

(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 - 518384

(P2003 - 518384A)

(43)公表日 平成15年6月10日 (2003.6.10)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		48/00	4 B 0 2 4
38/45		A 6 1 P 15/08	4 B 0 5 0
48/00		15/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 15/08		C 1 2 N 9/12	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 34数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 548683(P2001 - 548683)

(86) (22)出願日 平成12年12月21日 (2000.12.21)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月24日 (2002.6.24)

(86)国際出願番号 PCT/N000/00441

(87)国際公開番号 W001/048170

(87)国際公開日 平成13年7月5日 (2001.7.5)

(31)優先権主張番号 19996424

(32)優先日 平成11年12月23日 (1999.12.23)

(33)優先権主張国 ノールウェー (NO)

(71)出願人 レイントン、ニルス  
ノルウェー国、オスロ、ベストヘイムガテン  
ン 6ビー

(71)出願人 オルスタビク、シグルド  
ノルウェー国、オスロ、イリスベイエン  
18

(71)出願人 ヤンセン、トーレ  
ノルウェー国、スキイ、イドレットスベイ  
エン 44

(71)出願人 スカルヘッグ、ピヨルン、エス .  
ノルウェー国、サンドピカ、エンゲルヨル  
デット 69

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 ( 外 3名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト cAMP 依存性プロテインキナーゼの新規なアイソフォーム、C - s は精子中片部に局在  
するおよびその使用

(57)【要約】

本発明は、ヒツジ精子由来のC の精製およびペプチド配列決定によって同定した最近になって特性決定されたC アイソフォームへの類似性に基づいてヒトC -s タンパク質として同定された新規なヒトC アイソフォームのクローニングを包含する[11]。ヒトC -s タンパク質は精巣および射出された精子に存在し、C -sはヒト精子の中片部に局在する。本発明は、これに関してC -sタンパク質をコードするcDNA配列を包含し、配列番号：1(下線部)に示された特異的ヌクレオチド配列を含んでなり、上記タンパク質はcAMP 依存性プロテインキナーゼのC 触媒サブユニットの新規なスプライス変異体である。本発明は、上記cDNA 配列を含んでなるベクターにも関する。本発明は、配列番号：2(下線部)に示されるC -sタンパク質特異的アミノ酸配列によって特性決定されたタンパク質をも包含する。本発明は、更に医薬品、精子の運動性を操作するための薬剤、または避妊薬として使用するための薬剤の調製におけるC -sタンパク質およびcDNA配列の使用、並びにC -sと相互作用する分子をスクリーニングするための方法および試験システムにも関する。本発明は、キットをも包含する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】ヌクレオチド配列の配列番号：1を含んでなるC-sタンパク質をコードするcDNA配列であって、上記タンパク質がcAMP依存性プロテインキナーゼのC触媒サブユニットの新規スプライス変異体であることを特徴とする、cDNA配列。

【請求項2】請求項1に記載のcDNA配列を含んでなるベクター。

【請求項3】配列番号：2の特異的アミノ酸配列。

【請求項4】請求項1に記載のヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質。

【請求項5】配列番号：2の特異的C-sタンパク質アミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のcDNA配列によってコードされたタンパク質。

【請求項6】C-sタンパク質に対する抗体を含んでなる、キット。

【請求項7】非運動性精子の診断用の、請求項6に記載のキット。

【請求項8】医薬品の調製のためのC-sタンパク質の使用。

【請求項9】精子の運動性を操作するための薬剤の調製のためのC-sタンパク質の使用。

【請求項10】避妊薬として使用するための薬剤の調製のためのC-sタンパク質の使用。

【請求項11】雄生殖不能症を治療するための薬剤の調製のためのC-sタンパク質の使用。

【請求項12】アンチセンス薬の調製のための請求項1に記載のC-sDNA配列に相補的なDNA配列の使用。

【請求項13】C-sタンパク質の存在および位置についての患者精子の検査およびスクリーニングの方法であって、

a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、

b) 精子細胞の洗剤によるストリッピングの後、ポリ-L-リシンでコーティングしたカバースリップ(cover slips)上に沈降させることによって免疫蛍光法用の精製した精子細胞を調製し、

c) 一次抗体(Ab) ( 関連性のないAbまたはC<sub>1</sub>-s特異的Abである ) と共にインキュベーションし、Ab過剰量は、洗浄緩衝液によって除去し、精子細胞を蛍光剤と接合した二次抗-IgG Abと共にインキュベーションし、

d) 蛍光顕微鏡法で精子細胞を検査する

ことを含んでなる、方法。

【請求項14】 中片部(midpiece)に会合したC<sub>1</sub>-sの触媒活性についての患者精子のスクリーニング方法であって、

a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、

b) 超音波処理によって頭部と尾部の画分を分離し、遠心分離、そして洗剤含有緩衝液中での精子の尾部の溶解によりプロテインキナーゼ分析用の精製した精子細胞を用意し、

c) 確立されたアッセイによってC<sub>1</sub>-s特異的触媒活性をモニタリングし、C<sub>1</sub>活性を内部コントロールとして用いて相対的活性を決定する

ことを含んでなる、上記方法。

【請求項15】 請求項12または13に記載の方法によって製造した生成物。

【請求項16】 PKA触媒活性を測定するアッセイを用いるC<sub>1</sub>-s活性および/または位置の欠陥について、精子運動性による生殖不能症に罹っている男性患者をスクリーニングするための、C<sub>1</sub>-sタンパク質の阻害または活性化分子を用いる試験システム。

【請求項17】 請求項16に記載のスクリーニングの生成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## (発明の分野)

本発明は、C<sub>1</sub>-sタンパク質をコードする相補的DNA配列、およびこのDNA配列を含んでなるベクターに関する。本発明は、上記タンパク質、および診断、治療および男性避妊薬の開発におけるこのタンパク質の使用にも関する。

**【0002】**

## (発明の背景)

cAMPによるcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の活性化は、成熟した精子の鞭毛運動の開始と持続を誘発する[1,2]。2個の触媒サブユニット(C)と調節サブユニット(R)二量体からなるPKA四量体ホロ酵素は、触媒活性を有するモノマー性Cサブユニットを放出することによるcAMPの結合によって活性化される[3]。脱膜化精子(demembrated sperm)の運動性の再活性化は、cAMPまたは活性なCサブユニットによって行うことができる[4]。基礎となっている機構は未だ知られていないが、精子は別個のアデニリルシクラーゼ[5,6]、PKA IおよびII型アイソザイム[7]、およびホスホジエステラーゼ[8]、並びに別個のPKA Cアイソフォーム[9-11]を含むことが示されており、これは精子がcAMPを生成しその効果に影響を与える機構を有することを示唆している。更に、PKAのA-キナーゼ固定タンパク質(A-Kinase Anchoring Proteins; AKAP)を介する精子中の別個の細胞内部位への固定は、AKAP-PKA相互作用の崩壊により運動性が阻止されることから、精子の運動性の調節に重要であると考えられている[12]。従って、PKAIは、精子の機能にとって、従って受精能にとって不可欠であると考えられることができる。

**【0003】**

触媒(C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, PrKX [13])および調節(RI, RI<sub>1</sub>, RII, RII<sub>1</sub>)サブユニットの不均一性により、PKAアイソザイムはかなり複雑である。様々なRおよびCサブユニットは、異なる染色体上にある別個の遺伝子によってコードされる[14]。様々な種における触媒サブユニットの数種類の変異体が、これまでに報告されている。これらには、ヒトC<sub>1</sub>-2 [15]、アメフラシC<sub>1</sub>-N2 [16]、ヒツジC<sub>1</sub>-s [11]、ウシC<sub>1</sub> 2 [17]、マウスC<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>およびC<sub>3</sub> [18]、並びにネズミ科C

の偽遺伝子Cx [19]が挙げられる。更に、PKAサブユニットアイソフォームは、幾つかの細胞および組織において細胞特異的発現および差別的調節(differential regulation)を示す。それらは、主としてAKAPへの結合により異なる細胞内局在(subcellular localization)も示す[20,21]。

