

(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2004-201673

(P2004-201673A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-207500 (P2003-207500)
 (22) 出願日 平成15年8月13日 (2003.8.13)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-319521 (P2002-319521)
 (32) 優先日 平成14年11月1日 (2002.11.1)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年8月25日 社団法人日本生化学会発行の「生化学 第74巻 第8号」に発表

(71) 出願人 000000217
 エーザイ株式会社
 東京都文京区小石川4丁目6番10号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (72) 発明者 竹内 勝一
 京都市下京区西七条石井町33-17 シ
 ャローム33 202号
 (72) 発明者 高井 義美
 兵庫県神戸市西区学園東町2丁目5番地の
 73

最終頁に続く

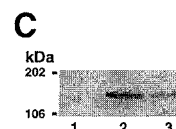
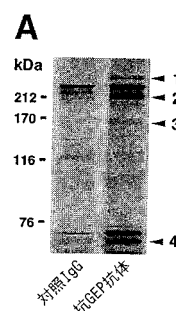
(54) 【発明の名称】 ラブコネクチン3結合蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特に R a b 3 A の活性化および不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質、ならびに、この蛋白質を用いる、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特に R a b 3 A の活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 抗 R a b 3 G E P 抗体を用いる共免疫沈降により、R a b 3 A の活性化および不活性化の制御に関与する蛋白質を特定した。この蛋白質は、ラブコネクチン3および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合するので、この結合を増加または減少させる物質のスクリーニングに使用できる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記 (a) または (b) の蛋白質。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質。

【請求項 2】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の蛋白質。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有する請求項 3 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

下記 (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 6】

下記 (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列と相同性が 8 0 % 以上の塩基配列を有し、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドにより宿主を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項 9】

請求項 8 記載の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現した、ラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質を培養物から採取することを含む、ラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質の製造法。

【請求項 10】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを検出するための、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも 1 5 ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーの使用。

【請求項 11】

請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも 1 5 ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることを特徴とする請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの解析方法。

【請求項 12】

被検ポリヌクレオチドが被検組織または被検細胞中に存在することを特徴とする請求項 1

10

20

30

40

50

1 に記載の解析方法。

【請求項 1 3】

請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも 1 5 ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする遺伝子の解析方法。

【請求項 1 4】

被検ポリヌクレオチドが被検組織または被検細胞中に存在することを特徴とする請求項 1 2 に記載の遺伝子解析方法。

【請求項 1 5】

請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも 1 5 ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプライマーを用いて、被検組織または被検細胞中の mRNA を RT - PCR 法によって増幅させ、請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを測定することを特徴とする遺伝子解析方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする mRNA にハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする mRNA を切断するリボザイム。

【請求項 1 8】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質をコードする mRNA を RNA 干渉により切断する二本鎖 RNA。

【請求項 1 9】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の蛋白質の免疫組織学的な解析方法。

【請求項 2 1】

蛋白質の局在を解析する方法である請求項 2 0 記載の解析方法。

【請求項 2 2】

蛋白質の発現量を解析する方法である請求項 2 0 記載の解析方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン 3 結合蛋白質と、ラブコネクチン 3 とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 または 2 に記載の蛋白質またはその異種相同蛋白質である R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラブコネクチン 3 (r a b c o n n e c t i n - 3) および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する蛋白質およびそれをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

【従来の技術】

Rab3Aは、Rab3A、-3B、-3C、-3Dの4つからなるRab3ファミリーのひとつで、神経伝達物質の Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスの制御に重要な役割を果たすことが知られている。神経伝達物質の Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスのプロセスは、(1)プレシナプス貯溜プールから、 Ca^{2+} チャンネルが存在する原形質膜の活性帯へのシナプス小胞の移動、(2)小胞の活性帯へのドッキング、(3)すでに放出可能な状態にあるプールでの、小胞のドッキングからプライミングへの推移、および、(4) Ca^{2+} 流入により誘導された小胞と膜の融合のステップを含む。

【0003】

Rab3A遺伝子ノックアウトマウス解析により、(1)シナプス小胞のプレシナプス原形質膜への移動とドッキングを促進し、(2) Ca^{2+} により誘導された、小胞と原形質膜との融合を阻害するというRab3Aの二つの働きが明らかになっている。しかし、神経伝達物質の Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスにおける、これらRab3Aの働きの分子メカニズムは知られていない。

【0004】

Rab3ファミリーメンバーは、GDP解離抑制蛋白質(RabGDI)、GDP/GTP交換反応促進蛋白質(Rab3GEP)およびGTPase活性促進蛋白質(Rab3GAP)の三つの制御因子により制御されることが知られている。Rab3GEPとRab3GAPはRab3ファミリーメンバーに特異であるが、RabGDIは全てのRabファミリーメンバーに対して活性である。これらの制御因子の働きによるRab3Aの循環的な活性化と不活性化が、神経伝達物質の Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスにおけるRab3Aの働きに必須である。これら制御因子の働きに関する、現在のモデルの一つは以下の通りである。GDP-Rab3AがRabGDIとの複合体として細胞質中に貯留される。Rab5、-7、-9に対してはGDI置換因子(GDF)、またはYpt1と-7に対してはRabリサイクリング因子(RRF)の様に、他の未同定分子の助けを受け、Rab3GEPの働きによりGDP-Rab3AがGTP-Rab3Aに活性化される部位であるシナプス小胞に、この複合体が動員される。GDFとRRFは同定されていない。GTP-Rab3Aは、その下流の二つのエフェクター、すなわち、小胞と活性帯にそれぞれ存在するラブフィリン3(rabphilin-3)とRim-3に結合する。融合段階の前または後に、エフェクターと複合体を形成するGTP-Rab3Aは、Rab3GAPの働きによりGDP-Rab3Aに非活性化される。GDP-Rab3AはRabGDIによりトラップされ、小胞から細胞質に移動する。それゆえ、Rab3GEPとRab3GAPはおそらくそれらが機能するとき、小胞へ動員されると考えられるが、それらのメカニズムは依然不明である。

【0005】

最近、ラット脳の粗シナプス小胞(CSV)画分から、Rab3GEPまたはRab3GAPを用いた共免疫沈降により新規蛋白質が単離され、ラブコネクチン3と命名されている(非特許文献1参照)。ヒトラブコネクチン3は3,036アミノ酸からなり、計算上の分子量は339,753である。ラブコネクチン3は12個のWDドメインを持つ。ラブコネクチン3は、シナプス小胞と関連する脳に豊富に発現している。また、さらにふたつの蛋白質がラット脳のCSV画分からRab3GEPを用いて共免疫沈降されることが見出されている(非特許文献1参照)。

【0006】

【非特許文献1】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、第12号、第9629-9632頁

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および

10

20

30

40

50

不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質を提供すること、ならびに、この蛋白質を用いる、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特に R a b 3 A の活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法を提供することである。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に直接結合するラブコネクチン 3 結合蛋白質を得ることに成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

【 0 0 0 9 】

(1) 下記 (a) または (b) の蛋白質。

10

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質。

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質。

【 0 0 1 0 】

(2) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する (1) 記載の蛋白質。

【 0 0 1 1 】

(3) (1) または (2) の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【 0 0 1 2 】

(4) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有する (3) のポリヌクレオチド。

20

【 0 0 1 3 】

(5) 下記 (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【 0 0 1 4 】

30

(6) 下記 (a) または (b) のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 1 ~ 4 4 7 0 の塩基配列と相同性が 8 0 % 以上の塩基配列を有し、かつラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【 0 0 1 5 】

(7) (3) ~ (6) のいずれか 1 項のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【 0 0 1 6 】

(8) (3) ~ (6) のいずれか 1 項のポリヌクレオチドにより宿主を形質転換して得られる形質転換体。

40

【 0 0 1 7 】

(9) (8) の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現した、ラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質を培養物から採取することを含む、ラブコネクチン 3 および G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質の製造法。

【 0 0 1 8 】

(1 0) (3) ~ (6) のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを検出するための、 3) ~ (6) のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも 1 5 ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーの使用。

50

【0019】

(11)(3)～(6)のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることを特徴とする(3)～(6)のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの解析方法。

【0020】

(12)被検ポリヌクレオチドが被検組織または被検細胞中に存在することを特徴とする(11)に記載の解析方法。

【0021】

(13)(3)～(6)のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプローブまたはプライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることを特徴とする(1)または(2)に記載の蛋白質をコードする遺伝子の解析方法。 10

【0022】

(14)被検ポリヌクレオチドが被検組織または被検細胞中に存在することを特徴とする(12)に記載の遺伝子解析方法。

【0023】

(15)(3)～(6)のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなるプライマーを用いて、被検組織または被検細胞中のmRNAをRT-PCR法によって増幅させ、(3)～(6)のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを測定することを特徴とする遺伝子解析方法。 20

【0024】

(16)(1)または(2)に記載の蛋白質をコードするmRNAにハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチド。

【0025】

(17)(1)または(2)に記載の蛋白質をコードするmRNAを切断するリボザイム。

【0026】

(18)(1)または(2)に記載の蛋白質をコードするmRNAをRNA干渉により切断する二本鎖RNA。 30

【0027】

(19)(1)または(2)に記載の蛋白質に対する抗体。

【0028】

(20)(19)に記載の抗体を用いることを特徴とする(1)または(2)に記載の蛋白質の免疫組織学的な解析方法。

【0029】

(21)蛋白質の局在を解析する方法である(20)に記載の解析方法。

【0030】

(22)蛋白質の発現量を解析する方法である(20)に記載の解析方法。

【0031】

(23)(1)または(2)の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。 40

【0032】

(24)(1)または(2)の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるRab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、Rab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、Rab3 GDP/GTP交換反応促進蛋白質結合蛋白質とRab3 GDP/GTP 50

交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法。

【0033】

【発明の実施の形態】

<本発明の蛋白質等>

本発明の蛋白質は、ラブコネクチン3およびRab3 GEPに直接結合する蛋白質である。本発明の蛋白質はラブコネクチン3と複合体を形成することから、以下、本発明蛋白質をラブコネクチン3βと、ラブコネクチン3をラブコネクチン3αとも呼ぶ。

【0034】

本発明の蛋白質のうち、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質は、後述の実施例に記載したように、ヒトのラブコネクチン3βとして特定された蛋白質である。蛋白質には、同一の機能を有する変異体の存在が予測され、また、蛋白質のアミノ酸配列を、例えば保存的置換のように適宜改変することによって、同一の機能を有する変異体を得ることができる。従って、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合する活性を有する蛋白質も本発明の蛋白質に含まれる。

10

【0035】

蛋白質のアミノ酸配列の改変は、部位特異的変異誘発法などの周知の手段により蛋白質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を改変し、塩基配列が改変されたポリヌクレオチドを発現させることによって行うことができる。また、ラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合する活性は、生理的な条件でこれらに結合することを意味し、この活性は公知の蛋白質相互間の結合を測定する方法に従って測定できる（例えば、後記実施例、または、「タンパク実験プロトコル 機能解析編」、秀潤社（1997）、第9章 免疫沈降、親和性レジンを用いた相互作用解析、第151～161頁参照）。従って、同一の機能を有するか否かを決定することは当業者であれば容易である。

20

【0036】

本発明の蛋白質を構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPIアンカー形成、架橋、γ-カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシル化、ピログルタメーピログルタメートの形成、フラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さらに、本発明の蛋白質にはシグナルペプチド部分がついた前駆体、シグナルペプチド部分を欠く成熟蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質を含む。本発明の蛋白質に付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素（HA）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ（6×His、10×His等）、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質（MBP）、免疫グロブリン定常領域、α-チューブリン断片、β-ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ（モノクローナルファージ上のエピトープ）、FLAG（Hopp et al.（1988）Bio/Technology 6: 1204-10）、Ickタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ（ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質）、SV40T抗原断片、T7-タグ（T7 gene 10蛋白質）、VSV-GP断片（Vesicular stomatitis ウイルス糖蛋白質）等の蛋白質の精製を容易にする配列（例えば、pcDNA3.1/Myc-His（Invitrogen）のようなベクターを利用できる）、組換え技術により蛋白質を生産する際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

30

40

【0037】

50

本発明の蛋白質は公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することができる。遺伝子組換え技術により本発明の蛋白質を製造する場合、製造される蛋白質は、選択する宿主の種類によってグリコシル化を受ける場合と受けない場合、さらに分子量、等電点等が異なる場合がある。通常、大腸菌等の原核細胞を宿主として蛋白質を発現させた場合、得られる蛋白質は本来蛋白質が有していたN-末端にメチオニン残基が付加された形で産生される。このような宿主の違いにより、構造の異なる蛋白質も本発明の蛋白質に含まれる。

【0038】

<蛋白質の製造>

In vitroで蛋白質を製造する場合、in vitroトランスレーション(Da 10
sso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res
. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系で蛋白質
を製造することができる。それに対して、細胞を用いて蛋白質を製造する場合、まず、適
当な宿主細胞を選択し、目的とするDNAによる形質転換を行う。続いて形質転換された
細胞を培養することにより所望の蛋白質を得ることができる。培養は、選択した細胞に適
した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM(Viro 10
logy 8: 396 (1959)、MEM(Science 122: 501
(1952))、RPMI 1640(J. Am. Med. Assoc. 199:
519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 7
3: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS 20
)等の血清を添加し、pH約6~8、30~40において15~200時間前後の培養
を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を
行ったりすることができる。

