

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-89572

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00 A
C 0 7 K 14/46	Z N A	C 0 7 K 14/46 Z N A
		14/47
		16/18
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-257043  
(22) 出願日 平成9年(1997) 9月22日

(71) 出願人 396020800  
科学技術振興事業団  
埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
(71) 出願人 597014729  
和田 学  
兵庫県神戸市垂水区桃山台1丁目16番地  
(71) 出願人 597134887  
尾葉石 浩  
兵庫県神戸市須磨区白川台七丁目2番地の  
7 シェスタ白川台407号  
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アクチン結合蛋白質1-アファディン

(57) 【要約】

【課題】 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と、この蛋白質を産業上利用するための遺伝子材料を提供する。

【解決手段】 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有するアクチン結合蛋白質I-アファディンと、この蛋白質をコードするcDNA配列ならびにこのcDNA配列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、およびI-アファディンを特異的に認識する抗体。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 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。

【請求項2】 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。

【請求項3】 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。

【請求項4】 請求項3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。

【請求項5】 請求項1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された抗体。

## 【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の基礎については、今だ十分に理解されてはいない。

【0003】このような細胞結合に係わる分子の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: A J)と、細胞-マトリックスA Jとに分類されている。

細胞-細胞A J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A Jに集中していることが知られているが、細胞-細胞A J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A J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)。

【0004】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。

【0005】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9-92615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-95/SAP90(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、細胞間接着に關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、細胞間接着に關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。

【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りに認められる。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。

【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)もこの発明の範疇に含まれる。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。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。

【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、AJ部位に局在することから、「a large splicing variant of AF-6protein localized at adherens junction: I-afadin」と命名した(以下、この発明の蛋白質を、I-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I-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I-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ブ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I-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-I-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p190は、いずれもPDZを有していた。

#### 実施例4：抗I-アフアディン抗体の作成

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-アフア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-アフアディンおよびS-アフア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-アフアディンの発現組織の確認

I-アフアディンcDNA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-アフア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。

【0020】また、実施例4で作成した抗I-アフア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(b1)に示したように、I-アフア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(b2)に示したように、I-アフアディンとS-アフア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-アフアディンは脳のみで発現していることが確認された。

【0021】以上の結果から、この発明のI-アフアディンは全ての組織で発現するのに対し、s-アフアディンは脳のみで発現していることが確認された。

#### 実施例6：I-アフアディンの生化学的特性

実施例1で得た205kDa蛋白質(I-アフアディン)のアクチン結合様式をブロット・オーバーレイ法を用いて検討した結果、I-アフアディンとアクチンとの結合はミオシンS1によって特異的に阻害されたが(図5a)、この阻害はMgATPの添加によって消失した。ミオシンS1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)、MgATP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-アフアディ

ンはF-アクチンの側面に結合することが確認された。

【0022】次に、falling ball法(Methods Enzymol. 85:211-233, 1982; J. Biol. Chem. 271:31775-31778, 1996)を用いて、I-アフアディンによる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-アフアディンは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。さらに、ストイキオメトリー(stoichiometry)を計算した結果(図5c)、アクチン約500分子に対してHis6-I-アフアディン-C1分子の割合で結合すると計算され、そのKd値は $10^{-7}$ オーダーと計算された。

【0023】また、アクチンに対するI-アフアディン効果をpyrene-アクチンを用いて検討したところ、I-アフア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。

#### 実施例7：I-アフアディンの局在位置の確認

抗I-アフアディン抗体を用い、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-アフアディンの局在位置を確認した。

【0024】肝臓では、I-アフア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6a)。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-アフア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6b1-3、c1-3)。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AJだけでなく、細胞-マトリックスAJに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6d1-3)。ただし、ピンキュリンは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EL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7a, b)。ZO-1は、線維芽細胞におけるカドヘリン性細胞-細胞AJ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AJに局在することが示唆された。

【0025】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プラキン(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)、デスモプラキンはデスモソームのマーカール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プラキンの局在は一致していなかった(図8 b 1-3)。