#### 【0004】

##### (発明の概要)

本発明は、ヒツジ精子由来のC の精製およびペプチド配列決定によって同定された最近特性決定されたC アイソフォームへの類似性に基づいてヒトC -sタンパク質として同定された新規なヒトC アイソフォームのクローニングを包含する[11]。ヒトC -sタンパク質は精巣および射出した精子に含まれており、C -sはヒト精子の中片部に局在した。本発明は、この点に関してC -sタンパク質をコードするcDNA配列を包含し、配列番号：1に示される特異的ヌクレオチド配列であって(下線部)上記タンパク質がcAMP依存性プロテインキナーゼのC 触媒サブユニットの新規なスプライス変異体であるものを含んでなる。

#### 【0005】

本発明はさらに、上記cDNA配列を含んでなるベクターにも関する。本発明は、配列番号：2に示されたC -sタンパク質特異的アミノ酸配列(下線部)によって特性決定されたタンパク質をも包含する。本発明は、医薬品の調製におけるC -sタンパク質およびcDNA配列の使用、精子の運動性を操作しまたは避妊薬として使用するための薬剤、並びにC -sと相互作用する分子をスクリーニングするための方法および試験システムにも関する。本発明は、キットをも包含する。

#### 【0006】

##### (発明の詳細な説明)

下記の略号を用いる：PKA, cAMP依存性プロテインキナーゼ；AKAP, A-キナーゼ固定タンパク質；C, PKAの触媒サブユニット；R, PKAの調節サブユニット；PBS, リン酸緩衝食塩水。

#### 【0007】

本発明は、C -sをコードする部分的cDNA配列、C 遺伝子の選択的エクソン1(alternative exon 1)によってコードされた新規なN-末端を含む選択的にスプラ

イシングしたPKA C サブユニットのクローニングおよび特性決定を明らかにするものである。本発明者らは、C -s mRNAがヒト雄性胚細胞で発現され、C -s タンパク質が射出された精子に含まれていることを明らかにする。更に、これらの結果から、精子中片部の洗剤可溶性および洗剤耐性構造へのC -sの局在化が明らかにされる。ヒツジおよびヒトC -sの独特なN-末端の7アミノ酸配列の長さは、それぞれの種におけるエキソン1に由来するものである[37]。更に、ネズミ科Cx偽遺伝子[19]は、ヒツジおよびヒトC -sとの相同性(6個のうち4個の同一な残基)を共有している同じ長さの予想N-末端領域(MPSSSND)に翻訳する。従って、ネズミ科Cx偽遺伝子はC -s mRNAのレトロポジション(retroposition)に由来する可能性がある。これは、3種類の異なる種におけるC -sの発現を示しており、C -sは進化の間、保存されてきたことを意味している。本発明は、C -sタンパク質をコードし、配列番号：1(下線部)に示される特異的ヌクレオチド配列を含むcDNA配列であって、上記タンパク質がcAMP依存性プロテインキナーゼのC 触媒サブユニットの新規なスプライス変異体であるものを含んでなる。本発明は、上記cDNA配列を含んでなるベクターにも関する。本発明は、配列番号：2(下線部)に示されるC -sタンパク質特異的アミノ酸配列によって特徴決定されるタンパク質をも包含する。本発明は、医薬品の調製、精子の運動性を操作しまたは避妊薬として使用するための薬剤、並びにC -sと相互作用する分子をスクリーニングするための方法および試験システム、におけるC -sタンパク質およびcDNA配列の使用にも関する。本発明は、キットをも包含する。

#### 【0008】

本発明者らは、別種の精巢に特異的なCサブユニットであるC アイソフォーム[9]であって、霊長類にのみ見られ、イントロンを含まないレトロポゾンに由来するものを以前に報告した[10]。配列アラインメントは、C -sがC アイソフォームとは明らかに異なっていることを示し、これはヒツジC -sについての前報[11]と一致する。しかしながら、ヒト雄性胚細胞に見られるC -sの発現パターンはC のそれに似ており、これらの二種類のアイソフォームは同様な胚細胞特異的プロモーターエレメントを用いている可能性がある。ヒト精子形成および精子機能におけるこれらのタンパク質の正確な役割は解明されないままであるが、ヒ

ト精巢および精子における二種類の異なるCアイソフォームが存在することは、機能を保存するために実質的に過剰が必要であることを示唆し、または異なるアイソフォームおよび選択的にスプライスされる遺伝子産物が別個の特異的な精子機能を果たすという知見を支持している。

#### 【0009】

ヒトC<sub>1</sub>-sの溶解度特性は、Triton X-100およびcAMPの両方の存在が精子中片部からこのタンパク質を完全に抽出するためには不十分であるという観察によって示される。これは、ヒツジC<sub>1</sub>-sがTriton X-100をcAMPと組合わせて加えることによってのみ抽出することができるというヒツジC<sub>1</sub>-sについての前報[11]とは対照的である。しかしながら、著者らは、この抽出後の不溶性物質については説明しなかった。従って、C<sub>1</sub>-sのプールはヒツジ精子においてもcAMPの存在下では不溶性であることも考えられる。しかしながら、本発明者らのデータはC<sub>1</sub>-sサブユニットが独特の溶解度特性を有するという知見を支持している。興味深い可能性は、そのRサブユニットへの固定の他に、(「通常の長さの」C<sub>1</sub>と比較して)短くなったC<sub>1</sub>-sアミノ末端は膜または細胞骨格構造と相互作用する疎水性領域を露出することである[32]。これにより、cAMPの非存在下および存在下のいずれにおいても遊離のモノマー性C<sub>1</sub>-sを不溶性となるであろう。このような仮定は、C<sub>1</sub>-sが、触媒サブユニットの他のアイソフォームに見られるSer10におけるN-末端ホスホリル化部位を欠いているという事実によって支持される。Ser10における突然変異誘発により、恐らくは疎水性領域に暴露した結果として触媒サブユニットは不溶性となる[34]。C<sub>1</sub>-sの独立固定により、R11ロックアウトマウスが繁殖力を有するという事実も説明される[35]。本発明者らは、最近になり、PKAのRIおよびR11サブユニットはA-キナーゼ固定タンパク質AKAP220によって精子中片部の洗剤耐性構造に固定されるが、S-AKAP84は同じ領域における膜構造と会合することを示した[36]。従って、AKAP220/S-AKAP84、RI/R11、およびC<sub>1</sub>-sは、運動性および/または他の精子機能の調節を専門とするヒト精子の中片部領域に見られるシグナル伝達複合体を構成することができる。

#### 【0010】

精子の運動性におけるC<sub>1</sub>-sの機能的な重要性を決定するため、本発明者らの一

人は、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>およびC<sub>3</sub>-sのいずれの変異体をもコードする遺伝子に遺伝子欠失を有するノックアウトマウスを生成した(Skalhegg et al., 2000提出)。上記のマウスは、正常な外観を有する形態学的に正常な精子を発生させる。しかしながら、この精子は運動能もPKAホスホトランスフェラーゼ活性も持たない。精子運動性の欠陥により、これらのマウスは不妊性であると思われる。C<sub>1</sub>ヌル(null)突然変異マウスは、更に成長ホルモンが低水準であるため成長が30%遅延する。これらのマウスは疾病にも感受性であり、10%しか性的に成熟しない。

#### 【0011】

C<sub>1</sub>-sは、伸長した成熟精子細胞の中片部において唯一に発現する酵素であり、その機能は精子の運動性の調節である。従って、C<sub>1</sub>-sの水準、位置および/または活性を変更することにより、本発明者らの結果によれば、精子細胞の遊泳能力及び卵細胞を受精させる能力が調節される。この知見を用いて、雄性生殖不能症を診断し、雄性生殖不能症の症例を治療し、男性避妊薬を開発することができる。

#### 【0012】

1) 精子細胞の運動性および診断法: 精子細胞の運動性に依存する生殖不能は、C<sub>1</sub>-sによる異常または低酵素活性、C<sub>1</sub>-sタンパク質の不在、またはC<sub>1</sub>-sの転位によって引起されることがある。

