

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 541862

(P2002 - 541862A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 9/06	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/06		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全160数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 612511(P2000 - 612511)

(86)(22)出願日 平成12年4月14日(2000.4.14)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月15日(2001.10.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/10004

(87)国際公開番号 W000/63434

(87)国際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(31)優先権主張番号 60/129,404

(32)優先日 平成11年4月15日(1999.4.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・ユタ・リサーチ・
ファウンデーション
アメリカ合衆国84108ユタ州ソルト・レイク
・シティ、アラピーン・ドライブ615番、ス
ウィート110

(71)出願人 イェール・ユニバーシティ
Y A L E U N I V E R S I T Y
アメリカ合衆国06536コネチカット州ニュー
・ヘイブン、コングレス・アベニュー295番

(72)発明者 ジェフリー・ダブリュー・アボット
アメリカ合衆国06536コネチカット州ニュー
・ヘイブン、コングレス・アベニュー295番

(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 M i n K 関連遺伝子、カリウムチャネル形成および心臓不整脈との相関

(57)【要約】

本発明は、イオンチャネルを形成する M i n - K に関連する遺伝子および遺伝子産物、および Q T 延長症候群 (L Q T) を含むイオンチャネル障害の診断方法に指向される。例えば、 K C N E 2 は I_{K_r} チャネルを形成し、 L Q T に関連する。 L Q T は、本発明により、試験されるべき個体の K C N E 2 の D N A 配列を解析し、各 D N A 配列を正常 K C N E 2 の既知の D N A 配列と比較することによって、診断される。また、試験されるべき個体のこれら M i n K 関連遺伝子は、 L Q T を含むイオンチャネル障害をもたらす変異についてスクリーニングすることもできる。 L Q T を含むイオンチャネル障害が予測できれば、開業医が現存する医学的療法を用いてこの疾患を予防することも可能となるであろう。本発明は、さらには、 H E R G および K C N E 2 (M i R P 1 としても知られている) タンパク質が集合して心臓の I_{K_r} カリウムチャネルを形成するという知見にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の：

(a) 配列番号：2に記載されたヒトMiRP1またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(b) 配列番号：4に記載されたラットMiRP1またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(c) 配列番号：6に記載されたヒトMiRP2またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(d) 配列番号：8に記載されたマウスMiRP2またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(e) 配列番号：10に記載されたヒトMiRP3またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(f) 配列番号：12に記載されたマウスMiRP3またはその相補体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸；

(g) ストリンジェント条件下で(a)～(f)のいずれかに記載された核酸にハイブリダイズする核酸および

(h) (a)～(f)のいずれかに記載された核酸に対して少なくとも90%の同一性を有する核酸よりなる群から選択される核酸を含む単離したDNA。

【請求項2】 本明細書に記載された変異を含む配列番号：2に記載されたポリペプチドをコードする単離したDNA。

【請求項3】 ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で請求項2記載のDNAに特異的にハイブリダイズする核酸プローブであって、ここに、該ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は該核酸プローブが配列番号：1に記載されたDNAにハイブリダイズすることを防ぐ該核酸プローブ。

【請求項4】 ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で請求項2記載のDNAに特異的にハイブリダイズする核酸プローブであって、ここに、該ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は該核酸プローブが配列番号：3に記載されたDNAにハイブリダイズすることを防ぐ該核酸プローブ。

【請求項5】 ストリンジェント条件下で請求項1記載のDNAまたはその

対立遺伝子変異体にハイブリダイズする対立遺伝子特異的プローブまたはプライマー。

【請求項6】 10～100塩基長である請求項5記載のプローブまたはプライマー。

【請求項7】 配列番号：2、4、6、8、10もしくは12またはそれらの対立遺伝子変異体、あるいはこれらのいずれかの相補体からの少なくとも10個の連続した塩基を含むことを特徴とする請求項6記載のプローブまたはプライマー。

【請求項8】 配列番号：2と最大限に整列させたとき、第22、25、161もしくは170番目の塩基を含む配列番号：2のサブ配列に、または配列番号：2の相補体中の対応するサブ配列もしくはその対立遺伝子変異体にハイブリダイズする対立遺伝子特異的プローブまたはプライマー。

【請求項9】 多型性部位を横切る単一塩基伸長反応を実行するのに適当なプライマーであって、該プライマーは配列番号：2のサブ配列またはその相補体にハイブリダイズし、ここに、該サブ配列は、22・25、161または170よりなる群から選択される塩基から5'に隣接する塩基および5'にて終止する該プライマー。

【請求項10】 QT延長症候群を引き起こす多型性を診断する方法であって、請求項3記載のプローブを、該プローブが該多型性を含む核酸へハイブリダイゼーションすることを許容するが、該プローブが配列番号：1の核酸へハイブリダイゼーションすることは防止するストリンジェント条件下で、DNAまたはRNAの患者の試料にハイブリダイズさせ、ここに、ハイブリダイゼーション信号の存在が該多型性の存在を示す該方法。

【請求項11】 該患者のDNAまたはRNAが増幅されており、該増幅DNAまたはRNAがハイブリダイズされることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】 ハイブリダイゼーションが、イン・サイチュで行われることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 QT延長症候群を引き起こすヒトKCNE2における多型

性の存在を診断する方法であって、該多型性の存在を同定する手段により行われ、ここに、該多型性は、変化したアミノ酸を持つ配列番号：2に記載されたKCNE2ポリペプチドの存在に起因するものであって、該変化したアミノ酸は本明細書に記載された群から選択される該方法。

【請求項14】 該手段が、(a)該多型性をアッセイする一本鎖コンホメーション多型性技術を用いること、(b)ヒトKCNE2を配列決定すること、および(c)RNAseアッセイを行うことからなる群から選択されることを特徴とする請求項13記載の方法。

【請求項15】 変異KCNE2ポリペプチドには結合するが、野生型KCNE2ポリペプチドには結合しない抗体であって、ここに、該変異KCNE2ポリペプチドが本明細書に記載した変化した配列を持つ配列番号：2に記載されたアミノ酸配列を有する該抗体。

【請求項16】 QT延長症候群を診断する方法であって、該方法は患者の試料を請求項15記載の抗体と反応させることによって患者における変異KCNE2ポリペプチドの存在をアッセイすることを含み、ここに、陽性反応の存在がQT延長症候群を示す該方法。

【請求項17】 該抗体がモノクローナル抗体である請求項16記載の方法。

【請求項18】 該アッセイが免疫プロットングおよび免疫細胞化学技術よりなる群から選択される請求項17記載の方法。

【請求項19】 以下の：

- (a) 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (b) 本明細書に記載された変異を持つ配列番号：2に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (c) 配列番号：4に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (d) 配列番号：6に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (e) 配列番号：8に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (f) 配列番号：10に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (g) 配列番号：12に記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド；

および

(h) (a) および (c) ~ (g) いずれかに記載のポリペプチドに対して少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドよりなる群から選択された単離されたポリペプチド。

【請求項20】 請求項19記載のポリペプチドに特異的な抗体。

【請求項21】 ポリクローナル抗体である請求項20記載の抗体。

【請求項22】 モノクローナル抗体である請求項20記載の抗体。

【請求項23】 ヒトにおけるQT延長症候群を診断する方法であって、該ヒトからのKCNE2ポリペプチドを配列決定するか、または、該ヒトからのポリペプチドから誘導された核酸から合成したKCNE2ポリペプチドを配列決定することを特徴とし、ここに、本明細書に記載された変異がQT延長症候群を示す該方法。

【請求項24】 KCNE2のエキソンを増幅する方法であって、プライマー対を用いることを特徴とする該方法。

【請求項25】 請求項1記載のDNAでトランスフェクトした細胞。

【請求項26】 請求項2記載のDNAでトランスフェクトした細胞。

【請求項27】 請求項1記載の単離したDNAを含むベクター。

【請求項28】 請求項2記載の単離したDNAを含むベクター。

【請求項29】 請求項27記載のベクターでトランスフェクトした細胞。

【請求項30】 請求項28記載のベクターでトランスフェクトした細胞。

【請求項31】 請求項1記載のDNAを含む非ヒト・トランスジェニック動物。

【請求項32】 請求項2記載のDNAを含む非ヒト・トランスジェニック動物。

【請求項33】 KCNE2に変異を持つヒトの治療または予防に有用な薬物をスクリーニングする方法であって：

(a) 変異を持つKCNE2を発現する第1の細胞セットを第1の誘導K⁺電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 該第1の誘導K⁺電流を測定し；

(c) 野生型 K C N E 2 を発現する第2の細胞セットを第2の誘導 K^+ 電流を測定するための浴液に入れ；

(d) 該第1の誘導 K^+ 電流を測定し；

(e) 薬物を工程 (a) の浴液に添加し；

(f) 工程 (e) の細胞における第3の誘導 K^+ 電流を測定し；次いで

(g) 該第3の誘導 K^+ 電流が該第1の誘導 K^+ 電流によりも該第2の誘導 K^+ 電流により近いかどうかを決定し、ここに、該第1の誘導 K^+ 電流によりも該第2の誘導 K^+ 電流により近い第3の誘導 K^+ 電流を生じる薬物が該ヒトの治療に有用であることを特徴とする該方法。

【請求項34】 該変異が本明細書に記載されたものであることを特徴とする請求項33記載の方法。

【請求項35】 該第1の細胞セット、該第2の細胞セットまたは両方の細胞セットをトランスジェニック動物から採取することを特徴とする請求項33記載の方法。

【請求項36】 該第1の細胞セット、該第2の細胞セットまたは両方の細胞セットがヒト H E R G RNAでトランスフェクトされることを特徴とする請求項33記載の方法。

【請求項37】 Q T 延長症候群の治療または予防に有用な薬物をスクリーニングする方法であって：

(a) 野生型 H E R G および野生型 K C N E 2 を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 工程 (a) の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；

(c) 野生型 H E R G および変異 K C N E 2 を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(d) 工程 (c) の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；

(e) 薬物を工程 (c) の浴液に添加し；

(f) 工程 (g) の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；次いで

(g) 該薬物が、野生型 H E R G および変異 K C N E 2 を発現する細胞において該薬物不存在下で観測される電流と比較して、野生型 H E R G および野生型 K

CNE 2を発現する細胞において観測される誘導 K^+ 電流により近いもしくはより近くない誘導 K^+ 電流を生じたかどうかを決定し、ここに、野生型HERGおよび野生型KCNE 2を発現する細胞において観測される電流により近い電流を生じる薬物がQT延長症候群の治療または予防に有用であることを特徴とする該方法。

【請求項38】 該変異KCNE 2が本明細書に記載された変異の一つをコードすることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項39】 (i) 工程(a)の細胞を野生型HERGおよび野生型KCNE 2で共トランスフェクトするか、(ii) 工程(c)の細胞を野生型HERGおよび変異KCNE 2で共トランスフェクトするか、または、(iii) 工程(a)の細胞を野生型HERGおよび野生型KCNE 2で共トランスフェクトし、次いで、工程(c)の細胞を野生型HERGおよび変異KCNE 2で共トランスフェクトすることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項40】 (i) 工程(a)の細胞、(ii) 工程(a)の細胞、または(iii) 工程(a)および(c)の細胞をRNAでトランスフェクトすることを特徴とする請求項39記載の方法。

【請求項41】 QT延長症候群の治療または予防に有用な薬物をスクリーニングする方法であって：

(a) 野生型HERGおよび野生型KCNE 2を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 工程(a)の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；

(c) 変異HERGおよび野生型KCNE 2を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(d) 工程(c)の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；

(e) 薬物を工程(c)の浴液に添加し；

(f) 工程(e)の細胞における誘導 K^+ 電流を測定し；次いで

(g) 該薬物が、変異HERGおよび野生型KCNE 2を発現する細胞において該薬物不存在下で観測される電流と比較して、野生型HERGおよび野生型KCNE 2を発現する細胞において観測される誘導 K^+ 電流により近いもしくはよ

り近くない誘導 K^+ 電流を生じたかどうかを決定し、ここに、野生型HERGおよび野生型KCNE2を発現する細胞において観測される電流により近い電流を生じる薬物がQT延長症候群の治療または予防に有用であることを特徴とする該方法。

【請求項42】 (i) 工程(a)の細胞を野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトするか、(ii) 工程(c)の細胞を野生型HERGおよび変異KCNE2で共トランスフェクトするか、または、(iii) 工程(a)の細胞を野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトし、次いで、工程(c)の細胞を野生型HERGおよび変異KCNE2で共トランスフェクトすることを特徴とする請求項41記載の方法。

【請求項43】 (i) 工程(a)の細胞、(ii) 工程(a)の細胞、または(iii) 工程(a)および(c)の細胞をRNAでトランスフェクトすることを特徴とする請求項41記載の方法。

【請求項44】 QT延長症候群の治療または予防に有用な薬物をスクリーニングする方法であって：

(a) 野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；

(b) 工程(a)のトランスジェニック動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(c) 野生型HERGおよび変異KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；

(d) 工程(c)のトランスジェニック動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(e) 薬物を工程(c)のトランスジェニック動物に投与し；

(f) 工程(e)の薬物処理された動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(g) 該薬物が、野生型HERGおよび変異KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において該薬物不存在下で観測される電流と比較して、野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において観測される誘導 K^+ 電流により近いもしくはより近くない誘導 K^+ 電流を生じたかどうかを決定し、ここに、野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において観測さ

れる電流により近い電流を生じる薬物がQT延長症候群の治療または予防に有用であることを特徴とする該方法。

【請求項45】 該変異ヒトKCNE2が本明細書に記載された変異をコードすることを特徴とする請求項44記載の方法。

【請求項46】 QT延長症候群の治療または予防に有用な薬物をスクリーニングする方法であって：

(a) 野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；

(b) 工程(a)のトランスジェニック動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(c) 変異HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物を調製し；

(d) 工程(c)のトランスジェニック動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(e) 薬物を工程(c)のトランスジェニック動物に投与し；

(f) 工程(e)の薬物処理された動物における誘導 K^+ 電流を測定し；

(g) 該薬物が、変異HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において該薬物不存在下で観測される電流と比較して、野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において観測される誘導 K^+ 電流により近いもしくはより近くない誘導 K^+ 電流を生じたかどうかを決定し、ここに、野生型HERGおよび野生型KCNE2で共トランスフェクトしたトランスジェニック動物において観測される電流により近い電流を生じる薬物がQT延長症候群の治療または予防に有用であることを特徴とする該方法。

【請求項47】 QT延長症候群を引き起こす多型性を診断する方法であって、患者から採取したRNAからcDNAを調製することによって患者におけるKCNE2配列を決定し、次いで、該cDNAを配列決定してQT延長症候群を引き起こす変異の存在または不存在を決定することを特徴とする該方法。

【請求項48】 QT延長症候群についてヒト対象における危険性を評価する方法であって、該対象の組織試料から単離されたKCNE2遺伝子またはその発現産物の配列を野生型KCNE2遺伝子またはその発現産物と比較することに

よってKCNE2遺伝子における変異につき該対象をスクリーニングし、ここに、該対象の配列における変異がQT延長症候群の危険性を示す該方法。

【請求項49】 該発現産物がKCNE2遺伝子のmRNAおよび該KCNE1遺伝子によりコードされたKCNE2ポリペプチドよりなる群から選択されることを特徴とする請求項48記載の方法。

【請求項50】 以下の手順：

(a) 未変性ポリアクリルアミドゲル上で該試料からの一本鎖DNAの電気泳動移動度を観察すること；

(b) KCNE2遺伝子プローブを該試料から単離されたゲノムDNAに、該プローブの該遺伝子へのハイブリダイゼーションに適切な条件下でハイブリダイズさせること；

(c) 対立遺伝子特異性プローブの該試料からのゲノムDNAへのハイブリダイゼーションを決定すること；

(d) 該試料からのKCNE2遺伝子の全てまたは一部を増幅して、増幅配列を生成し、次いで、該増幅配列を配列決定すること；

(e) 核酸増幅によって、該試料中の特異的KCNE2変異対立遺伝子の存在を決定すること；

(f) 該試料からのKCNE2遺伝子の全てまたは一部を分子クローニングして、クローン配列を生成し、次いで、該クローン配列を配列決定すること；

(g) 分子(1) 該試料から単離したKCNE2遺伝子ゲノムDNAまたはKCNE2 mRNAおよび(2) 該ヒト野生型KCNE2遺伝子DNAに相補的な核酸プローブとの間に、分子(1) および(2) が互いにハイブリダイズして二本鎖を形成する場合、ミスマッチがあるかどうかを決定すること；

(h) 該試料中のKCNE2遺伝子配列の増幅、および野生型KCNE2遺伝子配列を含む核酸プローブへの該増幅配列のハイブリダイゼーション；

(i) 該組織中のKCNE2遺伝子配列の増幅、および変異KCNE2遺伝子配列を含む核酸プローブへの該増幅配列のハイブリダイゼーション；

(j) 欠失変異についてのスクリーニング；

(k) 点変異についてのスクリーニング；

(l) 挿入変異についてのスクリーニング ;

(m) 該 K C N E 2 遺伝子配列または変異 K C N E 2 遺伝子配列を含む 1 以上の核酸プローブへの該試料中の K C N E 2 遺伝子のイン・サイチュハイブリダイゼーションを決定すること ;

(n) 免疫プロットイング ;

(o) 免疫細胞化学 ;

(p) 該組織から単離された K C N E 2 遺伝子タンパク質と K C N E 2 変異対立遺伝子のポリペプチド発現産物に特異的に結合できる結合パートナーおよび / または配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列を有する K C N E 2 ポリペプチドについての結合パートナーとの間の結合相互作用を決定すること ;

(q) 該結合パートナーの生化学的活性の阻害をアッセイすること ; および

(r) 該変異の部位は含まないがそのすぐ隣にハイブリダイズするプライマーを用いる単一塩基伸長アッセイを実行することのうち 1 以上を行うことを特徴とする請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 1】 非ヒト・トランスジェニック動物であって、該動物が野生型ヒト K C N E 2 および変異ヒト H E R G を含むことを特徴とする該動物。

【請求項 5 2】 非ヒト・トランスジェニック動物であって、該動物が変異ヒト K C N E 2 および野生型ヒト H E R G を含むことを特徴とする該動物。

【請求項 5 3】 薬物が高速遅延整流カリウム電流 (I_{K_r}) に影響する能力を決定する方法であって、

(a) 野生型 H E R G および野生型 K C N E 2 を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ ;

(b) 工程 (a) の細胞における第 1 の誘導 K^+ 電流を測定するかまたは検出し ;

(c) 薬物を工程 (a) の浴液に添加し ;

(d) 工程 (c) の細胞における第 2 の誘導 K^+ 電流を測定し ; 次いで、

(e) 工程 (c) の薬物の添加が、該第 1 の誘導 K^+ 電流を第 2 の誘導 K^+ 電流と比較して、 I_{K_r} を阻害するか、促進するか、または変化させるかどうかを決定することを特徴とする該方法。

【請求項54】 薬物が高速遅延整流カリウム電流 (I_{Kr}) に影響する能力を決定する方法であって、

(a) 変異HERGおよび野生型KCNE2を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 工程(a)の細胞における第1の誘導 K^+ 電流を測定するかまたは検出し；

(c) 薬物を工程(a)の浴液に添加し；

(d) 工程(c)の細胞における第2の誘導 K^+ 電流を測定し；次いで、

(e) 工程(c)の薬物の添加が、該第1の誘導 K^+ 電流を第2の誘導 K^+ 電流と比較して、 I_{Kr} を阻害するか、促進するか、または変化させるかどうかを決定することを特徴とする該方法。

【請求項55】 薬物が高速遅延整流カリウム電流 (I_{Kr}) に影響する能力を決定する方法であって、

(a) 野生型HERGおよび変異KCNE2を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 工程(a)の細胞における第1の誘導 K^+ 電流を測定するかまたは検出し；

(c) 薬物を工程(a)の浴液に添加し；

(d) 工程(c)の細胞における第2の誘導 K^+ 電流を測定し；次いで、

(e) 工程(c)の薬物の添加が、該第1の誘導 K^+ 電流を第2の誘導 K^+ 電流と比較して、 I_{Kr} を阻害するか、促進するか、または変化させるかどうかを決定することを特徴とする該方法。

【請求項56】 該KCNE2遺伝子が、以下の変異KCNE2遺伝子：

(a) Gln9 > Glu (C25G)；

(b) Met54 > Thr (T161C)；

(c) Ile57 > Thr (T170C)；および

(d) Thr > Ala (A22G)

の一つよりなる群から選択されることを特徴とする請求項55記載の方法。

【請求項57】 薬物が高速遅延整流カリウム電流 (I_{Kr}) に影響する能

力を決定する方法であって、

(a) 変異 HERG および変異 KCNE2 を発現する細胞を電流を測定するための浴液に入れ；

(b) 工程 (a) の細胞における第1の誘導 K^+ 電流を測定するかまたは検出し；

(c) 薬物を工程 (a) の浴液に添加し；

(d) 工程 (c) の細胞における第2の誘導 K^+ 電流を測定し；次いで、

(e) 工程 (c) の薬物の添加が、該第1の誘導 K^+ 電流を第2の誘導 K^+ 電流と比較して、 I_{Kr} を阻害するか、促進するか、または変化させるかどうかを決定することを特徴とする該方法。

【請求項58】 該 KCNE2 遺伝子が、以下の変異 KCNE2 遺伝子：

(a) Gln9 > Glu (C25G)；

(b) Met54 > Thr (T161C)；

(c) Ile57 > Thr (T170C)；および

(d) Thr > Ala (A22G)

の一つよりなる群から選択されることを特徴とする請求項57記載の方法。

【請求項59】 KCNE2 遺伝子中の変異の遺伝と薬物に対する反応との間の相関を決定する方法であって、

(a) 患者において KCNE2 遺伝子の存在または不存在を検出し；

(b) 投与された薬物に対する該患者の反応を観察し；次いで、

(c) 該患者の遺伝子型と該反応とを相関付ける

ことを特徴とする該方法。

【請求項60】 該 KCNE2 遺伝子が、以下の変異 KCNE2 遺伝子：

(a) Gln9 > Glu (C25G)；

(b) Met54 > Thr (T161C)；

(c) Ile57 > Thr (T170C)；および

(d) Thr > Ala (A22G)

の一つよりなる群から選択されることを特徴とする請求項59記載の方法。

【請求項61】 KCNE3 遺伝子中の変異の遺伝と薬物に対する反応との

間の相関を決定する方法であって、

- (a) 患者において K C N E 3 遺伝子の存在または不存在を検出し；
- (b) 投与された薬物に対する該患者の反応を観察し；次いで、
- (c) 該患者の遺伝子型と該反応とを相関付ける

ことを特徴とする該方法。

【請求項62】 K C N E 4 遺伝子中の変異の遺伝と薬物に対する反応との間の相関を決定する方法であって、

- (a) 患者において K C N E 4 遺伝子の存在または不存在を検出し；
- (b) 投与された薬物に対する該患者の反応を観察し；次いで、
- (c) 該患者の遺伝子型と該反応とを相関付ける

ことを特徴とする該方法。

【請求項63】 当該内在 K C N E 2 遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子中に破壊 (disruption) を含み、ここに、該破壊は該 K C N E 2 遺伝子の対立遺伝子からのメッセンジャーRNAの転写を防止し、該破壊のないマウスと比較して、当該ノックアウトマウスにおける K C N E 2 の低減したレベルをもたらすことを特徴とする哺乳類。

【請求項64】 当該内在 K C N E 3 遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子中に破壊 (disruption) を含み、ここに、該破壊は該 K C N E 3 遺伝子の対立遺伝子からのメッセンジャーRNAの転写を防止し、該破壊のないマウスと比較して、当該ノックアウトマウスにおける K C N E 3 の低減したレベルをもたらすことを特徴とする哺乳類。

【請求項65】 当該内在 K C N E 4 遺伝子の少なくとも一つの対立遺伝子中に破壊 (disruption) を含み、ここに、該破壊は該 K C N E 4 遺伝子の対立遺伝子からのメッセンジャーRNAの転写を防止し、該破壊のないマウスと比較して、当該ノックアウトマウスにおける K C N E 4 の低減したレベルをもたらすことを特徴とする哺乳類。

【請求項66】 ヒトにおけるQT延長症候群を診断する方法であって、

- (a) 該ヒトから核酸試料を採取し；次いで、
- (b) ヒトMiRP1、ヒトMiRP2およびヒトMiRP3よりなる群から

選択される遺伝子中の多型性部位を占有する塩基の同一性を決定し、ここに、該塩基の同一性が該症候群またはそれに対する罹患性を示すことを特徴とする該方法。

【請求項67】 さらに、該ヒトまたは治療する医者に該診断を知らせることを特徴とする請求項66記載の方法。

【請求項68】 QT延長症候群と関連付けられる多型性形態を同定する方法であって、

(a) QT延長症候群の存在または不存在で特徴付けられた複数の個体から核酸試料を採取し；

(b) ヒトMiRP1、ヒトMiRP2およびヒトMiRP3よりなる群から選択される遺伝子中の多型性部位を占有する塩基の同一性を決定し；次いで、

(c) 同定した塩基を該個体におけるQT延長症候群の存在または不存在と関連付けて、QT延長症候群と関連する多型性形態を同定することを特徴とする該方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、メリーランド州ベセスダのナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス (National Institute of Health) によって投資された助成金番号 R O 1 H L 4 6 4 0 1、R O 1 G M 5 1 8 5 1 および P 5 0 - H L 5 2 3 3 8、および米国パブリック・ヘルス・サービス (U.S. Public Health Service) からの助成金番号 M 0 1 R R 0 0 0 6 4 の下で政府援助によりなされた。連邦政府は本発明において特定の権利を有する可能性がある。

【0002】

発明の背景

本発明は、イオンチャネルを形成する $M i n - K$ に関連する遺伝子および遺伝子産物、および $Q T$ 延長症候群 ($L Q T$) を含むイオンチャネル障害の診断方法に指向される。例えば、 $K C N E 2$ は $H E R G$ とともに I_{K_r} カリウムチャネルを形成し、 $L Q T$ と関連する。 $L Q T$ は、本発明により、試験されるべき個体の $K C N E 2$ の $D N A$ 配列を解析し、各 $D N A$ 配列を正常 $K C N E 2$ の既知の $D N A$ 配列と比較することによって、診断される。また、試験されるべき個体のこれら $M i n K$ 関連遺伝子は、 $L Q T$ を含むイオンチャネル障害をもたらす変異についてスクリーニングすることもできる。 $L Q T$ を含むイオンチャネル障害が予測できれば、開業医が現存する医学的療法を用いてこの疾患を予防することも可能となるであろう。本発明は、さらには、 $H E R G$ および $K C N E 2$ ($M i R P 1$ としても知られている) タンパク質が集合して心臓の I_{K_r} カリウムチャネルを形成するという知見にも関する。この知識を用いれば、1個の細胞中でこれら2種のタンパク質を同時発現させることができ、そのような形質転換された細胞を用いて $L Q T$ の治療または予防に有用であろう薬物をスクリーニングすることもできる。本発明はさらには $L Q T$ の家系で見つけられたヒト $K C N E 2$ 遺伝子中の変異に指向される。

本発明の背景を説明するのに、または実施に関するさらなる詳細な説明を提供するのに、本明細書にて用いる刊行物および他の文献を、出典を明示することにより本明細書の一部とし、便宜上、その各々を添付した引用文献の一覧表に示す

。

【0003】

心臓不整脈が罹患および死亡の一般的原因であり、自然死全体の約11%を占める(Kannel、1987; Willichら、1987)。一般に、生命を脅かす心室性不整頻搏の個体の前兆診断および治療は粗末であり、ある場合には、医学的管理が実質的に不整脈および死亡の危険性を増大させる(Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators、1992)。これらの因子が心臓不整脈の危険性のある個体の早期検出を可能とし、不整脈の予防に高い優先性を示す。

【0004】

遺伝子および後天的因子の両方が心臓不整脈を発病する原因である。QT延長症候群(LQT)は、心室性不整頻搏、特にトルサード・ド・ポアンおよび心室細動より由来の不意の意識喪失、失神、発作および突然死の原因となる遺伝性心臓不整脈である(Ward、1964; Romano、1965; Schwartzら、1975; Mossら、1991)。この障害は、一般に、若い、どちらかと言えば、健康な個体で起こる(Ward、1964; Romano、1965; Schwartzら、1975)。LQT遺伝子キャリアは、大抵、心電図にてQT間隔の延長、異常な心臓性再分極を明示する(Vincentら、1992)。LQTの臨床的特徴は、一時的な心臓不整脈、特に再分極に関連する心室性不整頻搏などの、不整脈および心室細動における心電図の特徴的な波形特性で命名された、トルサード・ド・ポアンに由来するものである(Schwartzら、1975; MossおよびMcDonald、1971)。トルサード・ド・ポアンは心室細動、特に致死不整脈に変質する可能性がある。LQTは一般的な診断疾患ではないが、心室性不整脈は極一般的であり;毎年合衆国で300000以上の市民が突然に死亡しており(Kannelら、1987; Willichら、1987)、多くの場合、その基礎となる機構は異常な心臓の再分極にある。したがって、LQTは生命を脅かす心臓不整脈を分子レベルで研究する独特な機会を提供するものである。

【0005】

遺伝性および後天性形態の両方のLQTが定義されている。後天性LQTおよび二次的不整脈は心臓虚血症、徐脈および低血清中カリウムまたはカルシウム濃

度などの代謝性異常に由来させることができる (Zipes、1987)。LQTはまた、抗生物質、抗ヒスタミン薬、汎用性麻酔薬を含む、最も一般的には、抗不整脈薬を含む、特定の医薬を用いる治療に由来させることもできる (Zipes、1987)。遺伝的形態のLQTは少なくとも5個の異なる遺伝子に変異したことに由来させることができる。従来の研究においては、LQT遺伝子座が染色体1p15.5 (KVLQT1またはLQT1) (Keatingら、1991a; Keatingら、1991b)、7q35-36 (HERGまたはLQT2)、3p21-24 (SCN5AまたはLQT3) (Jiangら、1994)に地図作成された。これらのうち、遺伝的LQTの最も一般的な原因がKVLQT1である。本発明者らの研究データはこの遺伝子の変異が50%より多くの遺伝的LQTに關与しているとしている。最近になって、第4のLQT遺伝子座(LQT4)が4q25-27に地図作成された (Schottら、1995)。KCNE1 (LQT5)もまた、QT延長症候群に關係している (Splawskiら、1997b; Duggalら、1998)。これらの遺伝子は心臓作用電位の形成と関連するイオンチャンネルをコードする。変異はチャンネル機能不全および筋細胞再分極をもたらし得る。心筋でのチャンネル発現が局所的に不均一であるため、心臓再分極が異常であると不整脈に關する基体が創製される。KVLQT1およびKCNE1はまた内耳にて発現される (Neyroudら、1997; Vetterら、1996)。本発明者および第三者らは、これらの遺伝子の各々における同型接合体または異型接合体化合物の変異が難聴および重度の心臓表現型のジャーウェルおよびランゲ - ニールセン (JervellおよびLange-Nielsen) 症候群を惹起し得ることを明らかにした (Neyroudら、1997; Splawskiら、1997a; Schultze-Bahrら、1997; Tysonら、1997)。耳での機能的チャンネルの喪失が、難聴に至る、内リンパの生成を破壊するのは明らかである。

【0006】

LQTの前兆診断は、現在のところ、心電図におけるQT間隔の長さを基礎としている。QTc (心拍数について矯正されたQT; Bazzett、1920) が0.44秒より長いと、伝統的に、罹患している個体と分類される。しかし、大部分のLQT患者は、心電図を取っていない、若い、どちらかと言えば、健康な個体

である。その上、遺伝的研究は、QTcが感受的でも特異的でもないことを明らかにした(Vincentら、1992)。遺伝子キャリアおよびノンキャリアのQTc間隔のスペクトルは重複しており、そのため分類を誤る。ノンキャリアが長期QTc間隔を有することもでき、罹患していると診断され得る。逆に、あるLQT遺伝子キャリアでは、そのQTc間隔は0.44秒以下であるが、不整脈に関する危険性は高い状態にある。LQTを効果的かつ遺伝子特異的に治療するための正確な前兆診断が重要である。

【0007】

この障害の常染色体優性形態および常染色体劣性形態が報告されている。常染色体劣性LQT(ジャーウェルおよびランゲ-ニールセン症候群としても知られている)は先天的な神経性難聴と関連しており;この形態のLQTが稀に存在する(ジャーウェルおよびランゲ-ニールセン、1957)。常染色体優性LQT(ロマノ-ワード(Romano-Ward)症候群)はより一般的であり、他の表現型異常性に関連していない(Romanoら、1963;Ward、1964)。遺伝的LQTに極めて類似する障害もまた、通常、薬理的療法の結果として獲得することができる(Schwartzら、1975;Zipes、1987)。

【0008】

LQTに不整脈の機構を暗示するデータがある。以前に、LQTに関して2つの仮定が提案された(Schwartzら、1994)。1の仮定は左側自律神経の優勢が異常な心臓性再分極および不整脈を引き起こすと示唆する。この仮定は右側星状神経節を除去することで、不整脈がイヌで誘発され得るという知見により支持されている。加えて、逸話的証拠によれば、 β -アドレナリン作動性ブロック剤により、および左側星状神経節摘出術により、数人のLQT患者が効果的に治療されている(Schwartzら、1994)。LQTの関連する不整脈に関する第2の仮説は、心臓イオンチャンネルを調節する、心臓特異的イオンチャンネル遺伝子(複数でも可)の変異が筋細胞の再分極の遅れを引き起こすことを示唆する。筋細胞再分極の遅れはL-型カルシウムチャンネルの反応性を促進し、第2の脱分極をもたらす(JanuaryおよびRiddle、1989)。これらの第2の脱分極はトルサード・ド・ポアン不整脈で起こりそうな細胞機構である(Suwawicz、19

89)。この仮定はカルシウムチャネルの薬理的ブロックがQT延長および再分極関連の不整脈をヒトおよび動物実験で誘発し得るという観察により支持されている(AntzelevitchおよびSicouri、1994)。1の形態のLQTが心臓カルシウムチャネル遺伝子を変異させることで得られるという知見が筋細胞性仮定を支持している。

【0009】

理論上、心臓性ナトリウムチャネル遺伝子の変異はLQTを引き起こす。電位依存性ナトリウムチャネルは心室性筋細胞における速やかな脱分極を媒介し、さらに作用電位が安定期にある間の小さな電流を伝導する(Attwellら、1979)。ナトリウムチャネル機能の僅かな異常性(例えば、ナトリウムチャネル不活化の遅れおよびチャネル不活化の電位依存性の変化)は、QT延長および不整脈に至る、心臓再分極を遅れさせることができる。1992年に、Gellensらは心臓ナトリウムチャネル遺伝子、SCN5Aをクローンして特徴付けた(Gellensら、1992)。この遺伝子の構造は、2016個のアミノ酸のラージタンパク質をコードする、他の、以前に特徴付けられたナトリウムチャネルの構造と同じであった。これらのチャネルタンパク質は4つの同型ドメイン(DI-DIV)を含有し、その各々が6個の推定膜スパンニングセグメント(S1-S6)を含有する。最近になって、SCN5Aが染色体3p21に地図作成されており、それはLQT3に対する優れた候補遺伝子とされており(Georgeら、1995)、この遺伝子はLQT3と関連することが明らかにされた(Wangら、1995a)。

【0010】

1994年に、WarmkeおよびGanetzkyは新規なヒトcDNA、ヒトエーテルa-g-o-g-o関連遺伝子を同定した(HERG、WarmkeおよびGanetzky、1994)。HERGは、体細胞ハイブリッドパネルをPCR分析に付すことにより、ヒト染色体7にその起源が突きとめられ(WarmkeおよびGanetzky、1994)、LQT2の候補とされた。それはカルシウムチャネルと推定アミノ酸配列相同性を有する。HERGを、カルシウム調節カリウムチャネルをコードする、ドロソフィラエーテルa-g-o-g-o遺伝子(eag)との相同性により海馬cDNAラ

イブラリーより単離した (Bruggemannら、1993)。HERGはeagのヒト相同体ではなく、約50%のアミノ酸配列相同性を有するにすぎない。

【0011】

LQT1がKVLQT1遺伝子と関連することが見出された (Q.Wangら、1996)。KVLQT1が変異した16組の家族を同定して特徴付け、16組の家族すべてにおいて、LQT1とKLVT1の間に明確な関連のあることが明らかにされた。KVLQT1を染色体11p15.5に地図作成し、それをLQT1の候補遺伝子とした。KVLQT1はカリウムチャネルの構造的特徴を有するタンパク質をコードし、ノーザンブロット分析により測定されるような遺伝子の発現はKVLQT1が心臓で最も強く発現されることを明らかにした。LQTを引き起こす1つの遺伝子内欠失および10種の異なるミスセンス変異がKVLQT1で同定された。これらのデータはKVLQT1が新規な心臓カリウムチャネル遺伝子であると定め、この遺伝子における変異が心室性不整頻搏および突然死に対する罹病性を惹起することを明らかにした。

【0012】

I_{Ks} チャネルの一成分がminK、すなわち、単一の推定膜スパンングドメインを有する130アミノ酸タンパク質であることは知られていた (Takumiら、1988; GoldsteinおよびMiller、1991; Hausdorffら、1991; Takumiら、1991; Buschら、1992; WangおよびGoldstein、1995; KW Wangら、1996)。このタンパク質の大きさおよび構造から、minKが単独で機能的チャネルを形成することはないようにあった (Attaliら、1993; Lesageら、1993)。KVLQT1とminKを集合させ、心臓 I_{Ks} カリウムチャネルを形成するという証拠が示されている。このことがSanguinettiら (1996b)により公開された。 I_{Ks} 機能不全は心臓不整脈の原因の一である。後に (minKをコードする) KCNE1における変異もまた、LQTにて起こり得ることが明らかにされた (Splawaskiら、1997b)。

LQTに関わり、LQTの診断に使用し得る他の遺伝子の同定が所望される。

【0013】

発明の概要

本発明は、MinK関連遺伝子、それらのタンパク質産物、カリウムチャネルのごときイオンチャネルを形成するそれらの会合、および心臓不整脈のごときイオンチャネル障害とのそれらの関連性に指向される。

【0014】

本発明のひとつの局面において、ヒトKCNE2、ラットKCNE2、ヒトKCNE3、マウスKCNE3、ヒトKCNE4およびマウスKCNE4につきDNAおよびタンパク質配列が提供される。あるいは、これらの遺伝子は、それぞれ、MIRP1、MIRP2およびMIRP3と呼ばれる。

本発明の第2の局面において、 I_{Kr} カリウムイオンチャネルを形成するHREGとKCNE2との集合が提供される。

【0015】

本発明の第3の局面において、KCNE2の心臓不整脈との関連性が提供される。これらの2つのタンパク質が集合して該 I_{Kr} チャネルを形成するという知見はLQTを治療または予防するのに有用な薬物についてのスクリーニングするアッセイを開発に有用である。卵母細胞のごとき細胞中で両方の遺伝子を同時発現させることによって、その野生型および変異形態の両方において、該 I_{Kr} チャネルに影響を有する薬物をスクリーニングすることが可能である。この知見も、LQTに罹患した対象の早期診断についてのKCNE2遺伝子の分析に有用である。

本発明の第4の局面において、LQTに関連するKCNE2における変異を提供する。

【0016】

本発明の第5の局面において、LQTに罹患した対象の早期診断のため、該KCNE2遺伝子の分析を提供する。該診断方法は、試験されるべき個体の該KCNE2遺伝子のDNA配列を解析し、次いで、それを天然、非変異遺伝子のDNA配列と比較することを特徴とする。第2の具体例において、試験されるべき個体のKCNE1遺伝子をLQTを引き起こす変異につきスクリーニングする。LQTを予測する能力は、医者がベータブロッキング剤のごとき医療治療薬で当該疾患を予防することを可能にする。

