

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3623710号

(P3623710)

(45) 発行日 平成17年2月23日(2005.2.23)

(24) 登録日 平成16年12月3日(2004.12.3)

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

F I

C 1 2 N 15/09  
 C 0 7 K 14/78  
 C 0 7 K 16/18  
 // C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 0 7 K 14/78  
 C 0 7 K 16/18  
 C 1 2 N 5/00 B  
 C 1 2 P 21/08

請求項の数 9 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2000-65595 (P2000-65595)  
 (22) 出願日 平成12年3月9日(2000.3.9)  
 (65) 公開番号 特開2001-252077 (P2001-252077A)  
 (43) 公開日 平成13年9月18日(2001.9.18)  
 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  
 (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2丁目5番地の  
 73  
 (72) 発明者 中西 宏之  
 兵庫県神戸市西区学園西町2丁目5番地の  
 110

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質ネクチン-3

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。

【請求項2】

配列番号4のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。

【請求項3】

配列番号6のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3。

【請求項4】

請求項1から3のいずれかの蛋白質ネクチン-3をコードするポリヌクレオチド。

【請求項5】

配列番号1の塩基配列を有する請求項4のポリヌクレオチド。

【請求項6】

配列番号3の塩基配列を有する請求項4のポリヌクレオチド。

【請求項7】

配列番号5の塩基配列を有する請求項4のポリヌクレオチド。

【請求項8】

請求項4から7のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。

【請求項9】

請求項1から3のいずれかの蛋白質ネクチン-3に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

10

20

## 【 0 0 0 1 】

## 【 発明の属する技術分野 】

この出願の発明は、カドヘリン ( c a d h e r i n ) を介した細胞接着結合に關与する新規な蛋白質ネクチン - 3 と、これらの蛋白質を取得、利用するための遺伝子工学材料等に關するものである。

## 【 0 0 0 2 】

## 【 従来技術 】

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いる。なかでも細胞の接着結合 ( a d h e r e n s j u n c t i o n : A J ) は、組織の整合性を維持するのに欠くことのできない役割を担っている。このような機構的役割に加えて、A J は細胞増殖や組織の形態形成のコントロールに關わっているという証拠が増えてきている。また、多くの F - アクチン結合タンパク質がアクチン細胞骨格を接着分子に連結するリンカーの役目を果たしていることが明らかにされてきている。しかしながら A J の分子的な理解は不十分であり、どのような分子がアクチン細胞骨格を細胞膜に結合させているかは明らかではなかった。

## 【 0 0 0 3 】

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、「ニューラビン」 ( n e u r a b i n ) と命名して既に特許出願している ( 特開平 1 0 - 2 7 6 7 8 4 号公報 ) 。さらにこの出願の発明者等は、新規の F - アクチン結合タンパク質 1 - アファディン ( a f a d i n ) と、この 1 - アファディンと結合する蛋白質ポンシンをそれぞれ単離し、特許出願している ( 1 - アファディン : 特開平 1 1 - 8 9 5 7 2 号公報、ポンシン : 特願平 1 1 - 1 7 4 6 8 7 号 ) 。そしてさらに、この出願の発明者等は、カドヘリンを介した A J 形成に対してアファディンとともに機能する新規な蛋白質としてネクチン ( n e c t i n ) - 1 、 - 1 およびネクチン - 2 、 - 2 を特定している ( J . C e l l B i o l . 1 4 5 : 5 3 9 - 5 4 9 , 1 9 9 9 ) 。これらのネクチン - 1、2 は、Ca<sup>2+</sup> 非依存性の免疫グロブリン様接着分子であり、アファディンおよびポンシンとともに、A J 形成に 1 つの系として作用することを見出している ( G e n e s C e l l s 4 : 5 7 3 - 5 8 1 , 1 9 9 9 ; J . B i o l . C h e m . 2 7 5 : 6 1 3 - 6 1 8 , 2 0 0 0 ) 。

## 【 0 0 0 4 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

細胞接着の分子機構を解明することは、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があり、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。そして、そのなような解明のためには、細胞接着に關与する分子の全貌を明らかにする必要がある。

## 【 0 0 0 5 】

この出願の発明は、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 - 細胞間接着結合に關与する新規な蛋白質を提供することを課題としている。

## 【 0 0 0 6 】

また、この発明は、この蛋白質を遺伝子工学的に生産するための材料を提供することも課題としている。

## 【 0 0 0 7 】

## 【 課題を解決するための手段 】

この出願は、上記の課題を解決するものとしてい、以下の (1) から (9) の発明を提供する。

- (1) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン - 3。
- (2) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン - 3。
- (3) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン - 3。
- (4) 前記発明 (1) から (3) のいずれかの蛋白質ネクチン - 3 をコードするポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド。

- (5) 配列番号 1 の塩基配列を有する前記発明(4)のポリヌクレオチド。
- (6) 配列番号 3 の塩基配列を有する前記発明(4)のポリヌクレオチド。
- (7) 配列番号 5 の塩基配列を有する前記発明(4)のポリヌクレオチド。
- (8) 前記発明(4)から(7)のいずれかのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。
- (9) 前記発明(1)から(3)のいずれかの蛋白質ネクチン - 3 に対する抗体。

【 0 0 0 8 】

発明(1)～(3)の蛋白質ネクチン - 3 は、マウス由来の蛋白質であって、発明(4)のポリヌクレオチド(ゲノム遺伝子)から発現される3種類のスプライシングバリエーションである(以下、それぞれネクチン - 3<sub>1</sub>、ネクチン - 3<sub>2</sub>、ネクチン - 3<sub>3</sub>と記載する)。また、発明(4)のポリヌクレオチドから転写される mRNA からは、それぞれ発明(5)～(7)のポリヌクレオチド(cDNA)が合成される。なお、この発明のネクチン - 3 は、ネクチン - 1 およびネクチン - 2 と同様に、全ての哺乳動物に共通して存在する蛋白質であることから、前記発明(1)から(3)の蛋白質ネクチン - 3、およびこれらをコードするポリヌクレオチドはマウス由来のものに限定されるものではない。

10

【 0 0 0 9 】

以下、前記の各発明について実施の形態を詳しく説明する。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

発明(1)のマウス蛋白質ネクチン - 3 は、配列番号 1 に塩基配列を示した 1 6 5 0 b p の cDNA (発明(5)のポリヌクレオチド)にコードされた蛋白質であり、配列番号 2 に示した 5 4 9 のアミノ酸配列を有している。また、このネクチン - 3 の全 cDNA は、配列番号 7 に示した 2 1 7 8 b p の塩基配列を有している。

20

【 0 0 1 1 】

発明(2)のネクチン - 3 は、配列番号 3 に塩基配列を示した 1 5 3 3 b p の cDNA (発明(6)のポリヌクレオチド)にコードされた蛋白質であり、配列番号 4 に示した 5 1 0 のアミノ酸配列を有している。

【 0 0 1 2 】

発明(3)のネクチン - 3 は、配列番号 5 に塩基配列を示した 1 3 1 7 b p の cDNA (発明(7)のポリヌクレオチド)にコードされた蛋白質であり、配列番号 6 に示した 4 3 8 のアミノ酸配列を有している。

