

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-217745

(P2011-217745A)

(43) 公開日 平成23年11月4日(2011.11.4)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|-----------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B 0 2 4 |
| C O 7 K 14/47 (2006.01) | C O 7 K 14/47 | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 C | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 O 2 | 4 B 0 6 5 |
| C O 7 K 16/28 (2006.01) | C O 7 K 16/28 | 4 C 0 8 5 |

審査請求 有 請求項の数 23 O L 外国語出願 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-76144 (P2011-76144)
 (22) 出願日 平成23年3月30日 (2011. 3. 30)
 (62) 分割の表示 特願2000-542360 (P2000-542360) の分割
 原出願日 平成11年3月31日 (1999. 3. 31)
 (31) 優先権主張番号 9801164-6
 (32) 優先日 平成10年4月2日 (1998. 4. 2)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)
 (31) 優先権主張番号 9900319-6
 (32) 優先日 平成11年1月28日 (1999. 1. 28)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 509254926
 キシンテラ、アクチボラグ
 X I N T E L A A B
 スウェーデン国エスエー - 2 3 7 3 3、
 ビエレッド、トルルスヨペーゲン、1 6 5
 、ケアオブ、エヴィ、ルンドグレン-オケ
 ルルンド
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (74) 代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰

最終頁に続く

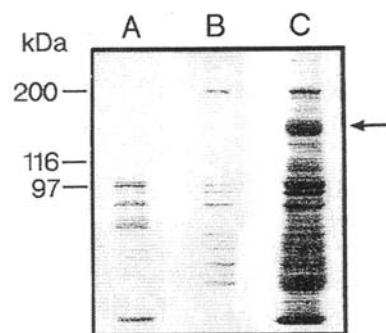
(54) 【発明の名称】 インテグリンヘテロ二量体およびそのサブユニット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規サブユニット 10をサブユニット と共に含む組換え体または単離インテグリンヘテロ二量体を提供する。

【解決手段】 10インテグリンは、ウシ軟骨細胞から、コラーゲン - II型アフィニティカラム上で精製することができる。インテグリンまたはサブユニット 10はあらゆる型の細胞の、例えば軟骨細胞、骨芽細胞および線維芽細胞のマーカーまたは標的として使用することができる。インテグリンまたはそのサブユニット 10は、種々の生理学的または治療方法におけるマーカーまたは標的として使用することができる。それらは、医薬組成物およびワクチンにおける活性成分として使用することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなる組換え型または単離型インテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片。

【請求項 2】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなる組換えインテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片の製造方法であって、

a) インテグリンサブユニット 10 をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を単離し、

b) 単離されたポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを構築し、

c) 宿主細胞をその発現ベクターで形質転換し、

d) 形質転換宿主細胞においてインテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を発現するに好適な条件下の培地で形質転換宿主細胞を培養し、さらに所望により、

e) 形質転換宿主細胞または培養培地からインテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を単離する工程を含んでなる方法。

【請求項 3】

インテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を製造し、それによりサブユニットがそれが天然に存在する細胞から単離される方法。

【請求項 4】

インテグリンサブユニット 10、またはその相同体もしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、ポリヌクレオチドが配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列またはその好適な一部を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

インテグリンサブユニット 10、またはその相同体もしくは断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、単離ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

インテグリンサブユニット 10、またはその相同体もしくは断片をコードし、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列またはその一部を含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 7】

インテグリンサブユニット 10、またはその相同体もしくは断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 8】

請求項 6 および 7 のいずれか 1 項で定義されたベクターを含む細胞。

【請求項 9】

インテグリンサブユニット 10、またはその相同体もしくは断片をコードし、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列またはその一部を含んでなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが細胞ゲノムに安定的に組み込まれている、請求項 2 の方法により作出される細胞。

【請求項 10】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニットアミノ酸 10、またはその相同体もしくは断片に特異的に結合する能力を有する結合物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、天然のインテグリン結合リガンド、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ならびにその断片からなる群から選択される、請求項 1 0 記載の結合物。

【請求項 1 2】

サブユニット 1 0 およびサブユニット を含んでなり、サブユニット 1 0 が配列番号 1 または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列、ならびに同等の生物学的活性を有するその相同体および断片を含んでなる、組換え型または単離型インテグリンヘテロ二量体。

【請求項 1 3】

サブユニット が 1 である、請求項 1 2 記載の組換え型または単離型インテグリンヘテロ二量体。 10

【請求項 1 4】

サブユニット 1 0 およびサブユニット を含んでなり、サブユニット 1 0 が配列番号 1 または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列、およびその相同体および断片を含んでなる組換えインテグリンヘテロ二量体の製造方法であって、

a) インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 1 0 をコードするヌクレオチド配列と、所望によりインテグリンヘテロ二量体のサブユニット をコードするヌクレオチド配列を含むもう 1 つのポリヌクレオチド、または同等の生物学的活性を有する相同体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドとを含んでなる 1 つのポリヌクレオチドを単離し、 20

b) サブユニット 1 0 をコードする単離ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを、所望によりサブユニット をコードする単離ヌクレオチドを含んでなる発現ベクターと組み合わせて構築し、

c) 宿主細胞を発現ベクターで形質転換し、

d) 形質転換宿主細胞においてサブユニット 1 0 およびサブユニット 、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体を発現させるのに好適な条件下の培地で形質転換宿主細胞を培養し、さらに所望により、

e) 形質転換宿主細胞または培地から、サブユニット 1 0 およびサブユニット 、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、あるいはその 1 0 サブユニットを単離する工程を含んでなる方法。 30

【請求項 1 5】

サブユニット 1 0 およびサブユニット 、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体を製造し、それによりインテグリンヘテロ二量体がそれが天然に存在する細胞から単離される方法。

【請求項 1 6】

インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 1 0 、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片をコードし、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列またはその一部を含むポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを含んでなる第 1 のベクターと、インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 、またはその相同体もしくは断片をコードするポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを含む第 2 のベクターとを含む細胞。 40

【請求項 1 7】

サブユニット 1 0 およびサブユニット 、またはその相同体もしくは断片、または同等の生物学的活性を有するそのサブユニット 1 0 を含んでなるインテグリンヘテロ二量体と特異的に結合する能力を有する結合物。

【請求項 1 8】

サブユニット が 1 である、請求項 1 7 記載の結合物。

【請求項 1 9】

タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、天然のインテグリン結合リガンド、およびその断片からなる群から選択される、請求項 1 7 または 1 8 記載の結合物。 50

【請求項 20】

細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、インテグリンサブユニット 10 の断片。

【請求項 21】

アミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q を含んでなるペプチドである、請求項 20 記載の断片。

【請求項 22】

配列番号 1 のアミノ酸 9 5 2 番付近からアミノ酸 9 8 6 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 20 記載の断片。

【請求項 23】

配列番号 1 のアミノ酸 1 4 0 番付近からアミノ酸 3 3 7 番付近までのアミノ酸配列を含んでなるペプチドである、請求項 20 記載の断片。

【請求項 24】

請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項で定義されたインテグリンサブユニット 10 の断片の製造方法であって、保護基を含むアミノ酸の一連の付加を含んでなる方法。

【請求項 25】

請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項で定義されたインテグリンサブユニット 10 の断片をコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項 26】

請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項で定義されたヒトインテグリンサブユニット 10 の断片と特異的に結合する能力を有する結合物。

【請求項 27】

タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、天然のインテグリン結合リガンド、およびその断片からなる群から選択される、請求項 26 記載の結合物。

【請求項 28】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10 およびサブユニット、または同等の生物学的活性を有するそのインテグリンもしくはサブユニットの相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体を、インテグリンサブユニット 10 を発現する細胞または組織（この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである）のマーカーもしくは標的分子として使用する方法。

【請求項 29】

断片が細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

断片がアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q を含んでなるペプチドである、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

断片が配列番号 1 のアミノ酸 9 5 2 番付近からアミノ酸 9 8 6 付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 29 記載の方法。

【請求項 32】

断片が配列番号 1 のアミノ酸 1 4 0 番付近からアミノ酸 3 3 7 付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 29 記載の方法。

【請求項 33】

サブユニット が 1 である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 34】

細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、請求項 28 記載の方法。

【請求項 35】

サブユニット 10 に関与する病状の際に使用される、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

【請求項 36】

病状が軟骨の損傷を含む、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

病状が外傷、慢性関節リウマチおよび変形性関節症を含む、請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

胚発達中の軟骨の形成を検出する方法である、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

軟骨の生理学上または治療上の修復を検出する方法である、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 40】

軟骨細胞の選択および分析、または選別、単離もしくは精製する方法である、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

軟骨または軟骨細胞の移植の際の軟骨または軟骨細胞の再生を検出する方法である、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

軟骨細胞の分化の *in vitro* 研究のための方法である、請求項 28 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 43】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片と特異的に結合する能力を有する結合物を、インテグリンサブユニット 10 を発現する細胞または組織（この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである）のマーカーもしくは標的として使用する方法。

【請求項 44】

断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、請求項 43 記載の方法。

30

【請求項 45】

断片がアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q を含んでなるペプチドである、請求項 43 記載の方法。

【請求項 46】

断片が配列番号 1 のアミノ酸 952 番付近からアミノ酸 986 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 43 記載の方法。

【請求項 47】

断片が配列番号 1 のアミノ酸 140 番付近からアミノ酸 337 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 43 記載の方法。

【請求項 48】

サブユニット が 1 である、請求項 43 記載の方法。

40

【請求項 49】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10 およびサブユニット、もしくは同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体の存在を検出する方法である、請求項 43 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

胚発達、血管形成または癌の発達中の細胞の分化段階を決定する方法である、請求項 43 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

50

インテグリンサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するそのインテグリンサブユニットの相同体もしくは断片の存在を細胞において検出する方法であって、配列番号1で示されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、これらがインテグリンサブユニット 1をコードするDNAもしくはRNAとはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。

【請求項52】

細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、請求項51記載の方法。

【請求項53】

断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、請求項51記載の方法。

【請求項54】

断片がアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQを含んでなるペプチドである、請求項53記載の方法。

【請求項55】

断片が配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項53記載の方法。

【請求項56】

断片が配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項53記載の方法。

【請求項57】

組織の再生または治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する方法である、請求項43～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

病状がインテグリンサブユニット 10に關与するいずれかの病状である、請求項57記載の方法。

【請求項59】

病状が慢性関節リウマチ、変形性関節炎および癌である、請求項58記載の方法。

【請求項60】

細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、請求項57記載の方法。

【請求項61】

組織の再生および治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する方法であって、配列番号1で示されるヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、それらがインテグリンサブユニット 10をコードするDNAまたはRNAとはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。

【請求項62】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、請求項61記載の方法。

【請求項63】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドがアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQを含んでなるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、請求項62記載の方法。

【請求項64】

ペプチドが配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項62記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 65】
ペプチドが配列番号 1 のアミノ酸 140 番付近からアミノ酸 337 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、請求項 62 記載の方法。
- 【請求項 66】
病状がインテグリンサブユニット 10 に関与するいずれかの病状である、請求項 61 記載の方法。
- 【請求項 67】
病状が慢性関節リウマチ、変形性関節炎または癌である、請求項 66 記載の方法。
- 【請求項 68】
病状がアテローム性動脈硬化症または炎症である、請求項 66 記載の方法。 10
- 【請求項 69】
細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、請求項 61 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 70】
サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンまたはサブユニット 10 の相同体もしくは断片を標的分子として使用できる医薬剤または抗体を有効成分として含んでなる医薬組成物。
- 【請求項 71】
軟骨、骨および血管の形成を刺激、阻害またはブロックするのに用いられる、請求項 70 記載の医薬組成物。 20
- 【請求項 72】
癒着が組織の機能を損なう感染、炎症および外科手術的介入後の腱 / 靭帯と周辺組織との間の癒着を防ぐのに用いられる、請求項 70 記載の医薬組成物。
- 【請求項 73】
サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片、またはインテグリンサブユニット 10 をコードする DNA もしくは RNA を有効成分として含んでなるワクチン。
- 【請求項 74】
軟骨または軟骨細胞の移植におけるインテグリンサブユニット 10 の、マーカーまたは標的としての使用。 30
- 【請求項 75】
軟骨細胞および / または骨芽細胞の、移植片の表面への接着を促進して骨の組み込みを刺激するために、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10 およびサブユニット、または同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体と特異的に結合する能力を有する結合物を使用する方法。
- 【請求項 76】
腱、靭帯、骨格筋または癒着が組織の機能を損なうその他の組織における、インテグリンサブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片の、抗癒着薬または分子の標的としての使用。 40
- 【請求項 77】
軟骨または骨の形成を刺激、阻害またはブロックする方法であって、サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片を標的分子として使用できる医薬または抗体の好適量を患者に投与することを含んでなる方法。
- 【請求項 78】 50

癒着が組織の機能を損なう感染、炎症および外科手術的介入後の腱/靭帯および周辺組織間の癒着を防ぐ方法であって、サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片を標的分子として使用できる医薬または抗体の好適量を患者に投与することを含んでなる方法。

【請求項 79】

サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片の活性化または阻害により細胞マトリックス合成および修復を刺激する方法。

10

【請求項 80】

インテグリン結合物の存在を *in vitro* で検出する方法であって、サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニットの相同体もしくは断片とサンプルとを相互作用させ、それによりインテグリン、サブユニット 10、または同等の生物学的活性を有する相同体もしくは断片を活性化させて、サンプル中に存在するその天然のリガンドまたはその他のインテグリン結合タンパク質への結合を変調することを含んでなる方法。

【請求項 81】

サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるヒトヘテロ二量体インテグリン、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニットの相同体もしくは断片とインテグリン結合物との相互作用の結果を *in vitro* で研究し、それにより細胞反応を誘導する方法。

20

【請求項 82】

相互作用の結果が細胞機能の変化として測定される、請求項 81 記載の方法。

【請求項 83】

インテグリンサブユニット 10 またはその相同体もしくは断片をコードする DNA または RNA を標的分子として使用する方法。

【請求項 84】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10 またはその相同体もしくは断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、請求項 83 記載の方法。

30

【請求項 85】

サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるヒトヘテロ二量体インテグリン、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニットの相同体もしくは断片、またはインテグリンサブユニット 10 またはその相同体もしくは断片をコードする DNA もしくは RNA を血管形成の際の標的分子として使用する方法。

【請求項 86】

サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または同等の生物学的活性を有するインテグリンもしくはサブユニット 10 の相同体もしくは断片の細胞表面発現を刺激することができる医薬または抗体を有効成分として含んでなる医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、サブユニット 10 およびサブユニット を含む組み換え体または単離インテグリンヘテロ二量体、そのサブユニット 10、上記インテグリンの相同体およびフラグメントならびに類似の生物学的活性を有する上記サブユニット 10 の相同体およびフラグメント、その生産方法、それをコードするポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド、それを含むベクターおよび細胞、それに特異的に結合する結合実体、ならびにその

50

使用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

インテグリンは、細胞-細胞および細胞-マトリックス相互反応を仲介するトランスメン
 ンブラン糖タンパク質の大きなファミリーである(1-5)。この超ファミリーの全ての
 既知メンバーは、 α -および β -サブユニットからなる非共有結合的に会合したヘテロ二
 量体である。現在では、八つの β -サブユニット(1-8)(6)および十六の α -
 サブユニット(1-9、V、M、L、X、IIb、EおよびD)が特徴
 付けられており(6-21)、これらのサブユニットは会合して20を超す異種のインテ
 グリンを生ずる。1サブユニットは10種の異なった β -サブユニット1-9およ
 びVと会合することが証明され、かつ、コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチン
 等の細胞外マトリックスタンパク質との相互反応を仲介することが証明されている。主た
 るコラーゲン結合インテグリンは $\alpha 1 \beta 1$ および $\alpha 2 \beta 1$ (22-25)である(22-
 25)。インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ および $\alpha 9 \beta 1$ もコラーゲンと相互反応すると報告されて
 いるが(26, 27)、この相互反応については十分に理解されていない(28)。 α -
 および β -インテグリンサブユニットの細胞外N-末端領域はリガンドの結合に重要であ
 る(29, 30)。この β -サブユニットの末端領域はFGおよびGAP共通配列を含む
 7回折畳み繰り返し配列(12, 31)からなる。この繰り返しは、推定2価カチオン結
 合サイト含む最後の3回または4回繰り返し部分を伴った α -プロペラー領域(32)へ
 と折り畳むことが予見される。 α -インテグリンサブユニット1、2、D、E、
 L、M、Xは~200アミノ酸挿入領域であるI-領域(A~領域)を含み、この
 ことは von Willebrand 因子、軟骨マトリックスタンパク質および補体因子C2 およびB
 (33, 34)中の配列に対する類似性を示す。このI-領域は、第2および第3FG-
 GAP繰り返し体間に局在し、金属依存性付着サイト(MIDAS)を含み、かつ、このもの
 はリガンドの結合に関与する(35-38)。

10

20

【0003】

軟骨中の唯一の細胞型である軟骨細胞は、 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、
 $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha V \beta 3$ および $\alpha V \beta 5$ (39-41)を包含する多数の異なったインテグリン
 を発現する。 $\alpha 1 \beta 1$ および $\alpha 2 \beta 1$ は軟骨の主成分の一つであるII型コラーゲン(25)
 との軟骨細胞相互反応を仲介することが判明している。また $\alpha 2 \beta 1$ は軟骨マトリ
 ックスタンパク質コンドロアドヘリン(42)に対する受容体である。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

この発明はサブユニット10を、サブユニット特にサブユニット1と会合した形態
 で含む新規コラーゲン型II結合インテグリンに関するものであるが、他の β -サブユニ
 ットも顧慮に値する。好ましい実施対様では、このインテグリンはヒトまたはウシの間接
 軟骨細胞ならびにヒト軟骨肉腫細胞から単離されている。

【0005】

またこの発明は、サブユニット好ましくはサブユニット1と会合したサブユニット
 10を含むウシインテグリンヘテロ二量体等の、他の種から単離した上記インテグリンの
 インテグリン相同体、ならびにヒト細胞の他の型からまたは他の種由来の細胞から単離し
 た相同体も包含する。

40

【0006】

この発明は具体的には、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2 で示されるアミノ酸配列を
 含む組み換え体または単離インテグリンサブユニット10に関し、かつ、同じ生物学的活
 性を示す、その相同体またはフラグメントに関する。

【0007】

この発明はさらに、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2 で示されるアミノ酸配列を含む
 組み換えインテグリンサブユニット10、または類似の生物学的活性を示すその相同体も

50

しはフラグメントの生産方法に関し、この方法は次の工程：

- a) インテグリンサブユニット 10をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、または類似の生物学的活性を示すその相同体もしくはフラグメントを単離し；
 - b) 単離したポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築し；
 - c) 上記発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフォームし；
 - d) トランスフォームされた宿主細胞を、インテグリンサブユニット 10 の発現に適する条件下の培地中で、または類似の生物学的活性をトランスフォームされた宿主細胞中で示すそれらの相同体もしくはフラグメントの発現に適する条件下の培地中で培養し；かつ任意に、
 - e) インテグリンサブユニット 10、または類似の生物学的活性を示すその相同体もしくはフラグメントを上記トランスフォームされ宿主細胞または上記培地から単離する工程；
- を包含する。

10

このインテグリン 10、または類似活性を示すそれらの相同体もしくはフラグメントも、それらが天然に存在する細胞からの単離により提供され得る。

【0008】

この発明はまた、インテグリンサブユニット 10、または類似の生物学的活性を示すそれらの相同体もしくはフラグメントをコードするヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチドにも関し、このポリヌクレオチドは SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるポリヌクレオチド配列、またはその一部を含む。

20

【0009】

この発明はさらに、SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるアミノ酸配列を示すインテグリンサブユニット 10、またはそれらの相同体もしくはフラグメントをコードするDNAまたはRNAに交配する単離ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにも関し、この場合、上記ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドはインテグリンサブユニット 1 をコードするDNAまたはRNAと交配する素質がない。

【0010】

さらなる観点において、この発明は上記ポリヌクレオチドを含むベクターに関し、かつ、上記ベクターを含む細胞および SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるような、これらゲノム中に統合されたポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを有する細胞に関する。

30

【0011】

この発明はまた、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、天然リガンド、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体等の、インテグリンサブユニット 10またはそれらの相同体もしくはフラグメントへの特異的結合能力を有する結合実体にも関する。

【0012】

さらなる観点でこの発明は、サブユニット 10およびサブユニット を含む組み換え体または単離インテグリンヘテロ二量体に関し、この場合、サブユニット 10は SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるようなアミノ酸配列または類似の生物学的活性を示す相同体またはフラグメントを含む。好ましい実施態様では、このサブユニット は 1 である。

40

【0013】

またこの発明は、サブユニット 10およびサブユニット を含む組み換え体インテグリンヘテロ二量体の生成方法にも関し、この場合、このサブユニット 10は SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるようなアミノ酸配列を含み、この方法は次の工程：

- a) インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 10をコードするヌクレオチド配列を含む一つのポリヌクレオチド、および任意に、インテグリンヘテロ二量体のサブユニット または類似の生物学的活性を示すその相同体またはフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む他のポリヌクレオチドを単離し；
- b) 上記サブユニット をコードする上記単離ヌクレオチドを含む発現ベクターとの組み

50

合わせで、上記サブユニット 10をコードする上記単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築し；

c) 上記発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフォームし；

d) トランスフォームされた上記宿主細胞を、サブユニット 10および を含むインテグリンヘテロ二量体の発現に適する条件下の培地中で、または類似の生物学的活性を上記トランスフォームされた宿主細胞中で示すその相同体またはフラグメントの発現に適する条件下の培地中で培養し；かつ任意に、

e) サブユニット 10 および を含むインテグリンヘテロ二量体、または同じ生物学的活性を示すその相同体またはフラグメントを上記トランスフォームされた宿主細胞または上記培地から単離する工程；

を包含する。

【0014】

このインテグリンヘテロ二量体、または類似の生物学的活性を示す相同体もしくはフラグメントもまた、これらが天然に存在する細胞からの単離により提供され得る。

【0015】

さらにこの発明は、第1ベクターを含む細胞に関し、この第1ベクターは、インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 10をコードする、または類似の生物学的活性を示すそれらの相同体もしくは部分をコードするポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、SEQ ID No.1または SEQ ID No.2 で示されるようなヌクレオチド配列もしくはそれらの部分、および、任意に第2ベクターを含み、上記第2ベクターは、インテグリンヘテロ二量体のサブユニット またはその相同体もしくはフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0016】

さらなる他の観点では、この発明はサブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体に特異結合し得る、または類似の生物学的活性を示す相同体もしくはフラグメントに特異結合する能力を有する結合実体に関し、この場合のサブユニットは1である。好ましい結合実体はタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、天然リガンド、ポリクロ-ナル抗体およびモノクローナル抗体である。

【0017】

さらなる観点で、この発明はインテグリンサブユニット 10のフラグメントに関し、この場合のフラグメントは細胞質領域、I-領域およびスプライド領域のペプチドを含む群から選択されたペプチドである。

【0018】

一つの実施態様では、上記フラグメントはアミノ酸配列 KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ を含むペプチドである。

【0019】

他の実施態様では、上記フラグメントは SEQ ID No.1 のアミノ酸約952からアミノ酸約986のアミノ酸配列を含む。

【0020】

さらなる実施態様では、上記フラグメントは SEQ ID No.1 のアミノ酸約140からアミノ酸約337のアミノ酸配列を含む。

【0021】

この発明の他の実施態様は、ヒトインテグリンサブユニット 10のフラグメントをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに関する。一つの実施態様ではオリゴヌクレオチドのこのポリヌクレオチドは、細胞質領域、I-領域およびスプライド領域のペプチドを含む群から選択されたペプチドであるフラグメントをコードする。さらなる実施態様では、このポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは上記定義のフラグメントをコードする。

【0022】

この発明はまた、上記定義のインテグリンサブユニット 10のフラグメントに特異的に

10

20

30

40

50

結合し得る能力を有する結合性実体に関する。

【0023】

またこの発明は、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2 で示されるアミノ酸配列を含むインテグリンサブユニット 10、または上記サブユニット 10 およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体、または類似の生物学的活性を示す上記インテグリンの相同体もしくはフラグメントを、上記インテグリンサブユニット 10を発現する細胞もしくは組織のマーカまたは標的分子として含むインテグリンサブユニット 10を使用する方法に関し、この場合の細胞もしくは組織はヒト由来のものを包含する動物細胞もしくは組織である。

【0024】

この方法の実施態様におけるフラグメントは、細胞質領域、I - 領域およびスプライズド領域のペプチドを含む群から選択されたペプチドである。

【0025】

この方法のさらなる実施態様では、このフラグメントはアミノ酸配列 KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ を含むペプチド、または SEQ ID No.1 のアミノ酸 No. 約952 からアミノ酸 No. 約986 のアミノ酸配列を含むフラグメント、または SEQ ID No. 1 のアミノ酸 No. 約140 からアミノ酸約337 のアミノ酸配列を含むフラグメントを含むペプチドである。

【0026】

サブユニット は好ましくは 1 である。この細胞は、軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞または繊維芽細胞からなる群から選択するのが好ましい。

【0027】

上記方法は、軟骨損傷、トラウマ、慢性関節リウマチおよび骨関節炎を包含する病理的症狀等の、上記サブユニット 10が関与する病離的症狀の間に使用できる。

【0028】

上記方法は、胎児性発生期間の軟骨の形成の検出または軟骨の生理学的もしくは治療的修復の検出に使用できる。上記方法はまた、軟骨細胞の選択および分析、または軟骨細胞の仕分け、単離もしくは精製のために使用できる。

【0029】

この方法のさらなる実施態様は、軟骨または軟骨細胞の移植期間中に軟骨または軟骨細胞の再生を検出する方法である。

【0030】

この方法のさらなる実施態様は、軟骨細胞の分化を *in vitro* で研究するための方法である。

【0031】

またこの発明は、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2に見られるアミノ酸配列を含むインテグリンサブユニット 10 に対する特異結合能力を有する結合実体、または上記サブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体に対する特異結合能力を有する結合実体、または、類似の生物学的活性を示すそれらの相同体もしくはフラグメントに対する特異結合能力を有する結合実体を、上記インテグリンサブユニット 10を発現する細胞もしくは組織のマーカまたは標的分子として使用する方法にも関し、この場合の細胞または組織はヒト由来を包含する動物からのものである。