【0039】

一方、in vivoにおける蛋白質の生産系を確立するためには、動物または植物へ目
的とするDNAを導入し、生体内において蛋白質を産生させる。ヤギ、ブタ、ヒツジ、マ
ウス、ウシ等の哺乳動物、カイコ等の昆虫(Susumu (1985) Nature 315: 592-4)等の動物系が公知である(Lubon (1998) Bio 30
technol. Annu. Rev. 4: 1-54)。また、哺乳動物系においてトランスジェニック動物を用いることもできる。

【0040】

例えば、所望の蛋白質をヤギの乳汁中に分泌させることを目的とする場合、該蛋白質をコ
ードするDNAをβカゼイン等の乳汁中に特異的分泌される蛋白質をコードするDNAと
結合し、目的蛋白質を融合蛋白質として発現させるようにする。次に、融合蛋白質をコ
ードするDNAをヤギの胚へ導入する。DNAを導入した胚を雌ヤギの子宮へ移植する。こ
のヤギから生まれるトランスジェニックヤギ、またはその子孫は乳汁中に所望の蛋白質を
分泌する。必要に応じ、乳汁量を増やすため、ホルモンを投与することもできる(Ebe 40
rt et al. (1994) Bio/Technology 12: 699-
702)。

【0041】

タバコ等の植物を用いたトランスジェニック植物の蛋白質産生系が公知である。まず、所
望の蛋白質コードDNAをpMON530等の植物発現に適したベクターに組み込み、A
grobacterium tumefaciens等の細菌に導入する。DNAの導入
された細菌をNicotina tabacum等の植物に感染させ、植物を再生させる
ことにより、所望の蛋白質を得られたトランスジェニック植物の葉より単離することがで
きる(Julian et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 131-8)。その他の方法としては、PEGを用いプロトプラストへDNA
を導入して植物体を再生する方法(Gene Transfer to Plants, 50
Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp.
66-74; インド型イネ品種に適する)、電気パルスによりプロトプラストへDNA

を導入して植物体を再生する方法 (Tokii et al. (1992) Plant Physiol. 100: 1503-7; 日本型イネに適する)、パーティクルガン法で植物細胞に直接DNAを導入し植物体を再生する方法 (Christou et al. (1991) Bio/Technology 9: 957-62)、アグロバクテリウムを介し細胞にDNAを導入し植物体を再生する方法 (Hiei et al. (1994) Plant J. 6: 271-82) 等が確立されている。植物を再生する方法については、Tokii et al. (1995) Plant Physiol. 100: 1503-7を参照することができる。

【0042】

トランスジェニック植物が一度得られた後は、さらに該植物の種子、果実、塊茎、塊根、株、切穂、カルス、プロトプラスト等を材料として同じように本発明の蛋白質を産生する植物宿主を繁殖させ得ることができる。

【0043】

通常、遺伝子組換え技術により製造された本発明の蛋白質は、まず、蛋白質が細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望の蛋白質を精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0044】

また、天然由来の蛋白質を精製して取得してもよい。例えば、後述の本発明の蛋白質に対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。また、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。本発明の蛋白質を融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。さらに、必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。

【0045】

<ポリヌクレオチド>

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドである。このポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質を遺伝子工学的に発現させる際に使用することができる。また、本発明のポリヌクレオチドは、ラブコネクチン3結合蛋白質遺伝子の検出試薬として用いることができる。つまり、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド、またはその一部の特異的断片を使用して、分子生物学的解析方法を行うことができ、ポリヌクレオチドを検出する方法、ポリヌクレオチドの発現量を解析する方法を提供する。例えば、サザンブロット法、ノーザンブロット法、PCR法、RT-PCR法、定量的RT-PCR法、in situ ハイブリダイゼーション法等があげられる。

【0046】

本発明において、ラブコネクチン3結合蛋白質がシナプスに局在することが確認されたことから、ラブコネクチン3結合蛋白質をシナプスのマーカーとして使用することができる

。すなわち、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド、またはその一部の特異的断片を使用して、ラブコネクチン3結合蛋白質遺伝子の発現を検出することによりシナプスを検出することができる。従って、本発明のポリヌクレオチドは、シナプス検出試薬として用いることができる。また、本発明の蛋白質は、ラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合することが確認されたことから、本発明のポリヌクレオチドは、これらの検出にも用いることができる。

【0047】

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、β-D-ガラクトシルキューエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、β-D-マンノシルキューエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9-β-D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キューエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

【0048】

本発明のポリヌクレオチドとしては、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号1~4470の塩基配列を有するポリヌクレオチドが挙げられる。このポリヌクレオチドは、後述の実施例において、塩基配列が決定されたポリヌクレオチドである。さらに、本発明のポリヌクレオチドは、ラブコネクチン3β蛋白質をコードする、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号1に記載された核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号1記載の配列とは異なる核酸配列を含むものである。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 43-74)。

【0049】

本発明のポリヌクレオチドは、ラブコネクチン3β蛋白質、またはその抗原性断片をコードする、配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である(Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-50

0 ; Wang et al. (1984) Science 224 : 1431 - 3 ; Dalbadié - McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6409 - 13)。複数個とは、通常には2～30個、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個である。

【0050】

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持することが必要な場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸 (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸 (Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸 (Arg, His, Lys)、中性アミノ酸 (Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸 (Ala, Gly)、分枝アミノ酸 (Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸 (Ser, Thr)、アミド型アミノ酸 (Gln, Asn)、含硫アミノ酸 (Cys, Met)、芳香族アミノ酸 (His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸 (His, Trp)、イミノ酸 (Pro, 4Hyp) 等に分類することができる。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限されず、該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸がラブコネクチン3β蛋白質の抗原性を有していれば良い。

【0051】

このような配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997))；特にSection 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152 : 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154 : 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85 : 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

【0052】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、ラブコネクチン3β蛋白質、またはその抗原性断片をコードする、配列番号1の核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含むポリヌクレオチドである。このようなポリヌクレオチドとしては、アイソフォーム、アルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が考えられ、本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号1を含む核酸配列からなるポリヌクレオチド、またはその断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法

については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0053】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込む。

10

20

【0054】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、50℃」、「2×SSC、0.1% SDS、42℃」、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution(CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37~55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。あるいは、0.1% SDSを含む4×SSC中42℃でのハイブリダイゼーション、次いで0.1% SDSを含む2×SSC中25℃(好ましくは、0.1% SDSを含む0.1×SSC中50℃)での1時間の洗浄が挙げられる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を適宜設定することができる。

30

40

【0055】

50

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号1を含む核酸配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムとして、アミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてはBLASTX、ヌクレオチド配列についてはBLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

【0056】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、ラブコネクチン3βのアイソフォームやアレリック変異体等、ラブコネクチン3βと類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号1に記載の核酸配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0057】

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0058】

<ベクター>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主細胞内に保持したり、該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを発現させたりするのに有用である。本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化シ

グナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のベクターは、好ましくは選択可能なマーカーを含む。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン (A T G)、終止コドン (T A A、T A GまたはT G A) の挿入を行ってもよい。

【0059】

本発明のベクターは、好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、*i n v i t r o*でまたは、目的とする宿主細胞内で発現ベクター中にコードされるポリペプチドを発現することができる構築物を指す。クローニングベクター、バイナリーベクター、インテグレイティングベクター等が本発明の発現ベクターに含まれる。発現の過程には、発現ベクター中のコード配列の翻訳可能なmRNAへの転写、及びmRNAから本発明のポリペプチドへの翻訳、さらに場合によっては発現されたポリペプチドの小胞体内腔、ペリプラズムまたは細胞外への分泌が含まれる。

【0060】

*I n v i t r o*におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBES T (P r o m e g a) を例示することができる。また、*E . c o l i*等の原核細胞宿主における発現を可能にするプロモーターとしてはP_L、*a r a B* (B e t t e r e t a l . (1988) S c i e n c e 240: 1041-3)、*l a c Z* (W a r d e t a l . (1989) N a t u r e 341: 544-6; W a r d e t a l . (1992) F A S E B J . 6: 2422-7)、*t r p*、*t a c*、*t r c* (*l a c*と*t r p*の融合)等のプロモーターが挙げられる。また、*t r p A*由来、ファージ由来、*r r n B*リボソームRNA由来ターミネーターが、利用可能である。さらに、大腸菌用のベクターは、好ましくはベクターを宿主内で増幅するための「*o r i*」、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つ。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。特に、ポリペプチドをペリプラズムへ分泌させることを目的とする場合、*p e l B*シグナル配列 (L e i e t a l . (1987) J . B a c t e r i o l . 169: 4379)を使用することができる。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pCR-Script、pGEX-5X-1 (P h a r m a c i a)、pEGFP、pBluescript (S t r a t a g e n e)、pET (I n v i t r o g e n; この場合の宿主はT7ポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)等のベクターを挙げることができる。また、特にサブクローニングまたは切出し用のベクターとしては、pGEM-T、pDIRECT、pT7等を例示できる。

【0061】

大腸菌以外の細菌宿主用としては、バチルス属のものが挙げられ、pUB110系、pc194系のベクターが例示される。より具体的に、枯草菌由来のpPL608、pKTH50等を挙げることができる。その他、*P s e u d o m o n a s p u t i d a*、*P s e u d o m o n a s c e p a c i a*等のシュードモナス属、*B r e v i b a c t e r i u m l a c t o f e r m e n t u m*等のブレビバクテリウム属 (pAJ43 (G e n e 39: 281 (1985))等)、*C o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m*等のコリネバクテリウム属 (pCS11 (特開昭57-183799号公報; pCB101 (M o l . G e n . G e n e t . 196: 175 (1984))等)、ストレプトコッカス属 (pHV1301 (F E M S M i c r o b i o l . L e t t . 26: 239 (1985))、pGK1 (A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 50: 94 (1985))等)、ラクトバチルス属 (pAMβ1 (J . B a c t e r i o l . 137: 614 (1979))等)、*R h o d o c o c c u s r h o d o c h r o u s*等のロドコッカス属 (J . G e n . M i c r o

10

20

30

40

50

biol. 138: 1003 (1992)), *Streptomyces lividans*, *Streptomyces virginiae*等のストレプトマイセス属 (Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual, Hopwood et al., Cold Spring Harbor Laboratories (1985) 参照; pI J486 (Mol. Gen. Genet. 203: 468-78 (1986)), pKC1064 (Gene 103: 97-9 (1991)), pUWL-KS (Gene 165: 149-50 (1995))の細菌を宿主とするベクター系が開発されている。微生物を宿主として利用できるベクターについては、『微生物学基礎講座8 遺伝子工学』(共立出版)等の文献を参照することができる。ベクターを細菌宿主へ導入するための手法としては、塩化カルシウム法 (Mandel and Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 158-62; Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166: 557-80)、エレクトポレーション法等を採用することができる。

10

【0062】

また、真核細胞宿主での発現を可能にする調節要素は、酵母を宿主とする場合には、AOX1及びGAL1プロモーターが例示される。酵母由来の発現ベクターとしては、*Pichia Expression Kit* (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01等が例示できる。酵母で利用可能なベクターに関しては、Adv. Biochem. Eng. 43: 75-102 (1990)、Yeast 8: 423-88 (1992)等に詳述されている。より具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*等のサッカロマイセス属では、YRp系、YEp系、YCp系、及びYIp系ベクターが利用可能である。特に、多コピーの遺伝子導入が可能であり、安定に遺伝子を保持できるインテグレーションベクター (EP537456等)が有用である。その他、*Kluyveromyces lactis*等のクルイベロマイセス属では、*S. cerevisiae*由来2 μ m系ベクター、pKD1系ベクター (J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981))、pGK11由来ベクター、クライベロマイセス自律増殖遺伝子KARS系ベクター等、シゾサッカロマイセス属では、Mol. Cell. Biol. 6: 80 (1986)に記載のベクター、pAUR224 (宝酒造)、チゴサッカロマイセスではpSB3 (Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985))由来ベクター、*Pichia angusta*、*Pichia pastoris*等のピキア属ではYeast 7: 431-43 (1991)、Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985)、Nucleic Acids Res. 15: 3859 (1987)等の文献記載のベクター、*Candida maltosa*、*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. utilis*等のキャンディダ属では、特開平8-173170号公報記載のベクター、また*C. maltosa*由来のARS (Agricult. Biol. Chem. 51: 1587 (1987))を利用したベクター、*Aspergillus niger*、*A. oryzae*等のアスペルギルス属では、Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989)記載のベクター、トリコデルマ属では菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーター (Bio/Technology 7: 596-603 (1989))を利用したベクターが利用できる。

20

30

40

【0063】

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルス後期プロモーター (Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター (Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV前初期プロモーター (Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター (Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim

50

et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター(Genetic Engineering Vol. 3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp. 83-141)、SV40 lateプロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTRプロモーター、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。さらに、ネオマイシン、G418等の薬剤による判別を可能とする薬剤耐性遺伝子がベクターに含まれていることが好ましい。そして、細胞内で遺伝子のコピー数の増加を計る場合には、例えば核酸合成経路を欠損したCHOを宿主とし、その欠損を補うDHFR遺伝子を有するpCHOI等のベクターを採用し、メトトレキセート(MTX)によりコピー数を増幅させることができる。一方、遺伝子の一過性発現のためには、SV40のT抗原遺伝子を染色体上に有するCOS細胞を宿主とし、pcD等のSV40の複製起点、またはアデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)、ポリオーマウイルス等の複製開始点を持つベクターを使用することができる。さらに、遺伝子コピー数の増幅のための選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)、チミジンキナーゼ(TK)、キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)等をコードする遺伝子を含んでもよい。適当なベクターとして、例えば、Okayama-Bergの発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8(Nature 329: 840-2 (1987))、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(Invitrogen)、pSPORT1(GIBCO BRL)、pSV2dhfr(Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCEP4(Invitrogen)、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13、pME18S(Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988))等が公知である。

【0064】

特に動物の生体内において本発明のポリヌクレオチドを発現させるためには、pAdexlcw等のアデノウイルスベクター、pZIPneo等のレトロウイルスベクターが挙げられる。ベクターはアデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニックリポソームDOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAEデキストラン法、ウイルス-リポソーム法(別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社(1997); 別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 1806-13 (1997); Circulation 92(Suppl. II): 479-82 (1995))、naked-DNAの直接導入法等により宿主に導

入することができる。アデノウイルス及びレトロウイルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス等を元に作製されたベクターを利用することもできる。生体内への投与は、*ex vivo*法でも*in vivo*法で行ってもよい。

【0065】

その他、昆虫発現システムも異種ポリペプチドを発現させる系として知られており、例えば、*Autographa californica*核ポリヘドロシスウイルス(*AcNPV*)をベクターとし、*Spodoptera frugiperda*細胞、または*Trichoplusia larvae*細胞中で外来遺伝子を発現させることができる。この際、目的とする外来遺伝子は、ウイルスの非必須領域にクローニングする。例えば、ポリヘドリンプロモーター制御下に連結してもよい。この場合、ポリヘドリン遺伝子は不活化され、コート蛋白質を欠く組換えウイルスが産生され、該ウイルスに感染した*Spodoptera frugiperda*または*Trichoplusia larvae*等の細胞中で目的とするポリペプチドが発現される(*Smith (1983) J. Virol.* 46: 584; *Engelhard (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224-7)。その他、昆虫細胞由来の発現ベクターとして、*Bac-to-BAC baculovirus expression system (Bigco BRL)*、*pBacPAK8*等も公知である。

10

【0066】

植物細胞を宿主とする場合には、例えばカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター等を利用したベクターが使用可能である。植物細胞へのベクターの導入法としては、PEG法、エレクトポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法等が公知である。

20

【0067】

ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる(*Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63*)。

30

【0068】

<形質転換体>

本発明の形質転換体は、本発明のポリヌクレオチドにより宿主を形質転換して得られる形質転換体であり、本発明の蛋白質を発現する。

【0069】

<宿主>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主が提供される。本発明のポリペプチドの製造には、*in vitro*及び*in vivo*の産生系が考えられる。本発明の宿主には、古細菌、細菌、真菌類、植物、昆虫、魚類、両生類、八虫類、鳥類、哺乳類由来の原核及び真核細胞が含まれる。本発明の宿主は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものである。該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

40

【0070】

細菌宿主としては、*E. coli* (*JM109*, *DH5α*, *HB101*, *XL1Blue*)、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*等、エシェリシア属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、セラチア属、バシルス属等に属するのグラム陽性及びグラム陰性細菌を例示することができる。

50

【0071】

真核宿主には、酵母等の真菌類、高等植物 (*Nicotiana tabacum* 由来細胞)、昆虫 (ドロソフィラ S2、スポロドプテラ Sf9、Sf21、Tn5)、魚類、両生類 (アフリカツメガエル卵母細胞 (Valle et al. (1981) Nature 291: 358-40))、八虫類、鳥類、哺乳類 (CHO (J. Exp. Med. 108: 945 (1995)); 中でも DHFR 遺伝子欠損 dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) 及び CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)) が好適である)、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637 (特開昭63-299号公報)、植物 (ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、コムギ、オオムギ、ライ麦、アルファルファ、亜麻等) 等の細胞が含まれる。真菌類としては、*Saccharomyces* 属に属する *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia* 属等の酵母に加えて、糸状菌の *Aspergillus* 属の *Aspergillus niger* 等の細胞を宿主とした発現系も公知である。

10

【0072】

宿主細胞へのベクターの導入は、エレクトポレーション法 (Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオンリポソーム法、電気パルス穿孔法 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション (Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法 (Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法 (Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6 試薬 (Boehringer-Mannheim) 等により行い得る。

20

30

【0073】

本発明の製造法は、本発明の蛋白質すなわちラブコネクチン3結合蛋白質の製造法であり、本発明の形質転換体を培養し、該形質転換体が発現したラブコネクチン3結合蛋白質を培養物から採取することを含む。より具体的には前述の<蛋白質の製造>に記載した方法を用いることができる。

【0074】

ラブコネクチン3βとラブコネクチン3αは、抗ラブコネクチン3α抗体および抗ラブコネクチン3β抗体のいずれを用いても共免疫沈降される。両タンパクは、0.5 M NaCl または 1% CHAPS 存在下では互いから分離しないが、1 M NaCl 存在下で一部が、1% デオキシコレート存在下では完全に分離する。さらに、これらの二つのタンパクは、シナプス小胞に共存する。これらの結果は、ラブコネクチン3αと3βとがサブユニット構造を構成することを示している。

40

【0075】

ラブコネクチン3αは膜貫通部分を持たないが、シナプス小胞と結合することが示されている (上記非特許文献1)。ラブコネクチン3αは、Triton X-100 や NP-40 の様な界面活性剤の存在下で小胞から分離することから、この蛋白質はシナプス小胞の表在性膜蛋白質の一つであることが示唆される。同様に、ラブコネクチン3βは膜貫通部分を持たず、同じ状況下で小胞から分離することから、この蛋白質もまた、シナプス小

50

胞の表在性膜蛋白質の一つであることが示唆される。

【0076】

ラブコネクチン3βは直接Rab3 GEPに化学量論的に結合するが、ラブコネクチン3αは結合しない。ラブコネクチン3αと3βの複合体は直接Rab3 GEPに結合するが、化学量論的にはこの結合はラブコネクチン3βのものよりもずっと小さいことから、3αと3βとの相互作用が、Rab3 GEPが複合体に結合しない様にその結合部位を隠すことが示唆される。対照的に、ラブコネクチン3α、3β、およびそれらの複合体のいずれもRab3 GAPに結合しないことから、ラブコネクチン3βは間接的に、おそらくは未同定の分子を介して、Rab3 GAPに結合すると示唆される。

【0077】

なお、ラブコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質は、J. Biol. Chem., 272, 3875-3878 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785、特開平10-210971号公報等に記載されているようにして得ることができる。

【0078】

<プローブ>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドに対するプローブが提供される。本発明のプローブは、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなる。ここで「相補的な配列」とは、ヌクレオチド配列中の少なくとも15個の連続した塩基が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上（例えば、97%または99%）が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT（RNAの場合はU）、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして相同性は、上述のハイブリダイズするポリヌクレオチドの場合と同様の方法で決定することができる。本発明のプローブは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドの一部の、連続してなる少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなる。本発明のプローブを用いることにより、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離することができる。また、本発明の蛋白質をコードする遺伝子発現を解析することができる。さらには、発現の局在を解析することができる。測定するサンプルは、臓器、組織、細胞等である。

【0079】

プローブを用いる本発明のポリヌクレオチドの解析または本発明の蛋白質をコードする遺伝子の解析は、プローブを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより行うことができ、通常には、プローブを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、生じたハイブリッドを検出し、その検出結果を解析することにより行われる。検出結果の解析には、ポリヌクレオチドまたは遺伝子の測定（検出、定量を含む）、ポリヌクレオチドまたは遺伝子の局在の検出が含まれる。被検ポリヌクレオチドは、被検組織または被検細胞中に存在するものであってもよい。

【0080】

<プライマー>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドに対するプライマーが提供される。このような本発明のプライマーは、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなり、本発明のポリヌクレオチドを検出または増幅するために利用することができる。通常、プライマーとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。本発明のプライマーは、本発明のポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすること

10

20

30

40

50

ができる。本発明のプライマーは、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドの一部の、連続してなる少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドからなる。本発明のプライマーを用いることにより、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離することができる。また、本発明の蛋白質をコードする遺伝子発現を解析することができる。さらには、発現の局在を解析することができる。測定するサンプルは、臓器、組織、細胞等である。これらのプライマーを用いて、mRNAをRT-PCRにより増幅できることは言うまでもない。また、定量的RT-PCRにより、サンプル中のmRNAを定量することもできる。

【0081】

プライマーを用いる本発明のポリヌクレオチドの解析または本発明の蛋白質をコードする遺伝子の解析は、プライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより行うことができ、通常には、プライマーを被検ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることによりポリヌクレオチドの増幅を行い（すなわち被検ポリヌクレオチド（必要により逆転写を行う）をテンプレートとし、プライマーを用いてPCRを行い）、増幅産物を検出し、その検出結果を解析することにより行われる。検出結果の解析には、ポリヌクレオチドまたは遺伝子の測定（検出、定量を含む）、ポリヌクレオチドまたは遺伝子の局在の検出が含まれる。被検ポリヌクレオチドは、被検組織または被検細胞中に存在するものであってもよい。

【0082】

<アンチセンス>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現をmRNAまたはDNAに対して結合することにより抑制するものである。

【0083】

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、（1）3重鎖形成による転写開始阻害、（2）RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、（3）合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、（4）イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（5）スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（6）mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、（7）キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、（8）翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、（9）リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、（10）mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに（11）核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる（平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347（1993））。

【0084】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンスポリヌクレオチドは、上述の（1）～（11）のどの機構により遺伝子発現を抑制するポリヌクレオチドであってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンスポリヌクレオチドをコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンスポリヌクレオチドは、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンスポリヌクレオチドとしては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法

(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21) 等により調製することができる。

【0085】

<リボザイム>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドに対するリボザイムが提供される。本発明のリボザイムは、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現を mRNA または DNA に対して結合することにより抑制するものである。

【0086】

リボザイムとは、RNA を構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム (large ribozyme) 及びスモールリボザイム (small libozyme) に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に 5' - リン酸と 3' - ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに (1) グアノシンによる 5' - スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループ I イントロン RNA、(2) 自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループ II イントロン RNA、及び (3) 加水分解反応による tRNA 前駆体を 5' 側で切断するリボヌクレアーゼ P の RNA 成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位 (40 bp 程度) であり、RNA を切断して、5' - ヒドロキシル基と 2' - 3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型 (Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型 (Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋 (1992) 化学と生物 30: 112) 等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易なため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くの RNA 配列と相補的となるように設計することにより、標的 RNA 中の塩基配列 UC、UU または UA を認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる (Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子 (1990) 蛋白質核酸酵素 35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である (Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋 (1992) 化学と生物 30: 112)。

【0087】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リポソーム等を利用した非ウイルスベクター、または naked DNA として ex vivo 法または in vivo 法により遺伝子治療に用いることもできる。

【0088】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びリボザイムの塩基配列の確認は、上述のポリヌクレオチドと同様の方法により行うことができる。

【0089】

<RNA 干渉>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドに対して RNA 干渉により切断する二本鎖 RNA が提供される。本発明の二本鎖 RNA は、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現を mRNA に対して結合し、酵素的に切断されることにより抑制するものである (Fire et al. (1998) Nature 391: 806-811; 森田 隆ら. (2002) 蛋白質 核酸 酵素 47: 1939-1945)。

【0090】

本発明の二本鎖RNAは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

【0091】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムおよび本発明のポリヌクレオチドに対してRNA干渉により切断する二本鎖RNAは、本発明の蛋白質をコードするmRNAを減少させることができる。従って、本発明の蛋白質を減少させることができる。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムおよび本発明のポリヌクレオチドに対してRNA干渉により切断する二本鎖RNAは、ラプコネクチン3結合蛋白質の阻害試薬として機能するため、本発明の蛋白質の機能解析試薬として有用である。

10

【0092】

本発明において、ラプコネクチン3結合蛋白質がシナプスに局在することが確認されたこと、ラプコネクチン3およびGDP/GTP交換反応促進蛋白質に結合することが確認されたことから、シナプス小胞の輸送の制御に関与していると考えられるので、ラプコネクチン3結合蛋白質を阻害する物質は、シナプス小胞の輸送の異常が原因と考えられる疾患、例えば、知的障害（精神遅滞）、注意欠陥多動障害、自閉性障害、学習障害などに関与している可能性が考えられる。従って、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、リボザイムおよび本発明のポリヌクレオチドに対してRNA干渉により特異的に切断する二本鎖RNAは、本発明の蛋白質に阻害作用を有するこれら疾患の治療剤の有効成分として使用できると考えられる。

20

【0093】

<抗体>

本発明により、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFv)(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol. 113, Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDousal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、β-ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変されていてもよい。

30

40

【0094】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、本発明のポリペプチド若しくはその断片のうち短いものは、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いてもよい。また、本発明のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全（または不完全）フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強

50

化するために用いてもよい。

【0095】

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate - Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4～21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12 - 11.13)を参照することができる。