#### 【0013】

1.1) 精子細胞の運動性の改良: 本発明により高処理量(high throughput)スクリーニングの後に、C<sub>1</sub>-sの酵素活性を特異的に改良する薬理組成物を同定し、特性決定し、製造することが可能になる。これらの組成物は、直接(混合によって)精子細胞に導入して、イン・ビトロでの受精または促進受精に関して運動性を改良することができるように開発すべきである。

#### 【0014】

1.2) 非運動性精子の診断キット: 精子細胞の運動性に依存する生殖不能症は、酵素活性を有するC<sub>1</sub>-sが存在しないことによって引起されることがある。本発明により、C<sub>1</sub>-sの存在が非運動性精子細胞の原因であるかどうかの診断を容易にするキットを開発することができる。このようなキットは、本発明者らの実験

室で既に開発されているC<sub>5</sub>-s特異的抗体を用いて開発すべきである。

【0015】

2) C<sub>5</sub>-s活性および位置に基づく避妊薬: 精子中片部からC<sub>5</sub>-s活性および/またはタンパク質を除去することにより、C<sub>5</sub>遺伝子を欠く遺伝子ノックアウトマウスを生成することによって示されるように、精子細胞が非運動性になる。

【0016】

2.1) C<sub>5</sub>-s活性に基づく避妊薬: 本発明により、高処理量スクリーニングの後に、新たに合成された精子においてC<sub>5</sub>-sの酵素活性を特異的および不可逆的に阻害する薬理組成物を同定し、特性決定し、製造することが可能となる。これらの組成物は、経口的に導入して、血液系に入って精子細胞に到達することができるように開発すべきである。

【0017】

2.2) C<sub>5</sub>-s位置に基づく避妊薬: 本発明により、高処理量スクリーニングの後に、精子中片部とのC<sub>5</sub>-sの相互作用を特異的および不可逆的に阻害する薬理組成物を同定し、特性決定し、製造することを可能にする。これらの組成物は、経口的に導入して、血液系に入って新たに合成された精子細胞に到達することができるように開発すべきである。

【0018】

本発明により、C<sub>5</sub>-sタンパク質の存在および位置について、患者精子を検査およびスクリーニングする方法であって、

- a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、
- b) 精子細胞の洗剤によるストリッピング後に、ポリ-L-リジンでコーティングしたカバースリップ(cover slips)上に沈降させて、免疫蛍光法用の精製した精子細胞を用意し、
- c) 一次抗体(Ab) (関連性のないAbまたはC<sub>5</sub>-s特異的Abである)と共にインキュベーションし、Ab過剰量は、洗浄緩衝液により除去し、精子細胞を蛍光剤と接合した二次抗-IgG Abと共にインキュベーションし、
- d) 蛍光顕微鏡法で精子細胞を検査する

ことを含んでなる、上記方法を開発することができる。

【0019】

本発明により、中片部に会合したC<sub>1</sub>-sの触媒活性について患者精子をスクリーニングする方法であって、

- a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、
  - b) 超音波処理により頭部と尾部の画分を分離し、遠心分離、そして洗剤含有緩衝液中での精子の尾部の溶解によってプロテインキナーゼアッセイ用の精製した精子細胞を用意し、
  - c) 確立されたアッセイによってC<sub>1</sub>-s特異的触媒活性をモニタリングし、C<sub>1</sub>活性を内部対照として用いて相対的活性を決定する、
- ことを含んでなる、上記方法を開発することもできる。

【0020】

(材料および方法)

5' -cDNA末端の迅速増幅(RACE)によるcDNAクローンの単離

ヒト精巣RACEの準備のできたcDNAは、Clontech Laboratories Inc.(パロアルト、カリフォルニア: カタログ番号7414-1)から購入した。プライマーC<sub>1</sub>-2137 (5' -GGACTTGGCCTCTCCTGTTCCCTTTTG-3' ; ヒトC<sub>1</sub> cDNA配列におけるヌクレオチド2137-2163)またはプライマーC<sub>1</sub>-1363 (5' -TGTGGGGAAAGAGGAAGGGAAAAGT-3' ; ヒトC<sub>1</sub> cDNA配列におけるヌクレオチド1363-1387)、およびアンカー特異的プライマー(AP1, Clontech)を用いて、一次PCRを行った。次の二次PCRは、プライマーC<sub>1</sub>-188 (5' -AACTGATCCAAGTGGGCTGTGTTC-3' ; ヒトC<sub>1</sub> cDNA配列におけるヌクレオチド188-212)またはC<sub>1</sub>-624 (5' -GCGAAACCGAAGTCTGTCACCTG-3' ; ヒトC<sub>1</sub> cDNA配列におけるヌクレオチド624-646)、およびアンカー特異的プライマー(A P2, Clontech)を用いて行った。Clontech Advantage PCRキット(Clontechカタログ番号K1905-1)を、両方のPCR反応においても94 30秒間の変性および68 4分間のアニーリングおよび伸長25サイクルで用いた。848-および560-塩基対PCR生成物をサブクローニングし、配列決定した。

【0021】

### cDNAの配列決定

プラスミドは、両方の鎖において、サイクルシーケンス法(ThermoSequenase キットカタログ番号US79760, Amersham Life Science Inc., クリーブランド, オハイオ 44128)、 $[^{33}\text{P}]$ で標識したジデオキシヌクレオチド(カタログ番号AH9539, Amersham)、およびベクター-および挿入特異的プライマーの組合せを用いるジデオキシ連鎖停止法[22]によって配列決定した。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データは、GCGプログラムパッケージ(Wisconsinパッケージについてのプログラムマニュアル, 第8版, 1994年9月, Genetics Computer Group, マジソン, ウィスコンシン 53711)を用いて分析した。

#### 【0022】

### ヒト精巣由来の胚細胞の分画化

胚細胞は、トリプシンとDNアーゼを用いる組合せ処理による単離[23]の後に、他所に記載された[24]方法と本質的に同様に、遠心懸濁分離法(centrifugal elutriation method)[24]を用いる分離した。細胞画分の純度は、フローサイトメトリーおよび位相差顕微鏡法を用いるDNA含量の分析によって評価した。

#### 【0023】

### 精子の分画化

ヒトドナー由来の成熟した運動性精子を、スイム-アップ(swim-up)法を用いて精製した[25]。精子頭部の除去を、精子を3分間超音波処理した後、頭部を1500 X gで5分間沈降させることによって行った。Triton X-100抽出については、精子または精子尾部を、本質的に他所に記載されたように[11]、20  $\mu$  McAMPの存在下または非存在下で1% Triton X-100を用いて30分間抽出した。

#### 【0024】

### オリゴヌクレオチドプローブ

特異的プローブは、他所に記載されているオリゴマー化法[26]において、ヒトC のcDNA配列(C<sup>-1</sup>)の102-141位に相当するオリゴ5' -AAGAAGGGCAGCGAGCAGGAGACGGTGAAGAATTCTTAG-3' およびC<sup>-s</sup>のcDNA配列(C<sup>-s</sup>)における1-40位に相当するオリゴ5' -CTGAGAACAGGACTGAGTGATGGCTTCCA ACTCCAGCGAT-3' を用いて作成した。

## 【0025】

## ノーザン分析

ヒト胚細胞画分由来の総RNAを、前報[27]のようにグアニジンイソチオシアネート/CsCl法によって抽出した。ノーザン分析は、10-20 µgRNA/レーンを用いて行った。ゲルを臭化エチジウムで染色して、それぞれのレーンにおける装填量を検証した。ヒト胚細胞画分または複数のヒト組織(Clontech, カタログ番号7759-1)を有するフィルターは、 $[^{32}\text{P}]$ で標識したC<sub>1</sub>-1またはC<sub>1</sub>-sプローブを用いてプローブした。

