

(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2003 - 522522

(P2003 - 522522A)

(43)公表日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全107数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 511485(P2001 - 511485)

(86)(22)出願日 平成12年7月18日(2000.7.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月17日(2002.1.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/19585

(87)国際公開番号 W001/005828

(87)国際公開日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(31)優先権主張番号 60/144,764

(32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 メルク エンド カムパニー インコーポ
レーテッド

MERCK & COMPANY IN
COPORATED

アメリカ合衆国、ニュージャ-ーシィ、ローウ
エイ、イースト リンカーン アヴェニュー
126

(72)発明者 ユーベル、ビクター

アメリカ合衆国、ニュー・ジャ-ージ-・07
065 - 0907、ローウエイ、イースト・リンカ
-ン・アベニュー・126

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニット

(57)【要約】

本発明は、カルシウム感受性カリウムチャンネルサブ
ユニット 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dをコ
ードする新規ヒトDNA配列、該DNA配列にコードさ
れるタンパク質、該DNA配列を含むベクター、該ベク
ターを含有する宿主細胞、ならびにヒト 2、 3 a、
3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットを含有するカ
ルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターおよ
びアゴニスト、および 3 遺伝子の転写のインヒビター
およびアゴニストの同定方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードするヌクレオチドを含んでなる単離されたDNA。

【請求項2】 配列番号2、配列番号4、セリンの代わりにアスパラギンを163位に有する配列番号4、配列番号6、アスパラギンの代わりにセリンを143位に有する配列番号6、配列番号8、セリンの代わりにアスパラギンを161位に有する配列番号8、配列番号10、アスパラギンの代わりにセリンを165位に有する配列番号10および配列番号6の2-246位よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む、請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号1、3、5、7、9および20よりなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のDNA。

【請求項4】 配列番号1の271-975位、配列番号3の341-1171位、配列番号5の796-1566位、配列番号7の869-1693位および配列番号9の457-1293位よりなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む、請求項1記載のDNA。

【請求項5】 ストリンジェントな条件下で請求項2記載のDNAにハイブリダイズする単離されたDNA。

【請求項6】 請求項1記載のDNAを含んでなる発現ベクター。

【請求項7】 請求項1記載のDNAを含んでなる組換え宿主細胞。

【請求項8】 単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質。

【請求項9】 配列番号2、配列番号4、セリンの代わりにアスパラギンを163位に有する配列番号4、配列番号6、アスパラギンの代わりにセリンを143位に有する配列番号6、配列番号8、セリンの代わりにアスパラギンを161位に有する配列番号8、配列番号10、アスパラギンの代わりにセリンを165位に有する配列番号10および配列番号6の2-246位よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する、請求項8記載のタンパク質。

【請求項10】 単一のアミノ酸置換を含有する、請求項8記載のタンパク質。

【請求項11】 保存された位置には存在しない2以上のアミノ酸置換を含有する、請求項8記載のタンパク質。

【請求項12】 B L A S TまたはF A S T Aにより測定した場合に請求項9記載のタンパク質に対して少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチド。

【請求項13】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質に特異的に結合する、または保存されたコアへの結合により 3サブユニットファミリーのタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項14】 配列番号1、3、5、7、9および20よりなる群から選ばれる配列の少なくとも1つの少なくとも15個の連続的ヌクレオチドを含むDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項15】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合する物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質に、該細胞をさらし、

(c) 該細胞への該物質の結合の量を測定し、

(d) 工程(c)における結合の量を、対照細胞(該対照細胞は、該対照細胞がヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を発現しないこと以外は、工程(a)の細胞と実質的に同一である)への該物質の結合の量と比較することを含んでなり、

工程(c)における結合の量が対照細胞への該物質の結合の量より多い場合、

該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合するものであることを特徴とする方法。

【請求項16】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合し従ってヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうる物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られている化合物に、該細胞をさらし、

(c) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質の存在下および不存在下、該細胞への該物質の結合の量を測定することを含んでなり、

該物質の存在下の該化合物の結合の量が該物質の不存在下の場合と異なる場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合しヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうることを特徴とする方法。

【請求項17】 ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターの同定方法であって

、
(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質または突然変異ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を宿主細胞内で組換え的に発現させ、それにより、その組換え的に発現したヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質に、他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットタンパク質とのヘテロマーを形成させることにより、カルシウム感受性カリウムチャンネルを形成させ、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであると疑われる物質の存在下および不存在下、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性を測定することを含んでなり、

該物質の不存在下と比較した場合の該物質の存在下の、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性の変化が、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであることを示すことを特徴とする方法。

【請求項 18】 遺伝子の転写を促進、増強または抑制する 3 遺伝子内の DNA 配列の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化 c DNA 配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) が先行するように、プロモーター - レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定し、

(c) 工程 (b) の細胞内のレポータータンパク質の存在量を、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片を有さないベクターでトランスフェクトされた細胞内のレポータータンパク質の存在量と比較することを含んでなり、

3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットを内因的に発現する細胞内でのみ、他のプロモーター要素の不存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる 3 遺伝子のプロモーター領域の断片が、プロモーター要素であり；

3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットを内因的に発現しない細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、レポータータンパク質の存在量を減少させる配列が、リプレッサー要素であり； 3 a、 3 b、 3 cまたは

3 dサブユニットを内因的に発現させる細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる配列が、エンハンサー配列であることを特徴とする方法。

【請求項19】 該ベクターが、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片から独立して機能するプロモーターまたはエンハンサー配列要素を含有する、請求項18記載の方法。

【請求項20】 該レポータータンパク質の存在量をトランスフェクト化細胞の割合に関して正規化する、請求項18記載の方法。

【請求項21】 遺伝子の転写を促進、増強または抑制する 3 遺伝子内の DNA 配列の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 2 0 のヌクレオチド 1 - 1 7 , 4 3 6) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、

(b) 該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、細胞からの核抽出物と共にインキュベートした後にゲル内で異なって移動する (「シフトを受ける」) 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片が、 3 遺伝子の発現を促進、増強または抑制する核因子に結合する DNA 配列であることを特徴とする方法。

【請求項22】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項18記載の方法により同定する、請求項21記載の方法。

【請求項23】 該細胞が 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットを発現する、請求項21記載の方法。

【請求項24】 該細胞が 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットを発現しない、請求項21記載の方法。

【請求項25】 3遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であつて、

(a) 該 3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片を、クローニングまたは精製された転写因子と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

3遺伝子のプロモーター配列要素に結合する因子が、該放射能標識DNA断片の移動におけるシフトを誘導し、該 3遺伝子の転写調節に関与することを特徴とする方法。

【請求項26】 該 3遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を、請求項18または21記載の方法により同定する、請求項25記載の方法。

【請求項27】 3遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であつて、

(a) 該 3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離すること、

(b) 単一の転写因子または転写因子のファミリーを特異的に認識する抗体を工程(a)のインキュベーション物に加え、ついで該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

工程(a)と比較した場合の工程(b)の二本鎖DNAの移動度におけるスーパーシフトが、該抗体により認識される転写因子が該二本鎖DNAに結合することを示すことを特徴とする方法。

【請求項28】 3遺伝子の転写調節に関与する核因子をコードするクローンをクローニングにより同定する方法であつて、

(a) 該 3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-1

7, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片で、
発現ライブラリーをスクリーニングし、

(b) 該ライブラリーのいずれのクローンが二本鎖DNAの放射能標識断片に
結合するのかを判定し、

(c) 工程(b)のクローンを増幅し、配列決定することを含んでなる方法。

【請求項29】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対
応する二本鎖DNAの断片を、請求項18または21記載の方法により同定する
、請求項28記載の方法。

【請求項30】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をクローニングに
より同定する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-1
7, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を安定なマトリ
ックスに結合させ、

(b) cDNAにコードされる融合タンパク質を表面に発現するファージを該
マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該マトリックスに結合しないファージを洗浄により除去し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖
DNAの過剰の断片で、該マトリックスに結合したファージを溶出することを含
んでなり、

工程(d)で溶出されたファージが、3 遺伝子の転写調節に関与する核因子
をコードすることを特徴とする方法。

【請求項31】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対
応するDNAを、請求項18または21記載の方法により同定する、請求項30
記載の方法。

【請求項32】 工程(d)で溶出されたファージを増幅し、配列決定する
、請求項30記載の方法。

【請求項33】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であっ
て、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-1

7, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を安定なマトリックスに結合させ、

(b) 細胞からの核抽出物を該マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該核抽出物からの非結合タンパク質を該マトリックスから洗浄し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する過剰の二本鎖DNAで、結合タンパク質を該マトリックスから溶出することを含んでなり、

工程(d)からの溶出されたタンパク質が、3 遺伝子の転写調節に関与する核因子であることを特徴とする方法。

【請求項34】 工程(d)からの溶出されたタンパク質をゲル上で分離し、該ゲルを染色して、該溶出タンパク質の純度を試験することを更に含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】 該ゲル上で分離されたタンパク質を配列決定することを更に含む、請求項34記載の方法。

【請求項36】 ウエスタンブロットまたは免疫沈降により、該溶出タンパク質を同定するために、該ゲル上で分離されたタンパク質を公知転写因子に対する抗体で免疫学的に分析することを更に含む、請求項34記載の方法。

【請求項37】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を、請求項18または21記載の方法により同定する、請求項33記載の方法。

【請求項38】 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片の少数ないしは幾つかのコピーをレポータータンパク質コード化cDNAに先行して含有する酵母株を構築し、

(b) 該挿入cDNAおよび転写活性化ドメインにコードされる融合タンパク質の形成を可能にするベクター中、細胞からのcDNAライブラリーを構築し、

(c) (b)のライブラリーを(a)の酵母株内に形質転換し、該レポーター

タンパク質の発現を示す酵母のコロニーを単離することを含んでなる方法。

【請求項39】 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を、請求項18または21記載の方法により同定する、請求項38記載の方法。

【請求項40】 単離されたコロニーからベクターを精製し、該ベクター内のcDNAを配列決定することを更に含む、請求項38記載の方法。

【請求項41】 該 3 遺伝子の転写速度を増強または抑制する物質の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化cDNA配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)の断片が先行するように、プロモーター-レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、化合物の存在下および不存在下、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定することを含んでなり、

(1) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を減少させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を抑制する物質であり、(2) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を増加させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を増強する物質であることを特徴とする方法。

【請求項42】 該方法が、対照細胞内の該レポータータンパク質の存在量に対する該化合物の効果が測定される対照を含み、該対照細胞が、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片を欠くベクターで該対照細胞がトランスフェクトされている以外は工程(b)の細胞と実質的に同じ細胞である、請求項41記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、カルシウム感受性カリウムチャンネルのサブユニットをコードする新規ヒトDNA配列に関する。

【0002】**(発明の背景)**

電位依存性カリウムチャンネルは、細胞膜電位の変化に応答して開閉する膜貫通孔を形成し、選択的にカリウムイオンが該膜を通過するのを可能にする。電位依存性カリウムチャンネルは、興奮性であると伝統的にみなされている細胞（例えば、ニューロン、筋細胞、分泌細胞）および非興奮性であると伝統的にみなされている細胞（例えば、T細胞、破骨細胞）の両方で見出されており、そのような細胞における細胞膜電位を維持し活動電位の再分極を制御することが示されている。脱分極後、電位依存性カリウムチャンネルは開き、カリウム流出を可能にして、膜の再分極を可能にする。この挙動のため、電位依存性カリウムチャンネルは、種々の疾患に関連した薬物発見のための重要な標的となっている。その結果、多数の電位依存性カリウムチャンネルが同定されており、多数がクローニングされている。それらは、一次構造および発現の組織特異的パターンの違いにより並びに電気生理学的および薬理学的特性により区別されうる。電位依存性カリウムチャンネルの総説としては、Robertson, 1997, Trends Pharmacol. Sci. 18: 474 - 483; Jan & Jan, 1997, J. Physiol. 505: 267 - 282; Catterall, 1995, Ann. Rev. Biochem. 64: 493 - 531を参照されたい。

【0003】

多数の機能的電位依存性カリウムチャンネルは、6個の膜貫通伸長セグメントをそれぞれが含有する4個のサブユニットの四量体であると考えられている。四量体を構成するサブユニットは同一であることもあれば（ホモ四量体の場合）、異なることもある（ヘテロ四量体の場合）。該四量体を構成する膜伸長サ

ブユニットは、該 サブユニットの挙動を改変しうる追加的な サブユニットを伴うことがある。

【0004】

電位依存性カリウムチャンネルの個々のタイプとしては、電位依存性およびカルシウム感受性カリウムチャンネルが挙げられ、これはカルシウム感受性カリウムチャンネルとしても公知である。カルシウム感受性カリウムチャンネルは多種多様な細胞に存在する。また、それは電位依存性カリウムチャンネルのなかでは独特である。なぜなら、その活性が、膜電位の変化によってだけでなく、細胞内カルシウム濃度によっても調節されるからである。形質膜の脱分極および細胞質カルシウム濃度の増加は共に、カルシウム感受性カリウムチャンネルの開口の可能性を増大させる。したがって、カルシウム感受性カリウムチャンネルは、膜興奮性および細胞内カルシウムの増加を含む細胞過程の間の連絡体として機能しうる。カルシウム感受性カリウムチャンネルは、グルコース媒介インスリン放出、血管筋緊張、気管支気道平滑筋緊張、眼圧の調節などの細胞内カルシウムの増加を伴うシグナリング事象を終結させることにより負のフィードバックの役割を果たしていると考えられている (Tanakaら, 1997, *J. Physiol.* 502: 545-557; Kaczorowskiら, 1996, *J. Bioenerg. Biomem.* 28: 255-267; Vergaraら, 1998, *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 321-329)。

【0005】

ある種のカルシウム感受性カリウムチャンネルが単離され、研究されている。機能的カルシウム感受性カリウムチャンネルは、サブユニットと、それより小さくそれに会合したサブユニットとから構成される。サブユニットはチャンネル孔を形成していると考えられており、一方、既に記載されているサブユニットはカルシウム感受性を増加させ、ある物質、例えばデヒドロソヤサポニンによる調節に対して該チャンネルを感受性にする (McManusら, 1995, *Neuron* 14: 645-650)。ウシ気管平滑筋由来のカルシウム感受性カリウムチャンネルが精製されており、~130 kDaのサブユニットおよび31 kDaのサブユニットから構成されることが示されている (Garcia

a - Calvoら, 1994, J. Biol. Chem. 269: 676 - 682)。Tseng - Crankら(1994, Neuron 13: 1315 - 1330)は、ヒトの脳から9個の関連カルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットをクローニングした。これらのサブユニットは、単一遺伝子h - slo遺伝子由来のスプライス変異体であると考えられている(Tseng - Crankら, 1994, Neuron 13: 1315 - 1330)。Knau ssら(1994, J. Biol. Chem. 269: 17274 - 17278)は、気管平滑筋からカルシウム感受性カルシウムチャンネルのサブユニットを精製しクローニングした。

【0006】

ほとんどの細胞では、カルシウム感受性カリウムチャンネルの開口は非不活性化過分極カリウム電流の生成を引き起こす。しかし、ある種の細胞(例えば、副腎のクロム親和性細胞および海馬ニューロン)では、該電流は不活性化性である。本明細書に記載の発明の知見が得られた後、Wallnerら, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4137 - 4132は、サブユニットと一緒に不活性化カルシウム感受性カリウムチャンネルを形成するヒト2カルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットの存在を開示した。不活性化を付与する能力は、該2サブユニットのN末端の19アミノ酸によるものであるとされた。

【0007】

米国特許第5,776,734号は、カルシウム感受性カリウムチャンネルのウシおよびヒト1サブユニットをコードする核酸に関するものである。米国特許第5,637,470号は、カルシウム感受性カリウムチャンネルの活性をモジュレーションする化合物の同定方法に関するものである。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、カルシウム感受性カリウムチャンネルのサブユニットをコードする新規ヒトDNA配列に関する。本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルのサブユニット2、3a、3b、3cおよび3dをコードす

るDNAを含む。該DNAは、配列番号1(2)、配列番号3(3a)、配列番号5(3b)、配列番号7(3c)および配列番号9(3d)に示すヌクレオチド配列を含む。また、該新規DNA配列にコードされるタンパク質を提供する。該タンパク質は、配列番号2(2)、配列番号4(3a)、配列番号6(3b)、配列番号8(3c)および配列番号10(3d)に示す推定アミノ酸配列を含む。組換え系内で該新規サブユニットタンパク質を発現させる方法、および該サブユニットを含むカリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターの同定方法を提供する。

【0009】

本発明はまた、該3a、3b、3cおよび3dサブユニットの5'部分、および該3サブユニットのコアタンパク質の5'部分を含有するゲノムDNA断片を含む。このゲノムDNA断片は該サブユニットのプロモーター要素を含有する。該3a、3b、3cおよび3dサブユニットをコードする遺伝子の転写に影響を及ぼす化合物に関するスクリーニング方法も提供する。

【0010】

(図面の簡単な記載)

図1Aは、該ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの2サブユニットをコードするDNA配列(配列番号1)を示す。該開始ATGコドンは271-273位であり、該終結コドンは976-978位である。図1Bは、該2サブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【0011】

図2Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの3aサブユニットをコードするDNA配列(配列番号3)を示す。該開始ATGコドンは341-343位であり、該終結コドンは1172-1174位である。図2Bは、該3aサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【0012】

図3Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの3bサブユニットをコードするDNA配列(配列番号5)を示す。該開始ATGコドンは796-798位であり、該終結コドンは1567-1569位である。図3Bは、該3

bサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【0013】

図4Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの3cサブユニットをコードするDNA配列(配列番号7)を示す。該開始ATGコドンは869-871位であり、該終結コドンは1694-1696位である。図4Bは、該3cサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号8)を示す。

【0014】

図5Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの3dサブユニットをコードするDNA配列(配列番号9)を示す。該開始ATGコドンは457-459位であり、該終結コドンは1294-1296位である。図5Bは、該3dサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号10)を示す。

【0015】

図6は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル1(配列番号11)、2(配列番号2)、3a(配列番号4)、3b(配列番号6)、3c(配列番号8)および3d(配列番号10)サブユニットの推定アミノ酸配列のアライメントを示す。

【0016】

図7は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルのサブユニットにより形成されるイオンチャンネルの電気生理学的特性に対する本発明の新規サブユニットの共発現の効果を示す。図7Aは、カルシウム感受性カリウムチャンネルまたは および サブユニットを発現するインサイドアウトパッチにおいて記録した電流-電位関係を示す。最大効果を検出するために、 および サブユニットcRNAを1:10のモル比(が過剰)で共注入した。該電位固定法は、-160mVまでの予備パルス(200ms)、ついで-80~+80mVの20mV脱分極工程(500ms)よりなるものであり、保持電圧は-80mVであり、内部Ca²⁺は30μMであった。サブユニット3bおよび3dは、電流密度を減少させうるものの、サブユニットにより形成されるチャンネルの電位依存性および速度論における認められうる変化を誘発しなかった。図7B:ピーク電流から算出され試験電位の関数としてプロットされた図7Aに示す記録に

関する正規化コンダクタンスに、ボルツマン方程式をあてはめた。 $V_{1/2}$ 値は20mV(サブユニット単独)、-55mV(+2サブユニット)、45.36mV(+3aサブユニット)、20mV(+3cサブユニット)である。図7Cは、サブユニットRNAよりモル過剰(10×まで)の3サブユニットRNAの共発現が、カルシウム感受性カリウムチャンネル電流の非不活性化成分を減少させたが排除しなかったことを示す。不活性化速度および部分(fractional)不活性化電流は、実施例2に記載のとおり計算した。

【0017】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【0018】

(発明の詳細な記載)

本発明の目的においては、「他のタンパク質を実質的に含有しない」は、他のタンパク質から少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは99%、より一層好ましくは99.9%フリーである(すなわち、かかる割合分は他のタンパク質を含有しない)ことを意味する。したがって、他のタンパク質を実質的に含有しないヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質調製物は、その全タンパク質に対する割合として、10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは1%以下、より一層好ましくは0.1%以下の非ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含有するであろう。ある与えられたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a

、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質調製物が他のタンパク質を実質的に含有しないか否かは、適当な検出方法（例えば、銀染色または免疫ブロット法）と組合せた例えばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）などのタンパク質純度を評価する通常の技術により判定することができる。

【0019】

「他の核酸を実質的に含有しない」は、他の核酸から少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは99%、より一層好ましくは99.9%フリーであることを意味する。したがって、他の核酸を実質的に含有しないヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットDNA調製物は、その全核酸に対する割合として、10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは1%以下、より一層好ましくは0.1%以下の非ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット核酸を含有するであろう。ある与えられたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットDNA調製物が他の核酸を実質的に含有しないか否かは、適当な染色方法（例えば、臭化エチジウム染色、ノーザンまたはサザンブロット法）と組合せた例えばアガロースゲル電気泳動などの核酸純度を評価する通常の技術により、または配列決定により判定することができる。

【0020】

「同類アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、化学的に類似した別のアミノ酸残基により置換されることを意味する。そのような同類置換の具体例としては、疎水性残基（イソロイシン、ロイシン、バリンまたはメチオニン）間での置換、ある極性残基を同じ電荷の別の極性残基で置換すること（例えば、リシンからアルギニンへの、アスパラギン酸からグルタミン酸への置換）、芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシンまたはフェニルアラニン）間での置換が挙げられる。

【0021】

あるポリペプチドが「ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a

、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットと実質的に同じ生物活性」を有するのは、そのポリペプチドが、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットと一緒に機能的カリウムチャンネルを形成することが可能であり、該ポリペプチドが、該 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットにより付与される特性に類似した特性を該 サブユニットに付与し、該ポリペプチドが、BLASTまたはFASTAなどの標準的なプログラムにより測定された場合に配列番号2、4、6、8または10と少なくとも約50%同一であるアミノ酸配列を有する場合である。例えば、アミノ酸配列において 3 a (配列番号4)と50%同一であるポリペプチドであって、該ポリペプチドおよび サブユニットから形成されるイオンチャンネルの電気生理学的測定値が例えば図7A~Cに 3 aサブユニットおよび該 サブユニットに関して記載のグラフを与える特性を サブユニットに付与するポリペプチドは、「ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 aサブユニットと実質的に同じ生物活性」を有するポリペプチドである。

【0022】

本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの成分であるヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットをコードするDNAの同定およびクローニングに関する。該 1サブユニットに対する相同性を有する配列に関してデータベースを検索することにより、EST (expressed sequence tag) (GenBankアクセッション番号AA904191、AI299145およびAI301175)を同定した。該ESTをコードするcDNAを購入し、両方向で配列決定した。AA904191をコードするクローンは全 2サブユニットをコードすることが確認された。なぜなら、それは、該オープンリーディングフレームの開始ATGの5'側のインフレームの終結コドンと該全オープンリーディングフレームとを含有していたからである。

【0023】

ついで該 2コード配列を使用して、追加的な サブユニットに関して該データベースを検索した。同定したESTからコンティグを集合させ、それを使用し

て該データベースをもう一度検索した。この反復法でいくつかのESTを同定した(GenBankアクセッション番号AA195381、AA236930、AA236968、AA279911、AA761761およびAA934876)。これらのESTをコードする重要なcDNAを購入し、両方向で配列決定した。これらのクローンはいずれも完全長ではなかった。ほとんどは、B細胞に富む扁桃の調製物において単離されたため、本発明者らは、B細胞に富むもう一つの組織であるヒト脾臓由来の商業的に製造されたcDNA(Clontechカタログ#7412-1)を鋳型として使用し、3'非翻訳領域(UTR)において遺伝子特異的オリゴヌクオチドを使用して、5'RACE(rapid amplification of cDNA ends)を行った。このようにして複数のDNA断片を増幅し、クローニングし、両方向で配列決定した。配列決定は、5'末端だけが異なる完全長クローンの4個のサブファミリー 3a、3b、3cまたは3dを示した。

【0024】

本発明のヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cおよび3dサブユニットは発現の組織特異的パターンを示す。種々の組織から単離したmRNAのノーザンブロット法は、該2サブユニットが主として子宮、心臓、卵巣、甲状腺、胎児腎、副腎髄質および脾臓で発現され、該3aサブユニットが主として心臓および骨格筋で発現され、該3bサブユニットが脳、骨格筋および精巣以外の調べたほとんどの組織で発現されることを示している。該3cおよび/または3dサブユニットは脾臓で見出されている。

【0025】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cおよび3dサブユニットの組織特異的発現パターンは、これらの異なるサブユニットが、異なる組織で認められるカルシウム感受性カリウムチャンネルの機能的多様性に寄与するという仮説を支持している。したがって、特異的サブユニットを含有する特異的カルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターは、特定の病態に關与するカルシウム感受性カリウムチャンネルのサブユニット組成に応じた種々の病態における薬理学的効力を有する。

【0026】

染色体マッピング研究は、 2 および 3 サブユニットが共にヒト染色体 $3q23-ter$ に位置づけられることを示している。本発明のサブユニットは、既に公知のヒト 1 サブユニット(GenBankアクセッション番号U25138)に対して約 $30\sim45\%$ のアミノ酸配列同一性を有する。本発明の 2 および 3 サブユニットは、お互いに対して約 40% のアミノ酸配列同一性を有する。該 $3a$ 、 $3b$ 、 $3c$ および $3d$ サブユニットは、それらの最もN末端の $1\sim20$ アミノ酸が異なるにすぎず、単一遺伝子の選択的スプライシング変異体である。実際のところ、連続的断片中の保存されたコアの開始部位および $3a$ 、 $3b$ 、 $3c/d$ の $5'$ ドメインを含有するGenBankデータベース中のヒトDNAのゲノム断片(アクセッション番号AC007823.4)が同定されている。図8を参照されたい。また、保存されたコアドメインを含有する2つの細菌人工染色体(BAC)が単離されている。また、これらのBACのうちの一つは、 $3c/d$ 特異的配列を含有する。したがって、本発明者らは、全 3 オープンリーディングフレームを一緒になってコードする重複BACクローンを同定した。該 2 サブユニットは別の遺伝子にコードされる。

【0027】

本発明は、他の核酸を実質的に含有しないヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2 、 $3a$ 、 $3b$ 、 $3c$ または $3d$ サブユニットをコードするDNAを提供する。本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2 、 $3a$ 、 $3b$ 、 $3c$ または $3d$ サブユニットをコードする単離された及び/又は組換えDNA分子を提供する。本発明は、配列番号 1 、 3 、 5 または 9 に示すヌクレオチド配列を含む他の核酸を実質的に含有しないDNA分子を提供する。 $3b$ の 143 位に相当するアミノ酸位置でセリンまたはアスパラギンをコードする配列多型性を示す各 3 サブユニットをコードするcDNAが単離されている。これは、保存されたコアドメインのアミノ酸 142 に相当する。

【0028】

したがって、本発明は、配列番号 4 、セリンの代わりにアスパラギンを 163 位に有する配列番号 4 、配列番号 6 、アスパラギンの代わりにセリンを 143 位

に有する配列番号6、配列番号8、セリンの代わりにアスパラギンを161位に有する配列番号8、配列番号10およびアスパラギンの代わりにセリンを165位に有する配列番号10よりなる群から選ばれるポリペプチドをコードする、他の核酸を実質的に含有しないDNAならびに単離された及び/又は組換えDNAを含む。

【0029】

本発明は、保存された3コアアミノ酸配列、配列番号6の2-246位を含むポリペプチドをコードする、他の核酸を実質的に含有しないDNAならびに単離された及び/又は組換えDNAを含む。

【0030】

本発明は、配列番号1、3、5、7および9のコード領域を含む単離されたDNA分子および他の核酸を実質的に含有しないDNA分子を含む。したがって、本発明は、配列番号1の271-975位、配列番号3の341-1171位、配列番号5の796-1566位、配列番号7の869-1693位または配列番号9の457-1293位を含む配列を有する単離されたDNA分子および他の核酸を実質的に含有しないDNA分子を含む。

【0031】

また、配列番号1の271-975位、配列番号3の341-1171位、配列番号5の796-1566位、配列番号7の869-1693位または配列番号9の457-1293位を含むヌクレオチド配列を有する組換えDNAも含まれる。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットをコードする本発明の新規DNA配列は、全体的または部分的に、他のDNA配列(すなわち、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットが天然では結合していないDNA配列)と結合して、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットをコードする「組換えDNA分子」を形成しうる。そのような他の配列は、転写または翻訳を制御するDNA配列、例えば、翻訳開始配列、IRES(internal ribosome entry sites)、RNAポリメラーゼIIのプロモーター、転

写または翻訳終結配列、エンハンサー配列、微生物における複製を制御する配列、抗生物質耐性を付与する配列、またはポリペプチド「タグ」（例えば、ポリヒスチジン領域、FLAGエピトープ、mycエピトープ、GSTまたはマルトース結合タンパク質）をコードする配列を含みうる。本発明の新規DNA配列は、プラスミド、コスミド、ウイルスベクター、P1人工染色体、酵母人工染色体などのベクター内に挿入することができる。

