

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3657751号

(P3657751)

(45) 発行日 平成17年6月8日(2005.6.8)

(24) 登録日 平成17年3月18日(2005.3.18)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 14/47

C 0 7 K 14/47 Z N A

C 0 7 K 16/18

C 0 7 K 16/18

//(C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 R 1:91 )

C 1 2 R 1:91

請求項の数 3 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平9-257043  
 (22) 出願日 平成9年9月22日(1997.9.22)  
 (65) 公開番号 特開平11-89572  
 (43) 公開日 平成11年4月6日(1999.4.6)  
 審査請求日 平成14年2月26日(2002.2.26)

(73) 特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (73) 特許権者 000228545  
 日本ケミカルリサーチ株式会社  
 兵庫県芦屋市春日町3番19号  
 (73) 特許権者 000000217  
 エーザイ株式会社  
 東京都文京区小石川4丁目6番10号  
 (74) 代理人 100093230  
 弁理士 西澤 利夫  
 (72) 発明者 高井 義美  
 兵庫県神戸市西区学園東町二丁目5番地の  
 73

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アクチン結合蛋白質I-アフアディン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列からなるアクチン結合蛋白質I-アフアディン。

【請求項2】

配列番号1のアミノ酸配列をコードするcDNA。

【請求項3】

請求項1のアクチン結合蛋白質I-アフアディンの部分ペプチドを抗原として作成された抗体であって、請求項1のアクチン結合蛋白質I-アフアディンを特異的に認識する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、新規なアクチン結合蛋白質I-アフアディン(I-Afadin)に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、動物の個体形成等に重要な役割を果たす細胞間密着結合に関与する新規動物性蛋白質I-アフアディンに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

動物個体における様々な細胞現象、例えば、細胞接着、細胞運動および細胞の形状決定等においては、細胞接着分子、受容体およびチャンネル等の膜貫通蛋白質によって形成される接着装置が重要な役割を果たしており、これらの接着装置は、しばしばアクチン性細胞骨格と結合することが知られている(Biochem. Biophys. Acta 737:305-341, 1983; Curr

. Opin. Cell Biol. 1:103-109, 1989; Cell Motil. Cytoskeleton. 20:1-6, 1991; Curr. Opin. Cell Biol. 3:849-853, 1991; Science. 258:955-964, 1992; Curr. Opin. Cell Biol. 4:834-839, 1992; Curr. Opin. Cell Biol. 5:653-660, 1993; Trends Biochem. Sci. 22:53-58, 1997)。従って、アクチン性細胞骨格と細胞質膜とは上記細胞現象において重要な役割を果たしており、それ故アクチン性細胞骨格を膜貫通蛋白質に結合させる生体分子の特定に多大な努力が払われてきた。しかしながら、アクチン性細胞骨格と細胞質膜との結合に関する分子的基礎については、今だ十分に理解されてはいない。

#### 【 0 0 0 3 】

このような細胞結合に係わる分子的基礎を理解するため、これまでに細胞接着部位が最も広範に研究された (Biochem. Biophys. Acta 737:305-341, 1983; Curr. Opin. Cell Biol. 1:103-109, 1989; Cell Motil. Cytoskeleton. 20:1-6, 1991; Curr. Opin. Cell Biol. 3:849-853, 1991; Science. 258:955-964, 1992; Curr. Opin. Cell Biol. 4:834-839, 1992; Curr. Opin. Cell Biol. 5:653-660, 1993; Trends Biochem. Sci. 22:53-58, 1997)。その結果、アクチン線維 (F - アクチン) に関連する細胞接着部位が2つのタイプ、すなわち、細胞 - 細胞接着帯 (adherens junctions: AJ) と、細胞 - マトリックス AJ とに分類されている。細胞 - 細胞 AJ においては、その細胞外表面でカドヘリン (cadherin) が互いに相互作用しており、多くの結合蛋白質が同定されている (Development 102:639-655, 1988; Cell Motil. Cytoskeleton. 20:1-6, 1991; Science 251:1451-1455, 1991; Curr. Opin. Cell Biol. 4:834-839, 1992; EMBO J. 8:1711-1717, 1989; Cell 65:849-857, 1991; Science 251:1451-1455, 1991; Curr. Opin. Cell Biol. 4:834-839, 1992)。これらの結合タンパク質のうち、 $\beta$ -カテニンは、F - アクチンと直接相互作用する (Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 92:8813-8817, 1995) と共に、 $\alpha$ -アクチニンおよび/または ZO - 1 を介して F - アクチンに間接的に相互作用している (J. Cell Biol. 130:67-77, 1995; J. Cell Biol. 138:181-192, 1997)。また、別の F - アクチン結合蛋白質であるピンキュリン (vinculin) は、細胞 - 細胞 AJ に集中していることが知られているが、細胞 - 細胞 AJ におけるその相互作用分子は未だ特定されていない (Cell Motil. Cytoskeleton. 20:1-6, 1991; Curr. Opin. Cell Biol. 4:834-839, 1992)。さらに、細胞外表面においてインテグリン (integrin) がマトリックス蛋白質と相互作用する細胞 - マトリックス AJ では、その細胞質ドメインは、 $\alpha$ -アクチニン、ピンキュリン、タリン (talin) 等の F - アクチン結合蛋白質と、直接または関節的に相互作用している (Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 11:379-416, 1995)。

#### 【 0 0 0 4 】

以上のとおり、多くの F - アクチン結合蛋白質が、アクチン性細胞骨格と細胞質膜のカドヘリンおよびインテグリンとの結合因子 (linker) として作用していると考えられている。

一方、アクチン性細胞骨格と細胞質膜との結合は、神経細胞に特異的な現象 (例えば、成長円錐の伸長やその後のシナプス結合の形成および維持等) にとっても重要である (Neuron 1:761-772, 1988; Science 242:708-715, 1988; Curr. Opin. Neurobiol. 4:43-48, 1994; Curr. Opin. Neurobiol. 4:640-647, 1994; Cell 83:171-176, 1995)。しかしながら、これらの神経細胞に特異的な現象において、どのような分子がアクチン性細胞骨格を細胞質膜に結合させているかは明らかではない。