【0032】

上記方法におけるフラグメントは、細胞質領域、I - 領域およびスプライズド領域のペプチドを含む群から選択されたペプチドであってもよい。好ましい実施態様における上記フラグメントはアミノ酸配列 KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、または SEQ No. 1 のアミノ酸配列 約No. 952 からアミノ酸配列 約No. 986 を含むフラグメント、または SEQ No. 1 のアミノ酸配列 約No. 140 からアミノ酸配列 約No. 337 を含むフラグメントを含むペプチドである。

【0033】

10

20

30

40

50

この方法は、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2に見られるアミノ酸配列を含むインテグリンサブユニット 10の存在、または上記サブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体の存在、または類似の生物学的活性を示すその相同体もしくはフラグメントの存在を検出する目的でも使用できる。

【0034】

この方法のさらなる実施態様では、上記方法は胚発生、血管形成、または癌の発生期間中に細胞の分化状態を決定するための方法である。

【0035】

さらなる実施態様におけるこの方法は、インテグリンサブユニット 10の細胞上での存在、または類似生物学的活性を示す上記インテグリンサブユニットの相同体もしくはフラグメントの細胞上での存在を検出する方法であり、この方法ではSEQ ID No.1 に見られるヌクレオチド配列から選択されたポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドを含む群から選択されたポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドが、交配条件下にマーカーとして使用され、この場合、上記ポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドはインテグリンサブユニット 1をコードするDNAもしくはRNAと交配する素質がない。上記細胞は、軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択されてもよい。上記インテグリンフラグメントは、細胞質領域、I - 領域およびスプライド領域から選択された、アミノ酸配列 KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ を含むペプチド等のペプチド、または SEQ ID No.1 のアミノ酸約 No. 952 からアミノ酸約 No. 986、または SEQ ID No.1 のアミノ酸約 No. 140 からアミノ酸約 No. 337を含むフラグメントを包含する群から選択されたペプチドである。

【0036】

さらなる実施態様におけるこの方法は、病理学的症状における、組織再生における、または軟骨の治療もしくは病理学的修復における、発生期間中の細胞の分化状態を決定するための方法である。この病理学的症状は、関節リウマチ、骨関節炎または癌を包含する病理学的症状のいずれでもよい。この細胞は、軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞を包含する群から選択できる。

【0037】

さらなる実施態様におけるこの方法は、病理学的症状における、組織再生における、および軟骨の治療もしくは病理学的修復における、発生期間中の細胞の分化状態を決定するための方法であり、この場合、SEQ ID No.1に見られるポリヌクレオチド配列から選択されたポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドが交配条件下のマーカーとして使用され、この場合の上記ポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドはインテグリンサブユニット 1をコードするDNAもしくはRNAと交配する素質がない。この観点における実施態様は方法を含み、この場合、上記ポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドは、細胞質領域、I - 領域およびスプライド領域のペプチドを含む群から選択されたペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドであり、例えば、アミノ酸配列 KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ を含むペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたは SEQ ID No.1 のアミノ酸約 No. 952 からアミノ酸約No. 986 から選択されたアミノ酸配列または SEQ ID No.1 のアミノ酸約 No. 140 からアミノ酸約No. 337 のアミノ酸配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドである。上記病理学的症状は、関節リウマチ、骨関節炎または癌を包含する病理学的症状のいずれでもよい。この細胞は、軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞を包含する群から選択できる。

【0038】

さらなる観点でこの発明は、サブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体；またはそのサブユニット 10；または類似の生物学的活性を示す上記インテグリンもしくはサブユニット 10の相同体もしくはフラグメント；を使用できる医薬的作因もしくは抗体を活性成分として含む医薬組成物に関する。上記医薬組成物の実施態様は、軟骨、骨もしくは血液導管の形成を刺激、阻害または阻止する目的における組成物

の使用である。さらなる実施態様は、感染、炎症後および外科的介入後の腱/靭帯間および組織周辺間の癒着防止に使用する医薬組成物を包含する。

【0039】

この発明はまた、サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または上記インテグリンもしくはサブユニット 10の相同体またはフラグメント、または上記インテグリンサブユニット 10をコードするDNAもしくはRNAを活性成分として含むワクチンに関する。

【0040】

この発明のさらなる観点は、軟骨または軟骨細胞の移植におけるマーカーまたは標的としての、上記定義のインテグリンサブユニット 10の使用に関する。

10

【0041】

この発明のさらなる観点は、オセオ組み込みを刺激するための移植組織片表面への軟骨細胞および/または骨芽細胞の付着促進目的の、SEQ ID No.1 または SEQ ID No.2 に見られるアミノ酸配列を含むインテグリンサブユニット 10に特異結合する能力を有する結合実体の使用方法、または上記サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体に特異結合する能力を有する結合実体の使用方法、または類似生物学的活性を示すその相同体もしくはフラグメントに特異結合する能力を有する結合実体の使用方法に関する。

【0042】

この発明はまた、インテグリンサブユニット 10または上記サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体を、癒着で組織機能を損なった腱、靭帯、骨格筋における抗癒着薬剤もしくは分子に対する標的として使用することに関する。

20

【0043】

この発明には、軟骨形成もしくは骨形成の刺激、阻害または阻止のための方法に関し、この方法は、サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または類似の生物学的活性を示す上記インテグリンまたはサブユニット 10の相同体もしくはフラグメントを標的分子として使用し得る医薬作用または抗体の適量を、被験者に投与することが包含される。

【0044】

他の実施態様におけるこの発明は、癒着が組織機能を損なった場合の感染後、炎症後、および外科的介入後の腱/靭帯間および周辺組織の癒着防止方法に関するものであり、この方法は、サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または類似の生物学的活性を示す上記インテグリンまたはサブユニット 10の相同体もしくはフラグメントを標的分子として使用し得る医薬作用または抗体の適量を、被験者に投与することを包含する。

30

【0045】

この発明はまた、サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または類似の生物学的活性を示す上記インテグリンの相同体またはフラグメントの活性化または遮断により、細胞外マトリックス合成および修復を刺激する方法に関するものである。

40

【0046】

さらなる観点でこの発明は、サブユニット 10およびサブユニット 10を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、または上記インテグリンまたはサブユニットの相同体もしくはフラグメントの相互反応を包含する、インテグリン結合性実体の存在を *in vitro* で検出するための方法に関し、この方法では、上記インテグリン、サブユニット 10、または類似生物学的活性を示すその相同体もしくはフラグメントをして、その天然リガンドへの結合性または試料中に存在する他のインテグリン結合性タンパク質への結合性を変調せしめるための試料を使用する。

【0047】

この発明はまた、サブユニット 10およびサブユニット 10、またはそのサブユニット

50

10、または上記インテグリンまたはサブユニットの相同体もしくはフラグメントを含むヒトヘテロ二量体インテグリンの相互反応の結果を *in vitro* で研究する方法に関し、この方法では、インテグリン結合性実体を用いて細胞性反応を開始させる。上記結果は細胞機能における改変として測定され得る。

【0048】

この発明のさらなる観点は、インテグリンサブユニット 10またはそれらの相同体もしくはフラグメントをコードするDNAもしくはRNAを標的分子として使用する方法に関する。この観点での実施態様では、ポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10またはそれらの相同体もしくはフラグメントをコードするDNAもしくはRNAと交配し、それによって上記ポリヌクレオチドもしくはオリゴポリヌクレオチドはインテグリンサブユニット 1をコードするDNAもしくはRNAとの交配ができない。

10

【0049】

この発明はまた、サブユニット 10およびサブユニット 10、またはそのサブユニット 10、または上記インテグリンもしくはサブユニットの相同体もしくはフラグメント、またはインテグリンサブユニット 10またはその相同体もしくはフラグメントをコードするDNAもしくはRNAを含むヒトヘテロ二量体インテグリンを、脈管形成期間中のマーカーまたは標的分子として使用する方法にも関する。

【発明の具体的な説明】

【0050】

この発明は、ヒトおよびウシ軟骨細胞が 1ファミリーにおける新規II型コラーゲン結合性インテグリンを発現することを証明する。以前の研究では、ヒトの軟骨肉腫細胞もまたインテグリンを発現することに対するいくつかの証拠が提出された(25)。インテグリンサブユニット 1に対する抗体を用いた免疫沈殿実験では、この新規インテグリンサブユニットは還元性条件下に約160kDaの見掛け分子量を示し、かつ、2インテグリンサブユニットよりも分子量が僅かに大きかったことを明らかにした。これを単離する目的で、サブユニットII型コラーゲン結合性タンパク質をウシ軟骨細胞から親和精製した。先ずこの軟骨細胞リゼイトをフィブロネクチン-「Sepharpse」プレカラムに塗布し、次で流動物をII型コラーゲン「Sepharose」カラムに塗布した。約160kDaのM_rを示すタンパク質が、コラーゲンカラムからEDTAを用いて特異溶離されたが、フィブロネクチンカラムからは溶離されなかった。このM_rは未確認1関連インテグリンサブユニットのM_rと一致した。この160kDaタンパク質バンドをSDS-PAGEゲルから切除し、トリプシンで消化し、単離ペプチドのアミノ酸配列を分析した。

20

30

【0051】

単離ペプチドに対応するプライマーがウシcDNAからの900bpPCRフラグメントを増幅し、このcDNAをクローン化し、配列決定し、かつヒトインテグリンサブユニット相同体を得る目的でヒト間節軟骨細胞ZapIIcDNAライブラリーのスクリーニング用に使用した。二つの重複クローンhc1およびhc2を単離し、サブクローン化し、配列決定した。これらのクローンは、cDNAの3'末端を包含するポリヌクレオチド配列の2/3を含んでいた。10cDNAの5'末端を含む第3クローンをRACE手法を用いて得た。160kDaタンパク質配列の配列分析によれば、このものはインテグリンサブユニットファミリーの1員であることを示し、かつ、このタンパク質は通称10であることが判明した。

40

【0052】

10の推定アミノ酸配列は、以前刊行された報告書(6-12)に記載のインテグリンサブユニットの一般的構造を共有することが判明した。10の大きな細胞外N末端部分は、プロペラー領域(32)へと折り畳まれることが最近予見された7回折畳み繰り返し配列を含んでいる。このインテグリンサブユニット10は、三つの推定2価のカチオン結合性サイト(DxD/NxD/NxxD)(53)、単一スパントランスメンブラン領域および短い細胞質領域を含む。大半のインテグリンサブユニットとは反対に、10の細胞質領域

50

は保守配列KxGFF (R/K) Rを含まない。 10中に予見されたアミノ酸配列は KLGFFAH である。いくつかの報告が、このインテグリン細胞質領域が信号トランスダクションに必須であり(54)、また、 - および - インテグリン細胞質領域の膜 - 近位領域がインテグリンの立体構造および親和状態を変調するのに関与することを示す(55 - 57)。鎖中の GFFKR モチーフはインテグリンサブユニットの会合に重要であり、また血漿膜へのインテグリンの輸送に対して重要であることが暗示される(58)。この KXGFFKR 領域は、細胞内タンパク質カルレチクリン(59)と相互反応し、興味あることには、カルレチクリンが存在しない胚幹細胞は、インテグリン仲介細胞付着性に欠けることが判った(60)。したがって 10の配列 KXGFFKR は 10 1 およびマトリックスタンパク質間の親和性を調節するための重要な因子を有する可能性がある。

10

【0053】

インテグリン サブユニットは20~40%の総体的同一性を共有することは既知である(61)。配列決定によれば、この 10サブユニットは、最高の同一性 1 (37%) および 2 (35%) をもって サブユニット含有I領域と最も密接に関連することを示す。インテグリン 1 1 および 2 1 はコラーゲンおよびラミニン両方に対する受容体であり(24; 62; 63)、また出願人らは最近、 2 1 が軟骨マトリックスタンパク質コンドロアドヘリンと相互反応することも証明した(42)。II型コラーゲン - 「Sepharoses」上で 10 1 が単離されたので、出願人らは、II型コラーゲンは 10 1 に対するリガンドであることを知った。同時に出願人らは親和精製実験により、 10 1 はI型コラーゲンとは相互反応するが、ラミニンまたはコンドロアドヘリンもまたこのインテグリンに対するリガンドであるか否かの問題解決はこれららである。

20

【0054】

還元型および非還元型の両条件下に 10会合 鎖は、 1 インテグリンサブユニットのように移動した。 10会合 鎖が 1 であるか否かを証明する目的で、軟骨細胞リゼイトを 10または 1 に対する抗体を用いて免疫沈殿させ、次いで 1 サブユニットに対する抗体を用いてウェスタンブロットに処した。これらの結果は、 10が 1 インテグリンのファミリーであることを明瞭に証明した。しかし、 10が同時に他の 鎖と結合する可能性は排除できない。

【0055】

10の細胞質領域に対して高めたポリクローナルペプチド抗体は二つのタンパク質バンドM_r 約 160 kD (10) および 125 kD (1) を還元型条件下に沈殿した。 10抗体を用いた免疫組織化学によれば、ヒト関節軟骨の組織部分中での軟骨細胞の染色を示した。この抗体染色は、 10ペプチドを用いた抗体の予備保温が染色を完全に廃止させたので、この抗体染色は明らかに特異的であった。胚組織からのマウス手足部分の免疫組織化学的染色は、間葉組織の縮合期間中にアップレギュレーションされることを証明した。このことは、このインテグリンサブユニット 10が軟骨形成期間中に重要であることを示す。生後3日のマウスでは、 10が圧倒的コラーゲン結合性インテグリンサブユニットであることが分かり、このことは 10が正常の軟骨機能の維持に重要な機能を有することを示す。

30

【0056】

タンパク質およびmRNAレベルでの発現研究によれば、 10の部分は寧ろ限定的であることを示す。免疫組織化学分析によれば、 10インテグリンサブユニットは軟骨中で主として発現されるが、このものは同時に軟骨膜、骨膜、Ranvierの骨化溝、関節周辺の筋膜および骨格筋ならびに心臓弁の間節様構造中にも見いだされる。この分布は 10インテグリンサブユニットが繊維芽細胞および骨芽細胞上にも存在することを指摘する。異なった細胞型からのcDNAのPCR増幅によれば、交互にスプライスされた 10インテグリンサブユニットの存在が明になった。このスプライスド 10は繊維芽細胞中に圧倒的であり、繊維芽細胞中の 10は軟骨細胞に存在する 10に比べて異なった機能を有する可能性があることを示唆する。

40

【0057】

50

インテグリンサブユニット 10の発現は、軟骨細胞を単層中で培養すると低減するように見られた。これとは対照的に 10の発現は、この細胞をアルギン酸塩ビーズ中で培養すると増加するのが見られた。後者の培養モデルは軟骨細胞の表現型を保持するすることが知られているので、上記結果は 10が分化軟骨細胞に対するマーカーとして機能できることを暗示している。

【 0 0 5 8 】

腱 / 靭帯間および周辺組織の癒着は感染、傷害後、および外科的介入後の公知問題点である。関節および関節シート間の癒着は滑走機能を損ない、かつ、例えば手指の関節の治療中に著しい問題点を引き起こし、その結果、機能不全に至る。関節および骨格筋の筋膜中への 10インテグリンサブユニットの局在化は、10をして、腱 / 靭帯の機能の損失を防止し得る抗癒着性を有する医薬物質または分子に対する可能性ある標的となさしめ得る。またインテグリンサブユニット 10は、癒着が問題になる他の組織における抗癒着性を有する医薬物質もしくは分子に対する標的ともなり得る。

10

【 実施例 】

【 0 0 5 9 】

実施例 1

II型コラーゲン - 「Sephacrose」上での 10インテグリンサブユニットの親和精製材料および方法

ウシ軟骨細胞、ヒト軟骨細胞またはヒト軟骨腫瘍細胞を前記のように単離した [Holmvaerらの Exp Cell Res, 221, 496-503 (1995), Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998)]。ウシ軟骨細胞の「Triton X-100」リゼイトを、フィブロネクチン - 「Sephacrose」プレカラム、次いでII型コラーゲン - 「Sephacrose」上に施し、このインテグリンサブユニット 10をII型コラーゲンカラムから EDTA により溶離した (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。溶離タンパク質をメタノール / クロロホルムで沈殿させ、還元型条件下に SDS-PAGE により分離し、クーマシーブルーで染色した (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。10 タンパク質バンドからのペプチドをトリプシンおよび相液クロマトグラフィーを用いた in-gel 消化により単離し、Edman 分解 (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998)) により配列決定した。

20

【 0 0 6 0 】

結果

図 1 は、フィブロネクチン - 「Sephacrose」からの EDTA 溶離タンパク質 (A)、II型コラーゲン - 「Sephacrose」カラムからの流動物 (B) およびII型コラーゲン - 「Sephacrose」からの EDTA 溶離タンパク質 (C) を示す。II型コラーゲン - 「Sephacrose」カラムから特異的に溶離した 10インテグリンサブユニット (160 kDa) を矢印で示す。図 2 は、ウシインテグリンサブユニット 10から溶離した 6 種のペプチドのアミノ酸配列を示す。図 3 a、b および c は、10インテグリンサブユニットがウシ軟骨細胞 (3 a)、ヒト軟骨細胞 (3 b) 上に存在することを示す。

30

II型コラーゲンに対する親和性、10インテグリンサブユニットとの共沈殿および還元型条件下の分子量 160 kDaにより、異なった細胞上での 10インテグリンサブユニットを確認する。これらの結果は、10が軟骨細胞および軟骨肉腫細胞から単離され得ることを示す。

40

【 0 0 6 1 】

実施例 2

ウシ 10インテグリンサブユニットに対応する PCR フラグメントの増幅

材料および方法

ウシペプチド 1 (図 2) に対応するポリヌクレオチド配列を増幅するために、縮重プライマー GAY AAY ACI GCI CAR AC (DNTAQT, forward) および TIA TIS WRT GRT GIG GYT (EPHHSI, reverse) を PCR に用いた (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。次いでペプチド 1 のクローン化ヌクレオチド配列に対応する内部特異プライマー TCA GCC TAC ATT CAG TAT (SAYIQY, forward) をウシペプチド 2 (図 2) に対応する ICK

50

RTC CC, RTG ICC IGG (PGHWDR, reverse) と共に用いて 900 bp PCR フラグメントをウシ cDNA から増幅した。2 倍縮重の位置には混合塩基を使用し、3 または 4 倍縮重の位置にはイノシンを使用した。mRNA 単離および cDNA 合成を文献記載 (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998)) に準拠して実施した。精製フラグメントをクローン化し、精製し、文献記載に従って配列決定した (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。

結果

ペプチド 1 のヌクレオチド配列 (図 2) が、ウシ cDNA の PCR 増幅、クローン化および配列決定により得られた。このヌクレオチド配列から正確なプライマーを設計し、ペプチド 2 - 6 に対応する縮重プライマーを用いる PCR 増幅に応用した。ペプチド 1 および 2 に対応するプライマーがウシ cDNA からの 900 bp フラグメントを増幅した (図 4)。

【0062】

実施例 3

ヒト 10 インテグリンサブユニットのクローン化および配列分析

材料および方法

ウシ 10 インテグリンに対応するクローン化 900 bp PCR フラグメントを、DIG DNA ラベル化キット (Boehringer Mannheim) に準拠してジゴキシゲニン - ラベル化し、ヒト間節軟骨細胞 Zap11 cDNA ライブラリー (Michael Bayliss, The Royal Veterinary Basic Sciences, London, UK により提供) (52) のスクリーニング用のプローブとして用いた。cDNA 挿入断片を伴う pBluescript SK + プラスミドを含むポジティブクローンを、ZAP-cDNA^R 合成キット (Stratagene) 記載のように *in vivo* で切除することにより ZAP ベクターからレスキューした。選択プラスミドを精製し、文献に準拠して、T3、T7 および内部特異プライマーを用いて配列決定した (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。10 の 5' 末端をコードする cDNA を得る目的で、出願人はプライマー AAC TCG TCT TCC AGT GCC ATT CGT GGG (reverse; 10 cDNA における残基 1254-1280) を設計し、これを「MarathonTM」cDNA 増幅キット (Clontech INC., Palo Alto, CA) の記載に準拠して cDNA 5' 末端 (RACE) の急速増幅に用いた。

【0063】

結果

二つの重複クローン hc1 および hc2 (図 5) を単離し、サブクローン化し、配列決定した。これらのクローンは、cDNA の 3' 末端を含むヌクレオチド配列の 2/3 を含んでいた。10 cDNA の 5' 末端を含む第 3 クローン (race1; 図 5) が RACE 技法を用いて得られた。10 cDNA、3884 ヌクレオチドの三つの重複クローンを配列決定した。このポリヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を図 6 に示す。この配列は、1167 アミノ酸成熟タンパク質をコードすると予測される 3504 ヌクレオチドオープンリーディング枠を含む。シグナルペプチド開裂サイトは矢印で示し、ウシペプチド配列に対するヒト相同体は下線を施し、I 領域は四角で囲んだ (boxed)。金属イオン結合サイトは下波線で示し、潜在的 N - グリコシル化サイトは星印で示し、推定トランスメンブラン領域は 2 重下線で示す。正常に保存された細胞質配列はドットおよびダッシュ下波線で示す。

【0064】

実施例 4

10 のスプライス変種を含むクローンの確認

ヒト軟骨細胞ライブラリー (実施例 3 参照) から単離した一つのクローンは nt 位置 2942 および 3055 間のヌクレオチドが削除された以外は、10 インテグリンサブユニットの配列と同一の配列を含んでいた。10 のスプライス変種は、このスプライス領域をランキングするプライマーを用いた PCR 実験において証明された (図 14 参照)。

【0065】

10

20

30

40

50

実施例 5

ノーザンブロットによる 10 インテグリンサブユニットの同定

材料および方法

ウシ軟骨細胞 mRNA を「QuickPrep[®] Micro」 mRNA 精製キット (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて精製し、1% アガロース - ホルムアルデヒドゲル上で分離し、ナイロン膜に移し、IV 架橋により固定化した。Random Primed DNA ラベル化キット (Boehringer Mannheim) を用いて cDNA プローブを 32 P ラベル化した。フィルターを 5x SSE, 5X Denharts 溶液、0.1% SDS, 50 μg/ml サケ精子 DNA および 50% ホルムアミド中、42°C で 2~4 時間予備交配し、次いで特異プローブ (0.5~1 × 10⁶ cpm/ml) を含む同一溶液を用いて 42°C で一昼夜交配した。特異的に結合した cDNA プローブをリン光イメージャー装置 (Fuji) を用いて分析した。再プローブに先立ちフィルターを 0.1% SDS 中、80°C で 1 時間洗浄してストリップした。この 10 インテグリン cDNA プローブを、制限酵素 BamHI (GIBCO BRL) および NcoI (Boehringer Mannheim) を用いて racel 含有プラスミドから単離した。ラット 10 インテグリン cDNA プローブは Staffan Johansson, Uppsala, Sweden から寄贈された。

【0066】

結果

ウシ軟骨細胞からの mRNA のノーザンブロット分析によれば、ヒト 10 cDNA プローブが約 5.4 kb (図 7) の単一 mRNA と交配した。比較として、インテグリンサブユニット 1 に対応する cDNA プローブを用いた。この cDNA プローブは同一フィルター上の約 3.5 kb の mRNA バンドと交配した。これらの結果は、10 に対する cDNA プローブが mRNA レベルで 10 インテグリンサブユニットを同定するのに使用できることを示す。

【0067】

実施例 6

インテグリンサブユニット 10 に対する抗体の調製

10 細胞質領域の一部 Ckkipееekreekle に対応するペプチド (図 6 参照) を合成し、鍵穴カサガイヘモシアニン (KLH) に複合させた。ペプチド/KLH 複合体を用いてラビットを免疫化しインテグリンサブユニット 10 に対する抗血清を生じさせた。10 を認識する抗体はペプチド結合カラム (Innovagen AB) 上で親和精製した。

【0068】

実施例 7

軟骨細胞からのインテグリンサブユニット 10 の免疫沈殿

材料および方法

ヒト軟骨細胞を ¹²⁵I ラベル化し「Triton X-100」を用いて溶菌し、文献 (Holmval I らの Exp. Cell Res, 221, 496-503 (1995)、Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998)) 記載のように免疫沈殿した。¹²⁵I ラベル化ヒト軟骨細胞の「Triton X-100」リゼイトを、インテグリンサブユニット 1、1、2、3、10 に対するポリクローナル抗体を用いて免疫沈殿した。この免疫沈殿タンパク質を非還元型条件下に SDS-PAGE (4-12%) により分離し、リン光イメージャーにより肉視した。10 または 1 で免疫沈殿したヒト軟骨細胞の「Triton X-100」リゼイトを非還元型条件下に SDS-PAGE (8%) により分離し、ポリクローナル 1 抗体を使用するウエスタンブロットおよび Camper らによる JBC, 273, 20383-20389 (1998) 記載のように化学発光検出法を用いて分析した。

【0069】

結果

10 の細胞質領域に対して高めたポリクローナルペプチド抗体は、Mr が約 160 kD (10) および 125 kD (1) を有する二つのタンパク質バンドを非還元型条件下に沈殿した。10 会合鎖は 1 インテグリンサブユニットのように移動した (図 8 a)。軟骨細胞における 10 会合鎖が実際に 1 であることを実証するために、軟骨細胞ライゼイ

10

20

30

40

50

トを 10 orb 1 に対する抗体を用いて免疫沈殿し、次いで 1 サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロットに処した(図 8 b)。これらの結果は、10が 1 インテグリンファミリーの 1 員であることを明瞭に示した。しかし、これらの結果は、10 が他の状況下に他の鎖と会合できる可能性を排除はしない。

【0070】

実施例 8

ヒトおよびマウス軟骨におけるインテグリンサブユニット 10の免疫組織化学的染色
手術期間に得られた成人軟骨(trochlear groove)の凍結部分(Anders Lindahl, Sahlgrenska Hospital, Gothenburg, Sweden 提供)および生後 3 日のマウス手足からの凍結部分を固定し、文献記載(Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998) のように免疫組織かがく用に調製した。10インテグリンサブユニットの発現は一次抗体(実施例 6 参照)およびペルオキシダーゼに複合した二次抗体として、細胞質領域に対するポリクローナル抗体を用いて分析した。

10

【0071】

結果

図 9 はヒト成人間節の軟骨の染色を示す。

10の細胞質領域を認識する 10抗体は、ヒト間節軟骨の組織部分における軟骨細胞を染色した(A)。この染色は、10ペプチドを用いて抗体を予備保温すると減少した(B)。10インテグリンサブユニットを認識する対照抗体は軟骨細胞に結合しなかった(C)。