## 【0026】

## 抗体

抗C<sub>1</sub>-s抗血清は、C<sub>1</sub>-sのアミノ酸1-9に相当するヘモシアニンカップリング合成ペプチド(Antigen EP 990209,  $\text{NH}_2$ -ASNSSDVKE-CONH<sub>2</sub>; Eurogentec, セライング, ベルギー)でウサギを免疫することによって作成し、1/100の希釈率で免疫蛍光法に用いた。抗C<sub>1</sub>-s抗血清を、プロテインA セファロースカラム(Pharmacia, ストックホルム, スウェーデン)上でIgGについて豊富にした後、CNBr活性化セファロース 4B (Pharmacia)にカップリングしたペプチドを有するカラム上で親和性精製し、2 µg/mlで免疫ブロッティングに用いた。C<sub>1</sub>抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., サンタクルス, カリフォルニア, 米国, カタログ番号sc-905)を2 µg/mlで用いて、PKA Cサブユニットの総てのアイソフォームを検出した。

## 【0027】

## 免疫学的手続き

免疫プロット分析は、他所に記載された通りに行った[28]。免疫反応性タンパク質は、第二層において西洋ワサビペルオキシダーゼ標識プロテインA (Amersham)によって検出し、ECL (Amershamカタログ番号RPN2106)を用いて展開した。免疫蛍光は、3%パラホルムアルデヒドでポリ-Lリシンコーティングしたガラススライドに固定したヒトドナー由来の洗剤抽出した成熟した運動性精子(上記参照)について行い、0.5% Triton X-100で15分間透過性にした。免疫蛍光検出は、以前に報告された通りに行った[29]。DNAを、0.1 µg/mlのHoechst 33342で標識した。細胞は、Olympus AX70エピ蛍光顕微鏡で100倍の対物レンズを用いて検査した。

。写真は、Phototonic Science CCDカメラおよびOpenLabソフトウェア(Improvisation Co., コベントリー, 英国)を用いて撮った。

【0028】

本発明が更に良好に理解されることができるようになるため、下記の例を挙げる。これらの例は例示のためだけのものであり、本発明の範囲をいかなる方法でも制限するものと解釈すべきではない。

【0029】

(例)

例1

ヒトC<sub>1</sub>-sの同定

差別的にスプライスしたC<sub>1</sub> 転写体の存在の可能性を調べるため、ヒト精巣cDNAライブラリーおよびエキソン1の下流に配置されたプライマーを用いて、5' -RACEを行った。これにより560bpのクローンが得られ、3' 領域(ヌクレオチド40-560)はヌクレオチド126-646由来の以前に特徴決定したヒトC<sub>1</sub> -cDNA [30]と同一性を共有していた。BLASTNプログラム(基本局所配列およびサーチツール[31])を用いて、ネズミ類Cx<sub>1</sub>偽遺伝子への相似性を14-560位で見いだした。ATG開始コドンと同定し(19-21位)、停止を一切含まないリーディングフレームの180アミノ酸を生じた。この部分リーディングフレームの173個のC末端アミノ酸残基はヒトC<sub>1</sub> タンパク質の16-188位と同一であったが、以前に報告したC<sub>1</sub> 配列には存在しない7アミノ酸(配列番号: 2、下線部)が新規なN末端を構成した。図1Aは、ヒトC<sub>1</sub> のエキソン2に相当するアミノ酸配列(枠内)および2個のペプチド配列間で異なるN末端アミノ酸(太字)を示す。N末端の7アミノ酸は、別個のC<sub>1</sub> タンパク質であるヒツジ精子由来の精製してペプチド配列決定したC<sub>1</sub> -s[11]と相同性であり(メチオニンの他に、6個のうち4個のアミノ酸が同一)(図1B)、これはヒトC<sub>1</sub> スプライス変異体は恐らくC<sub>1</sub> -sアイソフォームであることを示していた。

【0030】

例2

ヒトC<sub>1</sub> -s mRNAの組織および細胞特異的発現

どのヒト組織がC<sub>1</sub> およびC<sub>1</sub> -smRNAを発現するかを決定するため、C<sub>1</sub> (この実

験では、C<sub>1</sub>-1と表す)およびC<sub>1</sub>-sに特異的なプローブを放射能標識し、ヒト組織を用いるノーザンブロットのプローブに用いた。図2Aの上段に示されているように、C<sub>1</sub>-s mRNAは精巣でのみ発現した。C<sub>1</sub>-1プローブは、検討を行った総ての組織および細胞の種類で発現を検出した(図2A, 下段)。ヒト精巣でのC<sub>1</sub>-s mRNA発現を更に調べるため、胚細胞をC<sub>1</sub>-s mRNAの発現について検討した(図2B)。ヒト男性胚細胞を、材料および方法に記載されている通りに単離し、分画化した。C<sub>1</sub>-s mRNAは、太糸期の精母細胞(PS)を豊富化した画分4および5で発現したが(レーン4および5)、丸形精細胞(RS)を豊富化した画分1-3では検出されなかった(レーン1-3)。

#### 【0031】

##### 例3

C<sub>1</sub>-sタンパク質はヒト精巣および精子に見られる

C<sub>1</sub>-sのアミノ酸1-9に相当するペプチドに対する抗血清を親和性精製し、免疫ブロット分析に用いた。ヒト組織および細胞ホモジネートの免疫ブロッティングでは、精巣および精子に39kDaの免疫反応性バンドの存在を認めたが(図3A, 上段, それぞれレーン2および3)、検討を行った他の細胞や組織では見られなかった(図3A, 上段, レーン4-7)。予想されたように、異種発現したネズミ類C<sub>1</sub>およびヒトC<sub>1</sub>タンパク質は、抗血清と反応しなかった(図3A, それぞれレーン1および8)。ヒト精巣および精子における39kDaのバンドの免疫特異性は、抗原との競争によって示した(図3A, 下段, それぞれレーン2および3)。これらの組織における他のC<sub>1</sub>アイソフォームの存在並びに標準品の免疫反応性は、総ての既知のC<sub>1</sub>アイソフォームを認識する抗C<sub>1</sub>抗体を用いる平行ブロットをプローブすることによって示した(図3B)。

#### 【0032】

##### 例4

C<sub>1</sub>-sタンパク質は精子中片部の洗剤耐性構造に局在する

ヒトC<sub>1</sub>-sの細胞内局在化を、C<sub>1</sub>-s抗血清を用いる免疫蛍光によって精子で検討した(図4A, 赤色)。Triton X-100で抽出した(図4A, 左段)または未処理のままの(結果は図示せず)射出精子調製物では、C<sub>1</sub>-s標識は中片部領域に限定された

。予備免疫血清または無関係の抗体は精子での免疫蛍光によっていかなるシグナルをも生成しなかったので(結果は図示せず)、染色は特異的であることが示されており、また染色は相当するペプチドと競合した(図4A, 右段)。ヒト精子中片部でのC<sub>s</sub>-sの溶解性を更に検討するため、cAMPの非存在下および存在下の両方に精子尾部を洗剤で抽出した。図4Bは、抗C<sub>s</sub>-s抗体を用いて、Triton X-100(レーン1および2)または20 μM cAMPと組合わせたTriton X-100(レーン3および4)で抽出したヒト精子尾部からの不溶性(P)および可溶性(S)画分の免疫ブロッキングを示す。いずれの場合にも、約2/3が顆粒状画分から可溶化した。抽出緩衝液にcAMPを加えても、Triton X-100のみで処理した場合と比較していずれの画分でもC<sub>s</sub>-sシグナルは余り変化せず、C<sub>s</sub>-sのプールはcAMPの存在下でも不溶性であることを示唆していた。

### 【0033】

(文献)

- [1] Tash JS, Means AR. サイクリックアデノシンーリン酸およびカルシウムによるタンパク質ホスホリル化および精子の運動性の調節。Biol. Reprod. 1982; 26: 745-763.
- [2] Brokaw CJ. 精子鞭毛振動のリチウム感受性レギュレーターは、cAMP依存性ホスホリル化によって活性化される。J. Cell Biol. 1987; 105: 1789-1798.
- [3] Beebe SJ, Corbin JD. サイクリックヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ。The Enzymes 1986; 17: 43-111.
- [4] San Agustin JT, Witman GB. 脱膜化 (demembrated) 雄ヒツジ精子の再活性化におけるcAMPの役割。Cell Motil. Cytoskeleton 1994; 27: 206-218.
- [5] Gordeladze JO, Hansson V. ラット精巢の可溶性Mn<sup>2+</sup>依存性アデニルシクラーゼの精製および速度特性。Mol. Cell Endocrinol. 1981; 23: 125-136.
- [6] Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. サイトゾル性アデニルシクラーゼは哺乳類の独特なシグナル分子を画定する。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999; 96: 79-84.
- [7] Landmark BF, Oyen O, Skalhogg BS, Fauske B, Jahnsen T, Hansson V. ラット精巢のcAMP依存性プロテインキナーゼの調節サブユニットの細胞の位置およ

び年齢による変化。J. Reprod. Fertil. 1993; 99: 323-334.

[8] Salanova M, Chun SY, Iona S, Puri C, Stefanini M, Conti M. 4型のサイクリックアデノシンーリン酸に特異的なホスホジエステラーゼはラットの精子完成の際に別個の細胞内コンパートメントで発現する。Endo 1999; 140: 2297-2306.

[9] Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froyso A, Hansson V, Jahnsen T. cAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットに付いて第三のアイソフォームを表すヒト精巣由来の組織特異的プロテインキナーゼ(Cガンマ)の分子クローニング。Mol. Endocrinol. 1990; 4: 465-75.

[10] Reinton N, Haugen TB, Orstavik S, Skalhegg BS, Hansson V, Jahnsen T, Tasken K. cAMP依存性プロテインキナーゼのC 触媒サブユニットをコードする遺伝子。Genomics 1998; 49: 290-297.

#### 【0034】

[11] San Agustin JT, Leszyk JD, Nuwaysir LM, Witman GB. ヒツジ精子鞭毛のcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットは独特なアミノ末端配列を有する。J. Biol. Chem. 1998; 273: 24874-24883.

[12] Vijayaraghaven S, Goueli SA, Davey MP, Carr DW. プロテインキナーゼA固定インヒビターペプチドは哺乳類精子の運動性を阻止する。J. Biol. Chem. 1997; 272: 4747-4752.

[13] Zimmermann B, Chiorini JA, Ma Y, Kotin RM, Herberg FW. PrKXは調節サブユニットI型によって調節されるcAMP依存性プロテインキナーゼの新規な触媒サブユニットである。J. Biol. Chem. 1999; 274: 5370-5378.

[14] Tasken K, Naylor SL, Solberg R, Jahnsen T. ヒト染色体領域3p21.3-p21.2に対するcAMP依存性プロテインキナーゼ(遺伝子座PRKAR2A)の調節サブユニットRII をコードする遺伝子のマッピング。Genomics 1998; 50: 378-381.

[15] Thomis DC, Floyd-Smith G, Samuel CE. インターフェロンの作用機構。インターフェロンで治療したヒト細胞由来のヒトプロテインキナーゼAの触媒サブユニットの新規なスプライス部位変異体のcDNA構造および調節。J. Biol. Chem. 1992; 267: 10723-10728.

- [16] Beushausen S, Lee E, Walker B, Bayley H. 2個異なるN末端を有するアメフラシニューロンのcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1992; 89: 1641-1645.
- [17] Wiemann S, Kinzel V, Pyerin W. cAMP依存性プロテインキナーゼのウシ触媒サブユニットの異常形態であるアイソフォームC<sub>2</sub>。J. Biol. Chem. 1991; 266: 5140-5146.
- [18] Guthrie CR, Skalhegg BS, McKnight GS. cAMP依存性プロテインキナーゼのネズミ類C<sub>2</sub>遺伝子の2種類の新規な脳特異的スプライス変異体。J. Biol. Chem. 1997; 272: 29560-29565.
- [19] Cummings DE, Edelhoff S, Disteche CM, McKnight GS. マウスプロテインキナーゼA触媒サブユニット偽遺伝子のクローニングおよびCサブユニットアイソフォームの染色体マッピング。Mamm. Genome 1994; 5: 701-706.
- [20] Scott JD. サイクリックヌクレオチド依存性プロテインキナーゼ。Pharmacol. Ther. 1991; 50: 123-145.

【 0 0 3 5 】

- [21] Rubin CS. キナーゼ固定タンパク質およびサイクリックAMPによって運ばれるシグナルの細胞内ターゲティング。Biochim. Biophys. Acta 1994; 1224: 467-479.
- [22] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 連鎖停止阻害剤によるDNA配列決定。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977; 74: 5463-5467.
- [23] Grootegoed JA, Peters MJ, Mulder E, Rommerts FF, van der Molen HJ. ラット精巢の単離胚細胞における核アンドロゲンレセプターの不在。Mol. Cell Endocrinol. 1977; 9: 159-167.
- [24] Blanchard Y, Lavault MT, Quernee D, Le Lannou D, Lobel B, Lescoat D. ヒトの分化の特異的段階における精子形成細胞個体群の調製。Mol. Reprod. Dev. 1991; 30: 275-282.
- [25] Wikland M, Wik O, Steen Y, Qvist K, Sderlund B, Janson PO. イン・ビトロでの受精のための精子の調製の自己移行法。Hum. Reprod. 1987; 2: 191-195.

[26] Paquette J, Sapienza C. プロットハイブリダイゼーション実験におけるプローブとしてのオリゴヌクレオチドの信頼性のある使用方法。Mamm. Genome 1992; 3: 1-4.

[27] Knutsen HK, Reinton N, Tasken KA, Hansson V, Eskild W. マウスSertoli細胞系におけるサイクリックアデノシン3',5'-リン酸によるプロテインキナーゼAサブユニットの調節: RII メッセンジャーリボ核酸の誘発は連続的タンパク質合成には無関係である。Biol. Reprod. 1996; 55: 5-10.

[28] Witczak O, Skalhegg BS, Keryer G, Bornens M, Tasken K, Jahnsen T, Ørstavik S. 中心体に配置されたAキナーゼ固定タンパク質AKAP450をコードするcDNAのクローニングおよび特性決定。EMBO J. 1999; 18: 1858-1868.

[29] Collas P, Courvalin JC, Poccia D. ウニ精子クロマチンに対する膜のターゲティングはラミンBレセプター様一体的膜タンパク質によって伝達される。J. Cell Biol. 1996; 135: 1715-1725.

[30] Maldonado F, Hanks SK. ヒトcAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットC をコードするcDNAクローン。Nucl. Acids Res. 1988; 16: 8189-8190.

#### 【0036】

[31] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 基本局所配列およびサーチツール。J. Mol. Biol. 1990; 215: 403-410.

[32] Herberg FW, Zimmermann B, McGlone M, Taylor SS. 中裂界面における安定性およびサブドメインの配向のためのcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのAヘリックスの重要性。Protein Sci. 1997; 6: 569-579.

[33] Yonemoto W, Garrod SM, Bell SM, Taylor SS. cAMP依存性プロテインキナーゼの組換え触媒サブユニットにおけるホスホリル化部位の同定。J. Biol. Chem. 1993; 268: 18626-18632.

[34] Yonemoto W, McGlone ML, Grant B, Taylor SS. 大腸菌におけるcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの自動ホスホリル化。Protein Eng. 1997; 10: 915-925.

[35] Burton KA, Treash-Osio B, Muller CH, Dunphy EL, McKnight GS. マウス精子のII型調節サブユニットの欠失は運動性や受精に影響することなくプロテ

インキナーゼAを非局在化する。J. Biol. Chem. 1999; 274: 24131-14136.

[36] Reinton N., P. Collas, T. Haugen, B.S. Skalhegg, V. Hansson, T. Jahnsen and Tasken, K. ヒトAキナーゼ固定タンパク質hAKAP220は雄性胚細胞中心体および精子中片部に局在する。Dev. Biol. 2000; 223, 194-204.

[37] Desseyne, J.L., Burton, K.A., & McKnight, G.S. (2000) 雄性胚細胞の発生中のプロテインキナーゼAの触媒サブユニットの非ミリスチル化変異体の発現。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 6433-6438.