【0026】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。

【0027】

【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。

【0028】

【配列表】

配列番号：1

10 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

【0029】

【配列表】

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
			50					55						60	
Thr	Ala	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Arg
								70						75	
Pro	Asp	Met	Arg	Met	Leu	Ser	Ser	Pro	Lys	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Glu	Val
								85						90	
His	Val	Ser	Gly	Glu	Arg	Arg	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Lys	Pro	Leu	Val
								100						105	
Val	Gln	Leu	Asn	Trp	Asn	Lys	Asp	Asp	Arg	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Leu
								115						120	
Lys	Asn	Glu	Asn	Asp	Ala	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Gln	Ser	Asn	Gly
								130						135	
Pro	Glu	Lys	Gln	Glu	Lys	Glu	Gly	Val	Ile	Gln	Asn	Phe	Lys	Arg	Thr
								145						150	
Leu	Ser	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Arg	Glu	Lys	Glu	Ala
								165						170	
Leu	Arg	Gln	Ala	Ser	Asp	Lys	Glu	Glu	Arg	Pro	Ser	Gln	Gly	Asp	Asp
								180						185	
Ser	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ala	Ala	Glu	Val	Tyr	Lys	Asp	Met	Pro	Glu
								195						200	
Thr	Ser	Phe	Thr	Arg	Thr	Ile	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Val	Met	Lys	Arg
								210						215	
Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Arg	Met	Gln	Glu	Phe	Arg	Ser	Ser
								225						230	
Asp	Gly	Arg	Pro	Asp	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Arg	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser
								245						250	

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  
 Ser Met Asp Ala Glu Thr Tyr Val Asp Gly Gln Arg Ile Ser Glu Thr  
 465 470 475 480  
 Thr Met Leu Gln Ser Gly Met Arg Leu Gln Phe Gly Thr Ser His Val  
 485 490 495  
 Phe Lys Phe Val Asp Pro Ile Gln Asp His Val Leu Ser Lys Arg Ser  
 500 505 510  
 Val Asp Gly Gly Leu Met Val Lys Gly Pro Arg His Lys Pro Gly Ala  
 515 520 525  
 Val Gln Glu Thr Thr Phe Glu Leu Gly Gly Asp Ile His Ser Gly Thr  
 530 535 540  
 Ala Leu Pro Ala Ser Arg Ser Thr Thr Arg Leu Asp Ser Asp Arg Val  
 545 550 555 560  
 Ser Ser Ala Ser Ser Thr Ala Glu Arg Gly Met Val Lys Pro Met Ile  
 565 570 575  
 Arg Leu Asp Gln Glu Gln Asp Tyr Arg Arg Arg Glu Ser Arg Thr Gln  
 580 585 590  
 Asp Ala Ala Gly Pro Glu Leu Met Leu Pro Ala Ser Ile Glu Phe Arg  
 595 600 605  
 Glu Ser Ser Glu Asp Ser Phe Leu Ser Ala Ile Ile Asn Tyr Thr Asn  
 610 615 620  
 Ser Ser Thr Val His Phe Lys Leu Ser Pro Thr Tyr Val Leu Tyr Met  
 625 630 635 640  
 Ala Cys Arg Tyr Val Leu Ser Ser Gln His Arg Pro Asp Ile Ser Pro  
 645 650 655

Thr Glu Arg Thr His Lys Ala Ile Ala Val Val Asn Lys Met Val Ser  
 660 665 670  
 Met Met Glu Gly Val Ile Gln Glu Val Asp Gln Val Asp Gln Lys Gln  
 675 680 685  
 Lys Asn Ile Ala Gly Ala Leu Ala Phe Trp Met Ala Asn Ala Ser Glu  
 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  
 Gln Leu Glu Glu Asp Pro Asp Leu Gln Leu Pro Phe Leu Leu Pro Glu  
 930 935 940  
 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  
                   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  
 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  
                   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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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  
 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

【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 (p205) およびS-アフアディン (p190) 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、右はウエスタンブ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。

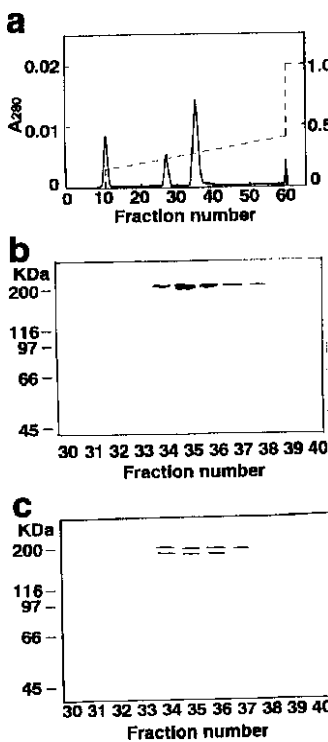
【図6】ラットまたはマウスの様々な組織におけるI-アフアディン、E-カドヘリンおよびピンキュリンの局在を示す写真図である。