20

【0072】

図 10 は、10抗体が、成長期の骨原基における軟骨細胞の大半を染色することを示す(aおよびb)。この 10抗体も Ranvier の骨化溝中の細胞を認識し、metaphys における軟骨をライニングしている骨樹皮中の骨芽細胞は 10に対して特に高度にポジティブである。Ranvier の骨化溝中の細胞は、骨の直径方向の成長に重要であると信じられる。このインテグリンサブユニット 10もまた軟骨膜および骨膜中に高度に発現される。これらの組織中の細胞は軟骨組織の修復に重要であるらしい。インテグリンサブユニット 10の上記局在化は、軟骨組織の機能に対して重要であることを暗示している。

【0073】

実施例 9

マウスの発生期におけるインテグリンサブユニット 10の免疫組織化学的染色材料および方法

30

マウス胚(13.5日)からの凍結部分を、Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998) 記載に準拠して免疫組織化学による 10発現用に研究した。10インテグリンサブユニットの発現は、一次抗体(実施例 6 参照)およびペルオキシダーゼに複合した二次抗体としての細胞質領域に対するポリクローナル抗体を用いて分析した。この胚部分もインテグリンサブユニット 10(Pharmingen からのモノクローナル抗体)および I I 型コラーゲン(モノクローナル抗体、Dr John Mo, Lund University, Sweden から寄贈)の発現のために研究した。

【0074】

40

図 11 は、10インテグリンサブユニットが、間葉細胞が縮合を受けて軟骨を形成する際には手足中で調節されないことを示す(a)。特に新規に形成された軟骨の端部は 10の高度発現を示す。軟骨形成は軟骨特異 I I 型コラーゲンの高度発現により証明される(b)。10インテグリンサブユニットに対する対照抗体は、軟骨上で弱い発現のみを示した(c)。他の実験では、10の発現が、手足、肋骨、脊椎を包含する全ての軟骨含有組織中に見いだされた。軟骨形成期間中の 10のアプレギュレーションは、このインテグリンサブユニットが軟骨および骨の発生ならびに損傷軟骨の修復の両方に重要であることを暗示する。

【0075】

実施例 10

50

関節軟骨以外の組織における 10 の mRNA 発現

材料および方法

10 インテグリンサブユニットの発現を、異なったヒト組織中での mRNA レベルで試験した。図 1 2 に示した組織からの固定化 mRNA を用いるノーザンドットプロットを、制限酵素 BamH1 および NcoI を用いて race 1-含有プラスミドから単離した 10 インテグリン cDNA プロブを用いて交配した。交配の程度をリン発光イメージャーを用いて分析した。次の記号は増加順序：-、+、++、+++、++++ で表示する mRNA レベルを示す。

【0076】

結果

交配 mRNA の分析によれば、10 は大動脈、気管、心臓、肺、および腎臓に発現された (図 2)。他の全ての組織は 10 発現に対しネガティブのように見えた。これらの結果は、10 インテグリンサブユニットの制限的分布を暗示する。

【0077】

実施例 1 1

腱および骨格筋周りの筋膜および心臓弁内の腱構築体における 10 の免疫組織化学的染色

材料および方法

手術中に得られた成人軟骨 (trochlear groove) の凍結部分 (Anders Lindahl, Salgrenska Hospital, Gothenburg, Sweden により提供) および生後 3 日マウス手足からの凍結部分を固定し、文献記載のように免疫組織化学用に調製した (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。10 インテグリンサブユニットの発現は、一次抗体 (実施例 6 参照) およびペルオキシダーゼに複合した第二抗体としての細胞質領域に対するポリクローナル抗体を用いて分析した。

【0078】

結果

図 1 3 に見られるように、10 の発現は腱を取り巻く筋膜 (a) および骨格筋 (b) 中および心臓弁の腱構造 (c) に見いだされた。この局在化は、10 が軟骨特異的 II 型コラーゲン以外にも他のマトリックス分子にも結合し得ることを暗示する。腱表面上へのインテグリン 10 の局在化は、10 が、感染、障害後または手術後の腱 / 靭帯間および組織周辺にしばしば起きる好ましからぬ癒着に関与し得ることを示す。

【0079】

実施例 1 2

軟骨細胞、内皮細胞および繊維芽細胞における 10 インテグリンサブユニットの mRNA 発現

材料および方法

mRNA の単離、cDNA の合成および PCR 増幅は文献記載のように行った (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998))。

結果

図 1 4 は、ヒト関節軟骨細胞 (レーン A6 および B1)、ヒトへその緒静脈内皮細胞 (レーン A2)、ヒト繊維芽細胞 (レーン A4)、およびラット腱 (図 1 4 b、レーン B2) からの 10 cDNA の PCR 増幅を示す。レーン 1、3 および 5 (図 1 4 A) は、内皮細胞、繊維芽細胞および軟骨細胞それぞれにおけるインテグリンサブユニット 10 に対応する増幅フラグメントを示す。10 配列位置 nt 2919-2943 (forward) および nt 3554-3578 (reverse) (図 6 参照) の対応する cDNA プライマーは異なった細胞からの 10 cDNA の増幅に使用された。この図は、10 が三種の全ての細胞型で増幅されたことを示す。10 の二つのフラグメントは増幅され、このものは 10 の元来の形態で (一層大きなフラグメント)、かつスプライス変異 (一層小さなフラグメント) の形態で存在した。この一層大きなフラグメントは軟骨細胞中で大勢を占め、一方、一層小さなフラグメントは腱中に一層顕著であった (B2)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

実施例 1 3

10哺乳類発現ベクターの構築

10の等身大タンパク質コード配列（三つのクローンからの併合；図 6 参照）を哺乳類発現ベクター p c D N A 3.1/Zeo (Invitrogen) 中に挿入した。このベクターは SV40 プロモーターおよび Zeosin 選択配列を含む。この 10含有発現ベクターを、1 インテグリンサブユニットは発現するが 10サブユニットの発現に欠く細胞中にトランスフェクトした。細胞表面上の 10インテグリンサブユニットの発現は、免疫沈殿法および/または 10に対して特異的な抗体を用いたフロー血球計算により分析できる。リガンド結合能力および挿入された 10インテグリンサブユニットの機能は細胞付着実験およびシグナル化実験で実証できる。

10

【 0 0 8 1 】

実施例 1 4

10のspray変種を含む哺乳類発現ベクターの構築

10のspray変種の等身大タンパク質コード配列を哺乳類発現ベクター pc D N A 3（実施例 1 3 参照）中に挿入した。このspray変種の発現および機能は実施例 1 3 記載のように分析でき、かつ、無傷の 10インテグリンサブユニットと比較できる。

【 0 0 8 2 】

実施例 1 5

10インテグリンゲノム D N A の部分単離および特性化材料および方法

20

制限酵素 EamHI (GIBCO BRL) および Nco I (Boehringer Mannheim) を用いた race1 含有プラスミドから単離したヒト c D N A を、³²P ラベル化し、マウス 129 コスミドライブラリー (Reinhard Fassler, Lund University 提供) のスクリーニング用プローブとして用いた。ポジティブクローンを単離し、サブクローンした。選択プラスミドを精製し、文献 (Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1998)) に準拠して T3、T7 および内部特異プライマーを用いて配列決定した。次いでマウスゲノム D N A に対応するプライマーを構築し、P C R に用いて増幅し、コスミドクローンから 10のゲノム配列を同定した。

【 0 0 8 3 】

図 1 5 は、10遺伝子の 7958 nt を示す。10インテグリンの上記部分ゲノム D N A 配列はエクソン 8 および Kozak 配列を含む。このマウスゲノム 10配列を用いてノックアウト実験用の標的ベクターを生じさせた。

30

【 0 0 8 4 】

実施例 1 6

アルギン酸塩 (alginate) ビーズ中で培養した 10インテグリンサブユニットのアップレギュレーション (upregulation)

単層で 2 週間培養したヒト軟骨細胞をトリプシン - EDTA で脱離し、アルギン酸塩ビーズ中に導入した。アルギン酸塩ビーズ中で培養した軟骨細胞は、単層中で培養された軟骨細胞の脱分化間、それらの表現型を保存することは既知である。アルギン酸塩もしくは単層中いずれかで培養した軟骨細胞を 1 1 日後に単離し、¹²⁵I で表面ラベル化した。この 10インテグリンサブユニットを次いで細胞質領域を認識するポリクローナル抗体を用いて免疫沈殿した (実施例 6 参照および Camper らの JBC, 273, 20383-20389 (1989))。

40

【 0 0 8 5 】

結果

図 1 6 に見られるように、アルギン酸塩ビーズ中で培養した軟骨細胞 (レーン 3 および 4) は 10 1 のそれらのタンパク質発現を上方調節アップレギュレーションした。このことは、極めて低い 10 1 発現を示す、単層中で培養 (レーン 1 および 2) した軟骨細胞とは対照的であった。a b 対照抗体を用いた免疫沈殿をレーン 1 および 3 に示す。軟骨細胞はアルギン酸塩中でそれらの軟骨特異的マトリクス生産を保持するが、単層中で培養したものは保持せず、この事実はアルギン酸塩が軟骨細胞の表現型を保持することを示

50

す。これらの結果は、 $\alpha 10$ インテグリンサブユニットが分化軟骨細胞に対するマーカーとして使用できることを支持する。

【0086】

実施例 17

ヒト平滑筋細胞からの $\alpha 10$ インテグリンサブユニットの免疫沈殿

材料および方法

ヒト平滑筋細胞をヒト大動脈から単離した。培養 1 週間後、細胞を¹²⁵Iラベル化し、溶菌し、 $\alpha 10$ インテグリンサブユニット 1 (レーン 1)、1 (レーン 2)、2 (レーン 3)、10 (レーン 4)、3 (レーン 5)、対照 (レーン 6) (図 17) に対する抗体を用いて免疫沈殿させた。この実験は実施例 7 記載のように実施した。 $\alpha 10$ 抗体は、 $\alpha 10$ および $\beta 1$ インテグリンサブユニットに対応する平滑筋細胞から二つのバンドを沈殿した (図 17)。

10

【0087】

実施例 18

$\alpha 10$ スライス領域に対する配列を含む細菌性発現ベクターの構築

交互スプライド領域 (アミノ酸 pos. 952-986, SEQ. ID 1) の *E. coli* 中での細胞内発現のためのプラスミドを文献記載のように構築した。この交互スプライド領域を *E. coli* 高頻度コドンテーブルを用いてバック翻訳し、元の配列 (SEQ. ID 1 ヌクレオチド pos. 2940-3044) と 96% 同一性の cDNA 配列を創った。配列重複エクステンション (Horon らの *Biotechniques* 8:528, 1990) を用いてプライマー $\alpha 10$ pfor (表 I) および $\alpha 10$ prev (表 I) を、 $\alpha 10$ アミノ酸配列をコードする 2 重鎖フラグメントの創造に用いた。ブドウ状球菌タンパク質 A の Z 領域を含む PET ベクター中でサブクローンするための制限酵素サイトを創る目的で、このフラグメントをプライマ - $\alpha 10$ pfor2 (表 I) および $\alpha 10$ prev2 (表 I) を用いる PCR 鋳型として用て、トロンピン開裂サイトを中間に有する Z 領域のアミノ末端と $\alpha 10$ スプライド領域との融合体を創った。第 2 PCR 反応で生じたフラグメントを示し (SEQ ID No. 3)、また発現ベクター中でのサブクローンに使用した新規制限酵素も示す。

20

【0088】

【表 1】

表 1

30

| | |
|-------------------|---|
| $\alpha 10$ pfor | 5'-G TTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTGTTCCGGTCTGATCATCTC CGCTCTGCTGCCGGCTGT-3' |
| $\alpha 10$ pfor2 | 5'-GGGGCATATGGTTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTG-3' |
| $\alpha 10$ prev | 5'-GATAACCTGGGACAAGCTTAGGAAGTAGTTACCACCGTGAGCAA CAGCCGGCAGCAGAGCGGA-3' |
| $\alpha 10$ prev2 | 5'-GGGGGATCCGCGCGGCACCAGGCCGCTGATAACCTGGGACAAG CTTAGGAAGT-3' |

40

50

【 0 0 8 9 】

【表 2】

文 献

1. Springer, T.A. (1990) *Nature* 346, 425-434
2. Ruoslahti, E. (1991) *J.Clin.Invest.* 87, 1-5
3. Hynes, R.O. (1992) *Cell* 69, 11-25
4. Hemler, M.E. (1988) *Immunol.Today* 9, 109-113
5. Yamada, K.M. (1991) *J.Biol.Chem.* 266, 12809-12812
6. Palmer, E.L., Ruegg, C., Ferrando, R., Pytela, R.,
and Sheppard, D. (1993) *J.Cell Biol.* 123, 1289-1297 10
7. Takada, Y., Elices, M.J., Crouse, C., and Hemler,
M.E. (1989) *EMBO J.* 8, 1361-1368
8. Poncz, M., Eisman, R., Heidenreich, R., Silver, S.M.,
Vilaire, G., Surrey, S., Schwartz, E., and Bennett,
J.S. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 8476-8482
9. Larson, R.S., Corbi, A.L., Berman, L., and Springer,
T. (1989) *J.Cell Biol.* 108, 703-712
10. Corbi, A.L., Kishimoto, T.K., Miller, L.J., and
Springer, T.A. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 12403-12411 20
11. Argraves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K.,
Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1987) *J.Cell
Biol.* 105, 1183-1190...
12. Corbi, A.L., Miller, L.J., O'Connor, K., Larson,
R.S., and Springer, T.A. (1987) *EMBO J.* 6, 4023-4028
13. Briesewitz, R., Epstein, M.R., and Marcantonio, E.E..
(1993) *J.Biol.Chem.* 268, 2989-2996
14. Ziober, B.L., Vu, M.P., Waleh, N., Crawford, J., Lin,
C.S., and Kramer, R.H. (1993) *J.Biol.Chem.* 268,
26773-26783 30
15. Hogervorst, F., Kuikman, I., van Kessel, A.G., and
Sonnenberg, A. (1991) *Eur.J.Biochem.* 199, 425-433
16. Takada, Y. and Hemler, M.E. (1989) *J.Cell Biol.* 109,
397-407
17. Takada, Y., Murphy, E., Pil, P., Chen, C., Ginsberg,
M.H., and Hemler, M.E. (1991) *J.Cell Biol.* 115,
257-266 40
18. Van der Vieren, M., Le Trong, H., Wood, C.L., Moore,
P.F., St.John, T., Staunton, D.E., and Gallatin, W.M.
(1995) *Immunity.* 3, 683-690

【表 3】

19. Schnapp, L.M., Breuss, J.M., Ramos, D.M., Sheppard, D., and Pytela, R. (1995) *J.Cell Sci.* 108, 537-544
20. Shaw, S.K., Cepek, K.L., Murphy, E.A., Russell, G.J., Brenner, M.B., and Parker, C.M. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 6016-6025
21. Suzuki, S., Argraves, W.S., Arai, H., Languino, L.R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 14080-14085 10
22. Ignatius, M.J., Large, T.H., Houde, M., Tawil, J.W., Barton, A., Esch, F., Carbonetto, S., and Reichardt, L.F. (1990) *J.Cell Biol.* 111, 709-720
23. Gullberg, D., Gehlsen, K.R., Turner, D.C., Åhlén, K., Zijenah, L.S., Barnes, M.J., and Rubin, K. (1992) *EMBO J.* 11, 3865-3873
24. Staaz, W.D., Rajpara, S.M., Wayner, E.A., Carter, W.G., and Santoro, S.A. (1989) *J.Cell Biol.* 108, 1917-1924 20
25. Holmvall, K., Camper, L., Johansson, S., Rubin, K., Kimura, J.H., and Lundgren-Åkerlund, E. (1995) *Exp.Cell Res.* 221, 496-503
26. Forsberg, E., Ek, B., Engström, Å., and Johansson, S. (1994) *Exp.Cell Res.* 213, 183-190
27. Wayner, E.A. and Carter, W.G. (1987) *J.Cell Biol.* 105, 1873-1884
28. Weitzman, J.B., Pasqualini, R., Takada, Y., and Hemler, M.E. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 8651-8657 30
29. Elices, M.J. and Hemler, M.E. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86, 9906-9910
30. Languino, L.R., Colella, S., Zanetti, A., Andrieux, A., Ryckewaert, J.J., Charon, M.H., Marchisio, P.C., Plow, E.F., Ginsberg, M.H., Marguerie, G., and et al (1989) *Blood* 73, 734-742
31. Tuckwell, D.S., Humphries, M.J., and Brass, A. (1994) *Cell Adhes.Commun.* 2, 385-402 40
32. Springer, T.A. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 65-72

【表 4】

33. Colombatti, A., Bonaldo, P., and Doliana, R. (1993) Matrix 13, 297-306
34. Lee, C.H., Bradley, G., and Ling, V. (1995) Cell Growth Differ. 6, 347-354
35. Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., and Humphries, M.J. (1995) Biochem.Soc.Trans. 23, 504S
36. Kern, A., Eble, J., Golbik, R., and Kuhn, K. (1993) Eur.J.Biochem. 215, 151-159 10
37. Tuckwell, D.S., Reid, K.B., Barnes, M.J., and Humphries, M.J. (1996) Eur.J.Biochem. 241, 732-739
38. Kamata, T. and Takada, Y. (1994) J.Biol.Chem. 269, 26006-26010
39. Dürr, J., Goodman, S., Potocnik, A., von der Mark, H., and von der Mark, K. (1993) Exp.Cell Res. 207, 235-244
40. Salter, D.M., Hughes, D.E., Simpson, R., and Gardner, D.L. (1992) Br.J.Rheumatol. 31, 231-234 20
41. Woods, V.L.J., Schreck, P.J., Gesink, D.S., Pacheco, H.O., Amiel, D., Akeson, W.H., and Lotz, M. (1994) Arthritis Rheum. 37, 537-544
42. Camper, L., Heinegård, D., and Lundgren-Åkerlund, E. (1997) J.Cell Biol 138, 1159-1167
43. Hemler, M.E., Sanchez Madrid, F., Flotte, T.J., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., Bhan, A.K., Springer, T.A., and Strominger, J.L. (1984) J.Immunol. 132, 3011-3018 30
44. Bottger, B.A., Hedin, U., Johansson, S., and Thyberg, J. (1989) Differentiation. 41, 158-167
45. Sommarin, Y. and Heinegård, D. (1983) Biochem.J. 214, 777-784
46. Häuselmann, H.J., Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L., Kuettner, K.E., Gitelis, S.H., and Thonar, E.J.M.A. (1992) Matrix 12, 116-129
47. Miller, E.J. (1972) Biochemistry 11, 4903-4909 40
48. Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) Anal.Biochem. 138, 141-143

【表 5】

49. Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.* 67, 835-851
50. Hellman, U. (1997) in *Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing* (Kamp, R.M., Choli-Papadopoulou, T., and Wittmann-Liebold, B., eds) pp. 97-104, Springer-Verlag, Heidelberg
51. Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Bayliss, M.T., Chubb, A.P., Hall, V.S., Moss, D.W., and Moncada, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11419-11423 10
52. Tuckwell, D.S., Brass, A., and Humphries, M.J. (1992) *Biochem. J.* 285, 325-331
53. Dedhar, S. and Hannigan, G.E. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 657-669
54. Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12411-12417 20
55. Puzon McLaughlin, W., Yednock, T.A., and Takada, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 16580-16585
56. O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 1047-1059
57. De Melker, A.A., Kramer, D., Kuikman, I., and Sonnenberg, A. (1997) *Biochem J* 529-537 30
58. Rojiani, M.V., Finlay, B.B., Gray, V., and Dedhar, S. (1991) *Biochemistry* 30, 9859-9866
59. Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demaurex, N., Grinstein, S., St Arnaud, R., and Dedhar, S. (1997) *Nature* 386, 843-847
60. Hynes, R.O. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 621-624
61. Santoro, S.A. (1986) *Cell* 46, 913-920
62. Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 2455-2462 40
63. Yokosaki, Y., Monis, H., Chen, J., and Sheppard, D. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 24144-24150

【 0 0 9 0 】

[配列表]

SEQUENCE LISTING

(1) 一般的情報:

(i) 配列の総数: 2

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列特徴:

- (A) 配列の長さ: 3884 塩基対
- (B) 配列の型: 核酸およびアミノ酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(vi) 起源:

- (E) 生物名: ヒト
- (F) 細胞の種類: 軟骨細胞

10

(xi) 配列の記載: 配列番号1:

```

CAGGTCAGAAACCGATCAGGCATGGAACCTCCCCTTCGTCACTCACCTGTTCTTGCCCCTG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
GTCCAGTCTTTGGCTAGTCCGTACCTTGAGGGGAAGCAGTGAGTGGACAAGAACGGGGAC

a           M E L P F V T H L F L P L -
                                                    20

GTGTTCCCTGACAGGTCTCTGCTCCCCCTTTAACCTGGATGAACATCACCCACGCCTATTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CACAAGGACTGTCCAGAGACGAGGGGGAAATTGGACCTACTTGTAGTGGGTGCGGATAAG

a   V F L T G L C S P F N L D E H H P R L F -
                                                    30

CCAGGGCCACCAGAAGCTGAATTTGGATACAGTGTCTTACAACATGTTGGGGGTGGACAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGTCCCGTGGTCTTCGACTTAAACCTATGTCACAGAATGTTGTACAACCCCCACCTGTC

a   P G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q -
                                                    40

CGATGGATGCTGGTGGGCGCCCCCTGGGATGGGCCTTCAGGCGACCGGAGGGGGACGTT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GCTACCTACGACCACCCGCGGGGGACCCCTACCCGGAAGTCCGCTGGCCTCCCCCTGCAA

a   R W M L V G A P W D G P S G D R R G D V -
                                                    50

TATCGCTGCCCTGTAGGGGGGGCCACAATGCCCCATGTGCCAAGGGCCACTTAGGTGAC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATAGCGACGGGACATCCCCCGGGTGTACGGGGTACACGGTTCCCGGTGAATCCACTG

a   Y R C P V G G A H N A P C A K G H L G D -
                                                    60

TACCAACTGGGAAATTCATCTCATCCTGCTGTGAATATGCACCTGGGGATGTCTCTGTTA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ATGGTTGACCCTTTAAGTAGAGTAGGACGACACTTATACGTGGACCCCTACAGAGACAAT

a   Y Q L G N S S H P A V N M H L G M S L L -
                                                    70

```

50

GAGACAGATGGTGATGGGGGATTCATGGCCTGTGCCCTCTCTGGTCTCGTGCTTGTGGC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CTCTGTCTACCACTACCCCCTAAGTACCGGACACGGGGAGAGACCAGAGCACGAACACCG

a E T D G D G G F M A C A P L W S R A C G -

AGCTCTGTCTTCAGTTCTGGGATATGTGCCCGTGTGGATGCTTCATTCCAGCCTCAGGGA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 TCGAGACAGAAGTCAAGACCCTATACACGGGCACACCTACGAAGTAAGGTCGGAGTCCCT

a S S V F S S G I C A R V D A S F Q P Q G -

10

AGCCTGGCACCCACTGCCCAACGCTGCCCAACATACATGGATGTTGTCATTGTCTTGGAT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 TCGGACCGTGGGTGACGGGTTGCGACGGGTTGTATGTACCTACAACAGTAACAGAACCTA

a S L A P T A Q R C P T Y M D V V I V L D -

GGCTCCAACAGCATCTACCCCTGGTCTGAAGTTCAGACCTTCCTACGAAGACTGGTAGGG
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CCGAGGTTGTCGTAGATGGGGACCAGACTTCAAGTCTGGAAGGATGCTTCTGACCATCCC

20

a G S N S I Y P W S E V Q T F L R R L V G -

AAACTGTTTATTGACCCAGAACAGATACAGGTGGGACTGGTACAGTATGGGGAGAGCCCT
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TTTGACAAATAACTGGGTCTTGTCTATGTCCACCCTGACCATGTCATACCCCTCTCGGGA

a K L F I D P E Q I Q V G L V Q Y G E S P -

30

GTACATGAGTGGTCCCTGGGAGATTTCCGAACGAAGGAAGAAGTGGTGAGAGCAGCAAAG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 CATGTACTCACCAGGGACCCCTCTAAAGGCTTGCTTCCTTCTTCACTACTCTCGTCTGTTTC

a V H E W S L G D F R T K E E V V R A A K -

AACCTCAGTCGGCGGGAGGGACGAGAAACAAAGACTGCCCAAGCAATAATGGTGGCCTGC
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 TTGGAGTCAGCCGCCCTCCCTGCTCTTTGTTTCTGACGGGTTGTTATTACCACCGGACG