#### 【 0 0 0 5 】

この点を明らかにするため、この出願の発明者等は、ラットの脳から幾つかの新規な F - アクチン結合蛋白質を単離し、特に神経細胞に特異的で、シナプスに多く存在する蛋白質の構造を解析し、既に特許出願している (特願平 9 - 9 2 6 1 5 号)。この先願発明の蛋白質 (以下、発明者等の命名に従って「ニューラビン」 (neurabin) と記載する) は、1つの F - アクチン結合ドメインと、1つの PDZドメインを有している。PDZドメインは様々な蛋白質に見出されており、そのうちの幾つかは細胞間結合に局在している。例えば、シナプス結合における PSD - 9 5 / SAP 9 0 (Neuron. 9:929-942, 1992; J. Biol. Chem. 268:4580-4583, 1993)、隔膜結合における Dlg (Cell. 66:451-464, 1991)

、密着結合におけるZO-1およびZO-2 (J. Cell Biol. 193:755-766, 1986; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3460-3464, 1991; J. Cell Biol. 121:491-502, 1993; J. Cell Biol. 123:1049-1053, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:7834-7838, 1993; J. Cell Biol. 124:949-961, 1994) 等である。また、最近の研究から、PDZドメインは標的蛋白質のユニークなC-末端モチーフに結合することが明らかにされたが (Trends Biochem. Sci. 21:455-458, 1996)、このモチーフは、N-methyl-D-aspartate受容体やShaker-type K<sup>+</sup> チャネル等の多くの膜貫通蛋白質に見出されている (Nature 378:85-88, 1995; Science 269:1737-1740, 1995; J. Neurosci. 16:2157-2163, 1996)。

【0006】

【発明が解決使用とする課題】

以上のとおりの様々な知見から、この発明者等による先願発明の蛋白質ニューラピンは、シナプスにおけるアクチン性細胞骨格と膜貫通蛋白質との接着因子として機能しているものと考えられる。

しかしながら、細胞間接着に関与する分子的基礎の全容は未だ解明されておらず、そのためには、アクチン結合蛋白質のさらなる同定が必須である。また、このような蛋白質は、例えば癌腫の浸潤、転移のメカニズムの解明につながる可能性もあり、癌腫の悪性度の診断やその治療法、治療薬等の開発への応用も期待される。

【0007】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞間接着に関与する新規なアクチン結合蛋白質を、その構造(アミノ酸配列)および性状を明らかにして提供

することを目的としている。

また、この発明は、このアクチン結合蛋白質の遺伝子工学的操作のための材料を提供する

ことも目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この発明は、上記の課題を解決するものとして、配列番号1のアミノ酸配列を有するアクチン結合蛋白質I-アフアディンを提供する。

またこの発明は、配列番号1と実質的に同一のアミノ酸配列を有する動物性蛋白質を提供する。

【0009】

さらにこの発明は、配列番号1のアミノ酸配列または配列番号1と実質的に同一のアミノ酸配列をコードするcDNAと、このcDNAまたはその一部配列がハイブリダイズするゲノムDNA配列をも提供する。

さらにまた、この発明は、上記のアクチン結合蛋白質I-アフアディンを免疫原として作成した抗体を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】

この発明のアクチン結合蛋白質I-アフアディンは、配列番号1のアミノ酸配列を含む蛋白質であって、この蛋白質には、配列番号1のアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片(5アミノ酸残基以上)も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を

作製するための抗原として用いることができる。さらに、この発明の蛋白質には、他の任意の蛋白質(例えば、蛍光蛋白質など)との融合蛋白質も含まれる。

【0011】

この発明の蛋白質は、公知の方法によってヒトの臓器、細胞株などから単離することができる。また、ペプチドとして使用する場合には、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によって調製することもできる。あるいはこの発明によって提供されるcDNA断片を用いて組換えDNA技術によりインビトロで生産することにより取得することもできる。例えば、組換えDNA技術によって蛋白質を取得する場合には、この発明のcDNA断片を適当な発現ベクターに組換え、この組換えベクターによる形質転換体細胞(大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等)からこの発明の蛋白質を大量に発現させるこ

10

20

30

40

50

とができる。具体的には、例えば、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のcDNAを挿入結合して発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、cDNAがコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、cDNAがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。一方、この発明の蛋白質を動物細胞で分泌発現させる場合には、cDNA断片を、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、この発明の蛋白質を動物細胞内で発現させることができる。

10

#### 【0012】

この発明のゲノムDNA配列は、上記蛋白質をコードするヒトおよび他の哺乳動物の遺伝子であって、例えば、この発明のcDNAまたはその一部配列をプローブとして既存のゲノムライブラリーから単離することができる。

この発明のcDNAは、配列番号1のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードしているDNA断片であって、たとえば、その塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のcDNAのクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて、目的cDNAを合成することもできる。一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および/または他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAもこの発明に含まれるものである。同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸の付加、欠失および/または他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、この発明の範疇に含まれるものである。

20

#### 【0013】

また、この発明のcDNAの部分配列は、10bp以上の連続配列であり、この連続配列からなるDNA断片(センス鎖およびアンチセンス鎖)もこの発明の範囲に含まれる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

30

さらに、この発明の抗体は、上記の蛋白質それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

#### 【0014】

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は、以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0015】

##### 【実施例】

実施例1：アクチン結合蛋白質I-アフアディンの同定と精製

胎児ラット脳より成長円錐を単離し、<sup>125</sup>Iで標識したF-アクチンによるプロット・オーバーレイ(blot overlay)法(Cell Motil. Cytoskeleton. 18:164-179, 1991)を行い、分子量205KDa(p205)のバンドを確認した。競合的結合阻害を試験した結果、この蛋白質はF-アクチンに特異的に結合したが、<sup>125</sup>Iで標識したG-アクチンには結合しないことから、F-アクチン結合蛋白質であることが確認された。