**【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1

<110> Nils Reinton, Sigurd Ørstavik, Trine B. Haugen, Tore Jahnsen, Kjetil Taskén og  
5 Bjørn S. Skålhegg

<120> A NOVEL ISOFORM OF HUMAN cAMP-DEPENDENT PROTEIN  
KINASE,

**Cα-s, LOCALIZES TO SPERM MIDPIECE AND THE USE THEREOF**

10 <160> 2

<210> 1

<211> 560 nucleotides

<212> cDNA

<213> Homo sapiens

15

**Cα-s cDNA sequence**

<400> 1

1 tgagaacagg actgagtgat ggettccaac tccagcgatg tgaaagaatt  
20 cttagccaaa  
61 gccaaagaag attttcttaa aaaatgggaa agtcccgcgc agaacacagc  
ccacttggat  
121 cagtttgaac gaatcaagac cctcggcagc ggctccttcg,ggcgggtgat  
gctggtgaaa  
25 181 cacaaggaga ccgggaacca ctatgccatg aagatcctcg acaaacagaa  
ggtggtgaaa  
241 ctgaaacaga tcgaacacac cctgaatgaa aagcgcaccc tgcaagctgt  
caactttccg  
301 ttctctgtca aactcgagtt ctcttcaag gacaactcaa acttatacat  
30 ggtcatggag  
361 tacgtgcccc gcggggagat gttctcacac ctacggcgga tcggaagggt  
cagtgagccc  
421 catgcccgtt tctacggcgc ccagatcgtc ctgacctttg agtatctgca  
ctcgttggat  
35 481 ctcatctaca gggacctgaa gccggagaat ctgctcattg accagcaggg  
ctacattcag  
541 gtgacagact tcggtttcgc

SEQ ID NO: 2

5

<110> Nils Reinton, Sigurs Ørstavik, Trine B. Haugen, Tore Jahnsen, Kjetil Taskén og  
Bjørn S. Skålhegg

<120> A NOVEL ISOFORM OF HUMAN cAMP-DEPENDENT PROTEIN

10 KINASE,  $\text{C}\alpha$ -s,

LOCALIZES TO SPERM MIDPIECE AND THE USE THEREOF

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 2

15 &lt;211&gt; 180 aa

&lt;212&gt; aminoacids

&lt;213&gt; Homo sapiens

20  $\text{C}\alpha$ -s Protein sequence

&lt;400&gt; 1

Met-Ala-Ser-Asn-Ser-Ser-Asp-Val-Lys-Glu-PheLeu-Ala-Lys-Ala-  
Lys-Glu-Asp-Phe-Leu-Lys-Lys-Trp-Glu-Ser-Pro-Ala-Gln-Asn-  
25 Thr-Ala-His-Leu-Asp-Gln-Phe-Glu-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Gly-  
Thr-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Val-Met-Leu-Val-Lys-His-Lys-Glu-  
Thr-Gly-Asn-His-Tyr-Ala-Met-Lys-Ile-Leu-Asp-Lys-Gln-Lys-  
Val-Val-Lys-Leu-Lys-Gln-Ile-Glu-His-Thr-Leu-Asn-Glu-Lys-  
30 Arg-Ile-Leu-Gln-Ala-Val-Asn-Phe-Pro-Phe-Leu-Val-Lys-Leu-  
Glu-Phe-Ser-Phe-Lys-Asp-Asn-Ser-Asn-Leu-Tyr-Met-Val-Met-  
Glu-Tyr-Val-Pro-Gly-Gly-Glu-Met-Phe-Ser-His-Leu-Arg-Arg-  
Ile-Gly-Arg-Phe-Ser-Glu-Pro-His-Ala-Arg-Phe-Tyr-Ala-Ala-  
Gln-Ile-Val-Leu-Thr-Phe-Glu-Tyr-Leu-His-Ser-Leu-Asp-Leu-  
Ile-Tyr-Arg-Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn-Leu-Leu-Ile-Asp-Gln-  
35 Gln-Gly-Tyr-Ile-Gln-Val-Thr-Asp-Phe-Gly-Phe-Ala

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

A) ヒトC アイソフォームの配列。クローニングしたC -s cDNA配列を、相当するアミノ酸配列に翻訳した。C 遺伝子由来のエキソン1(太字)およびエキソン2(枠内)の最初の28アミノ酸に相当するC (上)およびC -s(下)のペプチド配列を示す。B) ヒト(上)およびヒツジ(下)のC -sペプチド配列の配列比較。縦線は相同性を示す。

## 【図2】

A) ヒトC mRNAの組織分布。ヒトの複数の組織プロット(Clontech Inc., 2

$\mu\text{g}$ ポリA<sup>+</sup>RNA/レーン)を、 $[^{32}\text{P}]$ で標識したC<sub>s</sub>-特異的(上段)またはC<sub>s</sub>-1特異的(下段)プローブでプローブ下(材料および方法を参照)。線は、RNA分子量マーカー(kb)の移動を示す。B) ヒト精巣からの再細胞懸濁液を遠心懸濁分離法によって分画化し、総RNAを抽出して、 $[^{32}\text{P}]$ で標識したC<sub>s</sub>-特異的プローブを用いてノーザンブロット分析を行った。画分をDNA含量についてフローサイトメトリーによって分析し、一倍体細胞(丸形精細胞(RS))および四倍体細胞(太糸期の精母細胞(PS))に分離した。二倍体細胞は精原細胞、二次的精母細胞、または体細胞と白血球による混入であると考えた。レーン1: 57% RS, 7% PS, レーン2: 41% RS, レーン3: 16% RS, 7% PS, レーン4: 21%PS, 3%RS, レーン5: 51% PS, 4% RS。総RNA20  $\mu\text{g}$ を、レーン2(10  $\mu\text{g}$ )を除き、装填した。プローブは、18S rRNA(下部の矢印)の移行と比較して約2.8kb(上部の矢印)のC<sub>s</sub>-s mRNAを検出した。

### 【図3】

精子におけるヒトC<sub>s</sub>-免疫反応性タンパク質。ヒト細胞および組織溶解生成物からのニトロセルロース固定タンパク質を、2mMのペプチド抗原の非存在下(上段)または存在下(下段)で C<sub>s</sub>-抗血清(A)または総てのCサブユニットアイソフォームに反応性の抗C抗体(B)を用いて免疫ブロット分析を行った。レーン1: 組換えネズミ類C標準(500ng)、レーン2: ヒト精巣(20  $\mu\text{g}$ タンパク質)、レーン3: ヒト精子溶解生成物( $10^6$ 精子)、レーン4: ヒトT細胞(20  $\mu\text{g}$ )、レーン5: ヒトB細胞(20  $\mu\text{g}$ )、レーン6: ヒト脳(20  $\mu\text{g}$ )、レーン7: HeLa細胞(20  $\mu\text{g}$ )、レーン8: 組換えヒトC<sub>s</sub> (100ng)。

### 【図4】

A) 精子細胞におけるヒトC<sub>s</sub>-sの細胞内局在化。ヒトの運動性精子を1% Triton X-100で抽出し、ガラススライドにエタノールで固定し、2mMペプチド抗原の非存在下(左段)または存在下(中段)において C<sub>s</sub>-s抗血清(赤色染色)を用いて免疫蛍光分析に付した。細胞は、平行してHoechst(青色)でDNA染色を行った。B) ヒト精子尾部の洗剤抽出。精子尾部を1% Triton X-100(レーン1および2)、または1% Triton X-100および20  $\mu\text{M}$  McAMP(レーン3および4)で抽出し、可溶性(S)および不溶性(P)画分に分画化し、抗C<sub>s</sub>-s抗体を用いて免疫ブロッティングに付した。