40

a N L S R R E G R E T K T A Q A I M V A C -

ACAGAAGGGTTCAGTCAGTCCCATGGGGCCGACCCGAGGCTGCCAGGCTACTGGTGGTT
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 TGTCTTCCAAGTCAGTCAGGGTACCCCGGCTGGGCTCCGACGGTCCGATGACCACCAA

a T E G F S Q S H G G R P E A A R L L V V -

GTCACTGATGGAGAGTCCCATGATGGAGAGGAGCTTCTGTCAGCACTAAAGGCCTGTGAG
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

50

CAGTGACTACCTCTCAGGGTACTACCTCTCCTCGAAGGACGTCGTGATTTCCGGACTC

a V T D G E S H D G E E L P A A L K A C E -

GCTGGAAGAGTGACACGCTATGGGATTGCAGTCCTTGGTCACTACCTCCGGCGGCAGCGA

901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

CGACCTTCTCACTGTGCGATACCCTAACGTCAGGAACCAGTGATGGAGGCCGCCGTCGCT

a A G R V T R Y G I A V L G H Y L R R Q R -

10

GATCCCAGCTCTTTCTGAGAGAAATTAGAACTATTGCCAGTGATCCAGATGAGCGATTC

961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

CTAGGGTCGAGAAAGGACTCTCTTTAATCTTGATAACGGTCACTAGGTCTACTCGCTAAG

a D P S S F L R E I R T I A S D P D E R F -

TTCTTCAATGTCACAGATGAGGCTGCTCTGACTGACATTGTGGATGCACTAGGAGATCGG

1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

AAGAAGTTACAGTGTCTACTCCGACGAGACTGACTGTAACACCTACGTGATCCTCTAGCC

20

a F F N V T D E A A L T D I V D A L G D R -

ATTTTTGGCCTTGAAGGGTCCCATGCAGAAAACGAAAGCTCCTTTGGGCTGGAAATGTCT

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

TAAAAACCGGAACTTCCCAGGGTACGTCTTTTGTCTTCGAGGAAACCCGACCTTTACAGA

a I F G L E G S H A E N E S S F G L E M S -

CAGATTGGTTTCTCCACTCATCGGCTAAAGGATGGGATTCTTTTTGGGATGGTGGGGGCC

1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200

GTCTAACCAAAGAGGTGAGTAGCCGATTTCTACCCTAAGAAAAACCTACCACCCCGG

30

a Q I G F S T H R L K D G I L F G M V G A -

TATGACTGGGGAGGCTCTGTGCTATGGCTTGAAGGAGGCCACCGCCTTTTTCCCCCACGA

1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260

ATACTGACCCCTCCGAGACACGATACCGAACTTCTCCGGTGGCGGAAAAGGGGGGTGCT

40

a Y D W G G S V L W L E G G H R L F P P R -

ATGGCACTGGAAGACGAGTTCCCCCTGCACTGCAGAACCATGCAGCCTACCTGGGTTAC

1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320

TACCGTGACCTTCTGCTCAAGGGGGACGTGACGTCTTGGTACGTCGGATGGACCCAATG

a M A L E D E F P P A L Q N H A A Y L G Y -

TCTGTTTCTTCCATGCTTTTGCGGGGTGGACGCCGCTGTTTCTCTCTGGGGCTCCTCGA

1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380

AGACAAAGAAGGTACGAAAACGCCCCACCTGCGGCGGACAAAGAGAGACCCCGAGGAGCT

50

a S V S S M L L R G G R R L F L S G A P R -
 TTTAGACATCGAGGAAAAGTCATCGCCTTCCAGCTTAAGAAAAGATGGGGCTGTGAGGGTT
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 AAATCTGTAGCTCCTTTTCAGTAGCGGAAGGTGGAATTCTTTCTACCCCGACACTCCCAA

a F R H R G K V I A F Q L K K D G A V R V -
 GCCCAGAGCCTCCAGGGGAGCAGATTGGTTCATACTTTGGCAGTGAGCTCTGCCCATTTG
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 CGGGTCTCGGAGGTCCCCCTCGTCTAACCAAGTATGAAACCGTCACTCGAGACGGGTAAC

a A Q S L Q G E Q I G S Y F G S E L C P L -
 GATACAGATAGGGATGGAACAACCTGATGTCTTACTTGTGGCTGCCCCATGTTCTGGGA
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 CTATGTCTATCCCTACCTTGTGACTACAGAATGAACACCGACGGGGGTACAAGGACCCT

a D T D R D G T T D V L L V A A P M F L G -
 CCCCAGAACAAGGAAACAGGACGTGTTTTATGTGTATCTGGTAGGCCAGCAGTCCTTGCTG
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 GGGGTCTTGTTCCTTTGTCTGCACAAATACACATAGACCATCCGGTTCGTACGGAACGAC

a P Q N K E T G R V Y V Y L V G Q Q S L L -
 ACCCTCCAAGGAACACTTCAGCCAGAACCCCCCAGGATGCTCGGTTTGGCTTTGCCATG
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 TGGGAGGTTCTTGTGAAGTCGGTCTTGGGGGGTCTACGAGCCAAACCGAAACGGTAC

a T L Q G T L Q P E P P Q D A R F G F A M -
 GGAGCTCTTCTGATCTGAACCAAGATGGTTTTGCTGATGTGGCTGTGGGGGCGCCTCTG
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 CCTCGAGAAGGACTAGACTTGGTTCTACAAAACGACTACACCGACACCCCCGCGGAGAC

a G A L P D L N Q D G F A D V A V G A P L -
 GAAGATGGGCACCAGGGAGCACTGTACCTGTACCATGGAACCCAGAGTGAGTCAGGCCC
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 CTTCTACCCGTGGTCCCTCGTGACATGGACATGGTACCTTGGGTCTCACCTCAGTCCGGG

a E D G H Q G A L Y L Y H G T Q S G V R P -
 CATCCTGCCAGAGGATTGCTGCTGCCTCCATGCCACATGCCCTCAGCTACTTTGGCCGA
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 GTAGGACGGGTCTCCTAACGACGACGGAGGTACGGTGTACGGGAGTCGATGAAACCGGCT

a H P A Q R I A A A S M P H A L S Y F G R -

10

20

30

40

50

```

AGTGTGGATGGTCGGCTAGATCTGGATGGAGATGATCTGGTCGATGTGGCTGTGGGTGCC
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TCACACCTACCAGCCGATCTAGACCTACCTCTACTAGACCAGCTACACCGACACCCACGG

a   S V D G R L D L D G D D L V D V A V G A -

CAGGGGGCAGCCATCCTGCTCAGCTCCCGGCCATTGTCCATCTGACCCCATCACTGGAG
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
GTCCCCCGTCGGTAGGACGAGTCGAGGGCCGGGTAACAGGTAGACTGGGGTAGTGACCTC
10

a   Q G A A I L L S S R P I V H L T P S L E -

GTGACCCACAGGCCATCAGTGTGGTTCAGAGGGACTGTAGGCGGCAGGCCAAGAAGCA
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
CACTGGGGTGTCCGGTAGTCACACCAAGTCTCCCTGACATCCGCCGCTCCGGTTCTTCGT

a   V T P Q A I S V V Q R D C R R R G Q E A -

GTCTGTCTGACTGCAGCCCTTTGCTTCCAAGTGACCTCCCGTACTCCTGGTCGCTGGGAT
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
CAGACAGACTGACGTCCGGAAACGAAGGTTCACTGGAGGGCATGAGGACCAGCGACCCTA
20

a   V C L T A A L C F Q V T S R T P G R W D -

CACCAATTCTACATGAGGTTACCCGCATCACTGGATGAATGGACTGCTGGGGCACGTGCA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
GTGGTTAAGATGTA CTCCAAGTGGCGTAGTGACCTACTTACCTGACGACCCCGTGCACGT

a   H Q F Y M R F T A S L D E W T A G A R A -
30

GCATTTGATGGCTCTGGCCAGAGGTTGTCCCCTCGGAGGCTCCGGCTCAGTGTGGGGAAT
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
CGTAAACTACCGAGACCGGTCTCCAACAGGGGAGCCTCCGAGCCGAGTCACACCCCTTA

a   A F D G S G Q R L S P R R L R L S V G N -

GTCACTTGTGAGCAGCTACACTTCCATGTGCTGGATACATCAGATTACCTCCGGCCAGTG
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
CAGTGAACACTCGTCGATGTGAAGGTACACGACCTATGTAGTCTAATGGAGGCCGGTCAC
40

a   V T C E Q L H F H V L D T S D Y L R P V -

GCCTTGACTGTGACCTTTGCCTTGACAATACTACAAAGCCAGGGCCTGTGCTGAATGAG
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
CGGAACTGACACTGGAAACGGAACCTGTTATGATGTTTCGGTCCCGGACACGACTTACTC

a   A L T V T F A L D N T T K P G P V L N E -

GGCTCACCCACCTCTATACAAAAGCTGGTCCCCTTCTCAAAGGATTGTGGCCCTGACAAT
2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
50

```

CCGAGTGGGTGGAGATATGTTTTTCGACCAGGGGAAGAGTTTCCTAACACCGGGACTGTTA

a G S P T S I Q K L V P F S K D C G P D N -

GAATGTGTCACAGACCTGGTGCTTCAAGTGAATATGGACATCAGAGGCTCCAGGAAGGCC

2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460

CTTACACAGTGTCTGGACCACGAAGTTCACCTTATACCTGTAGTCTCCGAGGTCTTCCGG

a E C V T D L V L Q V N M D I R G S R K A -

10

CCATTTGTGGTTCGAGGTGGCCGGCGAAAGTGCTGGTATCTACAACCTCTGGAGAACAGA

2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520

GGTAAACACCAAGCTCCACCGGCCCTTTACGACCATAGATGTTGAGACCTCTTGTCT

a P F V V R G G R R K V L V S T T L E N R -

AAGGAAAATGCTTACAATACGAGCCTGAGTATCATCTTCTCTAGAAACCTCCACCTGGCC

2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580

TTCTTTTACGAATGTTATGCTCGGACTCATAGTAGAAGAGATCTTTGGAGGTGGACCGG

a K E N A Y N T S L S I I F S R N L H L A -

20

AGTCTCACTCCTCAGAGAGAGAGCCCAATAAAGGTGGAATGTGCCGCCCTTCTGCTCAT

2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640

TCAGAGTGAGGAGTCTCTCTCTCGGGTTATTTCCACCTTACACGGCGGGGAAGACGAGTA

a S L T P Q R E S P I K V E C A A P S A H -

GCCCGGCTCTGCAGTGTGGGGCATCCTGTCTTCCAGACTGGAGCCAAGGTGACCTTTCTG

2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700

CGGGCCGAGACGTCACACCCCGTAGGACAGAAGGTCTGACCTCGGTTCCACTGGAAAGAC

30

a A R L C S V G H P V F Q T G A K V T F L -

CTAGAGTTTGAGTTTAGCTGCTCCTCTCTCCTGAGCCAGGTCTTTGGGAAGCTGACTGCC

2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760

GATCTCAAACCTCAAATCGACGAGGAGAGAGGACTCGGTCCAGAAAACCTTCGACTGACGG

a L E F E F S C S S L L S Q V F G K L T A -

40

AGCAGTGACAGCCTGGAGAGAAAATGGCACCCCTTCAAGAAAACACAGCCCAGACCTCAGCC

2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820

TCGTCACTGTCCGACCTCTCTTTACCGTGGGAAGTTCTTTTGTGTCGGGTCTGGAGTCGG

a S S D S L E R N G T L Q E N T A Q T S A -

TACATCCAATATGAGCCCCACCTCCTGTTCTCTAGTGAGTCTACCCTGCACCGCTATGAG

2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880

ATGTAGGTTATACTCGGGGTGGAGGACAAGAGATCACTCAGATGGGACGTGGCGATACTC

50

a Y I Q Y E P H L L F S S E S T L H R Y E -
 GTTCACCCATATGGGACCCTCCCAGTGGGTCTGGCCCAGAATTCAAAACCACTCTCAGG
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
 CAAGTGGGTATACCCTGGGAGGGTCACCCAGGACCGGGTCTTAAGTTTTGGTGAGAGTCC

a V H P Y G T L P V G P G P E F K T T L R -
 GTTCAGAACCTAGGCTGCTATGTGGTCAGTGGCCTCATCATCTCAGCCCTCCTTCCAGCT
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000 10
 CAAGTCTTGATCCGACGATACACCAGTCACCGGAGTAGTAGAGTCGGGAGGAAGGTCTCGA

a V Q N L G C Y V V S G L I I S A L L P A -
 GTGGCCCATGGGGGCAATTACTIONTCTATCACTGTCTCAAGTCATCACTAACAATGCAAGC
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 CACCGGGTACCCCCGTTAATGAAGGATAGTGACAGAGTTCAGTAGTGATTGTTACGTTTCG

a V A H G G N Y F L S L S Q V I T N N A S -
 TGCATAGTGCAGAACCTGACTGAACCCCCAGGCCACCTGTGCATCCAGAGGAGCTTCAA
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120 20
 ACGTATCACGTCTTGACTGACTTGGGGGTCCGGGTGGACACGTAGGTCTCCTCGAAGTT

a C I V Q N L T E P P G P P V H P E E L Q -
 CACACAAACAGACTGAATGGGAGCAATACTCAGTGTGAGGTGGTGAGGTGCCACCTTGGG
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 GTGTGTTTGTCTGACTTACCCTCGTTATGAGTCACAGTCCACCACTCCACGGTGGAACCC 30

a H T N R L N G S N T Q C Q V V R C H L G -
 CAGCTGGCAAAGGGGACTGAGGTCTCTGTTGGACTATTGAGGCTGGTTCACAATGAATTT
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 GTCGACCGTTTCCCCTGACTCCAGAGACAACCTGATAACTCCGACCAAGTGTTACTTAAA

a Q L A K G T E V S V G L L R L V H N E F -
 TTCCGAAGAGCCAAGTTCAAGTCCCTGACGGTGGTCAGCACCTTTGAGCTGGGAACCGAA
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300 40
 AAGGCTTCTCGTTCAAGTTCAGGGACTGCCACCAGTCGTGGAAACTCGACCCTTGGCTT

a F R R A K F K S L T V V S T F E L G T E -
 GAGGGCAGTGTCTACAGCTGACTGAAGCCTCCCGTTGGAGTGAGAGCCTCTTGGAGGTG
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 CTCCCCTCACAGGATGTCGACTGACTTCGGAGGGCAACCTCACTCTCGGAGAACCTCCAC

a E G S V L Q L T E A S R W S E S L L E V -
 50

G TTCAGACCCGGCCTATCCTCATCTCCCTGTGGATCCTCATAGGCAGTGCCTGGGAGGG
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 CAAGTCTGGGCCGGATAGGAGTAGAGGGACACCTAGGAGTATCCGTCACAGGACCTCCC

a V Q T R P I L I S L W I L I G S V L G G -

T TGCTCCTGCTTGCTCTCCTTGTCTTCTGCCTGTGGAAGCTTGGCTTCTTTGCCATAAG
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
 AACGAGGACGAACGAGAGGAACAGAAGACGGACACCTTCGAACCGAAGAAACGGGTATTC

a L L L L A L L V F C L W K L G F F A H K -

A AAAATCCCTGAGGAAGAAAAAGAGAAGAGAAGTTGGAGCAATGAATGTAGAATAAGGGT
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
 TTTTAGGGACTCCTTCTTTTTTCTTCTTCTTCAACCTCGTTACTTACATCTTATTCCA

a K I P E E E K R E E K L E Q

C TAGAAAAGTCTCCCTGGCAGCTTTCTTCAAGAGACTTGCATAAAAAGCAGAGGTTTGGGG
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
 GATCTTTCAGGAGGGACCGTCGAAAGAAGTTCTCTGAACGTATTTTCGTCTCCAAACCCC

G CTCAGATGGGACAAGAAGCCGCCTCTGGACTATCTCCCCAGACCAGCAGCCTGACTTGA
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
 CGAGTCTACCCTGTTCTTCGGCGGAGACCTGATAGAGGGTCTGGTCGTCGGACTGAACT

C TTTTGAGTCCTAGGGATGCTGCTGGCTAGAGATGAGGCTTTACCTCAGACAAGAAGAGC
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
 GAAAACTCAGGATCCCTACGACGACCGATCTCTACTCCGAAATGGAGTCTGTTCTTCTCG

T GGCACCAAAACTAGCCATGCTCCCACCCTCTGCTTCCCTCCTCCTCGTGATCCTGGTTC
 3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
 ACCGTGGTTTTGATCGGTACGAGGGTGGGAGACGAAGGGAGGAGGAGCACTAGGACCAAG

C ATAGCCAACACTGGGGCTTTTGTGGGGTCTTTTATCCCCAGGAATCAATAATTTTT
 3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
 GTATCGGTTGTGACCCCGAAAACAAACCCAGGAAAATAGGGTCTTAGTTATTAATAA

T TGCTAGGAAAAAAAAAAGCGGCCGGAATTCGATATCAAGCT
 3841 -----+-----+-----+-----+-----+ 3884
 AACGGATCCTTTTTTTTTTCGCCGGCGCTTAAGCTATAGTTCGA

10

20

30

40

(2) 配列番号 2 の情報:

(i) 配列特徴:

50

- (A) 配列の長さ: 3779 塩基対
- (B) 配列の型: 核酸およびアミノ酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E)
- (i) 配列の種類: cDNA
- (vi) 起源:
 - (A) 生物名: ヒト
 - (B) 細胞の種類: 軟骨細胞

10

(xi) 配列の記載: 配列番号 2 :

CAGGTCAGAAACCGATCAGGCATGGAACCTCCCCTTCGTCACTCACCTGTTCTTGCCCCTG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 GTCCAGTCTTTGGCTAGTCCGTACCTTGAGGGGAAGCAGTGAGTGGACAAGAACGGGGAC

M E L P F V T H L F L P L -

GTGTTCTGACAGGTCTCTGCTCCCCCTTTAACCTGGATGAACATCACCCACGCCTATTC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CACAAGGACTGTCCAGAGACGAGGGGGAAAATTGGACCTACTTGTAGTGGGTGCGGATAAG

20

a V F L T G L C S P F N L D E H H P R L F -

CCAGGGCCACCAGAAGCTGAATTTGGATACAGTGTCTTACAACATGTTGGGGGTGGACAG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGTCCCGGTGGTCTTCGACTTAAACCTATGTACAGAAATGTTGTACAACCCCCACCTGTC

a P G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q -

30

CGATGGATGCTGGTGGGCGCCCCCTGGGATGGGCCTTCAGGCGACCGGAGGGGGGACGTT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GCTACCTACGACCACCGCGGGGACCTACCCGGAAGTCCGCTGGCTCCCCCTGCAA

a R W M L V G A P W D G P S G D R R G D V -

TATCGCTGCCCTGTAGGGGGGGCCACAATGCCCATGTGCCAAGGGCCACTTAGGTGAC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 ATAGCGACGGGACATCCCCCGGGTGTACGGGTACACGGTTCCCGGTGAATCCACTG

40

a Y R C P V G G A H N A P C A K G H L G D -

TACCAACTGGGAAATTCATCTCATCCTGCTGTGAATATGCACCTGGGGATGTCTCTGTTA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 ATGGTTGACCCTTTAAGTAGAGTAGGACGACACTTATACGTGGACCCCTACAGAGACAAT

a Y Q L G N S S H P A V N M H L G M S L L -

GAGACAGATGGTGATGGGGATTTCATGGCCTGTGCCCTCTCTGGTCTCGTGCTTGTGGC

50

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 CTCTGTCTACCACTACCCCCTAAGTACCGGACACGGGGAGAGACCAGAGCACGAACACCG

a E T D G D G G F M A C A P L W S R A C G -
 AGCTCTGTCTTCAGTTCTGGGATATGTGCCCGTGTGGATGCTTCATTCCAGCCTCAGGGA

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 TCGAGACAGAAAGTCAAGACCCTATACACGGGCACACCTACGAAGTAAGGTCGGAGTCCCT

a S S V F S S G I C A R V D A S F Q P Q G - 10
 AGCCTGGCACCCACTGCCAACGCTGCCAACATACATGGATGTTGTCATTGTCTTGGAT

481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 TCGGACCGTGGGTGACGGGTTGCGACGGGTTGTATGTACCTACAACAGTAACAGAACCTA

a S L A P T A Q R C P T Y M D V V I V L D -
 GGCTCCAACAGCATCTACCCCTGGTCTGAAGTTCAGACCTTCCTACGAAGACTGGTAGGG

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 CCGAGGTTGTCGTAGATGGGGACCAGACTTCAAGTCTGGAAGGATGCTTCTGACCATCCC

a G S N S I Y P W S E V Q T F L R R L V G - 20
 AAAGTGTATTGACCCAGAACAGATACAGGTGGGACTGGTACAGTATGGGGAGAGCCCT

601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 TTTGACAAATAACTGGGTCTTGTCTATGTCCACCCTGACCATGTCATACCCCTCTCGGGA

a K L F I D P E Q I Q V G L V Q Y G E S P - 30
 GTACATGAGTGGTCCCTGGGAGATTTCCGAACGAAGGAAGAAGTGGTGAGAGCAGCAAAG

661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 CATGTACTCACCAGGGACCCTCTAAAGGCTTGCTTCCTTCTTCACTCTCGTCGTTTC

a V H E W S L G D F R T K E E V V R A A K -
 AACCTCAGTCGGCGGGAGGGACGAGAAACAAAGACTGCCCAAGCAATAATGGTGGCCTGC

721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 TTGGAGTCAGCCGCCCTCCCTGCTCTTTGTTTCTGACGGGTTGTTATTACCACCGGACG

a N L S R R E G R E T K T A Q A I M V A C - 40
 ACAGAAGGGTTCAGTCAGTCCCATGGGGGCCGACCCGAGGCTGCCAGGCTACTGGTGGTT

781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 TGCTTCCCAAGTCAGTCAGGGTACCCCGGCTGGGCTCCGACGGTCCGATGACCACCAA

a T E G F S Q S H G G R P E A A R L L V V -
 GTCAGTATGGAGAGTCCCATGATGGAGAGGAGCTTCTGCAGCACTAAAGGCCTGTGAG

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 CAGTACTACCTCTCAGGGTACTACCTCTCCTCGAAGGACGTCGTGATTTCCGGACACTC

50

a V T D G E S H D G E E L P A A L K A C E -
GCTGGAAGAGTGACACGCTATGGGATTGCAGTCCTTGGTCACTACCTCCGGCGGCAGCGA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGACCTTCTCACTGTGCGATACCCTAACGTCAGGAACCAGTGATGGAGGCCGCCGCTCGCT

a A G R V T R Y G I A V L G H Y L R R Q R - 10
GATCCCAGCTCTTTCCTGAGAGAAAATTAGAACTATTGCCAGTGATCCAGATGAGCGATTC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CTAGGGTCGAGAAAAGGACTCTCTTTAATCTTGATAACGGTCACTAGGTCTACTCGCTAAG

a D P S S F L R E I R T I A S D P D E R F -
TTCTTCAATGTCACAGATGAGGCTGCTCTGACTGACATTGTGGATGCACTAGGAGATCGG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
AAGAAGTTACAGTGTCTACTCCGACGAGACTGACTGTAACACCTACGTGATCCTCTAGCC

a F F N V T D E A A L T D I V D A L G D R - 20
ATTTTTGGCCTTGAAGGGTCCCATGCAGAAAACGAAAGCTCCTTTGGGCTGGAAATGTCT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TAAAAACCGAACTTCCCAGGGTACGTCTTTTGCTTTTCGAGGAAAACCCGACCTTTACAGA

a I F G L E G S H A E N E S S F G L E M S -
CAGATTGGTTTCTCCACTCATCGGCTAAAGGATGGGATTCTTTTTGGGATGGTGGGGGCC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GTCTAACCAAAGAGGTGAGTAGCCGATTTCTACCCCTAAGAAAAACCTACCACCCCGG 30

a Q I G F S T H R L K D G I L F G M V G A -
TATGACTGGGGAGGCTCTGTGCTATGGCTTGAAGGAGGCCACCGCTTTTCCCCCACGA
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
ATACTGACCCCTCCGAGACACGATACCGAACTTCTCCGGTGGCGGAAAAGGGGGGTGCT

a Y D W G G S V L W L E G G H R L F P P R - 40
ATGGCACTGGAAGACGAGTTCCCCCTGCACTGCAGAACCATGCAGCCTACCTGGGTTAC
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TACCGTGACCTTCTGCTCAAGGGGGGACGTGACGTCTTGGTACGTCCGATGGACCCAATG

a M A L E D E F P P A L Q N H A A Y L G Y -
TCTGTTTCTTCCATGCTTTTTCGGGGTGGACGCCGCTGTTTCTCTCTGGGGCTCCTCGA
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
AGACAAAAGAAAGTACGAAAACGCCACCTGCGGCGACAAAAGAGAGACCCCGAGGAGCT

a S V S S M L L R G G R R L F L S G A P R - 50

TTTAGACATCGAGGAAAAGTCATCGCCTTCCAGCTTAAGAAAAGATGGGGCTGTGAGGGTT
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 AAATCTGTAGCTCCTTTTCAGTAGCGGAAGGTCGAATTCCTTTCTACCCCGACACTCCCAA

a F R H R G K V I A F Q L K K D G A V R V -

GCCCAGAGCCTCCAGGGGGAGCAGATTGGTTCATACTTTGGCAGTGAGCTCTGCCATTG
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 CGGGTCTCGGAGGTCCCCCTCGTCTAACCAAGTATGAAACCGTCACTCGAGACGGGTAAC

a A Q S L Q G E Q I G S Y F G S E L C P L -

GATACAGATAGGGATGGAACAACCTGATGTCTTACTTGTGGCTGCCCCCATGTTCTGGGA
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 CTATGTCTATCCCTACCTTGTGACTACAGAATGAACACCGACGGGGGTACAAGGACCCT

a D T D R D G T T D V L L V A A P M F L G -

CCCCAGAACAAGGAAACAGGACGTGTTTATGTGTATCTGGTAGGCCAGCAGTCCTTGCTG
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 GGGGTCTTGTTCCTTTGTCCTGCACAAAATACACATAGACCATCCGGTCGTCAGGAACGAC

a P Q N K E T G R V Y V Y L V G Q Q S L L -

ACCCTCCAAGGAACACTTCAGCCAGAACCCCCCAGGATGCTCGGTTTGGCTTTGCCATG
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 TGGGAGTTCTTGTGAAGTCGGTCTTGGGGGGTCTACGAGCCAAACCGAAACGGTAC

a T L Q G T L Q P E P P Q D A R F G F A M -

GGAGCTCTTCTGATCTGAACCAAGATGGTTTTGCTGATGTGGCTGTGGGGGCGCCTCTG
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 CCTCGAGAAGGACTAGACTTGGTTCTACAAAACGACTACACCGACACCCCGCGGAGAC

a G A L P D L N Q D G F A D V A V G A P L -

GAAGATGGGCACCAGGGAGCACTGTACCTGTACCATGGAACCCAGAGTGGAGTCAGGCCC
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 CTTCTACCCGTGGTCCCTCGTGACATGGACATGGTACCTTGGGTCTCACCTCAGTCCGGG

a E D G H Q G A L Y L Y H G T Q S G V R P -

CATCCTGCCCAGAGGATTGCTGCTGCCTCCATGCCACATGCCCTCAGCTACTTTGGCCGA
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 GTAGGACGGGTCTCCTAACGACGACGGAGGTACGGTGTACGGGAGTCGATGAAACCGGCT