【0032】

本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットのゲノム配列を含む、他の核酸を実質的に含有しないDNAならびに単離された及び/又は組換えDNAを含む。本発明は、配列番号20、配列番号20の1-40, 467位、配列番号20の17, 404-17, 806位、配列番号20の24, 710-25, 507位、配列番号20の32, 590-33, 514位、配列番号20の33, 515-33, 705位、または配列番号20の1-17, 404位を含む、他の核酸を実質的に含有しないDNAならびに単離された及び/又は組換えDNAを含む。

【0033】

本発明には、高いストリンジェンシーの条件下で配列番号1、3、5、7、9または20の少なくとも1つにハイブリダイズするDNA配列が含まれる。例えば、高いストリンジェンシーの条件を用いる方法は、以下のとおりであるが、それらに限定されるものではない。DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを、5×SSC、10×デンハルト液、50%ホルムアミド、2% SDSおよび100 μg/ml 変性サケ精子DNAを含むバッファー中、65 °Cで2時間～一晩行なう。³²P標識ランダムプライムドプローブのハイブリダイゼーションを、5×SSPE、10×デンハルト液、50%ホルムアミド、2% SDSおよび100 μg/ml サケ精子DNA中、42 °Cで一晩行なう。2×SSC、0.05% SDS中、42 °Cで40分間、ついで0.1×SSC、0.05% SDS中、65 °Cで40分間、洗浄を行なう。

【0034】

高いストリンジェンシーの条件を用いる他の方法は、5×SSC、5×デンハ

ルト液、50%ホルムアミド中、42で12~48時間行なうハイブリダイゼーション、または0.2×SSPE、0.2% SDS中、65で30~60分間行なう洗浄工程を含むであろう。

【0035】

高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを行なうための前記方法で挙げた試薬は当技術分野でよく知られている。これらの試薬の組成の詳細は、例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。前記のもの以外の使用可能な他の高いストリンジェンシー条件は当技術分野でよく知られている。

【0036】

遺伝暗号の縮重のため、2種のアミノ酸を除く全てのアミノ酸に関しては、2以上のコドンが特定のアミノ酸をコードする。このため、配列番号1、3、5、7または9のヌクレオチド配列とは有意に異なるが配列番号2、4、6、8または10と同じヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を尚もコードする合成DNAヌクレオチド配列を有するヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質コード化合成DNAの構築が可能となる。そのような合成DNAは本発明の範囲内にあると意図される。

【0037】

配列番号1、3、5、7または9の突然変異形態は本発明の範囲内にあると意図される。特に、野生型カルシウム感受性カリウムチャンネルと比較して改変された電位依存性、カルシウム感受性、電流速度論（例えば、活性化、不活性化または非活性化）または薬理学的特性を有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを該サブユニットと一緒にした場合に与える又はサブユニットと相互作用しないタンパク質をコードする配列番号1、3、5、7または9の突然変異形態は、本発明の範囲内にあると意図される。そのような突然変異形態は、ヌクレオチドの欠失、置換または付加を有することにより、配列番号1、3、5、7ま

たは9とは異なりうる。

【0038】

また、配列番号1、3、5、7または9に対応する配列を有するRNA分子も、本発明の範囲内にあると意図される。配列番号1、3、5、7または9またはそれらの一部の逆相補体であるアンチセンスヌクレオチド、DNAまたはRNAも、本発明の範囲内である。また、少数の位置が非天然または修飾ヌクレオチド（例えば、イノシン、メチル-シトシンまたはデアザ-グアノシン）で置換された配列番号1、3、5、7または9に基づくポリヌクレオチドは、本発明の範囲内にあると意図される。本発明のポリヌクレオチドはまた、該ヌクレオチド間に非天然連結が存在する配列番号1、3、5、7または9に基づく配列を含みうる。そのような非天然連結は、例えば、メチルホスファート、ホスホロチオアート、ホスホロジチオナート、ホスホロアミジットおよびホスファートエステルでありうる。本発明のポリヌクレオチドはまた、ヌクレオチド間の架橋としてデ-ホスホ結合、例えばシロキサソ、カルボナート、カルボキシメチルエステル、アセトアミダート、カルバマートおよびチオエーテル架橋を有する配列番号1、3、5、7または9に基づく配列を含みうる。存在しうる他のヌクレオチド間連結は、N-ビニル、メタクリルオキシエチル、メタクリルアミドまたはエチレンイミン連結を含む。配列番号1、3、5、7または9に基づくペプチド核酸も、本発明に含まれる。

【0039】

本発明のもう1つの態様は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質をコードするDNA配列を含有および/または発現するように操作された宿主細胞を含む。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を産生させるために、そのような組換え宿主細胞を適当な条件下で培養することができる。また、そのような組換え宿主細胞は、本明細書に記載のカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターの同定方法において有用である。組換え宿主細胞内でヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニット

タンパク質を発現させるために、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターを使用することができる。組換え宿主細胞は、原核性または真核性であることが可能であり、それらには、大腸菌 (*E. coli*) などの細菌、酵母などの真菌細胞、ヒト、ウシ、ブタ、サルおよびげっ歯類由来の細胞系を含む (これらに限定されるものではない) 哺乳類細胞、ツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞などの両生類細胞、およびショウジョウバエ (*Drosophila*) およびカイコに由来する細胞系を含む (これらに限定されるものではない) 昆虫細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質の組換え発現に適した広く入手可能な細胞および細胞系には、L細胞 L-M (TK⁻) (ATCC CCL 1.3)、L細胞 L-M (ATCC CCL 1.2)、293 (ATCC CRL 1573)、Raji (ATCC CCL 86)、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127I (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、MRC-5 (ATCC CCL 171)、CPAE (ATCC CCL 209)、Saos-2 (ATCC HTB-85)、ARPE-19 ヒト網膜色素上皮 (ATCC CRL-2302)、ツメガエル (*Xenopus*) 黒色素胞およびツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0040】

哺乳類細胞内で組換えヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を発現させるためには、種々の哺乳類発現ベクターを使用することができる。商業的に入手可能な適当な哺乳類発現ベクターには、pMC1neo (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、pcDNAI および pcDNAIamp、pcDN

A3、pcDNA3.1、pCR3.1 (Invitrogen)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pIZD35 (ATCC 37565) および pSV2-dhfr (ATCC 37146) が含まれるが、これらに限定されるものではない。もう1つの適当なベクターとしては、PT7TS卵母細胞発現ベクターが挙げられる。

【0041】

組換え細胞内での発現後、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を、他のタンパク質を実質的に含有しないレベルにまで通常の技術により精製することができる。使用しうる技術には、硫酸沈殿、疎水性または親水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、分取ゲル電気泳動およびアルコール沈殿が含まれる。いくつかの場合には、そのような技術に加えてタンパク質の変性および/またはリフォールディング工程を用いるのが有利かもしれない。

【0042】

ある種の電位依存性カリウムチャンネルサブユニットは、高レベルで適切に発現され膜内に挿入されるためには、他の電位依存性カリウムチャンネルサブユニットの発現を要する。例えば、KCNQ3の共発現は、ツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞におけるKCNQ2の発現を増強するらしい (Wangら, 1998, *Science* 282:1890-1893)。また、いくつかの電位依存性カリウムチャンネルKv1サブユニットは他の関連サブユニット (JeglaおよびSalzko, 1997, *J. Neurosci.* 17:32-44) またはKv2サブユニット (Shiら, 1995, *Neuron* 16:843-852) を要する。したがって、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質の

組換え発現は、ある条件下では、他のタンパク質の共発現から利益が得られることがあり、そのような共発現は本発明の範囲内にあると意図される。特に好ましい共発現形態は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質（またはその組合せ）とヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットタンパク質との共発現である。そのような共発現は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする発現ベクターを、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットタンパク質を天然で発現する細胞内にトランスフェクトすることにより行うことができる。あるいは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする発現ベクターを、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットをコードする発現ベクターもトランスフェクトされている細胞内にトランスフェクトすることができる。好ましくは、そのような細胞は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル または サブユニットを天然では発現しない。

【0043】

本発明は、他のタンパク質を実質的に含有しないヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含む。完全長ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質の推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号2、4、6、8および10に示されている。したがって、本発明は、アミノ酸配列配列番号2、配列番号4、セリンの代わりにアスパラギンを163位に有する配列番号4、配列番号6、アスパラギンの代わりにセリンを143位に有する配列番号6、配列番号8、セリンの代わりにアスパラギンを161位に有する配列番号8、配列番号10およびアスパラギンの代わりにセリンを165位に有する配列番号10を有する、他のタンパク質を実質的に含有しないヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含む。本発明はまた、アミノ酸配列配列番号2、配列番号4、セリンの代わりにアスパラギンを163位に有する配列番号4、配列番

号6、アスパラギンの代わりにセリンを143位に有する配列番号6、配列番号8、セリンの代わりにアスパラギンを161位に有する配列番号8、配列番号10およびアスパラギンの代わりにセリンを165位に有する配列番号10を有する、単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含む。

【0044】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質の突然変異形態は、本発明の範囲内であると意図される。特に、サブユニットと一緒にした場合に改変された電気生理学的または薬理学的特性を有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを与える配列番号2、4、6、8および10の突然変異形態は、本発明の範囲内である。

【0045】

多数の受容体タンパク質の場合と同様、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質のアミノ酸の多数を修飾し、それでもなお、元のタンパク質と実質的に同じ生物活性を保有させることが可能である。したがって、本発明は、アミノ酸の欠失、付加または置換を有するが天然に存在するヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質と実質的に同じ生物活性を依然として保有する修飾されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cおよび 3 dサブユニットタンパク質を含む。単一のアミノ酸の置換は通常はタンパク質の生物活性を改変しないことが、一般に認められている(例えば、Molecular Biology of the Gene, Watsonら, 1987, 第4版, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., p. 226; および Cunningham & Wells, 1989, Science 244: 1081-1085を参照されたい)。したがって、本発明は、配列番号2、4、6、8または10において1つのアミノ酸置換が施されているポリペプチドであって、天然に存在するヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質と実質的に

同じ生物活性を依然として保有するポリペプチドを含む。本発明はまた、配列番号2、4、6、8または10において2以上のアミノ酸置換が施されているポリペプチドであって、天然に存在するヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質と実質的に同じ生物活性を依然として保有するポリペプチドを含む。特に、本発明は、前記置換が同類置換である実施形態を含む。特に、本発明は、保存された位置には前記置換が存在しない実施形態を含む。保存された位置は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル1、2および任意の3サブユニットのすべてが同一アミノ酸を有する位置である(図6を参照されたい)。

【0046】

本発明のヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質は、翻訳後修飾、例えば、共有結合した炭水化物、リン酸化、ミリストイル化、パルミトイル化などを含有しうる。

【0047】

本発明はまた、キメラヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含む。キメラヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質からのものではないポリペプチド配列に融合したヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質の少なくとも一部の連続的ポリペプチド配列よりなる。

【0048】

本発明はまた、単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質、およびこれらの単離されたサブユニットをコードするDNAを含む。「単離(された)」なる語の使用は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質またはDNAが、その通常の細胞環境から取り出されていることを示す。したがって、単離されたヒトカルシウム感受性

カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質は無細胞溶液中に存在していたり、あるいはそれが天然に存在する場合の環境とは異なる細胞環境中に存在しうる。単離（された）なる語は、単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質が、存在する唯一のタンパク質であることを意味するものではなく、単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質に天然で付随する非アミノ酸物質（例えば、核酸、脂質、炭水化物）から少なくとも95%フリーであることを意味する。例えば、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質のうち、それを天然（すなわち、ヒトの介入の不存在下）では発現しない細菌内または更には真核細胞内で組換え手段により発現されたものは、「単離されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質」である。

【0049】

ある種のカリウムチャンネルサブユニットは相互作用してヘテロマー構造を形成し、それにより機能的カリウムチャンネルを与えることが公知である。例えば、KCNQ2とKCNQ3とが集合してヘテロマー機能的カリウムチャンネルを形成しうる（Wangら, 1998, Science 282:1890-1893）。したがって、本発明のヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質も、機能的カリウムチャンネルを構成するヘテロマー構造を他のタンパク質と共に形成しうる可能性があると考えられる。したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含むそのようなヘテロマーを含む。好ましいヘテロマーは、本発明のヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質がカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットとヘテロマーを形成しているものである。

【0050】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードするDNAは、当技術分野でよく知られた方法により得ることができる。例えば、完全長ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットタンパク質をコードするcDNA断片は、適当なプライマー対を使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いることによりヒトの子宮、卵巣または脾臓から単離することができる。そのようなプライマー対は、図1Aに配列番号1として示すヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2 サブユニットタンパク質のDNA配列に基づいて選択することができる。適当なプライマー対としては、例えば以下のものが挙げられるであろう：

5' - AAG ATG TTT ATA TGG ACC AGT GGC - 3'
' (配列番号12)

および

5' - ACT CAT AAC AGA CTG CAC GTT AC - 3'
(配列番号13)。

【0051】

前記および後記のプライマーは例示的なものであるにすぎない。当業者は、配列番号1に基づき、他の適当なプライマーを容易に設計することが可能であると認識するであろう。そのようなプライマーは、当技術分野でよく知られたオリゴヌクレオチド合成方法により製造されうるであろう。

【0052】

同様にして、本発明の他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットタンパク質に関するPCRプライマーを選択し製造することができる。例えば、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 aに関しては、適当なプライマー対としては、例えば以下のものが挙げられるであろう：

5' - GTC ATG CAG CCC TTC AGC ATC CC - 3'
(配列番号14)

および

5' - TTG CAG AAA TCA CAG ACA TCT GAA - 3'

' (配列番号15)。

【0053】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3aサブユニットが単離されうる
適当なcDNA鋳型は、ヒト心臓、骨格筋または脾臓cDNAである。

【0054】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3bサブユニットに関しては、適
当なプライマー対としては、例えば以下のものが挙げられるであろう：

5' - GCA ATG ACA GCC TTT CCT GCC TC - 3'

(配列番号16)

および

5' - TTG CAG AAA TCA CAG ACA TCT GAA - 3'

' (配列番号15)。

【0055】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3bサブユニットが単離されうる
適当なcDNA鋳型は、ヒト脾臓cDNAである。

【0056】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3cサブユニットに関しては、適
当なプライマー対としては、例えば以下のものが挙げられるであろう：

5' - GAA ATG TTC CCC CTT CTT TAT GAG - 3'

' (配列番号17)

および

5' - TTG CAG AAA TCA CAG ACA TCT GAA - 3'

' (配列番号15)。

【0057】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3cサブユニットが単離されうる
適当なcDNA鋳型は、ヒト膵臓または脾臓cDNAである。

【0058】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3dサブユニットに関しては、適
当なプライマー対としては、例えば以下のものが挙げられるであろう：

5' - GAG ATG GAC TTT TCA CCA AGC TCT - 3

' (配列番号18)

および

5' - TTG CAG AAA TCA CAG ACA TCT GAA - 3

' (配列番号15)。

【0059】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 3dサブユニットが単離されうる
適当なcDNA鋳型は、ヒト膵臓または脾臓cDNAである。

【0060】

Ampli Taq、Ampli Taq GoldまたはVentポリメラーゼ
を含む(これらに限定されるものではない)種々の熱安定酵素でPCR反応を行
なうことができる。Ampli Taqの場合には、10mM Tris - Cl ,
pH 8.3、2.0mM MgCl₂、200μMの各dNTP、50mM K
Cl、0.2μMの各プライマー、10ngのDNA鋳型、0.05単位/μl
のAmpli Taq中で反応を行なうことができる。該反応を95 で3分間加
熱し、ついで95 で20秒間、62 で20秒間、72 で3分間のサイクリ
ングパラメーターを用いる25サイクルに付す。これらの条件に加えて、適当な
種々のPCRプロトコールがPCR Primer, A Laboratory
Manual, C.W. DieffenbachおよびG.S. Dveks
ler編, 1995, Cold Spring Harbor Laborat
ory Press、またはPCR Protocols: A Guide to
Methods and Applications, Michaelら編
, 1990, Academic Pressに記載されている。

【0061】

本発明のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットはお互いに及び他
のカリウムチャンネルサブユニットに対して高度に相同性であるため、所望のカ
ルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットが実際に得られたことを確認
するために、本明細書に記載の方法により得られたクローンを配列決定すること
が望ましい。

【0062】

これらの方法により、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする cDNA クローンを得ることができる。これらの cDNA クローンを、適当なクローニングベクターまたは発現ベクター、哺乳類発現ベクター p cDNA 3.1 (Invitrogen, San Diego, CA) 内にクローニングすることができる。ついでヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質またはその一部をコードする発現ベクターを適当な宿主細胞内に導入し、該宿主細胞を適当な条件下で培養することにより、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を製造することができる。ついで、当技術分野でよく知られた方法により、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を単離することができる。

【0063】

前記 PCR 法に代わる方法としては、オリゴヌクレオチドプローブで cDNA ライブラリーをスクリーニングするための当技術分野でよく知られた方法を用い各ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質に特異的なオリゴヌクレオチドをプローブとして使用して、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする cDNA クローンを cDNA ライブラリーから単離することができる。そのような方法は、例えば、Sambrook ら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. (編), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U. K., Vol. I, II に記載されている。特定のヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユ

ニットに特異的でcDNAライブラリーのスクリーニングに使用されうるオリゴヌクレオチドは、図1～5に示すDNA配列に基づき容易に設計することができ、当技術分野でよく知られた方法により合成することができる。

【0064】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子を含むゲノムクローンは、Research Genetics, Huntsville, ALから商業的に入手可能なヒトPAC、YACまたはBACライブラリーから得ることができる。あるいは、本明細書に開示するヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットDNA配列に基づくプローブを使用して、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子を含むゲノムクローンを単離されうるゲノムライブラリー（例えば、P1人工染色体ベクター中のもの）を調製することができる。そのようなライブラリーの調製方法は当技術分野で公知である（例えば、Ioannouら, 1994, Nature Genet. 6: 84-89を参照されたい）。

【0065】

本発明の新規DNA配列は、種々の診断方法において使用することができる。本発明は、ある患者がヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子の1以上における突然変異を保持するか否かを判定するための診断方法を提供する。広い意味では、そのような方法は、該患者からのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子の1以上の中の又はその近傍の領域のDNA配列を決定し、その配列を、非罹患者（すなわち、診断されている状態を有さない者）からのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子の対応領域からの配列と比較することを含み、該患者からの遺伝子のDNA配列と該非罹患者からの遺伝子のDNA配列との配列における相違は、該患者がヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニット遺伝子の1

以上における突然変異を有することを示す。

【0066】

本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットを有する突然変異形態を有する患者を同定するための診断方法において、またはヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットをコードするRNAの発現レベルを測定するために、またはヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットに相同な遺伝子を単離するために使用しうる、配列番号1、3、5、7、9または20の配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブを提供する。特に、本発明は、配列番号1、3、5、7、9および20よりなる群から選ばれる配列の少なくとも約10、15または18個の連続的ヌクレオチドを含むDNAオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドプローブは、前記の少なくとも約10、15または18個の連続的ヌクレオチド以外は、配列番号1、3、5、7、9および20よりなる群から選ばれる配列の5個を超える連続的ヌクレオチドの伸長を含まない。該オリゴヌクレオチドは、他の核酸を実質的に含有しないことが可能である。本発明はまた、対応RNAオリゴヌクレオチドを提供する。該DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドは、プローブとしての使用のためにキット中にパッケージ化されうる。

【0067】

本発明は、種々の細胞型におけるヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質の組換え発現を可能にする。

【0068】

該ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットは、それら単独で、または大きなコンダクタンスのカルシウム感受性カリウムチャンネル(maxi-Kチャンネル)のサブユニットと共に、ツメガエル(Xenopus)卵母細胞内で発現されている。該サブユニットは、単独では電流を発現しない。しかし、該2、3 aおよび3 cサブユニットは、該サブユニットと共発現された場合には、カルシウム感受

性カリウム電流の不活性化を誘導する(図7)。2、3aおよび3cサブユニットにより生じる不活性化の速度は電位および内部カルシウム濃度に左右され、不活性化時間定数は、2、3aおよび3cサブユニットに関しては高い脱分極および高いマイクロモル濃度のカルシウムにおいて最大に達し、 $30\ \mu\text{M}$ 細胞内 Ca^{2+} で $80\ \text{mV}$ において $t_{\text{inact}} \sim 30 - 40\ \text{ms}$ である。

マイクロモル濃度の細胞内 Ca^{2+} の存在下で得られた電流-電位依存性の測定は、2サブユニットが活性化の電位依存性における大きなシフトを誘発することを示している(バス内の $30\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} の存在下、負の電位に向けて $\sim 80\ \text{mV}$; 図7B)。このモジュレーション効果は、不活性化を誘発しない1サブユニットに関して既に記載されているものに類似している(McManusら, 1995, Neuron 14: 645-650)。これとは対照的に、2、3a、3cおよび3dサブユニットは、サブユニットだけを含有するチャンネルと比較した場合に該電位依存性をシフトさせない(図7B)。

【0069】

本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性を測定するアッセイの開発を可能にする。組換え的に発現されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を使用するそのようなアッセイに、特に関心が持たれる。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターである化合物を同定するために、化合物のライブラリーまたは他の化合物源をスクリーニングするために、そのようなアッセイを用いることができる。そのような同定された化合物は、カルシウム感受性カリウムチャンネル活性を増強または抑制することが有益である疾患を有する患者を治療するために使用しうる医薬の開発のための「リード体」として使用することができる。

【0070】

前記アッセイの変法においては、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル

2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを使用し、突然変異カルシウム感受性カリウムチャンネルの活性のインヒビターまたはアクチベーターを同定する。

【0071】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質の組換え発現のための好ましい細胞系は、内因性カリウムチャンネルを発現しない細胞系（例えば、CV-1、NIH-3T3、CHO-K1、COS7）である。そのような細胞系に、カリウムチャンネルを通過しうるイオンである⁸⁶Rbをローディングすることができる。⁸⁶Rbがローディングされた細胞を物質の集合体（例えば、組合せライブラリー、天然物、医化学的方法により製造されたリード化合物の類似体）にさらし、⁸⁶Rb流出を改変しうる物質を同定することができる。そのような物質は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであると考えられる。

【0072】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターは、カルシウム感受性カリウムチャンネルに結合しうる物質であると考えられる。したがって、1つのタイプのアッセイは、集合体の物質の1以上がそのような結合能を有するか否かを判定するものである。

【0073】

したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合する物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有する細胞を、カルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質にさらし、

(c) 該細胞への該物質の結合の量を測定し、

(d) 工程(c)における結合の量を、対照細胞(該対照細胞は、該対照細胞がヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を発現しないこと以外は、工程(a)の細胞と実質的に同一である)への該物質の結合の量と比較することを含んでなり、

工程(c)における結合の量が対照細胞への該物質の結合の量より多い場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合するものであることを特徴とする方法を提供する。

【0074】

このアッセイのもう1つの変法は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られている化合物を使用する。それが該既知化合物の結合を増強、阻害または置換する能力により、新規結合体を同定する。この能力を有する物質はそれ自身が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターであると考えられる。

【0075】

したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合し従ってヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうる物質の同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3

cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を準備し、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られている化合物に、該細胞をさらし、

(c) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られていない物質の存在下および不存在下、該細胞への該化合物の結合の量を測定することを含んでなり、

該物質の存在下の該化合物の結合の量が該物質の不存在下の場合と異なる場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、

3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合しヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、

3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターでありうることを特徴とする方法を含む。

【0076】

一般には、該既知化合物を標識（例えば、放射能、酵素的、蛍光的標識）して、カルシウム感受性カリウムチャンネルへのその結合の測定を容易にする。

【0077】

前記方法により物質を同定したら、それがインヒビターまたはアクチベーターであるか否かを判定するために、それを機能的試験（例えば、本明細書に記載のもの）においてアッセイすることができる。

【0078】

特定の実施形態においては、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルに結合することが知られている化合物は、カリブドトキシン、イベリオトキシン (iberiotoxin) およびデヒドロソヤサポニンよりなる群から選ばれる、

【0079】

本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターの同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質または突然変異ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を宿主細胞内で組換え的に発現させ、それにより、その組換え的に発現したヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質に、他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットタンパク質とのヘテロマーを形成させることにより、カルシウム感受性カリウムチャンネルを形成させ、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであると疑われる物質の存在下および不存在下、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性を測定することを含んでなり、

該物質の不存在下と比較した場合の該物質の存在下の、工程 (a) で形成したカルシウム感受性カリウムチャンネルの生物活性の変化が、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであることを示すことを特徴とする方法を含む。

【0080】

カルシウム感受性カリウムチャンネルの他のサブユニット (例えば、サブユニット) を組換え的に発現させることが有利かもしれない。あるいは、そのような他のサブユニットを内因的に発現する宿主細胞を使用することが有利かもしれない。

【0081】

特定の実施形態においては、該生物活性は、カルシウム感受性カリウム電流の

生成、FRETシグナルまたは⁸⁶Rbの流出である。

【0082】

特定の実施形態においては、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質をコードするベクターをツメガエル(Xenopus)卵母細胞内に導入して、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を該卵母細胞内で発現させる。あるいは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質をコードするRNAをインビトロで調製し、該卵母細胞内に注入することによっても、該卵母細胞内でヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を発現させることができる。該卵母細胞内でのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質の発現後、およびこれらのサブユニットと他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニット(その「他の」サブユニットも該卵母細胞内に導入されうる)とを含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルの形成後、膜電位および/または内部カルシウム濃度を数工程で変化させた後、膜電流を測定する。該カルシウム感受性カリウムチャンネルが開く又は閉じてカリウムイオンの流動がそれぞれ可能となった又は阻止された場合に、膜電流の変化が認められる。KCNQ2およびKCNQ3カリウムチャンネルに関する同様の卵母細胞研究が、Wangら, 1998, Science 282:1890-1893に報告されており、この参考文献およびそこに引用されている参考文献は、そのような研究の実施方法の指針の参考となりうる。

【0083】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターは、該卵母細胞を物質の集合体にさらし、該物質の不存在下で認められる膜電流を該物質が遮断もしくは減弱または活性化もしくは増強しうるか否かを判定することにより同定することができる。

【0084】

したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターの同定方法であって、

(a) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を異種系内で発現させて、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを形成させ、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターであると疑われる物質の存在下および不存在下、該卵母細胞の膜電位または内部カルシウム濃度を変化させ、

(c) 工程 (b) の後に膜カリウム電流を測定することを含んでなり、

工程 (c) において測定した膜カリウム電流が該物質の存在下より不存在下で大きい場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターであり、

工程 (c) において測定した膜カリウム電流が該物質の存在下より不存在下で小さい場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターであることを特徴とする方法を提供する。

特定の実施形態においては、該異種系は、ツメガエル (*Xenopus*) 卵母細胞および哺乳類細胞系よりなる群から選ばれる。

【0085】

本発明はまた、第1蛍光色素と第2蛍光色素との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感

受性カリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターの同定のためのアッセイを含み、この場合、該第1色素は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞の形質膜の一方の側に結合し、該第2色素は、膜電位の変化に応答して該膜の一方の面から他方の面へ自由に往復できる。ある実施形態においては、該第1色素は該細胞の形質膜に不透過性であり、主に形質膜の細胞外表面に結合する。該第2色素は形質膜内に捕捉されるが、該膜内で自由に拡散できる。該膜の通常の(すなわち、負の)静止電位においては、該第2色素は主に形質膜の細胞外面の内部表面に結合し、したがって該第2色素は該第1色素に接近して位置する。この接近性は、それらの2つの色素の間の大量のFRETの生成を可能にする。膜の脱分極の後、該第2色素は該膜の細胞外面から細胞内面に移動し、それらの色素の間の距離が増加する。この距離の増加は、FRETの減少およびそれに対応した、該第1色素由来の蛍光発光の増加、およびそれに対応した、該第2色素からの蛍光発光の減少につながる。このようにして、それらの2つの色素間のFRETの量を用いて、該膜の分極状態を測定することができる。この技術の更に詳細な説明については、GonzalezおよびTsien, 1997, Chemistry & Biology 4: 269-277を参照されたい。また、GonzalezおよびTsien, 1995, Biophys. J. 69: 1272-1280および米国特許第5,661,035号も参照されたい。

【0086】

ある実施形態においては、該第1色素は、蛍光供与体として作用する蛍光性レクチンまたは蛍光性リン脂質である。そのような第1色素の具体例としては、クマリン標識ホスファチジルエタノールアミン(例えば、N-(6-クロロ-7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボキサミドアセチル)-ジミリストイルホスファチジル-エタノールアミン)またはN-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン); 蛍光標識レクチン(例えば、フルオレセイン標識コムギ胚芽凝集素)が挙げられる。ある実施形態においては、該第2色素は

、蛍光受容体として作用するオキソノールである。そのような第2色素の具体例としては、ビス(1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート)トリメチンオキソノール(例えば、ビス(1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート)トリメチンオキソノール)またはペンタメチンオキソノール類似体(例えば、ビス(1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート)ペンタメチンオキソノール);またはビス(1,3-ジブチル-2-チオバルビツラート)ペンタメチンオキソノール)が挙げられる。本発明での使用に適した種々の色素の合成方法に関しては、GonzalezおよびTsien, 1997, Chemistry & Biology 4:269-277を参照されたい。ある実施形態においては、該アッセイは、一重項酸素による光力学損傷を軽減するための天然カロテノイド(例えば、アスタキサンチン)を含みうる。