40

#### 【0016】

次に、胎児ラット脳の可溶画分をSDS-PAGEで処理し、分子量約205KDaの蛋白質バンドを、複数のカラムクロマトグラフィー(Q-Sepharose, phenyl-5PW, hydroxyapatite, Mono Q)で精製した。最終的なMono Qカラムクロマトグラフィーの結果を図1に示す。図1(a)は280nmでの吸光度、(b)は<sup>125</sup>I標識F-アクチンによるプロット・オーバーレイ、(c)はCoomassie brilliant blueで染色した蛋白質バンドであ

50

る。この図1(c)に示したように、精製蛋白質は、最終的に、約205kDa(p205)と約190kDa(p190)が得られた。そこで、これら2種類の精製蛋白質をポリアクリルアミドゲルから切り出し、分解酵素(lysyl endopeptidase)によって限定分解した後、ペプチドマッピングを行い、2つの蛋白質に共通する5つのペプチドを単離し、それらの部分アミノ酸配列を決定した。そして、配列データベースによる相同性検索の結果、5つのペプチドはヒトAF-6蛋白質と高い相同性を有することが確認された。一方、p205に特異的な2つのペプチドの配列は、既存のデータベースには存在しなかった。これらの結果から、p205およびp190はヒトAF-6蛋白質に関連するラット蛋白質であり、p190はp205のスプライシングバリエーション、相同体または分解産物であることが示唆された。また、p205は、A J部位に局在することから、「a large splicing variant of AF-6protein localized at adherens junction: l-afadin」と命名した(以下、この発明の蛋白質を、l-アフアディンまたはp205と記載する)。

実施例2: アクチン結合蛋白質l-アフアディン遺伝子クローニング

実施例1で得た205kDa蛋白質l-アフアディンの部分アミノ酸配列に基づいて7種類のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、ラットの脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、図2に示したような幾つかのオーバークローンが得られた。配列決定の結果、これらのクローンのうち、クローン20は、約4.9kbpからなるコード領域を含んでおり、このコード領域から推定されたアミノ酸配列は、p205の全てのペプチドを含んでいた。また、p205に特異的な2つのペプチドはC-端側に位置していた。なお、クローン94はp190をコードする約4.5kbpからなるコード領域を含んでいた。ただし、これらのクローン20および94は開始コドンを含んでおらず、その開始コドンはクローン84に含まれていた。そこで、p205の全長cDNAをクローン84および20から構築し、p190の全長cDNAをクローン84と94から構築した。

【0017】

また、クローン20、84および94をプローブとしたFISH分析(Cytogenet. Cell Genet. 61:282-285, 1992; Electrophoresis. 16:261-272, 1995)の結果、これらのcDNAはラット染色体1q12.2に位置することも確認された。

実施例3: アクチン結合蛋白質l-アフアディンの動物細胞での発現

実施例2で構築したp205のcDNAを発現ベクターに組み込み、このベクターをCOS7細胞に導入して、細胞の発現産物について<sup>125</sup>I標識F-アクチンを用いたプロット・オーバーレイ法による分析を行った。得られた組換え蛋白質(myc-l-afadin)は、図3(a)に示したように、SDS-PAGE上でネイティブなp205と類似の泳動を示し、また<sup>125</sup>I標識F-アクチンに対する結合活性を有してもいた。一方、C-端側の156アミノ酸残基を欠くp205の変異体は、<sup>125</sup>I標識F-アクチンに対する結合活性を示さなかった。これに対して、p205のC-端(199アミノ酸残基)とGTS(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)との融合蛋白質は<sup>125</sup>I標識F-アクチン結合活性を示した。

【0018】

以上の結果から、p205遺伝子は、配列番号1に記載した1,829アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、その推定分子量は207,667で、C-端199アミノ酸残基にF-アクチン結合ドメインを有することが明らかになった。また、p190遺伝子は、C-端約160アミノ酸残基を欠失した蛋白質をコードし、p205遺伝子のスプライシングバリエーションとであると結論づけられた。

【0019】

コンピュータによるホモロジー検索の結果、p190のアミノ酸配列は、ヒトAF-6蛋白質の全配列と90%一致した。ただし、ヒトAF-6蛋白質もp190も、p205のC-端領域を欠失していた。また、p205のC-端(F-アクチン結合ドメイン)は、他の如何なるF-アクチン結合蛋白質との有意な相同性を示さなかった。従って、p190がラットにおけるヒトAF-6の類似体であるのに対し、p205は新規なF-アクチン結合蛋白質であることが確認された。なお、図3(b)に示したように、p205およ

び p 1 9 0 は、いずれも P D Z を有していた。

#### 実施例 4 : 抗 I-アファディン抗体の作成

公知の方法に従い、配列番号 1 の 1814 - 1829 番目までのアミノ酸配列からなる合成ペプチドを免疫原として、I-アファディンを特異的に認識するウサギ・ポリクローナル抗体を作成した。また、配列番号 1 の 557 - 592 番目までのアミノ酸配列からなる合成ペプチドを免疫原として、I-アファディンおよび S-アファディンを認識するウサギ・ポリクローナル抗体を作成した。

#### 実施例 5 : I-アファディンの発現組織の確認

I-アファディン c D N A に特異的な配列をプローブとして用いたノーザンブロット分析の結果、図 4 ( a ) に示したとおり、I-アファディンは検査したラット組織 ( 心臓、脳、脾臓、肺臓、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣 ) の全てで発現していた。

10

#### 【 0 0 2 0 】

また、実施例 4 で作成した抗 I-アファディン抗体を用いたウエスタンブロット分析の結果からも、図 4 ( b 1 ) に示したように、I-アファディンはラットの全ての組織で発現することが確認された。

しかしながら、図 4 ( b 2 ) に示したように、I-アファディンと S-アファディンの両方を認識する抗体を使用したウエスタンブロットの結果からは、これらの臓器のうち、S-アファディンは脳のみを発現していることが確認された。