**A**

エキソン 2

エキソン 1

Cα                    **MGNAAAAKKGSEQES**

Cα-s                    **MASNSSD**

VKEFLAKAKEDFLKKWESPAQNTAHLDQ

VKEFLAKAKEDFLKKWESPAQNTAHLDQ

**B**

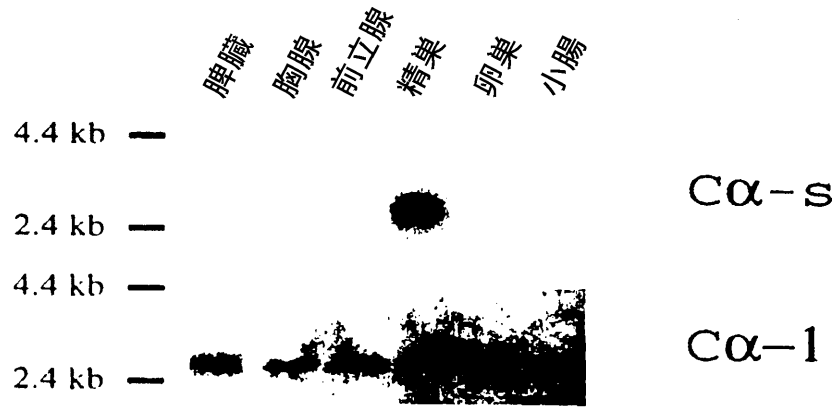
ヒト    Cα-s                    MASNSSD-

          | | | | |

ヒツジ    Cα-s                    MASNPN-

【图2】

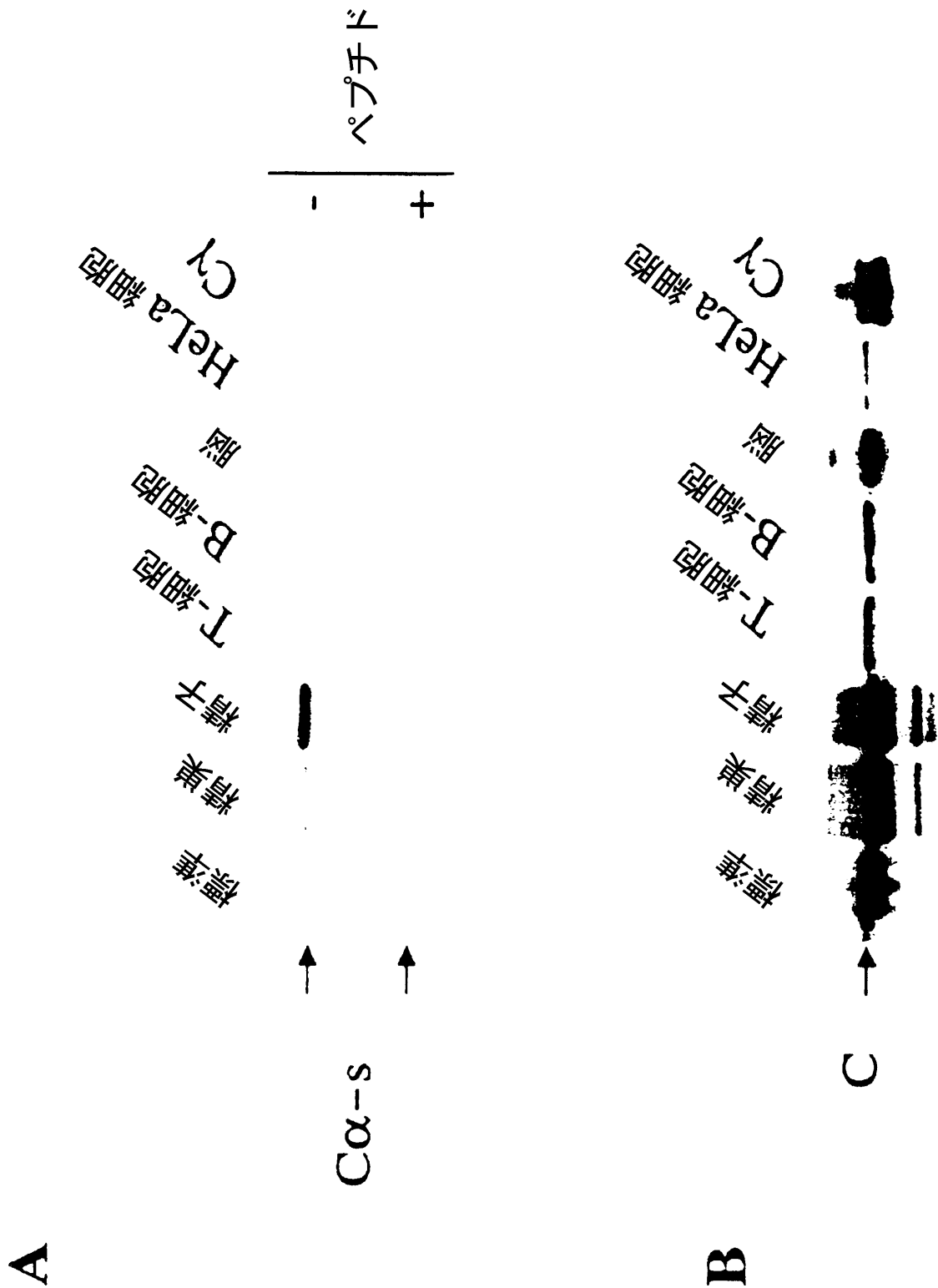
A



B



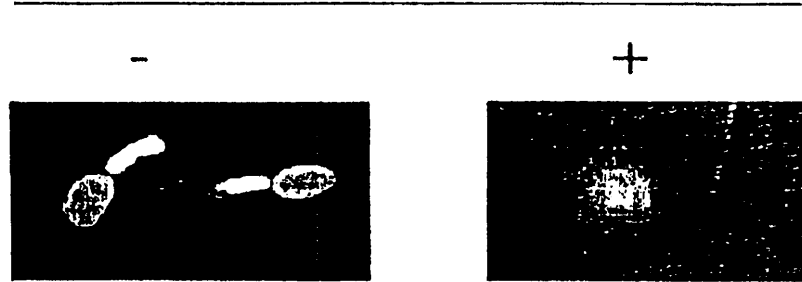
【図3】



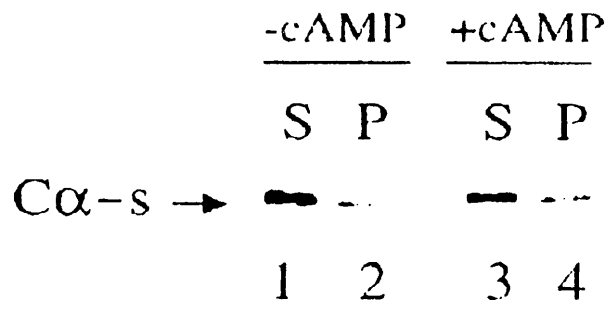
【図4】

**A**

ペプチド



**B**



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成14年3月27日(2002.3.27)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】ヌクレオチド配列の配列番号：1を含んでなるC-sタンパク質をコードするcDNA配列であって、上記タンパク質がcAMP依存性プロテインキナーゼのC触媒サブユニットの新規スプライス変異体である、上記cDNA配列。

【請求項2】請求項1に記載のcDNA配列を含んでなるベクター。

【請求項3】配列番号：2の特異的アミノ酸配列。

【請求項4】請求項1に記載のヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質。

【請求項5】配列番号：2の特異的C-sタンパク質アミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のcDNA配列によってコードされたタンパク質。

【請求項6】請求項1～5のいずれか一項に記載のC-sタンパク質に対する抗体を含んでなる、キット。

【請求項7】非運動性精子の診断用の、請求項6に記載のキット。

【請求項8】医薬品の調製のための、請求項1～5に記載のC-sタンパク質の使用。

【請求項9】精子の運動性を操作するための薬剤の調製のための、請求項1～5に記載のC-sタンパク質の使用。

【請求項10】避妊薬として使用するための薬剤の調製のための、請求項1～5に記載のC-sタンパク質の使用。

【請求項11】雄生殖不能症を治療するための薬剤の調製のための、請求項1～5に記載のC-sタンパク質の使用。

【請求項12】アンチセンス薬の調製を目的とする請求項1に記載のC-

sDNA配列に相補的なDNA配列の使用。

【請求項13】 請求項1～5に記載のC-sタンパク質の存在および位置について、患者精子を検査およびスクリーニングする方法であって、

- a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、
- b) 精子細胞の洗剤によるストリッピングの後、ポリ-L-リシンでコーティングしたカバースリップ上に沈降させることにより、免疫蛍光用の精製した精子細胞を用意し、
- c) 一次抗体(Ab) (関連性のないAbまたはC-s特異的Abである) と共にインキュベーションし、Ab過剰量は洗浄緩衝液によって除去し、精子細胞を蛍光剤と接合した二次抗-IgGAbと共にインキュベーションし、
- d) 蛍光顕微鏡法で精子細胞を検査することを含んでなる、上記方法。