【0087】

前記アッセイは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターを見出すために用いることができる。そのようなアッセイでは、一般には、例えば、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質と所望により他のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットとをコードする発現ベクターでのトランスフェクションによりヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを発現する細胞を使用する。そのような細胞においては、該膜電位の脱分極および細胞内カルシウム濃度の増加は、該カルシウム感受性カリウムチャンネルを開口させる傾向にあるであろう。これはカリウム流出を引き起こし、該脱分極に抗する傾向にあるであろう。すなわち、該細胞は再分極する傾向にあるであろう。該カルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターの存在は、この再分極を妨害または減弱させるであろう。したがって、インヒビターの存在下では、膜電位は、より正になる(すなわち、脱分極する)傾向にあるであろう。該カルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターはこのチャンネルを開口して、該膜電位を過分極

させる傾向にあるであろう。カルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターおよびアクチベーターにより引き起こされる膜電位（脱分極および過分極）の変化は、前記のFRETを用いるアッセイによりモニターすることができる。

【0088】

したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターの同定方法であって、

(a) 試験細胞を準備し（該試験細胞は、

(1) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを該細胞内で形成するように、該細胞内でのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質の発現を指令する発現ベクター、

(2) 該細胞の形質膜の一方の側に結合している第1蛍光色素、および

(3) 膜電位の変化にตอบสนองして該細胞の形質膜の一方の面から他方の面へ自由に往復できる第2蛍光色素を含む）、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターであると疑われる物質に該試験細胞をさらし、

(c) 該物質にさらされた試験細胞における蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の量を測定し、

(d) 該物質にさらされた試験細胞により示されたFRETの量を、対照細胞により示されたFRETの量と比較することを含んでなり、

該試験細胞により示されたFRETの量が、該対照細胞により示されたFRETの量より多い場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 cまたは 3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターであり、

該対照細胞が、(1)それが(a)(1)~(3)に記載の事項の少なくとも1つを含まないこと以外は該試験細胞と実質的に同じであるが、該物質にさらさ

れた細胞、または(2)該物質にさらされていない試験細胞であることを特徴とする方法を提供する。

【0089】

本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターの同定方法であって、

(a) 試験細胞を準備し(該試験細胞は、

(1) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを該細胞内で形成するように、該細胞内でのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質の発現を指令する発現ベクター、

(2) 該細胞の形質膜の一方の側に結合している第1蛍光色素、および

(3) 膜電位の変化に应答して該細胞の形質膜の一方の面から他方の面へ自由に往復できる第2蛍光色素を含む)、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターであると疑われる物質に該試験細胞をさらし、

(c) 該物質にさらされた試験細胞における蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の量を測定し、

(d) 該物質にさらされた試験細胞により示されたFRETの量を、対照細胞により示されたFRETの量と比較することを含んでなり、

該試験細胞により示されたFRETの量が、該対照細胞により示されたFRETの量より少ない場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターであり、

該対照細胞が、(1)それが(a)(1)~(3)に記載の事項の少なくとも1つを含まないこと以外は該試験細胞と実質的に同じであるが、該物質にさらされた細胞、または(2)該物質にさらされていない試験細胞であることを特徴と

する方法を提供する。

【0090】

前記アッセイの変法においては、該細胞の膜電位をそれ自身で定常状態に到達させる代わりに、該膜電位を、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルが開く電位に人工的に設定する。これは、例えば、公知方法で外部 K^+ 濃度を変化（例えば、外部 K^+ 濃度を増加）させることにより行なうことができる。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルが開いたそのような細胞をインヒビターにさらすと、該カルシウム感受性カリウムチャンネルは遮断され、該細胞の膜電位は脱分極するであろう。この脱分極は FRET の減少として観察されうる。

【0091】

前記アッセイの変法においては、該細胞の膜電位をそれ自身で定常状態に到達させる代わりに、別の脱分極電流の共発現により、該膜電位を、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルが開く電位に人工的に設定する。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルが開いたそのような細胞をインヒビターにさらすと、該カルシウム感受性カリウムチャンネルは遮断され、該細胞の膜電位は脱分極するであろう。この脱分極は FRET の減少として観察されうる。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルが開いたそのような細胞をアクチベーターにさらすと、該カルシウム感受性カリウム電流と追加的な脱分極電流とのバランスが変化し（すなわち、該カルシウム感受性カリウム電流は、全電流に大きな寄与をするであろう）、該細胞の膜電位は過分極するであろう。この分極は FRET の増加として観察されうる。

【0092】

したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターの同定方法であって、

(a) 細胞を準備し (該細胞は、

(1) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルを該細胞内で形成するように、該細胞内でのヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質の発現を指令する発現ベクター、

(2) 該細胞の形質膜の一方の側に結合している第 1 蛍光色素、および

(3) 膜電位の変化に应答して該細胞の形質膜の一方の面から他方の面へ自由に往復できる第 2 蛍光色素を含む)、

(b) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルにより形成されたイオンチャンネルが開くように、該細胞の膜電位を調節し、

(c) 該試験細胞における蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) の量を測定し、

(d) ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターであると疑われる物質に該細胞をさらしながら、工程 (b) および工程 (c) を繰返すことを含んでなり、

該物質にさらされた細胞により示された F R E T の量が、該物質にさらされていない細胞により示された F R E T の量と異なる場合、該物質が、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターまたはアクチベーターであることを特徴とする方法を提供する。

前記方法の特定の実施形態においては、該細胞は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質をコードする発現ベクターを含有する。前記方法の特定の実施形態においては、該発現ベクターを該試験細胞内にトランスフェクトする。

【0094】

前記方法の特定の実施形態においては、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質は、配列番号 2、4、6、8 および 10 よりなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する。

【0095】

前記方法の特定の実施形態においては、該第1蛍光色素は、蛍光性レクチン、蛍光性リン脂質、クマリン標識ホスファチジルエタノールアミン、N-(6-クロロ-7-ヒドロキシ-2-オキソ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボキサミドアセチル)-ジミリストイルホスファチジル-エタノールアミン)、N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン) およびフルオレセイン標識コムギ胚芽凝集素よりなる群から選ばれる。

【0096】

前記方法の特定の実施形態においては、該第2蛍光色素は、蛍光受容体として作用するオキソノール、ビス(1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート)トリメチンオキソノール、ビス(1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート)トリメチンオキソノール、ビス(1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート)クワトラ(quatra)メチンオキソノール、ビス(1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート)ペンタメチンオキソノール、ビス(1,3-ジヘキシル-2-チオバルビツラート)ペンタメチンオキソノール、ビス(1,3-ジブチル-2-チオバルビツラート)ペンタメチンオキソノール、およびビス(1,3-ジアルキル-2-チオバルビツラート)ヘキサメチンオキソノールよりなる群から選ばれる。

【0097】

前記方法の特定の実施形態においては、該細胞は真核細胞である。もう1つの実施形態においては、該細胞は哺乳類細胞である。他の実施形態においては、該細胞は、L細胞L-M(TK⁻)(ATCC CCL 1.3)、L細胞L-M(ATCC CCL 1.2)、293(ATCC CRL 1573)、Raji(ATCC CCL 86)、CV-1(ATCC CCL 70)、COS-1(ATCC CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、CHO-K1(ATCC CCL 61)、3T3(ATCC CCL 92)、NIH/3T3(ATCC CRL 1658)、HeLa(ATCC CCL 2)、C127I(ATCC CRL 1616)、BS-C-1(ATCC CCL 26)、MRC-5(ATCC CCL 171)、ツメガエル(Xenopus)黒色素胞、またはツメガエル(Xenopus)卵母細胞である。

【0098】

前記方法の特定の実施形態においては、該対照細胞は(a)(1)項を含むが、(a)(2)および(a)(3)項を含まない。

【0099】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターを同定するためのアッセイにおいては、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質に加えて、もう1つのカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットを共発現させることが有利かもしれない。特に、カルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットを共発現させることが有利かもしれない。好ましくは、これは、そのもう1つのサブユニットをコードする発現ベクターを該細胞内にコトランスフェクトすることにより行う。適当な他のサブユニットとしては、例えば、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットh-s1o(GenBankアクセッション番号U11058)、マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニットm-s1o(GenBankアクセッション番号U09383)、小コンダクタンズカルシウム感受性カリウ

ム サブユニット (GenBank アクセション番号 U69883、U69882、AF031815)、または中間コンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャンネル サブユニット (GenBank アクセション番号 AF022797) が挙げられる。

【0100】

遺伝子近傍のゲノム配列の小さな領域は、しばしば、その遺伝子の転写を調節する。これらの配列は、シス作用要素 (エlement) と称される。これらの DNA 配列に結合する、該転写装置が該遺伝子に結合し又はそれを転写する能力に直接的に影響を及ぼすタンパク質は、トランス作用要素と称される。該シス作用転写調節要素は、ほとんどの場合は転写開始部位の 5' 側に位置するが、遺伝子の転写部分内またはその 3' 側にも位置している。転写速度に対するそれらの効果に応じて、これらの配列は、プロモーター、エンハンサーおよびリプレッサーの 3つの範疇に分類することができる。プロモーターは独立して、該遺伝子の転写を可能にし、一方、エンハンサーは転写速度を増加させるが、プロモーターの転写独立性を誘導し得ない。リプレッサー要素は、プロモーター要素により指令される転写を阻害する。これらの要素の同定方法は当技術分野でよく知られており、Ausubelら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology、第9.6-9.8節および第12.0-12.11節、John Wiley & Sons, New York, NYに記載されている。

【0101】

したがって、本発明の新規ゲノム配列 (配列番号 20、図8) および単離された BAC クローンは、1) 遺伝子発現の転写制御に必要な DNA 配列、2) 転写調節に関与するタンパク質、および 3) 該 3 遺伝子の転写速度をモジュレーションする化合物の同定方法を可能にする。そのようなアッセイでは、レポータータンパク質のオープンリーディングフレームの上流にてベクター内に挿入された配列番号 20 の 1 - 17, 436 位の部分を含む単離された及び / 又は組換え DNA を使用する。

【0102】

有用なレポータータンパク質は、アッセイされる細胞内では発現されず（あるいは、内因性タンパク質から容易に識別され）、転写産物の存在量と該レポータータンパク質の存在量との間に直線関係を有し、検出系の飽和と最小検出レベルとの間に大きなウィンドウを有するものである。理想的には、該レポータータンパク質の存在量は、酵素反応、蛍光検出、イムノアッセイまたは他の手段により迅速に測定される。典型的なレポータータンパク質には、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ホタルルシフェラーゼ、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、分泌アルカリホスファターゼ（SEAP）、ヒト成長ホルモン（hGH）、グリーン蛍光タンパク質（GFP）およびGFP誘導体が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらのタンパク質を含むレポーターベクターは、構成的プロモーター、エンハンサーまたはそれらの両方を含有する類似したレポーターベクター（Clontech）と同様、商業的に入手可能である。

【0103】

本発明は、3遺伝子の発現の転写調節に関与するヌクレオチド配列の同定方法を提供する。配列番号20の1-17, 436位からのDNAの少なくとも6個の連続的ヌクレオチドの断片をプロモーター-レポーターベクター内のレポーターcDNAの上流に挿入したら、ついで該ベクターを、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニット3a、3b、3cまたは3dの1以上を内因的に発現する又は発現しない細胞内にトランスフェクトする。プロモーター-レポーターベクターは、プロモーター、エンハンサー、それらの両方を含有することが可能であり、あるいはそれらのいずれをも含有しないことが可能である。ついでトランスフェクト化細胞を、存在するレポータータンパク質の量に関してアッセイする。トランスフェクション効率および転写速度は共に、レポータータンパク質レベルに直接的に影響を及ぼすため、構成的プロモーターの背後に異なるレポーターを含有する第2ベクター（モル比1:1）をコトランスフェクトしてトランスフェクト化細胞の割合を求めることにより該トランスフェクション効率を測定することが、これらのアッセイにおいて有用である。

【0104】

前記アッセイの変法においては、他のエンハンサーまたはプロモーター要素を有さない、レポーター cDNA の上流に挿入された配列番号 20 の断片を有するベクターを構築する。これらのベクター（配列番号 20 の断片を有する及び有さないもの）を、3 サブユニットを内因的に発現する細胞内にトランスフェクトする。カルシウム感受性カリウムチャンネル 3 サブユニットプロモーター要素を、親ベクターで認められるより高いレベルでこれらの 5' 遺伝子断片がレポーターの発現を刺激する能力により同定する。ついで、同定されたプロモーター断片の領域を順次欠失させ該アッセイを繰返すことにより、最低限要求されるプロモーター配列を同定する。

【0105】

該アッセイのもう 1 つの変法は、エンハンサー要素を含有するプロモーター - レポーターベクター内のレポーター cDNA の上流に挿入された配列番号 20 の断片を含む。これらのベクター（配列番号 20 の断片を有する及び有さないもの）を、3 サブユニットを内因的に発現する細胞内にトランスフェクトする。弱いカルシウム感受性カリウムチャンネル 3 サブユニットプロモーター要素を、親ベクターで認められるより高いレベルでこれらの 5' 遺伝子断片がレポーターの発現を刺激する能力により同定する。ついで、同定された弱いプロモーター断片の領域を順次欠失させ該アッセイを繰返すことにより、最低限要求される弱いプロモーター配列を同定することができる。

【0106】

該アッセイのもう 1 つの変法は、上流に構成的プロモーターを有するプロモーター - レポーターベクター内のレポーター cDNA の上流に挿入された配列番号 20 の断片を含む。これらのベクター（配列番号 20 の断片を有する及び有さないもの）を、3 サブユニットを内因的に発現しない細胞内にトランスフェクトする。カルシウム感受性カリウムチャンネル 3 サブユニットリプレッサー要素を、親ベクターで認められるより低いレベルでこれらの 5' 遺伝子断片がレポーターの発現を刺激する能力により同定する。ついで、同定されたリプレッサー断片の領域を順次欠失させ該アッセイを繰返すことにより、最低限要求されるリプレッサー配列を同定する。

【0107】

前記に鑑み、本発明は、遺伝子の転写を促進、増強または抑制する 3 遺伝子内のDNA配列の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化cDNA配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)が先行するように、プロモーター-レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定し、

(c) 工程(b)の細胞内のレポータータンパク質の存在量を、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片を有さないベクターでトランスフェクトされた細胞内のレポータータンパク質の存在量と比較することを含んでなり、

3a、3b、3cまたは3dサブユニットを内因的に発現する細胞内でのみ、他のプロモーター要素の不存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる 3 遺伝子のプロモーター領域の断片が、プロモーター要素であり；

3a、3b、3cまたは3dサブユニットを内因的に発現しない細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、レポータータンパク質の存在量を減少させる配列が、リプレッサー要素であり；3a、3b、3cまたは

3dサブユニットを内因的に発現させる細胞内で、無関係な構成的プロモーター要素の存在下、該レポータータンパク質の存在量を増加させる配列が、エンハンサー配列であることを特徴とする方法を提供する。

【0108】

特定の実施形態においては、該ベクターは、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片から独立して機能するプロモーターまたはエンハンサー配列要素を含有する。

【0109】

特定の実施形態においては、該レポータータンパク質の存在量を、トランスフェクト化細胞の割合に関して正規化する。

【0110】

これらの配列への核タンパク質の結合は、ゲルシフトアッセイにより確認する

ことができる。転写に影響を及ぼすのに必要な最小の配列に対応する放射能標識DNA断片を、該調節DNA要素を同定するのに使用した細胞または3サブユニットを内因的に発現する組織からの核タンパク質抽出物と共にインキュベートする。タンパク質因子がその配列に結合すると、ゲル内の移動度が変化して、該放射能標識断片のサイズにおける見掛け上のシフトが生じるであろう。

【0111】

転写因子は、しばしば、2以上の特異的ヌクレオチド配列を認識しうる。そのような場合、前記アッセイにおいて検出された転写に影響を及ぼす能力を保持する配列番号20の1-17, 436位における3遺伝子の転写調節に必要な最小プロモーター、エンハンサーまたはリプレッサーとして同定された配列の変異は、本発明に含まれると意図される。

【0112】

ついで、このようにして同定された最小プロモーター、エンハンサーまたはリプレッサーDNA断片を使用して、該3遺伝子の転写に影響を及ぼすタンパク質を同定し及び/又は単離することができる。いくつかの方法が当技術分野でよく知られており、それらのいくつかはAusubelら編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, 第12.0-12.11節, John Wiley & Sons, New York, NYに記載されている。

【0113】

1つの方法においては、前記のゲルシフトアッセイを、クローニングまたは精製された公知転写因子を使用して行って、転写調節に関与する配列にそれらが結合しうるか否かを判定することができる。あるいは、特定の転写因子を認識する抗体を該転写因子-DNA複合体に加えるスーパーシフトアッセイを行うことができる。該抗体が該転写因子に結合し、そしてそれが該放射能標識DNA断片に結合すると、ゲル内の該複合体の移動度が更に変化して、該DNA単独と比較してスーパーシフトが生じる。特異的転写因子または1つのクラスの転写因子を認識する抗体の使用は、3遺伝子の調節に関与する因子の同定を可能にする。前記アッセイにおいて記載のとおりゲルシフトまたはスーパーシフトを受ける能

力を保持する配列番号20の1-17, 436位における3遺伝子の転写調節に必要な最小プロモーター、エンハンサーまたはリプレッサーとして同定された配列の変異は、本発明に含まれると意図される。

【0114】

前記に鑑み、本発明は、遺伝子の転写を促進、増強または抑制する3遺伝子内のDNA配列の同定方法であって、

(a) 該3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

細胞からの核抽出物と共にインキュベートした後にゲル内で異なって移動する(「シフトを受ける」)3遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片が、3遺伝子の発現を促進、増強または抑制する核因子に結合するDNA配列であることを特徴とする方法を提供する。

【0115】

特定の実施形態においては、該3遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を、請求項18記載の方法により同定する。

【0116】

特定の実施形態においては、該細胞は3a、3b、3cまたは3dサブユニットを発現する。

【0117】

特定の実施形態においては、該細胞は3a、3b、3cまたは3dサブユニットを発現しない。

【0118】

本発明は、3遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であって、

(a) 該3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片を、クローニングまたは精製された転写因子と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

3 遺伝子のプロモーター配列要素に結合する因子が、該放射能標識 DNA 断片の移動におけるシフトを誘導し、該 3 遺伝子の転写調節に関与することを特徴とする方法を提供する。

【0119】

特定の実施形態においては、該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 18 または 21 記載の方法により同定する。

【0120】

本発明は、3 遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17, 436) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の放射能標識断片を、細胞からの核抽出物と共にインキュベートし、該インキュベーション物をゲル上で分離すること、

(b) 単一の転写因子または転写因子のファミリーを特異的に認識する抗体を工程 (a) のインキュベーション物に加え、ついで該インキュベーション物をゲル上で分離することを含んでなり、

工程 (a) と比較した場合の工程 (b) の二本鎖 DNA の移動度におけるスーパーシフトが、該抗体により認識される転写因子が該二本鎖 DNA に結合することを示すことを特徴とする方法を提供する。

【0121】

もう 1 つの方法においては、配列番号 20 の 1 - 17, 436 位に結合し転写を調節する転写因子を精製することができる。転写に影響を及ぼすのに必要な最小配列に対応する DNA 断片を、マトリックス (典型的にはアガロースビーズ) に共有結合させる。ついでこのマトリックスを、該最小要素に結合する因子を含有する細胞の核抽出物と共にインキュベートする。ついで該マトリックスを、非特異的タンパク質を除去するように洗浄し、該因子を過剰の該 DNA 要素で又は変性により溶出する。ついで、精製されたタンパク質をイムノアッセイ、タンパク質配列決定または他の手段により同定することができる。

【0122】

したがって、本発明は、 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子の同定方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 2 0 のヌクレオチド 1 - 1 7 , 4 3 6) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を安定なマトリックスに結合させ、

(b) 細胞からの核抽出物を該マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該核抽出物からの非結合タンパク質を該マトリックスから洗浄し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する過剰の二本鎖 DNA で、結合タンパク質を該マトリックスから溶出することを含んでなり、

工程 (d) からの溶出されたタンパク質が、 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子であることを特徴とする方法を提供する。

【 0 1 2 3 】

特定の実施形態においては、該方法は更に、工程 (d) からの溶出されたタンパク質をゲル上で分離し、該ゲルを染色して、該溶出タンパク質の純度を試験することを含む。

【 0 1 2 4 】

特定の実施形態においては、該方法は更に、該ゲル上で分離されたタンパク質を配列決定することを含む。

【 0 1 2 5 】

特定の実施形態においては、該方法は更に、ウエスタンブロットまたは免疫沈降により、該溶出タンパク質を同定するために、該ゲル上で分離されたタンパク質を公知転写因子に対する抗体で免疫学的に分析することを含む。

【 0 1 2 6 】

特定の実施形態においては、該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を、請求項 1 8 または 2 1 記載の方法により同定する。

【 0 1 2 7 】

もう一つのアプローチにおいては、配列番号 2 0 の 1 - 1 7 , 4 3 6 位に結合

する転写因子をコードするcDNAを、いくつかの方法によりクローニングすることができる。1つの変法においては、該最小DNA配列を放射能標識し、それを使用して、該3遺伝子を内因的に発現する組織または細胞系から作製された発現ライブラリーをスクリーニングする。該転写因子をコードするcDNAライブラリーを含有するファージを、該転写因子をその表面に標的化する融合タンパク質を発現するように誘導する。そのようなファージブランクを、該最小DNA配列を含有する放射能標識DNA配列へのその結合能により同定する。

【0128】

したがって、本発明は、3遺伝子の転写調節に関与する核因子をコードするクローンをクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの放射能標識断片で、発現ライブラリーをスクリーニングし、

(b) 該ライブラリーのいずれのクローンが二本鎖DNAの放射能標識断片に結合するのかを判定し、

(c) 工程(b)のクローンを増幅し、配列決定することを含んでなる方法を提供する。

【0129】

特定の実施形態においては、該3遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNA断片を、請求項18または21記載の方法により同定する。

【0130】

もう1つのクローニングアプローチでは、転写因子融合タンパク質を表面に発現するファージを使用する。このアプローチでは、該最小DNA配列をマトリックスに結合させる。ついでファージ発現ライブラリーを該マトリックスに通過させ、洗浄する。該転写因子を含有するファージだけが該マトリックスに結合する。結合したファージを過剰の最小DNA配列で溶出し、精製する。ついで、該転写因子をコードするcDNAを該ファージから単離し、配列決定する。

【0131】

したがって、本発明は、 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該 3 遺伝子のプロモーター領域 (配列番号 2 0 のヌクレオチド 1 - 1 7 , 4 3 6) 内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の断片を安定なマトリックスに結合させ、

(b) c DNA にコードされる融合タンパク質を表面に発現するファージを該マトリックスと共にインキュベートし、

(c) 該マトリックスに結合しないファージを洗浄により除去し、

(d) 該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖 DNA の過剰の断片で、該マトリックスに結合したファージを溶出することを含んでなり、

工程 (d) で溶出されたファージが、 3 遺伝子の転写調節に関与する核因子をコードすることを特徴とする方法を提供する。

【 0 1 3 2 】

特定の実施形態においては、該 3 遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する DNA を、請求項 1 8 または 2 1 記載の方法により同定する。

【 0 1 3 3 】

特定の実施形態においては、工程 (d) で溶出されたファージを増幅し、配列決定する。

【 0 1 3 4 】

もう 1 つの転写因子クローニングアプローチは、酵母「ワン (one) - ハイブリッド」法 (Clontech からキットとして入手可能) である。この方法においては、レポーターの上流に該最小要素のいくつかの (3 個が推奨される) コピーを含有する酵母株を作製する。c DNA ライブラリーは、酵母プロモーターの転写活性化ドメインとの融合タンパク質として発現される c DNA を各ベクターが含有するように作製する。したがって、関心のある DNA に特異的に結合する任意の融合タンパク質が該レポータータンパク質の発現を誘導するであろう。ついで、該 c DNA を含有するベクターを該酵母から分離し、配列決定する。

。

【0135】

したがって、本発明は、3遺伝子の転写調節に關与する核因子をクローニングにより同定する方法であって、

(a) 該3遺伝子のプロモーター領域(配列番号20のヌクレオチド1-17, 436)内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片の少数ないしは幾つかのコピーをレポータータンパク質コード化cDNAに先行して含有する酵母株を構築し、

(b) 該挿入cDNAおよび転写活性化ドメインによりコードされる融合タンパク質の形成を可能にするベクター中の細胞からのcDNAライブラリーを構築し、

(c) (b)のライブラリーを(a)の酵母株内に形質転換し、該レポータータンパク質の発現を示す酵母のコロニーを単離することを含んでなる方法を提供する。

【0136】

特定の実施形態においては、該3遺伝子のプロモーター領域内に見出される配列に対応する二本鎖DNAの断片を、請求項18または21記載の方法により同定する。

【0137】

特定の実施形態においては、該方法は更に、単離されたコロニーからベクターを精製し、該ベクター内のcDNAを配列決定することを含む。

【0138】

転写因子は、しばしば、2以上の特異的ヌクレオチド配列を認識しうるため、そのような場合、前記アッセイにおいて検出された転写因子が結合しうる最小プロモーター、エンハンサーまたはリプレッサーとして同定された配列の変異は、本発明に含まれると意図される。

【0139】

前記方法による3遺伝子発現の転写調節に關与するヌクレオチド配列の同定は、該3遺伝子の転写を増強または抑制する物質を同定するための物質の集合体のスクリーニングに使用しうるアッセイの開発を可能にする。転写調節に關与

することが示されている該 3 遺伝子のプロモーター領域（配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17 , 436）の断片を、適当なベクター内のレポーター遺伝子のコード配列に結合させ、ついで適当な細胞に導入する。該細胞内の該レポータータンパク質の存在量を測定する。ついで、該 3 遺伝子の転写速度を増強または抑制しうると疑われる化合物に、該細胞をさらす。該化合物が実際に該 3 遺伝子の転写速度を増強しうる場合には、該細胞が該化合物にさらされた場合の該レポータータンパク質の存在量が増加するであろう。逆に、該化合物が実際に該 3 遺伝子の転写速度を抑制しうる場合には、該細胞が該化合物にさらされた場合の該レポータータンパク質の存在量が減少するであろう。

【0140】

したがって、本発明は、該 3 遺伝子の転写の速度を増強または抑制する物質の同定方法であって、

(a) レポータータンパク質をコードするレポーター遺伝子のコード化 cDNA 配列に該 3 遺伝子のプロモーター領域（配列番号 20 のヌクレオチド 1 - 17 , 436）の断片が先行するように、プロモーター - レポーターベクターを構築し、

(b) 該ベクターを細胞内にトランスフェクトし、化合物の存在下および不存在下、該ベクターにコードされるレポータータンパク質の存在量を測定することを含んでなり、

(1) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を減少させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を抑制する物質であり、(2) 該化合物の存在が該レポータータンパク質の存在量を増加させる場合には、該化合物が、該 3 遺伝子の転写速度を増強する物質であることを特徴とする方法を提供する。

【0141】

特定の実施形態においては、該方法は更に、対照細胞内の該レポータータンパク質の存在量に対する該化合物の効果が測定される対照を含み、該対照細胞は、該 3 遺伝子のプロモーター領域の断片を欠くベクターで該対照細胞がトランスフェクトされている以外は工程 (b) の細胞と実質的に同じ細胞である。

【0142】

前記方法は、明示的には、「ある1つの」物質が、該 3 遺伝子の転写のアクチベーターまたはインヒビターであるか否か、あるいはヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルの機能のアクチベーターまたはインヒビターであるか否かの試験に関するものであるが、そのような方法は、物質の集合体、例えば組合せ (combinatorial) ライブラリーを試験してそのような集合体のいずれかのメンバーがヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターであるか否かを判定するのに応用されることが当業者に明らかであろう。したがって、前記方法における物質として物質の集合体またはそのような集合体の個々のメンバーを使用することが、本発明の範囲内に含まれる。特に、カリウムイオンチャンネルのモジュレーションに関連していることが知られている化学構造体を含むように設計されたライブラリー、例えば、カリウムチャンネルアクチベーターに関するジヒドロベンゾピランライブラリー (国際特許公開WO95/30642) またはカリウムチャンネルインヒビターに関するピフェニル - 誘導体ライブラリー (国際特許公開WO95/04277) が特に適していると予想される。

【0143】

本発明は、前記方法により同定されたヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットタンパク質のアクチベーターまたはインヒビターを、および 3 遺伝子の転写のアクチベーターまたはインヒビターを含んでなる医薬組成物を含む。一般には、該アクチベーターおよびインヒビターを医薬上許容される担体と一緒にして医薬組成物を得る。アクチベーターまたはインヒビターと担体とを含有する医薬組成物の製剤化のそのような担体および方法の具体例は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。有効な投与に適した医薬上許容される組成物を形成させるためには、そのような組成物は、該アクチベーター