#### 【 0 0 2 1 】

以上の結果から、この発明の I-アファディンは全ての組織で発現するのに対し、s-アファ

20

#### 実施例 6 : I-アファディンの生化学的特性

実施例 1 で得た 2 0 5 K D a 蛋白質 ( I-アファディン ) のアクチン結合様式をプロット・オーバーレイ法を用いて検討した結果、I-アファディンとアクチンとの結合はミオシン S 1 によって特異的に阻害されたが ( 図 5 a )、この阻害は M g A T P の添加によって消失した。ミオシン S 1 は F - アクチンの側面に結合することが確認されている蛋白質であり ( Science 261:58-65, 1993; Nature 364:171-174, 1993 )、M g A T P はアクチン - ミオシン複合体を分離することが知られているため ( Biochemistry 14:2207-2214, 1975 )、I-アファディンは F - アクチンの側面に結合することが確認された。

#### 【 0 0 2 2 】

次に、falling ball法 ( Methods Enzymol. 85:211-233, 1982; J. Biol. Chem. 271:3177-31778, 1996 ) を用いて、I-アファディンによる F - アクチンの粘度変化を調べた結果、図 5 ( b ) に示したように、I-アファディンは F - アクチンの粘度を用量依存的に増加させ、粘度は最大約 3 倍にまで増加した。

30

さらに、ストイキオメトリー ( stoichiometry ) を計算した結果 ( 図 5 c )、アクチン約 5 0 0 分子に対して His6 - I-アファディン - C 1 分子の割合で結合すると計算され、その K d 値は  $1 0^{-7}$  オーダーと計算された。

#### 【 0 0 2 3 】

また、アクチンに対する I-アファディン効果を pyrene - アクチンを用いて検討したところ、I-アファディンはアクチンの核形成促進作用を示さないことも判明した。

40

#### 実施例 7 : I-アファディンの局在位置の確認

抗 I-アファディン抗体を用い、様々なマウスまたはラット組織の凍結切片を免疫蛍光顕微鏡で検査して I-アファディンの局在位置を確認した。

#### 【 0 0 2 4 】

肝臓では、I-アファディンは毛細胆管に沿った帯状結合複合体領域 ( belt-like junctional complex region ) に局在していた ( 図 6 a )。小腸では、抗 E - カドヘリン - モノクローナル抗体を併用して調べたところ、I-アファディンは腸吸収上皮の結合複合領域に E - カドヘリンと共に検出されたが、E - カドヘリンに比べ同部位により濃縮されていた ( 図 6 b 1 - 3、c 1 - 3 )。心臓については、抗ピンキュリン - モノクローナル抗体を併用して調べた。ピンキュリンは、細胞 - 細胞 A J だけでなく、細胞 - マトリックス A J に

50

対するマーカーとして知られている (Cell 18:193-205, 1979; Biochem. Biophys. Acta 737:305-341, 1983)。その結果、I-アフアディンは、心臓の境界膜にピンキュリンと共に検出された (図 6 d 1 - 3)。ただし、ピンキュリンは心筋細胞の外側縁に沿っても検出されたが、I-アフアディンはこの領域には検出されなかった。また、E-カドヘリンを発現する培養 E L 細胞 (Nature 329:341-343, 1987) を、抗 ZO - 1 抗体を併用して調べたところ、I-アフアディンの局在は ZO - 1 の局在と類似していた (図 7 a , b)。ZO - 1 は、線維芽細胞におけるカドヘリン性細胞 - 細胞 A J に存在することが知られているので (J. Cell Biol. 115:1149-1462, 1991; J. Cell Biol. 121:491-502, 1993)、I-アフアディンもまた、このカドヘリン性細胞 - 細胞 A J に局在することが示唆された。

#### 【 0 0 2 5 】

さらに、I-アフアディンの正確な局在を調べるために、小腸の凍結切片を抗 Zo - 1 モノクローナル抗体と抗 I-アフアディン抗体で共染色し、また肝臓の毛細胆管を抗デスモブラキン (desmoplakin) モノクローナル抗体と抗 I-アフアディン抗体で共染色した。ZO - 1 は密着結合に対するマーカーとして知られており (J. Cell Biol. 103:755-766, 1986; J. Cell Biol. 121:491-502, 1993)、デスモブラキンはデスモソームのマーカーとして知られている (J. Cell Biol. 63:515-523, 1974; Eur. J. Cell Biol. 32:117-130, 1983; J. Mol. Biol. 163:647-671, 1983; EMBO J. 6:885-889, 1987)。その結果、小腸の吸収上皮では、I-アフアディンは ZO - 1 より僅かに基底側に存在していた (図 8 a 1 - 3)。また、胆管では、I-アフアディンの局在とデスモブラキンの局在は一致していなかった (図 8 b 1 - 3)。

#### 【 0 0 2 6 】

これらの結果から、I-アフアディンは、密着結合やデスモソームよりもむしろ、細胞 - 細胞 A J に局在していることが示された。そしてさらに、免疫電子顕微鏡により I-アフアディンは、小腸の吸収上皮細胞の細胞 - 細胞 A J に局在することが観察された (図 9 a、b)。

以上により、この発明の I-アフアディンは、アクチン性細胞骨格と細胞 - 細胞 A J とを連結する新規なタンパク質であることが確認された。

#### 【 0 0 2 7 】

##### 【 発明の効果 】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、カドヘリン性細胞 - 細胞密着結合に局在する新規なアクチン結合蛋白質 I-アフアディンと、この I-アフアディンを産業上利用するための遺伝子材料が提供される。