【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。

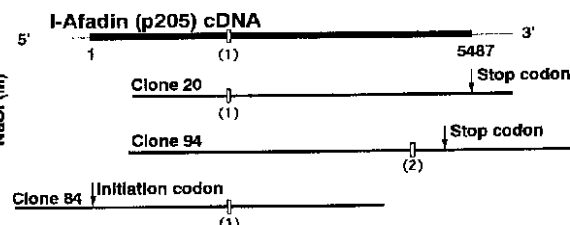
【図8】I-アフアディン、ZO-1およびデスモブラキンの異なる局在を示す写真図である。

【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。

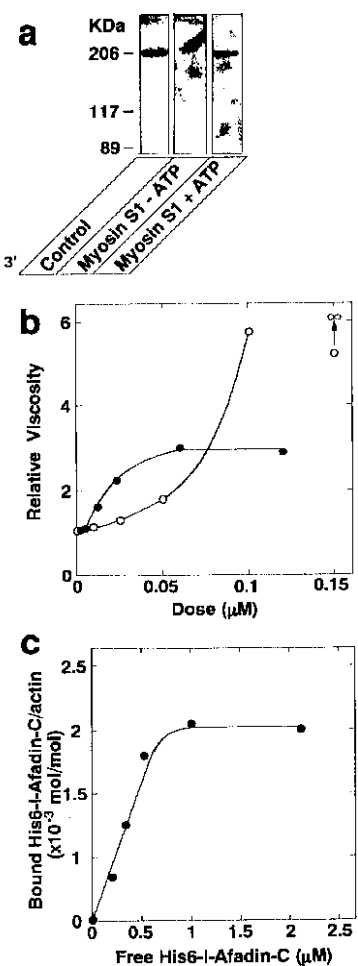
【図1】



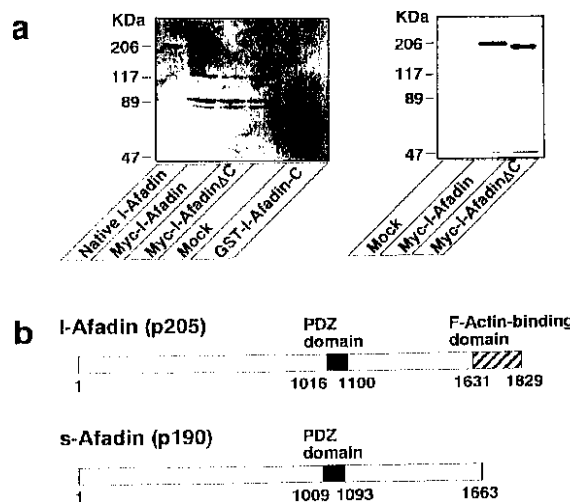
【図2】



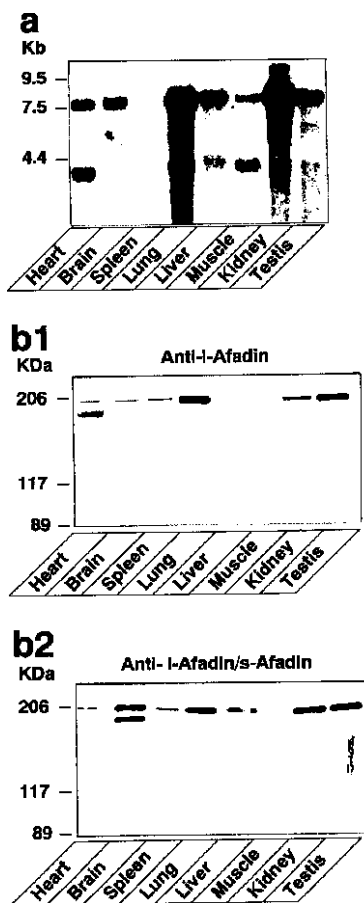
【図5】



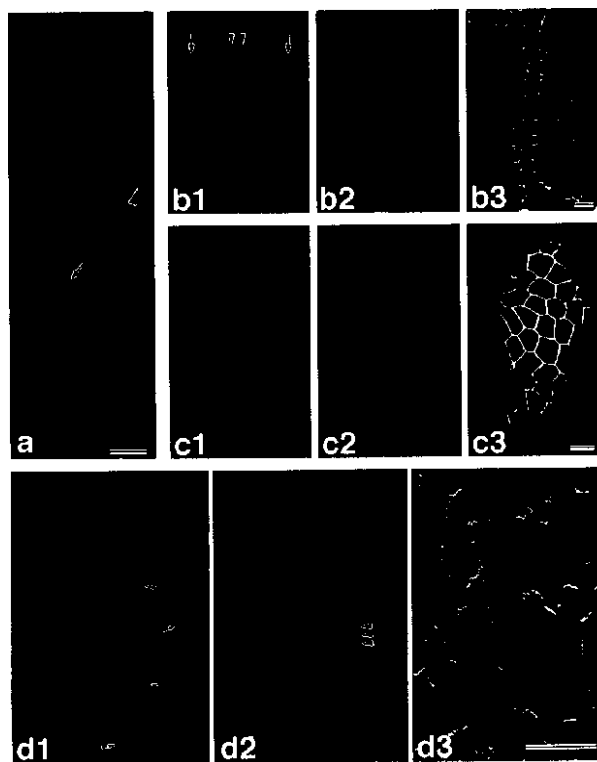
【図3】



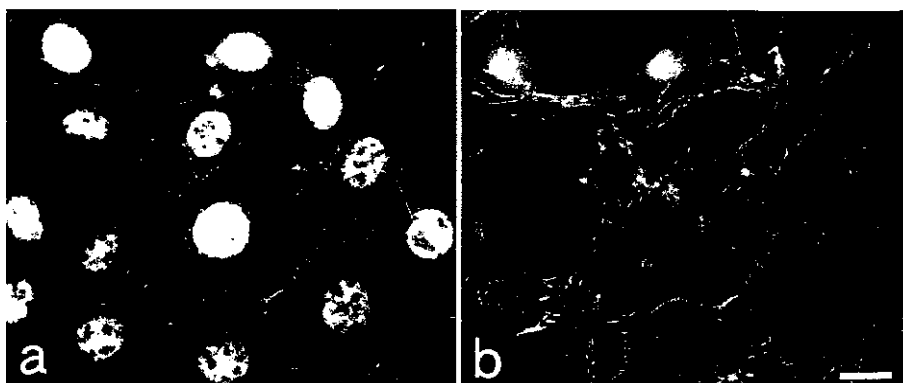
【図4】



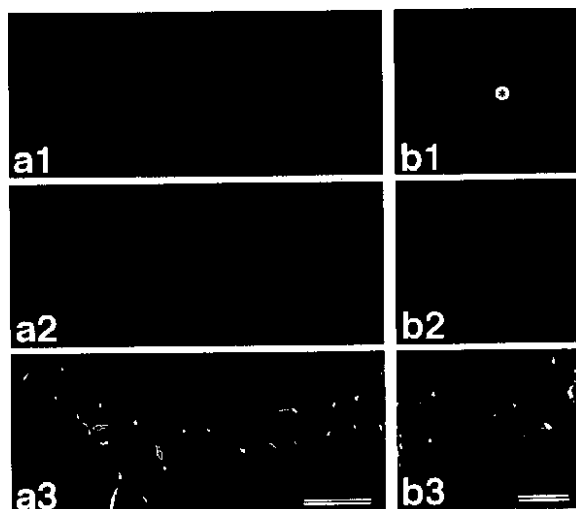
【図6】



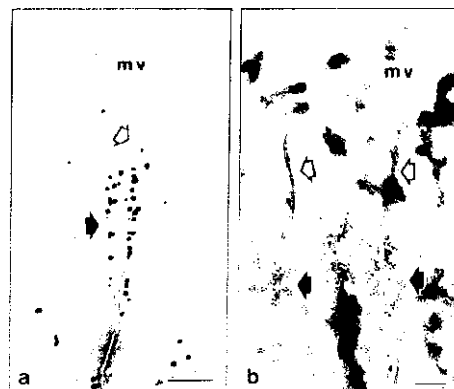
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

//(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(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

(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 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 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 シェスタ白川台407号