a H P A Q R I A A A S M P H A L S Y F G R -

AGTGTGGATGGTCGGCTAGATCTGGATGGAGATGATCTGGTTCGATGTGGCTGTGGGTGCC

10

20

30

40

50

1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 TCACACCTACCAGCCGATCTAGACCTACCTCTACTAGACCAGCTACACCGACACCCACGG

a S V D G R L D L D G D D L V D V A V G A -

CAGGGGGCAGCCATCCTGCTCAGCTCCCGGCCATTGTCCATCTGACCCCATCACTGGAG

1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
 GTCCCCCGTCGGTAGGACGAGTCGAGGGCCGGTAACAGGTAGACTGGGGTAGTGACCTC

a Q G A A I L L S S R P I V H L T P S L E - 10

GTGACCCACAGGCCATCAGTGTGGTTCAGAGGGACTGTAGGCGGCGAGGCCAAGAAGCA

1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
 CACTGGGGTGTCCGGTAGTCACACCAAGTCTCCCTGACATCCGCCGCTCCGGTTCTTCGT

a V T P Q A I S V V Q R D C R R R G Q E A -

GTCTGTCTGACTGCAGCCCTTTGCTTCCAAGTGACCTCCCGTACTCCTGGTCGCTGGGAT

2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
 CAGACAGACTGACGTCCGGAAAACGAAGGTTCACTGGAGGGCATGAGGACCAGCGACCCTA 20

a V C L T A A L C F Q V T S R T P G R W D -

CACCAATTCTACATGAGGTTACCCGCATCACTGGATGAATGGACTGCTGGGGCACGTGCA

2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 GTGGTTAAGATGTA CTCCAAGTGGCGTAGTGACCTACTTACCTGACGACCCCGTGCACGT

a H Q F Y M R F T A S L D E W T A G A R A -

GCATTTGATGGCTCTGGCCAGAGGTTGTCCCCTCGGAGGCTCCGGCTCAGTGTGGGGAAT 30

2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
 CGTAAACTACCGAGACCGGTCTCCAACAGGGGAGCCTCCGAGGCCGAGTCACACCCCTTA

a A F D G S G Q R L S P R R L R L S V G N -

GTCACTTGTGAGCAGCTACACTTCCATGTGCTGGATACATCAGATTACCTCCGGCCAGTG

2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
 CAGTGAACACTCGTCGATGTGAAGGTACACGACCTATGTAGTCTAATGGAGGCCGGTCAC

a V T C E Q L H F H V L D T S D Y L R P V - 40

GCCTTGACTGTGACCTTTGCCTTGACAATACTACAAAAGCCAGGGCCTGTGCTGAATGAG

2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
 CGGAACTGACACTGGAAACGGAACCTGTTATGATGTTTTCGGTCCCGGACACGACTTACTC

a A L T V T F A L D N T T K P G P V L N E -

GGCTCACCCACCTCTATACAAAAGCTGGTCCCCTTCTCAAAGGATTGTGGCCCTGACAAT

2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 CCGAGTGGGTGGAGATATGTTTTCGACCAGGGGAAGAGTTTCCTAACACCGGGACTGTTA 50

a G S P T S I Q K L V P F S K D C G P D N -
 GAATGTGTCACAGACCTGGTGCTTCAAGTGAATATGGACATCAGAGGCTCCAGGAAGGCC
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
 CTTACACAGTGTCTGGACCACGAAGTTCACCTTATACCTGTAGTCTCCGAGGTCCTTCCGG

a E C V T D L V L Q V N M D I R G S R K A - 10
 CCATTTGTGGTTCGAGGTGGCCGGCGAAAGTGCTGGTATCTACAACCTCTGGAGAACAGA
 2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
 GGTAACACCAAGCTCCACCGCCGCCTTTCACGACCATAGATGTTGAGACCTCTTGTCT

a P F V V R G G R R K V L V S T T L E N R -
 AAGGAAAATGCTTACAATACGAGCCTGAGTATCATCTTCTCTAGAAACCTCCACCTGGCC
 2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
 TTCCTTTTACGAATGTTATGCTCGGACTCATAGTAGAAGAGATCTTTGGAGGTGGACCGG

a K E N A Y N T S L S I I F S R N L H L A - 20
 AGTCTCACTCCTCAGAGAGAGAGCCCAATAAAGGTGGAATGTGCCGCCCTTCTGCTCAT
 2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 TCAGAGTGAGGAGTCTCTCTCTCGGGTTATTTCCACCTTACACGGCGGGAAGACGAGTA

a S L T P Q R E S P I K V E C A A P S A H - 30
 GCCCGGCTCTGCAGTGTGGGCATCCTGTCTTCCAGACTGGAGCCAAGGTGACCTTTCTG
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
 CGGGCCGAGACGTCACACCCCGTAGGACAGAAGGTCTGACCTCGGTTCCACTGGAAAGAC

a A R L C S V G H P V F Q T G A K V T F L -
 CTAGAGTTTGAGTTTAGCTGCTCCTCTCTCCTGAGCCAGGTCTTTGGGAAGCTGACTGCC
 2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
 GATCTCAAACCTCAAATCGACGAGGAGAGAGGACTCGGTCCAGAAACCTTCGACTGACGG

a L E F E F S C S S L L S Q V F G K L T A - 40
 AGCAGTGACAGCCTGGAGAGAAATGGCACCCCTTCAAGAAAACACAGCCCAGACCTCAGCC
 2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
 TCGTCACTGTCCGACCTCTCTTTACCGTGGGAAGTTCTTTTGTGTCGGGTCTGGAGTCGG

a S S D S L E R N G T L Q E N T A Q T S A -
 TACATCCAATATGAGCCCCACCTCCTGTTCTCTAGTGAGTCTACCCTGCACCGCTATGAG
 2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
 ATGTAGGTTATACTCGGGGTGGAGGACAAGAGATCACTCAGATGGGACGTGGCGATACTC

a Y I Q Y E P H L L F S S E S T L H R Y E - 50

G TTCACCCATATGGGACCCTCCCAGTGGGTCTGGCCCAGAATTCAAAAACCACTCTCAGG
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
 CAAGTGGGTATACCCTGGGAGGGTCACCCAGGACCGGGTCTTAAGTTTTGGTGAGAGTCC

a V H P Y G T L P V G P G P E F K T T L R -

ACTAACAATGCAAGCTGCATAGTGCAGAACCTGACTGAACCCCCAGGCCACCTGTGCAT
 2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
 TGATTGTTACGTTTCGACGTATCACGTCTTGGACTGACTTGGGGGTCCGGGTGGACACGTA

a T N N A S C I V Q N L T E P P G P P V H -

CCAGAGGAGCTTCAACACACAAACAGACTGAATGGGAGCAATACTCAGTGTGAGGTGGTG
 3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
 GGTCTCCTCGAAGTTGTGTGTTTGTCTGACTTACCCTCGTTATGAGTCACAGTCCACCAC

a P E E L Q H T N R L N G S N T Q C Q V V -

AGGTGCCACCTTGGGCAGCTGGCAAAGGGGACTGAGGTCTCTGTTGGACTATTGAGGCTG
 3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 TCCACGGTGGAAACCGTCGACCGTTTCCCCTGACTCCAGAGACAACCTGATAACTCCGAC

a R C H L G Q L A K G T E V S V G L L R L -

G TTCACAATGAATTTTTCCGAAGAGCCAAGTTCAAGTCCCTGACGGTGGTCAGCACCTTT
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
 CAAGTGTTACTTAAAAAGGCTTCTCGGTTCAAGTTCAGGGACTGCCACCAGTCGTGGAAA

a V H N E F F R R A K F K S L T V V S T F -

GAGCTGGGAACCGAAGAGGGCAGTGTCTACAGCTGACTGAAGCCTCCCGTTGGAGTGAG
 3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
 CTCGACCCTTGGCTTCTCCCGTCACAGGATGTCGACTGACTTCGGAGGGCAACCTCACTC

a E L G T E E G S V L Q L T E A S R W S E -

AGCCTCTTGGAGGTGGTTCAGACCCGGCCTATCCTCATCTCCCTGTGGATCCTCATAGGC
 3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
 TCGGAGAACCTCCACCAAGTCTGGGCCGATAGGAGTAGAGGGACACCTAGGAGTATCCG

a S L L E V V Q T R P I L I S L W I L I G -

AGTGTCTGGGAGGGTTGCTCCTGCTTGTCTCTTGTCTTCTGCCTGTGGAAGCTTGGC
 3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 TCACAGGACCCTCCCAACGAGGACGAACGAGAGGAACAGAAGACGGACACCTTCGAACCG

a S V L G G L L L L A L L V F C L W K L G -

TTCTTTGCCATAAGAAAATCCCTGAGGAAGAAAAAAGAGAAGAGAAGTTGGAGCAATGA

10

20

30

40

50

3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
 AAGAAACGGGTATTCTTTTAGGGACTCCTTCTTTTTTCTCTTCTTCAACCTCGTACT

a F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q

ATGTAGAATAAGGGTCTAGAAAAGTCCTCCCTGGCAGCTTTCTTCAAGAGACTTGCATAAA
 3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
 TACATCTTATTCCCAGATCTTTCAGGAGGGACCGTCGAAAGAAGTTCTCTGAACGTATTT

10

AGCAGAGGTTTGGGGGCTCAGATGGGACAAGAAGCCGCCTCTGGACTATCTCCCCAGACC
 3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
 TCGTCTCCAAACCCCGAGTCTACCCTGTTCTTCGGCGGAGACCTGATAGAGGGGTCTGG

AGCAGCCTGACTTGACTTTTTGAGTCCTAGGGATGCTGCTGGCTAGAGATGAGGCTTTACC
 3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
 TCGTCGGACTGAACTGAAAACCTCAGGATCCCTACGACGACCGATCTCTACTCCGAAATGG

20

TCAGACAAGAAGAGCTGGCACCAAAACTAGCCATGCTCCCACCCTCTGCTTCCCTCCTCC
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
 AGTCTGTTCTTCTCGACCGTGGTTTTGATCGGTACGAGGGTGGGAGACGAAGGGAGGAGG

TCGTGATCCTGGTTCCATAGCCAACACTGGGGCTTTTGTGGGGTCCTTTTATCCCCAG
 3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
 AGCACTAGGACCAAGGTATCGGTTGTGACCCCGAAAACAAACCCAGGAAAATAGGGGTC

30

GAATCAATAATTTTTTGCCTAGGAAAAAAAAAAGCGGCCGGAATTCGATATCAAGCT
 3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3779
 CTTAGTTATTAATAAAAAACGGATCCTTTTTTTTTTCGCCGCGCTTAAGCTATAGTTCGA

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列特徴:

- (A) 配列の長さ: 143 塩基対
- (B) 配列の型: 核酸およびアミノ酸
- (C) 鎖の数: 二本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

40

(iii) 配列の種類: cDNA

(vi) 起源:

- (A) 生物名: ヒト
- (B) 細胞の種類: 軟骨細胞

(xi) 配列の記載: 配列番号3:

50

Nde I

|

GGGGCATATGGTTCAGAACCTGGGTTGCTACGTTGTTTCCGGTCTGATCATCTCCGCTCT

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60

CCCCGTATACCAAGTCTTGGACCCAACGATGCAACAAAGGCCAGACTAGTAGAGGCGAGA

b G H M V Q N L G C Y V V S G L I I S A L -

GCTGCCGGCTGTTGCTCACGGTGGTAACTACTTCCCTAAGCTTGTCCCAGGTTATCAGCGG

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

CGACGGCCGACAACGAGTGCCACCATTGATGAAGGATTCGAACAGGGTCCAATAGTCGCC

b L P A V A H G G N Y F L S L S Q V I S G -

BamHI

|

CCTGGTGCCGCGCGGATCCCCC

121 -----+-----+---- 143

GGACCACGGCGCGCCTAGGGGG

b L V P R G S P -

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】 I I 型コラーゲン - 「Sepharose」上での 10インテグリンサブユニットの親和精製を示す。

【図2】 ウシ 10インテグリンサブユニットからのペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図3】 Aは、ウシ軟骨細胞からのインテグリンサブユニット 10の親和精製および免疫沈殿を示す。 Bは、ヒト軟骨細胞からのインテグリンサブユニット 10の親和精製および免疫沈殿を示す。 Cは、ヒト軟骨肉腫細胞からのインテグリンサブユニット 10の親和精製および免疫沈殿を示す。

【図4】 ウシインテグリンサブユニット 10に対応する 900 b p P C R フラグメントを示す。

【図5】 3種の重複クローンの線図である。

【図6】 ヒロ 10インテグリンサブユニットのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。

【図7】 インテグリン 10mRNAのノーザンプロットを示す。

【図8】 10の細胞質領域に対する抗体を用いたヒト軟骨細胞からの 10インテグリンサブユニットの免疫沈殿を示す (a)。 10 会合 鎖のウエスタンプロット (b)。

【図9】 ヒト関節軟骨中の 10インテグリンの染色を示す。

【図10】 生後3日マウスの手足軟骨における 10インテグリンの染色を示す。

【図11】 生後13.5日マウスの胚における 10インテグリンの染色を示す。

【図12】 各種ヒト組織中の 10mRNAの交配を示す。

【図13】 生後3日マウスの手足における関節周りの靭帯 (a)、骨格筋 (b) および心臓弁 (c) の染色をシスプラチン。

【図14】 ヒト軟骨細胞、ヒト内皮細胞。ヒト繊維芽細胞およびラット関節からの 10インテグリンサブユニットに対応する P C R フラグメントを示す。

【図15】 ヒトインテグリンサブユニット 10の部分ゲノムヌクレオチド配列を示す。

【図16】 アルギン酸塩中で培養した軟骨細胞における 10インテグリンサブユニットのアップレギュレーションを示す。

【図17】 ヒト平滑筋細胞からの 10インテグリンサブユニットの染色を示す。

10

20

30

40

50

【 図 2 】

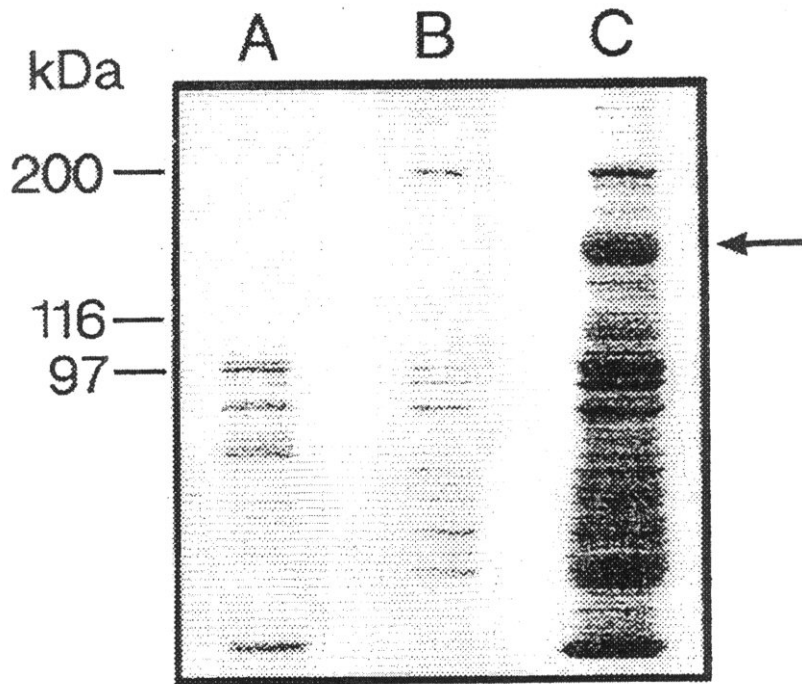
| ペプチド | アミノ酸配列 |
|------|---------------------|
| 1 | DNTAQTSAIYIQYEPHHSI |
| 2 | GPGHWDR |
| 3 | AAFDGSGQR |
| 4 | FAMGALPD |
| 5 | FTASLDEWTTAAR |
| 6 | VDASFRPQGXLAP |

【 図 1 2 】

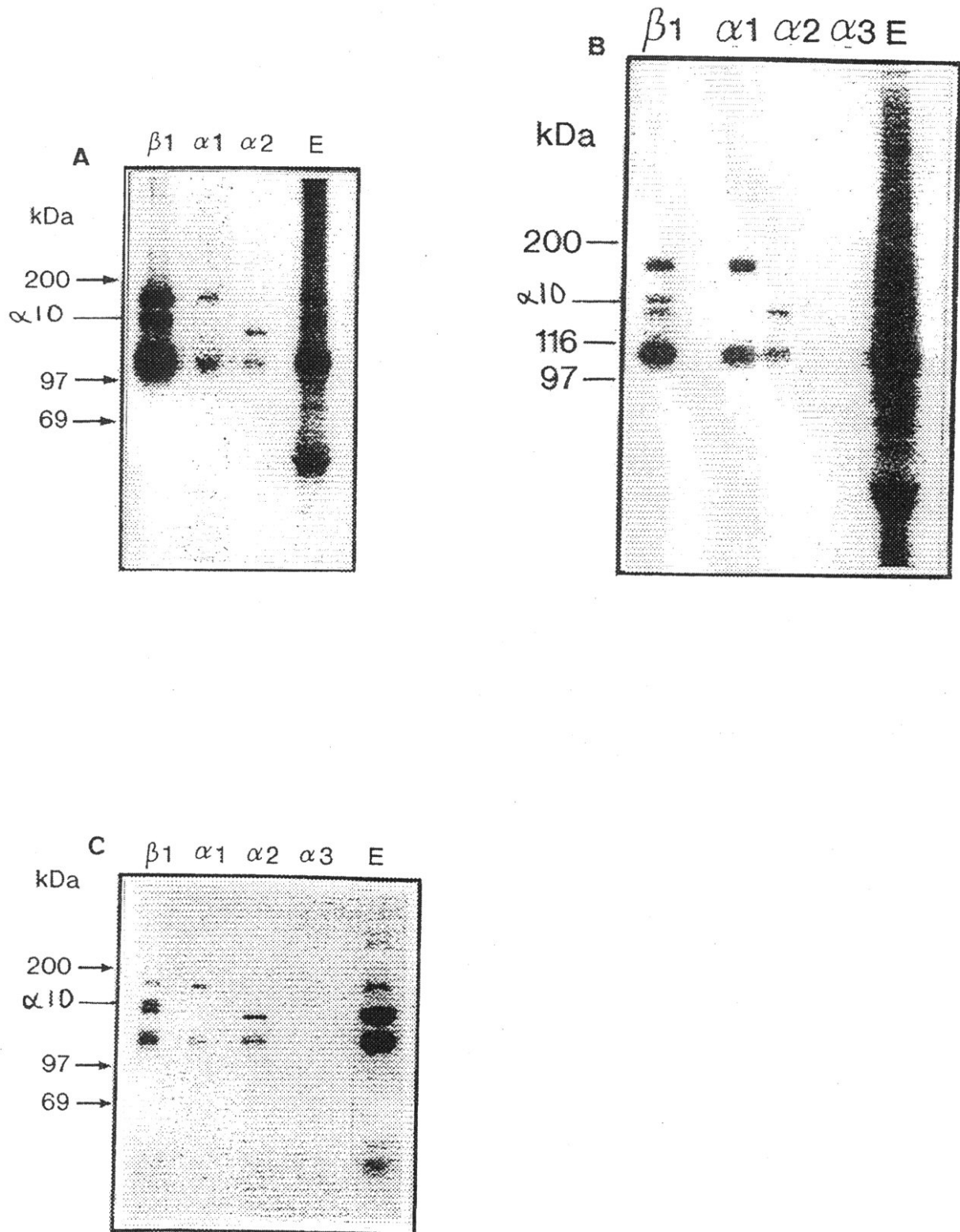
ヒトRNAマスタープロット

| 組 織 | 発 現 | 組 織 | 発 現 |
|------|------|-------|-----|
| 大動脈 | ++++ | 甲状腺 | - |
| 気管 | + | 唾液腺 | - |
| 肺 | ++ | 脾臓 | - |
| 胎児肺 | ++ | 胎児脾臓 | - |
| 腎臓 | ++ | 胸腺 | - |
| 胎児腎臓 | (+) | 胎児胸腺 | - |
| 心臓 | (+) | 末梢白血球 | - |
| 胎児心臓 | ++ | リンパ節 | - |
| 腎臓 | ++ | 虫垂 | - |
| 乳腺 | (+) | 胎盤 | - |
| 骨髄 | (+) | 全脳 | - |
| 小腸 | (+) | 胎児脳 | - |
| 骨格筋 | - | 扁桃 | - |
| 肝臓 | - | 尾状核 | - |
| 胎児肝臓 | - | 小脳 | - |
| 結腸 | - | 大脳皮質 | - |
| 膀胱 | - | 前頭葉 | - |
| 子宮 | - | 海馬 | - |
| 前立腺 | - | 延髄 | - |
| 胃 | - | 後頭葉 | - |
| 精巣 | - | 被殻 | - |
| 卵巣 | - | 黒質 | - |
| 脾臓 | - | 側頭葉 | - |
| 下垂体 | - | 視床 | - |
| 副腎 | - | 視床腹側核 | - |

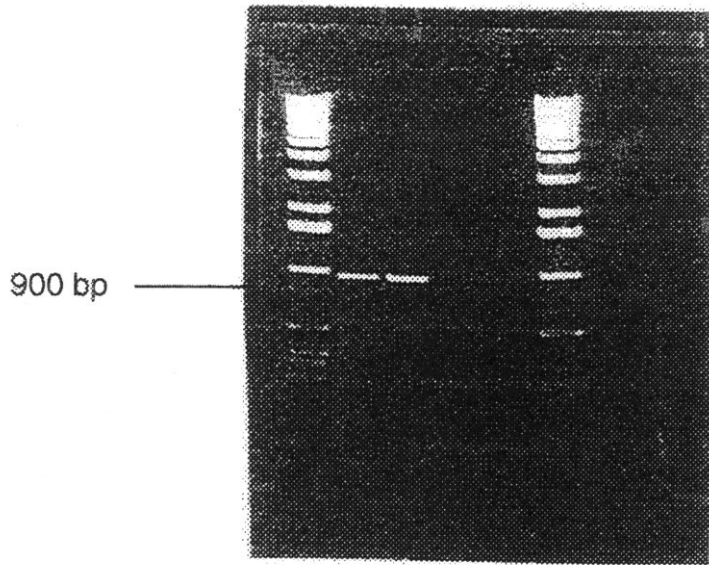
【 図 1 】



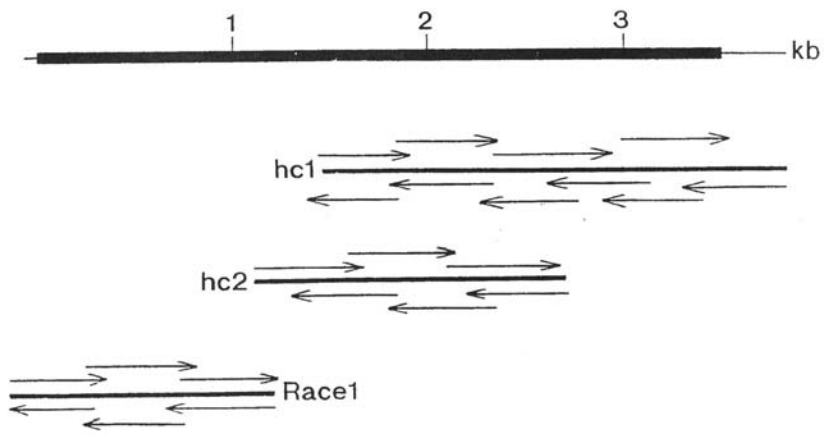
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 6 】

CAGGTCCAGAACCCGATCAGGCATGGAATCCCTCTGTCACCTGCTTCCCTCGTGTCTCGACA 72
 H E L P P V T H L F L P L V P L T -6

GGTCTGCTCCCTTTAACCTGGATGAACATCACCCAGCCTATTCCAGGGCCACCAAGCTGAATTT 144
 G L C S P F N L D E H H P R L F P G P P E A E F 19

GGATACAGTCTTCAACATGTGGGGTGGACAGCAGTGGATGCTGGGGCCGCCCTGGATGGCCCT 216
 G Y S V L Q H V G G G Q R M H L V G A P M D G P 43

TCAGGCACCGGAGGGGGAGCTTATGCTGCCCTGTAGGGGGGCCCAATGCCCATGTGCCAAGGGC 288
 S G D R R G D V Y R C P V G G A H N A P C A K 67

CACCTAGTGACTCAACCTGGGAATCATCTCATCCGCTGTGAATATGCACCTGGGATGCTCTGTTA 360
 H L G D Y Q L G N S S H P A V W H H L G H S L L 91

GAGCAGATGGTGGGGATCATGCCCTGTGCCCTCTGCTGCTGCTGTGGCAGCTCTGCTTC 432
 E T D G D G G P M A C A P L W S R A C G S S V F 115

AGTTCGGGATGTGCCCTGTGGATGCTTATTCCAGCTCAGGAAGCTGGCCAGCTGCCAACGC 504
 S S G I C A R V D A S F Q P Q G S L A P T A R 139

TGCCAACATACATGGATGTTGTCATTGCTTGGATGGCTCAACAGCATTACCCCTGGTCTGAAGTTCAG 576
 C P T Y M D V V I V L D G S N S I Y P M S E V Q 163

ACCTTCTCAGGAAGCTGGTAGGAATGTTATTGACCCAGAACAGATCAGGGTGGACTGGTACGATY 648
 N F L R R L V G K L F I D P E Q I O V G L V Q Y 187

GGGAGAGCCCTGTACATGAGTCCCTGGGATTTCCGAACGAGGAAGTGGTGGAGCAGCAAG 720
 G E S P V H E W S L G D F R T K E E V V R A A K 211

AACCTCAGTGGCGGGAGGAGAGAACAAAGATGCCAAGCAATAATGGTGGCTGCACAGAGGGTTC 792
 N L S R R E G R E T K T A Q A I M V A C T E G F 235

AGTCAGTCCATGGGGCCGACCCGAGCTGCCAGGCTACTGGTGGTCTACTGATGGAGATCCCATGAT 864
 S Q S H G G R P E A A R L L V V V T D G E S H D 259

GGAGAGGAGCTTCTCAGCAGTAAAGCCCTGAGGCTGGAGAGTGCACCGTATGGGATTCAGTCTT 936
 G E E L P A A L K A C E A G R V T R Y G I A V L 283

GGTCACTACTCCGGGGCAGCGAGATCCGAGCTTTCTGAGCAAAATAGAATTTGCCAGTGCACA 1008
 G H Y L R R Q R N D P S S F L R E I R T I A S D P 307

GATGAGGATTTCTTCAATGTCACAGATGAGGCTGCTCTGACTGACATTTGGATGCATAGGATCGG 1080
 D E R F F F N V T D E A A L T D I V D A L G D R 331

ATTTTGGCTTGAAGGGCCCATGCAGAAACGAAAGCTCTTTGGCTGGAATGCTCAGATTTGTTTC 1152
 I F G L E G E H A E H E S S F G L E H S Q I G F 355

TCCACTCATCGC TAAAGATGGGATTTCTTTGGATGGTGGGGCTATGACTGGGAGGCTCTGTGCTA 1224
 S T H R L K D C I L F G H V G A Y D W G G S V L 379

TGGCTGAAGAGGCCACCGCTTTTCCCGCAGCAATGGCACTGGAGAGGATTCGCCCTGCACTGCAG 1296
 W L E G G H R L F P P R M A L E D E F P P A L Q 403

AACCATGAGCTTACTGGTACTCTGTTCTTCATGCTTTTGGGGTGGAGCCGCCCTGTTCTCTCT 1368
 N H A A Y L V G Y S V S S M L L R G G R R L F L S 427

GGGCTCCTGATTTAGACATCGAGAAAAGTCACTGCCCTTCCAGCTTAAAGAAATGGGCTGTGAGGGTT 1440
 G A P R P R R H R G K V I A F O L K K D G A V R V 451