#### 【 0 0 2 8 】

##### 【 配列表 】

配列番号： 1

配列の長さ： 1829

配列の型： アミノ酸

配列の種類： 蛋白質

起源

生物名： ラット

組織： 胎児脳

配列

#### 【 0 0 2 9 】

##### 【 配列表 】

10

20

30

40

Met	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Asp	Glu	Glu	Arg	Arg	Lys	Leu	Ala	Asp	Ile				
1				5					10					15					
Ile	His	His	Trp	Asn	Ala	Asn	Arg	Leu	Asp	Leu	Phe	Glu	Ile	Ser	Gln				
			20					25					30						
Pro	Thr	Glu	Asp	Leu	Glu	Phe	His	Gly	Val	Met	Arg	Phe	Tyr	Phe	Gln				
		35					40					45							
Asp	Lys	Ala	Ala	Gly	Asn	Phe	Ala	Thr	Lys	Cys	Ile	Arg	Val	Ser	Ser				10
	50					55					60								
Thr	Ala	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Arg				
65					70					75					80				
Pro	Asp	Met	Arg	Met	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Glu	Val				
					85				90					95					
His	Val	Ser	Gly	Glu	Arg	Arg	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Lys	Pro	Leu	Val				
			100					105					110						20
Val	Gln	Leu	Asn	Trp	Asn	Lys	Asp	Asp	Arg	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Leu				
			115					120				125							
Lys	Asn	Glu	Asn	Asp	Ala	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Gln	Ser	Asn	Gly				
		130				135					140								
Pro	Glu	Lys	Gln	Glu	Lys	Glu	Gly	Val	Ile	Gln	Asn	Phe	Lys	Arg	Thr				
145					150					155					160				
Leu	Ser	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Arg	Glu	Lys	Glu	Ala				30
				165						170					175				
Leu	Arg	Gln	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Glu	Arg	Pro	Ser	Gln	Gly	Asp	Asp				
			180						185					190					
Ser	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Tyr	Lys	Asp	Met	Pro	Glu				
		195					200						205						
Thr	Ser	Phe	Thr	Arg	Thr	Ile	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Val	Met	Lys	Arg				
		210					215						220						40
Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Arg	Met	Gln	Glu	Phe	Arg	Ser	Ser				



225 230 235 240  
Asp Gly Arg Pro Asp Ser Gly Gly Thr Leu Arg Ile Tyr Ala Asp Ser  
245 250 255  
Leu Lys Pro Asn Ile Pro Tyr Lys Thr Ile Leu Leu Ser Thr Thr Asp  
260 265 270  
Pro Ala Asp Phe Ala Val Ala Glu Ser Leu Glu Lys Tyr Gly Leu Glu  
275 280 285  
Lys Glu Asn Pro Lys Asp Tyr Cys Ile Ala Arg Val Met Leu Pro Pro  
290 295 300  
Gly Ala Gln His Ser Asp Glu Arg Gly Ala Lys Glu Ile Ile Leu Asp  
305 310 315 320  
Asp Asp Glu Cys Pro Leu Gln Ile Phe Arg Glu Trp Pro Ser Asp Lys  
325 330 335  
Gly Ile Leu Val Phe Gln Leu Lys Arg Arg Pro Pro Asp Tyr Ile Pro  
340 345 350  
Lys Lys Met Lys Lys His Val Glu Gly Lys Pro Leu Lys Gly Lys Asp  
355 360 365  
Arg Ala Asp Gly Ser Gly Tyr Gly Ser Ala Leu Pro Pro Glu Lys Leu  
370 375 380  
Pro Tyr Leu Val Glu Leu Ser Pro Gly Arg Arg Asn His Phe Ala Tyr  
385 390 395 400  
Tyr Ser Tyr His Thr Tyr Glu Asp Gly Ser Asp Ser Arg Asp Lys Pro  
405 410 415  
Lys Leu Tyr Arg Leu Gln Leu Ser Val Thr Glu Val Gly Thr Glu Lys  
420 425 430  
Phe Asp Asp Asn Ser Ile Gln Leu Phe Gly Pro Gly Ile Gln Pro His  
435 440 445  
His Cys Asp Leu Thr Asn Met Asp Gly Val Val Thr Val Thr Pro Arg  
450 455 460

10

20

30

40

Ser Met Asp Ala Glu Thr Tyr Val Asp Gly Gln Arg Ile Ser Glu Thr	
465	470
Thr Met Leu Gln Ser Gly Met Arg Leu Gln Phe Gly Thr Ser His Val	
	485
Phe Lys Phe Val Asp Pro Ile Gln Asp His Val Leu Ser Lys Arg Ser	
	500
Val Asp Gly Gly Leu Met Val Lys Gly Pro Arg His Lys Pro Gly Ala	10
	515
Val Gln Glu Thr Thr Phe Glu Leu Gly Gly Asp Ile His Ser Gly Thr	
	530
Ala Leu Pro Ala Ser Arg Ser Thr Thr Arg Leu Asp Ser Asp Arg Val	
545	550
Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ala Glu Arg Gly Met Val Lys Pro Met Ile	
	565
Arg Leu Asp Gln Glu Gln Asp Tyr Arg Arg Arg Glu Ser Arg Thr Gln	20
	580
Asp Ala Ala Gly Pro Glu Leu Met Leu Pro Ala Ser Ile Glu Phe Arg	
	595
Glu Ser Ser Glu Asp Ser Phe Leu Ser Ala Ile Ile Asn Tyr Thr Asn	
	610
Ser Ser Thr Val His Phe Lys Leu Ser Pro Thr Tyr Val Leu Tyr Met	30
625	630
Ala Cys Arg Tyr Val Leu Ser Ser Gln His Arg Pro Asp Ile Ser Pro	
	645
Thr Glu Arg Thr His Lys Ala Ile Ala Val Val Asn Lys Met Val Ser	
	660
Met Met Glu Gly Val Ile Gln Glu Val Asp Gln Val Asp Gln Lys Gln	
	675
Lys Asn Ile Ala Gly Ala Leu Ala Phe Trp Met Ala Asn Ala Ser Glu	40
	680
	685