30

【 0 0 1 3 】

これらの蛋白質ネクチン - 3 は公知の方法により、マウスやその他の哺乳動物組織から単離する方法、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ペプチドを調製する方法、あるいは発明(5)～(7)によって提供されるポリヌクレオチドを用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換え DNA 技術によってネクチン - 3 を取得する場合には、発明(5)～(7)のポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によって RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また各ポリヌクレオチドを公知の方法により適当な発現ベクターに組換えれば(発明(8))、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、ポリヌクレオチドがコードするネクチン - 3 を大量に発現させることができる。

40

【 0 0 1 4 】

この発明の蛋白質ネクチン - 3 を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、DNA 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、この発明のポリヌクレオチドを挿入結合して組換え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すれば、ポリヌクレオチドがコードしているネクチン - 3 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、ポリヌ

50

クレオチドがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。

【 0 0 1 5 】

この発明の蛋白質ネクチン - 3 を動物細胞で発現させる場合には、この発明のポリヌクレオチドを、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、動物細胞内に導入すれば、この発明の蛋白質ネクチン - 3 を動物細胞内で発現できる。

【 0 0 1 6 】

以上のとおり方法によって得られるマウス蛋白質ネクチン - 3 は、例えば、この蛋白質を特異的に認識する抗体を作成するための抗原として使用することができる。

【 0 0 1 7 】

発明 ( 1 ) ~ ( 3 ) の蛋白質ネクチン - 3 には、配列番号 2、4 または 6 で表される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もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。

【 0 0 1 8 】

発明 ( 4 ) のポリヌクレオチドは、前記の蛋白質ネクチン - 3、および をコードする哺乳動物のゲノム遺伝子であって、例えば、発明 ( 5 ) ~ ( 7 ) のポリヌクレオチド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等から単離することができる。

【 0 0 1 9 】

発明 ( 5 ) ~ ( 7 ) のポリヌクレオチドは、配列番号 1、3 または 5 で表される塩基配列を有することを特徴とする c D N A であり、前記ネクチン - 3、および をそれぞれコードしている。これらのポリヌクレオチドは、配列番号 1、3 または 5 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、マウスやその他の哺乳動物 c D N A ライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のポリヌクレオチドと同一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 ( P C R ) 法を用いて、目的ポリヌクレオチドを合成することもできる。

【 0 0 2 0 】

一般に哺乳動物の遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号 1、3 または 5 において、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ポリヌクレオチドもこの発明に含まれる。

【 0 0 2 1 】

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残基の付加、欠失および / または他のアミノ酸残基による置換がなされている蛋白質も、配列番号 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、この発明に含まれる。

【 0 0 2 2 】

発明 ( 5 ) ~ ( 7 ) のポリヌクレオチドには、配列番号 1、3 または 5 で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含む c D N A 断片 ( 1 0 b p 以上 )、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなるポリヌクレオチドも含まれる。

【 0 0 2 3 】

発明 ( 9 ) の抗体は、蛋白質ネクチン - 3 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。

【 0 0 2 4 】

以下、この発明のネクチン - 3 の構造とその機能確認について行った実験結果を説明する。

1 . 方法

1 . 1 マウス・ネクチン - 3 c D N A の分子クローニング

E S T データベースから、ネクチン - 1 および - 2 に類似しているが、同一ではない 3 種

10

20

30

40

50

類のマウスESTクローン(AI1428160, AA492633, AA497887)をマウス脳cDNA(Clontech社)からPCR増幅した。これらcDNA混合物をプローブとして用いてマウスcDNAライブラリー(Stratagene社)をスクリーニングし、全長cDNAを得た。塩基配列の決定は、DNA sequencer(ABI 373)を用いて行った。

#### 1.2 ネクチン-3発現ベクターの構築

ベクターpCAGIPuro(J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)、pCAGIPuro-FLAG、pGEX-KG(Anal. Biochem. 192:262-267, 1991)、pMal-C2(New England Biolabs Inc.)およびpFastBac1-Msp-Fc(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)を用いて以下のネクチン-3発現ベクターを構築した。なお、pCAGIPuro-FLAGは、prepro-trypsinシグナルペプチドとpFLAG-CMV1(Eastman Kodak Co.)のFLAGエピトープをpCAGIPuroにサブクローニングすることによって作成した。

(a) pCAGIPuro-nectin-3 : 配列番号2の1-549(全長)

(b) pCAGIPuro-FLAG-nectin-3 : 配列番号2の56-549

(c) GST-nectin-3 -CP : 配列番号2の433-549(細胞質領域)

(d) GST-nectin-3 -CP - C : 配列番号2の433-545(C端4アミノ酸残基の欠失)

(e) GST-nectin-3 -CP : 配列番号6の397-438(細胞質領域)

(f) pFastBac1-Msp-Fc-nactin-3 -EX : 配列番号2の56-400(細胞外領域)

#### 1.3 形質転換体細胞の構築

L細胞(京都大学より入手)を10%ウシ胎児血清含有のDMEM培地で培養し、形質転換L細胞を作成した。全長ヒト・ネクチン-1を発現するL細胞株(nectin-1-L cells)または全長マウス・ネクチン-2を発現するL細胞株(nectin-2-L cells)は、それぞれ文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)に記載の方法で作成した。全長マウス・ネクチン-3を発現するL細胞株(nectin-3-L cells)は、組換え体ベクターpCAGIPuro-nectin-3を用いて作成した。ネクチン-1とFLAG-ネクチン-3を共に発現する細胞株(nectin-1/3-L cells)、またはネクチン-2とFLAG-ネクチン-3を共に発現する細胞株(nectin-2/3-L cells)は、それぞれ、細胞株(nectin-1-L cellsおよびnectin-2-L cells)に、Lipofectamine reagent(GIBCO BRL)を用いて、pCAGIPuro-FLAG-nectin-3をトランスフェクションすることによって作成した。各細胞株は、1日培養後、培地を交換し、5μg/mlのpuromycin(Sigma Chemical Co.)によって選択した。

#### 1.4 抗体の作成

ネクチン-3に対するウサギ抗血清(ポリクローナル抗体)を、GST-nectin-3-CPを抗原として作成した。ネクチン-3に対するラットモノクローナル抗体は、ネクチン-3の細胞外領域とIgG Fcとの融合蛋白質を抗原として作成した。ウサギ抗ネクチン-1ポリクローナル抗体は文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)に記載の方法で作成した。また、ネクチン-1のアミノ酸位置450-468に対応する合成ペプチドを抗原としてウサギ抗ネクチン-1ポリクローナル抗体を文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999)に記載の方法により作成した。さらに、ラット抗ネクチン-2モノクローナル抗体を文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、Exp

10

20

30

40

50

. Cell Res. 235:374-384, 1997)に記載の方法で、また、マウス・モノクローナルおよびウサギ・ポリクローナル抗1-アフアディン抗体を文献(J. Cell Biol. 139:517-528, 1997、Oncogene 18:1609-1618, 1999)に記載の方法で作成した。ラット抗E-カドヘリンモノクローナル抗体は竹市博士(京都大学)から供与された。マウス抗FLAGモノクローナル抗体はEastman Kodakより購入した。