GCCAGAGCTCCAGGGGGAGGATGGTCTACTTTGGCAGTGCCTTGCCTATGGATGACATAGG 1512
 A Q S L O G E Q I G S Y F G S E L C P L D T D R 475

GATGAACTACTGATGCTTACTTGTGGCTGCCCATGTTCTGGGACCCAGAACAAAGAAACAGGACT 1584
 D G T T D V L L V A A P H E L G P Q N K E T G R 499

GTTTATGTATCTGGTAGCCAGCAGTCTTCTGACCTCCAGGAACACTTGCAGCAGAACCCGCCAG 1656
 V Y V Y L V G Q Q S L L T L O G T L O P E P P Q 523

GATGCTGGTGGCTTTGCCATGGAGCTCTTCTGATCTGAACCAAGATGGTTTGTGATGGCTGTG 1728
 D A R F G F A H K K I P E E E K R E E K L E Q 547

GGGCGCTCTGGAAGATGGCCACAGGAGCACTGTACTGTACATGGAACCCAGAGTGGAGTCAAGCC 1800
 G A P L L D G H Q G A L Y L Y H G T O S G V R P 571

CATCTGCCAGAGGATGCTGCTGCCCTCAGTCCACATGCCCTCAGTACTTTGGCCAGTGTGGATGGT 1872
 H P A Q R I A A A S M P H A L S Y F G R S V D G 595

CGGTAGATCTGGATGGATGATCTGGTGGATGCTGGCTGGGGTGGCCAGGGGGCCAGCCTCTGCTCAGC 1944
 R L D L D G D D L V D V A V G A Q G G A A I L L S 619

TCGGCCCATGCTCATCTGACCCATCAGTGGAGGTGACCCACAGGCATCAGTGTGGTTCAGAGGGAC 2016
 S R P I V H L T P S L E V T P Q A I S V V Q R D 643

YTAGGGCCGAGGGCCAAAGAGCAGTGTCTGACTGACCCCTTTGCTCCAAGTCACTCCGCTACTCCT 2088
 C R R R G Q E A V C L T A A L C F Q V T S R T P 667

GGTGGTGGATCACCAATCTACATGAGGTTCACCCCATCCTGGATGAATGACTGCTGGGACGTGCA 2106
 G R W D H Q F Y H R F T A S L D E M T A G A R A 691

GCATTGATGCTTGGCCAGAGTTGCTCCCTGGAGGCTCCGGCTCAGTGTGGGAAATGCATTTGTGAG 2232
 A F D G S G Q R L S P R R L R L S V G N V T C E 715

CAGTCACTTCCATGCTGGATACATCAGATTAACCTCCGGCAGTGGCTTACTGTGACTTTGCCCTG 7304
 Q L H F H V L D T S D Y L R L V L T V T F A L 2309

GACAATACAAAGCCAGGGCTGTGCTGAATGAGGGCTACCCACTTATACAAAAGTGTGCCCTTC 2376
 D N T T K P G P V L N E G S P T S I Q K L V F F 763

TCAAAGATTGGCCCTGACATGAATGCTCAGACAGCTGGTCTCAAGTGAATGACATCAGAGGC 2448
 K C D C G P D N E C V T D L V L Q V N H D I R G 787

TCAGGAAGCCCATTTGCTGGTGGAGTGGCCGGGAAAGTGGTATCTACAACTCTGGAGCAACA 2520
 S R K A P F V V R G G R R K V L V S T T L E N R 811

AMGMAATGCTTACAATACAGGCTGAGTATCATCTTCTAGAACTCCACCTGGCAGTCTCACTCT 2592
 K E N A Y N T S L S I I F S R N L H L A S L T P 835

CAGAGGAGGCCCAATAAGTGGATGCTGCCGCCCTTCTGCTCAGTGGCCGCTGAGTGTGGGGCAT 2664
 Q R E S P I K V E C A A P S A H A R L C S V G H 859

CCTGCTTCAGAGTGGCCAGGTGACCTTCTGCTAGAGTTGAGTTAGTCTCTCTCTCTCTGAGC 2736
 P V F Q T G A K V T F L L E F E P S C S S L L S 883

CAGTCTTGGAGGCTGACTGCAGCAGTGCAGCTGGAGAGAAAGCCCTTCAAGAAACACAGCC 2808
 G Y F G K L T A S S D S L E R N G T L Q E M T A 907

CAGAGCTCAGCTACATCAATATAGCCGCCCTCTCTGCTTGTAGTGAAGTCACTCCAGCCATGAG 2880
 Q T S A Y I Q Y E P H L L F L S S L E R N G T L Q E M T A 931

GTTCACCATATGGAGCCCTCCAGTGGCTGCTGCCAGAAATCAAAACACTCTCAGGGTTCAGAACTA 2952
 V H P Y G T L P V G P G P E F K T T L R V Q N L 955

GGCTGATGTGGTGGTGGCTCATCTCAGCCCTCTCAGCTGTGGCCATGGGGCAATTACTTC 3024
 G C Y V V S G L I I S A L L P A V A H G G G N Y F 979

CTATCAGTCTCAAGTCACTAACAATGCAAGCTGCATAGTGCAGAACTGACTGAACCCAGGGCCA 3096
 L S L S O V I T N N A S C I V Q N L T E P P G P 1003

CCTGCTCAGAGGACTTCAACACAAACAGACTGAATGGGCAATAC TCAAGTGCAGTGGTGGAGG 3168
 P V H P E E L Q H T M R L N G S N T Q C Q V V R 1027

TGCACCTGGGAGCTGGCAAGGGGACTGAGTCTCTGTTGGATTTGAGCTGGTTCACAATGAATTT 3240
 C H L G Q L A K G T E V S V G L L R L V H N E P 1051

TTCCGAGAGCCAGTTCAGTCCCTGAGCTGGTTCAGCCTTTGAGCTGGGAAACGAGAGGGCAGTGC 3312
 F R R A K F K S L T V V S T F E L G T E E G S V 1075

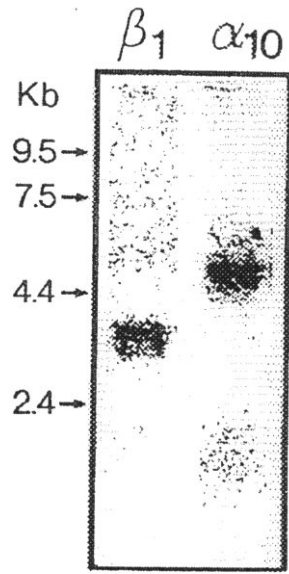
CTACAGTGAAGCTCCCTGGAGTGGAGGCTCTGGAGTGGTGGTTCAGAGCCGCCCTATCTCTCATC 3384
 L Q L T E A S R W S E S L E V V Q T R P I L I 1099

TCCTGTGATCTCATAGCAGTGTCTGGAGGGTGTCTGCTGCTGCTCTCTCTCTCTCTCTGTTGG 3456
 S L M I L I G S V L G G L L L A L L V F C L W 1123

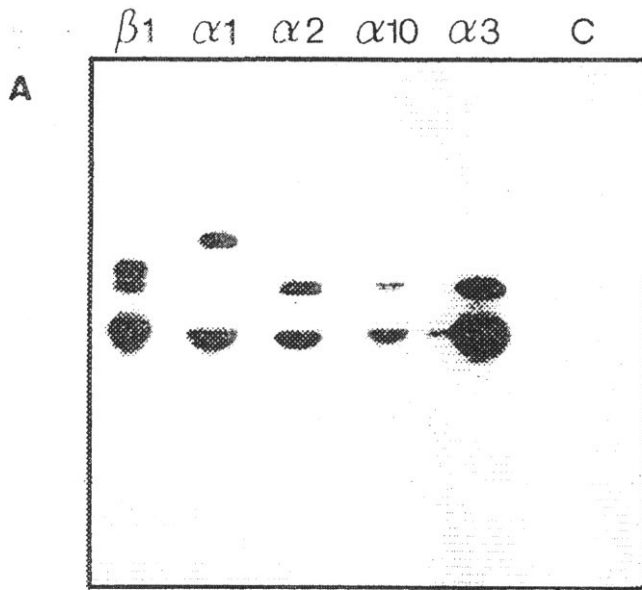
AAGCTTGGCTTTTCCCATAGAAATCCCTGAGGAAGAAAAGAGAAAGTGGAGCAATGAATG 3528
 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q 1145

TAGAATAGGGCTAGAAAGTCCCTCCGAGCTTCTTCAAGACTTGCATAAAGCAGAGGTTGGG 3600
 GCTCAGTGGGCAAGAGCCGCTCGGACTATCTCCAGACAGCAGCTGACTGACTTTTGAAGTCT 3672
 AGGATGCTGCTGGCTAGAGATGAGCTTTACTCTCAGACAAAGAGCTGGCCCAAAACTAGCAGTCC 3744
 CACCTCTGCTCCCTCTCTCTGATCTGGTTCATAGCCAACTGGGCTTTTGTGGGCTCTT 3816
 TATCCCCAGAAATCAATATTTTGGCTAGGAAAAAAGCCGCCGAATTCATCAAGCT 3884

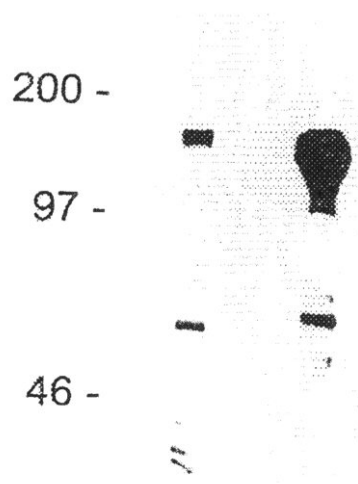
【 図 7 】



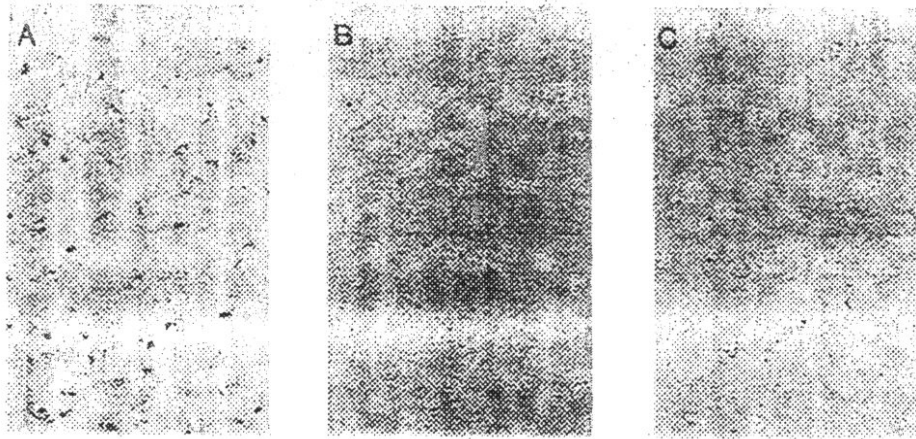
【 図 8 】



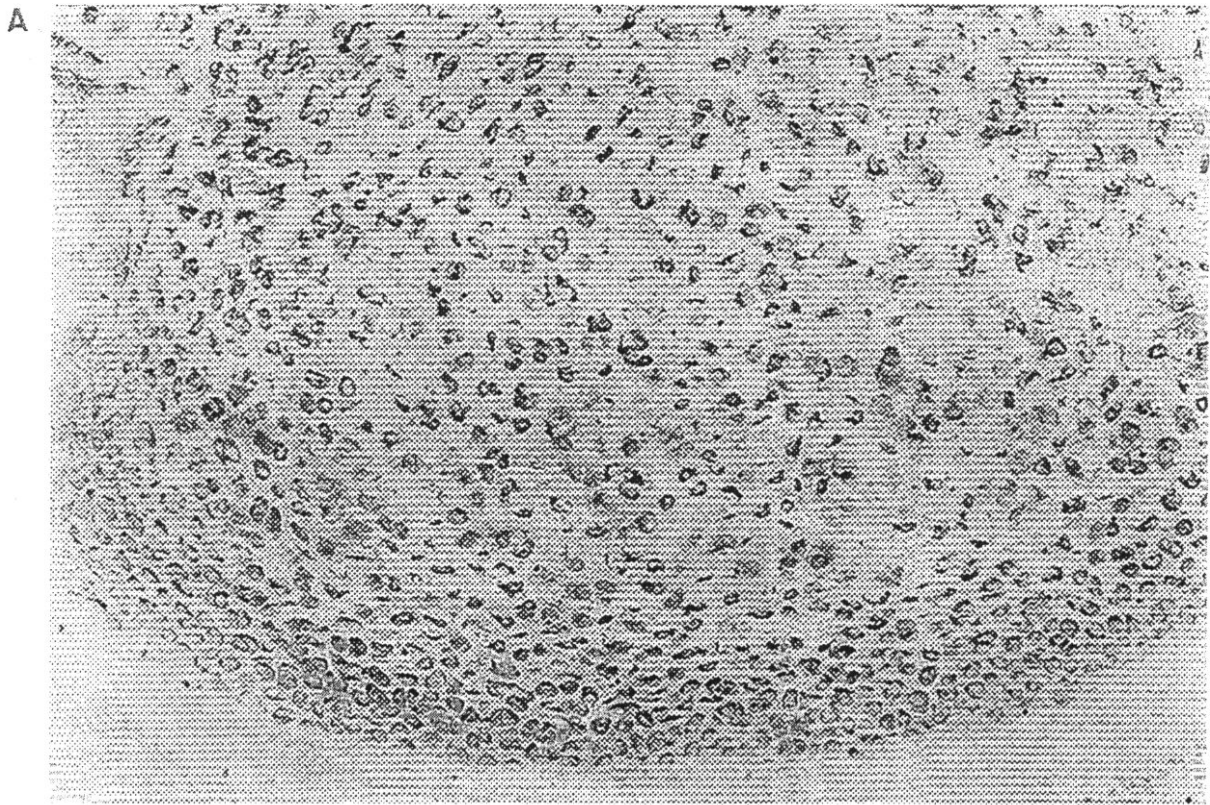
B IP: $\alpha 10$ $\beta 1$
Blot: $\beta 1$ $\beta 1$



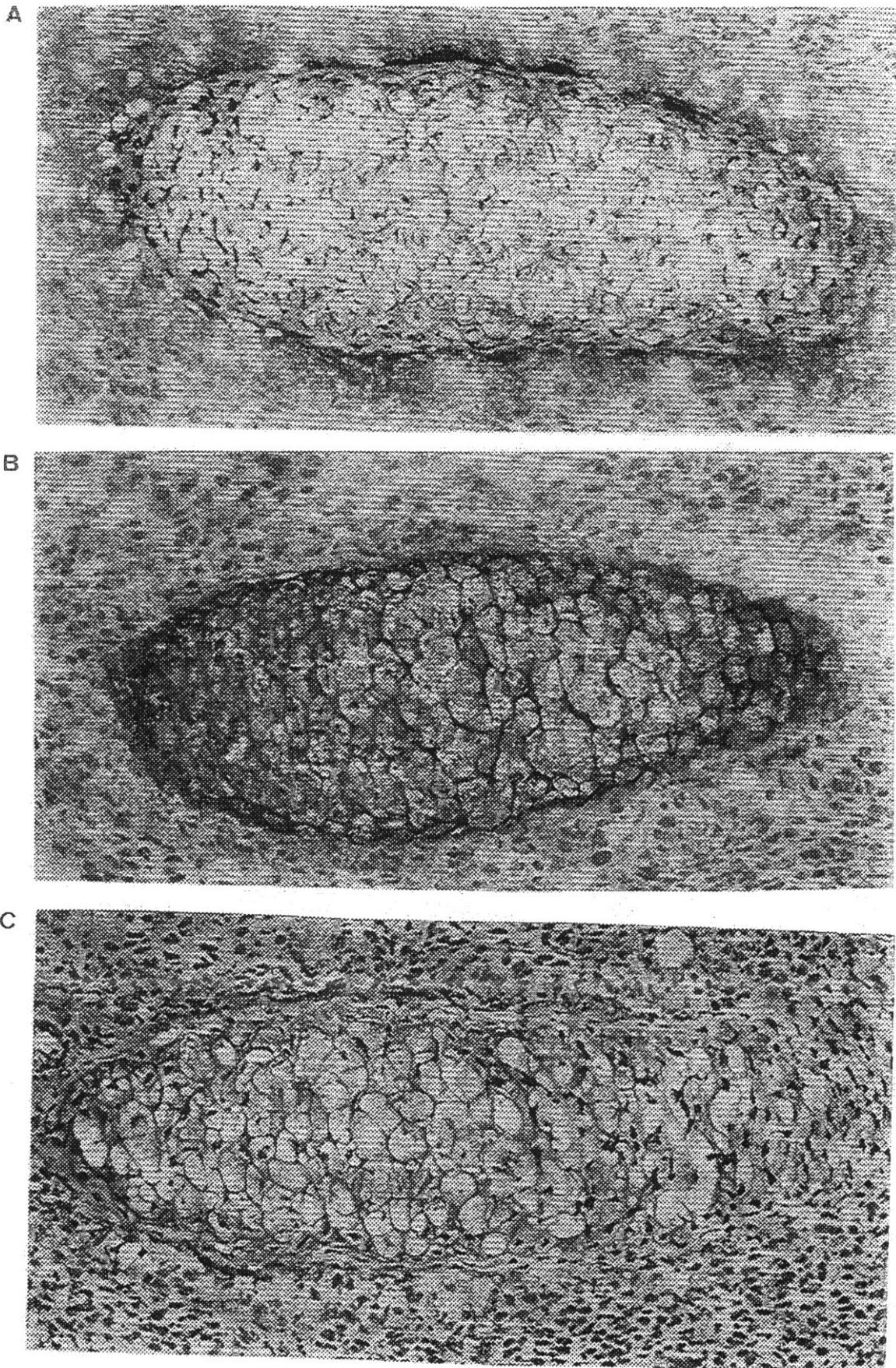
【 図 9 】



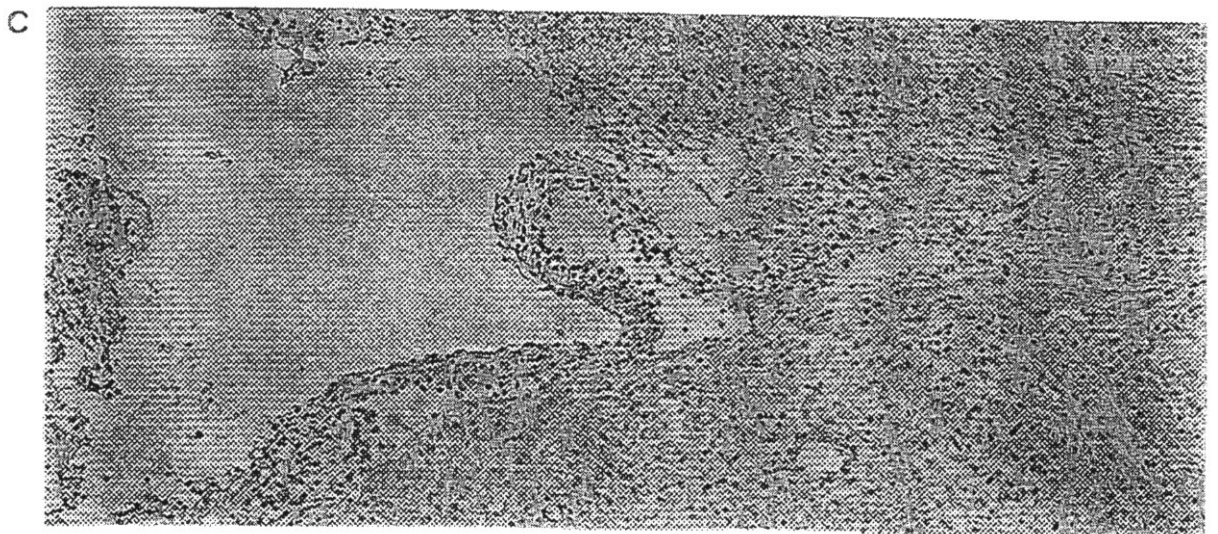
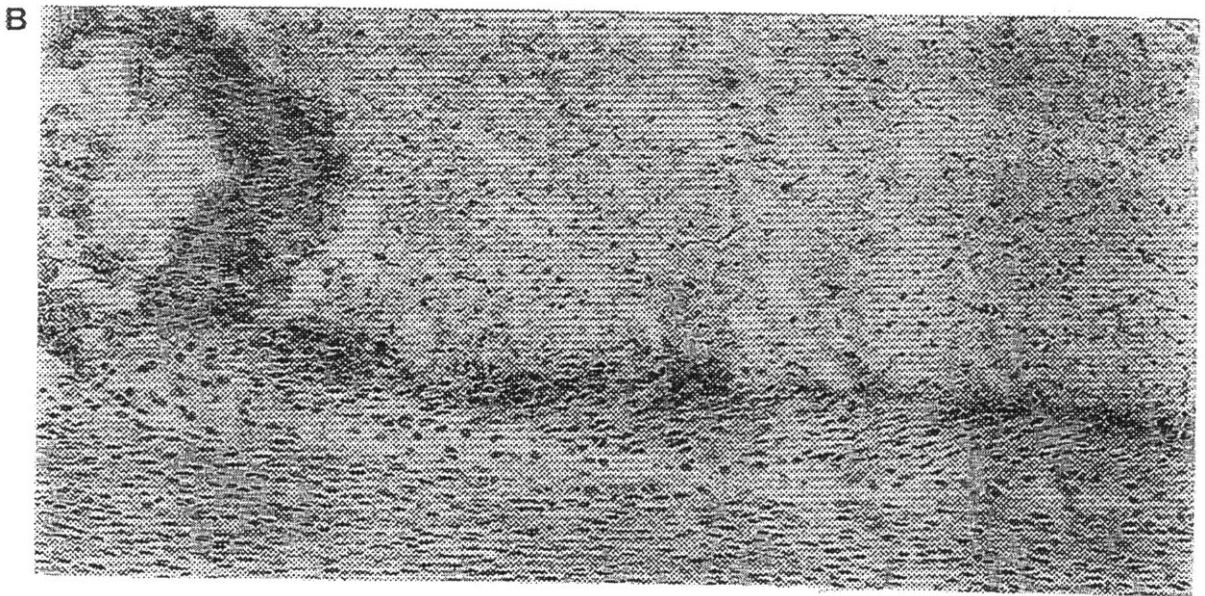
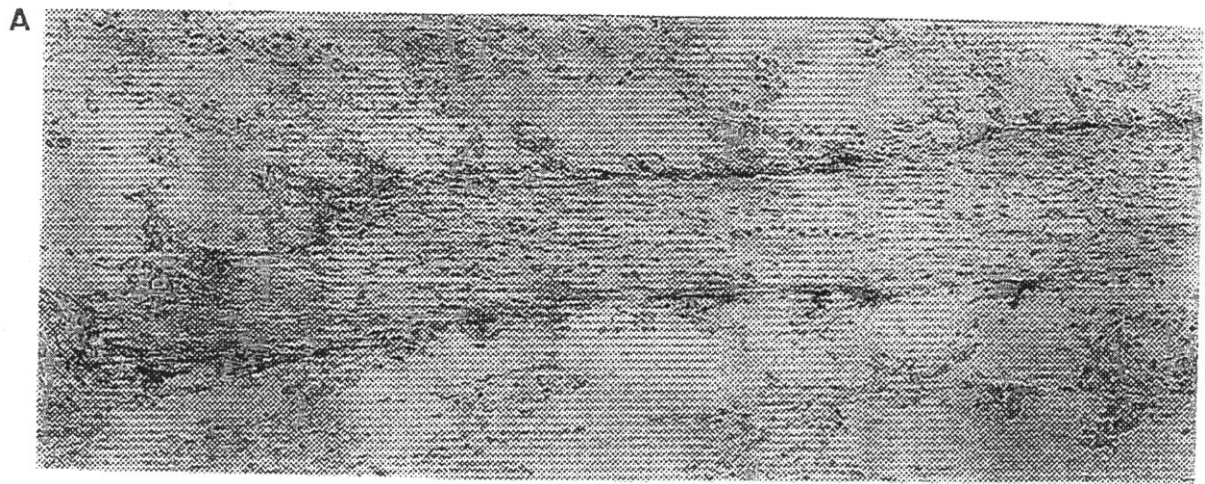
【図10】



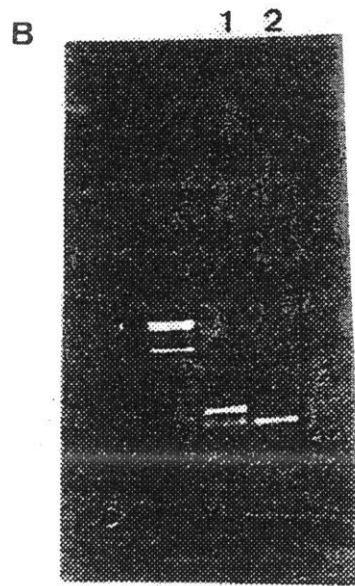
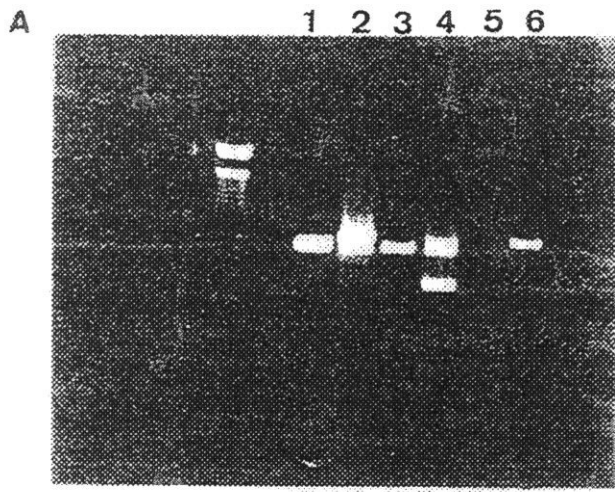
【図 11】



【図 13】



【 図 1 4 】



【 15 a 】

TGNTMMKCMKACCGAKMGWSAKGNCCGAKGGTKGKGVAAVGTGACARAGCTNGMNAARANGAAGTATGACCCWGTGGGC 80
 ? ? ? ? R ? ? ? P ? V ? ? ? D ? A ? ? K ? K Y D ? W A
 ? ? ? ? H ? ? ? ? R ? ? ? ? V T ? L ? ? K ? ? S M T ? G
 V ? ? ? ? T ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? . Q S ? ? K ? E V . P V G
 CRAGATAGMKAMDAAGCNGMSAGKTRAMGGACGATGGNCCMGCCAAVCGABWGGNAHTBCGGCNWDCARNGTCCAAATK 160
 ? I ? ? K ? ? ? ? ? G R W ? ? Q ? ? ? G ? ? G ? Q ? P N
 P R . ? ? S ? ? ? ? ? D D G P A ? R ? ? ? ? ? A ? ? ? V Q ?
 ? D ? ? ? ? A ? ? ? . R T M ? ? P ? ? ? ? ? R ? ? ? S K ?
 SANKTSCAGGAACCMACGGSAMTGGCTCGCARCCCDTAGGGATCAGGKACGATGRCTSCCGRNSKACTCSGNKTGATWA 240
 ? ? ? R N ? R ? G S Q P ? G I R ? D ? S P ? ? S ? . ?
 ? ? ? G T ? G ? A R ? P . G S G T M ? ? R ? T ? ? ? D ?
 ? ? S Q E P T ? W L A ? ? R D Q ? R ? L ? ? ? L ? ? ? I
 ATCGMNVGTMGGMAGGCGMGAATRWAAAGTANTGGTMAMAKATGWGVMMGAWATGATRRGTMGACTVTHVMGGVAK 320
 I ? ? R ? A ? E L ? S ? G R ? M ? R ? . ? V D ? ? G ?
 S ? V G R R R N ? K V ? V ? ? ? ? ? G ? D ? ? T ? ? ?
 N R ? ? ? G G G I ? K ? W ? ? ? ? ? ? ? M ? ? R L ? ? R ?
 VTAKSGGTACAGCGCAAKACARGRAKGTGTCTGAGGAADTCAGNAGGACAAMMTGCCGAAGTCMGGACTTAGKATRGAT 400
 ? ? Y R R ? Q ? ? V . G ? Q ? D ? ? A E V R T . ? ?
 ? ? G T G E ? ? ? ? V S E E ? ? R T ? L P K S G L ? ? D
 ? ? V Q A ? T ? ? C L R ? S ? G Q ? C R S ? D L ? ? I
 ACGAANCKTRGATCTTAMADGGGGGNKAGCGAGTGCSTAAACGVARATRGGNSWGTCTACTTMAACNCCAAGNGDGGACA 480
 Y E ? ? I L ? G G ? R V ? K R ? ? ? ? L L ? ? Q ? ? T
 T ? ? ? S ? ? ? ? V S E C ? N ? ? ? ? V Y ? N ? K ? G H
 R ? ? D L ? ? G ? A S A . T ? ? G ? S T ? T P ? ? D
 TTTACTAGASGAGGAGAGTAGCCAGATCACDTGAGATGATCTAAKGTGGGGTCCCGTGGCCAGTATATGAGAGGACTGGT 560
 F T R ? G E . P D H ? R . S ? V G S R C Q Y M R G L V
 L L ? E E S S Q I T . D D L ? W G P V A S I . E D W
 I Y . ? R R V A R S ? E M I . ? G V P L P V Y E R T G
 TCGGCAGACATWGATGCTCTTTGCTGACTCACATATTTGTTGCCVTGAGKATGATCAGATACGATCTGWTGTCCCTCATCA 640
 R Q T ? M L F A D S H I V A ? ? M I R Y D L ? S L I
 F G R H ? C S L L T H I L L P . ? . S D T I ? C P S S
 S A D I D A L C . L T Y C C ? E ? D Q I R S ? V P H H
 TGAATSTGRCCGTGATGCTAATGAGATTCCGCTATGATGGAACAAGAGACTTMTGTACAGCAGGCGAATGAAGTTTC 720
 M N ? ? R D A N E I R L . W N K R L ? L Q Q A N E G F
 . ? ? ? A V M L M R F A Y D G T R D ? C Y S R R M K V S
 E ? ? P . C . . D S P M M E Q E T ? A T A G E . R F
 TAGAGTAGGAGTCTCAGGAGGAGAGAACTGTGGACCTGGAGGACCAGGACTCCAGGAGGAAGTWGCCACAAGTGGCTT 800
 . S R S L R R R R E T V D L E D Q G L Q E E V A T T G L
 L R V G V S G G E K L W T W R T R D S R R K ? P Q L A
 L E . E S Q E E R N C G P G G P G T P G G S ? H N W L
 GMAGTTTCGGCTCCGATCCTGATACWGGCTCGTCCCTTVGAGTTATCCCCCTCTTTGCTGGATGGCTCAGAAATGCCTGG 880
 ? F R L R S . Y ? L V L ? V I P L S C W M A Q K C L
 ? S F G S D P D T G S S ? E L S P S L A G W L R N A W
 ? V S A F I L I ? A R S ? S Y P P L L L D G S E M P G
 ACCTTTTCATCCCCACTGGACAAACTAGGCGTCTGGCGTGTGGCCCTGGGATTGTGGGGCTGTGTGGCTCATATCCTC 960
 D L F I P T G Q T R R L A L W P W D C G A V W P H I L
 T F S S P L D K L G V W R C G P G I V G L C G L I S
 P F H P H W T N . A S G V V A L G L W G C V A S Y F
 CATTCTGTCTATTCTCACCTAATCTGTCCCTGGNTACGACTCAAGCCYGACTGACAMTGTGGTACAAGATAAGGAGGG 1040
 H S V Y S H P N L S L ? T T Q A ? T D ? V V Q D K E G
 I L S I L T L I C P W ? R L K P ? L T ? W Y K I R R
 P F C L F S P . S V P G Y D S S P D . ? C G T R . G G
 AGCCCAGGTGGGTGAGATGGAAGCTGAGATGGTNCAGTGTGTGCCMACCTCATTGTAATCAACTNCCTTGACTGAAGTT 1120
 A Q V G E M E A E M V H C V P T S L . F N ? L D . S
 E P R W V R W K L R W ? T V C ? P H C N S T ? L T E V
 S P G G . D G S . D G ? L C A ? L I V I Q L P . L K L
 AAAATCCAGATCCYTAGGGATGAGGGGAAGAACCTGCCAAAGACGGGTGAGGAAGGCAGTGTAAAGGAAGGCTCCTGCA 1200
 . N P D P . G . G E E P A K D G S G R Q C . G K A P A
 K I Q I ? R D E G K N L P K T G Q E G S A K G R L L Q
 K S R S L G M R G R T C Q R R V R K A V L R E G S C
 GGCCTCTGCAGTTGGACTTCATTGCTCCATTGCCAGAATCTCATAGCTCTCCCYTATCTCTGTCTTTGAGTCTAG 1280
 G L C S W T S F S P I A R I S . L F P L S L C L E S S
 A S A V G L H S V P L P E S H S S S ? Y L S V L S L
 R P L Q L D F I Q S H C Q N L I A L P ? I S L S . V .
 TTAAGAATTTGTTACCGGAGACAGAATCTCTTTCTTAGCCTCCTGGCCAGATATTTAAAGGAGGGGGTGGGTTACTT 1360
 . E F V T G D R I L F L S L L A R Y L K G G G W V T
 V K N L L P E T E F L F L A S W P D I . K E G G G L L
 L R I C Y R R Q N S L S . P P G Q I F K R R G V G Y F

【 15 c 】

CAGGTGAGGGGAAGCAAACCTTGGTTTCTGCTGGGAATGGAAGTTATGTGGATTGTTTATAATTGGGACCATTATGGCTAAA 2800
R . G K Q T W F L L G M E V M W I V Y N W D H Y G .
T G E G S K L G F C W E W K L C G L F I I G T I M A K
Q V R E A N L V S A G N G S Y V D C L . L G P L W L K

ATCTYCGGGGCGCTCAGGTGGGAGTTAATACCGATGCTATATTTCTGTGTGCACTCATGTTCTTAGACACCCAAATGG 2880
N L A G A Q V G G . Y R C Y I S C V H S C S . T P K W
I ? R A L R S E V N T D A I F P V C T H V L R H P N G
S ? G R S G R R L I P M L Y F L C A L M F L D T Q M

CAGTGGCCAAAACCTTCTCTGGCTTGTACCTCATTATCTAAACCTTGTACCTAATTATCTAAACCTTGGTCCTAAACT 2960
Q W P K L P L A C T S L S K P L Y L I I . N L G P K L
A S G Q N R S L W L V P H Y L N L C T . L S K T L V L N
A V A K T S S G L Y L I I . T F V P N Y L K P W S . T

CCACAGACATGAGGGCACAGAAAAGAGACGTGTCTCTCATCTCCATTCCGTTACACTGATTCTACCTCCCTGCTTCT 3040
H R H E G T E K R R V S H L P F G Y T D S Y L P C F
S T D M R A Q K R E T C L S S S I R L H . F L P S L L L
F Q T . G H R K E T C L S S S I R L H . F L P S L L L

CCCTGCCATTGGTGCTCCTTGGTGCTGAGGCATAATTGCCCTTACTATGTGGTCAGAACTCTGGGTTCCGCTAAGACCG 3120
S L P L V L L G A . G I I A L L C G Q N S G F A . R P
P C H W R A S L W L V P H Y L N L C T . L S K T L V L N
P A I G A P W C L R H N C L T M W S E L W V R L T T

AGCTACAGTTTCTGGTCTCATAGCCCTGCCAATTTCTGGATTAAAAAAGGCTCACATATAAAATACCTTTTCTGA 3200
S Y S F W S H S P A N F L D . K K K A H I . N T F S E
A T V S G L I A L P I S W I K K K R L T Y K I P F L
E L Q F L V S . P C Q F P G L K K K G S H I K Y L F .

AAATGAGCACAGTGTGAGTTGAAGTTAGATTTTGGGGATGGAGGTTGCTTGGATGCAAAGAGCAAGACAGTAGAGAAG 3280
N E H S V S . S . I L G D G G L L G C K E Q D S R E
K M S T V . V E V R F W G M E G C L D A K S K T V E K
K . A Q C E L K L D F G G W R V A W M Q R A R Q . R R

AGAATCATGGGAGGATAAAGAGGCTGGAATTTTCCCTGCTAGTGCCCTATAATCTTTGTTTCCCTAAAATAACAGCTCTG 3360
E N H G R D K R L E F F P A S A L . S L F P K I T A L
R I M G G I R G W N F S L L V P Y N L C F L K . Q L .
E S W E G . E A G I F P C . C P I I F V S . N N S S

ATTTTATGGGAATGGGGTCAGGAGAAAAGGAATCAGTAGGCACAGATGGGACCCCAAGCGTGGACTAAAGTTTGAGGAAA 3440
I L W E L G S G E R N Q . A Q M G P Q A W T K V . G N
F Y G N W G Q E K G I S R H R W D P K R G L K F E E
D F M G I G V R R K E S V G T D G T P S V D . S L R K

CTATGGGAGTAGGCAAGGGGTGTTTGTAAAGTGGATGAGATGAGGAGATTGTGGTGGGGGGAGTCTTGGGGGTGATAGG 3520
Y G S R Q G V F V R W M R . G D C G G G E S W G .
T M G V G K G C L . G G . D E E I V V G G S L G G D R
L W E . A R G V C K V D E M R R L W W G G V L G V I G

ACCCTAACAGGGATAGATGGCAAACCTGTGTGTGGGAGGCGGTGGTTCCACCCACTTAATTAGCGTTGAGGTGGGAG 3600
D P . Q G . M A N C V W A G R W F H P L N . R . G W Q
T L N R D R W Q T V C G Q A G G S T H L I S V E V G R
P L T G I D G K L C V G R P V V P P T . L A L R L A

GGCTGGAAGGAGCCAGCACTCTCAACCTTGGAGAAAGTGCAAGTGTGACAAGAAGAAACAGAAAGAGGAGACCCCGGGC 3680
G W K E P A L S T L E K V Q V . Q E E T E R G D T R A
A G R S Q H S Q P W R K C K C D K K K Q K E E T P G
G L E G A S T L N L G E S A S V T R R N R K R R H P G

AGGGAGCTCCTTGCCATCGTTTCTCCCATGGCCCTGGCTTGGGAAGAATTAGGAAGGGTGGTACTCTGCATCCTCA 3760
G S S L P S F L P M A L A L G R I R K G W . L C I L
Q G A P C H R F F P W P W L W E E L G K G G D S A S S
R E L L A I V S S H G P G F G K N . E R V V T L H P Q

GAAAAGCCCTCTCCTCTTGGACTCTCGAGGCTTAGAGAGGAGAATGTGTAGGAGGAATGATGTGGAAAGAGTAAC 3840
R K A L S P S L D S R G L E R R M C R R N D V E R V T
E K P S L P L W T L E A . R G E C V G G M M W K E . L
K S P L S L F G L S R L R E E N V . E E . C G K S N

TGACCTATCCAGATGTGTCTGTAATGAGATTTAGGAATGAGAATGGAATACAGCTGTGCTTCCAGCATGGCCGAGGGC 3920
. P I Q M C L . M R F Q E . E W K Y S C A S A W P R A
D L S R C V C E . D F R N E N G N T A V L Q H G R G
L T Y P D V S V N E I S G M R M E I Q L C F S M A E G

CTTAGGATCCTCACCACCCACAGGAAGAGAATCATCCAATCATCCCACCTGGGGTTCTGAGGACATGACATTGAC 4000
L G S L T P T P Q E E N H P I P P G V L R T . H .
P . D P S P P P H R K R I I Q S S H L G F . G H D I D
L R I P H P H P T G R E S S N H P T W G S E D M T L T

ACAGAGCAGGAGCTGAGATAGAAACACTCCCTCCTGTCTGTCTCCCACTAAGCCTCACCAGTCTTTCATTAAGTATG 4080
H R A G E L R . K H S P L S C L S L T S P S L T D
T E Q E S . D R N T P S C L S H . A S P V L H . L I
Q S R R A E I E T L P P V L S P T K P H Q S F I N .

【 15 d 】

TGGTGGATGCTAATTATGATCCTCACCCCTCAGGTCTCTGCTCCCCCTTAACTCTGGATGAACACCACCCAGACTCTTC 4160
 W W M L I M I L T P Q V S A P P L I W M N T T H D S S
 G G C . L . S S P L R S L L P L . S G . T P P T T L
 L V D A N Y D P H P S G L C S P F N L D E H H P R L E

ACAGGGCCACCAGAGGCCGAATTTGGATACAGTGTCTTACAGCATGTTGGGGGTGGACGGATGGTGAGAGGGAAAACA 4240
 Q G H Q R P N L D T V S Y S M L G V D S D G E R E N
 H R A T R G R I W I Q C L T A C W G W T A M V R G K T
 T G P P E A E F G Y S V L Q H V G G G Q R W . E G K T

GAGGACCGTGGGATCGGACTATGCACTCACTGATAAAGGGGAGGACCGGTCCAAGCTGGCCCTTTGAAAGTGCCTGGGGC 4320
 R G P W D R D Y A L T D K G E D R S K L A F E S A W G
 E D R G I G T M H S L I K G R T G P S W P L K V P G A
 R T V G S G L C T H . . R G G P V Q A G L . K C L G

TCCATGACGTCTCATGCACTCTCCCTCTCACTAATAAGGACCATGCTCACCGGATCTTTATATCCATATTCTCCTTCC 4400
 S M T S H A L S L S L Y . G P C S P D L Y I H I L L P
 L H D V L S C T L P L S H Y T K D H A H R I F I S I F S F

AGGATGCTGGTGGGTGCCCTGGGATGGGCCATCAGGTGACCGGAGAGGGGATGTTTATCGTTGCTCTATAGGGGGAT 4480
 G C W W V P P G M G H Q V T G E G M F I V A L . G D
 Q D A G G C P L W G A I R . P E R G C L S L L Y R G I
 R M L V G A P W D G F S G D R R G D V Y R C S I G G F

CCACAGTCTCCATGTACCAAAGGCCCTGGGTAAGAAGAAGCTGACCTTTCCCTGCTAATTCTGATGTTGACATC 4560
 S T V L H V P K A T W V R R S L T F P L L I P D V D I
 P Q C S M Y K R P P G . E E A . P F P C . F L M L T S
 H S A P C T Q K G H L G K K A P D L S P A N S . C . H

TAGTAACCTGACCCCTTGGACCTTGTCTTCAATGACCCCTGAAGTAAAGAAGCGAATATGACCCCATGACTTATTCT 4640
 . . L . P L G P C L Q . P . T K E A E L . P H D F I L
 L V T L T P W T L S F N D P E L K K P N Y D P M T S F
 H S A P C T Q K G H L G K K A P D L S P A N S . C . H

CTTCTACCCTTCCCAACCAGGTGACTATGAACTTGGAAATCTCTCAGCCTGCTGTAATATGCACCTAGGGATGTC 4720
 F Y P S S N Q V T I N L E I P L S L L . I C T . G C
 S L T L P P T R . L S T W K F L S A C C E Y A P R D V
 L L P F L Q P G D Y Q L G N S S Q P A V N M H L G M S

TCTACTAGAGACAGATGCTGATGGGGATTTCATGGTGAGCTGAAAGAAGGGCCTCAGAAGGTTACAGCAGGGAAGAGAG 4800
 L Y . R Q M L M G D S W . A E R R A S E G S Q Q G R E
 S T R D R C . W G I H G E L K E G P Q K V H S R E E S
 L L E T D A D G G I F M V S . K K G L R R R F T A G K R

CATTATGGTATCTGGGCAGTGGTGGCTTTCATCCCAGTGTCTGGAGGCAGAGTCAAGCCTGATCTACAGAGT 4880
 H Y G I W A V V A W A F H P S V L E A E S G L I Y R V
 A I M V S G Q W W L G P F I P V F W R Q S Q A . S T E
 A L W Y L G S G G L F S Q C S G G R V R P D L Q S

GAGCTCCAGGACAGCCAAGGCTATGCAGAGAAACCCGTGTTTGA AAAA C C C A A A A C C A A A A C T A A C C A A A C A A C A A C 4960
 S S R T A K A M Q R N P V L K N P K P K L T K Q Q Q
 . A P Q Q P R L C R E T L F . K T Q N Q N . P N N N N
 E L Q D S Q G Y A E K P C F E K P K T K T N Q T T T

AGAAAAAGCACCGTGGTAAGGAAATAGTCTGTATAGAAGAGACAAGGAATTCAAAACCCCTAGAGAGCAAGGCAGGGTT 5040
 Q K K H R G K G N . S V . K R Q G I Q N P R E Q G R V
 R K S T V V R E I S L Y R R D K E F K T L E S K A G F
 E K A P W . G K L V C I E E T R N S K F . R A R Q G

CCCCATGGAGTGGTCTCCATCTCTTTAACTAGGTGTGTGTTCCGAGAGGCCCTCTCAAGCCTGGGGATAACTATTTC 5120
 P H G V V S I S L L T R C V F R E A L S S L G I T I S
 P M E W S P S L F . L G V C S E R P S Q A W G . L F
 S P W S G L H L S F N . V C V P R G P L K P G D N Y F

TCCTATCCACCAGGCCTGTGCCCTCTTTGGTCTCGTGCCTGCGGCAGCTCTGTCTTCAGTTCTGGAATATGTGCCCGT 5200
 P I H P G L C F S L V S C L R Q L C L Q F W N M C P
 L L S T Q A C A P L W S R A C G S S V F S S S G I C A R
 S Y P P R P V P L F G L V P A A A L S S V L E Y V P V

GTGGATGCTTCATTCCGGCCCCAGGGAAGCCTGGCACCCACCGCCCAACGTGAGCCAGTGAAGGGCCCTGGAAGCTCAG 5280
 C G C F I P A P G K P G T H R P T . A S G R A L E A Q
 V D A S F R P O G S L A P T A Q R E P V E G P W K L S
 W M L H S G P R E A W H P P P N V S Q W K G P G S S

TTCCAGATAGGGATGCTGGGTGGGAAAACCTAGGACAAAGACTTGGTGGAGGGTCTGCATGGCTATCCTCATCATTCCC 5360
 F P D R D A G W E K L G Q R L G G G S A W L S S S F P
 S Q I G M L G G K N . D K D L V E G L H G Y P H S F
 V F R . G C W V G K T R T K T W W R V C M A I L I I P

AAGTGTGCTTGCAGAAGAGGCTCCTGTTTGTCTAACTGATTAGAATTCAGACTCCTTAGGAGAGCCTCAAGACACCAGGAT 5440
 S V L A E E A P V C . L I R I Q T P . E S L K T P G
 Q V C L Q K R L L F A N . L E F R L L R R A S R H Q D
 K C A C R R G S C L L T D . N S D S L G E P Q D T R I

【 15 e 】

CTGGTTTTACCAACTAAAAACAAAACAAAACAGCATATCCTGTGCACAGCCTATCCCTCATCCATCACGTGTCTCCAT 5520
 S G F T N L K T K Q N S I S C A Q P I P H P S R V L H
 L V L P T . K Q N K T A Y P V H S L S L I H H V S S I
 W F Y Q L K N K T K Q H I L C T A Y P S S I T C P F

ATCTTATTTTGGTCTTATAGATGCCAAGTCAGCACTCAGTTATTGGGTTCTCCCTCATGCCCTTCATATACTTTC 5600
 I L F L W V L . M P S Q H S V I G F S P H A F H I L S
 S Y F C G S Y R C Q V S T Q L L G S P L M P F I Y F
 Y L I F V G L I D A K S A L S Y W V L P S C L S Y T F

TTATCTACTGCCTTTTGGGAGATAGTCTTATGTAGCCAGGCTGTCTTGTGCTTGAATTTGCTTGCCCTCAGCTTCTCA 5680
 Y L L P F G R . S Y V A Q A V L D L G I C L P Q L L
 L I Y C L L G D S L M . P R L S L I L E F A C L S F S
 L S T A F W E I V L C S P G C P . S W N L L A S A S Q

GTCTCAAGTACTGGGATAATAGGCATGCATTGTCTGCCTGGCCTTTGCTGAACATGCCCTCTGTGGCCATTGGTAGGGCA 5760
 S L K Y W D N R H A L S A W P L L N M P S V A I G R A
 V S S T G I I G M H C L P G L C . T C P L W P L V G H
 S Q V L G . A C I V L C S P G C P . S W N L L A S A S Q

TGAGTCAAATACTGCCCTCCCCACACACACAAAAGTGGAGGCTCTCTAAGTGTTCATAGCACAGGGTAGT 5840
 . V K Y C P P P Q H T H K R K . G S L S V P . H R V V
 E S N T A L P H N T H T N E S E A L . V F H S T G .
 M S Q I L P S P T T H T Q T K V R L S K C S I A Q G S

GGTAGGCCCTCGTAGTGCATATTTTCTTTTACTCTGCCATCTCTTTCTTTGATTCCACACTGGGGACCTG 5920
 V G L S L V H I S F F Y S A H L F F L . F P H W G F
 W . A S R . C I F H S F L L P I S S E F D F H T G D L
 G R P L A S A Y F I L L L C P S L L S L I S T L G T W

GCATAGTACTTTCTCGTAATTAAGAGAGAATCCCTTTAAGTGCCTGCATTGCAGCGTCTCTCTGGGACATTCTCCCT 6000
 G I V L S W . L R E N S L L S A C I A A S S W D I L P
 A . Y F P G N . E R I P F . V P A L Q R P P G T F S L
 H S T F L V I K R E F P F K C L H C S V L L G H S F

TGCTGACTACACCCACATCCTTCCATGTTTTTTGTTTCCCATCACTATGCCCCCTTCTAGGCTGTCCACATACATGG 6080
 C . L H F T S F H V F C F P S L C P P S R L S H I H G
 A D Y T P H P S M F F V S H H Y A P L L G C P T Y M
 L L T T P H I L P C F L F P I T M P P F . A V P H T W

ATGTCGTCATGTTTTTGGATGGCTCAACAGTATCTATCCCTGGTCAGAAGTTCAGACTTTCCTTCGGAGGCTGGTAGGA 6160
 C R H C F G W L Q Q Y L S L V R S S D F P S E A G R
 D V V I V L D G S N S I Y P W S E V Q T F L R R L V G
 M S S L F W M A P T V S I P G Q K F R L S F G G W . E

AGACTGTTTCATCGATCCGGAGCAGATACAGGTAAGAGAAAGATATGTGGATAGGATTGGAGGGAAAGAAGTAAACACTCC 6240
 K T V H R S G A D T G K R K I C G . D W R E R S K H S
 R L F I D P E Q I O V R E R Y V I G G K E V N T P
 D C S S I R S R Y R . E K D M W I G L E G K K . T L

TGGACCCTTGGATGTAAGCAGCCTATCCAGCCTCTTGTAGACACCCTGGGACATTGTCTTCTACAGAACTCATGCTCAA 6320
 W T L G C K Q P C P A S . . H P G T L S S T E L M L K
 G P L D V S S H V Q P L D D T L G H C L L Q N S C S
 L D P W M . A A M S S L L M T P W D I V F Y R T H A Q

GAACTGTGCAATTAACCTACCAAAAAGTCACAAAATTTTCATAATGTTGAAGTAAAGTTATGATTGTGGGGGGCCAC 6400
 N C A I N L P K S H K N F I M F E V S L . L C G G P
 R T V Q L T Y Q K I S . C L K . V Y D C V G G H
 E L C N . L T K K S Q K F H N V . S K F M I V W G A T

ACTCAGAGCTTCCCTTTGCTGCTGTAGTGTGGCAATGCATGCCATGAGCTGCAAGTTAGACACACCTGTTCACTT 6480
 H S E L P F A A C S C L G N A C H E L Q V R H T C S L
 T Q S F P L L L V V A W A M H A M S C K L D T P V H F
 L R A S L C C L . L L G Q C M P . A A S . T H L F T

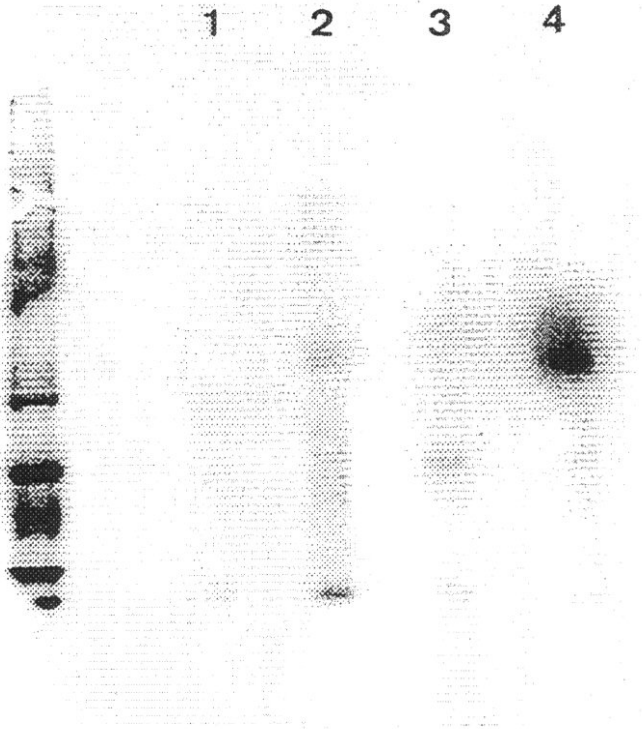
CCCCTTCATCGTGTGCAGGTTGGACACACCTGTTAGGGGTTCACTTCCCCTTCATCCTTTGTGCTCCATCTTCTCTACG 6560
 P L H R A A G W T H L L G V H F P F I L C A P S S L R
 P F I V L Q V G H T C . G F T S P S S F V L H L L Y
 S P S S C C R L D T P V R G S L P L H F L C S I F S T

CTCTTCATACATCCCATGTTGGGCACATGGTCTATTGTTCTCAGGTAGGACTGGTACAGTACGGGGAGAACCTGTGTCATG 6640
 S S Y I P C G H M V Y C S Q V G L V Q Y G E N P V H
 A L H T S H V G T W S I V L R . D W Y S T G R T L C M
 L F I H F M W A H G L L F S G R T G T V R G E P C A .