またはインヒビターの治療的に有効な量を含むであろう。

【0144】

治療用または予防用組成物は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質の活性が異常である状態を治療または予防するのに十分な量で個体に投与する。該有効量は、個体の状態、体重、性別、年齢などの種々の要因によって様々となりうる。他の要因には投与様式が含まれる。適当な量は、熟練した医師により決定されうる。一般には、有効量は、約 0.01 ~ 約 1,000、好ましくは約 0.1 ~ 約 250、より一層好ましくは約 1 ~ 約 50 mg / ヒト成人 / 日である。

【0145】

組成物は、適当な投与量で単独で使用することができる。あるいは、他の物質の同時投与または連続的投与が望ましいことがある。

【0146】

該組成物は、通常の投与用ビヒクル中の多種多様な治療用剤形として投与することができる。例えば、該組成物は、錠剤、カプセル剤（それぞれは時限放出 (timed release) および徐放製剤を含む)、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、水剤、懸濁剤、シロップ剤、乳剤などの経口剤形として又は注射により投与することができる。同様に、それらを、静脈内（ボラスおよび注入の両方）、腹腔内、皮下、局所（閉塞 (occlusion) の存在下または不存在下）または筋肉内形態として投与することも可能であり、それらはすべて、薬学分野の当業者によく知られた形態を用いることが可能である。

【0147】

組成物を単回 1 日量で投与したり、あるいは合計 1 日量を毎日 2、3 または 4 回の分割量で投与するのが有利かもしれない。さらに、組成物は、適当な鼻腔内ビヒクルの局所的使用により鼻腔内形態で、または当業者によく知られた経皮皮膚パッチの形態を使用して経皮経路により投与することができる。もちろん、経皮デリバリーシステムの形態で投与されるためには、該投与量の投与は、該投与計画の全体にわたり、断続的なものではなく連続的なものとなるであろう。

【0148】

該組成物を使用する投与計画は、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別および医学的状態；治療すべき状態の重症度；投与経路；患者の腎、肝および心臓血管機能；および使用するその個々の組成物を含む種々の要因に応じて選択される。通常の技量を有する医師は、該状態の進行の予防、阻止または停止に必要な組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。毒性を伴うことなく効力を与える範囲内の組成物濃度を最適に正確に得るためには、標的部位に対する該組成物のアベイラビリティの速度論に基づく計画が必要である。これは、組成物の分布、平衡および消失に関する考慮を含む。

【0149】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターおよびアクチベーター、あるいは 3 サブユニットの転写のインヒビターおよびアクチベーターは、過度または不十分なカルシウム感受性カリウムチャンネル活性が関与する種々の疾患の治療に有用であろう。したがって、本発明は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 c または 3 d サブユニットタンパク質を含有するカルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターおよびアクチベーターあるいは 3 サブユニットの転写のインヒビターおよびアクチベーターである物質の治療的に有効な量を患者に投与することによる、喘息、糖尿病、緑内障、妊娠ヒト子宮筋層、脳虚血、および神経伝達物質放出の刺激が望まれる状態（例えば、アルツハイマー病）および損傷神経の刺激が望まれる状態の治療方法を含む。

【0150】

また、本発明のチャンネル機能または転写活性のモジュレーターは、現在販売されているカリウムチャンネルインヒビター、例えばグリブリド、グリピジド、トルブタミドが有用である状態において、例えば抗糖尿病剤として有用であると予想される。カルシウム感受性カリウムチャンネルは、ニューロンの再分極および従って脱興奮に寄与する。したがって、カルシウム感受性カリウムチャンネルのインヒビターは、脱分極した興奮状態にニューロンを維持する傾向にある物質として作用すると予想される。多数の疾患、例えばうつ病および記憶障害は、神

経伝達物質の放出の障害から生じると考えられている。本発明のインヒビターは、ニューロン興奮性に寄与する物質として、そのような疾患の治療に有用であると予想される。なぜなら、それはニューロンの興奮性に寄与して、神経伝達物質の放出を刺激するからである。

【0151】

本発明のアクチベーターは、ニューロン活性を減少させるのが望ましい状態において有用であるはずである。そのような状態には、例えば、過度な平滑筋緊張、狭心症、喘息、高血圧、失禁、早期陣痛、片頭痛、脳虚血および過敏性腸管症候群が含まれる。

【0152】

本発明のカルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットは、他のイオンチャンネルのアクチベーターおよびインヒビターを同定するように設計されたスクリーニングに関して有用である。標的イオンチャンネルと特異的に相互作用する潜在的医薬を同定するために化合物をスクリーニングする場合には、同定される化合物が該標的イオンチャンネルに対して可能な限り特異的であることを保証する必要がある。これを行なうためには、該標的イオンチャンネルに類似した可能な限り多種多様なイオンチャンネルに対して該化合物をスクリーニングする必要がある。例えば、イオンチャンネルAと相互作用する潜在的医薬である化合物を見出すためには、該化合物がイオンチャンネルA（「プラス標的」）と相互作用しイオンチャンネルAを介して所望の薬理学的効果を与えることを保証するだけでは十分ではない。該化合物がイオンチャンネルB、C、Dなど（「マイナス標的」）とは相互作用しないことを確認する必要もある。一般に、スクリーニング計画の一部として、可能な限り多数のマイナス標的を有することが重要である（Hodgson, 1992, Bio/Technology 10:973-980、980頁を参照されたい）。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質をコードするDNA、およびヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質

を発現するように操作された組換え細胞は、他のイオンチャンネルと特異的に相互作用する化合物を同定するように設計されたスクリーニングにおいて「マイナス標的」として使用されうる点で有用である。例えば、Wangら, 1998, Science 282:1890-1893は、KCNQ2およびKCNQ3が、「M-チャンネル」として公知のヘテロマーカリウムイオンチャンネルを形成することを示している。KCNQ2およびKCNQ3における突然変異は、てんかんの原因となるため(Biervertら, 1998, Science 279:403-406; Singhら, 1998, Nature Genet. 18:25-29; Schroederら, Nature 1998, 396:687-690)、Mチャンネルは薬物発見のための重要な標的である。Mチャンネルのアクチベーターまたはインヒビターを同定するように設計されたスクリーニング計画は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質を含むカルシウム感受性カリウムチャンネルの、マイナス標的としての使用により、著しい利益を得るであろう。

【0153】

本発明はまた、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質に対する抗体を含む。そのような抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でありうる。本発明の抗体は、当技術分野でよく知られた方法により、全ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3a、3b、3cまたは3dサブユニットタンパク質に対して、または血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニンなどの適当な担体と共役した該サブユニットタンパク質の適当な抗原断片に対して産生させることができる。タンパク質の適当な抗原断片を同定する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Hopp & Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828およびJameson & Wolf, 1988, CABIOS (Computer Applications in the Biosciences) 4:181-186を参照されたい。

【0154】

ポリクローナル抗体の産生のためには、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質または抗原断片（適切な担体に共役させたもの）を、適当な非ヒト宿主動物（例えば、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウスまたはニワトリ）に定期的に注射する。該動物から定期的に採血し（または卵を集め）、得られた血清を、注射されたサブユニットまたは抗原に対する抗体の存在に関して試験する。該注射は、筋肉内、腹腔内、皮下などに行なうことができ、アジュバントと共に行なうことができる。

【0155】

モノクローナル抗体の産生のためには、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質または抗原断片（適切な担体に共役させたもの）を、ポリクローナル抗体の産生に関して前記したのと同様に適当な非ヒト宿主動物に注射する。モノクローナル抗体の場合には、該動物は一般にはマウスである。ついで該動物の脾臓細胞を不死化させる。これは、しばしば、Kohler & Milstein, 1975, Nature 256: 495 - 497に記載のとおり、骨髓腫細胞との融合により行なう。モノクローナル抗体の産生の更に詳しい説明については、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988を参照されたい。

【0156】

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質を標的器官の細胞内に導入するために、遺伝子治療を用いることができる。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質をコードするヌクレオチドは、受容細胞への感染により該ヌクレオチドの導入を媒介するウイルスベクターに連結させることができる。適当なウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイ

ルス、レンチウイルスおよびポリオウイルスに基づくベクターが含まれる。あるいは、リガンド-ヌクレオチドコンジュゲートを使用する受容体媒介標的化導入(receptor-mediated targeted transfer)、リポフェクション、膜融合または直接マイクロインジェクションを含む非ウイルス技術により、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質をコードするヌクレオチドを遺伝子治療のために細胞内に導入することができる。これらの方法およびそれらの変法は、エクスピボ(ex vivo)およびインビボ遺伝子治療に適している。ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質での遺伝子治療は、カルシウム感受性カリウムチャンネルの活性を上昇させることが有益である疾患の治療に特に有用であろう。ドミナントネガティブ表現型を示す突然変異カルシウム感受性カリウムチャンネルサブユニットをコードするcDNAは、カルシウム感受性カリウムチャンネルの活性を減少させることが有益である疾患の遺伝子治療に特に有用でありうる。

【0157】

本発明は、非ヒト種からヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質のオーソログ(orthologue)をクローニングするための方法を含む。一般には、そのような方法は、配列番号1、3、5、7、9または20に基づきPCRプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブを調製することを含み、これは、非ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットを含有する断片を適当なDNA調製物から増幅するために(PCRの場合)または非ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットを含有するcDNAもしくはゲノムクローンを適当なライブラリーから選択するために使用されうる。この方法の好ましい実施形態は、該カルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットをマウスからクローニングするための方法である。

【0158】

本発明は、マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットをコードする DNA を提供することにより、カルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニットの活性が異常であるヒト疾患のモデル動物の作製を可能にする。そのようなモデル動物は、改変されたカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット遺伝子を含むトランスジェニック「ノックアウト」または「ノックイン」マウスを作ることにより作製することができる。マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット遺伝子の部分が欠失したノックアウトマウスを作製することができる。ヒト疾患を招くことが示されている突然変異が該マウス遺伝子内に導入されたノックインマウスを作製することができる。そのようなノックアウトおよびノックインマウスは、カルシウム感受性カリウムチャンネルと疾患との関係の研究における貴重な手段であり、カルシウム感受性カリウムチャンネルが関与するヒト疾患の潜在的医薬または治療方法を試験するための重要なモデル系を提供するであろう。

【0159】

したがって、本発明は、

(a) マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット遺伝子または c DNA をクローニングするのに使用する PCR プライマーまたはオリゴヌクレオチドプローブを配列番号 1、 3、 5、 7、 9 または 20 に基づき設計し、

(b) 該 PCR プライマーまたは該オリゴヌクレオチドプローブを使用して、該マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット遺伝子または c DNA の少なくとも一部（該部分は、トランスジェニックマウスの作製に使用するのに十分な程度に大きい）をクローニングし、

(c) 天然状態から改変された該マウスカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3 a、 3 b、 3 c または 3 d サブユニット遺伝子の少なくとも 1 つのコピーを有するトランスジェニックマウスを製造することを含んでなる、ト

ランスジェニックマウスの製造方法を含む。

【0160】

ノックアウトおよびノックインマウスの製造方法は当技術分野でよく知られている。1つの方法は、標的遺伝子組換えトランスジェニックノックアウトマウスの作製における標的遺伝子組換えES細胞の使用を含み、例えばThomasら、1987、Cell 51:503-512に記載されており、種々の文献に概説されている(Frohmanら、1989、Cell 56:145-147; Capecchi、1989、Trends in Genet. 5:70-76; Baribaultら、1989、Mol. Biol. Med. 6:481-492)。

【0161】

特定の変化を染色体遺伝子内に挿入するために標的化相同組換えを用いることにより任意の遺伝的領域を不活性化したり所望の実質的に任意の突然変異に改変するための技術が利用可能である。一般には、「ターゲティングベクター」、すなわち、突然変異させたい遺伝的領域の一部を含有するプラスミドを使用する。該プラスミド上の遺伝的領域のこの部分と該染色体上の対応遺伝的領域との相同性に基づき、相同組換えを利用して該遺伝的領域内に該プラスミドを挿入して、該遺伝的領域を破壊することができる。通常、該ターゲティングベクターは選択マーカー遺伝子も含有する。

【0162】

100%に近い頻度で生じる相同染色体外組換えと比較して、相同プラスミド-染色体組換えは、 10^{-6} ~ 10^{-3} の頻度でしか検出されないと当初は報告された(Linら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1391-1395; Smithiesら、1985、Nature 317:230-234; Thomasら、1986、Cell 44:419-428)。非相同プラスミド-染色体相互作用は、比較しうる相同的挿入より頻繁であり、 10^5 倍(Linら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1391-1395)~ 10^2 倍(Thomasら、1986、Cell 44:419-428)大きなレベルで生じる。

【0163】

マウスES細胞におけるこの低い標的化組換え率を克服するために、稀有 (rare) 相同組換え体を検出または選択するための種々の方法が開発されている。相同改変事象を検出するための1つのアプローチでは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて相同的挿入に関して形質転換体細胞のプールをスクリーニングし、ついで個々のクローンをスクリーニングする (Kimら, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 8887-8903; Kimら, 1991, *Gene* 103: 227-233)。あるいは、相同的挿入が生じた場合にのみ活性となるマーカー遺伝子を構築してこれらの組換え体が直接的に選択されるのを可能にするポジティブ遺伝的選択アプローチが開発されている (Sedivyら, 1989, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 86: 227-231)。相同組換え体を選択するために開発された最も効果的なアプローチの1つは、該改変の直接的選択が存在しない遺伝子用に開発されたポジティブ-ネガティブ選択 (PNS) 法である (Mansourら, 1988, *Nature* 336: 348-352; Capecchi, 1989, *Science* 244: 1288-1292; Capecchi, 1989, *Trends in Genet.* 5: 70-76)。PNS法は、高レベルで発現されない遺伝子をターゲティングするのに、より効率的である。なぜなら、該マーカー遺伝子はそれ自体のプロモーターを有するからである。単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を使用しガンシクロビル (GANC)、FIAU (1-(2-デオキシ2-フルオロ-B-D-アラビノフラノシル)-5-ヨードウラシル) などのヘルペス薬でその非相同的挿入に対して選択することにより、非相同組換え体を選択する。この対抗選択により、生存している形質転換体のうちの相同組換え体の割合を増加させることができる。

【0164】

トランスジェニックマウスを製造するための他の方法は、受精卵の雄性前核のマイクロインジェクションを含む。そのような方法は当技術分野でよく知られている。

【0165】

本発明は、トランスジェニック非ヒト動物であって、該動物のゲノムが、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットの少なくとも一部をコードするDNAを含有することを特徴とする動物を含む。

【0166】

本発明を更に例示するために、以下に非限定的な実施例を記載する。

実施例1

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、3 a、3 b、3 cまたは3 dサブユニットタンパク質の同定およびcDNAクローニング

該1サブユニットをコードするDNA配列を使用して、新規サブユニットをコードする相同配列に関してGenBankデータベースを検索する。この検索は、1に対する類似性を有するEST(AA904191)を与えた。該ESTをコードするcDNAを購入し(Genome Systems)、両方向で配列決定した。合成オリゴヌクレオチドプライマー(配列番号12および13)を使用して、この遺伝子(2)の3'非翻訳領域(UTR)の小さな部分およびコード領域を増幅した。ついで該コード領域を、5'および3'翻訳エンハンサー配列間の拡大したポリリンカー(MVpl(+))を含有する修飾ベクター(pSP64T)内にサブクローニングした。

【0167】

ついで2の配列を使用して、追加的な新規サブユニットに関してGenBankデータベースを検索した。ついで、同定されたESTからの配列を使用して、再び該データベースを検索した。この反復アプローチで、以下のいくつかのESTを得た: AA195381、AA236930、AA236968、AA279911、AA761761、AA934876、AA195511、AA917510。これらの配列のアライメントは、それらが新規サブユニット(ここでは3と称される)のC末端部分をコードしていることを示唆している。これらのESTをコードする入手可能なcDNAを購入し(Genome Systems)、両方向で配列決定した。5'インフレーム終結コドンが欠けていること、および1および2の最初の膜貫通セグメントの中央部だけにしかア

ミノ酸アライメントしなかったことに基づけば、これらのクローンはいずれも、完全長タンパク質をコードしていなかった。

【0168】

それらの個々のサブユニットの特有 (unique) の及び保存された部分を別々に使用して、これらの転写産物をコードするゲノム配列に関して該データベースを検索した。 3 a、 3 b および 3 c 特異的断片 (GenBank アクセッション番号 AC007823 , version 2) を使用して、未同定ゲノム配列の単一の180キロベースの断片が同定された。このエントリーの後続のバージョンは、 3 a、 3 b および 3 c の順序の全3個の特異的断片を含有する40.4キロベースの連続的断片を含有していた。 3 c は、該コア配列の5'末端に隣接している。図8を参照されたい。

【0169】

ClontechのMarathon Ready Spleen cDNAキット(カタログ#7412-1)に記載のとおり、5'RACE反応において、3'終結コドンの3'側にアニーリングする合成オリゴ5'-TTTACAATTGTTATGTCAGAGCAGG-3'(配列番号19)を使用した。この反応は種々のサイズの複数の産物を与えた。電気泳動により分離されたいくつかの断片をゲル薄片から抽出し、クローニングした。このようにして、3つの異なるサブユニット(3 a、 3 b および 3 c) を同定した。

【0170】

新規サブユニットが見落とされていないことを保証するために、特異的断片の単離を試みることなく該PCR増幅反応の未分画産物をTAクローニングベクター(pCR2.1, Invitrogen)内に直接的にクローニングした。ついで、Current Protocols in Molecular Biology, 第6.1.1および6.3.1節に記載の「コロニーフィルターハイブリダイゼーション法」により、EST AA761761由来のプロープを使用して、コロニーをスクリーニングした。ハイブリダイズするコロニーからDNAを調製した。元のクローンとは異なる制限消化パターンを有するcDNAを

両方向で配列決定した。該オープンリーディングフレームを決定し、合成オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号14～18）を使用して増幅し、MVp1（+）中にサブクローニングした。1つの追加的な特有のサブユニット 3dが同定された。

【0171】

実施例2

ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 2、 3a、 3b、 3cまたは 3dサブユニットの発現の分析

ノーザンブロット分析：

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および末梢血白血球由来のポリ（A+）-RNAを含有するノーザンブロットをClontech, Palo Alto, CAから購入した。2（配列番号1のヌクレオチド268-1080）、3a（配列番号3のヌクレオチド70-384）、3b（配列番号5のヌクレオチド463-797）および3c/d（配列番号7のヌクレオチド311-912）由来の³²P標識ランダムプライムドcDNAプローブで、該ブロットをプローブした。該ハイブリダイゼーションは、5×SSPE、10×デンハルト液、50%ホルムアミド、2% SDS、100μg/ml サケ精子DNA中、42℃で一晩行った。該洗浄は、2×SSC、0.05% SDS中で42℃で40分間、ついで1×SSC、0.05% SDS中で50℃で40分間、段階的に行った。高いストリンジェンシーの洗浄を0.1SSC、0.05% SDSで65℃で40分間行った。X線フィルムにさらすことにより、またはホスホルイメージャーを用いるハイブリダイゼーションにより、その洗浄されたブロットを検出した。

【0172】

電気生理学的分析：

cRNAを、ヒトSlowpoke または 2、 3a、 3b、 3cまたは 3dサブユニットをコードするプラスミドからインビトロで合成し、ツメガエル（Xenopus）卵母細胞内に注入した（1、5または10×モル過

剰の サブユニットRNA + / - サブユニットRNAの1.5 ng / 卵母細胞)。カルシウム感受性カリウム電流をインサイドアウトパッチで記録した。記録は、対称カリウムのイオン条件下で行った。標準ピペットおよびバス溶液は116 mM グルコン酸カリウム、4 mM 塩化カリウム、10 mM HEPES, pH 7.2 を含有していた。グルコン酸カルシウムの安定度定数 (15.9 M^{-1}) を考慮して、3 ~ 30 μM の遊離イオン化カルシウム最終濃度が得られるように CaCl_2 を該バス溶液に加えた。EPC-7増幅器 (HEKA) を使用して、電流を記録した。pClamp 6.0 プログラム (Axon Instruments) を使用して、データ収集のための及び分析のための電位固定コマンドを作製した。(1) 試験電位 (-80 ~ 80 mV) におけるピークまたは定常状態の電流からの巨視的コンダクタンスの計算、または(2) 試験電位における末端 (tail) 電流ピーク (-80 mV) の測定または算出の2つの方法を用いて、 NP_0 -電圧関係を3、10および30 μM バスカルシウムで測定した。ボルツマン関数を該データにあてはめ、それを用いて半最大活性化パラメーター ($V_{1/2}$) を導き出した。電流の軌跡または平均電流の軌跡から、最大不活性化パラメーター (30 μM Ca^{2+} および 80 mV) を求めた。単一指数あてはめから、不活性化速度を求めた。部分非不活性化電流を定常状態 / ピーク電流として求め、部分不活性化電流を、ピーク電流から定常状態電流を差し引いてピーク電流で割ったものとして推定した。

【0173】

本発明の範囲は、本明細書に記載の特定の実施形態に限定されるものではない。実際のところ、前記の記載から、本明細書に記載のものに加えて本発明の種々の修飾が当業者に明らかとなるであろう。そのような修飾は、特許請求の範囲の範囲内に含まれると意図される。

【0174】

本明細書には種々の刊行物が引用されているが、それらの開示の全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1 Aは、該ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 2サブユニットをコードするDNA配列(配列番号1)を示す。該開始ATGコドンは271 - 273位であり、該終結コドンは976 - 978位である。

【図1 B】

図1 Bは、該 2サブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2 A】

図2 Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 3aサブユニットをコードするDNA配列(配列番号3)を示す。該開始ATGコドンは341 - 343位であり、該終結コドンは1172 - 1174位である。図2 Bは、該 3aサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図2 B】

図2 Bは、該 3aサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図3 A】

図3 Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 3bサブユニットをコードするDNA配列(配列番号5)を示す。該開始ATGコドンは796 - 798位であり、該終結コドンは1567 - 1569位である。

【図3 B】

図3 Bは、該 3bサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号6)を示す。

【図4 A】

図4 Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 3cサブユニットをコードするDNA配列(配列番号7)を示す。該開始ATGコドンは869 - 871位であり、該終結コドンは1694 - 1696位である。図4 Bは、該 3cサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号8)を示す。

【図4 B】

図4 Bは、該 3cサブユニットの推定アミノ酸配列(配列番号8)を示す。

【図5 A】

図5 Aは、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの 3dサブユニットをコードするDNA配列(配列番号9)を示す。該開始ATGコドンは457 - 459位であり、該終結コドンは1294 - 1296位である。

【図5B】

図5Bは、該 3dサブユニットの推定アミノ酸配列（配列番号10）を示す。

【図6】

図6は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネル 1（配列番号11）、2（配列番号2）、3a（配列番号4）、3b（配列番号6）、3c（配列番号8）および3d（配列番号10）サブユニットの推定アミノ酸配列のアライメントを示す。

【図7】

図7は、ヒトカルシウム感受性カリウムチャンネルの サブユニットにより形成されるイオンチャンネルの電気生理学的特性に対する本発明の新規 サブユニットの共発現の効果を示す。図7Aは、カルシウム感受性カリウムチャンネルまたは および サブユニットを発現するインサイドアウトパッチにおいて記録した電流 - 電位関係を示す。最大効果を検出するために、 および サブユニットcRNAを1：10のモル比（ が過剰）で共注入した。該電位固定法は、-160mVまでの予備パルス（200ms）、ついで-80～+80mVの20mV脱分極工程（500ms）よりなるものであり、保持電圧は-80mVであり、内部Ca²⁺は30μMであった。サブユニット 3bおよび 3dは、電流密度を減少させうるものの、 サブユニットにより形成されるチャンネルの電位依存性および速度論における認められうる変化を誘発しなかった。図7B：ピーク電流から算出され試験電位の関数としてプロットされた図7Aに示す記録に関する正規化コンダクタンスに、ボルツマン方程式をあてはめた。V_{1/2}値は20mV（ サブユニット単独）、-55mV（ + 2サブユニット）、45.36mV（ + 3aサブユニット）、20mV（ + 3cサブユニット）である。図7Cは、 サブユニットRNAよりモル過剰（10xまで）の 3サブユニットRNAの共発現が、カルシウム感受性カリウムチャンネル電流の非不活性化成分を減少させたが排除しなかったことを示す。不活性化速度および部分（fractional）不活性化電流は、実施例2に記載のとおり計算した。

【図8A】

図8A～Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4（配列番号20）のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8B】

図8A～Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4（配列番号20）のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8C】

図8A～Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4（配列番号20）のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8D】

図8A～Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4（配

列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8E】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8F】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8G】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は1

7, 404 - 17, 806 位に、該 3 b 特異的配列は 24, 710 - 25, 507 位に、該 3 c / d 配列は 32, 590 - 33, 514 位に、該 3 コア配列の開始部位は 33, 515 - 33, 705 位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド 1 - 17, 404 に位置しているらしい。

【図 8 H】

図 8 A ~ N は、GenBank アクセション番号 AC007823.4（配列番号 20）のゲノム配列を示す。該 3 サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド 1 - 40, 467 に含有されている。該 3 a 特異的配列は 17, 404 - 17, 806 位に、該 3 b 特異的配列は 24, 710 - 25, 507 位に、該 3 c / d 配列は 32, 590 - 33, 514 位に、該 3 コア配列の開始部位は 33, 515 - 33, 705 位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド 1 - 17, 404 に位置しているらしい。

【図 8 I】

図 8 A ~ N は、GenBank アクセション番号 AC007823.4（配列番号 20）のゲノム配列を示す。該 3 サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド 1 - 40, 467 に含有されている。該 3 a 特異的配列は 17, 404 - 17, 806 位に、該 3 b 特異的配列は 24, 710 - 25, 507 位に、該 3 c / d 配列は 32, 590 - 33, 514 位に、該 3 コア配列の開始部位は 33, 515 - 33, 705 位に存在する。組織特異的発現に関与する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー）はヌクレオチド 1 - 17, 404 に位置しているらしい。

【図 8 J】

図 8 A ~ N は、GenBank アクセション番号 AC007823.4（配列番号 20）のゲノム配列を示す。該 3 サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド 1 - 40, 467 に含有されている。該 3 a 特異的配列は 17, 404 - 17, 806 位に、該 3 b 特異的配列は 24, 710 - 25, 507 位に、該 3 c / d 配列は 32, 590 - 33, 514 位に、該 3 コア配

列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8K】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8L】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図8M】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオ

チド1 - 17, 404に位置しているらしい。

【図8N】

図8A~Nは、GenBankアクセッション番号AC007823.4(配列番号20)のゲノム配列を示す。該3サブユニットの異なるスプライス変異体がヌクレオチド1-40, 467に含有されている。該3a特異的配列は17, 404-17, 806位に、該3b特異的配列は24, 710-25, 507位に、該3c/d配列は32, 590-33, 514位に、該3コア配列の開始部位は33, 515-33, 705位に存在する。組織特異的発現に関与する配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー)はヌクレオチド1-17, 404に位置しているらしい。

【図1A】

FIGURE 1A

```

1  CTTAATCCTA TCCAAGTATG CAGTACGCTC TTGGGTCGTC TCATGAGACC CAGGGGCATG
61  TTGGAAAGAA CTGAGAGAAA GAGCAACAAA GCGGCGAGTG GTGTGAGAGG GCAGCACGCG
121 CTGTGGGGCC CTTCCAGAGA AATGTACTGA AAAAGTCTAC GCAATGTCTG GGATTTGCTA
181 AACAAATACCT GGAAAGCAGA CAGGTTTTTT TGCCATTCCCT CCAGGACATC CACCATAAGG
241 AAAGGAGACC CTGGACCAAC ATTCTCTAAG ATGTTTATAT GGACCAGTGG CCGGACCTCT
301 TCATCTTATA GACATGATGA AAAAAGAAAT ATTTACCAGA AAATCAGGGA CCATGACCTC
361 CTGGACAAAA GGAAAACAGT CACAGCACTG AAGGCAGGAG AGGACCGAGC TATTCTCCTG
421 GGACTGGCTA TGATGGTGTG CTCCATCATG ATGTATTTTC TGCTGGGAAT CACTCTCCTG
481 CGCTCATACA TGCAGAGCGT GTGGACCGAA GAGTCTCAAT GCACCTTGCT GAATGCGTCC
541 ATCACGAAAA CATTAACTG CTCCTTCAGC TGTGGTCCAG ACTGCTGGAA ACTTTCTCAG
601 TACCCCTGCC TCCAGGTGTA CGTTAACCTG ACTTCTTCCG GGGAAAAGCT CCTCCTCTAC
661 CACACAGAAG AGACAATAAA AATCAATCAG AAGTGCTCCT ATATACCTAA ATGTGGAAAA
721 AATTTTGAAG AATCCATGTC CCTGGTGAAT GTTGTCTATG AAAACTTCAG GAAGTATCAA
781 CACTTCTCCT GCTATTCTGA CCCAGAAGGA AACCAGAAGA GTGTTATCCT AACCAAATC
841 TACAGTTCCA ACGTGCTGTT CCATTCACCTC TTCTGGCCAA CCTGTATGAT GGCTGGGGGT
901 GTGGCAATTG TTGCCATGGT GAAACTTACA CAGTACCTCT CCCTACTATG TGAGAGGATC
961 CAACGGATCA ATAGATAAAT GCAAAAATGG ATAAAATAAT TTTTGTAAA GCTCAAATAC
1021 TGTTTTCTTT CATTCTTCAC CAAAGAACCT TAAGTTTGTA ACGTGCAGTC TGTTATGAGT
1081 TCCCTAATAT ATTCTTATAT GTAGAGCAAT AATGCAAAAG CTGTTCTATA TGCAAACATG
1141 ATGTCTTTAT TATTCAGGAG AATAAATAAC TGTTTTGTGT TGAA