10

【0096】

モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3 - 46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4 - 11.11)を参照することもできる。

20

30

【0097】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球を*in vitro*で免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(WO92/03918; WO93/02227; WO94/02602; WO94/25585; WO96/33735; WO96/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146 - 56等)。

ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

40

【0098】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、

50

非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

【0099】

本発明の抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994) J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7 参照)。

【0100】

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル交代を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161 参照)。

【0101】

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、<ポリペプチドの製造>の項で詳細に記載した蛋白質精製技術によっても行い得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sepharese F.F.(Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

【0102】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法により測定の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明のポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次

抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p - ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、B I A c o r e (P h a r m a c i a) 等の市販の系を使用することもできる。

【0103】

本発明の抗体は、ラブコネクチン3結合蛋白質の検出試薬として用いることができる。つまり、本発明の抗体を用いて、免疫組織学的な解析方法を行うことができ、したがって、本発明は、免疫組織学的な解析方法、例えば、蛋白質の発現量を解析する方法、蛋白質の局在を解析する方法を提供する。免疫組織学的な解析方法としては、例えば、酵素免疫測定法 (E I A) 、放射免疫測定法 (R I A) 、 E L I S A 法、W e s t e r n b l o t 法、フローサイトメトリー、免疫組織化学染色等があげられる。また、本発明のポリペプチド及びその断片の精製に使用することができる。

10

【0104】

本発明においてラブコネクチン3結合蛋白質がシナプスに局在することが確認されたことから、ラブコネクチン3結合蛋白質をシナプスのマーカーとして、本発明の抗体を用いた検出を行うこともできる。従って、本発明の抗体は、必要に応じシナプス検出試薬として用いることができる。また、本発明の蛋白質は、ラブコネクチン3およびG D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合することが確認されたことから、本発明の抗体は、これらの検出にも用いることができる。

20

【0105】

< 本発明のスクリーニング法 >

本発明の蛋白質は、ラブコネクチン3およびR a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質に結合する。従って、本発明の蛋白質は、これらの結合を増加または減少させる物質のスクリーニングに用いることができる。本発明の蛋白質はヒト由来のものであるが、この用途には、ラットなどの他種に存在する同活性を有する異種相同蛋白質も本発明の蛋白質と同様に使用できる。従って、本発明の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、ラブコネクチン3結合蛋白質と、ラブコネクチン3とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法、ならびに、本発明の蛋白質またはその異種相同蛋白質であるR a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質結合蛋白質と、R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質との結合を促進する物質または阻害する物質の候補物質のスクリーニング方法であって、R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質結合蛋白質とR a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質とを前記候補物質の存在下および非存在下で反応させ、前記結合を増加または減少させる前記候補物質を選択することを含む前記方法が提供される。

30

【0106】

ラブコネクチン3結合蛋白質とラブコネクチン3との結合、および、R a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質結合蛋白質とR a b 3 G D P / G T P 交換反応促進蛋白質との結合の測定は、蛋白質相互間の結合を測定する公知の方法に従って行うことができる。

40

【0107】

本発明の蛋白質およびその異種相同蛋白質は、p 1 6 0 は神経伝達物質放出等のシナプス小胞の輸送の制御に関与していると考えられるので、このように選択されたこれらの結合を促進または阻害する物質は、シナプス小胞の輸送の異常が原因となる疾患 (例えば、知的障害 (精神遅滞) 、注意欠陥多動障害、自閉性障害、学習障害) の治療剤の有効成分として使用できると考えられる。

【0108】

このような治療剤 (医薬) は、スクリーニングにより選択された物質 (有効成分) を、製剤化することにより製造できる。製剤化は、選択された物質の種類、製剤の形態等により

50

適宜、通常の方法に従って行うことができる。医薬は、有効成分と医薬的に許容な可能な担体との医薬組成物としてもよい。

【0109】

【実施例】

本発明を下記実施例により更に詳しく説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

【0110】

【実施例1】

(1) Rab3 GEPと共免疫沈降されたラット蛋白質の取得

J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)に記載された方法に従って、ラット脳のCSV画分抽出物に対して抗Rab3 GEP抗体を用いて共免疫沈降を行い、沈降物に対して電気泳動を行った。具体的には以下のように行った。この文献に記載のようにラット脳からCSV画分を調製した。画分を、バッファA (20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.8% n-オクチルグルコピラノシド)を用いて抽出し、抽出物(各2 mgのタンパク)を、抗Rab3 GEP抗体を固定したプロテインAセファロースビーズ(20 µl湿重量)と共に4で一晩静置した。バッファAでビーズを完全に洗浄した後、結合した蛋白質を、ビーズをSDSサンプルバッファ(60 mM Tris/HCl (pH 6.7), 3% SDS, 2% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 5%グリセロール)中で煮沸して抽出した。抽出物をSDS-PAGEにかけ、蛋白質染色を行った。この結果、ラプコネクチン3(バンドNo. 1)、p160(バンドNo. 3)そしてp60(バンドNo. 4)の他に、Rab3 GEPと共免疫沈降されたふたつのタンパク(バンドNo. 2)が検出された(図1のA)。

【0111】

No. 3バンドをゲルから切り出してトリプシンで消化し、そしてそのペプチドを質量分析にかけた。コンピューターデータベース検索により、p160がヒトcDNA断片(KIAA0541, GenBankアクセッション番号AB011113)から推定されるアミノ酸配列を含むことが明らかになった。

【0112】

なお、下記(5)に示すように、p160はラプコネクチン3と複合体を形成することが判明したので、以下、p160をラプコネクチン3β、ラプコネクチン3をラプコネクチン3αと呼ぶ。

【0113】

(2) 分子クローニングと一次構造決定

KIAA0541 cDNAは、約3.5 kbのコーディング領域とインフレーム停止コドンを含むが、予想される開始コドンを欠いていた。また、KIAA0541 cDNAの配列はヒトゲノムのBACクローンに含まれていた(GenBankアクセッション番号AC007052およびAC008006)。この情報を基礎として、ヒトラプコネクチン3β cDNAの5'末端を得るためにPCRを行った。具体的には以下のように行った。ATG GCA GGA AAC AGC CTT GTT CTA CCC A T T GTT C(配列番号3)/GTT GTC ATT GCC AGC CCT TCT TCA CTT CCC(配列番号4)の配列を有するプライマーセットを設計した。cDNA断片を、ヒト心臓cDNA(CLONTECH)からこれらのプライマーを用いて増幅した。PCR産物はpCR4 Bluntベクター(Invitrogen)にサブクローンした。DNAシーケンシングを、ジデオキシ核酸ターミネーション法により、DNAシーケンサー(ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, PE Biosystems)で行った。この結果、約1.0 kbのコーディング領域と予想される開始コドンを含むcDNA断片を得た。

【0114】

ヒトラプコネクチン3β cDNAの全長が、このcDNA断片をKIAA0541 cD

N Aにライゲーションすることで得られた(配列番号1)。コードされる蛋白質は1, 490アミノ酸からなり、計算上の分子量は163, 808であった(配列番号2)。ヒトラブコネクチン3βは7つのWDドメインを含んでいた(図1のB)。ライゲートしたcDNAがヒトラブコネクチン3βの全長をコードするかどうかを確認するため、このcDNAをHEK293細胞にトランスフェクトし、細胞抽出物をSDS-PAGEにかけ、続いて抗ラブコネクチン3β抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。具体的には以下のように行った。pCMVFαラブコネクチン3β(下記(3)参照)をHEK293細胞にトランスフェクトし、その細胞の溶解液をSDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いて抗ラブコネクチン3β-1抗体(下記(3)参照)を用いたウエスタンブロッティングが行われた。対照としてHEK293細胞溶解液とラット脳ホモジェネートを、同様にSDS-PAGEにかけ、続いてウエスタンブロッティングを行った。この結果、分子量約160kDaのタンパクが検出された(図1のC)。図1のC中、各レーンは以下の通りである。レーン1, 対照HEK293細胞(1μg蛋白質)、レーン2, pCMVFαラブコネクチン3βをトランスフェクトしたHEK293細胞(1μg蛋白質)、レーン3, ラット脳のホモジェネート(20μg蛋白質)。

10

20

30

40

50

【0115】

この分子量は、ラット脳由来の天然のラブコネクチン3βと同様であった。それゆえ、このcDNAがヒトラブコネクチン3βの全長をコードすると結論された。ヒトラブコネクチン3βは、ラットTRAG(GenBankアクセッション番号AF305813)とヒトWDR7(GenBankアクセッション番号XM028588)に似た領域構造を示した。TRAGはこれまで、TGF-β耐性細胞株で発現する蛋白質として同定されていたが、その機能は知られていない(Cytogenet. Cell Genet. 88, 324-325, 2000)。

【0116】

(3)ラブコネクチン3βに対する抗体の調製

ラブコネクチン3βの発現ベクターを、pGex4T-1(Amersham Biosciences Inc)を用いて構築した。構築物はラブコネクチン3βの以下のアミノ酸配列を含んでいた。pGex4T-1ラブコネクチン3β-1、アミノ酸番号487-625; pGex4T-1ラブコネクチン3β-2、アミノ酸番号615-920。

【0117】

GST融合タンパクはE. coliで発現させ、グルタチオンセファロースビーズ(Amersham Biosciences Inc.)を用いて精製した。抗原としてGST-ラブコネクチン3β-1および-2をそれぞれ用いてウサギポリクローナル抗ラブコネクチン3β-1および-2抗体を作成し、NHS-活性化セファロースビーズ(Amersham Biosciences Inc.)に各抗原を共有結合したものをを用いてアフィニティー精製した。

【0118】

(4)ラブコネクチン3βの組織および細胞下(subcellular)の分布の検討
ラブコネクチン3βの組織および細胞下分布を検討した。組織分布については、種々のラット組織のホモジェネート(各20μg蛋白質)をSDS-PAGEにかけ、続いて抗ラブコネクチン3β-2抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。細胞下分布については、ラット脳のホモジェネートを、細胞下分画し(J. Biol. Chem., 265, 11872-11879 (1990))、各画分(各10μg蛋白質)をそれぞれSDS-PAGEにかけ、抗ラブコネクチン3β-1抗体、抗ラブコネクチン3α抗体、または抗Rab3 GEP抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

【0119】

この結果、組織分布解析により、ラブコネクチン3βが脳に特異的に発現していることが明らかになった(図2のA)。脳での細胞レベル下分布解析により、ラブコネクチン3βがCSV画分中に高濃度であることを示した(図2のB)。図2のBにおける記号は以下

の画分等を示す。R c - 3 β , ラブコネクチン 3 β 、R c - 3 α , ラブコネクチン 3 α 、G E P , R a b 3 G E P、H o , ホモジェネート画分、P 1 , 核ペレット画分、P 2 , 粗シナプトソーム画分、P 3 , ミクロソーム画分、S , 可溶性細胞質画分、P 2 A , ミエリン画分、P 2 B , 小胞体およびゴルジ複合体画分、P 2 C , シナプトソーム画分、P 2 D , ミトコンドリア画分、S S , シナプス可溶性画分、C S V , 粗シナプス小胞画分、C S M , 粗シナプス膜画分。なお、図に示した結果は 3 つの独立した実験の典型的なものである。

【 0 1 2 0 】

さらに、マウス海馬とラット海馬ニューロンの初代培養 (J . B i o l . C h e m . , 2 7 7 , 9 6 2 9 - 9 6 3 2 (2 0 0 2)) について免疫電子顕微鏡観察 (B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . , 2 0 2 , 1 2 3 5 - 1 2 4 3 (1 9 9 4)) を行った。 10

【 0 1 2 1 】

試料は、抗ラブコネクチン 3 α 抗体と抗ラブコネクチン 3 β - 2 抗体を用いて二重染色を行い、続いて免疫蛍光顕微鏡法で観察した。

【 0 1 2 2 】

この結果、ラブコネクチン 3 β はラブコネクチン 3 α と共に、マウス海馬のシナプス領域と初代培養を行ったラット海馬ニューロンに共存していることが明らかになった (図 3 の A a と A b)。図 3 の A a は、マウス海馬 C A 3 領域、A b は、ラット海馬ニューロン初代培養 (培養 2 0 日目) である。記号は以下の通りである。S R , 放線状層、S L , 淡明層、S P , 錐体層、バー , 3 0 μ m。 20

【 0 1 2 3 】

また、培養 2 2 日目のニューロンを、抗ラブコネクチン 3 β - 1 抗体で染色した (図 3 の B)。図 3 の B においてバーは 2 0 0 n m を示す。この結果は、ラブコネクチン 3 β がシナプス小胞と関連することを示した (図 3 の B)。

【 0 1 2 4 】

これらの結果は、ラブコネクチン 3 β とラブコネクチン 3 α がシナプス小胞に共存することを示す。なお、図 3 に示した結果は、3 つの独立した実験の典型例である。

【 0 1 2 5 】

(5) ラブコネクチン 3 β に対する、ラブコネクチン 3 α 、R a b 3 G E P および R a b 3 G A P の結合の検討 30

ラブコネクチン 3 β とラブコネクチン 3 α の結合を検討した。C S V 画分の抽出物を、抗ラブコネクチン 3 α または 3 β - 2 抗体による免疫沈降にかけた。各免疫沈降物を S D S - P A G E (8 % ポリアクリルアミドゲル) につけ、続いて抗ラブコネクチン 3 α または 3 β - 1 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。さらに、抗ラブコネクチン 3 β - 2 抗体を用いた免疫沈降物は、まず 0 . 5 M N a C l または 1 % C H A P S で洗浄し、次いで S D S - P A G E (8 % ポリアクリルアミドゲル) につけ、さらにクーマシーブリリアントブルーによるタンパク染色を行った。結果を図 4 の A a ~ A c に示す。A a は、抗ラブコネクチン 3 α 抗体による免疫沈降物、A b は、抗ラブコネクチン 3 β - 2 抗体による免疫沈降物、A c は、N a C l または C H A P S 処理を行った、抗ラブコネクチン 3 β - 2 抗体による免疫沈降物の結果である。 40

【 0 1 2 6 】

ラブコネクチン 3 α がその抗体を用いて P 2 C 画分抽出物から免疫沈降されたとき、ラブコネクチン 3 β はウェスタンブロッティングから予想されたように共免疫沈降された (図 4 の A a)。逆に、ラブコネクチン 3 β がその抗体を用いて P 2 C 画分抽出物から免疫沈降されたとき、ラブコネクチン 3 α が共免疫沈降された (図 4 の A b)。抗ラブコネクチン 3 β - 2 抗体により共免疫沈降されたラブコネクチン 3 α およびラブコネクチン 3 β を、0 . 5 M N a C l または 1 % C H A P S のどちらかで洗浄し、続いてクーマシーブリリアントブルーでタンパク染色した。両タンパクは互いに分離せず、明らかに同じ分子比率で染色された (図 4 の A c)。ラブコネクチン 3 α とラブコネクチン 3 β は、1 50

M NaCl で一部が、1%デオキシコレートで完全に互いに分離した(データ省略)。これらの結果は、ラブコネクチン3 α とラブコネクチン3 β が複合体を形成することを示している。

【0127】

次に、ラブコネクチン3 α および3 β のいずれがRab3 GEPおよびRab3 GAPに結合しているかを調べた。この目的のため、昆虫細胞から得たラブコネクチン3 β とRab3 GEP、そしてE. coli から得たRab3 GAPの非触媒サブユニット(p150)の純粋なサンプルを調製した(J. Biol. Chem., 272, 3875-3878(1997)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785参照)。ラブコネクチン3 α は巨大な蛋白質なので、その全長蛋白質を、COS7細胞のような哺乳類細胞株で発現させることや、その純粋なリコンビナントサンプルをE. coli や昆虫細胞から用意することにまだ成功していない。それゆえ、天然のラブコネクチン3 α 、および、3 α と3 β の複合体をラット脳P2C画分から調製した。ラブコネクチン3 α と3 β の複合体は、プロテインAセファロースビーズに結合した抗ラブコネクチン3 β -2抗体を用いて、P2C画分から免疫沈降され、続いて0.5 M NaCl でビーズが洗浄された。このサンプルはラブコネクチン3 α と3 β の複合体として使われた。鎖の調製をするための別の実験で、プロテインAセファロースビーズに結合した抗ラブコネクチン3 β -2抗体を用いてP2C画分から免疫沈降されたラブコネクチン3 α と3 β の複合体は、3 α を3 β から分離するために、1 M NaCl で洗浄された。ビーズより分離された3 α は、続いてプロテインAセファロースビーズに固定した3 α に対する抗体を用いて免疫沈降された。

【0128】

ラブコネクチン3 β 、3 α または複合体と結合されたアフィニティービーズを準備した。ラブコネクチン3 β 結合ビーズに関しては、製造者のプロトコールに基づき(GIBCO BRL) pFastBac Hta ラブコネクチン3 β を用いて、ラブコネクチン3 β cDNAを持つバキュロウイルスを準備し、バキュロウイルスをHigh Five cell (Invitrogen) にトランスフェクトした。細胞の抽出物(5 mg 蛋白質)をバッファAを用いて調製し、プロテインAセファロースビーズ(20 μ l 湿容量)に固定された抗ラブコネクチン3 β -2抗体と共に4 で一晩静置した。ラブコネクチン3 α 結合ビーズに関しては、初めに、プロテインAセファロースビーズに結合された抗ラブコネクチン3 β -2抗体を用いて、ラブコネクチン3 α と3 β の複合体を上記のP2C画分から免疫沈降させた。次いでラブコネクチン3 α を1 M NaCl を含むバッファAにより4 で1時間洗浄することでビーズから分離した。分離したラブコネクチン3 α (0.4 μ g 蛋白質)を回収し、プロテインAセファロースビーズ(20 μ l 湿容量)に固定された抗ラブコネクチン3 α 抗体と共に4 で一晩静置した。複合体結合ビーズに関しては、ラブコネクチン3 α と3 β の複合体をP2C画分から同様に免疫沈降させ、次いで0.5 M NaCl を含むバッファAでビーズを洗浄した。ラブコネクチン3 α 、3 β 、または複合体と結合したアフィニティービーズは、次いで、バッファAで完全に洗浄した。

【0129】

リコンビナントRab3 GEPまたはGAP p150を、リコンビナントラブコネクチン3 β または天然のラブコネクチン3 α と結合したプロテインAセファロースビーズと静置した。また一方、ビーズ上に固定された抗ラブコネクチン3 β -2抗体により、P2C画分からラブコネクチン3 α および3 β が免疫沈降された後、ビーズを0.5 M NaCl で洗浄し、Rab3 GEPまたはGAP p150をビーズと共に静置した。静置の後、これらをSDS-PAGE(8%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いてクーマシーブリリアントブルーによるタンパク染色または抗Rab3 GEPもしくはGAP p150抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。結果を図4のBa1~Ba2に示す。Baは、ラブコネクチン3 α が結合したビーズ、Bbは、ラブコネクチン3 β が結合したビーズを示し、数字は、1がRab3 GEP、2がRab3 GAP p1

50を示す。

【0130】

この結果、ラブコネクチン3βはリコンビナントRab3 GEPに化学量論的に結合したが、ラブコネクチン3αは結合しなかった(図4のBa1およびBb1)。複合体はRab3 GEPに直接結合したが、化学量論的にはこの結合は、ラブコネクチン3βのものに比べ相当低かった(データ省略)。一方、ラブコネクチン3α、3βそして複合体のいずれも、Rab3 GAPには結合しなかった(図4のBa2, Bb2(複合体についてはデータ省略))。

【0131】

CSV画分の抽出物を、抗Rab3 GEPまたはGAP p150抗体による免疫沈降10
 にかけた。各免疫沈降物をSDS-PAGE(8%ポリアクリルアミドゲル)にかけ、続いて抗Rab3 GEPまたはGAP p150抗体そして抗ラブコネクチン3α抗体および抗ラブコネクチン3β-1抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。結果を図4のCaおよびCbに示す。Caは、抗Rab3 GEP抗体を用いた免疫沈降物、Cbは、抗Rab3 GAP p150抗体を用いた免疫沈降部の結果である。

【0132】

ラブコネクチン3βは、ラブコネクチン3αと同様に、P2C画分の抽出物から、抗Rab3 GEPまたは抗Rab3 GAP p150抗体を用いてそれぞれ、Rab3 GEPまたはRab3 GAP p150により一貫して共免疫沈降された(図4のCaおよびCbならびに図1のA参照)。20

【0133】

総合すると、これらの結果は、制御された様式で、ラブコネクチン3βが、直接的にRab3 GEPに結合し、また、未同定の分子を介して間接的にRab3 GAPに結合することを示す。なお、図4の結果は、3つの独立した実験の典型例である。

【0134】

なお、実施例1で用いられた抗Rab3 GAP p150抗体、抗Rab3 GEP抗体および抗ラブコネクチン3α抗体は、J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)、J. Biol. Chem., 273, 24781-24785 (1998)およびJ. Biol. Chem., 273, 34580-34585 (1998)に記載された方法により調製されたマウスモノクローナル抗Rab3 GAP p150抗体、ウサギポリクローナル抗Rab3 GEP抗体、および、ラットポリクローナル抗ラブコネクチン3α抗体である。J. Biol. Chem., 277, 9629-9632 (2002)には、抗Rab3 GEP抗体またはRab3 GAP p150抗体を用い、ラブコネクチン3αがRab3 GEPまたはGAPによりCSV画分からそれぞれ共免疫沈降されることが示されている。30

【0135】

【実施例2】

ポリL-リジンをコートしたウェルで 1×10^6 の神経芽腫細胞PC-12を培養し、培養開始日の翌日にリポフェクチン法によりmycを発現するpCMV myc及びP160(ラブコネクチン3β)をmycとの融合タンパク質として発現するpCMV myc: p160をトランスフェクトした。pCMV mycは、J. Biol. Chem., 272, 11943-11951(1997)に記載されている。pCMV myc: p160は、ラブコネクチン3βのアミノ酸配列1~1490(全長)をコードするDNAを、ラブコネクチン3βとmycとの融合蛋白質が発現されるように組み込んだものである。40

【0136】

トランスフェクションの2日後に、低カリウム(カリウム濃度: 4.7 mM)バッファーを加え、37℃で10分間インキュベートした後、バッファーを取り除いて、低カリウム濃度または高カリウム(カリウム濃度: 60 mM)のバッファーを加えた。37℃で50

10 分間インキュベートした後、上清中に分泌された成長ホルモン（GH）及び細胞に残されたGHの量を、hGH ELISAキット（ロッシュ社製）にて測定した。結果は、上清中及び細胞中のGHをあわせた量を100%として、分泌されたGHの割合（%）として表現した。

【0137】

その結果、低カリウムバッファーでは全体の2.3%しか放出されなかった成長ホルモンが、高カリウムバッファーでは、8.9%が放出され、カリウムの刺激により増加した成長ホルモンの放出は、p160を発現させることにより7.0%まで抑制された。この結果より、p160は成長ホルモン放出等のシナプス小胞の輸送の制御に関与していると考えられる。

10

【0138】

【発明の効果】

本発明により、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御機構の解明に有用な蛋白質、ならびに、この蛋白質を用いる、 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシス、特にRab3Aの活性化および不活性化の制御に有用な物質のスクリーニング方法が提供される。

【0139】

【配列表】

〈110〉 エーザイ株式会社(Eisai Co., Ltd.)

〈120〉 ラブコネクチン3 結合蛋白質

〈130〉 P-B1320

〈150〉 JP 2002-319521

10

〈151〉 2002-11-01

〈160〉 4

〈210〉 1

〈211〉 4473

〈212〉 DNA

20

〈213〉 Homo sapiens

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (1)..(4470)

〈400〉 1

30

atg gca gga aac agc ctt gtt cta ccc att gtt ctt tgg ggt cga aaa 48

Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Leu Pro Ile Val Leu Trp Gly Arg Lys

1 5 10 15

gcg ccc aca cat tgc atc tca gcg gta ctt tta aca gat gat ggg gcc 96

Ala Pro Thr His Cys Ile Ser Ala Val Leu Leu Thr Asp Asp Gly Ala

20 25 30

acg atc gta aca gga tgt cac gac gga caa ata tgt ctc tgg gat ctt 144

40

Thr Ile Val Thr Gly Cys His Asp Gly Gln Ile Cys Leu Trp Asp Leu

35	40	45		
tca gta gaa ctg caa att aat cct cga gca ctg ttg ttt ggt cat aca	192			
Ser Val Glu Leu Gln Ile Asn Pro Arg Ala Leu Leu Phe Gly His Thr				
50	55	60		
gca tca atc act tgt ttg tct aaa gct tgt gct tcc agt gac aaa cag	240			
Ala Ser Ile Thr Cys Leu Ser Lys Ala Cys Ala Ser Ser Asp Lys Gln				
65	70	75	80	10
tat att gtg agt gca tct gaa agt gga gag atg tgc ctc tgg gat gtg	288			
Tyr Ile Val Ser Ala Ser Glu Ser Gly Glu Met Cys Leu Trp Asp Val				
85	90	95		
agt gat ggc aga tgt att gaa ttt aca aaa tta gct tgc aca cat act	336			
Ser Asp Gly Arg Cys Ile Glu Phe Thr Lys Leu Ala Cys Thr His Thr				
100	105	110		
ggc ata cag ttc tac cag ttc tct gtt ggg aat cag cga gaa gga agg	384			20
Gly Ile Gln Phe Tyr Gln Phe Ser Val Gly Asn Gln Arg Glu Gly Arg				
115	120	125		
ctt tta tgc cac gga cat tac cct gaa atc ctt gtt gtg gat gct acc	432			
Leu Leu Cys His Gly His Tyr Pro Glu Ile Leu Val Val Asp Ala Thr				
130	135	140		
agc ctt gaa gta tta tac tcc tta gta tca aag ata tca cca gac tgg	480			
Ser Leu Glu Val Leu Tyr Ser Leu Val Ser Lys Ile Ser Pro Asp Trp				30
145	150	155	160	
att agc tcc atg agt att att cga tcc cac cga aca caa gag gac aca	528			
Ile Ser Ser Met Ser Ile Ile Arg Ser His Arg Thr Gln Glu Asp Thr				
165	170	175		
gtg gta gca ctc tcg gtg act ggc atc ctg aag gtc tgg att gtt acc	576			
Val Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Ile Leu Lys Val Trp Ile Val Thr				
180	185	190		40
tcg gaa ata agt gac atg cag gat act gag cca ata ttt gag gag gaa	624			

Ser Glu Ile Ser Asp Met Gln Asp Thr Glu Pro Ile Phe Glu Glu Glu		
195	200	205
tcc aaa cca att tat tgt cag aat tgc caa agc atc tct ttt tgt gca	672	
Ser Lys Pro Ile Tyr Cys Gln Asn Cys Gln Ser Ile Ser Phe Cys Ala		
210	215	220
ttt aca caa agg tca ctt ttg gtt gtg tgt tcc aaa tat tgg agg gtg	720	
Phe Thr Gln Arg Ser Leu Leu Val Val Cys Ser Lys Tyr Trp Arg Val		10
225	230	235
ttc gat gcc gga gac tat tcc ttg ttg tgt tca ggt cct agt gaa aat	768	
Phe Asp Ala Gly Asp Tyr Ser Leu Leu Cys Ser Gly Pro Ser Glu Asn		
245	250	255
gga cag aca tgg acc ggg ggg gac ttt gtc tca tca gat aaa gtc atc	816	
Gly Gln Thr Trp Thr Gly Gly Asp Phe Val Ser Ser Asp Lys Val Ile		20
260	265	270
att tgg aca gaa aat ggg caa agt tat att tac aaa cta cct gcc agt	864	
Ile Trp Thr Glu Asn Gly Gln Ser Tyr Ile Tyr Lys Leu Pro Ala Ser		
275	280	285
tgc ctt cca gct agt gat tca ttc cgc agt gat gtg ggg aag gca gtt	912	
Cys Leu Pro Ala Ser Asp Ser Phe Arg Ser Asp Val Gly Lys Ala Val		
290	295	300
gaa aat tta att cct cct gta caa cat atc ctc ttg gat cga aaa gat	960	30
Glu Asn Leu Ile Pro Pro Val Gln His Ile Leu Leu Asp Arg Lys Asp		
305	310	315
aaa gag ttg cta att tgt cct cct gtt act cgg ttc ttc tat gga tgc	1008	
Lys Glu Leu Leu Ile Cys Pro Pro Val Thr Arg Phe Phe Tyr Gly Cys		
325	330	335
aga gaa tat ttc cat aaa ctg tta att cag ggt gat tct tct gga agg	1056	
Arg Glu Tyr Phe His Lys Leu Leu Ile Gln Gly Asp Ser Ser Gly Arg		40
340	345	350

ttg aat att tgg aac ata tca gac aca gct gat aaa cag gga agt gaa	1104	
Leu Asn Ile Trp Asn Ile Ser Asp Thr Ala Asp Lys Gln Gly Ser Glu		
355 360 365		
gaa ggg ctg gca atg aca act tct att agt ttg caa gag gca ttt gat	1152	
Glu Gly Leu Ala Met Thr Thr Ser Ile Ser Leu Gln Glu Ala Phe Asp		
370 375 380		
aaa ctg aat cct tgt cct gct gga att ata gat cag ctg agt gtg att	1200	10
Lys Leu Asn Pro Cys Pro Ala Gly Ile Ile Asp Gln Leu Ser Val Ile		
385 390 395 400		
ccc aat agt aat gaa cct ctt aaa gta act gca agt gtg tac ata cca	1248	
Pro Asn Ser Asn Glu Pro Leu Lys Val Thr Ala Ser Val Tyr Ile Pro		
405 410 415		
gca cat gga cga ctt gtt tgt ggt cgt gaa gat gga agc ata gtt att	1296	
Ala His Gly Arg Leu Val Cys Gly Arg Glu Asp Gly Ser Ile Val Ile		20
420 425 430		
gta cct gcc aca cag acg gcc ata gta cag ctg ttg caa ggg gaa cac	1344	
Val Pro Ala Thr Gln Thr Ala Ile Val Gln Leu Leu Gln Gly Glu His		
435 440 445		
atg ctc aga aga ggt tgg cca cct cac aga aca ctc cgt ggt cat cgg	1392	
Met Leu Arg Arg Gly Trp Pro Pro His Arg Thr Leu Arg Gly His Arg		
450 455 460		30
aac aaa gtc aca tgt ttg cta tat cct cat cag gtc tca gct cgg tat	1440	
Asn Lys Val Thr Cys Leu Leu Tyr Pro His Gln Val Ser Ala Arg Tyr		
465 470 475 480		
gat caa aga tac ctg ata tct gga ggt gtg gat ttt tca gtc ata att	1488	
Asp Gln Arg Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Val Asp Phe Ser Val Ile Ile		
485 490 495		
tgg gac ata ttt tct gga gaa atg aaa cat atc ttc tgt gtt cat ggt	1536	40
Trp Asp Ile Phe Ser Gly Glu Met Lys His Ile Phe Cys Val His Gly		

500	505	510		
ggg gag att act caa ctt cta gtt cca cct gaa aac tgt agt gca aga	1584			
Gly Glu Ile Thr Gln Leu Leu Val Pro Pro Glu Asn Cys Ser Ala Arg				
515	520	525		
gta cag cac tgc atc tgc tct gta gcc agt gac cac tca gta gga ctt	1632			
Val Gln His Cys Ile Cys Ser Val Ala Ser Asp His Ser Val Gly Leu				
530	535	540		10
cta agt ttg cga gag aaa aaa tgc ata atg ttg gca tct cgt cac ctt	1680			
Leu Ser Leu Arg Glu Lys Lys Cys Ile Met Leu Ala Ser Arg His Leu				
545	550	555	560	
ttt cct att caa gta atc aaa tgg agg cct tct gat gat tac ctg gtg	1728			
Phe Pro Ile Gln Val Ile Lys Trp Arg Pro Ser Asp Asp Tyr Leu Val				
565	570	575		
gtg ggg tgt tca gat ggt tct gtg tac gtc tgg caa atg gat act ggt	1776			20
Val Gly Cys Ser Asp Gly Ser Val Tyr Val Trp Gln Met Asp Thr Gly				
580	585	590		
gca ttg gat cgt tgt gtg atg ggg ata aca gca gtt gag att cta aac	1824			
Ala Leu Asp Arg Cys Val Met Gly Ile Thr Ala Val Glu Ile Leu Asn				
595	600	605		
gct tgt gat gaa gct gtt cct gct gct gtt gat tca ctt agt cat cca	1872			
Ala Cys Asp Glu Ala Val Pro Ala Ala Val Asp Ser Leu Ser His Pro				30
610	615	620		
gca gtc aac cta aaa caa gct atg acg aga cgt agt ctt gct gct ctt	1920			
Ala Val Asn Leu Lys Gln Ala Met Thr Arg Arg Ser Leu Ala Ala Leu				
625	630	635	640	
aaa aat atg gcc cat cat aag cta caa acc ctt gca act aac ctc ttg	1968			
Lys Asn Met Ala His His Lys Leu Gln Thr Leu Ala Thr Asn Leu Leu				
645	650	655		40
gct tct gag gca tct gac aag gga aat tta cct aaa tat tct cat aac	2016			

Ala Ser Glu Ala Ser Asp Lys Gly Asn Leu Pro Lys Tyr Ser His Asn			
660	665	670	
tcc ctg atg gtt caa gca ata aag aca aac cta aca gac ccg gac ata		2064	
Ser Leu Met Val Gln Ala Ile Lys Thr Asn Leu Thr Asp Pro Asp Ile			
675	680	685	
cat gtg cta ttc ttt gat gtg gaa gcg ttg att att caa ctc ctg act		2112	
His Val Leu Phe Phe Asp Val Glu Ala Leu Ile Ile Gln Leu Leu Thr		10	
690	695	700	
gaa gaa gcc tct agg ccg aat act gct ctt att tcc cca gag aat ttg		2160	
Glu Glu Ala Ser Arg Pro Asn Thr Ala Leu Ile Ser Pro Glu Asn Leu			
705	710	715	720
caa aaa gca tct ggc agt tca gac aaa ggg ggc tct ttt tta act gga		2208	
Gln Lys Ala Ser Gly Ser Ser Asp Lys Gly Gly Ser Phe Leu Thr Gly			
725	730	735	20
aaa cga gca gca gtt ctc ttc caa caa gtg aaa gaa acg atc aaa gag		2256	
Lys Arg Ala Ala Val Leu Phe Gln Gln Val Lys Glu Thr Ile Lys Glu			
740	745	750	
aac atc aag gaa cac ctc ctt gat gat gaa gag gag gat gag gag ata		2304	
Asn Ile Lys Glu His Leu Leu Asp Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Ile			
755	760	765	
atg agg cag aga agg gaa gaa agt gat cct gaa tat cgg tcc agc aaa		2352	30
Met Arg Gln Arg Arg Glu Glu Ser Asp Pro Glu Tyr Arg Ser Ser Lys			
770	775	780	
tca aag cca ttg acc cta tta gaa tat aat tta act atg gac act gca		2400	
Ser Lys Pro Leu Thr Leu Leu Glu Tyr Asn Leu Thr Met Asp Thr Ala			
785	790	795	800
aag ctg ttt atg tcc tgc ctt cac gcc tgg ggt ttg aat gaa gta ctg		2448	
Lys Leu Phe Met Ser Cys Leu His Ala Trp Gly Leu Asn Glu Val Leu			40
805	810	815	

gat gaa gtt tgc ctg gat cgc ctt gga atg ctg aaa ccc cac tgc acc	2496	
Asp Glu Val Cys Leu Asp Arg Leu Gly Met Leu Lys Pro His Cys Thr		
820 825 830		
gta tgc ttt ggc ctc ttg tca aga gga ggc cat atg tca ctg atg ctg	2544	
Val Ser Phe Gly Leu Leu Ser Arg Gly Gly His Met Ser Leu Met Leu		
835 840 845		
ccg ggt tat aat cag cct gct tgt aaa ctg tca cat ggg aaa aca gaa	2592	10
Pro Gly Tyr Asn Gln Pro Ala Cys Lys Leu Ser His Gly Lys Thr Glu		
850 855 860		
gta gga agg aag ctg cca gcg tct gag gga gta gga aag gga act tac	2640	
Val Gly Arg Lys Leu Pro Ala Ser Glu Gly Val Gly Lys Gly Thr Tyr		
865 870 875 880		
gga gtg tcc cgt gcc gtc acc aca cag cat ctc ctg tct atc att tct	2688	20
Gly Val Ser Arg Ala Val Thr Thr Gln His Leu Leu Ser Ile Ile Ser		
885 890 895		
ttg gca aat act tta atg agt atg acc aat gca act ttt att ggt gat	2736	
Leu Ala Asn Thr Leu Met Ser Met Thr Asn Ala Thr Phe Ile Gly Asp		
900 905 910		
cat atg aag aag ggt cct acc agg cca cct aga cca agc acc cca gac	2784	
His Met Lys Lys Gly Pro Thr Arg Pro Pro Arg Pro Ser Thr Pro Asp		
915 920 925		30
ctt tct aag gca agg ggt tcc cct cca act tcc agt aat att gtg caa	2832	
Leu Ser Lys Ala Arg Gly Ser Pro Pro Thr Ser Ser Asn Ile Val Gln		
930 935 940		
gga cag att aaa caa gtt gct gca cct gtc gtt tcc gct cgg tct gat	2880	
Gly Gln Ile Lys Gln Val Ala Ala Pro Val Val Ser Ala Arg Ser Asp		
945 950 955 960		
gct gat cac tct ggc tct gac cct cct tct gct cct gct tta cat acc	2928	40
Ala Asp His Ser Gly Ser Asp Pro Pro Ser Ala Pro Ala Leu His Thr		

965	970	975		
tgt ttc tta gta aat gaa ggt tgg agt cag tta gct gct atg cac tgt	2976			
Cys Phe Leu Val Asn Glu Gly Trp Ser Gln Leu Ala Ala Met His Cys				
980	985	990		
gtt atg ctg cca gac cta ctg gga ttg gat aaa ttt agg cct ccc ctt	3024			
Val Met Leu Pro Asp Leu Leu Gly Leu Asp Lys Phe Arg Pro Pro Leu				
995	1000	1005		10
ctg gag atg ctg gcc cga aga tgg caa gat cga tgc ttg gag gtg	3069			
Leu Glu Met Leu Ala Arg Arg Trp Gln Asp Arg Cys Leu Glu Val				
1010	1015	1020		
aga gaa gcc gca cag gcc ctg ctt ctg gcg gaa ctg aga aga att	3114			
Arg Glu Ala Ala Gln Ala Leu Leu Leu Ala Glu Leu Arg Arg Ile				
1025	1030	1035		
gag cag gca ggc agg aag gaa gcc att gat gcc tgg gct cct tac	3159			20
Glu Gln Ala Gly Arg Lys Glu Ala Ile Asp Ala Trp Ala Pro Tyr				
1040	1045	1050		
tta cct cag tac ata gac cac gtc ata tca cct gga gtc aca tca	3204			
Leu Pro Gln Tyr Ile Asp His Val Ile Ser Pro Gly Val Thr Ser				
1055	1060	1065		
gaa gcc gcg cag act atc acc acg gct cct gat gcc tca ggg cct	3249			30
Glu Ala Ala Gln Thr Ile Thr Thr Ala Pro Asp Ala Ser Gly Pro				
1070	1075	1080		
gaa gca aaa gtc cag gag gaa gag cat gac ctt gtt gac gat gac	3294			
Glu Ala Lys Val Gln Glu Glu Glu His Asp Leu Val Asp Asp Asp				
1085	1090	1095		
atc acc act ggt tgc tta tca agt gtc cca caa atg aaa aaa att	3339			
Ile Thr Thr Gly Cys Leu Ser Ser Val Pro Gln Met Lys Lys Ile				
1100	1105	1110		40
tct aca tct tac gag gaa aga cgg aag caa gct acc gct att gtt	3384			

Ser Thr	Ser Tyr	Glu Glu	Arg	Arg Lys	Gln Ala	Thr	Ala Ile	Val		
1115			1120			1125				
tta ctt	gga gta	ata gga	gct	gaa ttt	ggg gct	gaa	att gaa	cct	3429	
Leu Leu	Gly Val	Ile Gly	Ala	Glu Phe	Gly Ala	Glu	Ile Glu	Pro		
1130			1135			1140				
cct aaa	cta ttg	acc aga	cct	cga agc	tct agc	caa	att cct	gag	3474	
Pro Lys	Leu Leu	Thr Arg	Pro	Arg Ser	Ser Ser	Gln	Ile Pro	Glu		10
1145			1150			1155				
gga ttc	ggg ttg	act agt	ggg	gga tcc	aac tac	tcg	ctg gcc	aga	3519	
Gly Phe	Gly Leu	Thr Ser	Gly	Gly Ser	Asn Tyr	Ser	Leu Ala	Arg		
1160			1165			1170				
cat act	tgc aag	gca ctg	acg	ttt ctt	ctg cta	cag	cct cca	agc	3564	
His Thr	Cys Lys	Ala Leu	Thr	Phe Leu	Leu Leu	Gln	Pro Pro	Ser		20
1175			1180			1185				
ccc aaa	ctt cct	cca cac	agc	act atc	cga aga	aca	gcc att	gat	3609	
Pro Lys	Leu Pro	Pro His	Ser	Thr Ile	Arg Arg	Thr	Ala Ile	Asp		
1190			1195			1200				
ctg att	gga cgt	ggg ttc	act	gtt tgg	gag cct	tac	atg gat	gtg	3654	
Leu Ile	Gly Arg	Gly Phe	Thr	Val Trp	Glu Pro	Tyr	Met Asp	Val		
1205			1210			1215				
tcc gct	gtt ctg	atg ggg	ctt	ctc gaa	ctt tgt	gcc	gat gcc	gag	3699	30
Ser Ala	Val Leu	Met Gly	Leu	Leu Glu	Leu Cys	Ala	Asp Ala	Glu		
1220			1225			1230				
aaa caa	ctt gcc	aac atc	aca	atg ggg	ttg cct	ctg	agc cca	gca	3744	
Lys Gln	Leu Ala	Asn Ile	Thr	Met Gly	Leu Pro	Leu	Ser Pro	Ala		
1235			1240			1245				
gct gac	tcg gcc	cgc tct	gcg	agg cat	gcc ctc	tcg	ctc att	gcc	3789	
Ala Asp	Ser Ala	Arg Ser	Ala	Arg His	Ala Leu	Ser	Leu Ile	Ala		40
1250			1255			1260				

acc gcc	aga cca ccc gcc ttc	atc acc acc ata gcc	aaa gag gta	3834	
Thr Ala	Arg Pro Pro Ala Phe	Ile Thr Thr Ile Ala	Lys Glu Val		
1265	1270	1275			
cac aga	cat acg gct ctt gca	gca aat acc caa tca	cag cag aat	3879	
His Arg	His Thr Ala Leu Ala	Ala Asn Thr Gln Ser	Gln Gln Asn		
1280	1285	1290			
atg cac	aca aca act ctt gca	cga gct aaa ggg gaa	att ttg aga	3924	10
Met His	Thr Thr Thr Leu Ala	Arg Ala Lys Gly Glu	Ile Leu Arg		
1295	1300	1305			
gtc att	gaa att ctt att gaa	aag atg ccc aca gat	gtt gtg gat	3969	
Val Ile	Glu Ile Leu Ile Glu	Lys Met Pro Thr Asp	Val Val Asp		
1310	1315	1320			
ctt ctc	gtg gag gtt atg gac	atc att atg tac tgc	ctt gaa gga	4014	
Leu Leu	Val Glu Val Met Asp	Ile Ile Met Tyr Cys	Leu Glu Gly		20
1325	1330	1335			
tct tta	gtt aaa aag aaa ggt	ctt caa gaa tgt ttc	cca gcc atc	4059	
Ser Leu	Val Lys Lys Lys Gly	Leu Gln Glu Cys Phe	Pro Ala Ile		
1340	1345	1350			
igc agg	ttc tac atg gtc agc	tat tat gag cgg aat	cac aga ata	4104	
Cys Arg	Phe Tyr Met Val Ser	Tyr Tyr Glu Arg Asn	His Arg Ile		
1355	1360	1365			30
gca gtt	gga gct cgc cat ggt	tca gtg gcc ctg tac	gac atc cgg	4149	
Ala Val	Gly Ala Arg His Gly	Ser Val Ala Leu Tyr	Asp Ile Arg		
1370	1375	1380			
act gga	aaa tgt cag aca atc	cat gga cac aag gga	cca atc act	4194	
Thr Gly	Lys Cys Gln Thr Ile	His Gly His Lys Gly	Pro Ile Thr		
1385	1390	1395			
gca gtg	gct ttt gct cct gat	gga aga tat ctt gcc	acc tac tca	4239	40
Ala Val	Ala Phe Ala Pro Asp	Gly Arg Tyr Leu Ala	Thr Tyr Ser		

1400	1405	1410		
aac act gac agc cac att tct ttt tgg cag atg aac acg tca ctg			4284	
Asn Thr Asp Ser His Ile Ser Phe Trp Gln Met Asn Thr Ser Leu				
1415	1420	1425		
ctg gga agc atc ggc atg ctg aac tcg gca cct cag ctg cgc tgc			4329	
Leu Gly Ser Ile Gly Met Leu Asn Ser Ala Pro Gln Leu Arg Cys				
1430	1435	1440		10
att aaa acc tac cag gtg ccc cct gtg cag ccc gcg tcc ccc ggc			4374	
Ile Lys Thr Tyr Gln Val Pro Pro Val Gln Pro Ala Ser Pro Gly				
1445	1450	1455		
tcc cac aat gcc ctc aag ctg gcc cgg ctc atc tgg act tcc aac			4419	
Ser His Asn Ala Leu Lys Leu Ala Arg Leu Ile Trp Thr Ser Asn				
1460	1465	1470		
cgc aac gtc atc ctc atg gcc cat gac ggg aag gag cac cgc ttc			4464	20
Arg Asn Val Ile Leu Met Ala His Asp Gly Lys Glu His Arg Phe				
1475	1480	1485		
atg gtc taa			4473	
Met Val				
1490				
				30
<210> 2				
<211> 1490				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 2				
Met Ala Gly Asn Ser Leu Val Leu Pro Ile Val Leu Trp Gly Arg Lys				
1	5	10	15	40
Ala Pro Thr His Cys Ile Ser Ala Val Leu Leu Thr Asp Asp Gly Ala				

	20		25		30										
Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Cys	His	Asp	Gly	Gln	Ile	Cys	Leu	Trp	Asp	Leu
	35						40					45			
Ser	Val	Glu	Leu	Gln	Ile	Asn	Pro	Arg	Ala	Leu	Leu	Phe	Gly	His	Thr
	50					55						60			
Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Leu	Ser	Lys	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln
65					70					75					80
Tyr	Ile	Val	Ser	Ala	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Met	Cys	Leu	Trp	Asp	Val
			85					90					95		
Ser	Asp	Gly	Arg	Cys	Ile	Glu	Phe	Thr	Lys	Leu	Ala	Cys	Thr	His	Thr
	100							105					110		
Gly	Ile	Gln	Phe	Tyr	Gln	Phe	Ser	Val	Gly	Asn	Gln	Arg	Glu	Gly	Arg
	115						120					125			
Leu	Leu	Cys	His	Gly	His	Tyr	Pro	Glu	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Thr
	130					135					140				
Ser	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Ile	Ser	Pro	Asp	Trp
145					150					155					160
Ile	Ser	Ser	Met	Ser	Ile	Ile	Arg	Ser	His	Arg	Thr	Gln	Glu	Asp	Thr
			165					170					175		
Val	Val	Ala	Leu	Ser	Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Lys	Val	Trp	Ile	Val	Thr
	180						185					190			
Ser	Glu	Ile	Ser	Asp	Met	Gln	Asp	Thr	Glu	Pro	Ile	Phe	Glu	Glu	Glu
	195					200						205			
Ser	Lys	Pro	Ile	Tyr	Cys	Gln	Asn	Cys	Gln	Ser	Ile	Ser	Phe	Cys	Ala
	210					215					220				
Phe	Thr	Gln	Arg	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Cys	Ser	Lys	Tyr	Trp	Arg	Val
225					230					235					240
Phe	Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ser	Leu	Leu	Cys	Ser	Gly	Pro	Ser	Glu	Asn
			245						250					255	

10

20

30

40

Gly Gln Thr Trp Thr Gly Gly Asp Phe Val Ser Ser Asp Lys Val Ile
 260 265 270
 Ile Trp Thr Glu Asn Gly Gln Ser Tyr Ile Tyr Lys Leu Pro Ala Ser
 275 280 285
 Cys Leu Pro Ala Ser Asp Ser Phe Arg Ser Asp Val Gly Lys Ala Val
 290 295 300
 Glu Asn Leu Ile Pro Pro Val Gln His Ile Leu Leu Asp Arg Lys Asp
 305 310 315 320
 Lys Glu Leu Leu Ile Cys Pro Pro Val Thr Arg Phe Phe Tyr Gly Cys
 325 330 335
 Arg Glu Tyr Phe His Lys Leu Leu Ile Gln Gly Asp Ser Ser Gly Arg
 340 345 350
 Leu Asn Ile Trp Asn Ile Ser Asp Thr Ala Asp Lys Gln Gly Ser Glu
 355 360 365
 Glu Gly Leu Ala Met Thr Thr Ser Ile Ser Leu Gln Glu Ala Phe Asp
 370 375 380
 Lys Leu Asn Pro Cys Pro Ala Gly Ile Ile Asp Gln Leu Ser Val Ile
 385 390 395 400
 Pro Asn Ser Asn Glu Pro Leu Lys Val Thr Ala Ser Val Tyr Ile Pro
 405 410 415
 Ala His Gly Arg Leu Val Cys Gly Arg Glu Asp Gly Ser Ile Val Ile
 420 425 430
 Val Pro Ala Thr Gln Thr Ala Ile Val Gln Leu Leu Gln Gly Glu His
 435 440 445
 Met Leu Arg Arg Gly Trp Pro Pro His Arg Thr Leu Arg Gly His Arg
 450 455 460
 Asn Lys Val Thr Cys Leu Leu Tyr Pro His Gln Val Ser Ala Arg Tyr
 465 470 475 480
 Asp Gln Arg Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Val Asp Phe Ser Val Ile Ile

10

20

30

40

	485	490	495
Trp Asp Ile Phe Ser Gly Glu Met Lys His Ile Phe Cys Val His Gly			
500	505	510	
Gly Glu Ile Thr Gln Leu Leu Val Pro Pro Glu Asn Cys Ser Ala Arg			
515	520	525	
Val Gln His Cys Ile Cys Ser Val Ala Ser Asp His Ser Val Gly Leu			
530	535	540	
Leu Ser Leu Arg Glu Lys Lys Cys Ile Met Leu Ala Ser Arg His Leu			
545	550	555	560
Phe Pro Ile Gln Val Ile Lys Trp Arg Pro Ser Asp Asp Tyr Leu Val			
565	570	575	
Val Gly Cys Ser Asp Gly Ser Val Tyr Val Trp Gln Met Asp Thr Gly			
580	585	590	
Ala Leu Asp Arg Cys Val Met Gly Ile Thr Ala Val Glu Ile Leu Asn			
595	600	605	
Ala Cys Asp Glu Ala Val Pro Ala Ala Val Asp Ser Leu Ser His Pro			
610	615	620	
Ala Val Asn Leu Lys Gln Ala Met Thr Arg Arg Ser Leu Ala Ala Leu			
625	630	635	640
Lys Asn Met Ala His His Lys Leu Gln Thr Leu Ala Thr Asn Leu Leu			
645	650	655	
Ala Ser Glu Ala Ser Asp Lys Gly Asn Leu Pro Lys Tyr Ser His Asn			
660	665	670	
Ser Leu Met Val Gln Ala Ile Lys Thr Asn Leu Thr Asp Pro Asp Ile			
675	680	685	
His Val Leu Phe Phe Asp Val Glu Ala Leu Ile Ile Gln Leu Leu Thr			
690	695	700	
Glu Glu Ala Ser Arg Pro Asn Thr Ala Leu Ile Ser Pro Glu Asn Leu			
705	710	715	720

10

20

30

40

Gln Lys Ala Ser Gly Ser Ser Asp Lys Gly Gly Ser Phe Leu Thr Gly
 725 730 735
 Lys Arg Ala Ala Val Leu Phe Gln Gln Val Lys Glu Thr Ile Lys Glu
 740 745 750
 Asn Ile Lys Glu His Leu Leu Asp Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Ile
 755 760 765
 Met Arg Gln Arg Arg Glu Glu Ser Asp Pro Glu Tyr Arg Ser Ser Lys
 770 775 780
 Ser Lys Pro Leu Thr Leu Leu Glu Tyr Asn Leu Thr Met Asp Thr Ala
 785 790 795 800
 Lys Leu Phe Met Ser Cys Leu His Ala Trp Gly Leu Asn Glu Val Leu
 805 810 815
 Asp Glu Val Cys Leu Asp Arg Leu Gly Met Leu Lys Pro His Cys Thr
 820 825 830
 Val Ser Phe Gly Leu Leu Ser Arg Gly Gly His Met Ser Leu Met Leu
 835 840 845
 Pro Gly Tyr Asn Gln Pro Ala Cys Lys Leu Ser His Gly Lys Thr Glu
 850 855 860
 Val Gly Arg Lys Leu Pro Ala Ser Glu Gly Val Gly Lys Gly Thr Tyr
 865 870 875 880
 Gly Val Ser Arg Ala Val Thr Thr Gln His Leu Leu Ser Ile Ile Ser
 885 890 895
 Leu Ala Asn Thr Leu Met Ser Met Thr Asn Ala Thr Phe Ile Gly Asp
 900 905 910
 His Met Lys Lys Gly Pro Thr Arg Pro Pro Arg Pro Ser Thr Pro Asp
 915 920 925
 Leu Ser Lys Ala Arg Gly Ser Pro Pro Thr Ser Ser Asn Ile Val Gln
 930 935 940
 Gly Gln Ile Lys Gln Val Ala Ala Pro Val Val Ser Ala Arg Ser Asp

10

20

30

40

945	950	955	960
Ala Asp His Ser Gly Ser Asp Pro Pro Ser Ala Pro Ala Leu His Thr			
	965	970	975
Cys Phe Leu Val Asn Glu Gly Trp Ser Gln Leu Ala Ala Met His Cys			
	980	985	990
Val Met Leu Pro Asp Leu Leu Gly Leu Asp Lys Phe Arg Pro Pro Leu			
	995	1000	1005
Leu Glu Met Leu Ala Arg Arg Trp Gln Asp Arg Cys Leu Glu Val Arg			
	1010	1015	1020
Glu Ala Ala Gln Ala Leu Leu Leu Ala Glu Leu Arg Arg Ile Glu Gln			
	1025	1030	1035
Ala Gly Arg Lys Glu Ala Ile Asp Ala Trp Ala Pro Tyr Leu Pro Gln			
	1045	1050	1055
Tyr Ile Asp His Val Ile Ser Pro Gly Val Thr Ser Glu Ala Ala Gln			
	1060	1065	1070
Thr Ile Thr Thr Ala Pro Asp Ala Ser Gly Pro Glu Ala Lys Val Gln			
	1075	1080	1085
Glu Glu Glu His Asp Leu Val Asp Asp Asp Ile Thr Thr Gly Cys Leu			
	1090	1095	1100
Ser Ser Val Pro Gln Met Lys Lys Ile Ser Thr Ser Tyr Glu Glu Arg			
	1105	1110	1115
Arg Lys Gln Ala Thr Ala Ile Val Leu Leu Gly Val Ile Gly Ala Glu			
	1125	1130	1135
Phe Gly Ala Glu Ile Glu Pro Pro Lys Leu Leu Thr Arg Pro Arg Ser			
	1140	1145	1150
Ser Ser Gln Ile Pro Glu Gly Phe Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Asn			
	1155	1160	1165
Tyr Ser Leu Ala Arg His Thr Cys Lys Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu			
	1170	1175	1180

10

20

30

40

Gln Pro Pro Ser Pro Lys Leu Pro Pro His Ser Thr Ile Arg Arg Thr
 1185 1190 1195 1200
 Ala Ile Asp Leu Ile Gly Arg Gly Phe Thr Val Trp Glu Pro Tyr Met
 1205 1210 1215
 Asp Val Ser Ala Val Leu Met Gly Leu Leu Glu Leu Cys Ala Asp Ala
 1220 1225 1230
 Glu Lys Gln Leu Ala Asn Ile Thr Met Gly Leu Pro Leu Ser Pro Ala
 1235 1240 1245
 Ala Asp Ser Ala Arg Ser Ala Arg His Ala Leu Ser Leu Ile Ala Thr
 1250 1255 1260
 Ala Arg Pro Pro Ala Phe Ile Thr Thr Ile Ala Lys Glu Val His Arg
 1265 1270 1275 1280
 His Thr Ala Leu Ala Ala Asn Thr Gln Ser Gln Gln Asn Met His Thr
 1285 1290 1295
 Thr Thr Leu Ala Arg Ala Lys Gly Glu Ile Leu Arg Val Ile Glu Ile
 1300 1305 1310
 Leu Ile Glu Lys Met Pro Thr Asp Val Val Asp Leu Leu Val Glu Val
 1315 1320 1325
 Met Asp Ile Ile Met Tyr Cys Leu Glu Gly Ser Leu Val Lys Lys Lys
 1330 1335 1340
 Gly Leu Gln Glu Cys Phe Pro Ala Ile Cys Arg Phe Tyr Met Val Ser
 1345 1350 1355 1360
 Tyr Tyr Glu Arg Asn His Arg Ile Ala Val Gly Ala Arg His Gly Ser
 1365 1370 1375
 Val Ala Leu Tyr Asp Ile Arg Thr Gly Lys Cys Gln Thr Ile His Gly
 1380 1385 1390
 His Lys Gly Pro Ile Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Asp Gly Arg Tyr
 1395 1400 1405
 Leu Ala Thr Tyr Ser Asn Thr Asp Ser His Ile Ser Phe Trp Gln Met

10

20

30

40

1410 1415 1420
 Asn Thr Ser Leu Leu Gly Ser Ile Gly Met Leu Asn Ser Ala Pro Gln
 1425 1430 1435 1440
 Leu Arg Cys Ile Lys Thr Tyr Gln Val Pro Pro Val Gln Pro Ala Ser
 1445 1450 1455
 Pro Gly Ser His Asn Ala Leu Lys Leu Ala Arg Leu Ile Trp Thr Ser
 1460 1465 1470
 Asn Arg Asn Val Ile Leu Met Ala His Asp Gly Lys Glu His Arg Phe
 1475 1480 1485
 Met Val
 1490

10

<210> 3
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> primer

<400> 3
 atggcaggaa acagccttgt tctaccatt gtic

30

34

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> primer

<400> 4
 gtgtcattg ccagcccttc ttcacttccc

30

50

【図面の簡単な説明】

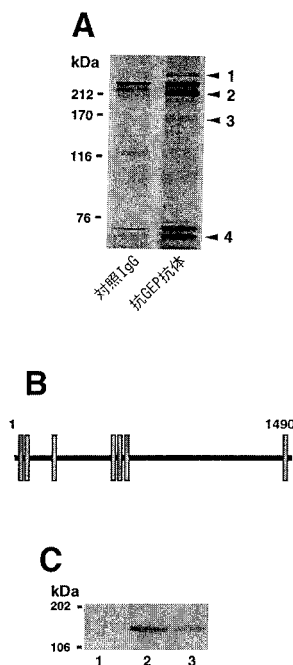
【図 1】 p 1 6 0 (ラブコネクチン 3 β) の単離と一次構造の概要。(A) 抗 R a b 3 G E P 抗体による p 1 6 0 (ラブコネクチン 3 β) の共免疫沈降の結果 (電気泳動写真)。1 ; p 3 4 0、2 ; p 2 0 0、3 ; p 1 6 0、4 ; p 6 0。(B) 構造概要。グレーは W D ドメインを示す。(C) リコンビナントラブコネクチン 3 β のウェスタンブロッティングの結果 (電気泳動写真)。レーン 1, 対照群 H E K 2 9 3 細胞 (1 μ g 蛋白質)、レーン 2, p C M V F a ラブコネクチン 3 β をトランスフェクトした H E K 2 9 3 細胞 (1 μ g 蛋白質)、レーン 3, ラット脳のホモジェネート (2 0 μ g 蛋白質)。

【図 2】 ラブコネクチン 3 β の組織および細胞レベル下の分布。(A) 組織分布 (電気泳動写真)。(B) 細胞レベル下分布 (電気泳動写真)。R c - 3 β , ラブコネクチン 3 β 、R c - 3 α , ラブコネクチン 3 α 、G E P, R a b 3 G E P、H o, ホモジェネート画分、P 1, 核ペレット画分、P 2, 粗シナプトソーム画分、P 3, ミクロソーム画分、S, 可溶性細胞質画分、P 2 A, ミエリン画分、P 2 B, 小胞体およびゴルジ複合体画分、P 2 C, シナプトソーム画分、P 2 D, ミトコンドリア画分、S S, シナプス可溶性画分、C S V, 粗シナプス小胞画分、C S M, 粗シナプス膜画分。

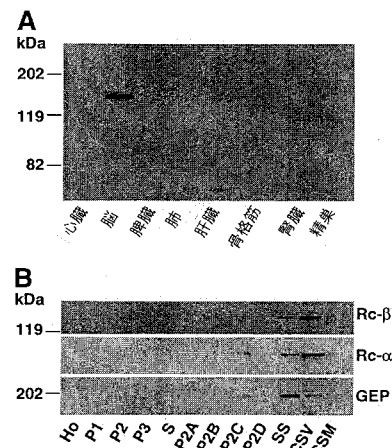
【図 3】 シナプスにおけるラブコネクチン 3 α と 3 β の共存を示す免疫蛍光顕微鏡像 (顕微鏡写真)。

【図 4】 ラブコネクチン 3 に対する、R a b 3 G E P の直接的な結合と R a b 3 G A P の間接的な結合を示すウェスタンブロッティングの結果 (電気泳動写真)。

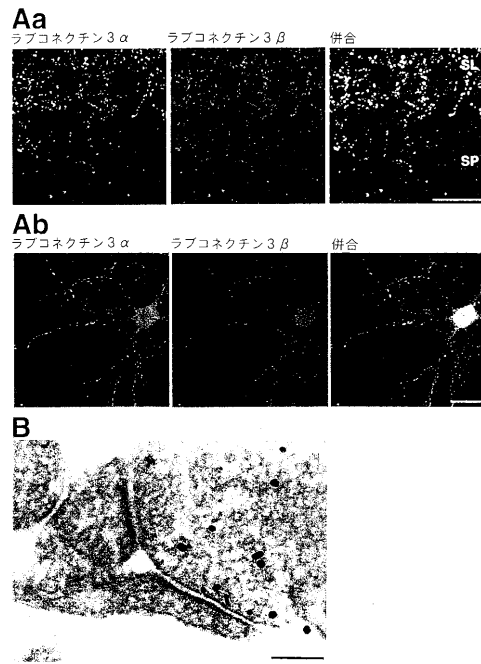
【図 1】



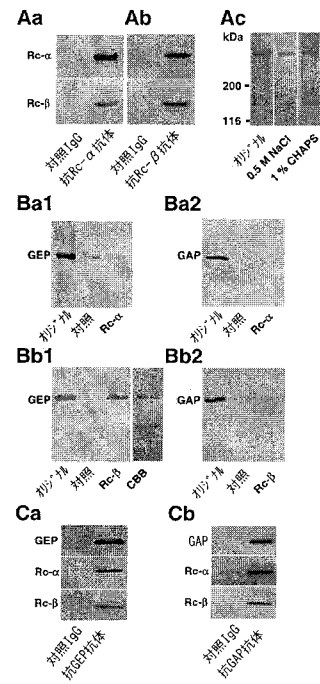
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/00	C 1 2 P 21/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	C
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB20 BB46 BB50 CB01 DA13 DA36 FA16
 FB02 FB03 FB12 GC15
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 CA11 CA12 DA02 DA06 EA04
 GA13 HA14 HA17
 4B050 CC01 CC10 LL01 LL05
 4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ41 QQ53 QR32 QR56 QR62 QS25
 QS34
 4B064 AG01 CA01 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA21 EA50 FA74

专利名称(译)	爱Connectin-3结合蛋白		
公开(公告)号	JP2004201673A	公开(公告)日	2004-07-22
申请号	JP2003207500	申请日	2003-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材有限公司		
[标]发明人	竹内勝一 高井義美		
发明人	竹内 勝一 高井 義美		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC10 4B050/LL01 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	2002319521 2002-11-01 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种蛋白质，该蛋白质用于阐明Ca²⁺依赖性胞吐作用的控制机制，特别是Rab3A的激活和失活，以及使用该蛋白质的Ca²⁺依赖性胞吐作用。特别地，其提供了用于筛选可用于控制Rab3A的活化和失活的物质的方法。通过使用抗Rab3 GEP抗体的共免疫沉淀法鉴定了涉及Rab3A激活和失活调节的蛋白质。由于该蛋白与rabconnectin-3和GDP / GTP交换反应促进蛋白结合，因此可用于筛选增加或减少该结合的物质。[选型图]图1