#### 1.5 その他の方法

細胞凝集アッセイ(Cell Aggregation Assay)は、文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)に記載の方法に従って行った。また、2種類 10  
種類のL細胞株間での混合細胞凝集アッセイは、文献(J. Cell Biol. 103:171-187, 1986)の記載に従い、一方のL細胞株をDiI(Molecular Probe Inc. USA)によって事前標識して行った。

#### 【0025】

化学的交叉結合(Chemical Cross-linking)は、文献(Blood 92:4602-4611, 1998、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)に記載の方法に従って行った。免疫沈降(Immunoprecipitation)は、文献(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)に記載の方法に従って行った。培養細胞の免疫蛍光顕微鏡観察は、文献(J. Cell Biol. 139:517-528、J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)に記載の方法に従って行った。蛋白質濃度の測定は、文献(Anal. Biochem. 72:248-254, 1976)の記載に従って、ウシ血清アルブミンを対照とする方法により行った。SDS-PAGEは文献(Nature 227:680-685, 1970)の記載に従って行った。 20

#### 【0026】

また、アフィニティークロマトグラフィーは以下のとおりに行った。アフアディンPDZドメインのMBP融合蛋白質はamylose resin beads(New England Biolabs Inc.)に固定化した。GST-nectin-3-CPおよびGST-nectin-3-CP-Cはそれぞれアフィニティービーズに固定化した。これらのビーズをPBS(0.1% Triton X-100含有)で十分に洗浄した後、PBS(20 mM maltose, 0.1% Triton X-100含有)により溶出した。 30

### 2. 結果

#### 2.1 ネクチン-3 cDNAのクローニングとその特徴

マウスcDNAライブラリーから得られたcDNAクローンは、配列番号7の塩基配列を有しており、1647bpからなる翻訳領域(配列番号1)に549アミノ酸配列(配列番号2)からなる蛋白質(推定分子量60,580)をコードしていた。また、このクローンは前記ESTクローンを全て含んでいた。この蛋白質をネクチン-3と命名した。 40

#### 【0027】

このネクチン-3のアミノ酸配列は、N端疎水性シグナルペプチド(配列番号2の位置1-55)および膜貫通領域(配列番号2の位置405-421)を有していた。また、N結合型グリコシル化は位置73、83、125、186、222および331に見られた。また、このネクチン-3は、細胞外領域に3つのIg様ドメインを含んでおり、細胞質領域にはC端保存モチーフを有していた(表1)。

#### 【0028】

#### 【表1】

C-Terminal sequences of the nectin family members

Nectin-1 $\alpha$	S F I S K K E W Y V
Nectin-1 $\beta$	V R T T E P R G E C
Nectin-2 $\alpha$	S L I S R R A V Y V
Nectin-2 $\delta$	D E F V S R A M Y V
Nectin-3 $\alpha$	S V I S R R E W Y V
Nectin-3 $\beta$	L Y I N P R E H Y V
Nectin-3 $\gamma$	L G Q V R A L E D T

10

20

【0029】

以上のとおりのネクチン - 3 の構造的な特徴は、ネクチン - 1 $\alpha$ 、- 1 $\beta$ 、- 2 $\alpha$  および - 2 $\delta$  と類似している。ホモロジーの程度は領域によって異なるが、ネクチン - 3 の細胞外領域のアミノ酸配列は、ネクチン - 1 $\alpha$  およびネクチン - 2 $\alpha$  とそれぞれ 35.9% および 30.7% 同一であった。

【0030】

また、ネクチン - 3 を単離する過程で、2つのスプライシングバリエーション（ネクチン - 3 $\alpha$  および - 3 $\beta$ ）が見出された。ネクチン - 3 の cDNA（翻訳領域）は 1533 bp の塩基配列（配列番号 3）を有しており、510 のアミノ酸配列（配列番号 4）からなる蛋白質（推定分子量 55,808）をコードしている。このネクチン - 3 の細胞外領域（配列番号 4 の位置 1 - 357）はネクチン - 3 のそれと同一であるが、膜貫通領域 および細胞質領域（配列番号 4 の位置 358 - 510）はネクチン - 3 とは異なっている。しかし、ネクチン - 3 は C 端保存モチーフを有していた（表 1）。

30

【0031】

ネクチン - 3 の cDNA（翻訳領域）は 1317 bp の塩基配列（配列番号 5）を有しており、438 のアミノ酸配列（配列番号 6）からなる蛋白質（推定分子量 47,259）をコードしている。このネクチン - 3 の細胞外領域、膜貫通領域および細胞質領域はネクチン - 3 と同一であるが、ネクチン - 3 は C 端保存モチーフを欠失している（表 1）。

【0032】

図 1 は、以上のネクチン - 3 $\alpha$ 、- 3 $\beta$  および - 3 $\gamma$  のアミノ酸配列（1文字記号）の比較図である。

40

【0033】

なお、以下の実験では主としてネクチン - 3 を対象とする。その理由は、様々な組織を対象としたノーザンブロット分析の結果、ネクチン - 3 が主要なスプライシングバリエーションであることが確認されたからである（図 8、B1 - B3 参照）。

2.2 ネクチン - 3 の trans Homo - Interaction と c  
i c Homo - dimer Formation  
nectin - 1 - L cells および nectin - 2 - L cells を用いた研究により、ネクチン - 1 およびネクチン - 2 が細胞 - 細胞接着活性（trans 50

50

Homo-Interaction)を示すことが確認されている(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)。そこで先ず、ネクチン-3が同様の活性を有するか否かを調べた。抗ネクチン-3ポリクローナル抗体は、細胞株nectin-3-L cellsの発現産物について、分子量約100 kDaの2つの蛋白質バンドを認識した(図2A、図3)。これらは、グリコシル化等の翻訳後修飾の違いによるものと考えられる。また、これらの分子量は、アミノ酸配列から推定される分子量とも異なるが、これもまたグリコシル化の相違によるものと考えられる。さらに、各細胞株におけるネクチン-1、-2および-3の発現レベルは同等であった(データ示さず)。

#### 【0034】

次に、細胞株nectin-3-L cellsを用いてネクチン-3の細胞凝集活性を調べた。その結果、ネクチン-3は経時的に細胞凝集活性を示した(図2B、C1、C2)。この活性はEDTA添加によって影響されないことから(データ示さず)、ネクチン-3の細胞-細胞接着活性はCa<sup>2+</sup>非依存性であることが確認された。以上の結果から、ネクチン-3は、ネクチン-1、-2および-2と同様(J. Cell Biol. 145:539-549, 1999、Exp. Cell Res. 235:374-384, 1997、Blood 92:4602-4611, 1998、J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)のCa<sup>2+</sup>非依存性のホモフィリックCAM(細胞接着分子)であることが確認された。

#### 【0035】

ネクチン-1および-2はcis homo-dimerを形成することが知られているので(J. Biol. Chem. 275:613-618, 2000)、ネクチン-3についても同様に活性について調べた。細胞株nectin-3-L cellsを単一細胞に分離し、細胞表面クロスリンカーBS3と共にインキュベートし、抗ネクチン-3ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結果、2量体に対応する分子量約200~220 kDaのバンドが確認された(図3)。また、より高分子量のバンドも検出された。この交叉結合は単一細胞懸濁により行ったので、このダイマーやオリゴマーはtrans homo-interactionよりもcis homo-interactionによるものである可能性が高い。