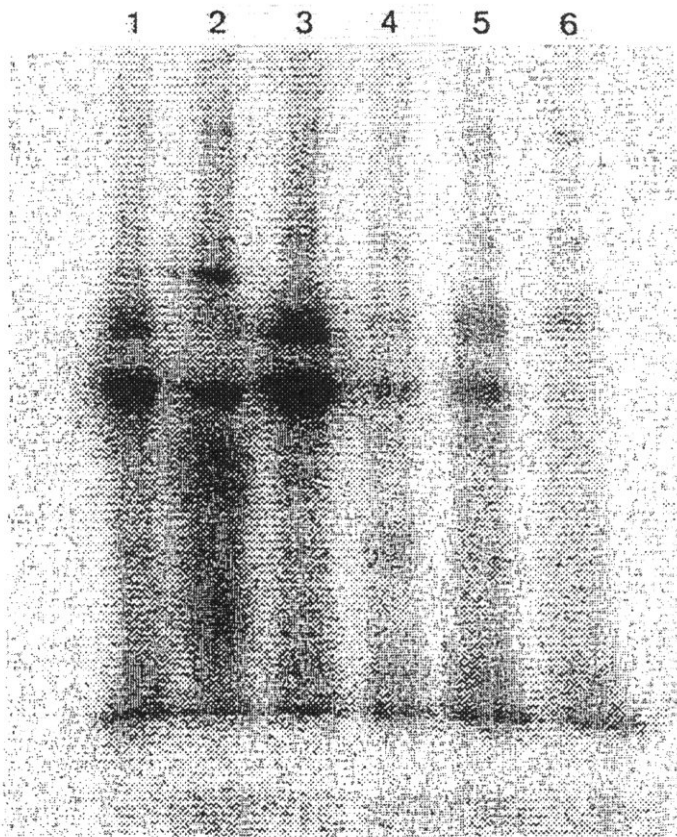
AGTGGTCCCTGGGAGACTTCCGAACAAGGAAGAAGTTGTGAGAGCAGCAAGGAACCTAAGTCCGGAGGGAAGGGCGAGAA 6720
 E W S L G D F R T K E E V V R A A R N L S R R E G R E
 S G P W E T S E Q R K K L . E Q Q G T . V G G K G E K
 V V P G R L P N K G R S C E S S K E P K S E G R A R

ACGAGAACCCGCAAGCATCATGGTGGCATGGTGAGACATTGTAAGGGGTCGTGTGAGGGAGGAGGAAGGATCAGCAG 6800
 T R T A Q A I M V A W . D I V K G S C E G G G R I S R
 R E P P K R E S W H G E T L . R G R V R E E E G S A
 N E N R P S D H G G M V R H C K G V V . G R R K D Q Q

【図 16】



【図 17】



【手続補正書】

【提出日】平成23年5月2日(2011.5.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる組換え型または単離型のII型コラーゲン結合インテグリンサブユニット 10。

【請求項2】

配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる組換えインテグリンサブユニット 10の製造方法であ

って、

- a) インテグリンサブユニット 10の上記断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを単離し、
- b) 単離されたポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを構築し、
- c) 宿主細胞をその発現ベクターで形質転換し、
- d) 形質転換宿主細胞においてインテグリンサブユニット 10の上記断片を発現するに好適な条件下の培地で形質転換宿主細胞を培養し、さらに所望により、
- e) 形質転換宿主細胞または培養培地からインテグリンサブユニット 10の上記断片を単離する工程を含んでなる方法。

【請求項3】

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片を製造し、それによりサブユニットがそれが天然に存在する細胞から単離される方法。

【請求項4】

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチドが配列番号1もしくは配列番号2で示されるヌクレオチド配列の一部を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項5】

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードするDNAまたはRNAとハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1をコードするDNAまたはRNAとはハイブリダイズできない、単離ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項6】

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードし、配列番号1もしくは配列番号2で示されるヌクレオチド配列の一部を含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなり、または

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードするDNAまたはRNAとハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1をコードするDNAまたはRNAとはハイブリダイズできない、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなる、ベクター。

【請求項7】

請求項6で定義されたベクターを含む細胞。

【請求項8】

インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードし、配列番号1もしくは配列番号2で示されるヌクレオチド配列の一部を含んでなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが細胞ゲノムに安定的に組み込まれている、請求項2で定義された方法の工程a)~d)により作出される細胞。

【請求項9】

配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット

10の断片であってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片に特異的に結合する能力を有する抗体である結合物。

【請求項10】

配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列からなる、インテグリンサブユニット10の断片。

【請求項11】

配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列からなるペプチドである、インテグリンサブユニット10の断片。

【請求項12】

細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドであってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチドであるインテグリンサブユニット10の断片、請求項10～11のいずれか1項で定義されたインテグリンサブユニット10の断片の製造方法であって、保護基を含むアミノ酸の一連の付加を含んでなる方法。

【請求項13】

細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドであってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチドであるインテグリンサブユニット10の断片、請求項10～11のいずれか1項で定義されたインテグリンサブユニット10の断片をコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項14】

細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドであってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチドであるインテグリンサブユニット10の断片、請求項10～11のいずれか1項で定義されたヒトインテグリンサブユニット10の断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物。

【請求項15】

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはその断片である、請求項14記載の結合物。

【請求項16】

配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット10、またはサブユニット10およびサブユニットを含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのインテグリンもしくはサブユニットの断片であってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を、インテグリンサブユニット10を発現する細胞または組織（この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである）のマーカ－もしくは標的分子としてin vitroにおいて使用方法。

【請求項17】

細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、請求項16記載のin vitroにおける方法。

【請求項18】

軟骨細胞の選択および分析、または選別、単離もしくは精製する方法である、請求項16～17のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

【請求項19】

インテグリンサブユニット 10、またはそのインテグリンサブユニットの断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片の存在を細胞において検出する *in vitro* における方法であって、配列番号 1 で示されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、これらがインテグリンサブユニット 1 をコードする DNA もしくは RNA とはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。

【請求項 20】

サブユニット 10 およびサブユニット 10 を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンまたはサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片を標的分子として使用できる抗体を有効成分として含んでなる医薬組成物。

【請求項 21】

インテグリンサブユニット 10 またはその相同体もしくは断片をコードする DNA または RNA を標的分子として使用する *in vitro* における方法であって、

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、方法。

【請求項 22】

組織の再生および治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達の細胞の分化段階を決定する方法であって、配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、それらがインテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。

【請求項 23】

インテグリンサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA を含んでなる標的分子であって、

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、標的分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

腱/靭帯間および周辺組織の癒着は感染、傷害後、および外科的介入後の公知問題点である。関節および関節シート間の癒着は滑走機能を損ない、かつ、例えば手指の関節の治癒中に著しい問題点を引き起こし、その結果、機能不全に至る。関節および骨格筋の筋膜

中への 10インテグリンサブユニットの局在化は、 10をして、腱ノ靭帯の機能の損失を防止し得る抗癒着性を有する医薬物質または分子に対する可能性ある標的となさしめ得る。またインテグリンサブユニット 10は、癒着が問題になる他の組織における抗癒着性を有する医薬物質もしくは分子に対する標的ともなり得る。

本発明において、以下のような発明が関連する。

(1) 配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる組換え型または単離型の II 型コラーゲン結合インテグリンサブユニット 1 0。

(2) 配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる組換えインテグリンサブユニット 1 0 の製造方法であって、

a) インテグリンサブユニット 1 0 の上記断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを単離し、

b) 単離されたポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを構築し、

c) 宿主細胞をその発現ベクターで形質転換し、

d) 形質転換宿主細胞においてインテグリンサブユニット 1 0 の上記断片を発現するに好適な条件下の培地で形質転換宿主細胞を培養し、さらに所望により、

e) 形質転換宿主細胞または培養培地からインテグリンサブユニット 1 0 の上記断片を単離する工程を含んでなる方法。

(3) インテグリンサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片を製造し、それによりサブユニットがそれが天然に存在する細胞から単離される方法。

(4) インテグリンサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチドが配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の一部を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

(5) インテグリンサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、単離ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

(6) インテグリンサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片をコードし、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列の一部を含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなるベクター。

(7) インテグリンサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含んでなるベクター。

(8) 上記 6 および 7 のいずれか 1 項で定義されたベクターを含む細胞。

- (9) インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードし、配列番号1もしくは配列番号2で示されるヌクレオチド配列の一部を含んでなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが細胞ゲノムに安定的に組み込まれている、上記2で定義された方法の工程a)～d)により作出される細胞。
- (10) 配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片に特異的に結合する能力を有する抗体である結合物。
- (12) ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはその断片である、上記10記載の結合物。
- (13) サブユニット 10およびサブユニット を含んでなり、サブユニット 10が配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる、組換え型または単離型インテグリンヘテロ二量体。
- (14) サブユニット が 1である、上記13記載の組換え型または単離型インテグリンヘテロ二量体。
- (15) サブユニット 10およびサブユニット を含んでなり、サブユニット 10が配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなる組換えインテグリンヘテロ二量体の製造方法であって、
- a) インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 10の断片をコードするヌクレオチド配列を含む一つのポリヌクレオチドと、所望によりインテグリンヘテロ二量体のサブユニット をコードするヌクレオチド配列を含むもう一つのポリヌクレオチドを単離し、
 - b) サブユニット 10をコードする単離ポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターを、所望によりサブユニット をコードする単離ヌクレオチドを含んでなる発現ベクターと組み合わせて構築し、
 - c) 宿主細胞を発現ベクターで形質転換し、
 - d) 形質転換宿主細胞においてサブユニット 10の断片およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体を発現させるのに好適な条件下の培地で形質転換宿主細胞を培養し、さらに所望により、
 - e) 形質転換宿主細胞または培地から、サブユニット 10の断片およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、あるいはその 10サブユニットの断片を単離する工程を含んでなる方法。
- (16) サブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体であってサブユニット 10がアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体を製造し、それによりインテグリンヘテロ二量体がそれが天然に存在する細胞から単離される方法。
- (17) インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードし、配列番号1もしくは配列番号2で示されるヌクレオチド配列の一部を含むポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを含んでなる第1のベクターと、インテグリンヘテロ二量体のサブユニット 、またはその同等の生物学的活性を有

する断片をコードするポリヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを含む第2のベクターを含む細胞。

(18) サブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体であってサブユニット 10がアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される本質的に同等の生物学的活性を有する断片を含んでなるインテグリンヘテロ二量体と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物。

(19) サブユニット が 1である、上記18記載の抗体である結合物。

(21) ポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、上記18または19記載の結合物。

(22) 細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドであってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列からなる群から選択されるペプチドである、インテグリンサブユニット 10の断片。

(23) アミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQからなるペプチドである、上記22記載の断片。

(24) 配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列からなる、上記22記載の断片。

(25) 配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列からなるペプチドである、上記22記載の断片。

(26) 上記22~25のいずれか1項で定義されたインテグリンサブユニット 10の断片の製造方法であって、保護基を含むアミノ酸の一連の付加を含んでなる方法。

(27) 上記22~25のいずれか1項で定義されたインテグリンサブユニット 10の断片をコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

(28) 上記22~25のいずれか1項で定義されたヒトインテグリンサブユニット 10の断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物。

(30) ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはその断片である、上記28記載の結合物。

(31) 配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのインテグリンもしくはサブユニットの断片であってアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQ、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片を、インテグリンサブユニット 10を発現する細胞または組織(この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである)のマーカームしくは標的分子としてin vitroにおいて使用方法。

(32) 断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記31記載のin vitroにおける方法。

(33) 断片がアミノ酸配列KLGFFAHKKIPEEEKREEKLEQを含んでなるペプチドである、上記31記載のin vitroにおける方法。

(34) 断片が配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記31記載のin vitroにおける方法。

(35) 断片が配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記31記載のin vitroにおける方法。

(36) サブユニット が 1である、上記31記載のin vitroにおける方法。

(37) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記31記載のin vitroにおける方法。

(38) サブユニット 10に関与する軟骨の損傷を含む病状の際に使用される、上記31

～ 37のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(39) 病状が外傷、慢性関節リウマチおよび変形性関節症を含む、上記38記載のin vitroにおける方法。

(40) 胚発達中の軟骨の形成を検出する方法である、上記31～37のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(41) 軟骨の生理学上または治療上の修復を検出する方法である、上記31～37のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(42) 軟骨細胞の選択および分析、または選別、単離もしくは精製する方法である、上記31～37のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(43) 軟骨または軟骨細胞の移植の際の軟骨または軟骨細胞の再生を検出する方法である、上記31～37のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(44) 軟骨細胞の分化のin vitro研究のための方法である、上記31～37のいずれか1項に記載の方法。

(45) 配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはその断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物を、インテグリンサブユニット 10を発現する細胞または組織（この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである）のマーカもしくは標的として使用するin vitroにおける方法。

(46) 断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記45記載のin vitroにおける方法。

(47) 断片がアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Qを含んでなるペプチドである、上記45記載のin vitroにおける方法。

(48) 断片が配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記45記載のin vitroにおける方法。

(49) 断片が配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記45記載のin vitroにおける方法。

(50) サブユニット が 1である、上記45記載のin vitroにおける方法。

(51) 配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、もしくは本質的に同等の生物学的活性を有するその相同体もしくは断片の存在を検出する方法である、上記45～50のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(52) 胚発達中の細胞の分化段階を決定する方法である、上記45～50のいずれか1項に記載のin vitroにおける方法。

(53) インテグリンサブユニット 10、またはそのインテグリンサブユニットの断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片の存在を細胞において検出するin vitroにおける方法であって、配列番号1で示されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、これらがインテグリンサブユニット 1をコードするDNAもしくはRNAとはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカとして使用される方法。

(54) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記53記載のin vitroにおける方法。

(55) 断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記53記載のin vitroにおける方法。

(56) 断片がアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Qを含んでなる

ペプチドである、上記 5 3 記載の *in vitro* における方法。

(57) 断片が配列番号 1 のアミノ酸 9 5 2 番付近からアミノ酸 9 8 6 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 5 3 記載の *in vitro* における方法。

(58) 断片が配列番号 1 のアミノ酸 1 4 0 番付近からアミノ酸 3 3 7 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 5 3 記載の *in vitro* における方法。

(59) 組織の再生または治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する方法である、上記 5 3 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の *in vitro* における方法。

(60) 病状がインテグリンサブユニット 1 0 に関与する慢性関節リウマチ、変形性関節炎または癌のいずれかの病状である、上記 5 9 記載の *in vitro* における方法。

(61) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記 5 9 記載の *in vitro* における方法。

(62) 組織の再生および治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する *in vitro* における方法であって、配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。

(63) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記 6 2 記載の *in vitro* における方法。

(64) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドがアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q を含んでなるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記 6 3 記載の *in vitro* における方法。

(65) ペプチドが配列番号 1 のアミノ酸 9 5 2 番付近からアミノ酸 9 8 6 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 6 3 記載の *in vitro* における方法。

(66) ペプチドが配列番号 1 のアミノ酸 1 4 0 番付近からアミノ酸 3 3 7 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 6 3 記載の *in vitro* における方法。

(67) 病状がインテグリンサブユニット 1 0 に関与するいずれかの病状である、上記 6 3 記載の *in vitro* における方法。

(68) 病状が慢性関節リウマチ、変形性関節炎または癌である、上記 6 7 記載の *in vitro* における方法。

(69) 病状がアテローム性動脈硬化症または炎症である、上記 6 7 記載の *in vitro* における方法。

(70) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記 6 2 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の *in vitro* における方法。

(71) サブユニット 1 0 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 1 0、またはインテグリンまたはサブユニット 1 0 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片を標的分子として使用できる抗体を有効成分として含んでなる医薬組成物。

(72) 軟骨、骨および血管の形成を刺激、阻害またはブロックするのに用いられる、上記 7 1 記載の医薬組成物。

(73) サブユニット 1 0 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 1 0、またはインテグリンもしくはサブユニット 1 0 の相同体もしくは断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片、またはインテグリンサブユニット 1 0 をコードする DNA もしくは RNA を有効成分として含んでなるワクチン

。

(74) 軟骨または軟骨細胞の移植におけるインテグリンサブユニット 10の、マーカーまたは標的としてのin vitroにおける使用。

(75) 軟骨細胞および/または骨芽細胞の、移植片の表面への接着を促進して骨の組み込みを刺激するために、配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはその断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物を使用するin vitroにおける方法。

(76) インテグリン結合物の存在をin vitroで検出する方法であって、サブユニット 10およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニットの断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片とサンプルとを相互作用させ、それによりインテグリン、サブユニット 10またはその断片を活性化させて、サンプル中に存在するその天然のリガンドまたはその他のインテグリン結合タンパク質への結合を変調することを含んでなる方法。

(77) サブユニット 10およびサブユニット を含んでなるヒトヘテロ二量体インテグリン、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニットの断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片とインテグリン結合物との相互作用の結果をin vitroで研究し、それにより細胞反応を誘導する方法。

(78) 相互作用の結果が細胞機能の変化として測定される、上記77記載の方法。

(79) インテグリンサブユニット 10またはその相同体もしくは断片をコードするDNAまたはRNAを標的分子として使用するin vitroにおける方法。

(80) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片をコードするDNAまたはRNAとハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1をコードするDNAまたはRNAとはハイブリダイズできない、上記79記載のin vitroにおける方法。

(81) 配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるコラーゲン結合インテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体、またはそのインテグリンもしくはサブユニットの断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162~359、974~1008、1121~1145および23~1120のアミノ酸配列から選択される断片を含む、インテグリンサブユニット 10を発現する細胞または組織(この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである)のマーカーもしくは標的分子。

(82) 断片が細胞質ドメイン、Iドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記81記載のマーカーもしくは標的分子。

(83) 断片がアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Qを含んでなるペプチドである、上記81記載のマーカーもしくは標的分子。

(84) 断片が配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記81記載のマーカーもしくは標的分子。

(85) 断片が配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記81記載のマーカーもしくは標的分子。

- (86) サブユニット が 1 である、上記 8 1 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (87) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記 8 1 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (88) マーカ－もしくは標的が該サブユニット 1 0 に関する病状の際に使用される、上記 8 1 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (89) 病状が軟骨の損傷を含む、上記 8 8 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (90) 病状が外傷、慢性関節リウマチおよび変形性関節症を含む、上記 8 8 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (91) 胚発達中の軟骨の形成を検出するものである、上記 8 1 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (92) 軟骨の生理学上または治療上の修復を検出するものである、上記 8 1 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (93) 軟骨または軟骨細胞の移植の際の軟骨または軟骨細胞の再生を検出するものである、上記 8 1 ~ 8 7 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (94) 配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 1 0、またはサブユニット 1 0 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはその断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物を含む、インテグリンサブユニット 1 0 を発現する細胞または組織（この細胞またはヒトをはじめとする動物起源のものである）のマーカ－もしくは標的分子。
- (95) 断片が細胞質ドメイン、I ドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記 9 4 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (96) 断片がアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q を含んでなるペプチドである、上記 9 4 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (97) 断片が配列番号 1 のアミノ酸 9 5 2 番付近からアミノ酸 9 8 6 番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 9 4 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (98) 断片が配列番号 1 のアミノ酸 1 4 0 番付近からアミノ酸 3 3 7 付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記 9 4 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (99) サブユニット が 1 である、上記 9 4 記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (100) 配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 1 0、またはサブユニット 1 0 およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体であってサブユニット 1 0 がアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片を含むものの存在を検出するものである、上記 9 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (101) 胚発達中の細胞の分化段階を決定するものである、上記 9 4 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のマーカ－もしくは標的分子。
- (102) インテグリンサブユニット 1 0、またはそのインテグリンサブユニットの断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 1 6 2 ~ 3 5 9、9 7 4 ~ 1 0 0 8、1 1 2 1 ~ 1 1 4 5 および 2 3 ~ 1 1 2 0 のアミノ酸配列から選択される断片の存在を細胞において検出する方法であって、配列番号 1 で示されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、これらがインテグリンサブユニット 1 をコードする DNA もしくは RNA とはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカ－として使用される方法。
- (103) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記 1 0 2 記載の方法。

- (104) 断片が細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドである、上記102記載の方法。
- (105) 断片がアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Qを含んでなるペプチドである、上記102記載の方法。
- (106) 断片が配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記102記載の方法。
- (107) 断片が配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列を含んでなる、上記102記載の方法。
- (108) 組織の再生または治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する方法である、上記102～107のいずれか1項に記載の方法。
- (109) 病状が慢性関節リウマチ、変形性関節炎および癌である、上記108記載の方法。
- (110) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記108記載の方法。
- (111) 組織の再生および治療上の、また生理学上の軟骨の再生における病状において、発達中の細胞の分化段階を決定する方法であって、配列番号1で示されるヌクレオチド配列から選択されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、それらがインテグリンサブユニット 1をコードするDNAまたはRNAとはハイブリダイズできないハイブリダイゼーション条件下でマーカーとして使用される方法。
- (112) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、細胞質ドメイン、イドメインおよびスプライシングドメインのペプチドからなる群から選択されるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記111記載の方法。
- (113) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドがアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Qを含んでなるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記111記載の方法。
- (114) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが配列番号1のアミノ酸952番付近からアミノ酸986番付近までのアミノ酸配列を含んでなるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記111記載の方法。
- (115) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが配列番号1のアミノ酸140番付近からアミノ酸337番付近までのアミノ酸配列を含んでなるペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、上記111記載の方法。
- (116) 病状がインテグリンサブユニット 10に關与するいずれかの病状である、上記111記載の方法。
- (117) 病状が慢性関節リウマチ、変形性関節炎または癌である、上記111記載の方法。
- (118) 病状がアテローム性動脈硬化症または炎症である、上記111記載の方法。
- (119) 細胞が軟骨細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨芽細胞および繊維芽細胞からなる群から選択される、上記111～118のいずれか1項に記載の方法。
- (121) 配列番号1もしくは配列番号2で示されるアミノ酸配列を含んでなるインテグリンサブユニット 10、またはサブユニット 10およびサブユニット を含むインテグリンヘテロ二量体、またはその断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片と特異的に結合する能力を有する抗体である結合物を含む軟骨細胞および/または骨芽細胞の、移植片の表面への接着を促進して骨の組み込みを刺激するための剤。
- (122) サブユニット 10およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号1におけるアミノ酸番号162～359、974～1008、1121～1145および23～1120のアミノ酸配列から選択される断片を標的分子として使用できる抗体の好適量を含んでなる軟骨または骨の形成を刺激、阻害またはブロックするための剤。

(123) サブユニット 10 およびサブユニット を含んでなるインテグリンヘテロ二量体、またはそのサブユニット 10、またはインテグリンもしくはサブユニット 10の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片の活性化または阻害により細胞外マトリックス合成および修復を刺激するための刺激剤。

(124) インテグリンサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA を含んでなる標的分子。

(125) ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドが、インテグリンサブユニット 10 の断片であってアミノ酸配列 K L G F F A H K K I P E E E K R E E K L E Q、配列番号 1 におけるアミノ酸番号 162 ~ 359、974 ~ 1008、1121 ~ 1145 および 23 ~ 1120 のアミノ酸配列から選択される断片をコードする DNA または RNA とハイブリダイズするが、インテグリンサブユニット 1 をコードする DNA または RNA とはハイブリダイズできない、上記 124 記載の標的分子。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------------|------------|
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 1 0 1 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 1 0 1 | |
| | A 6 1 P 29/00 | |
| | G 0 1 N 33/53 M | |

(72)発明者 エビー、ルンドグレン オーケルルンド

スエーデン国ブイエレッド、トロルシュベージェン、1 6 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA02 EA04 GA11 HA01 HA14 HA17
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QR33 QR40 QR59 QR62 QR77
 QR80 QS05 QS25 QS34
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA13
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA44
 4C085 AA13 AA14 AA17 BB11 CC32 DD62 DD88
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA50 DA75 DA76 EA28 EA50 EA51
 FA74

【外国語明細書】

2011217745000001.pdf

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 整合素异二聚体及其亚基 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011217745A | 公开(公告)日 | 2011-11-04 |
| 申请号 | JP2011076144 | 申请日 | 2011-03-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | XINTELA | | |
| 申请(专利权)人(译) | Kishintera , Akuchiboragu | | |
| [标]发明人 | エビールンドグレンオーケルルンド | | |
| 发明人 | エビー、ルンドグレン-オーケルルンド | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K14/47 C12P21/02 C12N5/10 C07K16/28 C12Q1/68 A61K39/395 A61P35/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P9/10 G01N33/53 A61K38/00 A61P9/00 A61P19/00 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P41/00 C07K14/70546 C07K16/2839 G01N33/68 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12P21/02.C C12N5/00.102 C07K16/28 C12Q1/68.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P9/10.101 A61P29/00 G01N33/53.M C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N15/13 C12N15/63.Z C12N5/00.101 C12N5/16 C12P21/08 C12Q1/6813.Z G01N33/53.D | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QR33 4B063/QR40 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA17 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/DD88 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 中村KoTakashi | | |
| 优先权 | 9801164 1998-04-02 SE 9900319 1999-01-28 SE | | |
| 其他公开文献 | JP5650038B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

解决的问题：提供重组或分离的整联蛋白异二聚体，其包含新的亚基 α_{10} 和亚基 β 。解决方案：可以从II型胶原亲和柱上的牛软骨细胞中纯化 α_{10} 整联蛋白。整联蛋白或亚基 α_{10} 可用作任何类型的细胞，例如软骨细胞，成骨细胞和成纤维细胞的标志物或靶标。整联蛋白或其亚基 α_{10} 可以在各种生理或治疗方法中用作标记或靶标。它们可用作药物组合物和疫苗中的活性成分。[选型图]图1