本発明の第6の局面において、薬物候補をスクリーニングして、LQTの治療または予防に有用な薬物を同定する。

【0017】

本発明の第7の局面において、LQTおよび他の関連するまたは関連しない障害の治療に有用な薬物をLQTまたはそのような障害を引き起こす危険性につきスクリーニングする。何故ならば、それらはイオンチャネルと相互作用し、それをブロックするであろうからである。

本発明の第8の局面において、当該遺伝子型および薬物反応の薬理遺伝子学を提供する。

【0018】

図面の簡単な記載

図1A~1Cは、MiRP1が心臓中で発現され、MinKに関連することを示す。図1A：ラットMiRP1組織分布。rKCNE1フラグメント（寄託番号D85797、387bp）で行われた指示されたラットのナザンプロット；レーンにつき組織あたり2µgのポリ(A)⁺mRNA。図1B：-アクチンにつきプローブされたパネルa中のプロット。図1C：ラットとヒトとのMiRP1およびMinKの予測ペプチド配列。推定経膜セグメントに下線を付す；同一残基に薄く影付けする；心臓不整脈に関連する3つのhMiRP1位置に濃く影付けする(Q9、M54、I57)。MiRP1は、2つのN-結合グリコシル化サイト(N6、N29)および2つのタンパク質キナーゼC-媒介リン酸化サイト(T71、S74)につきコンセンサス配列を含有する。ラットとヒトとのKCNE1 cDNAは、その5'上流配列中にATGを介在しないインフレーム終止コドンをおよび予測した開始メチオニンに対して3位にAを含有する；ヒトとラットとのKCNE1の寄託番号は、それぞれ、AF071002およびAF071003である。

【0019】

図2A~Fは、rMiRP1がイオンチャネルサブユニットであることを示す。HERG（黒塗り四角）または、rMiRP1およびHERG（白抜き四角）サブユニットで形成されたチャネルの属性を0.3mM Ca²⁺、100mM

KCl溶液中、実施例に記載するごとく示されたプロトコルにより評価した。図2A：プロトコル1による生電流トレース（挿入図）；目盛線1 μ Aおよび1秒。図2B：プロトコル3による生電流トレース（挿入図）；その他は図2Aと同じ。図2C：プロトコル1による定常活性化；矢印部で測定した尾部電流、10個の卵母細胞の群の平均 \pm s . e . m、 I_{Max} に対して正規化（40 mV）。実線はボルツマン関数： $1 / \{ 1 + \exp [(V_{1/2} - V) / V_s] \}$ に従う。ここに、 $V_{1/2}$ は半値電位（half maximal voltage）および V_s は傾き係数；エラーバーは s . e . m . を表す。HERG、および rMiRP1 + HERGチャンネルにつき、それぞれ、 $V_{1/2}$ は -46 ± 1 および -37 ± 1 mV、 V_s は 11.4 ± 0.2 および 11.7 ± 0.1 であった。（2C、挿入図）プロトコル2による種々の電位における活性化速度、3つの卵母細胞の群、60 mVでの速度に正規化。図2D：プロトコル3によるピーク尾部電流；図2Cと同様に当て嵌め；10個の卵母細胞の群の平均 \pm s . e . m . ；HERG、および rMiRP1 + HERGチャンネルの -150 mVにてのピークは、それぞれ、 -8.8 ± 0.5 および -4.9 ± 0.7 μ Aであった。図2E：プロトコル4による定常不活性化（挿入図）；8個の卵母細胞の群の平均 \pm s . e . m . 、ピーク（ -140 mV）に対して正規化。図2F：プロトコル3による種々の電位における脱活性化速度；電流緩和を8つの卵母細胞の群を用いて、単一指数関数（ $I = A e^{-t/\tau}$ ）で当て嵌めた。； -120 mVにてのHERGおよび rMiRP1 + HERGチャンネルは、それぞれ、 1.5 ± 0.2 および 0.21 ± 0.01 秒、および A は 7.9 ± 0.4 および 4.2 ± 0.5 μ Aであった。

【0020】

図3A～3Cは、単一の rMiRP1 / HERGチャンネル（白抜き四角）が天然 I_{Kr} チャンネルに対するコンダクタンスにおいて類似するが、HERGチャンネル（黒塗り四角）は類似しないことを示す。実施例に示すごとく、プロトコル7により 0.3 mM Ca^{2+} 、 100 mM KCl 溶液中で行われた。図3A：種々の電位における単一チャンネル電流；目盛線 0.5 pA および 0.2 秒。図3B：脱活性化前に記録されたおよそ $30,000$ イベント（ 150 推移）のパネル a におけるパッチから -90 mVにて計算した全点ヒストグラム、 P_0 は反映し

ていない。図3C：指示された電位にて保持された細胞付着パッチ ($n = 5$) における単一HERGまたはrMiRP1 + HERGチャネルについての電流 - 電位関係；全点ヒストグラムを各電位につき 1.3×10^5 イベントで構築した、 ~ 400 推移。傾きコンダクタンスは、HERGおよびrMiRP1 + HERGチャネルにつき、それぞれ、 12.9 ± 2.0 および 8.2 ± 1.4 pSであった。0.5 kHzにてフィルターをかけた。

【0021】

図4A ~ 4Bは、単一rMiRP1 + HERGチャネルは、HERGチャネルよりも速く脱活性化することを示す。図4A：図3と同様に細胞付着チャネルにおける単一チャネルの脱活性化、目盛線2 pAおよび0.75秒。図4B：-100 mVにてパネルa中で行われた50 ~ 70の試行のアンサンブル；キャパシタンス推移をゼロトレース控除によって中性にした。ヒストグラムに単一指数関数 ($I = I_0 + I e^{-t/\tau}$) で当て嵌めた；HERGチャネルにつき $\tau^{-1} = 300$ m秒、 $I_0 = -8$ pA、 $I = -20$ pA、；rMiRP1およびHERGサブユニットを含有するチャネルにつき $\tau^{-1} = 131$ m秒、 $I_0 = -10$ pA、 $I = -24$ pA。目盛線10 pAおよび0.5秒。

【0022】

図5A ~ 5Fは、 K^+ によるそれらの調節および脱活性化速度において、rMiRP1 / HERGチャネル (白抜き四角) は天然 I_{Kr} と同様であるが、HERGチャネル (黒塗り四角) は同様でないことを示す。実施例に記載されたプロトコルにより1 mM Ca^{2+} 、4 mM KCl溶液中で行われた。図5A：プロトコル6による生電流トレース；目盛線0.1 μ A、1秒。図5B：活性化パルスの終端 (矢印) にての電流 - 電位関係、7つの卵母細胞の群の平均 \pm s.e.m.；図5Aにおける実験と同様。図5C：外部KClでの電流増幅の変化；0 mVにてパネルaにおいて実験した8つの細胞の群の平均 \pm s.e.m.。実線は該データへの直線当て嵌め；HERGにつき、該関係は傾き = 46 ± 2 および切片 = 377 ± 6 nA ($R = 0.998$) を与える；rMiRP1 / HERGにつき、傾き = 11.7 ± 0.4 および切片 = 155 ± 2 nA ($R = 0.999$)。図5D：プロトコル3による生電流トレース；1秒プレパルスおよび試験パル

ス持続；目盛線 $1 \mu\text{A}$ および 250ms 。図5E：ピーク（図5D中の矢印）にての電流 - 電位関係；5つの卵母細胞の群の平均 $\pm \text{s.e.m.}$ ；HERGおよび rMiRP1 / HERG チャンネルにつき、電流は、それぞれ、 -50mV にて 1200 ± 100 および $300 \pm 60 \text{nA}$ であったが、 -12mV にて -2200 ± 100 および $-900 \pm 70 \text{nA}$ であった。図5F：プロトコル5により評価され、6つの卵母細胞の群の非ブロック電流のフラクションとしてプロットされた、 20KCl 中の種々の濃度の E-4031 溶液による定常ブロック；阻害定数は文中で報告される。いずれのチャンネル型も初期パルスでのブロックを示さなかった。

【0023】

図6A～6Bは、rMiRPおよびHERGは安定な複合体を形成することを示す。図6A：rMiRP1-HA(M1)、HERG-cmyc(H)およびコネキシン43-cmyc(C)のCOS細胞における発現。レーンは全細胞ライゼート(TL)または抗cmyc抗体で行われた免疫沈降(IP)を含有する。SDS-PAGE(10～16%)および抗-HA抗体でのウェスタンブロット可視化。細胞を以下のごとくサブユニットで感染させた：レーン1、2：M1+H；レーン3：H；レーン4：M1；レーン5：M1+C；バーは32.7、30.2および24kDaをマークする。図6B：rMiRP1はイン・ビトロでMinKに優先してHERGと複合体を形成する。レーンは、ウサギ網状赤血球ライゼートから生じた³⁵S-メチオニン標識翻訳産物の抗-cmyc抗体を用いる免疫沈降を含有し、オートラジオグラフィーにより可視化された。反応混合物は、以下のごとく、サブユニット、rMiRP1(M1)、rMinK(m)およびHERG-cmyc(H)を含有した：レーン1：M1+H；レーン2：m+H；レーン3：M1+m+H；バー30.2および24kDa。

【0024】

図7A～7Cは、hMiRP1およびHERGで形成されたチャンネル(HERG単独で形成されたものではない)が二相キネティクスでE-4031によりブロックされることを示す。示したチャンネルサブユニットを発現するCHO細胞は、 -80mV から $+20 \text{mV}$ まで1秒間、次いで、 -40mV まで2秒間、0 .

5秒間のサイクル間隔でステップした。細胞を薬物適用前に4サイクル研究し、 $1\ \mu\text{M}$ E-4031 (バー) の存在下、 $-80\ \text{mV}$ にて1分間密接に保持し (held closed)、次いで、該薬物の連続的存在下で30~70サイクル研究した。図7A: HERGチャンネルを発現する細胞についての最初の20本の電流トレース; この細胞の第1パルス中の非ブロック電流のフラクションは $=0.99$ であった。図7B: hMIRP1/HERGチャンネルを発現する細胞についての最初の20本の電流トレース; この細胞の第1パルス中の非ブロック電流のフラクションは $=0.64$ であった。図7C: パネルa (HERGチャンネル、黒塗り四角、 $=38$ サイクル) およびパネルb (hMIRP1/HERGチャンネル、白抜き四角、 $=4$ サイクル) 中の細胞についての平衡ブロックへの緩和。

【0025】

図8A~8Dは、野生型または不整脈関連hMIRP1サブユニットでのチャンネル機能を示す。図8A: $1\ \text{mM}$ Ca^{2+} 、 $4\ \text{mM}$ KCl 溶液でプロトコル6によりCHO細胞中の野生型(WT)、T8A、Q9EまたはM54T-hMIRP1およびHERGの生電流トレース、目盛線は、WTにつき $15\ \text{pA}$ 、およびT8A、Q9EおよびM54T-hMIRP1につき $50\ \text{pA}$ 、および 0.5 秒。図8B: $20\ \text{mV}$ まで脱分極し(示さず)、次いで、 -20 ないし $-120\ \text{mV}$ の電位まで再分極することによって誘引された尾部電流、その他は図8Aと同じ; 目盛線は、WTにつき $50\ \text{pA}$ 、T8AおよびM54Tにつき $100\ \text{pA}$ 、およびQ9E-hMIRP1につき $500\ \text{pA}$ 、および 0.1 秒。図8C: 活性化: WT (白抜き四角)、T8A (白抜き三角)、Q9E (黒塗り丸) およびM54T-hMIRP1 (黒塗り下向き三角) についての等時性 P_0 曲線; 曲線は、 $10\sim14$ 個の細胞の群の平均 $\pm\text{s.e.m.}$ および図2Cと同じように当て嵌める; 半値活性化電位および傾き係数を表1に報告する。図8D: 脱活性化: WT (白抜き四角)、T8A (白抜き三角)、Q9E (黒塗り丸) およびM54T-hMIRP1 (黒塗り下向き三角) についての高速成分、高速および低速速度およびそれらの重みは、生電流トレースを二重指数関数に当て嵌めることによって評価した(表1)。

【0026】

図9A~9Cは、Q9E-hMiRP1がクラリスロマイシン-誘導不整脈および増大した薬物感受性に関連することを示す。示さない限り、 1 mM Ca^{2+} 、 4 mM KCl 溶液(実施例)を用いた。図9A:プロトコル6によりCHO細胞中でHERGと共に発現したQ9E-hMiRP1の生電流トレース;目盛線 0.1 pA および 0.1 秒 。図9B:+ 20 mV にての活性化後、クラリスロマイシンの様々な用量での平衡にてのピーク尾部電流増幅の変化;半値ブロック濃度は文中、ヒル係数は、WT(白抜き四角)およびQ9E-hMiRP1(白抜き丸)について、それぞれ、 1.7 ± 0.2 および 1.7 ± 0.1 であった。図9C:パネルa中での電流-電位関係、 0.5 mM クラリスロマイシンの不存在下(黒塗り丸)または存在下(白抜き丸)、6つの細胞の群の平均 $\pm\text{ s.e.m.}$ 。データを図2Cのボルツマン関数を用いて当て嵌め、非ブロック電流のフラクションの逆数を積算する; 0.5 mM クラリスロマイシンで、野生型についての $V_{1/2}$ は $-30 \pm 8\text{ mV}$ であり(示さず)、一方Q9E-hMiRP1について、それは $-25 \pm 5\text{ mV}$ であった(示す);傾き係数は不変であった。 1 mM Ca^{2+} 、 1 mM KCl 溶液および 0.5 mM クラリスロマイシン中(示さず)、野生型の $V_{1/2}$ は $-32 \pm 6\text{ mV}$ であり、Q9E-hMiRP1のそれは $-29 \pm 10\text{ mV}$ であった;傾き係数は、これも不変であった。

【0027】

配列表の簡単な記載

配列番号:1はヒトKCNE2のDNA配列である。配列番号:2はヒトKCNE2のタンパク質配列である。配列番号:3はラットKCNE2のDNA配列である。配列番号:4はラットKCNE2のタンパク質配列である。配列番号:5はヒトKCNE3のDNA配列である。配列番号:6はヒトKCNE3のタンパク質配列である。配列番号:7はマウスKCNE3のDNA配列である。配列番号:8はマウスKCNE3のタンパク質配列である。配列番号:9はヒトKCNE4のDNA配列である。配列番号:10はヒトKCNE4のタンパク質配列である。配列番号:11はマウスKCNE4のDNA配列である。配列番号:12はマウスKCNE4のタンパク質配列である。配列番号:13~18は変異スクリ

ーニング用の増幅プライマーのDNA配列である。配列番号：19はエピトープタグ化に用いるHA残基のアミノ酸配列である。配列番号：20はエピトープタグ化に用いるcmyc残基のアミノ酸配列である。

【0028】

発明の詳細な説明

本発明は、本明細書に記載するごとく、いくつかのMinK関連遺伝子の配列の決定、カリウムチャネルのごときイオン性チャネルを形成するそれらの会合、および心臓不整脈のごときイオンチャネル障害とのそれらの関連性に指向される。本発明は、MinK関連遺伝子の分子変異体、特に、LQTの病気素因を引き起こすまたはそれに関連するKCNE2にも指向される。また、試験されるべき個体のこれらMinK関連遺伝子は、LQTを含むイオンチャネル障害をもたらす変異についてスクリーニングすることもできる。LQTを含むイオンチャネル障害が予測できれば、開業医が現存する医学的療法を用いてこの疾患を予防することも可能となるであろう。本発明は、さらには、HERGおよびMiRP1(KCNE2)が集合して心臓の I_{Kr} カリウムチャネルを形成するという決定にも指向される。

より詳しくは、本発明はKCNE2遺伝子中の変異および、LQTの診断におけるそれらの使用に関する。本発明は、さらには、LQTを引き起こすKCNE2遺伝子変異体の存在につきヒトをスクリーニングする方法に指向される。今や、LQTはより早く(すなわち、症状が現われる前)、より決定的に検出し得るので、LQTを有すると認定された個体はよりよい治療オプションを利用できる。本発明はLQT1を治療し、予防するのに有用な薬物につきスクリーニングする方法にも指向される。本発明は、さらには、イオンチャネルに不都合な効果につきスクリーニングする方法に指向される。最後に、本発明は、遺伝子型を薬物相互作用に相関付けること、すなわち、薬理遺伝子学に指向される。

【0029】

本発明は、MinK関連遺伝子、例えば、KCNE2遺伝子をスクリーニングして変異を同定する方法を提供する。かかる方法は、MinK関連遺伝子、例えば、KCNE2遺伝子の一部を増幅する工程をさらに含んでもよく、さらに

KCNE 2 遺伝子の一部を増幅するためのプライマーである1セットのポリヌクレオチドを用意する工程を含んでもよい。該方法は、KCNE 2 に関連する LQT のごときイオンチャネル障害の診断または予後のいずれかに使用する変異の同定に有用である。

【0030】

本発明は、さらには、(KCNE 2 をコードする) KCNE 2 もまた LQT に関与していることを示す。KCNE 2 タンパク質および HERG は集合して K^+ チャネルを形成する。よって、本発明は、KCNE 2 遺伝子をスクリーニングして変異を同定する方法を提供する。さらに、かかる方法は KCNE 2 遺伝子の一部を増幅する工程を含んでもよく、さらに KCNE 2 遺伝子の一部を増幅を行うためのプライマーである1セットのポリヌクレオチドを用意する工程を含んでもよい。該方法は、LQT の診断または LQT の予後のいずれかに使用する変異の同定に有用である。

【0031】

本発明は、薬物候補をスクリーニングして、LQT のごときイオンチャネル障害の治療または予防に有用な薬物を同定する方法に指向される。卵母細胞、哺乳動物細胞またはトランスジェニック動物(例えば、ノックアウト(knockout)マウス)のごとき細胞中で変異 HERG および/または KCNE 2 遺伝子を同時発現させ、次いで、 I_{Kr} チャネルに対する薬物候補の影響をアッセイすることによって、LQT 薬物スクリーニングを行う。該影響を、野生型 HERG および KCNE 2 遺伝子の I_{Kr} チャネル活性と比較する。

最後に、本発明は、薬物との反応に対する遺伝子型の影響を決定する方法に指向される。例えば、該方法は、特定の対立遺伝子の存在を LQT のごときイオンチャネル障害の治療または予防に有用な薬物に対する改善されたまたは不都合な反応と相関付けることが可能である。

【0032】

KCNE 2 遺伝子が LQT の発症に関与していることの証明は、異常な KCNE 2 遺伝子産物あるいは異常なレベルの該遺伝子産物を生じさせる配列を罹患した血族メンバーから抽出したDNA中に見出すことにより得られる。かかる LQ

Tの疑いのある対立遺伝子は多数の血縁者において疾病と共分離するであろう。それらは、一般人の集団中の個体よりもLQT罹患した非血族個体においてずっと高頻度に存在するであろう。これらの変異は多くの形態であり得る。最も重大な形態は、遺伝子が異常なタンパク質をコードすることとなる、あるいはタンパク質発現を有意に変化させることとなるフレームシフト変異または大規模欠失であろう。あまり重大でない崩壊的変異は、システインへのまたはシステインからの変化、塩基性アミノ酸から酸性アミノ酸への変化またはその逆、疎水性アミノ酸から親水性アミノ酸への変化またはその逆、あるいは2次または3次タンパク質構造に影響する他の変異のごとき、生成タンパク質に有意な影響を与える小規模なイン-フレーム欠失および非保存的塩基対の置換を包含するであろう。サイレント変異または保存的アミノ酸の置換を生じさせる変異は、一般的にはタンパク質機能を崩壊させないと考えられる。

【0033】

本発明の診断および予後方法によれば、野生型KCN E 2遺伝子の変化が検出される。さらに、野生型KCN E 2遺伝子を検出し、この遺伝子座の結果としてのLQTの原因の欠如を確認することにより本発明方法を行うことができる。「野生型遺伝子の変化」は、コーディングおよび非コーディング領域における欠失、挿入および点突然変異を包含するすべての形態の変異を含む。欠失は遺伝子全体であってもよく、遺伝子の一部だけでもよい。点突然変異は停止コドン、フレームシフト変異またはアミノ酸置換を引き起こすものであってもよい。体細胞変異は、特定組織においてのみ生じ、生殖系においては遺伝されないものである。生殖系変異はいずれの体組織においても見ることができ、遺伝される。点突然変異は遺伝子のプロモーターのごとき調節領域において生じることもあり、mRNA発現の消失または減少を導く。また点突然変異は正しいRNAプロセッシングを停止させ、KCN E 2遺伝子産物の発現の消失、あるいはmRNAの安定性または翻訳効率の低下を導く。

【0034】

有用な診断方法は、後でさらに詳細に説明するが、蛍光イン・サイチュ(in situ)ハイブリダイゼーション(FISH)、直接DNA配列決定、PFGE分

析、サザンブロット分析、1本鎖コンホメーション分析(SSCA)、RNAse保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)、ドットブロット分析ならびにPCR-SSCPを包含するが、これらに限らない。

【0035】

KCNE2 遺伝子の変異に関してヒトのいずれの組織を試験することによってもLQTの存在を確認することができる。例えば、生殖系KCNE2変異を遺伝している人はLQTを発症する傾向がある。このことを、その人の身体のいずれの組織から得たDNAを試験することによっても調べることができる。最も簡単には、採血し、血液細胞からDNAを抽出する。さらに、胎児細胞、胎盤細胞または羊水細胞をKCNE2の変異について調べることにより出生前診断を行うことができる。野生型KCNE2対立遺伝子の変化は、点突然変異または欠失によるものであっても、本明細書で議論するいずれかの手段により検出することができる。

【0036】

DNA配列の変化を検出するために使用されるいくつかの方法がある。直接DNA配列決定は、手動配列決定または自動蛍光配列決定法であり、配列の変化を検出できる。別のアプローチは1本鎖コンホメーション多型性アッセイ(SSCP)(Orita et al., 1989)である。この方法は、特にDNAフラグメントサイズが200bp以上である場合にはすべての配列変化を検出するものではないが、大部分のDNA配列の変化を検出するように最適化できる。低下した検出感度は不利であるが、SSCPを用いた場合の高処理量は研究による変異の検出のための直接配列決定にとり魅力的かつ実行可能な別法である。次いで、SSCPゲル上で変化した移動度を有するフラグメントを配列決定して、DNA配列変化の正確な性質を調べる。2つの相補的DNA鎖間のミスマッチの検出に基づく他のアプローチはクランプされた変性ゲル電気泳動(clamped denaturing gel electrophoresis (CDGE))(Sheffield et al., 1991)、ヘテロ2本鎖分析(HA)(White et al., 1992)および化学的ミスマッチ開裂(CMC)(Grompe et al., 1989)を包含する。上記方法は大きな欠失、重複または挿入を検出するものではなく、さらに転写またはタンパク質への翻訳に影響する調節的変異を検出

するものでもない。タンパク質末端切断アッセイまたは非対称アッセイのごとき、これらのクラスの変異を検出できる他の方法は、特定タイプの変異のみを検出し、ミスセンス変異を検出しないものである。現在利用可能なDNA配列変化検出方法のレビューはGrompe(1993)の最近のレビューに見られる。変異が知られたものである場合には、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションのごとき対立遺伝子に特異的な検出アプローチを用いて同じ変異に関して多数の他の試料を迅速にスクリーニングすることができる。かかる方法には、可視的な結果が得られるように金微粒子で標識したプローブを使用できる(Elghanian et al., 1997)。

【0037】

1種またはそれ以上の制限酵素、好ましくは多種の制限酵素で切断したDNAの一連のサザンロットを観察することにより、DNA配列中の多型性を検出するための迅速な予備分析を行うことができる。各ロットは一連の正常個体および一連のLQT症例のものを含む。ハイブリダイズしているフラグメントを示すサザンロット(KCNE2遺伝子座付近またはこれを含む配列でプローブした場合には対照DNAとは長さが異なる)は変異の可能性を示す。非常に大きな制限フラグメントを生じる制限酵素を使用した場合には、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いる。

【0038】

当該分野においてよく知られた方法を用いてKCNE2対立遺伝子を分子クローニングし、次いで対立遺伝子の配列決定を行うことにより点突然変異の検出を行ってもよい。また、例えば、PCRまたは他の増幅方法を用いて遺伝子またはその遺伝子の一部を増幅してもよく、増幅された遺伝子またはその遺伝子の一部を配列決定してもよい。

【0039】

可能な対立遺伝子の存在を確認するための、より完全であるが、やはり間接的な試験方法が6つ知られている：1) 1本鎖コンホメーション分析(SSCP)(Orita et al., 1989)；2) 変性グラジエントゲル電気泳動(DGGE)(Wartell et al., 1990; Sheffield et al., 1989)；3) RNase保護アッセ

イ (Finkelstein et al., 1990; Kinszler et al., 1991) ; 4) 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (A S O s) (Conner et al., 1983) ; 5) E. coli mutSタンパク質のごとき、ヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質の使用 (Modrich, 1991) ; ならびに 6) 対立遺伝子特異的 P C R (Ruano and Kidd, 1989)。対立遺伝子特異的 P C R に関しては、3' 末端において特定の K C N E 変異にハイブリダイゼーションするプライマーを使用する。特定の変異が存在しない場合には、増幅産物は観察されない。欧州特許出願公開第 0 3 3 2 4 3 5 号および Newton et al., 1989 に開示された増幅困難変異系 (Amplification Refractory Mutation System (ARMS)) を用いてもよい。クローニング、配列決定および増幅により遺伝子の挿入および欠失を検出することもできる。さらに、遺伝子または周辺マーカー遺伝子用の制限フラグメント長多型性 (R F L P) プローブを用いて、対立遺伝子の変化または多型性フラグメント中の挿入を評価することができる。かかる方法は、罹病個体において見出される変異の存在に関して罹病個体の親類をスクリーニングする際に特に有用である。当該分野において知られた挿入および欠失を検出するための他の方法を用いることもできる。

【 0 0 4 0 】

最初の 3 つの方法 (S S C P、D G G E および R N a s e 保護アッセイ) において、新たな電気泳動バンドが出現する。S S C P は異なって移動するバンドを検出するものである。なぜなら配列の変化は 1 本鎖の分子内塩基対形成において相違を生じさせるからである。R N a s e 保護は、変異ポリヌクレオチドを開裂して 2 個またはそれ以上の小さなフラグメントにすることを含む。D G G E は、変性グラジエントゲルを用いて、野生型配列と比較した場合の変異配列の移動速度の相違を検出する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドアッセイにおいては、特異的配列を検出するオリゴヌクレオチドを設計し、ハイブリダイゼーションシグナルの存在または不存在を検出することによりアッセイを行う。mutS アッセイにおいては、変異配列および野生型配列間のヘテロ 2 本鎖中のヌクレオチドミスマッチを含む配列にのみタンパク質が結合する。

【 0 0 4 1 】

本発明によれば、ミスマッチとは、2 つの鎖が 1 0 0 % の相補性を有しない場

合にハイブリダイゼーションした核酸2本鎖である。全体的な相同性の欠如は欠失、挿入、逆位または置換による可能性がある。ミスマッチの検出を用いて遺伝子またはそのmRNA生成物中の点突然変異を検出することができる。これらの方法は配列決定法よりも感度が低いが、多数の試料について実行することが簡単である。ミスマッチ開裂法の例はRNase保護法である。本発明の実施に際して、本発明方法は、ヒト野生型KCNE2遺伝子コーディング配列に対して相補的な標的リボプローブの使用を含む。リボプローブおよびヒトから単離されたmRNAまたはDNAのいずれかをアニーリング（ハイブリダイゼーション）させ、次いで、2本鎖RNA構造中のいくつかのミスマッチを検出できる酵素RNase Aで消化する。ミスマッチがRNase Aにより検出される場合、それはミスマッチ部位で開裂を引き起こす。よって、アニーリングしたRNA調合物を電気泳動ゲルマトリックスで分離する場合において、ミスマッチが検出されて、RNaseにより開裂されるならば、リボプローブおよびmRNAまたはDNAに関して全長2本鎖RNAよりも小型のRNA生成物が見られるであろう。リボプローブは全長のmRNAまたは遺伝子である必要はないが、いずれかのセグメントであってもよい。リボプローブがmRNAまたは遺伝子のセグメントのみを含む場合、これらのプローブを多種使用して、ミスマッチに関してmRNA配列全体をスクリーニングすることが望ましい。

【0042】

類似のやり方で、酵素的または化学的開裂を用いて、ミスマッチを検出するためにDNAプローブを用いることができる。例えば、Cotton et al., 1988; Shenk et al., 1975; Novak et al., 1986参照。別法として、マッチした2本鎖と比較した場合のミスマッチ2本鎖の電気泳動度の変化によりミスマッチを検出することもできる。例えば、Cariello, 1988参照。リボプローブまたはDNAプローブのいずれかを用い、ハイブリダイゼーションの前にPCR（下記参照）を用いて、変異を含む可能性のある細胞のmRNAまたはDNAを増幅することができる。特に、変化が欠失および挿入のごとき大きな転位である場合には、サザンハイブリダイゼーションを用いてKCNE2遺伝子のDNAにおける変化を検出することもできる。

【0043】

PCRを用いることにより増幅され得るKCNE2遺伝子のDNA配列を、対立遺伝子特異的プローブを用いてスクリーニングしてもよい。これらのプローブは核酸オリゴマーであり、各オリゴマーは既知変異を有する遺伝子配列の領域を含んでいる。例えば、1のオリゴマーは、遺伝子配列の一部に対応した約30ヌクレオチドの長さであってもよい。かかる一式の対立遺伝子特異的プローブを用いることにより、PCR増幅生成物をスクリーニングして、すでに同定されている遺伝子中の変異の存在を同定することができる。例えば、ナイロン膜上で、対立遺伝子特異的プローブと増幅されたKCNE2配列とのハイブリダイゼーションを行うことができる。高ストリンジエンシー条件下での特定プローブとのハイブリダイゼーションは、対立遺伝子特異的プローブの場合と同じ組織中の変異の存在を示す。

【0044】

新たに開発されたマイクロチップ技術による核酸分析方法も本発明に適用可能である。この方法において、文字通り数千の異なったオリゴヌクレオチドプローブがシリコンチップ上に隊列として構成される。分析すべき核酸を蛍光標識し、チップ上のプローブとハイブリダイゼーションさせる。これらの核酸マイクロチップを用いて核酸-タンパク質相互作用を研究することも可能である。この方法を用いて、分析すべき核酸中の変異の存在を検出でき、あるいは目的遺伝子の発現レベルを測定することができる。該方法は、数千もの多くのプローブを一度に平行処理する方法であり、分析速度を驚くほど速めることができる。この方法を使用したいくつかの論文が公表されている。これらのうちいくつかはHacia et al., 1996; Shoemaker et al., 1996; Chee et al., 1996; Lockhart et al., 1996; DeRisi et al., 1996; Lipshutz et al., 1995である。乳癌遺伝子BRCA1中の変異に関して人々をスクリーニングするためにこの方法がすでに使用されている(Hacia et al., 1996)。この新しい方法はChemical and Engineering Newsのニュース論文(Borman, 1996)にレビューされており、論説の主題であった(Editorial, Nature Genetics, 1996)。Fodor(1997)も参照。

【0045】

候補遺伝子座における変異に関する最も明確な試験は、患者由来のゲノム KCNE2 配列を対照集団由来のものと直接比較することである。別法として、例えばPCRによる増幅後にメッセンジャーRNAを配列決定することができ、それにより候補遺伝子のエキソン構造を決定する必要がなくなる。

【0046】

KCNE2 のコーディング領域の外側にある患者由来の変異を、それらの遺伝子付近または遺伝子中のイントロンおよび調節配列のごとき非コーディング配列を調べることにより検出することができる。非コーディング領域中の変異が重要であるという初期の証拠は、対照個体と比較した場合の患者中の異常なサイズあるいは多量のメッセンジャーRNA分子を明らかにするノーザンブロット実験から得られたものといえる。

【0047】

当該分野において知られたいずれかの方法を用いて KCNE2 mRNA 発現の変化を検出することができる。これらの方法はノーザンブロット分析、PCR増幅、およびRNAse保護を包含する。減少したmRNA発現は野生型遺伝子の変化を示す。野生型遺伝子の変化は、野生型KCNE2タンパク質の変化についてスクリーニングすることによっても検出され得る。例えば、KCNE2と免疫反応するモノクローナル抗体を用いて組織をスクリーニングすることができる。同族抗原の欠如は変異を示す。変異対立遺伝子産物に特異的な抗体を用いて変異遺伝子産物を検出することもできる。当該分野において知られたいずれかの便利なフォーマットを用いてかかる免疫学的アッセイを行うことができる。これらのフォーマットはウェスタンブロット、免疫組織化学的アッセイおよびELISAアッセイを包含する。変化したKCNE2タンパク質を検出するためのいずれかの手段を用いて野生型KCNE2遺伝子の変化を検出することができる。タンパク質結合決定試験のごとき機能アッセイを用いることができる。さらに、KCNE2 の生物学的機能を検出するアッセイを使用することもできる。変異したKCNE2遺伝子産物を見出すことは、野生型KCNE2遺伝子の変化を示すものである。

【0048】

変異K C N E 2遺伝子または遺伝子産物を、血清、便、尿および痰のごとき他の人体試料において検出することもできる。組織中の変異した遺伝子または遺伝子産物の検出に関して上で述べたのと同じ方法を他の身体試料に適用することができる。かかる身体試料をスクリーニングすることにより、L Q Tに関して単純かつ早期の診断を行うことができる。

【0049】

本発明のプライマーペアは、PCRを用いる特定のK C N E 2対立遺伝子のヌクレオチド配列の決定に有用である。K V L Q T 2に関する1本鎖DNAプライマーのペアをK V L Q T 2遺伝子中またはその周辺の配列にアニーリングさせて、当該遺伝子自体のDNA合成の増幅を開始させることができる。これらのプライマーの完全なセットは遺伝子コーディング配列、すなわちエキソンのすべてのヌクレオチドの合成を可能にする。好ましくは、プライマーのセットはイントロン配列およびエキソン配列の両方の増幅を可能にするものである。対立遺伝子特異的プライマーを用いることもできる。かかるプライマーは特定のK C N E 2変異対立遺伝子にのみアニーリングし、かくして、変異対立遺伝子が鋳型として存在する場合にのみ生成物を増幅するであろう。

【0050】

増幅配列のその後のクローニングを容易化するために、プライマーはその5'末端に制限酵素部位配列が付いたものであってもよい。よって、制限酵素部位を形成するに必要なわずかのヌクレオチドを除いて、プライマーのすべてのヌクレオチドはK C N E 2配列あるいはK C N E 2に隣接した配列に由来するものである。かかる酵素および部位は当該分野においてよく知られている。当該分野においてよく知られた方法を用いてプライマー自体を合成してもよい。一般的には、市販オリゴヌクレオチド合成装置を用いてプライマーを作成することができる。K C N E 2の配列が得られたならば、個々のプライマーの設計は当業者のよく為すところである。本発明は、イントロン/エキソン境界のデータをさらに提供するものであり、そのことによりすべてのエキソン領域を完全に増幅し配列決定するためのプライマーを設計することを可能にする。

【0051】

本発明により提供される核酸プローブは多くの目的に有用である。それらをゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションに使用することができ、すでに上で述べた点突然変異を検出するためのRNase保護法に使用することもできる。それらのプローブを用いてPCR増幅生成物を検出することができる。他の方法を用いてKCNE2遺伝子またはmRNAをのミスマッチを検出するためにそれらのプローブを用いてもよい。

【0052】

野生型KCNE2遺伝子を有する個体はLQTを有しないことが見出されている。しかしながら、KCNE2遺伝子産物の機能を妨害する変異がLQTの発病に関与している。よって、機能を失った、あるいは機能が変化したタンパク質を生じさせる変化した（あるいは変異した）KCNE2遺伝子の存在は、心臓不整脈の危険性を増大させるLQTを直接引き起こす。KCNE2遺伝子変異を検出するために、生物学的試料を調製し、分析すべき対立遺伝子と野生型対立遺伝子との間の相違に関して分析する。上記のいずれかの方法により変異KCNE2対立遺伝子を先ず同定することができる。次いで、変異対立遺伝子を配列決定して特定の変異対立遺伝子の特定の変異を同定する。別法として、変異した（変化した）タンパク質を同定することにより変異対立遺伝子を先ず同定することができる。次いで、変異対立遺伝子を配列決定して各対立遺伝子に関して特定の変異を同定する。そして、特に、タンパク質の変化した機能を生じさせる変異を本発明の診断および予後方法に使用する。

【0053】

HERGタンパク質がMiRP1(KCNE2)タンパク質と集合することも見出されている。よって、KCNE2遺伝子産物の機能を妨害するKCNE2中の変異がLQTの発病に関与している。よって、機能を消失した、あるいは機能が変化したタンパク質を生じさせる変化した（あるいは変異した）KCNE2遺伝子の存在は、心臓不整脈の危険性を増大させるLQTを直接引き起こす。KCNE2遺伝子変異を検出するために、生物学的試料を調製し、分析すべき対立遺伝子と野生型対立遺伝子との間の相違に関して分析する。上記のいずれかの方法により変異KCNE2対立遺伝子を先ず同定することができる。そして慣用的な

方法を用いて変異対立遺伝子を配列決定して特定の変異した(変化した)タンパク質の特定の変異を同定する。次いで、変異対立遺伝子を配列決定して各対立遺伝子に関して特定の変異を同定する。そして、特に、タンパク質の変化した機能を生じさせる変異を本発明の診断および予後方法に使用する。

【0054】

実施例は、現に表されているように、本発明のいくつかの特徴を記載する。該 KCNE ペプチドは、正常イオンチャネル機能に必要とされる明らかになりつつあるスーパーファミリーである。KCNE 1によりコードされる *MinK* は129個のアミノ酸、単一の経膜セグメントを有し、多数の組織中で発現する [Takumi et al., 1988; Swanson, et al., 1993]。 *MinK* の遺伝した変異は *LQTS* および先天性聾に関連する [Schulze-Bahr et al., 1997; Splawski et al., 1997; Tyson et al., 1997; Duggal et al., 1998]。これらの摂動についての分子ベースが理解されている：心臓および聴覚系の正常機能に重要な I_{K_s} チャネルは *MinK* および *KvLQT1* の共集合体であり、ポア形成サブユニットである [Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Vetter et al., 1996]。 *KvLQT1* のみを含有するチャネルは実験細胞中では機能し得るが、 I_{K_s} チャネルは、遅めの活性化および脱活性化キネティクス、大きめの単一チャネルコンダクタンス、クラスIII抗不整脈薬への高めの親和性およびもう一つのメッセンジャーに対する高めの感受性を有する [Sanguinetti et al., 1996; Busch et al., 1997; Kaczmarek and Blumenthal, 1997; Sesti and Goldstein, 1998; Yang and Sigworth, 1998]。これらの特性は、 *MinK* および *KvLQT1* サブユニットの深い物理的相関によるものである [Goldstein and Miller, 1991; Wang et al., 1996; Tai et al., 1997; Sesti and Goldstein, 1998; Tai and Goldstein, 1998]。その機能的および臨床的重要性に関わらず、このタイプの混合複合体は *MinK* ホモログとして普通でないと考えられ、あるいは、同様の機能を従位的に機能するサブユニットは知られていなかった。

【0055】

ここに、本発明者らは、染色体位置、cDNA配列および予測産物、野生型挙動および KCNE 1 (*MinK*) の第1の遺伝子ホモログの不整脈関連性を描写

する。KCNE2によりコードされるMiRP1は123個のアミノ酸、単一の予測経膜セグメントを有し、心筋および骨格筋において発現される。MinK同様に、MiRP1はポア形成サブユニットと共集合して、その機能が天然心臓カリウムチャンネルとそれに似た機能属性である安定した複合体を生じる。MinK/KvLQT1複合体は I_{Ks} チャンネルの挙動を再現するが、MiRP1/HERG複合体は I_{Kr} チャンネルの挙動を要約する。HERGサブユニット単独で形成されたチャンネルと比較すると、MiRP1を含有するそれらは、変化した電位依存性活性、脱活性化のキネティクス、ユニタリーコンダクタンス、外部 K^+ による調節に対する感受性および薬理学を示す。変異形態において、MiRP1は先天性および後天性心臓不整脈に関連する。MinKおよびMiRP1は正常心臓イオンチャンネル機能に重要であることが明らかにされた。

【0056】

KCNEペプチドを天然細胞中の様々なチャンネルアッセムブリーに取り込ませる。rMiRP1を卵母細胞中の7つの異なる K^+ チャンネルサブユニットと共発現させたとき効果が存在しないことから、機能特異性が推測される。MinK/HERGアッセムブリーが形成し得る(図6; [McDonald et al., 1997])にもかかわらず、イン・ビトロでMinKよりもMiRP1がHERGと優先的に会合することから(図6)、特異的結合が示される。 I_{Kr} および I_{Ks} 以外のチャンネルにおけるKCNEペプチドの役割はほぼ確実のようであるが、ヒトとマウスとのMiRP2(KCNE3)およびマウスMiRP3(KCNE4)の研究は、それらはHERGまたはKvLQT1電流を変化させず、卵母細胞の内在チャンネルサブユニットを活性化することもない。

【0057】

MiRP1/HERG複合体は、天然心臓 I_{Kr} チャンネルのように機能する。HERGサブユニットだけで形成されたチャンネルは、作動、コンダクタンス、 K^+ による調節、およびメタンスルホンアニリドによるブロックにおいて異なることが知られている[Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995; Spector et al., 1996; Zou et al., 1997; Ho et al., 1998]および[Shibasaki, 1987; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Yang et al., 1994; Veldkamp et al.