【請求項14】 請求項1～5に記載の中片部(midpiece)に会合したC-sの触媒活性についての患者精子のスクリーニング方法であって、

- a) 射出された成熟精子または副睾丸から直接単離された伸長した精子を集めて、緩衝液で洗浄し、
- b) 超音波処理により頭部と尾部の画分を分離し、遠心分離、洗剤含有緩衝液中での精子の尾部の溶解によってプロテインキナーゼ分析用の精製した精子細胞を用意し、
- c) 確立されたアッセイによってC-s特異的触媒活性をモニタリングし、C-1活性を内部コントロールとして用いて相対的活性を決定することを含んでなる、上記方法。

【請求項15】 請求項12または13に記載の方法によって製造した生成物。

【請求項16】 PKA触媒活性を測定するアッセイを用いるC-s活性および/または位置の欠陥について、精子運動性による生殖不能症に罹っている男性患者をスクリーニングするための、請求項1～5に記載のC-sタンパク質の阻害または活性化分子を用いる試験システム。

【請求項17】 請求項16に記載のスクリーニングの生成物。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NO 00/00441
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C12N 9/12 // C12Q 1/48 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)		
IPC7: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Molecular biology of the cell, Volume 10, 1999, Jovenal T. San Agustin et al, "The catalytic subunit of sperm cAMP-dependent protein kinase (PKA) is a splice variant of C alpha expressed specifically in the testis in a wide range of mammals" page 276a --	1-17
X	The Journal of Biological Chemistry, Volume 273, No 38, 1998, Jovental T. San Augustin et al, "The Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase of Ovine Sperm Flagella Has a Unique Amino-terminal Sequence", page 24874 - page 24883 --	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 May 2001		21-05-2001
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Yvonne Siösteen/BS Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 00/00441

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Molecular Endocrinology, Volume, 1990, Stephen J. Beebe et al, "Molecular Cloning of a Tissue-Specific Protein Kinase (C-gamma) from Human Testis-Representing a Third Isoform for the Catalytic Subunit cAMP-Dependent Protein Kinase" page 465  --	1-17
A	Nucleic Acids Research, Vol 16, No 16, 1988, F. Maldonado et al, "A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit C alpha", & EMBL Genbank DDBJ, accession no. X07767, F. Maldonado et al: "A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit type alpha",  --	1-17
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 267, No 15, 1992, Daniel C. Thomis et al, "Mechanism of Interferon Action", page 10723 - page 10728  --	1-17
A	Mammalian Genome, Volume 5, 1994, D.E. Cummings et al, "Cloning of a mouse protein kinase A catalytic subunit pseudogene and chromosomal mapping of C subunit isoforms" page 701 - page 706  --	1-17
A	Biochimica et Biophysica Acta, Volume 1089, 1991, S. Wiemann et al, "Rat C-alpha catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase: cDNA sequence and evidence that it is the only isoform expressed in myoblasts" page 254 - page 256  --	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 00/00441

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>STN International, file BIOSIS, BIOSIS accession no. 2001:126841, document no. PREV200100126841, San Augustin, Jovental T, "The <b>**unique**</b> <b>** catalytic**</b> subunit of <b>** sperm**</b> <b>** cAMP**</b>-dependent protein kinase is the product of an alternative Calpha mRNA expressed specifically in spermatogenic cells", Molecular Biology of the Cell, (september,2000) vol 11, no. 9, pp. 3031-3044. print, &amp; EMBL Genbank DDBJ, accession no AF239744,</p> <p>San Augurin, J.T.  <b>"The unique catalytic subunit of sperm cAMP-dependent protein kinase is the product of an alternative Capha mRNA expressed specifically in spermatogenic cells",</b></p>	1-17

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	15/16	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 N	9/12		33/50	J
G 0 1 N	33/15			Z
	33/50		33/53	Y
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
		A 6 1 K	37/52	
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(71)出願人	タスケン、キエティル ノルウェー国、リッキン、ベルゲルスレッ タ 20			
(71)出願人	ハウゲン、トリネ ノルウェー国、オスロ、アアゴトス ベイ 13			
(72)発明者	レイントン、ニルス ノルウェー国、オスロ、ベスト Heim ガテ ン 6 ビー			
(72)発明者	オルスタビク、シゲルド ノルウェー国、オスロ、イリスベイエン 18			
(72)発明者	ヤンセン、トーレ ノルウェー国、スキイ、イドレットスベ イエン 44			
(72)発明者	スカルヘッグ、ピヨルン、エス . ノルウェー国、サンドピカ、エンゲルヨ ルデット 69			
(72)発明者	タスケン、キエティル ノルウェー国、リッキン、ベルゲルスレッ タ 20			

(72)発明者 ハウゲン、トリネ  
ノルウェー国、オスロ、アアゴトス ベイ  
13

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB14 FA16 FB07 FB12  
4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 DA03  
EA04 GA11 HA15  
4B050 CC03 DD07 LL01 LL03  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA22  
BA23 CA53 DC25 ZA81 ZA86  
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 NA14  
ZA81 ZA86

专利名称(译)	人cAMP依赖性蛋白激酶的新同种型, Ca-s定位于精子片及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003518384A</a>	公开(公告)日	2003-06-10
申请号	JP2001548683	申请日	2000-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	雨吨尼尔斯 OL稳定西格尔德点击 扬森托雷 骷髅海格比约恩·ES タスケンキエテイル Haugentorine		
申请(专利权)人(译)	Reinton, 尼尔斯 Orusutabiku, 矽格 杨森, 十 Sukaruheggu, 比约恩, 上课. 塔斯肯, Kietiru 豪根, Torine		
[标]发明人	レイントンニルス オルスタビクシグルド ヤンセントーレ スカルヘッグビヨルンエス タスケンキエテイル ハウゲントリネ		
发明人	レイントン、ニルス オルスタビク、シグルド ヤンセン、トーレ スカルヘッグ、ビヨルン、エス。 タスケン、キエテイル ハウゲン、トリネ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/711 A61K38/00 A61K38/45 A61K48/00 A61P15/08 A61P15/16 C12N9/12 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	A61K38/00 A61P15/08 A61P15/16 C12N9/1205 G01N33/573 G01N2333/912		
FI分类号	A61K31/711 A61K48/00 A61P15/08 A61P15/16 C12N9/12 G01N33/15.Z G01N33/50.J G01N33/50.Z G01N33/53.Y C12N15/00.ZNA.A A61K37/52		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB14 2G045/FA16 2G045/FB07 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC25 4C084/ZA81 4C084/ZA86 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZA86		
优先权	19996424 1999-12-23 NO		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种新的人Ca同工型, 其基于与最近表征的Ca同工型相似而被鉴定为人Ca-s蛋白, 所述Ca同工型通过从绵羊精子中纯化和肽测序鉴定。包括表格克隆[11]。人Ca-s蛋白存在于睾丸和射出的精子中, 而Ca-s则位于人精子的中部。在这方面, 本发明包括编码Ca-s蛋白的cDNA序列, 其包含SEQ ID NO: 1所示的特定核苷酸序列(带下划线), 所述蛋白是CAMP依赖性蛋白激酶Ca。它是催化亚基的新型剪接变体。本发明还涉及包含上述cDNA序列的载体。本发明还包括以SEQ ID NO: 2(带下划线

的 ) 所示的Ca-s蛋白特异性氨基酸序列为特征的蛋白。本发明进一步提供了Ca-s蛋白和cDNA序列在制备药物，用于控制精子运动的药物或用作避孕药的药物以及与Ca-s相互作用的分子中的用途。它还涉及用于筛选的方法和筛选系统。本发明还包括试剂盒。