690		695		700											
Leu	Leu	Asn	Phe	Ile	Lys	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu
705		710		715		720									
Asp	Ala	Gln	Asp	Val	Leu	Ala	His	Leu	Val	Gln	Met	Ala	Phe	Lys	Tyr
		725		730		735									
Leu	Val	His	Cys	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Asn	Asn	Tyr	Met	Pro	Ala	Phe
		740		745		750									
Leu	Asp	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Arg	Pro	Lys	Ile	Asp	Asp
		755		760		765									
Val	Leu	His	Thr	Leu	Thr	Gly	Ala	Met	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Cys	Arg
		770		775		780									
Val	Asn	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Phe	Ser	Gln	Leu	Phe	His	Phe
785		790		795		800									
Ile	Asn	Met	Trp	Leu	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Thr	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly
		805		810		815									
Leu	Cys	Ser	His	Tyr	Trp	Gly	Ala	Ile	Ile	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	His
		820		825		830									
Ile	Glu	Ala	Trp	Ala	Glu	Lys	Gln	Gly	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Asp	Cys
		835		840		845									
His	Leu	Ser	Arg	Ile	Val	Gln	Ala	Thr	Thr	Leu	Leu	Thr	Met	Asp	Lys
		850		855		860									
Tyr	Val	Pro	Asp	Asp	Ile	Pro	Asn	Ile	Asn	Ser	Thr	Cys	Phe	Lys	Leu
865		870		875		880									
Asn	Ser	Leu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Gln	Asn	Tyr	His	Cys	Ala	Pro
		885		890		895									
Asp	Glu	Pro	Phe	Ile	Pro	Thr	Asp	Leu	Ile	Glu	Asn	Val	Val	Ala	Val
		900		905		910									
Ala	Glu	Asn	Thr	Ala	Asp	Glu	Leu	Ala	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg	Asp	Val
		915		920		925									

10

20

30

40

Gln Leu Glu Glu Asp Pro Asp Leu Gln Leu Pro Phe Leu Leu Pro Glu			
930	935		
Asp Gly Tyr Ser Cys Asp Val Val Arg Asn Ile Pro Asn Gly Leu Gln			
945	950	955	960
Glu Phe Leu Asp Pro Leu Cys Gln Arg Gly Phe Cys Arg Leu Val Pro			
	965	970	975
His Thr Arg Ser Pro Gly Thr Trp Thr Ile Tyr Phe Glu Gly Ala Asp			
	980	985	990
Tyr Glu Ser His Leu Met Arg Glu Asn Thr Glu Leu Thr Gln Pro Leu			
	995	1000	1005
Arg Lys Glu Pro Glu Val Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Gln Asn Gly			
1010	1015	1020	
Met Gly Leu Ser Ile Val Ala Ala Lys Gly Ala Gly Gln Asp Lys Leu			
1025	1030	1035	1040
Gly Ile Tyr Val Lys Ser Val Val Lys Gly Gly Ala Ala Asp Val Asp			
	1045	1050	1055
Gly Arg Leu Ala Ala Gly Asp Gln Leu Leu Ser Val Asp Gly Arg Ser			
	1060	1065	1070
Leu Val Gly Leu Ser Gln Glu Arg Ala Ala Glu Leu Met Thr Arg Thr			
	1075	1080	1085
Ser Ser Val Val Thr Leu Glu Val Ala Lys Gln Gly Ala Ile Tyr His			
	1090	1095	1100
Gly Leu Ala Thr Leu Leu Asn Gln Pro Ser Pro Met Met Gln Arg Ile			
1105	1110	1115	1120
Ser Asp Arg Arg Gly Ser Gly Lys Pro Arg Pro Lys Ser Glu Gly Phe			
	1125	1130	1135
Glu Leu Tyr Asn Asn Ser Ala Gln Asn Gly Ser Pro Glu Ser Pro Gln			
	1140	1145	1150
Met Pro Trp Thr Glu Tyr Ser Glu Pro Lys Lys Leu Pro Gly Asp Asp			

10

20

30

40

1155	1160	1165	
Arg Leu Met Lys Asn Arg Ala Asp His Arg Ser Ser Pro Asn Val Ala			
1170	1175	1180	
Asn Gln Pro Pro Ser Pro Gly Gly Lys Ser Pro Tyr Thr Ser Gly Thr			
1185	1190	1195	1200
Ala Ala Lys Ile Thr Ser Val Ser Thr Gly Asn Leu Cys Thr Glu Glu			
	1205	1210	1215
Gln Thr Pro Pro Pro Arg Pro Glu Ala Tyr Pro Ile Pro Thr Gln Thr			
	1220	1225	1230
Tyr Thr Arg Glu Tyr Phe Thr Phe Pro Ala Ser Lys Ser Gln Asp Arg			
	1235	1240	1245
Met Ala Pro Val Gln Asn Gln Trp Pro Asn Tyr Glu Glu Lys Pro His			
	1250	1255	1260
Met His Thr Glu Ser Asp His Ala Ser Ile Ala Ile Gln Arg Val Thr			
1265	1270	1275	1280
Arg Ser Gln Glu Glu Leu Arg Glu Glu Lys Val Tyr Gln Leu Glu Arg			
	1285	1290	1295
His Arg Val Glu Ser Gly Met Asp Arg Lys Cys Asp Ser Asp Met Trp			
	1300	1305	1310
Ile Asn Gln Ser Ser Ser Val Glu Ser Ser Thr Ser Ser Gln Glu His			
	1315	1320	1325
Leu Asn His Ser Ser Lys Ser Val Thr Pro Ala Ser Thr Leu Thr Lys			
	1330	1335	1340
Ser Gly Pro Gly Arg Trp Lys Thr Pro Ala Ala Val Leu Pro Thr Pro			
1345	1350	1355	1360
Val Ala Val Ser Gln Pro Ile Arg Thr Asp Leu Pro Pro Pro Pro Pro			
	1365	1370	1375
Pro Pro Pro Ala His Tyr Thr Ser Asp Phe Asp Gly Ile Ser Met Asp			
	1380	1385	1390