```

【図1B】

FIGURE 1B

1 MFIWTSGRTS SSYRHDEKRN IYQKIRDHDL LDKRKTVTAL KAGEDRAILL GLAMMVCSIM
 61 MYFLLGITLL RSYMOSVWTE ESQCTLLNAS ITETFNCSEFS CGPDCWKLSQ YPCLQVYVNL
 121 TSSGEKLLLY HTEETIKINQ KCSYIPKCGK NFEESMSLVN VVMENFRKYQ HFSCYSDPEG
 181 NQKSVILTKL YSSNVLFHSL FWPTCMMAGG VAIVAMVKLT QYLSLLCERI QRINR

【図2A】

FIGURE 2A

1 GCTCCCGGCT GCCGAGGCGG AAACACAGGT GATGAGGTGG CGGCAAGCAC AGTGCAAAGA
 61 GAGAGAAGCA GCTTCGGCTG CAGCAAACCA CGCAGGTCCT TCTTGATCAT CTAGAACTGA
 121 CCGCTCCGCC TTGCCAGGAG TCTGCAGAAC CACGTGGCTG GCCTGCCTGA AGTTCTCACC
 181 TCTCTAGGAA GGCGGGGGGC TTCTAATGGC TGCAGCTGCG CTGGGGGCTG GGGGCTCCCG
 241 CTGGGACTCC ACTTCCGTGG ATGTCTAAGC TTCACCTTTC TTGCGCCCGC AGGGGCATGA
 301 CTCAGGTGAA AGGGAGCCAT TTTCTCAGAC CCCTGGCCTC ATGCAGCCCT TCAGCATCCC
 361 CGTGCAAATC ACACCTCAGG GCAGCCGGAG GCGCCAGGGG AGGACAGCCT TTCTGCCTC
 421 AGGGAAGAAG AGAGAGACAG ACTACAGTGA TGGAGACCCA CTAGATGTGC ACAAGAGGCT
 481 GCCATCCAGT ACTGGAGAGG ACCGAGCCGT GATGCTGGGG TTTGCCATGA TGGGCTTCTC
 541 AGTCCTAATG TTCTTCTTGC TCGGAACAAC CATTCTAAAG CCTTTTATGC TCAGCATTCA
 601 GAGAGAAGAA TCGACCTGCA CTGCCATCCA CACAGATATC ATGGACGACT GGCTGGATG
 661 TGCCTTCACC TGTGGTGTGC ACTGCCACGG TCAGGGGAAG TACCCGTGTC TTCAGGTGTT
 721 TGTGAACCTC AGCCATCCAG GTCAGAAAGC TCTCCTACAT TATAATGAAG AGGCTGTCCA
 781 GATAAATCCC AAGTGCTTTT ACACACCTAA GTGCCACCAA GATAGAAGTG ATTTGCTCAA
 841 CAGTGCTCTG GACATAAAAG AATTCTTCGA TCACAAAAAT GGAACCCCTT TTTATGCTT
 901 CTACAGTCCA GCCAGCCAAT CTGAAGATGT CATTCTTATA AAAAAGTATG ACCAAATGGC
 961 TATCTTCCAC TGTTTATTTT GGCCTTCACT GACTCTGCTA GGTGGTGCCC TGATTGTTGG
 1021 CATGGTGAGA TTAACACAAC ACCTGTCTTT ACTGTGTGAA AAATATAGCA CTGTAGTCAG
 1081 AGATGAGGTA GGTGGAAGAG TACCTTATAT AGAACAGCAT CAGTTCAAAC TGTGCATTAT
 1141 GAGGAGGAGC AAAGGAAGAG CAGAGAAATC TTAAGACGGT GGCCAAATTA AAGTGCTGGC
 1201 CTTCAGATGT CTGTGATTTT TGCAACTCGA GTATGCG

【図2B】

FIGURE 2B

1 MQPFSIPVQI TLQGSRRRQG RTAFPASGKK RETDYSDDGP LDVHKRLPSS TGEDRAVMLG
 61 FAMMGFSVLM FFLGTTILK PFMLSIQREE STCTAIHTDI MDDWLDCAFT CGVHCHGQGK
 121 YPCLQVFNVL SHPGQKALLH YNEEAVQINP KCFYTPKCHQ DRSDLLNSAL DIKEFFDHKN
 181 GTPFSCFYSP ASQSEVILI KKYDQMAIFH CLFWPSLTLG GALIVGMVR LTQHLSSLCE
 241 KYSTVVRDEV GSKVPYIEQH QFKLCIMRRS KGRAEKS

【図3A】

FIGURE 3A

```

1 AAGAGAAAGA ACAAGAAAA GAAAAAGAAG AGGAAAAAAT CCCCAGTACC CATAGAAACC
61 CTTAAAGATG TTTAAAAAGA GTTAACTTAT CAGAACACAG ATTTAAGTGA AATTAAGGAA
121 GAAGAGCAGG TAAAGTCTAC TGACAGAAAAG TCAGCAGTGG AAGCCCCAAA CGAGGTGACT
181 GAAAATCCAA AACAGAAAAT TGCAGCAGAA AGCAGTGAAA ATGCTGATTG TCCAGAGAAT
241 CCTAAAATGA AGTTGGATGG AAAACTTGAC CAAGAAGGCA ATGATGTAAA AACAGCAGCT
301 GAGGAGGTAC TAGCTGGTAG AGACACATTA GATTTTGAGG ATGTCACAGT TCAATCATCA
361 GGCCCGAGGG CTGGTGGTGA AGAATTAGAT GAAGGTGTTG CAAAAGATAA TGCTAAAATA
421 GCTGGTGCCA CTTAAAGCAA TCCTGAAGAA CCAGAGAGTG AAGATGCAGA TCACTGCACC
481 GTACCCAAAA ATGAAAGTCC CTCACAGGAC ATTAGTGATG CCTGTGAAGC AGAAAGTACA
541 GAGGAGGCGG GGATGTCAGA ACATCCAAGT CAGACCATCA GGAAAGCTTT AGACAGCAAT
601 AGCCTAAAAA ACCATGACTT GTTGGCACCA GGAGGAGAGC CGGGGGACTT CAATCCAGAA
661 AGCAGAGAAG ATACCAGAGG AGGGAACGAG AAGGGCAAAA GCAAAGAAGA CCGTACCATG
721 TCCTAAGCTG AGGCAGGCGG CAGGCCTGGT GCACAGGAAG TCTGAGTGTG AGGGGCTCTT
781 TTCTCTCCAC TGCCAATGAC AGCCTTTTCT GCCTCAGGGA AGAAGAGAGA GACAGACTAC
841 AGTGATGGAG ACCCACTAGA TGTGCACAAG AGGCTGCCAT CCAGTACTGG AGAGGACCGA
901 GCCGTGATGC TGGGGTTTGC CATGATGGGC TTCTCAGTCC TAATGTTCTT CTGCTCGGA
961 ACAACCATTC TAAAGCCTTT TATGCTCAGC ATTCAGAGAG AAGAATCGAC CTGCACTGCC
1021 ATCCACACAG ATATCATGGA CGACTGGCTG GACTGTGCCT TCACCTGTGG TGTGCACTGC
1081 CACGGTCAGG GGAAGTACCC GTGTCTTCAG GTGTTTGTGA ACCTCAGCCA TCCAGGTGAG
1141 AAAGCTCTCC TACATTATA TGAAGAGGCT GTCCAGATAA ATCCCAAGTG CTTTACACA
1201 CCTAAGTGCC ACCAAGATAG AAATGATTTG CTCAACAGTG CTCTGGACAT AAAAGAATTC
1261 TTCGATCACA AAAATGGAAC CCCCTTTTCA TGCTTCTACA GTCCAGCCAG CCAATCTGAA
1321 GATGTCATTC TTATAAAAA GTATGACCAA ATGGCTATCT TCCACTGTTT ATTTTGGCCT
1381 TCACTGACTC TGCTAGGTGG TGCCCTGATT GTTGGCATGG TGAGATTAAC ACAACACCTG
1441 TCCTTACTGT GTGAAAAATA TAGCACTGTA GTCAGAGATG AGGTAGGTGG AAAAGTACCT
1501 TATATAGAAC AGCATCAGTT CAAACTGTGC ATTATGAGGA GGAGCAAAGG AAGAGCAGAG
1561 AAATCTTAAG ACGGTGGCCA AATTAAGTG CTGGCCTTCA GATGTCTGTG ATTTCTGCAA
1621 CTCGAGTATG CG

```

【図3B】

FIGURE 3B

```

1 MTAFPASGKK RETDYSDBGD LDVHKRLPSS TGEDRAVMLG FAMMGFSVLM FFLLGTTILK
61 PFMLSIQREE STCTAIHTDI MDDWLDCAFT CGVHCHGQGK YPCLQVFNVL SHPGQKALLH
121 YNEEAVQINP KCFYTPKCHQ DRNDLLNSAL DIKEFFDHKN GTPFSCFYSP ASQSEDVILI
181 KKYDQMAIFH CLFWPSLTLG GGALIVGMVR LTQHLSLLCE KYSTVVRDEV GSKVPYIEQH
241 QFKLCIMRRS KGRAEKS

```

【図4A】

FIGURE 4A

```

1 CCCAGCTACT CGGGAGGCTG AGGCAGGAGA ATCGCTTGAA CCTGGGAGGC GGAGGAGGTT
61 GCAGTGA ACT GAGATCGTAC CCAGCCTGGG CAACAGTGCG AGGCTCCGTC TCAAAAAAAAA
121 ACCAAAAAAC AAAAAACAA AAAACGACAG AGAAGGCCAA AAAAAACACA TCTGTGGGCT
181 GGATGCCGCC ATGCCCACCG GTTTGCGACC TTTGTGTTGG ACTCTTCTGT TCACCAGACA
241 CCCTGCCCTG CGAGAATGTA TCTCATCCTT TGCTGGAGCA GGTTCGACG CACAGTGGAG
301 AGAGGAGAGA AGAAATGAAG GGACACTTAT GCAGAACCAT GAGTGGCCAG AGAGGAGGAG
361 AAGGAGGGTG AGAGGAGCAA AGAAGCCATG ACAACTTCAT AATTCGTAGT GGACTGGGCA
421 GTGGCCAGAA ATTCTGGTGG TGGATATGCT GCCTTTCCAA CAGGTGAATA TGAAAGAATA
481 AGTCAAACCC TGTT CAGGAC GCTGTAAATT CCAAATGTGA ACTTTTTGAG TCATTCTTTT
541 CATGTGGAAT TCAAAGGAGA ATGTAACAA ATTTTCAGGA GGGACGTGCA ATATCCCTGA
601 AAGATAACAG AGTTCGTAAC ACTTATTTAC ATACAACATT CTCTAGTTAT TGATTAAACA
661 GATCTCTACA GACTTGCATG AGGCAACATT TCTTAGGCTT GTTTGCTACA ATATCTTTAA
721 AAATACTTGA TTACACATCA CTTTAGCTTA TTTAGATGGA CTTTTCACCA AGCTCTGAAC
781 TGGGATTTCA TTTTGTGCA TTCATCCTGC TCACGAGACA CAGGTAGGCA GCAAATGAGA
841 TTATCCCTCC AGTCCCCTAT GATTGGAAT GTTCCCCTT CTTTATGAGC TCACTGCAGT
901 ATCTCCTTCT CCCTTTCCCC AAAGGACAGC CTTTCCTGCC TCAGGGAAGA AGAGAGAGAC
961 AGACTACAGT GATGGAGACC CACTAGATGT GCACAAGAGG CTGCCATCCA GACTGGAGA
1021 GGACCGAGCC GTGATGCTGG GTTTGGCCAT GATGGGCTTC TCAGTCCTAA TGTTCTTCTT
1081 GCTCGGAACA ACCATTCTAA AGCCTTTTAT GCTCAGCATT CAGAGAGAAG AATCGACCTG
1141 CACTGCCATC CACACAGATA TCATGGACGA CTGGCTGGAC TGTGCCTTCA CCTGTGGTGT
1201 GCACTACCAC GGTCAGGGGA AGTACCCGTG TCTTCAGGTG TTTGTGAACC TCAGCCATCC
1261 AGGTCAGAAA GCTCTCCTAC ATTATAATGA AGAGGCTGTC CAGATAAATC CCAAGTGCTT
1321 TTACACACCT AAGTGCCACC AAGATAGAAG TGATTTGCTC AACAGTGCTC TGGACATAAA
1381 AGAATTCCTC GATCACA AAA ATGGAACCCC CTTTTCATGC TTCTACAGTC CAGCCAGCCA
1441 ATCTGAAGAT GTCATTCTTA TAAAAAGTA TGACCAAATG GCTATCTTCC ACTGTTTATT
1501 TTGGCCTTCA CTGACTCTGC TAGGTGGTGC CCTGATTGTT GGCATGGTGA GATTAACACA
1561 ACACCTGTCC TTAGTGTGTG AAAAAATATAG CACTGTAGTC AGAGATGAGG TAGGTGGAAA
1621 AGTACCTTAT ATAGAACAGC ATCAGTTCAA ACTGTGCATT ATGAGGAGGA GCAAAGGAAG
1681 AGCAGAGAAA TCTTAAGACG GTGGCCAAAT TAAAGTGCTG GCCTTCAGAT GTCTGTGATT
1741 TCTGCAACTC GAGTATGCG

```

【図4B】

FIGURE 4B

```

1 MFPLLYELTA VSPSPFPQRT AFPASGKKRE TDYSDGDPLD VHKRLPSSTG EDRAVMLGFA
61 MMGFSVLMFF LLGTTILKPF MLSIQREEST CTAIHTDIMD DWLDCAFTCG VHCHGQGYKYP
121 CLQVFNLSH PGQKALLHYN EEAVQINPKC FYTPKCHQDR SDLLNSALDI KEFFDHKNGT
181 PFSCFYSPAS QSEDVILIKK YDQMAIFHCL FWPSLTLGG ALIVGMVRLT QHLSLLCEKY
241 STVVRDEVGG KVPYIEQHOF KLCIMRRSKG RAEKS

```

【図5A】

FIGURE 5A

```

1 CGCCCGGGAT CCGAAATGAA GGGACACTTA TGCAGAACCA TGAGTGGCCA GAGAGGAGGA
61 GAAGGAGGGT GAGAGGAGCA AAGAAGCCAT GACAACCTCA TAATTCTGAG TGGACTGGGC
121 AGTGGCCAGA AATTCTGGTG GTGGATATGC TGCCTTTCCA ACAGGTGAAT ATGAAAGAAT
181 AAGTCAAACC CTGTTCAGGA CGCTGTTAAT TCCAAATGTG AACTTTTTGA GTCATTCTTT
241 TCATGTGGAA TTCAAAGGAG AATGTAAACA AATTTTCAGG AGGGACGTGC AATATCCCTG
301 AAAGATAACA AAGTTCGTAA CACTTATTTA CATAACAACAT TCTCTAGTTA TTGATTAAAC
361 AGATCTCTAC AGACTTGCAT GAGGCAACAT TTCTTAGGCT TGTTTGCTAC AATATCTTTA
421 AAAATACTTG ATTACACATC ACTTTAGCTT ATTTAGATGG ACTTTTCACC AAGCTCTGAA
481 CTGGGATTTT ATTTTGTGTC ATTCATCCTG CTCACGAGAC ACAGGACAGC CTTTCTGCCC
541 TCAGGGAAGA AGAGAGAGAC AGACTACAGT GATGGAGACC CACTAGATGT GCACAAGAGG
601 CTGCCATCCA GTACTGGAGA GGACCGAGCC GTGATGCTGG GGTTTGCCAT GATGGGCTTC
661 TCAGTCCTAA TGTTCTTCTT GCTCGGAACA ACCATTCTAA AGCCTTTTAT GCTCAGCATT
721 CAGAGAGAAG AATCGACCTG CACTGCCATC CACACAGATA TCATGGACGA CTGGCTGGAC
781 TGTGCCTTCA CCTGTGGTGT GCACTGCCAC GGTCAGGGGA AGTACCCGTG TCTTCAGGTG
841 TTTGTGAACC TCAGCCATCC AGGTCAGAAA GCTCTCCTAC ATTATAATGA AGAGGCTGTC
901 CAGATAAATC CCAAGTGCTT TTACACACCT AAGTGCCACC AAGATAGAAA TGATTTGCTC
961 AACAGTGCTC TGGACATAAA AGAATTCTTC GATCACAAAA ATGGAACCCC CTTTTCATGC
1021 TTCTACAGTC CAGCCAGCCA ATCTGAAGAT GTCATTCTTA TAAAAAGTA TGACCAAATG
1081 GCTATCTTCC ACTGTTTATT TTGGCCTTCA CTGACTCTGC TAGGTGGTGC CCTGATTGTT
1141 GGCATGGTGA GATTAACACA ACACCTGTCC TTACTGTGTG AAAAAATATAG CACTGTAGTC
1201 AGAGATGAGG TAGGTGGAAA AGTACCTTAT ATAGAACAGC ATCAGTTCAA ACTGTGCATT
1261 ATGAGGAGGA GCAAAGGAAG AGCAGAGAAA TCTTAA

```

【図5B】

FIGURE 5B

```

1 MDFSPSSELG FHFVAFILLT RHRTAFPASG KKRETDYSDG DPLDVHKRLP SSTGEDRAVM
61 LGFAMMGFSV LMFLLGTTI LKPFMLSIQR EESTCTAIHT DIMDDWLDCA FTCGVHCHGQ
121 GKYPCLQVFV NLSHPGQKAL LHYNEEAVQI NPKCFYTPKC HQDRNDLLNS ALDIKEFFDH
181 KNGTPFSCFY SPASQSEDAI LIKKYDQMAI FHCLFWPSLT LLGGALIVGM VRLTQHLSSL
241 CEKYSTVVRD EVGGKVPYIE QHQFKLCIMR RSKGRAEKS

```

【図6】

FIGURE 6

```

BKb1 .....MVK.KLVM
BKb2 .....MFIWTSGRITSSSYRHDEKRNIIYQKIRDHDLDDKRKTVT
BKb3a .....MQPFVIPVQITLQGSRRRQGRITAFPASGKKRETDYS...DGDPLDVHKRLP
BKb3b .....MTAFPASGKKRETDYS...DGDPLDVHKRLP
BKb3c .....MFPLLYELTAVSPSPFPQRTAFPASGKKRETDYS...DGDPLDVHKRLP
BKb3d MDFSPSSELGFHEVAFILLTRH.....RTAFPASGKKRETDYS...DGDPLDVHKRLP

BKb1 AQRGETRALCLGVTMVVCAVITYIILVTTVLPLYQKSVWTOESKCHLI.....ET.NI
BKb2 ALKAGEDRAILLGLAMMVCSIMMYFLLGITLLRSYMQSVWTEESQCTLLNASIT.ETFNC
BKb3a SS.TGEDRAVMLGFAMMGFSVLMFFLLGTTILKPFMLS IQREESTCTAIHTDIMDDWLDC
BKb3b SS.TGEDRAVMLGFAMMGFSVLMFFLLGTTILKPFMLS IQREESTCTAIHTDIMDDWLDC
BKb3c SS.TGEDRAVMLGFAMMGFSVLMFFLLGTTILKPFMLS IQREESTCTAIHTDIMDDWLDC
BKb3d SS.TGEDRAVMLGFAMMGFSVLMFFLLGTTILKPFMLS IQREESTCTAIHTDIMDDWLDC

BKb1 RDQEELKGGKVPQYPC...WVNVSAAGRWAFLYHTEDTRDQDQCCSYIPGSV...DNYQT
BKb2 SFSCGPDCKLSQYPCLOVYVNLTS.GEKLILYHTEETIKINQKCSYIPKCG...KNFEE
BKb3a AFTCGVHCHGQGYPCLOVFNLS.HPGQKALLHYNEEAVQINPKCFYTPKCHQDRNDLL
BKb3b AFTCGVHCHGQGYPCLOVFNLS.HPGQKALLHYNEEAVQINPKCFYTPKCHQDRNDLL
BKb3c AFTCGVHCHGQGYPCLOVFNLS.HPGQKALLHYNEEAVQINPKCFYTPKCHQDRSDLL
BKb3d AFTCGVHCHGQGYPCLOVFNLS.HPGQKALLHYNEEAVQINPKCFYTPKCHQDRSDLL

BKb1 ARADVEKVRAKFQEQVYFCFSAPRGNETSVLFRQLYGPQALLFSLFWPTFLLTGGLLII
BKb2 SMSLVNVVMENFRKYQHFCYSYDPEGNQKSVILTKLYSSNVLFHSLFWPTCMMAGGVAIV
BKb3a NSALDIKEFFDHKNGTPFSCFYSPASQSEDVILIKKYDQMAIFHCLFWPSLTLGGALIV
BKb3b NSALDIKEFFDHKNGTPFSCFYSPASQSEDVILIKKYDQMAIFHCLFWPSLTLGGALIV
BKb3c NSALDIKEFFDHKNGTPFSCFYSPASQSEDVILIKKYDQMAIFHCLFWPSLTLGGALIV
BKb3d NSALDIKEFFDHKNGTPFSCFYSPASQSEDVILIKKYDQMAIFHCLFWPSLTLGGALIV

BKb1 AMVKSNOYLSILAAQK.....
BKb2 AMVKLTQYLSLLCERIORINR.....
BKb3a GMVRLTQHLSLLCEKYSTVVRDEVGGKVPYIEQHQFKLCIMRRSKGRAEKS
BKb3b GMVRLTQHLSLLCEKYSTVVRDEVGGKVPYIEQHQFKLCIMRRSKGRAEKS
BKb3c GMVRLTQHLSLLCEKYSTVVRDEVGGKVPYIEQHQFKLCIMRRSKGRAEKS
BKb3d GMVRLTQHLSLLCEKYSTVVRDEVGGKVPYIEQHQFKLCIMRRSKGRAEKS

```

【図7】

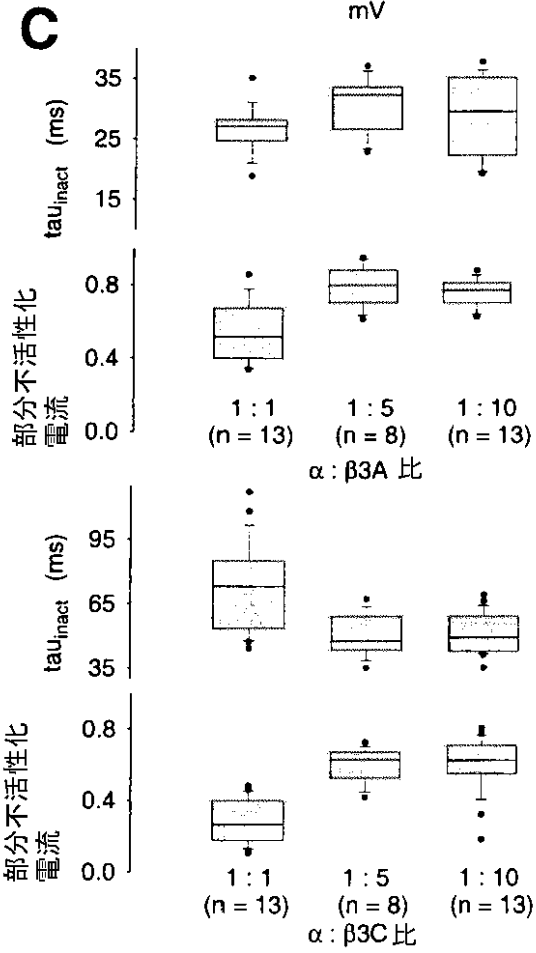
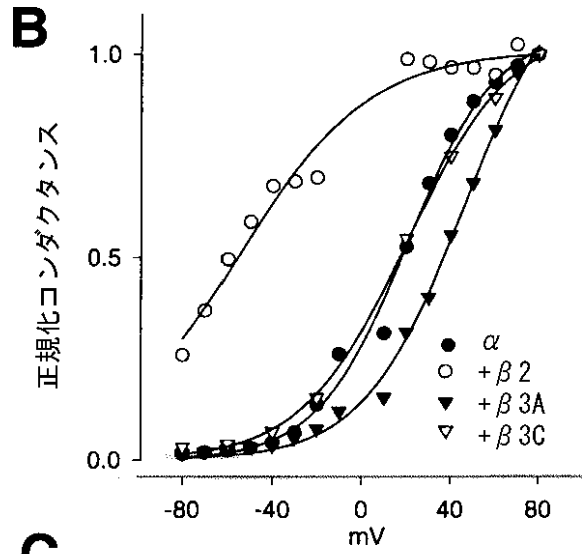
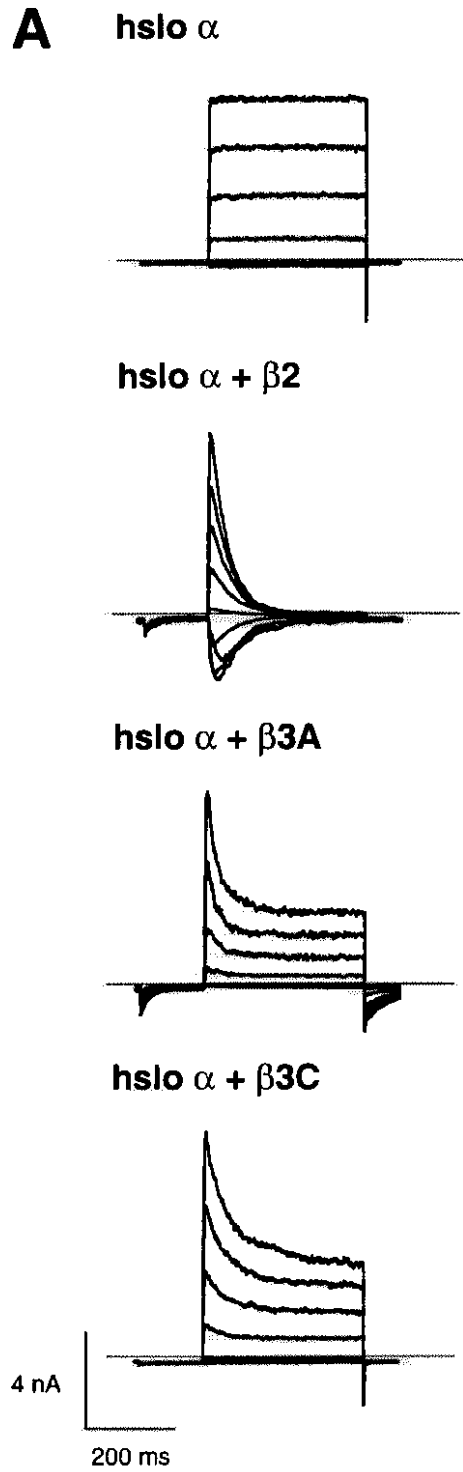


Figure 7

【図8A】

FIGURE 8A

```

1 aatcatgtga gttcatcatt ataaaacagc tgatttataa caactgattt taaagtgggt
61 tgttagcttg aagataaatg agatagggca tgattcaggt ttctgtgtac acactatatt
121 ctaatgaaag taattacaat tatcttctaa acagctgcag atatTTTTTC tataaacaat
181 tttagatggt acattgttaa atgttagctt tcaaattctt cacattttaa ctcaatgaag
241 tcctTTTTtag caaacttaca ggaatcattg tatcattcag ctattaaata aggaattggt
301 ctaattcaca tcttaattaa gaactttact aggttatatc ttttgcaagt atgagaataa
361 tctagataga aggactagaa ttggattaaa ggtgatccag ataaaaatag taattcfaat
421 gaggaatttt tttaacattg aaaatagtac cctgtttatt ttttttaatg ttagagtcaa
481 accattgcac attactgtgt aaaaatacac aaagatggta acttgctgct aaagcccttt
541 ttactTTTTga atctttgtat ttttttcacc tttgtaattt taagttgtgc ttttatcact
601 catttgTTTT ctatctttat ttctgtttgg gttaaagtta caaacagcaa gtttttgtgt
661 ttaaattcct gaaaatggtg cgatggaatt acagtaatgt gttacggctt gggccctcgc
721 caggagtgtg tctcgcagtc agcagtgaaa acaaagttcg aacagcacac tatcagagct
781 aacagatagc tagtactgtg gaaaaacata atggattcag taaacctggc agtctaagat
841 aaaaggtatg agttcatttt gttgcaacat aaaaatgtta gtttttttgt cagacttttg
901 ttaagatgag gttttaaatt gttgtactat aaatactttt tacactgaaa tcaacctgtt
961 gggtttaact gatgcctact tctatatttt taagtgcgta tttgaaagtg tcgatattta
1021 ttctgcaacc ttgcacacat catttatatc ccctggacct cactattcct gtgtatgaat
1081 tgtgattttt aaaatgtttt gtggctttta aatatctttg aagcagtgga agaaccattt
1141 cttcaagcag atttttatga agaagtcocaa aacaggtgat cctctttctg cattcaacct
1201 acgacccatt ttttaatatg gtcatacatt ggtattttga aatcactatt ttatactagt
1261 tgtgtttggt tattgcctgg tgaacaaaca aggcgatgct acctgccaac cagaaagtgt
1321 atttggttaag cagtaccctt tatgttatac tgtacggcat tttttatac tatttgttac
1381 cttgtaaagg tggcaatgaa tacatgaaaa taccagcatt atcgatacaa agtataattt
1441 tcacaaactt ggtatgcttg aaacacagat cgggatgtta ttagatgtga caaaagctaa
1501 tgatgttaag cctcgatagg accttcagtg gacttaagcc agttgaagga aacataaacg
1561 catcaaaagct taagtccaag atgacataac attggaattt taaatgtatt tgctctttca
1621 gggacaaaaga ccccttcctg tcctgtctg ttgctttata atggactttt cttaggaatg
1681 aattaagttc aaatgcagag aattgccagc atataaaaacg caaggatcag aaccctgagt
1741 ttgaaactcag cccctgtgta cagcctcctg gtggcctctg ttttaattaga tcgtgctgct
1801 atagcagttc cttctagctc agttgctttg atgtagtacc caaattttgg cctaaaagtg
1861 atttaatttag taataatttt taaagatata ggatgttgaa caaagtatag cacaaagaag
1921 atgtgatttg aggattgtat aatcataatg tcctgggaac ttcttaagta aaagatcttc
1981 ttaaattgat ctcaggtcct tttttcctg tatcagccag agttgaacaa acttttgttt
2041 aaaaaaagag ccagatagta aatattctag gctttatggg ccataaagtc tcttgagct
2101 actcatttct acagttttag agcaaaagca gccatagata gataataggt aatgaatgg
2161 gtgtggctgt gtttcaagaa aactttaaca aaagctggca gctggctaga tttgcttgt
2221 aaggtgctat atgctgacce ctgcttatta actaaagtca gtattgcatt ctgttttgcc
2281 tgttcatatc tatgaagact tagaattcct attcacctt tctgggattc aggtgccaca
2341 tgggcagaga aacgtggttt ctatcaaatc atctatataa aatactttat aagtgaataa
2401 ttacttgaat cctttgagat gttacaagtt ttttttttcc ttgagtcatg ctaatagatg
2461 gttcaataca tgaatgagtc ccttgctgaa atgctttagg acttcagact acctgaacg
2521 ttgattactc tttatactga aataggcatt attcagtgga agagagggaa gaccaaattg
2581 atagactgga ctttattcga aaccagatga accttttaac actggatggt aagaaaaaaa
2641 tcaaggaggt taccgaggag gtggcaaaaca aagtgggtaa cagtagcttc atgattaaaa
2701 taacctggat ggaaattatt tttgataatg ctaaaaatgt tattcctgtt acttttaaaag
2761 aatgttttca gatttttcaa ttttaatttt ttgaataatt gataatcttg ttttaattatt
2821 ttaactcaa aattttcata ttttcaggtt tcatgtgcaa tgacagatga aatttgcga
2881 ctgtctgttt tggttgatga attttgttca gagtttcatc ctaatccaga tttattaaaa
2941 atataaaaa gtgtaagtta aagtatagat aaaattattc agagacagtt tcttattatt
3001 ctataccctc atttatttca tggtttggca tttcagtgta tcagtacaaa atgaaactgt

```

【图8B】

FIGURE 8B

```

3061 tagatctctt gtgccctctt gtaataaatg taaactgtct tgtataaaaa gtaaatagaa
3121 aatftatact tagaatgaga taaagatcat ttaggacga ggcacagtgg ctcatgectg
3181 taatctcaac actttgggag gccgaggtgg gaggatcagt tgggcccag agttcgagac
3241 cagcctgggc aacacagtga gaactcta atacaaaaaa cagttaggct ggttgcggtg
3301 gctcccgcct ttaatcccag cactttggga ggctgagcgg gacggatcac gaggtcagga
3361 gttcgagacc agcctgacca acatggtgaa accctgtcta ctaaaaatac aaaaaaaaaa
3421 ttagccggtg gcaggcgcct gtaataccag ctactctgga ggctgagggc ggagaatcgc
3481 ttgaaaccgg aaggcagaag tggcagtgg ccaagatcac accactgcac tccaacctgg
3541 gcaacaagag caaaactcta tctcaaaaaa aataaaaaat agccaagcat ggcgacacgc
3601 ttctatagtc ccagttactc aggagtctga ggcaggagga tcgctgagc ctaggaggtc
3661 aaggctacag tgagtcaaga tcaaaagcact ccagcctagg caacaagca agaccctgtc
3721 tcaaaaaaaaa aaaaaaagtc aaataaaaaa gaccattttg gcatttactg aatattttat
3781 gtctttataa aaactacata ctttctggag aaaaaataat atggatattt accattgtta
3841 acaggaatta aataagcaca tagaggatgg tatgggaaga aatttggctg atcgatgcac
3901 cgatgaagta aacgccttag tgcttcagac ccagcaagaa attattggta atatttatgt
3961 ctacaaggct atgtctgggt tgttttttca ttcagactg gtgaagact tattttcctt
4021 taggcattcc attgaaggta aaacatttac cattcttata ttaagtgttg taattttgtt
4081 ctttctagaa aatttgaagc cattacttcc agctgggtata caggataaac tacatacact
4141 gatcccttgc aagaaatttg atctcagtta taatctaat taccacaagt tatgttcaga
4201 ttttcaagag gatattgtat tcccttttt ccttgggct ggtcttccct tgtacatcga
4261 tttttgggcc tagaaatgct caaaggggtc tccataggatt atcagagcct atctttcagg
4321 tatgtatctt tgaatctacc aattaagact ctcttttatt attttgttta tgtggttttt
4381 ctataataaaa actagcttta caaaactcgc acatttaaaa gctagtatct atctcttaga
4441 gccattttct aggtagatat ttagtttgag catctccaat ctgaaaaatc ttaaaaggtc
4501 aaaatgaaaa actttttgag tacggtgaca ccacaggtgg aaaattccac accagacctc
4561 aatgaggcca tagtaaaaaa gcaggcacac aacacacagt ttattcagtg tctcaaggg
4621 aaaaaagact cagcctcttc tagctgcaat atatcttttc cacgtatgcc caaattcccc
4681 cacacaagca cacctatgaa gggactaaa atggcacatg tgcaggtcca gtgcaccaac
4741 agcattttcc ccatgatgcc ccacaagggg ccaagacctt tgtgcattac ccagtatggg
4801 cttcttact tctgtcttt tctctgggtg aaagatactg tttaaaaaaaa attttttttt
4861 gagtggggat gcgtttgaga cagagacctg cgctgtggct caggctggag tgcagtgggt
4921 caatcttggc tcaactgcaac ctccacctcc cgggttcag cgattctct gcctcagct
4981 cctgagcagc tgggattata cgcacccacc accacacca gctaattttt gtaattttag
5041 tagacatggg tttcaccgtg ttggccagac tggctctgaa ctctgacct caagtgatcc
5101 aactgcctca gcctcccaaa gtgttgggat tacaggcgtg agccacagca cccaggctgt
5161 ttaaaatggt taaaaggcct acagataccc ttgtgggtga cattgataag aaaaagaaga
5221 ggcatttatt tttatttata acacataaat ttaagctgtt ggaaaaactg gacaataatg
5281 taagtggaaa acttcttaca gaagaatgat gttggaatga acaccatata tgacctaaaa
5341 gaaagaacaa ctttctcaaa gttgttcttt aggactaac tgttgaagtt ccatgctaaa
5401 aatgatgaca gaagttaatg aaaaaaacaa aaacactgca gaaagttaaa aacgaagatc
5461 ttgatcatgc attgaaagag tggatccatc agcattgcag tgaacacgtg ccacttaagg
5521 acatgctgat catgaaataa acatctatta aatgaactg aaaatcgaag ggaactgtga
5581 gtattcaata ggctgggttag agaaatttaa ggtaagatag cattaacttt tctaagggtt
5641 tgtgggtgta aagcatcttg atcacaacaa agcagagaaa ttcattgatg aatttgccaa
5701 gattgtctct gatgaaaatc tgactccaga acaagtctat aatgctgatg aaacatcact
5761 gttttgcat tattgaccca gaaagacact gactacagct gaggagacag cccctacaag
5821 aataaaggat gcaaaagaca gaataactgt gctgggatgt gctaatgcag caggcataaa
5881 tgtgaactta ctgtgatagg caaaagcttg catctcact gttttcaagg aatgcatttt
5941 ttttactagt ccattattgt actaacaacaa aggcattggat ccttagggac atctttctg
6001 attggtttca caaacatttt ataccagctt gtgtgcactt gcagggaagc taggcccgat
6061 gatgactgca agattttgtt attccttgac aactattctg ctcatcgtct agctgaaatt
6121 cttattaaaa aaagtgtttc attatttcaa ccttgtgacc agggattctc acgatcaatg
6181 aagagtaaat acaaaaacct tttttgggca gcattgctagc agcagtgaac tgaggcctgg

```

【图8C】

FIGURE 8C

```

6241 gtgtggaagg ttttcagaag gagtttagaa tgaaagatgc catagatgct tttgccagca
6301 caaggagttt aggatgaagg atgccatata tgccagcact tggagacag tgactcagtt
6361 gtgtatgcct gcagcctctg cctgtcacta cttttattga tgatgaggag caaatgggtg
6421 actttgaagt atgtcaagtg agctccttat gcaaaaaata atatcttcag agtccatccg
6481 taagctggaa gaaggatata tcaaagaagt gtttgacatt gataatgagg tttcagttgt
6541 tcattcatta actgatggca aaatagctaa aatgcttcta aatcaagggt attatgataa
6601 tgggtataat gaagatgatt tcattgacct cgcagaacaa ctgcctatag gcagcatggg
6661 gatgggctta ttgaagcact agagcagcat gtattcataa cagaacaaga aataggttta
6721 taaaatcaag gagagacttc aacaaaaacc attgttaaag aggcaagtag gtggtagtgc
6781 aggaaacatt ttaaaaggcc attcagcaca atgtcttatt atgccgagag gacccacttc
6841 ttggctccctc aactgcttct gatgtttctt ctacacctac aaagtactgt gtaccggaac
6901 tttttaatca aaacataaca ttgtaggtag agactgaaag cctgccattg ttgctgttta
6961 acagctgata caggtgttct ggtgatgcca ctgtgctgct tagtttgaat acgttatttt
7021 tcaactgttat taatgggtgtg tcttatattt ttactattaa gttcctttgt gtgaatccgt
7081 gtaagaaaat gattgcttgt cagtagtatg taaattcaat caagaatgat ggtgatgcca
7141 aacaaccata gagtgtcac atgggtggct gacatagcaa cacctgtgtt tcttgataag
7201 tcagtgtaca caacctttgt tccatgcaca aaattattta aatattggat aaaattacct
7261 tcaggctatg catataagggt atatgaagca taaatgaatt ttgtgtttgg acttgggtcc
7321 catcctcaag atagctcatt atatctatga actattcaaa aatcctaaaa aatctgaaat
7381 ctgaaacact tctggctcca agcattttgg ataagggaca ctcaacctgt agtatgctta
7441 agggaaagct tatcctaaag ctttcgtcca atactgttgc aggtgggtgct acattcattt
7501 ttgaaacatt tctgttttct taaaagattt ggttttcaca tttcaataaa actagcataa
7561 atacaagcat ttttttaatt ttttttatt atacttttaa gttctagggt acatgtacac
7621 aacgtgcagg tttgttacct atgtatacat gtgccatggt agtgtgtgc acccattaac
7681 tcatcattta cattaggtat atctoctaat gctatccctc ctcttctctc ccatcccaca
7741 acaggccccg ggggtgtgatg tcccccttc tgtgtccaag tgttctcatt gttcaattcc
7801 cacctatgag tgagaacatg cagtgtttgg tttttgtcc ttgcaatagt ttgctgagaa
7861 tgatggtttc cagcttcac gatgtcccta caaaggacat gaactcatca tttttatgg
7921 ctgcatagta tccatgggtg tatatgtgcc acattttctt aatccagctc atcattgttg
7981 gacatttggg ttggttccaa gtctttgcta ttatgagtag tgctgcagta aacatatgtg
8041 tgcattgttc tttatagcac catgatttat attcctttgg gtatatacc agtaatggga
8101 tggctgggtc agatagtatt tctagtctta gatccctgag gaatcaccac actgtcttcc
8161 acaatgggtg aactagttta cagtcaccac aacagtgtaa aagtgttctt atttctccac
8221 atcctctcca gcacctgtg tttcctgact ttgtaatgat tgccattcta actgggtgga
8281 gatgatatct cattgtgggt ttgatttgca tttctctgat ggccagtgat gatgaacatt
8341 ttttcacgtg tctattggct gcataaatgt cttcttttga gaagtgtctg ttcatactct
8401 tgcgccactt tttgatgggg ttgtttttt cttgtaaatt tgtttgagtt ctctgtagat
8461 tctcgatatt acccctttgt cagatgagta gattgcaaaa attttctccc attctgtagg
8521 ttgcctgttc actctgatgg tagtttcttt tgctgtgcag aagctcttta gtttaatgag
8581 atcccatttg tcaattttgg cttttgttgc cattgccttt ggtgttttag acatgaagtc
8641 cttgcccatg cctgtgtcct gaatgatatt gcctaggttt ttttctagg ttttctagg
8701 tttaggctca acatttaagt ctttaatgca tcttgaatta atttttgtat aagggtgaag
8761 gaagggatcc agtttcagct ttgtacatat agctageccag ttttcccagc accatttggt
8821 aaatagggaa tcccttcccc atttcttgtt tttgtcaggt ttgtcaaaga tcagatagtt
8881 gtagatgtgt ggtattattt ctgagggtct tgttctgttc cattgggtca tatctctggt
8941 ttggtagcag taccatgctg ttttggttag tgtttggtag tgtagtatag ttggaagtca
9001 ggtagcgtga tgccctccagc tttgttcttt tggttagga ttgacttggc aatgcccggct
9061 cttttttgggt tccatatgaa ctttaaagta gtttttttcc aattctgtga agaaagtcat
9121 tggtagcttg atggggatgg cattgaatct ataaattacc ttgggcagta tggccatttt
9181 catgatattg atctctcta tccatgagca tggaaatgtt tccatttca cccattcaca
9241 attgcttcca agagagtaaa atacctagga atccaactta caaaggatgt gaaggacctc
9301 ttaagggaga actacaaacc actgctcctc gaaataaaaag agaatacaag catttfaaaa
9361 gaaaaacttt aaaaaattta tcaattcagt aatttttttag gaaatttgtg aaattgtaaa
9421 accatcacca caatttagtt ttagtttttg tcacctcaaa gctgttttac tcattttagt
9481 tcaattatga tttccacctc cagcctcacc actaatctgc cttctgttta tggatttggc
9541 ctttctggag gtttctata aatgcaatca tatagaatgt ggccttatat gactgggttc
9601 tttcacttag tataatgttt tcaaggttta tcatcatggt atcagtgttg taggatgtat
9661 cagtacttca tttcttatta cggctgagga atattccatt atagatacaa cactatccat

```

【図8D】

FIGURE 8D

```

9721 tcaccagttg atggacatta gggtagtttg tagtttttgg ccattatgaa tactgtatata
9781 aatattcatg tacatgtttt ttatgtggac gtgcgttttc atttctcttg agtatatagc
9841 taggttctaa tgggtataga gtagtattcg ttgtaggttt gatttgcatt tcctaatga
9901 ccaatgattt taaacatctt ttttgtgtgc tcactagcca tttgtgtatc ttcttttgtg
9961 aaatgtctat tcaaagcttt tacctatfff taaattatff gggctctata gaggttgcagg
10021 atttctttgc atattctgga tcaaatcctt tctcacatat atgatttcca aatagtfff
10081 tttatfffft gagacaagga cttgctatgc ccaagctgga gtatgggtgg gtgatcacag
10141 ttcactgcca cctctgcttc caaggagctg ggaccacagg catgtgccac cacacctagc
10201 taatttaaaa gaaatfffft tagacacaag gtctcactgt gctgtgctgg ctggtttcaa
10261 actcctggtc tcaagctatc ctctgccat ggccctccag agtgctggga ctacaggcat
10321 aagtcactgc acccagcccc aaatatatff ctcttgctg tggctgtgtg ttttgaagtt
10381 taagaggttt ttatfffft gtcctfffft tttttfffft tttttttgag actgagtttc
10441 actctgttgt ccagactgga gtgcagtggt gcaatctcgg ctactgcaa gctctgctc
10501 ctgggttcac gccattctcc tgccctagcc tcccaagtag ttgggactac aggcctccac
10561 cacctcctg gtctaattff tttttttat gtatfffft tagagacagg gtttctactgt
10621 gttagccagg atggctcga tctcctgacc tcgagatcca tccacctcgg cctcccaag
10681 tgctgggatt acaggcgtga gccaccgcgc ccggccgaag tctttttttt ttttttagt
10741 ttatcatttt ttgttgttgt ttgtttcaag gattgtgctt ttgttgttag ttttttaaa
10801 aacacacttt gttcctcttg agagttgagg gcctactggt acatttagac cccattgtat
10861 attatgaaaa ttattgtttc atgatatcat tggccatat tgtagataag aatttccaaa
10921 ttatfffft tttctacata tatttgtggt gtactcatca tttagggtaa ttttccctc
10981 atagatgtgc tactataatt ttagagttff ataaagataa ctttatagtt gtttaagtt
11041 aatctfffft cctttctctt tttttttggc agctccctag atcttttagt tctactcca
11101 ctgctcctac cactccagca acgcccagata atgcatcaca ggaagaactc atgattacat
11161 tagtaacagg attggcgtcc gttacatcta gaacttctat gggcatcatt atgttggag
11221 gagtggtgta aacattact ttagtataa ttaaaatcga aatgtttgca aggtgcctg
11281 ttagctcaca aaagaaaagg tatacagtat ttacttctat ttataggatc tgtaaaatag
11341 tatgaaaatt tgcaggttaa aagtagtgaa ttaaatatca caagtttcat cttaaatff
11401 taaaaaacat acatcttttag gaatgaacta tcaccaccta gctggctctt aatcttctc
11461 aagcattttc acatcacagc acacaaagaa atatfftgtac gttgaggtaa taagaaaacc
11521 ccaggtgccc tatctagcct tctctgaata tcaaggggat ctgtcttaag tattaaatgt
11581 tatttttagt agtagttctt atttgtttct ttaaaaaatg tatatcatta acagcatgga
11641 tatgcttggt ttggtttttg aaaggtctga cttacaatat ttaacattgt tttatfffft
11701 agatacattg aatcaggata agtctggcag cttataaagc tctccctcat ttgtgtgctg
11761 atccctttta agcctgattg atttctggta acttcaggtt ttctcatgga gaaggaatat
11821 acatttttag aaaatgtatc taactcaaag atccataggg aactaaaatg cttttaaatg
11881 tactctccaa agtgggtggt ttccctctca gactaagcta tgactttatc ttacagattt
11941 ggaaaactat aggtcggaaa ctccatctg tttcattaac tatgtatgga gctttgtatc
12001 tttatgaaag actgagctgg accaccccat gccaaaggag cgagccttta aacagcagtt
12061 tgtaaacatg gcaactgaaa aactgaggat gattgttagc tccacgagtg caaactgcag
12121 tcaccaagta aaacagtaag ttggaagggt catcttctct ttaaaaaaaa gttactgaaa
12181 tatgacatac atgcagaaaa agcācaaaat aagtgtattg ctcaagaat taccacaaaa
12241 tgaacatggt tcgtgatggc cataaatgag aaaaaataga acaatactaa acctcactgc
12301 tgccctttct cctcctaat cactattctt ctttccattc tctgataga ttaggtttga
12361 acattagaaa attggtagat aggaactctc aagaactctg gaggggttta aaaagatagt
12421 tcttaatfff tttctfffft tttcagagat aggtctctg tcgcccaggc tggagggcag
12481 tggcacaatc tggctcactg cagcctcgaa tcttgggctc aagtgatctt actgcctcag
12541 cctcccagct agctgggacc acaggtgtgt gccaccacac caggataatt ttttaatfff
12601 tttttttctt ttgagacagg gactcaatat gttgccggg ttggtcttga ccacctgggc
12661 tcaagtaatc ctccctctc aagcctcctg agtagctgag attataggca tgagccacca
12721 tgcccaactc aaaagatctt cagcagcct attctaaatt tatgtactg gctgggcaag
12781 gtggctcagc cctataatcc cagcacattg ggaggctgag gcaggcggat cacttgaggt
12841 cgggagttcg agaacagcct ggccaacatg gtgaaacccc atctctacta aaaacacaaa
12901 aattagccgg gcatggtagc acatgcctgt aatctcagct agttgggagg ctgaggcaca
12961 agaatcgctt gaccctggaa ggcagaggtt gtagttagcc gagatcacat cactgaactc
13021 cagcctgggc gacagagtga gactctgtca cacatacaaa aaaaattaag cactggatat
13081 agatttattt ttctattctt tgtcttttct tcttagaaa gtgaaacaga aaaaaacaa
13141 aataaaataa cttctaattg attaagaatt caggttattt gtgtctctat taataggggt

```

【図8E】

FIGURE 8E

13201 tattctataa catttaggaa tgcatacaaaa ttcattgatca gatatacactt gccaaagaatg
 13261 ggggcttcat cagatccgga atagaattta tctaaaagtg atcaagacat gcagacttat
 13321 aaaaagctat gaacatcctg tctgtataac aacttggcca gcaacattcc tggcgcaaag
 13381 ggctaaggct ccttcaagcc ttgagaataa gacacttaaa agaataagcc caagctcctc
 13441 ctgagcggagg aggccgaata ttgtcagtag aagcatggac ttttggatgt gatctgttct
 13501 ggagccccgg acctagccct tggtactttg tgatttttgc acaagttctc cggactctct
 13561 ggtcttctgt gtcctcatct gctgaatgcg caaaaagtcc ctacctctc aagttctgtg
 13621 tctgaaggac attatgttct catagcactg agcacaatcc ctggcacatg gttactcagg
 13681 gcacccaagt taccattatg tgtctaggga aagttgggtt gggcatgcag ttgttgaatt
 13741 ctcttcttct tgggtgagcg ctgcctctca gcagctgatg ggggaatcct tgcattattg
 13801 tcactccagg agagaagata cctgcttctc gcaagcaaac ttacggtttc atacacttta
 13861 ttggatctca aaggcagatc tttttttggt ttgttttgct ttcttgagat ggagtttctg
 13921 tctcgttgcc caggetggag tgcaatggca cgatctgatc gtggctcact gcaatctctg
 13981 cctcctgggt tcaagtgatt ctctcgctc agcctcccaa gtatctggga tgacaggcat
 14041 gcgccactat ggccagctaa tttttagtct ttagtagaga tgggtttcac catgttggtg
 14101 aggctggctc cgaactcctg acctcaggag atctacctgc gtcagctccc taaagttctg
 14161 ggattacggg ggtgagccac cacaccggc ttaaaggcag atctttaaag cacttaaat
 14221 catctgctct aactcccaca ttgcacagag aaataagctg agttccaagg aggcagcata
 14281 acctgagact agaaatggtg cttaggttcc taagcccagg cctccaaggt ctatttactg
 14341 tataatgtga gctgatgtct cccaaagtat aaatgtaggg tcacctgtgt taggatcata
 14401 tgaagggctt tttaaaatgc aagttcttgg gtcctttacc ctaattgttt tatcagaatc
 14461 tctagagatg ggacctggga atctgtatct aacagaggat cacacctgag ttcaagaacc
 14521 actcatgtag tagaacaatt acctcaactt aaaatatgaa atgtatctgt agcaagtgcc
 14581 acctggtaaa gacttgatca cagtggattt caaacaagac aaagtattga gggctgttga
 14641 actgtcaaag aatttcagct attatttcta ttagtttctg cctcactatc catcgagttg
 14701 tttgtatgcc aggataggcc aagttctctg gctctgtga gcttgtgtaa gctcagtag
 14761 ctctctgctc ttgaaaaagc ccaaaaagtg aattaacatt tgtatagact tagaactgta
 14821 actagctcat aaatagtage cactagtatt atcactcaga gcaggaaaag catctgcaca
 14881 gaggtgacgc tggtttctct gatgtgagcc tagttcaggc agtcagggtc ccatttgatt
 14941 agcaagatgg ctggagataa taatcagggt aaaggaaagg aaagatccca tcgaaggctc
 15001 cagaagtttg tggcacagat catacttctc tgttgtttgt tttcctgcaa agagaatgta
 15061 agatcagatg tgactttact tttgacagtt tgaattcttg ctccatcag caaaaattct
 15121 ccatattgga ataactgtcc agttaggggt ttacttattc tcctacgaac aaatatagat
 15181 agtcacgcaa agaacatagg ctggtgtgta aattttaggt tgttgtcaat gatttgtgca
 15241 tctctaatt ggaaaacaca gacatagttt tcatgaacat ggagaatttc gattacaaa
 15301 taattcttag ccataatagg tattgtatat ttaattgaga gaatgtgaaa aacaatgagg
 15361 aagtagtttc tccagtatgg tgaaggcaca agagggttct tttttttccc ctaagtaag
 15421 catctactaa atgcaaaaaga aatgattgtg gactctggaa tctggaatcc acgatgctag
 15481 cactttgcag taatagcctc tttcatatat agatctcaca acagtttgta gacactaagt
 15541 ttttccatgc tctgcaact cacactgagt ttttatttac tcccttttta ctctgaaaa
 15601 gcagggcagg aagtttttaa agggttcctt gcagttacaa agctagaatt tgaaccagt
 15661 gtcaaagcct ctgggtcaga ttgggagggg gccacggtt tgaacttgac agttaattca
 15721 tggttgctgt tttatggagc aggaagtgac ctttagtgc tcagaggaag gaataagctg
 15781 agggagggtc caggagacca gaggtaacgt gcctggcatc tcttatcact gcattctaag
 15841 tggcttagcc ttgctgtgtt cctgaatgca cacattggga ttgcaactca caccgaccac
 15901 ttaggttctc tcttgagaga taggctgtga gtcctgaatg gagtgtgtgt gttagggg
 15961 cttggcttcc aggccaaagag tggagtgagt gtggtacttg gtggacagag aggccagttg
 16021 gttatcaagt gaaggggctg tagggaaaaa gttcagaggg caaaaagcta tgttgcctc
 16081 tctcacttat tgtccatgag tattttcttt taaatggaac cggaatcata agataagaat
 16141 gaccaggagg ctctggtaaa ggcaggtgca agttttgtgt gacaagatcc tcatggacta
 16201 aaaaatgatc atatttctga ggttgaatca aatacataaa agcagcagca aatcacacac
 16261 ttcttcaag agagttacca agttgcaggg gaaatttatt agcacaata agtctgaaaa
 16321 ggaaaagcta tccatatata caaggttaag ttggaagaag gaggcagaaa gaagaaattc
 16381 cagttgttat cattattttt tattccaaat tgcactgttt cactaaaata ctctggactg
 16441 ggtgcagttg cttacaccta taatcccagc actttgggag actagggcgg cagactactt
 16501 gagtcaggc attcgagacc agcctggtca acatgatgaa accctgtctt tactaaaaat
 16561 acaaaaatta gccagtcgtg gtggccatg cctgtaatcc cagctactcg ggaggtcag
 16621 gcaggagaat cgcttgaacc tgggaggtgg aggttgcagt gagccaagat tgagccagtg

【图8F】

FIGURE 8F

16681 cactccggcc tgggtgacag agggagactc catctcaaaa aaacccaac aaatatttta
 16741 taaaatagaa atagaaaaat aatacaaatg aaaagtctat taagtatata tttttattaa
 16801 gcaatattaa aatgactgca agtaagagtt tatatagcta tatgtacatg gatatttata
 16861 gatgagatta cgcttacatt ctgcccaca ccactctgga aaatgttaag ataatatcgc
 16921 ctgactgaa aaacatacag caaacatggt ctctttggca ttctgtcatc cacatctaca
 16981 ggtgcctgta gcaatgtgtg gtactataat ataatggtaa ttgatgttcc taatttggga
 17041 gtgtggaaag atccccaat gtcttttaag tcatcagaga aagataaaaat aatatttgat
 17101 acagcttttc ttaaaatttg agataatttt aatggcgagt tattttatgg ccctttgtat
 17161 ctggaaaaat tgggaaatca catatggttt aaaagcgaat tatcttaatt ggaacatgcc
 17221 attaactaga aaacccatta ttccagcttg cactctaaac gacaatacgt ggaaaaggaa
 17281 acgcgccag ggcaaacat ttctcttctc tataaacctt gaactgagta cgccctcac
 17341 caattataga gggccccctt gggcctcaga actttccaca agcgttgagg tctctatggc
 17401 gatgctccc gctgccgagg cggaaacaca ggtgatgagg tggcggcaag cacagtgcaa
 17461 agagagagaa gcagcttcgg ctgcagcaaa ccacgcaggt ccttcttgat catctagaac
 17521 tgaccgctcc gccttgccag gactctgag aaccacgtgg ctagcctgcc tgaagtctc
 17581 acctctccag gaaggcgggg ggcttctaag ggctgcagct gcgctggggg ctgggggctc
 17641 ccgctgggac tccacttccg tggatgtcta agcttcaact ttcttgccc cgcaggggca
 17701 tgactcaggt gaaagggagc cattttctca gaccctggc ctcatgcagc ccttcagcat
 17761 ccccgtgcaa atcacacttc agggcagccg gaggcggccag gggaggtaag tcaactccgg
 17821 aagctctgcc ggtagtggga atctggctga acaagcagtt gcaagaagag gggacatctc
 17881 gagcttgggg agtgagtggt tctttttct ctgaggatgc ccacttgcca tgcctcccag
 17941 ggtaccagc aggttccccc agtagcactc acatcacggg gctgcagcct ttctgtttgg
 18001 ctctatctc taggttgcca gttctggag actggagacc ttttaaactc acctgtttgg
 18061 cccagcact gatcatagcc cagcccatag ttggtgctca agaataactc gttggtgaa
 18121 tgaggaatga agaaattaga ccagcatttg gtcccattgg tgaagccctg gactcacagc
 18181 ccttggattc aaaccagct caccacttaa tcagccatat gactgggcag gtcccattgg
 18241 tgaagccctg gactcacagc ccttggattc aaaccagct caccacttaa tcagccatat
 18301 gactgggcaa gtcacttaac ttctctgttt gcctcatctc cttatctgtg aaatgcagat
 18361 agtaagagcc cctgcgtgtc tcagcacagt ataccacatc ctctctaaac tatactgta
 18421 taccgggtat acgctctaca cctccctaaa ctctagcctt ttagctattg ttattacca
 18481 cctactctt ctccctaaag ggggaagtga gagattattt tcaggaccoc ttttctcccc
 18541 agggaaatga aaagcaaaga agctgaagc ctctagtgc ctgcaacctc ttgtcctgcc
 18601 ctagggttgg ggcattggggc agtcaatgtg ggaaccaaaa tggagagaag agtgatgect
 18661 gaggtgttg gacaaatggg atactaaac cttttgtgcc aggcgctgtg gctcacactc
 18721 gtaatcccag cactttggga ggccgaggtg agtggatcac ctgaggtcag gagttcgaga
 18781 gcagcctggc caacatggtg aaaccccgct tctactaaaa atacaaaaat tagctgggca
 18841 tgggtgggtgg gcgcctgtaa tcccagctac tcaggaggct gaggctggag aattgcttga
 18901 acctgggagg aggaggttgc agtgagcaga gattgtgcca ttgactcca gcctgggcca
 18961 caagagccaa actctgtctc aaacaaagaa aaacctgttg ggaggggtac atttcagaac
 19021 caggttcaact cactatctgg aaatagcat gatttattat tggctctagt ggagttggga
 19081 gctgagaatt ggaaaacatt aaagatggta atggctatca tgttactcag ttccattatc
 19141 acttaactgc actcaggggt atttgagagg gagcatgagg agagtgagat acaggagttt
 19201 ggataagatg ggggttcagg gaagaaggac cagacagact acagaggaaa gaaaggtgtt
 19261 cttctcgcta gacatgaacc aatttttttg tgaacagaca attaaaatga attactttat
 19321 ggcaaaagat caaatgacaa acatgcaagc aaacaagttt tagtgtccca tacgtcacac
 19381 aattaactag atataaagc agttgtgttg tcatcaaagc aaactactgt atcccatttt
 19441 catttctgaa atgcacaact gaattattgc tatttctctc tgcagaactt gatgaactat
 19501 gttgacttaa ccttatttgc tgtttcaaaa taagtgttta aataatgttg taattaaaaa
 19561 atagaagagt aaaaataatt accaagggtc tctctgttaa ccaaacgaa ttacagggaa
 19621 atattaatat agtgtacttc atgtttagac attcatttca cataccccc tgaaatgaa
 19681 gtcagatgaa ttatgaagtt ttgatgagcc acagcatggt tctaaggaat acttctgca
 19741 aaagtttcag tgctggaggg agaggctgct ggcttctgtg gggatcacac ccagggtgagt
 19801 gtgttcaggc tgtttgtaat tgagtttggc tcaggctaag ccagaagctg cctgtagcca
 19861 tgtgtctgac ttgggctggg tgggaaagtc agtctatct gcagtgaaga gaatagaagg
 19921 tgggtgatat tgccttgatt atgaataaaa cagctcaagg taatacactg gttagaagcg
 19981 gacatgtatt actggcagaa aaaggaatca atatgctttt tatccatctt cctgactaga
 20041 aagcaacta gatcatactt aagtgtttg aggtccttgg atgaaagatg cttgtaata
 20101 caacaaagtt aattacaagg ctgtttatgg tctgagaaaa ctggaaacaa cctaataata

【図8G】

FIGURE 8G

20161 ttcaataata aggaaatggt taaggaaata tggcatatct aattgatgga acattatgta
 20221 gccaatagga ttacaaagaa ttgttaatga catgggaaag tgcttattat gttaagtgaa
 20281 aaagataaga ttaacaaaaa aatctcaaat catatctaata gtgatctcat tctgtttaa
 20341 acaatatagg ccagggtgagg tggattatgc ctataatctc agcactttgg gaggccgagg
 20401 cagggtgatc acctgaggtc aagatttcga gactagcctg gccaacatgg tgaaaacccg
 20461 tttctactaa aaacaaaaaa attagctggg cgtggtagcc ggcgcctata atcccagcta
 20521 cttggggaggc tgaggcagga gaattgcttg aaccgggaa gcagaggttg tagtgagctg
 20581 agatcatgcc actgcaactgc agcctggatg acagagtgg actccatctc aaaaaaaaa
 20641 aaaaaaaaaa aaagaaaaga aaaagaaaaa caaacagaa acaaaaaaca aaaaacaaaa
 20701 aacctaatat agagcaggag gggattaacc cagcaacca agtgcacaat cattaccttt
 20761 aagtgttggt ggtgagtttt tgttctcttc tgtacatttt tttttgtatt tttcaagttt
 20821 catacaatga gcatataaaa atatattact ttcatgaatc atttgacatt tgttgaggaa
 20881 tttcttgggg ctaagtttgt agtcaggctc tgagagggtga caacgtgctg gcagcccttg
 20941 cagccctcgc toctctctcg cgcctctctg gccttggcgc ccaactctggc cggccttagg
 21001 gagccccctt ctgggctggc caaggctaga gccggctccc tcagcttgca gggagggtggg
 21061 gaggggagagg cgccggcggg aaccgggct gtgcggggag cttgcggggc agtccgagtt
 21121 ccagggtggc gtggactcag cgggcccagca ctccgagtg cgcagccggc tacaagccac
 21181 ggacagtgg gggcttagca cctgggcccag cagctgctgt gctcaatttc tcacagggcc
 21241 ttaggtgcct ccccgccggg cagggcttgg gacctgcag ccgccatacc tgagcctccc
 21301 cccgctccc tgggctcctg tgccgcccga gccctcctga tgagcgtgc cccctgctcc
 21361 acggcaccca gtcccatcca ccaactcaagg tctgaggagt gcgggcacac gcacaggact
 21421 ggaggcagc tccacctgtg gccccggtc gggatccact ggggaagcc agctgggctc
 21481 ctgagctgg tggggacttg gagaacgttt atgttttagct aagagattgt aaatacacca
 21541 attggtactg tgtatctagc tcaagttta taaacacacc aatcagcacc ctgtatctag
 21601 ctgagggttt gtgaatgcac caatcgacac tgtatctagc tactctggtg gggacttggg
 21661 aaacgtttgt gtccacactc tgtatctagc taatctagtg gggatgtgga gaacctttgt
 21721 gtctagctca gggattgtaa acgcaccaat cagcacctg tcaaaatggg ccaatttagct
 21781 ctctgtaaaa tggaccaatc ggctctctgt aaaatggacc aatcagcagg atgtgggtgg
 21841 ggccagataa gagaataaaa gtaggctgcc ccagccagca gtggcaacct gctcaggtec
 21901 ctttccacgc tgtggaggat ttgttcttt gctctttgca ataaatcttg gtactgctcg
 21961 ttttgggt ccacgctgcc tttatgagct gtaacactca ctggaaggt ctgcaagctc
 22021 actcctgaag ccagggagac cacgaaccca tcgggaggaa tgaacaactc cagaggcgc
 22081 gccctaaagag ctataacact cactgcgaag gtccgaggct tcattcttga agtcgggtgag
 22141 accaagaacc caccaattcc ggacacagtt tcataaatgt tccatacatg cttgagaata
 22201 atatatattc tgtagaagtg agtattctat atttatcatt tagataaaac ttgttaattg
 22261 ctttacttaa atctattacc ctactggttt gttcaggtca agctatctaa attactgggg
 22321 gagtgtataa aaatacatca taatctgata gtggattttg tctatctctt cttgtagttt
 22381 aatcagtgaa acaatgctat caggtaaccta caaattagca ttgttacatt ttccgtgtga
 22441 attgagcctt taatcagttg taaaacactt atttttaat ttctaataaa gctttttaat
 22501 ttttaacatt catgtttgct ttttgttaca ttttgcctat aaatttcacc ctttttgtat
 22561 ctgtgtttta gatgtatctt ttgtaaaaac atgcatatag atagttctcc atttacagtg
 22621 ggattacatc ctgacaaaac catcataagt ggaaaatact gtaagttgaa aacttcagag
 22681 tattagctat ttacctcat gatttgtgtg cagactggga actatggctg gctgccactg
 22741 cccagcatct caagagagta gggtaactga tatcgctagc ccaggaaata atgcaaatc
 22801 aaaatttgag gtacagttc tactgaattc atattgcttt cacaccatag taatgtaaaa
 22861 aaattgcaag tgtggggcgg gggggccat gggggggcg gagggcggcc agccccgctt
 22921 cccccggccc attccacccc cggccaggct cagcccggcg ccacctacgc cccgcccctg
 22981 ccggctgccc ccgagcccag tcccgcgagc cgtccccgg cgggtggctt cttggccccg
 23041 gaagcgcgag cgttcaactc gggcgagtg gctccgtctc cgcggacaga ggcgcgccc
 23101 cctggcccgg cccggggggg ggggctccgg cacggctccc gagcgtttcc cgcgggtgg
 23161 agcggggcga gccagcagg ttgaccagcc ccgcccac gcagagccgg gagatctact
 23221 gttgagcgc ggaagcgcag aggtggcgg aggccggct cggcgaaaa cgggaggccc
 23281 gcgggaggc tctgagatc cccatgaagg agctggagcg gcagcagaag gaggtagaag
 23341 agagaccaga aaaatatttt actgagaagg ggtctcgtaa catgctgggc ccgtctgcag
 23401 ccacgctggc ctttctgggt gggacttct ctacagagag cagcggagac acctctatat
 23461 ccacgacac cgaggcgtcc atcagggaaa tcaaggactc tctagcagaa gttgaagaga
 23521 aatgtaagaa ggctatggtt tccaatgctc agttagacaa tgaaaacaca aacttcattt
 23581 accaagttag cacccgaaa gatatgttc tggagattga agaacagctg gctgaatata

【図8H】

FIGURE 8H

23641 ggcggcagta cgaagagaaa aacaaataat ttgaaagga aaaacacgcc cacagtatac
 23701 tgcagtttca gtttgctgaa gtcaaggagg ccctgaagca aacagaggaa atgctcgaga
 23761 aacatggaat aatcctaaat tcagaaatag ttaccaatgg agagacttcc gacactctca
 23821 gtaatgtttg ataccaagat cctaccaaga tgacgaaaga agagttaaat gccctcaagt
 23881 cgacagggga tgggacccta ggaaagccag tgagggtggag gtgaagaatg aaatcgtggc
 23941 gaatgtgggg aaaagagaaa tcttgacaaa tactgagaaa gaacaacaca cagaggacac
 24001 agtgaaggat tgtgtggaca tagaggtatt cactgctggt gagaataccg aggaccagaa
 24061 atcctctgaa gacactgcc ccttcctagg aaccttagca ggtgctacct atgaggaaca
 24121 ggttcaaagc caaattcttg agagcgttc tctcctgaa aacacagcac aggttgagtc
 24181 aatgaggtc atgggtgcac cagatgacag gaccagaact ccccttgagc catccaactg
 24241 ttggagtgc ttagatggtg ggagccacac agagaatgtg ggagaggcag cggtgactca
 24301 ggttgagag caggcagaca cagtggcctc atgtccttta gggcatagtg atgacacagt
 24361 ttatcatgat gacagatgta tggtagaggt ccccaacag ttagagacaa gcatagggca
 24421 tagtttagag aaagaattca ccaaccagga agcagctgag cccaaggagg ttccagtgca
 24481 gagtacagaa gcaggtaggg atcacaacga agaagagggt gaagaaaaag gattaagggg
 24541 tgagaaacca atcaagacag aagttcctgg ttctccagca ggaactgaga gcaagggtca
 24601 ggagcgaca ggtccaagta cagtagacac tcaaagtga cccctcagata tgaagagcc
 24661 agatgaagaa aagaatgacc aacagggaga ggcattggac tcattgcaga agagaaagaa
 24721 caagaaaaag aaaaagaaga ggaaaaaatc cccagtacc atagaaacc ttaaagatgt
 24781 ttaaaaagag ttaacttata agaacacaga ttaaagtga ataaaggaag aagagcaggt
 24841 aaagtctact gacagaaagt cagcagtggg agcccaaac gaggtgactg aaaaatccaa
 24901 acagaaaatt gcagcagaaa gcagtgaaaa tgttgattgt ccagagaaat ctaaatgaa
 24961 gttggatgga aaacttgacc aagaaggcaa tgatgtaaaa acagcagctg aggaggtact
 25021 agtggtaga gacacattag attttgagg tgtcacagtt caatcatag gcccgagggc
 25081 tgggtgtaga gaattagatg aaggtgtgc aaaagataat gctaaaatag ctggtgccac
 25141 ttaaagcaat cctgaagaac cagagagcga agatgcagat cactgcaccg tacccaaaaa
 25201 tgaagttccc tcacaggaca ttagtgatgc ctgtgaagca gaaagtacag agaggtgtgg
 25261 gatgtcagaa catccaagtc agaccatcag gaaagctta gacagcaata gcctaaaaaa
 25321 ccatgacttg ttggcaccag gaggagagcc gggggacttc aatccagaaa gcagagaaga
 25381 taccagagga gggaaacgaga agggcaaaag caaagaagac cgtaccatgt cctaagctga
 25441 ggcagggcgg agggcgtggtg cacaggaagt ctgagtgtga ggggctctt tctctccact
 25501 gccaatgtaa gtagaatggt ctaaattcat agagatgcac tgfatgcca tcaccaggtg
 25561 atctactgct ttaagttata gactgttact tgtagatttc catgtaatca ttgaggttat
 25621 cacccagatt agaaagacat atttgttata agtgtacatt ctaattgaga gcatatatac
 25681 agtagtatca aacaataatg tctactgtt atagtccact taataaaaat agaagcattt
 25741 accatttgcc ttaggctgat aggaatgtga atattcttga ccaaatatat cagcatctaa
 25801 ttgaaatgac caaatagcat tcttagact ctgtattatg aatataattg atatttaaat
 25861 taatgtcttg tcatatatg tgtactttca tatttgattt taaaatatac attataacct
 25921 gtatggtatt ttatttaaag gagataaacc gccaaatagc aaataggtca ctgaaaagat
 25981 ttgcacetta gaacaataat cattttaagg ataacaagta aaggtctgaa agcatgaggg
 26041 gctttatgtg ccttcacctc atataagttc ttgattttga accaatgctt ttggatctca
 26101 ttgttgatga tacttgaatt tactttgtag gagattttaa cttcatgctg atgatgtatc
 26161 aaattcattt tatacaaagt ttaaagattt tttctggaag tgatacatgt caaattacat
 26221 ttcctactgc agtatttgag cagggacagt cattttttaa atgtttttgg ccgggtgtgg
 26281 tggctcacgc ctgtaatctc agcacgttgg gaggccaagg cgggtggatc acctgaggtc
 26341 agaagttcaa ggccagcctg gccaacatgg tgaaccctg tctctacgaa aaatacaaaa
 26401 aattggccag gcgtgggtgg gggcgctgt aatcccagcc actccggagg ctgaggcagg
 26461 agaategctt gaacctgcca ggccggagatt gcagtcagcc aagatcaagc cattgtactc
 26521 cagcctggac aacgagcgaa actctgtcta aaaaacacac acacacacac acacacacac
 26581 aaaacaatgt tttcatgctt gtaaccctag cacattggga agccaagttt ggaggtcgc
 26641 ttgagggcag gagttcaagg ctgcagtgag ctatgattgc accactatac tttagcctgg
 26701 gagacagagt gagaccctgt ctctaaaaaa aagaaaaagt ttttgaacct taaaattact
 26761 tctctttgtt tgaatttcta atcatcattc aaaagaacag ttaaaaaagg ttactttgtc
 26821 ttgtgcaact acaaattaga ctggagttag atatttttaa gagctgaatc acttttggtg
 26881 tttgtttata aatgttttca ttgtttatgt cccagttat tcttattgga aaattcttgt
 26941 tttgatctgc ctgaagaaaa tatctgtttt ctatataaag aaacatttaa aaataattgt
 27001 aaagttagat ttaattgtaa aatataaaat cacaaggaa tgtaccttat gaatgttgac
 27061 attttatgaa attatgtaga ttcataatc tgttacaaga tagaattgaa tgcaaaaaga

【图8I】

FIGURE 8I

```

27121 ccaaatcctc attaaaattt gaggaaaaca taagtgttat tatgtaattg aaataaaaac
27181 attttatagt tgtaaaaaaa attgcaagtg gaaccatctt aagttggggg acatctatat
27241 gtatttaaat ctagtctgac aatctttata tttgaaaaac agttttttta gagatagggg
27301 ctcacctatc actgaggctg gagtgcagtg gcacaatcaa gcttattgca gcctcaaaca
27361 cctgggctca agcaatcctc ctggctcagc ctcttgagta gctaggacta taggtgtgcc
27421 actacaactg gatgggtgtt taatttttat tgtgtagaga cagggctctg ctatgttgcc
27481 caggctgggc tcgaactcct gggttcaagt gattctccca cgttggtttc ccaagtggtt
27541 gggactatag gcatgagcac cacagcctgc cctactctct atcttttaac tggatcattt
27601 actccattta gttttattgt aattactgat atactgatgc aataacatta ttctatcatg
27661 ttattctgtg ctatttgtcc tgacttnttc atgagttttt cctcatctt tattgctttt
27721 tttggattga tttttccct ttccattctt tgtttctcta ctagtttggg atttctggag
27781 tatcacctaa aagagtagag aaaggtgata tttctattta gcatgcatat ttgaactttt
27841 caacatgaaa ttaatgtctt tatttttccc catggaaaaa ttatcactgt tactccctct
27901 aaattatatt ctcttgtcat gtatttatct tttcttttaa cccacaaga cataatagta
27961 ataagataat tactattatt attattttgt agaattaata tctttttttt tctttgagat
28021 ggagtcttcc tctgttgccc aggtggagt gcagtgggtg gatcttggct tactgcaacc
28081 tctgcctcct gggtttaggt gattctcctg tttcagcctt ccgagttagct gggattacag
28141 gtgtgtgcca ccacgtccag ctaatttttg tattttttgt agagatgggg ttctgccatg
28201 ttgggcagtc tggctctggaa ctctgacgt caggtgatct gccacctgg gcctcccaaa
28261 gtgttgggat tacaggcgtg agccactgtg tccagcctag agttaatata tttacttacc
28321 tgtttacttc tgtatttgcct ctccatttct ggttaaatat cagctgttat ctggattttt
28381 ttogttctgc cttgagtaaa tacttgacct tttccttca gtgagggctc atcaaggaca
28441 aactcagttt tgtgtttgaa atgtctttgt ctgaaatgct tttattcaat gagaggattt
28501 tttgtagac atagaattct gtggtaactt tttctcagta tattgataat attcttgcct
28561 tatggcttct agtcttgtta cagagaagta agctctcagc caaattgtca ttactttgaa
28621 gttaatgttc tttttctttg ggcactgtta agatttctc ttgtcttgt agctgtgcaa
28681 tatactctgt atgtgtttaa gtgtggttcc tctttatttt atcccatggg cttctggagt
28741 ctgggaactg gtcttcaatc agttctagaa tttgactatc tttttaaaat attgcttctg
28801 acttatgtct cttttcttct ggaattctga atagatatta tttccattta aaaatctctc tgtattatac
28861 ctttcatgtc tctgaacctc tcttaatac tttccattta aaaatctctc tgtattatac
28921 tctggctatt tttgcagatc cagctctgtg ttcactaatt atcttctcag atgtatctaa
28981 ttgagtgtta tgtctgttca ttaaattttt actttcaatt attttatttt tgatttctat
29041 aaattctttt ttaaattatta gctctacatt ttagaattcc ttgatttctg acattttgga
29101 tcttctcttt atttctttaa atatgttaca gatgtgtatt ttatattcta tgcaaatatac
29161 tgaatttttt cgtggatctc attttgtggt ctattttttt tgcactcaa egccttgatt
29221 tctgtgtgtt tttatgactt ttattttatt ttttattatg tttttattta ttcatttttt
29281 tttgagatag agtcttgcct tgttcccag actggaagtgc agtggcacga tctcagctca
29341 ctgcaacatc caccttctgg gtccaagtga ttgtcccacc tcagcctccc gagttagctgg
29401 gattacaggt gctgcccact acacctggct aatttttgtt tttttaatag agacagggct
29461 tagccatggt ggccgggctc gtctcaaaact cctgacctca ggtgatccac ctgccttagc
29521 ctctgaaagt gctgggatta tagccatgaa ctacctgcgc tggctgttgt gtgttttatg
29581 acttctaaat gagtgcatat actccttggg catttatata cgtcttcttt ttttatttta
29641 ttttatttga gacgagtctt gctctgtcgc taggctggag tgcagtggcg caatcttggc
29701 tcactgcaac ctccgactcc ttgttcaaag gattctcctg ccgcagcagc tagaattaca
29761 ggcacgtgcc accacgccc gctaattttt tgtgttttta gtagagatag ggtttctcac
29821 catgtaggcc aggatggctc cgatctcctg acttcatgat tcgcccacct cgacttccaa
29881 aagtgtctgg attacaggct tgagccattg cgcttggcct atagaattct tttaaaggcct
29941 aagttaaatg tgtgtgccta cagagaacat acgtatttta atttgccagg ttgcagaggg
30001 cactacctac ttaacaaca ttacacgaaa ttcttagctt gagatttttg tattaccag
30061 gtagtatgaa ttcaggctgt aaactcctt gaggatcccc ttgaggatta tctaaaattt
30121 caggggagat tgtagtttct ctcttttagt cagtgttaag gtttgagaaa ggcattttcc
30181 ttgccatttc ctatggagtg gtacggtagt ggtgaagga gaggggctat ttccagttca
30241 acctgacctt gacttttaag tcttttgggg toccagctct agttggatgg tatattaaac
30301 tacatactc ggatagacc ttggacattgt ctctgtctcc tgtgacctta taaactgtga
30361 aacaaaagct caagttcacc aagttccgca aatgcccctca agttaaaact tgacttctgt
30421 ccaccttctt ttctgggttc ctactttcac atagtttttg tcttttgagt atttccaatt
30481 ctttttaage tttggccaga agtttttagt gtctgtagtt agagtgggtg tctagtgtac
30541 cataccactg aacagaagc ctgttacttt tacaataata aaaacatata tatgtgggct

```

【図8J】

FIGURE 8J

```

30601 ttttaaaaaa atttttaaat ttattttattt actttttttt ttgagatgga gtctcactct
30661 gtgccccagg ctggagtgca gtggcatgat cttggctcac tgcaacctct gccaccggg
30721 ttcaagcgat tttcctgcct cagcctcctg agaagctgtg attacaggcg catgccaccg
30781 tgcctggcta aatthttgat ttttaggaga gacaggtttc accatgttgg tcaggctggt
30841 ctcaaactcc tgagctcagg tgatctgccc acctggcct cccaaagtgc tgggattaca
30901 agcatgagcc actgcacctg gccaaacctc tctatgtttt agttttttat gattatttta
30961 tattatccct tccccacaca tgaataact tctttccaag tgacttatga agttgtcaac
31021 ttttcataaa gccttggaac aaagtggca gaaaaattat aaataaaaag tcttgtctag
31081 gacagtacag gtctgtctta ttctaaatt agatcagaat cgggttatgc cggtttttta
31141 taacatacca ttataattgg gtatgttaaa gaatgtatta gagatgcatt agaagagcga
31201 cctcattata agcctcttca cccatggatt ccaaggatat cttacaataa acctctggga
31261 taccttacgc tacagagcaa ctaaagtcca gcttagagc acaagggaaa atgcaggata
31321 ttgggtcctg gaaactacaa aaaccatcaa actctacttt agggctaaaa ctttctttta
31381 atcaatctgt catatthtatt gataaattag aaaatgtggc tgggtgcagt ggctcacacc
31441 tgtaatccta gcagtttggg aggccgaggt ggggtgatca cgaggtcagg agatggagac
31501 cattctgctc aacacagtga aaccctctc tactaaaaat acaaaaatta gccggcgctg
31561 gtgggtggcg cctgtagtcc cagctactca ggaggcggag gcaggagaat ggcttgaacc
31621 cgggagacgg aggttgcagt gagcggagat tgccccactg cactccagcc tgggtgacag
31681 agggagactc catctcaaaa aaaaaaaaaa aaaagtacag gttcaaattt cattaaattt
31741 tttttccatg ccccttctct ggtggttaga tgatagggga tgagtaaaat atcaaagaca
31801 actaaaaatt cctaaactag atcctcgggt cccaaagaag tgtaaccat ggagtcccc
31861 acctctgag gttggtgctt cctggcacag gctctggaa cattctggat tgtctgacat
31921 tccttttact cgcttttagaa cctaaagatg ttgctggggg aaaagggagc gggagagag
31981 gaaggggaag gatgtgggat aaggcataaa ctatgcttgt gggaaaaaaa caaccagtaa
32041 tttccttgat ggggtttttg cttgacttta aatgcagta agcttttagg aagcttgatg
32101 gagcctgtgt ttctaccatt agtgcctgat ttgtttggct taagatttca ttaagcttct
32161 taaaaaggag ataacttctgg aactcaaatg gctactgagc agggatggc aaatcagtga
32221 cactgtagga agtggagggg ttttgcaaa ctagagaaca caccttccac aggggcagcc
32281 actgctctgc tgggcccgtt gttcatctgc agggacgtgc atcttgggat tatttccaaa
32341 gtcagaactc agcattttta tgagaaatgt catgattttt aaggcttaa caagttatcc
32401 cacattaaaa aaataataat aaaccaggcc ggggtgcagtg gctcacgctt gtaatcccaa
32461 catthttggg ggtgaggtg ggtggatcat gaggtcaggc gttcgagacc attatggcca
32521 acatggtgaa acactgtctc tacttaaaat acaaaaatta gctgggcctg gtggcggcg
32581 cctgtaatcc cagctactag ggaggtgag gcaggagaat cgcttgaacc tgggagcgg
32641 aggaggttgc agtgaactga gatcgtaccc agcctgggca acagtgcgag gttccgtctc
32701 aaaaaaaccc aaaaaacaca aaaacaaaa acgacagaga aggccaaaca aaacacatct
32761 gtgggctgga tgcggccatg cccaccggtt tggaccttt gtgttggact cttctgttca
32821 ccagacaccc tgccttgcga gaatgtatct catcctttgc tggagcaggt ttgcaggcac
32881 agtggagaga ggagagaaga aatgaaggga cacttatgca gaaccatgag tggccagaga
32941 ggaggagaag gaggggtgaga ggagcaaaga agccatgaca acttcataat tctgagtgga
33001 ctgggcagtg gccagaaatt ctggtggtgg atatgctgcc tttccaacag gtgaatatga
33061 aagaataagt caaacctgt tcaggacgct gtttaattcca aatgtgaact ttttgagtca
33121 tctttccat gtggaattca aaggagaatg taacaaatt ttcaggaggg acgtgcaata
33181 tccctgaaag ataacaaagt tcgtaacact tatttacata caacattctc tagttattga
33241 ttaaacagat ctctacagac ttgcatgagg caacatttct taggcttgtt tgctacaata
33301 tctttaaaaa tacttgatta cacatcactt tagcttattt agatggactt ttcaccaagc
33361 tctgaaactg gatthcattt tgttgcattc atcctgctca cgagacacag gtaggcagca
33421 aatgagatta tccctccagt ccccatggat tggaaatggt ccccttctt tatgagctca
33481 ctgcagtatc tccttctccc tttcccaaa ggacagcctt tcctgctca gggagaaga
33541 gagagacaga ctacagtgat ggagaccac tagatgtgca caagagctg ccatccagtg
33601 ctggagagga cggagccgtg atgctggggt ttgccatgat gggcttctca ggtctaatgt
33661 tcttcttgc tggacaacc attctaagc cttttatgct caggtaagaa acagaggaag
33721 gaaatctaga gtttccaatt cagataagat ccaggcacag cggtaaagga ggagaggtg
33781 gctttggttt ctcaatctgt gaetctctgc catggtctag aaaaagaaaa atacaattcc
33841 tcttccgctg tcagtgtctg gggcagctgg gtgtggagga agaggtggcg agaaggtcaa
33901 agatatttcc ctgcactgcc tccctccatc tcataatcta tatatactc caaacacgta
33961 atccacaaat tatagtttct tcatthtaggt cataaatcct ccccttaaaa tgttggattt
34021 ccaagagaga gttaaacctt gtatgtgagc acaataaaaag ttttttgagt ctgaattttt

```

【図 8 K】

FIGURE 8K

```

34081 tgagtttgac agtgtctacc tggcacatag tagttgctca atacatatta gtttccttcc
34141 ttttaattag gttcttttatt caataatagt agtgatacag ttgacctttg aacaacatgg
34201 gtttgaactt cggaatcca cttataaatg gattttcttc tgtgcctgcc acccctgaga
34261 cagtaagatc aatccctect ctttctctct ctcctcagcc tactcaacat gaagaggaca
34321 gggagaggac ctttatgatg atccacttcc atttagtaaa tagtaaacat gttttctctt
34381 ccttatgatt ttttttcttc aatttttggt ttaagttccg gggtaacatgt acagaatgtg
34441 caggtttggt acaaaggtaa acgtgtgcca tgggtggttg cagcacagat caacctatca
34501 cctgggtatt aagcccagca tgcattagct attcttctctg atgctctccc tccccctact
34561 ccaactgagag gccccagtgt gtgttgctcc cctctagggtg tccatgtggt ctcctcattc
34621 agctcccact ttttaagtgag aacattcagt gtttggttct ctgtttctgc attagtttgc
34681 tgaggataat ggcttccagc ttcatttcat ctatgtccc gcaaatgaca tgatcttgtt
34741 ctctcttatg attttctttc ctttctttt ttctgagacg gagtcttgtc ctgtcaccca
34801 ggctgaagtg cagtggcagc atcttggctc actgcaacct ctgcctcccg aattcaagca
34861 gttctctctgc ctcagcctcc caagtagctg ggaccacagg tgtgtgcccac catacttggc
34921 taatttttaa atgtttggtg gagatgggat cccctatgt tgcaccagggt ggtcgtgaac
34981 tcctaagctc aagtcctcct tctaccttgg tctcccaag tgcctgggatt acaggcatga
35041 gccaccatgc ctgaccagta gttaaatttt tgaggagtca aaagtatat gcaaattttc
35101 gactgcaggt ttgggggtgt ggtgttggca tccctaacc ctgaattgtt caagggctca
35161 ctttagttgc tacttattaa gtatatgctg tatgctcaat acatactata ttttatccta
35221 cttaaacctc cagcagccca tgatggaagt gttattttag ttttcatttt ataaatgaga
35281 aagctgaggg tcagaaaggc caagtaactt gcccaagttc acatagccgg taataatat
35341 gcctgtcatt ctgacgtaag actgtcttct taatacctaa atgatgtttg ctgaatgag
35401 gggaatgggg gttctgatta gggaggggag ggggctattt aattttgtag gatggcccac
35461 acaacatgtg gtactctggg gccaggtcag ttcagggtaa aaggaaggca aggggtgctt
35521 tttggacatt gctttatttt tggacagccc tttttttttt ggacagccaa agagcaacag
35581 gaggcccagg gggagtggaa gaggaaggcc taggagttca gtgagggaaa ggggtcataa
35641 aaaaggaaga gagtggccta cttctgttat ttatgattca tctcctgcca tctctaggtt
35701 accattgtta ggggaaagat gtagaagtca ccatttacta tagcacacag tgccactgtt
35761 ggaagaattc cgcggatcct ctccctatag tgagtcgtat tagcggcgcg aaatttatta
35821 gagcaatata gtctacaat gtcaagctcg accgatgccc ttgagagcct tcaaccagt
35881 cagctccttc cgggtgggccc ggggcatgac tattggcgcg ccggatcgat ccttaattaa
35941 gtctactaga taacttcgta taatgatac tatacgaagt tattatctat gtcgggtgcg
36001 gagaagaggg taatgaaatg tgcccgcct acgcagggca tccatttatt actcaaccgt
36061 aaccgatttt gccaggttac gcggctcag gcatgcaagc ttggcgcgcg cgtcgaccaa
36121 ttctcatggt tgacagctta tcatcgaatt tctgccattc atccgcttat taccattat
36181 tcaggcgtag caaccaggcg ttttaagggca ccaataactg ccttaaaaaa attacgccc
36241 gccctgccac tcatcgcagt actgttghta ttcattaagc attctgcccga catggaagcc
36301 atcacaaacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaacctgt cgccttgcgt
36361 ataataattg cccatggtga aaacgggggc gaagaagtgt tccatattgg ccacgtttaa
36421 atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt ggctgagacg aaaaacatat tctcaataaa
36481 ccttttaggg aataggcca ggttttccac gtaacagccc acatctgcg aatatatgtg
36541 tagaaactgc cggaaatcgt cgtgttattc actccagagc gatgaaaacg tttcagttg
36601 ctcatggaaa acggtgtaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct caccgtcttt
36661 cattgccata cggaaactcc gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaaggc
36721 cggataaaac ttgtgcttat tttcttttac ggtctttaa aaggccgtaa tatccagctg
36781 aacggtctgg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gctcctaaaat gttctttacg
36841 atgccattgg gatatatcaa cgggtgtata tccagtgatt ttttctcca ttttagcttc
36901 cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgcct ggtagtgate ttatttcatt
36961 atgggtgaaag ttggaacctc ttacgtccc atcaacgtct cattttcgcg aaaagtggc
37021 ccagggtctc cgggtatcaa cagggacacc aggtttatt tattctgcca agtgatectc
37081 cgtcacaggt atttattcgc gataagctca tggagcggcg taaccgtcgc acaggaagg
37141 cagagaaagc gcggatctgg gaagtacgg acagaacggg caggacctgg atttgggagg
37201 cggttgcccg cgtgctgctg gacggtgtga cgttctctgt tccggtcaca ccacatacgt
37261 tccgccattc ctatgcatg cacatgctgt atgcccgtat accgctgaaa gttctgcaaa
37321 gcctgatggg acataagtcc atcagttcaa cggaggtcta caccgaaggt tttgctgctg
37381 atgtggctgc cggccaccgg gtgcagtttg cgatgccgga gtctgatgcg gttgcatg
37441 tgaaacaatt atcctgagaa taaatgcctt ggcctttata tggaaatgtg gaactgagtg
37501 gatatgctgt ttttgtctgt taaacagaga agctggctgt tatccactga gaagcgaacg

```

【図 8 L】

FIGURE 8L

37561 aaacagtcgg gaaaatctcc cattatcgtg gagatccgca ttattaatct caggagcctg
 37621 tgtagegctt ataggaagta gtgttctgtc atgatgcctg caagcggtaa cgaaaacgat
 37681 ttgaatatgc cttcaggaac aatagaaatc ttcgtgcggt gttacggtga agtggagcgg
 37741 attatgtcag caatggacag aacaacctaa tgaacacaga accatgatgt ggtctgtcct
 37801 tttacagcca gtagtgctcg ccgcagttga gcgacagggc gaagccctcg agtgagcag
 37861 gaagcaccag ggaacagcac ttatatattc tgcttacaca cgatgctta aaaaacttcc
 37921 cttgggggta tccacttata cacggggata tttttataat tattttttta atagttttta
 37981 gatcttcttt tttagagcgc cttgtaggce tttatccatg ctgggtctag agaagtggtt
 38041 gtgacaaatt gccctttcag tgtgacaaat cacctcaaa tgacagtcct gtctgtgaca
 38101 aattgccctt aacctgtga caaattgcc tcagaagaag ctgttttttc acaaagtat
 38161 ccctgcttat tgactctttt ttatttagtg tgacaatcta aaaacttgtc acacttcaca
 38221 tggatctgtc atggcggaaa cagcggttat caatcacaag aaacgtaaaa atagcccgcg
 38281 aatcgtccag tcaaacgacc tcaactgaggc ggcataatag ctctcccggg atcaaaaacg
 38341 tatgtgtgat ctgttcggtg accagatcag aaaatctgat ggcacctac aggaacatga
 38401 cggtatctgc gagatccatg ttgctaataa tgctgaaata ttcggattga cctctcgga
 38461 agccagtaag gatatacggc aggcattgaa gatttcgcg ggaaggaag tggttttta
 38521 tcgcctgaa gaggatgccg gcgatgaaaa aggcattgaa tcttttctt ggtttatcaa
 38581 acgtgcgcac agtccatcca gagggcttta cagtgtacat atcaacctat atctcattcc
 38641 cttctttatc gggttacaga accggtttac gcagtttcgg cttagtgaaa caaaagaaat
 38701 caccaatccg tatgccatgc gtttatacga atccctgtgt cagtatcgtg agccggatgg
 38761 ctcaggcatc gtctctctga aaatcgactg gatcatagag cgttaccagc tgctcaaaag
 38821 ttaccagcgt atgcctgact tccgcgcgcg ctctctgcag gtctgtggtt atgagatcaa
 38881 cagcagaact ccaatgcgcc tctcatacat tgagaaaaag aaaggccgcg agacgactca
 38941 tatcgtatct tccctccgcg ataccacttc catgacgaca gcatagctctg agggttctct
 39001 gtcacagatt tgaggggtgt tcgtcacatt tgttctgacc tactgagggt aatttgccac
 39061 agttttgctg tttccttcag cctgcattgga ttttctcata ctttttgaac tgtaattttt
 39121 aaggaagcca aatttgaggg cagtttgta cagttgattt ccttctcttt cctctcgtca
 39181 tgtgacctga tatcgggggt tagttcgtca tcattgatga ggggtgatta tcacagttta
 39241 ttactctgaa ttggctatcc gcgtgtgtac ctctacctgg agtttttccc acggtggata
 39301 tttctctctg cgctgagcgt aagagctatc tgacagaaca gttcttcttt gcttctctgc
 39361 cagttcgctc gctatgctcg gttacacggc tgcggcgagc gctagtata ataatgact
 39421 gaggtatgtg ctctcttat ctcttttctg agtgttctc ttattttaaa caacttgcg
 39481 gtttttgat gactttgcca tttgttgtt gctttgcagt aaattgcaag atttaataaa
 39541 aaaacgcaa gcaatgatta aaggatgttc agaatgaaac tcatggaac acttaaccag
 39601 tgcataaacg ctggtcatga aatgacgaag gctatcgcca ttgcacagtt taatgatgac
 39661 agcccggaag cgaggaaaat aaccggcgcg tggagaatag gtgaagcagc ggatttagtt
 39721 ggggttctt ctcaggctat cagagatgcc gagaaagcag ggcgactacc gcaccggat
 39781 atggaattc gaggacgggt tgagcaactg gttgggtata caattgaaca aattaatcat
 39841 atgcgtgatg tgtttggtac gcgattgcga cgtgctgaag acgtatttcc accggtgatc
 39901 ggggttgctg ccataaaagg tggcgtttac aaaacctcag tttctgttca tcttgcctag
 39961 gatctggctc tgaaggggct acgtgttttg ctctgggaag gtaacgacc ccagggaaca
 40021 gcctcaatgt atcacggatg ggtaccagat ctctcatattc atgcagaaga cactctctg
 40081 ctttctatc ttggggaaaa ggacgatgtc acttatgcaa taaagcccac ttgctggcgc
 40141 gggcttgaca ttattccttc ctgtctggct ctgcaccgta ttgaaactga gttaatgggc
 40201 aaattgatg aaggtaaact gccaccgat ccacacctga tgctccgact ggccattgaa
 40261 actgttgctc atgactatga tgtcatagtt attgacagcg cgcctaactt gggatcggc
 40321 acgattaatg tcgtatgtgc tgcgtatgtg ctgattgttc ccacgectgc tgagttggtt
 40381 gactacacct ccgcaactgca gttttctgat atgcttcgtg atctgctcaa gaacggtgat
 40441 cttaaagggg tcgagcctga tgtacgnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngac
 40501 agtctatctg ttagtatat tctagccctt tatagcttgc tggctctcag atgtagaatt
 40561 gctgaaagat gtaattcaga ctgtttgaa agaagacaag tccctccctc tccctgggtt
 40621 cactgtgaac cacggagggt tctacgatac atgggtctaac cactgaaaat ttactgtcct
 40681 tactgagata ttttagaagt gtaaaataca gactgtattt caaagacagc atgaaaaagc
 40741 cagcttttgt agcagccacc aagcttgttt tactttatac aggcctcccta attcctctct
 40801 gccactcaa ccttcaactg atatccctgg cagaaggatg aaaaatcaa agggcaagag
 40861 atagaacatt tgtttcaggt attgggacaa ctccaagtat taagataaca gattcatttc
 40921 atgctgttcc atttaataca tgtttattca tggcaaatat tattttttat tattttttat
 40981 ttttatttta atttaagtgg gtacatagta gttttatgta tttatgggtt acgtgagata

【図 8M】

FIGURE 8M

```

41041. ttttgataca ggcattgcaat aatcacatca gggtaaatgg ggtgtccatc atctcaagta
41101. tttatccttg tgtcacaac aatccaatta tactcttagt tgtttaaaaa tgcggggagt
41161. ggagggcaag tggagggaga gcattaggac aaatacctaa tgcattgccc gcttaaaacc
41221. tatgtgatgg gttgacaggt gcagcaaac accatggcac atgtatacct atgtaacaaa
41281. cctgcacggt ctgcacatgt atcccgtaat gtaaagtaaa ataaaaatagc ataaaaacaa
41341. ataaaggaat cactaatgaa acctacatct gcaaaaataaa ttataaatat tgaagaagaa
41401. taaaaagtac aaaaaattat ttttgtctat agtcaactca ttgtgctatc aaatactagt
41461. cttattcatt ctttttgttt tttgtacca ctaacctacc cactccccgc cctacacccc
41521. ccaacaaccc gccccatact cttccaagcc tctggtaacc gtccttctac tatctccatg
41581. agtgaattg ttttaatttt taacttccac aaataagtga gaatatgtga agtttgtctt
41641. tctgtacctg gcttaaatct cacttaacat aatgacctcc agttccatcc atgttattgc
41701. aatgactgg acctcatttt cttaatggct gaatagtact ccatttgtga tatgtaccac
41761. attaaaaaaa atcaatttgt tagttgatgg attgctttca aatcttggct attgcaata
41821. gtgctgcaat agctaagatt tggatattct tgggagtga gatattcttg ggatattctt
41881. taatcttttc tttcttttt gagacagagt ctgctctgt tgcaccaggc ggagtgtagt
41941. ggcgcaatct tggctcactg caacctctgc ctcccgggtt caaacaatc tctgtctca
42001. gctcctgag tagcttggat tacaggcact caccaccatg cccagataat ttttatttt
42061. ttagtagaga cggggtttca ccatgttggc caggctggtc tcaaactcct gacctcagat
42121. gatccacca tctcggcctc ccaagtgtc gggattacag gcgtgagcca cctcggccag
42181. cctgattttt tttcttttga gtatatacct acctctattt tcagtttttt gaggcaccct
42241. caaactgttc tccatagtga ttgtactaat ttacattccc actaacagtg tacaaggggt
42301. cccttttctc cctattcttg ctagcatttg ttattgcttg acttttggat aaaagccatt
42361. taaactgggg tgagatgata tgtcattgta gttttgattt gcatttctct gatgatcaat
42421. gacaatgcct ttttgtatgc ttgtttccca ctgtatgtc ttctcttgag aaatgtctat
42481. gcagatcttt tgcccattta aaaaactgga ttattatatt tttctctata gagtgtttg
42541. agctcctttt atattctgat tattaacccc ttgtcagatg ggtagtgtgc aattattttc
42601. taccactctg tggtttgtct cttcactttg ttgattcttt cttttgctat gcagaaagtt
42661. ttttaattga tatgatccta tgtgttcaca ttgcttttgg ttgectgtgc ttatgaggtt
42721. ttactcaagg aatctttgcc tactctggga cttactgttt tcttttacta gtttcatagt
42781. tgcaggtctt aaatttcagt ctttaatcca ttttgatttg atttttgtat aaggctagag
42841. ataacaggtc tagttcactc ttttgcata ggatattccag ttttcccagc atcatttatt
42901. gaagagactg tcttttcccc aatttatgct cttggtaact ttgtcaaaaa tgaattcact
42961. gcagatgtat gcatttacct ctgggttctc tattctgttc cactgatgta tgtgtctggt
43021. tttatgccag taccttgcctg ttttggttac tgtagtttta tagtataagt ttaagtcaga
43081. taaagtgat tctcccattt tgttcttttt gctcagggtg gctttggctc ttctgggtct
43141. ttcgtgggtc caaatgaatt tttagaaatt ttttctattt ctgtgaagaa tgcattgggt
43201. attttgatag gcattgcatt aaatctgtag atcgctttga gtaatatgga cattttaaca
43261. ttattgatat ttccaatcca tgaacatgta atgtctttcc ttttttggg cttcttcaat
43321. ttcttgcaat aatgttttat agttttcatt tttagatatc ttcaactctgt tagttaattc
43381. ctaggatatt aattttattt gttagcattg taaatgggat cttttaaatc ttcttttca
43441. gattgttcac tgttagcata tagaantgct actgatgttt gtatgtgaa ttgtatcct
43501. gcaactttac tgagtttggt tatcagttct tatagttttc ttgatggat ctttagtatt
43561. tcccaaatat aagatcatat ctgaaaacta gaataatttg acttcttctc atccaattg
43621. gatgcccttt atttctttct cttgtatgat tgcctcaagct aggactttca gtattatggt
43681. gaataacagt ggtgtaagtg ggcaccttg ttgttttcca gatcttagag aaaaggcttt
43741. caatttttcc ccattcagta tgatactaac tctggatctg ttgtatatgc tttttattat
43801. gttgaggtat gtctctctg taaccagttt tgtgaggttt ttgttatgaa gggctgttga
43861. attttatcaa gtgctttttc agcatcaatt gaaatgatca tatagttttg tctttcattc
43921. tgttgatag atgtattaca ttaattgatt tgcatagttt gaactatctt tgcattccca
43981. ggctaaatct cactctgtca taatgaatga tgagtattg agttagtga tttgtatgag
44041. ttatcgaata ttgagtttga tttggtagta ttgagaatt tttgcatcaa tattcatcag
44101. aatattgggt gtatagtttt atttttattg atgtgtcttt gcttagtctt agtatcaaga
44161. taatactggc ctcatagaat gagtctggaa gtattccctc ctttctttgt gtttttgaat
44221. agtttgagta ggattgggat agtttttttt tatttaattt gtttattttg cttgagacac
44281. ggtgtcactc tgtcaccaca ggctggagta cagtgggtgt atcttggctt acctagcct
44341. ctgcctcgcc tcccaggctc aagcgattct ctaataatat ttgctttata tattcgggtg
44401. ctccagtgtt tgggtcatat atatttatca aattgttata tctcttctgt gaattgacct
44461. ctttatcatt atatagtgc cttcttgttc tcttcttata gtttttgtct tgaatctat

```

【図 8N】

FIGURE 8N

```

44521 ttgtctgatt tatccaatth atttatctga ctctctgctt ttttttggtt tccatttgca
44581 tggaaatatt ttttccatcc cttatthtca gtttactgtg tattcttggg caagttactt
44641 tctgagcctc aatttccctca tctgatagtt ggtgtctggt aggatctatc ttacaggact
44701 gttttaagga ttaaattgaga caatgcacag tgcttggggc atgatgagat atggtaatta
44761 ggaaataatt actcaggcca ggcacgggtg ctcatgccta taattccaac atthttgggag
44821 gctatgggtg gaggatcgct taacaccagc ctgggcaata tagtcacacc cagctctccc
44881 aaagaaagaa agaaagaaag aaaaaatta gccactatt gtggtcacat gactgtagtc
44941 ccagctactc aggaggctga gatgggagga tcacttgagc ctggaagggt gagggtgcag
45001 tgagccatga ttgtgctact gcgctccagc ttgggcaaca acatgagaac ttatthcaaa
45061 atagctaaca aatggtagtt attatgtta cattatthta thtagaatta thattcaatt
45121 attatthtgt aataatcaac aaaaattatc cthtttgta gcatctthtt atctcttctc
45181 tgatthctth tthgaacaaa thtaaaaaaca tattataata thaaaaaacg gagaccaggt
45241 ctccctgtgt taccaggct gtectcaaac tectgggctc gagcaatcct tccgccacag
45301 cthttcaaaag tgctgcggtt acaggcgtga gccactgtgc ctggccttgc atthttctg
45361 thagggthtatt ttgtthattt gttatctgtg taatthattt actthgatgt thaaagcaaa
45421 gaattacaac tcagtgaagg agatctctc acatgtaact tgcaactcta aatatgacct
45481 tatctaagag ggtattagtt tcaattatgc tgccctatg ggtcattgaa gtgagactct
45541 tctgtgtgtc ccataagagt gcactaaggc aactgaagtc atthgatgtc ctcagcccc
45601 thggcaagca cagaggtgct caaaagactg atgaacttg cactaagatt thtcttccag
45661 aagacagggg gaaatcacca aatggthttt thtttaaagc aaactaaata thtagccacc
45721 thttgggttc actthtttht thctthttct thtttactag tcattgactt gaagctcatg
45781 gthttactct thaacaccag ccagtcaact gcaggttctt gggcaaaaaa gcaaaaggaa
45841 taatgatccc thgtggattc ctgagtcacc tgctthtgg gctgtgcagc gtctgtggtc
45901 agcaccacac cggtacctc actatgtctc aggtthtgg cthttgggagc tagcctggaa
45961 gctaagaact ctcactthca cctggtatta actactthgt thctthttt thttthttt
46021 tgagacggag tctcgtctt gtcaccagc ctggagtga gtggcacgat ctcagctcac
46081 tgcaacctct gctcctggg thcaagcgt tctcctgct cagcctccc agtagctggg
46141 attaaaggct cctgccacca ccccgagct atthttthta thtttagtag agatggagtt
46201 tcatcatggt gggcaggtg gctcgaact tctgacctc ggtgatctc ccacctggc
46261 ctctgaagt gctgggatta caggcgtgag ccacattgcc cagcctggta thaaactact
46321 thtaaaaggc ctctctgtt caaagaatg ctgtthtgc gaatgctgt agacacatga
46381 accctgggct tgctgctccc thaatthtgg ggaagctatg gatgtcaagc agaatagagc
46441 tathttgtta cttgaccagg thtccataac thtttgaca tacctthatt cctgcacctg
46501 tcccacataa thtaccctt atagctctt caccagcagg aatataaatg tcatggcagg
46561 gccaccatgt tgcaaacctc ctagggtcca tctgacgtt actagcttgt gtgaatggta
46621 ctcttggag gtaccattgc aatgcacagc ctgagcagc ctctgcagta agtccaactg
46681 tggatggggc aaaatgagtg gttagcagaa ttggcctcat acatctthta thctggcatt
46741 gagtatgtgg taggcactca agaaatatt thaaatgaat gacattggtc thccattta
46801 thttgagtha atthgacca gcttaatcag tggatcttht caactagtha atthtctac
46861 cctccaccct aggaaggtgt thcagthta atagathtt thtattgggt thttthtga
46921 cattagcaaa acctctgga aagaggatt catatcagcc cctcatgagc agggagctgt
46981 gagtattcag gctgcttgg gctgctgag thttccagc agaggtggct ggtcctagag
47041 tgggtgtht gtcattctt gacctatgat gatgctggga aataactcag tgatgtggtg
47101 tcatthttt atctcacaga thgtggctct gagaagagat thagthtt atcttcagaa
47161 catagcatca atgagthtgg gtcatagctc cagccaactc agccagaaac agatacacag
47221 tatgcaacca agtgggaata aatthaccct atthtctaa thttggaatat agagcctgag
47281 gggthgaagt gtgggtggat tatctgctt ggttcttcc thttcctga atthtactt
47341 tagthgaagg aaathttgct aactgttht gtgccagaa tgggaaagccc cctacctagg
47401 cctcacctc tgaathttt cagthtcaagt ggacaagtag thtttgagca ctcaactgt
47461 gtcaggctca ggtgacctc tgcgattthc acttctctt gatctthtca cctaagctg
47521 tgggacttgt gthctgggag aaaaatgaaa thtacctcat ccttatgggt ctgaaaaaat
47581 tgagctccc agacttgggt tgcctgatc tgcttctca atgtthaaaga ggaacataaa
47641 gccatgtaga aaatcttht cthttgacaa agcctggct thcaaattct ctgttctgc
47701 agtaccacaa atthatacatt tgaatgtcag agatthaat thgacatctt thttgcaaaa
47761 atctatccc cacttctggc thtagctgcc cagagagctc thgtctctgg gctgactaga
47821 gaaaagacca cacagthtga gatgcaaaaa aggaaatgcc atthaacatat thcagggtga
47881 atthttctt gcatttggca cthtgcaatc tagtccaggc thaaagattg taggathttc
47941 thtgtgttht cctthtttht actthtgcag gaaacaaggc ataaatatt cagcttggac

```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/19585
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(?) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. 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. : 556/23.1, 23.5, 24.5, 24.31; 550/350, 587.1, 587.9; 435/ 69.1, 71.1, 71.2, 471, 590.1, 254.3, 254.11, 325, 6, 7.1, 7.9 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) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,637,470 A (KACZOROWSKI et al.) 10 June 1997 (10.06.97), see entire document.	1-42
A	US 5,776,734 A (KACZOROWSKI et al.) 07 July 1998 (07.07.98), see entire document.	1-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 doubt 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 "5" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 27 DEC 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 505-9230		Authorized officer PREMA MERTZ Telephone No. (703) 505-0196 <i>Jayce Budgers for</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/19585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C07K 14/47, 16/18; G01N 33/53, 33/567; C12N 5/10, 15/19, 15/68, 15/64

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

556/23.1, 23.5, 24.3, 24.31; 530/560, 587.1, 587.9; 435/ 69.1, 71.1, 71.2, 471, 320.1, 254.3, 254.11, 325, 6, 7.1, 7.2

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST, CAS ONLINE, MEDLINE, CAPLUS

search terms: calcium sensitive potassium channel beta2, beta3a, beta3b, beta3c, beta3d, nucleic acid, recombinant production, antibody, assay, binding, activator, inhibitor, gene transcription, nuclear factors

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 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50		33/559	
	33/53		33/561	
	33/559		33/58	A
	33/561	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/58		5/00	A
(72)発明者	スワンソン, リチャード アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065 - 0907、ローウエイ、イースト・リ ンカーン・アベニュー・126			
(72)発明者	リュウ, ユアン アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065 - 0907、ローウエイ、イースト・リ ンカーン・アベニュー・126			
(72)発明者	ラグルツタ, アマンド アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065 - 0907、ローウエイ、イースト・リ ンカーン・アベニュー・126			
F タ-ム(参考)	2G045 AA35 AA40 BA13 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB05 FB06 FB07 FB08 4B024 AA01 BA21 BA31 CA04 CA06 CA09 DA02 EA04 FA02 GA11 HA01 4B063 QA18 QQ09 QQ43 QQ49 QR32 QR55 QS02 QS34 4B065 AA90X AA93Y AA99Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46 4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA01 EA28 FA74			

专利名称(译)	新型人钙敏感钾通道亚基		
公开(公告)号	JP2003522522A	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2001511485	申请日	2000-07-18
申请(专利权)人(译)	默克结束Kamupani公司		
[标]发明人	ユーベルピクター スワンソンリチャード リュウユアン ラグルツタアマンド		
发明人	ユーベル,ピクター スワンソン,リチャード リュウ,ユアン ラグルツタ,アマンド		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/559 G01N33/561 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/705		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/559 G01N33/561 G01N33/58.A C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA18 4B063/QQ09 4B063/QQ43 4B063/QQ49 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS02 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	60/144764 1999-07-20 US		
其他公开文献	JP2003522522A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码钙敏感性钾通道亚基 $\beta 2$, $\beta 3a$, $\beta 3b$, $\beta 3c$ 或 $\beta 3d$ 的新型人DNA序列, 由该DNA序列编码的蛋白质, 包含该DNA序列的载体和包含该载体的宿主细胞。并且涉及含有人 $\beta 2$, $\beta 3a$, $\beta 3b$, $\beta 3c$ 或 $\beta 3d$ 亚基的钙敏感钾通道的抑制剂和激动剂, 以及鉴定 $\beta 3$ 基因转录的抑制剂和激动剂的方法。

