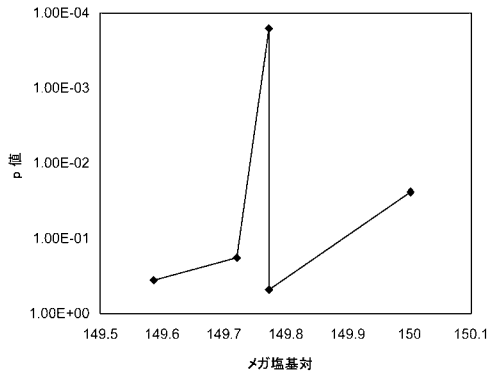
【図面の簡単な説明】

【 0 1 9 0 】

【図1】 Genomic Hybrid Identity Profiling (GenomeHIP) を使用した高密度マッピングである。ヒトゲノム全体を代表するクローンの間の平均間隔が 1.2メガ塩基対である合計 2263個の BACクローンを、GenomeHIPを使用して連鎖について検査した。x軸の各点は、クローンに対応する。オリエンテーションをよりよくするためにいくつかのクローンをライブラリー名で示した(例えば FE0DBACA19ZG04)。ヒト第5染色体上の 149772850塩基対から始まり 149921225塩基対までの領域にわたるクローン FE0DBACA28ZH06 (p値 1.64×10^{-4}) について連鎖を示唆する証拠が計算された。ゲノム全体の選別について Lander および Kruglyak (1995) によって提唱された連鎖を示唆する有意水準に対応する p値 7.0×10^{-4} を有意水準として使用した。

20

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB2004/002995
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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) IPC 7 C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/58082 A (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 23 December 1998 (1998-12-23) pages 8-16	1-8, 16-30
X	WO 99/55915 A (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE S) 4 November 1999 (1999-11-04) abstract; claims 1-30	1-8, 16-30
X	WO 00/68433 A (CHILDREN'S HOSPITAL OF LOS ANGELES; PETERS, JULIUS; WAIDYARATNE, N., S) 16 November 2000 (2000-11-16) abstract; claims 1-15	1-8, 16-30
X	WO 03/045998 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE; INSTITUT PASTEUR; AS) 5 June 2003 (2003-06-05) abstract; claims 1-71	1-8, 16-30
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 April 2005		Date of mailing of the international search report 14 -07- 2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/JP2004/002995

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/039342 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC; SILOS-SANTIAGO, INMACULADA) 15 May 2003 (2003-05-15) page 35, line 15 - page 42, line 10 page 31, line 10 - page 33, line 12 page 33, line 13 - page 34, line 9 -----	9,10,12, 14,15
X	DATABASE DBSNP [Online] NCBI; 20 October 2000 (2000-10-20), TSC-CSHL: "ss2372053 Fasta sequence" XP002323917 retrieved from HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/SNP/SNP_SS.CGI ?SUBSNP_ID=2372053 Database accession no. SS2372053 abstract -----	11,13
P,X	DATABASE DBSNP [Online] NCBI; 20 February 2004 (2004-02-20), CSHL-HUDD-: "ss19638392 Fasta sequence" XP002323918 retrieved from HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/SNP/SNP_SS.CGI ?SUBSNP_ID=19638392 Database accession no. SS19638392 abstract -----	11,13
A	LAMB JANINE A ET AL: "Autism: Recent molecular genetic advances" HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 9, no. 6 Spec. Review Issue, 12 April 2000 (2000-04-12), pages 861-868, XP002323914 ISSN: 0964-6906 the whole document -----	
A	PHILIPPE ANNE ET AL: "Genome-wide scan for autism susceptibility genes" HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 8, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 805-812, XP002323915 ISSN: 0964-6906 the whole document -----	
A	TURNER MARTHA ET AL: "Genetic clues to the biological basis of autism" MOLECULAR MEDICINE TODAY, vol. 6, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 238-244, XP002323919 ISSN: 1357-4310 the whole document -----	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte 101 Application No
PCT/IB2004/002995

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	SHASTRY B S: "Molecular genetics of autism spectrum disorders" JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 48, no. 10, 2003, pages 495-501, XP002315920 the whole document	
T	JAMAIN S ET AL: "Genetics of autism: From genome scans to candidate genes" MEDECINE/SCIENCES 2003 FRANCE, vol. 19, no. 11, 2003, pages 1081-1090, XP002323916 ISSN: 0767-0974 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/002995

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9858082	A	23-12-1998	US 6228582 B1	08-05-2001
			WO 9858082 A1	23-12-1998
			US 2002155450 A1	24-10-2002
WO 9955915	A	04-11-1999	AU 3773099 A	16-11-1999
			WO 9955915 A2	04-11-1999
			US 6566061 B1	20-05-2003
WO 0068433	A	16-11-2000	AU 4989700 A	21-11-2000
			WO 0068433 A2	16-11-2000
WO 03045998	A	05-06-2003	CA 2364106 A1	30-05-2003
			AU 2002364808 A1	10-06-2003
			CA 2409500 A1	30-05-2003
			EP 1453861 A2	08-09-2004
			WO 03045998 A2	05-06-2003
			US 2005118588 A1	02-06-2005
WO 03039342	A	15-05-2003	EP 1517912 A2	30-03-2005
			JP 2005509416 T	14-04-2005
			WO 03039342 A2	15-05-2003
			US 2003152970 A1	14-08-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 フィリッピ, アン

フランス国、エフ - 7 7 3 1 0 サン・ファルゴー・ポンティエリー、レジダンス・デュ・ブリユール 8

(72) 発明者 ロッシュマン, エルケ

ドイツ国、8 9 1 7 9 バイマーシュテッテン、シラーシュトラッセ 1 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA02 CA09 DA06 EA04 GA11 HA03
HA14
4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ43 QQ52 QQ79 QR08
QR32 QR48 QR56 QR62 QR77 QR80 QS25 QS32 QS34 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA23 MA01 NA14 ZA012 ZA022
ZA052 ZA062 ZA122 ZA152 ZA182 ZB072 ZB212 ZC212
4C085 AA13 AA14 CC32 DD88 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02
ZA05 ZA06 ZA12 ZA15 ZA18 ZB07 ZB21 ZC21
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA21 EA28 EA50
FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	人类孤独症易感基因及其应用		
公开(公告)号	JP2007503210A	公开(公告)日	2007-02-22
申请号	JP2006524467	申请日	2004-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	英特盖根公司		
申请(专利权)人(译)	安特节吉恩		
[标]发明人	ハーガーヨルク フィリッピアン ロッシュマンエルケ		
发明人	ハーガー,ヨルク フィリッピ,アン ロッシュマン,エルケ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/18 C12Q1/02 C07K14/47 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/28 A61P3/00 A61P37/02 G01N33/53 C12P21/08 A61K38/17 C12N15/12 G01N33/50		
CPC分类号	A61K38/1709 A61P3/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 G01N33/5008 G01N33/5023 G01N33/5058 G01N33/5091		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C07K16/18 C12Q1/02 C07K14/47 A61K37/02 A61K45/00 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/7088 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/28 A61P3/00 A61P37/02 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA182 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA06 4C086/ZA12 4C086/ZA15 4C086/ZA18 4C086/ZB07 4C086/ZB21 4C086/ZC21 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	60/496900 2003-08-22 US 60/496917 2003-08-22 US		
其他公开文献	JP2007503210A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了可用于诊断, 预防和治疗孤独症和相关疾病以及筛选治疗活性药物的人类孤独症易感基因的鉴定。本发明更具体地涉及以下事实: 染色体5上的SLC6A7基因及其预定等位基因与孤独症的易感性相关并成为治疗性干预的新靶点被披露。本发明涉及

SLC6A7基因和表达产物中的特定突变，以及基于这些突变的诊断工具。本发明，阿斯伯格综合征，广泛性发育障碍，智慧延迟，焦虑，抑郁，注意力缺陷多动障碍，语言发育迟缓，发脾气，代谢障碍，免疫功能紊乱，躁郁症等精神和神经疾病它可以用于倾向，检测，预防和/或治疗的诊断。

表 1

第 5 染色体ゲノム配列(Build34)におけるスカロイド位置	SNPの同一性	dbSNPの参照	多型	遺伝子座における位置および/或酸変化の型	配列番号 1 における位置
149023175	SNP3	rs1531236	C/T	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149037031	SNP4	rs3733660, rs1135093	A/G	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149594018	SNP5	rs6890699	C/G	SLC6A7 遺伝子座の 5'	
149598218	SNP6	rs3764886	A/G	5' UTR	289
149599057	SNP7	rs758590	C/T	イントロン	1128
149601459	SNP8	rs917585	C/G	イントロン	3530
149604212	SNP9	rs2240784	C/T	イントロン	5421
149606429	SNP10	rs758593	A/G	イントロン	8500
149613943	SNP12	rs3815375	A/G	イントロン	16014
149659923	SNP14	rs2288799	A/G	SLC6A7 遺伝子座の 3'	