10

20

30

40

Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ala Asn Gln Ala Ala Pro Gln Ser Ala			
1395	1400	1405	
Gln Val Ala Ala Ala Glu Arg Lys Lys Arg Glu Glu His Gln Arg Trp			
1410	1415	1420	
Tyr Glu Lys Glu Lys Ala Arg Leu Glu Glu Glu Arg Glu Arg Lys Arg			
1425	1430	1435	1440
Arg Glu Gln Glu Arg Lys Leu Gly Gln Met Arg Thr Gln Ser Leu Asn			10
1445	1450	1455	
Pro Ala Ser Phe Ser Pro Leu Ala Thr Gln Ala Lys Pro Glu Lys Pro			
1460	1465	1470	
Ser Thr Leu Gln Arg Pro Gln Glu Thr Val Ile Arg Glu Leu Gln Pro			
1475	1480	1485	
Gln Gln Gln Pro Arg Thr Ile Glu Arg Arg Asp Leu Gln Tyr Ile Thr			
1490	1495	1500	20
Ile Ser Lys Glu Glu Leu Ser Ser Gly Asp Ser Leu Ser Pro Asp Pro			
1505	1510	1515	1520
Trp Lys Arg Asp Ala Arg Glu Lys Leu Glu Lys Gln Gln Gln Met His			
1525	1530	1535	
Ile Val Asp Met Leu Ser Lys Glu Ile His Glu Leu Gln Asn Lys Gly			
1540	1545	1550	
Asp Arg Thr Ala Glu Glu Ser Asp Arg Leu Arg Lys Leu Met Leu Glu			30
1555	1560	1565	
Trp Gln Phe Gln Lys Arg Leu Gln Glu Ser Lys Gln Lys Asp Glu Asp			
1570	1575	1580	
Asp Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Val Asp Thr Met Leu Ile Met Gln			
1585	1590	1595	1600
Arg Leu Glu Ala Glu Arg Arg Ala Arg Leu Gln Asp Glu Glu Arg Arg			
1605	1610	1615	40
Arg Gln Gln Gln Leu Glu Glu Met Arg Lys Arg Glu Val Glu Asp Arg			

	1620	1625	1630	
	Val Arg Gln Glu Glu Asp Gly Arg His Gln Glu Glu Glu Arg Val Lys			
	1635	1640	1645	
	Arg Asp Ala Glu Glu Lys Arg Arg Gln Glu Glu Gly Tyr Tyr Ser Arg			
	1650	1655	1660	
	Leu Glu Ala Glu Arg Arg Arg Gln His Glu Glu Ala Ala Arg Arg Leu			
1665	1670	1675	1680	10
	Leu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Leu Ser Arg Pro Pro Leu Pro Gln Asp			
	1685	1690	1695	
	Tyr Glu Pro Pro Ser Gln Ser Ser Ala Pro Ser Ala Pro Pro Pro Pro			
	1700	1705	1710	
	Pro Gln Arg Asn Ala Ser Tyr Leu Lys Thr Gln Val Leu Ser Pro Asp			
	1715	1720	1725	
	Ser Leu Phe Thr Ala Lys Phe Val Ala Tyr Asp Asp Asp Asp Glu Glu			20
	1730	1735	1740	
	Glu Asn Tyr Val Pro Ala Gly Pro Asn Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Gly			
1745	1750	1755	1760	
	Thr Thr Ala Gly Thr Tyr Asp Ala Pro Arg Asp Thr Arg Glu Lys Leu			
	1765	1770	1775	
	Ser Arg Ser Gln Asp Ala Asp Leu Pro Gly Ser Ser Gly Ala Pro Glu			
	1780	1785	1790	30
	Asn Leu Thr Phe Arg Glu Arg Gln Arg Leu Phe Ser Gln Gly Gln Asp			
	1795	1800	1805	
	Val Ser Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Lys Leu Thr Glu Leu Glu Asn			
	1810	1815	1820	
	Glu Leu Asn Thr Lys			
1825				40

【図面の簡単な説明】

【図1】モノQカラムクロマトグラフィーの吸光度 (a)、<sup>125</sup>I 標識 F - アクチンによるプロット・オーバーレイの結果 (b) および SDS 電気泳動の染色結果 (c) である。

【図2】 I-アフアディン (p 205) および S-アフアディン (p 190) の cDNA の模式図である。

【図3】 (a) は、様々な組換え I-アフアディン断片の F - アクチン結合活性を示す。左は <sup>125</sup>I 標識 F - アクチンによるプロット・オーバーレイ、右はウエスタンプロットの結果である。(b) は、I-アフアディンおよび S-アフアディンの構造を示した模式図である。

【図4】 I-アフアディンの臓器分布を調べた結果であり、(a)はノーザンブロット、(b)は抗I-アフアディン抗体(b1)および抗I-アフアディン/S-アフアディン抗体(b2)を用いたウエスタンブロットの結果である。

【図5】 I-アフアディンの生化学特性であり、(a)はI-アフアディンのFアクチン結合活性のミオシンS1による阻害、(b)はI-アフアディンによるF-アクチン粘度の増加、(c)はHis6-I-アフアディン-CのF-アクチンへの結合を示す。

【図6】 ラットまたはマウスの様々な組織におけるI-アフアディン、E-カドヘリンおよびピンキュリンの局在を示す写真図である。

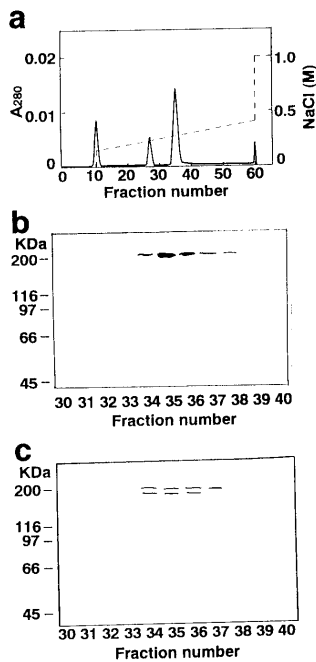
【図7】 EL細胞におけるI-アフアディンおよびZO-1の局在を示す写真図である。

【図8】 I-アフアディン、ZO-1およびデスモブラキンの異なる局在を示す写真図である。

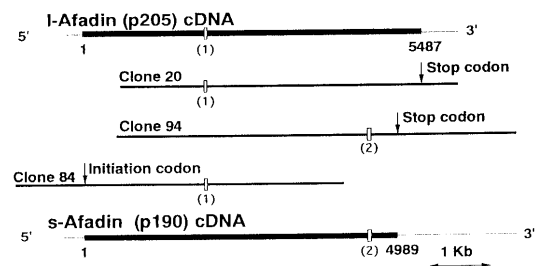
10

【図9】 ラット小腸におけるI-アフアディンの局在を示す写真図である。

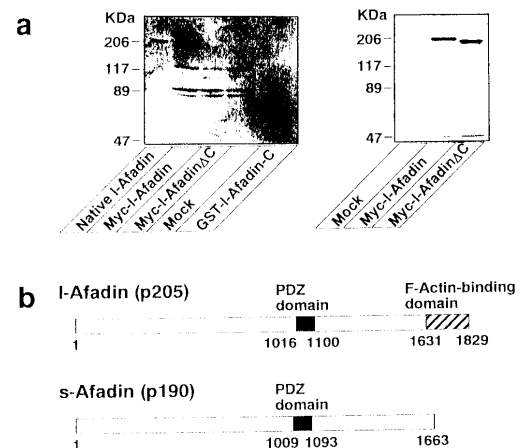
【図1】



【図2】



【図3】

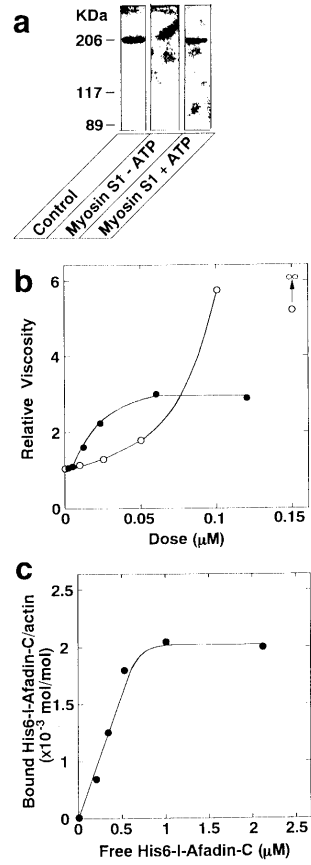




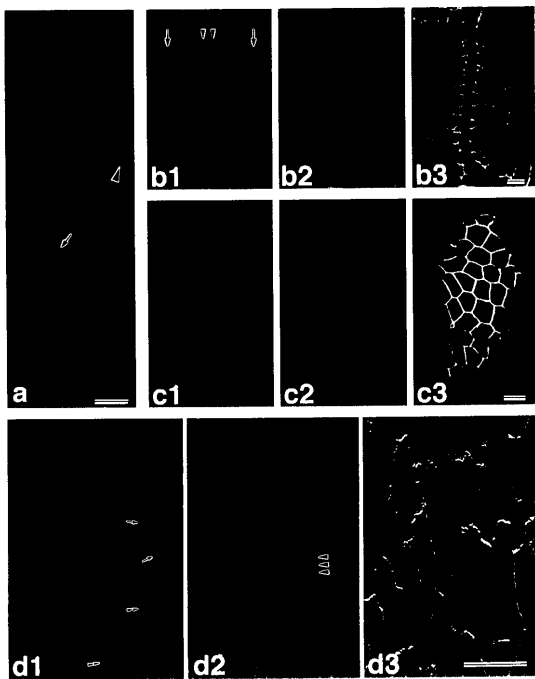
【 4 】



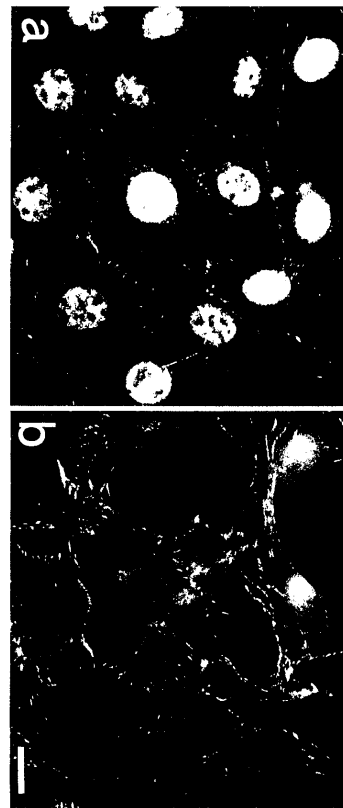
【 5 】



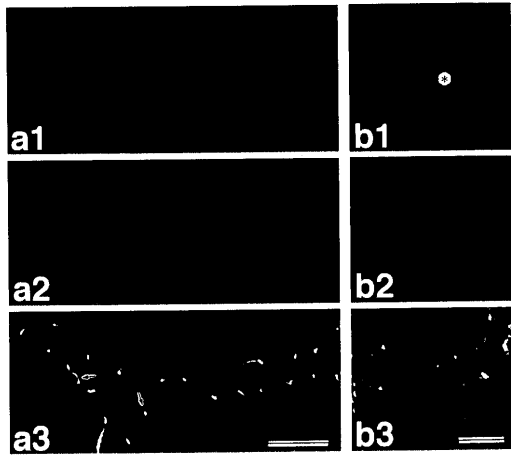
【 6 】



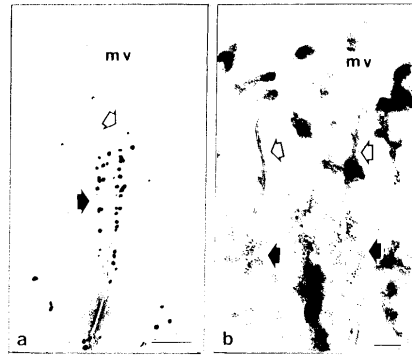
【 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 中西 宏之  
兵庫県神戸市西区学園西町二丁目5番地の110
- (72)発明者 萬代 研二  
大阪府箕面市小野原東四丁目3番7-203号
- (72)発明者 和田 学  
兵庫県神戸市垂水区桃山台一丁目16番地
- (72)発明者 尾葉石 浩  
兵庫県神戸市須磨区白川台七丁目2番地の7  
シエスタ白川台407号

審査官 阪野 誠司

- (56)参考文献 特開平10-276784(JP,A)  
J Biol Chem., 1996年 1月, 271(2), 607-610  
J Cell Biol., 1997年10月, 139(2), 517-28  
中西宏之, 創造科学技術推進事業1997創造科学技術研究報告会(東京) 第4部講演要旨集  
, 1997年12月, 100-105

- (58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C12N 15/00-90  
C07K 14/00-825  
PubMed、JICSTファイル(JOIS)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq