

(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2001-252077  
(P2001-252077A)

(43) 公開日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/78	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/78		16/18	4 B 0 6 4
16/18		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 26 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)

(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 599086227

高橋 健一

兵庫県神戸市垂水区桃山台1丁目16番地

(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

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質ネクチン-3

(57) 【要約】

【課題】 細胞-細胞間接着結合に関与するネクチン蛋白質ファミリーに属する新規な蛋白質と、この蛋白質の遺伝子工学材料および抗体を提供する。

【解決手段】 配列番号2、4または6のアミノ酸配列を有する蛋白質ネクチン-3と、配列番号1、3、5の塩基配列をそれぞれ有するポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを保有する組換えベクター、並びに前記の蛋白質ネクチン-3に対する抗体。

## 【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2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2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2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】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、カドヘリン(cadherin)を介した細胞接着結合に関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學材料等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いる。なかでも細胞の接着結合(adherens junction: AJ)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、AJは細胞増殖や組織の形態形成のコントロールに関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AJ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。

【0003】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」(neurabin)と命名して既に特許出願している(特開平10-276784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-アフアディン(afadin)と、この1-アフアディンと結合する蛋白質ボンシンをそれぞれ単離し、特許出願している(1-アフアディン:特開平11-89572号公報、ボンシン:特願平11

-174687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AJ形成に対してアフアディンとともに機能する新規な蛋白質としてネクチン(nectin)-1、-1およびネクチン-2、-2を特定している(J. Cell Biol. 145:539-549,1999)。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、アフアディンおよびボンシンとともに、AJ形成に1つの系として作用することを見出している(Genes Cells 4:573-581, 1999; J. Biol. Chem.275:613-618, 2000)。

## 【0004】

【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、そのような解明のためには、細胞接着に関与する分子の全貌を明らかにする必要がある。

【0005】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-細胞間接着結合に関与する新規な蛋白質を提供することを課題としている。

## 【0006】

【0006】また、この発明は、この蛋白質を遺伝子工學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。

## 【0007】

【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、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ド。
- (5) 配列番号1の塩基配列を有する前記発明(2)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(2)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(2)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。

【0008】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

、ネクチン - 3、ネクチン - 3 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。

【0009】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。

【0010】

【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1650bp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549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2178bpの塩基配列を有している。

【0011】発明(2)のネクチン - 3は、配列番号3に塩基配列を示した1533bp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510のアミノ酸配列を有している。

【0012】発明(3)のネクチン - 3は、配列番号5に塩基配列を示した1317bp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438のアミノ酸配列を有している。

【0013】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。

【0014】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た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。

【0015】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。

【0016】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。

【0017】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。

【0018】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。

【0019】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cDNA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(PCR)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。

【0020】一般に哺乳動物の遺伝子は個体差による多型が頻りに認められる。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。

【0021】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。

【0022】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cDNA断片(10bp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。

【0023】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。

【0024】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 cDNAの分子クローニング

EST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-nectin-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. 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I-アファディン抗体を文献(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EastmanCodak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。

【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- 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。

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。

【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-1α	S F I S K K E W Y V
Nectin-1β	V R T T E P R G E C
Nectin-2α	S L I S R R A V Y V
Nectin-2δ	D E F V S R A M Y V
Nectin-3α	S V I S R R E W Y V
Nectin-3β	L Y I N P R E H Y V
Nectin-3γ	L G Q V R A L E D T

【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、-1、-2および-2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およびネクチン-2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および

ネクチン-3) が見出された。ネクチン-3のcDNA (翻訳領域) は1533bp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)。

10 【0031】ネクチン-3のcDNA (翻訳領域) は1317bp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、-3および-3のアミノ酸配列 (1文字記号) の比較図である。

20 【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cis 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 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  $Ca^{2+}$  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。Dil 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4 A 1 - A 3)、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、Dil 標識された細胞株 nectin-3 -L-cells が非標識細胞株 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4 B 1 - B 3)。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4 C 1 - C 3)。

【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5 A 1 - A 3) 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5 B 1 - B 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5 C 1 - C 3)。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6 A)。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6 B)。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6 C)。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7 A 1 および A 2)。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7 B 1)。同様の結果は細胞株 nectin-2 /3 -L cells においても得られた (図7 B 2)。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、ノーザンブ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8 A 1 および A 2)。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ブロット分析では、様々な組織において幾つかの mRNA バンドが検出された (図8 A 3)。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8 B 1)。ネクチン-3 は

約5.2-kbおよび3.3-kbのmRNAバンドを示し、これらは精巢で発現していた(図8B2)。ネクチン-3は精巢において約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AJs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のアファ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。

【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。

【0040】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Japan Science and Technology Corporation
<120> Protein Nectine-3
<130>
<140>
<141>
<160> 7
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1650
<212> DNA
<213> Mouse
<220>
<221> CDS
<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
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
gcc ccg acg ccg ccg ccg 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
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

```

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	
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	
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	
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	
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	
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
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	



	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	
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
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				
	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
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
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	
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	
agg gag tgg tat gtc taa				1650
Arg Glu Trp Tyr Val				
	545	550		
<210> 2				
<211> 549				
<212> PRT				
<213> Mouse				
<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				
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  
 130 135 140  
 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys  
 165 170 175  
 Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val  
 180 185 190  
 Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly  
 195 200 205  
 Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp  
 245 250 255  
 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser  
 260 265 270  
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn  
 275 280 285  
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp  
 290 295 300  
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn  
 305 310 315 320  
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr  
 325 330 335  
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val  
 340 345 350  
 Ile Tyr Ile Ser Asp Pro Pro Thr Thr Thr Thr Leu Gln Pro Thr Val  
 355 360 365  
 Gln Trp His Ser Ser Pro Ala Asp Val Gln Asp Ile Ala Thr Glu His  
 370 375 380  
 Lys Lys Leu Pro Phe Pro Leu Ser Thr Leu Ala Thr Leu Lys Asp Asp  
 385 390 395 400  
 Thr Ile Gly Thr Ile Ile Ala Ser Val Val Gly Gly Ala Leu Phe Leu  
 405 410 415  
 Val Leu Val Ser Ile Leu Ala Gly Val Phe Cys Tyr Arg Arg Arg Arg  
 420 425 430  
 Thr Phe Arg Gly Asp Tyr Phe Ala Lys Asn Tyr Ile Pro Pro Ser Asp

	435		440		445											
Met	Gln	Lys	Glu	Ser	Gln	Ile	Asp	Val	Leu	His	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	
	450		455		460											
Ser	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Asn	Pro	Val	Asn	Asn	
465			470		475									480		
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																
<210>	3															
<211>	1533															
<212>	DNA															
<213>	Mouse															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(1)..(1533)															
<400>	3															
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				
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				
gcc	ccg	acg	ccg	ccg	ccg	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				
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		
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	
			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	
	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
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
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
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
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
             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 act			1296
	Glu Glu Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln Lys Asp Leu Leu Gly Gln Thr			
	420	425	430	
	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	
	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			
	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			
	<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			
	130	135	140	
	Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser			
	145	150	155	160
	Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys			
	165	170	175	
	Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val			
	180	185	190	
	Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly			
	195	200	205	

Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr  
 210 215 220  
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp  
 245 250 255  
 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser  
 260 265 270  
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn  
 275 280 285  
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp  
 290 295 300  
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn  
 305 310 315 320  
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr  
 325 330 335  
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val  
 340 345 350  
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val  
 355 360 365  
 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

<210> 5

<211> 1317

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1317)

<400> 5

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  
 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
gcc ccg acg ccg ccg 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
ttc tcc ccg 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
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
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
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
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
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	
130	135
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
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
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
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
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
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
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
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
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  
 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  
 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

cgf gct ctc gaa gac act taa 1317  
 Arg Ala Leu Glu Asp Thr  
 435

<210> 6  
 <211> 438  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <400> 6

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  
 130                      135                      140  
 Lys Tyr Ile Cys Lys Ala Val Thr Phe Pro Leu Gly Asn Ala Gln Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Thr Thr Val Thr Val Leu Val Glu Pro Thr Val Ser Leu Ile Lys  
 165                      170                      175  
 Gly Pro Asp Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Glu Thr Val Ala Ala Val  
 180                      185                      190  
 Cys Val Ala Ala Thr Gly Lys Pro Val Ala Gln Ile Asp Trp Glu Gly  
 195                      200                      205  
 Asp Leu Gly Glu Met Glu Ser Ser Thr Thr Ser Phe Pro Asn Glu Thr  
 210                      215                      220  
 Ala Thr Ile Val Ser Gln Tyr Lys Leu Phe Pro Thr Arg Phe Ala Arg  
 225                      230                      235                      240  
 Gly Arg Arg Ile Thr Cys Val Val Lys His Pro Ala Leu Glu Lys Asp  
 245                      250                      255  
 Ile Arg Tyr Ser Phe Ile Leu Asp Ile Gln Tyr Ala Pro Glu Val Ser  
 260                      265                      270  
 Val Thr Gly Tyr Asp Gly Asn Trp Phe Val Gly Arg Lys Gly Val Asn  
 275                      280                      285  
 Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe Lys Ser Val Trp  
 290                      295                      300  
 Ser Arg Leu Asp Gly Gln Trp Pro Asp Gly Leu Leu Ala Ser Asp Asn  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Leu His Phe Val His Pro Leu Thr Val Asn Tyr Ser Gly Val Tyr  
 325                      330                      335  
 Val Cys Lys Val Ser Asn Ser Leu Gly Gln Arg Ser Asp Gln Lys Val  
 340                      345                      350  
 Ile Tyr Ile Ser Asp Ile Pro Leu Thr Gln Thr Ser Ser Ile Ala Val  
 355                      360                      365  
 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 Val  
 420                      425                      430  
 Arg Ala Leu Glu Asp Thr  
 435  
 <210> 7  
 <211> 2178  
 <212> DNA  
 <213> Mouse  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (197)..(1846)  
 <400> 7  
 gaattcggca cgagcgacgg cggagtcgag gcagccgca gcgctcggcc gaggggcgc 60

```

gggcggcgac ggcgcaggag ccgggggttg aggacacgcg cgctggcct tccgcgccgc 120
ggccgcccgc gccgcccca cccagagcct gaggcgccgg ggcgcgggcg agcgggtggg 180
ccggggcaag gcgggc atg gcg cgg acc ccg 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
      15           20           25
ctg ctg ctg ccg gcc ccg acg ccg ccg ctg ctg ctg ctg ctt att 328
Leu Leu Leu Pro Ala Pro Thr Pro Pro Pro 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
      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
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
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
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
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
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
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

```

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
Lys Gly Val Asn Leu Lys Cys Asn Ala Asp Ala Asn Pro Pro Pro Phe	
285 290 295 300	
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	
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
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
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	
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	
445 450 455 460	
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	
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	

```

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 cgcgacttca 1866
Val Ile Ser Arg Arg Glu Trp Tyr Val

                545                550
ctatgtacaa ggtttcattc acactagtgtg accattttca gattgttcat actttttctt 1926
gaggaagaat aagctttttc aagtgtgattt cgagcttact ttttatattc tgatctgaca 1986
aatgaaaatg taaaacctgg gttcaatgta tctgagctgc tttacagttt tcaactgctat 2046
actactgtct caagatttaa attctaagtc agagtacttt attggctctga ggcacacagg 2106
taagaaagat gtcaacgtta aatgtatgac gtttttgga caaaaattaa aaaaaaaaaa 2166
aaaaaaaaactcg ag 2178

```

【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100µm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40µmを示す。

【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10µmを示す。

【図6】trans hetero-interaction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。

【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。

【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10µmである。

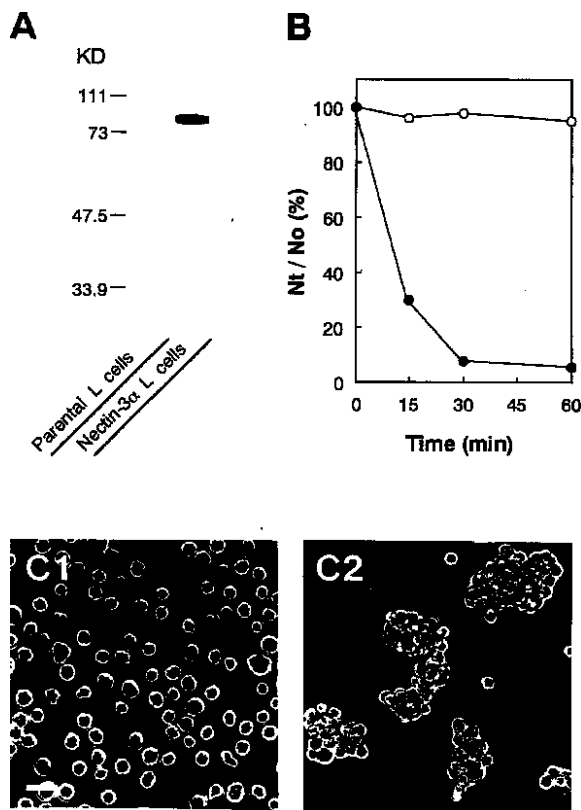
【図10】アフアディンとネクチン-3 との直接的な

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。

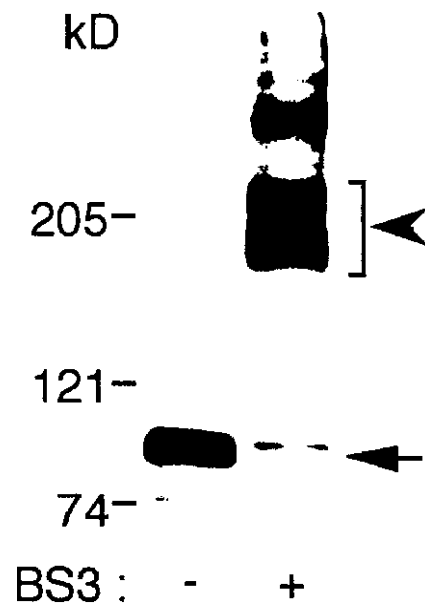
【図1】

Nectin-3 $\alpha$	MARTPGAPFLCPGGGKAQLSSAFPFAAGLLLPARTPPPLLLLIPLLLSRLCGALAGS	60
Nectin-3 $\beta$	MARTPGAPFLCPGGGKAQLSSAFPFAAGLLLPARTPPPLLLLIPLLLSRLCGALAGS	60
Nectin-3 $\gamma$	MARTPGAPFLCPGGGKAQLSSAFPFAAGLLLPARTPPPLLLLIPLLLSRLCGALAGS	60
Nectin-3 $\alpha$	IVEPHVTAVWGKNVSLKCLIEVNETITDISWFKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSSVQGDYQGR	120
Nectin-3 $\beta$	IVEPHVTAVWGKNVSLKCLIEVNETITDISWFKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSSVQGDYQGR	120
Nectin-3 $\gamma$	IVEPHVTAVWGKNVSLKCLIEVNETITDISWFKIHGKSTQTVAVHHPOYGFSSVQGDYQGR	120
Nectin-3 $\alpha$	VLFKNYSLNDATITLHNIQFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITVTVLVEPTVSLIKGPD	180
Nectin-3 $\beta$	VLFKNYSLNDATITLHNIQFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITVTVLVEPTVSLIKGPD	180
Nectin-3 $\gamma$	VLFKNYSLNDATITLHNIQFSDSGKYICKAVTFPLGNAQSSITVTVLVEPTVSLIKGPD	180
Nectin-3 $\alpha$	LIDGGNETVAAVCVAAATGKPVADIDWEGDLGEMESSTISFPNETATIVSOYKLFPTRFAR	240
Nectin-3 $\beta$	LIDGGNETVAAVCVAAATGKPVADIDWEGDLGEMESSTISFPNETATIVSOYKLFPTRFAR	240
Nectin-3 $\gamma$	LIDGGNETVAAVCVAAATGKPVADIDWEGDLGEMESSTISFPNETATIVSOYKLFPTRFAR	240
Nectin-3 $\alpha$	GRRITCVVKHPALEKDIRYSFILDIOYAPEVSVTGYDGNWVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3 $\beta$	GRRITCVVKHPALEKDIRYSFILDIOYAPEVSVTGYDGNWVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3 $\gamma$	GRRITCVVKHPALEKDIRYSFILDIOYAPEVSVTGYDGNWVGRKGVNLCNADANPPPF	300
Nectin-3 $\alpha$	KSVWSRLDQGWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVYVCKVSNLSGORSQOKVIYISDIP	360
Nectin-3 $\beta$	KSVWSRLDQGWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVYVCKVSNLSGORSQOKVIYISDIP	360
Nectin-3 $\gamma$	KSVWSRLDQGWPDGLLASDNTLHFVHPLTVNYSGVYVCKVSNLSGORSQOKVIYISDIP	360
Nectin-3 $\alpha$	TTTLQPTVQWHSFPADVQDIATEHKKLPFPLSTLATLKDDTIQTIIASVVGALFLVLVS	420
Nectin-3 $\beta$	TQTSSIAVAGAVIGAVLALFIITVFVTVLLTPRKKRPSYLDKVIDLPPTHKPPVYEEER	420
Nectin-3 $\gamma$	TQTSSIAVAGAVIGAVLALFIITVFVTVLLTPRKKRPSYLDKVIDLPPTHKPPVYEEER	420
Nectin-3 $\alpha$	ILAGVFCYRRRTFRGDYFAKNYIPFSDMQKESQIDVLHQDELDSYFDSVKKENKNPVNN	480
Nectin-3 $\beta$	PSLPQKDLLGQTEHLPLQTFKEKGAQGLQPSNGPISRRFDYEDESTMQEGGTQRMCPLY	480
Nectin-3 $\gamma$	PSLPQKDLLGQVRALED	438
Nectin-3 $\alpha$	LIRKDYLEEPEKTQWNNVENLTFRFRPMDYYEDLKMGMKFVSDERYNESEDGLVSHVDGS	540
Nectin-3 $\beta$	SGMCHQDRSPRQHHPRNPERLYINPREHYV	510
Nectin-3 $\gamma$		
Nectin-3 $\alpha$	VISRREWYV	548
Nectin-3 $\beta$		
Nectin-3 $\gamma$		

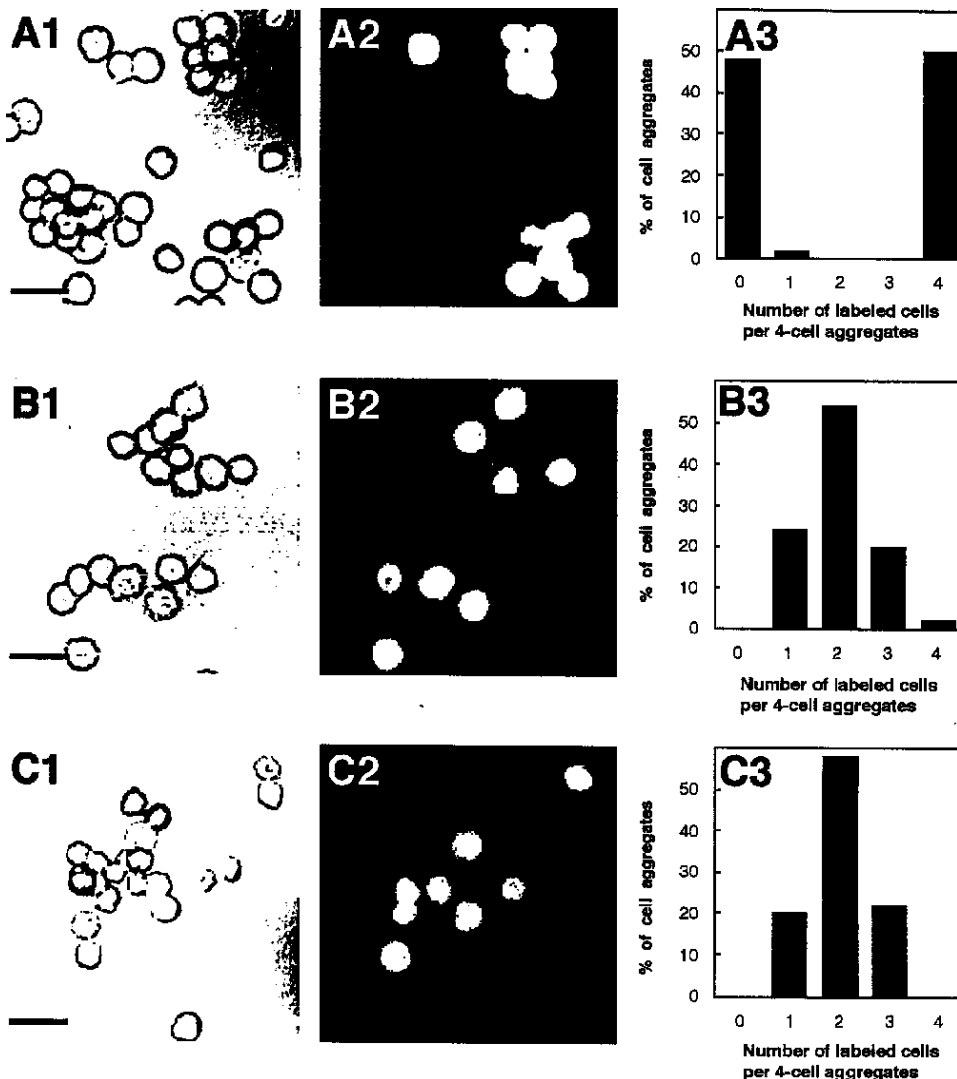
【図2】



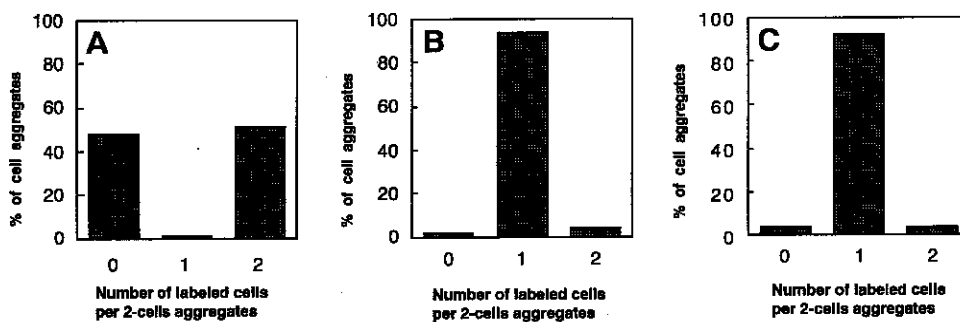
【図3】



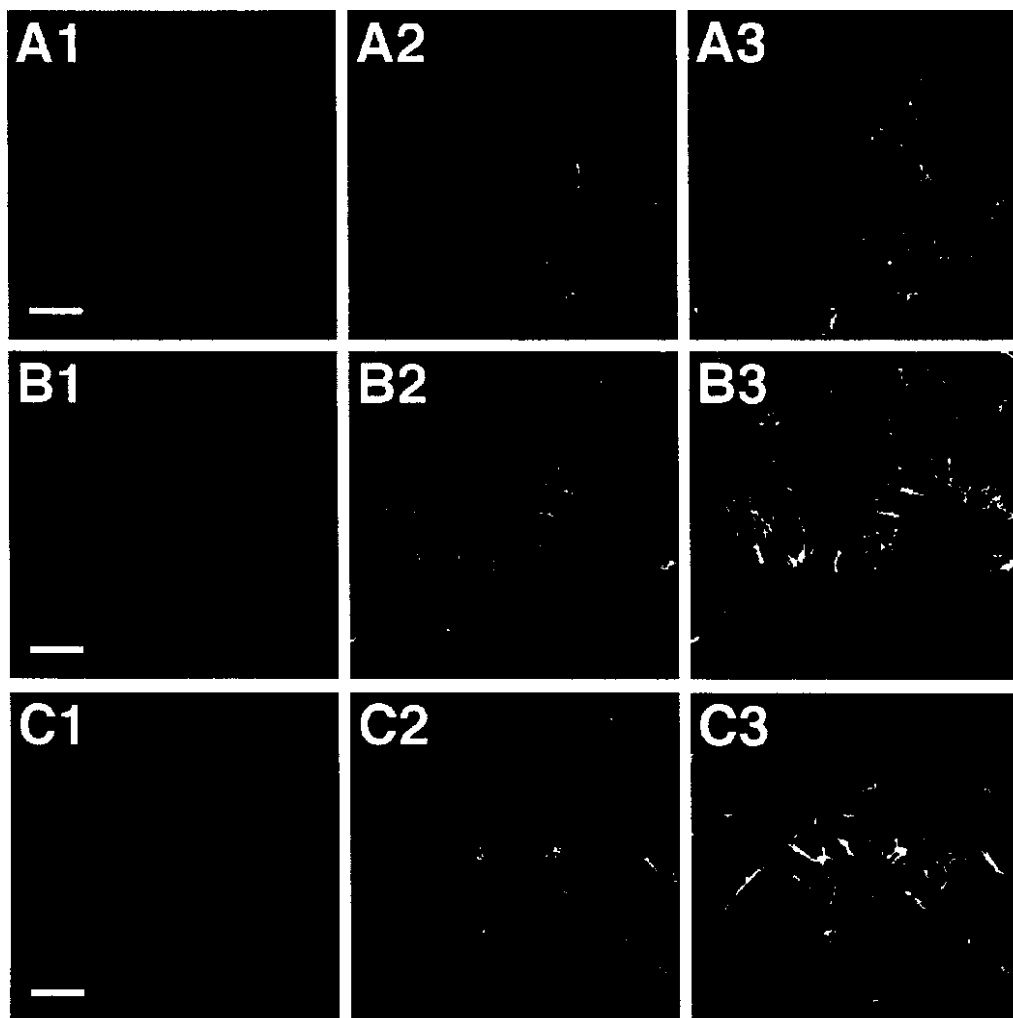
【図4】



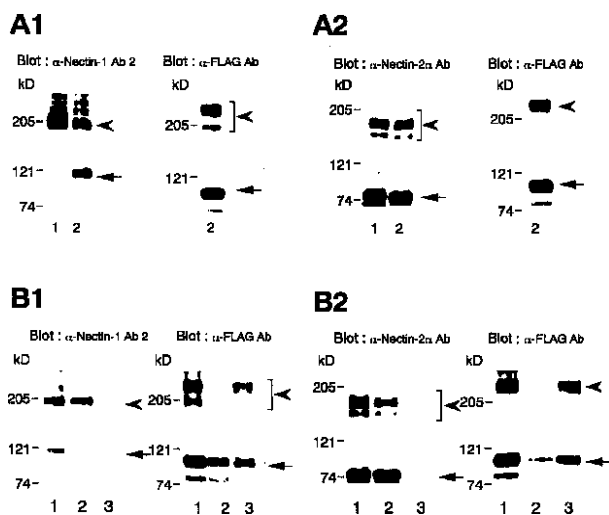
【図6】

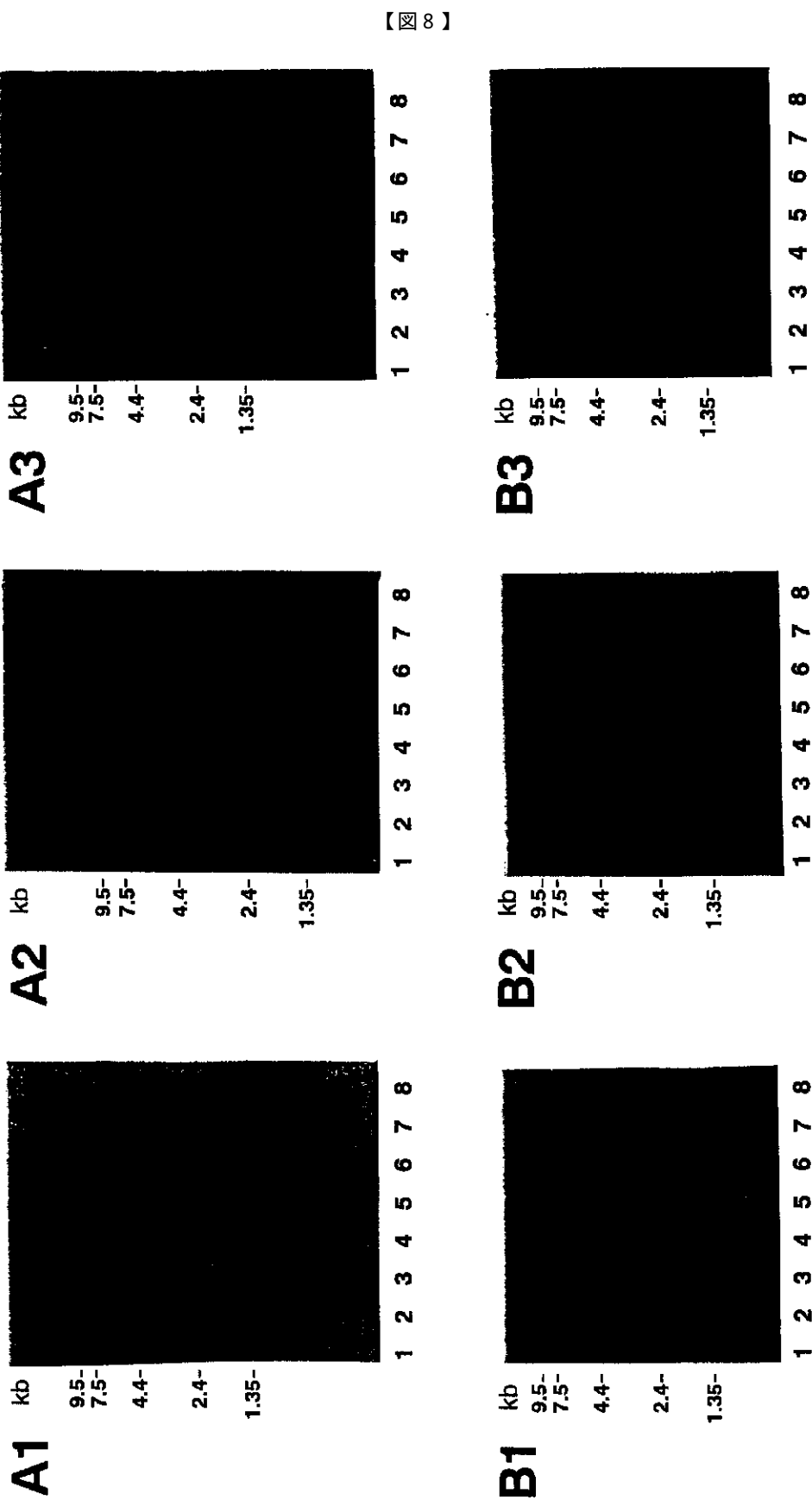


【図5】



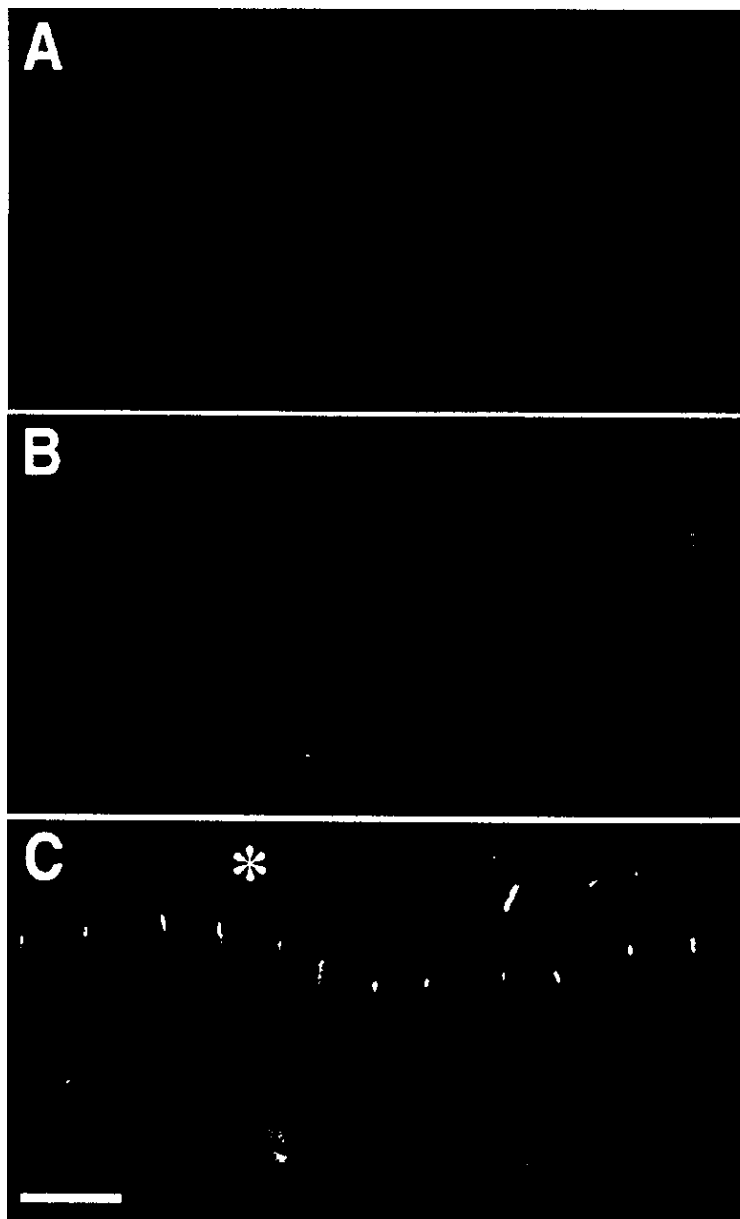
【図7】



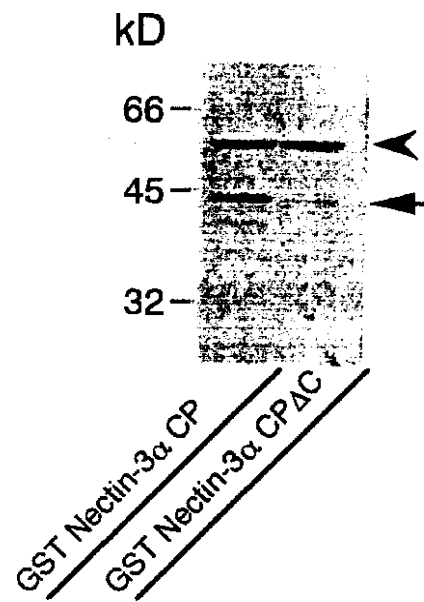




【図9】



【図10】



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2丁目5番地の  
110
- (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81番  
地 セルシオン桂205号
- (72)発明者 高橋 健一  
兵庫県神戸市垂水区桃山台1-16 JCR  
コート310

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA20 BA53 BA80  
CA04 DA02 EA04 GA11  
4B064 AG01 AG27 BA14 CA10 CA19  
CA20 CC24 DA01 DA14 DA20  
4B065 AA91X AA91Y AB01 AB05  
AC14 BA02 BA08 CA25 CA26  
CA44 CA46 CA60  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA53 CA45  
DA75 DA76 EA28 EA51 FA72  
FA74 HA05 HA06

10