, 1995; Ho et al., 1996; Howarth et al., 1996]。天然 I_{Kr} チャンネルが $MiRP1$ および $HERG$ サブユニットの共集合により形成されるというアイデアは、ここに報告する6つの観察と一致する。

【0058】

第1に、 $MiRP1$ を含有するチャンネルの単一チャンネルコンダクタンスは $HERG$ チャンネルのものよりも小さいが、単離したウサギおよびヒトの心臓細胞における I_{Kr} チャンネルのものと同じである [Shibasaiki, 1987; Veldkamp et al., 1995; Zou et al., 1997]。第2に、ネズミとヒトとの心臓筋細胞において、 $MiRP1/HERG$ 複合体は $HERG$ サブユニットだけで形成されたチャンネルよりも3倍速く脱活性化する [Yang et al., 1994; Sanguinetti et al., 1995; London et al., 1997; Wang et al., 1997]。第3に、 $MiRP1/HERG$ 複合体は、ネズミ心房とモルモット心室との筋細胞における I_{Kr} チャンネル同様に、 $HERG$ チャンネルよりも外部 K^+ による調節に対して感受性が低い [Shibasaki, 1987; Scamps and Carmeliet, 1989; Sanguinetti and Jurkiewicz, 1992; Sanguinetti et al., 1995; Yang and Roden, 1996; Yang et al., 1997]。第4に、 $MiRP1$ および $HERG$ サブユニットは、安定な様式で共集合する。第5に、天然 I_{Kr} チャンネルの保証は、メタンスルホンアニリドクラスIII抗不整脈薬によるブロックが2つの相、初期試験パルスで観察される高速相および低速相で進行することである [Carmeliet, 1992]。逆に、 $HERG$ チャンネルは、明らかなブロックの発現前に活性化の閾に対して正の電位に対して繰返しパルスをかけることを必要とする [Spector et al., 1996]。心筋細胞中の天然 I_{Kr} チャンネル同様に、 $hMiRP1$ および $HERG$ の集合により形成されたチャンネルは、二相E-4031ブロックを示す 混合複合体は初期試験パルスで著しく阻害され、ゆっくりと平衡ブロックに緩和する(図7B、c)一方、 $HERG$ サブユニットだけで形成されたチャンネルは繰返し試験パルス後にのみ阻害される(図7A)。最後に、Q9E-hMiRP1は、イン・ビトロで $MiRP1/HERG$ チャンネルのクラリスロマイシン感受性を増大させる(図9)。クラリスロマイシンは、単離したモルモットとイヌとの心室筋細胞において、 I_{Kr} 電流をブロックし、高用量にて、ヒトにおいて、延長したQT間隔およびTdPを誘発

することが知られている [Daleau et al., 1995; Antzelevitch et al., 1996; Katapadi et al., 1997]。当該変異体がクラリスロマイシン誘導トルサード・ド・ポアン (T d P) および V F に罹患した患者から単離されたことは、天然 I_{Kr} チャンネルが h M i R P 1 で形成されるという論文を支持する。

【 0 0 5 9 】

h K C N E 2 は不整脈罹患性遺伝子である。M i R P 1 の遺伝子における変異は不整脈に罹患しやすくさせるという仮説を支持する分子遺伝子データは、L Q T S および/または V F に関連する 3 つのミスセンス変異の同定を含む。Q 9 E - h M i R P 1 は薬物誘導不整脈に罹患した 2 0 人の患者のうち一人に確認された。M 5 4 T - h M i R P 1 および I 5 7 T - h M i R P 1 はそれぞれ、先天性または散発性不整脈に罹患した 2 3 0 人の患者のうち一人から単離された。該仮説を支持する非遺伝子データは、 I_{Kr} 機能障害が L Q T S および不整脈罹患性を引き起こすことが知られており、M i R P 1 および H E R G が共集合して I_{Kr} 様チャンネルを形成し、および K C N E 2 における不整脈関連変異はイン・ビトロで形成されたチャンネルに有害な影響を有するという観察を含む。共通の多型性があるという別の説明は誤りが立証されている。

【 0 0 6 0 】

不整脈に関連する M i n K および M i R P 1 変異体は共通の効果を有する。M i n K の 4 つの変異体は先天性 L Q T S に関連している : T 7 I、D 7 6 N、S 7 4 L および T L 5 8、5 9 P P [Schulze-Bahr et al., 1997; Splawski et al., 1997; Tyson et al., 1997; Duggal et al., 1998]。S 7 4 L および/または D 7 6 L - M i n K での I_{Ks} チャンネル形成は、活性化の $V_{1/2}$ をより脱分極した電位シフトし、脱活性化を加速し [Splawski et al., 1997; Sesti and Goldstein, 1998]、および、単一チャンネルコンダクタンスを減少させる [Sesti and Goldstein, 1998] ことによって、 K^+ フラックスを減少させる (および心臓活動電位を延長する)。同様に、該 Q T 間隔の延長化に関連する M i R P 1 変異体は、活性化の電位依存性を増大し、脱活性化を加速することによって K^+ 電流を低減する。Q 9 E - h M i R P 1 で形成されたチャンネルを通る電流は、薬物ブロックにより感受性なので、クラリスロマイシンに暴露されたとき、野生型と

比較してさらに低減する(図9)。

【0061】

MiRP1、MinK、HERGおよびKvLQT1における不整脈関連変異は、チャネル機能に同程度の変化を生じる。Q9E-hMiRP1は活性化を妨害し、(0mVにて0.5mM クラリスロマイシンで野生型と対して電流に60%の低下を生じる)マクロライド抗菌剤に対する感受性を増強する。M54T-hMiRP1は、野生型の2倍速く脱活性化する I_{Kr} チャネルを形成し、^{高速}に54%の低下を示す(表1)。同様に、HERGおよびKvLQT1における機能損失変異は、ピーク電流に50~80%の低下をもたらし[Sanguinetti et al., 1996; Wollnik et al., 1997]、一方、他のLQTS関連HERG変異は、^{高速}を40~70%から低下させることによって脱活性化速度を増加させる[Chen et al., 1999]。LQTSに関連するS74LおよびD76N-MiRP1変異は、40~70%低下した単一チャネルコンダクタンスおよび33~75%高速化した脱活性化速度を有する I_{Ks} チャネルを形成する[Sesti and Goldstein, 1998]。逆に、T8A-hMiRP1は、活性化の $V_{1/2}$ における8mVの負シフト以外は、低下に関連せず、野生型のように機能した。

【0062】

心臓活動電位を延長化する医薬での治療中のTdPの発生は予測できない。TdPは、キニジン[Roden et al., 1986]、ゾタロール[Hohnloser and Woosley, 1994]およびイブチリド[Ellenbogen et al., 1996]を含む種々の抗不整脈薬、抗ヒスタミンテルフェナジン[Woosley, et al., 1993]、消化管運動賦活調整剤シサプリド[Carlsson et al., 1997]およびマクロライド抗菌剤エリスロマイシン[Daleau et al., 1995; Antzelevitch et al., 1996]およびクラリスロマイシン[Kunda et al., 1997; Lee et al., 1998]での治療の認識された危険性である。各場合において、いくつかの場合、 I_{Kr} チャネルの阻害によって、該剤は心臓 K^+ 電流を低減させる。薬物誘導TdPの危険性にある患者を同定するベースライン特性はQT間隔の先天性延長、低カリウム血症、女性(female gender)および低心拍数を含み、それら各々は、活動電位持続時間を延長化する;この観察は、Roden(1998)が再分極蓄積(repolarization reserve)の

概念、すなわち、正常メカニズムによる規律正しい、急速な再分極化に影響する心筋層の過剰能力を発展させることに導いた。TdPの危険因子はこの蓄積を低減し、より適当なさらなるストレスによる不整脈の沈殿物を生成する。

【0063】

かくして、Q9E-hMiRP1を保有する患者におけるベースラインでの延長されたQT間隔についてのもっともらしいシナリオは、容易には活性化せず、したがって、少ない K^+ しか通過させずに時機を得て再分極化を達成するチャンネルの形成である。低下した K^+ 電流をもたらす3つのさらなる因子が、この患者をTdPおよびVFに罹患し易くしたのであろう。第1に、クラリスロマイシンが心臓 I_{Kr} チャンネルをブロックする；Q9E-hMiRP1チャンネルは、該薬物に対して3倍感受性が高いので、この効果は該患者においてより顕著であろう。第2に、同時発生の低カリウム血症が、 I_{Kr} チャンネル活性を低減し、該アクトライド抗菌剤による阻害をさらに増強する。第3に、女性であることが独立危険因子であり、ウサギ心室筋細胞に見られるごとく、おそらく I_{Kr} 密度に性差特異性差異によるものであろう[Makker et al., 1993; Drici et al., 1998; Ebert et al., 1998]。本発明者らの結果は、後天性不整脈が変異チャンネルサブユニットの遺伝に起因し得るというアイデアを支持し、このサブユニットは、心臓再分極能力を低減するが、誘発的な刺激が心筋層の普通に再分極する能力をさらに低減するまでは十分に耐性である。

【0064】

定義

本発明は以下の定義および使用の方法を採用し、それらは、適切な場合、KCNE2に言及される。しかしながら、かかる定義および使用の方法はKCNE3およびKCNE4にも適用可能である。

「ポリヌクレオチドの増幅」とは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ライゲーションアンプリフィケーション(すなわちリガーゼ連鎖反応, LCR)およびQ-レプリカーゼの使用に基く増幅方法のごとき方法を利用する。また、ストランドディスプレイメント増幅(SDA)、好熱性SDA、および核酸配列に基いた増幅(3SRまたはNASBA)も有用である。これらの方法は当業者に

周知であり、本分野で広く実施されている。例えば、米国特許第4,683,195号および第4,683,202号ならびにInnisら,1990年(PCRについて);WuおよびWallace,1989年(LCRについて);米国特許第5,270,184号および第5,455,166号ならびにWalkerら,1992年(SDAについて);Spargoら,1996年(好熱性SDAについて);Spargoら,1996年(好熱性SDA)および米国特許第5,409,818号,Fahyら,1991年およびCompton,1991年(3SRおよびNASBAについて)を参照。PCRを行うための試薬およびハードウェアは商業的に入手可能である。KCNE2領域由来の配列を増幅するために有用なプライマーは、好ましくはKCNE2領域内の配列またはその中の標的配列に隣接する領域内の配列に相補的であり、および特異的にこれらにハイブリダイズする。増幅によって生じたKCNE2配列は直接配列決定できる。別法として、ただしあまり好ましくないが、増幅配列を配列分析前にクローニングしてもよい。酵素的に増幅したゲノムフラグメントの直接クローニングおよび配列分析の方法はScharfら,1986年によって開示されている。

【0065】

「検体ポリヌクレオチド」および「検体鎖」とは、標的配列を含むと推測される1本鎖または2本鎖のポリヌクレオチドをいい、それらは生物学的試料を包含する様々なタイプの試料に存在していてもよい。

「抗体」。本発明はまた、KCNE2ポリペプチドおよびそれらのフラグメントまたはKCNE2領域由来のポリヌクレオチド配列に特異的に結合できるポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体およびそれらのフラグメント、ならびにそれらの免疫学的に結合する同等物も提供する。「抗体」なる用語は、均一の分子実体、または抗体生産物のように大多数が異なる分子実体からなる混合物をいうのに共に用いられる。ポリヌクレオチドを、ペプチドシンセサイザーにおいて合成的に調製し、キャリアー分子(例、キーホール・リンペット・ヘモシアニン)に結合させ、および数ヶ月にわたってウサギに注入できる。ウサギ血清をKCNE2ポリペプチドまたはそれらのフラグメントに対する免疫反応性について試験する。タンパク質ポリペプチド、融合タンパク質またはそれらのフラグ

メントをマウスに注入することにより、モノクローナル抗体を作成できる。モノクローナル抗体はELISAによってスクリーニングされ、KCNE2ポリペプチドまたはそれらのフラグメントとの特異的な免疫反応性について試験される。[Harlow and Lane, 1988]を参照。これらの抗体はアッセイおよび医薬において有用である。

【0066】

十分量の目的のポリペプチドが得られれば、それを様々な目的に用いることができる。典型的な使用は、結合について特異的な抗体の生産である。これらの抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよく、当業者に周知のイン・ビトロまたはイン・ビボのどちらの技術で生産されてもよい。ポリクローナル抗体の生産のため、適当な標的免疫系（典型的にはマウスまたはウサギ）を選択する。動物について適当な方法および免疫学者に周知の他のパラメーターによって決定された形式で、実質的に精製された抗原が免疫系に与えられる。注入のための典型的な部位は足蹠中、筋肉内、腹腔内、または皮内である。当然、他の種をマウスまたはウサギに代えてもよい。ついで、目的の特異性のために適合させて、当業者に既知の技術を用いてポリクローナル抗体を精製する。

【0067】

通常、免疫アッセイにより免疫学的応答を検定する。通常、かかる免疫アッセイは、例えば抗原と同じ細胞および同じ形式で生産された抗原のソースの何らかの精製を含む。様々な免疫アッセイ方法が当業者に周知である。[Harlow and Lane, 1988]または[Goding, 1986]を参照。

【0068】

典型的には、例えば[Harlow and Lane, 1988]または[Goding, 1986]に記載のごとき標準的方法により、親和性 $10^{-8}M^{-1}$ 、または好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-10}M^{-1}$ またはそれ以上のモノクローナル抗体が作成される。要するに、適当な動物が選択され、望ましい免疫化プロトコールに従う。適当な期間の後、適当な選択条件下で、かかる動物の脾臓を摘出し、個々の脾臓細胞を溶かし、典型的には、ミエローマ細胞を不死化する。その後、細胞をクローン分離し、抗原の目的の領域に特異的な適当な抗体の生産について各クローンの上清を試

験する。

【0069】

他の適当な技術は、抗原性ポリペプチドへのリンパ球のイン・ビトロ曝露、または別法として、ファージもしくは類似のベクター中の抗体ライブラリーの選択物へのリンパ球のイン・ビトロ曝露を含む。Huseら、1989年を参照。本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾して、または修飾せずに使用できる。多くの場合、ポリペプチドおよび抗体を、検出可能なシグナルを与える基質を共有結合的または非共有結合的に結合させることにより標識する。広範な標識および結合技術が知られており、科学文献と特許文献の両方で広く報告されている。適当な標識は放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光剤、化学ルミネセンス剤、磁性粒子などである。かかる標識の使用を教示する特許には、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号および第4,366,241号がある。また、組換え免疫グロブリンを生産することもできる（米国特許第4,816,567号を参照）。

【0070】

「結合パートナー」とは、例えば抗原と抗原特異的抗体または酵素とその阻害剤のように、高い特異性でリガンド分子を結合できる分子をいう。通常、特異的結合パートナーは単離条件下で、十分な親和性で検体コピー/相補2重鎖（ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの場合）に結合して固定しなければならない。特異的結合パートナーは当業者に既知であり、例えば、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、IgGとプロテインA、多くの受容体-リガンドの組、および相補的ポリヌクレオチド鎖を含む。相補的ポリヌクレオチド結合パートナーの場合、パートナーは通常少なくとも15塩基の長さであり、および少なくとも40塩基の長さであってもよい。15未満の長さ（例、8塩基）、15～40の間、および40より多い塩基もまた用いることができることは当業者に理解されよう。ポリヌクレオチドはDNA、RNA、または合成ヌクレオチドアナログを含む。さらに、結合パートナーは本明細書に記載のごとく例えば2-ハイブリッド酵母スクリーニングアッセイを用いて同定できる。

【0071】

「生物学的試料」とは、個体由来の検体ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含むことが推測される組織または流体の試料（特に限定されるものではないが、例えば血漿、血清、髄液、リンパ液、皮膚の表面切片、呼吸器、腸および尿生殖器の管、涙、唾液、血液細胞、腫瘍、器官、組織およびイン・ビトロ細胞培養構成物を含む）をいう。

【0072】

「コードする」。ポリヌクレオチドが、本来の状態、または当業者に周知の方法で操作された場合に、転写および/または翻訳されてポリヌクレオチドのmRNAおよび/もしくはポリペプチドまたはそれらのフラグメントを生産する場合、ポリヌクレオチドはポリペプチドを「コードする」という。アンチセンス鎖はかかる核酸の相補体であり、コーディング配列はそれらから推測できる。

【0073】

「単離された」または「実質的に純粋な」。「単離された」または「実質的に純粋な」核酸（例、RNA、DNAまたは混合ポリマー）は、天然では本来のヒト配列またはタンパク質に付随している他の細胞成分（例、リボソーム、ポリメラーゼ、多くの他のヒトゲノム配列およびタンパク質）から実質的に分離されているものである。当該用語は、天然に存在する環境から移動させられた核酸配列またはタンパク質を包含し、および組換えまたはクローン化DNA単離物および化学合成アナログまたは異種系により生物学的に合成されたアナログを含む。

【0074】

「KCNE2対立遺伝子」とは、各々KCNE2遺伝子座の正常な対立遺伝子およびLQTを生じる変種を保有するKCNE2対立遺伝子をいう。

【0075】

「KCNE2遺伝子座」、「KCNE2遺伝子」、「KCNE2核酸」または「KCNE2ポリヌクレオチド」とは、各々正常な組織で発現すると考えられるポリヌクレオチド（それらは全てKCNE2領域内である）をいい、その対立遺伝子にはLQTを生じるものがある。KCNE2遺伝子座はコーディング配列、介在配列ならびに転写および/または翻訳を調節する翻訳制御因子を包含するこ

とを意図する。KCNE2遺伝子座は当該DNA配列の全ての対立性変種を包含することを意図する。「KCNE2」および「MIRP1」なる用語は相互に交換して用いることができる。同様に、KCNE3遺伝子座はコーディング配列、介在配列ならびに転写および/または翻訳を調節する翻訳制御因子を包含することを意図する。該KCNE3遺伝子座は、該DNA配列の全ての対立遺伝子変種を包含することを意図する。「KCNE3」および「MIRP2」なる用語は相互に交換して用いることができる。同様に、KCNE4遺伝子座はコーディング配列、介在配列ならびに転写および/または翻訳を調節する翻訳制御因子を包含することを意図する。該KCNE4遺伝子座は、該DNA配列の全ての対立遺伝子変種を包含することを意図する。「KCNE4」および「MIRP3」なる用語は相互に交換して用いることができる。

【0076】

これらの用語は、核酸に適用された場合、ヒトKCNE2ポリペプチド、フラグメント、ホモログまたは変種（例えばタンパク質融合体または欠失体を包含する）をコードする核酸をいう。本発明の核酸は天然のKCNE2コード遺伝子または天然のKCNE2コード遺伝子と実質的に相同性を有するものあるいはそれらの一部に由来の配列または実質的に類似する配列を有する。

【0077】

KCNE2の遺伝子または核酸は、各々、KCNE2遺伝子の正常な対立遺伝子（KCNE2ポリペプチドのアミノ酸配列に影響を与えないサイレント対立遺伝子および実質的にその機能に影響を与えないKCNE2ポリペプチドのアミノ酸配列変種を導く対立遺伝子を包含する）を包含する。また、これらの用語は、KCNE2ポリペプチドの機能に悪影響を及ぼす1以上の変異を有する対立遺伝子も包含する。変異は、KCNE2ポリペプチドのアミノ酸配列における有害な変化を生じ、KCNE2の機能の部分的または完全な欠失の結果を与える、KCNE2核酸配列における変化であってもよい。あるいは、有効なKCNE2の発現の損失またはKCNE2ポリペプチドの異常型の生産の結果をあたえる、核酸配列の変化であってもよい。

【0078】

KCNE2核酸は、配列番号：1（ヒト）または配列番号：3（ラット）に記載されたものであってもよく、上記のような対立遺伝子、または示した配列の1以上の核酸の1以上の付加、挿入、欠失および置換である変化により、示したものと異なる変種もしくは誘導体であってもよい。ヌクレオチド配列に対する変化がタンパク質レベルでのアミノ酸変化の結果を生じるか否かは遺伝子コードによって決定される。同様の考察および範囲が、本明細書中KCNE2につき記載されるごとく、ヒトKCNE3（配列番号：5）、マウスKCNE3（配列番号：7）、ヒトKCNE4（配列番号：9）およびマウスKCNE4（配列番号：11）にあてはまる。

【0079】

したがって、本発明の核酸は、配列番号：1および3に記載された配列とは異なる配列を包含し、さらに、これらの図に示したものと同一アミノ酸配列のポリペプチドをコードするであろう。すなわち、本発明の核酸は遺伝子コードの縮重の結果として生じる配列を包含する。一方、コードされたポリペプチドは配列番号：2および4に記載されたアミノ酸配列とは1以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列を含んでもよい。本発明は、配列番号：2および4に記載されたアミノ酸配列のアミノ酸配列変種、誘導体または対立形質もまた提供する。

【0080】

KCNE2遺伝子はまた、各々(a)(i)配列番号：1（ヒト）または配列番号：3（ラット）に記載されたアミノ酸配列をコードするDNA配列の相補鎖に、高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし（Ausubelら、1992年）、および(ii)KCNE2に対して機能的に同等の遺伝子産物をコードする、あらゆるDNA配列、あるいは(b)(i)配列番号：2または配列番号：4に記載されたアミノ酸配列をコードするDNA配列の相補鎖に、適度なストリンジェント条件のごときあまりストリンジェントではない条件下でハイブリダイズし（Ausubelら、1992年）、および(ii)KCNE2に対して機能的に同等の遺伝子産物をコードする、あらゆるDNA配列もいう。本発明はまた本明細書に記載の配列の相補鎖である核酸分子も包含する。

【0081】

本発明のポリヌクレオチド組成物は、当業者に容易に理解されるように、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合成型、および混合ポリマー、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を包含し、化学的または生化学的に修飾されていてもよく、非天然または誘導体化ヌクレオチド塩基を含有していてもよい。かかる修飾は、例えば、標識、メチル化、アナログにより天然に生じるヌクレオチドの1以上の置換、非電荷結合（例、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホラミデート、カルバミデート、等）、電荷結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、等）、未決定の（pendent）分子（例、ポリペプチド）、インターカレーター（例、アクリジン、プソラレン、等）、キレーター、アルキレーター、および修飾結合（例、アノマー核酸、等）のごときヌクレオチド間修飾を含む。水素結合および他の化学的相互作用を介して目的の配列に結合する能力においてポリヌクレオチドを模倣する合成分子もまた包含される。かかる分子は当業者に既知であり、例えばペプチド結合が分子骨格においてリン酸結合に置き換わったものを包含する。

【0082】

本発明は、KCNE2領域の全部または一部を含む組換え核酸を提供する。組換え構築物は宿主細胞中で自律複製可能であってもよい。別法として、組換え構築物は宿主細胞の染色体DNAに組み込まれてもよい。かかる組換えポリヌクレオチドは、そのオリジンまたは操作の効力により、1)天然では会合するポリヌクレオチドの全部または一部と会合しない；2)天然で結合するもの以外のポリヌクレオチドに結合する；または3)天然に存在しない、ゲノム、cDNA、半合成、または合成オリジンのポリヌクレオチドを含有する。本発明の核酸がRNAを包含する場合、示した配列のリファレンスはRNA同等物と比較してUによってTが置き換えられて解釈される。

【0083】

したがって、他で天然に存在しない配列を含む組換え核酸は本発明によって提供される。野生型の配列を用いても良いが、それは、例えば欠失、置換または挿入によって頻繁に変化する。様々なタイプのcDNAまたはゲノムライブラリーを本発明の核酸の天然のソースとしてスクリーニングできる。またはかかる核酸

はゲノムDNAまたはその他の天然のソース中に常在性の配列の増幅により得ることができる。cDNAライブラリーの選択は通常目的のタンパク質についてのmRNAに富んだ組織ソースに対応する。通常ファージライブラリーが好ましいが、他のタイプのライブラリーを用いても良い。ライブラリーのクローンをプレート上に広げ、スクリーニング用の培養基に移し、変成させ、および目的の配列について探索する。

【0084】

本発明において用いられるDNA配列は、一般に少なくとも約5コドン(15ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約7~15コドン、もっとも好ましくは少なくとも35コドンを有する。1以上のイントロンが存在しても良い。このヌクレオチドの数は通常、KCNE2コーディング配列およびKCNE2コーディング配列に特異的にうまくハイブリダイズするプローブに必要な、ほぼ最小の長さである。本明細書中、特にチップ技術に関して、8ヌクレオチドの低さ、より一般的には8~17ヌクレオチドのオリゴマーをプローブとして用いることができる。

【0085】

核酸操作のための技術は一般的に、例えば、Sambrookら, 1989年またはAusubalら, 1992年に記載されている。制限酵素等のような、かかる技術の適用に有用な試薬は当業者に周知であり、New England BioLabs, Boehringer Mannheim, Amersham, Promega, U. S. Biochemicals, New England Nuclearのようなベンダーおよび多数のソースから商業的に入手可能である。本発明の融合タンパク質を生産するために用いられる組換え核酸配列は天然または合成配列から得てもよい。多くの天然の遺伝子配列が、適当なプローブを用い、様々なcDNAまたはゲノムライブラリーから入手可能である。GenBank, National Institutes of Healthを参照。

【0086】

本明細書中、KCNE2遺伝子座または領域または対立遺伝子の「一部」とは、少なくとも8ヌクレオチド、または好ましくは約15ヌクレオチド、またはより好ましくは少なくとも約25ヌクレオチドの最小サイズを有するものとして定

義され、および少なくとも約40ヌクレオチドの最小サイズを有していてもよい。この定義は8~40ヌクレオチドの範囲内の全てのサイズおよび40ヌクレオチド以上の全てのサイズを包含する。したがって、この定義は8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400、500ヌクレオチドの核酸、またはこれらの値の範囲内のあらゆる数のヌクレオチドを有する核酸(例、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121ヌクレオチド等)、または500ヌクレオチド以上を有する核酸を含む。本発明は、配列番号:1、3、5、7、9および11、その相補鎖または機能的に同等の核酸配列由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての新規な核酸を包含する。本発明は従来技術において存在する核酸は包含しない。すなわち、本発明は、従来技術に存在する核酸をしない限りにおいて、配列番号:1、3、5、7、9および11由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての核酸を包含する。

【0087】

「KCNE2タンパク質」または「KCNE2ポリペプチド」とは、KCNE2遺伝子座、それらの変種またはフラグメントによってコードされるタンパク質またはポリペプチドをいう。「KCNE2」および「MiRP1」なる用語は相互に交換して用いられる。同様に、「KCNE3タンパク質」とは、KCNE3遺伝子座、それらの変種またはフラグメントによってコードされるタンパク質またはポリペプチドをいう。「KCNE3」および「MiRP2」なる用語は相互に交換して用いられる。同様に、「KCNE4タンパク質」とは、KCNE3遺伝子座、それらの変種またはフラグメントによってコードされるタンパク質またはポリペプチドをいう。「KCNE4」および「MiRP3」なる用語は相互に交換して用いられる。「ポリペプチド」なる用語はアミノ酸のポリマーおよびその同等物をいい、特定の長さの生産物;したがって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質をいうものではない。この用語はポリペプチドの修飾(例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等)をいうものではなく、これらは除かれる。この定義に含まれるのは例えば1以上のアミノ酸のアナログ(例えば、非天然のアミノ酸等を包含する)を含有するポリペプチド、置換結合および当業者に既知の他の修飾を有するポリペプチドであり、これらは天然に生じるものと非

天然に生じるものの両方を含む。通常、かかるポリペプチドは天然のKCNE2配列に対して少なくとも約50%、好ましくは90%を超える相同性を有し、さらに好ましくは少なくとも約95%の同一である。また、高度または低度にストリンジェントな条件下でKCNE2コード核酸にハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質およびKCNE2タンパク質に対する抗血清によって回収される密接に関連するポリペプチドまたはタンパク質も含まれる。

【0088】

KCNE2ポリペプチドは配列番号：2（ヒト）または配列番号：4（ラット）に記載されたものであってもよく、それらは単離および/または精製型であってもよく、天然に会合する物質が無く、または実質的に無いものであってもよい。該ポリペプチドは、原核細胞での発現により生産される場合または合成的に生産される場合、グリコシル化のような本来の翻訳後プロセッシングを欠いていてもよい。別法として、本発明はまたKCNE2ポリペプチドの配列変異体、対立形質または誘導体であるポリペプチドも導く。かかるポリペプチドは、1以上のアミノ酸の1以上の付加、置換、欠失または挿入によって、配列番号：2または配列番号：4に記載されたものとは異なるアミノ酸配列を有していてもよい。好ましくは、かかるポリペプチドはKCNE2の機能を有する。同様の考察および範囲が、本明細書中KCNE2につき記載されるごとく、ヒトKCNE3（配列番号：6）、マウスKCNE3（配列番号：8）、ヒトKCNE4（配列番号：10）およびマウスKCNE4（配列番号：12）にあてはまる。

【0089】

置換変種は典型的にはタンパク質内の1以上の部位において1アミノ酸の他への交換を含み、他の機能や性質を損なうことなく、タンパク質溶解開裂に対する安定性のようなポリペプチドの1以上の性質を調節するために設計されてもよい。アミノ酸置換は残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性に基いてなすことができる。好ましい置換は保存的なもの、すなわち、1アミノ酸が類似の形および電荷のものに置換されたものである。保存的置換は当業者に周知であり典型的には以下のグループ内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アス

パラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびチロシン、フェニルアラニン。

【0090】

例えば、抗体の抗原 - 結合領域または基質分子上の結合部位またはKCNE2ポリペプチドと相互作用するタンパク質上の結合部位のような構造との相互作用結合能力を認識可能な程度に損なうことなく、タンパク質構造中の特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換してもよい。タンパク質の生物学的機能活性を定義するのはタンパク質の相互作用能力および性質であるので、タンパク質配列、およびその基礎をなすDNAコーディング配列において特定のアミノ酸置換をなすことができ、それにも関わらず類似の性質のタンパク質が得られる。かかる変化をなすことにおいて、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮してもよい。タンパク質における相互作用的な生物学的機能の供与において疎水性アミノ酸指標の重要性は一般的に当業者に理解される（KyteおよびDoolittle、1982年）。別法として、親水性に基き効果的に類似アミノ酸の置換をなすことができる。タンパク質における相互作用的な生物学的機能の供与において親水性の重要性は一般的に当業者に理解される（米国特許第4,554,101号）。ポリペプチドの設計における疎水性指標または親水性の使用は米国特許第5,691,198号においてさらに検討されている。

【0091】

相同性について比較されるポリペプチド配列の長さは、一般的に少なくとも16アミノ酸、通常少なくとも約20残基、より通常では少なくとも約24残基、典型的には少なくとも約28残基、および好ましくは約35残基以上である。

【0092】

「作動可能に結合された」とは、記載した成分が意図した方法で機能できる関係である並置をいう。例えば、プロモーターがコーディング配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはコーディング配列に作動可能に結合されている。

【0093】

「ペプチド模倣」または「模倣」なる用語は、KCNE2ポリペプチドの必須

の生物学的活性を有する物質をいうことを意図する。ペプチド模倣は、タンパク質 2 次構造の要素を模倣するペプチド含有分子であってもよい (Johnsonら, 1993年)。ペプチド模倣の背後の基礎となる原理は、抗体と抗原の相互作用、酵素と基質または骨格タンパク質のような分子相互作用を促進するように、タンパク質のペプチド骨格が主にアミノ酸側鎖に向かって存在することである。ペプチド模倣は天然分子と類似の分子相互作用を可能にするように設計される。模倣は全くペプチドでなくてもよいが、天然の KCNE 2 ポリペプチドの必須の生物学的活性は保有する。

【0094】

「プローブ」。LQTを罹患し易くする KCNE 2 対立遺伝子に関するポリヌクレオチドの多型性は、ストリンジェント～中ぐらいのストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、標的配列のポリヌクレオチドと安定なハイブリッドを形成するポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによって検出される。プローブが標的配列と完全に相補的であることが推測される場合、高度にストリンジェントな条件が用いられる。ある程度の不一致が予測される場合、例えば、変種が、プローブが完全に相補的でない結果を予期される場合、ハイブリダイゼーションのストリンジェントさを弱めてもよい。非特異的/不定の結合を制御する、すなわちノイズを最小にする条件が選択される (本明細書中、単に「ストリンジェントな」条件を用いるという場合、「高度にストリンジェントな」条件が用いられると読まれることを意図している。)。かかる指示はニュートラルな DNA 多型性と変異を同一視するので、これらの指示はさらに KCNE 2 感受性対立遺伝子の検出を示すためのさらなる分析が必要である。

【0095】

KCNE 2 対立遺伝子用のプローブは、KCNE 2 領域、その cDNA、機能的に同等の配列、またはそれらの相補鎖から得ることができる。プローブは、KCNE 2 領域の全部または一部にわたり、該領域への特異的ハイブリダイゼーションを可能にする、任意の適当な長さであってよい。標的配列がプローブの配列と同一の配列を含む場合、ハイブリッドはストリンジェントな条件下でも比較的安定なのでプローブは短くてもよい (例、約 8 ~ 30 塩基対の範囲内)。ある程

度のプローブとの不一致が予測される場合、すなわちプローブが変種領域へハイブリダイズするであろう場合、必要な特異性を有し標的配列にハイブリダイズする、より長いプローブを用いることができる。

【0096】

プローブは標識またはリポーター分子に結合している単離ポリヌクレオチドを包含し、標準的な方法により、配列類似性を有する他のポリヌクレオチド配列を単離するために用いることができる。プローブを調製および標識する技術については、Sambrookら、1989年またはAusubalら、1992年を参照。他の類似ポリヌクレオチドは同一性ポリヌクレオチドを用いることにより選択できる。別法として遺伝子コードの重複性の使用により、これらの、または類似のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、合成または選択してもよい。例えば、サイレント変化（それにより様々な制限部位を生じる）により、様々なコドン置換を導入し、または特定の系について発現を最適化できる。変異を導入して、ポリペプチドの性質を修飾し、あるいはポリペプチド分解またはターンオーバー率を変化させることができる。

【0097】

本発明の合成オリゴヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチドを含有するプローブは、天然に発生するかもしくは組換えの1本もしくは2本鎖ポリヌクレオチド、または化学合成から得ることができる。またプローブをニックトランスレーション、クレノウフィルインリアクション、その他の当業者に既知の方法により標識することもできる。

【0098】

KCNE2をコードするポリヌクレオチド配列由来の、少なくとも約8ヌクレオチド、通常少なくとも約15ヌクレオチドで、および約9 kb未満、通常約1.0 kb未満を有するポリヌクレオチド配列の部分が、プローブとして好適である。したがって、この定義は8ヌクレオチド~9000ヌクレオチドのサイズのプローブを包含する。したがって、この定義は8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400、500ヌクレオチドのプローブ、またはこれらの値の範囲内のあらゆる数のヌクレオチドを有するプローブ

(例、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121ヌクレオチド等)、または500ヌクレオチド以上を有するプローブを含む。また、当該プローブを用いてKCNE2をコードするmRNAが細胞または組織中に存在するかどうかを決定することもできる。本発明は、配列番号：1、3、5、7、9および11、その相補鎖または機能的に同等の核酸配列由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての新規なプローブを包含する。本発明は従来技術において存在するプローブは包含しない。すなわち、本発明は、従来技術に存在するプローブを包含しない限りにおいて、配列番号：1、3、5、7、9および11由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての核酸を包含する。

【0099】

類似の考察およびヌクレオチド長をKCNE2遺伝子の全部または一部の増幅にも適用できる。したがって、プライマーの定義は8、12、15、20、25、40、60、80、100、200、300、400、500ヌクレオチドのプライマー、またはこれらの値の範囲内のあらゆる数のヌクレオチドを有するプライマー(例、9、10、11、16、23、30、38、50、72、121ヌクレオチド等)、または500ヌクレオチド以上もしくは500~9000の間の任意の数のヌクレオチドを有するプローブを包含する。また、当該プライマーを用いてKCNE2をコードするmRNAが細胞または組織中に存在するかどうかを決定することもできる。本発明は、KCNE2遺伝子増幅についてのKCNE2遺伝子座、その相補鎖または機能的に等価な核酸配列由来の少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての新規なプライマーを包含する。本発明は従来技術において存在するプライマーは包含しない。すなわち、本発明は、従来技術に存在するプライマーを包含しない限りにおいて、少なくとも8ヌクレオチドを有する全ての核酸を包含する。

【0100】

「タンパク質修飾またはフラグメント」は、本発明により、1次構造配列と実質的に同一であるが、イン・ビボもしくはイン・ビトロの化学的および生化学的修飾を含み、または異常なアミノ酸を取り込んでいるKCNE2ポリペプチドまたはそれらのフラグメントを規定する。かかる修飾は、例えばアセチル化、カル

ボキシル化、ホスホリル化、グリコシル化、ユビキチン化、放射性核種等による標識、および様々な酵素的修飾を包含し、当業者に容易に理解されよう。かかる目的に有用な、様々なポリペプチド標識方法および置換基または標識は当業者に周知であり、 ^{32}P のような放射活性アイソトープ、標識抗リガンド(例、抗体)に結合するリガンド、フルオロフォア、化学ルミネッセンス剤、酵素、および標識リガンドについての特異的結合ペアとして使用できる抗リガンドを包含する。標識の選択は、必要な感受性、プライマーとの結合の容易さ、安定性の要求、および利用可能な機器による。ポリペプチド標識方法は当業者に周知である。Sambrookら、1989年またはAusubalら、1992年を参照。

【0101】

実質的に完全長のポリペプチドのほかに、本発明は、ポリペプチドの生化学的に活性なフラグメントを提供する。重要な生化学的活性は、リガンド結合、免疫学的活性およびその他のKCNE2ポリペプチドに特有な生化学的活性を包含する。免疫学的活性は、標的免疫系における免疫学的機能、KCNE2タンパク質のエピトープについての拮抗剤または代用抗原として供される結合に関する免疫学的エピトープの分配、の両方を包含する。本明細書で用いられる場合、「エピトープ」とはポリペプチドの抗原決定基をいう。エピトープは、当該エピトープに特有の空間的コンホメーションにおいて3つのアミノ酸を含むことができる。通常、エピトープは、少なくとも5つのかかるアミノ酸、およびより通常では少なくとも8~10個のかかるアミノ酸からなる。かかるアミノ酸の空間的コンホメーションの決定方法は当業者に既知である。

【0102】

免疫学的目的のため、タンデム-リピートポリペプチドフラグメントを抗原として用いて、高抗原性タンパク質を生産することができる。別法として、かかるポリペプチドは特異的結合についての高効率拮抗剤として供される。KCNE2ポリペプチドまたはそれらのフラグメントに特異的な抗体生産は下記に記載する。

【0103】

本発明はまた、KCNE2ポリペプチドおよびそれらのフラグメントを含有す

る融合ポリペプチドも提供する。相同ポリペプチドは、2以上のKCNE2ポリペプチド配列間、またはKCNE2ポリペプチドおよび関連タンパク質間の融合体であってもよい。同様に、誘導タンパク質の性質または活性の組み合わせを示す異種性融合体を構築することができる。例えば、リガンド結合または他のドメインを異なる融合ポリペプチドまたはフラグメント間で「交換」してもよい。かかる相同または異種融合ポリペプチドは、例えば、結合の長さまたは特異性を変化させ得る。融合パートナーは免疫グロブリン、細菌 - ガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、 - ラクタマーゼ、アミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよび酵母接合因子を包含する。Godowskiら、1988年を参照。

【0104】

融合タンパク質は、典型的には下記のような組換え核酸法、または化学合成のいずれかによってなされる。ポリペプチド合成技術は、例えば、Merrifield(1963年)に記載されている。

【0105】

「タンパク質精製」とは、KCNE2ポリペプチドまたはそれらを、KCNE2をコードする組換え核酸で形質転換した細胞に由来するような他の生物学的物質から単離する様々な方法をいい、当業者に周知である。例えば、本発明によって与えられる抗体等を用いる免疫親和性クロマトグラフィーによって、かかるポリペプチドを精製できる。様々なタンパク質精製方法が当業者に周知であり、Deutscher、1990年およびScopes、1982年に記載の方法を包含する。

【0106】

「単離」、「実質的に純粋」および「実質的に均一」なる用語は、天然状態では付随している成分から分離されているタンパク質またはポリペプチドをいい、相互に交換して用いられる。モノマータンパク質は、少なくとも試料の約60～75%が単一のポリペプチド配列を示す場合に、実質的に純粋である。実質的に純粋なタンパク質は、典型的には約60～90%W/Wのタンパク質試料を含み、より通常では約95%、および好適には約99%純粋である。タンパク質純度および均一性は、タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動とそれに続くゲルの染色に基づく単一ポリペプチドバンドの可視化のような当業者に周知の多数

の方法によって示すことができる。特定の目的のため、より高い分離はHPLCまたは精製に用いられる当業者に周知のその他の手段の使用によって与えられる。

【0107】

KCNE2タンパク質は、天然状態では付随している天然汚染物質から分離された場合、天然の付随成分を実質的に含まない。したがって、化学的に合成したか、または天然でそれを生じる細胞とは異なる細胞系で合成したポリペプチドは、それが天然に会合する成分を実質的に含まない。当業者に周知の精製技術を用いる単離により、タンパク質が天然で会合する成分を実質的に含まないようにできる。

【0108】

異種細胞型で発現された場合でも、単離および操作された遺伝配列の発現生産物として生産されたポリペプチドは、本明細書でいう「単離されたポリペプチド」である。合成的に作成した型または異種細胞によって発現された分子は、本質的に単離された分子である。

【0109】

「組換え核酸」とは、天然には生じない核酸、または2つの別々に分離された配列フラグメントの人工的な組み合わせにより作成された核酸である。この人工的な組合せは、多くの場合、化学合成手段または核酸の単離フラグメントの人工的操作（例、遺伝子工学技術）によってなされる。これは、通常コドンを同一または保存アミノ酸をコードする重複コドンに置き換えるために行い、典型的にはこれと同時に配列認識部位を導入または除去する。別法として、目的の機能を有する複数の核酸フラグメントを一緒にして、目的の機能の組み合わせを生じさせることを行う。

【0110】

「制御配列」とは、通常、遺伝子座のコード領域から100kb以内の配列をいうが、それらはコード領域から離れていてもよく、遺伝子発現（遺伝子転写、翻訳、スプライシング、メッセンジャーRNA安定性等を含む）に影響を与える。

【0111】

「実質的相同性または類似性」。核酸またはそのフラグメントは、他の核酸（またはその相補鎖）と至適に並置された場合に（適切なヌクレオチドの挿入または欠失を伴って）ヌクレオチド塩基の少なくとも約60%、通常には少なくとも約70%、より通常には少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95~98%においてヌクレオチド配列同一性が存在すれば、他に対して「実質的に相同」（または「実質的に類似」）である。

【0112】

同一性とは、2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の度合を意味し、かかる配列の2本の鎖の間の適合の同一性により決定される。同一性は容易に算出し得る。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の同一性を測定する数多くの方法があり、「同一性」なる語は当業者によく知られている [Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Human Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribkov, M., and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]。2つの配列間の同一性を決定するのに普通用いられる方法は、限定されないが、[Guide to Huge Computers, Martin, J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipman, D. (1998)] に開示されたものを含む。同一性を決定する好ましい方法は、試験される2つの配列間に最大の適合を与えるように設計される。かかる方法は、コンピュータプログラムに集成される。2つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラムは、限定されないが、GCGプログラムパッケージ [Devereux et al. (1984)]、BLASTP、BLASTN、FASTA [Altschul et al. (1990); Altschul et al. (1997)] を含む。

【0113】

あるいは、核酸またはそのフラグメントが別の核酸（またはその相補鎖）に選択的ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする場合に、鎖またはその相補物に対して実質的相同性（または類似性）が存在する。ハイブリダイゼーションの選択性は、特異性の全体的な欠如よりも実質的に選択的なハイブリダイゼーションが生じる場合に存在する。代表的には、選択的ハイブリダイゼーションは、少なくとも約14ヌクレオチドにわたる少なくとも約55%、好ましくは少なくとも約65%、より好ましくは少なくとも約75%、最も好ましくは少なくとも約90%の相同性が存在する場合に生じる（Kanehisa, 1984参照）。上記の相同性比較の長さはより長くにわたってもよく、特定の実施態様においてはしばしば少なくとも約9ヌクレオチド、通常には少なくとも約20ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、代表的には少なくとも約28ヌクレオチド、より代表的には少なくとも約32ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約36ヌクレオチドまたはそれ以上にわたる。

【0114】

当業者には容易に理解されるように、核酸ハイブリダイゼーションは、塩基組成、相補鎖の長さおよびハイブリダイズする核酸間でのヌクレオチド塩基のミスマッチ数に加えて、塩濃度、温度または有機溶媒のような条件によって影響される。ストリンジェントな温度条件は一般に30℃以上、代表的には37℃以上、好ましくは45℃以上の温度を包含する。ストリンジェントな塩条件は通常1000mM未満、代表的には500mM未満、好ましくは200mM未満である。しかし、いずれかの単一のパラメーターの程度よりも、パラメーターの組合せがずっと重要である。ストリンジェンシー条件は核酸の長さおよび核酸の塩基組成に依存し、当該分野において周知の技術によって決定することができる（例えば、Wetmur and Davidson, 1968参照）。

【0115】

プローブ配列はまた、特定の条件下で二重鎖DNAに特異的にハイブリダイズして、三重鎖または他のより高次のDNA複合体を形成し得る。そのようなプローブの調製および適切なハイブリダイゼーション条件は当該分野において周知である。

【0116】

ポリペプチドに言及する場合、用語「実質的相同性」または「実質的同一性」は、問題のポリペプチドまたはタンパク質が天然のタンパク質全体またはその部分と少なくとも約30%の同一性、通常には少なくとも約70%の同一性、より通常には少なくとも約80%の同一性、好ましくは少なくとも約90%の同一性、より好ましくは少なくとも約95%の同一性を示すことを示す。

【0117】

ポリペプチドに関して、相同性は、代表的には配列解析ソフトウェアを使用して測定される（例えば、the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705参照）。タンパク質解析ソフトウェアは、種々の置換、欠失および他の改変に割り当てられた相同性の尺度を使用して類似配列を適合させる。保存的置換は、代表的には、以下の群内での置換を包含する：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。

【0118】

「実質的に類似した機能」は、野生型 K C N E 2 核酸または野生型 K C N E 2 ポリペプチドとの関連で改変された核酸または改変されたタンパク質の機能をいう。改変ポリペプチドは野生型 K C N E 2 ポリペプチドに実質的に相同であり、実質的に同じ機能を有する。改変ポリペプチドは変化したアミノ酸配列を有してもよく、そして/または修飾アミノ酸を含んでもよい。機能の類似性に加えて、改変ポリペプチドは、より長い半減期のような他の有用な特性を有してもよい。改変ポリペプチドの機能（活性）の類似性は、野生型 K C N E 2 ポリペプチドの活性と実質的に同じであってもよい。あるいは、改変ポリペプチドの機能（活性）の類似性は、野生型 K C N E 2 ポリペプチドの活性より高くてもよい。改変ポリペプチドは、従来技術を使用して合成されるか、または改変核酸によってコードされ、従来技術を使用して生産される。改変核酸は従来技術によって調製される。野生型 K C N E 2 遺伝子機能に実質的に類似の機能を有する核酸は、

上記の改変タンパク質を生産する。

【0119】

ポリペプチドの「フラグメント」、「部分」または「セグメント」は、少なくとも約5～7個の連続したアミノ酸の、しばしば少なくとも約7～9個の連続したアミノ酸の、代表的には少なくとも約9～13個の連続したアミノ酸の、最も好ましくは少なくとも約20～30個またはそれ以上の連続したアミノ酸の、一続きのアミノ酸残基である。

本発明のポリペプチド(可溶性である場合)を、固相支持体(例えば、ニトロセルロース、ナイロン、カラム充填材料(例えば、セファロースビーズ)、磁性ビーズ、グラスウール、プラスチック、金属、ポリマーゲル、セルまたは他の基材)に結合させてもよい。そのような支持体は、例えばビーズ、ウェル、ディップスティックまたは膜の形態を取ってもよい。

【0120】

「標的領域」とは、増幅および/または検出される核酸の領域をいう。「標的配列」なる語は、プローブまたはプローブが所望の条件下でそれとともに安定なハイブリッド形成する配列をいう。

【0121】

本発明の実施には、特に示さない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学および免疫学の従来技術を用いる(例えば、Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991参照)。ヒト遺伝子マッピング(ヒト第1染色体のマッピングを含む)のための技術および材料の一般的議論は、例えばWhite and Lalouel, 1988に提供される。

【0122】

組換えまたは化学合成核酸の調製：ベクター、形質転換、宿主細胞

多量の本発明のポリヌクレオチドを、適切な宿主細胞中での複製によって生産してもよい。所望のフラグメントをコードする天然または合成ポリヌクレオチドフラグメントを、原核または真核生物細胞中への導入およびその中での複製が可能な組換えポリヌクレオチド構築物(通常はDNA構築物)に組込む。通常、ポ

リヌクレオチド構築物は単細胞宿主（例えば、酵母または細菌）中での複製に適切であるが、培養哺乳動物または植物または他の真核生物細胞株への導入（ゲノム内の組み込みを伴うかまたは伴わない）を意図してもよい。本発明の方法によって生産された核酸の精製は、例えば、Sambrook et al., 1989またはAusubel et al., 1992に記載されている。

【0123】

本発明のポリヌクレオチドを、例えばBeaucage and Caruthers (1981)に記載のホスホルアミダイト法またはMatteucci and Caruthers (1981)に記載のトリエステル法による化学合成によって生産してもよく、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成機で実施してもよい。相補鎖を合成し、適切な条件下で鎖をアニールさせること、または適切なプライマー配列とともにDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加することのいずれかによって、化学合成の1本鎖生成物から2本鎖フラグメントを得てもよい。

【0124】

原核または真核生物宿主中への導入用に調製したポリヌクレオチド構築物は、宿主によって認識される複製システム（所望のポリペプチドをコードする意図されるポリヌクレオチドフラグメントを含む）を含んでもよく、好ましくはセグメントをコードするポリペプチドに作動可能に連結された転写および翻訳開始調節配列も含む。発現ベクターは、例えば、複製起点または自律複製配列（ARS）、発現制御配列、プロモーター、エンハンサーならびに必要なプロセッシング情報部位（例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列およびmRNA安定化配列）を含んでもよい。そのようなベクターを当該分野で周知の、例えばSambrook et al., 1989またはAusubel et al., 1992に論じられる標準的な組換え技術によって調製してもよい。

【0125】

適切なプロモーターおよび他の必要なベクター配列は、宿主中で機能するように選択され、適切であれば、KCNE2遺伝子に天然に結合したものを含んでもよい。細胞株と発現ベクターとの作業可能な組合せの例は、Sambrook et al., 1989またはAusubel et al., 1992に記載されている（Metzger et al., 1988も参

照)。多数の有用なベクターが当該分野において公知であり、Stratagene、New England Biolabs、Promega Biotechおよびその他のような販売業者から入手可能である。trp、lac、ファージプロモーター、tRNAプロモーターおよび解糖系酵素プロモーターのようなプロモーターを原核生物宿主において使用してもよい。有用な酵母プロモーターは、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖系酵素(例えば、エノラーゼまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)、マルトースおよびガラクトースの利用を担う酵素およびその他のプロモーター領域を包含する。酵母発現に使用するために適切なベクターおよびプロモーターはさらにHitzeman et al., EP 73,675Aに記載されている。適切な非天然哺乳動物プロモーターは、SV40の初期および後期プロモーター(Fiers et al., 1978)またはマウスモロニー白血病ウイルス、マウス腫瘍ウイルス、トリ肉腫ウイルス、アデノウイルスII、ウシパピローマウイルスもしくはポリオーマに由来するプロモーターを包含し得る。昆虫プロモーターはバキュロウイルスに由来し得る。さらに、多コピーの遺伝子を作製するように、構築物を増幅可能遺伝子(例えば、DHFR)に連結してもよい。適切なエンハンサーおよび他の発現制御配列については、Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1982)も参照のこと。例えば、米国特許第5,691,198号;同第5,735,500号;同第5,747,469号;および同第5,436,146号も参照のこと。

【0126】

そのような発現ベクターは自律複製してもよいが、それらはまた当該分野において周知の方法によって、宿主細胞のゲノムに挿入されて複製してもよい。

【0127】

発現およびクローニングベクターはおそらく、ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子である選択マーカを含む。この遺伝子の存在によって、インサートを発現する宿主細胞のみの増殖が保証される。代表的な選択遺伝子は、a)抗生物質または他の毒性物質(例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートなど)に対する耐性を付与する、b)栄養要求欠損を相補する、またはc)複合培地からは利用可能でな

い重要な栄養素を供給する（例えば、バチルス用のD - アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）タンパク質をコードする。適切な選択マーカーの選択は宿主細胞に依存し、異なる宿主に適切なマーカーは当該分野において周知である。

【0128】

目的の核酸を含むベクターをイン・ビトロで転写し、生じたRNAを宿主細胞に周知の方法（例えば、注入）（Kubo et al., 1988参照）によって導入することができる。あるいはベクターを宿主細胞に当該分野において周知の方法によって直接導入することができる。方法は細胞性宿主の種類に依存して変動し、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE - デキストランまたは他の物質を用いるトランスフェクション；マイクロプロジェクトイルボンバードメント；リポフェクション；感染（ベクターがレトロウイルスゲノムのような感染性因子である場合）；および他の方法を包含する（一般に、Sambrook et al., 1989およびAusubel et al., 1992参照）。当該分野において公知のいずれかの方法（とりわけ、上記の方法を包含する）による宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入は、本明細書において「形質転換」という。上記の核酸が導入された細胞は、その細胞の子孫も包含することを意味する。

【0129】

多量の本発明の核酸およびポリペプチドを、ベクターまたは他の発現ビヒクル中のKCNE2核酸またはその部分を、適合する原核または真核生物宿主細胞において発現させることによって調製してもよい。最も一般的に使用される原核生物宿主はエシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）であるが、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）またはシュードモナス（*Pseudomonas*）のような他の原核生物を使用してもよい。

【0130】

哺乳動物あるいは他の真核生物宿主細胞（例えば、酵母、糸状菌、植物、昆虫または両生類もしくは鳥類種）も本発明のタンパク質の生産に有用であり得る。培養哺乳動物細胞の増殖自体は周知である（Jakoby and Pastan (eds.) (1979)参照）。一般に使用される哺乳動物宿主細胞株の例は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、およびWI38、BHK、

およびCOS細胞株であるが、他の細胞株が、例えばより高い発現、所望のグリコシル化パターンまたは他の特徴を提供するために適切であり得ることは当業者によって理解される。一般に使用される昆虫細胞株の例はSF9である。

【0131】

クローンは、ベクター構築の様式に依存してマーカーを使用することによって選択される。マーカーは同じかまたは異なるDNA分子（好ましくは同じDNA分子）上に存在してもよい。原核生物宿主においては、形質転換体を、例えばアンピシリン、テトラサイクリンまたは他の抗生物質に対する耐性によって選択してもよい。温度感受性に基く特定産物の生産も適切なマーカーとして作用し得る。

【0132】

本発明のポリヌクレオチドで形質転換された原核または真核生物細胞は、本発明の核酸およびポリペプチドの生産のみならず、例えばKCNE2ポリペプチドの特徴の研究のためにも有用である。

【0133】

本明細書中に開示するKCNE2遺伝子配列に基くプローブおよびプライマーは、他の種において相同なKCNE2遺伝子配列およびタンパク質を同定するために使用される。これらの遺伝子配列およびタンパク質は、それが単離された種についての、本明細書に記載の診断/予後、治療および薬物スクリーニング法において使用される。

【0134】

使用法：薬物スクリーニング

本発明は、形質転換された細胞、トランスフェクトされた卵母細胞またはトランスジェニック動物においてKCNE2、KCNE3またはKCNE4タンパク質を使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。KCNE2タンパク質のいずれかにおける変異は心臓 I_{Ks} カリウムチャネルの機能を変化させる可能性があるため、候補薬物は、それぞれ、正常KCNE2タンパク質および変異HERGタンパク質、または変異HERGおよび変異KCNE2タンパク質のいずれかを含む細胞を使用して、チャネルに対する影響についてスクリー

ニングされる。薬物を培養細胞に添加するかまたはトランスジェニック動物に投与し、 I_{K_s} カリウムチャネルの誘導電流に対する影響を、野生型HERGおよびKCNE2を含有する細胞または動物の誘導電流に対して比較する。より正常なレベルまで誘導電流を変化させる薬物候補はLQTの治療または予防に有用である。薬物スクリーニングに用い得る適当な電気生理学的方法は、実施例に記載されている。これらの方法は、卵母細胞または安定に形質転換された細胞に適用し得る。この方法において、KCNE2、KCNE3またはKCNE4を含む電位依存性イオンチャネルへの薬物の効果を決定し得る。

【0135】

本発明は種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいてKCNE2ポリペプチドまたはその結合フラグメントを使用することによる化合物のスクリーニングに特に有用である。

【0136】

そのような試験において用いられるKCNE2ポリペプチドまたはフラグメントは、溶液中で遊離しているか、固体支持体に固定されているか、または細胞表面上に保持されているかのいずれかであってもよい。薬物スクリーニング法の1つは、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換えポリヌクレオチドで安定に形質転換された真核または原核生物宿主細胞を、好ましくは競合的結合アッセイにおいて利用する。そのような細胞（生存または固定形態のいずれか）を、標準的結合アッセイに使用することができる。例えば、KCNE2ポリペプチドまたはフラグメントと試験薬剤との間の複合体の形成について測定してもよく、またはKCNE2ポリペプチドまたはフラグメントと既知のリガンドとの間の複合体の形成が試験薬剤によって妨害される程度を検討してもよい。

【0137】

従って、本発明は、薬剤をKCNE2ポリペプチドまたはそのフラグメントと接触させる工程、および(i)、薬剤とKCNE2ポリペプチドまたはフラグメントとの間の複合体の存在、または(ii)KCNE2ポリペプチドまたはフラグメントとリガンドとの間の複合体の存在について当該分野において周知の方法によってアッセイする工程を包含する薬物のスクリーニング法を提供する。その

ような競合的結合アッセイにおいて、KCNE2ポリペプチドまたはフラグメントは代表的には標識されている。遊離のKCNE2ポリペプチドまたはフラグメントは、タンパク質：タンパク質複合体中に存在するものから分離され、遊離の（すなわち複合体化されていない）標識の量が、それぞれ試験薬剤のKCNE2への結合の尺度、あるいはKCNE2：リガンド結合の妨害の尺度となる。遊離ではなく結合KCNE2の量を測定してもよい。KCNE2ではなくリガンドを標識して、試験薬物の存在下または非存在下におけるリガンドのKCNE2への結合量を測定することも可能である。

【0138】

別の薬物スクリーニング用技術は、KCNE2ポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物についての高処理量スクリーニングを提供し、これはGeyzen（PCT公開公報W0 84/03564）に詳細に記載されている。簡潔に記載すると、多数の異なる小ペプチド試験化合物を固体基材（例えば、プラスチックピンまたは何らかの他の表面）上で合成する。ペプチド試験化合物をKCNE2ポリペプチドと反応させ、洗浄する。次いで、結合したKCNE2ポリペプチドを当該分野において周知の方法によって検出する。

【0139】

上記の薬物スクリーニング技術において使用するために、精製KCNE2を直接プレート上にコートすることができる。しかし、このポリペプチドに対する非中和抗体を抗体の捕獲のために使用して、KCNE2ポリペプチドを固相上に固定化することができる。

【0140】

本発明はまた、KCNE2ポリペプチドまたはそのフラグメントへの結合について、KCNE2ポリペプチドに特異的に結合する能力を有する中和抗体を試験化合物と競合させる競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を意図する。この方法において、抗体を使用して、KCNE2ポリペプチドの抗原決定基の1つ以上を共有するいずれかのペプチドの存在を検出することができる。

【0141】

上記のスクリーニング法は、KCNE2のみを用いるアッセイに限定されるも

のではなく、KCNE2 - タンパク質複合体の研究にも適用可能である。この複合体の活性に対する薬物の影響を分析する。

【0142】

以下のアッセイがこれらの方法に従って薬物候補のスクリーニングに使用できるアッセイの例である。

【0143】

変異KCNE2（それ自体または融合タンパク質の一部として）を、野生型KCNE2が結合する野生型タンパク質（それ自体または融合タンパク質の一部として）と混合する。この混合を、薬物の存在下および薬物の非存在下の両方で実施し、変異KCNE2と野生型タンパク質との結合量を測定する。結合量が薬物の非存在下よりも薬物の存在下において多い場合は、この薬物はKCNE2における変異から生じるLQTを治療するための薬物候補である。

【0144】

野生型KCNE2（それ自体または融合タンパク質の一部として）を、野生型KCNE2が結合する野生型タンパク質（それ自体または融合タンパク質の一部として）と混合する。この混合を、薬物の存在下および薬物の非存在下の両方で実施し、野生型KCNE2と野生型タンパク質との結合量を測定する。結合量が薬物の非存在下よりも薬物の存在下において多い場合は、この薬物はKCNE2における変異から生じるLQTを治療するための薬物候補である。

【0145】

野生型タンパク質のようにKCNE2（それ自体または融合タンパク質の一部として）に結合する変異タンパク質を野生型KCNE2（それ自体または融合タンパク質の一部として）と混合する。この混合を、薬物の存在下および薬物の非存在下の両方で実施し、野生型KCNE2と変異タンパク質との結合量を測定する。結合量が薬物の非存在下よりも薬物の存在下において多い場合は、この薬物はこのタンパク質をコードする遺伝子における変異から生じるLQTを治療するための薬物候補である。

【0146】

本発明のKCNE2分子（ならびにKCNE3およびKCNE4分子）、な r

びに本明細書に記載するスクリーニングアッセイによって同定されるKCNE2活性(例えば、KCNE2遺伝子発現)に対して刺激性または阻害性効果を有する剤またはモジュレータは、個体に投与して異常KCNE2活性に関連する障害を(予防的または治療的に)処理し得る。そのような処理に関連して、薬理遺伝子学(すなわち、個体の遺伝子型とその個体の外来の化合物もしくは薬物への反応と間の関係の研究)を考慮することができる。治療薬の代謝の差異は薬理学上活性な薬物の用量と血中濃度との間の変えることによって重篤な毒性または治療の失敗をもたらし得る。かくして、医者または臨床医は、KCNE2分子またはKCNE2モジュレータを投与するかどうを決定し、ならびにKCNE2分子またはKCNE2モジュレータでの治療の用量および/または治療計画を仕立てるのに、関連する薬理遺伝子学研究において得られた知見を適用することを検討することができる。

【0147】

薬理遺伝子学は、罹患したヒトにおける変化した薬物特性および異常作用による薬物への反応において臨床学上明らかに遺伝性の変異を扱う。例えば、[Eichelbaum et al., (1996)]および[Linder et al. (1997)]を参照。一般に、2つのタイプの薬理遺伝子学的状態に分類し得る。薬物が体に作用する方法を変化させる単一因子(変化した薬物作用)として遺伝する遺伝子状態または体が薬物に作用する方法を変化させる単一因子(変化した薬物代謝)として遺伝する遺伝子状態。これらの遺伝子状態は稀な遺伝子欠損としてまたは普通に発生する多型性としてのいずれかで発生し得る。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(G6PD)はよくある遺伝性酵素病であり、そこでの主たる臨床的合併症は酸化促進薬物(抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の消化およびファバビーンの消費後の溶血である。

【0148】

遺伝子を同定する一つの薬理遺伝子学的アプローチは、「ゲノムワイドな相関」として知られ、元来、既知の遺伝子関連マーカーからなるヒトゲノムの高解像度マップ(例えば、ヒトゲノム上の60,000~100,000個の多型性または可変部位からなる「2対立遺伝子」遺伝子マーカーであり、それらの各々は2

つの変異体を有する)に頼る。そのような高解像度マップは、ヒトゲノムにおける何千万もの知られた単一ヌクレオチド多型性(SNP)から作成し得る。本明細書で用いるとき、「SNP」はDNAのストレッチ中の単一ヌクレオチド塩基に生じる一般的な変化である。例えば、SNPはDNAの1000塩基毎に1回起るであろう。SNPは疾患プロセスに関与するかもしれないが、大多数が疾患に関連しないであろう。そのようなSNPの発生に基づく遺伝子マップを考えると、個体は、それら個体ゲノムにおける特定パターンのSNPに依存する遺伝子カテゴリーに分類し得る。そのような方法において、そのような遺伝子的に類似する個体の中で共通するであろう特性を考慮して、治療計画を遺伝子的に類似する個体の群に仕立て得る。

【0149】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」という方法を用いて、薬物反応を予測する遺伝子を同定し得る。この方法によると、薬物標的をコードする遺伝子が知られていれば(例えば、本発明のKCNE2タンパク質またはKCNE2レセプター)、その遺伝子の全ての共通する変異体は個体群中でかなり容易に同定し得、該遺伝子の一つのバージョンをもう一つのものに対して有していることが特定の薬物反応に関連しているかどうかを決定し得る。

【0150】

例示的な具体例として、薬物代謝酵素の活性は薬物作用の強度および持続性の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)およびシトクロムP450、酵素CYP2D6およびCYP2C19)の遺伝子多型性の発見は、何人かの患者が期待される薬物効果を得ないか、あるいは、何故誇張された薬物反応を示し、標準および安全用量の薬物の摂取後に重大な毒性を示すのかに関する説明を提供した。これらの多型性は個体群中の2つの発現型において発現する;エクテンシブ・メタボライザー(extensive metabolizer; EM)およびプアー・メタボライザー(poor metabolizer; PM)。PMの流行は異なる個体群の間で異なる。例えば、CYP2D6についての遺伝子コーディングは高度に多型性であり、いくつかの変異がPMにおいて同定され、それは全て機能性CYP2D6の不存在をもたらす。CYP2D

6 およびCYP2C19のプアー・メタボライザーは、彼らが標準用量を受けたときに、非常にしばしば、誇張された薬物反応を経験する。もし、代謝物が活性治療部位であれば、CYP2D6 - 形成代謝物モルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果につき証明されるように、PMは治療的反応を示さない。他方の極端は、標準用量に反応しないいわゆる超高速メタボライザーである。最近、超高速メタボライザーの分子ベースはCYP2D6 遺伝子増幅によるものであると確認された。MinK関連ペプチドでの類似の解析は遺伝子型と薬物効果とを相関付ける。

【0151】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」という方法を用いて、薬物反応を予想する遺伝子を同定し得る。例えば、薬物（例えば、本発明のKCNE2分子またはKCNE2モジュレータ）を投与された動物の遺伝子発現は毒性に関する遺伝子経路が興奮しているかどうかの指示を与える。

【0152】

1 以上の上記した薬理遺伝子学的アプローチから生じた情報を用いて、個体を予防的または治療的に処理するための適切な用量および治療計画を決定し得る。この知見は、投与または薬物選択に適用する場合、不都合な反応または治療上の失敗を回避し得、かくして、KCNE2分子または、本明細書に記載された例示のスクリーニングアッセイの一つにより同定されたモジュレータのごとき、KCNE2モジュレータで対象を治療するときの治療的もしくは予防的効力を増強する。

【0153】

使用法:合理的な薬物設計

合理的薬物設計の目的は、例えば、ポリペプチドのより活性なまたは安定な形態である薬物であって、例えばイン・ビボでポリペプチドの機能を高める、または、それに妨害する薬物を形成するために、目的の生物活性ポリペプチドまたはそれらが相互作用する小分子（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、インヒビター）の構造アナログを製造することである。合理的な薬物デザインに用いるいくつかのアプローチは、三次元構造解析、アラニンスキャン、分子モデリングおよ

び抗 - i d 抗体の使用を含む。これらの技術は当業者によく知られており、各々、出典明示して本明細書の一部とみなされる米国特許第 5, 8 3 7, 4 9 2 ; 5, 8 0 0, 9 9 8 ; 5, 8 9 1, 6 2 8 号に記載されたものを含む。

【 0 1 5 4 】

かくして、例えば改良された K C N E 2 ポリペプチド活性または安定性を有する、または K C N E 2 ポリペプチド活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニストなどとして作用する薬物を設計することができる。クローン化した K C N E 2 配列の入手可能性により、十分量の K C N E 2 ポリペプチドを、X線結晶学のような分析研究を行うために利用することができる。加えて、本明細書中に提供される K C N E 2 タンパク質配列に関する知識は、X線結晶学に代わる、またはそれに加えるコンピューターモデリング法を用いているものをガイドする。

【 0 1 5 5 】

本発明のポリペプチドをコンビナトリアルライブラリー技術の結果として開発された化合物をスクリーニングするために使用してもよい。コンビナトリアルライブラリー技術は、ポリペプチドの活性を調節する能力について潜在的な膨大な数の異なる物質を試験する効率的な方法を提供する。そのようなライブラリーおよびその使用は当該分野において公知である。ペプチドライブラリーの使用が好ましい(例えば、WO 97/02048参照)。

【 0 1 5 6 】

簡潔に記載すると、ポリペプチドの活性を調節する物質についてのスクリーニング法は、適切な反応媒質中での1個以上の試験物質のポリペプチドとの接触、処理されたポリペプチドの活性の試験、およびその活性の試験物質(単数または複数)で処理していない匹敵する反応媒質中のポリペプチドの活性との比較を包含し得る。処理ポリペプチドと未処理ポリペプチドとの間の活性の差異が、関連する試験物質(単数または複数)の調節効果の指標となる。

【 0 1 5 7 】

活性の調節についてのスクリーニングの前にまたはそれとともに、試験物質をポリペプチドと相互作用する能力について、例えば、酵母ツーハイブリッドシステム(例えば、Bartel et al., 1993; Fields and Song, 1989; Chevray and Na

thans, 1992; Lee et al., 1995) においてスクリーニングしてもよい。このシステムを、ポリペプチドの活性を調節する実際の能力について物質を試験する前の粗スクリーニングとして使用してもよい。あるいは、スクリーニングを、試験物質をKCNE2特異的結合パートナーへの結合についてスクリーニングするために、またはKCNE2ポリペプチドの模倣物を見出すために使用し得る。

【0158】

ポリペプチド活性を調節するかまたはそれに影響を及ぼす物質の同定の後に、この物質をさらに研究してもよい。さらに、これを調製物（すなわち、製品もしくは処方物）または医薬、医薬組成物もしくは薬物のような組成物中で製造および/または使用してもよい。

【0159】

従って、本発明は、種々の態様において、本明細書の開示に従って核酸分子を使用してポリペプチド活性のモジュレーターとして同定された物質のみならず、その物質を含有する医薬組成物、医薬、薬物または他の組成物、その物質を含有するその組成物の投与を包含する方法、例えばLQTの治療（予防的処置を含み得る）のためのその組成物の患者への投与を包含する方法、例えばLQTの治療のための投与用組成物の製造におけるその物質の使用、および医薬上許容される賦形剤、ビヒクルまたは担体および所望により他の成分とその物質とを混合する工程を包含する医薬組成物の製造方法にも拡張される。

【0160】

ポリペプチド機能のモジュレーターとして同定された物質はペプチド性または非ペプチド性であってもよい。非ペプチド「低分子」が、多くのイン・ビトロにおける医薬用途にしばしば好ましい。従って、物質の模倣物（特にペプチドの場合）を医薬用途のために設計してもよい。

【0161】

公知の医薬上活性な化合物に対する模倣物の設計は、「リード」化合物に基いた医薬品の開発への公知のアプローチである。活性化合物の合成が困難であるかもしくは高価である場合、または特定の投与方法に不適切である場合（例えば、純粋なペプチドは、消化管中のプロテアーゼによって迅速に分解される傾向があ

るので経口組成物に不適切な活性薬剤である)に、これが所望され得る。一般に、模倣物の設計、合成および試験は、標的特性について多数の分子をランダムにスクリーニングすることを回避するために使用される。

【0162】

所定の標的特性を有する化合物からの模倣物の設計においていくつかの工程が一般にとられる。第1に、標的特性の決定において重大および/または重要な化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合、これはペプチド中のアミノ酸残基を系統的に変動させることによって(例えば、各残基を順に置換することによって)行うことができる。ペプチドのアラニンスキャンがそのようなペプチドモチーフを精錬するために一般に使用されている。化合物の活性領域を構成するこれらの部分または残基はその「ファルマコフォア」として知られている。

【0163】

一旦ファルマコフォアが見出されれば、その構造はその物理的特性(例えば、立体化学、結合、大きさおよび/または電荷)に従って、一連の供給源(例えば、分光技術、X線回折データおよびNMR)からのデータを使用してモデリングされる。コンピューター解析、類似性マッピング(これは、原子間の結合ではなく、ファルマコフォアの電荷および/または体積をモデリングする)ならびに他の技術をこのモデリングプロセスにおいて使用することができる。

【0164】

このアプローチの変形において、リガンドの三次元構造およびその結合パートナーをモデリングする。リガンドおよび/または結合パートナーが結合に際してコンホメーションを変化させる場合に、これは特に有用であり得、模倣物の設計においてこれを考慮にいれたモデリングが可能となる。

【0165】

次いで、ファルマコフォアを模倣する化学基をグラフトできる鋳型分子を選択する。鋳型分子およびそれにグラフトされる化学基は、模倣物の合成が容易になるように簡便に選択することができ、薬理学上許容されそうであり、イン・ビボにおいて分解せず、リード化合物の生物活性を保持している。あるいは、模倣物がペプチドに基く場合、ペプチドを環化させてその剛性を増加させることによ

て、さらなる安定性を達成することができる。次いで、このアプローチによって見出された模倣物を、それが標的特性を有しているかどうか、またはどの程度それを示すかを見るためにスクリーニングすることができる。次いで、さらなる最適化または改変を実施して、イン・ビボまたは臨床試験用の1個以上の最終模倣物に到達することができる。

【0166】

使用法:核酸診断および診断キット

個体をLQTに罹患しやすくしているKCNE2対立遺伝子の存在を検出するために、血液のような生物試料を調製し、KCNE2感染性対立遺伝子の存在または不在を分析する。LQTの存在を検出するために、または予後の指標として、生物試料を調製し、KCNE2の変異対立遺伝子の存在または不在を分析する。これらの試験の結果と解釈情報は、試験した個体へ連絡するためにヘルスケアプロバイダーに返す。そのような診断は、診断試験所により行われ得、またはこれとは別に、診断キットを作成し、ヘルスケアプロバイダーまたは自己診断のための民間の個人に販売する。

初めに、スクリーニング法は関連するKCNE2配列の増幅を含む。発明のもう一つの好ましい態様においては、スクリーニング法は非PCR準拠法を含む。そのようなスクリーニング法は、当該分野で周知の2段階の標識増幅法を含む。PCR準拠スクリーニング法も非PCR準拠スクリーニング法も、高レベルの感度で標的配列を検出することができる。

【0167】

今日使用されている最もポピュラーな方法は、ターゲット増幅である。ここでターゲット核酸配列は、ポリメラーゼを用いて増幅する。ポリメラーゼ駆動増幅を用いる一つの特に好ましい方法は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)である。ポリメラーゼ鎖反応および他のポリメラーゼ駆動増幅アッセイにより、ポリメラーゼ駆動増幅サイクルの使用によるコピー数の百万倍以上の増加を達成することが可能となる。一旦増幅されれば、生じた核酸を配列決定し、DNAプローブのための基体として用いることができる。

プローブをターゲット配列の存在を検出するために用いる場合、血液または血

清のような分析されるべき生物試料を処理して、所望により核酸を抽出することができる。試料核酸は、ターゲット配列の検出を促進するために種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッキングで調製することができる。プローブの標的配列とでハイブリッドを形成するために、分析物核酸の標的領域は通常、少なくとも部分的に一本鎖でなければならない。配列が本来一本鎖である場合、変性は必要とされない。しかしながら、配列が二本鎖である場合、配列は好ましくは変性される必要がある。変性は当該分野で公知の種々の方法により行うことができる。

【0168】

分析物核酸およびプローブは、プローブ中の標的配列の、分析物中の推定標的配列との安定なハイブリッド形成を促進する条件下でインキュベートする。分析物に結合させるために用いるプローブの領域は、K C N E 2の標的領域に完全に相補的であるようにすることができる。それゆえ、偽陽性を防ぐために、高ストリンジェンシー条件が望ましい。しかし、プローブが該ゲノムにユニークな染色体の領域に相補的である場合にのみ、高ストリンジェンシー条件を用いる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さおよびホルムアミドの濃度を含めた、ハイブリダイゼーション中および洗浄工程中の多くの要因により決定する。これらの要因は、例えばManiatis et al., 1982およびSambrook et al., 1989に概説されている。ある条件下では、三量体、四量体などのような高次のハイブリッドの形成が、ターゲット配列を検出する手段を提供するために所望される可能性がある。

【0169】

生じたハイブリッドの検出は、もし存在すれば、通常、標識プローブの使用により成し遂げられる。これとは別に、プローブは標識されなくてもよいが、直接的にまたは間接的に標識したリガンドとの特異的結合により検出することもできる。適当な標識および、プローブとリガンドを標識するための方法は当該分野で公知であり、例えば公知方法（例えばニックトランスレーション、ランダムプライムプライミングまたはキナーゼ）により取り込まれることができる放射性標識、ビオチン、蛍光基、ケミルミネセンス基（例えばジオキシエタン、特にト

リガーされたジオキシエタン)、酵素、抗体、金ナノ粒子などが含まれる。この基本スキームのバリエーションは当該分野で公知であり、外来物質からの検出すべきハイブリッドの分離を促進するバリエーション、および/または標識部分からのシグナルを増幅するバリエーションが含まれる。多くのこれらのバリエーションは、例えばMatthews and Kricka, 1988; Landegren et al., 1988; Mifflin, 1989; U.S. Patent 4,868,105; および、EPO Publication No. 225,807に概説されている。

【0170】

前記のように、非PCR準拠スクリーニングアッセイが、本発明においても企図される。この方法により、核酸プローブ(または、通常ホスホジエステルを置換しているメチルホスホネートバックボーンのようなアナログ)が低レベルのDNTターゲットにハイブリダイズする。このプローブは、プローブに共有結合している酵素を持ち、該共有結合はハイブリダイゼーションの特異性を妨害しない。この酵素-プローブ-コンジュゲート-標的核酸複合体を、次いで遊離プローブ酵素コンジュゲートから単離することができ、基質を酵素検出のために添加する。酵素活性は、発色または発光出力の変化として観察され、 10^3 - 10^6 の感度増加となる。オリゴデオキシヌクレオチド-アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートの調製およびそのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に関する例としては、Jablonski et al. (1986)を参照されたい。

【0171】

2段階の標識増幅法が当該分野で公知である。これらのアッセイは、小さいリガンド(ジゴキシゲニン、ビオチンなど)を、KCNE2に特異的に結合することができる核酸プローブに結合させるという原則に基づいて機能する。対立遺伝子特異的プローブも本実施例の範囲内に意図され、例示的な対立遺伝子特異的プローブには、本特許出願の素因変異を包含しているプローブが含まれる。

一例では、核酸プローブに結合させた小リガンドが抗体-酵素コンジュゲートにより特異的に認識される。本実施例の一態様において、ジゴキシゲニンを核酸プローブに結合させる。ハイブリダイゼーションを、ケミルミネセンス基質に代わる抗体-アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートにより検出する。本具体例

による核酸プローブを標識するための方法に関しては、Martin et al., 1990を参照されたい。第二の例においては、小リガンドが第一リガンドに特異的に複合させることができる第二リガンド-酵素コンジュゲートにより認識される。本例の周知の具体例はビオチン-アビジンタイプの相互作用である。核酸プローブを標識するための方法およびビオチン-アビジン準抛アッセイにおけるその使用に関しては、Rigby et al., 1977およびNguyen et al., 1992を参照されたい。

【0172】

本発明の核酸プローブアッセイが、K C N E 2を検出することができる核酸プローブのカクテルを用いるということも本発明の範囲内に意図される。つまり、K C N E 2の細胞試料中での存在を検出するための一例においては、遺伝子に相補的な1を超えるプローブを用い、および特に、異なるプローブの数は、これとは別に、2、3、または5の異なる核酸プローブ配列である。もう一つの例において、患者におけるK C N E 2遺伝子配列の変異の存在を検出するために、これらの遺伝子に相補的な1を超えるプローブを使用し、ここでカクテルには、はK C N E 2に関して改変を有する多くの患者において同定される対立遺伝子特異的変異に対して結合することができるプローブが含まれる。この態様においては、いずれの数のプローブも使用することができ、好ましくは、個体をLQTに罹患し易くしているとみなされる主要遺伝子変異に対応するプローブが含まれる。

【0173】

使用法:ペプチド診断および診断キット

LQTの存在は、野生型K C N E 2ポリペプチドの改変に基づいて検出することもできる。そのような変更は、常法に従う配列分析により決定することができる。より好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)を用い、K C N E 2ペプチドの差、またはその不存在を検出する。抗体を生起させ、かつ精製する方法は当該分野で周知であり、そのような方法のいずれも、本発明中にクレームする調製を達成するために選択することができる。本発明の好ましい態様において、抗体は溶液からはK C N E 2タンパク質を免疫沈降させ、ならびにウエスタンまたは、ポリアクリルアミドゲルの免疫プロット上でこれらのタンパク質と反応する。もう一つの好ましい態様において、抗体はパラフィンまたは凍結

組織セクションにおいて、免疫細胞化学法を用いて KCNE 2 タンパク質を検出する。

【0174】

KCNE 2 またはその変異を検出するための方法に関する好ましい態様には、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫放射分析アッセイ (IRMA) および、モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチアッセイを含む免疫酵素アッセイ (IEMA) が含まれる。典型的なサンドイッチアッセイは、David et al., in U.S. Patent Nos. 4,376,110 および 4,486,530 に記載されており、出典明示して本明細書の一部とみなす。

【0175】

使用法: 遺伝子治療

本発明により、それぞれ変異 KCNE 2 対立遺伝子を担う細胞に野生型は KCNE 2 機能を供給する方法も提供される。そのような機能を供給することにより、受容細胞の正常な機能化が可能となる。野生型遺伝子または該遺伝子の部分は、遺伝子が染色体外に留まるようにベクターにて細胞に導入することができる。そのような場合に、遺伝子は、染色体外の場所から細胞により発現される。より好ましいのは、野生型遺伝子またはその部分を、それが細胞中に存在する内在性変異遺伝子と組み換えられるように、変異細胞に導入する場合である。そのような組換えは、遺伝子変異の修正に帰着する二重組換え現象を必要とする。組換えおよび染色体外での維持両方のための遺伝子の導入のためのベクターは当該分野で公知であり、いずれの適当なベクターを用いてもよい。電気泳動、リン酸カルシウム共沈殿およびウイルス形質導入のような、DNA を細胞に導入するための方法は、当該分野で公知であり、方法の選択は医師の能力内にある。

前に広く論じたように、KCNE 2 遺伝子またはフラグメントは、適切な場合に、細胞中でのそのような遺伝子の発現生成物の量を増すために、遺伝子治療法において用いることができる。「正常」レベルで変種遺伝子が発現されるが、遺伝子産物が充分には機能的ではない心臓細胞においてすら所定 LQT 遺伝子の発現のレベルを増すのに有用でもあり得る。

【0176】

遺伝子治療は、例えばFriedman(1991)またはCulver(1996)により記載されるように、一般に許容される方法に従い行う。患者からの細胞を、まず前記の診断法により、KCNE 2ポリペプチドの細胞中での産生を確認するために分析する。発現コントロールエレメントに結合したKCNE 2遺伝子のコピーを含み、細胞内で複製することができるウイルスまたはプラスミドベクター（次のさらなる説明を参照されたい）を調製する。該ベクターは細胞内で複製することもできる。これとは別に、ベクターは複製欠乏性であってもよく、遺伝子治療で用いるためにヘルパー細胞中で複製される。適当なベクターは、U.S. Patent 5,252,479およびPCT公開出願W093/07282およびU.S. Patent Nos. 5,691,198; 5,747,469; 5,436,146および5,753,500に開示されるように公知である。ベクターを次いで患者に注射する。感染遺伝子が標的細胞のそれぞれのゲノムに永続的に導入されない場合は、該治療は周期的に繰り返さなければならないであろう。

【0177】

当該分野で公知の遺伝子導入系は、本発明の遺伝子治療法の実施に有用であろう。これらには、ウイルスおよび非ウイルス導入法が含まれる。パポウイルス（例えばSV40、Madzak et al., 1992）、アデノウイルス(Berkner, 1992; Berkner et al., 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Wilkinson and Akrigg, 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Schneider et al., 1998)、ワクシニアウイルス(Moss, 1992; Moss, 1996)、アデノ関連ウイルス(Muzyczka, 1992; Ohi et al., 1990; Russell and Hirata, 1998)、HSVおよびEBVを含むヘルペスウイルス(Margolskee, 1992; Johnson et al., 1992; Fink et al., 1992; Breakefield and Geller, 1987; Freese et al., 1990; Fink et al., 1996)、レンチウイルス(Naldini et al., 1996)、シンドビスおよびセムリキ・フォレスト・ウイルス(Berglund et al., 1993)およびトリのレトロウイルス(Bandyopadhyay and Temin, 1984; Petropoulos et al., 1992)、ネズミ(Miller, 1992; Miller et al., 1985; Sorge et al., 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller et al., 1988)およびヒト起源(Shimada et al., 1991; Helseth et al., 1990; Page et al., 1990; Buchshacher

and Panganiban, 1992)を含む多数のウイルスを遺伝子導入ベクターとして、または遺伝子導入ベクターを修復するための基礎として用いることが出来た。ほとんどのヒト遺伝子治療プロトコルは、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスもまた用いられるが、無能力化したネズミのレトロウイルスに基くものであった。

【0178】

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子導入法には、リン酸カルシウム共沈殿 (Graham and van der Eb, 1973; Pellicer et al., 1980);機械的方法、例えばマイクロインジェクション (Anderson et al., 1980; Gordon et al., 1980; Brinster et al., 1981; Costantini and Lacy, 1981);リポソームを介する膜融合媒介導入 (Felgner et al., 1987; Wang and Huang, 1989; Kaneda et al., 1989; Stewart et al., 1992; Nabel et al., 1990; Lim et al., 1991);および直接DNA撮取およびレセプター媒介DNA導入 (Wolff et al., 1990; Wu et al., 1991; Zenke et al., 1990; Wu et al., 1989; Wolff et al., 1991; Wagner et al., 1990; Wagner et al., 1991; Cotten et al., 1990; Curiel et al., 1992; Curiel et al., 1991)のような化学法が含まれる。ウイルス媒介遺伝子導入は、リポソーム送達を用いる直接イン・ビボ遺伝子導入と組み合わせることができ、ウイルスベクターを腫瘍細胞へ指し向け、周りの非分裂細胞には指し向けないことを可能にする。これとは別に、レトロウイルスベクター産生細胞系統を腫瘍に注射することができる (Culver et al., 1992)。次いで、産生細胞の注射により、ベクター粒子の継続的供給源が提供される。この技術は手術不能の脳腫瘍を有するヒトにおける使用で認可されている。

【0179】

生物学的および物理的遺伝子導入法を組み合わせるアプローチにおいては、いずれかのサイズのプラスミドDNAを、アデノウイルスヘキソタンパク質に特異的なポリリジンコンジュゲート抗体と結合させ、生じた複合体をアデノウイルスベクターに結合させる。3分子複合体を次いで使用して、細胞を感染させる。アデノウイルスベクターは、連結されたDNAが損なわれる前に効果的な結合、内部化およびエンドソームの分解を可能にする。アデノウイルス準拠ベクタ

一の送達のための他の方法に関しては、Schneider et al.(1998)およびU.S.Patent Nos.5,691,198;5,747,469;5,436,146および5,753,500を参照されたい。

リポソーム/DNA複合体が直接イン・ビボ遺伝子導入を媒介することができることはすでに示されている。標準的なリポソーム調製物においては、遺伝子プロセスは非特異的であるが、局在化されたイン・ビボ摂取および発現が、例えば直接イン・サイチュ投与後の腫瘍沈積物において、報告されている(Nabel, 1992)。

【0180】

遺伝子治療の文脈において発現ベクターは、その中にクローン化されたポリヌクレオチドを発現するのに十分な配列を含む構築物を含むことを意味する。ウイルス発現ベクターにおいては、該構築物は、該構築物のパッケージングを支持するのに十分なウイルス配列を含む。ポリヌクレオチドがKCNE2をコードする場合、発現によりKCNE2が生じる。ポリヌクレオチドがアンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムをコードする場合、発現によりアンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムが生じる。つまりこの文脈においては、発現は、タンパク質産物が合成されることを必要としない。発現ベクターにクローン化されたポリヌクレオチドに加えて、ベクターは真核細胞において機能し得るプロモーターをも含む。クローン化したポリヌクレオチド配列は、このプロモーターの制御下にある。適当な真核プロモーターには、前記のものが含まれる。発現ベクターは前記の選択マーカーおよび他の配列のような配列をも含むことができる。

【0181】

DNAを直接心臓組織にターゲットする遺伝子導入法が好ましい。レセプター媒介遺伝子導入は、例えば、(通常、共有結合閉鎖したスーパーコイル化したプラスミドの形態の)DNAの、たんぱく質リガンドへのポリリジンを経由する結合により成し遂げられる。リガンドは、標的細胞/組織型の細胞表面上の対応するリガンドレセプターの存在に基いて選択する。これらのリガンド-DNAコンジュゲートは所望により血液に直接注入することができ、レセプター結合および、DNA-タンパク質複合体の内部化が起こる標的組織へ指向される。DNAの細胞内破壊の問題を克服するために、アデノウイルスとの共感染が、エンドソ

一ム機能を壊すために含まれ得る。

治療は次のようである：K C N E 2 感染性対立遺伝子を担う患者を、その心臓プレカーサー細胞のいくらかまたは全てが機能的に正常な K C N E 2 対立遺伝子の少なくとも一つの追加コピーを受容するように、遺伝子送達ビヒクルを用いて処理する。このステップにおいて、治療した個体は、感染性対立遺伝子の効果が、正常な対立遺伝子の存在により打ち消される程度まで、L Q T のリスクが低下した。

【0182】

使用法:ペプチド治療

K C N E 2 活性を有するペプチドを、変異または欠失 K C N E 2 対立遺伝子を有する細胞に供給することができる。タンパク質は細菌中で、例えば公知の発現ベクターを用いて c D N A 配列の発現により製造することができる。これとは別に、K C N E 2 ポリペプチドは、K C N E 2 産生哺乳類細胞から抽出することができる。加えて、該合成化学法を用いて K C N E 2 タンパク質を合成することができる。そのような方法のいずれも、K C N E 2 タンパク質を含む本発明の調製物を提供することができる。該調製物は、他のヒトタンパク質とは実質的に異なる。これは微生物中またはイン・ビボでの合成により非常に容易に達成される。

【0183】

活性 K C N E 2 分子は、例えばマイクロインジェクションにより、またはリポソームの使用により細胞に導入することができる。これとは別に、いくらかの活性分子が細胞により能動的に、または拡散により取りこまれることができる。K C N E 2 活性を有する分子の提供により、L Q T の部分的逆転が導かれる。K C N E 2 活性を有する他の分子（例えばペプチド、薬物または有機化合物）を、そのような逆転をもたらすために使用することもできる。実質上類似する機能を有する修飾ポリペプチドも、ペプチド治療のために用いる。

【0184】

使用法:形質転換宿主

治療薬を試験するための動物は、全動物の突然変異誘発後または生殖細胞または接合子の処理後に選択することができる。そのような処理には、通常第二動物

種由来の変異 K C N E 2 対立遺伝子の挿入ならびに破壊された相同遺伝子の挿入が含まれる。これとは別に、動物の内在性 K C N E 2 遺伝子を、常法 (Capecchi, 1989; Valancius and Smithies, 1991; Hasty et al., 1991; Shinkai et al., 1992; Mombaerts et al., 1992; Philpott et al., 1992; Snouwaert et al., 1992; Donehower et al., 1992) を用いる挿入または欠失変異または他の遺伝子改変により破壊してもよい。試験物質を動物に投与した後に、L Q T の存在を評価しなければならない。試験物質が L Q T の出現を予防または抑制する場合、該試験物質は L Q T の治療のための候補治療薬である。これらの動物モデルにより、潜在的な治療生成物のための非常に重要な試験ビヒクルが提供される。常法が用いられ、各々、出典明示して本明細書の一部とみなされる米国特許第 5, 8 3 7, 4 9 2、5, 8 0 0, 9 9 8 および 5, 8 9 1, 6 2 8 号に記載されたものを含む。

【0185】

L Q T の前兆診断は、心電図上の Q T 長期化の同定に依存してきた。不幸にも、心電図は、若く健康な個体においてはめったに行われぬ。加えて、多くの L Q T 遺伝子キャリアは比較的正常な Q T 間隔を有し、疾患の第一のサインは致命的な心臓不整脈である可能性がある (Vincent et al., 1992)。今回、多くの L Q T 遺伝子が同定され、L Q T と関連付けられ、この疾患に関する遺伝子試験を企図することが可能となる。これは継続変異解析およびさらなる L Q T 遺伝子の同定を必要とする。より詳細な表現型分析を用いて、L Q T の変異型間の表現型の違いが発見される可能性がある。これらの違いは診断および治療に有用となる可能性がある。

【0186】

K C N E 2 遺伝子変異と L Q T の間の関連性の同定により、L Q T を発症する危険にある人を同定するための、個体の早期前兆スクリーニングが可能となる。そのような個体を同定するために、K C N E 2 対立遺伝子を、直接に、または対立遺伝子のクローニングの後に変異に関してスクリーニングする。対立遺伝子を、正常対立遺伝子からの核酸配列の違いの存在に関して、以下の方法を含むがそれには限られないいずれかの適当な方法を用いて試験する。：蛍光イン・サイチ

ユハイブリダイゼーション (F I S H)、直接DNA配列決定、P F G E分析、サザンブロット分析、一本鎖コンホメーション解析 (S S C P)、連鎖解析、R N a s e保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (A S O)、ドットブロット分析およびP C R - S S C P分析。DNAマイクロチップ法に関する最近開発された方法も有用である。例えば、(1) クローン化した対立遺伝子および正常なK C N E 2遺伝子両方のヌクレオチド配列または適当なフラグメント (コーディング配列またはゲノム配列) を決定し、および次いで比較するか、または、(2) K C N E 2遺伝子または遺伝子フラグメントのRNAの転写産物を、試験される個体からの一本鎖全ゲノムDNAにハイブリダイズさせ、生じたヘテロ二本鎖をリボヌクレアーゼA (R N a s e A) で処理し、いずれかのミスマッチの位置を検出するために変性ゲル上に流す ; かのいずれかである。これらの方法の2つは、以下の方法に従って行うことができる。

【 0 1 8 7 】

試験すべき個体におけるK C N E 2遺伝子の対立遺伝子を常法を用いてクローン化する。例えば、血液試料を個体から採取する。この試料中の細胞から単離したゲノムDNAを部分的に約20kbの平均フラグメントサイズに部分消化する。18-21kbの範囲のフラグメントを単離する。生じたフラグメントを適当なベクターに連結する。クローンの配列を次いで決定し、正常なK C N E 2遺伝子と比較する

これとは別に、ポリメラーゼ鎖反応 (P C R s) を5'領域のためのプライマー対またはK C N E 2遺伝子のエキソンのためのプライマー対を用いて行う。P C Rを次いで正常K C N E 2遺伝子のいずれかの配列に基づくプライマー対を用いて行うこともできる。例えば、イントロンの一つのためのプライマー対を調製し、利用することができる。最終的に、R T - P C RをmRNAに関して行うこともできる。次いで、増幅産物を一本鎖コンホメーション多型 (S S C P) により常法を用いて解析し、いずれかの違いを同定し、次いで、これらを配列決定し、正常な遺伝子配列と比較する。

【 0 1 8 8 】

個体は、適当なプライマー対を用いて個体のDNAを増幅することにより、お

よび、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いるドット-プロットハイブリダイゼーションにより増幅された産物を分析することにより、共通のKCNE 2遺伝子変種を迅速にスクリーニングすることができる。

第二の方法は、正常なKCNE 2遺伝子と欠損遺伝子の間の違いの検出を支援するためにRNase Aを用いる。この比較は、プローブとしてKCNE 2遺伝子の小さな(~ 500 bp)制限フラグメントを用いるステップにて行う。まず、KCNE 2遺伝子を、遺伝子配列を約500 bpのフラグメントに切断する制限酵素を用いて消化する。これらのフラグメントを電気泳動ゲル上で分離し、ゲルから精製し、個々に、両定位にてSP6ベクター(例えばpSP64またはpSP65)にクローン化する。KCNE 2遺伝子フラグメントのインサートを含むSP6に基くプラスミドを当該分野で周知のSP6転写系を、[$-^{32}P$] GTPの存在下で用いてイン・ビトロで転写し、遺伝子の両鎖の放射能標識RNA転写産物を生成する。

【0189】

個々に、常法を用い、対立遺伝子DNAを用いてヘテロ二量体を形成するために、これらのRNA転写産物を使用する。KCNE 2フラグメントと個体からのKCNE 2対立遺伝子サブクローンの間の配列の違いによるRNA:DNAヘテロ二本鎖に生じるミスマッチは、RNase Aを用いて処理すると、RNA鎖の開裂を生じる。そのようなミスマッチは、点変異または個体の対立遺伝子の小欠失の結果である可能性がある。RNA鎖の開裂により、変性ゲル上でRNAプローブそのものよりも早く移動する2またはそれ以上の小RNAフラグメントが得られる。

見出されるいずれの違いも、KCNE 2遺伝子の分子変種を有する個体および、その結果としてのQT延長症候群の存在を証明する。これらの変種は多くの形態をとることができる。ほとんどのひどい型は、遺伝子に異常なタンパク質をコードさせるフレームシフト変異または大きな欠失であるか、タンパク質の発現を明らかに変更するものである。よりひどくはない切断破壊変異には、生み出されるタンパク質に明らかな影響を有する小さなインフレーム欠失および非保存的塩基対置換、例えばシステイン残基への、またはシステイン残基からの変化、塩基

性アミノ酸から酸性アミノ酸への、またはその逆の変化、疎水性から親水性アミノ酸への、またはその逆の変化または、二次または三次タンパク質構造に影響を与える他の変異が含まれる。サイレント変異または保存的アミノ酸置換に帰着する置換がタンパク質の機能を破壊するとは一般には考えられない。

【0190】

遺伝子試験により、出生時または出生以前からもLQTの危険にある個体を同定することが可能となる。LQTの前症状診断により、これらの疾患の予防が可能となる。ベータアドレナリン作動性ブロック剤を含む現存している医薬治療法により、該疾患に関連する問題の発症を予防することおよび遅らせることができる。最終的に、本発明は、全自然死の11%を占める心臓不整脈のような共通の心疾患の原因および治療に関する我々の理解を変える。現存している診断法は、心電図からQT間隔を測定することに焦点を当てている。この方法は、QT延長症候群の存在の十分迅速な指標ではない。本発明は、該疾患の存在のより迅速な指標である。LQTの遺伝的試験および改善されたメカニズム理解により、生命を脅かす不整脈の予防のための機会が合理的治療により提供される。例えば、カリウムチャネル開放剤が、KCNE2変異を有する患者において不整脈のリスクを減じることが可能である。これに対してナトリウムチャネルブロック剤が、SCN5Aの機能を変更する変異を有する患者のためのより有効な治療法である可能性がある。これらの不整脈はしばしば正常な心臓再分極を伴い、遺伝要因と獲得要因の組み合わせから生じる可能性があるため、最終的にこれらの研究により、一般の不整脈の基礎となるメカニズムに洞察が提供され得る。

【0191】

医薬組成物および投与経路

本発明のKCNE2ポリペプチド、抗体、ペプチドおよび核酸は、慣用的な医薬配合技術にしたがって調製される医薬組成物に処方できる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA)を参照のこと。組成物は、有効物質または有効物質の医薬上許容される塩を含有していてもよい。これらの組成物は、1の有効物質に加えて、医薬上許容される賦形剤、担体、バッファー、安定化剤または他の当該分野でよく知られた

物質を含んでいてもよい。かかる物質は、非毒性であって、有効成分の効力を妨害しないべきである。担体は、例えば、静脈内、経口、鞘内、神経弓上または非経口などの投与に望ましい調製物の形態に依存して、多種多様な形態をとってもよい。

【0192】

経口投与の場合、化合物をカプセル、丸薬、錠剤、ロゼンジ、メルト、粉末、懸濁液またはエマルジョンのような固体または液体調製物に処方することができる。経口投薬形態の組成物を調製するには、経口液体調製物（例えば、懸濁液、エリキシルおよび溶液）の場合、通常の医薬媒体のいくつか、例えば、水、グリコール、油、アルコール、フレーバー剤、保存料、着色料、懸濁化剤などを用いてもよく；経口固体調製物（例えば、粉末、カプセルおよび錠剤）の場合、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などのような担体を用いてもよい。投与が安易なため、錠剤およびカプセルが最も有益な経口投与単位形態を示し、この場合、固体医薬担体が明らかに用いられる。所望ならば、錠剤を標準技術により、糖被覆または腸溶性被覆してもよい。有効物質をカプセルに包んで、血脳関門を通過させるのと同時に、胃腸管を安定に通過させることができる。例えば、WO96/11698参照のこと。

【0193】

非経口投与の場合、化合物は、医薬担体中に溶解させ、溶液または懸濁液のいずれかとして投与してもよい。適当な担体の例は、水、セーライン、デキストロース溶液、フラクトース溶液、エタノール、または動物性、植物性もしくは合成起源の油である。担体は、また、他の成分、例えば、保存料、懸濁化剤、可溶化剤、バッファーなどを含有していてもよい。化合物が鞘内に投与されるとき、それらはまた、脳脊髄液中に溶解していてもよい。

【0194】

有効物質は、好ましくは、治療上有効量で投与される。実際の投与量ならびに投与の速度および時間推移は、治療される状態の性質および重篤度に依存するであろう。治療の規定、例えば、投与量、タイミングなどの決定は、一般的な従業者または専門家の責任内にあり、典型的には、治療されるべき障害、個々の患者

の状態、デリバリー部位、投与方法および従業者に既知の他の因子を考慮に入れる。技術およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesにおいて見出すことができる。

【0195】

別法では、ターゲティング療法を用いて、抗体または細胞特異的リガンドのようなターゲティング系の使用によって、ある特定の型の細胞に有効物質をより特異的にデリバリーしてもよい。ターゲティングは、種々の理由、例えば、物質が許容できない毒性である場合、または別法で高すぎる投与量を必要とする場合、または別法で標的細胞に侵入することができない場合に望ましい。

【0196】

これらの物質を直接投与する代わりに、それらを標的細胞中、例えば、上記のようなウイルスベクター中または米国特許第5,550,050号およびPCT公開公報WO92/19195、WO94/25503、WO95/01203、WO96/02286、WO96/02646、WO96/40871、WO96/40959およびWO97/12635に記載のような、患者における移植のために設計された細胞に基づくデリバリー系において生産できた。ベクターは、治療されるべき特異的細胞を標的とすることができるか、または標的細胞に対してより組織特異的な調節エレメントを含有することができた。細胞に基づくデリバリー系は、患者の体内において所望の標的部位に移植されるように設計されており、有効物質のコーディング配列を含有する。別法では、該物質は、治療されるべき細胞中で生産されるか、または該細胞を標的とする活性化物質による活性形態への変換のための前駆形態で投与できた。例えば、EP425,731AおよびWO90/07936を参照のこと。

【0197】

本発明の実施は、特に示さない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝子学、免疫学、細胞生物学、細胞培養およびトランスジェニック生物学の常法を用い、それらは当該技術分野の範囲である。例えば、Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1992; Glover, 1985; Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988; Jakoby and Pasta

n, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.), Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds, 1986); Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照のこと。

【0198】

多型性解析方法

単一塩基伸長法は、例えば、米国特許第5,846,710; 6,004,744; 5,888,819および5,856,092号に記載される。簡単には、該方法は、標的配列に相補的なプライマーをハイブリダイズして該プライマーの3'末端を、該標的配列の可能性のある変異の部位のすぐ隣であるがその部位にかからないようにする。すなわち、該プライマーは、5'のすぐ隣の塩基および5'にて終止する標的ポリヌクレオチドの相補体から当該多型性部位までのサブ配列を含む。ハイブリダイゼーションを可能性のある変異の部位を占有するであろう塩基に相補的な1以上の標識ヌクレオチドの存在下で行う。例えば、2対立遺伝子多型性について、2つの異なって標識されたヌクレオチドを用い得る。4対立遺伝子多型性について、4つの異なって標識されたヌクレオチドを用い得る。いくつかの方法において、特定の方法は複数の異なって標識されたヌクレオチドを用い、該ヌクレオチドはジデオキシヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションは、該標的配列中の変異の部位を占有する塩基に相補的なヌクレオチドが存在するならば、プライマー伸長を許容する条件下で行う。伸長は標識ヌクレオチドを

組み入れ、それによって、標識伸長プライマーを生成する。複数の異なって標識されたヌクレオチドを用い、該標的がヘテロ接合性であれば、複数の異なって標識された伸長プライマーを入手し得る。伸長プライマーが検出され、どの塩基が該標的ポリヌクレオチドにおける変異の部位を占有するかの指示を与える。

【0199】

実施例

本発明を以下の実施例でさらに詳細に説明するが、これは説明のために掲げるのであって、断じて本発明を限定する意図のものではない。

当該分野でよく知られている標準的な技術または以下に特記する技術が利用される。

【0200】

実施例1

分子生物学的方法

遺伝子を修飾されたMCS (pGA1) (SestiおよびGoldstein, 1998)でpBF2に連結した後に、全てのcRNAを合成した。本発明者らは、BLASTアルゴリズム (Altschulら, 1990)を用い、KCNE1によってコードされた蛋白質配列でもってNCBIデータベースをサーチし、有意に相同な遺伝子を見出すことはできなかった。統計学的有意性についての閾値未満の配列の再評価により、短い標的モチーフを運ぶ9つのESTが同定された。ラットMinKにおける標的アミノ酸は、I_{Ks}チャネルゲーティング (T59、I62、R68、S69、K71、S75、D77) (Takumira, 1991; Splawskiら, 1997)、イオン選択性 (F55、T59) (GoldsteinおよびMiller, 1991; TaiおよびGoldstein, 1998)、単位コンダクタンス (S75、D77) (SestiおよびGoldstein, 1998)、ポア閉鎖 (Y47、I48、F55、G56、F57) (GoldsteinおよびMiller, 1991; Wangら, 1996; TaiおよびGoldstein, 1998)に影響することが知られている部位および深I_{Ks}チャネル導電経路において暴露を獲得するもの (F55、G56、F57、T59) (Wangら, 1996; Taiお

よびGoldstein, 1998)である。MiRP1をコードするラットおよびヒト配列を、まず、逆転写によって心臓ポリ(A)⁺mRNA(Clontech)から単離した。Marathon™DNAキットおよびスクリーニングされたランダムおよびオリゴ(dT)-起点の成人ヒト心臓および成体ラットcDNAライブラリー(Clontech)で、cDNA末端の迅速な増幅を行って、完全な配列を決定した。ラットおよびヒトrMiRP1についての3つのcDNAを単離し、両ストランドについて配列決定した。LaserGene(DNA STAR, Inc., Madison, WI)を用いて、ヌクレオチドおよび蛋白質の配列の解析を行った。Blossumアルゴリズムおよびギャップオープニングおよび15および0.1の伸長ペナルティを備えたClustal W1.6にて整列を行った。MinKについての遺伝子はKCNE1と命名されるので、新しい遺伝子には、ゲノムデータベース命名委員会(HUGO/GDB)によってKCNE2(MiRP1)、KCNE3(MiRP2)およびKCNE4(MiRP3)が与えられている。ヒトrMiRP1、ラットMiRP1、ヒトMiRP2、マウスMiRP2およびマウスMiRP3についての受託番号は、各々、AF071002、AF071003、AF076531、AF076532、およびAF076533である。

【0201】

SSCP分析。ゲノム試料をPCRによって増幅し、SST分析で用いた。3つのプライマー対を突然変異スクリーニングで用いた：

【0202】

【化1】

- 1F, 5'-CCGTTTTCTAACCTTGTTTCG-3'(配列番号：13)および
- 2R, 5'-AGCATCAACTTTGGCTTGGAG-3'(配列番号：14)；
- 3F, 5'-GTCTTCCGAAGGATTTTTATTAC-3'(配列番号：15)および
- 4R, 5'-GTTCCCGTCTCTTGGATTTC-3'(配列番号：16)；
- 5F, 5'-AATGTTCTCTTTCATCATCGTG-3'(配列番号：17)および
- 6R, 5'-TGTCTGGACGTCAGATGTTAG-3'(配列番号：18)。

【0203】

Perkin Elmer Cetus 9600サーモサイクラーを用い、10 μ lの最終容量にて、PCRを50 ngのDNAで行った。PCR反応は、4%ホルムアミドおよび10%グリセロールの最終濃度を有し、鉱油で覆った。増幅条件は、3分間の94℃、続いての10秒間の94℃、20秒間の55℃および20秒間の72℃の35サイクル、続いての72℃における5分間の伸長であった。40 μ lの0.1% SDS / 10 mM EDTAおよび30 μ lの95%ホルムアミド負荷色素で反応を希釈した。混合物を94℃にて5 - 10分間で変性し、直ちに氷上に置いた。3 μ lの各試料を4%の5%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド 49:1)で、室温の0.5×および1×突然変異検出増強ゲル(MDE, FMC Bioproducts)で電気泳動に付した。5%ゲルでの電気泳動は、40 Wにて2 - 3時間行い、0.5×および1×ゲルでの電気泳動は、各々、350 Vまたは800 Vにて一晩行った。ゲルを3 MM濾紙上で乾燥し、-70℃にて18時間フィルムに暴露した。

【0204】

DNA配列決定。異常および正常SSCPバンドをゲルから切り出し、100 μ lのddH₂O中で65℃にて30分間溶出させた。10 μ lの溶出したDNAを、元のプライマー対を用いる第2の100 μ l PCR反応で鋳型として用いた。産物を、Microcon 100マイクロコンセントレーター(Amicon)にて、400 μ lのddH₂Oで3回洗浄した。Applied Biosystemsモデル373A DNAシーケンサーにて、元のプライマーを用い、ジデオキシ鎖停止法によって、DNAを両方向に直接的に配列決定した。

【0205】

実施例2

電気生理学方法

卵母細胞を*Xenopus laevis*から単離し、コラゲナーゼ処理によって脱小胞化し、46 nl cRNAを翌日注入した。2電極電圧クランプ(Oocyte Clamp, Warner Instruments Inc., Hamden, CT)およびIBMコンピューターおよび非売品のソフトウェアを用い、0.2 ngのラットまたはヒトMiRP1 cRNAと共にまたはそれ

なくして1 ngのHERG cRNAの注入から2 - 4日後に、全細胞電流を測定した。特記しない限り、データは4 kHzでサンプリングし、1 kHzで濾過した。生データをリーク修正なしに示す。Axopatch 200A増幅器 (Axon Instruments, Foster City, CA)、Quadra 800コンピューターおよびACQUIREソフトウェア (Instrutech, Great Neck, NY) を用いて単一チャンネル記録を記録し、濾過せずにVHSテープに保存した。TAC (Instrutech, Great Neck, NY) またはIGOR (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR) パッケージを用いる解析に先立ち、4極ベッセルフィルターを通してデータを濾過した。全ての実験は22で行った。

【0206】

プロトコル。全ての場合に電圧を - 80 mV に保持する。(1) 定常状態活性化; 10 mV ステップにて - 80 ないし 40 mV の3秒間のプレパルス、- 110 mV への6秒間のテストパルス; パルス間隔5秒。(2) 活性化速度; 20 mV ステップでの0 ないし 60 mV における0.005 - 3秒の増加プレパルス持続、- 100 mV における3秒間のテストパルス; パルス間隔5秒。(3) ピーク電流; 定常状態脱活性化; 脱活性化速度; 30 mV への3秒間のプレパルス、10 mV ステップにての - 150 ないし 10 mV の5秒間のテストパルス; 1秒間の - 120 mV へのパルス; パルス間隔5秒。(4) 定常状態不活化; 20 mV への3秒間のプレパルス、10 mV ステップでの - 120 ないし 60 mV の30ミリ秒間のパルス; 20 mV における1秒間のテストパルス; パルス間隔2秒。(5) E - 4031閉鎖; 50サイクルを反復した: 30 mV への3秒間のパルス、- 100 mV への5秒間のテストパルス。(6) 等時性およびピーク電流; 10 mV のステップでの - 80 ないし 20 または 40 mV への1または2秒間のパルス、続いての3秒間のパルス間隔での - 40 mV への2秒のステップ。(7) - 80 ないし 20 mV の2秒間のパルス、続いての、3秒のパルス間隔での、10 mV のステップにての - 120 ないし 20 mV の電圧への4または6秒のテストパルスによって、単一チャンネルを活性化した。

【0207】

イオン条件。HERGのみで形成された、またはrMiRP1およびHERGの両サブユニットを含有するチャネルの活性化を、プロトコル1および2によって種々 Ca^{2+} 濃度で評価した。ブロッキングイオンとしての Ca^{2+} を処理し、本発明者らは、 -100 mV における $0.29 \pm 0.02\text{ mM}$ のHERGチャネルに対する見掛けの平衡阻害定数(K_i)を見出し、これは、他の者(Hoら, 1998)によって報告されているものと同様の値であり、他方、rMiRP1を含有するヘテロマーチャネルは、ほぼ3倍低い見掛けの K_i を有した。かくして、最初の特徴付けは、「低 Ca^{2+} /高 K^+ 」浴溶液(mMで表す): 95 KCl、5 NaCl、1 $MgCl_2$ 、0.3 $CaCl_2$ および10 HEPES、NaOHにてpH7.6、中で行った。他の実験は、ヒト血漿で見出されるイオン化種のレベルに基づく溶液を用いる(mMで表す): 4 KCl、95 NaCl、0.75 $MgCl_2$ 、1 $CaCl_2$ および10 HEPES、NaOHにてpH7.6。図4での K^+ 滴定では、NaClおよびKClを等張的に置き換えた。細胞-付着パッチでは、ピペット溶液は以下の通りであった(mMで表す): 100 KCl、1 $MgCl_2$ 、0.3 $CaCl_2$ 、10 HEPES、KOHにてpH7.5。全細胞では、ピペットは以下のものを含有した(mMで表す); 100 KCl、1 $MgCl_2$ 、10 HEPES、2 EGTA、KOHにてpH7.5。

【0208】

薬理学。キニジンはSigmaから購入し、クラリスロマイシンはAmerican Bioanalytical (Natick, MA)から購入した。キニジンおよびE-4031は、浴溶液に容易に溶解した。DMSO中のクラリスロマイシンの50 mMストックを実験のために浴溶液で希釈した。キニジンおよびクラリスロマイシンは1 mM Ca^{2+} 、4 mM KCl溶液を用いるまたは特記した -40 mV におけるプロトコル1によって実験された。E-4031は、卵母細胞のための1 mM Ca^{2+} 、4 mM KCl溶液を用いる -100 mV におけるプロトコル3、およびCHO細胞のための -40 mV におけるプロトコル1によって実験した。ヒル係数は、 $1 / (1 + ([薬物] / K_i)^n)$ によって決定した。

【0209】

実施例3

生化学的方法

HA残基 (YPYDVPDYAX ; 配列番号 : 19) cmyc残基 (ISMEQKLISEEDLNK ; 配列番号 : 20) をコードするヌクレオチドでそれぞれにおける末端停止コドン置き換えることによって、rMiRP1およびHERGにエピトープを付した。COS細胞の一過性トランスフェクションはDEAD-Detran、クロロキノン、DMSOストックによるものであった。30秒間の10,000Gにおける遠心によって明らかにする前に、トランスフェクトした細胞を緩衝液A (mMで表す) : 150NaCl、1%NP-40、1%CHAPS、0.2PMSF、20NaF、10Na₃VO₄、50トリス、pH7.4および0.7μg/mlヘプスタチン中に溶解させた。抗-cmycモノクローナル抗体9E10 (Oncogene Research) および固定化ブロテインA/G (Pierce) で免疫沈澱を行った。試料はSDS-PAGE (10-16%) によって分離した。フルオログラフィーのためのホースラディッシュペルオキシダーゼ-ケミネミネセンス結合抗体 (Oncogene Research) と共に抗-HAモノクローナル抗体にCA5 (Boehringer) でウェスタンブロットを行った。Speedread Lysate 2™ (Novagen) ウサギ網状細胞溶解物を用いて、rMiRP1、rMinKおよびHERG-cmycについてのcRNAから蛋白質サブユニットを生じさせた。サブユニットを³⁵S-メチオニン (Amersham) で放射標識し、1.5%NP-40を含有する緩衝液A中で希釈した。結合アッセイは、等しい容量の反応混合物を混合し、前記したIPに先立って氷上で2時間インキュベートすることによって行った。

【0210】

実施例4

MinKに関連する産物をコードする遺伝子の同定およびクローニング

National Center for Biotechnology Information (NCBI) を通じて入手可能なデータベースをMinK-関連配列について評価した。我々のサーチ戦略は、I_{Ks}チャネルゲーティング (Takumiら、1999 ; Splawsk

yら, 1997)、イオン選択性(GoldsteinおよびMiller, 1991; TaiおよびGoldstein, 1998)、単位コンダクタンス(SestiおよびGoldstein, 1998)、ポア閉鎖(GoldsteinおよびMiller, 1991; Wangら, 1996; TaiおよびGoldstein, 1991)に影響することが知られているMinK中の部位および I_{Ks} チャネル導電経路において物理的に暴露されたもの(Wangら, 1996; TaiおよびGoldstein, 1998)を標的化した。このようにして、MinK-関連遺伝子の断片は9つの発現された配列タグ(EST)およびクローン化された3つの新しい遺伝子上で同定された。MinKについての遺伝子は、KCNE1と命名されるので、新しい遺伝子はKCNE2、KCNE3およびKCNE4と命名され、それらのヌクレオチドおよび予測される蛋白質配列をNCBIに寄託した。

【0211】

実施例5

rMiRP1はイオンチャネルサブユニットである

ラットrMiRP1(rMiRP1)をコードするEST遺伝子断片はノーザンプロット分析(図1A)によってラット心筋および骨格筋において豊富な単一メッセージを検出したので、心臓cDNAライブラリーをスクリーニングし、複数の同一のrMiRP1クローンを単離した。369bpの予測されるオープンリーディングフレームは、2N-結合グリコシル化部位、単一の膜貫通セグメントおよび2つのプロテインキナーゼC-媒介リン酸化部位についてのコンセンサス配列を持つ123アミノ酸の蛋白質を予測させる(図1C)。これは、rMiRP1は、MinKで見出される同一の単純なタイプI膜トポロジー-細胞外アミノ末端、続いての単一の膜にわたるストレッチおよび細胞質カルボキシ末端を有する(Buschら, 1992; DlumenthalおよびKaczmarek, 1994; WangおよびGoldstein, 1995)を有する。MiRP1およびMinKのラット単離体は27%のアミノ酸同一性および45%の相同性を示す(図1C)。

【0212】

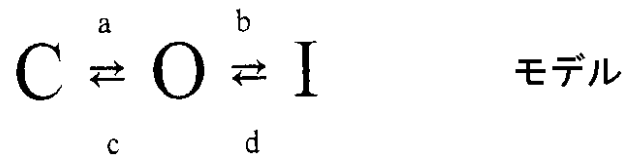
rMiRP1がイオンチャネルサブユニットとして機能できるか否かをテストするために、そのcRNA(1-25ng)を*Xenopus laevis*卵母細胞に注入した。MinKについての相補的RNAは、細胞に内因性であるポア-形成サブユニットとのその会合によってこれらの条件下でK⁺電流を誘導する(BlumenthalおよびKaczmarek, 1992; WangらおよびGoldstein, 1995; Sanguinettiら, 1996, Taiら1997)。対照的に、2-電極電圧クランプによる測定は、rMiRP1についてのcRNAでの注入から1ないし14日後に電流を明らかとしなかった(n=45, 示さず)。さらに、rMiRP1についてのcRNAは、KvLQT1、KCNQ2、Shaker、速不活化-除去(6-46)Shaker、Kv1.3、Kv1.5、Kv1.6、Kv2.1のサブユニットの発現によって形成されたチャネルに対して見掛けの効果を有しなかった(n=15-39, 示さず)。逆に、rMiRP1はHERGサブユニットで形成されたチャネルの特性に対して有意な効果を有した。

【0213】

外向きK⁺電流に都合がよい正の電圧へ脱分極すると、HERGチャネルが開く。しかしながら、これらのチャネルを通じての正味のイオン移動は、膜の両側のK⁺濃度が同一である場合(チャネル特徴付けでルーチンの用いられる非生理学的条件)、脱分極-過分極サイクルにわたって内向きであるので、それらは内側に整流されると記載される。対称100mMのKCl溶液(図2)で行い、以下のごとく形成された記録でわかるように、内向き整流は迅速なチャネル不活性化に由来する(Shibasaki, 1987; Sanguinettiら, 1995; Trudeauら, 1995; Smithら, 1996; Wangら, 1997; Zouら, 1997)。

【0214】

【数1】



【0215】

HERGチャネルは脱分極に際して閉じた状態から開いた状態へと活性化される(C → O)が、それは迅速に不活性化される(O → I)ので、外向きの電流をほとんど通さない。再分極が負の電位に戻るにつれ、チャネルは不活性状態から開いた状態に迅速に回復し(O ← I)、それは閉じる(C ← O)までK⁺電流を通過させる。工程gと比較して工程cは迅速であるので(転移と呼ばれる脱活性化)、再分極の間に開いた状態で費やされた時間は重要である。これは、脱活性化速度がK⁺電流の大きさに対してそのような強力な影響を有するのを説明する。低いCa²⁺濃度は天然のI_{Kr}およびHERGチャネルのゲーティング転移を遅らせるので(SanguinettiおよびJurkiewicz, 1992; Hoら, 1996)(Sanguinettiら, 1995; Hoら, 1998)、まず、0.3mM Ca²⁺、100mM KCl溶液を用いてチャネルの機能に対するrMiRP1の影響を調べた。

【0216】

膜が種々のテスト電位までステップされた後に閉じた状態を平衡とするチャネルの分率を評価するプロトコルを用い、活性化はrMiRP1によって変更されることが判明した(図2A、図2C)。rMiRP1を含有するチャネルは、HERGサブユニットでのみ形成されたチャネルと比較した場合、半最大活性化(V_{1/2})を達成するのに、より正の電位、~9 ± 1mV(10卵母細胞についての平均 ± s.e.m.)を必要とした; 対照的に、傾き因子の変化は明らかでなかった(図2C)。V_{1/2}におけるこのシフトは、rMiRP1で形成されたチャネルの活性化のより遅い速度に由来するよう見えた(図2C、insert, モデル工程)。

【0217】

ピーク電流はrMiRP1によっても変化した。保持された脱電極によってチ

チャンネルを十分に活性化させ、次いで、種々のテスト電位において最大電流を測定するプロトコルを用い、全細胞電流の電流のサイズを評価した(図2B)。HERGサブユニットで形成されたものと比較して、平均ピーク電流はrMiRP1でのチャンネルにつき40%小さかった(図2D)。以下に示すごとく、これは、チャンネルゲーティングの変化よりはむしろ変化し単一チャンネル電流(すなわち、単位時間当たりの開いたチャンネルを通して移動するイオンの数)に主として由来した。

【0218】

定常状態プロトコル(Smithら, 1996)を用いて不活性化(工程b)を判断し、ここに、余りに短くて脱活性化がほとんど起こり得ないプレパルスの間に、チャンネル不活性化は種々の電圧で平衡に達し;次いで、不活性化状態におけるチャンネルの分率を、電圧をテスト電位まで段階的に変化させることによって評価する。HERGチャンネルの不活性化は、プレパルス電圧が-100ないし30mVであるrMiRP1を含有するものと同であった(図2E)。電流-電圧の関係は-100mVよりも負である電位においてのみ異なり、ここに、脱活性化の差は明らかになった。脱活性化からの回復(工程c)は、両チャンネルタイプにおいて依然として極端に速かった。

【0219】

チャンネルの脱活性化(工程d)は、rMiRP1によって顕著に変化した。脱分極工程によってチャンネルが十分に活性化された後、チャンネルが閉じた状態へ戻るスピードを種々のテスト電位で評価した。これらのイオン状態下で、rMiRP1は脱活性化速度の7倍増加を誘導した(図2F)。かくして、HERGチャンネルは、-100mVまで認識可能に脱活性化されず、rMiRP1で形成されたチャンネルと同一の脱活性化速度を達成するのにより負のステップ50mVを必要とした。脱活性化は電圧-感受性であったが、rMiRP1での速度増加は-100ないし-150mVで変化しなかった(示さず)。

【0220】

実施例6

rMiRP1/HERGおよび天然 I_{Kr} チャンネルの単位コンダクタンスおよ

び脱活性化

単一 - チャネル分析は、*rMiRP1* がピーク全細胞電流を低下させる主なメカニズムを明らかとした (図2D)。*rMiRP1* は、開いたチャネル複合体を通じてほぼ40%の単位電流の減少を引き起こした (図3A、図3B)。かくして、すでに記載されているごとく (Zouら, 1997)、単一HERGチャネルは、 12.9 ± 2 pXの傾きコンダクタンスを有することが判明した (図3C)。*rMiRP1* を含有するチャネルは 8 ± 1 pSの値を示した (図3C)。これは、同一条件下で研究されたウサギ房室節細胞における天然 I_{Kr} チャネルで報告された単位コンダクタンス値、 8.4 pS (Shibasaki, 1987) と同様である。

【0221】

チャネルを*rMiRP1* で形成し、全細胞様式で調べた場合に観察されたチャネル脱活性化の増加した速度 (図2F) は、単一 - チャネルレベルでも明らかであった (図4)。単一HERGチャネルは、従前に報告されているごとく (Zouら, 1997)、 -100 mVに保持されたパッチにおいて何秒も依然として開いていたが、*rMiRP1* で形成されたチャネルは迅速に閉じた (図4A)。50 - 70トレースの全体的平均は、*rMiRP1* でのチャネルの形成によって引き起こされた脱活性化の2.3倍加速を強調する (図4D)。このようにして、*rMiRP1* で形成されたチャネルは、再度、天然 I_{Kr} チャネルに似ていた。ヒトおよびマウス心室筋細胞において、 I_{Kr} チャネルは、HERGまたはネズミエーテルagonagon関連遺伝子 (MERG) サブユニット単独で形成されたチャネルよりも2ないし3倍速く脱活性化することが判明した (Yangら, 1994; Sanguinettiら, 1995; Lees-Millerら, 1997; Londonら, 1997)

【0222】

実施例7

rMiRP1 / HERGおよび天然 I_{Kr} チャネルの外部 K^+ による調節

ヒト血漿におけるものと同様のイオン条件 (1 mMイオン化 Ca^{2+} 、 4 mM KCl溶液) を次に使用した。天然 I_{Kr} チャネルおよびHERGサブユニッ

トのみで形成されたものの1つのホールマークは、脱分極化電圧における電流電圧の関係についての負の傾きである；これはチャンネルの不活性化に由来する（Sanguinettiら，1995；Smithら，1996，Spectorら，1996）。予測されるごとく、rMiRP1は電流/電圧関係の形状に対して有意な効果を有しなかった（図5A、図5B）。というのは、それはチャンネル不活性化を変化させなかったからである（図2E）。対照的に、外向きK⁺電流の上方調節は外部K⁺濃度の上昇と関係し、天然I_{Kr}およびHERGチャンネル双方のもう1つの顕著な特徴（SanguinettiおよびJurkiewicz，1992；Sanguinettiら，1995）は、rMiRP1によって修飾された。外部K⁺イオンが1mMから8mMまで変化した場合、rMiRP1を含有するチャンネルはHERGチャンネルよりも応答が低かった（図5C）。ネズミ心房細胞またはモルモット心房筋細胞で天然I_{Kr}チャンネルを調べると、rMiRP1でここに観察されたもののように、外部K⁺に対する浅い応答も見出された（Shibasaki，1987；ScampsおよびCarmeliet，1989；SanguinettiおよびJurkiewicz，1992；Sanguinettiら1995；YangおよびRodén，1996）。血漿-様イオン条件および全細胞モードで調べると、rMiRP1は、再度、脱活性化の速度を、HERGチャンネルについての $\tau = 130 \pm 8$ ミリ秒から 61 ± 4 ミリ秒（平均 \pm s.e.m、プロトコル3、n = 5細胞）へとほぼ2倍増加させることが観察された（図5D）。

【0223】

これらのイオン条件下での、外部K⁺イオンによる活性化、脱活性化および調節に対するrMiRP1の組合せた効果は、HERGサブユニット単独によって形成されたチャンネルと比較して、その形状がほとんど変化しない電流/電圧関係を生じた（図5B）。しかしながら、rMiRP1でのチャンネルを発現する卵母細胞は、HERGチャンネルでのものの内向き電流の半分および外向き電流の1/4を通過させた（図5D、5E）。

【0224】

実施例8

rMiRP1およびHERGサブユニットの安定な会合

エピトープタグで修飾され、哺乳動物組織培養細胞で発現された蛋白質を調べることによって、rMiRP1およびHERGの間のサブユニット相互作用をまづ評価した。エピトープは巨視的チャネル活性に対して明らかな効果を有しなかった(示さず)。COS細胞でのrMiRP1-HAの一過性発現、続いての抗-HA抗体でのウェスタンブロット分析は、成熟蛋白質および少量のそのモノ-および未グリコシル化形態に適した移動距離において、3つの特異的なバンドを明らかとした(図6A、レーン1);エンドグリコシダーゼF処理の結果、最も低い予測質量において、1つの特異的バンドに対するプロフィールが崩壊した(示さず)。

【0225】

HERG-cmycとrMiRP1-HAとの共発現は、抗-cmycモノクローナル抗体での免疫沈殿(IP)によるrMiRP1-HAの回収を可能とした(図6A、レーン2)。HERG-cmycが単独で発現された場合(図6A、レーン3)、rMiRP1-HAが単独で発現された場合(図6A、レーン4)、あるいはチャネル蛋白質コネキシン43-cmycがrMiRP1-HAと共に発現された場合(図6A、レーン5)、抗-cmyc IPはシグナルを与えなかったため回収は特異的であることが示された。

【0226】

従前に報告されているごとく、MinKおよびHERG-cmycは共に会合する(McDonaldら, 1997)。MinKおよびrMiRP1のHERG-cmycへの結合を比較するために、イン・ビトロで合成された³⁵S-標識MinKおよびMiRP1サブユニットを用いてアッセイを行った。rMiRP1およびHERG-cmyc、続いての抗-cmyc IPのインキュベーションは、オートラジオグラフィー(図6B、レーン1)によって判断して、rMiRP1の強力な回復を可能とした。同様に、rMinKおよびHERG-cmycのインキュベーションは、rMinKの強力な回復を可能とした(図6B、レーン2)。rMiRP1およびrMinKを1:1の比率で混合し、HERG-cmycと共に5倍モル過剰でインキュベートすると、rMinKの存在化で

観察されたもののように、抗-cmyc-IPはrMiRP1の強力な回復に導き、他方、rMinKの回復は貧弱であった(図6B、レーン3)。かくして、rMinKおよびrMiRP1は、各々、HERG-cmycと会合することができた。しかしながら、これらのイン・ビトロ条件下では、両ペプチドの存在は、rMinKとのものに優先して、安定なrMiRP1/HERG複合体の形成を有利にした。

【0227】

実施例9

ヒトrMiRP1遺伝子、hKCNE2のクローニングおよび機能

rMiRP1/HERGチャネル複合体および天然心臓I_{KR}チャネルの推定される分子的相関に基づき、本発明者らはヒトMiRP1についての遺伝子(hKCNE2)をクローンして、心臓不整脈を持つ患者における突然変異の存在につきスクリーニングした。多数の同一クローンがヒト心筋cDNAライブラリーから単離された。ラットにおけるごとく、心筋および骨格筋において転写体が検出された(示さず)。ヒトcDNAは、2つのN-結合グリコシル化部位、単一の膜貫通セグメントおよび2つのプロテインキナーゼC-媒体リン酸化部位を持つ123アミノ酸の蛋白質を予測させた。ラットおよびヒトrMiRP1の整列は82%同一性および97%相同性を示した(図6c)。

該hKCNE2遺伝子は染色体21q22.1に位置決めされた(受託番号AP000052)。hKCNE1、MinKをコードする遺伝子は従前にこの部位に位置決めされているので(受託番号AP000053)、これは注目すべきであった。79kbだけ分離して、該2つの遺伝子を反対方向に整列させる。このオープンリーディングフレームは34%同一性を有し、双方は単一のエクソンに含まれる(Splawskiら, 1998)。これは、MiRP1およびMinKが遺伝子の複製および発散の進化を通じて関連することを示唆する。

【0228】

1mM Ca²⁺、4mM KCl溶液を用いてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において一過性発現によって調べられた野生型ヒトMiRP1は、ラットMiRP1と同一の効果を有した。rMiRP1でのチャネルのように

、hMiRP1/HERG複合体は、半最大活性化を達成するのにより正の電位への脱分極を必要とし、HERGサブユニット単独によって形成されたチャネルと比較して傾き因子の変化を示さなかった(表1)。rMiRP1のように、hMiRP1は定常状態不活性化を変化させなかった(示さず)。rMiRP1でのそのように、hMiRP1/HERG複合体はHERGチャネルよりも速く脱活性化した(ほぼ3倍)(表1、-120mVにおける τ_f)。最後に、(卵母細胞における)hMiRP1で形成されたチャネルの単位コンダクタンスはrMiRP1でのチャネルで測定されたのと同であった(8.0 ± 0.7 pS)(図3cに示すごとく $n=11$ パッチ(示さず))。

【0229】

【表1】

表 1

hMiRP1/HERGチャネルおよびHERGサブユニットのみで形成されたチャネルの活性化および脱活性化パラメーター

チャネル (細胞の数)	活性化 $V_{1/2}$ mV	活性化 傾き, mV	脱活性化 τ_f s	脱活性化 τ_{ss} s	脱活性化 $I_f/(I_s + I_f)$
HERG (11)	-25 ± 5	9.1 ± 1.4	241 ± 119	782 ± 376	0.59 ± 0.19
WT hMiRP1 (21)	-21 ± 6	9.5 ± 1.0	80 ± 26	483 ± 491	0.82 ± 0.03
T8A hMiRP1 (15)	-29 ± 6	9.4 ± 1.7	100 ± 40	590 ± 370	0.83 ± 0.05
Q9E hMiRP1 (14)	-12 ± 4	7.6 ± 0.4	100 ± 27	750 ± 451	0.80 ± 0.11
M54T hMiRP1 (10)	-21 ± 6	7.2 ± 2.0	37 ± 8	266 ± 35	0.81 ± 0.06

活性化速度は 1.0 mM Ca^{2+} 、 4 mM KCl溶液中のマクロパッチにて見積もった。電流は図2におけるごとく活性化パラメーターにつき測定し、適合させた；脱活性化については、二重指数関数($I_0 + I_f e^{(-t/\tau)_f} + I_s e^{(-t/\tau)_s}$)およびプロトコル3を用いた(-120 mV)。 1 mM Ca^{2+} 、 1 mM KCl溶液中で閉鎖を調べると、野生型hMiRP1でのチャネルは $V_{1/2} = -20 \pm 5$ mVおよび傾き= 9.2 ± 2 を示し、他方、Q9E-hMiRP1チャネルは $V_{1/2} = -12 \pm 5$ mVおよび傾き= 7.6 ± 1 ($n=7-13$ 細胞)を有した。

【0230】

活性化速度は 1.0 mM Ca^{2+} 、 4 mM KCl溶液中のマクロパッチにて見積もった。電流は図2におけるごとく活性化パラメーターにつき測定し、適合させた；脱活性化については、二重指数関数($I_0 + I_f e^{(-t/\tau)_f} +$

$I_s e^{(-t/\tau)_s}$) およびプロトコル3を用いた (-120 mV)。 1 mM

Ca^{2+} 、 1 mM KCl 溶液中で閉鎖を調べると、野生型 hMiRP1 でのチャンネルは $V_{1/2} = -20 \pm 5\text{ mV}$ および傾き $= 9.2 \pm 2$ を示し、他方、 Q9E-hMiRP1 チャンネルは $V_{1/2} = -12 \pm 5\text{ mV}$ および傾き $= 7.6 \pm 1$ ($n = 7 - 13$ 細胞) を有した。

【0231】

実施例10

hMiRP1/HERG および天然 I_{Kr} チャンネルは二相クラスIIIブロック速度を呈する

クローン化された HERG および天然 I_{Kr} チャンネルの間の基本的な不一致は、 E-1031 のようなメタンスルホンアニリドクラスIIIに対するそれらの共通点のない応答である。当該剤に暴露された閉じた HERG チャンネルは、初期テストパルスでほとんど阻害を示さず、反復活性化パルスまたは延長された脱分極にてゆっくりと平衡閉鎖を達成する (Spectorら, 1996 ; Zhouら, 1998)。対照的に、天然 I_{Kr} チャンネルは、閉鎖の二相 - 初期テストパルスでの有意な阻害および引き続いてのテストパルスでの平衡ブロックに対する容易な緩和を示す (Carmeliet, 1992 ; Carmeliet, 1993)。

【0232】

予測されるごとく、 CHO 細胞で発現され、 E-4031 中に浴した HERG チャンネルは、最初のテストパルスに対して最小の阻害を示した (図7A)。顕著に対照的に、 hMiRP1 で形成されたチャンネルは、天然 I_{Kr} チャンネルのように、最初のパルスに対して有意に阻害された (図7B)。 $1\text{ }\mu\text{M}$ E-4031 による最初のパルスにおける未ブロック電流の分率は、 HERG では 0.9 ± 0.1 であり、 MiRP1 および HERG で形成されたチャンネルでは 0.6 ± 0.2 であった ($n = 9$ 細胞)。

【0233】

CHO 細胞中の HERG チャンネルは、反復パルスでゆっくりと平衡に達し (図7C; 緩和は、 26 ± 9 パルスサイクルの時定数 () を持つ単一指数関数減衰

によって最良に近似された ($m = 9$ 細胞)。hMiRP1でのチャンネルのブロックは、最初の速いブロック、続いての $= 4 \pm 1$ パルスサイクルでの単一指数関数減衰として最良に記載された ($n = 7$ 細胞、図7C)。かくして、混合されたチャンネル複合体は、天然 I_{Kr} チャンネルで観察された特徴的二相ブロッキング速度を再現した (Charmeliet, 1992, Carmeliet, 1993)。

【0234】

メタンスルホンアニリドの能力は、細胞型およびイオン条件で広く変化する (SnydersおよびChaudhary, 1996; YangおよびRoden, 1996; Yangら, 1997)。他の者はE-4031によるHERGチャンネルのブロックが、卵母細胞では弱く ($K_i = 588 \text{ nM}$) (Trudeauら, 1995)、哺乳動物組織培養細胞では強い ($K_i = 7.7 \text{ nM}$) (Zhouら, 1998) ことを見出している。卵母細胞においては、本発明者らは、HERGチャンネルのE-4031ブロックが貧弱である ($K_i = 1,250 \pm 200 \text{ nM}$) ことを見出し: rMiRP1およびHERGで形成されたチャンネルはほぼ3倍より感受性であった ($K_i = 380 \pm 60$) (図5F)。CHO細胞において、HERGチャンネルはE-4031によって強力にブロックされ ($K_i = 8.8 \pm 0.8 \text{ nM}$) ; 再度、hMiRP1で形成されたチャンネルは、ほぼ二倍より感受性であった ($K_i = 4.6 \pm 0.6 \text{ nM}$) ($n = 6$ 細胞)。フェレット心筋細胞中の天然 I_{Kr} チャンネルはE-4031に対して感受性であることが判明した ($K_i = 10.3 \text{ nM}$) (Liuら, 1996)。

【0235】

実施例11

ヒトMiRP1における突然変異は不整脈と関連する

MiRP1突然変異体は心臓不整脈を引き起こすという仮説を検定するために、本発明者らは、薬物-誘導不整脈を持つ20人の患者および遺伝性または散発性不整脈を持つが、それらのKVLQT1、HERG、SCN5A、またはKCNE1 遺伝子に突然変異を持たない230人の患者のパネルをスクリーニングした。また、1,010個人の対照集団を評価した。SSCPおよびDNA配列決

定による分析は、3つの異常および1つの多形を明らかにした。

Q9E - hMiRP1。薬物 - 誘導不整脈を持つ20人の患者のうち一人は hKCNE2 のヌクレオチド + 25 において G から C へのトランスバージョンを有し、hMiRP1 の推定細胞外ドメインにおいて Q9 から E への置換を生じた。この突然変異は 1,010 人の対照個人では同定されなかった。該患者は、高血圧、インスリン非依存性糖尿病および発作の病歴を持つ 76 歳のアフリカンアメリカ人女性である。2つのベースライン心電図は、ボーダーライン延長された心拍につき修正した QT 間隔を示した (QTc = 460 ミリ秒)。心電図記録は、温めないし中程度の散在性運動低下を持つ同心性左心室肥大を明らかとしたが、心室拡張は明らかにしなかった。該患者が肺炎で入院が許可され、7 用量の静脈内エリスロマイシン (6 時間ごとに 500 mg) 治療し、次いで、経口クラリスロマイシン (12 時間ごとに 500 mg) にスイッチした。2 用量のクラリスロマイシンの後に心電図は 540 ミリ秒の QTc を示した。該患者は TdP および VF を発症し、細動除去を必要とした。その時点で、彼女は低カリウム血症であり、2.8 meq / L の血清ナトリウムレベルであった。

【0236】

M54T - hMiRP1。遺伝性または散発性不整脈を持つ 230 人の患者の一人はヌクレオチド + 161 において T から C へのトランジションを有し、予測される膜貫通セグメントにおいて T に代えての M54 の置換を引き起こした。この突然変異は 1,010 人の対照個人では同定されなかった。この患者は健康な 38 歳の白人女性である。彼女は投薬を受けていなかった。この個人はジョギングの間に VF を有した。彼女の蘇生は細動除去を必要とした。電気生理学的実験および右心室バイオプシーと共に超音波心臓動態診断および心臓カテーテルからの結果は正常であった。引き続いての心電図は、非典型的応答が機能することを示し、QT 間隔は 390 ないし 500 ミリ秒の範囲であった。自動内部細動除去器を設置した。

【0237】

I57T - hMiRP1。遺伝性または散発性不整脈を持つ 230 人の患者のうちのもう 1 人は、+ 170 において T から C へのトランジションを有し、予測

された膜貫通セグメントにおいてI57からTへの置換を引き起こした。この患者は健康な48歳のヒスパニック女性であり、TdPまたはVFの履歴は有しない。彼女の休止心電図は延長されたQT間隔を示す(QTc = 470ミリ秒)。彼女は、現在、遺伝的、臨床的および生物物理学的評価を受けている多世代家族のメンバーである。

【0238】

T8A-hMiRP1。1,202人のスクリーニングした個人のうち18人において、ヌクレオチド+22におけるAからGへの多形はMiRP1の推定細胞外ドメインにおいてT8からAへの変化を生じた。該変化はキニジン誘導不整脈を持つ1人の患者、遺伝性または散発性不整脈を持つ1人の患者および16人の対照で見出された。

【0239】

実施例12

不整脈 - 関連hMiRP1突然変異体はK⁺フラックスを減少させる

野生型hMiRP1/HERGチャネルおよびQ9E、M54T、I57TまたはT8A-hMiRP1で形成されたチャネルを、1mM Ca²⁺4mM KCl溶液を用い、CHO細胞での一過性発現によって比較した。Q9E-hMiRP1およびHERGで形成された突然変異体チャネルは、それらの定常状態不活性化および脱活性化の速度において、野生型サブユニットで形成されたものと同様であった(図8B、8D;表1)。しかしながら、この突然変異体はチャネル活性化の電圧依存性を増加させた。かくして、Q9E-hMiRP1チャネルは、半最大活性化を達成するのにより正の電位への脱分極を必要とし、野生型と比較して減少した傾き因子を有した(図8、表1)。電圧依存性の増加は与えられた脱分極工程につき開いたチャネルを生じたのは少なく、従って、K⁺フラックスを低下させた。心臓においては、減少したK⁺電流は相3再分極を遅らせると予測される。これは心臓の活動電位持続を長くし、これは、延長されたQT間隔として表面心電図に反映されている。

【0240】

M54T hMiRP1で形成された突然変異体チャネルは、それらの定常状

態不活性化において野生型と同等であった(示さず)。しかしながら、この突然変異体は、この場合には、 $V_{1/2}$ を変化させることなく活性化傾き因子を減少させることによって、活性化の電圧-依存性を増加させた(図8C;表1)。加えて、この突然変異体で形成されたチャネルは、閉鎖のスピードアップされた速度を示し、これらのチャネルは野生型hMiRP1でのそれよりもほぼ3倍速く、HERGサブユニット単独で形成されたチャネルよりも6-7倍速く脱活性化される(図8D;表1)。前記したごとく、増加した電圧-依存性の結果、与えられた電圧工程で開いたチャネルは少ない;より速い脱活性化は、突然変異体チャネルが、もしそれらが開いたとしても、野生型よりもより迅速に閉じることを示す。心臓においては、これらの両効果は K^+ 電流を減少させ、心臓の活動電位および心電図で測定したQT間隔を延長する。

また、157T-hMiRP1はMiRP1/HERGチャネル複合体を通じる K^+ フラックスを減少し、これは他の場所で詳細に考慮されるであろう(Splawskiら, 1999)。

【0241】

該T8A-hMiRP1変異体はスクリーニングした1260人の個人のうち18人から単離された。該変異体を含有するチャネルは野生型MiRP1でのものと同様であったが、それらは、活性化につき減少した電圧-依存性を示し、脱分極に際してより容易に開く(図8B、8C、8D;表1)。該変異体は不整脈を持つ2人の患者、キニジン誘導QT延長(500ミリ秒)を持つ1人の患者で見出された。キニジンは I_{Kr} チャネルを阻害することが知られているので(Rodenら, 1986)、本発明者らは、野生型またはT8A-hMiRP1で形成されたチャネルの閉鎖を比較した。2つのチャネルタイプのキニジン感受性は有意には異ならず;野生型チャネルは $0.79 \pm 0.18 \mu M$ の平衡定数(K_i)を呈し、他方、T8A-hMiRP1チャネルは $K_i = 0.84 \pm 0.10 \mu M$ を有し、ヒル係数は、各々、 1.1 ± 0.07 および 1.0 ± 0.05 であった。(n=97細胞)。

【0242】

実施例13

Q9E-hMiRP1で形成されたチャネルのクラリスロマイシンによる増加した閉鎖

クラリスロマイシン - 誘導TdPおよびVFに関連するQ9E-hMiRP1はHERGと合同して、このマクロライド抗生物質による閉鎖に対して増大した感受性を持つチャネルを形成する。野生型hMiRP1で形成されたチャネルについてのピーク外向き電流の半ブロックに導く用量は、 0.72 ± 0.18 mMであり、これはHERGのみで形成されたチャネルで測定されたものと同様である (0.75 ± 0.31 mM)。対照的に、Q9E-hMiRP1で形成されたチャネルは 0.24 ± 0.04 mMの*K_i*を呈した (図9A、9B)。閉鎖は、活性化に対する閾値に対して正の電圧でのみ観察され、プレパルス電位がより正になるにつれて増大した (図9C)。これは、開いたチャネルの閉鎖 (クラスII抗不整脈剤によるI_{Kr}チャネルの障害の基礎であると考えられるメカニズム) と合致する (Spectorら, 1996; Wangら, 1997)。しかしながら、クラリスロマイシンは、野生型およびQ9E-hMiRP1双方のチャネルにつき、 $V_{1/2}$ においてより正の電位への10mVシフトを引き起こした (傾き因子に変化はない) (図9C)。現在、クラリスロマイシン障害のメカニズムは状態依存性として最良に記載される。

【0243】

天然I_{Kr}チャネルは、低下した外部K⁺にてクラスIII剤に対して増大する感受性を示すので (WangおよびRoden, 1996)、本発明者らは、浴K⁺濃度が4から1mMに低下すると、クラリスロマイシンブロックを再評価した。溶液の変化はいずれのチャネルの活性に対する効果も有さず (表1)、クラリスロマイシンのブロッキング能力は、野生型MiRP1で形成されたチャネルおよびQ9E-hMiRP1でのもの双方につき、ほぼ20%増加した (野生型*K_i* = 0.59 ± 0.1 、Q9E-hMiRP1につき*K_i* = 0.20 ± 0.07 mM、各々、n = 6細胞、示さず)。かくして、Q9E-hMiRP1で形成されたチャネルはクラリスロマイシン閉鎖に対してより感受性であり、障害は電流間低カリウム血症によって強化される。

【0244】

実施例 1 4

K C N E 2 に対するポリクローナル抗体の創生

K C N E 2 コーディング配列のセグメントは、E . c o l i i においては融合蛋白質として発現される。過剰発現された蛋白質はゲル溶出によって精製され、これを用い、H a r l o w および L a n e (1 9 8 8) によって記載されたものと同様の手法を用いてウサギおよびマウスを免疫化する。この手法は、種々の他の蛋白質に対して抗体を生成することが示されている（例えば、K r a e m e r ら , 1 9 9 3 参照）。

【 0 2 4 5 】

簡単に述べれば、K C N E 2 コーディング配列のストレッチはプラスミド P E T 5 A (N o v a g e n , I n c . , M a d i s o n , W I) においては融合蛋白質としてクローン化される。I P T G での誘導の後、予測される分子量を持つ融合蛋白質の過剰発現を S D S / P A G E によって確認する。融合蛋白質は電気溶出によってゲルから精製される。K C N E 2 融合産物としての蛋白質の同定は、N - 末端における蛋白質配列決定によって確認される。次に、精製された蛋白質をウサギにおいて免疫原として用いる。ウサギをフロイントの完全アジュバント中の 1 0 0 μ g の蛋白質で免疫し、3 週間の間隔で 2 回ブースター注射し、最初のフロイントの完全アジュバント中 1 0 0 μ g の免疫原、続いて、P P S 中の 1 0 0 μ g の免疫原で行う。抗体含有血清は、しかる後、2 週間後に収集する。

【 0 2 4 6 】

この手法を反復して、K C N E 2 遺伝子産物の突然変異体形態に対して抗体を生じさせる。野生型 K C N E 2 に対する組合せてこれらの抗体を用いて、種々の組織および生物学的流体中で、突然変異体形態の存在および相対的レベルを検出する。

また、前記手法を用いて、K C N E 3、K C N E 4 に特異的なポリクローナル抗体を生成させる。

【 0 2 4 7 】

実施例 1 5

K C N E 2 に特異的なモノクローナル抗体の創生

以下のプロトコルに従って、モノクローナル交代を生成させる。よく知られているごとく、グルタルアルデヒドまたはEDCを用い、キーホールリンペットヘモシアニンに結合した完全なKCNE2またはKCNE2ペプチド（野生型または突然変異体）を含む免疫原でマウスを免疫化する。

【0248】

該免疫原はアジュバントと混合する。各マウスには10 100 µgの免疫原の4回の注射を与え、4回目の注射の後に、マウスから血液試料を採取して、血清が免疫原に対する抗体を含有するかを判断する。血清力価はELISAまたはRIAによって測定する。免疫原に対する抗体の存在を示す血清を持つマウスを、ハイブリドーマ生産につき選択する。

【0249】

脾臓を免疫マウスから摘出し、単一の細胞懸濁液を検出する（HarlowおよびLane参照）。KohlerおよびMilstein（1975）によって実質的に記載されているごとく細胞融合を行う。簡単に述べれば、P3.6.5.3骨髓腫細胞（American Type Culture Collection, Rockville, MD）を、HarlowおよびLane（1988）によって記載されているごとく、ポリエチレングリコールを用いて、免疫脾臓細胞と融合させる。96ウエル組織培養プレート中、 2×10^5 細胞/ウエル密度にて細胞を平板培養する。個々のウエルを増殖につき調べ、野生型または突然変異体KCNE2標的蛋白質を用いるELISAまたはRIAによって、増殖を持つウエルの上清をKCNE2特異的抗体の存在につきテストする。陽性ウエル中の細胞を増殖させ、サブクローンして、モノクローナル性を確立し、確認する。

【0250】

所望の特異性を持つクローンを増殖させ、マウスにおける腹水液として、または中空繊維系で増殖させ、特徴付けおよびアッセイ開発のために十分な量の抗体を生産する。

また、前記手法を用いて、KCNE3およびKCNE4につき特異的なモノクローナル抗体を生成させる。

【0251】

実施例16

KCNE2 についてのサンドイッチアッセイ

モノクローナル抗体をプレート、チューブ、ビードまたは粒子のごとき個体表面上に付着させる。好ましくは、抗体は90-ウエルのELISAプレートのウエル表面に付着させる。KCNE2ペプチド/蛋白質(野生型または突然変異体)を含有する100 μ lの試料(例えば、血清、尿、組織サイトゾル)を固相抗体に添加する。試料を室温にて2時間インキュベートする。次に、試料流体をデカントし、固相を緩衝液で洗浄して、未結合物質を除去する。(KCNE2ペプチド/蛋白質上の異なる決定基に対する)第2のモノクローナル抗体100 μ Lを固相に加える。この抗体をディテクター分子(例えば¹²⁵I、酵素、フルオロフォアまたはクロモフォア)で標識し、第2の抗体と共に該固相を室温にて2時間インキュベートする。第2の抗体をデカントし、固相を緩衝液で洗浄して、未結合物質を除去する。

【0252】

試料中に存在するKCNE2ペプチド/蛋白質量に比例する結合標識の量を定量する。野生型KCNE2に特異的なモノクローナル抗体ならびにKCNE2で同定された突然変異の各々に特異的なモノクローナル抗体を用いて別々のアッセイを行う。

また、前記手法を用いて、適当なKCNE3またはKCNE4抗体を用いてKCNE3およびKCNE4につきアッセイを行う。

【0253】

実施例17

KCNE2 K⁺チャネルに影響する薬物をスクリーニングするためのアッセイ

KCNE2は会合して心臓I_{Kr}カリウムチャネルを形成するという知識を持って、今や、このチャネルに対して効果を有するであろう薬物につきスクリーニングするためのアッセイを考案することができる。遺伝子KCNE2を卵母細胞または哺乳動物細胞に共トランスフェクトし、前記したごとく共発現させる。共

トランスフェクションは、野生型または特異的に突然変異させた KCNE 2 のいずれかの組合せを用いて行われる。共トランスフェクションで用いる遺伝子の1つは、LQTを引き起こす突然変異を含む場合、野生型遺伝子のみとの共トランスフェクションと比較し、誘導電流の変化が観察される。薬物候補をトランスフェクトされた細胞の浴溶液に添加し、誘導された電流に対する薬物候補の効果をテストする。それが野生型 KCNE 2 で共トランスフェクトされた細胞で観察された電流に近くなるように誘導電流を変化させる薬物候補はLQTを治療するのに有用である。

【0254】

本発明の好ましい具体例の詳細を引用して本発明をこの出願で開示してきたが、本発明の精神および添付の請求の範囲内で修飾は当業者に容易であろうと考えられるごとく、当該開示は限定する意味のものではなく、例示的であることを意図することが理解されるべきである。

【0255】

【外1】

LIST OF REFERENCES

- Altschul, S. F. et al. (1990). *J. Mol. Biol.* **215**:403-10.
- Altschul S.F. et al. (1997). *Nucl. Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Anand, R. (1992). Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press).
- Anderson, W.F. et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:5399-5403.
- Anderson, M.A. and Gussella, J.F. (1984). *In Vitro* **20**:856-858.
- Antzelevitch, C. and Sicouri, S. (1994). *J. Am. Col. Card.* **23**:259-277.
- Antzelevitch, C. et al. (1996). *J Am Coll Cardiol* **28**:1836-48.
- Attali, B. et al. (1993). *Nature* **365**:850-852.
- Attwell, D. et al. (1979). *Pflugers Arch.* **379**:137-142.
- Ausubel, F.M. et al. (1992). Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, New York, NY).
- Balser, J.R. et al. (1990). *J. Gen. Physiol.* **96**:835-863.
- Balser, J.R. et al. (1991). *Circ. Res.* **69**:519-529.
- Bandyopadhyay PK and Temin HM (1984). *Mol. Cell. Biol.* **4**:749-754.
- Barhanin J, et al. (1996). *Nature* **384**:78-80.
- Bartel PL, et al. (1993). "Using the 2-hybrid system to detect protein-protein interactions." In Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, Oxford University Press, pp. 153-179.
- Bazzett H (1920). *Heart* **7**:353-370.
- Beaucage SL and Caruthers MH (1981). *Tetra. Letts.* **22**:1859-1862.
- Berglund P, et al. (1993). *Biotechnology* **11**:916-920.
- Berkner KL, et al. (1988). *BioTechniques* **6**:616-629.
- Berkner KL (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:39-66.
- Blumenthal, E. M. and Kaczmarek, L. K. (1992). *Neurochemical Research* **17**:869-76.
- Blumenthal, E. M. and Kaczmarek, L. K. (1994). *J. Neurosci.* **14**:3097-105.
- Borman S (1996). *Chemical & Engineering News*, December 9 issue, pp. 42-43.
- Breakefield XO and Geller AI (1987). *Mol. Neurobiol.* **1**:337-371.
- Brinster RL, et al. (1981). *Cell* **27**:223-231.
- Bruggemann A, et al. (1993). *Nature* **365**:445-448.
- Buchsacher GL and Panganiban AT (1992). *J. Virol.* **66**:2731-2739.
- Buckler AJ, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4005-4009.
- Burn TC, et al. (1995). *Gene* **161**:183-187.

- Busch AE, et al (1992). *Science* **255**:1705-1707.
- Busch, A. E. et al. (1997). *Br J Pharmacol* **122**:187-9.
- Capecchi MR (1989). *Science* **244**:1288.
- Cardiac Arrhythmia Suppression Trial II Investigators (1992). *N. Engl. J. Med.* **327**:227-233.
- Cariello NF (1988). *Am. J. Human Genetics* **42**:726-734.
- Carlsson, L. et al. (1997). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**:220-7.
- Carmeliet, E. (1992). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**:809-17.
- Carmeliet, E. (1993). *Circ Res* **73**:857-68.
- Chee M, et al. (1996). *Science* **274**:610-614.
- Chen, J. et al. (1999). *Biophys. J.* **76**:A331.
- Chevray PM and Nathans DN (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5789-5793.
- Chin HM, et al. (1991). *Genomics* **11**:914-919.
- Church DM, et al. (1994). *Nat. Genet.* **6**:98-105.
- Compton J (1991). *Nature* **350**:91-92.
- Conner BJ, et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:278-282.
- Costantini F and Lacy E (1981). *Nature* **294**:92-94.
- Cotten M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4033-4037.
- Cotton RG, et al. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4397-4401.
- Covarrubias M, et al. (1991). *Neuron* **7**:763-773.
- Cui J, et al. (1994). *J. Gen. Physiol.* **104**:87-105.
- Culver KW, et al. (1992). *Science* **256**:1550-1552.
- Culver K (1996). Gene Therapy: A Primer for Physicians, 2nd Ed., Mary Ann Liebert.
- Curiel DT, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8850-8854.
- Curiel DT, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* **3**:147-154.
- Curran ME, et al. (1995). *Cell* **80**:795-804.
- Daleau, P. et al. (1995). *Circulation* **91**:3010-6.
- DeRisi J, et al. (1996). *Nat. Genet.* **14**:457-460.
- Deutscher M (1990). *Meth. Enzymology* **182**:83-89 (Academic Press, San Diego, Cal.).
- Donehower LA, et al. (1992). *Nature* **356**:215.
- Drici, M. D. et al. (1998). *JAMA* **280**:1774-6.
- Duggal P et al. (1998). *Circulation* **97**:142-146.
- Ebert, S. N. et al. (1998). *J Womens Health* **7**:547-57.

- Editorial (1996). *Nature Genetics* 14:367-370.
- Eichelbaum, M. et al. (1996). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 983-985
- Elghanian R, et al. (1997). *Science* 277:1078-1081.
- Ellenbogen, K. A. et al. (1996). *J Am Coll Cardiol* 28:130-6.
- Enhancers and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1983).
- Erickson J, et al. (1990). *Science* 249:527-533.
- Fahy E, et al. (1991). *PCR Methods Appl.* 1:25-33.
- Felgner PL, et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.
- Fields S and Song O-K (1989). *Nature* 340:245-246.
- Fiers W, et al. (1978). *Nature* 273:113-120.
- Fink DJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* 3:11-19.
- Fink DJ, et al. (1996). *Ann. Rev. Neurosci.* 19:265-287.
- Finkelstein J, et al. (1990). *Genomics* 7:167-172.
- Fodor SPA (1997). *Science* 277:393-395.
- Freese A, et al. (1990). *Biochem. Pharmacol.* 40:2189-2199.
- Friedman T (1991). In Therapy for Genetic Diseases, T. Friedman, ed., Oxford University Press, pp. 105-121.
- Gellens M, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:554-558.
- George AL, et al. (1995). *Cytogenet. Cell. Genet.* 68:67-70.
- Glover D (1985). DNA Cloning, I and II (Oxford Press).
- Goding (1986). Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed. (Academic Press, N.Y.).
- Godowski PJ, et al. (1988). *Science* 241:812-816.
- Goldstein SAN and Miller C (1991). *Neuron* 7:403-408.
- Gordon JW, et al. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7380-7384.
- Gorziglia M and Kapikian AZ (1992). *J. Virol.* 66:4407-4412.
- Graham FL and van der Eb AJ (1973). *Virology* 52:456-467.
- Green ED and Olson MV (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1213-1217.
- Grompe M (1993). *Nature Genetics* 5:111-117.
- Grompe M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5855-5892.
- Guthrie G and Fink GR (1991). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press).
- Gyapay G, et al. (1994). *Nat. Genet.* 7:246-339.

- Hacia JG, et al. (1996). *Nature Genetics* **14**:441-447.
- Harlow E and Lane D (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Hasty PK, et al. (1991). *Nature* **350**:243.
- Hausdorff SF, et al. (1991). *Biochem.* **30**:3341-3346.
- Heginbotham L, et al. (1994). *Biophys. J.* **66**:1061-1067.
- Heiseth E, et al. (1990). *J. Virol.* **64**:2416-2420.
- Ho, W. K. et al. (1998). *J Physiol (Lond)* **507**:631-8.
- Hodgson J (1991). *Bio/Technology* **9**:19-21.
- Hohnloser, S. H., and Woosley, R. L. (1994). *Sotalol. N Engl J Med* **331**:31-8.
- Howarth, F. C. et al. (1996). *Pflugers Arch* **431**:713-22.
- Huse WD, et al. (1989). *Science* **246**:1275-1281.
- Innis MA, et al. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, CA).
- Jablonski E, et al. (1986). *Nucl. Acids Res.* **14**:6115-6128.
- Jakoby WB and Pastan IH (eds.) (1979). Cell Culture. Methods in Enzymology Vol. 58 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich (NY)).
- January CT and Riddle JM (1989). *Circ. Res.* **64**:977-990.
- Jervell A and Lange-Nielsen F (1957). *Am. Heart J.* **54**:59-68.
- Jiang C, et al. (1994). *Nat. Genet.* **8**:141-147.
- Johnson PA, et al. (1992). *J. Virol.* **66**:2952-2965.
- Johnson, et al. (1993). "Peptide Turn Mimetics" in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., eds., Chapman and Hall, New York.
- Kaczmarek, L. K., and Blumenthal, E. M. (1997). *Physiol Rev* **77**:627-41.
- Kaneda Y, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**:12126-12129.
- Kanehisa M (1984). *Nucl. Acids Res.* **12**:203-213.
- Kannel WB, et al. (1987). *Am. Heart J.* **113**:799-804.
- Katapadi, K. et al. (1997). *Angiology* **48**:821-6.
- Keating MT, et al. (1991a). *Science* **252**:704-706.
- Keating MT, et al. (1991b). *Am. J. Hum. Genet.* **49**:1335-1339.
- Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996). *Curr Opin Genet Dev* **6**:326-33.
- Kinszler KW, et al. (1991). *Science* **251**:1366-1370.
- Kohler G and Milstein C (1975). *Nature* **256**:495-497.

- Kraemer FB, et al. (1993). *J. Lipid Res.* **34**:663-672.
- Kubo T, et al. (1988). *FEBS Lett.* **241**:119.
- Kundu, S., et al. (1997). *Ann Emerg Med* **30**:542-4.
- Kwiatkowski TJ, et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* **18**:7191-7192.
- Kyte J and Doolittle RF (1982). *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Landegren U, et al. (1988). *Science* **242**:229-237.
- Lathrop, GM, et al. (1985). *Am. J. Hum. Genet.* **37**:482-498.
- Lee JE, et al. (1995). *Science* **268**:836-844.
- Lee, K. L. et al. (1998). *Am J Med* **104**:395-6.
- Lees-Miller, J. P. et al. (1997). *Circ Res* **81**:719-26.
- Lesage F, et al. (1993). *Receptors and Channels* **1**:143-152.
- Li G-R, et al. (1996). *Circ. Res.* **78**:689-696.
- Lim CS, et al. (1991). *Circulation* **83**:2007-2011.
- Linder, M. W. et al. (1997). *Clin. Chem.* **43**:254-266.
- Lipshutz RJ, et al. (1995). *BioTechniques* **19**:442-447.
- Liu DW and Antzelevitch C (1995). *Circ. Res.* **76**:351-365.
- Liu, S. et al. (1996). *Biophys J* **70**, 2704-15.
- Lockhart DJ, et al. (1996). *Nature Biotechnology* **14**:1675-1680.
- London, B. et al. (1997). *Circ Res* **81**:870-8.
- MacKinnon R (1991). *Nature* **350**:232-235.
- MacKinnon R, et al. (1993). *Science* **262**:757-759.
- Madzak C, et al. (1992). *J. Gen. Virol.* **73**:1533-1536.
- Magovcevic I, et al. (1992). *Genomics* **12**:125-129.
- Makkar, R. R. et al. (1993). *JAMA* **270**:2590-7.
- Maniatis T, et al. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Mann R and Baltimore D (1985). *J. Virol.* **54**:401-407.
- Marchuk D, et al. (1991). *Nucl. Acids Res.* **19**:1154.
- Margolskee RF (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:67-95.
- Martin R, et al. (1990). *BioTechniques* **9**:762-768.
- Matsuura H, et al. (1987). *Pflugers Arch.* **410**:596-603.
- Matteucci MD and Caruthers MH (1981). *J. Am. Chem. Soc.* **103**:3185.

- Matthews JA and Kricka LJ (1988). *Anal. Biochem.* **169**:1.
- McDonald, T. V. et al. (1997). *Nature* **388**:289-92.
- Merrifield B (1963). *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2156.
- Metzger D, et al. (1988). *Nature* **334**:31-36.
- Mifflin TE (1989). *Clinical Chem.* **35**:1819-1825.
- Miller AD (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:1-24.
- Miller AD, et al. (1985). *Mol. Cell. Biol.* **5**:431-437.
- Miller AD, et al. (1988). *J. Virol.* **62**:4337-4345.
- Modrich P (1991). *Ann. Rev. Genet.* **25**:229-253.
- Mombaerts P, et al. (1992). *Cell* **68**:869.
- Moss AJ and McDonald J (1971). *N. Engl. J. Med.* **285**:903-904.
- Moss AJ, et al. (1991). *Circulation* **84**:1136-1144.
- Moss B (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:25-38.
- Moss B (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11341-11348.
- Muzyczka N (1992). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:97-129.
- Nabel EG, et al. (1990). *Science* **249**:1285-1288.
- Nabel (1992). *Hum. Gene Ther.* **3**:399-410.
- Naldini L, et al. (1996). *Science* **272**:263-267.
- Newton CR, et al. (1989). *Nucl. Acids Res.* **17**:2503-2516.
- Neyroud N, et al. (1997). *Nat. Genet.* **15**:186-189.
- Nguyen Q, et al. (1992). *BioTechniques* **13**:116-123.
- Novack DF, et al. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:586-590.
- Ochman H, et al. (1988). *Genetics* **120**:621-623.
- Ohi S, et al. (1990). *Gene* **89**:279-282.
- Orita M, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2766-2770.
- Page KA, et al. (1990). *J. Virol.* **64**:5270-5276.
- Pellicer A, et al. (1980). *Science* **209**:1414-1422.
- Petropoulos CJ, et al. (1992). *J. Virol.* **66**:3391-3397.
- Philpott KL, et al. (1992). *Science* **256**:1448.
- Pongs O, et al. (1988). *EMBO J.* **7**:1087-1095.
- Quantin B, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2581-2584.
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 18th Ed (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

- Rettig J, et al. (1994). *Nature* **369**:289-294.
- Rigby P'VJ, et al. (1977). *J. Mol. Biol.* **113**:237-251.
- Roden, D. M. (1998). *Pace-Pacing and Clinical Electrophysiology* **21**:1029-1034.
- Roden, D. M. et al. (1986). *Am Heart J* **111**:1088-93.
- Romano C (1965). *Lancet* **I**658-659.
- Romano C, et al. (1963). *Clin. Pediatr.* **45**:656-683.
- Rosenfeld MA, et al. (1992). *Cell* **68**:143-155.
- Ruano G and Kidd KK (1989). *Nucl. Acids Res.* **17**:8392.
- Russell MW, et al. (1995). *Am. J. Hum. Genet.* **57**:503-507.
- Russell D and Hirata R (1998). *Nature Genetics* **18**:323-328.
- Sambrook J, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Sanguinetti MC and Jurkiewicz NK (1990). *J. Gen. Physiol.* **96**:195-215.
- Sanguinetti, M. C., and Jurkiewicz, N. K. (1992). *Pflugers Archiv* **420**:180-6.
- Sanguinetti MC, et al. (1995). *Cell* **81**:299-307.
- Sanguinetti MC, et al. (1996a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2208-2212.
- Sanguinetti MC, et al. (1996b). *Nature* **384**:80-83.
- Scamps, F., and Carmeliet, E. (1989). *Am J Physiol* **257**:C1086-92.
- Scharf SJ, et al. (1986). *Science* **233**:1076-1078.
- Schneider G, et al. (1998). *Nature Genetics* **18**:180-183.
- Schott J, et al (1995). *Am. J. Hum. Genet.* **57**:1114-1122.
- Schultze-Bahr E, et al. (1997). *Nat. Genet.* **17**:267-268.
- Schwartz PJ, et al. (1975). *Am. Heart J.* **109**:378-390.
- Schwartz PJ, et al. (1994). "The long QT syndrome." In Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside. D. P. Zipes and J. Jalife eds. (W.B. Sanders Company) pp.788-811.
- Scopes R (1982). Protein Purification: Principles and Practice, (Springer-Verlag, NY).
- Seino S, et al. (1992). *Genomics* **13**:1375-1377.
- Sesti, F., and Goldstein, S. A. N. (1998). *J. Gen. Phys.* **112**:651-64.
- Sheffield VC, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:232-236.
- Sheffield VC, et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* **49**:699-706.
- Shenk TE, et al. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:989-993.
- Shi G, et al. (1996). *Neuron* **16**:843-852.

- Shibasaki, T. (1987). *J Physiol* **387**:227-250.
- Shimada T, et al. (1991). *J. Clin. Invest.* **88**:1043-1047.
- Shinkai Y, et al. (1992). *Cell* **68**:855.
- Shoemaker DD, et al. (1996). *Nature Genetics* **14**:450-456.
- Smith PL, et al. (1996). *Nature* **379**:833-836.
- Snouwaert JN, et al. (1992). *Science* **257**:1083.
- Snyders, D. J., and Chaudhary, A. (1996). *Mol Pharmacol* **49**:949-55.
- Sorge J, et al. (1984). *Mol. Cell. Biol.* **4**:1730-1737.
- Spargo CA, et al. (1996). *Mol. Cell. Probes* **10**:247-256.
- Spector, P. S. et al. (1996). *Circ Res* **78**:499-503.
- Spector PS, et al. (1996). *J. Gen. Physiol.* **107**:611-619.
- Splawski I, et al. (1997a). *N. Engl. J. Med.* **336**:1562-1567.
- Splawski I, et al. (1997b). *Nat. Genet.* **17**:338-340.
- Splawski, I. et al. (1998). *Genomics* **51**:86-97.
- Sternberg N (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:103-107.
- Stewart MJ, et al. (1992). *Hum. Gene Ther.* **3**:267-275.
- Stratford-Perricaudet LD, et al. (1990). *Hum. Gene Ther.* **1**:241-256.
- Surawicz B (1989). *J. Am. Coll. Cardiol.* **14**:172-184.
- Swanson R, et al. (1993). *Seminars in the Neurosciences* **5**:117-124.
- Tai, K.-K. et al. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**:1654-1658.
- Tai, K. K., and Goldstein, S.A.N. (1998). *Nature* **391**:605-608.
- Takumi T, et al. (1988). *Science* **242**:1042-1045.
- Takumi T, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**:22192-22198.
- Tanigami A, et al. (1992). *Am. J. Hum. Genet.* **50**:56-64.
- Tokino T, et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* **48**:258-268.
- Tyson J, et al. (1997). *Hum. Mol. Genet.* **6**:2179-2185.
- Valancius J and Smithies O (1991). *Mol. Cell Biol.* **11**:1402.
- Veldkamp, M. W. et al. (1995). *Circulation* **92**:3497-504.
- Vetter DE, et al. (1996). *Neuron* **17**:1251-1264.
- Vincent GM, et al. (1992). *N. Engl. J. Med.* **327**:846-852.
- Wagner E, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4255-4259.
- Wagner E, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3410-3414.

- Walker GT, et al., (1992). *Nucl. Acids Res.* **20**:1691-1696.
- Wang KW and Goldstein SA (1995). *Neuron* **14**:1303-1309.
- Wang KW, et al. (1996). *Neuron* **16**:571-577.
- Wang CY and Huang L (1989). *Biochemistry* **28**:9508-9514.
- Wang Q and Keating MT (1994). *BioTechniques* **17**:282-284.
- Wang Q, et al. (1995a). *Cell* **80**:805-811.
- Wang Q, et al. (1995b). *Hum. Mol. Genet.* **4**:1603-1607.
- Wang Q, et al. (1996). *Nat. Genet.* **12**:17-23.
- Wang, S. et al. (1997). *J Physiol* **502**:45-60.
- Wang, S. et al. (1997). *FEBS Lett* **417**:43-7.
- Ward OC (1964). *J. Ir. Med. Assoc.* **54**:103-106.
- Warmke JE and Ganetzky B (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:3438-3442.
- Wartell RM, et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* **18**:2699-2705.
- Weinstein LS et al. (1988). *FEBS Letters* **232**:333-340.
- Wells JA (1991). *Methods Enzymol.* **202**:390-411.
- Wetmur JG and Davidson N (1968). *J. Mol. Biol.* **31**:349-370.
- White MB, et al. (1992). *Genomics* **12**:301-306.
- White R and Lalouel JM (1988). *Annu. Rev. Genet.* **22**:259-279.
- Wilkinson GW and Akrigg A (1992). *Nucleic Acids Res.* **20**:2233-2239.
- Willich SN, et al. (1987). *Am. J. Cardiol.* **60**:801-806.
- Wolff JA, et al. (1990). *Science* **247**:1465-1468.
- Wolff JA, et al. (1991). *BioTechniques* **11**:474-485.
- Wollnik, B. et al. (1997). *Hum Mol Genet* **6**:1943-9.
- Woosley, R. L. et al. (1993). *JAMA* **269**:1532-6.
- Wu DY and Wallace RB (1989). *Genomics* **4**:560-569.
- Wu CH, et al. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**:16985-16987.
- Wu GY, et al. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**:14338-14342.
- Wymore RS, et al. (1994). *Genomics* **20**:191202.
- Yang, T., and Roden, D. M. (1996). *Circulation* **93**:407-11.
- Yang, T. et al. (1994). *Circ Res* **75**:870-8.
- Yang, T. et al. (1997). *Circ Res* **80**:782-9.
- Yang WP, et al. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:4017-4021.

- Yang, Y., and Sigworth, F. (1998). *J. Gen. Physiol.* **112**:665-678.
- Zenke M, et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3655-3659.
- Zhou, Z. et al. (1998). *Biophys J* **74**:230-41.
- Zipes DP (1987). *Am. J. Cardiol.* **59**:26E-31E.
- Zou, A. et al. (1997). *Am J Physiol* **272**:H1309-14.

Patents and Published Patent Applications

- European Patent Application Publication No. 0332435.
- EPO Publication No. 225,807.
- Hitzeman et al., EP 73,675A.
- EP 425,731A.
- WO 84/03564.
- WO 90/07936.
- WO 92/19195.
- WO 93/07282.
- WO 94/25503.
- WO 95/01203.
- WO 95/05452.
- WO 96/02286.
- WO 96/02646.
- WO 96/11598.
- WO 96/40871.
- WO 96/40959.
- WO 97/02048.
- WO 97/12635.
- U.S. Patent 3,817,837.
- U.S. Patent 3,850,752.
- U.S. Patent 3,939,350.
- U.S. Patent 3,996,345.
- U.S. Patent 4,275,149.
- U.S. Patent 4,277,437.
- U.S. Patent 4,366,241.

U.S. Patent 4,376,110.

U.S. Patent 4,486,530.

U.S. Patent 4,554,101.

U.S. Patent 4,683,195.

U.S. Patent 4,683,202.

U.S. Patent 4,816,567.

U.S. Patent 4,868,105.

U.S. Patent 5,252,479.

U.S. Patent 5,270,184.

U.S. Patent 5,409,818.

U.S. Patent 5,436,146.

U.S. Patent 5,455,166.

U.S. Patent 5,550,050.

U.S. Patent 5,691,198.

U.S. Patent 5,735,500.

U.S. Patent 5,747,469.

U.S. Patent 5,846,710.

U.S. Patent 5,856,092.

U.S. Patent 5,888,819.

U.S. Patent 6,004,744.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott, Geoffrey W.
 Sesti, Federico
 Splawski, Igor
 Keating, Mark T.
 Goldstein, Steve A.N.
 University of Utah Research Foundation
 Yale University

<120> MinK-Related Genes, Formation of Potassium Channels and
 Association with Cardiac Arrhythmia

<130> KCNE2 et al.

<140>
 <141>

<150> US 60/129,404
 <151> 1999-04-15

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (74)..(442)

<400> 1
 caaatccaga aaagatccgt tttcctaacc ttgttcgcct attttattat ttaaattgca 60
 gcaggaggga agc atg tct act tta tcc aat ttc aca cag acg ctg gaa 109
 Met Ser Thr Leu Ser Asn Phe Thr Gln Thr Leu Glu
 1 5 10
 gac gtc ttc cga agg att ttt att act tat atg gac aat tgg cgc cag 157
 Asp Val Phe Arg Arg Ile Phe Ile Thr Tyr Met Asp Asn Trp Arg Gln
 15 20 25
 aac aca aca gct gag caa gag gcc ctc caa gcc aaa gtt gat gct gag 205
 Asn Thr Thr Ala Glu Gln Glu Ala Leu Gln Ala Lys Val Asp Ala Glu
 30 35 40
 aac ttc tac tat gtc atc ctg tac ctc atg gtg atg att gga atg ttc 253
 Asn Phe Tyr Tyr Val Ile Leu Tyr Leu Met Val Met Ile Gly Met Phe
 45 50 55 60
 tct ttc atc atc gtg gcc atc ctg gtg agc act gtg aaa tcc aag aga 301
 Ser Phe Ile Ile Val Ala Ile Leu Val Ser Thr Val Lys Ser Lys Arg
 65 70 75
 cgg gaa cac tcc aat gac ccc tac cac cag tac att gta gag gac tgg 349
 Arg Glu His Ser Asn Asp Pro Tyr His Gln Tyr Ile Val Glu Asp Trp
 80 85 90
 cag gaa aag tac aag agc caa atc ttg aat cta gaa gaa tcg aag gcc 397
 Gln Glu Lys Tyr Lys Ser Gln Ile Leu Asn Leu Glu Glu Ser Lys Ala
 95 100 105

acc atc cat gag aac att ggt gcg gct ggg ttc aaa atg tcc ccc 442
 Thr Ile His Glu Asn Ile Gly Ala Ala Gly Phe Lys Met Ser Pro
 110 115 120

tgataagggga gaaaggcacc aagctaacat ctgacgtcca gacatgaaga gatgccagtg 502
 ccacgaggca aatccaaatt gtctttgctt agaagaaagt gagttccttg ctctttggtg 562
 agaattttca tggagattat gtggttgccc aataaagata gatgacattt caatctcagt 622
 gatttatgct tgcttggttg agcaatattt tgtgctgaag acctctttta ctttccgggc 682
 aagtgaatgt cattttaatc aatatcaatg atgaaaataa agccaaattt 732

<210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ser Thr Leu Ser Asn Phe Thr Gln Thr Leu Glu Asp Val Phe Arg
 1 5 10 15
 Arg Ile Phe Ile Thr Tyr Met Asp Asn Trp Arg Gln Asn Thr Thr Ala
 20 25 30
 Glu Gln Glu Ala Leu Gln Ala Lys Val Asp Ala Glu Asn Phe Tyr Tyr
 35 40 45
 Val Ile Leu Tyr Leu Met Val Met Ile Gly Met Phe Ser Phe Ile Ile
 50 55 60
 Val Ala Ile Leu Val Ser Thr Val Lys Ser Lys Arg Arg Glu His Ser
 65 70 75 80
 Asn Asp Pro Tyr His Gln Tyr Ile Val Glu Asp Trp Gln Glu Lys Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Gln Ile Leu Asn Leu Glu Glu Ser Lys Ala Thr Ile His Glu
 100 105 110
 Asn Ile Gly Ala Ala Gly Phe Lys Met Ser Pro
 115 120

<210> 3
 <211> 468
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (35)..(403)

<400> 3
 cctgtgagga atctctcctc ctcaaggggg aaac atg acc act tta gcc aac ttg 55
 Met Thr Thr Leu Ala Asn Leu
 1 5

acg cag acc ctg gag gat gcc ttc aaa aag gtt ttc att act tat atg 103
 Thr Gln Thr Leu Glu Asp Ala Phe Lys Lys Val Phe Ile Thr Tyr Met
 10 15 20

gac agc tgg agg agg aac aca aca gcc gaa caa cag gcg ctc cag gcc 151
 Asp Ser Trp Arg Arg Asn Thr Thr Ala Glu Gln Gln Ala Leu Gln Ala
 25 30 35

aga gtg gat gcc gag aac ttc tac tac gtc atc ctg tac ctc atg gtg 199
 Arg Val Asp Ala Glu Asn Phe Tyr Tyr Val Ile Leu Tyr Leu Met Val
 40 45 50 55

atg atc ggc atg ttc gcc ttc atc gtg gtg gcc atc ctg gtg agc acg 247
 Met Ile Gly Met Phe Ala Phe Ile Val Val Ala Ile Leu Val Ser Thr
 60 65 70

gtg aag tcc aag cgg cgg gag cac tcc cag gac ccg tac cac cag tac 295
 Val Lys Ser Lys Arg Arg Glu His Ser Gln Asp Pro Tyr His Gln Tyr
 75 80 85

atc gtg gag gat tgg cag cag aag tat agg agt cag atc ttg cat ctg 343
 Ile Val Glu Asp Trp Gln Gln Lys Tyr Arg Ser Gln Ile Leu His Leu
 90 95 100

gaa gac tcc aag gcc acc atc cat gag aac ctg ggg gcg acg ggg ttc 391
 Glu Asp Ser Lys Ala Thr Ile His Glu Asn Leu Gly Ala Thr Gly Phe
 105 110 115

aca gtg tca ccc tgataaagaa cgagagtcca tctgcccagg aaggggtgct 443
 Thr Val Ser Pro
 120

tctgcccact tgaagcccca ctgac 468

<210> 4
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4
 Met Thr Thr Leu Ala Asn Leu Thr Gln Thr Leu Glu Asp Ala Phe Lys
 1 5 10 15
 Lys Val Phe Ile Thr Tyr Met Asp Ser Trp Arg Arg Asn Thr Thr Ala
 20 25 30
 Glu Gln Gln Ala Leu Gln Ala Arg Val Asp Ala Glu Asn Phe Tyr Tyr
 35 40 45
 Val Ile Leu Tyr Leu Met Val Met Ile Gly Met Phe Ala Phe Ile Val
 50 55 60
 Val Ala Ile Leu Val Ser Thr Val Lys Ser Lys Arg Arg Glu His Ser
 65 70 75 80
 Gln Asp Pro Tyr His Gln Tyr Ile Val Glu Asp Trp Gln Gln Lys Tyr
 85 90 95
 Arg Ser Gln Ile Leu His Leu Glu Asp Ser Lys Ala Thr Ile His Glu
 100 105 110
 Asn Leu Gly Ala Thr Gly Phe Thr Val Ser Pro
 115 120

Met Phe Leu Phe Ala Val Thr Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile
 85 90 95
 Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
 100

<210> 7
 <211> 972
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (241)..(549)

<400> 7
 atcctggaaa cttgataatc aatgactctc taggagttgg aaatccgggg actcaaggaa 60
 gagaaacaaa acaccagtgt ttctgtctgt gccattttgg aaccaagaga tgcacottgc 120
 aaggaactga ggggttgg gacatccaag aagagatcct caaagatgtc tcagagccag 180
 cagagtctct gaactgtttg atcacattcc agctcttccc atacctcaat atctgttgc 240
 atg gag act tcc aac ggg act gag acc tgg tac atg agc ctc cat gct 288
 Met Glu Thr Ser Asn Gly Thr Glu Thr Trp Tyr Met Ser Leu His Ala
 1 5 10 15
 gtg ctg aag gct ctg aac aca acc ctt cac agt cac ttg ctc tgc cgg 336
 Val Leu Lys Ala Leu Asn Thr Thr Leu His Ser His Leu Leu Cys Arg
 20 25 30
 cct ggg cca gga cca ggg cca gac aat caa act gag gat cgt cgg gct 384
 Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Asp Asn Gln Thr Glu Asp Arg Arg Ala
 35 40 45
 agc ctt cct ggt cgt aat gac aac tcc tac atg tat att ctc ttt gtc 432
 Ser Leu Pro Gly Arg Asn Asp Asn Ser Tyr Met Tyr Ile Leu Phe Val
 50 55 60
 atg ttc cta ttt gcc gtc act gtg ggc agt ctc atc ctg gga tat acc 480
 Met Phe Leu Phe Ala Val Thr Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 cgt tca cgc aaa gtg gac aaa cgt agt gac ccc tat cat gtg tac atc 528
 Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile
 85 90 95
 aag aac cgt gtg tct atg atc tgatgtgagg aacctgaaga caatggaaga 579
 Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
 100
 ttacaatgtc tgaggattgt cttctgtgct ctcoggaact caactcaacc atatcaagcc 639
 acagtgtatc tatgtaagat caacagggaa ctggttaagag gattaggtca ttattaggac 699
 cagagaagag ggactgatag gccagctott gtggatgaga catttttoga gacacagatg 759
 cgcattataa actcagagcc catgaacaca tatatataaa gtatggacaa ccagcaagta 819

gaagaggaag ctgtggcgaa gggaaatggg gcagaaagat gctctggata tataatcttt 879
 taatgtatga ttttcaacat gagaaacctt gataaaactg agaatgctac ttaaaaaaaaa 939
 aaaaaaaaaa aaaaaaatTT cgcggccgc aag 972

<210> 8
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Met Glu Thr Ser Asn Gly Thr Glu Thr Trp Tyr Met Ser Leu His Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Lys Ala Leu Asn Thr Thr Leu His Ser His Leu Leu Cys Arg
 20 25 30
 Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Asp Asn Gln Thr Glu Asp Arg Arg Ala
 35 40 45
 Ser Leu Pro Gly Arg Asn Asp Asn Ser Tyr Met Tyr Ile Leu Phe Val
 50 55 60
 Met Phe Leu Phe Ala Val Thr Val Gly Ser Leu Ile Leu Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 Arg Ser Arg Lys Val Asp Lys Arg Ser Asp Pro Tyr His Val Tyr Ile
 85 90 95
 Lys Asn Arg Val Ser Met Ile
 100

<210> 9
 <211> 1932
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (604)..(1113)

<400> 9
 gaaccctctt ggactggagc atttgggaat tcaaaacttg ggacaaactg tcagccttgg 60
 taagtcagca aggctacact ttgctttcag aaacatttaa aagagggaca tttttgcca 120
 ttaatagatg aatTTTTTtT ctttatttTt ttctgtcttt tttttgttct aaggaaacat 180
 tgttttgaat ttaaaatagt ttggTTTTgT aaacacaatg taaactttgt ttctgctcag 240
 ttaaaatacy ttTcccagtt ttaaagatac tatttactgt atgctcctgt cttacattga 300
 tttttttttt aatcaaagta atactgctca ctacaaacag gacaaatgtg taaactaaaa 360
 aaaaaaaaaa agtcttcttT acttttccca gtgaacottc cgggcttctT ctccogtgca 420
 ctccaagccc tcatagetca ctcttgtcag ctgTTTTggt tatgctattt ctttcatgca 480
 cttttaagct tttttggtat tgcagttcca caaacctcgt gotccccac ctccotggcc 540
 caggacctgg gggagagtct aacctgcggc tttttcccag cccctgctgt ggaggcagcc 600

taagagatga tcttctatctt tgaccttttg tctaacttat gaccttgaac tctgacctgt 1793
gacctgacg catcacatga tggcatgacg ttctttggat cagaagagct tccccagaat 1853
ctaacctgca ctccccgatgg tggttcagga gactcttctct gatctttcta gaaggggtaa 1913
agtgggggttg aacaaggcc 1932

<210> 10
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 11
<211> 2499
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (86)..(595)

<400> 11
aacatcctca gatttggcgc tttaagagtt ccacacttgg gacaaactgt cagcttttga 60
tccgggtgt gtgagcggca attca atg ctg agg atg gag cct ctg aac agc 112
Met Leu Arg Met Glu Pro Leu Asn Ser
1 5

aca tac ccc agc gct gca gcc tcc agc agc ccc ctc gag tcc cat gtg 160
 Thr Tyr Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ser His Val
 10 15 20 25
 cct agt aac agc agt ggt aat ggc aat gaa tac ttc tat att ttg gtc 208
 Pro Ser Asn Ser Ser Gly Asn Gly Asn Glu Tyr Phe Tyr Ile Leu Val
 30 35 40
 gtt atg tcc ttc tat ggc gtt ttc ctg atc gga atc atg ctg ggc tac 256
 Val Met Ser Phe Tyr Gly Val Phe Leu Ile Gly Ile Met Leu Gly Tyr
 45 50 55
 atg aaa tcc aag agg cgg gag aag aag tcc agc ctt ctg ctg ttg tac 304
 Met Lys Ser Lys Arg Arg Glu Lys Lys Ser Ser Leu Leu Leu Leu Tyr
 60 65 70
 aaa gac gag gag agg ctg tgg ggg gag gct atg aag ccg cta cct atg 352
 Lys Asp Glu Glu Arg Leu Trp Gly Glu Ala Met Lys Pro Leu Pro Met
 75 80 85
 atg tcc ggc ttg agg tca ggg cag gtg ccc atg atg ctg aat atg ctg 400
 Met Ser Gly Leu Arg Ser Gly Gln Val Pro Met Met Leu Asn Met Leu
 90 95 100 105
 cag gag agt gtg gcg ccg gca ctg tcc tgc act ctt tgc tcg atg gaa 448
 Gln Glu Ser Val Ala Pro Ala Leu Ser Cys Thr Leu Cys Ser Met Glu
 110 115 120
 ggg gac agt gtg agc tcc gag tcc tcc tct cct gat gtg cac ctt ccc 496
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Glu Ser Ser Ser Pro Asp Val His Leu Pro
 125 130 135
 atc cag gag gag ggg gct gat gac gag ctg gag gag acc tcc gag acg 544
 Ile Gln Glu Glu Gly Ala Asp Asp Glu Leu Glu Glu Thr Ser Glu Thr
 140 145 150
 cct ctc aac gac agc agt gaa ggc tct tcc gag aac atc cac cag aat 592
 Pro Leu Asn Asp Ser Ser Glu Gly Ser Ser Glu Asn Ile His Gln Asn
 155 160 165
 tcc tagcaccac caggtgctag gaggtagctc cgtaagctac acttgacaga 645
 Ser
 170
 gggaagacac ttgccaagtg cggggtttcg cttttgctct gcggctgcc aattgaacag 705
 actgagggca agctcAAAA tggggcaggg agagacaagg ctgagctgca gtccttgagg 765
 ttctgtgagg actcatctct gaaaaagtcc cagagacata cagcatgacc attgactctg 825
 gggcctgggt ggtggtgggt ctgtggtcag catctggctg gataatgtgg tgttttttca 885
 ctggaggccc tgggtaactt ctgcagcctc tgtctgtgcc cagggtgac aactgcccag 945
 ggcaggctga aggactcgtt togatttgct aattttccta gagctttggt cttctagatc 1005
 tgatgggctg taagtatctt taatgtgtgc ctgtggcatt cgattagaga cagttatata 1065
 tttcacttgg aggtgggaga aagctgaaga gagaaccag attgtttgca caatgcaaag 1125
 ggagaaggta attcgtacac atgtctgaat tagctgggag tataagctat gacctcatct 1185
 gagcttttgt ctcacctgtg agcttgaact ctacagcatt gcaggtgagc atggctttct 1245

ttgccagtca gcttcctcat aaccaagcct gcattcggga tggctgttca tgggtgctct 1305
 cctgaccttc acagattggg taatgggtgg gttatacaag gccaaatcat tgacagctct 1365
 gctgcagctc tttttccag cctagttttc tgaggccaga aaggacacat gtgggcctca 1425
 taatatgggg ttttgtcac tagctggacc ctggaagggc atacttaggc gagatcgagc 1485
 agagctgggg ttcaagcaat gtgcttctgt gtctgagccc tgacactcat tcaactgtgag 1545
 gttctgggca tgtcatcaca agattctgcc tacatgaggc tctgaggct gtgcagcccc 1605
 agggggctgg gaggacatct ttagactttg tactgtgtga taaatcctcc acagcctggt 1665
 gtgaggaagt ttggagcaag tatttcccct ttggccgctt agtctggaga aagatgtgtt 1725
 gacttaaaga cacagttgga gactttggat atgtgtagct ggggaattcg aggctggatc 1785
 atcggccttc cttactgtgg ctttcccagg atgcgactga agaagctggc agcatagttt 1845
 cctctgcaga gtcgtgtgga tgggaggtat ttaacacacc caaccgaggg aaagagaaat 1905
 ttaaagggag ctactcaaga gctttgcagc aggctcttgt gcccttagaa gaccagaag 1965
 aagcagaaaa ctccccaaag gtcaagtttg cctctagtgc aaaaccttct taatttttat 2025
 ttatctgaac tctccctgga ttgagacaga gcagtcacta atgtcccat gaggggttaa 2085
 cactataagg agctgttttt ttcaatcagt tttgacacag agatagaaag gtaatttatg 2145
 ttagaggcgg aaaggggccc tctgttcaact ttaagattca gagtgtggat caactccaaa 2205
 gggggccgtt taagttgaaa gaagccaagt taagtttggc ctcgtgcctg gaatcacttg 2265
 aattctgaaa ctttactgcg acagacatgt gcgttgtcac attttccatt gcttaatcct 2325
 ggtttgggtc aagtctgtct gcgectgtta caaagtgatg tatatacttc cttccagtat 2385
 gctgagttgt agacaattgt ctgggtgtatt taatggtttg taattttcac gatatttttt 2445
 aatttaata aacacatfff cgatatgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatt 2499

<210> 12

<211> 170

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Leu Arg Met Glu Pro Leu Asn Ser Thr Tyr Pro Ser Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Pro Leu Glu Ser His Val Pro Ser Asn Ser Ser Gly Asn
 20 25 30

Gly Asn Glu Tyr Phe Tyr Ile Leu Val Val Met Ser Phe Tyr Gly Val
 35 40 45

Phe Leu Ile Gly Ile Met Leu Gly Tyr Met Lys Ser Lys Arg Arg Glu
 50 55 60

Lys Lys Ser Ser Leu Leu Leu Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Leu Trp
 65 70 75 80

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for mutation screening

<400> 16
gttcccgtct cttggatttc a 21

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for mutation screening

<400> 17
aatgttctct ttcacatcgc tg 22

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for mutation screening

<400> 18
tgtctggacg tcagatgtta g 21

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:HA residues for epitope mapping

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (10)
<223> Xaa represents encoded stop codon.

<400> 19
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Xaa
1 5 10

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:cmv residues for epitope-mapping

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (15)

<223> Xaa represents encoded stop codon.

<400> 20
Ile Ser Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Xaa
1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A~1Cは、MiRP1が心臓中で発現され、MinKに関連することを示す。

【図2】 図2A~Fは、rMiRP1がイオンチャネルサブユニットであることを示す。

【図3】 図3A~3Cは、単一のrMiRP1/HERGチャネル(白抜き四角)が天然 I_{Kr} チャネルに対するコンダクタンスにおいて類似するが、HERGチャネル(黒塗り四角)は類似しないことを示す。

【図4】 図4A~4Bは、単一rMiRP1+HERGチャネルは、HERGチャネルよりも速く脱活性化することを示す。

【図5】 図5A~5Fは、 K^+ によるそれらの調節および脱活性化速度において、rMiRP1/HERGチャネル(白抜き四角)は天然 I_{Kr} と同様であるが、HERGチャネル(黒塗り四角)は同様でないことを示す。

【図6】 図6A~6Bは、rMiRPおよびHERGは安定な複合体を形成することを示す。

【図7】 図7A~7Cは、hMiRP1およびHERGで形成されたチャネル(HERG単独で形成されたものではない)が二相キネティクスでE-4031によりブロックされることを示す。

【図8】 図8A~8Dは、野生型または不整脈関連hMiRP1サブユニットでのチャネル機能を示す。

【図9】 図9A~9Cは、Q9E-hMiRP1がクラリスロマイシン-誘導不整脈および増大した薬物感受性に関連することを示す。

【图1A - 1B】

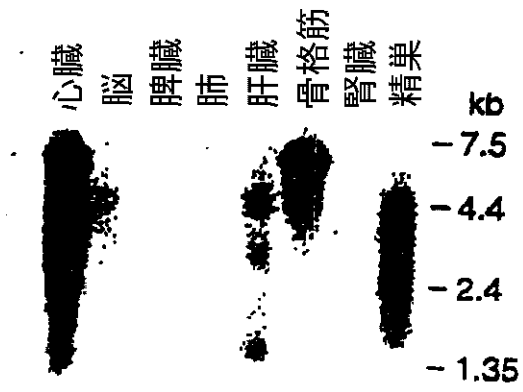


FIG. 1A



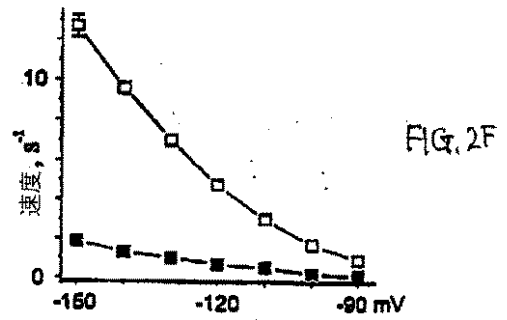
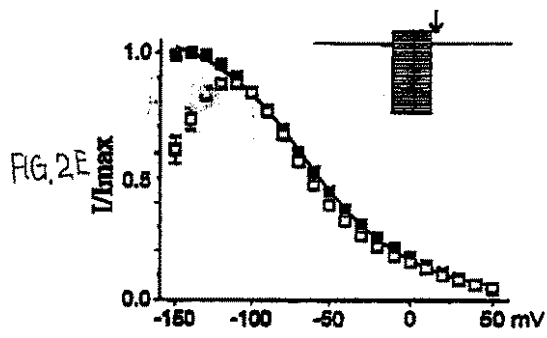
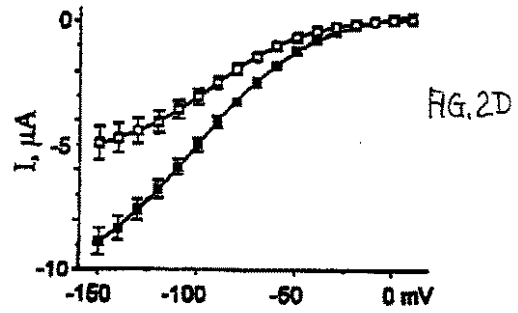
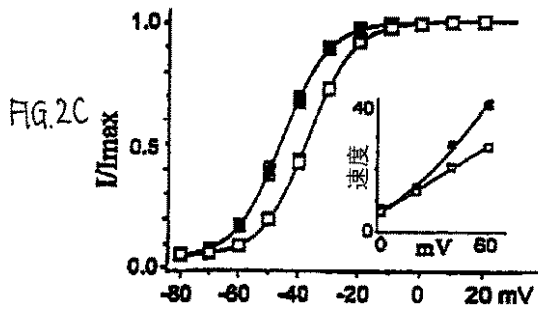
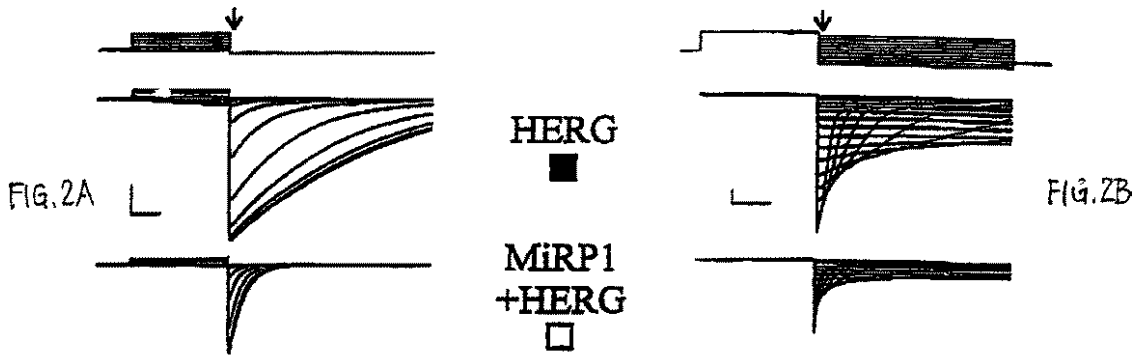
FIG. 1B

	1	10	20	30	40	50	60						
xMiRP1	MTI	PII	QVLEDA	KKVF	IYYMDSWR	HTTA	EQQALQARV	AENFY	YVIV	LMVMI	MA	IVVA	
hMiRP1	MST	SP	TLLEDV	RRIF	IYYMDSWR	HTTA	EQRALQAKV	AENFY	YVIV	LMVMI	MA	IVVA	
xMinK	-MA	SS	IVLP	-L	ASLWQETDEKPGG	MSADLARRS	QLRD	SK	-	LEA	ILMVI	FG	FTLGC
hMinK	-MI	SI	AVTP	-L	TKLWQETVQGG	MSG	LARRSPRSG	GK	-	LEA	VLEVI	FG	FTLGC

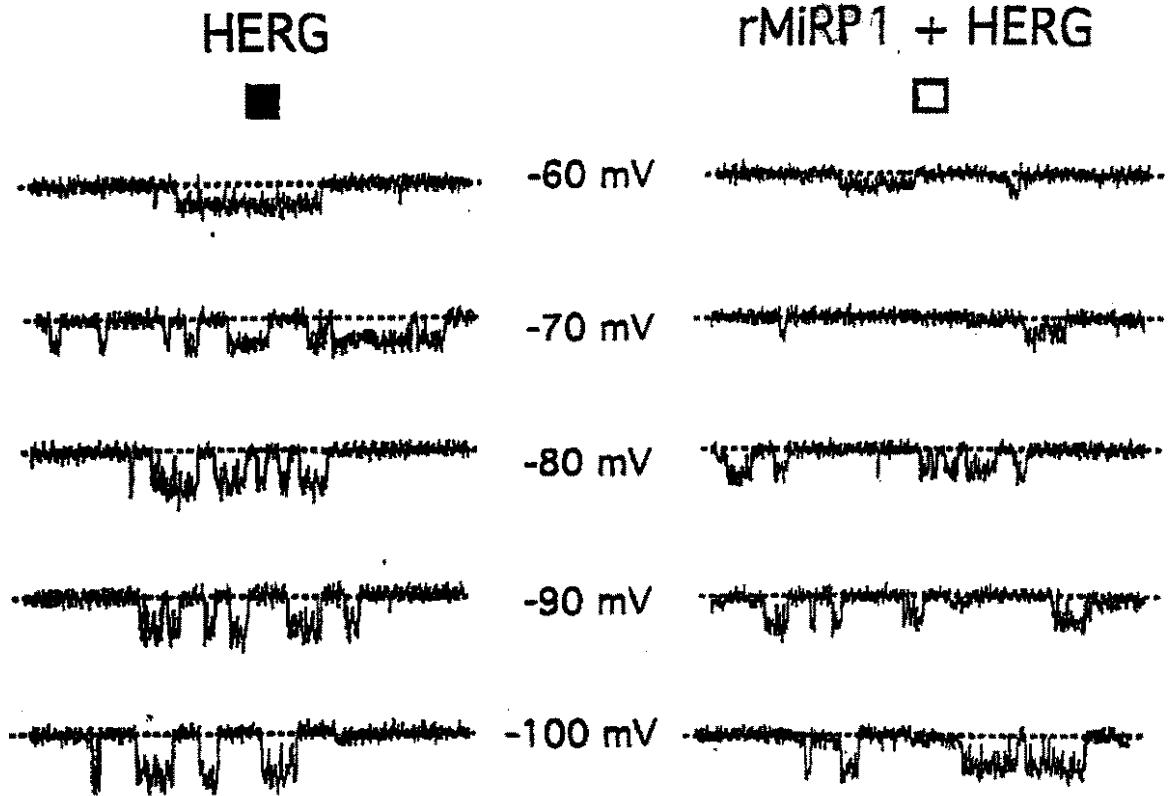
	70	80	90	100	110	120						
xMiRP1	LV	VVK	RR	Q	YRS	SKAT	IK	LG	NG	FTWS		
hMiRP1	LV	VVK	RR	Q	YRS	SKAT	IK	LG	NG	FTWS		
xMinK	ML	YIR	KI	ENV	ES	AKALF	ARV	SFRAC	YVIV	DA	VEQPATHL	ELKPLS
hMinK	ML	YIR	KI	ENV	ES	AKALF	ARV	SYRSC	YVIV	DA	VEQPATHL	ELKPLS

FIG. 1C

【図2A - 2F】



【図 3A - 3C】



1 pA
0.1 s

FIG. 3A

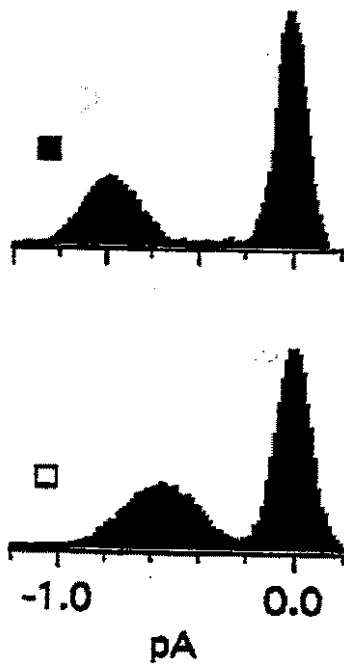


FIG. 3B

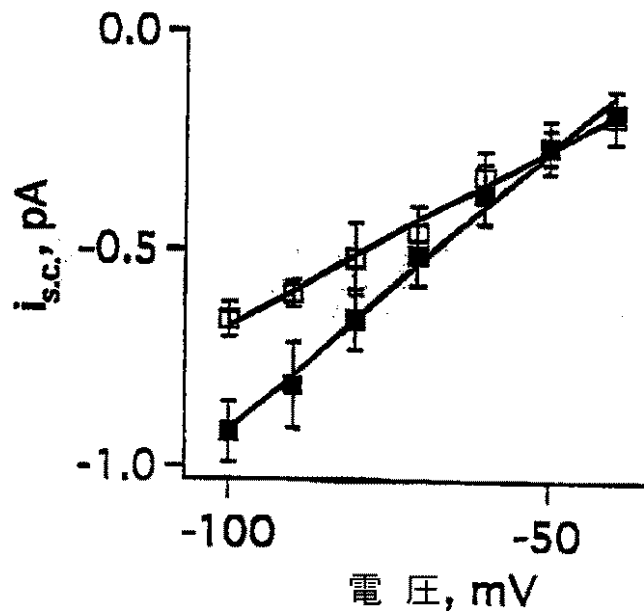


FIG. 3C

【図4A - 4B】

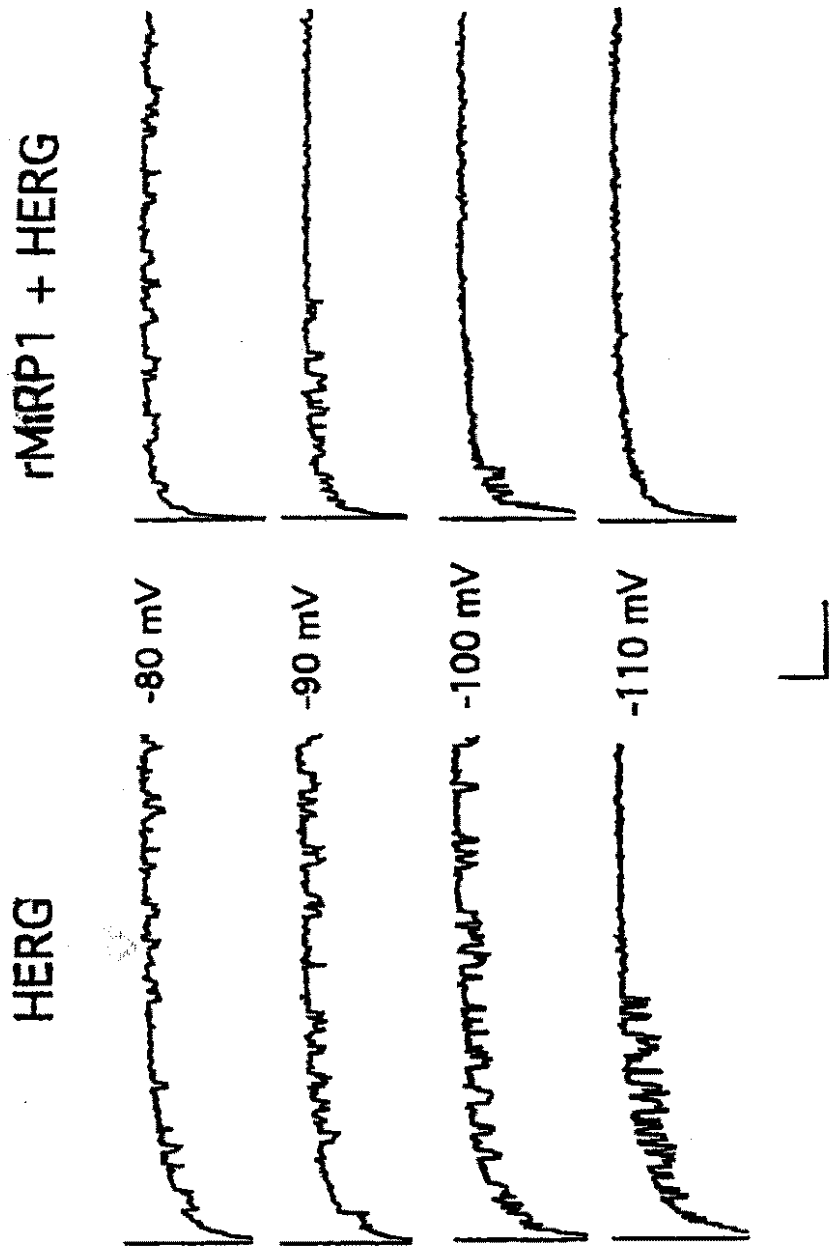
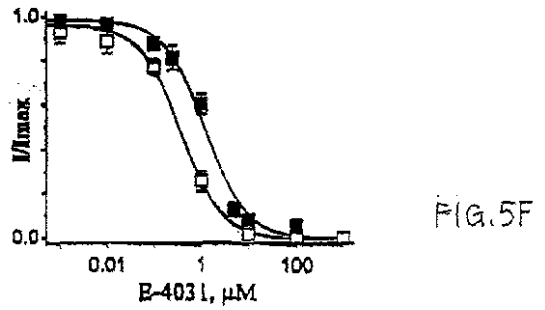
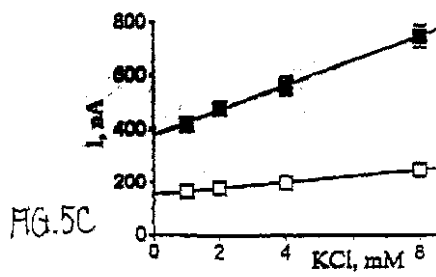
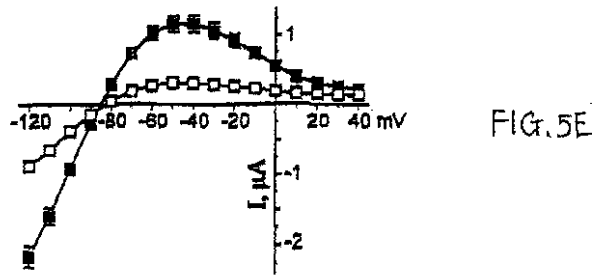
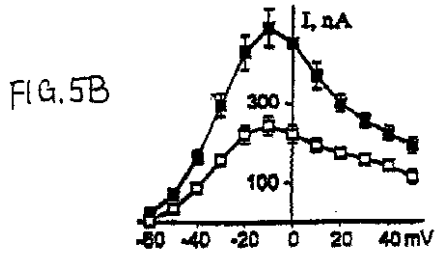
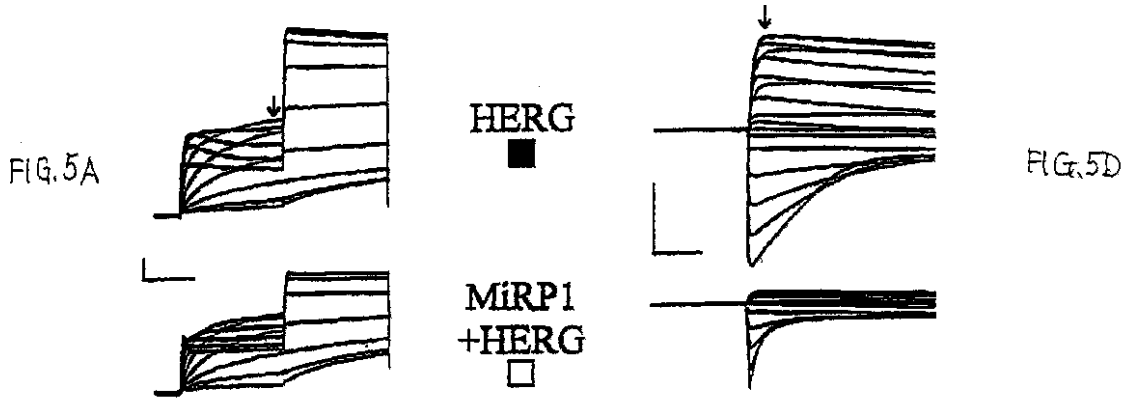


FIG. 4A



FIG. 4B

【図5】



【図6A】

- 5 IP M1 C
- 4 IP M1 -
- 3 IP - H
- 2 IP M1 H
- 1 TL M1 H



FIG. 6A

【図6B】



FIG. 6B

【図7A】

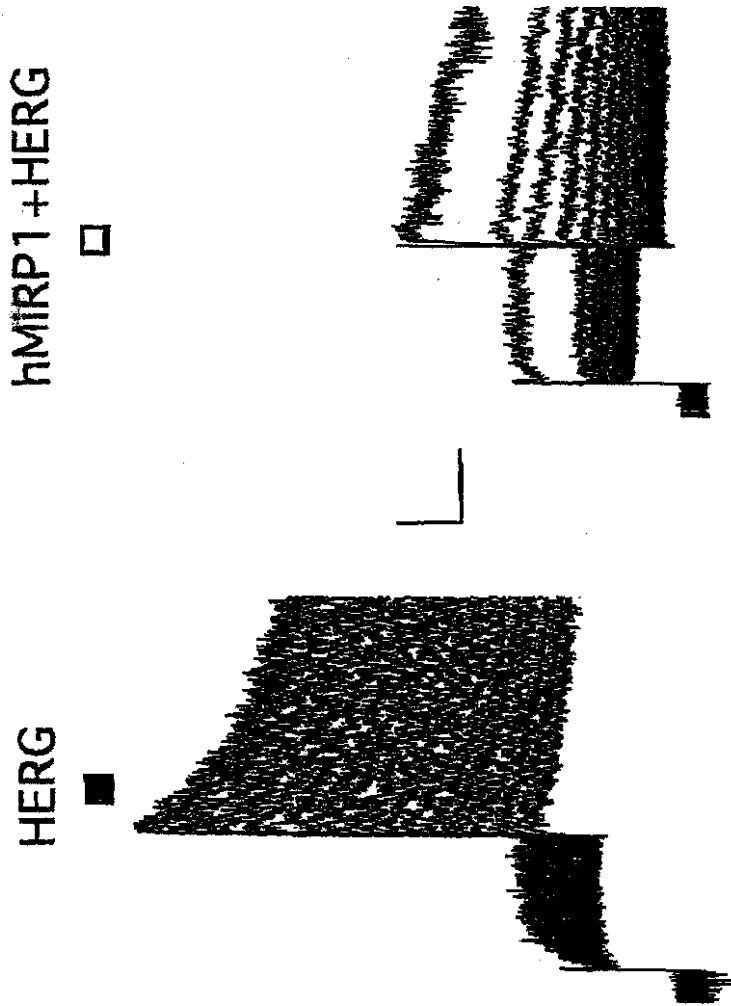


FIG. 7B

FIG. 7A

【図7B】

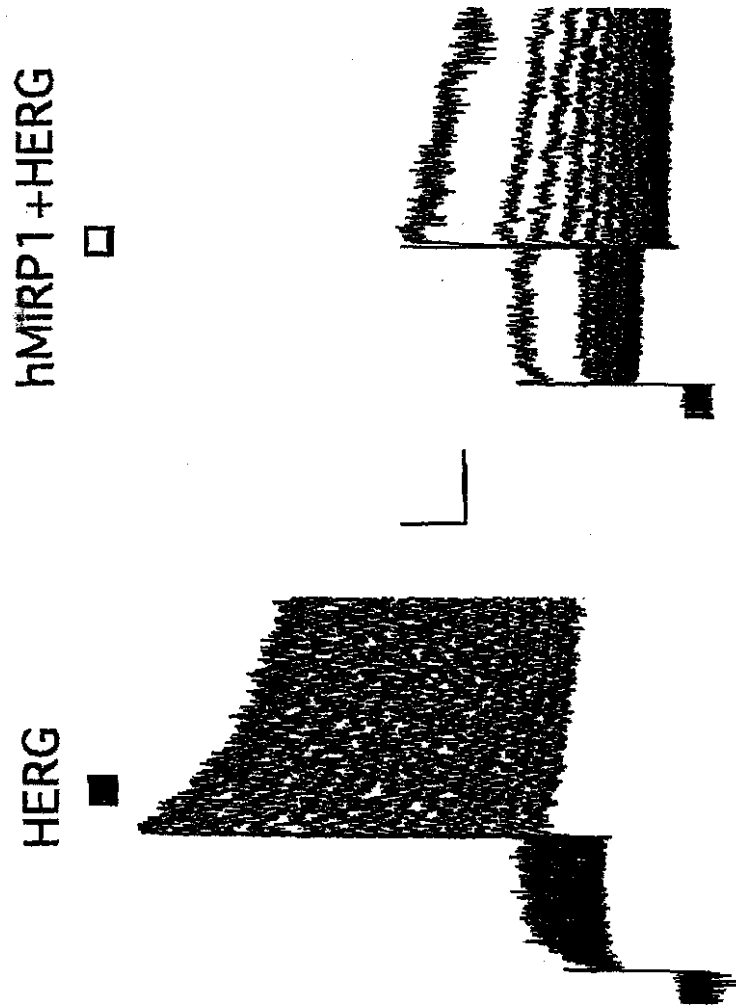


FIG.7B

FIG. 7A

【図7C】

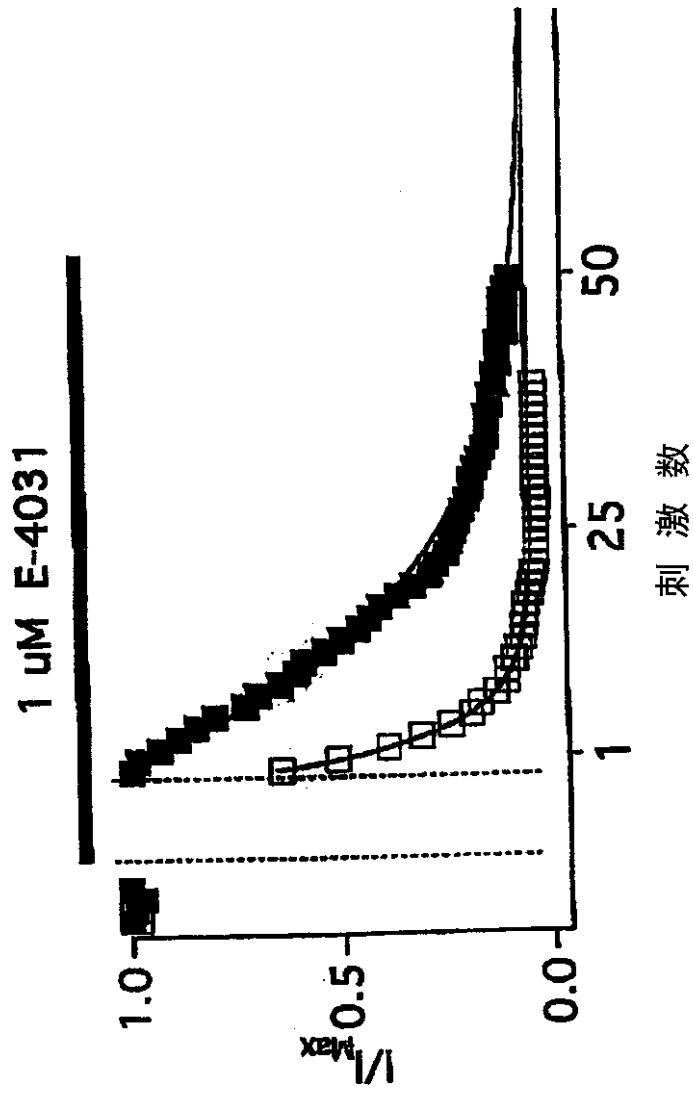


FIG. 7C

【 8A - 8B】

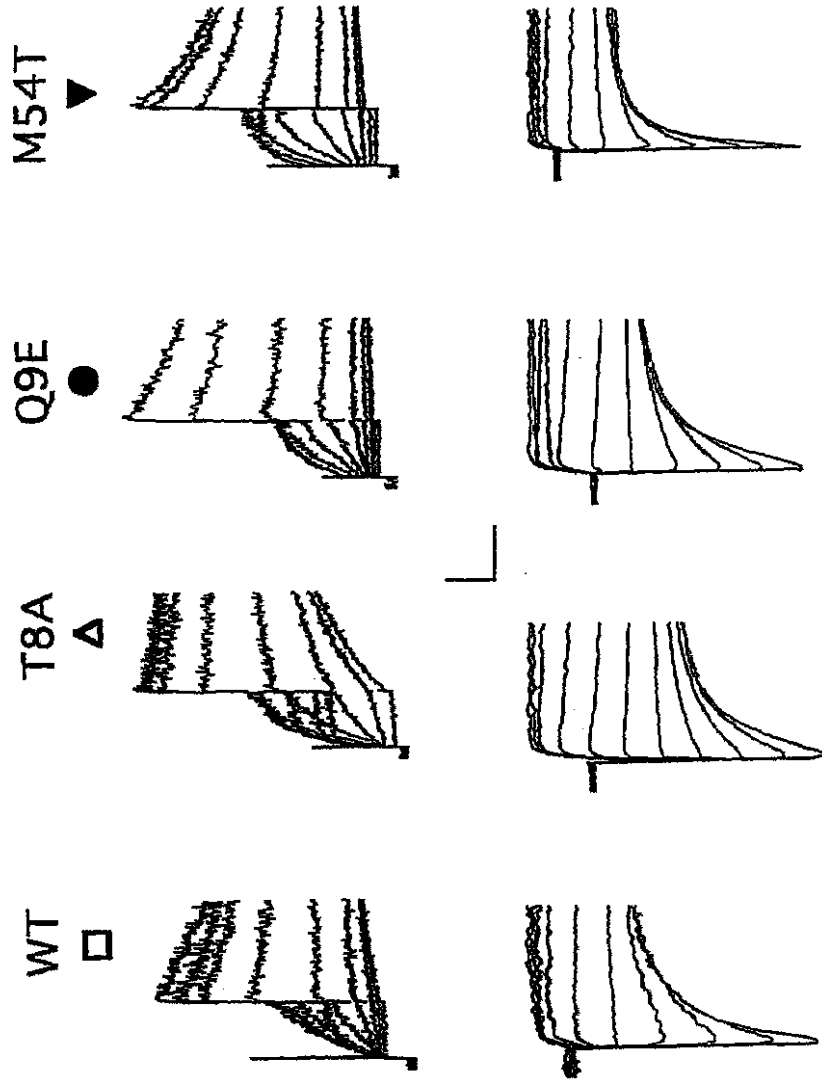


FIG. 8A

FIG. 8B

【図8C - 8D】

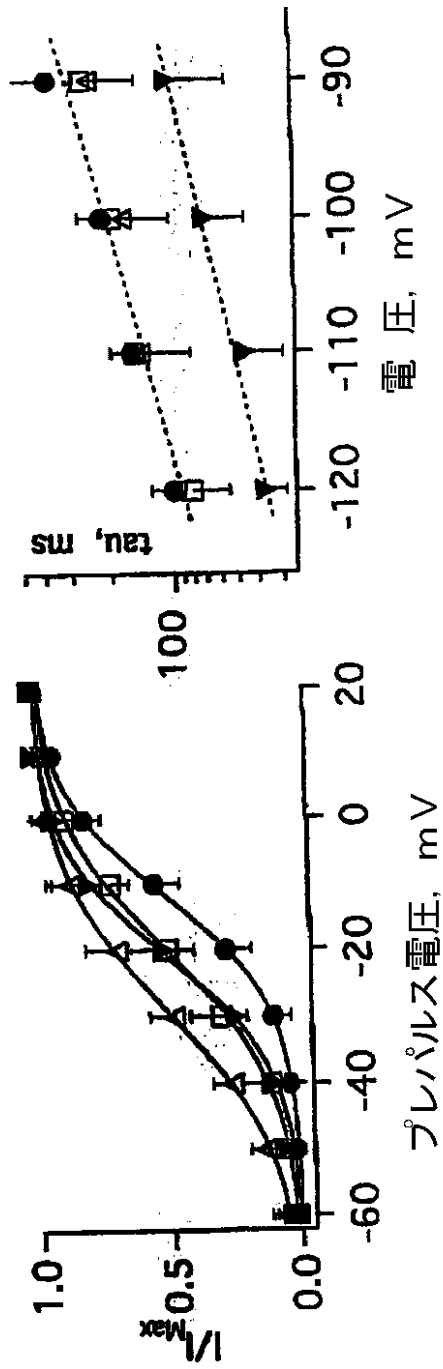


FIG. 8D

FIG. 8C

【図9A - 9C】

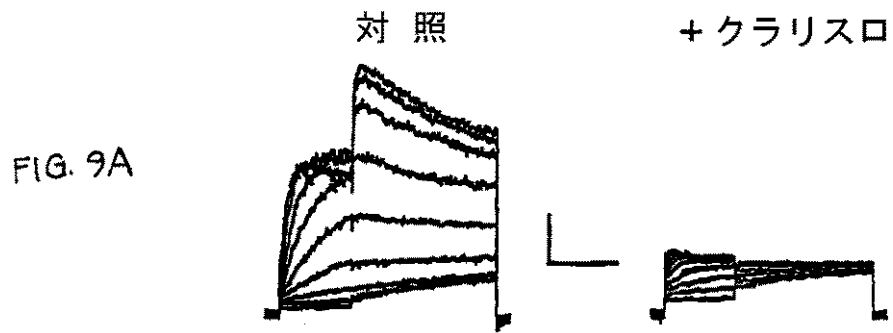


FIG. 9B

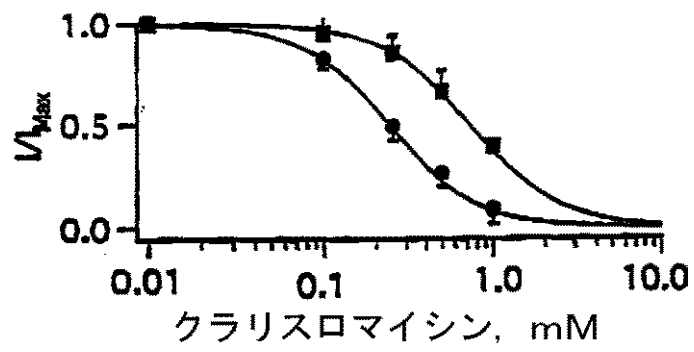
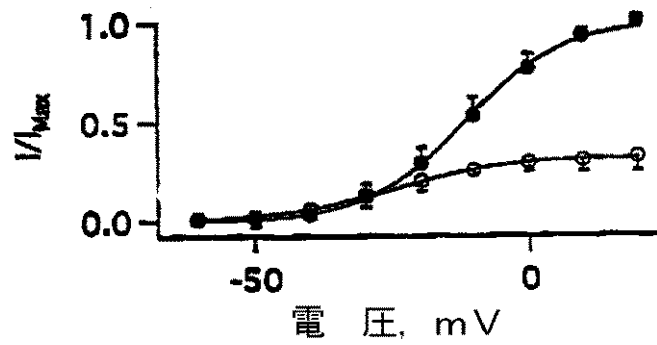



FIG. 9C



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/10004
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12N 5/00, 5/02; C07H 21/02, 21/04; G01N 33/00; A01K 67/00, 67/033 US CL : 336/23.1; 435/6, 325; 800/3, 9, 13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1; 435/6, 325; 800/3, 9, 13 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, CAPLUS, WEST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ABBOTT et al. A new superfamily of small ion channel subunits. Biophysical Journal. January 1999, Vol. 76, No. 1, part 2, page A75, abstract Su-Pos257, see entire abstract.	1-68
A, P	ABBOTT et al. MiRP1 forms I _{Kr} Potassium Channels with HERG and Is Associated with Cardiac Arrhythmia. Cell. 16 April 1999, Vol. 97, pages 175-187.	1-68
Y	MCDONALD et al. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current/I _{Kr} . Nature. 17 July 1997, Vol. 388, pages 289-292, see entire document.	1-68
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 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 *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 31 JULY 2000		Date of mailing of the international search report 14 AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer PETER PARAS JR.  Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/10004

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CURRAN et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: <i>HERG</i> mutations cause long QT syndrome. <i>Cell</i> . 10 March 1995, Vol. 80, pages 795-803, see entire document.	1-58
A	GOULDING et al. Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. <i>Nature</i> . 24 November 1994, Vol. 372, pages 369-374.	1-68

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	16/18	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15		1/19	4 C 0 8 5
	1/19		1/21	4 C 0 8 6
	1/21	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/08		1/68	A
C 1 2 Q	1/02			Z
	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
			33/50	Z
			33/53	D
G 0 1 N	33/15		33/566	M
	33/50		33/577	B
	33/53	A 6 1 K	31/711	
			39/395	D
			48/00	N
// A 6 1 K	31/711			
	38/00	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	39/395		5/00	A
	48/00	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ジェフリー・ダブリュー・アボット
アメリカ合衆国06536コネチカット州ニュー・ヘイブン、 kongress・アベニュー
295番

(72)発明者 フェデリコ・セステイ
アメリカ合衆国06536コネチカット州ニュー・ヘイブン、 kongress・アベニュー
295番

- (72)発明者 イゴール・スプラブスキー
 アメリカ合衆国02134マサチューセッツ州
 オールストン、チェスター・ストリート97
 番、アパートメント・エイ - 2
- (72)発明者 マーク・ティ・キーティング
 アメリカ合衆国02446 - 4006マサチューセ
 ッツ州ブルックライン、メイソン・ストリ
 ート1番
- (72)発明者 スティーブ・エイ・エヌ・ゴールドスタイ
 ン
 アメリカ合衆国06437コネチカット州ギル
 フォード、ブロード・ストリート65番
- F ターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA34 AA35 AA40
 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13
 DA14 DA36 DA77 FB01 FB02
 FB03
 4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA09
 CA11 DA01 DA02 DA05 DA11
 EA01 EA02 EA03 EA04 GA11
 HA12 HA15
 4B063 QA01 QA08 QA13 QA17 QA19
 QQ01 QQ42 QQ52 QR08 QR14
 QR33 QR42 QR55 QR59 QR62
 QR74 QR80 QS05 QS25 QS33
 QS34 QS36 QX02 QX04
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y
 AB01 AB02 BA02 BA08 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
 BA01 BA08 MA01 NA14 ZA382
 ZB212
 4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
 MA01 MA04 NA14 ZA38 ZB21
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	MinK相关基因，与钾通道形成和心律失常的相关性		
公开(公告)号	JP2002541862A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2000612511	申请日	2000-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	犹他大学研究基金会 耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	犹他州研究基金会大学 耶鲁大学		
[标]发明人	ジェフリー・ダブリュー・アボット フェデリコ・セステイ イゴール・スプラブスキー マーク・ティ・キーティング スティーブ・エイ・エヌ・ゴールドスタイン		
发明人	ジェフリー・ダブリュー・アボット フェデリコ・セステイ イゴール・スプラブスキー マーク・ティ・キーティング スティーブ・エイ・エヌ・ゴールドスタイン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/06 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/02 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61P9/06 C07K14/705 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/156		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P9/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33 /566 G01N33/577.B A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 C12N15/00.ZNA.A C12N5 /00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045 /CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063 /QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063 /QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA382 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085 /GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA38 4C086/ZB21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA09 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/129404 1999-04-15 US		
其他公开文献	JP4643020B2 JP2002541862A5		

摘要(译)

本发明涉及与形成离子通道的Min-K有关的基因和基因产物，以及诊断包括长QT综合征（LQT）在内的离子通道疾病的方法。例如，KCNE2形成Ir通道并与LQT关联。根据本发明，通过分析待测个体的 KCNE2DNA序列并将每个DNA序列与正常的 KCNE2已知DNA序列进行比较来诊断LQT。还可以针对个体中的这些与MinK相关的基因进行筛选，以找出导致离子通道受损（包括LQT）的突变。包括LQT在内的离子通道疾病的可预测性，将使从业人员可以使用现有的医学疗法预防这种疾病。本发明进一步涉及以下发现：HERG和KCNE2（也称为MiRP1）蛋白组装形成心脏Ir钾通道。