2.3 ネクチン-3とネクチン-1または-2との trans Hetero-interaction

ネクチンファミリーの各メンバーがヘテロフィリックな細胞-細胞接着活性(trans hetero-interaction)を示すか否かを調べるため、混合細胞凝集アッセイを行った。DiI標識された細胞株nectin-1-L cellsが非標識nectin-2-L cellsと混合された場合には、常に、標識細胞だけか、または非標識細胞だけが凝集し(図4A1-A3)、両方のL細胞株からなる凝集塊はほとんど検出されなかった。一方、DiI標識された細胞株nectin-3-L cellsが非標識細胞nectin-1-L cellsと混合された場合には、標識細胞と非標識細胞とからなる凝集塊が観察された(図4B1-B3)。このことは、ネクチン-3がネクチン-1とtrans hetero-interactionを形成することを示している。また、同様の結果が、ネクチン-3とネクチン-2についても得られた(図4C1-C3)。

#### 【0036】

さらにこの結果を確認するため、免疫蛍光顕微鏡観察を行った。細胞株nectin-1-L cellsと細胞株nectin-2-L cellsとを共培養した場合には、ネクチン-1とネクチン-2は、それぞれのL細胞株の細胞-細胞接触部位に局在していた(図5A1-A3)が、ネクチン-1およびネクチン-2は2つのL細胞株同士の接触部位には検出されなかった。一方、細胞株nectin-3-L cellsと細胞株nectin-1-L cellsとを共培養した場合には、ネクチン-3とネクチン-1は、2つのL細胞株同士の接触部位に共存していた(図5B1-B

10

20

30

40

50



3)。同様の結果は、細胞株 *nectin-3-L-cells* と細胞株 *nectin-2-L-cells* とを共培養した場合にも観察された(図5C1-C3)。これらの結果から、ネクチン-3はネクチン-1および-2と *trans hetero-interaction* を形成するが、ネクチン-1と-2はそのような相互作用を示さないことが確認された。

#### 【0037】

次に、ネクチンファミリーの各メンバーが、*trans homo-interaction* を形成するか、あるいは *trans hetero-interaction* を形成するかを調べるため、混合細胞凝集アッセイを用いて2種類の細胞凝集を分析した。4細胞凝集の結果と同様に、細胞株 *nectin-1-L-cells* と細胞株 *nectin-2-L-cells* とを混合した場合には、ホモ型の2細胞凝集が形成された(図6A)。これに対して、細胞株 *nectin-1-L-cells* と細胞株 *nectin-3-L-cells* とを混合した場合にはヘテロ型の2細胞凝集が形成され、ホモ型の細胞凝集はほとんど観察されなかった(図6B)。同様の結果は、細胞株 *nectin-3-L-cells* と細胞株 *nectin-2-L-cells* とを混合した場合にも観察された(図6C)。以上の結果から、ネクチン-3とネクチン-1または-2との *trans hetero-interaction* の親和性は、ネクチン-1、-2または-3の *trans homo-interaction* の親和性より明らかに強いことが確認された。

#### 2.4 ネクチン-3とネクチン-1または-2との *cis hetero-dimer* 形成

ネクチン-3がネクチン-1または-2と *cis hetero-dimer* を形成するか否かを調べるため、細胞株 *nectin-1/3-L-cells* および細胞株 *nectin-2/3-L-cells* を用いて、FLAG-ネクチン-3をそれぞれ細胞株 *nectin-1-L-cells* および細胞株 *nectin-2-L-cells* で発現させた。その結果、FLAG-ネクチン-3は、ネクチン-1または-2の *cis dimer* のサイズを変えなかった(図7A1およびA2)。細胞株 *nectin-1/3-L-cells* に細胞表面交叉結合を行い、次いで抗FLAGモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行うと、ネクチン-1は上清中に回収され、FLAG-ネクチン-3とは共免疫沈降しなかった(図7B1)。同様の結果は細胞株 *nectin-2/3-L-cells* においても得られた(図7B2)。以上の結果から、ネクチン-3は、ネクチン-1または-2とは *cis hetero-dimer* を形成しないことが確認された。

#### 2.5 ネクチン-3の組織分布および細胞内局在

以前の報告(J. Virol. 66:2807-2813, 1992、Gene 155:261-265, 1995、Gene 159:267-272, 1995)と同様に、ノーザンプロット分析の結果からは、ネクチン-1は脳で優性に発現しており、ネクチン-2は全身性に発現していた(図8A1およびA2)。ネクチン-3の3種類のスプライシングバリエーションに共通な翻訳領域をプローブとして用いたノーザンプロット分析では、様々な組織において幾つかのmRNAバンドが検出された(図8A3)。そこで、各バリエーションの組織分布を調べるために、各バリエーションに特異的なcDNAプローブを用いた。ネクチン-3は約5.2-kb、3.8-kb、3.3-kbおよび2.7-kbのmRNAバンドを示し、これらは精巣で有意に発現し、他の組織(心臓、脳、肺、肝臓および腎臓)では僅かに発現していた(図8B1)。ネクチン-3は約5.2-kbおよび3.3-kbのmRNAバンドを示し、これらは精巣で発現していた(図8B2)。ネクチン-3は精巣において約3.3-kbのmRNAバンドを示し、肺、肝臓および腎臓において2.1-kbのmRNAバンドを示した(図8B3)。

#### 【0038】

次に、ネクチン-3の細胞内局在を調べるため、抗ネクチン-3ポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光顕微鏡観察を行った。ネクチン-3は、マウス小腸吸収上皮の接着複

10

20

30

40

50

合体領域にネクチン - 2 と共存していた ( 図 9 ) 。以上の結果から、ネクチン - 2 と同様に ( J . Cell Biol . 145 : 539 - 549 , 1999 ) 、ネクチン - 3 もまたカドヘリン性細胞 - 細胞 A J s に局在していることが示唆された。

#### 2.6 ネクチン - 3 とアフアディンとの直接結合

ネクチン - 3 がアフアディンと直接に結合するか否かを調べるため、アフィニティークロマトグラフィーを行った。ネクチン - 3 の細胞質領域の GST 融合蛋白質 ( GST - nectin - 3 - CP ) は、amylose resin beads に固定化された MBP - afadin - PDZ ( アフアディンの PDZ 領域との MBP 融合蛋白質 ) に結合した ( 図 10 ) 。ネクチン - 3 のアフアディンへの結合の化学量論は約 1 : 1 であった。これに対して、細胞質領域の C 端 4 アミノ酸残基を欠失したネクチン - 3 との GST 融合蛋白質 ( GST - nectin - 3 - CP - C ) は結合しなかった。同じく、C 端の保存モチーフを欠失しているネクチン - 3 の細胞質領域との GST 融合蛋白質もアフィニティービーズとは結合しなかった。

10

【 0039 】

#### 【 発明の効果 】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、ネクチン - 1 および - 2 と同一の蛋白質ファミリーに属する新規蛋白質ネクチン - 3 が提供される。この蛋白質は、細胞結合の分子機構の全容を解明するための重要な情報を提供するばかりか、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予防・治療法、治療薬等の開発に有用である。

20

【 0040 】

#### 【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Protein Nectine-3

<130>

10

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 1650

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)..(1650)

<400> 1

atg gcg cgg acc ccg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys

1

5

10

15

40

gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96



130	135	140		
aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc	480			
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser				
145	150	155	160	
tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa	528			10
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys				
	165	170	175	
ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt	576			
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val				
	180	185	190	20
tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt	624			
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly				
	195	200	205	
gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca	672			
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr				
	210	215	220	30
gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga	720			
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg				
225	230	235	240	
gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac	768			
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp				40
	245	250	255	

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca	816	
Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser		
260 265 270		
gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac	864	
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn		10
275 280 285		
ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg	912	
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp		
290 295 300		
agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat	960	20
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn		
305 310 315 320		
act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat	1008	
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr		
325 330 335		30
gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt	1056	
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val		
340 345 350		
atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt cag ccg aca gtt	1104	
Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val		
355 360 365		40

cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata gca aca gag cat	1152	
Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His		
370 375 380		
aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca ctt aag gat gac	1200	
Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp		
385 390 395 400		10
aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg gct ctc ttc tta	1248	
Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu		
405 410 415		
gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat agg aga cga cgg	1296	
Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg		20
420 425 430		
acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att cca cca tca gac	1344	
Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp		
435 440 445		
atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag gat gag ctg gat	1392	30
Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp		
450 455 460		
tct tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat cca gta aac aac	1440	
Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn		
465 470 475 480		40
ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa act cag tgg aat	1488	

Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn  
 485 490 495

aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg gat tac tat gaa 1536  
 Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu  
 500 505 510

10

gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa cgc tac aat gaa 1584  
 Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu  
 515 520 525

agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc gta att tcc agg 1632  
 Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg  
 530 535 540

20

agg gag tgg tat gtc taa 1650  
 Arg Glu Trp Tyr Val  
 545 550

- <210> 2
- <211> 549
- <212> PRT
- <213> Mouse

30

<400> 2

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro

40





Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser	
260	265
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn	
275	280
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp	
290	295
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn	10
305	310
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr	
325	330
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val	
340	345
Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val	
355	360
Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His	20
370	375
Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp	
385	390
Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu	
405	410
Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg	30
420	425
Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp	
435	440
Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln Asp Glu Leu Asp	
450	455
Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn Pro Val Asn Asn	40
465	470
Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys Thr Gln Trp Asn	

485                      490                      495  
 Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met Asp Tyr Tyr Glu  
                     500                      505                      510  
 Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu Arg Tyr Asn Glu  
                     515                      520                      525  
 Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser Val Ile Ser Arg  
                     530                      535                      540  
 Arg Glu Trp Tyr Val  
 545

10

<210> 3  
 <211> 1533  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

20

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1533)

30

<400> 3  
 atg gcg cgg acc cgg ggc cgg gcc cgg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa 48  
 Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys  
                     1                      5                      10                      15

gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg 96  
 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro  
                     20                      25                      30

40

gcc ccg acg ccg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt etc	144	
Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu		
35 40 45		
ttc tcc cgg etc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca	192	
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro		10
50 55 60		
cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att	240	
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile		
65 70 75 80		
gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc	288	20
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly		
85 90 95		
aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct	336	
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser		
100 105 110		30
gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt	384	
Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu		
115 120 125		
aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga	432	
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly		40
130 135 140		

aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc 480  
 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser  
 145 150 155 160

tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa 528  
 Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys  
 165 170 175

10

ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt 576  
 Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val  
 180 185 190

tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt 624  
 Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly  
 195 200 205

20

gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca 672  
 Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr  
 210 215 220

gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720  
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg  
 225 230 235 240

30

gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768  
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp  
 245 250 255

40

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816

Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser		
260	265	270
gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac	864	
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn		
275	280	285
ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg	912	10
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp		
290	295	300
agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat	960	
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn		
305	310	315
		320
act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat	1008	
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr		
	325	330
		335
gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt	1056	
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val		30
	340	345
		350
atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg	1104	
Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val		
	355	360
		365
gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc	1152	40
Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val		

370	375	380		
ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt			1200	
Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu				
385	390	395	400	
gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat			1248	10
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr				
405	410	415		
gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag act			1296	
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr				
420	425	430		20
gaa cac ttg cct ttg cag act cag ttc aag gag aaa gga gct ggt ggt			1344	
Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly				
435	440	445		
ctt cag ccc tct aat gga cca att agc agg aga ttt gac tat gag gat			1392	
Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp				
450	455	460		30
gag agc aca atg caa gaa gat gga act cag cgc atg tgc ccc ctt tat			1440	
Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr				
465	470	475	480	
agc cag atg tgc cac caa gac cga agc cct cgc caa cat cac cca cgc			1488	
Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg				40
485	490	495		

aac ccc gag aga ctc tac atc aac cca cga gaa cat tat gtg tga 1533  
 Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val  
                   500                          505                          510

<210> 4

10

<211> 510

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 4

Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys  
   1                  5                          10                          15  
 Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro  
                   20                          25                          30  
 Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu  
                   35                          40                          45  
 Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro  
                   50                          55                          60  
 His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile  
   65                  70                          75                          80  
 Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly  
                   85                          90                          95  
 Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser  
                   100                          105                          110  
 Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu  
                   115                          120                          125  
 Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly

20

30

40





Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val  
 370 375 380  
 Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr  
 405 410 415  
 Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr  
 420 425 430  
 Glu His Leu Pro Leu Gln Thr Gln Phe Lys Glu Lys Gly Ala Gly Gly  
 435 440 445  
 Leu Gln Pro Ser Asn Gly Pro Ile Ser Arg Arg Phe Asp Tyr Glu Asp  
 450 455 460  
 Glu Ser Thr Met Gln Glu Asp Gly Thr Gln Arg Met Cys Pro Leu Tyr  
 465 470 475 480  
 Ser Gln Met Cys His Gln Asp Arg Ser Pro Arg Gln His His Pro Arg  
 485 490 495  
 Asn Pro Glu Arg Leu Tyr Ile Asn Pro Arg Glu His Tyr Val  
 500 505 510

10

20

30

<210> 5

<211> 1317

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1317)

40

<400> 5

atg gcg cgg acc ccg ggc cgg gcc cgg ttg tgt cct gga ggc ggc aaa	48	
Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro Gly Gly Gly Lys		
1 5 10 15		
gca caa ctt tcc tgg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga ctg ctg ctg ccg	96	10
Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly Leu Leu Leu Pro		
20 25 30		
gcc cgg acg cgg cgg cgg ctg ctg ctg ctg ctt att ccc ctg ctt ctc	144	
Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Pro Leu Leu Leu		
35 40 45		20
ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att att gtg gag cca	192	
Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile Ile Val Glu Pro		
50 55 60		
cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg aag tgt tta att	240	
His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu Lys Cys Leu Ile		
65 70 75 80		30
gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag aag ata cat ggc	288	
Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu Lys Ile His Gly		
85 90 95		
aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag tat gga ttc tct	336	
Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln Tyr Gly Phe Ser		40
100 105 110		

gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa aac tat tca ctt	384	
Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys Asn Tyr Ser Leu		
115	120	125
aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc tca gat tct gga	432	
Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe Ser Asp Ser Gly		10
130	135	140
aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga aat gct cag tcc	480	
Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser		
145	150	155
160		
tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg agc ctg ata aaa	528	20
Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys		
165	170	175
ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca gta gca gcc gtt	576	
Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val		
180	185	190
tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att gac tgg gaa ggt	624	
Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly		
195	200	205
gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt cct aat gaa aca	672	
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr		
210	215	220
		40

gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca aga ttt gct cga 720  
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg  
 225 230 235 240

gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc tta gaa aag gac 768  
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp  
 245 250 255

10

att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct cct gaa gtt tca 816  
 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser  
 260 265 270

gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga aaa ggt gtt aac 864  
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn  
 275 280 285

20

ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc aag tcc gtg tgg 912  
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp  
 290 295 300

agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg gcg tca gat aat 960  
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn  
 305 310 315 320

30

act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat tct ggc gtt tat 1008  
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr  
 325 330 335

40

gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt gat caa aag gtt 1056

Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val	
340	345
350	
atc tac att tca gac atc ccg ctt acg cag acc tca tcc ata gca gtg	1104
Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val	
355	360
365	
gct gga gcc gtg att gga gct gtc ctg gcc ctc ttc atc atc acc gtc	1152
Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val	
370	375
380	
ttt gtg act gtg ttg ctg acg cct cgg aaa aag aga ccg tcc tat ctt	1200
Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu	
385	390
395	400
gac aaa gta atc gac ctt cca cct aca cat aag cca ccc cct gta tat	1248
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr	
405	410
415	
gaa gaa cga att cct tct ctc cct cag aaa gac ctt ctt ggc cag gta	1296
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val	
420	425
430	
cgt gct ctc gaa gac act taa	1317
Arg Ala Leu Glu Asp Thr	
435	

10

20

30

40



Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly	
195	200
Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr	
210	215
Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg	
225	230
Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp	10
245	250
Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser	
260	265
Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn	
275	280
Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp	
290	295
Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn	20
305	310
Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr	
325	330
Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val	
340	345
Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val	30
355	360
Ala Gly Ala Val Ile Gly Ala Val Leu Ala Leu Phe Ile Ile Thr Val	
370	375
Phe Val Thr Val Leu Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Ser Tyr Leu	
385	390
Asp Lys Val Ile Asp Leu Pro Pro Thr His Lys Pro Pro Pro Val Tyr	
405	410
Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Val	40



420  
 Arg Ala Leu Glu Asp Thr  
 435

425

430

<210> 7 10  
 <211> 2178  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (197)..(1846) 20

<400> 7  
 gaattcggca cgagcgacgg cggagtcgag gcagccgcga gcgctcggcc gagtggcggc 60  
 gggcggcgcac ggcgcaggag ccgggggttg aggacacgcg cgctggccct tccgcgccgc 120  
 ggccgcgccg gccgccgcca cccagagcct gaggcgccgg ggcgcggggcg agcgggtggg 180 30

ccggggcaag gcgggc atg gcg cgg acc cgg ggc ccg gcc ccg ttg tgt cct 232  
 Met Ala Arg Thr Pro Gly Pro Ala Pro Leu Cys Pro  
 1 5 10

gga ggc ggc aaa gca caa ctt tcc tcg gcg ttt cct ccc gcg gcc gga 280  
 Gly Gly Gly Lys Ala Gln Leu Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Ala Gly 40  
 15 20 25

ctg ctg ctg ccg gcc ccg acg ccg ccg cgg ctg ctg ctg ctg ctt att	328	
Leu Leu Leu Pro Ala Pro Thr Pro Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile		
30 35 40		
ccc ctg ctt ctc ttc tcc cgg ctc tgt ggt gcc tta gct gga tca att	376	
Pro Leu Leu Leu Phe Ser Arg Leu Cys Gly Ala Leu Ala Gly Ser Ile		10
45 50 55 60		
att gtg gag cca cat gtc aca gca gtg tgg gga aag aat gtt tca ttg	424	
Ile Val Glu Pro His Val Thr Ala Val Trp Gly Lys Asn Val Ser Leu		
65 70 75		
aag tgt tta att gaa gtg aat gaa act ata acc cag atc tca tgg gag	472	20
Lys Cys Leu Ile Glu Val Asn Glu Thr Ile Thr Gln Ile Ser Trp Glu		
80 85 90		
aag ata cat ggc aaa agt aca cag act gtt gca gtt cat cat cct cag	520	
Lys Ile His Gly Lys Ser Thr Gln Thr Val Ala Val His His Pro Gln		
95 100 105		30
tat gga ttc tct gtt caa gga gat tat cag gga aga gtc ttg ttt aaa	568	
Tyr Gly Phe Ser Val Gln Gly Asp Tyr Gln Gly Arg Val Leu Phe Lys		
110 115 120		
aac tat tca ctt aat gat gca aca att act ctg cat aac ata ggc ttc	616	
Asn Tyr Ser Leu Asn Asp Ala Thr Ile Thr Leu His Asn Ile Gly Phe		
125 130 135 140		40

tca gat tct gga aaa tat ata tgc aaa gcc gtt aca ttc cca ctt gga 664  
 Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly  
                   145                  150                  155

aat gct cag tcc tct aca aca gtg act gtg tta gtt gaa ccc aca gtg 712  
 Asn Ala Gln Ser Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val  
                   160                  165                  170

10

agc ctg ata aaa ggg ccg gat tct tta att gat gga ggg aat gag aca 760  
 Ser Leu Ile Lys Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr  
                   175                  180                  185

gta gca gcc gtt tgt gta gca gcc act gga aag cca gtc gca cag att 808  
 Val Ala Ala Val Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile  
                   190                  195                  200

20

gac tgg gaa ggt gat ctt ggt gaa atg gaa tct agt aca act tct ttt 856  
 Asp Trp Glu Gly Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe  
 205                  210                  215                  220

cct aat gaa aca gca acg att gtc agc caa tac aag ctg ttt ccc aca 904  
 Pro Asn Glu Thr Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr  
                   225                  230                  235

30

aga ttt gct cga gga agg cga att act tgt gtt gta aaa cat cca gcc 952  
 Arg Phe Ala Arg Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala  
                   240                  245                  250

40

tta gaa aag gac att cgc tac tct ttc ata cta gac ata cag tat gct 1000

Leu Glu Lys Asp Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala		
255	260	265
cct gaa gtt tca gta aca gga tat gat gga aat tgg ttc gtg gga aga	1048	
Pro Glu Val Ser Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg		
270	275	280
aaa ggt gtt aac ctc aag tgt aat gct gat gca aac cct cca ccc ttc	1096	10
Lys Gly Val Asn Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe		
285	290	295
aag tcc gtg tgg agc agg ttg gat gga caa tgg cct gat ggt tta ttg	1144	
Lys Ser Val Trp Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu		
	305	310
		315
gcg tca gat aat act ctt cat ttt gtc cat cca ttg act gtc aat tat	1192	
Ala Ser Asp Asn Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr		
	320	325
		330
tct ggc gtt tat gtc tgt aaa gta tca aat tcc ctt ggt caa aga agt	1240	
Ser Gly Val Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser		30
	335	340
		345
gat caa aag gtt atc tac att tca gat cct cct acc acc acc acc ctt	1288	
Asp Gln Lys Val Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu		
	350	355
		360
cag ccg aca gtt cag tgg cat tcc tca cct gct gac gtc cag gat ata	1336	40
Gln Pro Thr Val Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile		

365	370	375	380	
gca aca gag cat aaa aaa ttg ccc ttt cct ttg tca act ttg gca aca	1384			
Ala Thr Glu His Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr				
	385	390	395	
ctt aag gat gac aca att ggc acc atc att gct agt gta gtg ggt ggg	1432			10
Leu Lys Asp Asp Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly				
	400	405	410	
gct ctc ttc tta gtg ctt gtg agc att tta gct ggg gta ttc tgc tat	1480			
Ala Leu Phe Leu Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr				
	415	420	425	
				20
agg aga cga cgg acg ttt cgt gga gac tac ttt gcc aaa aac tac att	1528			
Arg Arg Arg Arg Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile				
	430	435	440	
cca cca tca gac atg cag aaa gaa tca cag att gat gtt ctt cac cag	1576			
Pro Pro Ser Asp Met Gln Lys Glu Ser Gln Ile Asp Val Leu His Gln				
	445	450	455	30
gat gag ctg gat tct tac cca gac agt gta aaa aag gaa aac aaa aat	1624			
Asp Glu Leu Asp Ser Tyr Pro Asp Ser Val Lys Lys Glu Asn Lys Asn				
	465	470	475	
cca gta aac aac ctg atc cgc aaa gac tac tta gag gag cct gag aaa	1672			
Pro Val Asn Asn Leu Ile Arg Lys Asp Tyr Leu Glu Glu Pro Glu Lys				
	480	485	490	40

act cag tgg aat aat gta gag aac ctc act agg ttt gaa aga ccg atg 1720  
 Thr Gln Trp Asn Asn Val Glu Asn Leu Thr Arg Phe Glu Arg Pro Met  
 495 500 505

gat tac tat gaa gat cta aaa atg gga atg aag ttt gtc agt gat gaa 1768  
 Asp Tyr Tyr Glu Asp Leu Lys Met Gly Met Lys Phe Val Ser Asp Glu 10  
 510 515 520

cgc tac aat gaa agt gaa gat ggt ttg gtt tct cat gta gat ggc tcc 1816  
 Arg Tyr Asn Glu Ser Glu Asp Gly Leu Val Ser His Val Asp Gly Ser  
 525 530 535 540

gta att tcc agg agg gag tgg tat gtc taa cagccactga cgcgactica 1866 20  
 Val Ile Ser Arg Arg Glu Trp Tyr Val  
 545 550

ctatgtacaa ggtttcattc acaactagttg accattttca gattgttcat actttttctt 1926

gaggaagaat aagctttttc aagttgattt cgagcttact ttttatattc tgatctgaca 1986 30

aatgaaaatg taaaacctgg gtccaatgta tcigagctgc tttacagitt tcaactgctat 2046

actactgtct caagatttaa attctaattgc agagiacttt attggctcga ggcacacagg 2106

taagaaagat gtcaacgtta aatgtatgac gtttttggta caaaaattaa aaaaaaaaaa 2166

aaaaaactcg ag 2178 40

【図面の簡単な説明】

【図1】ネクチン - 3、- 2 および - 3 のアミノ酸配列の比較図である。背景黒領域は3つのバリエーションでの共通配列、背景灰色領域はネクチン - 3 と - 3 での共通配列、下線はシグナルペプチド、2重下線は膜貫通領域、星印はアスパラギンのグリコシル化部位を示す。

【図2】ネクチン - 3 の trans homo - interaction を確認した結果である。(A) はネクチン - 3 の発現レベルであり、細胞の溶出物を SDS - PAGE に展開し、抗ネクチン - 3 ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析し 50

た。(B)は細胞凝集活性であり、は親L細胞株、はネクチン-3 発現L細胞株である。(C)は細胞凝集活性であり、C1は親L細胞株、C2はネクチン-2 発現L細胞株である。バーは100 $\mu$ mを示す。

【図3】ネクチン-3 の *cis* homo-dimer 形成を確認した結果である。ネクチン-3 発現細胞をBS3の存在下かたは非存在下でインキュベートし、各細胞溶出物をSDS-PAGEに展開し、抗ネクチン-3 ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析した。矢印は単量体、矢頭は2量体を示す。

【図4】混合細胞凝集活性を調べた結果である。A1-A3は標識化ネクチン-1 発現L細胞株と非標識化ネクチン-2 は発現L細胞株；B1-B3は標識化ネクチン-3 発現L細胞株と非標識化ネクチン-1 発現L細胞株；C1-C3は標識化ネクチン-3 発現L細胞株と非標識化ネクチン-2 発現L細胞株；A1、B1、C1は干渉コントラスト顕微鏡画像；A2、B2、C2は蛍光顕微鏡画像；A3、B3、C3は統計分析の結果である。バーは40 $\mu$ mを示す。

10

【図5】2種類のL細胞株の共培養の免疫蛍光顕微鏡画像である。A1-A3はネクチン-1 発現L細胞株と-2 発現L細胞株；B1-B3はネクチン-3 発現L細胞株と-1 発現L細胞株；C1-C3はネクチン-3 発現L細胞株と-2 発現L細胞株；A1、B2はネクチン-1 ；A2、C2はネクチン-2 ；B1はネクチン-3 (モノクローナル抗体)；C1はネクチン-3 (ポリクローナル抗体)；A3、B3、C3は併用染色である。バーは10 $\mu$ mを示す。

【図6】*trans hetero-iteration*の親和性を確認した結果であり、2細胞凝集の組成(標識化細胞と陽標識化細胞)を定量的に分析した。Aは標識化ネクチン-1 発現L細胞株と非標識化ネクチン-2 発現L細胞株；Bは標識化ネクチン-3 発現L細胞株と非標識化ネクチン-1 発現L細胞株；Cは標識化ネクチン-3 発現L細胞株と非標識化ネクチン-2 発現L細胞株である。

20

【図7】ネクチン-3 とネクチン-1 または-2 との *cis* hetero-dimer 形成を調べた結果である。Aは *cis* dimer 形成の比較である。A1はネクチン-1 発現L細胞株(レーン1)と-1 / 3 発現L細胞株(レーン2)；A2はネクチン-2 発現L細胞株(レーン1)と-2 / 3 発現L細胞株(レーン2)である。Bは免疫沈降の結果であり、B1はネクチン-1 / 3 発現L細胞株、B2はネクチン-2 / 3 発現L細胞株、レーン1は細胞抽出物、レーン2は上清、レーン3は沈殿物である。矢印は単量体、矢頭は2量体である。

30

【図8】ネクチン-3 の組織分布を調べた結果である。Aはネクチン-1、-2および-3のノーザンブロット分析の結果であり、A1はネクチン-1；A2はネクチン-2；A3はネクチン-3である。Bはネクチン-3、-3 および-3 のノーザンブロット分析の結果であり、B1はネクチン-3、B2はネクチン-3、B3はネクチン-3 である。レーン1は心臓、レーン2は脳、レーン3は脾臓、レーン4は肺、レーン5は肝臓、レーン6は骨格筋、レーン7は腎臓、レーン8は精巣である。

【図9】マウス小腸吸収上皮におけるネクチン-3 の細胞内局在を調べた結果である。Aはネクチン-3 ；Bはネクチン-2 ；Cは併用である。星印は小腸の内部空間を示す。バーは10 $\mu$ mである。

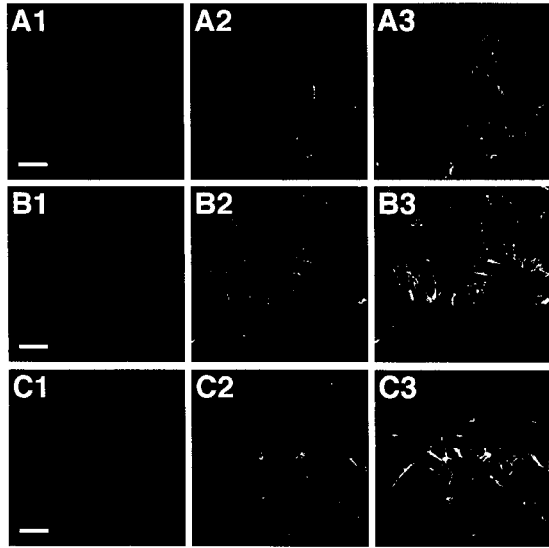
40

【図10】アフアディンとネクチン-3 との直接的な結合を調べた結果である。矢印は融合蛋白質GST-nectin-3-CP、矢頭は融合蛋白質MBP-afadin-PDZを示す。

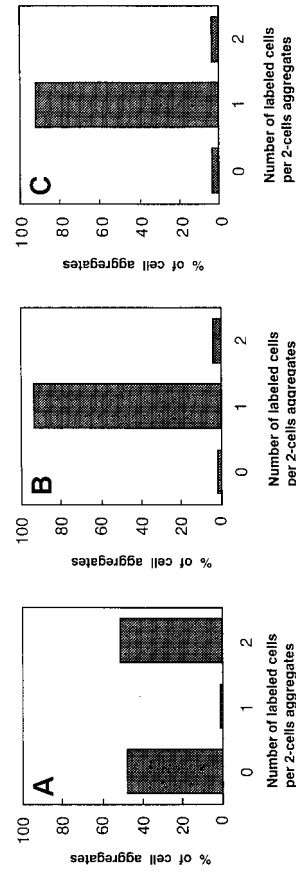




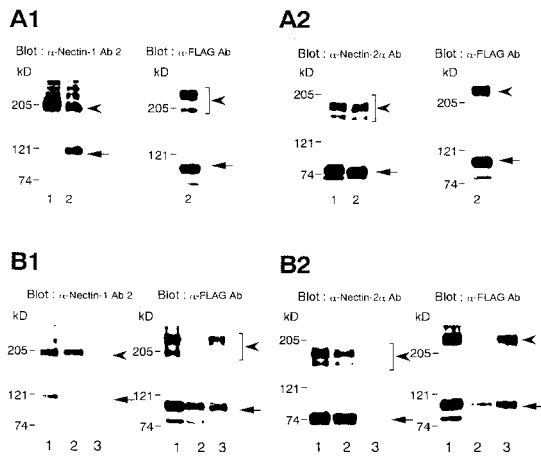
【 5 】



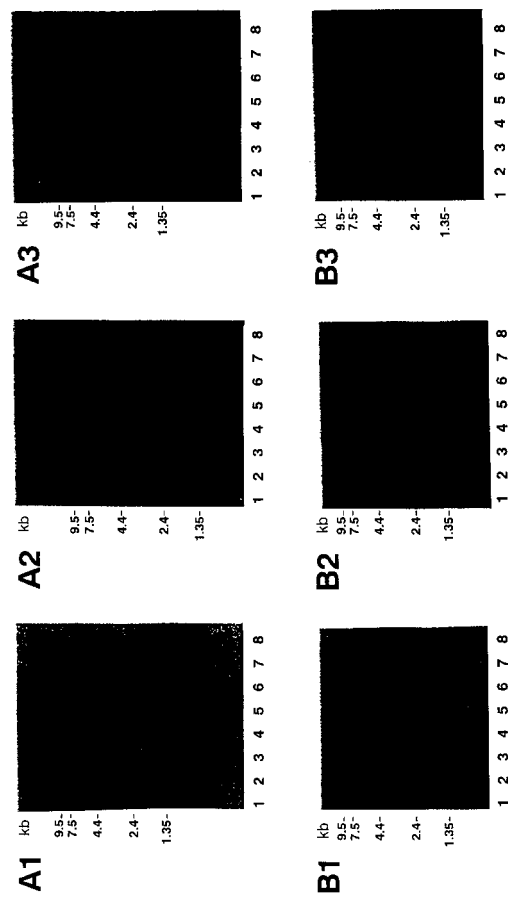
【 6 】



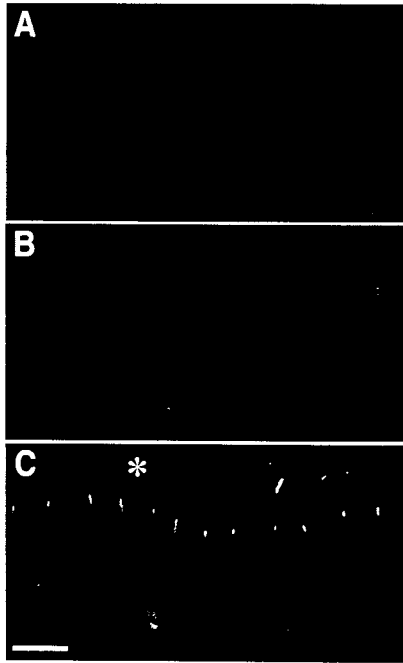
【 7 】



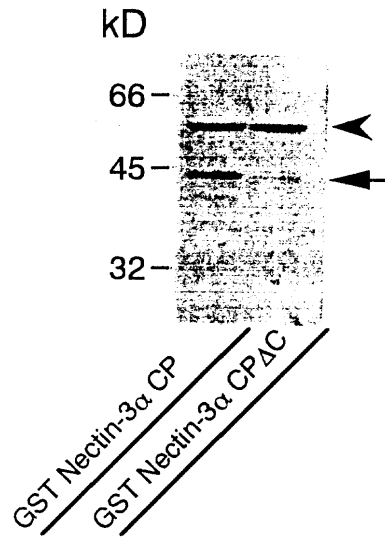
【 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 堀川 啓子  
京都府京都市西京区下津林東芝ノ宮町8 1 番地  
(72)発明者 高橋 健一  
兵庫県神戸市垂水区桃山台 1 - 1 6

セルシオン桂205号

JCRコート310

審査官 高 美葉子

- (56)参考文献 J Cell Biol(1999),Vol.145,No.3,p.539-549  
J Biol Chem(2000),Vol.275,No.1,p.613-618  
Genes Cells(1999),Vol.4,NO.10,p.573-581

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C12N 15/00  
C07K 14/00  
C07K 16/00  
MEDLINE(STN)  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq