

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536855

(P2010-536855A)

(43) 公表日 平成22年12月2日 (2010. 12. 2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00 Z N A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 4
C O 7 K 14/705 (2006. 01)	C O 7 K 14/705	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	
C O 7 K 14/00 (2006. 01)	C O 7 K 14/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-521897 (P2010-521897)	(71) 出願人	592104782
(86) (22) 出願日	平成20年8月22日 (2008. 8. 22)		ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月23日 (2010. 4. 23)		ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/010045		オブ・ニューヨーク
(87) 国際公開番号	W02009/025867		THE TRUSTEES OF COL
(87) 国際公開日	平成21年2月26日 (2009. 2. 26)		UMBIA UNIVERSITY IN
(31) 優先権主張番号	60/966, 052		THE CITY OF NEW YO
(32) 優先日	平成19年8月23日 (2007. 8. 23)		R K
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100
			27、ニューヨーク、ウエスト・ワンハン
			ドレッドシックスティーンズ・ストリート
			・アンド・ブロードウェイ (番地無し)
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化Notch融合タンパク質の組成物および治療方法

(57) 【要約】

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を含む融合タンパク質を提供する。この発明はまた、腫瘍を有する対象を治療する方法、対象における脈管形成を阻害する方法、卵巣癌を有する対象を治療する方法、代謝性疾患を有する対象を治療する方法であって、当該対象に対して当該対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を投与することを含む方法を提供する。本発明は更に、癌を有する対象を治療するための、対象における脈管形成を阻害するための、卵巣癌を有する対象を治療するための、代謝性疾患を有する対象を治療するための薬学的組成物の製造における上記融合タンパク質の使用を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を有する融合タンパク質。

【請求項 2】

当該Notch受容体タンパク質がNotch 1 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 3】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 2 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 4】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 3 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 5】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 4 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 6】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 7】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 8】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 3 の融合タンパク質。

【請求項 9】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 4 の融合タンパク質。

【請求項 10】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 11】

当該シグナルペプチドがNotch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4 またはIgG重鎖である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 12】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 13】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 13を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 14】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 24を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 15】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 23を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 16】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 17】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復13 - 24を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 18】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復25 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 20】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 13を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 21】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 22】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 23】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 24】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復13 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 25】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復21 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 26】

配列番号54に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 27】

配列番号55に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 28】

配列番号56に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 29】

配列番号57に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 30】

配列番号58に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 31】

配列番号59に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 32】

配列番号60に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 33】

配列番号61に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 34】

配列番号62に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 35】

配列番号63に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 36】

配列番号64に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 37】

配列番号65に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項2の融合タンパク質。

【請求項 38】

配列番号66に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項2の融合タンパク質。

【請求項 39】

10

20

30

40

50

配列番号 67 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 40】

配列番号 68 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 41】

配列番号 69 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 42】

配列番号 70 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

10

【請求項 43】

配列番号 71 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 44】

配列番号 72 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 45】

配列番号 73 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

20

【請求項 46】

配列番号 74 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 47】

配列番号 75 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 48】

配列番号 78 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 49】

配列番号 79 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

30

【請求項 50】

配列番号 80 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 51】

配列番号 81 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 52】

配列番号 82 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 53】

配列番号 83 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 54】

配列番号 84 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

40

【請求項 55】

配列番号 85 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 56】

配列番号 86 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 57】

配列番号 87 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 58】

配列番号 88 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 59】

配列番号 89 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の

50

融合タンパク質。

【請求項 6 0】

配列番号 9 0 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 1】

配列番号 9 1 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 2】

配列番号 9 2 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

10

【請求項 6 3】

配列番号 9 3 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 4】

配列番号 9 4 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 5】

配列番号 9 5 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 6】

20

配列番号 9 6 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 7】

配列番号 9 7 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 8】

配列番号 9 8 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 9】

配列番号 9 9 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

30

【請求項 7 0】

配列番号 1 0 0 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 1】

配列番号 1 0 1 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 2】

配列番号 1 0 2 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

40

【請求項 7 3】

配列番号 1 0 3 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 4】

腫瘍を有する対象を治療するために有効な量の請求項 1 - 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより腫瘍を有する当該対象を治療することを含む腫瘍を有する対象を治療する方法。

【請求項 7 5】

対象における脈管形成を阻害するために有効な量の請求項 1 - 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより当該対象において脈管形成を阻害することを含む対象における

50

脈管形成を阻害する方法。

【請求項 76】

対象を治療するために有効な量の請求項 1 - 73 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む卵巣癌を有する対象を治療する方法。

【請求項 77】

対象を治療するために有効な量の請求項 1 - 73 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより代謝性疾患を有する当該対象を治療することを含む代謝性疾患を有する対象を治療する方法。

【請求項 78】

当該代謝性疾患が、糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、または循環器病である請求項 77 の方法。

【請求項 79】

腫瘍を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 73 の融合タンパク質の使用。

【請求項 80】

対象における脈管形成を阻害するための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 73 の融合タンパク質の使用。

【請求項 81】

卵巣癌を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 73 の融合タンパク質の使用。

【請求項 82】

代謝性疾患を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 73 の融合タンパク質の使用。

【請求項 83】

当該代謝性疾患が、糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、または循環器病である請求項 82 の使用。

【請求項 84】

対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 73 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における生理学的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害する方法。

【請求項 85】

当該病理学的なリンパ管形成が腫瘍リンパ管形成またはリンパ節転移である請求項 84 の方法。

【請求項 86】

対象における腫瘍リンパ節転移を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 73 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍リンパ節転移を阻害する方法。

【請求項 87】

当該転移が血管、リンパ性脈管構造またはリンパ節を介して生じる請求項 86 の方法。

【請求項 88】

対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 73 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害する方法。

【請求項 89】

当該二次的腫瘍の増殖が、二次的腫瘍に関連する脈管形成の阻害により阻害される請求項 88 の方法。

【請求項 90】

対象における腫瘍による血管取り込みを阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 73 の何

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法。

【請求項 9 1】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と血管内皮成長因子 (VEGF) の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 2】

前記 VEGF の阻害剤が、VEGF-A、PGEF、FEGF-B、VEGF-C または VEGF-D の阻害剤である請求項 9 1 の方法。

【請求項 9 3】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と VEGF レセプター阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 4】

当該 VEGF レセプター阻害剤が、VEGFR-1 阻害剤、VEGFR-2 阻害剤または VEGFR-3 阻害剤である請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 5】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と血小板由来成長因子 (PDGF) の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 6】

血小板由来成長因子の阻害剤が、PDGF-A の阻害剤または PDGF-B の阻害剤である請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 7】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と PDGF レセプターアンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 8】

当該 PDGF レセプターアンタゴニストが PDGF レセプター-B-アンタゴニストである請求項 9 7 の方法。

【請求項 9 9】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と HER2/neu の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 1 0 0】

血管性の増殖性網膜症の治療に有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む血管性の増殖性網膜症の治療方法。

【請求項 1 0 1】

前記血管性の増殖性網膜症が、糖尿病性網膜症、黄斑変性 (macular defernation) または未熟児網膜症である請求項 1 0 0 の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2007 年 8 月 23 日に提出された米国仮出願番号 60/966,052 の優先権を主張するものであり、その内容は引用によりここに組み込まれる。

【0 0 0 2】

ここに開示される本発明は、米国保健研究所 (National Institutes of Health) からの助成番号 R01HL62454 号、並びに国防総省からの助成番号 DAMRDCW81XWH-04-1-054 および助成番号 DAMD17-03-1-0218 号の米国政府の支援によりなされた。従って、合衆国政府は本発明において一定の権利を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

この出願を通して、種々の出版物がカッコ内にアラビア数字により、またはカッコ内に著者および出版データにより引用される。これらの出版物についての全引用は、本明細書の最後に見出すことが可能である。これらの出版物の開示は、これによって引用により本出願に組み込まれ、本発明の属する技術分野をより十分に記載する。

【 0 0 0 4 】

[発明の背景]

脈管の成長

胎芽発生の期間において、脈管系の形成は早期の必須の工程である。胎芽において、脈管の成長は近軸および垂直プレート中胚葉に由来する多能性の血管芽細胞で開始する。当該血管芽細胞 (hemangioblast) は、血液前駆体 (hematopoietic progenitor) または内皮細胞前駆体の何れにも分化する可能性を有し、血管芽細胞 (angioblast) として知られる。

10

【 0 0 0 5 】

血管の発達は、脈管形性として知られる工程で開始し、それにより血管芽細胞が内皮細胞に分化し、遊走し、それと共に初期の血管網状組織を形成する。この初期の血管ネットワークは、同種の大きさであり、且つ全て内皮細胞で作られている脈管からなる。血管網状組織が、次に、脈管形性を経て再構築される。

【 0 0 0 6 】

脈管形性は新しい血管の発芽、これらの血管の無血管領域への遊走、および付属細胞、周細胞および平滑筋細胞の補充を含む (Gale and Yancopoulos, 1999)。分化し、収縮性のある血管壁を形成する平滑筋細胞は、神経稜細胞 (neural crest cells)、間充織細胞 (mesenchymal cells) および更に内皮細胞までも含む多数の前駆体から生じる (Owens, 1995)。成人においては、脈管形性は、濾胞性の発達、創傷治癒、並びに腫瘍脈管形性および心疾患などの病理学的過程を必要とする。

20

【 0 0 0 7 】

NotchファミリーおよびNotchリガンド

ショウジョウバエ (*Drosophila*)、*C.エレガンス* (*C. Elegans*)、ゼブラフィッシュ (*zebrafish*) および哺乳類の研究は、Notch経路が、多数の細胞運命の決定を調節するために機能する進化的に保存されたシグナリング機構であることを示している。Notchシグナリングは、3つの胚層全てから生ずる細胞の適切なパターンニングのために必要とされる。細胞の状況に依存して、Notchシグナリングは、分化を阻害も誘導もし、増殖を誘導し、および細胞生存を促進することが可能である (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Lewis, 1998; Weinmaster, 1997)。ショウジョウバエにおいて、単一のNotchタンパク質が2つのリガンド、セレイト (Serrate) とデルタにより活性化される。哺乳類において、これらのファミリーは4つのNotch遺伝子 (Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4) と5つのリガンド、2つのセレイト様 (Jagged1-2) と3つのデルタ (DI1、3、4) にまで広がっている (Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Gallahan and Callahan, 1997; Lardelli et al., 1994; Lindsay et al., 1995; Shawber et al., 1996a; Shutter et al., 2000a; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1992; Weinmaster et al., 1991)。胚発生の間中、Notchレセプターおよびリガンドは、動的な空間的且つ時間的パターンで発現される。しかしながら、全てのリガンドが全てのレセプターを活性化するのはかどうかは不明である。

30

40

【 0 0 0 8 】

Notchシグナリングと機能

Notchシグナリングは、多くの異なる種類の細胞運命の決定に、環境的な状況に依存する阻害性、誘導性または増殖性のシグナルを供給することによって影響している (以下に総説されている: Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Greenwald, 1998; Robey, 1997; Vervoort et al., 1997)。この多面的な機能は、Notchが空間時間的な方法において複数のシグナル経路を調節することを示唆する。

50

【 0 0 0 9 】

Notchが調節する細胞運命の決定と一致して、当該レセプターとリガンドの両方が、単一の膜貫通ドメインを有する細胞表面タンパク質である（図1）。Notchタンパク質の調節性の細胞ガイドドメインは、大部分は、リガンド結合のために必要とされる直列に配列したEGF様反復からなる(Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Weinmaster, 1998)。EGF様反復までのC末端は、更なる3つのシステインリッチ反復であり、LIN12/Notch反復(LIN12/Notch repeats; (LNR))と称される(Greenwald, 1994)。LNRの下流に、フーリン様転換酵素(furin-like convertase)により認識されるタンパク分解性の切断配列(RXRR)が位置する。Notch1については、この部位での切断により180キロダルトンの細胞外ペプチドと120キロダルトンの細胞内ペプチドが得られ、これらは共に保持されて細胞表面でヘテロダイマーレセプターを生じる(Blaumueller et al., 1997; Kopan et al., 1996; Logeat et al., 1998)。

10

Notchの細胞内ドメイン(NotchICD、図1)は、この形態のNotchが構成的に信号を出すことを示す機能喪失のNotchの表現型を救う(Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1993; Lyman and Young, 1993; Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993)。

【 0 0 1 0 】

Notchの細胞質ドメインは3つの同定可能なドメインを含む：RAMドメインおよびアンキリン反復ドメインおよびC末端PESTドメイン（図1）。リガンド活性化において、Notchは2つの更なるタンパク分解性の切断を受け、その結果、細胞質ドメインの放出が起こる(Weinmaster, 1998)。このNotchペプチドは核に転位置し、CSL(CBF, Su (H), Lag-2)として知られる転写性のリプレッサーと相互作用し、それを転写性のアクチベーターに変える。CSL/Notch相互作用は、NotchのRAMドメインの存在に依存し；一方では、転写性の活性は、アンキリン反復の存在を必要とする(Hsieh et al., 1996; Hsieh et al., 1997; Roehl et al., 1996; Tamura et al., 1995; Wettstein et al., 1997)。インビボおよびインビトロ研究の両方が、HESおよびHey遺伝子がNotch/CSL依存性シグナリングの直接のターゲットであることを示す(Bailey and Posakony, 1995; Eastman et al., 1997; Henderson et al., 2001; Jarriault et al., 1995; Nakagawa et al., 2000; Wettstein et al., 1997)。HESおよびHey遺伝子は、bHLH転写性リプレッサーであり、N-boxでDNAを結合する(Nakagawa et al., 2000; Sasai et al., 1992; Tietze et al., 1992)。Notchはまた、CSL非依存性の経路によりシグナリングすることも提唱されている。実際に、まさにアンキリン反復ドメインの発現はNotchシグナリングの幾つかの形態のために必要十分である(Lieber et al., 1993; Matsuno et al., 1997; Shawber et al., 1996b)。

20

30

【 0 0 1 1 】

最終的に、PESTドメインは、SEI-10/ユビキチン依存性経路によるタンパク質ターンオーバーに関連している(Greenwald, 1994; Oberg et al., 2001; Rogers et al., 1986; Wu et al., 1998; Wu et al., 2001)。当該レセプターと同様に、Notchリガンドの細胞外ドメインもまた、直列に配列されるEGF様反復の大部分からなる（図1）。これらの反復の上流は、当該レセプターのリガンド結合と活性化のために必要とされるDSL(Delta, Serrate, Lag-2)として知られる異なるEGF様反復である(Artavanis-Tsakonas et al., 1995)。

40

【 0 0 1 2 】

[Notchシグナリングおよび血管発生]

血管形成および脈管形成を誘導するために機能する多くの遺伝子が同定されているが、殆どが、血管発生の際にどのように細胞運命決定が特定化されるのかについては知られていない。多くの観察が、Notchシグナリング経路が細胞運命決定と血管系のパターンニングにおいて役割を担い得ることを示唆する。

【 0 0 1 3 】

Notch1、Notch4、Jagged1およびDI14は、全て発達中の血管において発現され、一方でNotch3は補助的の平滑筋細胞において発現される(Krebs et al., 2000; Shutter et al., 2000b; Uyttendaele et al., 1996; Villa et al., 2001; Xue et al., 1999)。Jagged1

50

欠損マウスは、胚芽致死性であり、幾つかの血管性の欠陥を有する(Xue et al., 1999)。Notch1のヌル接合体マウスは、胚芽致死性であり、幾つかの神経細胞の欠陥で死に至るが、脈管形成における欠陥をも有する(Krebs et al., 2000; Swiatek et al., 1994)。Notch4欠損マウスは出産され、正常であるように見えるが、Notch1およびNotch4の両方を欠損した胎芽は、幾つかの出血毒素性および血管パターン性欠陥でE9.5で死に至り、これはNotch1およびNotch4が、血管発生の間において機能的に重複性であり得ることを示す(Krebs et al., 2000)。内皮におけるNotch4の活性型の外因性発現もまた、二重のNotch1/Notch4ヌル接合体マウスについて見られるのと同様な血管の欠陥を引き起こし、Notchシグナリングの適切なレベルが、胎芽血管構造の適切な発生のために重要な意味を有することを示唆している(Uyttendaele et al., 2001)。

10

【0014】

纏めると、Notch/Notchシグナル成分のためのマウス変異体からのデータは、血管リモデリング、動脈静脈特異化、血管平滑筋細胞補充および心臓/心流出血管発生を含むNotch依存性の幾つかの過程を明らかにする。

【0015】

最近の実験が、動脈/静脈の内皮細胞特異化にNotchシグナリングを結び付けている。E13.5胎芽(embryos)のインサイチュー分析は、Notch1、Notch3、Notch4、Dll4、Jagged1およびJagged2発現が動脈に限定され、静脈では欠けていることを明らかにした(Villa et al., 2001)。発現データと一致して、ゼブラフィッシュにおけるNotchシグナリングの破損が、動脈性マーカーのエフリンB2(efrinB2)の減少と付随し、一方では、Notchの活性型の異所性の発現が背動脈範囲内の静脈性細胞マーカーEphB4の減少を導く(Lawson et al., 2001)。これらのデータは、Notchシグナリングが脈管形成の間の動脈性および静脈性の細胞運命の特定化することを助け得ることを示唆する。

20

【0016】

纏めると、Notch/Notchシグナル成分のためのマウス変異体からのデータが、血管リモデリング、動脈静脈特異化、血管平滑筋細胞補充および心臓/心流出血管発生を含むNotch依存性の幾つかの過程を明らかにする。

【0017】

NOTCHシグナリングはまた、成人血管系において機能することも示唆されている。ヒトにおいて、NOTCH3の細胞ガイドメインにおけるミスセンス突然変異は退行性の血管性疾患、CADASILの発生に関連する(CARONTI ET AL., 1998; DESMOND ET AL., 1998; JOUTEL ET AL., 2000; JOUTEL ET AL., 1996)。創傷治癒モデルにおいて、Jagged1発現の増加が、再生化している内皮性の創傷縁で観察され、Notchシグナリングが成人の脈管形成の過程において機能している可能性が示唆されている(LINDNER ET AL., 2001)。纏めると、これらのデータは、血管発生; 血管形成、血管パターン性/脈管形成、および動脈/静脈特定化の間の重要な意味を持つ多くの工程でのNotchシグナリング機能を支持する。しかしながら、Notchシグナリング経路がこれらの異なる工程に影響するための分子的な機序は更に明らかにされるべきである。

30

【0018】

[重要性]

シミズら(J. Biol. Chem. 274(46): 32961-32969 (1999))は、結合試験におけるNotch1ECD/Fc、Notch2ECD/FcおよびNotch3ECD/Fcの使用を記載する。しかしながら、シミズらは、脈管形成を阻害するためのそれらのタンパク質の使用には言及していない。

40

【0019】

キタジュースキーら(Kitajewski et al.)に対する2002年4月30日発行の米国特許第6,379,925号は、マウスのNotch4を記述する。しかしながら、それは、問題となる当該出願において明らかにされるNotchに基づく融合タンパク質を記載するものではない。

【0020】

Notchタンパク質は、脈管構造、造血系および神経系を含む発生上の決定において重要な役割を果たしている。そのために、それらの機能の理解は、細胞運命決定および傾倒が

50

発生期間および成人組織においてどのように制御されているのかを理解するための鍵である。今日までに、NotchまたはNotchリガンド遺伝子の破損についての幾つかの報告は、この経路が血管の発生を導く機構の基礎的な部分であることを強調する血管の表現系を記載している。異常なNotch活性は、癌および血管性疾患（CADASIL）の両方を含むヒトの病理に関連付けられてきた。腫瘍脈管形成におけるNotchの分析は最近になって始まったものであるが、我々のNotchの潜在的な下流のターゲットの発見は、脈管形成に関連する病理学的な過程における役割を示唆する。例えば、VEGFR-3は腫瘍脈管形成および腫瘍リンパ管形成の両方に関連している。幾つかの他の潜在的なNotchターゲットの発現または機能も腫瘍脈管形成に関連している：それらはエフリンB2（*ephrinB2*）、*Id3*、アンジオポイエチン1（*Angiopoietin 1*）およびPDGF-Bを含む。Notch遺伝子機能におけるこれらのターゲットの役割についての洞察は、ヒトの病理学の将来の分析を明らかに促進するであろう。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0021】

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を有する融合タンパク質を提供する。

【0022】

本発明は、腫瘍を有する対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより腫瘍を有する当該対象を治療することを含む腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。

【0023】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより当該対象において脈管形成を阻害することを含む対象における脈管形成を阻害する方法を提供する。

【0024】

本発明は、対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む卵巣癌を有する対象を治療する方法を提供する。

【0025】

本発明は、対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより代謝性疾患を有する当該対象を治療することを含む代謝性疾患を有する対象を治療する方法を提供する。

【0026】

本発明は、腫瘍を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0027】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0028】

本発明は、卵巣癌を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0029】

本発明は、代謝性疾患を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0030】

本発明は、対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における生理学的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害する方法を提供する。

【0031】

本発明は、対象における腫瘍転移を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対

象に投与することを含む、対象における腫瘍転移を阻害する方法を提供する。

【0032】

本発明は、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。

【0033】

本発明は、対象における腫瘍による血管取り込み (blood vessel cooption) を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法を提供する。

【0034】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と血管内皮成長因子 (VEGF)、VEGF-A、P1EF、FEGF-B、VEGF-CまたはVEGF-Dの阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0035】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質とVEGFレセプターアンタゴニスト、VEGFR-1アンタゴニスト、VEGFR-2アンタゴニストまたはVEGFR-3アンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0036】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と血小板由来成長因子 (PDGF)、PDGF-AまたはPDGF-Bの阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0037】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質とPDGFレセプターアンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0038】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質とHER2/neuの阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0039】

本発明は、血管性の増殖性網膜症の治療に有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む血管性の増殖性網膜症の治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】この図は、NotchおよびNotchリガンド：Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged-1、Jagged-2、Delta様1、Delta様3、Delta様4：の模式的な構造を示す。

【図2】この図は、Notchに基づく融合タンパク質 (NotchECD/Fc) の模式的な設計を示す。EGF反復を含むNotch1、Notch2、Notch3またはNotch4の細胞外ドメインは抗体のFc部分に対して融合されている。

【図3】この図は、Notchに基づく融合タンパク質の活性を試験するための共培養アッセイを示す。NotchおよびNotch応答性転写性レポーターは、「Notch応答性」細胞、HeLaにおいて発現される。Notchリガンド、Jagged-1、Delta様1またはDelta様4は、「リガンド提示」細胞、293において発現される。発現は個々の細胞集合体のトランスフェクションにより媒介され、細胞は共培養され、次にNotch依存性レポーター活性について試験される。

【図4】この図は、NotchとNotchリガンドとの間の相互作用によるNotchシグナリングの活性化に対するNotchに基づく融合タンパク質の阻害活性を示す。Notchシグナリングの誘導は、Notch1発現細胞および3種類のNotchリガンド発現細胞の両者の共培養により検出され、これらの誘導はNotchに基づく融合タンパク質発現ベクターのNotch1発現細胞への共トランスフェクションにより阻害された。そのため、Notchに基づく融合タンパク質は、N

10

20

30

40

50

otchとNotchリガンドとの間の相互作用の阻害に基づくNotch阻害剤として使用可能である。

【図5】この図は、293におけるNotch1に基づく融合タンパク質（Notch1ECD/Fc）の発現を示す。パネルA:細胞溶解物における発現(lys)または培地に分泌された発現(sup)。パネルB:293溶解物におけるNECD/Fcの発現の一覧。

【図6】この図は、アデノウイルスコーディングVEGF-165に感染させたHUVECにおけるNotchシグナリングの活性化を示す。Notchシグナリングの活性化は、CBF1プロモーター活性を使用して検出される。CBF1プロモーターの転写性活性は、Notch-ICのCBF1への結合により活性化される。我々は、異なるMOIでアデノウイルスコーディングVEGF-165に感染させたHUVECにおけるCBF1プロモーター活性を測定した。CBF1プロモーターの誘導は、MOI依存 10
的な様式でのAd-LacZ感染細胞に比較して、Ad-VEGF感染HUVECにおいて明瞭に検出された。このデータは、VEGFの過剰発現がHUVECにおけるNotchシグナリングを活性化できることを示した。

【図7】この図は、NotchシグナリングのVEGF誘導性の活性化におけるNotchに基づく融合タンパク質の効果を示す。Ad-Notchに基づく融合タンパク質のAd-VEGFとの重感染は、Ad-VEGF感染単独により誘導されるCBF1プロモーター活性の活性化を明らかに減少した。パネルAにおいて、各アデノウイルスについて40MOIでの感染の場合、レポーター遺伝子のトランスフェクション後の24時間での60%の阻害と48時間での90%の阻害が検出された。このNotchトラップの阻害活性は、Ad-Notchに基づく融合タンパク質のMOIに依存した。

【図8】この図は、HUVECで過剰発現されたVEGF-165による発芽の誘導におけるNotchに基づく融合タンパク質の効果を我々が評価した実験を示す。Ad-VEGF感染HUVECをタイブコラーゲンゲル上で8日間培養した場合、発芽はコラーゲンゲルの中へ誘導された。過剰発現 20
されたVEGFによる発芽のこの誘導は、アデノウイルスコーディングNotchに基づく融合タンパク質の重感染により明瞭に阻害された。Ad-Notchに基づく融合タンパク質それ自身は、形態学上の影響は少なかった。

【図9】この図は、顕微鏡下で視野当たりの芽をカウントした結果を示す。HUVECへのAd-VEGF感染は使用されたMOIに依存して芽の数を増加した。Notchに基づく融合タンパク質の半分のMOIが使用された場合でさえも、Ad-VEGFに比較して、Ad-VEGF誘導性の発芽は明瞭に阻害された。これらのデータは、VEGFがHUVECの発芽をNotchシグナリングの活性化を介して誘導し、Notchに基づく融合タンパク質がVEGF誘導性発芽を阻害できたことを示唆し 30
た。

【図10】この図は、ラットNotch1タンパク質の細胞外ドメイン（配列番号1）とリンカー配列（配列番号2）のアミノ酸配列を示す。

【図11】この図は、ラットNotch2タンパク質の細胞外ドメイン（配列番号3）とリンカー配列（配列番号2）のアミノ酸配列を示す。

【図12】この図は、マウスNotch3タンパク質の細胞外ドメイン（配列番号4）のアミノ酸配列を示す。

【図13】この図は、マウスNotch4タンパク質の細胞外ドメイン（配列番号5）とリンカー配列（配列番号2）のアミノ酸配列を示す。

【図14A】この図は、ラットNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号6）を示す。 40

【図14B】この図は、ラットNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号6）を示す。

【図15A】この図は、ラットNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号7）を示す。

【図15B】この図は、ラットNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号7）を示す。

【図16A】この図は、マウスNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号8）を示す。

【図16B】この図は、マウスNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号8） 50

を示す。

【図 1 7 A】この図は、マウスNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 9）、並びにリンカー配列の核酸配列（配列番号 10）およびアミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

【図 1 7 B】この図は、マウスNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 9）、並びにリンカー配列の核酸配列（配列番号 10）およびアミノ酸配列（配列番号 2）を示す。

【図 1 8 A】この図は、ヒトNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 11）を示す。

【図 1 8 B】この図は、ヒトNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 11）を示す。

【図 1 9 A】この図は、ヒトNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 12）を示す。

【図 1 9 B】この図は、ヒトNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 12）を示す。

【図 2 0 A】この図は、ヒトNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 13）を示す。

【図 2 0 B】この図は、ヒトNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 13）を示す。

【図 2 1 A】この図は、ヒトNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 14）を示す。

【図 2 1 B】この図は、ヒトNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号 14）を示す。

【図 2 2 a】図22A - 22I これらの図は、VEGFがNotchシグナリングを活性化してHUVECの発芽を誘導することを示す。HUVECは、40MOI（図 2 2 A、2 2 H、2 2 I）または20MOIでAd-VEGFを形質導入された。Ad-LacZをHUVECに対して同時形質導入して、同様の総量のアデノウイルス60MOI（図 2 2 G）、80MOI（図 2 2 A）および100MOI（図 2 2 H、2 2 I）とした。図 2 2 AはNotchおよびNotchリガンド発現のRT-PCR分析を示す。番号はPCRサイクルを示す。図 2 2 Bは、CSLレポーター活性における形質導入VEGFの効果を示す。図 2 2 Cは、Ad-VEGFを形質導入されたCSLレポーター活性におけるSU5416の効果を示す。図 2 2 DはNotchデコイ（N1ECDFc）の構成物を示す。図 2 2 EはAd-N1ECDFcを形質導入されたHUVECからのN1ECDFcの分泌を示す。図 2 2 Fは共培養アッセイでのリガンド誘導性CSLレポーター活性に対するN1ECDFcの効果を示す（白四角：（-）；黒四角：0.33 ng pHyTC-N1ECDFc；黒四角：0.67 ng pHyTC-N1ECDFc）。図 2 2 G - Iは、Ad-VEGF形質導入HUVECに対するN1ECDFcの効果を示す。Notchシグナリングは、表示された用量でのAd-N1ECDFcの共伝達の存在または不在におけるHUVECへのAd-VEGFの形質導入により活性化された。図 2 2 Gは、Ad-VEGFによりトランス活性化されたCSLレポーター活性におけるN1ECDFcの効果を示す。図 2 2 Hは、40MOIのAd-N1ECDFcの同時形質導入によるAd-VEGF形質導入HUVECの発芽の阻害を示す。図 2 2 IはAd-VEGF形質導入HUVECの発芽におけるN1ECDFcの効果の定量化を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。

【図 2 2 b】記載なし。

【図 2 2 c】記載なし。

【図 2 3 a】図23A - 23J これらの図は、NotchシグナリングがFlt1発現を上方制御してHUVECの発芽を誘導することを示す。HUVECは、40MOIでのAd-LacZまたはAd-N1ICの何れかを形質導入された。図 2 3 A - 2 3 CはNotch誘導性HUVEC発芽におけるレセプターチロシンキナーゼの阻害剤の効果を示す。図 2 3 Aは、PD166866、ZD1893の1 μ MおよびSU5416の0.5 μ Mで処理されたAd-N1IC形質導入HUVECの発芽の写真である。図 2 3 Bは、1 μ Mの阻害剤の効果の定量化を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。図 2 3 cはSU5416の効果の用量依存性を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。図 2 3 D - EはAd-N1IC形質導入HUVECにおけるFlt-1発現の誘導を示す。図 2 3 DはRlt-1mRNA発現のRT-PCR分析を示す。図 2 3

10

20

30

40

50

EはFlt-1タンパク質発現のW.B.分析を示す。図23F-GはNotch誘導性HUVEC発芽のPIGF刺激による促進を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、完全培地の代わりに、50 ng/ml PIGFの不在または存在においてSFMと共にコラーゲンゲル上で培養された。図23Fは、Ad-N1IC形質導入HUVECのPIGF誘導性の発芽を示す（矢印（arrow head）：単一の糸状仮足を伴う芽；矢（arrow）：複数の糸状仮足を伴う芽）。図23GはAd-N1IC形質導入HUVECの発芽におけるPIGFの効果の定量化を示す（白四角：複数の；黒四角：全体の）。図23H-IはFlt1発現におけるFlt-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、コントロール（CT）またはFlt-1 siRNAの何れかの200pmolでトランスフェクションされた。図23Hは、Flt-1 mRNA発現の減少を示す。図23IはFlt-1タンパク質発現の減少を示す。図23JはNotch誘導性HUVECの発芽におけるflt-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、100または200pmolの何れかのsiRNAをトランスフェクションされ、コラーゲンゲル上で2日間培養された。

10

【図23b】記載なし。

【図23c】記載なし。

【図24】これらの図は、VEGFがNotchシグナリングを介したMMP-9およびMT1-MMPの両方の上方制御によるゼラチナーゼ活性を制御することを示す。図24A-Bは、HUVECにおいてVEGFにより刺激されたMMP-9およびMMP-2活性のゼラチン酵素電気泳動分析を示す。図24Aは、MMP-9活性におけるN1ECDFcの効果を示す。形質導入HUVECを記載された日数で（即ち、D2、D4、D6、D8）フィブリンゲル上で培養した。同様な結果が、コラーゲンゲルを用いることにより得られたが、MMP-9の誘導は、コラーゲンゲルよりもフィブリンゲルにおいてより強いものであった（データには示さず）。図24Bは、MMP-2活性におけるN1ECDFcの効果を示す。HUVECを記載された用量でAd-N1ECDFcを形質導入し、コラーゲンゲル上で培養したHUVECから4日目に培養上清を採取した。図24C-Dは、NotchシグナリングでのMMP-9およびMT1-MMPの上方制御を示す。HUVECをAd-LacZまたはAd-N1ICの何れかで形質導入した。番号はPCRサイクルを示す。図24Cは、MMP-9およびMMP-2の発現におけるNotchシグナリングの効果のRT-PCR分析を示す。図24DはNotchシグナリングを伴う転写物およびタンパク質の両方のMT1-MMP発現の誘導を示す。図24Eは、Ad-N1ECDFcの同時形質導入を伴うAd-VEGF-HUVECにおけるMMP-9およびMT1-MMP発現のRT-PCR分析を示す。HUVECは、各々40MOIで、Ad-N1ECDFcの同時形質導入の不在または存在においてAd-VEGFで形質導入された。Ad-LacZが同時形質導入されて、80MOIの同様な総量のアデノウイルスとした。

20

30

【図25a】図25A - 25D これらの図は、VEGF依存性インビボ脈管形成におけるNotchシグナリングの役割を示す。図25A - 25DはマウスDASアッセイにおけるVEGF誘導性脈管形成のN1ECDFcによる阻害を示す。代表的な写真を示す。図25Aは、293/VEGFトランスフェクションでの、対Notchデコイ（Notchに基づく融合タンパク質）N1ECDFcも発現している293/VEGFでの皮下の誘導性脈管形成を示す。図25Bはコントロールにおける293/VEGF、対Notchデコイ（Notchに基づく融合タンパク質）-N1ECDFc発現293における293/VEGFにより誘導される血管新生の程度の定量化を示す。図25CはAD-LacZ感染MDA-MB-231細胞、対Ad-N1ECDFc（Notchに基づく融合タンパク質）感染MDA-MB-231細胞での皮下誘導性脈管形成を示す。MDA-MB-231乳癌細胞はVEGFを産生する（データには示さず）。図25Dは、Ad-LacZ感染MDA-MB-231細胞、対Ad-N1ECDFc（Notchに基づく融合タンパク質）感染MDA-MB-231細胞により誘導される血管新生の程度の定量化を示す。

40

【図25b】記載なし。

【図26】これらの図は、Ad-VEGF165形質導入HUVECの増殖を示す。HUVECは記載された用量のAd-VEGF165で形質導入された。Ad-LacZも同時形質導入されて、細胞当たり40PfuのMOIで同様な総量のアデノウイルスとした。HUVECを1%FBSを補充したSFM中に懸濁し、次に、0.4mlの培地と共に1ウェル当たり 1×10^4 細胞で24ウェルマルチウェルプレートに播種した。4日後、細胞数をCCK-8キットを用いて測定し、その結果を、細胞当たり40pfuのMOIでAd-GFPを形質導入したコントロール細胞の数に対して決定した細胞数の比で示した。図26は、増殖における形質導入されたVEGFの効果を示す。図26Bは、SU5416の阻害効果

50

を示す。Ad-VEGF形質導入HUVECを記載された用量のSU5416で処理した。

【図 2 7】これらの図は、I 型コラーゲンゲル上でのHUVECの発芽の誘導を示す。HUVECは、記載された用量でのAd-VEGF165またはAD-N11Cの何れかで形質導入された。Ad-LacZも同時形質導入されて、アデノウイルスの同様な総量を細胞当たり40pfuのMOIとした。形質導入HUVECは完全培地を用いてコラーゲンゲル上で培養された。発芽の量は、7日目に顕微鏡下で評価された。

【図 2 8】これらの図は、細胞増殖におけるNotchシグナリングの変化の影響を示す。細胞を記載されたアデノウイルスで形質導入した。Ad-GFPも同時形質導入して、アデノウイルスの同様な総量を細胞当たり60pfuのMOIとした。4日後、細胞数をCCK-8キットを使用して決定し、結果を、細胞当たり60pfuのMOIでのAd-GFPで形質導入されたコントロール細胞の数に対して決定された細胞数の比として示す。図 2 8 A は、HUVECの増殖における形質導入されたN11CおよびNotch融合タンパク質の影響を示す。形質導入HUVECを完全培地に懸濁し、次に1ウェル当たり 1×10^4 細胞で24ウェルマルチウェルプレートに0.4mlの記載された培地と共に播種した（白四角：Ad-N11C；黒四角：Ad-N1ECDFc）。図 2 8 B は、H P1/VEGF形質移入体の増殖におけるNotch誘導タンパク質の効果を示す。形質導入されたKP1/VEGF形質移入体をRPMI1640に懸濁し、次に24ウェルマルチウェルプレートに1ウェル当たり 2×10^4 細胞で0.5mlの培地と共に播種した。

【図 2 9】この図は、AD-N11C-形質導入HUVECにおけるPIGF発現の誘導のRT-PCR分析を示す。HUVECは、細胞当たり40pfuのMOIでのAd-LacZまたはAd-N11Cの何れかで感染させた。全RNAを、コラーゲンゲル上で5日間に亘り完全培地で培養された形質導入HUVECから単離した。

【図 3 0】これらの図は、Ad-N11C-またはAd-VEGF-形質導入HUVECの何れかの発芽のFlk-1 siRNAトランスフェクションによる阻害を示す。図 3 0 A は、Ad-VEGF-HUVECにおけるFlk-1 mRNAおよびタンパク質の発現の200pmolのFlk-1 siRNAのトランスフェクションによる減少を示す。細胞当たり40pfuのMOIでのAd-VEGF-HUVECをコントロール（CT）またはFlk-1 siRNAの何れかの200pmolでトランスフェクトした。総RNAをトランスフェクションの48時間後に単離した。トランスフェクションの48時間に亘りSFMで血清を枯渇された細胞から収集した。図 3 0 B および 3 0 C は、VEGFまたはNotchの何れかの誘導性HUVEC発芽におけるFlk-1 siRNAトランスフェクションの阻害効果を示す。細胞当たり40 pfuのMOIでのVEGFまたはNotchの何れかの誘導性HUVECを記載された通りの200pmolのsiRNAでトランスフェクトし、5日間コラーゲンゲル上で培養した。図 3 0 B はHUVEC発芽におけるFlk-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す（白四角：Ad-VEGF；黒四角：Ad-N11C）。図 3 0 C はFlk-1 siRNAトランスフェクションの阻害効果の定量化を示す。

【図 3 1】これらの図は、Ad-N11C-形質導入HUVECの発芽のマトリックスメタロプロテイン阻害剤GM6001の処理での阻害を示す。細胞当たり40pfuでのAd-LacZまたはAd-N11C-HUVECの何れも、50 μ mでのGM6001の不在または存在において5日間コラーゲンゲル上で培養した。図 3 1 A は、Notch誘導性HUVEC発芽におけるGM6001の効果を示す。図 3 1 B はGM6001の阻害効果の定量化を示す。

【図 3 2】図 32A - 32D これらの図は、NotchデコイがNotchリガンドにより刺激されたNotchシグナリングの活性化を阻害することを示す。図 3 2 A は、Notchデコイ（N1ECDFc）の概要と、培養上清中に分泌されたNotch1デコイを検出するためのウェスタンブロットを示す。Notch1デコイをコードするアデノウイルス（Ad-N1ECDFc）を記載された通りのm.o.i.で形質導入されたHUVEC。図 3 2 B は、Notch1デコイが共培養シグナリングアッセイにおいてリガンド誘導性CSLレポーター活性を阻害することを示す。Notchシグナリングの活性化は、Notchリガンドを発現する293細胞と共培養されたNotch1を発現するHeLa細胞において測定した。データは、平均値 \pm SDとして示す。図 3 2 C は、Notch4の異所性発現がフィブリンゲル上で培養されたHUVECの形態形成を誘導することを示す。HUVECは、30m.o.i.でNotch4をコードするアデノウイルス（Ad-Notch4）と、感染細胞を標識するための10m.o.i.のAd-GFPで形質導入した。2日後、HUVECを安定なHUVECトランスフェクタントとフィブリンゲル上で共培養し、形態学的変化を蛍光顕微鏡を使用して記録した。Notch4は細胞

伸展 (cell extensions) を誘導し (上段左、白色矢印)、200nMの化合物Eの処理はNotch4誘導性進展を阻害した (上段右)。Notch1デコイ発現はNotch4誘導性細胞伸展を阻害した。アデノウイルス形質導入HUVECを、Fc (下段左) またはNotch1デコイ (下段右) の何れかを発現している安定したHUVECトランスフェクタントとフィブリンゲル上で共培養し、2日後に写真を撮った。線 (Bar) = 200 μ m。図3 2 DはNotch4誘導性伸展におけるNotchシグナル阻害の効果の定量化を示す。発芽の減少は、化合物Eでの処理およびN1ECDFcの形質導入後に統計学的に有意であった (共に $p < 0.0001$; データは平均値 \pm SDで示す)。

【図3 3】図33A - 33D これらの図は、FGF4がマウス乳癌Mm5MT細胞におけるNotchリガンドの発現を誘導することを示す。レトロウイルスの遺伝子移入により産生された安定したMm5MTトランスフェクタント。図3 3 Aは、偽トランスフェクタント (Mm5MT-X) と比較しての、FGF4を発現するMm5MTトランスフェクタント (Mm5MT-FGF4) におけるJagged1およびDll1の誘導を示すNotchリガンドの発現のRT-PCR分析の定量化を示す。図3 3 Bは、Jagged1タンパク質は、対Mm5MT-XでのMm5MT-FGF4において、ウェスタンブロットにより測定することにより評価された。図3 3 Cは、FGFレセプターキナーゼの阻害剤であるPD166866による、Mm5MT-FGF4細胞におけるNotchリガンド発現の減少を示す。図3 3 Dは、Mm5MTトランスフェクタントにおけるJagged1染色の免疫組織化学的分析を示す。線 = 50 μ m。

【図3 4】図34A - 34C これらの図は、Notch1デコイが、マウスにおけるMm5MT-FGF4腫瘍の脈管形成および皮下腫瘍増殖を阻害することを示す。図3 4 Aは、マウスにおいて、Mm5MT-FGF4-XとMm5MT-FGF4-Fcの腫瘍体積が、Mm5MT-FGF4-N1ECDFcトランスフェクタントとは有意に異なることを示す (21日目、 $P=0.037$ および $P=0.008$, Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fc、それぞれ対Mm5MT-FGF4-N1ECDFc; データは平均値 \pm SDで示す)。図3 4 Bは、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントの腫瘍内のCD31染色を用いた新生血管の免疫組織化学的分析を示す。上段パネル、線=100 μ m、下段パネル、線 = 50 μ m。図3 4 Cは、定量分析が、Fcまたは偽トランスフェクタント腫瘍と比較したときの、Mm5MT-FGF4-N1ECDFcトランスフェクタントにおけるCD31(+)新生血管の減少を示すことを示す (Mm5MT-FGF4-N1ECDFcに対して、Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fcについて共に $P < 0.001$; データは平均値 \pm SDで示す)。異種移植はインキュベーション (inoculation) の22日後に採取し、抗CD31抗体で染色した。

【図3 5】図35A - 35D これらの図は、Notch1デコイ発現がヒトNGP異種移植における脈管形成を崩壊し、腫瘍生存度を障害することを示す。我々は以前、これらのヒト神経芽細胞種の異種移植が、成熟した階層的な脈管構造を有し、これはVEGF阻害に対して相対的に抵抗性であることを報告している (16)。Notchレセプター活性が、NGP脈管形成に寄与するの否かを決定するために、我々は、NGP細胞を、Notch1デコイ構成物でトランスフェクトしたが、これは培養におけるそれらの増殖能には影響しなかった (データには示さず)。しかしながら、インビボでの腫瘍生存度における顕著な減少があり (図3 5 A) (TUNEL=赤色蛍光、赤血球=緑色蛍光、線=100 μ m)、腫瘍細胞アポトーシスの有意な増加 (図3 5 B、 $P=0.0002$ 、NGP-LacZ腫瘍に対するNGP-N1ECDFcにおけるTUNEL-陽性細胞) と、腫瘍内出血 (図3 5 C、 $p < 0.0001$ 、実質性赤血球シグナルの定量化) を伴った。加えて、NGP-N1ECDFc異種移植における腫瘍血管ネットワークは、NGP-LacZコントロールに比べて、物理的に崩壊しているように見え、(抗CD31および SMA抗体をそれぞれ使用する) ECおよびVMCのための免疫染色がこれらの血管細胞層の連続性の欠如を示していた (図3 5 D、線 = 50 μ m)。個々の血管性細胞は、互いに剥離しているように見えた。纏めると、これらの結果は、Notch1デコイ発現が、ECおよびVMCの安定した脈管性導管 (vascular conduits) を形成する能力を崩壊し、それにより血管崩壊、出血および腫瘍組織の虚血を引き起こすことを示唆する。

【図3 6】この図は、Notch1デコイを発現するようにプログラムされたSKOV3腫瘍細胞が卵巣癌異種移植の増殖を阻害することを示す。

【図3 7】この図は、FoxoおよびNotchによる筋芽細胞分化の調節を示す。C2C12細胞を抗ミオシン抗体 (緑色) およびDAPI (青色) で免疫染色した。パネルの記載についてのテキストを参照されたい。各実験は6回または6回以上繰り返した。

【図38】図38A-38C これらの図は、C2C12分化の定量的な分析を示す。図38AはC2C12細胞におけるミオシン発現のウェスタンブロット分析を示す。図38Bはミオシン陽性細胞の形態計測分析を示す。分化実験からの結果は、全てのDAPI陽性細胞に対するパーセンテージとしてミオシン免疫染色細胞の数をスコアリングすることにより分析した。図38Cは、DBD-Foxo1ADAレポーター遺伝子アッセイを示す。我々は、Foxo1-ADAまたはDBD-Foxo1ADAを共トランスフェクトされた細胞における正準のFoxo1応答Igf1p1プロモーター（左のパネル）とHes1プロモーター（右のパネル）を使用する遺伝子アッセイを行った。ウェスタンブロット（挿入）は、2つのタンパク質の発現レベルが同様であることを示す。星印はANOVAによる $P<0.01$ を示す。

【図39】これらの図は、Foxo1がCslと共免疫沈降することを示す。a) LacZ-（符号「-」で示す）またはJagged1-発現HEK293細胞（符号「+」で示す）と共培養されたC2C12細胞における内在性Foxo1およびCslの共免疫沈降。b-c) FLAG-CslおよびHA-Foxo1で共トランスフェクトされたC2C12細胞における共免疫沈降実験。d-e) FLAG-Cslおよび切断型ミュータントMyc-またはHA-タグ付256Foxo1と共トランスフェクトされたC2C12細胞における共免疫沈降実験。

【図40】図40A-40D これらの図は、Foxo1がCslに対して直接に結合することを示す。A) HEK293細胞からの免疫沈降されたCslとのGST-Foxo1融合タンパク質のGSTプルダウンアッセイ。b-c) 無細胞系におけるGST-Foxo1およびGST-FLAG-Cslの結合、並びにCsl相互作用ドメインのマッピング。全長および切断型フラグメントのGST-Foxo1およびGST-FLAG/Cslを、細菌から精製して共インキュベートした。その後、Cslを抗FLAG抗体を使用して単離し、免疫沈降物を抗Foxo1または抗FLAG抗体でイムノブロットにより分析した。d) 筋芽細胞分化中の内在性Foxo1、CslおよびNotch1（Endog）、または続くFoxo1-ADA（Foxo1-ADA）での形質導入を検出するためのC2C12細胞におけるHes1プロモーターChIPスパンニングCsl結合部位。インプットは、免疫沈降前にクロマチンから抽出されたDNAを表す。各時点に対応するHes1（準定量的なRT-PCR）およびミオシン（ウェスタンブロット）発現が示される。0日目は、筋芽細胞融合を誘導するために、細胞を血清欠乏とした時点と定義した。略語：IP:免疫沈降；IB:イムノブロット；TCL:全細胞溶解物。

【図41】図41A - 41B これらの図は、Foxo1がNotch誘導性Hes1、Hes5およびHey1発現を制御することを示す。a) Foxo1-ADAまたはNotch1-ICで形質導入され、続いて記載された通りのGfp、Foxo1またはCsl siRNAでトランスフェクトされたC2C12における準定量的なRT-PCRにより測定されたHes1、Hes5およびHey1発現。B) Foxo1-ADA、Notch1-IC、Foxo1 siRNA、GFP siRNAまたはコントロールプラスミドで形質導入されたHEK293細胞におけるHes1レポーター遺伝子アッセイ。我々はフシフェラーゼ活性を測定し、それを β -ガラクトシダーゼ活性により正規化した。データは、コントロールベクターに対して相対的な任意のユニットで表す。

【図42】図42A - 42F これらの図は、Foxo1が、Hes1プロモーターに対するNotchの結合と、Hes1ターゲット遺伝子の活性化のために必要とされることを示す。A) Csl siRNAの不在（レーン1-2）および存在（レーン3-4）においてLacZ-（符号「-」で示す）またはJagged1-（符号「+」で示す）発現HEK293細胞と共培養されたC2C12細胞における内在性Foxo1とNotch1ChIPアッセイ。B) Foxo1 siRNAの不在（レーン1-2）と存在（レーン3-4）での共培養系での内在性Notch1のChIPアッセイ。c) Notch1またはGfp siRNAの不在および存在における共培養に続くHes1プロモーターアッセイ。d) Foxo1 siRNAの不在（レーン1-2）および存在（レーン3-4）での共培養系でのHes1に対して結合するNcorおよびSmrtおよびMam11 ChIPアッセイ。e) 準定量的なRT-PCRによるC2C12細胞におけるMyoD、Myf5および β -アクチンの発現。f) Hes1プロモーターのFoxo1およびNotch調節のモデル。

【図43】図43A - 43D これらの図は、骨格筋におけるFoxo1の条件的な消失（conditional ablation）を示す。

【0041】

A) 種々の種類の筋におけるFoxo1およびFoxo4発現レベルのウェスタンブロット。b) Myog-Foxo1マウスおよびコントロール（lox/lox）同腹仔からのヒラメ筋および足底筋の異染

性および免疫組織化学的分析。c) Myog-Foxo1(黒棒 (solid bars))とコントロールマウス (白棒 (empty bars)) の遺伝子発現分析; TropC: トロポニン-C; TropT: トロポニン-T; Mlc: ミオシン軽鎖; Myog: ミオゲニン(Myogenin); Mck: 筋型クレアチンキナーゼ。データは3つの独立した測定値の平均値 \pm SEMである(n=6、各遺伝子型について)。星印はANOVAによる $P<0.05$ を示す。d) 8週齢Myog-Foxo1マウスおよびlox/lox同腹仔におけるトレッドミルパフォーマンス試験(Treadmill performance test)(n=6、各遺伝子型について)。星印はANOVAによる $P<0.05$ を示す。

【図44】この図は、C2C12細胞におけるアデノウイルス形質導入の効果を示す。我々は、細胞にHA-Foxo1-ADAまたはHA-Notch1-ICアデノウイルスを形質導入し、抗HA抗体(赤色)およびDAPI(青色)で免疫組織化学法を行った。

【図45】この図は、トランスフェクトされたFoxo1発現の阻害を示す。我々は、アデノウイルスの形質導入に続き、内在性(左のパネル)およびトランスフェクトされた(右のパネル)Foxo1の発現を阻害するFoxo1 siRNAの能力を試験した。

【図46】この図は、Foxo1 siRNAの特異性を示す。Foxo1 siRNAでトランスフェクトされたC2C12細胞におけるFoxo1、Foxo3およびFoxo4発現のウェスタンブロット分析。

【図47】この図は、Foxo1-ADAおよびNotch1-ICが細胞増殖に影響しないことを示す。我々はC2C12細胞にLacZ、Foxo1-ADAまたはNotch1-ICアデノウイルスを形質導入し、抗Ki67抗体およびDAPIで、免疫組織化学法を行い、少なくとも1000細胞をカウントすることにより、Ki67陽性細胞に対するパーセンテージとして、Ki67標識インデックスを定量化した。

【図48】この図は、siRNA抵抗性Foxo1-ADAを示す。Foxo1 siRNAでトランスフェクトされた細胞におけるFoxo1-ADAとsiRNA抵抗性Foxo1-ADAのウェスタンブロット。

【図49】この図は、Foxo1-Csl共免疫沈降の特異性を示す。Foxo3またはFoxo4発現ベクターの共トランスフェクションに続いて、我々はCslとの共免疫沈降実験を行った。

【図50】この図は、Hes1プロモーターアッセイを示す。我々は、4タンデム型反復のCsl結合部位を含む合成Hes1レポーター遺伝子をC2C12細胞中のFoxo1およびNotch1-ICでのプロモーターアッセイにおいて使用した。

【図51】この図は、siRNAによるCsl発現の阻害を示す。我々は、異なる濃度のCsl siRNAでのC2C12細胞のトランスフェクションに続くウェスタンブロットによりCslレベルを測定した。

【図52】この図は、図式化されたヒトNotch1デコイの11の構築物を示す。

【図53】この図は、Notch1シグナルペプチド末端を決定するためのNotch1のシグナル配列分析を示す。デンマーク工業大学(the Technical University of Denmark)によりオンラインで提供されるSignal 3.0 Server(the Signal 3.0 Server)を使用する分析の予測結果を示す。結果は、アラニン18(A19)とA19の間に位置する切断のメジャー部位とA19とアルギニン20(R20)との間のマイナー部位を予測する。これらの2つの切断部位はヒトNotch1のアミノ酸配列1-20において「/」により示した: MPPLLAPLLCLALLPALA/A/R(配列番号15)。ヒトNotch1のアミノ酸1-23をコードするヌクレオチド配列はatgccgccgc tctgtggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga ggcccgcgga(配列番号16)である。

【図54】この図は、ヒトHcシグナルペプチド末端を決定するためのヒトHcのシグナル配列分析を示す。MWGWKCLLFWAVLVATLCTA/R(配列番号17)。デンマーク工業大学によるオンライン提供されるSignalIP 3.0 Serverを使用する分析の予測結果を上を示す。これらの結果は、アラニン21(A21)とアルギニン22(R22)の間に位置する切断のメジャー部位を予測する。この切断部位は、上で提供されたヒトHc(配列番号17)のアミノ酸配列1-22において「/」により示す。ヒトHcのアミノ酸1-22をコードするヌクレオチド配列はatgtggggct ggaagtgcct cctcttctgg gctgtgctgg tcacagccac tctctgcact gccagg(配列番号18)である。

【図55】この図は、ヒトNotch1のEGF反復36の後で終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図56】この図は、ヒトNotch1のEGF反復13の後で終止する全ての構成物についてのヒ

10

20

30

40

50

トNotch1/Fc融合配列を示す。

【図57】この図は、ヒトNotch1のEGF反復23の後で終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図58】この図は、ヒトNotch1のEGF反復24の後を終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図59A】図59Aおよび59B この図は、ヒトNotch1の完全長アミノ酸(aa)配列を示し、aa残基1(M=メチオニン)からaa残基2555(K=リジン)からなる(配列番号52)。シグナルペプチドおよび最初の36EGF様反復ドメインがこの配列のaa1-1433に存在する。アミノ酸1-1433、またはこれらのaaの部分集合は、次のセクションにおいて記載されるヒトNotch1デコイタンパク質の設計のために利用される。EGF反復1-36を含むアミノ酸に下線を付す。

10

【図59B】記載なし。

【図60】この図は、Notch1デコイタンパク質におけるFcタグを産生するために利用できるヒトFcアミノ酸配列を示す(配列番号53)。ヒトFcの237アミノ酸は、Notch1のEGF様反復のまさに下流の、全てのNotch1デコイ構成物のC末端で融合される。ヒトFcのこの領域が検出およびNotchデコイの精製を可能にし、分泌されるヒトNotch1-ヒトFc融合タンパク質の安定化に役立つ。

【図61】この図は、h-Notch⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号54)を示す。h-Notch⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1433からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸1434-1670。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1670アミノ酸を含む。

20

【図62】この図は、h-Notch⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号55)を示す。h-Notch⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-531からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸532-768。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。

30

【図63】この図は、h-Notch⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号56)を示す。h-Notch⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復1-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-948からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸949-1185。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。

【図64】この図は、h-Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号57)を示す。h-Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-594からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸595-831。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。

40

【図65】この図は、h-sp^{HC}Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号58)を示す。h-sp^{HC}Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-593からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸594-830。予測されるシグナルペプチド配列に

50

下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。

【図66】この図は、h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号59）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1118からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸1119-1355。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1355アミノ酸を含む。

10

【図67】この図は、h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号60）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-1117からなる配列；これに続く（3）ヒトHCタグを含むアミノ酸1118-1354。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1354アミノ酸を含む。

【図68】この図は、h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号61）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-478からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸479-715。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は715アミノ酸を含む。

20

【図69】この図は、h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号62）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-477からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸478-714。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は714アミノ酸を含む。

30

【図70】この図は、h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号63）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-508からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸509-745。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は745アミノ酸を含む。

40

【図71】この図は、h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号64）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-507からなる配列；これに続く（3）ヒトHCタグを含むアミノ酸508-744。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は744アミノ酸を含む。

50

【図 7 2 A】この図は、図 6 1 において示される h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 6 5)。

【図 7 2 B】記載なし。

【図 7 3】この図は、図 6 2 において示される h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 6 6)。

【図 7 4 A】この図は、図 6 3 において示される h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 6 7)。

【図 7 4 B】記載なし。

【図 7 5】この図は、図 6 4 において示される h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 6 8)。

10

【図 7 6】この図は、図 6 5 において示される h-sp^{H^c}Notch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 6 9)。

【図 7 7 A】この図は、図 6 6 において示される h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 0)。

【図 7 7 B】記載なし。

【図 7 8 A】この図は、図 6 7 において示される h-sp^{H^c}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 1)。

【図 7 8 B】記載なし。

【図 7 9】この図は、図 6 8 において示される h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 2)。

20

【図 8 0】この図は、図 6 9 において示される h-sp^{H^c}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 3)。

【図 8 1】この図は、図 7 0 において示される h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 4)。

【図 8 2】この図は、図 7 1 において示される h-sp^{H^c}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す (配列番号 7 5)。

【図 8 3】この図は、ヒト Notch4 の全長アミノ酸 (aa) 配列を示し、aa 1 (M = メシオニン) から aa 2003 (K = リシン) からなる (配列番号 7 6)。シグナルペプチドおよび第 1 の 29 EGF-様反復ドメインはこの配列の aa 1-1174 に存在する。アミノ酸 1-1174 またはこれら aa の部分集合はヒト Notch4 デコイタンパク質の設計に利用され、次のセクションで説明される。EGF-反復を取り囲むアミノ酸は下線を付す。

30

【図 8 4】この図は、Notch4 デコイタンパク質における Fc タグを産生するために利用できる ヒト Fc 配列を示す (配列番号 7 7)。ここで示される ヒト Fc の 237 アミノ酸は Notch4 の EGF 様反復のまさに下流の、全ての Notch4 デコイ構成物の C 末端で融合される。ヒト Fc のこの領域が検出および Notch デコイの精製を可能にし、分泌される ヒト Notch4-ヒト Fc 融合タンパク質の安定化に役立つ。

【図 8 5】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 7 8) を示す。h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる: (1) ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列; これに続く (2) ヒト Notch4 の EGF-様反復 1-29 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-1173 からなる配列; これに続く (3) ヒト HC タグを含むアミノ酸 1174-1410。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 1410 アミノ酸を含む。

40

【図 8 6】この図は、h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 7 9) を示す。h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる: (1) ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列; これに続く (2) ヒト Notch4 の EGF-様反復 1-13 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-554 からなる配列; これに続く (3) ヒト Fc タグを含むアミノ酸 555-791。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 791 アミノ酸を含む。

50

【図 8 7】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 0）を示す。h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復1-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-933からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸934-1170。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1170アミノ酸を含む。

【図 8 8】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 1）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-602からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸603-839。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は839アミノ酸を含む。

【図 8 9】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 2）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-597からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸598-834。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は834アミノ酸を含む。

【図 9 0】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 3）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-843からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸844-1080。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1080アミノ酸を含む。

【図 9 1】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 4）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-838からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸839-1075。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1075アミノ酸を含む。

【図 9 2】この図は、h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 5）を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-444からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸445-681。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は681アミノ酸を含む。

【図 9 3】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 6）を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-439からなる配列；こ

10

20

30

40

50

れに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸440-676。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は676アミノ酸を含む。

【図94】この図は、h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号87)を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる:(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列;これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-392からなる配列;これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸393-629。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は629アミノ酸を含む。

10

【図95】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号86)を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる:(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列;これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-387からなる配列;これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸388-624。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は624アミノ酸を含む。

20

【図96A】この図は、ヒトNotch4の核酸配列(配列番号89)を示す。

【図96B】記載なし。

【図97】この図は、ヒトNotch4シグナルペプチド配列(配列番号90)を示す。下線を付した配列がシグナルペプチドをコードする。

【図98】この図は、ヒトHCシグナルペプチド(nt 1-66)の核酸配列(配列番号91)を示す。

【図99】この図は、ヒトFcタグの核酸配列(配列番号92)を示す。

【図100A】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号93)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-29)[nt 1-3522]。

【図100B】記載なし。

【図101】この図は、h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号94)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-13)[nt 1-1662]。

30

【図102A】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号95)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-23)[nt 1-2799]。

【図102B】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号95)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-23)[nt 1-2799]。

【図103】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号96)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-29)[nt 1-81, 1075-3522]。

【図104】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号97)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-29)[nt 1075-3522]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

40

【図105】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号98)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-23)[nt 1-81, 1075-2799]。

【図106】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号99)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-23)[nt 1075-2799]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図107】この図は、h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号100)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復13-23)[nt 1-81, 1549-2799]。

【図108】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号101)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復13-23)[nt 1549-2799]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

50

【図 1 0 9】この図は、h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列（配列番号 1 0 2）を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復21-29) [nt 1-81, 2428-3522]。

【図 1 1 0】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列（配列番号 1 0 3）を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復21-29) [nt 2428-3522]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図 1 1 1】図は、ヒトNotch4デコイの 1 1 形成物の組織的配列を示す。

【図 1 1 2】図は、Notch4シグナルペプチドが末端であることを決定するためのNotch 4のシグナル配列分析を示す。

【図 1 1 3】図は、ヒトNotch4のEGF反復 2 9 後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。

【図 1 1 4】図は、ヒトNotch4のEGF反復 1 3 後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。

【図 1 1 5】図は、ヒトNotch4のEGF反復 2 3 後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。

【図 1 1 6】図は、循環グルコースおよびインスリンレベルを下げるNotch4不足を示す。我々は、Notch4 (N4)突然変異マウスの血液グルコースおよびインスリンレベルを最近分析している。離乳 (P21) で、N4+/-交尾から発生される複数の同腹子は通常餌または脂肪の 4 5 %カロリーからなる高脂肪食のいずれかが供される。5 ヶ月の歳のときに、血液を引き出し、かつグルコースおよびインシュリンレベルが無作為に肥育されたマウスまたは 6 時間の空腹後のマウスから測定される。雌において、N4アレルの低下は食に依存する循環グルコースレベルの十分な減少に関連する。これに対し、N4不足は通常食で肥育された雄のみにグルコースレベルの減少と付随した。すべての雌のインシュリンレベルは影響さらなかった（データなし）。これは、雌マウスがインシュリン耐性に対して遺伝的に保護され、かつ従って代謝性異常が精巧に穏やかであることによるかもしれない。通常食において、雌マウスのインシュリンレベルに相違がなかった。しかしながら、N4のアバレーション (ablation) は高脂肪食で飼育される雄マウスのインシュリンレベルに無作為に与える十分な減少に関連する。同様な傾向は、6 時間絶食したN4ノックアウト雌に観察される。したがって、N4損失は通常食で飼育される両方の雄および雌の血液グルコースレベルの十分な減少に関連する。雌において、グルコースレベル、しかしインシュリンレベルではなく、のこの減少は高脂肪食で飼育されるN4マウス雌に観察された。これに対し、グルコースレベルはN4ノックアウト雄で変化せず、一方インシュリンレベルが減少した。これらの結果は、混乱したインシュリンシグナルによる高血糖の遺伝的かつ環境形態に対して保護するNotch4不足と矛盾しない。

【図 1 1 7】図は、高脂肪食を供したマウスの重量利得を抑えたNotch4発現損失を示す。

【図 1 1 8】図は、マウス血清に存在するラットNotch1デコイを示す。哺乳類血流中のラットNotch1デコイ系生物の安定性を試験した。ウエスタンブロット分析は全長たんぱく質がマウスで発現でき、かつ変質の僅かな形跡で検出可能なレベルにて存在されることを証明する。

【図 1 1 9】図は、ヒトNotch 1 デコイ (n-Notch(1-36)デコイ)およびラットNotch1デコイブロックマウス乳房腫瘍増殖を示す。ここで表される増殖曲線はラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイのいずれかがヌードマウスの腫瘍 異種移植の増殖を低減することを証明する。

【図 1 2 0】図は、肺組織へのSKNEP1転移を抑制するラットNotch1デコイを示す。SKNEP1ユーイング肉腫細胞は、制御Fcタンパク質またはラットNotch1デコイス1 (sort 2)またはラットNotch1デコイス4 (sort 4)を発現するためにプログラムされた。これらのSKNEP1細胞ラインはヌードマウスの肝臓に同所性で移植される。腫瘍増殖の 6 週間後に、肺への転移は組織学的に評価した。僅かな肺に示されるラットNotch1デコイに発現するSKNEP1細胞は転移に対して陽性である。我々は、ヌードマウスのラットNotch1デコイの発現が肺に転移するためにSKNEP1細胞の容量を減少すると結論付ける。

【図 1 2 1】図は、マウス皮膚のリンパでVEGFR-3およびLYVE-1を共発現するNotch1およ

10

20

30

40

50

びNotch4を示す。Notch1およびNotch4のこれらの発現は、マウスP4背部皮膚の脈管構造で分析した。この時点で、経皮リンパ管は表面近くのリンパキャピラリーに活発に再造形し、かつ低経皮層の管に集まる。皮膚の5 μ m断面はNotch1またはNotch4（赤）およびPECAM, VEGFR-3またはLYVE-1（緑）に対する抗体で共染色された。Notch1およびNotch4は、血液およびリンパ管内皮細胞マーカー、PECAM（上部パネル）での重複するパターンの発現を共有する。Notch1およびNotch4は、両方のVEGFR-3（中間パネル）および経皮脈管構造のLYVE-1（下部パネル）で共発現された。この発現パターンはNotch1およびNotch4が発現され、かつ新生児新皮のリンパ管で機能するかもしれないことを証明する。

【図122】図は、Notch4同型接合性ノックアウトマウスで変化する経皮リンパキャピラリーを示す。我々は、P4マウスの経皮リンパを試験した。野生型セクションおよびNotch4ヌル接合体はPECAMおよびLYVE-1（緑）に対する抗体で免疫染色される。PECAM染色の分析は変異体と野生型皮膚（上部パネル）の間に同様に見られた。これに対し、Notch4変異体の新皮のLYVE-1-陽性管はしばしば拡張され、かつLYVE-1染色は不連続であった（下部パネル）。これらの結果は、Notch4シグナルがリンパ血管網状組織の再造形に関与してもよいことを提案する。

【図123】この図は、マウス経皮リンパの減少LYVE1発現に関連するNotch4の損失を示す。Notch4異型接合性（N4+/-）マウスは交尾され、結果として得られた子の背部皮膚は取り除かれ、かつ出生後14日に包埋される。皮膚の断面は、内皮細胞マーカー、PECAM（データなし）、またはリンパ内皮細胞マーカー、LYVE1（A）に免疫染色される。それぞれに対して5つの領域は顕微鏡によって捕捉され、かつPECAMおよびLYVE1染色は画像ソフトウェア（B, C）を用いて定量される。PECAM発現は野生型（WT）新皮（B）に比べてN4-/-新皮で約25%に減少する。LYVE-1染色は、WTマウス（C）に比べてN4-/-で約50%減少されるLYVE1染色でPECAMより影響を受けた。WT（A）に比べてN4-/-リンパでLYVE1染色の強度での減少であった。

【図124】図は、ヒト乳がんリンパ管を発現されるNotch1およびNotch4を示す。我々は、ヒト乳がんのVEGFR-3またはLYVE-1（緑）およびNotch1またはNotch4（赤）に対する抗体で二重免疫組織化学をなした。Notch1およびNotch4は腫瘍外血液およびヒト微小乳頭乳がんのリンパ内皮で表される。測定するために、もしNotch1情報伝達が腫瘍リンパ内皮内で活性化されるならば、我々はポドプレニン（podoplanin）（緑）およびN1Val（赤；細胞シグナル）に対する抗体で二重染色し、抗体は活性化Notch1ペプチドを特別に検出する。活性化Notch1ペプチドの発現は、殆ど（白矢印）観測されるが、リンパ内皮核（下部パネル）の全て（黄色矢印）ではない。これらの結果は、Notch1が病理学的なリンパ管で活発に情報伝達する。

【発明の詳細な説明】

【0042】

〔用語〕

本出願において使用されるとき、ここに明確な他の記載がある場合を除き、次の各用語は以下に示す意味を有する。

【0043】

「投与すること」は当業者に公知の何れかの方法を使用して達成または実行されればよい。当該方法は、例えば、病巣内、筋肉内、皮下、静脈内、腹腔内、リボソーム媒介、経粘膜、経腸、局所的、経鼻、経口、経肛門、経眼、経耳の送達手段を含む。

【0044】

「付着された」は、何れかの手段により接続されることを意味するべきである。1つの態様において、付着されたことは、共有結合により接続されたことを意味する。もう1つの態様において、付着されたことは、非共有結合性に接着されたことを意味する。

【0045】

「アミノ酸」、「アミノ酸残基」および「残基」は、ここでは交換可能にタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに組み込まれたアミノ酸を指す。アミノ酸は、例えば、天然に発生しているアミノ酸または天然に発生しているアミノ酸と同様の様式で作動できる天

10

20

30

40

50

然のアミノ酸の類似体であってよい。

【0046】

「抗体」は、これに制限するものではないが、(a) 2つの重鎖と2つの軽鎖を含み、抗原を認識するイムノグロブリン分子；(b) ポリクローナルまたはモノクローナルイムノグロブリン分子；および(c) その一価または2価のフラグメント；を含むであろう。イムノグロブリン分子は何れかの一般的に知られる種類に由来してよく、これらに限定するものではないが、IgA、分泌性のIgA、IgG、IgEおよびIgMを含む。IgGのサブクラスは当業者に周知であり、これらに限定するものではないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む。抗体は、天然に発生しているものと非天然に発生しているものの両方であってよい。更に、抗体は、キメラ抗体、完全な合成抗体、単一鎖抗体およびそのフラグメントを含む。抗体は、ヒトまたは非ヒトであってよい。非ヒト抗体は、組み換え法によりヒト化されて、ヒトにおけるそれらの免疫原性を減少してもよい。抗体フラグメントは、これらに限定するものではないが、FabおよびFcフラグメントを含む。1つの態様において、「抗体のFc部分」は、ジスルフィド結合により連結された2つの重鎖のC末端の半分からなるイムノグロブリンのパパイン消化により得られる結晶性フラグメントであり、イムノグロブリンの「エフェクター領域」として知られている。もう1つの態様において、「抗体のFc部分」は重鎖の1つのC末端の半分の全て、実質的に全てを意味する。

10

【0047】

抗体に関しての「ヒト化」は、CDR領域の外側の幾つか、殆どまたは全てのアミノ酸がヒトイムノグロブリン分子に由来する対応するアミノ酸で置換された抗体を意味する。アミノ酸の少量の付加、欠失、挿入、置換または修飾は、それらが問題とする抗原への抗体の結合能を抑制しない限りにおいて差支えない。適切なヒトイムノグロブリン分子は、これらに限定されるものではないが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgM分子を含む。種々の刊行物が、抗体のヒト化をどのように作成するのかを記載しており、例えば、米国特許第4,816,567号、5,225,539、5,585,089および5,693,761、並びにPCT国際公開番号WO 90/07861に記載される。

20

【0048】

ここにおいて使用されるとき、薬学的組成物における場合の用語「組成物」は、(単数または複数の) 活性成分および担体を形成する(単数または複数の) 不活性成分を含む生産物、並びに当該成分の何れかの2若しくは2以上の組み合わせ、複合若しくは集合により、または当該成分の1若しくは1以上の分離により、または当該成分の1若しくは1以上の他の種類の反応若しくは相互作用により、直接的または間接的に結果として生じる何れかの生産物を包含することを意図する。

30

【0049】

ここにおいて使用されるとき「有効な量」は、腫瘍、疾患または障害を有する対象を治療することが可能な量をいう。従って、有効な量は、治療しようとする患者および治療されるべき状態によって変わるだろう。当業者は、そのような十分な量を決定するために慣例的な滴定実験を行うことが可能である。化合物の有効な量は、対象および使用される特定の投与経路に依存して変化するだろう。化合物に基づいて、当該量が、連続したポンプなどによって連続して、または断続的な間隔で(例えば、1または1以上の独立した時に) 送達される。所望の時間間隔での特定の化合物の複数の量が、当業者による過度の実験もなく決定される。1つの態様において、有効な量は約1 μ g/kg ~ 10 mg/kgである。もう1つの態様において、有効な量は、10 μ g/kg ~ 1 mg/kgである。更なる態様において、有効な量は100 μ g/kgである。

40

【0050】

Notchレセプタータンパク質に関連して使用されるとき、「細胞外ドメイン」は、全てのまたは一部分のNotchであり、これは(i) 細胞外に存在する(即ち、膜貫通部分または細胞内部分のどちらとしても存在しない)、および(ii) インタクトのNotchレセプタータンパク質が結合する細胞外リガンドに対して結合していることを意味する。Notchの細胞外ドメインは任意にシグナルペプチドを含んでよい。「細胞外ドメイン」、「ECD」

50

および「外部ドメイン」は同義である。

【0051】

「半減期を増大する成分 (Half-life-increasing moiety)」は、第2の成分に対して稼働可能に付着されたとき、当該第2の成分のインビボの半減期を増大する成分を意味する。半減期を増大する成分は、例えば、抗体のFc部分、グリコシル化タグ (即ち、グリコシル化されたポリペプチド)、ポリエチレングリコール (PEG)、それに対して付着されたPEGを有するポリペプチドおよび脂質修飾化ポリペプチドなどを含む。

【0052】

疾患または望ましくない生物学的な過程の開始を「阻害する」は、疾患または過程の開始の可能性を減少すること、または完全に疾患または過程の開始を抑制することのどちら

10

も意味するべきである。好ましい態様において、疾患または過程の開始を阻害することは、完全にその開始を抑制することを意味する。

【0053】

「Notch」、「Notchタンパク質」および「Notchレセプタータンパク質」は同義である。加えて、用語「Notchに基づく融合タンパク質」および「Notchデコイ」は同義である。以下のNotchアミノ酸配列が公知であり、引用することによりここに組み込まれる; Notch1 (Genbank accession no. S18188 (ラット)); Notch2 (Genbank accession no. NP 077334 (ラット)); Notch3 (Genbank accession no. Q61982 (マウス)); およびNotch4 (Genbank accession no. T09059 (マウス))。以下のNotch核酸配列が公知であり、引用することによりここに組み込まれる; Notch1 (Genbank accession no. XM 342392 (ラット)およびNM 017617 (ヒト)); Notch2 (Genbank accession no. NM 024358 (ラット), M99437 (human and AF308601 (ヒト)); Notch3 (Genbank accession no. NM 008716 (マウス)およびXM 009303 (ヒト)); およびNotch4 (Genbank accession no. NM 010929 (マウス)およびNM 004557 (ヒト))。

20

【0054】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「核酸配列」は、ここにおいて交換可能に使用され、各々デオキシリボヌクレオチドおよび/またはリボヌクレオチドをいう。デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、天然に発生している、またはその合成的な類似体であってよい。「核酸」は何れかの核酸を意味し、これらに限定するものではないが、DNA、RNAおよびそのハイブリッドを含む。核酸分子を形成する核酸塩基は、塩基A、C、G、TおよびU、並びにその誘導体であってよい。これらの塩基の誘導体は当該技術分野において周知であり、PCR系、試薬および消耗品において例示される (PCR Systems, Reagents and Consumables, Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA)。核酸は、これらに限定するものではないが、アンチセンス分子および触媒的な核酸分子、例えば、リボザイムおよびDNAzymeなどを含む。核酸はまた、ペプチド類似体、フラグメントまたは誘導体をコードする核酸を含み、それらは1または1以上のアミノ酸残基の同一性の観点から天然に発生している形態とは異なり (特定された残基の全体よりも少ない残基を含む欠失類似体; 1または1以上の残基が1または1以上の残基により置換されている置換類似体; および1または1以上の残基が当該ペプチドの末端または内側の部分に対して加えられている付加類似体)、当該天然に発生している形態の性質の一部分または全部を共有するものである。

30

40

【0055】

第2の成分に対して付着している第1の成分に関しての「稼働可能に付着している」は、それがそのように付着されていない場合に、第1の成分を (例えば、結合特性などの) 機能可能にする様式において付着されることをいう。

【0056】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」はここにおいて交換可能に使用され、各々アミノ残基のポリマーを意味する。アミノ酸残基は、天然に発生しているものであっても、その化学的類似体であってよい。ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質はまた、グリコシル化、脂質付着、硫酸化、ヒドロキシル化およびADPリボース化

50

などの修飾を含んでもよい。

【0057】

ここで使用されるとき、「薬学的に許容される担体」は、担体が製剤の他の成分と適合性であり、且つその受給者に対して有害ではないことを意味し、標準的な薬学的に許容される何れの担体をも包含する。そのような担体は、例えば、0.01~0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸バッファーまたは0.8%の生理食塩水を含む。或いは、そのような薬学的に許容される担体は、水性または非水性溶液、懸濁液および乳濁液を含む。非水溶性溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油および注射用有機性エステル、例えば、オレイン酸エチルなどである。水性担体は、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液および懸濁液を含み、これらは塩水および緩衝化媒体を含む。非経口ベヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲルおよび固定油を含む。静脈内用ベヒクルは、流体および栄養分補充液、電解質補充液、例えば、リンゲルデキストロースなどに基づく液などを含む。保存剤および他の添加物、例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどが存在してもよい。

10

【0058】

「対象」は何れかの有機体を意味し、これらに限定するものではないが、哺乳類、例えば、マウス、ラット、イヌ、モルモット、フェレット、ウサギおよび霊長類などを含む。好ましい態様において、対象はヒトである。

【0059】

「治療すること」は、疾患または障害の進行を遅くする、止めるまたは後退することの何れかを意味する。ここにおいて使用されるとき、「治療する」はまた、疾患または障害に関連する症状の寛解をも意味する。疾患は、これらに限定するものではないが、腫瘍脈管形性、アテローム性動脈硬化、創傷治癒、黄斑性変性、未熟児網膜症、子癇前症、子癇前症、糖尿病性網膜症、虚血、脳卒中、循環器病、乾癬、リンパ浮腫、腫瘍形成および腫瘍リンパ管形成を含む。

20

【0060】

脈管形性は、創傷治癒過程、雌性月経周期および子宮内膜リモデリングの間、並びに胚芽発生および臓器発達の間に遭遇される。病理学的な設定において、脈管形性は、関節リウマチ、黄斑性変性、糖尿病性網膜症および腫瘍増殖などの異なる疾患において重要な役割を演じている。

30

【0061】

臨床的な知見を含むインビボにおいては相当なエビデンスが証拠が存在し、異常な脈管形成が多く疾患状態に関連し、それらは関節リウマチ、炎症、癌、乾癬、退行性の眼科的状态などを含む。

【0062】

Notch融合タンパク質を使用するための他の疾患は、代謝性疾患、これらに限定するものではないが、例えば、糖尿病、肥満、前糖尿病状態、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、循環器病、インスリンの発現の調節およびインスリン機能の調節である。

【0063】

Notch融合タンパク質の使用はまた、ヒトに対して循環器病および糖尿病の危険性を増加する医学上の障害の組み合わせを指す代謝性症候群に適応する。そのような症候群を指す他に知られた名称は、症候群X、インスリン抵抗性症候群、リーベン症候群(Reaven's syndrome)である。当該症候群の幾つの特徴は以下を含む：空腹時高血糖、高血圧、中心性肥満(内臓肥満としても知られる)、高密度リポタンパク質(LDL)の減少、トリグリセリドの上昇、尿酸値の上昇。上記で列記された空腹時高血糖は、二型糖尿病または障害性空腹時グルコースおよび障害性グルコース耐性またはインスリン抵抗性を含む。代謝性症候群に加えて、Notchデコイは前糖尿病状態のための効能を有する。

40

【0064】

ユニット、プレフィックスおよびシンボルは、それらのSI公認の形態において表示さ

50

れてよい。他の記載がない限り、核酸配列は、左から右に5'から3'の配向で記載され、アミノ酸配列は左から右に、アミノ末端からカルボキシ末端の配向で記載される。アミノ酸は、それらの一般的に知られる3文字記号か、1文字記号の何れかによりここにおいて示されてよく、これらはIUPAC-IUB生化学命名法委員会により推奨される。ヌクレオチドは同様に、それらの一般的に受容される単一文字コードにより示されてよい。

【0065】

以下の略語がここにおいて使用される：ECD：細胞外ドメイン；IC：細胞内ドメイン；NECD/Fc：Notch-に基づく融合タンパク質；N1：Notch1；N2：Notch2；N3：Notch3；N4：Notch4；DII：Delta-様；EC：内皮細胞；FGF：繊維芽細胞成長因子；FGFR：繊維芽細胞成長因子レセプター；HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞；m.o.i.：感染の多重度；VMC：血管壁細胞；VEGF：血管内皮細胞成長因子；VEGFR：血管内皮細胞成長因子レセプター；sp：シグナルペプチド；PDGF：血小板由来成長因子；PDGFR：血小板由来成長因子レセプター；P1GF：胎盤性成長因子。

【0066】

[発明の態様]

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメイン、およびそれに対して結合する抗体のFc部分を含む融合タンパク質を提供する。

【0067】

当該融合タンパク質の第1の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-36を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-13を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-24を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復9-23を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復9-36を含む。もう1つの態様においてNotch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復13-24を含む。更なる態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復25-36を含む。

【0068】

融合タンパク質の第2の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。

【0069】

融合タンパク質の第3の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。

【0070】

融合タンパク質の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-29を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復1-13を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復1-23を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復9-23を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復9-29を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復13-23を含む。更なる態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復21-29を含む。

【0071】

融合タンパク質の1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。

【0072】

融合タンパク質の1つの態様において、シグナルペプチドはthe signal peptide of Notch1、Notch2、Notch3、Notch4のシグナルペプチドまたは抗体のHc(HC；重鎖)部分である

10

20

30

40

50

配列番号 84 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 85 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 86 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 87 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 88 で示される。

【0076】

1 つの態様において、融合タンパク質連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 89 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 90 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 91 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 92 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 93 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 94 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 95 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 96 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 97 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 98 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 99 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 100 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 101 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 102 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 103 で示される。

【0077】

本発明は、上記の融合タンパク質の対象を治療するために有効な量を前記対象に対して投与し、それにより腫瘍を有する前記対象を治療することを含む、腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。

【0078】

本発明は、対象において脈管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより当該対象における脈管形成を阻害することを含む、対象において脈管形成を阻害する方法を提供する。

【0079】

本発明は、当該患者の治療ために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む、卵巣癌を有する対象を治療する方法を提供する。

本発明は、当該対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより代謝性疾患を有する当該対象を治療することを含む、代謝性疾患を有する対象を治療する方法を提供する。1 つの態様において、代謝性疾患は糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中または循環器病である。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

本発明は、腫瘍を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 1 】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 2 】

本発明は、卵巣癌を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 3 】

本発明は、代謝性疾患を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。1つの態様において、代謝性疾患は糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中または循環器病である。

【 0 0 8 4 】

本発明は、対象において生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む、当該対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するための方法を提供する。

【 0 0 8 5 】

本発明は、対象において腫瘍転移を阻害するために有効な量の上記融合物を当該対象に投与することを含む、当該対象における腫瘍転移を阻害する方法を提供する。態様において、当該転移は、血管、リンパ性脈管構造またはリンパ節を介して生じる。腫瘍転移とは、1つの臓器から他の非隣接的な臓器に癌が広がることである。

【 0 0 8 6 】

本発明は、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む、当該対象において二次的腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。阻害はまた、二次的または転移性腫瘍に関連する腫瘍脈管形成についてのものでもあってよい。1つの態様において、当該二次的腫瘍増殖は、二次的腫瘍に関連する脈管形成の阻害により阻害される。

【 0 0 8 7 】

本発明は、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む当該対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法を提供する。血管取り込みの過程は、腫瘍細胞は既存の血管と、吸収される血管の補助による増殖とに関連する過程である。吸収された血管における腫瘍のこの増殖は、腫瘍脈管形成の不在において存在しても、腫瘍脈管形成に先行して存在しても、または腫瘍脈管形成との組み合わせで存在してもよい。

【 0 0 8 8 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質と血管内皮成長因子(VEGF)の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、VEGFの阻害剤は、VEGF-Aの阻害剤、P1GFの阻害剤、VEGF-Bの阻害剤、VEGF-Cの阻害剤、VEGF-Dの阻害剤である。VEGF阻害剤の例は、これらに制限するものではないが、ベパシズマブ(bevacizumab)、PTK787、Bay43-9006、S U11248、AG013676、ZD6474、VEGF-trapおよび抗VEGFR2を含む。そのような阻害剤の例は更に以下に十分に記載される ; Ferrara et al., (2004) Nature Reviews Drug Discovery, Vol.3:391-400 and Ellis et al. (2008) Nature Reviews Cancer Vol8:579-591 ; これらのそれぞれの内容は引用によりここに組み込まれる。

【 0 0 8 9 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とVEGFR-1、VEGFR-2またはVEGFR-3の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、当該阻害剤は1以上のVEGFRを標的

10

20

30

40

50

とする。

【 0 0 9 0 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質と血小板由来増殖因子(PDGF)の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、血小板由来増殖因子の阻害剤は、PDGF-Aの阻害剤またはPDGF-Bの阻害剤である。

【 0 0 9 1 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とPDGFレセプターアンタゴニストとを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、PDGFレセプターアンタゴニストは、PDGFレセプターBアンタゴニストである。

10

【 0 0 9 2 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とHER2/neuの阻害剤を対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。

【 0 0 9 3 】

本発明は、血管性増殖性網膜症を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む血管増殖性網膜症を治療する方法を提供する

101. 前記血管性の増殖性網膜症が、糖尿病性網膜症、黄斑変性 (macular defernati on) または未熟児網膜症である請求項 1 0 0 の方法。

20

【 0 0 9 4 】

本発明はまた、半減期を増大する成分 (half-life-increasing moiety) に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物の有効量を当該対象に投与し、それにより当該対象を治療することを含む、腫瘍を有する対象を治療するための第 1 の方法も提供する。

【 0 0 9 5 】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物の有効量を当該対象に投与し、それにより当該対象における脈管形成を阻害することを含む、対象において脈管形成を阻害する第 2 の方法も提供する。

30

【 0 0 9 6 】

上記方法の第 1 の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質はヒトNotch1レセプタータンパク質である。もう 1 つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう 1 つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

【 0 0 9 7 】

上記の方法の第 2 の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch2レセプタータンパク質はヒトNotch2レセプタータンパク質である。もう 1 つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう 1 つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

40

【 0 0 9 8 】

上記方法の第 3 の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch3レセプタータンパク質はヒトNotch3レセプタータンパク質である。もう 1 つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう 1 つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にあ

50

る。

【0099】

上記方法の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質はヒトNotch4レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

【0100】

上記方法の第5の態様において、対象は哺乳類である。1つの態様において、哺乳類はヒトである。

【0101】

上記方法の第6の態様において、脈管形性は腫瘍脈管形性である。

【0102】

当該第2の方法の更なる態様において、対象は腫瘍を有する。もう1つの態様において、対象は病態的な血管過形成に罹患している。1つの態様において、病態的な血管過形成は、良性のヘマジオーマ (benign hemangioma) である。更なる態様において、対象はリンパ管増殖性疾患に罹患する。

【0103】

本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の第1の組成物を提供する。1つの態様において、細胞外ドメインは、半減期を増大する成分に対して共有結合されている。もう1つの態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

【0104】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインと薬学的に許容された担体とを含む物質の第2の組成物も提供する。

【0105】

本発明は更に、(i) 半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物をその中に有するバッキング物質、および(ii) 当該組成物が、腫瘍または当該対象における脈管形成を阻害することにより治療可能な他の疾患を有する対象の治療において使用することに向けられることを指示する表示を含む製品を提供する。

【0106】

上記の製品の第1の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質は、ヒトNotch1レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0107】

上記製品の第2の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch2レセプタータンパク質はヒトNotch2レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0108】

上記製品の第3の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch3レセプタータンパク質はヒトNotch3レセプタ

10

20

30

40

50

ータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0109】

上記製品の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質はヒトNotch4レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0110】

上記製品のもう1つの態様において、当該組成物は、薬学的担体と混合される。最後の態様において、対象はヒトである。

【0111】

本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターを提供する。

【0112】

1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、ベクターは、これらに限定するものではないが、プラスミド、コスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、ラムダファージまたはYACを含む。

【0113】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターおよび適切な宿主細胞を含む宿主ベクター系を提供する。1つの態様において、宿主細胞は、真核細胞である。もう1つの態様において、真核細胞はCHO細胞である。もう1つの態様において、真核細胞はHeLa細胞である。更なる態様において、宿主細胞は細菌性細胞である。

【0114】

最後に、本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターと、適切な宿主細胞とを具備する宿主ベクター系を、当該ポリペプチドの産生を可能にする条件下で増殖させること、並びにそのように産生されたポリペプチドを回収することとを具備する当該ポリペプチドを産生する第3の方法を提供する。

【0115】

本発明を、続く実験の詳細のセクションにおいて説明する。このセクションは、本発明を理解するのを助けるために記載されるものであるが、その後続く特許請求の範囲に記載される本発明を何れの方角にも制限することを目的とするものではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0116】

[実験の詳細]

[第1のシリーズの実験]

ヒトNotch1融合タンパク質 (Notchデコイ)

Notch1デコイはシグナルペプチド、全て含むNotch1細胞外ドメイン部分またはEGF-様反復ドメインのサブセット、およびヒトFcタンパク質(アミノ酸1-237)部分をコードする配列を用いて組み立てる。ヒトNotch1の完全な全長配列を図59に供する。

【0117】

利用されるシグナルペプチドは天然Notch1シグナルペプチドか、またはヒトHcシグナルペプチドかいずれかであり、それぞれNotch1領域で融合される。シグナルペプチドはNotchデコイタンパク質の分泌をなす。

使用されるNotch1細胞外ドメインは、Notch配位子を結合するために設計され、かつヒ

10

20

30

40

50

トNotch1タンパク質の36 EGF-様反復ドメインの全てまたはサブセットからなる。

【 0 1 1 8 】

Fcタグは所望のヒトNotch1の所望EGF-様反復のC-終端で融合し、かつNotch1デコイタンパク質の精製、検出および安定化をなすために貢献する。

【 0 1 1 9 】

ヒトNotch1デコイの全てに亘る設計、11形成物、は(1)Notch1デコイタンパク質の分泌をタンパク質を生成するために用いられる真核細胞の細胞外媒体に対してなすためのシグナルペプチド、(2)Notch配位子と関連させるための全ての細胞外ドメイン部分またはヒトNotch1のEGF-様反復部分、および(3)検出させるためのヒトFcタンパク質部分に対してコード化するためである。

10

【 0 1 2 0 】

ヒトNotch1デコイの次の11の形成物は説明され、かつ図52に図示される。

【 0 1 2 1 】

- 1) h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-1)
- 2) h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイ(図52のN1-2)
- 3) h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-3)
- 4) h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイ(図52のN1-4)
- 5) h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイ(図52のN1-5)
- 6) h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-6)
- 7) h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-7)
- 8) h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-8)
- 9) h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-9)
- 10) h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-10)
- 11) h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-11)

20

ヒトNotch1配列

aa残基2555(K = リシン)に対してaa残基1 (M = メチオニン)からなるヒトNotch1全長アミノ酸配列は図59に示す。シグナルペプチドおよび第1の36 EGF-様反復ドメインはこの配列のaa 1-1433に表す。アミノ酸1-1433、またはこれらのaaサブセットはヒトNotch1デコイタンパク質の設計に利用し、次のセクションで説明する。

30

【 0 1 2 2 】

Notch1デコイタンパク質上のFcタグを生成するために利用されるヒトFc配列

図60に示される、ヒトFcの237アミノ酸はまさにNotch1EGF-様反復の下流で、全てのNotch1デコイのC-終端で融合した。ヒトFcのこの領域はNotchデコイの検出および精製をなし、かつ分泌ヒトNotch1-ヒトFc融合タンパク質を安定化するために貢献する。

【 0 1 2 3 】

Notch1デコイタンパク質に利用されるシグナルペプチド

2つの特異なシグナルペプチド配列はヒトNotch1デコイタンパク質の設計に組み込まれる。第1はヒトNotch1のアミノ酸1-20を含むために予測するシグナルペプチドである。この測定は、デンマークのTechnical Universityによって提供されるシグナルIP 3.0サーバプログラムを用いてなされた。第2はヒトIgG重鎖(HC)シグナルペプチドのアミノ酸1-22を含むために予測されるヒトHcシグナルペプチドである。

40

【 0 1 2 4 】

1. ヒトNotch1シグナルペプチド(aa 1-20)

MPPLLAPLLCLALLPALA/A/R (配列番号16)

予測されるヒトNotch1シグナルペプチドのアミノ酸配列は図53に図示される。デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する分析の予測結果は図53に示される。これらの結果は、アラニン18 (A18)およびアラニン19 (A19)の間に位置される開裂の多数サイトとA19およびアルギニン20 (R20)の間に位置される開裂の少数サイトとを予測する。これら2つの開裂サイトは上に供される、ヒトNotch1のアミノ酸配列1-20に“ / ”によって示す。

50

【 0 1 2 5 】

2. このシグナル配列に利用されるNotch1デコイに利用されるヒトNotch1シグナルペプチド融合ペプチド(aa 1-23)

Notch1シグナルペプチドが十分に利用されることを確かめるために、開裂の予測少数サイトを越える3つの付加アミノ酸がヒトNotch1デコイに提供される。したがって、Notch1シグナルペプチドを組み込むヒトNotch1デコイ形成物で利用されるアミノ酸配列は以下に示すように予測シグナルペプチド開裂のサイトとNotch1 EGF-様反復の間のグリシン-プロリン-アルギニン(GPR-太字/下線引き)を含む。

【 0 1 2 6 】

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPR (配列番号130)

10

3. ヒト HC シグナルペプチド (aa 1-22)

予測ヒトHcシグナルペプチドのアミノ酸配列は、
MWGWKCLLFWAVLVTATLCTA/R (配列番号18)

である。

【 0 1 2 7 】

デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する予測結果は、以下に示す。これらの結果は、アラニン21 (A21)およびアルゲニン22 (22)間に位置する開裂の多数サイトを予測する。この開裂サイトは、以下に供されるヒトHcのアミノ酸配列1-22に“ / ”によって示される。

【 0 1 2 8 】

20

h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイ

h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイはNotch1 (図52のN1-1)のEGF-様反復1-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【 0 1 2 9 】

図61に示すh-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1433からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸1434-1670。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1670アミノ酸を含む。

30

【 0 1 3 0 】

h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイ

h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイはNotch1 (図52のN1-2)のEGF-様反復 1-13を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【 0 1 3 1 】

図62に示すh-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-531からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸532-768。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。

40

【 0 1 3 2 】

h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイ

h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイはNotch1 (図52のN1-3)のEGF-様反復 1-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【 0 1 3 3 】

図63で示されるh-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復 1-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-948からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸949-1185。予測されるシグナルペ

50

プチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1185アミノ酸を含む。

【0134】

h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイ

h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイはNotch1 (図52のN1-4)のEGF-様反復 9-23を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^NはヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0135】

図64に示されるh-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：

(1) ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-593からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸595-830。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は830アミノ酸を含む。

h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイはNotch1 (図52のN1-5)のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^{HC}はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

図65に示されるh-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：

(1) ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-592からなる配列；これに続く(3) ヒトHCタグを含むアミノ酸593-829。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。

【0136】

h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ

h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイはNotch1 (図52のN1-6)のEGF-様反復9-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^NはヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0137】

図66に示されるh-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：

(1) ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1118からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸1119-1355。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1355アミノ酸を含む。

【0138】

h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイはNotch1 (図52のN1-7)のEGF-様反復9-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^{HC}はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0139】

図67に示されるh-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：

(1) ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-1117からなる配列；これに続く(3) ヒトHCタグを含むアミノ酸1118-1354。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1354アミノ酸を含む。

【0140】

h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイ

10

20

30

40

50

h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイはNotch1 (図52のN1-8)のEGF-様反復13-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^NはヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0141】

図68に示されるh-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-478からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸479-715。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は715アミノ酸を含む。

10

【0142】

h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイはNotch1 (図52のN1-9)のEGF-様反復13-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^{HC}はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0143】

図69に示されるh-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-477からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸478-714。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は714アミノ酸を含む。

20

【0144】

h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイ

h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイはNotch1 (図52のN1-10)のEGF-様反復25-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^NはヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0145】

図70で示されるh-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-508からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸509-745。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は745アミノ酸を含む。

30

【0146】

h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイはNotch1 (図52のN1-11)のEGF-様反復25-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語sp^{HC}はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0147】

図71に示されるh-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-507からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸508-744。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は744アミノ酸を含む。

40

【0148】

方法

ヒトNotch1デコイ構造

臍静脈内皮細胞(HUVEC)からの総RNAは、ヒトNotch1デコイ変異体を生成するために用い

50

た。総RNAはM-MLV逆転写酵素および無作為六量体プライマーまたはNotch1デコイ特異的プライマーのいずれかで逆転写した。合成されたCdnaはそれからNotch1デコイ特異的上流（センス）および下流（アンチセンス）を使って増幅した。

【0149】

下流プライマーはフレームヒトNotch1/Fcキメラを生成するためにFC配列のBglIIIサイトで結合するであろう5'末端でBamHIまたはBglIII選択サイトのいずれかをコード化する。

【0150】

ヌクレチド配列がEGF-様反復36をコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BglIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を（Notch1、図4）に供するであろう。これは、形成物；h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイに適用する。

10

【0151】

ヌクレチドがEGF-様反復13にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BamHIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を（Notch1、図5）に供するであろう。これは形成物h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイに適用する。

【0152】

ヌクレチドがEGF-様反復23にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BglIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を（Notch1、図6）に供するであろう。これは形成物h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイに適用する。

20

【0153】

ヌクレチドがEGF-様反復24にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BglIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を（Notch1、図7）に供するであろう。これは形成物h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイに適用する。

【0154】

増幅されたPCR生成物は異なるヒトNotch1/Fcキメラを生成するためにpBluescript SK IにFcにサブクローニング（subcloned）する。Notch1/Fcデコイ配列はそれから発現およびヒトNotch1デコイタンパク質の精製のために哺乳類発現ベクター（pAd-lox, pCCL, pcDNA3）を往復する。

30

【0155】

ヒトNotch4Fusionタンパク質（Notchデコイ）

Notch4デコイはシグナルペプチド、全て含むNotch4細胞外ドメイン部分またはEGF-様反復ドメインのサブセット、およびヒトFcタンパク質（アミノ酸1-237）部分をコードする配列を用いて組み立てる。ヒトNotch4の完全な全長配列を図83に供する。

【0156】

利用されるシグナルペプチドは天然Notch4シグナルペプチドか、またはヒトHcシグナルペプチドかいずれかであり、それぞれNotch4領域で融合される。シグナルペプチドはNotch4デコイタンパク質の分泌をなす。

40

【0157】

使用されるNotch4細胞外ドメインはNotch配位子を結合するために設計され、かつヒトNotch4タンパク質の29EGF-様反復ドメインの全てまたはサブセットからなる。

【0158】

Fcタグは所望のヒトNotch4の所望EGF-様反復のC-末端で融合し、かつNotch4デコイタンパク質の精製、検出および安定化をなすために貢献する。

【0159】

ヒトNotch4デコイの全てに亘る設計、11の形成物、は（1）Notch4デコイタンパク質の分泌をタンパク質を生産するために用いられる真核細胞の細胞外媒体に対してなすためのシグナルペプチド、（2）Notch配位子と関連させるための全ての細胞外ドメイン部分

50

またはヒトNotch4のEGF-様反復部分、および(3)検出させるためのヒトFcタンパク質部分に対してコード化するためである。

【0160】

ヒトNotch4デコイの次の11の形成物は説明され、かつ図111に図示される。

【0161】

- 1) h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイ (図111のN4-1)
- 2) h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイ (図111のN4-2)
- 3) h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイ (図111のN4-3)
- 4) h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ (図111のN4-4)
- 5) h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ (図111のN4-5)
- 6) h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ (図111のN4-6)
- 7) h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ (図111のN4-7)
- 8) h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ (図111のN4-8)
- 9) h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ (図111のN4-9)
- 10) h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイ (図111のN4-10)
- 11) h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイ (図111のN4-11)

10

ヒトNotch4配列

aa残基2003(K = リシン)に対してaa残基1 (M = メチオニン)からなるヒトNotch4全長アミノ酸配列は図83に示す。シグナルペプチドおよび第1の29EGF-様反復ドメインはこの配列のaa 1-1174に表す。アミノ酸1-1174、またはこれらのaaサブセットはヒトNotch4デコイタンパク質の設計に利用し、次のセクションで説明する。EGF-反復1-29を含むアミノ酸は下線を引く。

20

【0162】

Notch4デコイタンパク質上のFcタグを生成するために利用されるヒトFc配列

図84に示される、ヒトFcの237アミノ酸はまさにNotch4EGF-様反復の下流で、全てのNotch4デコイのC-末端で融合した。ヒトFcのこの領域はNotchデコイの検出および精製をなし、かつ分泌ヒトNotch4-ヒトFc融合タンパク質を安定化するために貢献する。

【0163】

Notch4デコイタンパク質に利用されるシグナルペプチド

2つの特異なシグナルペプチド配列はヒトNotch4デコイタンパク質の設計に組み込まれる。第1はヒトNotch4のアミノ酸1-24を含むために予測するシグナルペプチドである。この測定は、デンマークのTechnical Universityによって提供されるシグナルIP 3.0サーバプログラムを用いてなされた。第2はヒトHCシグナルペプチドのアミノ酸1-22を含むために予測されるヒトHcシグナルペプチドである。

30

【0164】

1. ヒトNotch4シグナルペプチド (aa 1-24)

MQPPSLLLLLLLLLLLLLCVSVVRP/R (配列番号104)

予測されるヒトNotch4シグナルペプチドのアミノ酸配列は図112に図示される。デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する分析の予測結果は図112に示される。これらの結果は、プロリン23 (A23)およびアルギニン24 (R24)の間に位置される開裂の多数サイトを予測する。開裂サイトは上に供される、ヒトNotch4のアミノ酸配列1-24に“/”によって示す。

40

【0165】

2. このシグナル配列に利用されるNotch4デコイに利用されるヒトNotch4シグナルペプチド融合ペプチド(aa 1-27)

Notch4シグナルペプチドが十分に利用されることを確かめるために、開裂の予測される少数サイトを越える3つの付加アミノ酸がヒトNotch4デコイに提供される。したがって、Notch4シグナルペプチドを組み込むヒトNotch4デコイ形成物で利用されるアミノ酸配列は以下に示すように予測シグナルペプチド開裂のサイトとNotch4 EGF-様反復の間のグリシン-プロリン-アルギニン(GPR-太字/下線引き)を含む。

50

【 0 1 6 6 】

MQPPSLLLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLL (配列番号131)

3. ヒト HC シグナルペプチド (aa 1-22)

予測ヒトHcシグナルペプチドのアミノ酸配列は、
MWGWKCLLFWAVLVTATLCTA/R (配列番号17)

である。

【 0 1 6 7 】

デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する予測結果は、以下に示す。これらの結果は、アラニン21 (A21)およびアルゲニン22 (22)間に位置する開裂の多数サイトを予測する。この開裂サイトは、以下に供

10

【 0 1 6 8 】

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-1)のEGF-様反復1-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 6 9 】

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1) ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch4のEGF-様反復1-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-1173からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸1174-1410。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1410アミノ酸を含む。

20

【 0 1 7 0 】

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-2)のEGF-様反復1-13を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 7 1 】

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1) ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch4のEGF-様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-554からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸555-791。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は791アミノ酸を含む。

30

【 0 1 7 2 】

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-3)のEGF-様反復1-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 7 3 】

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1) ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch4のEGF-様反復1-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-933からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸934-1170。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1170アミノ酸を含む。

40

【 0 1 7 4 】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイ

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-4)のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 7 5 】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1) ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2) ヒトNo

50

tch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-602からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸603-839。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は839アミノ酸を含む。

【0176】

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイはNotch1（図111のN4-5）のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【0177】

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-597からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸598-834。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は834アミノ酸を含む。

【0178】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1（図111のN4-6）のEGF-様反復9-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【0179】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-843からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸844-1080。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1080アミノ酸を含む。

【0180】

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1（図111のN4-7）のEGF-様反復9-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【0181】

h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-838からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸839-1075。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1075アミノ酸を含む。

【0182】

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイ

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイはNotch1（図111のN4-8）のEGF-様反復13-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【0183】

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：

（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-444からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸445-681。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は681アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 4 】

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-9)のEGF-様反復13-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 5 】

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-439からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸440-676。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は676アミノ酸を含む。

10

【 0 1 8 6 】

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイ

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-10)のEGF-様反復21-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 7 】

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-392からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸393-629。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は629アミノ酸を含む。

20

【 0 1 8 8 】

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-11)のEGF-様反復21-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 9 】

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-387からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸388-624。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は624アミノ酸を含む。

30

【 0 1 9 0 】

方法

ヒト Notch4デコイ構造

臍静脈内皮細胞(HUVEC)からの総RNAは、ヒトNotch4デコイ変異体を生成するために用いた。総RNAはM-MLV逆転写酵素および無作為六量体プライマーまたはNotch4デコイ特異的プライマーのいずれかで逆転写した。合成されたcDNAはそれからNotch4デコイ特異的上流(センス)および下流(アンチセンス)を使って増幅した。

40

【 0 1 9 1 】

下流プライマーはフレームヒトNotch4/Fcキメラを生成するためにFC配列のBglIIIサイトで結合するであろう5' 終端でBamHIまたはBglIII選択サイトのいずれかをコード化する。

【 0 1 9 2 】

ヌクレチド配列がEGF-様反復29をコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BglIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図113)に供するであろう。これは、形成物；h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイ、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ、h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイ、h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイに適用する。

50

【 0 1 9 3 】

ヌクレチドがEGF-様反復13にコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BamHIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図114)に供するであろう。これは形成物h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイに適用する。

【 0 1 9 4 】

ヌクレチドがEGF-様反復23にコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BglIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図115)に供するであろう。これは形成物h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイ、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ、h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイに適用する。

10

【 0 1 9 5 】

増幅されたPCR生成物は異なるヒトNotch4/Fcキメラを生成するためにpBluescript SK I Fcにサブクローン(subcloned)する。Notch4/Fcデコイ配列はそれから発現およびヒトNotch4デコイタンパク質の精製のために哺乳類発現ベクター(pAd-lox, pCCL, pcDNA3)を往復する。

【 0 1 9 6 】

[第2のシリーズの実験]

材料および方法

プラスミド構成物

LacZ、完全長Notch4、または活性型Notch4/int3をコードするアデノウイルス構成物は以前に記載されている(Shawber et al., 2003)。6mycタグ(Kopan et al., 1994)を有するフレームに融合された活性型Notch1 cDNAをアデノウイルス発現ベクターであるpAd-loxにクローニングした。VEGF165およびN1ECDFcの両方もまた、当該pAd-loxにクローニングした。アデノウイルスストックを作成し、以前の記載の通り力価を求め(Hardy et al., 1997)。LacZ、活性型Notch4/int3、J1、DII1およびDII4の何れかをコードするレトロウイルス発現ベクターpHyTcは以前に記載されている(Uyttendaele et al., 2000, Shawber et al., 2003, Das et al., 2004 in print)。Myc/Hisタグを有するフレームに融合されたNotch1 (bp 5479-7833, Genbank accession# X57405)の細胞内ドメインおよびDII4の細胞外ドメイン (bp 1-1545, Genbank accession# AF253468, provided by Chiron)をコードするプラスミドをpHyTcに操作した。

20

30

【 0 1 9 7 】

Clin. Exp. Immunol. (1992) 87(1):105-110に記載される方法を使用して、Notch1ECD、Notch2ECD、Notch3ECDおよびNotch4ECDを、プラスミドpCMX-sFR1-IgGに含まれるFc配列を使用して操作して、Notchに基づく融合タンパク質、即ち、Notch1ECD/Fc、Notch2ECD/Fc、Notch3ECD/FcおよびNotch4ECD/Fcを作成する。

【 0 1 9 8 】

アデノウイルス遺伝子導入

アデノウイルス感染の前日に、3代目の7.5x10⁵細胞のHUVECをI型コラーゲンコーティング6ウェルプレートに播種した。Ad-LacZ、Ad-VEGF165またはAd-N1ECDFcでのアデノウイルス感染を記載されるm.o.i.で行い、37℃で1時間、時々プレートを回旋しながらインキュベートした。

40

【 0 1 9 9 】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

リガンド誘導性Notchシグナリングを決定するために、Helaおよび293由来Bosc細胞を使用する共培養アッセイを行った。一過性のトランスフェクションをリン酸カルシウム沈殿により行った。1日前に10cmプレートに1.5x10⁶で播種されたHela細胞を、333ngのpBOSNotch1、333ngのpGA981-6、および83ngのpLNC lacZを用いて、666ngのpCMV-FcまたはpHyTC-N1ECDFcの何れかと共にトランスフェクトした(x1には333ng、x2には666ng)。1日前に10cmプレートに4x10⁶で播種されたBosc細胞を、680ngのpHyTc-Jagged1、pHyTc-DII1、pHyTc-CII4またはpHyTc-x(空ベクター)の何れかでトランスフェクトした。トランスフェク

50

ションの1日目に、細胞を、12ウェルプレートで24時間に亘りトリプリケートで共培養した(HeLa:Bosc, 1:2)。細胞を採取し、トランスフェクション後2日目をエンハンスドルシフェラーゼアッセイキット(the Enhanced Luciferase assay kit (BD PharMingen))を使用してルシフェラーゼ活性を測定し、-ガラクトシダーゼ活性をガラクトライトプライスキット(the Galacto-Light Plus kit (PE Biosystems))を用いて測定した。全てのアッセイは、バースオールド・デュアル-インジェクション・ルミノメーター(Berthold dual-injection luminometer)において行った。

【0200】

VEGF誘導性Notchシグナリングの決定のために、アデノウイルスで感染させたHUVECを使用した。1日前に6ウェルプレートに 8.0×10^5 で播種されたHUVECを、記載されたとおりのm.o.i.でコントロールとしてのAd-LacZまたはAd-VEGFの何れかで、Ad-N1ECD/Fcの存在または不在において感染させた。感染後2日目、感染させたHUVECを24ウェルプレートにトリプリケートで 1.5×10^5 細胞で再播種し、24時間に亘り培養し、次に12.5ngのpRL-SV40(Promega)および137.5ngのpGA981-6をエフェクテン・トランスフェクション・試薬(Effectene transfection reagent (Qiagen))を用いてトランスフェクトした。細胞をトランスフェクションの1日後または2日後の何れかで採取し、ルシフェラーゼ活性を、デュアル-ルシフェラーゼ(登録商標)レポーターアッセイシステム(Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega))を使用して測定した。

【0201】

発芽アッセイ

コラーゲンを作るために、ブタI型コラーゲン(Nitta gelatin, Tokyo, Japan)の氷冷溶液を10xTPMI1640培地および中和バッファと、8:1:1で混合した。400 μ Lアリのコートのコラーゲンを次に24ウェルプレートに加え、少なくとも1時間に亘り37 $^{\circ}$ Cでゲル化した。(上記の)アデノウイルス感染に続いて、HUVECを採取し、1ウェル当たり 1.3×10^5 細胞で、0.8mLのEGM2培地中で24ウェルプレート中のコラーゲンの上から播種した。HUVECは、播種後48時間で殆どコンフルエントになった。播種後、培地を1週間に亘り2日毎に交換した。発芽を観察し、顕微鏡に搭載されたオリンパスデジタルカメラで8日後に写真を撮影した。発芽の数を定量化するために、各ウェル当たり5視野を無作為に選択し、二人の研究者により盲検法で顕微鏡下で発芽をカウントした。

【0202】

結果および考察

NOTCHECD/FC融合タンパク質

Notchのアンタゴニストとしての機能

Notchアンタゴニスト-NotchECD/Fc融合タンパク質

我々は、幾つかのNotchアンタゴニストを作成した(図2)。我々の戦略は、ヒトまたはマウスFcドメインに対して細胞外ドメイン(ECD)中のNotchEGF反復をコードする配列を融合するためのものである。この設計は、シグナリング機能は伴わないが、リガンド結合ドメインを保持し、従って、リガンドに結合してリガンド機能を阻害する分泌タンパク質を作る。我々は、これらのタンパク質を「NotchECD/Fc」と呼び、4つ全てのNotch-4ECD/Fcを作成している。Fcドメインは、イムノプロットまたは免疫組織化学によるアフィニティ精製とタンパク質検出を容易にする。

【0203】

Notchアンタゴニストの試験

1つの細胞において発現されたりガンドともう1つの細胞において得られたNotchレセプター活性化とを有するインビトロ共培養系(図3)を使用して、Notch経路の転写活性化を測定した。我々は、この共培養アッセイを使用して、Notch1ECD/Fc機能がリガンド依存性Notchシグナリングを阻害することを示した(図4)。N1ECD/Fc発現ベクターを、HeLa細胞中で異なる比率で完全長Notch1とCSL-ルシフェラーゼレポーターと共トランスフェクトし、次にリガンド発現293細胞と共培養した。我々は、NotchリガンドによるNotch1シグナリングの活性化がN1ECD/Fc発現により減少したことを観察した。この効果は、濃度

依存性を示した；N1ECD/FcのNotch1に対して2:1の比率は、1:1の比率よりもシグナリングの阻害においてより効果的であった。Notch1ECD/Fcは、Jagged1、Delta1様1またはDelta様4により媒介されるシグナリングを阻害できた。

【0204】

Notchアンタゴニストの発現および精製

我々は、タンパク質精製の目的のためにレトロウイルスベクターを使用してNotchECD/Fcを発現するCHOおよびHeLa細胞株を作成した。HeLa-NotchECD/Fc株から回収された上清において示される通り、N1ECD/Fcタンパク質が分泌され（図5）、タンパク質A(pA)アガロースで精製される。pA精製サンプル（Sup）および全細胞溶解物（Lys）を-Fc抗体とイムノプロットし（図5、パネルA）、N1ECD/Fcが培地に分泌されることを示した。NotchECD/Fcのためのアデノウイルスベクターを使用してHeLa細胞を感染し、これらの細胞からの溶解物を-Fc抗体とイムノプロットし、それらがNotchECD/Fc（1、2、3、4）タンパク質を発現していることを示した（図5、パネルB）。我々は、現在、pAアフィニティクロマトグラフィを使用してCHO細胞培養上清からN1ECD/Fcを精製している。

10

【0205】

Notch融合タンパク質を使用した脈管形成の阻害の定義

Notchシグナリングの活性化はCBF1プロモーター活性を用いることにより検出できる。Notchシグナリング機能を、CBF1プロモーターの転写性活性を測定することにより測定でき、これはNotch-1CのCBF1への結合により活性化される。我々は、異なるMOIでVEGF-165をコードするアデノウイルスで感染されたHUVECにおけるCBF1プロモーター活性を測定した（図6）。CBF1プロモーターの導入は、MOIに依存する様式で、Ad-LacZ感染細胞に比較して、Ad-VEGF感染HUVECにおいてははっきりと検出された。このデータはVEGFの過剰発現がHUVECにおけるNotchシグナリングを活性化できたことを示した。従って、VEGFはNotchシグナリング活性を誘導した。

20

【0206】

我々は、Notch融合タンパク質がNotchシグナリングのVEGF誘導性の活性化を阻害できるか否かを求めた。Ad-Notch融合タンパク質とAd-VEGFとの重感染は、Ad-VEGF感染単独により誘導されるCBF1プロモーター活性の活性化を明らかに低下した（図7）。図7において各アデノウイルスについて40MOIでの感染の場合において、レポーター遺伝子のトランスフェクション後24時間では60%阻害、48時間では90%の阻害が検出され、また、Notchデコイの阻害活性はAd-Notch融合タンパク質のMOIに依存した。

30

【0207】

Notch融合タンパク質はVEGFにより誘導された血管形成性の発芽の開始を阻害する

この実験において、我々は、HUVECにおいて過剰発現したVEGFによる発芽の誘導（発芽の開始）におけるNotchデコイの効果を評価した。Ad-VEGF感染HUVECを型コラーゲンゲルにおいて8日間培養した場合、発芽がコラーゲンゲル中に誘導された。過剰発現されたVEGFによるこの発芽の誘導は、Notch融合タンパク質をコードするアデノウイルスの重感染により明らかに阻害された（図8）。Ad-Notch融合タンパク質自身は形態学上の小さな影響を有していた。

40

【0208】

図9において、我々は顕微鏡を使用して視野当たりの芽をカウントした。HUVECへのAd-VEGF感染は、使用したMOIに依存して芽の数を増加した。Ad-VEGF誘導性発芽は明らかに阻害された。これらのデータは、VEGFがNotchシグナリングの活性化によりHUVECの発芽を誘導したこと、およびNotch融合タンパク質がVEGF誘導性の発芽を阻害できたことを示唆する。

【0209】

第2のシリーズの実験において引用された参考文献

1. Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science* 268:225-232.
2. Bailey, A.M., and J.W. Posakony. 1995. Suppressor of hairless directly

50

activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Development* 9:2609-22.

3. Bettenhausen, B., M. Hrabe de Angelis, D. Simon, J.L. Guenet, and A. Gossler. 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121:2407-18.

4. Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90:281-91.

5. Caronti, B., L. Calandriello, A. Francia, L. Scorretti, M. Manfredi, T. Sansolini, E.M. Pennisi, C. Calderaro, and G. Palladini. 1998. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). Neuropathological and in vitro studies of abnormal elastogenesis. *Acta Neurol Scand.* 98:259-67.

6. Desmond, D.W., J.T. Moroney, T. Lynch, S. Chan, S.S. Chin, D.C. Shungu, A.B. Naini, and J.P. Mohr. 1998. CADASIL in a North American family: clinical, pathologic, and radiologic findings [see comments]. *Neurology* 51:844-9.

7. Dunwoodie, S.L., D. Henrique, S.M. Harrison, and R.S. Beddington. 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124:3065-76.

8. Eastman, D.S., R. Slee, E. Skoufos, L. Bangalore, S. Bray, and C. Delidakis. 1997. Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of Enhancer of split m gamma and m delta expression. *Mol Cell Biol.* 17:5620-5634.

9. Fortini, M.E., and S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell* 75:1245-7.

10. Gale, N.W., and G.D. Yancopoulos. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes and Development* 13:1055-1066.

11. Gallahan, D., and R. Callahan. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14:1883-90.

12. Greenwald, I. 1994. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:556-62.

13. Greenwald, I. 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12:1751-62.

14. Henderson, A.M., S.J. Wang, A.C. Taylor, M. Aitkenhead, and C.C.W. Hughes. 2001. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem.* 276:6169-6176.

15. Hicks, C., S.H. Johnston, G. diSibio, A. Collazo, T.F. Vogt, and G. Weinmaster. 2000. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nature Cell Biology* 2:515-520.

16. Hsieh, J.J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M.G. Peterson, and S.D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular & Cellular Biology* 16:952-9.

17. Hsieh, J.J., D.E. Nofziger, G. Weinmaster, and S.D. Hayward. 1997. Epstein-Barr virus immortalization: Notch2 interacts with CBF1 and blocks differentiation. *J Virol.* 71:1938-45.

18. Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377:355-3

10

20

30

40

50

58.

19. Joutel, A., F. Andreux, S. Gaulis, V. Domenga, M. Cecillon, N. Battail, N. Piga, F. Chapon, C. Godfrain, and E. Tournier-Lasserre. 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients [see comments]. *J Clin Invest.* 105:597-605.

20. Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillon, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E.A. Cabanis, M.M. Ruchoux, J. Weissenbach, J.F. Bach, M.G. Boussier, and E. Tournier-Lasserre. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-10.

21. Kopan, R., E.H. Schroeter, H. Weintraub, and J.S. Nye. 1996. Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1683-8.

22. Krebs, L.T., Y. Xue, C.R. Norton, J.R. Shutter, M. Maguire, J.P. Sundberg, D. Gallahan, V. Closson, J. Kitajewski, R. Callahan, G.H. Smith, K.L. Stark, and T. Gridley. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development* 14:1343-1352.

23. Lardelli, M., J. Dahlstrand, and U. Lendahl. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mechanism of Development* 46:123-136.

24. Lawson, N.D., N. Scheer, V.N. Pham, C. Kim, A.B. Chitnis, J.A. Campos-Ortega, and B.M. Weinstein. 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128:3675-3683.

25. Lewis, J. 1998. Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* 9:583-589.

26. Lieber, T., S. Kidd, E. Alcomo, V. Corbin, and M.W. Young. 1993. Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7:1949-1965.

27. Lindner, V., C. Booth, I. Prudovsky, D. Small, T. Maciag, and L. Liaw. 2001. Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alteration in cell matrix and cell-cell interactions. *Pathology* 159:875-883.

28. Lindsell, C.E., C.J. Shawber, J. Boulter, and G. Weinmaster. 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909-917.

29. Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8108-12.

30. Lyman, D., and M.W. Young. 1993. Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10395-10399.

31. Matsuno, K., M.J. Go, X. Sun, D.S. Eastman, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* 124:4265-4273.

32. Nakagawa, O., D.G. McFadden, M. Nakagawa, H. Yanagisawa, T. Hu, D. Srivastava, and E.N. Olson. 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13655-13660.

33. Oberg, C., J. Li, A. Pauley, E. Wolf, M. Gurney, and U. Lendahl. 2001

10

20

30

40

50

- . The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem.* 276:35847-35853.
34. Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 75:487-527.
 35. Rebay, L., R.G. Fehon, and S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74:319-29.
 36. Robey, E. 1997. Notch in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 7:551-7.
 37. Roehl, H., M. Bosenberg, R. Blelloch, and J. Kimble. 1996. Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the *C. elegans* GLP-1 receptor. *Embo J.* 15:7002-7012. 10
 38. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degrade proteins: The PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
 39. Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes & Dev.* 6:2620-2634.
 40. Shawber, C., J. Boulter, C.E. Lindsell, and G. Weinmaster. 1996a. Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol.* 180:370-6.
 41. Shawber, C., D. Nofziger, J.J. Hsieh, C. Lindsell, O. Bogler, D. Hayward, and G. Weinmaster. 1996b. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122:3765-73. 20
 42. Shimizu, K., S. Chiba, T. Saito, T. Takahashi, K. Kumano, H. Hamada, and H. Hirai. 2002. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for the release of the Notch2 intracellular domain. *Embo J.* 21:294-302.
 43. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. DeBlandre, C.R. Kintner, and K.L. Stark. 2000a. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14:1313-1318.
 44. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. DeBlandre, C.R. Kitner, and K.L. Stark. 2000b. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes and Development* 14:1313-1318. 30
 45. Struhl, G., K. Fitzgerald, and I. Greenwald. 1993. Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* 74:331-45.
 46. Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F. Franco del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1994. Notch 1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & Development* 8:707-719.
 47. Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, and T. Honjo. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol.* 5:1416-1423. 40
 48. Tietze, K., N. Oellers, and E. Knust. 1992. Enhancer of splitD, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6152-6156.
 49. Uyttendaele, H., J. Ho, J. Rossant, and J. Kitajewski. 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *PNAS.* 98:5643-5648.
 50. Uyttendaele, H., G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon, and J. Kitajewski. 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122:2251-9.
 51. Vervoort, M., C. Dambly-Chaudiere, and A. Ghysen. 1997. Cell fate det 50

ermination in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 7:21-28.

52. Villa, N., L. Walker, C.E. Lindsell, J. Gasson, M.L. Iruela-Arispe, and G. Weinmaster. 2001. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of Development* 108:161-164.

53. Weinmaster, G. 1997. The Ins and Outs of Notch Signaling. *Mol Cell Neurosci.* 9:91-102.

54. Weinmaster, G. 1998. Notch signaling: direct or what? *Curr Opin Genet Dev.* 8:436-42.

55. Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1992. Notch 2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931-941.

56. Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G.A. Lemke. 1991. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113:199-205.

57. Wettstein, D.A., D.L. Turner, and C. Kintner. 1997. The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 124:693-702.

58. Wu, G., E.J. Hubbard, J.K. Kitajewski, and I. Greenwald. 1998. Evidence for functional and physical association between *Caenorhabditis elegans* SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15787-91.

59. Wu, G., S.A. Lyapina, I. Das, J. Li, M. Gurney, A. Pauley, I. Chui, R. J. Deshaies, and J. Kitajewski. 2001. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 21:7403-7015.

60. Xue, Y., X. Gao, C.E. Lindsell, C.R. Norton, B. Chang, C. Hicks, M. Gendron-Maguire, E.B. Rand, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* 8:723-30.

【 0 2 1 0 】

[第 3 のシリーズの実験]

VEGFは、Notchシグナリングを介して脈管形成を阻害する

VEGFとNotchシグナリング経路の両方が血管の発生のためには重要である。ここで、我々はVEGFがNotchシグナリングを活性化して脈管形成を開始することを示す。VEGFは、DeltaおよびNotch4の発現を増大し、Notchシグナリング活性化を生じ、培養された初代内皮細胞における糸状仮足を誘導する。VEGFレセプター阻害剤を使用する研究は、Notchシグナリング活性が、VEGF-1 (Flt-1) 発現を誘導することにより次々にVEGFの作用を増強することを示す。VEGF作用の他の成分は、MMP-9およびMT1-MMPの誘導を含み、Notchにより媒介される。VEGF誘導性皮膚新血管新生のモデルのためのインビボアッセイを用いて、我々は分泌されたNotch阻害剤 (Notchに基づく融合タンパク質) がVEGF誘導性新血管新生とVEGFR-1発現の誘導を阻害することを発見した。このように、Notchシグナリングは、恐らく開始の段階で、VEGFにより調節される脈管形成のためにはなくてはならない。

【 0 2 1 1 】

VEGFは、ECMの分解、発芽 (糸状仮足の形成)、増殖、生存および内皮細胞の遊走などの複数の過程からなる脈管形成発達の重要な制御因子である。殆どの段階は、VEGFシグナリングの下流の分子と協同しているのだろうが、これらの段階が、どのような経緯で調節されて、血管原性の発芽などのより複雑な形態形成の現象を起こすのかは知られていない。Notchシグナリングは、進化的に保存された細胞運命決定を制御するために機能するシグナリング機構である (1)。Jagged1およびDelta様などのリガンドによる結合において、Notch (NotchIC) の細胞質内のドメインはプレセニリン/ -セクレターゼにより放出され、核に転位置し、転写性のリプレッサーCSL (CBF1/Su(H)/lag2) と相互作用し、それを転写性のアクチベーターに変換する (1)。Notchシグナリングの血管発生における役割

は、標的変異を有するマウスの研究により示唆された(2)。内皮におけるNotch活性化はまた血管リモデリングを崩壊することから、適切なNotchシグナリングは血管発生のために必須である(3)。NotchのVEGFシグナリングに対する関連性は示唆されているが(4-6)、NotchシグナリングがVEGF調節性の脈管形成においてどのような役割を有しているのか、Notchシグナリングが成人の脈管構造における生理的および病理学的な脈管形に関係しているのか否かは、成末だにはっきりしない。

【0212】

HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)の増殖は、VEGF(図26Aおよび26B)および発芽などの分化関連性の生物応答に依存しており、初期の段階で評価できる(7)。最初に、我々は、報告(5)通り、アデノウイルスで形質導入されたVEGFが、bFGFを含む完全培地で培養されたHUVECにおいてNotchおよびNotchリガンド発現の両方を誘導するのか否かを試験した(図2)。RT-PCR分析は、DI4およびNotch4 mRNAの両々が、アデノウイルスで形質導入されたVEGF HUVEC(Ad-VEGF-HUVEC)において、アデノウイルスで形質導入されたLacZ HUVECに比べて上方制御されたことを示した(図22A)。形質導入されたVEGFは、Jagged1およびNotch1を誘導しているようには見えなかった。CSLルシフェラーゼレポーター活性で、形質導入されたVEGFはまた、Notchシグナリングを用量依存性に活性化し(図22B)、これはNotchシグナリングでトランス活性化された(8)。Notchシグナリングは、増殖に比べて、より高い用量のAd-VEGFで活性化された(図26A)。VEGFRキナーゼの阻害剤であるSU5416がVEGF誘導性CSLルシフェラーゼレセプター活性を低減したことから(図22C)、VEGFはNotchシグナリングをレセプターキナーゼの活性化により誘導した。膜貫通および細胞質内ドメインの両方を欠失しているNotch変異体が、Notchシグナリングに対するドメイン陰性阻害剤として機能したことから(9)、我々はNotchシグナリングを阻害するためのNotchに基づく融合タンパク質またはデコイ(N1ECDFc)を作成した(図22D)。Ad-N1ECDFc形質導入性HUVECの培養上清のウェスタンブロット分析は、N1ECDFcが発現されてウェルに分泌されたことを示した(図22E)。そこにおいてNotchリガンド(J1、DI1またはDI4の何れか)を発現しているBosc細胞が、Notch1を発現しているHeLa細胞において、コントロールBosc細胞と比較してNotchシグナリングを活性化している共培養アッセイを使用することにより、我々は、N1ECDFc発現プラスミドのトランスフェクションでのNotchシグナリングの阻害を測定した(図22F)。次に、我々は、N1ECDFcが、HUVECに形質導入されたVEGFによるNotchシグナリングの活性化を阻害するか否かを試験した(図22G)。HUVECへのAd-VEGFとのAd-N1ECDFcの同時形質導入は、VEGFにより誘導されるCSLルシフェラーゼ活性を明らかに減少した。Gerhardtら(Gerhardt et al.)は、VEGFが、血管性発芽の先端での糸状仮足伸展を導くことによって初期の出生後網膜における脈管形成を制御したことを報告した(10)。血管原性の発芽の間に、静止状態の内皮細胞の間に糸状仮足の突出を起こす分化した内皮細胞の形成が、1つの初期の現象であるかもしれない。ここで、我々は、糸状仮足突出を起こしている単一の内皮細胞の形成を発芽という。初代内皮細胞の発芽は、それらをフィブリンまたはコラーゲンゲル上で3次元で培養することにより誘導される(11)。Ad-VEGF-HUVECが完全培地と共にコラーゲンゲル上で培養される場合に、形質導入性HUVECは5日間でコラーゲンゲルに糸状仮足の伸展を起こし(図22H)、芽の数は用量依存性に増加した(図27A)。活性型Notch4をコードするアデノウイルス(Ad-Notch4/int3)によるNotchシグナリングの活性化は、HUVECの発芽を誘導し(12)、またNotch1のそれは(Ad-N1IC)もまた、HUVECの発芽を誘導した(図23Aおよび27B)。VEGFおよびNotchシグナリングの両方がHUVECの発芽を誘導することから、我々は、N1ECDFcがVEGF誘導性HUVECの発芽を阻害したのか否かを試験した(図22H-I)。Ad-VEGF-HUVECの発芽は、Ad-N1ECDFcの同時形質導入により明らかに阻害された。Ad-LacZまたはAd-N1ECDFc形質導入性HUVECは、何れも芽を形成しなかった(図22H)。N1ECDFcは、細胞数に影響することなくVEGF誘導性HUVECの発芽を阻害した(図22I)。形質導入されたN1ECDFcは、HUVECの増殖を明らかに変化させない一方で、Ad-N1IC形質導入性HUVECのそれは用量依存性に阻害され(図28A)、内皮増殖に対するNotchシグナリングの阻害効果と一致する(13)。

10

20

30

40

50

【0213】

NotchシグナリングがVEGFの下流であるのか否かを試験するために、我々は、N1IC誘導性HUVECの発芽においてVEGFRを含むチロシンキナーゼレセプターのための3つの異なる阻害剤を評価したが、これは3つの成長因子が完全培地に存在するからである(図23A-C)。1 μ Mの濃度で、各化合物は、各キナーゼに対する選択的阻害を示した(データに示さず)。PD166866またはZD1893の何れもAd-N1IC-HUVECの発芽には影響を示さなかったが、SU5416は明らかにそれを阻害した(図23A-B)。SU5416は、より低い濃度で生存度をより減少すると共にAd-N1IC-HUVECの発芽を選択的に阻害した(図23C)。Taylorら(Taylor et al.)が、NotchはFlk1/KDR/VEGFR2発現を下方制御することを報告していることから(14)、NotchはFlk1と協同して発芽を促進することはなさそうである。従って、我々は、Notchシグナリングの活性化が、HUVECにおけるFlt1/VEGFR1発現に影響するの
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
1020
1025
1030
1035
1040
1045
1050
1055
1060
1065
1070
1075
1080
1085
1090
1095
1100
1105
1110
1115
1120
1125
1130
1135
1140
1145
1150
1155
1160
1165
1170
1175
1180
1185
1190
1195
1200
1205
1210
1215
1220
1225
1230
1235
1240
1245
1250
1255
1260
1265
1270
1275
1280
1285
1290
1295
1300
1305
1310
1315
1320
1325
1330
1335
1340
1345
1350
1355
1360
1365
1370
1375
1380
1385
1390
1395
1400
1405
1410
1415
1420
1425
1430
1435
1440
1445
1450
1455
1460
1465
1470
1475
1480
1485
1490
1495
1500
1505
1510
1515
1520
1525
1530
1535
1540
1545
1550
1555
1560
1565
1570
1575
1580
1585
1590
1595
1600
1605
1610
1615
1620
1625
1630
1635
1640
1645
1650
1655
1660
1665
1670
1675
1680
1685
1690
1695
1700
1705
1710
1715
1720
1725
1730
1735
1740
1745
1750
1755
1760
1765
1770
1775
1780
1785
1790
1795
1800
1805
1810
1815
1820
1825
1830
1835
1840
1845
1850
1855
1860
1865
1870
1875
1880
1885
1890
1895
1900
1905
1910
1915
1920
1925
1930
1935
1940
1945
1950
1955
1960
1965
1970
1975
1980
1985
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035
2040
2045
2050
2055
2060
2065
2070
2075
2080
2085
2090
2095
2100
2105
2110
2115
2120
2125
2130
2135
2140
2145
2150
2155
2160
2165
2170
2175
2180
2185
2190
2195
2200
2205
2210
2215
2220
2225
2230
2235
2240
2245
2250
2255
2260
2265
2270
2275
2280
2285
2290
2295
2300
2305
2310
2315
2320
2325
2330
2335
2340
2345
2350
2355
2360
2365
2370
2375
2380
2385
2390
2395
2400
2405
2410
2415
2420
2425
2430
2435
2440
2445
2450
2455
2460
2465
2470
2475
2480
2485
2490
2495
2500
2505
2510
2515
2520
2525
2530
2535
2540
2545
2550
2555
2560
2565
2570
2575
2580
2585
2590
2595
2600
2605
2610
2615
2620
2625
2630
2635
2640
2645
2650
2655
2660
2665
2670
2675
2680
2685
2690
2695
2700
2705
2710
2715
2720
2725
2730
2735
2740
2745
2750
2755
2760
2765
2770
2775
2780
2785
2790
2795
2800
2805
2810
2815
2820
2825
2830
2835
2840
2845
2850
2855
2860
2865
2870
2875
2880
2885
2890
2895
2900
2905
2910
2915
2920
2925
2930
2935
2940
2945
2950
2955
2960
2965
2970
2975
2980
2985
2990
2995
3000
3005
3010
3015
3020
3025
3030
3035
3040
3045
3050
3055
3060
3065
3070
3075
3080
3085
3090
3095
3100
3105
3110
3115
3120
3125
3130
3135
3140
3145
3150
3155
3160
3165
3170
3175
3180
3185
3190
3195
3200
3205
3210
3215
3220
3225
3230
3235
3240
3245
3250
3255
3260
3265
3270
3275
3280
3285
3290
3295
3300
3305
3310
3315
3320
3325
3330
3335
3340
3345
3350
3355
3360
3365
3370
3375
3380
3385
3390
3395
3400
3405
3410
3415
3420
3425
3430
3435
3440
3445
3450
3455
3460
3465
3470
3475
3480
3485
3490
3495
3500
3505
3510
3515
3520
3525
3530
3535
3540
3545
3550
3555
3560
3565
3570
3575
3580
3585
3590
3595
3600
3605
3610
3615
3620
3625
3630
3635
3640
3645
3650
3655
3660
3665
3670
3675
3680
3685
3690
3695
3700
3705
3710
3715
3720
3725
3730
3735
3740
3745
3750
3755
3760
3765
3770
3775
3780
3785
3790
3795
3800
3805
3810
3815
3820
3825
3830
3835
3840
3845
3850
3855
3860
3865
3870
3875
3880
3885
3890
3895
3900
3905
3910
3915
3920
3925
3930
3935
3940
3945
3950
3955
3960
3965
3970
3975
3980
3985
3990
3995
4000
4005
4010
4015
4020
4025
4030
4035
4040
4045
4050
4055
4060
4065
4070
4075
4080
4085
4090
4095
4100
4105
4110
4115
4120
4125
4130
4135
4140
4145
4150
4155
4160
4165
4170
4175
4180
4185
4190
4195
4200
4205
4210
4215
4220
4225
4230
4235
4240
4245
4250
4255
4260
4265
4270
4275
4280
4285
4290
4295
4300
4305
4310
4315
4320
4325
4330
4335
4340
4345
4350
4355
4360
4365
4370
4375
4380
4385
4390
4395
4400
4405
4410
4415
4420
4425
4430
4435
4440
4445
4450
4455
4460
4465
4470
4475
4480
4485
4490
4495
4500
4505
4510
4515
4520
4525
4530
4535
4540
4545
4550
4555
4560
4565
4570
4575
4580
4585
4590
4595
4600
4605
4610
4615
4620
4625
4630
4635
4640
4645
4650
4655
4660
4665
4670
4675
4680
4685
4690
4695
4700
4705
4710
4715
4720
4725
4730
4735
4740
4745
4750
4755
4760
4765
4770
4775
4780
4785
4790
4795
4800
4805
4810
4815
4820
4825
4830
4835
4840
4845
4850
4855
4860
4865
4870
4875
4880
4885
4890
4895
4900
4905
4910
4915
4920
4925
4930
4935
4940
4945
4950
4955
4960
4965
4970
4975
4980
4985
4990
4995
5000
5005
5010
5015
5020
5025
5030
5035
5040
5045
5050
5055
5060
5065
5070
5075
5080
5085
5090
5095
5100
5105
5110
5115
5120
5125
5130
5135
5140
5145
5150
5155
5160
5165
5170
5175
5180
5185
5190
5195
5200
5205
5210
5215
5220
5225
5230
5235
5240
5245
5250
5255
5260
5265
5270
5275
5280
5285
5290
5295
5300
5305
5310
5315
5320
5325
5330
5335
5340
5345
5350
5355
5360
5365
5370
5375
5380
5385
5390
5395
5400
5405
5410
5415
5420
5425
5430
5435
5440
5445
5450
5455
5460
5465
5470
5475
5480
5485
5490
5495
5500
5505
5510
5515
5520
5525
5530
5535
5540
5545
5550
5555
5560
5565
5570
5575
5580
5585
5590
5595
5600
5605
5610
5615
5620
5625
5630
5635
5640
5645
5650
5655
5660
5665
5670
5675
5680
5685
5690
5695
5700
5705
5710
5715
5720
5725
5730
5735
5740
5745
5750
5755
5760
5765
5770
5775
5780
5785
5790
5795
5800
5805
5810
5815
5820
5825
5830
5835
5840
5845
5850
5855
5860
5865
5870
5875
5880
5885
5890
5895
5900
5905
5910
5915
5920
5925
5930
5935
5940
5945
5950
5955
5960
5965
5970
5975
5980
5985
5990
5995
6000
6005
6010
6015
6020
6025
6030
6035
6040
6045
6050
6055
6060
6065
6070
6075
6080
6085
6090
6095
6100
6105
6110
6115
6120
6125
6130
6135
6140
6145
6150
6155
6160
6165
6170
6175
6180
6185
6190
6195
6200
6205
6210
6215
6220
6225
6230
6235
6240
6245
6250
6255
6260
6265
6270
6275
6280
6285
6290
6295
6300
6305
6310
6315
6320
6325
6330
6335
6340
6345
6350
6355
6360
6365
6370
6375
6380
6385
6390
6395
6400
6405
6410
6415
6420
6425
6430
6435
6440
6445
6450
6455
6460
6465
6470
6475
6480
6485
6490
6495
6500
6505
6510
6515
6520
6525
6530
6535
6540
6545
6550
6555
6560
6565
6570
6575
6580
6585
6590
6595
6600
6605
6610
6615
6620
6625
6630
6635
6640
6645
6650
6655
6660
6665
6670
6675
6680
6685
6690
6695
6700
6705
6710
6715
6720
6725
6730
6735
6740
6745
6750
6755
6760
6765
6770
6775
6780
6785
6790
6795
6800
6805
6810
6815
6820
6825
6830
6835
6840
6845
6850
6855
6860
6865
6870
6875
6880
6885
6890
6895
6900
6905
6910
6915
6920
6925
6930
6935
6940
6945
6950
6955
6960
6965
6970
6975
6980
6985
6990
6995
7000
7005
7010
7015
7020
7025
7030
7035
7040
7045
7050
7055
7060
7065
7070
7075
7080
7085
7090
7095
7100
7105
7110
7115
7120
7125
7130
7135
7140
7145
7150
7155
7160
7165
7170
7175
7180
7185
7190
7195
7200
7205
7210
7215
7220
7225
7230
7235
7240
7245
7250
7255
7260
7265
7270
7275
7280
7285
7290
7295
7300
7305
7310
7315
7320
7325
7330
7335
7340
7345
7350
7355
7360
7365
7370
7375
7380
7385
7390
7395
7400
7405
7410
7415
7420
7425
7430
7435
7440
7445
7450
7455
7460
7465
7470
7475
7480
7485
7490
7495
7500
7505
7510
7515
7520
7525
7530
7535
7540
7545
7550
7555
7560
7565
7570
7575
7580
7585
7590
7595
7600
7605
7610
7615
7620
7625
7630
7635
7640
7645
7650
7655
7660
7665
7670
7675
7680
7685
7690
7695
7700
7705
7710
7715
7720
7725
7730
7735
7740
7745
7750
7755
7760
7765
7770
7775
7780
7785
7790
7795
7800
7805
7810
7815
7820
7825
7830
7835
7840
7845
7850
7855
7860
7865
7870
7875
7880
7885
7890
7895
7900
7905
7910
7915
7920
7925
7930
7935
7940
7945
7950
7955
7960
7965
7970
7975
7980
7985
7990
7995
8000
8005
8010
8015
8020
8025
8030
8035
8040
8045
8050
8055
8060
8065
8070
8075
8080
8085
8090
8095
8100
8105
8110
8115
8120
8125
8130
8135
8140
8145
8150
8155
8160
8165
8170
8175
8180
8185
8190
8195
8200
8205
8210
8215
8220
8225
8230
8235
8240
8245
8250
8255
8260
8265
8270
8275
8280
8285
8290
8295
8300
8305
8310
8315
8320
8325
8330
8335
8340
8345
8350
8355
8360
8365
8370
8375
8380
8385
8390
8395
8400
8405
8410
8415
8420
8425
8430
8435
8440
8445
8450
8455
8460
8465
8470
8475
8480
8485
8490
8495
8500
8505
8510
8515
8520
8525
8530
8535
8540
8545
8550
8555
8560
8565
8570
8575
8580
8585
8590
8595
8600
8605
8610
8615
8620
8625
8630
8635
8640
8645
8650
8655
8660
8665
8670
8675
8680
8685
8690
8695
8700
8705
8710
8715
8720
8725
8730
8735
8740
8745
8750
8755
8760
8765
8770
8775
8780
8785
8790
8795
8800
8805
8810
8815
8820
8825
8830
8835
8840
8845
8850
8855
8860
8865
8870
8875
8880
8885
8890
8895
8900
8905
8910
8915
8920
8925
8930
8935
8940
8945
8950
8955
8960
8965
8970
8975
8980
8985
8990
8995
9000
9005
9010
9015
9020
9025
9030
9035
9040
9045
9050
9055
9060
9065
9070
9075
9080
9085
9090
9095
9100
9105
9110
9115
9120
9125
9130
9135
9140
9145
9150
9155
9160
9165
9170
9175
9180
9185
9190
9195
9200
9205
9210
9215
9220
9225
9230
9235
9240
9245
9250
9255
9260
9265
9270
9275
9280
9285
9290
9295
9300
9305
9310
9315
9320
9325
9330
9335
9340
9345
9350
9355
9360
9365
9370
9375
9380
9385
9390
9395
9400
9405
9410
9415
9420
9425
9430
9435
9440
9445
9450
9455
9460
9465
9470
9475
9480
9485
9490
9495
9500
9505
9510
9515
9520
9525
9530
9535
9540
9545
9550
9555
9560
9565
9570
9575
9580
9585
9590
9595
9600
9605
9610
9615
9620
9625
9630
9635
9640
9645
9650
9655
9660
9665
9670
9675
9680
9685
9690
9695
9700
9705
9710
9715
9720
9725
9730
9735
9740
9745
9750
9755
9760
9765
9770
9775
9780
9785
9790
9795
9800
9805
9810
9815
9820
9825
9830
9835
9840
9845
9850
9855
9860
9865
9870
9875
9880
9885
9890
9895
9900
9905
9910
9915
9920
9925
9930
9935
9940
9945
9950
9955
9960
9965
9970
9975
9980
9985
9990
9995
10000
10005
10010
10015
10020
10025
10030
10035
10040
10045
10050
10055
10060
10065
10070
10075
10080
10085
10090
10095
10100
10105
10110
10115
10120

【 0 2 1 5 】

マウス背部気嚢(Dorsa Air Sac ; DAS)アッセイにおいて(19)、VEGF121(293/VEGF)を過剰発現する293細胞の安定したトランスフェクタントは、インビボの脈管形成を有意に誘導した(図25A、左側パネル)。このVEGF誘導性脈管形成は、293/VEGF単独に(図25A)比較して、N1ECDFcの同時発現によって明らかに阻害された。血管密度を測定し、図25Bの中で示された脈管形成のインデックスは、293/VEGF誘導性脈管形成を、293/N1ECDFcの共発現により阻害することを示す(図25B)。

【 0 2 1 6 】

また、マウス背部気嚢(Dorsa Air Sac ; DAS)アッセイにおいて(19)、ヒト乳癌細胞株、MDA-MB-231は、恐らくVEGFの分泌によって有意にインビボの脈管形成を誘導した(図25C、左側パネル)。このVEGF誘導性脈管形成は、LacZを発現するアデノウイルスと比較して、N1ECDFcのアデノウイルスを媒介とした発現によって明らかに阻害された(図25C)。血管密度が測定され、図25Dの中で示された脈管形成のインデックスは、MDA-MB-231誘導性脈管形成がN1ECDFcの発現によって阻害することを示す。

【 0 2 1 7 】

Flk1は、胎芽におけるその強いチロシンキナーゼ活動による脈管形成のための主な陽性シグナルトランスデューサーであり、その一方で、Flt1は、脈管形成の陰性シグナルトランスデューサーであると考えられている。しかしながら、PlGF2を過剰発現するLLCのインビボの成長が、細胞質のFlt-1キナーゼドメインを欠失するマウスにおける厳しく損なわれたので、Flt-1についての陽性の役割は成体マウスにおいて示された(20)。PlGF/Flt-1シグナリングがFlk-1のリン酸化部位を変更し、虚血の心筋の脈管形成を強めたので(21)、Notchは、糸状仮足の伸張を誘導するか、または脈管原性の発芽を強めるかの何れかのためにFlt-1シグナリングを誘導すること、およびFlk-1シグナリングを和らげることにより、VEGFシグナリングを変えるために機能するのかもしれない。興味深いことに、Notchシグナリングは、PlGF発現を上方制御した(図29)。しかしながら、以前に(22)を報告された通り、Notchシグナリングの連続的な活性化は、脈管原性の発芽を含む多細胞ルーメンの形成を阻害する。Notchシグナリングは、出芽/糸状仮足形成の後に切られるべきであり、Notch経路の一時的な活性化が要求される。

【 0 2 1 8 】

腫瘍脈管形成がVEGF依存性である膵臓の細胞発癌(Rip1Tag2マウス)のトランスジェニックマウスモデルにおいて、VEGF発現のレベルは増加しないが、VEGFレセプターへのマトリックスに蓄えられた細胞外VEGFの動員が生じる。MMP-9はこの動員の原因であり、腫瘍発生はRip1Tag23MMP-9-ヌルダブル-トランスジェニックマウスにおいて阻害された(23)。NotchはMMP-9発現を上方制御し、血管原性の発芽のための部位での局所的なVEGFレベルを増加するかもしれない。NotchはさらにMT1-MMP発現を上方制御しているが、細胞外MMP-2はNotch活性化ないHeLa細胞の細胞膜に対するターゲットとされている可能性がある。Notchは、ゼラチナーゼ活動およびVEGF濃度の調節による脈管原性の発芽のための部位を決定するかもしれない。内皮のMMP-9が肺特異的転移(20)においてFlt-1によって調節されたので、Flt-1は、MMP-9の誘導に間接的に関与するかもしれない。

【 0 2 1 9 】

[第 3 の シ リ ー ズ の 実 験 に お い て 引 用 さ れ た 参 考 文 献]

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. Science 1999;284(5415):770-776.
2. Shawber CJ, J. K. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. Bioessays. 2004;26(3):225-34.
3. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, J. K. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(10):5643-8.
4. Lawson ND, Vogel AM, BM. W. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differ

entiation. *Dev Cell* 2002;3(1):127-36.

5. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):14-25.

6. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(45):5949-54.

7. Montesano R, L. O. Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1987;130(2):284-91. 10

8. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, A. I. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995;377(6547):355-8.

9. Small D, Kovalenko D, Kacer D, Liaw L, Landriscina M, Di Serio C, et al. Soluble Jagged 1 represses the function of its transmembrane form to induce the formation of the Src-dependent chord-like phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(34):32022-30.

10. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161(6):1163-77. 20

11. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, et al. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;132(6):1177-88.

12. Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, et al. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 2004;279(29):30771-80.

13. Nosedà M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):8813-22. 30

14. Taylor KL, Henderson AM, CC. H. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 2002;64(3):372-83.

15. Itokawa T, Nokihara H, Nishioka Y, Sone S, Iwamoto Y, Yamada Y, et al. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* 2002;1(5):295-302.

16. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(7):1104-17.

17. Seiki M, Koshikawa N, I. Y. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer metastasis Rev* 2003;22(2-3):129-43. 40

18. Yamamoto M, Tsujishita H, Hori N, Ohishi Y, Inoue S, Ikeda S, et al. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase by hydroxamate inhibitors: an examination of the subsite pocket. *J Med Chem* 1998;41(8):1209-17.

19. Funahashi Y, Wakabayashi T, Semba T, Sonoda J, Kitoh K, K. Y. Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. *Oncol Res*. 1999;11(7):319-29.

20. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in 50

lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002;2(4):289-300.

21. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9(7):936-43.

22. Leong KG, Hu X LL, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, Hood L, et al. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2830-41.

23. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2(10):737-44.

10

【 0 2 2 0 】

[第 4 の シ リ ーズ の 実 験]

Notch1外部ドメイン由来の新規構成物はNotchシグナリング、内皮形態形成および腫瘍脈管形成を阻害する

Notchシグナリングは血管発生のために必要であり、腫瘍脈管形成においても機能する。血管内皮成長因子(VEGF)の抑制は、有効になった抗脈管形成治療法であり、VEGFは、内皮細胞(EC)におけるNotchおよびNotchリガンドDelta様4(Dll4)発現の両方を誘導できる。Dll4の阻害は、腫瘍増殖を制限し、新生血管を崩壊することができるが、腫瘍脈管形成におけるNotchレセプター機能を阻害する効果はまだ明らかにされていない。この研究において、我々は、この経路を阻害するためにNotch1レセプターの可溶性融合タンパク質(N1ECDFcまたはNotch1デコイ)を生成し、インビトロおよびインビボでの脈管形成におけるその効果を評価した。Notch1デコイ発現は、3つの異なるNotchリガンドのNotch1に対する結合により刺激されたシグナリングを減少し、更にNotch4を過剰発現するECの形態形成を阻害した。我々は、2つのモデル：繊維芽細胞増殖因子4(Mm5MTFGF4)を過剰発現するマウスの乳腫瘍Mm5MT細胞およびNGPヒト神経芽細胞腫細胞：を使用して、腫瘍脈管形成におけるNotch1デコイ発現の影響を試験した。外因的に発現されたFGF4は、Mm5MT-FGF4細胞においてNotchリガンドJagged1およびDelta様1(Dll1)の発現を誘導し、Jagged1はMm5MT-FGF4異種移植片において発現された。Notch1デコイの過剰発現は、Mm5MT-FGF4細胞の腫瘍形成性にインビトロで影響しなかったが、マウスにおけるMm5MT-FGF4異種移植片の増殖を制限したが、一方で、著しく新脈管形性を損なった。同様に、Notch1デコイ発現はインビトロのNGP細胞に影響せず、しかし血管を崩壊し、NGP異種移植片における腫瘍生存能力を減少した。これらの結果は、Notchレセプターシグナリングが腫瘍新脈管形成のために必要であること、腫瘍治療のための新しい標的を提供することを強く示唆する。

20

30

【 0 2 2 1 】

脈管形成は、VEGF、繊維芽細胞増殖因子(FGF)および肝細胞成長因子(HGF)を含む多数のシグナル経路によって精巧に調節される。これらの中で、VEGFは、内皮増殖、生存およびチューブ形成を含む脈管形成の段階ほとんどすべてに臨界的に影響を及ぼす(1)。この変化し続ける役割と一致して、VEGF阻害剤は、前臨床のモデルにおける脈管形成を低減し、癌治療として臨床的に有効になった(2)。この確立された効能にもかかわらず、異なる腫瘍タイプは、VEGF遮断に広い感受性の変化を示す(2)。この可変性の根本的な理由は明らかではない。1つの可能性は、代替のシグナルがVEGF阻害にもかかわらず灌流を可能にして、腫瘍血管を救済するということである。従って、そのような経路の検証が明らかに治療上の重要性である。

40

【 0 2 2 2 】

高度に保存されたNotch遺伝子ファミリーは膜内外のレセプター(Notch1、-2、-3、-4)およびリガンド(Jagged1、-2;デルタ様またはDll1、-3、-4)、および膜貫通型タンパク質をコードする。リガンド結合に際して、Notchの細胞質ドメイン(NotchIC)はプレセニリン / セクレターゼによって放出される(3)。Notchシグナリングは、致命傷を引き起こすDll4のハプロ不全と共に、胎芽の重篤な血管の欠陥を生ずる(4)。腫瘍脈管形成におけるNotchシグナリングの潜在的な役割はこのように多くの新しい興味を起こさせる。Dll4リポー

50

ター構成物のためのトランスジェニックマウスは、腫瘍内皮細胞(EC)において発現を示し(5)、増加したDII4発現は、ヒト癌において検出されている(6、7)。DII4遮断が実験的腫瘍における増殖と灌流を抑制する(8と9)ことを示していることによりこの役割が批判されることを最近の2つの報告は確証する。興味をそそるのは、これらの研究において、DII4阻害は、単に血管増殖を防ぐだけではなく、腫瘍血管を混乱させ、DII4が機能的な血管アッセムブリのために必要であることを示唆する。

【0223】

最近のデータは、Notchレセプターが腫瘍血管においても機能することを示す。例えば、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)において、最近、HGFが内皮ではなく腫瘍細胞上のJagged1の発現を上方制御すると示された。増加したJagged1発現は、マウスにおける近隣のECにおけるNotchシグナリングを活性化し、腫瘍脈管形成と増殖を刺激する(10)。従って、これらのデータは、腫瘍ECにおけるNotchシグナリングの活性化のための少なくとも2つの異なる機序があることを示唆する。

10

【0224】

これらの研究において、我々は、Notch1の細胞外ドメイン(N1ECDFc、またはNotch1デコイ)に基づいた新しい可溶性構成物を使用して、脈管形成におけるNotchレセプター活性化の役割を評価した。インビトロで、Notch1デコイは、Notchシグナリングのリガンド誘導性活性化と、アデノウイルスによりNotch4を過剰発現するECの形態形成との両方を阻害した。インビボで、Notch1デコイ発現は、Jagged1発現がFGF4の形質導入によって上方制御されたマウスMm5MT異種移植片の増殖を遅らせ、NGP神経芽細胞腫瘍における血管と腫瘍生存能力を崩壊した。これらのデータは、腫瘍新脈管形成中のNotchレセプター機能の必要性を支持し、この経路の阻害が有効な新しい抗腫瘍戦略を提供するかもしれないことを示唆する。

20

【0225】

[材料と方法]

試薬と発現ベクター

化合物EはCalbiochem(San Diego, CA)から、PD166866はエーザイ(東京(日本))から購入した。Notch1デコイ(N1ECDFc)は、ヒトIgG Fcへのフレーム中で融合されたラットNotch1エクストドメイン(bp 241-4229、Genbank accession # X57405)をコードする。レトロウイルスのpHyTC-Jagged1、-DII1、-DII4およびpBos-Notch1は記述されている(11)。Notch1デコイおよびFcを、レトロウイルスベクターpHyTCXへ操作し、マウスFGF4はpQNCXへ操作した。LacZおよびマウスNotch4をコードするアデノウイルスの構成物およびpAdlox-GFPは記述されている(12)(13)。

30

【0226】

HUVEC、アデノウイルスおよびレトロウイルス感染

HUVECは記述された通りに単離し(14)、マウス乳癌Mm5MTを入手した(ATCC, Manassas, VA)。我々は、示された多重度の感染(m.o.i.)でアデノウイルスと、感染のためGP2-293細胞(BD Biosciences, Bedford, MA)からのレトロウイルス上清を使用した。HUVECは300g/mlのhygromycinB(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して選択し、Mm5MT-FGF4は、ダブルのトランスフェクタントを伴い、1mg/ml G418 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY)において選択した。

40

【0227】

ウェスタンブロット

Ad-N1ECDFc-形質導入HUVECは、内皮無血清培地(GIBCO-Invitrogen)で48h、およびDMEMでMm5MT-FGF4トランスフェクタントを培養した。ウェスタンブロットは抗ヒトFc(Pierce, Rockford, IL)を使用して行なった。

【0228】

定量的なRT-PCR

Mm5MTトランスフェクタントを、ベヒクルまたは1 μ MのPD166866(FGFレセプターキナーゼの阻害剤)と共に7日培養し、総RNAを単離し(RNeasy mini-kit, Qiagen, Valencia, CA)

50

、第1の鎖のcDNAを合成した(SuperScript™ First-Strand Synthesis System, Invitrogen)。

【0229】

アクチン、FGF4、Jagged1、DII1およびDII4のための定量的なRT-PCR(SYBER Green PCR Master Mix, 7300 Real Time PCR; Applied Biosystems, Foster City, CA)をトリプリケートで行い、値を -アクチンについて標準化した。値はコントロールに比較した倍数で示す(プライマー配列は要求により入手可能)。

【0230】

共存培養シグナリング分析

リガンド誘導性シグナリングのNotch1デコイ阻害は記述された通りに行った(11)。HeLa細胞は、666ngのpCMV-FcまたはpHyTC-N1ECDFc(x1のために333ng、x2のために666ng)の何れかと、333ngのpBOS-Notch1、333ngのpGA981-6および83ngのpLNC-LacZでトランスフェクトした。293細胞を、680ngのpHyTc-Jagged1、pHyTc-DII1、pHyTc-DII4またはpHyTc-X(空のベクター)でトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクションの48h後にルシフェラーゼ活性(Enhanced Luciferase assay kit, BD Pharmingen, San Diego, CA)と、 -ガラクトシダーゼ活性(Galacto-Light Plus kit, Applied Biosystems)を測定した。アッセイはトリプリケートで行なった。

【0231】

内皮共存培養形態形成アッセイ

HUVEC形態形成は、Ad-Notch4形質導入HUVECとNotch1デコイHUVECまたはFc-HUVECトランスフェクタントとの共培養をすることを加えたことにより変更して、既述された通りに(11)評価した。10m.o.iのAd-GFPを30m.o.iのAd-LacZまたはAd-Notch4と共にHUVECに重形質導入し、48時間後、フィブリンゲル(24ウェルプレート、 1.5×10^4 cells/well)に播種した。安定したHUVEC-偽(HUVEC-X)、HUVEC-Fc、またはHUVEC-N1ECDFcトランスフェクタントを 1.35×10^5 cells/wellで播種し、ベヒクルまたは200nMのcompound Eを3時間後に添加した。7日後に、HUVEC形態形成を、視野当たりの総GFP陽性細胞と比較する方法で、GFP陽性細胞の数として計算した。

【0232】

Mm5MT腫瘍モデル

6-8週齢の雌性C3Hマウス(Taconic, Hudson, NY)を、 10^6 Mm5MT トランスフェクタント(各N=10)で皮下移植した。腫瘍直径は、ノギスで測定し、体積を算出した(長さ(mm)x幅(mm)²/2)。腫瘍は22日目に採取して分析した。実験は3度行った。

【0233】

免疫組織化学

5μmの新鮮な凍ったMm5MT組織セクションを免疫染色した(15)(抗体リストの補足のデータを参照)。CD31定量化は、Eclipse E800顕微鏡およびImagePro Plus v.4.01 (Silver Spring, MD)を使用して行った。20の異なる視野をスライド毎に測定し、密度比を(特異的染色の領域)/(全領域、各視野)として計算した。データは、Mm5MT偽トランスフェクタントに対する各Mm5MTトランスフェクタントの平均密度比の平均の比として示す。

【0234】

NGP腫瘍モデル

NGP腫瘍モデルは以前に詳細に記述されました(16)。NGP細胞を、上記の通りにLacZまたはN1ECDFcでトランスフェクトし、4-6週齢のNCRのヌードマウス(Taconic、ジャーマンタウン、NY; NGP-LacZ n=11、NGP-N1ECDFc n=13)に腎臓内に 10^6 NGP-LacZまたはNGP-N1ECDFc細胞を移植した。6週で、腫瘍を分析のために採取した。5μMのパラフィン抱埋切片をCD-31/PECAMと平滑筋アクチン(SMA)で免疫染色した。アポトーシスを検出するために(TUNEL分析)、我々はキット(Apoptag Red in situ kit(Chemicon))を使用した。シグナルを、正常な腎領域を除いた各組織の任意に選択された20~23視野を写真に写すことにより定量化した。各フレームは、それぞれ赤色(TUNELシグナル)および緑色チャンネルの両方で撮影した。アドビ・フォトショップを使用して、赤血球自己蛍光を除去する

ために緑色チャンネルシグナルを減じた。一定の赤色チャンネル閾値を任意に選択し、総シグナル領域を4 NGP-N1ECDFcおよび3NGP-LacZ腫瘍において測定した。赤血球定量化を同様に行った。

【0235】

統計解析

定量分析における有意性は、Tukey-クレイマーテスト(Tukey-Kramer tests、CD31定量化)およびクラスカル-ヴァリス解析(Kruskal-Wallis analysis、他の全て)を使用して評価した。

【0236】

結果

Notchデコイは、Notch1を発現している細胞においてリガンド誘導性Notchシグナリングを阻害する

Notch1デコイは、ヒトIgG Fcに対して融合されたNotch1のエクトドメインメインに基づいており、プロテイングにより特定された通りにアデノウイルスNotch1デコイ(Ad-N1ECDFc)感染HUVECによる培養上清に分泌された(図32A)。我々は、共存培養シグナリングアッセイを使用してNotch1デコイ活性を評価した(11)。Notchリガンド(Jagged1、DII1、DII4)を発現する293細胞はNotch1を発現するHeLa細胞と培養したときに、Notchシグナリングを活性化し、これはCSLルシフェラーゼリポーター活性により測定された(図32B)。HeLa(図32B)または293細胞(データには示さず)の何れかにおけるNotch1デコイの発現は、共存培養アッセイにおけるNotch1シグナリングを阻害し、これはNotch1デコイがJagged1、DII1またはDII4による活性化を阻害したことを示す。

【0237】

Notch1デコイはNotch4により誘導されたHUVECの形態形成を阻害する

Notch4発現は、フィブリンゲルにおいて培養されたHUVECからの細胞伸展を誘導し(図32c)、これはVEGF and FGF2により誘導される形態学的な変化に似ている(17と18)。フィブリンは、EC(19)におけるJagged1を誘導する。我々は、そのような伸展が、HUVECに形質導入されたNotch4の内因性Notchリガンド活性化を反映するという仮説について、化合物E(CE)、セクレターゼ阻害剤(GSI)またはNotch1デコイの何れかをを用いて試験した。ベヒクルと比較して、200nM CEでの処理は、明らかにNotch4HUVECにおける伸展を阻害した(図32Cの上パネル、32D)。発芽の減少は有意であった(図32D、 $p < 0.0001$ 、化合物E処理とN1ECDFc形質導入の両方について；データは平均値 \pm SDで示す)。HUVECにおけるNotch4+Notch1デコイ共同発現は、同様にNotch4+Fcコントロールに比べて内皮の伸展を阻害した(図32C、下パネル；32D)。まとめると、これらのデータは、Notchレセプター活性化が、このアッセイにおけるHUVEC伸張を誘導するのに必要十分であり、Notch1デコイは同様にGSIに対して機能し、更に、Notchレセプター阻害剤としてその活性が妥当であることを示す。

【0238】

FGF4は、マウス乳腫瘍Mm5MT細胞において、Notchリガンド、Jagged1およびDII1の発現を誘導した

FGF4のMm5MT細胞におけるか蒸発は、クローン原性および異種移植アッセイにおいて腫瘍形成能を促進した(データには示さず)。HGF/MAPKシグナリングがHNSCCにおけるJagged1発現を誘導したので(10)、我々はFGF4がMm5MT細胞のNotchリガンドの発現を刺激するかどうかを検討した。我々は、定量的PCRを使用して、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントのJagged1とDII1のアップ調節を検出した(DII4発現は不変だった)(図33A)。FGFRキナーゼ阻害剤PD166866は、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントにおけるJagged1およびDII1の両方を誘導を抑制し(図33C)、これはFGF4誘導性Jagged1およびDII1発現がFGFRシグナリングを必要とすることを示す。イムノプロテイングにより、Mm5MT-FGF4細胞におけるJagged1タンパク質の上方制御が確認され(図33B)、免疫染色により、Mm5MT-FGF4腫瘍におけるJagged1の著しい増加が示された(図33D)。更に、Notch4がMm5MT-FGF4腫瘍内皮で検出された(データには示さず)。

【0239】

10

20

30

40

50

Notch1デコイ発現はマウスにおけるMm5MT-FGF4腫瘍の脈管形成および増殖を阻害した我々は、内皮のNotchレセプターによるシグナリングにより、Jagged1発現Mm5MT-FGF4腫瘍が脈管形成を促進すると仮定した。従って、我々は、マウスにおけるMm5MT-FGF4異種移植片増殖に対するNotch1デコイ発現の効果を評価した。安定してFcまたはNotch1デコイの何れかを過剰発現するMm5MT-FGF4の腫瘍形成能は、クローン原性アッセイによって不変であった（データには示さず）。しかしながら、両方のMm5MT-FGF4偽トランスフェクタントおよびFcトランスフェクタントと比較して、Mm5MT-FGF4-N1ECDFc異種移植片増殖は有意に遅延し、これはNotch阻害が腫瘍形成において重大な成分を失ったことを示唆する（図34A）。内皮マーカーCD31/PECAMについての免疫染色は、Mm5MT-FGF4-N1ECDFc腫瘍における脈管形成を顕著に阻害した（図34B）。血管アッセムブリにおけるNotchの必要性と一致して、ECは、剥離した孤立した細胞と小さなクラスタとして見え、それと共にわずかな組織された血管が検出された。抗CD31染色の定量分析は、Notch1のデコイ発現腫瘍において微細血管密度の58%の減少を示した（ $P<0.001$ 、Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fcの両方について、対Mm5MT-FGF4-N1ECDFc；データは平均値 \pm SDで示す；図34C）。

10

20

30

40

50

【0240】

Notch1デコイ発現はヒトNGP神経芽細胞腫異種移植において脈管形成を崩壊した、マウスにおける、NGP異種移植は、VEGF阻害に対して比較的に抵抗性である成熟した階層的血管を形成した（16）。Notchレセプター活性化がNGP脈管形成に寄与したかどうか判断するために、我々は、上記のように、N1ECDFcでNGP細胞をトランスフェクトした。Mm5MT-FGF4-N1ECDFc細胞で観察された結果と同様に、培養中のNGP-N1ECDFc細胞の増殖はトランスフェクションに影響されなかった（データには示さず）。しかしながら、異種移植片生存能は、有意に増加した腫瘍細胞アポトーシスを伴って著しく損なわれた（ $P=0.0002$ 、TUNEL-陽性細胞についてNGP-N1ECDFc対NGP-LacZ腫瘍、図35A）。腫瘍内の出血は、血管が物理的に崩壊したことを示唆し、NGP-N1ECDFc腫瘍において有意に増加した（ $P<0.0001$ 、図36C）。滑らかでインタクトに見えるコラーゲンスリーブが残ったが、血管基底膜の構成成分コラーゲンIVの免疫染色により、小さくなった分岐と共に、血管の全面的な減少が示された（データには示さず）。しかしながら、ECおよび血管壁細胞（VMC）の免疫染色（それぞれ抗CD31および抗-SMA抗体を使用）は、これらの正常に隣接する細胞層の障害を示した。個々の血管の細胞は不規則に見えて、血管連続性が損失されると共に、互いに不安定に引き離された（図35D）。纏めると、Notch1デコイ発現が腫瘍血管中の内皮とVMC相互作用を崩壊し、これらの結果は、腫瘍組織の不安定、出血および不完全な灌流を導いたことを示唆する。

【0241】

考察

最近の報告書は、脈管形成におけるNotchリガンドDII4の重大な役割を確認し、血管を崩壊することにより、DII4阻害が有効に腫瘍増殖を抑制することができることを示す（8、9）。本研究では、我々は、血管に対するその影響は異なるが、Notch1エクドメインに由来する新規構成物を使用するNotchレセプター機能の阻害もまた、有効に腫瘍灌流を低減することを示す。Notch1デコイは、Notch1へのリガンドJagged1、DII1およびDII4の結合により誘導されたシグナリングを阻害した。血管新生におけるNotchレセプター活性化の役割と一致し、Notch4の過剰発現は内皮細胞伸展を誘導し、これはNotch1デコイまたはGS1の何れかによるNotchシグナリングの阻害によって防ぐことができた。Notch1デコイは腫瘍細胞増殖をインビトロで阻害しなかったが、Notch1デコイの発現はMm5MT-FGF4異種移植片の増殖および脈管形成を阻害し、そこにおいてJagged1発現は上方制御された。同様に、Notch1デコイ発現は、NGP腫瘍細胞増殖における効果はインビトロではなかったが、腫瘍血管および生存能をインビボでは崩壊した。

【0242】

HUVECにおけるNotch4過剰発現は、Notchリガンドの外因性の発現のないフィブリンゲルにおける内皮伸展を誘導するのに十分であった。フィブリンがECにおけるJagged1発現を誘導することが知られており、従って、このアッセイにおけるJagged1のHUVEC発現を促進

するために機能したのかもしれず、我々は、これがNotch4の活性化を引き起こしたと推測しする。HeLa共存培養シグナリングアッセイにおいて、Notch1デコイはリガンド-Notch1レセプター相互作用によってシグナリングを阻害した。Notch4がHeLa細胞において不十分に処理されて示された通り、我々はNotch4活動を同様に評価することができなかった(データには示さず)。しかしながら、処理されたNotch4は、アデノウイルスのNotch4形質導入後にHUVECにおいて見られ(示さず)、これはNotch1デコイがリガンド誘導性Notch4活性化を阻害することができることを示す。

【0243】

腫瘍形成におけるNotchシグナリングのために最近示された多数の役割は、癌治療の潜在的な目標としてのこの経路の魅力を増加させるものである。Notch活性化はヒト癌における悪性変化において直接に機能している可能性もあるが(20、21)、それはまた脈管形成のためにも必要とされ得る(8と9)。興味深いことには、Notchリガンド誘導は成長因子シグナルによって調節される。例えば、Jagged1は、HGFによって腫瘍細胞において誘導され(10)、Dll4はVEGFによってECにおいて誘導される(22)。ここで、我々は、FGF4がマウスMm5MT細胞のJagged1およびDll1発現を同様に刺激することができることを示す。Notch1デコイはインビボでMm5MT-FGF4腫瘍増殖および脈管形成を低減したが、腫瘍形成性に対してインビトロでは影響しなかった。従って、これらの結果は、腫瘍細胞ではなくMm5MT血管中のNotchレセプター活性化がこのシステムにおける新生物の増殖のために必要であることを示唆する。

【0244】

Mm5MTFGF4およびNGP異種移植片の両方はNotch1デコイ発現の後に腫瘍血管の著しい障害を示したが、これらのモデルにおいて観察された血管の表現型の違いは、Notch機能の腫瘍特異的なパターンが血管アセンブリを微調節する可能性を示唆する。Mm5MT-FGF4腫瘍は急速に増殖し、補充されるVMCの比較的欠けた密集した不規則な内皮ネットワークを発達する。これらの未熟な血管床はDll4を発現し(データには示さず)、Notch1デコイ発現によって広範囲に除去され、腫瘍実質組織において小さなクラスタまたは単離された個々のECを分離する。血管ネットワークを形成するこの初期の障害と一致し、デコイ発現腫瘍の残りは壊死性でなく、コントロールよりも有意に小さい。対照的に、NGP腫瘍はVMCによる内皮の様に近い被覆と共に、成熟した脈管叢を発生する。NGP血管はNotch1を発現し、Dll4を相対的にほとんど表現しない(示さず)。NGP腫瘍におけるNotch1デコイ発現は血管連続性の損失と共に、腫瘍内の出血および壊死を引き起こし、ある程度の腫瘍増殖が生じた後で、渚流された血管が不安定になることを示唆する。

【0245】

纏めると、これらのデータは、Notchシグナリングが腫瘍脈管形成の多数の側面を制御するモデルについての支持を提供する。Notch活性化は血管新生のために広く必要とされる一方で、個々のNotchタンパク質は差次的に血管リモデリングを調節する可能性がある。我々の結果は、腫瘍血管におけるNotchリガンドレセプター相互作用の重要性を確認し、Notchレセプター機能を乱すことが、腫瘍脈管形成を崩壊する新しい有効な手段を提供するかもしれないことを示唆する。

【0246】

[第4のシリーズの実験のための参考文献]

1. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.*, 25: 581-611, 2004.
2. Jain, R., Duda, D., Clark, J., and Loeffler, J. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 Jan;3(1):24-40., 3: 24-40, 2006.
3. Kopan, R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.*, 115: 1095-1097, 2002.
4. Shawber, C. and Kitajewski, J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays.*, 26: 225-234, 2004.

5. Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Adams, N. C., Lin, H. C., Holash, J., Thurston, G., and Yancopoulos, G. D. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci* 101: 15949-15954, 2004.
6. Patel, N. S., Li, J.-L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D. W., and Harris, A. L. Up-regulation of Delta-like 4 Ligand in Human Tumor Vasculature and the Role of Basal Expression in Endothelial Cell Function. *Cancer Res.*, 65: 8690-8697, 2005.
7. Patel, N. S., Dobbie, M. S., Rochester, M., Steers, G., Poulson, R., Le Monnier, K., Cranston, D. W., Li, J.-L., and Harris, A. L. Up-Regulation of Endothelial Delta-like 4 Expression Correlates with Vessel Maturation in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*, 12: 4836-4844, 2006. 10
8. Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chantery, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J. A., de Sauvage, F., Plowman, G., and Yan, M. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444: 1083-1087, 2006.
9. Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., Bolland, P., Gale, N. W., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., and Thurston, G. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 444: 1032-1037, 2006. 20
10. Zeng, Q., Li, S., Chepeha, D. B., Giordano, T. J., Li, J., Zhang, H., Polverini, P. J., Nor, J., Kitajewski, J., and Wang, C.-Y. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell*, 8: 13-23, 2005.
11. Das, I., Craig, C., Funahashi, Y., Jung, K.-M., Kim, T.-W., Byers, R., Weng, A. P., Kutok, J. L., Aster, J. C., and Kitajewski, J. Notch Oncoproteins Depend on γ -Secretase/Presenilin Activity for Processing and Function. *J Biol Chem.*, 279: 30771-30780, 2004. 30
12. Shawber, C. J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J. A. N. Notch Signaling in Primary Endothelial Cells. *Ann NY Acad Sci*, 995: 162-170, 2003.
13. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., and Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol.*, 71: 1842-1849, 1997.
14. Jaffe, E., Nachman, R., Becker, C., and Minick, C. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.*, 52: 2745-2756, 1973.
15. Vorontchikhina, M. A., Zimmermann, R. C., Shawber, C. J., Tang, H., and Kitajewski, J. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expression Patterns*, 5: 701-709, 2005. 40
16. Kim, E. S., Serur, A., Huang, J., Manley, C. A., McCrudden, K. W., Frisner, J. S., Soffer, S. Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Kandel, J. J., and Yamashiro, D. J. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11399-11404, 2002.
17. Montesano R and L., O. Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J Cell Physiol.*, 130: 284-291., 1987.
18. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaije 50

r R, and VW., v. H. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. J Cell Biol, 132: 1177-1188, 1996.

19. Zimrin, A. B., Pepper, M. S., McMahon, G. A., Nguyen, F., Montesano, R., and Maciag, T. An Antisense Oligonucleotide to the Notch Ligand Jagged Enhances Fibroblast Growth Factor-induced angiogenesis in Vitro. J Biol Chem, 271: 32499-32502, 1996.

20. Nickoloff, B., Osborne, B., and L., M. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. Oncogene, 22: 6598-6608, 2003.

21. Radtke, F. and Raj, K. THE ROLE OF NOTCH IN TUMORIGENESIS: ONCOGENE OR TUMOUR SUPPRESSOR? Nature Reviews Cancer, 3: 756-767, 2003.

22. Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., and Herlyn, M. Regulation of Notch1 and Dll4 by Vascular Endothelial Growth Factor in Arterial Endothelial Cells: Implications for Modulating Arteriogenesis and angiogenesis. Mol Cell Biol 23: 14-25, 2003.

【 0 2 4 7 】

[第 5 のシリーズの実験]

卵巣癌における治療学的ターゲットとしてのNotch

上皮の卵巣癌は、米国の患者における婦人科医学的癌による死亡の主な原因である。初期段階でこの疾患を診断することができないこと、およびこの腫瘍に向けられた新しい治療法の不足に患者は苦しんでいる。血管内皮成長因子(VEGF)は悪性上皮卵巣癌細胞によって生産され、それは次に、腫瘍を育て、腫瘍脈管形成を促進する[1]。最近の臨床試験は、幾つかのケースにおいて治療学的な処置のためのVEGFターゲティングが結果を改善することを示している[2]。従って、抗脈管形成の治療法が、卵巣癌を治療するためのアプローチとして確認されているが、これらの利益を確立するためにはより多くの研究が必要である。我々は、Notchシグナリング経路が生理学および病理学の両方における脈管形成における新しい脈管形成の経路であることを確認した[3、4]。Notchは、細胞運命決定、細胞生存および増殖を促進する細胞表面レセプター(図1-Notch1)である。我々の研究室は、Notchデコイ(図1に図式化する)と呼ばれるNotch阻害剤を開発し、それは、リガンド依存性Notchシグナリングを阻害することができ(データには示さず)、Fcタグに対して融合したNotch1細胞外ドメインを含む融合タンパク質である(N1ECDFc)。我々は、Notchデコイがウィルムス腫瘍マウスモデルにおいてVEGFに誘導された脈管形成および腫瘍脈管形成を阻害できることを示している(データには示さず)。我々はヒト卵巣癌細胞SKOV3を生成したが、これはNotchデコイ、SKOV3-N1ECDFcを過剰発現する。我々は、マウスに異種移植された場合、SKOV3細胞のNotchデコイの発現が腫瘍の増殖を有意に阻害することを明らかにした(図36)。従って、Notchデコイは卵巣癌増殖を阻害する。我々は、この阻害が腫瘍脈管形成をターゲットとしていると仮定した。更に、我々はヒト卵巣癌サンプルを調査し、幾つかのNotchリガンドおよびNotchレセプターが卵巣癌に関連した腫瘍血管において高度に発現されることを明らかにし、それにより、1つはヒト卵巣腫瘍血管においてNotchをターゲットにできること、その結果、それらの増殖が阻害できるという仮説を立証する。

【 0 2 4 8 】

この研究は、Notchシグナリングが卵巣癌中の腫瘍脈管形成を促進するという仮説を検討する。さらに、我々は「Notchデコイ」を利用するNotchの阻害が腫瘍増殖を阻害するだろうと仮定している。我々は、Notchデコイ作用が、腫瘍血管または腫瘍細胞の増殖、またはその両方に対するものであるかどうかを判断する。全面的な目的はNotchデコイを確立し、卵巣癌の治療のための治療薬としてNotchデコイを確立することである。

【 0 2 4 9 】

特異的な目的:

特異的な目標1:

10

20

30

40

50

Notchデコイ発現がSKOV3またはOVCAR3の細胞の腫瘍異種移植片増殖を阻害するかどうか判断して、Notchデコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうかを明白にすること。

【0250】

特異的な目標2:

効能/安定性の増加したバージョンを作るためにNotchデコイ設計を修正すること。

【0251】

特異的な目標3:

マウスにおける卵巢癌腫瘍異種移植片を阻害するために、更に標準的な化学療法剤と組み合わせにおいて精製されたNotchデコイを使用すること。

【0252】

研究戦略:

特異的な目標1:

NotchデコイがSKOV3またはOVCAR3の細胞の腫瘍異種移植片増殖を阻害するかどうか判断して、Notchデコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうかを明白にすること。

【0253】

我々は、予備的な結果は、Notch1デコイを発現してプログラムされたSKOV3腫瘍細胞が卵巢癌異種移植片(図36)の増殖を阻害することを示す。この発見は別の卵巢癌細胞株OVCAR3においても再現されるだろう。Notchデコイは、腫瘍細胞、腫瘍血管または両方の増殖を阻害し得る。Notchデコイが腫瘍細胞をターゲットしているか否かを決定するために、我々はNotchデコイを発現する卵巢癌株が柔軟な寒天アッセイにおいてより不十分な増殖であるかどうか測定する。デコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうか判断するために、我々は、そのような阻害の証拠となる異種移植された腫瘍の評価を行う。コントロール異種移植片の腫瘍脈管形成の手段は、微細血管密度評価、腫瘍内皮細胞の増殖のインデックスおよびレクチン灌流による腫瘍血管イメージングを含む。Notchデコイを発現する異種移植片について腫瘍脈管形成の阻害の測定は、アポトーシス性内皮細胞の評価、腫瘍微小血管系の減少および腹水蓄積の蓄積を含む。

【0254】

特異的な目標2:

効能/安定性の増加したバージョンを作るためにNotchデコイ設計を修正すること

現在のNotchデコイは、Notch阻害剤としての効果はあるが、それが比較的大きなタンパク質であるので、容易に適用可能な精製はされていない。我々は、細胞外ドメインのより小さな部分を含むNotch1デコイの変異体を開発することを目的とする。これらの変異体は細胞培養に基づいたアッセイにおいてNotchシグナリングの阻害剤としてスクリーニングされる。阻害性の変異体は次についてスクリーニングされる:産生される細胞からの分泌効率、分泌後の安定性、それらの溶解性、およびFcアフィニティータグによる精製の容易さ。精製された変異体は、潜在的な毒性について評価するためにマウスに注射される。

【0255】

特異的な目標3:

マウスにおける卵巢癌腫瘍異種移植片を阻害するために、更に標準的な化学療法剤と組み合わせにおいて精製されたNotchデコイを使用すること

特異的な目標2から精製されたデコイは、卵巢癌異種移植片(SKOV3/OVCAR3)に対する効能を評価するために単一の薬剤として、または化学療法と組み合わせて使用される。単一の薬剤として精製されたNotchデコイを使用して、我々は、特異的な目標1の実験内に見られた腫瘍異種移植片増殖への阻害を再現し、阻害のために最適な濃度を決定することを目的とした。この目的を達成するために、我々は、マウスにおけるSKOV3/OVCAR3異種移植片増殖を阻害するために必要とされる治療上の最適な服用量、服薬スケジュールおよび期間を決定する。次に、我々はパクリタキソールと組み合わせてNotchデコイを使用する。異種移植片増殖を阻害する際の効能を決定するために、Notchデコイの最適な服用量を、パクリタキソールと共に、またはパクリタキソールなしで使用する。

【 0 2 5 6 】

インパクト:

この研究は直接的な卵巣癌の治療を進歩させることを目指す。臨床研究は、VEGF阻害剤により卵巣癌を成功裏に治療することを最近確立した。化学療法による治療を補足するために開発されている新しい治療薬はほとんどない。この成功にもかかわらず、VEGFを腫瘍成長を阻害するためのターゲットとすることは、単に腫瘍増殖をある程度に抑制するだけかもしれない。それはまた、VEGF阻害に耐性のある新しい腫瘍血管増殖を導くかもしれない。我々は、卵巣癌における代替的な脈管形成の経路、Notchシグナル経路をターゲットとすることを目的とする。この研究は、新しい治療の実体であるNotchデコイの開発により治療を前進させるであろう。我々の予備的研究は、Notchデコイがマウスモデルにおいて卵巣癌成長を阻害することができると既に立証している。従って、治療の実体としてのNotchデコイの開発のインパクトは高度に重要であり得る。

10

【 0 2 5 7 】

革新:

Notchデコイの我々の最近の開発は、卵巣癌を治療するために新しい以前に試験されていないパラダイムを示す。他の公表された研究は、卵巣癌の治療にまだこの経路を密接に結び付けてはいない。しかし、我々の予備証拠はこれを調査の重要分野として定義付ける。卵巣癌の治療のための新しい治療のアプローチとしてのVEGF阻害の最近の成功にもかかわらず、我々は、Notchなどの他の脈管形成の経路を阻害することによりこのアプローチが補われる必要があると考える。

20

【 0 2 5 8 】

[第 5 のシリーズの実験のための参考文献]

1. Abu-Jawdeh, G.M., et al., Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. Lab Invest, 1996. 74(6): p. 1105-15.
2. Monk, B.J., et al., Activity of bevacizumab (rhMAB VEGF) in advanced refractory epithelial ovarian cancer.. Gynecol Oncol, 2005. 96(3): p. 902-5.
3. Shawber, C., J.J. Kandel, and J. Kitajewski, Notch: cell fate determination from vascular development to human vasculopathy. Drug Discovery Today: Disease Models, 2004. 1(3): p. 351-8.
4. Zeng, Q., et al., Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. Cancer Cell, 2005. 8(1): p. 13-23.

30

【 0 2 5 9 】

[第 6 のシリーズの実験]

Foxo/Notch経路は筋原性を制御する

分化および繊維タイプ特異化

Foxo転写調節因子は新陳代謝および細胞の分化を調節する。Foxo依存性の代謝経路および目標遺伝子と異なり、これらのタンパク質が分化を調節する機序は調査されていない。Notchシグナリングの活性化は、細胞の分化に機能獲得型のFoxoの影響を模倣する。モデル系として筋肉分化を使用して、我々は、Notch目標遺伝子の活性化に関連し、Notchエフェクター-Cslからのコリプレッサークリアランスの促進により、Foxoが物理的に機能的にNotchと相互に作用することを示す。構成的に活性型のFoxo1による筋芽細胞分化の阻害は、Notchシグナリングの阻害によって部分的に救済され、一方で、Foxo1機能欠損は、筋形成のNotch阻害を妨げ、MyoD発現を増加する。従って、骨格筋における条件的なFoxo1アブレーションは、ミオゲニン含有(緩慢単収縮)ファイバーを犠牲にして、MyoD含有(迅速単収縮)筋繊維および変更された繊維型分布を増加することに帰着する。前駆体細胞の維持および分化を調節するために、Notch/Foxo1の協調は、Notchによって環境上の合図にFoxo1による代謝性の合図を統合するのかもしれない。

40

【 0 2 6 0 】

50

再生医療における主要な問題は、特定化する細胞の種類が未分化幹または前駆体細胞からどれくらい高度に発生するかを理解することである(1)。この問題に密接な関係し、微環境により生じる生化学的なシグナルがどのようなものであるか、内分泌腺/栄養上の合図はどのように細胞の分化プロセスを活性化するために転写的調節されるのかが問題となる。フォックスヘッド(Fox)タンパク質のOサブファミリーは、細胞生存および代謝を促進するホルモン、栄養素およびストレス応答を調節する。Foxo転写を微調節する能力は、これらの細胞の機能をコントロールするのに不可欠であり、リン酸化およびアセチル化を含む転写後修飾に大部分は依存性である(2)。最終分化細胞のそれらの役割に加えて、Foxoタンパク質も、筋芽細胞(3)、前脂肪細胞(4)および内皮細胞分化(5)に関連する。更に、Foxo4はミオカルジン(Myocardin)との相互作用によって血管平滑筋細胞分化を調節する(6)。Foxo3ノックアウトマウスは未成熟卵巣不全を示し、これは卵巣成熟におけるこの遺伝子の役割と一致する(7)。Foxoタンパク質が細胞の分化をコントロールするメカニズムは不明瞭ままであり、また、最近の条件付きのアブレーション研究は、造血性系統における3つのFoxoアイソフォーム中の著しい程度の機能的なオーバーラップと一致する(8、9)。

10

20

30

40

50

【0261】

Notch経路は胚形成の間において、神経、血管、筋肉および内分泌腺の分化に重要な役割を果たしている(10)。リガンド誘導性の分裂において、Notchレセプターの細胞内ドメインが核に移動し、サブプレッサーから転写性のアクチベーターにまでその転写特性を変更し、それがDNA結合蛋白質Cslと相互に作用する(11)。CslターゲットはHairy and Enhancer of Split (Hes, Hey)遺伝子を含む。Hes1は腸内胚葉(gut endoderm、12)、前脂肪細胞(13)および神経性の分化(14)を調節する。活性型Notchシグナリング、またはNotch1レセプター機能の獲得は、MyoD転写を抑制することによりC2C12および10T/2の筋芽細胞の分化を阻害する(15-21)。

【0262】

全ての細胞の分化コンテキストにおいて、Foxo1の機能獲得型(3-5)はNotch1活性化を表現模写すること(13、17、22、23)は注目すべきことである。さらにマウスにおいてもFoxo1アブレーション(24)はNotch1アブレーションを表現模写する(25)。興味をそそる類似性にも拘らず、FoxoおよびNotchシグナルは2つの表面上別個のメカニズムにより、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ経路(Foxo)、そしてその、Hes/Hey経路(Notch)を経る。この研究には、我々は、Cslからのコリプレッサークリアランスの促進により、Foxoが物理的に機能的にNotchと相互に作用することを示し、それにより、筋形成のプログラムをコントロールことを示す。筋原性の先駆体は中胚葉の幹細胞(26)から発生し、MRFファミリー(MyoD、Myogenin、MRF4およびMyf5)(27)の筋原性の転写調節因子の発現内でピークに達する多段階過程によって筋管に変わる。筋原性の転写調節因子はEタンパク質でヘテロ二量体化し、ミオサイトに特有のMEF2エンハンサー因子(28)を備えた綿密な調節に作用して、筋肉に特有の遺伝子の発現を促進する。

【0263】

成人の筋肉はその筋繊維コンテンツ(29)によって主に定義される異種混合の組織である。異なるミオシン重鎖(MyHC)サブタイプは異なる筋繊維を特徴付ける。I型ファイバーは主として緩慢な単収縮でMyHCを発現し、II型ファイバーは迅速な単収縮でMyHC(29)を発現する。繊維型特異的なプロセスは多数のステップでコントロールされる。最初に、筋原性の前駆細胞には異種である見え、鳥類の胎芽クロス移植実験からの証拠は、初期の先駆体主として遅筋ファイバーおよび後の先駆体が速筋ファイバー(29)寄与することを示す。誕生後、繊維型特異性も細胞によって影響され、神経および内分泌腺/栄養上の合図(28)を含む自律の要因に支配される。Foxo共活性剤Pgc1は遅筋線維(30)の形成を促進する際に重大な役割を果たす。また、最近のデータはこのプロセス(31)にさらにFoxo deacetylase Sirt1を密接に結び付けた。マウスにおいて条件付きの突然変異生成を使用して、我々は、Foxo1不全の骨格筋(筋芽細胞系統に得意な重要な機能と一致する)のMyoD含んでい

割が反映されることを示す。

【 0 2 6 4 】

結果

C2C12分化におけるFoxo1およびNotchシグナリングの相互作用

NotchとFoxoが筋肉発生をコントロールするために協同していることを理解するために、我々は細胞分化モデルを使用した。C2C12細胞は、成長因子撤回、Foxo1の核転置に関連したプロセスにおける筋原性の転換および筋管融合を生じる(3)。それにより、筋芽細胞融合の抑制によって反映されるよう(図37a-c)に、構成的に活性型のFoxo1突然変異体(Foxo1ADA) (4)をコード化するアデノウイルスの形質導入はC2C12分化を誘導するために血清撤回の影響を阻害した。反対に、siRNAによるFoxo1抑制はこれらのプロセスに影響しなかった(図37d)。同様に、構成的に活性型Notch(Notch1-IC)は筋芽細胞分化を阻害する際にFoxo1ADAを表現型模写した(図37e)。事実上、細胞はすべて、アデノウイルスで形質導入されるようになった(図44)。Foxo1 siRNAは、制御蛋白質または他のFoxoアイソフォーム(図46)に影響せずに、用量依存的な様式で内在性のFoxo1およびトランスフェクトされたFLAG-Foxo1(図45)の両方の発現を有効に抑えた。Foxo1-ADAもNotch1-ICもC2C12増殖(図47)に影響しなかった。

10

【 0 2 6 5 】

我々は、内在性のNotchシグナリングの抑制によりFoxo1ADAの影響を阻害することができかどうかを試験した。この目的のために、我々は、膜内外のアンカーおよび細胞内ドメインを欠失するトランケイテッドなNotch1レセプターを使用した。それは、結合力のあるNotchリガンドによってデコイレセプターとして働く(32、33)(Y.F.およびJ.K.(出版されていない観察))。デコイは、成長因子撤回(図37f)に応じて分化を被るC2C12の能力ではなく筋芽細胞分化(図37g)の部分的に救済されたFoxo1ADA抑制に影響した。Notchシグナリングを阻害する代替プローブとして、プレセニン阻害剤(PSI)化合物E(34)は、さらに筋芽細胞分化のFoxo1ADA抑制を救済した(図37h)。

20

【 0 2 6 6 】

Notchシグナリングに対するFoxo1の影響を検討するために、我々はFoxo1 siRNAおよびNotch1-ICを共同トランスフェクトした。Foxo1 siRNAは、Notch1-IC(図37i)によって筋芽細胞分化およびミオシン発現の抑制を救済した。一方、コントロールsiRNAは効果がなかった(データには示さず)。筋芽細胞文化に対するFoxo1 siRNAの非特異性の影響を除外するために、我々は耐siRNA性のFoxo1ADAを生成した(図48)。Foxo1 siRNAは、Foxo1ADAの影響を逆にしたが(図37j)、耐siRNA性のFoxo1ADAによって引き起こされたC2C12分化の抑制を救済しなかった(図37k)。我々は、Foxo1およびNotch1-ICがミオシンレベルを>80%減少させ、その一方でNotchデコイおよびFoxo1 siRNAが完全に分化された細胞の~70%にそれらを戻したことを示し、図38aにおいてこれらのデータの定量分析を示す。我々は、ミオシン陽性細胞の形態測定の実行を行うことにより、同様のデータを得た(図38b)。これらのデータは、Foxo1が筋芽細胞分化に対するNotchの影響のために必要であることを示す。

30

【 0 2 6 7 】

我々は、次にFoxo1がその転写の機能によって分化に影響するかどうかテストした。この目的のために、我々は、N208AおよびH212R(DBD-Foxo1ADA)の置換によって、ADA突然変異体のバックボーンにおいて不十分な突然変異体を結合するDNAを生成した(6、35)。我々は、Igfbp1プロモーター活性(標準的なFoxo1目標)の測定により、この突然変異体がDNAを結合することができないことを確認した。Foxo1-ADAはIgfbp1プロモーター活性を10倍増加した。しかし、DBD-Foxo1ADAはそのような増加はなかった(図38c、左パネル)。驚いたことに、この突然変異体は、分化を阻害することについて、DNA結合成分Foxo1ADAと同じくらい有効であった(図37l)。これらのデータは、配列特異的な様式でDNAに結合する能力と無関係に、Foxo1が分化をコントロールすることを示す。

40

【 0 2 6 8 】

Foxo1はCslに結合し、Hes1プロモーターに補充される

50

Notch1-ICはCslに結合して共活性化し、Hesをプロモートし、Heyを発現する(11)。DBD-Foxo1ADA突然変異体を使用した結果に基づいて、我々は、NotchリガンドJagged1(符号「+」によって表示された)を発現するHEK293細胞とNotch1レセプターを発現するC2C12細胞の共存培養を使用して、Notch依存性様式でFoxo1がCsl、またはネガティブコントロール(符号「-」で示す)としてのLacZと相互に作用するかどうかを試験した。我々は、Foxo1とCslが培養細胞において相互作用するという証拠のいくつかの系を提供する。我々は、内在性のCsl免疫沈殿において内在性のFoxo1を発見した。また、共免疫沈殿は、Notchシグナリングの活性化によって有意に増強された(図39a)。相互作用の特異性を確認するために、我々は、C2C12細胞のHAタグを付与したFoxo1およびFLAGタグを付したCslを発現した。抗HA(Foxo1)抗血清での免疫沈殿により、我々は、免疫プロットにFLAG-Cslを発見した(図39b)。反対に、抗FLAG(Csl)抗血清での免疫沈殿により、我々は、免疫プロットにHA-Foxo1を発見した(図39c)。我々はCsl免疫沈殿の他のFoxoアイソフォームを発見しなかった(図42)ので、Cslによる共免疫沈殿への能力はFoxo1に特有であるように見える。トランケイテッドなFoxo1突然変異体(256、アミノ酸1-256をコード化する)(36)は、Cslと相互に作用する能力を保持した。我々は、Myc-256免疫沈殿(図39d)にFLAG-Cslを、FLAG-Csl免疫沈殿(図39e)にHA-256を検出し、これによりCslがFoxo1のN-ターミナルドメインと相互に作用することが示される。これが直接のタンパク質間の相互作用であるかどうかを判断し、相互作用ドメインをマッピングするために、我々は、バクテリア内で産生されたGST-Foxo1と、HEK293細胞において発現されたFLAG-Cslをアフィニティ精製し、ブルダウンアッセイを行った。我々は、C-末端のFoxo1(aa.290-655)またはGST(図40a)を持たず、N-末端Foxo1(アミノ酸1-300)と完全長で結合しているCslを検出した。次に我々は菌培養精製したGSTフラグ/CslおよびGST-Foxo1を含む無細胞系を使用して、Foxo1と相互に作用するCslドメインをマッピングしました。再度、我々は、Csl免疫沈殿中に、C-ターミナル(290-655)Foxo1を除く完全長(1-655)とN末端(1-300)を回収した。逆に、N-末端のFoxo1はN-末端Csl(図40b)と相互に作用する。我々は、Cslの中のFoxo1を結合するドメインをマッピングするためにCsl欠損変異株を使用した。これらの研究は、アミノ酸172-279(図40c)を含むドメインに対してFoxo1が結合することを示し、これはCsl NTDドメイン内に含まれる(37)(図40c、図形)。興味深いことには、このドメインはDNAおよびコレプレッサー結合のために必要であるが、Notch結合には寄与しない(38と39)。

10

20

30

40

50

【0269】

CslはHes1プロモーター(40)の中の共通配列に結合し、それは、このようにFoxo/Csl相互作用の有用な読み出し分析を提供する。もし後者がC2C12分化を調節するために要求されるのであれば、3つの予測が得られる:(a) Foxo1は、Hes1プロモーターの中のCslを測る染色質免疫沈殿分析(ChIP)で検出される。(b)相互作用は分化依存である。(c)Foxo1ADAによる分化の抑制はHes1プロモーターにおけるCsl成分への構成的な結合に付随する。図40dは、予測がすべて満たされたことを示す。最初に、我々は、C2C12細胞を分化する際にHes1のCsl結合部位を測るプライマーを使用してChIPsを行行った。我々は、未分化細胞からの免疫沈殿の内在性のFoxo1、Notch1およびCslを発見した(図40d Endogレーン(0日))。PCRで増幅された配列がフォックスヘッド結合部位を含んでいなかったのも、我々はFoxo1がCslによってこのDNA断片に結合するとの結論を下した。さらに、細胞が分化すると共に、Foxo1とNotch1の両方の結合は減少した(1日目および2日目)。我々は、構成的に核Foxo1ADAを備えた細胞を形質導入した後に分化は阻害された(図37c)。また、CslおよびNotch1と同様に、突然変異体Foxo1はHes1プロモーターに持続して結合した。

【0270】

私たちは次にHes1発現を分析した。予測は、Hes1レベルがFoxo1とNotch1によってHes1プロモーターの占有と関連するということである。実際は、Foxo1と称されるHes1 mRNA発現とCslに結合するNotch1は減少した。その一方でミオシタンパク質レベルは増加した(図40d)。Csl転写でFoxo1の直接効果を除外するために、我々はCslプロモーターとレポーター遺伝子分析を実行した。Cslプロモーターにおけるフォックスヘッド結合部位に10反復が存在するにも拘らず、Foxo1はCslレポーター遺伝子の発現を活性化しなかった(41)(デ

ータには示さず)。さらに、Csl発現はFoxo1ADAを発現するC2C12細胞において影響されなかった(示されない)。これらのデータは、Foxo1がCslとのタンパク質/タンパク質相互作用によってNotch依存性分化を調節することを示す。

【0271】

CslによるHesおよびHey遺伝子のNotch誘導のためにFoxo1が必要である

我々は、Foxo1ADAがC2C12細胞の内在性のHes1、Hes5およびHey1の発現を促進する能力を検討した。Foxo1-ADAおよびNotch1-ICの両方は、3つの遺伝子の発現を増加させた。その一方でFoxo1 siRNAは、Notch1-ICによって誘導されたHes1、Hes5およびHey1発現を阻害した(図41a)。Foxo1 siRNAは成長因子欠乏細胞においてHes1、Hes5およびHey1発現に効果がなかった(図41a)。

10

【0272】

我々は、プロトタイプのNotchターゲット遺伝子として、Hes1における実験に注目した。我々は、Hes1発現の測定と同様にHes1プロモーターとリポーター分析を使用して、Hes1転写を調節するFoxo1の能力を分析した。Foxo1-ADAおよびNotch1-ICは、1.8-および2.5-倍にHes1プロモーター活性をそれぞれ誘導した。Notch1-ICとFoxo1ADAの同時トランスフェクションは2.5倍の増加(図41b)を引き起こした。Foxo1 siRNAの同時トランスフェクションは用量依存的な様式でNotchに誘導されたHes1活性を抑制した。一方で、コントロールsiRNAは効果(図41b)がなかった。Csl結合モチーフである4つのタンデム反復を含む合成のHes1リポーターについても同様の結果を得た(図50)。さらに、DBD-Foxo1ADAは、Hes1のFoxo1活性化のために直接のDNA結合が必要ではないことを確認し、Foxo1ADAよりさらに大きな程度までHes1レポーター遺伝子活性を誘導した(図38c、右パネル)。

20

【0273】

Notch1-ICがFoxo1 siRNAを発現する細胞においてHes1発現の誘導しないということは、Csl/Notch相互作用のためにFoxo1が必要であることを示唆する。したがって、我々は、共存培養システムにおけるHes1プロモーターへのFoxo1およびNotch1の結合を試験した。我々は、内在性のNotchシグナリングの活性化を誘導するためにNotchリガンドJagged1を発現するHEK293細胞とNotch1を発現するC2C12細胞を共同培養した。Jagged1を表現する細胞がある状態での共存培養は、ChIP分析においてHes1プロモーターに結合する内在性のFoxo1(図42a(レーン1-2))およびNotch1を増加した(図42a、b、レーン1-2)(42)。これらのデータは、Cslを備えたFoxo1共同免疫沈殿が共存培養で増加したという観察と一致する(図39a)。Hes1プロモーターに結合するFoxo1がCsl依存かどうかテストするために、我々はsiRNA(図51)でCsl発現を阻害した。Csl siRNAのトランスフェクションは、それらがCsl依存であることを示し、Hes1プロモーターに結合するFoxo1とNotch1の両方を阻害した(図42a(レーン3-4))。さらに、Foxo1-ADAは、Csl siRNAがある状態においてHes1発現を誘導しなかった(図41a(レーン5))。ChIP実験の結果はHes1プロモーター分析によって確証された。Jagged1またはNotch1だけの発現はHes1活動に効果がなかった。しかし、共同培養することにより、Hes1レポーター遺伝子活動の3.7倍の増加を産出した(図42c)。ChIP分析において、Foxo1 siRNAは、NotchのHes1プロモーターへの結合(図42b(レーン3-4))と、Hes1プロモーター活性の誘導を阻害した(図42c)。これらの結果は、Hes1プロモーターにNotch1を結合するために、Foxo1が必要であることを示唆し、それによってFoxo1発現の抑制がNotch1-ICを発現する筋芽細胞の分化を回復するメカニズムを提供する。Foxo1 siRNAが共存培養システムにおけるHes1のNotch誘導を阻害する能力は、Notch1-ICの分化実験において観察された効果がトランケイテッドな細胞内のNotch1突然変異体(15)によるNotchシグナリングの非生理学の活性化による可能性を排除する。

30

40

【0274】

Foxo1は、コリプレッサークリアランスとMam11のCslへの結合する促進する

Hes1発現のFoxo1依存の活性化の分子のメカニズムを明確にするために、我々はHes1プロモーターでコリプレッサー/コアクチベーター交換を調査した。Notchの活性化はコリプレッサーNcorおよびSmrt(43)を取り除き、Hes1プロモーターへのコアクチベーターMam11(42)を補充した。Foxo1 siRNAはNotchに誘導されたコリプレッサー交換(図42d)を抑制した

50

。これらのデータは、Foxo1がCsl(図40c)の領域172-279に結び付けるという観察と一致する。それはNcor/Smrt結合部位(38と39)を含むことを示した。転写の複合体の観察された変化がHes1活動の変化に帰着することを示すために、我々は、筋形成に含まれるHes1標的遺伝子の発現を調査した。Hes1はMyf5(16、17)に影響せずに、bHLH転写調節因子MyoDを阻害することにより筋芽細胞分化を抑えた。発現分析は、Myf5が影響されなかった間、Notch h1-ICまたはFoxo1-ADAがMyoDを抑えることを明らかにした。NotchデコイまたはFoxo1 siRNAは部分的にMyoD発現をリストアした(図42e)。

【0275】

Foxo1を欠損した骨格筋における変更された繊維型の組成物

細胞のデータに基づいて、インビボ、条件付きの遺伝子不活性化の使用して、我々は筋肉分化中のFoxo1機能を調査することを試みた。この実験の予測された結果は、Myf5含有筋芽細胞ではなくMyoD含有細胞の加速された分化である。ミオゲニンが緩徐繊維(44)の優勢な要因である一方で、MyoDは速いファイバーの優勢な筋原性の要因であり、MyoD発現中のFoxo/Notch抑制の除去は緩徐繊維を犠牲にして速いファイバーの増加した形成に潜在的に帰着する。マウスには3つのFoxoアイソフォームがある:Foxo1、3および4(8、9)。Foxo1が最も豊富な(図43a)ものである場合、後者はひらめ筋以外のほとんどの筋肉種類(45)において優勢である。偶然の一致で、ひらめ筋も、生理学上遅筋線維の中で豊かになり、私たちが容易に私たちの仮説を分析することを可能にした。我々は、ミオゲニン-cre遺伝子組み換えを備えたfloxedされたFoxo1対立遺伝子には同型接合体のマウスとの交差により、骨格筋中のFoxo1発現を不活性化した。mRNA分析は、計画通りノックアウトを生じることを示した(データには示さず)。

【0276】

II型種類のファイバーが豊富な筋肉が影響されなかったのに対して(図43b)、組織学分析はMyog-Foxo1マウスのひらめ筋のI型(遅延単収縮)ファイバーの減縮を明らかにした。組織学の発見と一致して、I型の発現、ファイバーマーカーは減少した。その一方でI型ファイバーマーカーはMyog-Foxo1マウス(図43c)の中で増加した。その後、我々は筋原性の転写調節因子MyoD、Myf5およびミオゲニンの発現を分析した。MyoDは、速いファイバーの優勢な要因および緩徐繊維(44)の中でのミオゲニンである。組織病理学と一致して、Myf5発現が不変だったのに対して(図43c)、我々はミオゲニンにMyoD発現および~80%減少の2倍の増加が見られた。さらに、I型ファイバーを調節する発現、Foxo1コアクチベーターPgc1は不変であり、これは減少したFoxo1依存のPgc1転写(図43c)(46)によってMyog-Foxo1マウスの表現型を説明することができないことを示す。観察された繊維状スイッチの機能的な相関として、トレッドミルにおけるランニング性能を検討した。実際は、I型(耐久性)ファイバーの減縮から予言されるように、Myog-Foxo1マウスは低減されたランニング性能を表示した(図43d)。

【0277】

最後に、適応性があるか、細胞非自律の要因に対立するものとして、これらの変更が繊維状特異性の発展的な変更を反映したかどうか判断するために、我々はE9.5によりFoxo1(24)およびNotch1ノックアウト(25)胎芽の中のMyoD発現を測定した。Foxo1-/-胎芽、MyoDレベルは 3.1 ± 1.1 倍、Notch1-/-胎芽 7.3 ± 2.9 倍、コントロール(P、両方の突然変異体対野生体、 $n=4$ 中の <0.05)と比較して増加した。インビボで観察されたMyoD発現の増加はFoxo1の間の物理的、機能的な相互作用と一致して、またNotchは、筋芽細胞分化において重要なシグナリングネクサスである。したがって、我々は、Myog-Foxo1マウスにおける繊維タイプのスイッチが胚発生の間のMyoDを含んでいる筋芽細胞の加速された分化の結果であることを提唱する。

【0278】

議論

この研究は、FoxoとNotchの経路が筋肉分化の調節に協力するという生化学、細胞、遺伝証拠を提供する。データは、Csl NTD領域(図42f)へ直接の結合によってHes1プロモーターでコリプレッサー交換を促進するためのFoxo1作用の新しい方法を明らかにする。我々は

、このドメインへ結合するFoxo1がNotch/Csl複合体を安定させてコリプレッサークリアランスおよびMam1リクルーターを促進することを提案し、これは構造の研究(37)からのNTDの提案された役割と一致する。発見はさらにメカニズムを提供し、どれによって、2つの主な生化学プロセス、ホスホイノシトール-3-キナーゼ/Akt経路およびNotch/Hes経路、細胞の分化を生体内でコントロールする相乗効果の様式に注目する。Foxo1のための提案された役割は、その転写の機能に依存せず、Cslで直接の相互作用を含んでいる。我々は研究はNotch1シグナリングの原型のエフェクターとしてHes-1に注目するが、我々はデータはHes-1がNotch/Foxo相互作用のただ1つの媒介物であることを示すと介されるべきではない。例えば、我々は、Foxoが多数の細胞コンテキストにつけたNotchとの相互に作用することを示唆し、前脂肪細胞、PC-12およびHUVECの分化中の同様のFoxo/Notch停止を観察した(示されないデータ)。

10

【0279】

我々は、前駆細胞の維持および分化を調節するために、Foxo1によってNotchによって同化作用の合図にNotch/Foxo協力が環境上の合図を統合することを提案する。この2層をなしたメカニズムは、Foxo1が活性なときに、発展的な合図(Notch)に応じて分化を回避する様々な組織中の、つまり成長因子の欠如中で傾倒した前駆細胞を可能にする。その後、これらの細胞は、成人の組織中の休止状態を続ける。ここでそれらは、Foxo1抑制に結びつくNotchリガンドおよびホルモン/栄養上の合図のコンビネーションに応じて定期的に分化することが可能になる。この解釈は、Foxo1欠損の筋肉において観察された繊維タイプスイッチ、筋原性のプログラムの誘導者に対立するものとして、筋原性の血統内の運命決定物としてFoxo1の位置を決めるように見える観察と一致する。他のFoxoとNotchのアイソフォームも相互作用するかどうか、それらがどのようにこのプロセスに寄与するかは今のところ不明である。

20

【0280】

Foxo1が遺伝子発現の共同調整装置であるという実証は、この転写調節因子の変化し続ける機能の潜在的な説明を提供する。私たちの研究から出現する興味ある質問は、1つの機能から別の機能までのスイッチがどのように達成されるか、また、成長因子、ホルモンおよび栄養素に応じたFoxo1の複雑な翻訳後修飾が、どのようにこのプロセスに影響を与えるかである。発見はFoxo1シグナリングを含んでいる疾病プロセスの病態生理学にとって広い意味合いを持つ。我々の観察の潜在的な含意は、過度のFoxo関数(48)によって特徴づけられた代謝異常の治療としてNotchシグナリング(47)を阻害する薬剤の使用を調査する能力である。

30

【0281】

材料と方法

動物産生および分析

ミオゲニン-cre(49)およびFoxo1floxマウスは記述される(9)。野生型、ヌルおよびFoxo1flox対立遺伝子が、5'-GCT TAG AGC AGA GAT GTT CTC ACA TT-3', 5'-CCA GAG TCT TTG TAT CAG GCA AAT AA-3' and 5'-CAA GTC CAT TAA TTC AGC ACA TTG A-3'のプライマーを用いたPCRで検知された。トレッドミルパフォーマンステストに先立って、マウス(Columbus Instruments)を2日間訓練した。そのテストは、消耗まで10minの間隔で1m/minの増加を後に続けて、第1 30minの15m/minで行なった。骨格筋サンプルは、オクタ・マトリックス中で急速に凍結した。また、7つのμm連続切片が得られた。筋繊維は、メタクロマジーのATPアーゼ(50)を使用し、反骨格の遅いミオシン(シグマ)で免疫染色して分類した。胚の研究については、我々は、E9.5でヘテロ接合のFoxo1(24)またはNotch1(25)マウスおよび回復された胎芽の時間が計られた交配をセットアップした。mRNAは全体の胎芽から分離した。また、下記に述べられるように、リアルタイムRT-PCRを行った。

40

【0282】

ウイルスの発現研究

記述される(3と4)ように、C2C12細胞を分化した。Foxo1-ADA、Notch1-IC、Jagged1、アデノウイルスのCslおよびNotchデコイ、および哺乳類の発現ベクターは記述されている(3

50

6、51)。我々は、pQCXIHベクトルを使用するFoxo1ADAおよびNotch1-ICを発現するレトロウイルスを生成した。Notchデコイ(pAdlox Notch1ECD-Fc)を生成するために、Notch1(bp 241-4229、GenBank accession# X57405)の細胞外ドメインはヒトIgG Fcタグを備えた構造において融合され、pAdloxへクローニングした。レトロウイルスの上清をpVSV-Gベクトルで一時的に共同トランスフェクトされた細胞から生産され、GP2-293細胞(BDバイオサイエンス)へpQCXIHベクトルを指定した。DNAの結合する不十分なFoxo1を生成するために、私たちは、QuikChange突然変異生成キット(Stratagene)を使用して、N208とH212をアラニンとアルギニンにそれぞれ置換した。その後、変異体をFoxo1ADA突然変異体のバックボーンにおいてクローンを作成した。

【0283】

10

ルシフェラーゼ分析および共存培養アッセイ

我々は、HEK293をHes1ルシフェラーゼ(転写スタート部位からの-194~160)(Hes1/pGL2基礎)、合成のHes1-ルシフェラーゼ(4x Csl結合部位、4 x Csl/pGL2基礎)、またはCslルシフェラーゼ(-1536~22および基礎的なCsl/pGL2)レポーター遺伝子をpCMV5、pCMV5-Foxo1-ADA、pQNC-Notch1-IC、pHyTc NotchデコイまたはFoxo1 siRNAと共にトランスフェクトした。私たちはプラスミドpRSV- -ガラクトシダーゼをトランスフェクション効率のコントロールとして用いた(51)。共存培養分析について、我々は、トランスフェクションによってC2C12細胞においてNotch1を発現し、HEK293細胞においてJagged1またはのLacZを発現した。その後、我々はHEK293細胞を回収し、C2C12細胞にそれらに播した。1時間のインキュベーション後、我々は共同培養細胞を実験に使用した。

20

【0284】

ウェスタンブロットと免疫沈殿

我々は、抗ミオシン(MF-20)、抗HA(12CA5, Boehringer Mannheim)、抗FLAG(M2、シグマ)、抗Foxo1(H128およびN20、Santa-Cruz)、抗Notch1(C-20、Santa-Cruz)、抗Csl(Chemicon and Santa-Cruz)、抗NcoR(Santa-Cruz)、抗SMRT(サンタクルーズ)または抗MAML1(Chemicon)抗体を使用して、標準技術によってこれらの分析を行った。Foxo/Csl共同免疫沈殿については、我々は精製した核フラクションを使用した(52)。SDS-PAGEにおいてCslがIgG重鎖に接近して移動するため、私たちはプロテインAビーズに対する架橋抗体に対してジメチルピリミデート(dimethylpyrimilidate、DMP from Pierce))を使用し、溶出されたタンパク質複合体のIgG汚染を回避した(52)。

30

【0285】

染色質免疫沈殿アッセイ

私たちは、以前に記述されるようなC2C12細胞のChIP分析とFryerによって記述される(42)のような共同培養細胞におけるChIP分析を行なった(4)。Hes1プロモーターのCsl結合部位を増幅するために使用されたプライマー・ペアは次の通りである：

5'-GCAAAGCCCAGAGGAAAGAGTTAG-3'および 5'-AGGAGAGAGGTAGACAGGGGATTC-3'。

【0286】

siRNAトランスフェクションおよびsiRNA耐性Foxo1

Foxo1に特有のsiRNAシーケンスは5'-ACGGAGGATTGAACCACTATA-3'である。Cslの特異的なsiRNAシーケンスは5'-TAGGGAAGCTATGCGAAATTA-3'である。

40

【0287】

siRNAはフィポデクタミン-プラス試薬(Invitrogen)を使用してトランスフェクトした。我々は、シーケンス5'-ACGGCGGTCTGAACCACTATA-3'に3つの残留物(強調)をトランスフェクトすることにより、siRNA耐性のFoxo1を生成した。リアルタイムRT-PCR研究のために使用されたプライマーは要求に応じて入手可能である。

【0288】

組換え型タンパク質と相互作用アッセイ

私たちはpGEX6P-1へのクローニングによりアミノ酸1-527、1-279、1-172および279-527断片を含むGST-FLAG-Cslを生成した。GST-Foxo1構成物は記述された通りである(53)。細菌培養およびIPTG誘導に従って、私たちはGST融合タンパク質を精製し、それらを共にイ

50

ンキュベートした。その後、我々は抗FLAG抗体での免疫沈殿によりGST-FLAG/CsIを単離し、免疫の小球を広範囲に洗浄し、抗Foxo1抗血清で免疫プロットを行った。

【 0 2 8 9 】

[第 6 のシリーズの実験のための参考文献]

1. Singec, I., Jandial, R., Crain, A., Nikkhah, G., and Snyder, E.Y. 2007. The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med* 58:313-328.
2. Accili, D., and Arden, K.C. 2004. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *Cell* 117:421-426.
3. Hribal, M.L., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J.R., and Accili, D. 2003. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 162:535-541. 10
4. Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., Arden, K.C., and Accili, D. 2003. The forkhead transcription factor foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4:119-129.
5. Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K.I., Hofmann, W.K., Heeschen, C., Aicher, A., Kollipara, R., Depinho, R.A., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2005. Involvement of Foxo transcription factors in 脈管形性 and postnatal neo血管新生. *J Clin Invest* 115:2382-2392.
6. Liu, Z.P., Wang, Z., Yanagisawa, H., and Olson, E.N. 2005. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* 9:261-270. 20
7. Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., and DePinho, R.A. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301:215-218.
8. Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. 2007. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128:325-339.
9. Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., et al. 2007. FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128:309-323. 30
10. Shawber, C.J., and Kitajewski, J. 2004. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays* 26:225-234.
11. Lai, E.C. 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3:840-845.
12. Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24:36-44.
13. Ross, D.A., Rao, P.K., and Kadesch, T. 2004. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol* 24:3505-3513. 40
14. Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18:2196-2207.
15. Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122:3765-3773.
16. Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila 50

hairly and Enhancer of split. *Genes Dev* 6:2620-2634.

17. Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. 1999. Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274:7238-7244.

18. Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K.M., and Weinmaster, G. 1999. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* 126:1689-1702.

19. Wilson-Rawls, J., Molkentin, J.D., Black, B.L., and Olson, E.N. 1999. Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol Cell Biol* 19:2853-2862.

20. Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. 2001. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* 128:107-116.

21. Conboy, I.M., and Rando, T.A. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3:397-409.

22. Shawber, C.J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J. 2003. Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 995:162-170.

23. Limbourg, F.P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R.T., Chin, M.T., and Liao, J.K. 2005. Essential role of endothelial Notch1 in 脈管形性. *Circulation* 111:1826-1832.

24. Hosaka, T., Biggs, W.H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N.M., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. 2004. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2975-2980.

25. Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., et al. 2000. Notch signaling is essential for vascular 形態形成 in mice. *Genes Dev* 14:1343-1352.

26. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11:497-504.

27. Rudnicki, M.A., and Jaenisch, R. 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* 17:203-209.

28. Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. 2006. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19-37.

29. Schiaffino, S., and Reggiani, C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76:371-423.

30. Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801.

31. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122.

32. Nickoloff, B.J., Osborne, B.A., and Miele, L. 2003. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22:6598-6608.

33. Nickoloff, B.J., Qin, J.Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bonish, B., and Miele, L. 2002. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ* 9:842-855.
34. Pan, Y., Lin, M.H., Tian, X., Cheng, H.T., Gridley, T., Shen, J., and Kopan, R. 2004. gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial 形態形成. *Dev Cell* 7:731-743.
35. Dowell, P., Otto, T.C., Adi, S., and Lane, M.D. 2003. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J Biol Chem* 278:45485-45491. 10
36. Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., and Accili, D. 2001. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108:1359-1367.
37. Kovall, R.A., and Hendrickson, W.A. 2004. Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *Embo J* 23:3441-3451.
38. Hsieh, J.J., and Hayward, S.D. 1995. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268:560-563.
39. Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12:2269-2277. 20
40. Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawauchi, M. 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22:965-971.
41. Kawauchi, M., Oka, C., Shibayama, S., Koromilas, A.E., Matsunami, N., Hamaguchi, Y., and Honjo, T. 1992. Genomic organization of mouse J kappa recombination signal binding protein (RBP-J kappa) gene. *J Biol Chem* 267:4016-4022.
42. Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. 2004. Mastermind recruits C ycc:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16:509-520. 30
43. Liang, Y., Chang, J., Lynch, S.J., Lukac, D.M., and Ganem, D. 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16:1977-1989.
44. Hughes, S.M., Taylor, J.M., Tapscott, S.J., Gurley, C.M., Carter, W.J., and Peterson, C.A. 1993. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118:1137-1147. 40
45. Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., 3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., and Accili, D. 2002. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110:1839-1847.
46. Daitoku, H., Yamagata, K., Matsuzaki, H., Hatta, M., and Fukamizu, A. 2003. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *糖尿病* 52:642-649.
47. Miele, L., Miao, H., and Nickoloff, B.J. 2006. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 6:313-323.
48. Accili, D. 2004. Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insu 50

lin action: from triumvirate to republic. 糖尿病 53:1633-1642.

49. Knapp, J.R., Davie, J.K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E.N., and Klein, W.H. 2006. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development* 133:601-610.

50. Ogilvie, R.W., and Feedback, D.L. 1990. A metachromatic dye-ATPase method for the simultaneous identification of skeletal muscle fiber types I, IIA, IIB and IIC. *Stain Technol* 65:231-241.

51. Das, I., Craig, C., Funahashi, Y., Jung, K.M., Kim, T.W., Byers, R., Weng, A.P., Kutok, J.L., Aster, J.C., and Kitajewski, J. 2004. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 279:30771-30780.

52. Chi, T., Yan, Z., Xue, Y., and Wang, W. 2004. Purification and functional analysis of the mammalian SWI/SNF-family of chromatin-remodeling complexes. *Methods Enzymol* 377:299-316.

53. Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550-555.

第7のシリーズの実験

糖尿病患者はしばしば肥満および血管の病理を開発する。糖尿病の合併症に寄与する分子のメカニズムはこれから解明する。過去2年以内に、私は出生後の欠陥に対するNotch4ノックアウトマウスを評価した。これらの分析は、Notch4突然変異体マウスが糖尿病の特徴を開発することを明らかにした:1)皮下脂肪の劇的な増加に見られるような初期の開始肥満および2)糖尿病性網膜症の網膜脈管構造暗示における減少周細胞含有量。我々は、NotchおよびFoxo1(インシュリンシグナリングの転写調整、が脂肪生成と脈管形成を調節するように協力することを見出した。Notch1、Notch1/Notch4またはFoxo1に対するマウス欠乏は、脈管原性の欠陥にて子宮内で死亡する。これらのデータは、調節異常のNotchシグナルが糖尿病の肥満および血管病理学に寄与すると我々に仮定させる。提案目的は、この仮説について考察し、かつ脂肪生成と脈管形成におけるNotchとインシュリンシグナル相互作用の役割を定義する。マウスモデルは遺伝子操作を経由してNotch、Foxo1およびインシュリン受容体活性を変更するために使用されるであろう。脂肪生成および代謝性機能障害は、これらのマウスに由来したNotch4とインシュリン受容体ノックアウトマウスおよび胚の繊維芽細胞において評価されるであろう。胚・網膜の脈管形成は、Notch1、Notch4および/またはFoxo1のためのマウスハプロ不全において評価されるであろう。最後に、増殖性網膜症におけるNotchおよびFoxo1シグナルの機能は低酸素症誘導網膜脈管形成マウスモデル中で評価されるであろう。私の経歴ゴールは、糖尿病研究の分野で独立した科学研究者になることである。

【0290】

新陳代謝におけるNotch機能の評価

我々は、細胞運命決定を調節するためにNotchおよびFoxo1、インシュリンシグナル転写調整、がCSLを備えた転写の複合体を形成することを見出した。Foxo1の1つの対立遺伝子の損失は、インシュリン受容体ハプロ不全マウスにおける高血糖および高インスリン血症を救う。同様に、野生型同腹仔と比較して、マウスのNotch4の損害はより低い血糖レベルと関連した。Foxo1とNotch4は、成人ネズミ膵臓のβ-細胞におけるオーバーラップ発現パターンを共有し、Notch1が両方のβ-またはβ-細胞で発現される。この目標において、我々がさらにNotch突然変異体マウスの新陳代謝を特徴づけるであろう。さらに、我々は欠陥がNotchおよびNotch/Foxo1の突然変異体マウスの膵臓の中にあるかどうか判断するであろう。

【0291】

脂肪生成におけるNotch4機能の評価

我々は、Notch4ノックアウトマウスがより大きな脂肪組織貯蔵物を持っていることを見出した。皮膚において、Notch4が脂肪細胞と血管の両方で発現される。Notch4は細胞自律神経または細胞非自律神経機構のいずれかによって脂肪生成を調節するかもしれない。細胞自律神経モデルにおいて、脂肪細胞中のNotch機能は基質無血管画分における関連付ける前脂肪細胞からの分化を調節する。択一的に、Notch、脂肪組織内の脈管形成を調節することができる。その後、それは脂肪生成に影響する。我々はそのNotchとFoxo1が培養された繊維芽細胞のホルモン誘導脂肪生成を阻害するように協力することを確立した。インシュリン受容体突然変異体マウスにおいて、脂肪生成が乱され、かつ分化はFoxo1を阻害することにより部分的に救済された。しかしながら、Notch機能の異常がインシュリン依存の脂肪細胞分化および機能に生体内で影響する場合があるかどうかは未知である。この質問に取り組む始めるために、我々はさらに皮下・内臓の脂肪の部への焦点を備えたNotch突然変異体マウス中の脂肪の表現型を特徴づけるであろう。我々はそれから、もしNotch4不足がInsr突然変異体マウス中の皮下の脂肪の表現型を救うならば決定する。最後に、我々はNotch4とInsrの欠陥のあるマウスに由来した胚の繊維芽細胞の脂肪細胞分化におけるNotch機能を評価するであろう。我々のゴールは、脂肪細胞分化におけるNotchとインシュリン相互作用の役割を決定することである。

【0292】

糖尿病と肥満

肥満は、インスリン抵抗性、高血糖および種類2糖尿病{Eckel、2005年の#769}の発生のための主要な危険因子である。それは心血管の機能障害にもまた関係する。脂肪組織は、エネルギー超過のうちにトリアシルグリセロールを蓄えて、エネルギー剥奪のうちに遊離脂肪酸およびグリセリンを放出する際に重要な代謝機能を有する。さらに、脂肪細胞は脂肪動態と名付けられて、多くの生物活性の物質を生むことにより同化作用のホメオスタシスを調節する。脂肪動態はホルモン細胞分裂、増殖因子および他の生物活性の合成物からなる。命題はレプチン、腫瘍壊死因子アルファ、アンジオテンシンII、インターロイキン6、インターロイキン1、adiponectin、resistinおよびプロスタグランジンを含む。分泌された要因は、同化作用管の生物学を調節する際に主な役割を果たし、インスリン抵抗性と心疾患の間の接続であるためにそういうものとして提案された。肥満の発生は、インシュリンシグナルによって調節され、かつ脈管形成に依存性のように見える。脂肪細胞において、インシュリンシグナルが血管内皮増殖因子(VEGF){ミック(2002年の#767)}を誘導する。VEGFは、血管壁漏れやすさ{Yancopoulos(2000年の#65)}と同様に内皮細胞増殖、移植および分化も促進することができる脈管形成の有力な誘導物質である。肥満のマウスモデルにおいて、VEGFのアンタゴニストが脈管形成だけでなく脂肪生成{Rupnick、2002年#766を防ぐ;Fukumura(2003年の#768)}も崩壊する。したがって、脂肪組織において脂肪細胞分化および脈管形成の相互のパラクリン調節がある。

【0293】

脂肪生成の中のNotch機能

脂肪細胞分化につけたNotchの役割はちょうど解明され始める。インビトロの分析を使用して、Notchシグナルは繊維芽細胞のホルモンの誘導された脂肪生成を促進し阻害することに示した。ストロマの細胞株には、Notchがその後、脂肪細胞分化{Sciaudone、2003年の#772}の増加に結びついた骨芽細胞分化を乱した。これに対し、両方のリガンド媒介Notchシグナル、または本質的に活発なNotch1の異所的発現は、3T3-L1繊維芽細胞{ガルセス(1997年#177)の脂肪生成を阻害した;ロス(2004年の#773)}。同様に、Notch目標遺伝子の過剰発現、HES1は、繊維芽細胞{ロス(2004年の#773)}の脂肪細胞分化を阻害した。siRNAを備えたHES1発現を崩壊することはさらに繊維芽細胞脂肪細胞分化を阻害した。したがって、Notchの抑制および活性化の両方は、脂肪生成がNotchシグナルに敏感な投薬であることを示唆する脂肪生成を乱す。

【0294】

脂肪細胞に特有の遺伝子C/EBP およびPPAR の損失で関連繊維芽細胞脂肪生成のNotchを媒介とした抑制した。Notchシグナルが活性化された繊維芽細胞の脂肪細胞分化も発現

によって救済した。C/EBP またはPPAR、そのNotchの示唆は、これらの2つの遺伝子の発現を抑えることにより脂肪生成を阻害する。繊維芽細胞データと一致しているので、レチノイン酸に誘導された脂肪生成は、Notch1ノックアウト胎様体身体{ニコルズ(2004年の#770)}の中でわずかに増強された。最後に、Notch1発現は、糖尿病につけたNotchの役割が脂肪細胞分化{ヤン(2003年の#777)}を関連づけたことを示唆するインシュリン微妙な対象に関する耐インシュリン性の患者から分離された脂肪組織中で低減されると分かった。

【0295】

糖尿病における管の合併症

糖尿病患者は、主要な高血圧症、卒中、乏血、網膜症、アテローム性動脈硬化症および心臓発作を含む多数の管の合併症を表示する。しかしながら、糖尿病の管の合併症に寄与する分子のメカニズムに関してほとんど知られていない。盲目はそのような合併症のうちの1つで、それは管の起源を持っているが、よく理解されていない。20年間の診断内で、糖尿病患者の4分の1は盲目に結びつく増殖の網膜症になる。糖尿病性網膜症は、管の浸透性、基底膜の厚化、および新血管新生{の増殖期が後続する網膜の微小血管系のpericytesの損害の増加でCukiernik(2004年の#749)}を始める。管の成長因子(VEGF)は糖尿病の増殖の網膜症の進行に巻き込まれる。VEGFシグナリングは内皮細胞増殖、移住、分化および血管壁漏れやすさ{Yancopoulos(2000年の#65)}を促進することができる。種類Iおよび種類II糖尿病のマウスモデルには、転写調節因子を感じる低酸素症、HIF1 およびVEGFが目{近藤(低酸素症が糖尿病性網膜症の進行における開始の事象であることを示唆する2004年の#744)}内に増加させられることが分かった。VEGFがHIF1 {Yancopoulos、2000年の#65}の直接の転写の目標であるので、VEGFの誘導は恐らくHIF1 によって調停する。糖尿病性網膜症内にVEGFのための役割を支援して、霊長動物目の中のVEGFの異所的発現は、増殖の網膜症および黄斑の浮腫{Leberherz(2005年の#748)}の急速現像に結びつく。糖尿病のネズミモデルには、VEGFレセプタシグナル阻害剤SU5416の皮下注射がVEGFを抑え、網膜の微小血管の浸透性および血管収縮{Cukiernik(2004年の#749)}を誘導した。最後に、3つのすべてのVEGFRの阻害剤の内因性注入、PTK/ZKは低酸素症のマウスモデル{マイエル(2005年の#750)}の中の網膜新生血管を低減する。したがって、VEGF信号の調節異常は増殖の網膜症の進行に重大な役割を果たし、さらに他の糖尿病の管の合併症に寄与することができる。

【0296】

新陳代謝におけるNotch機能の評価

我々は、NotchおよびFoxo1、インシュリンシグナルの転写調整がCSLを持つ転写複合体を形成し、細胞運命決定を調節することを見出した。Foxo1の1つの対立遺伝子の損失は、インシュリンシグナル欠陥のあるマウス(Nakae 2002年ng)において高血糖および高インスリン血症を救出する。マウスにおいて、血糖レベルの著しい減少に関連するN4の損失は、野生体同腹児に匹敵する。Foxo1のようにNotch4は新陳代謝を調節する際にインシュリンシグナルに反対するかもしれない。グルコースとインシュリンのレベルを循環させることは、肝臓のように組織を生産するグルコース、および島状細胞を生産するインシュリンの両方によって調節される。膵臓の細胞細胞およびFoxo1遺伝子組換えにおける増加したFoxo1シグナルは、細胞失敗および糖尿病(Nakae 2002年ng)導く。Foxo1とNotch4は、Notch1が両方の細胞を発生しながら、成人マウス膵臓の細胞におけるオーバーラップする発生パターンを共有する。したがって、Notch4および/またはNotch1は膵臓島の内分泌腺の細胞に機能を持っているかもしれない。この目標には、我々がさらにNotch突然変異体マウスの新陳代謝および膵臓を特徴づける。Notch突然変異体マウスは交差されるL2、Ttr-Insr-/-マウス(図21)、かつN4および(または)N1不足がこのInsrの不十分な背景の中で観察された糖尿病・膵臓の欠陥を抑えるかどうか判断するために使用される。

【0297】

脂肪生成におけるNotch機能の評価

我々は、N4ノックアウトマウスが皮膚の脂肪異常発達を持っていることを見出した。N4突然変異体マウス中のこの脂肪組織表現型は、脂肪細胞の細胞の自律の欠陥、または非細胞の自律の脈管原性の欠陥から発生するかもしれない。N4のハプロ不全マウスとは対照的

にInsr欠陥のあるマウスは脂肪組織発育不全になる{Cinti、1998年#774を表示します;北村、2004年の#745}(岡本JCI 2004)。支配的な陰性のFoxo1の異所的発現は脂肪生成を回復するInsr-/-胚の繊維芽細胞{Nakae(2003年の#765)}。我々は、NotchとFoxo1が繊維芽細胞のホルモンに誘導された脂肪生成を阻害するように協力することを見出した。インシュリンシグナル(図3)を備えた停止中のFoxo1機能以来、Notchはさらに脂肪生成にインシュリンシグナルに対して反対する機能を持っているかもしれない。脂肪細胞と一致している、Notch4のための自律の機能はNotch4は皮下の脂肪細胞内に発現される。したがって、我々はNotchとNotchに由来した胚の繊維芽細胞のNotch機能脂肪生成をInsr欠陥のあるマウスに対して評価する。我々はさらに皮下脂肪欠陥を特徴づけて、Notch突然変異体マウス中の内臓の脂肪組織を評価する。最後に、我々はNotch4不足がInsr突然変異体マウスの皮膚の脂肪組織欠陥を救う場合、測定する。

10

【0298】

肥満のマウス・モデルにおいて、VEGFのアンタゴニストが脈管形成および脂肪生成{Rupnick(2002年#766)の両方を阻害し;Fukumura、2003年の#768}、脈管形成と脂肪生成の相互の調節があることを示す。N4のハプロ不全マウスがさらに網膜の脈管形成の欠陥を表示するので、皮下脂肪の観察された増加は内皮細胞機能障害から発生するかもしれない。したがって、我々は、さらに違いがNotch突然変異体マウスの脂肪組織血管にあるかどうか判断するであろう。

【0299】

[第8のシリーズの実験]

20

[マウス血漿に存在するラットNotch1デコイ]

マウス血清に存在されるラットNotch1デコイ

哺乳類血流におけるラットNotch1デコイ系生物の安定性を試験した。図118に示すようにNotchデコイは哺乳類循環システムで安定である。

【0300】

ヌードマウスは、制御アデノウイルスまたはラットNotch1デコイ(rN1デコイ)を発現するアデノウイルスで注入された。注入後2週間において、リンパ液は収集され、かつ4マイクロリットルがウエスタンブロット分析で評価された。この分析は、全長ラットNotch1デコイタンパク質(図118の矢印参照)がマウスにおいて発現でき、かつ分解の僅かな証拠で検出レベルにて現れることを証明する。

30

[第9のシリーズの実験]

ヒトNotch1デコイ(h-Notch(1-36)デコイ)およびラットNotch1デコイブロックマウス乳房腫瘍増殖

ヒトNotch1デコイおよびラットNotch1デコイの活性は、乳房腫瘍細胞株、Mm5MT-FGF4、の増殖に対して比較される。図119に示すように両方のhNotch1デコイおよびrNaotch1デコイはMm5Mt-FGF4の増殖速度を減少する。

【0301】

我々は、ヌードマウスでMm5MT-FGF4細胞増殖に利用する腫瘍モードを開発した。この実験で、 2×10^5 Mm5MT-FGF4細胞はヌードマウスに移植し、かつ4日間後のアデノウイルスをFC制御にコードし、ラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイは眼球静脈に注入した。Notchデコイはマウス肝臓に感染され、かつ血流に分泌されるアデノウイルスによって生産される(図118の例)。図119に表される増殖曲線は、ラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイがヌードマウスの腫瘍異種移植の増殖を減少することを証明する。

40

【0302】

ラットNotch1デコイが肺組織へのSKNEP1転移を阻害する

Notch1デコイはマウスモードで転移をブロックできる。我々は、腫瘍増殖およびユーイング肉腫細胞株、SKNEP、の転移に対するラットNotch1デコイの活性を試験した。この腫瘍モデルにおいて、SKNEP腫瘍細胞は腫瘍が増殖し、それから肺に転移された子に同所性に移植する。SKNEP腫瘍細胞のラットNotch1デコイの発現は、図120に示すように腫瘍増殖および肺への繊維を減少する。

50

【 0 3 0 3 】

SKNEP1ユースイング肉腫細胞は、制御FCタンパク質またはラットNotch1デコイス1 (sort 2) またはラットNotch1デコイス4 (sort 4) を発現するためにプログラムされる。6 週間の腫瘍増殖後に、肺への転移は組織学的に評価した。ラットNotch1デコイを発現するSKNEP1細胞は、転移に対して陽性であった僅かな肺を示した。我々は、ヌードマウスのラットNotch1デコイの発現がSKNEP1細胞の容量を減少し、肺に転移することを結論する。

【 0 3 0 4 】

[第 1 0 のシリーズの実験]

Notch1およびNotch4はマウス皮膚のリンパ管中でVEGFR-3およびLYVE-1で共発現する

Notch1およびNotch4はマウス皮膚のリンパ管で発現する

我々は、マウスP4背部皮膚の脈管構造でのNotch1およびNotch4の発現を分析した。この時点で、経皮リンパ管は表面近くのリンパキャピラリーに活発に再造形し、かつ低経皮層の管に集まる。皮膚の 5 μ m 断面はNotch1またはNotch4 (赤) およびPECAM, VEGFR-3またはLYVE-1 (緑) に対する抗体で共染色された。Notch1およびNotch4は、血液およびリンパ管内皮細胞マーカー、PECAM (上部パネル、図 1 2 1) での重複するパターンの発現を共有する。Notch1およびNotch4は、両方のVEGFR-3 (中間パネル、図 1 2 1) および経皮脈管構造のLYVE-1 (下部パネル、図 1 2 1) で共発現された。この発現パターンはNotch1およびNotch4が発現され、かつ新生児新皮のリンパ管で機能するかもしれないことを証明する。

【 0 3 0 5 】

真皮リンパキャピラリーはNotch4変異体マウスで変化する

我々は、P4マウスの経皮リンパを試験した。野生型セクションおよびNotch4ヌル接合体はPECAMおよびLYVE-1 (緑) に対する抗体で免疫染色される。PECAM染色の分析は変異体と野生型皮膚 (上部パネル、図122) の間に同様に見られた。これに対し、Notch4マウスの皮膚のLYVE-1-陽性管は野生型のそれより異なる形態学を有する (中間パネル、図122)。Notch4マウスLYVE-1管はしばしば拡張され、かつLYVE-1染色は不連続であった (下部パネル、図122)。これらの結果は、Notch4シグナルがリンパ血管網状組織の再造形に関与してもよいことを提案する。

【 0 3 0 6 】

Notch4損失は減少されたLYVE-1陽性管を結果として生じる

Notch4異型接合性 (N4+/-) マウスは交尾され、結果として得られた子の背部皮膚は取り除かれ、かつ出生後 1 4 日に包埋される。結果は図123に示す。皮膚の断面は、内皮細胞マーカー、PECAM (データ示さず)、またはリンパ内皮細胞マーカー、LYVE1 (A) に免疫染色される。それぞれに対して5つの領域は顕微鏡によって捕捉され、かつPECAMおよびLYVE1染色は画像ソフトウェア(B, C)を用いて定量される。PECAM発現は野生型(WT) 新皮(B) に比べてN4-/-新皮で約25%に減少する。LYVE-1染色は、WTマウス(C) に比べてN4-/-で約50%減少されるLYVE1染色でPECAMより影響を受けた。WT (A) に比べてN4-/-リンパでLYVE1 染色の強度での減少であった。

【 0 3 0 7 】

マウスのNotch4機能の損失はリンパ管形成における役割を示唆する皮膚リンパの発達を崩壊する。

【 0 3 0 8 】

Notch1およびNotch4はヒト乳がんが発現する

我々は、ヒト乳がんのVEGFR-3またはLYVE-1 (緑) およびNotch1またはNotch4 (赤) に対する抗体で二重免疫組織化学をなした。結果は図124に示す。Notch1およびNotch4は腫瘍外血液およびヒト微小乳頭乳がんのリンパ内皮で発現される。測定するために、もしNotch1情報伝達が腫瘍リンパ内皮内で活性化されるならば、我々はポドブレニン (podoplanin) (緑) およびN1Val (赤; 細胞シグナル) に対する抗体で二重染色し、抗体は活性化Notch1ペプチドを特別に検出する。活性化Notch1ペプチドの発現は、殆ど (白矢印) 観測されるが、リンパ内皮核 (下部パネル) の全て (黄色矢印) ではない。これらの結果は、Notch1が病理学的なリンパ管で活発に情報伝達することを証明する。これらの結果は、またNo

10

20

30

40

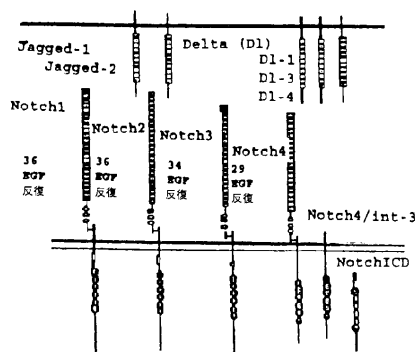
50

tch1およびNotch4が腫瘍リンパ管形成に機能するかもしれないことを証明する。

【 図 1 】

図 1

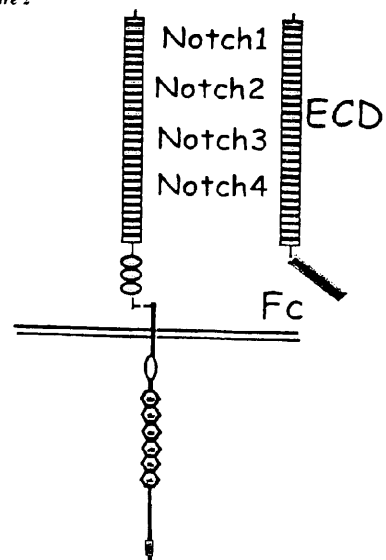
Figure 1



【 図 2 】

図 2

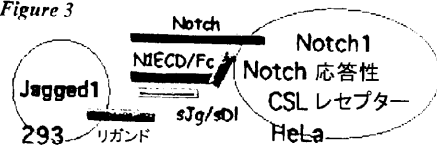
Figure 2



【 図 3 】

図 3

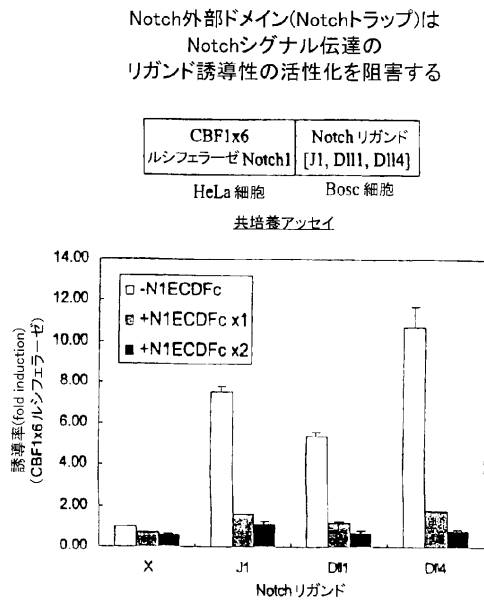
Figure 3



【 図 4 】

図 4

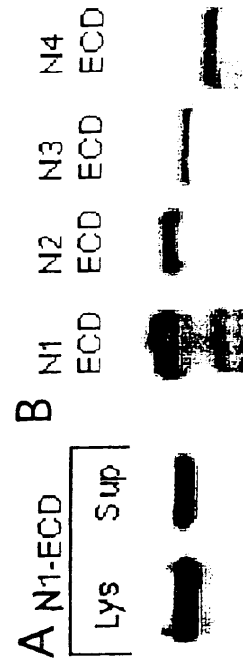
Figure 4



【 図 5 】

図 5

Figure 5

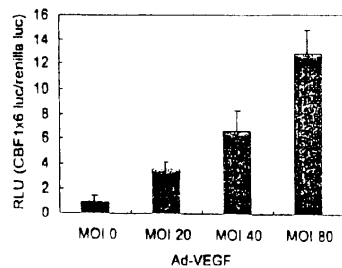


【 図 6 】

図 6

Figure 6

VEGF-165をコードするアデノウイルスに感染した
HUVECにおけるNotchシグナル伝達の活性化

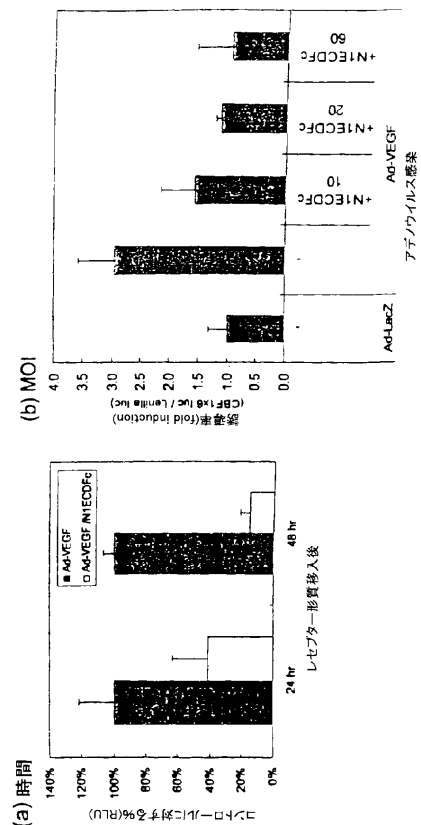


【 図 7 】

図 7

Figure 7

Notch外部ドメイン(Notchデコイ)はアデノウイルス感染HUVECにおける
VEGF刺激により誘導されるNotchシグナル伝達の活性化を阻害する

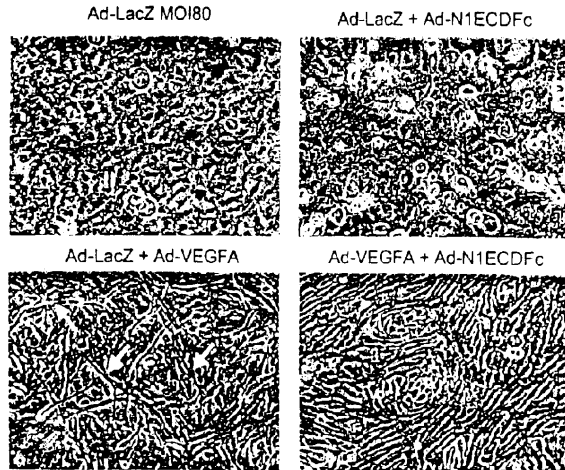


【図 8】

図 8

Figure 8

NotchデコイはI型コラーゲンゲル上のVEGFの過剰発現により誘導されるHUVECの発芽を阻害する

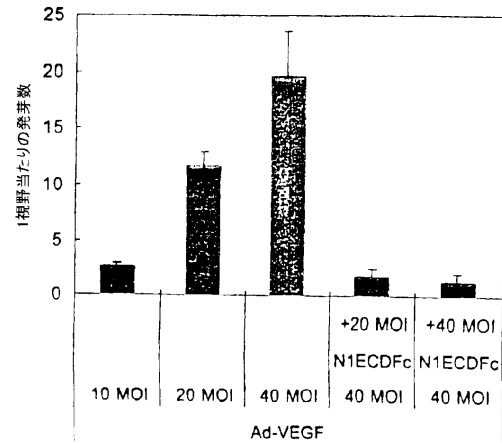


【図 9】

図 9

Figure 9

NotchトラップはI型コラーゲンゲル上のVEGFの過剰発現により誘導されるHUVECの発芽を阻害する



【図 10】

図 10

```

1 mprllaplic ltlpalaar gircsqpsq cinggrceva ngteacvcsq afvgqrcqdp
51 spclstpcnk agtycyvdhg givdyacscp lgfagpilit planacianp crngqcdll
121 titeykercp pgwagkscq adpcaanpca nggclptee sylcgcpqpg hqptcrqdv
181 acsqnpglcr hqgtchneig syrcacraeth tghpcelpyv pcspcpqng gterctgdt
241 hccacilpgfa gqnceenvdd cpqnnckngg acvdgvntyn cccpewtgq yctedvdecq
301 lmpnacqng tchshggya cvcvgwtgse dcadnidcca saacfggac hdrvaafyce
361 cphgrtgllc hindacianp cnegancdtn pvngkaictc prgytgpac qdvdecalg
421 npeehagkcl ntlgafecq lggtygprce ldvneclanp qndateldq igefqicmcp
481 gysgycel ntecasocpl nqrcvdkln flcgcpkgf ghilcqvdyd ecaatpckng
541 skldgpnity tcvtcepgtg tchevdidee dgdphchigl hddqgdlcl dsgtclakid
601 etninechaq pchhgctcd rdnvylclcl kgtggncl nldcaanpca dpgygtghhe
661 gycacacpgy tgmenvnd ecagapchng gtccedgiagf tccrpegyhd ptclsevmec
721 nnpchihgac rdglnykc dcapgwagtc dinnneean pcvngtckd mtsqyvtcr
781 egfsgpncqt nlncaanpc lnqgtciddv agykencpl ytgatecvvl apcatapcka
841 gvcckesedy eafscvcpq wqgtccidid necvkpcprh gaaqctngcs yrelcagayt
901 grncesdidd crppchngg actdgvnnaaf cdelpgfaga tceedineca tnpqnganc
961 ldcvdaytct cpgtnglhc enntpdcetes scfnggtcqd glnstclcp pgftgagcyq
1021 dvneclanp lhggtcdav gytketcpqg rgtgghcel nvdchppid pasrpkfcm ngctcdvqvg yctctppgfv
1081 yhecragwt gfnedlva cevasqkrgi dvtllcqhgg lcvdeedkhy chagaggytga
1141 ycevdvdece pmpcngatc tdyllgffack cvagyhgcne eeineclag pcqnggtcid
1201 ltntykcwp rgtgghcel nvdchppid pasrpkfcm ngctcdvqvg yctctppgfv
1261 gercedvne clmpncpgrg tqnvcqvnd fhcceraght grceaving crqkpcmgg
1321 vcaaanter gficerparf egatcncrcl tcelargclng gtclagfagf ngilchldy sft 1433
1381 pccqfpass cvganpcynq gtceptseep fyrcelpakf ngilchldy sft 1433

```

リンカー配列
DLGPA

Figure 10

【図 12】

図 12

Figure 12

```

1 mglgargrrr rrrlmalppp pppmlalpl1 lllaglaaa ppcldgspca nggrcthqgp
51 alsaalcclp gwvgercqls dpcaspcag rvgcqsavva starfscrl rfgqgdcacq
121 pdpcvarpcv hgpcavqpd grfacacppg yqgqcasvd decragttr hqgtclntps
181 stfrcqplay tgllicenpv pcaspacrnq gterqasvdt ydcacilpgfa gqnceenvdd
241 cpghrcnlng tcvdgvntyn cccpewtgq fctedvdecq lqpnachngg tclallggha
301 cvcvgwtgse scqnnidcca tcvcthgacc hdrvaafyce cpmgtgllc hddcaanpca
361 chedalcdtn pvagraictc ppgftggacd qdvdecalg apcehlgrcv ntqgaficq
421 gxytgytcca tdvneclap crngatcldr lqgtfclcm gfttycevd idccaspvcv
481 ngvckdrvm gftctcpqf agmqlqldc ecaatpckng akcvdpgdy ecrcaegfeg
541 tlcernvddc apdpchgrc capgytgrc sqvdecreq perygkclid crpytgthc
601 lvdylcrpc pgttgvncev nldcaanpca tgyvcrdgin rydcvcpqf tglpcnwein
661 ecaaspccge gscvdegngf helcpggalp pclpanhpc ahkpcshgvc hdsppgtrcv
721 cpgwagpccr sqalpdace apgqaggtc tcdgigfct capgfighgc evlapctpal
781 cehghhcead pdrivcscp pvgwpprcqg dvdecagasp cphgtctnl pgnfricrh
841 gytgpfcded idddcpncp hggacqdvq sfecscldgf apgcaradv eelaspccpg
901 tcdhvasft cccppgygf hcdilpde pscnngacc vdwaaafcl crpytgthc
961 qyeadpcfar pchhgacmp thpffctcr egfsgcqn pvdccqape qngcrvqvg
1021 ayicppgya grlclqalp cteaaqmgv rleqlcggg xcldkgrhy cvcpgrtga
1081 hcehvdpcr apcqhggc rymgygyce cpagygdac ednldecaa pccnggacld
1141 lvyrlcscp pgtlyvict nedddclgpa ldagvclhn gtvclvvgf rncpccpgrt
1201 lhceadinec rpscahaht rdcldqpggh frcvchpgft prcqialap ceapccqghg
1261 qchhlgrg gltctchcv pfwlgrcev arcelclcp gvlpcqter gprccppal
1321 spgarvava spagatnasc asapchggc clpvgqvff rvcapwgg prctcpaa 1379

```

リンカー配列
リンカー配列なし

【図 11】

図 11

```

1 mpaalpaalr allwllwga gpaahlgcr ggepcvnegt cvtyhngtgy crpcpgllge
51 yqchrdpckc nrcqnggtcv tqamlgkac rcapgttged cqvstshpcf verpcqnggt
121 chmlawdtye ctcqvgtfk ccqcdvclis hpcengstca svangfacrc pagitgqkd
181 adinecdlpg rcqhggtcln lpgayrcqcp qrtfgqhcda pyvpcapcp vnggtcrqg
241 dftacchelp gfgancern iddephnkq ngvvcvdyv tynrcppqg tggfctcdvd
301 eellgpnacq nggtctnrg sygcvcvngw sgddcenid dcafaactpg atcidrvaaf
361 scelpcgkag llchlddaci enpchgkalc dtnlpgqyl ctcpgykgca dcdedvdeca
421 mansanpcha gkvtnddga hceclkgayg pccmdinec hsdpcndat cldkggfctc
481 lmpgfkchv celevneqg pcvngngcv dvnarfgle ppgftspvcq lldidcaasp
541 clngakclth pnygcgcac stfgclcdem ldncdpdpch hggcqdlda ylcicngym
601 galcadqide cyaspclndg rclldvngyq cncqpgtqgl ctcpgykgca dcdedvdeca
661 dglnrycvc apstfgtgrn lldidcaasp crkdaticnd vngfcmcpce gphhpcyqg
721 vneclapci hgnctgglag ykclcdagw glncevdkne clenpcqng tcmnlvngy
781 ctkxgfkgy ncvnideca anpclngtc ldvagtych cmlpytgknc qtlvapcpa
841 pcenaavcke apnfesfcl cpvgwgqrc tvdvdeavk pcmmngichn tqgaymccp
901 pfgagmdee dindclanp qnggscvdkv ntfaccllpg fvgdckqtd necleapckn
961 ggtcdyvne yttctepagf gvhcnndie dvnarfgle tcvdinefe clcpvgfttp
1021 fclhdinec anpncngtc vdlgtyvzct cplgytgknc qtlvncaps pcknkgctag
1081 ekarpcrlcp pgwagaycdv invckaaal kqgvvheic qhagiclnag ntkhccqplg
1141 ytgayceql decaanpchg gatcedfjgg yrcvcvpyg gnvcyevde cqnqpcqngg
1201 tclidvnhfk cccppgtrgl lceaidcca gephclngg cvdriggayc relpgfager
1261 cegdinecl npeasegald clqknnyc vcrasftgrb cetfldvcpq kpcclngtca
1321 vaenvpdlf crppgfgsa rccagsgqvq crsgcgvht aosphefcpn hkdcaagca
1381 nqchgstcy pqrqpyyyc rccpfvngah cshaptaps 1419

```

リンカー配列
DLGPA

Figure 11

【図 13】

図 13

Figure 13

```

1 mqpallllll lplnfpvlt rcllcgsape pcangctclr larggicgc apglfgetc
51 fdpdcdtql cknngscgal ltpgpcrap tslpfpfac tcepgfgrd cqtthlelcp
121 pafcanghce yvasegrpqc scepsvteq cqlrdfean pcangvcla tpgqlcrpc
181 pglfeghtcer dlnecfleg pcpqgtachn tlgayqclcp vggspqckl rkagcpagac
241 lnggtcqlvp eghatfhcl cpgftglde emnpdcdvch qcngatclid glidytlclp
301 ktwkgwdece didecearp prcrngtccq ntagatveve vevagsgce enldcaast
361 cspstclidc vafacclcp spehgsaci ntpgfnclc lpgygtgare adhneclap
421 yegatqhdl dcqnaqgpg spehgsaci ntpgfnclc lpgygtgare adhneclap
481 chpgatclid lathclcp gleglceve vnctanpel ntagatveve vevagsgce
541 tgarcekdmd ecastpcang grcrdpgaf vceclpgfeg pchekevde ldpccvga
601 clidpaffc lcrpftgql cevpcltpm cpqgqcgqg ehrapclcpd gpgcvpaad
661 ncpchngc ralcvedegv tsgcetelg geistcpahg gthcpgaggy nctcpagym
721 lceaeavac hspclnsgs calrpgygc tclpctgsh cqtavdhvcs aelnggtcv
781 nkgpftfcl atqfqlhce aktncpca permactqd pcragatclcs ppytgeact
841 lldicarkpc phtarclqg pafqclclq wgladclpl acqknaagg ielsglcpf
901 glcidcgay fercppsfqg klcdmvpnc pnpchhgtat cvpgegyve cqpagygqg
961 ckwldccqg qchuhgtct erpgthcac ppgfalrce gvdvcldrp chpgatgach
1021 wlnafygc lpghtgrea vendlcagp cengseact tpppftch cpgkfeptc
1081 ahxalagbh hchngclcp apkgppclc clagfsgpd cltppapga spppcilng
1141 tctctpggn pfgatcapp apgpcrpg 1170

```

リンカー配列
DLGPA

【 図 1 4 A 】

図 14A

Figure 14A

```

1 atgacaggct tccagggttg ccaggccctg ctgcattctg ccaaggccgt ggttcgcttg
61 agatgctccc agccaagtgt gacctgcctg aatggaggga ggtgcgaagt ggcacaaggc
121 actgaagcct gtatctgcag cgaagcgttc ttggggccag gatgcaggaa cccagccctc
181 tgccctcagca caccatgtaa gaatgctgga acgtgctaat ttgtgagcaa tggcggcctc
241 gtggacttatg cctgagttgt cccctgggtg ttctctgggc cctctgcctt gacacctctg
301 gccaatgctt gctctggcaa cccctggcgc aacgggggga cctgtgacct gctcactctc
361 acagaaatca agtgcgcgtg ccgcctcagg ttgctcaggaa agtcatgtca gcaagccgaa
421 cccctggcct ccaacccctg tgcgaatgtg ggcctcagtg tgcctcttga ttactcagtg
481 atcttgctgt ccccccgcgg ctccatcagg cccactctga acatgagat tgctctctat
541 agccagaacc ctgggttggt cgcctcaggc ggcactgtgc agctgcctta cgtgcctctg
601 cgtctgctct cgtctgcacc ccaactcgtt ccccacttgc agctgcctta cgtgcctctg
661 agccctctca cctgcagaaa cgaaggacct tggccgctta cgggggacac caccacagg
721 ttgtccttgc tgcagagctt ttgtggacag aactgtgaag aaatgtgga tgaactccca
781 ggaaacaact gcagaaacgg gggtgctctg gtggacgggt tgaatcctta caattgcgcg
841 tggccacagg atgcagcagg tgcgtcctgc agcagagatg ttggacagtg tcaagctcatg
901 cccaaagcct gccagaatgg cgaagcctgc cacaactccc acatgagat tgctctctat
961 ttgtctcaatg cgtggactgg ttgagactgc agtgaagaa ctgagtctg ttgctctctg
1021 gctctgtttt cgtggcacc ctgccactgc cgtctgctt ccttctactg cgaagtctca
1081 ctaggggcgc caggctcgt gtgcacctgt aacgttgcgt gtatcagaa cccctgcac
1141 gagggtctca actgcacac caaccctgtc aacggcaagg ccatctgac ttgcctctg
1201 gggtcaacgg ggcctgcctg cagcagaggc gtggatgagt ggcctctagg tgcacaacgg
1261 ttgagctcgc cgggaagtgt cctcaacaca ttgggctctg tgcagctgca ctactctgc
1321 ggtcactctg ggcctgcctg tgagattgat ttgacagagt gctcagctg ctactctgc
1381 aatgatgcca cgtgcctgc ccaagattgg gatttctcag gtatgtgat gccaggttat
1441 gagggtgtat actgtgagt caacacggag gattgtgcca gacgccccgt tctacacat
1501 ggccgtctgc tggacagat caacgagttc ctgtgtcagt gtcccaagg cttcagcggg
1561 caactgtgca agtctcagtg ggttgagtg gcacacacac catgcagaa cggcgcacag
1621 tgcttgagtg ggcctgcacc ctacacttgc gtgtgcacag aaggttaccg ggggacccac
1681 tccagagtggt caattgaca gtgtgacctt gcccctgtgc actatggtt gtgcaagagt
1741 ggttgagcca ccttactgt cctctgcagg ccaagctaca caggcctaca ctgtgagacc
1801 aaactaatg agtgtcacag ccagcgtgc cgcctggcg gcaactgcca ggaactgtac
1861 aaactacac tctgtctatg cctcaagggg accacaggag ccaactgtga gatcaatctg
1921 gatgctgtg cgaagcaacc cttgtgacct ggcactgtgc agatggctac cgaatggctac
1981 gagtgtggt agtgcagcgt cttcagcagg agcatgtggt gcatgcagg ctactctgc
2041 cggcgagcgc cctgcacaaa cggggcgctc ttgtgagctg gcatgcagg ctactctgc
2101 cgtgcctcgc agggctacca cgaacctcag tgcctgtctg aggtcacaag gtgcacaagt
2161 aacccctgca tccatggagg ttgcgggagt ggcctcaatg gatcaaaatg tgaactgtgc
2221 cctgggtgga gtgggacaaa ctgtgacatc aacaacaatg agtgtgagtc caaccttgt
2281 gtcaacggta gcaactgcaa agcatgacc agtggctcag tatgcacctg ccgagaaggc
2341 ttctagtgtc gacactgcaa gacaaatctt aacgaatgtg cttccaaacc ctgcctgaac
2401 cagggaact gcaattgaa ttgctgtcgg tacaaatgtg actgcctctt gccctataca
2461 ggaagcaat gtgaggtgtt gttggcctca ttgcccacaa cctcctgcca aagctgtgga
2521 gtatgcagg agtctgagaa ctatgagagc ttctctctgt ttgttccac agctgtgcaa
2581 ggtcaaaact gcagatcga catcaatgag ttgttgaaaa gccctgtctg ccaatggtgc
2641 tcttgccaga acaccaatgg cagctacagg tgcctctgcc aggtgtgcta cagcgctcgc
2701 aactgcgaga gtgacatcga tgaactgcga cccaacccat gtcaacaagg ggtttctctg
2761 actgacgggg ttcaacgggc cttctgcgac tgcctgcgcc gcttcagggg tgcttctgtg
2821 gggggaggg ttcaacgggc cgcacagcaat ccatgcraaa atggcgcaaa ctgcactgac
2881 tgggtggaga gctacagtg cactgcgcac acgggctcca atggatcca ttgcgagaac
2941 aacacactgt actgaccca gactcctgt ttaactgggt gcaactgtgt ggaatggttc
3001 aactcttcca cctgtctgtg cccactctgc ttacagggca gctactgtgt ggaatggttc
3061 aatgagtgtg actcagcgcc ctgtctgcat ggtggcaact gccaagacag ctatggtacc
3121 taaagtgtta cctgcacaca gggctacact ggtctcaact gccaagacct ttgtgcgtgg
3181 tgtactcag ctccctgcaa gaattggcgc aagtgtctgc agacaaacac acagtacac
3241 tgcagtgccc gcacggcgtg gactgtctc aactgcgagc tgcactagt gtctgcagg

```

【 図 1 4 B 】

図 14B

Figure 14B

```

1301 gtggctgcac agaagcagg catcagatgc actctectat gcragcacgg agggctctgt
1361 gtggatgagg aagacaagca ttactgcac tgcaggagag gatacacggg cagactactgt
1421 gaggacagg ttgacagagt cccactaat cctgcaga acggagccac ctgactctgac
1481 tatctcggtg gcttttctgt caagtgtgtg cctgggtacc atgtctcaa ctgctctgac
1541 gagatcaacg agtgcctatc ccaacctgtc cagaatgggg gtacctgat tgactgtgac
1601 aacactaca agtgcctcgt ccccggggc acacagggtg taccatgga gatcaacgac
1661 gatgactgac atctcctctt agacctctgt tcccgaagcc ccaaatgctt caataatgac
1721 acctgctagg accaggtagg tggctatacc tgaactcagc cgcagagctt cgtcggggag
1781 cgtgcgagg gcatgtcaa tgaatgtctc tccaaacct gtgcccacg tggcaccag
1841 aactgcgtgc agcgtgttaa tgacttcaa tgcagtgcc gggtggcca cactggagc
1901 cgtgtgagt cgtcattaa tggctcagg gcaaaacat gcaggaatgg aggtgtctgt
1961 gctgtggcct ccaacacccc cgttgattc atctgtaggt gccctgcggg cttcgaggtg
4021 gccactgtgt aaaaagcgc cgcacttgt ggcagtttgc gctgcctcaa cgttggtac
4081 tgcactctag ccccacggc tcccacttgc ctatgcctgc cgtctctca tgccctcaa
4141 tgcaggttcc caccagcag cccctgtgtg ggtagcaac cctgcacaa tgaaggcag
4201 ttgtgagcca catcagagg cccctctcac cgtgtcttat gctctgcaa atccacagg
4261 ctgctgtgac acatctgga ctacagcttc acn 4293

```

【 図 1 5 A 】

図 15A

Figure 15A

```

511 atgccccttc tgcgtccgc cgcgtcggg
541 gctcgtgtgt gctgtggt gtgaggcgg ggcctcgcgt acgctttgca gtgcgagg
601 gttccacag cctgtgttaa ttggggagc ttgtgtt acacaacgg cagaggtcac
661 tgcagatgct cagagagcct cttgagaaa taattgtcaac atcgagacac ttgagagag
721 aacccgtgtc agaatgtgtg taactgtgtg acgcaggcca ttgtggaaa agcactcctg
781 cgtatgtctc cagggttccac agggaggagc ttgcataact cgaactctca cccctgtttt
841 gtttccgcgc cctgtcagaa ttggagtgac ttgcacatgc tgaactgtgga cactctatgag
901 tgcactctgc aagttgctt caccagaaaag cagtgtcagt ggaacagatg cttctgtctc
961 catccctgtg aaatgggag cactgtgac ttgtgtgcca accagttctc ctgcagatgt
1021 cctgcagcca tcaacggcca gaagtgtgac gcccacatca atgaatgtga catccacga
1081 cgtgcctcac atggtgggac ctgctccaac cttctgggt cctacagatg ccaactgcct
1141 cagcgggcca caggagcca cgtgcacag ctttaagctgc cctgtgcacc ctcacactgc
1201 gtcaatggga gcaactcgc ttgagcagc caacttctgt ctgaagca ttgctgtcca
1261 ggtttttagg ggaagcactgt cagcgggaat atcgacact gcccatacca caggtgtcag
1321 aatggagggg ttgtgtgtga cttgagcaat attacaact cgcgtgcacc cccctgtcag
1381 actggggcgt ttgtcagaca agactggat agtgtctgc ttgcagccaa tgccttctag
1441 aatggagcca cttgcacaaa cgcacagga ggtacagct cgtgtgcgt gaacggctg
1501 agtgggggtg actgcagca gaactcagat gctctgtcct ttgcttctgt caccggcagg
1561 tccacccctc ttgactgtgt ggcctctctc tctgtccttt gtcacaggg aaaggcagg
1621 cctctgtgct atcgtgtgct cactgtgctc ttcaactgtg gcaactgtgt cactgtgtg
1681 gatccaaacc cctgtatgtg cagtgatatt ttgacactgccc cagaggctca caagggtcct
1741 gactgcacag aagactgtga ttgagtgtct atggcaaca gtaacctgtg tgagatgca
1801 ggaagtgtgt tgaatcaga ttgcgctct cactgcaggt gtctgaagg ctacgcagg
1861 cctcgtgtgt agtggacat caacagatgt cactcagacc cctgtcagaa cgaagccacc
1921 tgcctgtgta agtttgggg cttacactgt cttgtcagtc cgggtttcaa aggtgtgcat
1981 tgtgaactgt agtgatga ttgcagagc aacctgtgt taacacatgt gcaagtgtg
2041 gacaagatca atgccttcca gtgtctgtgt cccctgtgt taacaggacc agtgcgacc
2101 atcgacattg acgactgtc cagtactccc ttgctgaatg gggccaaagt catcgatcac
2161 ccgaatggct atgaatgca gtgtgcaca ggaattcaat gcaactgtgt tgatgagaa
2221 atcgacaact gtgaccgga tcttggcacc catggccagt gccaggtatg gattgtctc
2281 taccacgca ctcgaacc cgggtacatg ggaactctct tgaatgacca gatgatgaa
2341 tgcacagca gctcctgct gaatgatga cgtgtcagt acctgtgaa ggcctacag
2401 tgcacatgccc aacgggtac ctcaggcctt aattgaaaa ttaattttga ttgctgtgct
2461 agcaacccct gtctgcacgg agcctgtgtg gacggcatca accgttacc ttgtgtgtg
2521 tctccggagt ttacagggca gagggtcaac atagacattg atgagtgtgc cttcaacccc
2581 ttgcgcaagg atgcgagctg catcaatgac gtgaatggt ttccgtgtat gtgcctgag
2641 ggaacacac atccagctgt ctaactacag gtaaaagagt gtttgagcag tccctgcatc
2701 caggaact actgagtggt ttctcagag tatagtgag ttgagtgagg agggggtt
2761 ggtatcaact ggaagtgga caaaatgag ttctttcta accgtgcca gaacggagg
2821 acatgtatac acctgtgaa ttgctacagg ttatcatgca agaagggtct caaaggctat
2881 aactgcagg ttgaacataga ttggtgtgct tgaacccgt gtctgaacca agggactgct
2941 cctgagtgc ttgagtgtca cactgcac ttcatgtgct cttacacagg caagaattgt
3001 caacgggtg ttggcctcgt cttccctaac cgtgtgaga accgtgcagt ttgtaaaag
1061 gcaacacact ttgagagctt cactgtcgtg ttgtcccctg gctggcaagg tcaagctgtg
1121 acagtgact ttgagtggtg ttctcagag cgtgtatga acaatggcat ctgcataat
1181 actcagggc gactcagtg cgaagtcct cccgtctca ctgactca gtataga ctgagaga
1241 gacatcattg actgccttgc caaccctgc cagaacggag gctctgtgt ggaacagt
1301 aacactctct cctgcctgtg cttctctgct ttctgagggg acaagtgcac aacagacatg
1361 aatgaatgc ttgagcagcc ctgtaagat ggggggacct gctctgcca cgtcaacagc
1421 taccactgca cgtgccttgc gggcttccat ggaatccact gtgaaaaaa catcatgag
1481 tgaactgga gctcctgttt caatggcggc acgtgtgtgt atgggataca cttttctct
1541 tgcctatgct cgtgtgggtt cactgtctcc ttctgcctcc atgatatcaa ttgagtgcag
1601 tcaacccgtg gctgaatctc ggaacgtgt gtgtatggc ttggtacca cgaatgacc
1661 tgcctctgtg gctactatg aaaaactgtg caaatctgga tgaactgtg cagccctct
1721 cctgtataa acaaaaggac ttgctctcag aaaaaggca ggcacgctg cgtgtgtcgt
1781 cctggatggg atggcgcata cctgtatgtg ctaaatgtgt cctgtaagg cgaagctg

```

【 図 1 5 B 】

図 15B

Figure 15B

```

1841 cagaaaggag taactgttga acactgtgct cagcactggt gtatctgtat caatgctggc
1901 aacacgcac actgcagtg cccctggggc taccagggga gctactgca ggaacagctt
1961 gacagagtg cgtcacaacc atgcccagat ggtgcacat gtagtatga agtggacagg
4021 tacaagatgt agttgtctcc aggggtacag ggtgtcaact ctgagtatga agtggacagg
4081 tgcagaaact agcctgtcca gaacggggg ctttgtgaa agaacatga tgaactgtgt
4141 tctcgtgtgc caccagggac cggggcggg ctttgtgaa agaacatga agtggacagg
4201 ggggcccccc actgcttaa ttgtgacac ttgtggacc gataatgga atgcctgtcc
4261 cgtcttttgc ctggttttgc ttgggggggg ttgaggggg acataaatga atgcctgtcc
4321 aaactctgca cctcagagg cagccttggg ttgacttgc ttgacttgc ttgacttgc
4381 gctgcggcca ggccttccac agggcgacac ttgcagaaact tctatagatg gtgtccccac
4441 aagccttgcc tgaatggagg gacttgtgt gtggctgca cactgctga ttgcttcaat
4501 ttgctgtgtc cccaggggt ctcgggggca agatgcgga cgaactgtg acaagtgaag
4561 tgcagaaagg gggagcagt ttgtcacac gccctgggg ccaactgct ctgcggcaac
4621 cacaaggact gtagtgtag ttgcgtagt aaacctgccc agcaggagg cactgtcac
4681 cctacgcgcc agcctctta ctactcttgc cgtgtctccc accggttctg gggcagccac
4741 tgcagaggt acacagcccc caccagg 4767

```

【図 16 A】

図 16A

Figure 16A

```

60
61 tggggctggg gggccggggc ggcggcgccg gtcgtgcctt gatggccttg ccaccgccac
121 caccgcccat gggggcgctg cccctgctgc tgcgtctagc ggggctgggg gctgcagcac
181 ccccttgctc ggaaggagac ccatgtgcaa atggaggctg gtcgacccac cagcagccct
241 cccctggaggc tgcctgacct gtcctgccag gctgggtggg tgagcggtgc cagctgggaag
301 acccttgcca ctcaggccct cgtgtggcgc gaggcggttg ccagagttca gtcgtggcg
361 gaccccgccg atctctcctg cgtgtgctcc ggtgcttcca agccccagac tgcctggcagc
421 cagaccctcg cgtcagcagg cctgtgtctc atgggtcccc ctgctcagtg gggcgcgatg
481 ggcgatttgc ctgtgacctg ccacctggct accagggtca agctgacca agtgacatag
541 atgagtgccc atctgtgaca acttgccgtc atggtggatc ctgtctcaat acactggat
601 ccttcgcctg ccagtgctct ctgtgttata caggcgctgc gtcgtgagaa cccgtatgic
661 cctgtgcccc ttcctcgctg cgtaatgggt gcaactgtag gcagagcagt gatgtcacat
721 atgactgtgc ttgccttctc gacttcaggg gctcagaaact tgaagtcaac gtggtgacct
781 gtcctgggca ttgctgtctc aaagggggaa cgtgtgtaga cgtgtgtcaat acctcaaat
841 ggcagtgccc tccggagttg accggcgagc tctgtacaga agatgtggat ggcctgacag
901 tgcagcccaa tgcctgccac acgggggata cctgctcaa ctaactgggt ggcgccagct
961 gctgtgtgt cactgtgctg acgggtggga gctgcagtca gaactcgaat gatgtgcta
1021 cagcctgtgt ttccactggg gccacctgac atgacgtgtg ggctcttttc tactgtacct
1081 gccctatggg gaagacaggg cctctgtgct atctggatga tgcattgtgc agcaacctcc
1141 gccatgaggg tgcctatctg gacacaaacc ctgtgagtgg ccgggcctac tgcacctgcc
1201 caccctgctt cactggaggg gcatgtgacc aggatgtgga tgaagtctcg attgggtcca
1261 accctctgga accatttgggt cgggtgtgta atacacaggg ctcatctctg tgcacatgtg
1321 gcccgctgca taccgagcct cgtgtgaga ctgatgtcaa tgaagtcttc tccgggccct
1381 gccgcaacca ggcctgctgt ctgtgacgaa ttggcagct tactgtcat tgcagggag
1441 gcttccacag gacctactgt gagggtgaca tgcagcaatg tgcagagcag ccatgtgca
1501 atggtggctg ctgcaaggac agagtcaatg gcttcaagct cacttgccca tgcagattca
1561 gtgggtccat gtgtcagctg gctgtggatg agtgtgcaag cactccctgc cggaaatggg
1621 caagtgctgt ggaaccagct gacgctatg agtgcgtg tgcagagggc tttaggggca
1681 ccttctgtga gcgaacgtg gatgaactgc ctccggatcc ctgccacac gggcgctgtg
1741 tcatggcat tgcagcttc tctgtgtctt gtcgcccaag ctatacgggc atacgctgtg
1801 agagcagggt ggaagagctc ggcgccagc ctgtgtgata tgggggcaaa tgcctgagct
1861 tggtagaaca gtaacctcgc cgttgtctc ccggaacac aggtgtgaa tgtgaagca
1921 acattgatga ctgtgccagt aacctctgta cctttggagt ttgcctgat ggcataaac
1981 gttatgactg tgtctgcag cctggattca caggccccct ctgcaacgtg gagatcaatg
2041 agtgtgcacc cagccactgt ggaagggggt gctcctgtgt ggaaggggaa aatggcttcc
2101 actgctctg tccacctgga tccctgcctc cactttgctt acctgcgaa cactcctgtg
2161 ccccaagacc ctgtagctat ggaagtctgc atgatgcacc agggcggttc cgtgtgttt
2221 gtgagccctg gtgaggtgac cctcgtgtga gccagacct ggcctcaagt gctgtgagt
2281 cccagccctg ccaggctggt ggcacctgca ccagtgatgg aataggcttt cgtctgacct
2341 gtcgccccgg attcagggc caacagtggt aggtgtgtgc cccctgtact ccaagcctct
2401 gtgagccctg aggcacctg gactgtgacc ctgacggctt gactgtctgt tccctgtctc
2461 cagctgggca agcggccaga tgcagcagg atgtgtgata atgtgcgggt gctctcaact
2521 gccgccccca tggtaactgc accaacctgc cagggaattt caggtgtcat tgcacagg
2581 gatacactgg ccccttctgt gatcaagaca ttgacagctg tgaacccaac cgtgtctcc
2641 atgtgtgctc ctgcccagat gscgtgggct ccttttctgt tcttctgctc gacggtttg
2701 ctgtgtctcg ctgtgccaga gatgtggagc aatgtctgag cagccctgtt ggccttgga
2761 cctgtactga tcaegtggcc tcttcaact gtgcctgtcc acctgtgaa ggaagcttcc
2821 actgtgagat tgaacttgcc gactgcagcc ccagttctgt cttcaatgga gggacgtgtc
2881 tggatggcgt gactctcttc agctgtctgt gtgcgcccg ctacacaggg acacactgcc
2941 aatacagggc tgaacccctgc ttttcccgcc cctgtctgca cgggggcctc tgcacccca
3001 ccccaacagg atttgaatgc acctgcgggg agggcttca tggagtgag tgcagaacc
3061 cagtgagctg gtgcagccag gcaacctgtc agaattgggg tgcgtgtgtc cagactggg
3121 cctactgcat ttgtccacct ggaatgaagt gccgctgtg cgacatacaa agcctgccct
3181 gccagggggc gcagccccag atgggggtga ggttggagca gctgtgtgag gaaggtgaa
3241 agtgcataga caaggccgc tccactact gttgtgttcc agaggccgt acgggtagt
3301 actgtgaaca cgaagggtg cctgcacgg ccaagcctg ccagacggg gcaactgac

```

【図 17 A】

図 17A

Figure 17A

```

117
121 agccctagtt gctgtctg cgtctcttgc cactcaattt cctgtctc ctgaccagag
181 agctctgtg tgaagatgc ccagagccct gtgcacagg aggcacctgc ctgaggttat
241 ctcagggaca agaatctgc cactctgca agatgggtg ggttgaagct tgcaggttct
301 ctgacccctg caggatata ccaactgca gaaatgggtg cactctgca cctctgacat
361 ccaacccccc agctccctg atctcactt aaacccatct ggaagagctc tgcctacct
421 gccctctggt cttcaacgtg gatgcagcc aaacccatct ggaagagctc tgcctacct
481 cttctgtctc caacgggggt cactgtatg ttcaagcctc aggcgcacca cagtgtctct
541 gcagacctg gtggacgggt gagaatgac agctccaga cttctgtca gccacacaa
601 gtgcacagg aggcgtgtgc ctggccacat acccccagat ccaagtgcgc tgcctacct
661 ggttccagggt tcaacctgtg gaacgcagca tcaacagtg cctctggag ccgggacct
721 gccctcagg caactctggt gactgcagc tgggttctca ccaagtctc tgcctgtg
781 ggcaggaagg tccccagtg agctcagga acctgtgga cctctgga agctgtctca
841 atggggggac ctgccagctg gtcccaggg gacactcac cttctatc tgcctgtg
901 ccccaaggtt cagcgggctg gactgtgag tgaacccaga tgaactgtc aggcacaggt
961 gtcaaaagg ggcacactgt ctggatgggc tggataccta cactgtctc tgcaccaaga
1021 catggaagg ctgggagctg tctgaagata tgaatgaatg tgaagccgg ggtccctc
1081 gctgcaggaa cggltggcaac tgcagaaaca cagctggag ctttcaact gtgtgtgta
1141 gtgtgtggg cgtgtgagat tgaagagaa acctgtgga agctgtgtg gcaactgtg
1201 cccggggatc cactgcact gacgtgtg gctcttctc ctgctctgc ccaactggag
1261 gcacaggct cctgtgccc atggaagaca tgtgtttag tcaagcgtc cactgtgag
1321 cccagtgcg ccccaacct ctgacaggt ccacctctg ctatagccag cctgtgact
1381 caggatccac ctgtaccaa gatctggat agtaccacat ggcacagaa ggcacagtc
1441 cctgcagaca tggcgtctc tgaatcaaa cccctggctc cttcaacgtc cctgtgctg
1501 ctgtgtacac gggctccgc tgtgaagct accacatga gtgcctgtca cagcctgac
1561 acccaggcag cactgctg gactgtgt ccaacttcca ctgctctgc ccaactgtg
1621 tggaggagg gctgtgtg gtgggggtca atgagtgac cttcaatccc tgcctgaac
1681 aagctgctg ccatgacct ctcaacgggt tccagtgct ctgcttctt ggaatcacg
1741 gcgccgagt tgaagaagac atggagagt gtacgcagc cccctgtgc aatgggggc
1801 gctgcaggaa cggltggcaac gacttctact ccagagttct ccaaggtctt gaaggagac
1861 actgtgagaa agagtggtc gactgtgga gtgacacct cccgtgggt ggcagctgc
1921 tgaatctccc cggagactc tctgtctct ccgctctg tttccacagg caacttgt
1981 aggttccctt gtgcacccc aacatgtgcc aactggaca gcaatgccaa ggtcaggaa
2041 acagagcccc ctgctctgc cctgacggaa gctctgtgt tgtctctgc gaggacact
2101 gccctgtca ccatggccat tgcagagat cctgtgtgt gtgtgtgag ggtgtgactg
2161 gcccagatg cagagacaaa ctgggtggt cactctccc acctgtgct catgggggga
2221 cctgcccacc acagctctt ggcacaaat gactctgccc tgcagctac atgggttga
2281 cctgtgtgga gaaagtga cctgtgtcact cagggcctg tctcaatggt gactcttga
2341 gactctgctc tgaaggctat tctgtcact ccttccaag tcaacaggt gctcagctg
2401 agactgctg ggaacactgt gtgtgtgct cgtgctcaa tgggggtac tgtgtgaaca
2461 agcctggcac tttctctgc cctgtgcca ctggttcca gggcgctgac tgtgtggaga
2521 agactaaccc cagctgtgca gacagccctt gaggaaaca ggcacactgc caagacac
2581 ctagaggggc cgtgctctc tgcagccctg gctatacagg aagcactgc cagactctg
2641 tgaattgtg tgcctggagg cctgttccc acctgtgctt cagactcag agtgggctc
2701 cgttccagc cgtgtgctt cagagtgga cagggtctt ctgtgactc cactgtctc
2761 gccagtggc cgaatgagc caagctgag agctctgg tctgtgcaa atgtggagg
2821 tctgtatga cagggctcc tctattctt cactgtgccc tctgtgact caaggagaa
2881 tatgcaggaa taatataaac cctgtgagc ccaactcctg ccaacagg tctactgtg
2941 tgcctcagcc cagtgctat gctgtcagt gtgcccagg ctatgaggga cagaactgt
3001 caaagctact tgaagctgt cagtcacagc cctgcacaa ccaaggac tgaacttca
3061 ggcctggagg cttccactg gctgcccct caggctctgt ggaactgct gttgaggag
3121 atgtggatga gtgtctggac cggcctctc accctggccc cactgactt tgcacttct
3181 tgcagagc ctttactgc cagctctgt cgtggcaca aggcagagg tgtgagggt
3241 agatggact ctgcaagc caactctgt ccaatggag atctgtgag atcaacaag
3301 ggcaccccc tggcttccc tgcactgac ccaagggtt tgaaggccc acctgacg

```

【図 16 B】

図 16B

Figure 16B

```

3361 gtggtt.acat ggggggctat gtgtgtgagt gtcacagctg ctatgtgtgt gacagtgtg
3421 aggaataaat agatgagtgt gcttcccagc cctgccagaa cggaggtctc tgtatgata
3481 ttgtggcccc ctatctctgt tctgtcccc ctggcacact gggagttctc tgtgagatca
3541 atgaggacga ctgtgaccta ggcctacccc tgaactcagg cgttcagctg ctacacagatc
3601 gcacctgtgt ggaacctggg ggtggcttcc gctgatactg tccccagga tacacaggtc
3661 tgaactgtga ggcagacatc aatgagtgct gcccggtgct ctgcatgca gccatatact
3721 gggactgctt acaagatcca ggtggcatt tccgtgcgt ctgcatctt ggcttcacag
3781 ggctctgctg tcaagattgt ctgtccccct gtgagtcaca gccatgtcag catggaggcc
3841 agtgcctgca cagcctagc cgtggagggt ggctgacct cactgtcac tgttccccc
3901 cactctgggg tctgctgtgt gagggggtg cagctctgt cgaagagctg cagtgcacc
3961 tgggtatccc atgcccagc acagccctg gaccaagctg cgttctct cccgggctgt
4021 cggggccctc ctgcccgggt tctaggcgct caccctcagg agctactaac gccagctg
4081 cctctgcccc ttgtctgcat gggggctcat gctacctgt acagagtgc ctttcttcc
4141 gctgtgtgt cgtctcggc tggggcgccc cgtgtgtga gacccctcc gcagc 4196

```

【図 17 B】

図 17B

Figure 17B

```

3361 acaaagccct ttcctgcggc atccatcaact gccacaatgg aggcctatgt ctgcccctcc
3421 ctaagccagg gtccaccaca cctgtgctt gccctcagtg ttttggggg cctgactgtc
3481 tgacacctcc agctccaccg ggcctcggtc cccctccacc ctgctgcac aatggtacct
3541 gcactgagac cctggggtg ggcacccgtg gctttcaatg cacttgccct cctgactctc
3601 caggggcccg gtgtcaaaag ccaggg.1626

```

リンカー配列

```

GAT CTG GGC CCG GGC
D L G P G

```

【 図 18 A 】

図 18A

Figure 18A

```

1 atgcccgcgc tccgtgcgcc cctgctctgc ctggcgcctg tgcgccgcct cgcgcgcacga
61 gggccgcgcgc gctcccagcc cggtagagcc tgcctgaatg gcgggaagtg tgaagcggcc
121 aatggcacgg aggcctgcgt ctgtggcggg gccctcgtgg gcccgcgatg ccaggacccc
181 aaccctgcgc tcagcacccc ctgcaagaac gcggggacat gccactgctg ggaaccgcga
241 ggctggcgag actatgcctg cagctgtgce ctgggctctc ctgggccccc ctgctgacga
301 cccctgggaca atgctcctgc caccaccccc tgcgcgaacg gggggacctg cgaactgcctc
361 acgctgcaggg agtacaaggc agctgcctcc cccggctggg cagggaatcc ctgcagcgag
421 gctgacccgt gcgctccaca cccctgcgcc aacggctggc agtgctctgc cttgcggccc
481 cctacatctc gccactgcgc acccagcttc catggcccca cctgcccgca ggaatgtcaac
541 gactgtggcc agaagccggg gctttggccc cagggagcca cctgcacaca cgaagtgctg
601 cctacacgct gcgtgcgcgc tgcaccccac actggcccga actgcgagcg gccctacgtg
661 cccctgcagcc cctgcgcctg ccgaagcggg ggcactgcct gccacacggg cgaactgcac
721 cagagtgtgg cctgcctcgc aggtccacc ggcacagact gtgaggaana tatcagcagt
781 gctccaggaa acaactgcga gacggggggt gctgtgtgag acggcgtaga cactcaacaa
841 tgcctgcctc cgcgcagctg gacaggtcag tactgtaccg aggatgtgga cgaagtgcag
901 ctgatgccaa atgctgcgca gaacgggggt acctgcacca acaccccggg tggctaccaac
961 tgggtgtgtg tcaacggctg gactggtaga cactgcagcg agaactatga tgaactgtgc
1021 agcggcgccg gcttccacgg cagcaactgc gactgcctgt tggcctccct ctactggcag
1081 tgcctccact gcgcgcaggg tctgtgtgac cactcaacg agcatgcctc cagcaacccc
1141 tgaacggagg gctccaaact gcacaccaa cctgtcaatg gcaaggccat ctgctaccaac
1201 ccccgccggg acacgggggt ggcctgcgag caggacgtgg atgatgtctc gctgggtggc
1261 aaccctgggg agcatcgagg caagtgcctc aacacgtctg gctccttcga gtgcacagt
1321 ctgcggggct acacggggcc cggatgcgag actgcagctc acgagctgct ctgcagcccg
1381 tgcgcgaacg accgccactg cctggaccag attggggagt tccagtgcct ctgcactgcc
1441 ggtctacggg gtgtgcactg cgaagtcaac acagacgagt gtgccagcag cccctgctg
1501 caacatggcc gctgctcgga caagatcaat gacttccagt gcgagtgcgc cagggcctc
1561 actgggcctc tgtgccagta cgaatgggac gactgtgcca gccacccctg caagaatggt
1621 gccagtgccc tggaccggac caacacttac accctgtgtg gcaaggagg gtacacgggg
1681 acgcaactgc agggcggaact cgaatggtgc gaacccgacc cctgcacca cggctcctgc
1741 aagagcgggc tgcgcacctc cactgtgccc tgcgcacagg gctacacgg ccaacacgt
1801 gagcacaaac tcaacgagtg ctccagccag cccctgcgcc acggggcgac ctgcacagg
1861 cgcgacaaac cctacccctg ctctgctcgg aaggggacca caggaccaca ctgcagatc
1921 aacctggagt actgtgccag cagcccccgc gactcgggca cctgtctgga caagatcgat
1981 ggcacagagt gtgctctgga gccgggctac acaggagaca tgtgtcaac caacatcgat
2041 gactgtcggg gccacccctg ccaacacggg ggcacctcgg aggacggcat caatgcctc
2101 accctgcgct gccccgaggg ctacacagac cccacccccc tctctgaggt caatgagtgc
2161 aacacgaacc cctgcgctga cggggcgctg cgggacagcc tcaacgggta caagtgcagc
2221 tctgaactcg ggtgagagtg ggtgagagtg gactcaaca acaactgagtg tgaatccaac
2281 cctgtgtctc acggcgagc ctgcaaaagc atgacagtg gctacagtg cactgcagtg
2341 gaaggtctca gcggtcccca ctgcacagcc acaatcaacg agtgctgctc caacccatgt
2401 ctgaacacgg gcaactgtat tgacagctgt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgccc
2461 tacacaggtg ccaactgtga ggtggtgctg gccccgtgtg ccccccagcc ctgcagaaac
2521 ggcggggagt cagggcacat caggagctat gagagctctt cctgtgtctg ccccacgggc
2581 tggcaagcag ggcagacactg tgaggtcgac atcaacagat gctgtctgag cccgtgcggc
2641 caaggcgcat cctgcacgaa caccacggg ggcctaccgt gccactgcga ggcgcgtac
2701 agtggggcca actgcagagc cgaactgcac gactgcggcc ccaacccctg tcaacacggg
2761 ggctcctgca cagacggcat caacacggcc tctgcgact gctgcccgg cctccggggc
2821 acctctctgt aggagggcat caacagtggt gccagtgacc cctgcgccaa cggggccaac
2881 tgcacggact gctgagacag ctacacgtgc accctgcggc caggcttcag cgggactcac
2941 gctgagaaac actgactctg ctgcacagag agctcctgct tcaacgggtg cactgcgtg
3001 gaacggctca accgtctcag ctgcacagag acccccggct tcaacgggag cactgcccag
3061 caactgtca atgagtcgga ctcaacagcc gctctgcat ggcggcgctg tcaaggaggg
3121 tggcgctctc acaggtgcac ctgcacccag ggcactacat gccccaactg ccaagacact
3181 gctgactggt gtagctctc gccctgcag aaccggcgca atgctggga gacccaac
3241 cagtaccgct gcagtgccc cagcgctgg accggcctt acgctgcagt gccacgctg
3301 cctctggagg tggctgcgca gcgacaagg gtgacgtgt cccgctctg cagacatgga

```

【 図 18 B 】

図 18B

Figure 18B

```

3361 gggctctgtg tggacgggg caaacacgac cactgcctgt gctaggcggt ctacacaggg
3421 agctactgtg aggaactggt ggaacgagtg tcaaccagcc cctgcagaa cggggccacc
3481 tgcacggact acctggggcg ctactcctg aagtgcgtg ccgctacca cggggtgaac
3541 tgccttgagg agatcgagga gtgctctcct caccctgcgc agaacggggg cactgcctc
3601 gacctcccca acactacaa gtgctcctg ccaagggcca ctcaagggt gactgtgag
3661 atcaacgttg acactgcaa tccccctgtt gacccctgtt cccggagccc caagtgttt
3721 acaacgggca cctgcgtgga ccaggtgggg gctacagct gcaactgcc cccgggcttc
3781 gtgggtgagc gctgtgagg ggaatgcaac gactgcctc ccaatccct cgcgcggctc
3841 ggacccagga actgcgtgca gcgctcaat gacttccat cggagtgcc tgcgtgtac
3901 accggggccc gctgcagtc cgtcatcaat ggtgcgaag gcaagccctg caaagatggg
3961 ggcacctgct cgtggtcct caacacggcc cgcgggtca tctgcaagt cccctgggg
4021 ttcgagggcg ccaactgtga gaatgagct cgtacctgc gcaagctgc ctgcctcaac
4081 ggccgacat gcatctcgg cccggcagc cccactgcc tgtgctggg cccctcacg
4141 gggccgaat gccacttccc gggcagcag cccctgctgg gcggcaaccc ctgctcaac
4201 caggggacct gtgagccca atccagagc cctcttacc gttgctgt ccccgccaa
4261 tccaacgggg cctgtgcca catcctggac taccgttc 4299

```

【 図 19 A 】

図 19A

Figure 19A

```

13 atgcccgc cctgcgcc gctctgctg gggcctgct ggcctctggt
61 cctgtgctgc cggccccccc gcatgcactg cagtgtcgag atggctatga acctgtgta
121 aatgaaggaa tctgtgttac ctaccacaa cctgcagagt actgcaaatg tccagaaagg
181 ttcttggggg aatattgtca acatcgagac cctgtgaga agaacccgtg ccagaaatgt
241 gggacttgtg tggccccccc catgtgggg aaagccactg gccagtgtgc ctcaagtttt
301 acagggaggg actgcagata ctcaacatct catccatgct tctgtctcgc acctgcctg
361 aatggcgcca actgcatatg ctacagcgcc gctacactgt agtgacactg tcaagtggg
421 tttacaggga agagtgaca actgcggagt gcttgcctgt ctaccccctg tgcnaatgga
481 agtactctga cactgtgagc caacagatgc gacatccaga gactctgagg cactgaggg
541 cagaaatgtg agctgtatgt caactgagtg tgcactgccc ctacgggctt caccggcgag
601 acctgcctca acctgcctgg tctctaccag cctcaccctt gctgcaatgg aggaacctgt
661 tactgtgaca gctgtatgt gccctgcgca cctcaccctt gctgcaatgg aggaacctgt
721 cggcagactg gtagcttcat ttttagtgcc aactgccttc caggttttga agggagcacc
781 tgtgaggaga aattgtatga ctgcctaac cacaagtgtc aaagcgaggg tttgtgtgtg
841 gatgggggta aacttacaac ctgcggctgt ccccccacat ggaacagaca gttctgaca
901 gaagatgtg atgagtgtg gctgcagacc aaactgcctt aaagcgaggg cactgtgccc
961 aacggcnaat gaggctgag ctgctgtatgt gctacagct ggaatgcgta gactgcagtg
1021 gagaacattg atgattgtgc ctgcgctccc tgaactccag gctccacact cctgcagcgt
1081 gtgcctctct tctcttgcac tgcgccagag gggaaaggcg gctcctctgt tcatctggt
1141 gatgcattga tcaagaaatc tgcaccaag ggggactgtg gtgacccaaa cccctcaaat
1201 gggcaataca ttggcacttg cccaaaggcc tacaaggggg ctgactgcac aagaatgtg
1261 gatgaatgtg ctatgggcaa taagaactct gtagcactg caggaaaaat tctgaacag
1321 gatggcgctt tcaactgga gtagctgaag ggtatgtgag gaactctgtg tgaatggag
1381 atcaatgagt gccattcaga cccctgcag aatgatgcta cctgtctgga taagatgga
1441 gacttccatc gctctgcat gccagtttc aaaggtgtgc attgtgaact aagaataaat
1501 gaatgtcaga gcaacccctg tgtgaacaat gggcagtggt tggataaagt caatgcttc
1561 cagtgctgtg gctcctctgg tctcctggg cagatttgc cagattgatc tgaatgactg
1621 tcaagatctc cgtctgga tggggagag tgaatgact acccgcaatg ctatgaatgc
1681 cagtgtgcca caggtttcac tgggtgtgtg tgtgagga gactgcacca ctgtgaccc
1741 gatccttgc ccaatgatca gttcaggaat ggtattgatt cctacacctg cactgtcaat
1801 cccgggtaca tggggcccat ctgcagtgac cagattgat aatgttacag cagccttgc
1861 ctgaacgagt gctcgtgat tgaactggtc aatggctacc agtgcaactg cagccagggc
1921 acgtcagggg taaattgtga aattaatttc gatgactgtg caagtacccc tttgatccat
1981 ggaactgcta atgagggct taatgctcac agttgtgctt gctacacagg atccacaggg
2041 cagagatgta acattgcat tgaatgagtc gctacaccc cctgtgcaac ggggcacaa
2101 tctatcaacg gctggaatgg tttcctgtgt aatgtcccgg aggaacccca tcaaccagc
2161 tctactcac aggtgaacga atgcctgagc aatccctgca tcaactggaaa ctgtactgga
2221 ggtctcagtg gatataagtg tctctgtgat gcaggctggg ttggcatcaa cgtgaagtg
2281 gacaaaatg aatgccttcc gaatccatgc ttaaaagctt atactgcca ggtgaatgt
2341 aatggaatac ggtgactgt caggaagggg ctaacggctc gttctgata catagtgag
2401 gatgaatg ctcaaacct atgcctgaac caggaacaaa gttctgata catagtgag
2461 tactctgct actgtgctg gctacacaa gctcaacaa atgacagat atggtgcac
2521 tgttcccaa accctgtgga gaatgctgt gtttgcaag atgacacaaa tttgagagt
2581 tatactgtgt tgtgtgctc tggctggcaa ggtcagcggc gataactga catgacag
2641 tcatctcca agcctgcat gaacatggc cctgccata acacccagg cagtacatg
2701 tgtgaatgt caccagctt cagtgtatg gactgtgagg aggaactgga tgaactgctt
2761 gccactcctt gcaagaatgg aggttctctg atggaaggag tgaactctt cctcctgctc
2821 gctctcctgg gttcactgg ggaataatgc cagacagaca tgaatgagt tctgagtga
2881 cctgtgaag atgaagacc atgctgaac caggtacaa gttacactg caagtgcag
2941 gcaagcttg atgagagac ctgagaaac caatcaatg agtgactgga gactgtgct
3001 tcaatgggt gccatgtgt tgaatgagt aactcctct cctgtgtgt cctgtgctg
3061 tcaactggat cctctgctt ccatgagat aatgaatgca gctctatc atgctggaat
3121 gagggaactg gttgtgatg cctgggtacc taactgtga gctgcccct gggctacact
3181 ggaaaaaact gtcagacct gttgaatcct tgcagctgg ctacatgtaa aaacaaagt
3241 acctgtgttc agaaaaagc agagtccag tgcctatgt cactgtgag ggtggtgct

```

【 図 19 B 】

図 19B

Figure 19B

```

3301 tattgcgag tcccacatg cttctgtgac atagcagcct ccaggagagg tgtgctgtt
3361 gaacacttgt gccagacatc aggtgtctgc atcaatgctg gcaaacgca ttaactgtag
3421 tggcccttgg gctaatctgg gagctactgt gaggagcaac tcatgtagt tgccttcaac
3481 cctgcctcag accgggggac atcgagtga tcaactggtg gatacagtg caggtgtgc
3541 ccaggctatc aggtgtcaa ctgtgagtca ctgtgagtga aactattcca agtgcctgc
3601 cagatgggag gccactgtat tgaactgtgt aactattcca agtgcctgc
3661 actggggggc tactctgtga agaaacatc gatgactgtg cctgcctgtt gctgctgtt
3721 aatgggtggc agtgatgga taggttggga ggtcactgtt gtcgtgctt gctgctgtt
3781 actggggggc gttgtgagg agacataac gactgcctt ccaacccctt cagctgtgag
3841 ggacgcttg actgtatac gttccaact gactacctt gttgttgcg tagtgcctt
3901 actggcggg actgtgaac cttgtcgtat gttgttccc agatgcccct cctgaatgga
3961 gggacttgtg ctgtggcag taactgctt gatggtttca tttgcggtt tcccgggga
4021 tttccgggg caaggtgcca ggcagctgt ggaacatgga aatgtagaa gggggagcag
4081 tgtgtgaca cgtcctctgg acccctgct tctgcccga gtcgccgga ctgcagta
4141 ggtgtgcca gtacccctg ccagctcggg ggaactgag accctcagc ccagcctctt
4201 tactactct gcc 4213

```

【 図 2 0 A 】

図 20A

Figure 20A

```

77      atgg ggcgcggggc ccgtggccgc ccgcgcgcgc gtgcgccgat
121 gtcgcgcgca ccgcgcgcgc caccctgcgc gcgcgcgcgc ctgcgtgcgc tgcgcgcggg
181 gccggggggct ccgcgcgcgc cttgcctgga ccgaagccgc tctgcaaatg gaggtgcctg
241 caccgcagctg ccgcgcgcgc aggtgcctg ccgtgcgcgc cctgcgtcgg tgggtgcgcg
301 gtcgcgcgctg gaggcgcgcg gtcctgcgcg ccctgcgtgc ggcgcgcgctg tgcgcgcgag
361 ttcagctggtg gctgcgcgcg ccgcattctc atgcgcgcgc ccgcgcgcgc tccgcgcgcgc
421 tgcctgcctc ctgcgcgcgc cctgcctcag cagccctctg gccgcgcgct ccgcgcgcgc
481 atggggggccc gatggagcgt tctctgcctc ctgcgcgcgc ggctacragg gccgcgcgct
541 ccgaagcgac ggcctgcgct ggcgggtggg tgcgcgcctg ccgcctgggt gcacctgcct
601 caacacaccc tggctctctc gctgcagctg tccagctggc tacacagggc cactatgtga
661 gaaccccgcc gtcgcctgct caccctcacc atgccttaac gggggcaccct gcagcgagag
721 tggcgagcttc actacgcagc gtgcctgctt cctctgggtt gagggtcaga attgtgaagt
781 gaaagctgac agctgcgcag gacacagctg tctcaaaagg ggacacagcg tggatggcgt
841 caaaccttat aactgcgcag gccctctcga gtggacaggg cagttctgca ccggagagct
901 ggatgagctg cagctgcagc ccaacgctct ccacaatggg gtaacctgtg tcaaacgctg
961 ggggtggcgc agctgcgcgt gtgcacatgg ctggacaggg gagagctgca gtccaaatat
1021 cgatgactgt gccacagcgc tgtgcttcca tggggccacc tgcctagacc gcgtggcttc
1081 ttctctatgt gctgcgcgca tgggcaagac tggcctcctg tgcctacctg atgcgcgctg
1141 tgcgcagcgc actgcgcagc aggtgcctct ctgtgcacac aatccgctga accgcccggc
1201 cacttgaccc tgcctctcgc gcttcacggg tggggactgt gccacagctg tggcagagt
1261 ctctatctgc gccacccctc gcagacaccc ggcacagctg gtgaacagcg agggctctct
1321 cctgtgcgag tgcgctgctg gctacactgg acctgcctgt gagaccgctg tcaacagctg
1381 cctgtcgggg cctgcgcgaa accagggcac gtgcctcgac cgcctagggc agttcacctg
1441 tatctgtatg gcaggtctca caggaaacta ttgcgagctg gacattgacg agtgcacag
1501 cagccctctg gtcaacaggg gggctgcgaa ggacagagct aatggcttca gctgcacctg
1561 cctctcgggc ttacgcgcct ccaactgcca gctgcagctg gacgagctgc ccagcagcg
1621 ctgcaggat gcgcgcaaat gcgtggacca gcccgatggc tacgagtgcc gctgtgcgca
1681 gggcttctg ggcacgctgt gtgatcgcaa cgtggacgac tgcctccctg accatgcgca
1741 ccatggctgc tgcgtggatg gcactgccag cttctcatgt gctgtgctc ctggctcac
1801 gggcacagc tgcgcagcgc aggtggagca atgcgcgagc cagcctgcgc gccatggggg
1861 caaatgccta gactgggtg acaagtacct ctgcgctgct cctctctggg ccacaggtgt
1921 gaactgcgaa ggcagacttg acgactgctg cagcaacccc tgcaccttgg agtctgcg
1981 tgatggctac aaccgctacg actgtgctg ccacactggc tccacagggc ccttctgtaa
2041 cgtggagatc aatgagtgtg cttccagccc atggcgcgag ggaggttctt gttggatgt
2101 ggaaaaatgc ttccgctgct tctgcctgcg ttgctcttgg ccccaactct gcttcccccc
2161 gagccatccc tctgcctcag agcctcgag tccagcctac tgcctatgat cacttggggg
2221 gttccgctgt gttgtggagg cttgctgggg tggccccctg tgcagcgaga gcttggggg
2281 agacgctgt gactgcagc cgtgcagggc cgtgcagggc cgtgcagggc atggaaatgg
2341 ttccacagc acctgcgcgc cttgtgtcca gggacgctga tgcgaactc ttccctctg
2401 caaccgcac ccctgtgagc atggggggcg ctgcagctct gcccttgccc agctgctgt
2461 ctgctctgc cccaggggt ggcaaggccc acgatgcag cagatctgg ccgagtgtgc
2521 tggcccgcca cctgtggcc ctcagtgtat ctgcacacac ctggcaggga gtttcagctg
2581 caccctgcat ggaaggatca ctggcccttc ctgcgctcag gacatcaatg actgtgaccc
2641 caaccatgct ctgaacgctg gctgtgcca agacgacgtg ggcctcttct cctgtcctg
2701 cctccctgtg tgcgcgcgc cagatgcgc cgtgtggctg gatgagtgcc tgaacacccc
2761 ctgcagggcg gacactgca atgcgcgcg cgtgcctctc acctgcacct gccgcaggg
2821 ctacggaggt ttcactgctg aacagagact gccgcagctg agccacagct cctgtctcga
2881 tggcgggacc tgtgtggagc cgtggaactc gtacagctgc ctgtgcctgc ccggtcacac
2941 aggaagccac tgcacacatg aggcagaccc ctgcctctcg ggcctctgcc tacacggggg
3001 cgtctgcagc ggcgcacccc ctgcttctcg ctgcactgct ctgcagagct tccagggccc
3061 cagtgctcag acgtctgttg attggtgcag ccgcagacct tgcacaaagc ggggtcctg
3121 cgtcagact ggggctattt gcttctgccc ccttggatgg agcggaagcc ctgtgacat
3181 ccgaagcttg ccttcagagg aggcgcgagc ccagctcggg gtgcgctggt agcagctgtg
3241 tcaagcgggt ggcagctgtg tgaatgaaga cagctccccc tactgctgt gccacaggg
3301 ccgactggt agcactgtg agcaggaggt ggaacccctg tggccctcag cctgcagca

```

【 図 2 0 B 】

図 20B

Figure 20B

```

1361 tgggggggacc tgcctgctct atatcggggg ctacatgtgt gagtgtcttc ctggctacaa
1421 tgggtgataac tgtgaggagc acgtggagca gtgtgctccc cagcctgccc agcacggggg
1481 ttcatgtcatt gacctcgttg ccgctatct ctgctcctgt ccccaaggaa cgtcggggt
1541 gctctgcgag attaatgagg atgactcgg ccacaggcca cgcctgact caggccccc
1601 gtgcctacac aatggcactc gctggacctt ggtgggtggt tctcgtgca cctgtcccc
1661 aggatcacct ggtttgcct gcgagcaga catcaatgag tgcctcag gtgcttgcca
1721 cgcggcacac acccgggact gcttcagga cccagggcca ggttctcgtt gctttgtca
1781 tgcctgcttc tgcagctctc gcttcagac tctcctgctt ccttcgagct cccagccatg
1841 cagcatggga ggcagatgac gctctacccc gggctcctgg ggtgggctga ccttcacctg
1901 tcatctgtgc cagcgttctt ggggtcccg ttgcgaggg gtgggcgct cctgcgcggt
1961 gctgcagtg ccggtggggc tccatgcca cagacgccc ccggggccgc gctgcgcctg
4021 cccccaggg ttgtcgggac cctcctgccc #050

```

【 図 2 1 A 】

図 21A

Figure 21A

```

91      atgcagcccc cttcaactgt gctgtgctg
121 ctgctgctgc tctgtctatg tgtctcagtg gtccagcccc gagggctgct gttggggagt
181 ttcccaagaac cctgtgcccc tggagacacc tgcctgagcc tgcctctggg accaaggggc
241 tgcagactgtg cccctgcttc cttgggtgag acgtgccagt ttctgaccc cctgcagaae
301 gccgcagctg cgcacaaatg aggcagctgc caagcctctg ttccgctccc cctagggctc
361 cccagctcttc cctctccatt gacaccagca ttctgtgcca cttgcctccc tggcttcaat
421 ggtgagagat cctgagccca gctgaagac cctgtctccc cctcctctg ttccaaaaag
481 ggcgcgctgc aatgcagag cttgggcgc cctgcagctc cctgcagctc tggatggaga
541 gttgagcaggt gccacacttg gactctctg tcaagccccc catgtgttaa tggagggtgt
601 tgtctggcca ccaaccccac gatccagtgc cactgcccc ccgggtctga gggccatccc
661 tgtgacgctg atgtcaacga gtgtctccag gaccacagac cctgcaccaa aggcacctcc
721 tgcctaaaaa cctgggctc cttccagctg cctctgcccc tggggcagga ggttccactg
781 tgtgagctgc ggcagggacc ctgcctcctt aggggtggtt cgaatggggg cactctgcag
841 ctgagtcgag agaaagactc caactttcac cttgcctctt gtcctccagg ttctatagge
901 ccagactgtg agtgcgctg ggcacactgt gtccagcccc agtgcagaaa tgggggacat
961 tgcagggatg ggttcgacac ctgcgcgcgc cctgcgcca aaactctgga aggtgggag
1021 tctctcgagg atgtggatga gtgtgagacc caggatcccc ctcactgcag aaacggggg
1081 acctgcagaa actctgctgg tagcttccac tgcgtgtgtg tgaagtgcct gggcgggaca
1141 agctgtgagg agaacctgga tgaactatt gctgcacact gtgcctccgg atccactgct
1201 attgacccgg tgggtctctt cctctgcttc tgcacactg gacgcacagg actcctgtg
1261 cacttgagg agactgtctt ggcgcagcgg tgcctagggg atgcctaaa cagacccaac
1321 cctctcagag gctcactcat ctgcctgtgt cagctgtgtt attcgggggt cacttgccac
1381 caggacctgg acgagtctct gatggcccg caggcccaaa cctcctctga acatgggggt
1441 cctgcctcca caactctgg cctctccaac tgcctctgct cacttgctta cacaggtccc
1501 cgttctgagg ctgacacaaa tgaagtgcct tcccagcctt gccacccagg aagcactctg
1561 ctggacctac ttgcacactt ccaactgcct tgcctgcag gcttagaagg gcaagtctgt
1621 aggtggagaa caagagagtg tgcctcagct ccttgcttga accacgggga ttgcactgac
1681 ctgtccagcg gcttccagt cactgcctgt cctggactct ccgcgcagc atgtgagag
1741 gatctcagtg agtgcaagag cttcctctgt gccaatgggt ggaagtgcga ggaacagct
1801 ggaagcttcc actgcgaagt tctccagggc ttggaaggcg caeagtgtca aaacagagtg
1861 gatagtgccc tgaagtaccc atgtccctgt ggcgcagct gcttgactt tccagagccc
1921 tctttctgcc tctgcctctt tggcttcaaa ggcagactct ataaggttcc cctgtgtgt
1981 cccaaactgt gccagcccaa cagatattgt aaggacagga aagcaaggc caactgcctc
2041 tgcctgtgt gggagccctg ctgcgcaca cctgagga caagcagctt cctgcagcgg
2101 cactgcagaa gatctctatg tgtgtgtgac gtgggttggg ccggggccaa gtgcagga
2161 gagctagggg gttgcacttc tgcacctgt gcccatgggg ggaactgcta cccacagccc
2221 tctggctaca actgcacctg ccttcagggc tacacaggac ccaactgtag tgaagagatg
2281 acagcttgct actcaggccc atgtctcaat ggcggctcct gcaacccatg ccttgagggc
2341 taactactga cctgcctccc aagccacaca gggccccagt gccaaacag cactgaactc
2401 tgtgtgtgac actgcctctt caatgggggt acctgtgtga accagctcg caactctccc
2461 tgcctgtgtg cactgggctt caagggcgcc cgtgtgagg acctgcagc ccccgctgtg
2521 gcagacagcc cctgtaggaa taaggcaacc tgcagagaa gcttcagga tcccgctgcg
2581 cctgcctcca ctgctacac cggagggcgc tgcagactc tgaaggactt atgtgccag
2641 aagcctgccc cagcaaatc ccaactgcct cagactgggc cctccttccc ctgctgtgct
2701 cttcagggat ggaacgggccc tctctgcaac cttccactg cctcctgcca gaagcttga
2761 ctgagccaa gcatagagct cttctccctt tgcacaaag gagcctctg tctgcagcag
2821 ggcctcctct atttctgcca ctgcctccct ggaattccaa gcaagctgt ccagatcac
2881 gtgaacacat gtagtctcag gctttgagca aacggggcca cctgcagcc cagcccaagt
2941 ggaactctct gacagctgac cagactctac gatggagca atgtccaaa ggaactcgat
3001 gctgtcaggt ccaaacctgt tacaacactt ggaactctga tcccaaac tggagagct
3061 cactgtcct cctctcaggg ctttgcgggg ctacgctgtg agggagaagt caatgccttc
3121 ctggacagc cctgcacccc cacaagcact gacagctgccc actctctgg caatgccttc
3181 tactgcaggt gtctgcctgg acacacaggg cagtgggtgt aggtggagat gaacccctgc
3241 cacagccac cctgctttaa tggagggaac tgtgaggcca cagcaggacc accctgggt
3301 tcatctgccc actgcgccaa ggtttttgaa ggcctccact gcagccacag ggcctcttc

```

【 図 2 1 B 】

図 21B

Figure 21B

```

3361 tgcggctctc atcaactgca cccagggagg cttgtctctc cctcccttaa gccaggtctc
3421 cccacagctg gtgcctgccc cagtggctat gggggtctct actgctgac cccacagctc
3481 cctaaaggct gtgcctccc cctccctcag ctatacaatg gcaagtctc agagaccagc
3541 ggcctggggg gccagggct tgcctgctcc gctctccagg gccccgggtg
3601 cagaaacccc ga

```


【図 2 2 a】

図 22a

Figure 22A

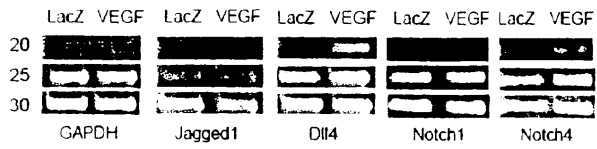


Figure 22B

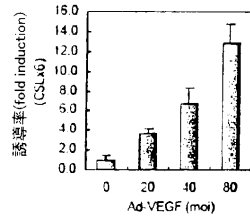


Figure 22C

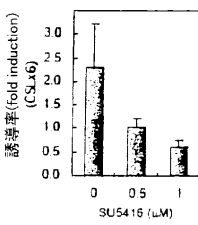
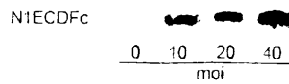


Figure 22D



Figure 22E



【図 2 2 c】

図 22c

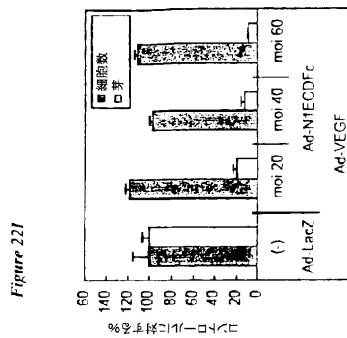


Figure 22I

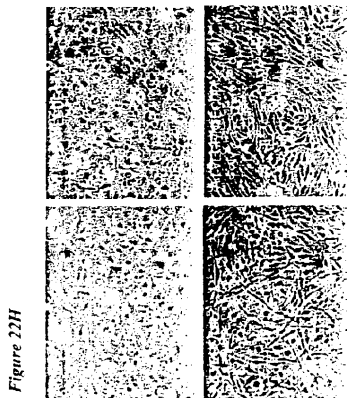


Figure 22H

【図 2 2 b】

図 22b

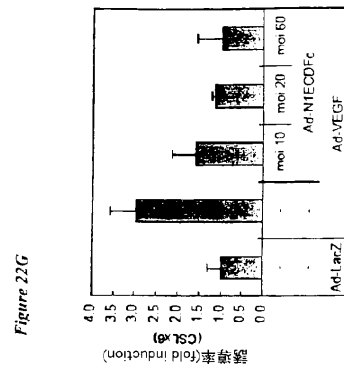


Figure 22G

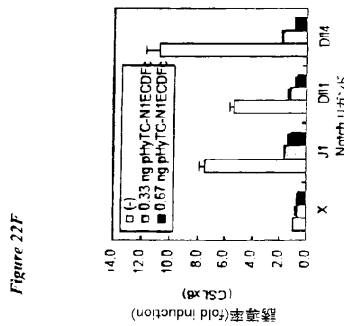


Figure 22F

【図 2 3 a】

図 23a

Figure 23A

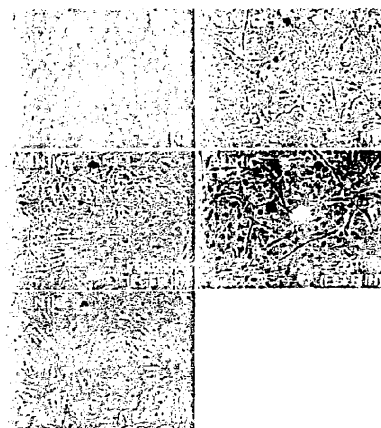


Figure 23B

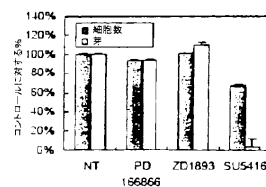
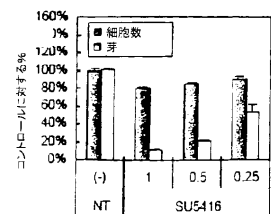


Figure 23C



【図 2 3 b】

図 23b

Figure 23D

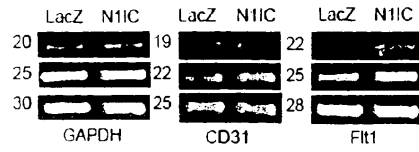


Figure 23E

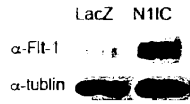
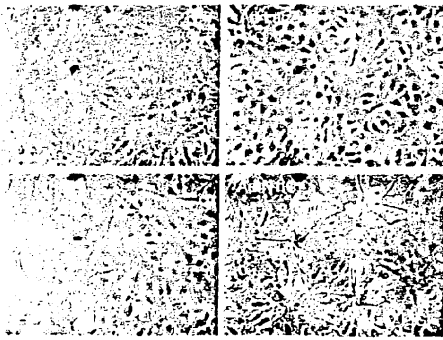


Figure 23F



【図 2 3 c】

図 23c

Figure 23G

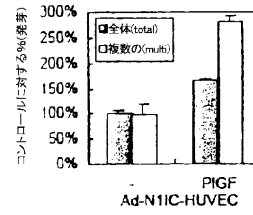


Figure 23H



Figure 23I

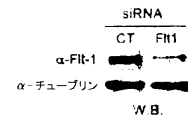
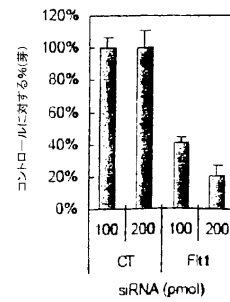


Figure 23J



【図 2 4】

図 24

Figure 24B

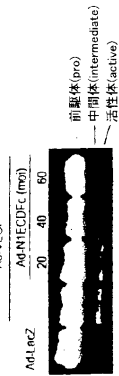


Figure 24D

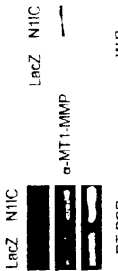


Figure 24F

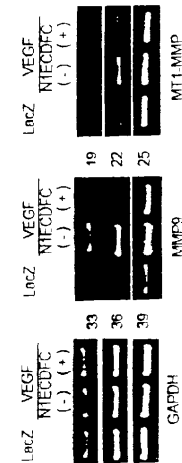


Figure 24C



【図 2 5 a】

図 25a

Figure 25A

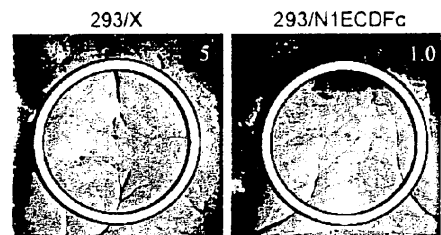
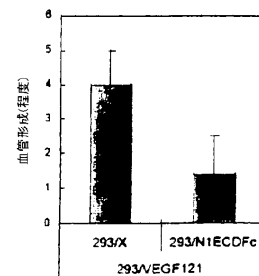


Figure 25 B



【 図 2 5 b 】

図 25b

Figure 25C

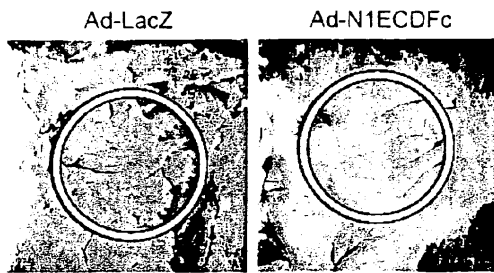
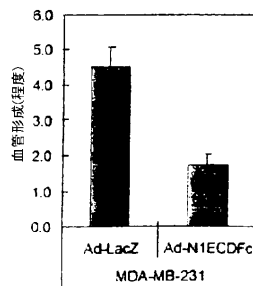


Figure 25D



【 図 2 8 】

図 28

Figure 28A

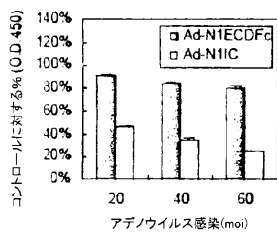
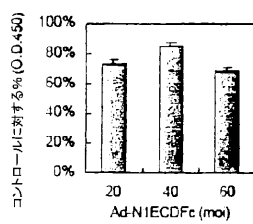


Figure 28B



【 図 2 9 】

図 29

Figure 29



【 図 2 6 】

図 26

Figure 26A

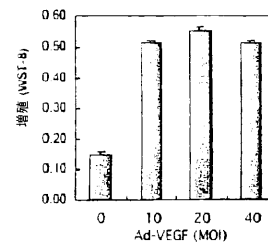
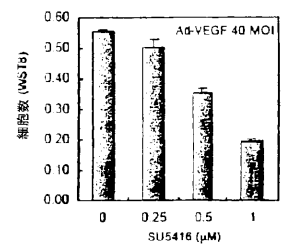


Figure 26B



【 図 2 7 】

図 27

Figure 27A

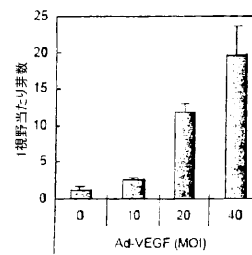
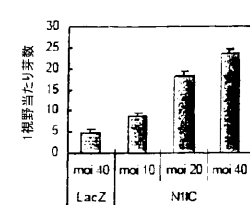


Figure 27B



【 図 3 0 】

図 30

Figure 30A

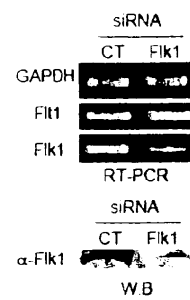


Figure 30B

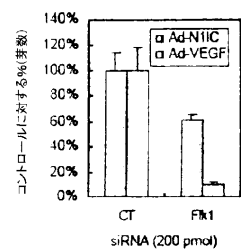
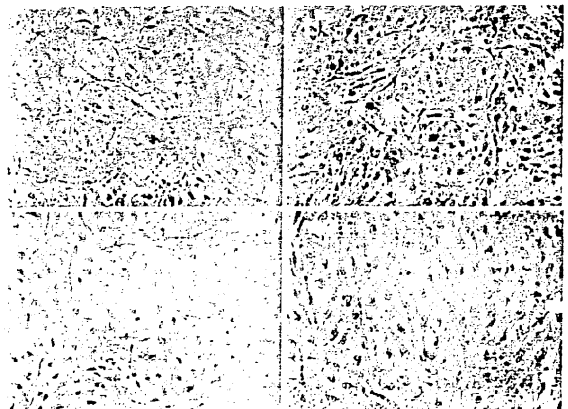
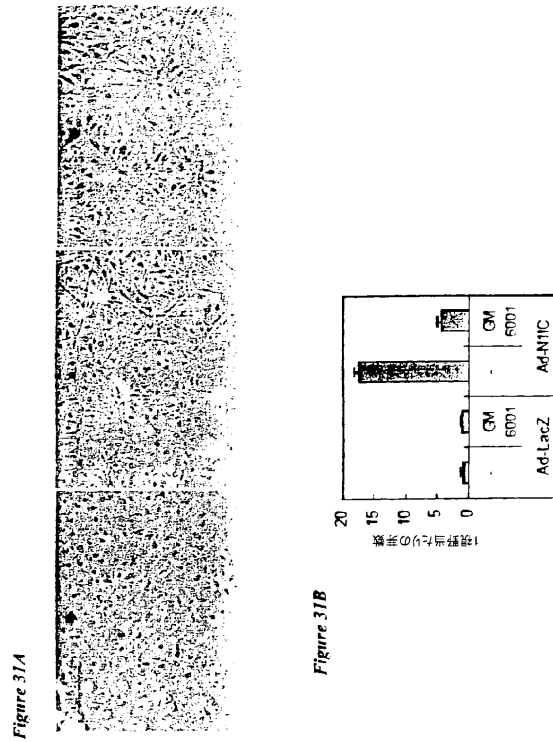


Figure 30C



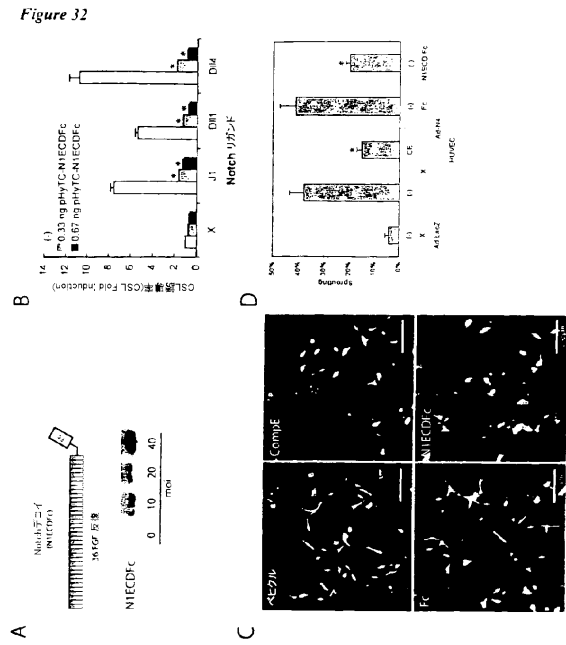
【図 3 1】

図 31



【図 3 2】

図 32



【図 3 3】

図 33

Figure 33



【図 3 4】

図 34

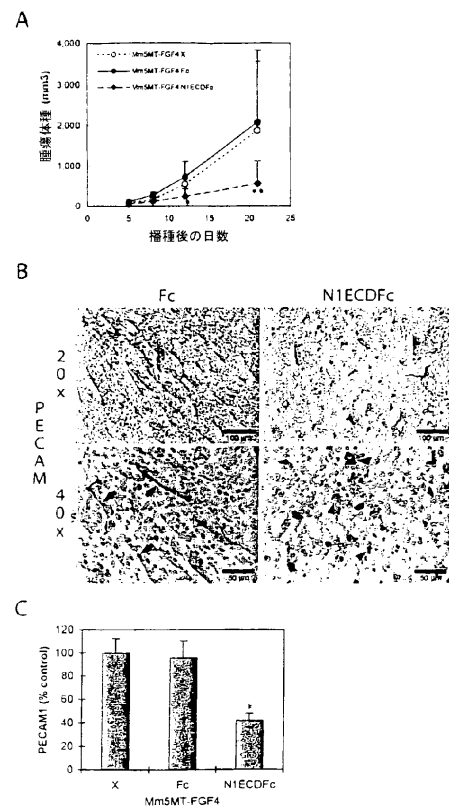
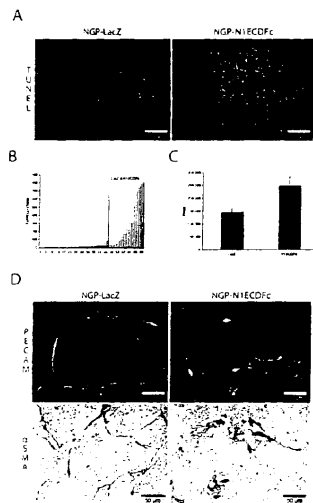


Figure 34

【図 35】

図 35

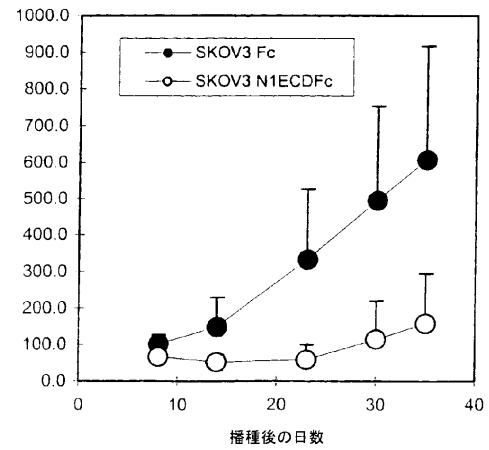
Figure 35



【図 36】

図 36

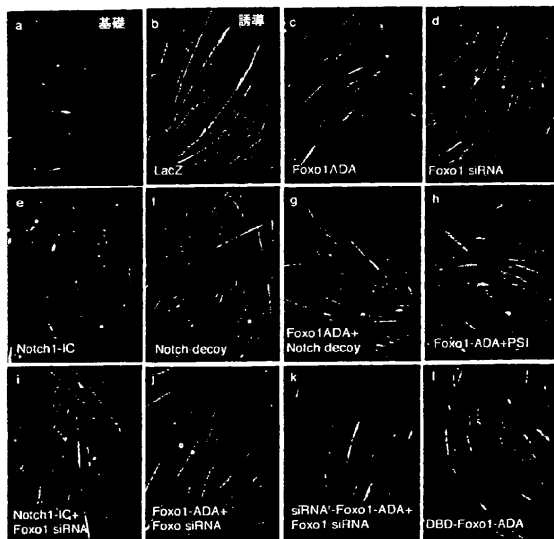
Figure 36



【図 37】

図 37

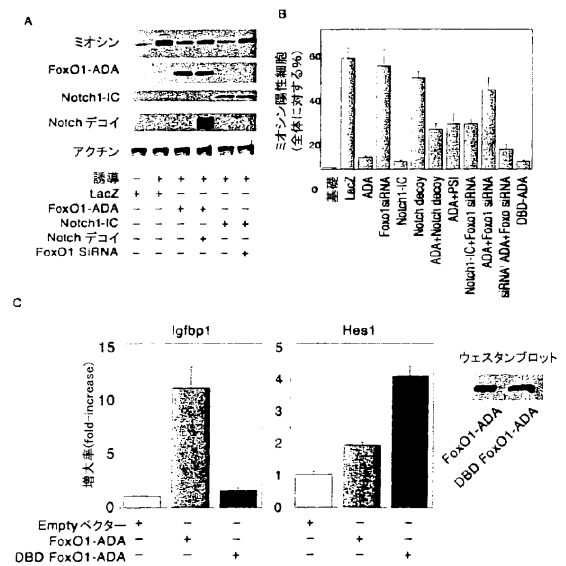
Figure 37



【図 38】

図 38

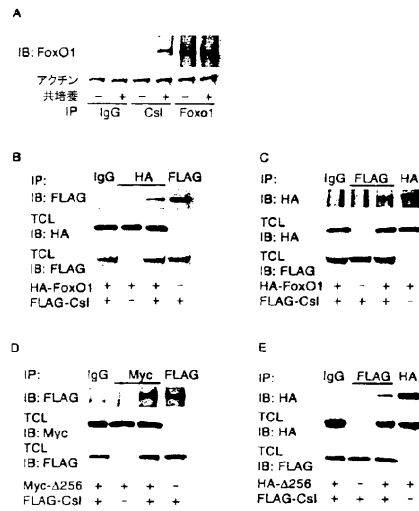
Figure 38



【 図 3 9 】

図 39

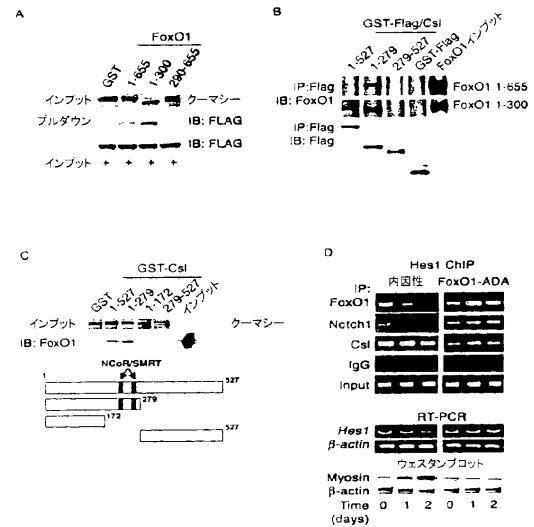
Figure 39



【 図 4 0 】

図 40

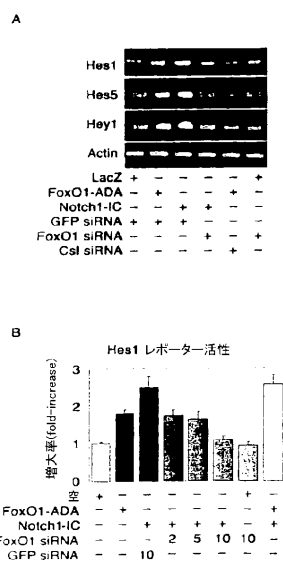
Figure 40



【 図 4 1 】

図 41

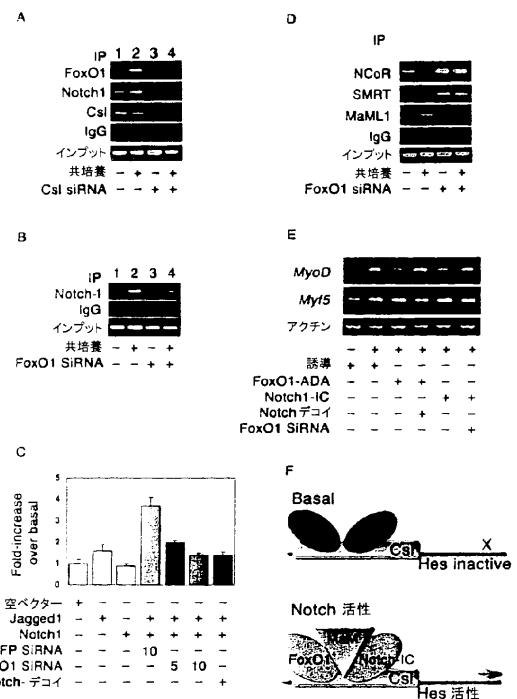
Figure 41



【 図 4 2 】

図 42

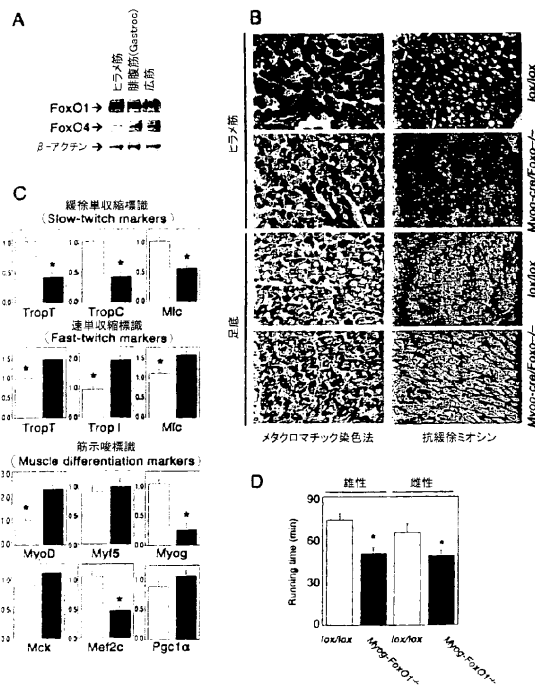
Figure 42



【 図 4 3 】

图 43

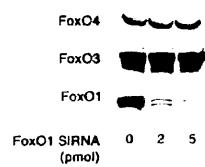
Figure 43



【 図 4 6 】

图 46

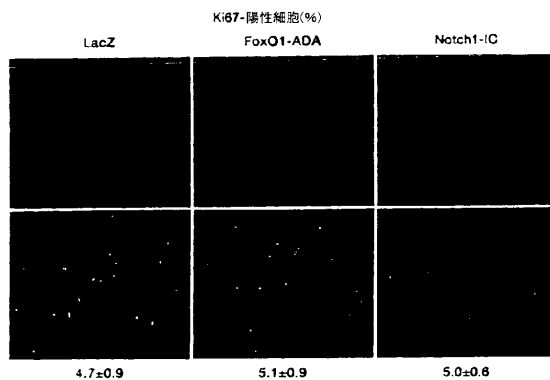
Figure 46



【 図 4 7 】

图 47

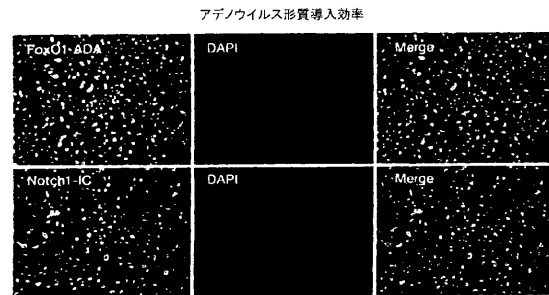
Figure 47



【 図 4 4 】

图 44

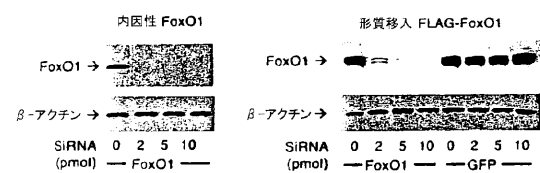
Figure 44



【 図 4 5 】

图 45

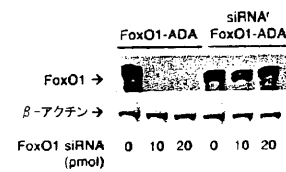
Figure 45



【 図 4 8 】

图 48

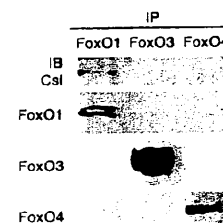
Figure 48



【 図 4 9 】

图 49

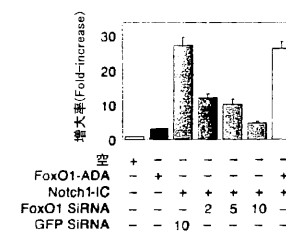
Figure 49



【 図 5 0 】

图 50

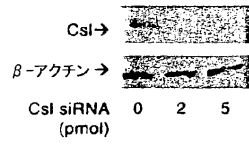
Figure 50



【図 5 1】

図 51

Figure 51



【図 5 2】

図 52

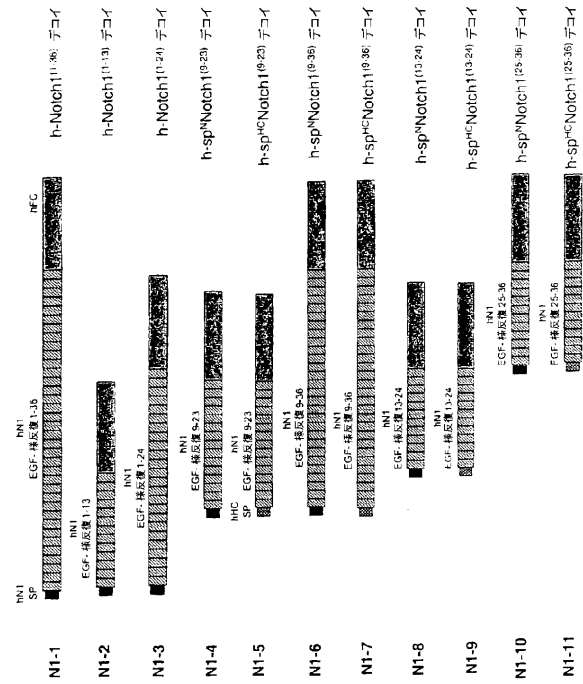


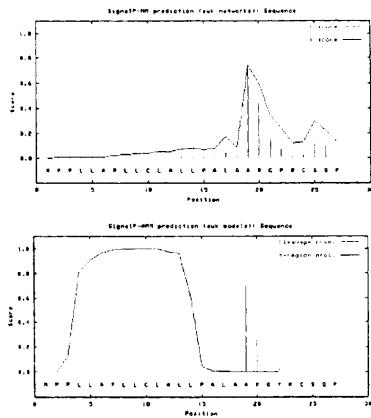
Fig. 52

【図 5 3】

図 53

Fig. 53

ヒトNotch1シグナルペプチド

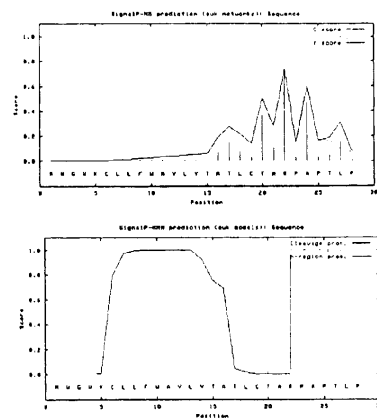


【図 5 4】

図 54

Fig. 54

ヒトIgG重鎖(HC)シグナルペプチド



【図 5 5】

図 55

Fig. 55

ヒトNotchデコイ (EGF-LR 1-36)
 ヒトNotchデコイ (EGF-LR 9-36)
 ヒトNotchデコイ (EGF-LR 25-36)

ヒトN1

tac agc ttc ggg (SEQ ID NO: 19)
 atg tcg aag ccc (SEQ ID NO: 20)
 Y S F G (SEQ ID NO: 21)

最後のヌクレオチドに換えてBglII部分を付加

tac agc ttc gga **GAT CTA** (SEQ ID NO: 22)
 atg tcg aag ccc **CTA GA** (SEQ ID NO: 23)
 Y S F G (SEQ ID NO: 21)

N1/FC 融合

tac agc ttc gga GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 24)
 atg tcg aag cct CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 25)
 Y S F G D L G P (SEQ ID NO: 26)

【図 5 7】

図 57

Fig. 57

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 9-23)

ヒトN1

gag acc gac atc ~~gac gac~~ (SEQ ID NO: 35)
 ctc tgg ctg tag ~~ctg ctg~~ (SEQ ID NO: 36)
 E T D I D D (SEQ ID NO: 37)

BglII部位の付加

gag acc gac atA **GAT CT** (SEQ ID NO: 38)
 ctc tgg ctg taT **CTA GA** (SEQ ID NO: 39)
 E T D I (SEQ ID NO: 40)

N1/FC 融合

gag acc gac atA GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 41)
 ctc tgg ctg taT CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 42)
 E T D I D L G P (SEQ ID NO: 43)

【図 5 6】

図 56

Fig. 56

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 1-13)

ヒトN1

gat gtg gac gag (SEQ ID NO: 27)
 cta ctc ctg ctc (SEQ ID NO: 28)
 D V D E (SEQ ID NO: 29)

BamHI部位の付加

gat gtg gac gag **GAT CCG** (SEQ ID NO: 30)
 cta ctc ctg ctc **CTA GGC** (SEQ ID NO: 31)
 D V D E (SEQ ID NO: 29)

N1/FC 融合

gat gtg gac gag GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 32)
 cta ctc ctg ctc CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 33)
 D V D E D L G P (SEQ ID NO: 34)

【図 5 8】

図 58

Fig. 58

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 1-24)
 ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 13-24)

ヒトN1

gac atc aac gag (SEQ ID NO: 44)
 ctg tag ttg ctc (SEQ ID NO: 45)
 D I N E (SEQ ID NO: 46)

BamHI部分の付加

gac atc aac gag **GAT CCG** (SEQ ID NO: 47)
 ctg tag ttg ctc **CTA GGC** (SEQ ID NO: 48)
 D I N E (SEQ ID NO: 46)

N1/FC 融合

gac atc aac gag GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 49)
 ctg tag ttg ctc CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 50)
 D I N E D L G P (SEQ ID NO: 51)

【 図 5 9 A 】

図 59A

Figure 59A

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPBCQDP
 TPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGLCLTPLDNACLTPCRNGGTCOLLTLTEYKCRCP
 PGWSGKSCQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN
 HNEVGSYRCVCRATHTPNCERPIYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVTHEACLPGTGQNCENID
 CPGNNCKNGGACVDGVTYNCRCPEWYQGYCTEDVDEQCLMPNACQNGGTCNTHGGYNCVCVN
 CWYGEDCSENIDDCASAAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRGLLCHLNDACISNPNCEGSCDTP
 PVNGKAICTCPSGYTGPAACSDQVDECSLGANPCEHAGKICINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNE
 CVSNPCQNDATCLDQIGEFQICMPGYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGT
 TGHLCQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDQVA
 TFCCLCRPGYTGHHGCTININECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFCCLKGTGPNCEINLDDCASSPC
 DSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPNCHGGTCDGINGFTCRCPGEGYHDPCLSL
 EVNECNSNPCVHGACRDSLNGYKCDGPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCCKMTSGYVCTCR
 EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCDIDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECR
 QSDYSEFSVCPTGWGGTCEVDINECVLSPCRHGASCONTHGGYRCHCQAGYSGRNCEIDIDD
 CRPNPCHNGGSCDGTGINTAFCDCLPGFRGTFCEDINECASDPCRNGANTDCVDSYTCCTCPAGF
 SGTHCENNTDCTESSCFNGGTCDGINSFTCLCPGFTGSYCQHVNEDCSQPLHGGTCQDGC
 GSYRCTCPQGYTGFCNQNLVHWCSSPCKNGGKQWHTQYRCECPSGWTGLYGVFVSVCVAA
 QRQGVQVVARLQHGGLCYDAGNTHHCRQAGYTGSCYEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGGYSCK
 CVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQNGGTCLDLPNTYKCSQPRGTQGVHCEINVDCCNPVDPVSR
 PKCFNNGTCVDQVGGYSTCPCPFVGERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDHFCBGRAGHT
 GRRCESVINGCKGKPCKNCGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSIRCTNGGTCIS
 GPRSPTECLCGPTGTECECPASSPCLGPNPCYNQGTCEPTSESFFYRCLCPAKFNGLLCHILDY
 SFGGAGAGDIPPLIIEACECLPECQEDAGNKVCSLQCNHACGWDGDCSLNFDNPKMCTQSLQ
 CWKYPSDGHCDSCQNSAGCLPDGFCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHCQDGCNSAECBWDGLD
 CAEHVPERLAAGTLVVVLMPEPELRNSSFHFLRELSVLHNTVVKRDAHQQMIFPPYGREBE
 LRKHPIKRAAECMAAPDALLGOVKASILLPGSGEGRRRRELDPMVDRGSLVYLEIDNAGQVQASS
 QCFQSATDVAAFLCALASLSLNIYKIFAVQSEVTEPPPPAQLHFMVAAAAFVLLFFVGCQVYL
 LSRKRRRQHGQLWFPPEGFVSEASKKRRREPLGDSVGLKPLKNASDGMALMDNQNNEWGDEDLET
 KKEFRPEPVLPDLDDQTDHRQWTCQHLDAADLRMSAMAPTTPQGEVDACMDVNVFPGDFTFL
 MTASCGGGLGTGENSEEEDAPAVISOFTYQASLHMQTDORTGTAHLAARYSRSDANKRLLEA
 SADANIQDNHGRTPLHAASVADAGQVFQILIRNRATDLDAKMHGDTTPLLARLAVEGMLLEDLI
 NSHADVNVDOLCKS

【 図 6 1 】

図 61

Figure 61

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPBCQDP
 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGLCLTPLDNACLTPCRNGGTCOLL
 TLTEYKCRCPPGWSGKSCQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN
 BCGQKPGCLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTPNCERPIYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT
 HECACLPGFTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVTYNCRCPEWTGQYCTEDVDEQ
 LMPNACQNGGTCNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAAACFHGATCHDRVASFYCE
 CPHGRGTGLLCHLNDACISNPNCEGSCDTPNVNGKAICTCPSGYTGPAACSDQVDECSLGA
 NPCEHAGKICINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICMP
 GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGTGHLQYDVDECASTPCKNG
 AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHH
 ETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFCCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
 GYSCACEPGYTGSMCNINIDECAGNPNCHGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPCLSEVNEC
 NSNPCVHGACRDSLNGYKCDGPGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCCKMTSGYVCTCR
 EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTCDIDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRN
 GGECRQSEDYSEFSVCPTGWGGTCEVDINECVLSPCRHGASCONTHGGYRCHCQAGYS
 GRNCEIDIDDCRPNPCHNGGSCDGTGINTAFCDCLPGFRGTFCEDINECASDPCRNGANC
 TDCVDSYTCCTCPAGFSIHCEENNTDCTESSCFNGGTCDGINSFTCLCPGFTGSYCQH
 DVNECDQCLHGGTCQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCSSPCKNGGKQWHTHTQ
 YRCECPSGWTGLYCDVPSVSCVAAQRQGVQVVARLQHGGLCYDAGNTHHCRQAGYTG
 YCEDLVDECSPPCQNGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQNGGTCLD
 LPNTYKCSQPRGTQGVHCEINVDCCNPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSTCPCPFV
 GERCEGDVNECLSNPCDARGTQNCVQRVNDHFCBGRAGHTGRRCESVINGCKGKPCKNNG
 TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTECLCGPFTG
 PBCQFPASSPCLGPNPCYNQGTCEPTSESFFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGDLGPGEP
 KSCDKTHTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLKEYCKVSNKALPAPIEKTISK
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 LSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 5 9 B 】

図 59B

Figure 59B

ALHWAJAVNVDAVVLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDI
 TDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLEDYNLVRSPLHGAPLGSTPLSPPLCSFNGYLG
 LKPGVQGGKVRKPSKGLACGSKAKDLKARRKKSQDGKCLLDSSGMLSPVDSLESPH
 GYLSDVASPPLLSPFPQSPSYVPLNHLPGMPDTHLGTGHLNVAAKPEMAALGGGRLAF
 ETGPPRLSHLPVASGTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSLNQCCEWLSRLQSGMVPNQYNP
 LRGSVAPGLSTQAPS LQHGVMGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTQQ
 VQPNQLMQQQNLQPANIQQQSLQPPPPPPQPHLGVSAAASGHLGRSFLSCPEQSADV
 QPLGPSSSLAVHTILPQESPALPTSLPSSSLVPPVTAQFLTPPSQHSYSSPVNDTPSHQL
 QVPEHPFLTSPSPESPDQSSSSPHSNVSDWSEGVSSPPTSMQSQIARIPEAFK

【 図 6 0 】

図 60

Figure 60

DLGPEGPKSCDKTHTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWVDCGVVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLKEYCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 2 】

図 62

Figure 62

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPBCQDP
 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGLCLTPLDNACLTPCRNGGTCOLL
 TLTEYKCRCPPGWSGKSCQADPCASNPCANGGQCLPFEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN
 BCGQKPGCLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHTPNCERPIYVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT
 HECACLPGFTGQNCENIDDCPGNNCKNGGACVDGVTYNCRCPEWTGQYCTEDVDEQ
 LMPNACQNGGTCNTHGGYNCVCVNGWTGEDCSENIDDCASAAACFHGATCHDRVASFYCE
 CPHGRGTGLLCHLNDACISNPNCEGSCDTPNVNGKAICTCPSGYTGPAACSDQVDECSLGA
 NPCEHAGKICINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICMP
 GYEGVHCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGTGHLQYDVDEBGLGPEPKS
 CDKTHTCCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 YVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLKEYCKVSNKALPAPIEKTISK
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 LSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 3 】

図 63

Figure 63

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPQCQDP
NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNFCRNGGTCDLL
TLTEYKCRCPPGWSGKSCQADPCASNPCANGGQCLPFEEASYICHCPPSFHGPTCRQDVN
BCGQKPLCRHGGTCHNEVGSYRCVCRATHGPNCEPYPVPCSPSPCQNGGTCTRTGQDVT
HECACLPQFTGQNCENIDDCPGNCKNGGACVDGVNTYNCRCPPWTGQYCTEDVDECQ
LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVNGWTGEDCSENIDDCASAAACFHGATCHDRVASFYCE
CPHGRGTLLCHLNDACISNPNCEGNSNCDTNPVNGKAITCPSGYTGPAQSDVDEC SLGA
NPCEHAGKICINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICIMP
GYEGVHCENVTDECASSPLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNG
AKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHHC
ETNINECSSQPCRHHGGTCQDRDNAYLCFCLKGTTPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPNCHNGGTCEGNGFTCRCPEGYHDPCTCLSEVNEC
NSNPCVHGACRDSLNGYKCDPCGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCR
EGFSGPNCQTNINECASNPCLNQGTICIDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRN
GGECRQSEDYESFSCVCTPGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYS
GRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTCEEDINEDLGPGEKSCDK
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 6 】

図 66

Figure 66

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSAACAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRGTGLLCHLNDAC
CISNPNCEGNSNCDTNPVNGKAITCPSGYTGPAQSDVDEC SLGANPCEHAGKICINTLGS
FECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICIMPGEVGHCEVNTDECA
SSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTE
EGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHHCETNINECSSQPCRHHG
GTCQDRDNAYLCFCLKGTTPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
NINIDECAGNPNCHNGGTCEGNGFTCRCPEGYHDPCTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNG
GYKCDPCGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNQTNINEC
ASNPCLNQGTICIDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSC
VCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNP
CHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTCEEDINECASDPCRNGANTCDVDSYTCCTCPAGF
SGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCDVGINSTFTCLCPPGFTGSYQHDVNECESQPC LHGGT
CQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQTHTYRCECFSGWTGLYCD
VPSVSEVAARQGVQDVARLCQHGGCLCVDAGNTHHCRCQAGYTGSCYEDLVDECSPSPCQ
NGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSBEIDECLSHPCQNGGTCLDLPTNYKCSCPRGQTG
VHCEINVDCCNPVDPVPSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPFGVGERCEGDVNECLSNP
CDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGPKCKNGGTCAVASNTARGFICK
CPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTICISGPRSPCLCLGPFTEGPECQFPASSPCLGGN
PCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGDLGPGEKSCDKTHTCPPCPAPE
ELLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDQVEVHNAKTKPR
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 4 】

図 64

Figure 64

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCSAACAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRGTGLLCHLNDAC
CISNPNCEGNSNCDTNPVNGKAITCPSGYTGPAQSDVDEC SLGANPCEHAGKICINTLGS
FECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICIMPGEVGHCEVNTDECA
SSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTE
EGYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHHCETNINECSSQPCRHHG
GTCQDRDNAYLCFCLKGTTPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
NINIDECAGNPNCHNGGTCEGNGFTCRCPEGYHDPCTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNG
GYKCDPCGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNQTNINEC
ASNPCLNQGTICIDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSC
VCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNP
CHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTCEEDINEDLGPGEKSCDK
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 5 】

図 65

Figure 65

MWGWKCLLFWAVLVTATLCTARCASAAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRGTGLLCHLNDAC
CISNPNCEGNSNCDTNPVNGKAITCPSGYTGPAQSDVDEC SLGANPCEHAGKICINTLGSF
ECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICIMPGEVGHCEVNTDECA
SSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTE
GYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHHCETNINECSSQPCRHHG
GTCQDRDNAYLCFCLKGTTPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
NINIDECAGNPNCHNGGTCEGNGFTCRCPEGYHDPCTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNG
GYKCDPCGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNQTNINEC
ASNPCLNQGTICIDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSC
VCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNP
CHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTCEEDINEDLGPGEKSCDK
SCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVSEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 7 】

図 67

Figure 67

MWGWKCLLFWAVLVTATLCTARCASAAACFHGATCHDRVASFYCECPHGRGTGLLCHLNDAC
CISNPNCEGNSNCDTNPVNGKAITCPSGYTGPAQSDVDEC SLGANPCEHAGKICINTLGSF
ECQCLQGYTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQICIMPGEVGHCEVNTDECA
SSPCLHNGRCLDKINEFQCECPTGFTGHLQCYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTE
GYTGTHCEVDIDECDDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHHHCETNINECSSQPCRHHG
GTCQDRDNAYLCFCLKGTTPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
NINIDECAGNPNCHNGGTCEGNGFTCRCPEGYHDPCTCLSEVNECNSNPCVHGACRDSLNG
GYKCDPCGWSGTNCDINNNECESNPCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNQTNINEC
ASNPCLNQGTICIDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSC
VCPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASCQNTGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNP
CHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTCEEDINECASDPCRNGANTCDVDSYTCCTCPAGF
SGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCDVGINSTFTCLCPPGFTGSYQHDVNECESQPC LHGGT
CQDGCYSYRCTCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQTHTYRCECFSGWTGLYCD
VPSVSEVAARQGVQDVARLCQHGGCLCVDAGNTHHCRCQAGYTGSCYEDLVDECSPSPCQ
NGATCTDYLGGYSCKCVAGYHGVNCSBEIDECLSHPCQNGGTCLDLPTNYKCSCPRGQTG
VHCEINVDCCNPVDPVPSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPFGVGERCEGDVNECLSNP
CDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRRCESVINGCKGPKCKNGGTCAVASNTARGFICK
CPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGTICISGPRSPCLCLGPFTEGPECQFPASSPCLGGN
PCYNQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGDLGPGEKSCDKTHTCPPCPAPE
ELLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDQVEVHNAKTKPR
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 8 】

図 68

Figure 68

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCASSPCLHNGRCLDKINEFQCEBPTGFTGHLQYDVDE
ECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCL
CRPGYTGHHCEININESSSQCRHGCTCQDRDNAYLCFLKGTTPNCEINLDDCASSPC
DSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEGDIINGFTCRCEGYHD
PTCLSEVNECNSNPVCHGACRDSLNGYKCDPCDGPWSGTNCDINNNECESNPVNGGTCKD
MTSGVCTCREGFGSPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVL
AFCAPSPCRNGGECRQSEDEYSPSCVPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASQNTHTGG
YRCHQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTFCCEEDINEDL
GPGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKQSLSLSPGK

【 図 6 9 】

図 69

Figure 69

MWGKCLLFWAVLVATLCTARCASSPCLHNGRCLDKINEFQCEBPTGFTGHLQYDVDE
CASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLC
RPGYTGHHCEININESSSQCRHGCTCQDRDNAYLCFLKGTTPNCEINLDDCASSPCD
SGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEGDIINGFTCRCEGYHDP
TCLSEVNECNSNPVCHGACRDSLNGYKCDPCDGPWSGTNCDINNNECESNPVNGGTCKDM
TSGVCTCREGFGSPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLLPYTGTATCEVVL
PCAPSPCRNGGECRQSEDEYSPSCVPTGWQGTCEVDINECVLSPCRHGASQNTHTGGY
RCHQAGYSGRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFRGTFCCEEDINEDL
GPGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKQSLSLSPGK

【 図 7 2 A 】

図 72A

Figure 72A

1 atgcccgcgc tccctggccc cctgctctgc ctggcgcctgc tggcccgcct cgcgcgcagca
61 ggccctgcgat gctcccacgc cggtagagac tgcctgaatg gcgggaagtg tgaacccggcc
121 aatggcacag aggcctcagc cttgtggcgg gccttcctgg gccccgcgatg ccaggagcccc
181 aaccctgcctc tcagcacccc ctgcaagaagc gcggggacat gccacatggt ggaccgcgaca
241 ggctgtggcag actatgctcg cagctgtggc ctggcctctc ctggggccctc ctgcctgcaga
301 cccctgggaca atgctcgact caccaccccc tggccgcacag ggggcacactg cgactgcgctc
361 acgctgcagcg agtcacagct ccgctgcctgc cagggaatcc gtgcctgcatg
421 gctgcacccgt gcgctgcaca cccctggccc aacggtggcc agtgccctgcc ctccgagggcc
481 tccctacatct gccactggccc acccagctgc catggcccctc cctgcggcga ggatgtcagc
541 gagtgctggct agaacccccc gctttggccc cagcgaggca cctgcacaaa cgaggtcagg
601 tccctacogct gctctggcgg cgtcacccac actgagccca actgcagagc gctctacgtg
661 cctcgcagcc cctcgcctcg ccagaaacgg ggacactgccc gcccccaggg tatcagtcac
721 cagcagtgct cctctgcctc aggtctccac ggccacgaat gtgaggaaaa tatcagatg
781 tgcaccagaa acaactgcaa gaacgggggt gctgtgtgg acgggtgaa caactacaac
841 tggcctgcct ccgacagagt gacaggtcac tactgtacc aggatgtgga cgagtgcacg
901 ctgatgcgcaa atgctctgcca gaacggcggt acctgccaca aaccccacg tggctacacac
961 tgcgtgtgtg tcaacggctg gactgttgag gactgcagcg agaacatgta tgcctgtgccc
1021 agcgcgcgct gcttccacag cgcacactgc catgacctgt tggcctctct ctactgcgag
1081 tgtcccccag gccgcacagg tctgtgtgct cactccaac agcatgcat cagcaacccc
1141 tgaacagagg gctcccaact cgacacacac cctgtcaatg gcaaggccat cctgcactgc
1201 cccctgggggt acacggggccc ggctcgcagc caggacgtgg atgagtgtct gctgggtgccc
1261 aacccctgct agcatcgagg caagtgcctc aacacgtggg gctccttcga gtgccagtg
1321 ctgcagggtc acacggggccc ccgatgcgag atcgacgtca acagagtgcg ctccgaacccc
1381 tgcacagaac acgcacactc cctggaccaa attggggagt tccagtgcac ctgcactgccc
1441 ggctacaggg gtgtgcactg cgaagtcaac acagacagat gtgccagcag cccctgcctg
1501 cacaatggcc gctgcctgga caagatcaat gagtccagc gcagagtccc caccggcttc
1561 actgggcctc tgtgcagata cgaatggagc gagtgtgcca gcccccctg caagaatggg
1621 gccaaagtgc tggagcagat caacacttac acctgtgtg gcccggaagg gtacacgggt
1681 acgactgctg aggtggacat cgaatgagtc gaaccccagc cctgcaccta cggctcctgc
1741 aaggacgggg tgcgcaactt cacttgcctc tggcccccag gctacacggg ccatcactgc
1801 gagcacaaca tcaacgagtg cccagccagc cctgcgcgca acggggggac ctgcgagga
1861 cggacagag cctactctg cctcctgcag aaggagacca cagagaccaca cctgcagatc
1921 aacctggagt actgtgcag cagcccctgc gactcgagga cctgtctgga caagatcgat
1981 ggctacagat gtgcctgtga gccgggctac acaggagaga tgtgtaaat caacatcgat
2041 gagtgtgcgg gcaacccctg ccacaacggg gcaacctgcg aggacggcat caatggcttc
2101 acctgcctct gccccgaggg ctaccacgac cccacctgoc tgcctgaggt caatgagtc
2161 aacagcaaac cctgcctcca cgggctctgc cgggacagcc tcaacgggta caagtcgca
2221 tgcacccctg ggtggagtg gacaaactgt gacatcaaca acaatgagtg tgaacccaac
2281 ccttgtgtca acggcgccac ctgcaaaagc atgaccagtg gctacgtgtg cacttgcggg
2341 gagggcttca cgggtcccaa ctgcagacac aacatcaacg agtggtgctc caacccaatc
2401 ctgaacacag gccactgtat tgacgacgtt gccgggtaca agtgcaactg cctgctgccc
2461 tacacagggt ccactgtgta gttggtgctg gccctctatg ccccacgccc ctgcagaaa
2521 ggcggggagt gcaggcaatc cgaggactat gagaactctt cctgtgctgt ccccacggg
2581 tggcagaagg agacctgtga ggtgcacatc aacgagtgct tctgagccc gtgcgcgaca
2641 ggccgcatct gccagcaaac ccaacggggc taccctgccc actgcacagg cggctcacgt
2701 ggccgcaact gcgagacga catcgacgac tggccgccca accctgtgca caacggggg
2761 tccctgcacag acggcatcaa caggccttc tgcactgccc tggccggtt cgggggcaat
2821 tctctgaggg agggacatcaa cgaatgtgoc atgacccct gcccgacaag ggccaactgc
2881 acggactgct tggacagcta cactgtcaac gcccccagc gcttcagcgg gatccacgtg
2941 gagacaaca cgtctgagc cacagagagc tccctgttca acggtggcac ctgcgtgagc
3001 agcatcaact cgtctacccc cctgcttcca cccggcagta cctgcagcac

【 図 7 0 】

図 70

Figure 70

MPPLAPLLCLALLPALAARGPRCASSPCLHNGRCLDKINEFQCEBPTGFTGHLQYDVDE
DCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSGYQHDVNECDSPCLHGGTCQDGGGSGYRC
TCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQHTHTQYRCECPGSGWTGLYCDVPSVCEVAA
QRQGVDAVARLCQHGGCLVDAGNTHHRCRQAGYTGSGYCEDLVDCRSPSPCQNGATCTDYL
GYSCKVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQNGGTCLDLNTYKCSCPRGQTQGVHCEINVDCC
NPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPGGFVGRCGEVDNECLSNPCDARGTQNCV
QRVNDHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATC
ENDARTCGSLRCLNGGTCTISGPRSPCLCLGPPTGPECQFPASSPCLGPNPCYNQGTCEP
TSSEPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGDLGPGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FCSCVMHEALHNNHYTKQSLSLSPGK

【 図 7 1 】

図 71

Figure 71

MWGKCLLFWAVLVATLCTARCASSPCLHNGRCLDKINEFQCEBPTGFTGHLQYDVDE
CTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSGYQHDVNECDSPCLHGGTCQDGGGSGYRC
TCPQGYTGPNQNLVHWCDSPPCKNGGKCWQHTHTQYRCECPGSGWTGLYCDVPSVCEVAA
QRQGVDAVARLCQHGGCLVDAGNTHHRCRQAGYTGSGYCEDLVDCRSPSPCQNGATCTDYL
GYSCKVAGYHGVNCSSEIDECLSHPCQNGGTCLDLNTYKCSCPRGQTQGVHCEINVDCC
NPVDPVSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPGGFVGRCGEVDNECLSNPCDARGTQNCV
RVNDHCECRAGHTGRRCESVINGCKGKPKCKNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATC
NDARTCGSLRCLNGGTCTISGPRSPCLCLGPPTGPECQFPASSPCLGPNPCYNQGTCEP
TSSEPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGDLGPGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FCSCVMHEALHNNHYTKQSLSLSPGK

【 図 7 2 B 】

図 72B

Figure 72B

3061 gatgtcaatg agtgcgactc acagccctgc ctgcactggc gcaactgtca ggacggctgc
3121 ggctcctaca ggtgcacctg ccccagggc tacactggcc ccaactgtca gaactctgtg
3181 cactgtgttg actcctgcgc ctgcaagaac ggccggcaat cctggcgagc ccaacccagc
3241 taacgctgag agtgcacccg cgtctggacc ggctcttaac cgcagtgccc cagcgtgtcc
3301 tgtgaggttg ctgcgcagcg acaagggtgt gactgtccc gccctgtcca gcatggagg
3361 cctctgttgg acgcgggcaa cagcaacacc tggcgtgccc agggcggtca cacaggcagc
3421 taactgtgag actgtggga cgaatgtcca cccagccctt gctcagaacg ggccacttgc
3481 acggaactac tggggcgcta cctctgcaag tggcgggcgt gctacacag ggtagactgc
3541 cctgaggaag cgcagagtg cctctccac ccttcgaga aggggggac ctgctctgac
3601 cctcccaca cctcaaatg cctcgtcca cggggcaatc aggtgtgca cctgagatc
3661 aactggagc actgcaatcc cccctgtgac cccgtgtccc ggagcccaa gtgctttaa
3721 aacggcaact ggcgggacca ggtgggcgc tacaactgca cctgcgcgc gggtctgtg
3781 ggtgagcct gaaagggga tgcacacag tgcctgtcca atcctgtgca cggcctgtg
3841 cccagaaat cgtgtcagcg cgtcaatgac tccaactgc agtgcctgct tggtaacacc
3901 ggccgcgct cgtgactcgt catcaatggc tgcacaagca agcctgtcaa gaatggggg
3961 aactgcgccc cggctccaa caccgcgcgc gggttactc gcaagtccc tgcgggcttc
4021 gagggcgcca cgtgcagaa tgcagctcgt accctgcgca gctctgctg cctcaacgg
4081 ggcaaatgca tctccggccc ggcagcccc cactgctgt gcttggccc cttcacggg
4141 cccgaatgac agtcccgcc cagcagcccc tgcctgggag gcaacccctg cttacaacag
4201 ggagactgt agtccacatc cagagcccc tcttaccgtt gctgtgccc cgtcaaatc
4261 aacgggctc tgcgccatc ccttgactac agcttcgag atctggccc gggcgagcc
4321 aaactctgtg acaaaactca cacatgccca cgtggccag cacttgaact cctggggga
4381 cctgacttcc cctcttccc cccaaaaccc aaggacccc tcatgatct cccgacccc
4441 gaggtacat gctgtgtggt ggcagtgaac caggaagac ctagaggtcaa gttcaactg
4501 taactggag cgtgtgaggt gcaataatgc aagacaaag cggcgaggga cagatcaac
4561 agcacagac gttgtgtcag cgtctcaac gctctgccc aggactggct gaatggcag
4621 gactacaagt gcaaggtctc caacaaagc cctccagccc ccatcgaaa aacatctcc
4681 aaggccaag ggcagcccc agaaccagc ggttacaacc tgcctccatc cggggagag
4741 ctgaccaaga accagctcag cctgacctgc gcttcaaa gctctatcc cagcagatc
4801 gctgtggagt gggagagcaa tgggagcgc gagaacact acaagacac gcccccgg
4861 ctgactccg acggctcctt cttctctac agcagctca cgtggacaa gagcagtg
4921 agcagggga acgctcttc atgctcctg atgcatgag cctgcacaa ccatcacg
4981 cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga

【図 7 3】

図 73

Figure 73

```

1 atgcgcgcgc tectggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
61 ggcccgccgat gctcccagcc cgggtgagacc tgcctgaatg gcgggaagtg tgaagcgccgc
121 aatgggcacgg aggcctcgct ctgtggcgccg gccctctgtg gcgcgcgcgc ccagagacccc
181 aacccgtgccc tcaatgacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga
241 ggctgtggcag aatattgctg cagctgtgccc ctgggctctct ctgggcccct ctgctgtgaca
301 cccctggaca atgctctgct caccaccccc tgcgcgaacg gggggcaactg gcacgtgctc
361 acgtctgacgg agtacaagtg ccgctgcccgc cccggctggg cagggaatac gtgccaagcag
421 gctgacccgtg gcgctctccaa cctctgcccgc aacggctggcc tptgcttgc cttcgaggcc
481 tcttacaactg gccatgccc cccagcttct cactggccca cctgcccaga ggacgtcaac
541 gagtgtggcgc agaagcccg gctttgcccgc caggaggcca cctgcacaaa cgaagtgcgc
561 tcttacaactg gctgtgccc gcgcaacccc actggcccca actgcgagcg gccctactgt
621 cctctgacgc cctgcccgc ccagacccgg gccacactg gcccccagg gcacgtcaac
721 cagcagtggt cctgcccgc aggtcttccc ggccagaaat gtgagaaaaa tatcgacat
781 tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt cctctgtggt acggctgtaa caactacaac
841 tgcctgcccgc cgcgcagatg gacaggtcag tactgtacc agaatgtgga cgaagtgcag
901 ctgatgccaa atgctctgca gaacggcggt acctgccaca aaccccagg tggctacaac
961 tgcgtgtgtg tcaacggctg gactgtgag gactgtacc agaatgtgga tgaactgtgc
1021 agcgcctgct gcttcccgc gccacacgg cctgctgccc cccacacgg gcacgtcaac
1081 tgttcccatg gccgcacagg cctgctgtgc caactcaac cctgtcaat gcgaagccat ctgcaactgc
1201 cctctgggggt acacggccc gcctgtgac caggacgtg atgaagtctc gctgggtgcc
1261 aacccctgtg agcatgcggg caagtgcact acacgcgtgc gctctctga gtgcagagt
1321 ctgcaagggt acacggggcc cgaatgcag atcgagtcba acgagtgctg ctgcaacgg
1381 tgcagaaacg acgcacactg cctggacagg attggagat tccagtgcac ctgactgccc
1441 ggctacagag gtgtgactg cgaagtcaac gacttccagt gacgtgcac agaatgtgga tgaactgtgc
1501 caaatggccc gctgcttggg caaatcaat gacttccagt gacgtgcac agaatgtgga tgaactgtgc
1561 acctgggcat tgcctgagta cgaatgtgga cgaatgtgga gcaacccctg caaagtgtg
1621 gccaaagtgc tggagggacc caacacttcc acctgtgtg ctgacggagg gtacaacggg
1681 acgcactgct aggtggacat cgaatgtgga cgaatgtgga cgaatgtgga cgaatgtgga
1741 aaggacggcg tgcgcacact cactgcccct tgcgcgcacg gctacaagg ccactactgc
1801 gagacacaaa tcaacagagt cctcaggccc cgcgcgcacg acgggggac cgcgcgcacg
1861 cgcgacaaag cctcactctg cctcctgctg aaggggacca caggacccaa ctgcgagat
1921 aacctggatg actgtgccc cactgcccgc cactgcccgc cactgcccgc cactgcccgc
1981 gactacagag gtgctgtgga gcgggctac acagggagca tgtgtaaat caaatccat
2041 gactgtgccc gcaacccctg ccacacccct cgcacacccg aggaacgcac caatgtctc
2101 acctgcccgt gcccccagg cctcaccacg cctcaccacg cctcaccacg cctcaccacg
2161 aacagcaacc cctgctgcca cggggctgca cggggctgca cggggctgca cggggctgca
2221 tgtgacctgc ggtgagtggt gacaaactg acatcaaca acatcaaga tgaactgacc
2281 cctgtgtgta acggcgccac ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag
2341 gagggtctca gctgtcccaa ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag
2401 gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat
2461 tacaacagct cactgtgga ggtggtgctg ggtggtgctg ggtggtgctg ggtggtgctg
2521 ggccgggggt cagagcaact cagagcaact cagagcaact cagagcaact cagagcaact
2581 tggcaagggt agacgtgga ggtgcaact aacagtgat tctgtgacg gtcggggac
2641 gggtgcatct ggcagaaact ccaagggcgc taccgtgac cctcaggcgc cctcaggcgc
2701 gggtgcaact ggcagaaact ccaagggcgc taccgtgac cctcaggcgc cctcaggcgc
2761 tctgtgacag agggcatcaa caggcccttc tgcactgac tgcactgac tgcactgac
2821 tctgtgaggt agggatctca agggatctca agggatctca agggatctca agggatctca
2881 actcaacat gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt
2941 tcccceaaa aacccaagg accccctatg attctcggg cccctgaggt caatgctg
3001 ggtgtggacg tgagccacga agacccctg gtaacttca actgtgactg ggacggcggt

```

【図 7 4 B】

図 74B

Figure 74B

```

3061 gagggtcata atgccaagac aaagcccggy gaggagcagt acaacagcac glaccgtgtg
3121 gtcagcgtcc tcaacgtctc gacacagac tgcctgaatg gcaagagcta caagtgcag
3181 gctcccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaaaca tctccaaagc caaaggcgag
3241 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggy atgagctgac caagaaccag
3301 gctcagctga cctgcttggg caaaggcttc tatcccagc acatgcctg ggaagtggag
3361 agcaatgggc agcccgagaa acagtacaag acaacgcttc cctgtgtgga cctcgacggc
3421 cctctctctc tctacagcaa gctcacctg gacaaagca ggtggcagca ggggaacgtc
3481 tctcatgct cctgtgctc cgtgatgct gaggtctgc acaaccact acacgcagaa gacgtctctc
3541 cgtctccggy gtaaatga

```

【図 7 4 A】

図 74A

Figure 74A

```

1 atgcgcgcgc tectggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
61 ggcccgccgat gctcccagcc cgggtgagacc tgcctgaatg gcgggaagtg tgaagcgccgc
121 aatgggcacgg aggcctcgct ctgtggcgccg gccctctgtg gcgcgcgcgc ccagagacccc
181 aacccgtgccc tcaatgacccc ctgcaagaac gccgggacat gccacgtggt ggaccgcaga
241 ggctgtggcag aatattgctg cagctgtgccc ctgggctctct ctgggcccct ctgctgtgaca
301 cccctggaca atgctctgct caccaccccc tgcgcgaacg gggggcaactg gcacgtgctc
361 acgtctgacgg agtacaagtg ccgctgcccgc cccggctggg cagggaatac gtgccaagcag
421 gctgacccgtg gcgctctccaa cctctgcccgc aacggctggcc tptgcttgc cttcgaggcc
481 tcttacaactg gccatgccc cccagcttct cactggccca cctgcccaga ggacgtcaac
541 gagtgtggcgc agaagcccg gctttgcccgc caggaggcca cctgcacaaa cgaagtgcgc
561 tcttacaactg gctgtgccc gcgcaacccc actggcccca actgcgagcg gccctactgt
621 cctctgacgc cctgcccgc ccagacccgg gccacactg gcccccagg gcacgtcaac
721 cagcagtggt cctgcccgc aggtcttccc ggccagaaat gtgagaaaaa tatcgacat
781 tgtccaggaa acaactgcaa gaacgggggt cctctgtggt acggctgtaa caactacaac
841 tgcctgcccgc cgcgcagatg gacaggtcag tactgtacc agaatgtgga cgaagtgcag
901 ctgatgccaa atgctctgca gaacggcggt acctgccaca aaccccagg tggctacaac
961 tgcgtgtgtg tcaacggctg gactgtgag gactgtacc agaatgtgga tgaactgtgc
1021 agcgcctgct gcttcccgc gccacacgg cctgctgccc cccacacgg gcacgtcaac
1081 tgttcccatg gccgcacagg cctgctgtgc caactcaac cctgtcaat gcgaagccat ctgcaactgc
1201 cctctgggggt acacggccc gcctgtgac caggacgtg atgaagtctc gctgggtgcc
1261 aacccctgtg agcatgcggg caagtgcact acacgcgtgc gctctctga gtgcagagt
1321 ctgcaagggt acacggggcc cgaatgcag atcgagtcba acgagtgctg ctgcaacgg
1381 tgcagaaacg acgcacactg cctggacagg attggagat tccagtgcac ctgactgccc
1441 ggctacagag gtgtgactg cgaagtcaac gacttccagt gacgtgcac agaatgtgga tgaactgtgc
1501 caaatggccc gctgcttggg caaatcaat gacttccagt gacgtgcac agaatgtgga tgaactgtgc
1561 acctgggcat tgcctgagta cgaatgtgga cgaatgtgga gcaacccctg caaagtgtg
1621 gccaaagtgc tggagggacc caacacttcc acctgtgtg ctgacggagg gtacaacggg
1681 acgcactgct aggtggacat cgaatgtgga cgaatgtgga cgaatgtgga cgaatgtgga
1741 aaggacggcg tgcgcacact cactgcccct tgcgcgcacg gctacaagg ccactactgc
1801 gagacacaaa tcaacagagt cctcaggccc cgcgcgcacg acgggggac cgcgcgcacg
1861 cgcgacaaag cctcactctg cctcctgctg aaggggacca caggacccaa ctgcgagat
1921 aacctggatg actgtgccc cactgcccgc cactgcccgc cactgcccgc cactgcccgc
1981 gactacagag gtgctgtgga gcgggctac acagggagca tgtgtaaat caaatccat
2041 gactgtgccc gcaacccctg ccacacccct cgcacacccg aggaacgcac caatgtctc
2101 acctgcccgt gcccccagg cctcaccacg cctcaccacg cctcaccacg cctcaccacg
2161 aacagcaacc cctgctgcca cggggctgca cggggctgca cggggctgca cggggctgca
2221 tgtgacctgc ggtgagtggt gacaaactg acatcaaca acatcaaga tgaactgacc
2281 cctgtgtgta acggcgccac ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag
2341 gagggtctca gctgtcccaa ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag ctgcaaaag
2401 gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat gacgtgcat
2461 tacaacagct cactgtgga ggtggtgctg ggtggtgctg ggtggtgctg ggtggtgctg
2521 ggccgggggt cagagcaact cagagcaact cagagcaact cagagcaact cagagcaact
2581 tggcaagggt agacgtgga ggtgcaact aacagtgat tctgtgacg gtcggggac
2641 gggtgcatct ggcagaaact ccaagggcgc taccgtgac cctcaggcgc cctcaggcgc
2701 gggtgcaact ggcagaaact ccaagggcgc taccgtgac cctcaggcgc cctcaggcgc
2761 tctgtgacag agggcatcaa caggcccttc tgcactgac tgcactgac tgcactgac
2821 tctgtgaggt agggatctca agggatctca agggatctca agggatctca agggatctca
2881 actcaacat gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt gccacccgt
2941 tcccceaaa aacccaagg accccctatg attctcggg cccctgaggt caatgctg
3001 ggtgtggacg tgagccacga agacccctg gtaacttca actgtgactg ggacggcggt

```

【図 7 5】

図 75

Figure 75

```

1 atgcgcgcgc tectggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcgcgcgcgc cgcgcgcgcgc
61 ggcccgccgat gctcccagcc cgggtgagacc tgcctgaatg gcgggaagtg tgaagcgccgc
121 tcttcttact cagagtgtcc ccatggccgc acaggtctgc tgtgcccact caacgcagca
181 tgcattcagca accctgttaa agagggtctc aactgcgacg ccaacccctg caatgcaag
241 gccattctgca cctgcccctc ggggtacacg ggcccggctg gacgcagga cgtggatgag
301 tctgtctggt gctgccaacc cctgcgacgt cctgcgacgt cctgcgacgt cctgcgacgt
361 ttcgactgcc agtgtctgca gggctacacg ggcccgcgat gcaatgctga cgtcaacag
421 tgcattctgca tgcctgtgca gagggtgctg acctgctgca gaacagacgc cactgtgaggt
481 agcagccctc gcttgcacaa tggccgtgct cgtgagaggt tgaactgaggt tgaactgaggt
541 tgcgccacgg gcttctactg gcatctgtgc ctgagaggt tgaactgaggt tgaactgaggt
561 ccccgcaaga atggtgcca atgctggac gggcccaaca cttaacatg tgtgtgacg
621 gaagggtaca cggggacgca ctgagaggt gacatgaggt agtgagccgc cgaacccctg
721 cactacggct cctgcaagg caaggtgccc accttcaact gcttgcgcg cccagcttgc
841 acggggcacc actgaggac caacatcaac gactgtctca gctgagcctg gctgagcctg
901 ggacccctgc agagccgca caacgctacc cctgctctc gctgagaggt gacacacgga
961 cccaaactgc agatcaact ggaatgact ggcagacgc cctgacact cctgacact
1021 ctggacaga tcatgagcta cgaatgtgct tgtgagcgg gctacacagg gacatgtgt
1081 aacatcaaca tcatgaggt tgcgggcaac cctgccaac acggggggac ctgagagac
1201 ggcattcaat gcttcaact cctgcccgc gagggtcac acgacccac ctgctgtct
1261 gggtaacaat gctgactgta cctgggggtg agtgggacca actgtgacat caaacacat
1321 gagtgtgaat ccaacccctt tgtcaacgg ggcacccgca aagacatgac cagtggctac
1381 tgtgtgacct gccggggagg cctcagcgt cccaaactgc agacacacat caacagagt
1441 gcttcaacc catgtctgaa ccagggacg tgtattgac cgttgcggg gtaacaagt
1501 aactgctgc tgccttcaac aggtgcccag tgtgaggtg tgcgtggccc gctgcccgc
1561 agccctgca gaaacggcgg ggaatgacg caatccgag actatgag cttctcctg
1621 cctgcccaca cgggctggca agggcagac tgtgaggtg acatcaacg gctgctctg
1681 agccctgccc ggcacggcgc atcctgccc agacccacg gcggtacgc ctgccaactg
1741 caggccgct acagtggcg caactgcag accgacatg acctggccc gggcgacgc
1801 aaactctgtg acaaaactca caactgccc cgtgcccac cactgaact cctgggggga
1861 cctgcaact tctcttctcc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgactc cgggacccct
1921 agaggtcact gctggtggt ggaactgag cagacagac cgaagacaa gttcaactg
1981 tgcctgagc gctgaggtg gataactgc aagcaaaag cctggaggga gactacac
2041 agcactgac gctgaggtg gcttcaac gcttcaac gcttcaac gcttcaac
2101 gactacagt gcaaggtct caacaaagc cctccacac cctccacac cctccacac
2161 aaagccaaag ggcagccccc agaacacag gttacacac tgcacacac cctggagag
2221 ctgaccaaag accagtcag cctgacctg cctgacctg cctgacctg cctgacctg
2281 cctgagagt gggagagcaa tgggagcag gagaacacat caaagacac gcttccctg
2341 ctgagacct agcgtctct cttctctac agcaactca cgtgacaa gagcaagt
2401 agaggggga acgtctctc atgctctct atgctctct atgctctct cctgcacaa ccaactacag
2461 cagaagagcc tctctctct cccgggtcaa tga

```

【図 7 6】

図 76

Figure 76

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctcttcttg gctgtgctgg tcaacgcaac tctctgcact
61 gccaggtctg ccaagcgccg ctgcttccac ggccgcacct gccatgacgc tgtggctctc
121 tctacttgcc agtgttccca tggccgcaca ggctctgcgt gccacctcaa cgacgatgc
181 atcagcaacc cctgtaacga gggcttccaa tgcgacacca accctgtcaa tggcgaagcc
241 atctgcacct gcccttcggg gtacacgggc ccggccttgc gccagagcgt ggaatgagtgc
301 tgcgtgggtg ccaacccttg cgagcatgcg ggcaagtgcg tcaacacgct gggctctctc
361 gagtgcacgt gttcgcagg gtacacgggc ccctcgctcg agatcgacgt caacgagtgc
421 gtctcgaaac cgtgccagaa cgacgcaccc tggcctggac agattggggg gtttcagtgct
481 atccgcacgc ccgcttacga ggggtgtgac tgcgaggcca acacagacga gtgtgcacgc
541 agccctctgc tgcacaatgg ccgctgctcg gacaagatca atgagttcca gtgcgagtgc
601 cccacgggct tcaactggca cctgtgcag aacgatgtgg acgagtgtgc caagcacccc
661 tgcgaagaat gtgccaaagt cctggacgga cccaacactt acacctgtgt gtgcacggaa
721 ggttacacgg qgacgcactg cgaggtggac ttcgactgag tgcgacccga cccctgcaac
781 tccgctctcc cgaaggacgg cgtcgccacc ttcaacttgc tctgcgcccc agcgtacacg
841 ggccaccact gcgagaccaa catcaacgag tgcctccagc agccctgcgc ccacgggggg
901 acctgccagg acccgacaaa cgcctacact agcagccctt ggcactcggg caactgtctg
961 aactgcgaga tcaacttggg tgacltggcc agcagccctt acacaggggg catgtgtaac
1021 gacaagaatc atggttacga gtgtgctctg gagccggggt acacaggggg catgtgtaac
1081 atcaacatcg atgagtgtgc gggcaacccc tggccacaac gggggcacctg cgaaggacggc
1141 atcaatggct tcaacttgcg ctgcccgcag ggttaccacg accccacactg cctgtctcga
1201 gtcaatgagt gcaacagcaa cccctgctgc caggggggct ccggggacag cctcaacggg
1261 tacaagtgcg actgtgacct tgggttgagt ggggacaaat gtcacaacaa cgtacacgag
1321 tgtgaatcca acccttggtt caacggcgcc acctgcaaa acatgacaa tgcgtactgt
1381 tgcactcgcc gggagtggtt caggtgtccc aactgcaaa ccaacatcaa cgaagtgtgc
1441 tccaacccat gttctgaacca gggcagtggt attgacagcg ttgcccggta caagtgcac
1501 tgcctgtgct cctacacagg tgcactgtgt gagggtgtgc ttgcccggta tgcctccacg
1561 cccctgcagaa acggcgggga gtgcaggcaa tccgaggact atgagagctt ctctctgtct
1621 tgcctccacg cctgcaagg cgaacctgtg gaggtcgaca tcaacgagtg cttctgtgagc
1681 ccgtgcgcgc acggcgctac ctgccgaac acccaaggcg gctacgcctg ccaactgcacg
1741 gcggctacaa gtggcgccaa ctgcgagacc gacatagatc tggggcccgcg cgaagccaaa
1801 tcttgtgaca aaactacac atgcccacgg tggccagcac ctgaactcct ggggggacgt
1861 tcaagtcttc tcttctcccc aaaccccagg gacacctca tgcactctcc gacccctgag
1921 gtcaactgct tgggttgagg cgtgagccac gaagacccct aggtcaagt ctcaactgtac
1981 gtggacggcg tggaggtgca taatgcacgc cgaagaggcg gggagggagc gtcaacagcg
2041 acgtaccgtg tggctgagct cctcacgcgc ctgcacacag acggctgtaa tgcgaagcag
2101 tacaagtgcg agtgttccaa caaaggctgc tcaaaaaggg cccactcccc atctctcaaa
2161 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tcaacccctc cccactcccc ggaatgagct
2221 accaagaacc agccccgaga accacaggtg tcaacccctc cccactcccc ggaatgagct
2281 gtggagtggg agagcaatgg gcaagccggg aacaactcaa agaacacgcg cccctgtctg
2341 gactccagag cctctctctt cctctacacg aagctccacg tggagcaagc cagggtggag
2401 accgggaagc tcttctcatg cctccatgat catgaggttc tgcacaacca ctcaacgcag
2461 aagagccctt cctctctccc cctgaatatg

```

【図 7 7 A】

図 77A

Figure 77A

```

1 atgcgcgcgc tctctggcgc cctctgtctg ctggcgctgc tggccgcgct cggccgacga
61 ggcccgccgc atgcccagcg cgcctgtctc cagggcgcca cctgcacaga cgtgtggcgc
121 tctcttactc cgaagtgtcc ccatggcgcc acaggtgtgc tgtgcacact caatggcaag
181 tgcattcaga accctctgaa cgaagggtct aactgtgaca ccaacctctg caatggcaag
241 gctacaccca cctgcccctc ggggtacaca gggcgctctg cgaacctctg caatggcaag
301 tgcctgctgg gtgcacacca ctggagagat gggcgagga gcatcaacac gtcgggtctc
361 ttcgagtgcc agttactctg gggctacacg gggcccgat cgaagatcga cgtcaacagc
421 tggcgcttga acccgtgcga gaacgacgcc accgtctctg accagattgg ggaatttcaa
481 gtcacttctga tggccgctc cgaaggltgt cactgcgagg tcaacacaga cgaattgccc
541 agacggccct gcttgcacaa tggccgctgc ctggacaaga tcaatgagtc cgaattcaga
601 gcccacacg gcttcaactg gcatctgtgc cagtacagtg tggacgagt tgcacgaccc
661 cctgtcaaga atgggtgccaa tggcctggag ggacccaaca cttacacctg tctgtgcacg
721 gaagggttaca cggggacgca ctgcgagtg gactcagatg agtgcgaccc cgaacctctg
781 caactcggct cctgcaagga cggcgctgcc accctcaact gctctgcacg ccaagctac
841 accggccacc actgcgagac caacatcaac gagtgtctca gccacacctg ccccgccagg
901 ggcaactgcc aggaacgcga caacgctcac ctctgtcttc gcttgaagg gacccaagga
961 cccaactgct agatcaactt ggaatgactg gccagcagcc cctgcgactc gggcactgtg
1021 ctggacaaga tgcagtgcga cgaatgtgct tgtgagcctg gagggtctac actgtgactg
1081 aacatcaaca tgcagtgtgt tggcggaac ccttgccaca accggggcac ctgcgaggac
1141 ggcactcaatg gcttcaactg cgtgtgccc gagggtctac accgaccccc cgaactgtct
1201 gagggtcaatg agtgcaacag caacctctgc gtccacgggg cctgcgggga cagcctcaac
1261 ggggtcaaatg gcgactgga ccttgggttg aggtgggacg ggggtctac actgtgactg
1321 gagtgtgaat ccaacctctg tgcacaggg ggcaccttga aagactgac cagtgtgtgt
1381 gtgtgcacct gcggggaggg cttcagcggt cccaacttga agacacacat caacagagtg
1441 gcttcaaccc catgtctgaa caggggacag tgaattgagc agctgtctgc cgtgcacccc
1501 aactgtctgc tgcctgcac accgtgcacg aggtgcagtg tggagtgag tgcggcgccc gtcggccccc
1561 agccctctga gaaacggcg ggaagtgcag tggagtgag caatccagag actatgaag cctctctgtg
1621 gctgtcccca cggcgaggca agggcagacc tggtaggctg acatcaagca gtcgctctgt
1681 agccctgtgc cctgcaagga atctgcacg aacacccag cggcctaccc gtcgcaactg
1741 caggccggct acagtggcg caactgcag accgacatcg agactgccc gcccaacctg
1801 tgcacaacag ggggtctctg tcaacagcgc actcaacag cctctgtctg cctctgccc
1861 ggtctccggg gcaacttctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
1921 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
1981 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2041 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2101 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2161 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2221 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2281 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2341 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2401 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc
2461 accgggggca actgcagga cctgcgtctg tgaaggagac atcaacagtg gtgcacatga ccccgctgc

```

【図 7 7 B】

図 77B

Figure 77B

```

2881 tgcagcgccc gtggcaccaa gaactgcgtg cagcgcgcca atgacttcca ctgcgagtgc
2941 cgtgtcgtgc acacggcgcg cgcgtgcgag tccgtcatca atggctgcaa agcgaagccc
3001 tgcgaagaatg ggggacactg cgcgtggccc tccaacacgg ccccggggtt catctgcgaag
3061 tgcctcgcgg gcttcgaggg cgcacagtggt gagaatgacg cctgtacctg cggcagcctg
3121 cgtctgctca acggcgccac atgcatctcc gggcccgcca gccccacctg cctgtgcttc
3181 gggcccttca cgggccccga atgcccagtc acctccagga gccctctgct gggcgccaac
3241 cccctgctca acagggggag ctgtgagccc acatccgaga gccctctcta cctgtgctg
3301 tggcccgcca aatlcacagg gctcttgtgc actacactgg actacagcct cgaagatctg
3361 gggccggggc agcccaaatc ttgtgacaaa actcacactt gccccacgtg cccagcactt
3421 gaactcctgg ggggacagtc agctcttctc ttcccccaaa aaacccaagg acactctagt
3481 accctccgga cccctgaggt cacatgcgtg gttggggag tgaacacga agactctagg
3541 gtcaagtcca actggtacct ggaagcgctg gagggtgata atgcgaagac aaagcccgcg
3601 gaggagcagc acacagcacc gtaccgtgtg gtcagtgctc tcaactctct gcacacagac
3661 tgggtgagtg gcaaggaatg caagtgcag gtcttcacaa aagcctcccc agccccatc
3721 gagaanaaca tctccaaagg caaaggcgag ccccgagaa acacagtgta cactctgcc
3781 ccatcccggg atagctgac caaagaccag gtcagcttga cctgcctgtt caaaggcttc
3841 tatcccgagc acatcccggt ggaagtggag agcaatggcg agccggagaa gactacaaag
3901 accacgcttc cgtgtgga ctcccgagcc tctctcttcc cctacagcaa gctaccctg
3961 gacaagagca gttggacga ggggaagctc tctctatgct cgtgtatgca tgaagctctg
4021 caaacacact acacgacgaa gaggctctcc ctgctccgg gtaaatga

```

【図 7 8 A】

図 78A

Figure 78A

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctcttcttg gctgtgctgg tcaacgcaac tctctgcact
61 gccaggtctg ccaagcgccg ctgcttccac ggccgcacct gccatgacgc tgtggctctc
121 tctacttgcc agtgttccca tggccgcaca ggctctgcgt gccacctcaa cgacgatgc
181 atcagcaacc cctgtaacga gggcttccaa tgcgacacca accctgtcaa tggcgaagcc
241 atctgcacct gcccttcggg gtacacgggc ccggccttgc gccagagcgt ggaatgagtgc
301 tgcgtgggtg ccaacccttg ccaacccttg cgaagatgcg cggcactgca tcaaacagct
361 gagtgcacgt gttctcaggg ctacacgggc ccccgatgag agatcgacgt caacgagtgc
421 gctgtgaacc cgtgccagaa cgaagccacc cgtgcacgag agatcgagga gttccagtgc
481 atctgcagtc cgggttacga ggggtgtgac tgcgaagatca accacagaga gttgtccagt
541 agccctctgc tgcacaaatg cgcgtgtctg cgaagaatga actgattcca gtgcagtgtc
601 cccacgggct tcaactggga tctgtgccc tacaagtgtg acgagtgtgc cagcagtgct
661 tgcgaagaat gtgccaaagt cctggacgga cctggacgga atcgactgag gtgcaccccc
721 ggggtacacg ggaagcactg cgaagtgagc atcgactgag tgcacccgca cccctgcac
781 taagggtctc gtaaggatgg cgtgcagcgc ttaactgccc cctgcgcgcc aggtctgac
841 gccacactc ggaagatcca catcaagag tgcactgccc agcctctgcg ccccgaggcg
901 acctgccagg acccgacaaa cgcctacact tggcttctgc tgaaggggag cacaagaccc
961 acctgcgaga tcaacttggg tgaactgtgc agcagccccc cgaactcggt cctctgtctg
1021 gacaagatcg atggctacga gtgtgctgt gaggccggct accagggag catgtgtaac
1081 atcaacatcg atgagtgtgc gggcacaacc tgcacacccc ggggacactg cgaagacggc
1141 atcaatggct tcaactgccc cctcccgagg ggtcaccag accccactct cctctctgag
1201 tcaatgaagt caaacagcaa cccctgcct acccgggcct gcggggacag cgtgcagctg
1261 racaagtgcg actgtgaccc tgggtggagt ggggacaaat gtcacatcaa caaacatgag
1321 tgtgaattcca acccttgtgt caacggcgcc actgcgaag actgacacag tggctacgtg
1381 tgcacctgcc gggagggtct cagcggtccc aactgcccga ccaacatcaa cgaagtgtgc
1441 tccaacccat gcttgacaca gggcacgtgt attgacagc tgcgggggta caaagtgtgc
1501 tgcctgtctg cctacacagg tgcacggcaa tccgagactc atgagagctt cctctgtgct
1621 tgcctcagaa accggcgagg gtgcagggca tccgagactc gagggtgaca tcaacagtg
1681 ccgtgcccgc cctgcgacat ctcgacgaac accacgggcy cctaccgtg ccaatgcca
1741 gccggttaca gtggcgccaa ctgcgagacc gacatcgagc actgcggcg caaccgtgtg
1801 caacaagggg cctctctgca agacggcatc aacagggctt cctgtgactc ccaagtgacc
1861 tccggggcca cctctctgta ggaaggacat aacaggtgtg tcaacgtgta cctgcggc
1921 ggggacacac ctgagagact cgtggacag tacaagtgta cactgctgac gctcggcg
2041 acctgtgtg ctgacatcaa cctgtcaac tgcgtgtgca ccccggtgtg caacgtgtgc
2101 tctgcagac acctgtcaa tgaagtgcag tcaacgctc cctgtgctg cggacactgt
2161 caggacggct cggctctcta cagtgacac tggccccagg gctcacctg cccaactgc
2221 ccaagcctgt tcaactgtgt tgaactctg cctgcgaag agggcgcaa cctgtggcg
2281 acccaacccc agtaccctgt cgaagtgtgc agcggttgc cggccttta ctgcagctg
2341 ccaagcgtgt cctgtgagt ggtgcgag cgaacaggt tgaagttgc cctgctgtg
2401 cagcatggag ggtctgtgt ggaacgggg aacacgacc actgcgctg ccaaggggcg
2461 taccacagca cgtactgtga ggaactgtgt taactctga agtcgtgac cggctacac
2521 gggggcaact gcaaggaact cccggcggg taactctga agtcgtgac cggctacac
2581 ggggtgaact gctctgagga gatcgacgag tgcctctcc accctgcca gaaagggggc
2641 acctgtctg acctcccaa cactcaag gatctctgc cagggggcac tcaaggtgtg
2701 cactgtgaga tcaactgtga cgaactgca rccccgtg acccgtgt cggagacccc
2761 aagtgtctta acaacggcac ctgctggag caggtggggc gctacagctg cactgcctc
2821 ccgggtcttg tgggtgagc ctgtgaggg gatgtcaacg acttctactg cgaagtgcgt
2881 gacgccccgt gcaaccagaa ctgctgtgac cgtctcaatg acttctactg cgaagtgcgt
2941 cctccctaca cggggcgccg ctgcgagtc gctcaaatg acttctactg cgaagtgcgt

```

【 図 7 8 B 】

図 78B

Figure 78B

```

1301. aagaatgggg gcaactgggc cgtggctccc aacacggccc gggggttcat ctgcaagtgc
1361. cctgcggggc cggagggggc cactgtgtgg aatgacggct gtaacctggc cagcctgggc
1321. tgcctcaacg ggcgcacatg catctccggc cggcgacggc ccaacctgct gtgacctggc
1381. cccctcaacg ggcgcacatg cagctccggc ggcgcacggc cctgctgggc cggcacaaccc
1241. tgcatacaac aggggactgt tgaggccaca tccggagagc cctttcaacg tgcctgtggc
1301. cccgccaac tcaacgggct ctgtgtgca atcctggact acagcttcgg agatctgggc
1361. cggcgcgagc ccaaatctgt tgacaaaact caacatggc cagcgtggcc agacactgaa
1421. ctctcggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac
1481. tcccgagccc ctgaggtcac atgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga ccttgaggtc
1541. aagtccaact ggcactggga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag
1561. gacgagtaca acagcagcta cgtgtgggt agcgtctcca cgtctctgca ccaagactgg
1561. ctgaatggca aggagtacaa gtgcagggtc tcccaaaaag cctccacg cccactcgag
1721. aaaaaccatc ccaagccaa agggcagccc cgaagaccac aggtgtacac cctgccccca
1781. ttcgggagtg agctgaccaa gaacggagtc aagctgacct gctgtgtcaa aggtctctat
1841. cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagagc aatgggcagg cggagaaaca ctacaagacc
1901. accgctcccc tgcctgactc cgaaggctcc tcttctctct acagcaagct caccgtggac
1961. aagagcaggt ggcagcagg gaaactcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggcctcgac
4021. aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga

```

【 図 7 9 】

図 79

Figure 79

```

1 atgcgcgcgc tcttggcgcc cctgtctgtg ctggcgctgc tgcctggcgt cgcgcgcaga
61 ggcgcgcgat gtgcacgag cccctgctgt caaatggccc gctgctggga caagatcaat
121 agttctcagt gcgagtgcgc cccctgcttc actgggcttc tgtgctgga cgaatgggac
181 agttgtgaca gcaacccctg caagaatggt gccacgtccc tgagcggaac caactcttac
241 acctgtgtgt gcaagggaag gtacatcggg accgactggc agttgacat cgaatggtgc
301 gaccgcgacc cctgccaact cggctcctgc aaggacggcg tgcacaactt cactcgtccc
361 tgcgcctcag gctacacggg ccacctgccc gagaccaaca tcaagagtg ctcacgacag
421 cccctgcccgc acgggggacac ctgcacgagc cgcgacaacg cctacactct ctcgcctgtg
481 aaggggacaa caggacccaa ctgcgagatc aacctggatg actgtgccag cagccctctg
541 gactcgggca cctgtctgga caagatcgat ggctacgagt gtgctgtgga gccggcttac
601 acaggagaga tgtgtaacat caacatcgat gagtgtcggg gcaacccctg ccaacaggg
661 ggcacctgcy aggacggcat caatggcttc acctgcctgt gccctgaggg ctaccacgac
721 cccacctgccc tgtctgaggt caatgagtgc aacagcaacc cctgcttcca cggggctctg
781 cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac tctgacctgt ggtgaggtgg gaccactgt
841 gacatcaaca acaatgagtg tgaatccaa cctgtgtgta cggcgcgacc ctgcaagacc
901 atgaccagtg gctactgtgt cacttgcggc gagggttcca gcggctccaa ctgcagacc
961 aacatcaacg agtgcgctgc caacctgat ctgaaccagg gcaactgtat ggcgtgtg
1021 gccgggtaca agtgcaactg cctgctgccc tacacagagt ccaactgtgt ggcgtgtg
1081 gccctgtgtg ccccgagccc ctgcagaaac ggcggggagt gcaagcaatc cgaagctat
1141 gagagcttct cctgtgtctg ccccgagggc tggcaagggc agactctgtg ggtcgaatc
1201 aacgagtgcg cctgtgagccc gtgcgggccc ggcgcatcct gccagaacac cctgctggg
1261 taccgtgccc actgcgaggg cggctacagt gggcgcaact gcagacgga cctgcagac
1321 tgcgcgcaca acccgctgca caacgggggg tctgtgacag aocggatcaa caggctctc
1381 tgcgactgccc tgcgcggctt cgggggcaat tctgtgag agacatcaa cgaagtctg
1441 ggcgcgggag agcccaaatc ttgtgacaaa aulcaacat gccacagtg cccagacact
1501 gaactcctgg ggcgacgctc agtctctctc ttcctccaa gcccaaggga caccctatg
1561 atctcccgga cccctgaggt cactgtgtgt gtggtggagc tgagccagca agacctgtg
1621 ctcaagtcca actggtactg ggaaggctgt gaggtgcat atgcnaagac aaagcgggg
1681 gaggagcagt acaacagcac gtactgtgtg tgcagctctc taccgtctct gccacagac
1741 tggctgaact gcaaggagta caagtgcag gtctccaaac aagcctctcc agccccctg
1801 gagaaaaacc tccccaaagc caaaggcgag ccccgagaa ccaaggtgta caccctgccc
1861 ccatcccggg acgagctgac caagaaccag gtcagctgta cctgctgtgt ccaagctctc
1921 taccacagcg acactgcctg ggaagtggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag
1981 accagcgccc cgtgtctgga ctcgacggc tcttctctcc tctacagcaa gctcaccgtg
2041 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgct tctctatgct cgtgatgca tgaggtctg
2101 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga

```

【 図 8 0 】

図 80

Figure 80

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctctctctg gctgtgtctg tcaacgccc tctctgcact
61 gccaggtgtg ccaagcagccc ctccctctgc atgtggcctg gctgtgacaa gatcaatgag
121 tccagtgctg agtgcccacc ggactctcat gggcatctgt gccactgca tctggaacag
181 tctgcccaga ccccctctgc aagtgctctg acgacccaa cacttcaacc
241 tctgtctgca cgaaggggta caccgggagc cactgcgagg tggaactcga tgagtgcgac
301 cccgacccct gccactacgg ctctctgcaag gaecggctcg ccaacttcaa ctgctctctg
361 cgcctagggt acacggggca ccatctcgag accaaccata acagtgctc cagccagccc
421 tgcgcgcacg ggggcacctg ccaggacggc gacaaagcct acctctgct ctgcttgaag
481 gggacacacg gacccaactg cagatcaaac ctggagtcat gtgccaagac cccctggcac
541 cggggcacct gctctgacaa ctccatgggc tacgagtgtg cctgtgagct gggctacaca
601 gggagctagt gtaacatcaa catcgatgag tgtgggggca acccttgca caacggggg
661 actgtggagg acggatcaaa tggcttcaac tgcgtgtgccc cggaggggta ccaagacccc
721 acctgctatg ctgaggtcaa tgagtcaaac agcaaccccc cgttccagcg ggcctgcagg
781 gaaacccctc accggtacaa gtgcgactct gaacctgggt ggaagtggag caactgtgac
841 atcaacaaca atagagtgtga acocaaacct ttgttcaacg cgcgcacctg caaagacatg
901 accagctggt acgttgtcac ctcccgggag ggtctcaagc gtcocaaact ccaagaccaa
961 atcaacgagt gtgcgttcaa cccatgctcg aaccagggca cgtgacttga cgaqcttgc
1021 ggttacaaat gcaactgctc gctgcctcac caaggtgcca cgtgtgaggt ggtctggcc
1081 cctgtgtgccc ccaagcccctg caggcaagcc caaggagtgca gccaatcgga ggaactatga
1141 agcttctctc gtgtctgccc caggcgctgg caaaggcgca cctgtgagct cgaactcaac
1201 ggtgtgcttc tgagccctgt caggcgctgg gcatcctgac agaacaacca cgycggtcac
1261 cgtctgcaat gccaggcgcg ctacagtggg cgtcaactgc agacagcat ctgagactgc
1321 cggcccacac cgtgtcacaa cgggggctctc tgcacagacg gcatcaaac ggtcttctgc
1381 gactgctctg cgggcttccc ggggactctc tgtgaggagg acatcaacga ggaatctggg
1441 cggggcgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgccc caccgtgccc agcaactgaa
1501 ctctcggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac
1561 tcccggaacc ctgaggtcac atgctgtggg gtggacgtga gccacgaaga ccttgaggtc
1621 aagtccaact ggtacgtgga cggcgctggg gtgcataatg ccaagacaaa gcccggggag
1681 gacgagtaca acagcagcta cgtgtgccc agcgtctca cgtctctgca ccaagactgg
1741 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaggccc tcccaaaaag cctctccagc cccactcgag
1801 aaaaaccatc ctaagcccaa agggcagccc cgaacacac agctgacct cctgtcccca
1861 tccggagatg aggtgaccaa gaaccaggtc gactgacct cgtgtgcaaa aggtctctca
1921 cccagcgaga tgcctgtgga cgtggagagc aatgggagcg cggagaacaa ctacaagacc
1981 accgctcccc tgcctgactc cgaagctccc tcttctctcc acagcaagct caccgtggag
2041 aagagcaggt ggcagcagg gaaactcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggcctcgac
2101 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga

```

【 図 8 1 】

図 81

Figure 81

```

1 atgcgcgcgc tcttggcgcc cctgtctgtg ctggcgctgc tgcctggcgt cgcgcgcaga
61 ggcgcgcgat gtgcacgag cccctgctgt caaatggccc gctgctggga caagatcaat
121 agttctcagt gcgagtgcgc cccctgcttc actgggcttc tgtgctgga cgaatgggac
181 gactgtgaca gcaacccctg caagaatggt gccacgtccc tgagcggaac caactcttac
241 acctgtgtgt gcaagggaag gtacatcggg accgactggc agttgacat cgaatggtgc
301 gaccgcgacc cctgccaact cggctcctgc aaggacggcg tgcacaactt cactcgtccc
361 tgcgcctcag gctacacggg ccacctgccc gagaccaaca tcaagagtg ctcacgacag
421 cccctgcccgc acgggggacac ctgcacgagc cgcgacaacg cctacactct ctcgcctgtg
481 aaggggacaa caggacccaa ctgcgagatc aacctggatg actgtgccag cagccctctg
541 gactcgggca cctgtctgga caagatcgat ggctacgagt gtgctgtgga gccggcttac
601 acaggagaga tgtgtaacat caacatcgat gagtgtcggg gcaacccctg ccaacaggg
661 ggcacctgcy aggacggcat caatggcttc acctgcctgt gccctgaggg ctaccacgac
721 cccacctgccc tgtctgaggt caatgagtgc aacagcaacc cctgcttcca cggggctctg
781 cgggacagcc tcaacgggta caagtgcgac tctgacctgt ggtgaggtgg gaccactgt
841 gacatcaaca acaatgagtg tgaatccaa cctgtgtgta cggcgcgacc ctgcaagacc
901 atgaccagtg gctactgtgt cacttgcggc gagggttcca gcggctccaa ctgcagacc
961 aacatcaacg agtgcgctgc caacctgat ctgaaccagg gcaactgtat ggcgtgtg
1021 gccgggtaca agtgcaactg cctgctgccc tacacagagt ccaactgtgt ggcgtgtg
1081 gccctgtgtg ccccgagccc ctgcagaaac ggcggggagt gcaagcaatc cgaagctat
1141 gagagcttct cctgtgtctg ccccgagggc tggcaagggc agactctgtg ggtcgaatc
1201 aacggagtgcg cctgtgagccc gtgcgggccc ggcgcatcct gccagaacac cctgctggg
1261 taccgtgccc actgcgaggg cggctacagt gggcgcaact gcagacgga cctgcagac
1321 tgcgcgcaca acccgctgca caacgggggg tctgtgacag aocggatcaa caggctctc
1381 tgcgactgccc tgcgcggctt cgggggcaat tctgtgag agacatcaa cgaagtctg
1441 ggcgcgggag agcccaaatc ttgtgacaaa aulcaacat gccacagtg cccagacact
1501 gaactcctgg ggcgacgctc agtctctctc ttcctccaa gcccaaggga caccctatg
1561 atctcccgga cccctgaggt cactgtgtgt gtggtggagc tgagccagca agacctgtg
1621 ctcaagtcca actggtactg ggaaggctgt gaggtgcat atgcnaagac aaagcgggg
1681 gaggagcagt acaacagcac gtactgtgtg tgcagctctc taccgtctct gccacagac
1741 tggctgaact gcaaggagta caagtgcag gtctccaaac aagcctctcc agccccctg
1801 gagaaaaacc tccccaaagc caaaggcgag ccccgagaa ccaaggtgta caccctgccc
1861 ccatcccggg acgagctgac caagaaccag gtcagctgta cctgctgtgt ccaagctctc
1921 taccacagcg acactgcctg ggaagtggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag
1981 accagcgccc cgtgtctgga ctcgacggc tcttctctcc tctacagcaa gctcaccgtg
2041 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgct tctctatgct cgtgatgca tgaggtctg
2101 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga
2221 ctgtctctcg gtaaatga

```

【 図 8 2 】

図 82

Figure 82

```

1 atgtggggnt ggaagtgect cctctctctgg gctgtgctgg tcaacagccac tctctggaact
61 gccagggtgtg ccaagtgaacct ctgcgcgaac ggggccaact gaacggactg cgtggacagc
121 tacaactgtga cctgcccgcgc aggtctctcag gggatccaact gtgagaacaa caagcctgac
181 tgcacagaga gctcctcgtgt caacggttgcc acctgogtgg acggcatcaa ctgcttcacc
241 tgcctgtgtc caccgcgctt caacggcgagc taactgccaac acgaagtcaa tgaagtgcagc
301 tcaacagcctc gctcgcgatgg cggcacctgt caggacggct gcgctctcta caggtgcaac
361 tgcctccaggg gctacactgg ccccaactgc cagaaccttg tgaactgtgt tgaactctcg
421 cctgtgaaga acggcgcgaa atgctgtgag acccaacacc agtacaogctg cgaagtgcctc
481 agcggttgga cggcgcttta ctgcgacgtg cccagcggtg cctgtgaggt gactgcgacg
541 cgacaaggtg ttgacgttgc cggcctgtgc cagcatggag ggcctctgtg ggaacgctgc
601 aacacgcaac actgcgcgtg cggcggtggc tacaacggca gctactgtga ggaactgtgtg
661 gacaggtgct caccacgccc ctgcgagaac gggggcacc ctgacgtacta cctggcgggc
721 taactctgca agtgcgttgc cggctaccac ggggtgaact gctctgagga gatcgacag
781 tgcctctccc accctctgca gaacgggggg acctgctctg acctcccaa cactacaa
841 tgcctctgca cagggggcac ctgggggttg cactgtgaga tcaacgttga cgaactgcaat
901 ccccccgttg acctcgtgtc cgggagcccc aagtgtctta acaacggcac ctgctgtgac
961 caggttggtg gctacagctg caactgcctg cggggtcttg tgggtgaagc ctgctgaagg
1021 gatgtcaacg agtgcctgtc caatcctctg gacgcctgtg gacccagaa ctgctgtgac
1081 cgcgtcaatg acttccactg cgaagtgcct gctgtgtaca cggggtgctg ctgctgagtc
1141 gtcatcaatg gctgcaaaag caagcctctg aagaatgggg gacactgtgc cgtggtctcc
1201 aacacgctgc cggggttcat ctgcaactgc cctgcgggct tcaaggggtc cagctgtgag
1261 aatcagctgc gtacctgcgg cagcctctgc tgcctcaacg gcgcgcacat catctccggc
1321 cgcagcaqcc ccaactgctc gtgctctggc cctctcaacg gccccgaatg ccaagtctccg
1381 gccagcaqcc cctgctctgg cggcaacccc tgcatacaac agggggaactg tgagccca
1441 tccgagaqcc cctctcaacg ttgctctgtc cccgcgaact caacggggtc cttgtgcaac
1501 atcttggaact acagctcttg agatctggg cggggcgagc ccaaatcttg tgaacaa
1561 cacaactgccc caccgtgccc agcaacttga cctctgggg gacgtgcaat cttctctctc
1621 ccccaaaac ccaaggacac cctcagatgc tcccggatc ctgaggtcac atcgctggtg
1681 gtggcagaga gccacgaaag ccttgaggtc aagtccaact agtacttga cggcgtgga
1741 gtcataatg ccaagacaaa gcgcgtggag gacagatga acacagctga cgtgtggtc
1801 agtgcctcca cgtcctgca cgaagctgag ctgaatggca aggaatgaca gtgcgaagtc
1861 tcaacaacag cctctccagc ccccatcgag aaaaactct ccaagccaa agggcagccc
1921 cgagaacacc agtgtgacac cctgcccaca tcccgggatg agctgacaaa gaacagagtc
1981 agcctgacct gctggtgcaa agctctctat cccagcgaca tgcctgtgga gtgggagaagc
2041 aatggcgagc cgggagaaca ctacaagacc acgctctccg tgcctgacct cgaaggtctc
2101 tctctctctc acagcaagct caccgtggag aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc
2161 tcatgctccg tgatgcatga ggtctgtcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg
2221 tctccgggta aatga

```

【 図 8 3 】

図 83

Figure 83

```

MQPPSLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCQAPGFLGE
TCQFPDPCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLED
PCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQCSCMPGWTEGQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPIQIC
HCPFGFEHACERDVNECFQDPGCPKGTSGHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
RGCSNGGTCLMPEKDSFHLCLCPPGFIGPDCVNPDCNVSHQCCNGGTCCQDGLDITYTC
LCPETWTGWDCEDEVECTGQPPHCRNGGTQNSAGSFHCVSVSGWGGTSCENLDDCI
AATCAPGSTCIDRVGSFSLCLPPGRTGLLCHLEDMCLSQPCHGDAQCSNTPLTGSTLCLC
QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCINTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECL
SQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGLEGLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQCICL
PGFSGTRCEEDIDECRESSPCANGGQCQDPGAFHCKCLPGFEGPRCQTVEDECLSDPCPV
GASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDKDKANCLCPDGSFGCAP
FEDNCTCHHGHCRSSCVCDVGTGPECEABELGGCISAPCAHGGTCYPPQPSGYNCTCPTG
YTGPTCSEEMTACHSGCLNGGSCNPSFGGYCTCPPSHTGPPQCTSTDYCVSAPCFNGG
TCVNRPGTFSCLCAMGFQGPCEGLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCTGYTGGG
CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHLCLQGWTPGLCNLPLSSCQKAALSQGDVSSLC
CHNGGLCVDSGSPSYFCHCPGPGFQGSQCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGY
DQNGCSKELDACQSPCHNHGCTCPKPGGFHACAPPGFVGLRCEGVDDECLDQCPHTGT
AACHSLANAFYQCQLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLGFICHCPKGF
GPTCSTRAPSCGFHHCHHGLCLLPSKPGFPFPRACLSGYGGPDCLTPAPKGCQPPSPC
LYNGCSSETTLGLGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPFQAGKCEGRSGDGCADAGCSGGPGNWG
GDSCLGVPDPWKGCPSHRCWLLFRDGGCHPQCDSEELPDGYDCETPACTPAYDQYCH
DHFHNGHCXKGCNTAECGWDGDCRPEDGDFEWGFSALLLVLSPPALDQQLFALARVLS
LTLRVGLAVWRKDRDGRDMVYPYPGARAERKLGTRDTPYQERAAQTQPLGKETDLSL
FVVMGVCLSRGCPDHPASRCFWDPLGLLRLFAAMAAGVGALEPLLPGLPLAVHPHAGTAP
PANQLWPVVLCSFVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHAGLWLPFGFTRRPRTQSAFHR
RPLGEDSICLKALKPKAEVDEGVMCSGPEEGEVGQABETGPPSTCQLWSLGGCGA
LPQAAMLTPPQESEMEAPDLTRGPDGVTPLMSAVCCGVEQSGTFQGAWLCPPEPWEPL
DGGACAPQATVGTGTPPLHLAARFSRPTAARLLLEAGANPNQDPRAGRTPLHAHAADAR
EVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDLVEELIAAQADVARDKWKCTALHW
AAAVNNARAARSLLOAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEAQLLLGLGAARELRDQAG
LAPADVAHQNRHNDLLTLEAGAPPEARHKAATPGREAGPPPRARTVSVSVPHPGGALPR
CRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGAYSHCRSLSGVAGAGGPTPRRRFSAGM
RGRPRNPALMRGRYVGAAGRGGRVSTDWDPCDWALGACGSASNIPTPPCLTPSPERGS
PQLDCGPALQEMPINQGGEGKK

```

【 図 8 4 】

図 84

Figure 84

```

DLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK

```

【 図 8 6 】

図 86

Figure 86

```

MQPPSLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCQAPGFLGE
TCQFPDPCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLED
PCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQCSCMPGWTEGQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPIQIC
HCPFGFEHACERDVNECFQDPGCPKGTSGHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
RGCSNGGTCLMPEKDSFHLCLCPPGFIGPDCVNPDCNVSHQCCNGGTCCQDGLDITYTC
LCPETWTGWDCEDEVECTGQPPHCRNGGTQNSAGSFHCVSVSGWGGTSCENLDDCI
AATCAPGSTCIDRVGSFSLCLPPGRTGLLCHLEDMCLSQPCHGDAQCSNTPLTGSTLCLC
QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCINTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECL
SQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGLEGLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQCICL
PGFSGTRCEEDIDECRESSPCANGGQCQDPGAFHCKCLPGFEGPRCQTVEDECLSDPCPV
GASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDKDKANCLCPDGSFGCAP
FEDNCTCHHGHCRSSCVCDVGTGPECEABELGGCISAPCAHGGTCYPPQPSGYNCTCPTG
YTGPTCSEEMTACHSGCLNGGSCNPSFGGYCTCPPSHTGPPQCTSTDYCVSAPCFNGG
TCVNRPGTFSCLCAMGFQGPCEGLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCTGYTGGG
CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHLCLQGWTPGLCNLPLSSCQKAALSQGDVSSLC
CHNGGLCVDSGSPSYFCHCPGPGFQGSQCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGY
DQNGCSKELDACQSPCHNHGCTCPKPGGFHACAPPGFVGLRCEGVDDECLDQCPHTGT
AACHSLANAFYQCQLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLGFICHCPKGF
GPTCSTRAPSCGFHHCHHGLCLLPSKPGFPFPRACLSGYGGPDCLTPAPKGCQPPSPC
LYNGCSSETTLGLGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPFQAGKCEGRSGDGCADAGCSGGPGNWG
GDSCLGVPDPWKGCPSHRCWLLFRDGGCHPQCDSEELPDGYDCETPACTPAYDQYCH
DHFHNGHCXKGCNTAECGWDGDCRPEDGDFEWGFSALLLVLSPPALDQQLFALARVLS
LTLRVGLAVWRKDRDGRDMVYPYPGARAERKLGTRDTPYQERAAQTQPLGKETDLSL
FVVMGVCLSRGCPDHPASRCFWDPLGLLRLFAAMAAGVGALEPLLPGLPLAVHPHAGTAP
PANQLWPVVLCSFVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHAGLWLPFGFTRRPRTQSAFHR
RPLGEDSICLKALKPKAEVDEGVMCSGPEEGEVGQABETGPPSTCQLWSLGGCGA
LPQAAMLTPPQESEMEAPDLTRGPDGVTPLMSAVCCGVEQSGTFQGAWLCPPEPWEPL
DGGACAPQATVGTGTPPLHLAARFSRPTAARLLLEAGANPNQDPRAGRTPLHAHAADAR
EVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDLVEELIAAQADVARDKWKCTALHW
AAAVNNARAARSLLOAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEAQLLLGLGAARELRDQAG
LAPADVAHQNRHNDLLTLEAGAPPEARHKAATPGREAGPPPRARTVSVSVPHPGGALPR
CRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGAYSHCRSLSGVAGAGGPTPRRRFSAGM
RGRPRNPALMRGRYVGAAGRGGRVSTDWDPCDWALGACGSASNIPTPPCLTPSPERGS
PQLDCGPALQEMPINQGGEGKK

```

【 図 8 5 】

図 85

Figure 85

```

QPPSLLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPPEPCANGGTCLSLSLGQGTCCQAPGFLGET
CQFPDPCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLED
PCPPSFCSKRGRCHIQASGRPQCSCMPGWTEGQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYPIQIC
HCPFGFEHACERDVNECFQDPGCPKGTSGHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
RGCSNGGTCLMPEKDSFHLCLCPPGFIGPDCVNPDCNVSHQCCNGGTCCQDGLDITYTC
LCPETWTGWDCEDEVECTGQPPHCRNGGTQNSAGSFHCVSVSGWGGTSCENLDDCI
AATCAPGSTCIDRVGSFSLCLPPGRTGLLCHLEDMCLSQPCHGDAQCSNTPLTGSTLCLC
QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCINTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECL
SQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGLEGLCEVETNECASAPCLNHADCHDLLNGFQCICL
PGFSGTRCEEDIDECRESSPCANGGQCQDPGAFHCKCLPGFEGPRCQTVEDECLSDPCPV
GASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDKDKANCLCPDGSFGCAP
FEDNCTCHHGHCRSSCVCDVGTGPECEABELGGCISAPCAHGGTCYPPQPSGYNCTCPTG
YTGPTCSEEMTACHSGCLNGGSCNPSFGGYCTCPPSHTGPPQCTSTDYCVSAPCFNGG
TCVNRPGTFSCLCAMGFQGPCEGLRPSCADSPCRNRATCQDSPQGPRCLCTGYTGGG
CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHLCLQGWTPGLCNLPLSSCQKAALSQGDVSSLC
CHNGGLCVDSGSPSYFCHCPGPGFQGSQCQDHVNPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGY
DQNGCSKELDACQSPCHNHGCTCPKPGGFHACAPPGFVGLRCEGVDDECLDQCPHTGT
AACHSLANAFYQCQLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCEATAGSPLGFICHCPKGF
GPTCSTRAPSCGFHHCHHGLCLLPSKPGFPFPRACLSGYGGPDCLTPAPKGCQPPSPC
LYNGCSSETTLGLGPGFRCSCPHSSPGPRCQKPFQAGKCEGRSGDGCADAGCSGGPGNW
GDSCLGVPDPWKGCPSHRCWLLFRDGGCHPQCDSEELPDGYDCETPACTPAYDQYCH
DHFHNGHCXKGCNTAECGWDGDCRPEDGDFEWGFSALLLVLSPPALDQQLFALARVLS
LTLRVGLAVWRKDRDGRDMVYPYPGARAERKLGTRDTPYQERAAQTQPLGKETDLSL
FVVMGVCLSRGCPDHPASRCFWDPLGLLRLFAAMAAGVGALEPLLPGLPLAVHPHAGTAP
PANQLWPVVLCSFVAGVILLALGALLVLQLIRRRRREHAGLWLPFGFTRRPRTQSAFHR
RPLGEDSICLKALKPKAEVDEGVMCSGPEEGEVGQABETGPPSTCQLWSLGGCGA
LPQAAMLTPPQESEMEAPDLTRGPDGVTPLMSAVCCGVEQSGTFQGAWLCPPEPWEPL
DGGACAPQATVGTGTPPLHLAARFSRPTAARLLLEAGANPNQDPRAGRTPLHAHAADAR
EVCQLLLRSRQTAVDARTEDGTTPLMLAARLAVEDLVEELIAAQADVARDKWKCTALHW
AAAVNNARAARSLLOAGADKDAQDNREQTPLFLAAREGAVEAQLLLGLGAARELRDQAG
LAPADVAHQNRHNDLLTLEAGAPPEARHKAATPGREAGPPPRARTVSVSVPHPGGALPR
CRTLSAGAGPRGGGACLQARTWSVDLAARGGAYSHCRSLSGVAGAGGPTPRRRFSAGM
RGRPRNPALMRGRYVGAAGRGGRVSTDWDPCDWALGACGSASNIPTPPCLTPSPERGS
PQLDCGPALQEMPINQGGEGKK

```


【 図 8 7 】

図 87

Figure 87

MQPPSLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGGTCLSLSLGQGTQCAPGFLGE
 TCQFPDPCQNAQLCQNGGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTCLPGFTGERCQAKLED
 PCPPSFCSKRGRCHI QASGRPCQSCMPGWTGEQCQLRDFCSANPCVNGGVCLATYFQIQC
 HCPGPFEGHACERDVNECFQDPGCPKGTSCNHTLGSFQCLCPVQGEGPRCELRAGPCPP
 RGCSNGGTQCLMPEKDS TFHLCLCPPGFIGPDCVNPDMNCVSHQCNGGTQCDGLDITYTC
 LCPETWTGWDCESDVDECBTQGPZHCNRNGGTQNSAGSFHCVCVSGWGTSCBENLDDCI
 AATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCHLEDMLCSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLC
 QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCNLTGFSFNCLCPPGYTGSRCADHNECL
 SQPCHPGSTCLDLLATFHLCLPPGLEQLCEVETNECASAPCLNHADCHDLNFGQCICL
 PGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPGAFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCV
 GASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLQCPKQICKDQDKANCLCPDGSPOCAP
 PEDNCTCHHGHQRSSCVCDVGTGPECEAELGGCISAPCAHGGTCYPPSGYNTCTPTG
 YTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGYYCTCPHSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGG
 TCVNRPGTFSCLCAMGPGQPRCEBGLRPSCADSPCRNRATQDSPQGPRLCPTGYTGGS
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCQGWGTGPLCNPLSSCQKAALSQGDVSSL
 CHNGGLCVDSPSYFCHCPGFGQSLCQDHNVPDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGG
 PSYVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 8 8 】

図 88

Figure 88

MQPPSLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCH
 LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSC
 CLNTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHLCLCPGLEQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNFGQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPG
 AFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVPGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAP
 NLQCPKQICKDQDKANCLCPDGSPOCAPPEDNCTCHHGHQRSSCVCDVGTGPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPPSGYNTCTPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGY
 YCTCPHSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTVCNRPGTFSCLCAMGPGQPRCEBGLRPSCA
 DSPCRNRATQDSPQGPRLCPTGYTGGSQCTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCL
 QGWGTGPLCNPLSSCQKAALSQGDVSSLCHNGGLCVDSPSYFCHCPGFGQSLCQDHN
 VNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 8 9 】

図 89

Figure 89

MWGKCLLFWAVLVTATLCTARCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCHLEDMC
 LSQPCCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCNLT
 PGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHLCLCPGLEQLCEVETNE
 CASAPCLNHADCHDLNFGQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPGAFHCK
 CLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVPGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLQCP
 KQICKDQDKANCLCPDGSPOCAPPEDNCTCHHGHQRSSCVCDVGTGPECEAELGGCIS
 APCAHGGTCYPPSGYNTCTPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGYYCTCP
 PSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTVCNRPGTFSCLCAMGPGQPRCEBGLRPSCADSPCR
 NRATQDSPQGPRLCPTGYTGGSQCTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCQGWGT
 PLCNPLSSCQKAALSQGDVSSLCHNGGLCVDSPSYFCHCPGFGQSLCQDHNVPDLG
 PGPKEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 0 】

図 90

Figure 90

MQPPSLLLLLLLLLLCVSVVRPRGLLCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCH
 LEDMCLSQPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSC
 CLNTPGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHLCLCPGLEQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNFGQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPG
 AFHCKCLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVPGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAP
 NLQCPKQICKDQDKANCLCPDGSPOCAPPEDNCTCHHGHQRSSCVCDVGTGPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPPSGYNTCTPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGGY
 YCTCPHSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTVCNRPGTFSCLCAMGPGQPRCEBGLRPSCA
 DSPCRNRATQDSPQGPRLCPTGYTGGSQCTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCL
 QGWGTGPLCNPLSSCQKAALSQGDVSSLCHNGGLCVDSPSYFCHCPGFGQSLCQDHN
 NPCESTRPCQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDQNCSEKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGFH
 CACPPGVGLRCEGDVDECLDQCPHTGTAAACHLANAFYCQLPGHTGQWCEVEIDPCH
 SQPCFHGGTCEATAGSPLGFI CHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGCLCLSPKPGFP
 PRACLSGYGCPDCLTPPAPKGCPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGPRCSCHSPSPGPRCQ
 KPGDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 1 】

図 91

Figure 91

MWGKCLLFWAVLVTATLCTARCIAATCAPGSTCIDRVGSFSCLCPPGRTGLLCHLEDMC
 LSQPCCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGGSCNLT
 PGSFNCLCPPGYTGSRCADHNECLSQPCHPGSTCLDLLATFHLCLCPGLEQLCEVETNE
 CASAPCLNHADCHDLNFGQCICLPGFSGTRCEEDIDECRSSPCANGGQCQDQPGAFHCK
 CLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCVPGASCLDLPGAFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLQCP
 KQICKDQDKANCLCPDGSPOCAPPEDNCTCHHGHQRSSCVCDVGTGPECEAELGGCIS
 APCAHGGTCYPPSGYNTCTPTGYTGPTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGYYCTCP
 PSHTGPQCQTSTDYCVSAPCFNGGTVCNRPGTFSCLCAMGPGQPRCEBGLRPSCADSPCR
 NRATQDSPQGPRLCPTGYTGGSQCTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCQGWGT
 PLCNPLSSCQKAALSQGDVSSLCHNGGLCVDSPSYFCHCPGFGQSLCQDHNVPCE
 RFPQNGATCMAQPSGYLCQCAPGYDQNCSEKELDACQSQPCHNHGTCTPKPGGFH
 CACPPGVGLRCEGDVDECLDQCPHTGTAAACHLANAFYCQLPGHTGQWCEVEIDPCH
 SQPCFHGGTCEATAGSPLGFI CHCPKGFEGPTCSHRAPSCGFHHCHHGGCLCLSPKPGFP
 PRACLSGYGCPDCLTPPAPKGCPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGPRCSCHSPSPGPRCQ
 KPGDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 2 】

図 92

Figure 92

MQPPSLLLLLLLLLLLLLLVSVVRPGLLCASAPCLNHADCHDLLNGFQCICLPFGSGTRCE
 EDIDECRSSPCANGGQCQDQPGAFHCKLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCPVGASCLDLPG
 AFFCLCPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDQKDKANCLCPDGSPGCAPPEDNCTCHH
 GHQCRSSCVCDDVGWTFCEAEELGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCTCPTGYTGPTCSEB
 MTACHSGPCLNGGSCNPSPGGYCTCPPSHSTGPQCQTSIDYCVSAPCFNGGTCVNRPGTF
 SCLCAMGFPQGPCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDPSQGPRLCPTGYTGGSQCLTMLDCA
 QKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVD
 SGPSYFCHCPPGFQGSILQDHNVPDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPFK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLT
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 3 】

図 93

Figure 93

MWGKCLLFWAVLVTATLCTARCASAPCLNHADCHDLLNGFQCICLPFGSGTRCEEDIDE
 CRSSPCANGGQCQDQPGAFHCKLPGFEGPRCQTEVDECLSDPCPVGASCLDLPGAFFCL
 CPSGFTGQLCEVPLCAPNLCPKQICKDQKDKANCLCPDGSPGCAPPEDNCTCHHGHCR
 SSCVCDDVGWTFCEAEELGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCTCPTGYTGPTCSEBMTACH
 SGFCLNGGSCNPSPGGYCTCPPSHSTGPQCQTSIDYCVSAPCFNGGTCVNRPGTFSCCLA
 MGFGQGPCEGKLRPSCADSPCRNRATCQDPSQGPRLCPTGYTGGSQCLTMLDCAQKPCP
 RNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSPSY
 FCHCPPGFQGSILQDHNVPDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPFKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 6 A 】

図 96A

Figure 96A

1 agggagagcccc cttcactgctg gctgctgctg cctgctgctg tggctgctg tggctgctg
 61 gtcagagcccc gaggctctgct gctgagagat tccccagacc cctgtgcccc tggagggccc
 121 tggctgagct tggctgaggg acagagagac tgcagctgtg cctgtgctct cctgggtgag
 181 acgtgcaagt tctgtgctgg ctggcgagag gccagctgtg gccaaaatgg aggcagctgag
 241 caagcctctg tcttgcctccc ccttaggctc cccagctctc ccttccatg gacacccctg
 301 tctctgtgca cttgctctccc tggcttcaact ggtagagagt gccagggccaa gcttgaagag
 361 cctgtgcttc ccttctctgt tcccaaaaag gctgctgccc acatccaggc ctggcgctgg
 421 ccacagtgct cctgtcatgc tggatggaca ggttagcagt gccagctctg ggaactctctg
 481 tccagcaaac atgtgtttaa tggaggggtg tgtctggcca cttaccacca gatccagtcg
 541 cactgccccac cgggtcttcca gggccatgac tctgaacgtg atgtcaacga gtgcttccag
 601 gaccacagag actgtgcccaa aggcacctcc tgcataaca ccttgggctc ctccagctcc
 661 ccttgcctctg tggggcagga gggctccactg tctgagctgc gggcaggacc ctgcccctct
 721 aggggctggt cagatggggg cctagctccag ctgatggcag aaaaagactc cactcttacc
 781 cctgtgctct gttcccccag tttcataggg ctagagtgtg aggtgaactc agacaaactg
 841 ctgagccccc agtgcagaaa tgggggcaat tgcaggatg ggtcggacac ctacacctgc
 901 cctgtcccag aaactctggc aggtctggag tctctcgaag atgtggatga gtgtgagacc
 961 cagggtcccc ctactgtcag aaacgggggc acctgcagaa actctgctgg tagctttcac
 1021 tggctgtgtg tgaagtgtgt gggcgccaca agctgtgagg aagaaactga tagctgtact
 1081 gctgcccact gtgccccagg atccacctgc attgacggg tgggtctctt cctctgctcc
 1141 tgcccactct gacgcacagg actcctgtgc cacltggag acatgtgtct gagccagccg
 1201 tggcatgggg atgcccattg cagacccaac cccctcacag gctccacact gatggctggt
 1261 cagctggctt ctttggggcc cactgtgccac caggacctgg acgtagtgtc gatggccag
 1321 caaggcccaa gctctgtgca agacggcgtt boctgctcca aaactctctg cctcttccac
 1381 tggctctgtc cacttgctca caaaggtctc cgttgtgagg ctgatccaaa tgaagtcttc
 1441 tcccagccct gccacccagg aaacacctgt ctggacctac tgcacacctc cactgtgctc
 1501 tggcccccag cacttagagg tgcagatgac ctgtctcaag gcttccagtc cactgtgctg
 1561 cctgtgctga aacagcagg tgcagatgac ctgtctcaag gcttccagtc cactgtgctg
 1621 cctggatctt cggcccccag atgtgaggag gatactgagg agtcagaaag ctctccctgt
 1681 gccaatgggt ggcagtgcca ggcacagcct ggaagccttc actgcaagt ctgtcccccag
 1741 tttgaagggc cactgtgtca aaacagaggtg tgaagtgcac tgaagtgcac atgtccogtt
 1801 ggaagcagct gccctgatct tccagaggcc tcttlttggc tctgcccctc tgggttccaa
 1861 gctgagctct tgaaggttctc cctgtgtgtg cccaactgt gccaagcccaa gcagatgagt
 1921 aaggaccaga aagcaaacgg cactgtctc tgtcctgat gaaagccttg ctgtgcccac
 1981 cctgaggaca actgcaacct caccacaggg cactgcagaa gatctccatg tgggtgtgac
 2041 gtgggtttga gggggcaga gtgtgaggca gactgagggt gctgctatct tgcacacctg
 2101 gcccatgggg cactgctgtca ccccagccc cctgtgtaca actgcaacct cccctacaca
 2161 tacacaggag ccaactgtag tgaagagatg acagcttgcc actccaggcc atgtctcaat
 2221 tggcgctctc cagacccatg cactggagtc tactactgca cccgcccctc aaagcacaac
 2281 gggcccagat gccaaaccag cactgaetac tgtgtgtctg ccccgctgct caatgggggt
 2341 acctgtgtga caggctctgg ccttctcttc tgcctctgtg ccatgggctc caggggctgg
 2401 cctctgtagg gaaagctgg ccccagtgat gcagacagcc cctgtaggaa tagggccaac
 2461 tggcaggaac cctctcagg tcccctgtgc cctgcccaca ctgctacac cgaagagcag
 2521 tggcagatcc ctatgactat atgtgcccag aagccctgac cagcacaatc cactgtctc
 2581 cagactgggc cctcttctca ctgctctgtc cccaaggtat ggaacgggctc tctgtgctc
 2641 ctccacatgt cctcttgcga gaagctgca ctgagccaa gcaatagact cctcttctct
 2701 tggcacaagt gaggcctctg tatgcacagc ggcctctctc attctgtcca ctgcccctcc
 2761 gattctcaag cagagctctg cagatcagc gtgaacccat gccagctgtg cccagctgag
 2821 aacggggcca cctgcagcc ccaagccagt ggttatctct cccagctgtg cccagctgag
 2881 gatgagcaga actcgtcaaa ggaactcgat ctctgtcagt cccaactgtc tccaaactac
 2941 ggaactctga cctccaaaaa tggaggatcc cactgtgctc gcccctcagg ccttgtgggg

【 図 9 4 】

図 94

Figure 94

MQPPSLLLLLLLLLLLLLLVSVVRPGLLCADSPCRNRATCQDPSQGPRLCPTGYTGGSQ
 TMLDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNPLSSCQKAALSQGIDVSSLCH
 NGGLCVDSPSYFCHCPPGFQGSILQDHNVPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCCQCAPGYDG
 QNCSKELDACQSQPCNHGTCITPKPGGFHACPPGFVGLRCEGSDVDECLDQPCHTGTAA
 CHSLANAFYQCQLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCBATAGSPLGFIHCPKGFGRGP
 TCSHRAPSCGFHHCHHGLCLPSPKGFPFPRACLSGYGGPDCLTPAPKGGCPSCLY
 NGSCSETTGLGGPGFRSCPHSSPGPRCQKPGDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGP
 SVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREQYN
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 5 】

図 95

Figure 95

MWGKCLLFWAVLVTATLCTARCADSPCRNRATCQDPSQGPRLCPTGYTGGSQCLTMLDL
 CAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTPGLCNPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLC
 VDSGPSYFCHCPPGFQGSILQDHNVPCESRPCQNGATCMAQPSGYLCCQCAPGYDGQNSK
 ELDACQSQPCNHGTCITPKPGGFHACPPGFVGLRCEGSDVDECLDQPCHTGTAAACHSLA
 NAFYQCQLPGHTGQWCEVEIDPCHSQPCFHGGTCBATAGSPLGFIHCPKGFGRGP
 APSCGFHHCHHGLCLPSPKGFPFPRACLSGYGGPDCLTPAPKGGCPSCLYNGSCS
 ETTGLGGPGFRSCPHSSPGPRCQKPGDLGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLF
 PKPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 6 B 】

図 96B

Figure 96B

3001 ctacgtctgt agggagagct ggaagagct ctgagaccag cctgccaccc cagagagcact
 3061 gcaagcttgc actctctgac caatgcttc taacgccact gctgctgct gctacagagc
 3121 cagtgtgtgt aggtggagat agacccctgc cagacccaac cctgcttcca tggagggacc
 3181 tggagggcca cagcaggatc accctggagt ttaactgtcc actgccccaa tggatttga
 3241 gggcccaact gcagccacag gccccttccc tggcgtcttc atacttgcca cagcagggac
 3301 ctgtgtctgc cctccctcaa gccagagctt ccaacagctg gctgctgct cagtgggctg
 3361 gggggtctgt actgctgac ccccaagct cctaaaaggt gttgcccctc ctcccagtc
 3421 ctatacaatg gaaagctgct agagaccag ggtctgggg gccacaggtc tcatgctccc
 3481 tgccttcaca gcttccagc gcccctggt cagaaaaccg gaggcaaggg gttgtagggc
 3541 aagaagtgag atggggcctg cgaatctggc tgaagtgccc cgggagggaa ctggatgga
 3601 ggggactgct cctctggagt cccagacccc tgaagagggc gccctcccca ctctcggtg
 3661 tggcttctct tccgggacgg gcaagtgcac ccaactgtg actctgaaga gtgtctgtt
 3721 gatgcttact actgtgagac cctccacgc tgcacccag ctatgacca gtaactgcat
 3781 gatcaacttc acaacgggca ctgtgagaaa gggctgagaa ctgacagatg tggctgggat
 3841 gagggtgact gcaggcctga agatggggag ccaagatggg gggcctccct ggcctgtgt
 3901 gtggtactga gccccccag cctagaccag cagctgtttg ccttggccc ggtgctgtc
 3961 ctgactctga ggttaggact ctgggtaaag aagatctgt atggcagga cagtgtgtac
 4021 cctcatctct gggcccccgc tgaagaaaag ctaggaggaa ctgaggaccc cactatcag
 4081 gaggagagc cccctcaac gcaagccctg ggcaagagga ccagactccc cagtgtggg
 4141 ctgtcgatgg tcatcggtgt ggaattgtcc cgtctgtggc ctgaccaccc agctcagc
 4201 tctcctggg accctgggtt tcatctccc tctctgtgt cgaatgctg agtcggagcc
 4261 ctggagcccc tgcctctgg accaactgct gctgtccacc ccatcgagg gacgcacccc
 4321 cctgcacaac agcttccctg gctgtgtgtg tgttccccag gggccgggtt gatctctgt
 4381 gcccacagg cctctccctg cctcagctc atccgggttc gaacccgaga gcatgagct
 4441 cctcagctgc cctccctgct cactgagct agtcagctc agtcagctc agtcagctc
 4501 cggcccccac taggcagga cagactggt ctaacagcag tgaagaaa ggcagaggt
 4561 gatgagatg agttgtgtg gtatctcagg ccttgaagag cctgagaggt ggcagagct
 4621 gaagaaacag gcccacccc cactgtccag cctcgttctg tgaagggctg ctgtggggc
 4681 ctcccctcag cagccatgct aactctccc caggaaatct agatggaa gctcgaactg
 4741 gacacccctg gactgatgg ggtgacccc ctgatgtcag cagtctgct tggggagatg
 4801 cagtcocggga ccttccaagg ggcattgtt ggaatgctg agccctggga accctctctg
 4861 gatggagggg cctgtcccca ggcctacac ctggggcact gggagacccc cctcagagac
 4921 gctgcctgat tctcccggc aaacgtctgc cctgcctccc cctcagacccc cccacacccc
 4981 aacacccag acggggcagg gcgcacccc ctctcatgct ctgtgctgt tgaatgctg
 5041 gaggcttctc agcttctgt cctgagcaga caaactctg caaactctg cagacagac
 5101 gggacacac cctgatgtgt ggtgcacag ctgggggtgt aagaactgct tgaagaaact
 5161 attcagcccc aagcagact gggggccaga gataaactg gataaactg gctcactg
 5221 gctgtgctg tgaacaacgc ccagacccc cgtctgcttc tccaggccg agcagataaa
 5281 gatgcccag acaacaggga gcagacccc ctatctctg acccaactg acccaactg
 5341 gaagtaccc agctactgct ggggctggg gcagcccag agctgcggga cagagctgg
 5401 ctacggccc cgaagctgct tcaaccaagt aacacactgg atctgctgac gctgctgaa
 5461 ggggctggg caccagaggg cctgacaaa gcaaccccag gcccgaggc tgggcccctc
 5521 cctgcctgac ggaaggtgtc agtaagctgt cgtgggggt cgtgctgct gaaagctg
 5581 tcccgagac tgcagccgg agcaggccct tgcctgggg ggcgggccc atctctatg cggagctc
 5641 actgtgtgct tagactggg agcccgacc cctgcgggct gtaggtttc tgcagctg
 5701 cgggagatg gacagagag agcccgacc cagagagat agaggtg tgcctggg
 5761 cgggggctc gcccacacc tgcagaaag tgcagatg tgcagatg agcttgcct
 5821 gggcaggg tctcaacgga tgaactggc tgcagatg tgccttctc cgtcccga ggggagatc
 5881 tctgcttcca acattccgat cccgctctc tgccttctc cgtcccga ggggagatc
 5941 cctcaactgt actgtgtcc cccagcctc caaagaatgc cctaaacca agggagagag
 6001 ggtaaaaaat ag

【図 97】

図 97

Figure 97

```

1 atgcagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctg tgcctgctatg tgcctcagtg
61 gtcagaccga gagggtgct g 81

```

【図 98】

図 98

Figure 98

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctctctctg gctgtgctgg tcaacgcac tctctgcact
61 gccagg

```

【図 99】

図 99

Figure 99

```

781 gagcccaaat cctctgacaa aactcacaca tgcaccacgt gccacgaccc tgaactctctg
841 ggggggacgt cagtctctct ctcccccaca aaacccaaag acacccctcat gatctccctgg
901 acccctgagg tcaatctgct ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtctc
961 aactggttacg tggacggcgt ggaaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaagagcag
1021 tacaacagca cgtactgctt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcacagga ctggctgaat
1081 ggcaaggaggt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc tgcaccccat cgagaaaacc
1141 atctccaaag ccaaaggcca gccccgagaa ccacaggtgt acacctggcc cccatccctg
1201 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgctcgg tcaaaagctt ctatccacag
1261 gacatcgctg tggagtggga gacgaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt
1321 cccgtctcgg acctcgacgg cctctctctc ctctacagca agctcacctg ggaacagagc
1381 aggtggcagc aggggaacgt ctctctcctg tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac
1441 taccgcagca agagcctctc cctgtctcgg ggtcaatga

```

【図 100B】

図 100B

Figure 100B

```

3061 cgagcctgct actctctggt caatgccttc tactgcaggt gctgctctgg acacacaggc
3121 cagtgtgtgt aggtgagagt agaccctctg cacagccaac cctgctctca tggaggggac
3181 tglgagggca cagcaggatc accctcggtt tcatctgccc actgcccaca gggctttgaa
3241 ggccctaccl cgagccacag ggcccctctc tgcggctccc atcaactgcca ccaaggaggc
3301 ctgtgtctcg cctcccctaa gccaggcttc ccaaccagct gtgcctgctc cagtggctat
3361 gggggtctct actgctcag cccaccagct cctaaaaggt gtggcctccc ctcccctatg
3421 ctatcacaat gtgactgtct agagaccagc ggtttggggg gccaggctt tgcagtctcc
3481 tgcctccaca gctctccagg gccccgtggt cagaaaaccc gagaatctgg cccggcgag
3541 cccaaatctt gtgacaaaac tcaacacatg ccaactgtcc cagcaactga actcctgggg
3601 ggacgctcag tcttctctct ccccccacaa cccaaggaca cctcraagt ctcccggacc
3661 cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagtcaaac
3721 tgttacgttg accgctggtt cagctctctc acctctctgc accaggactg gctgaatgg
3781 aacagcacgt accgtgtggt cagctctctc acctctctgc accaggactg gctgaatgg
3841 aagagtcaca agtgcaggct ccccaacaaa gccctccacg ccccatcgga gaaaacatc
3901 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaaaca caggtgtaca cctgcccc cctccgggat
3961 gagctgacca agaaccaggt cagctgaccc tgcctggtca aaggtctcta tcccaggac
4021 atcgccgtgg agtgggagag caatggggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
4081 gtctggact ccgacggctc ctctctctc taccgaagc tcaactgtga caagagcagg
4141 tggcagcagg ggaacgtctt cctactgtcc gtgatgcagt aggtcttgca caaccactac
4201 acgcagaaga gccctctctc gctcccggtt aaatga

```

【図 100A】

図 100A

Figure 100A

```

1 atgcagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctg tgcctgctatg tgcctcagtg
61 gtcagaccga gagggtgct gctgaggagt tccacagaac cctgtgccaa tggagggcac
121 tgcctgagcc tgtctctggg acaaggagac tgcacagctg cccctggctt cctgggtgag
181 acgtgccagt ttcctgaccc ctgccagaac gccacgctct gccaaaatgg aggcagctgc
241 caagccctgc ttcctgctcc ctgagggtcc cccagctctc cctctccatt gacacccagc
301 tctctgtgca ctgctctccc tggcttcaat ggtgagagat gccaggccaa gcttgaagac
361 cctgtctctc cctcctctct tcccaaaagg ggcctgctcc acatccagac cctgggcgcg
421 ccaagtgctc cctgcatgct tggatggaca ggtgagcagt gccagctctg ggaactctgt
481 tcaacccaac catgtgttaa tggaggggtg tgtctgacca cataccccca gatccagctg
541 cactgcccac cgggtcttga gggccatgct tctgaacgtg atgtcaacga gtgctccag
601 gaccaggagc cctgccccaa aggcacctcc tgcataaaca ccttgggctc cttccagctg
661 ctctgccccg tggggcagga gggccacagt tctgagctgc gggcaggacc cctgctctct
721 aggggtgctt cgaatggggg cactgtccag ctgagctcag agaaagactc cactcttcc
781 cctgctctct gtcccccaag ttctataggc ctagacttgc aggtgaaatc agacactgt
841 gtcacccacc agtgcagaa tgggggacct tgcagagatg ggtgagacat ctacacctgt
901 ctctgcccag aaacttgaa aggtgggac tgcctcagat ggtgagacat ctacacctgt
961 cagggtcccc ctcaatgacg aaacgggggc acccccaaga actctgtctg tagctttcac
1021 tgggtgtgtg tgaatggctg gggcgccaca agctgtagg agaaccttga tgaacttatt
1081 gctgccacct gtcccccggt atccacctg attgacctgg tgggtcttt cctccgctcc
1141 tgcaccactg gacgcacagg actcctgtgc caactggaag acatgtgctt gaggcagcgg
1201 tgcaccactg atgcccactg cagcaaccaac cccctccagc cctccacact ctgctgtgtg
1261 cagcctggct attcgggggc cactgtccac caggacctgg acgagtgctt gatggccag
1321 caaggcccaa gctcctgtga acatggcgtt tctgtcctca acactcctgg cctcttcaac
1381 tgcctctctc cactgtgcta caccggctcc cgttgtgagg ctgatacaca tgaagtctcc
1441 tcccagccct gccaccaggt aagcactctg ctggacttac ttgccacctt cactgtctcc
1501 tcccggccag gcttagaagg gacgtctctg gagggtgaga ccaacagagt tgcctcagct
1561 cctgtcctga accacggcga ttgcatgac ctgctcaacg gcttccagtg catctcctg
1621 cctggtattt ccggcaccgg atgtgagga gatatactg atgtgagga cctctcctgt
1681 gccaatggtg ggcagtgcac ggaaccagct ggagccttcc actgcaagtg tctcccaggc
1741 ttgaaagggc cagctgttca aacagaggtg gatgagtgcc tgaagtgaacc atgtccctgt
1801 ggagccagct gcttgatct tccaggagcc ttctttttgc tctgcccctc tggtttcaac
1861 ggccagctct gtgaggttcc cctgtgtgct cccaacctgt gccagctcaa cagatatact
1921 aaggaccaga aagacaaggc caactgctc tgtctgtatg gaagccttgg cgtgcccctg
1981 cctgaggaca actgcccctg ccaaccagg cactgacaga gatcctctatg tgtgtgtgac
2041 ggtgtgtgga cggggccaga gctgagagca gaactcaggga gctgactctc tgaactctgt
2101 gctcctggag ggaactgcta ccccagccc tctgtgtaca actgcaactg cctcaaggc
2161 caacagggc ccaactgtag tgaaggagat acagctgtcc actcagggcc agtcttcaac
2221 ggcgctctct gcaaccctag cctgtgagg taactatgca cctgcccctc taagccacaca
2281 gggccctcag gccaaaaccag cactgactac tgtgtgtctg cccctgtctt caatggggg
2341 acctgtgga acaggcctgg cacttctcct tgcctctgtg ccaatggctc ccaaggcccg
2401 cgtgtgagg gaaagtctcc cccaactgtg cgacagaccc cctgtaggaa tagggcaaac
2461 tgcacaggca gccctcaggg cctcccgctg cctgcccaca ctgctcaac cgaagcagc
2521 tgcacagctc tgaatgactt atgtgcccag aagcctgtcc cagcaaatc ccaactgtcc
2581 cagaactggc cctccttcca ctgcttgtg cctccagcctt attctgcca cctccgtccc
2641 ctctcactgt cctcctgcca gaaggctgca ctgagccaga gatatagct cctctcctt
2701 tgcacaaatg gaggcctctg tctgacagag ggcctcctct attctgcca cctccgtccc
2761 ggattccaa cagcctgtgt ccaagatcac gtgaacccat gtagagtcag gccctgtcag
2821 aacggggcca actgcatg ccaagcctgg aggtattctt gccagctgtg ccaagctcac
2881 gatggacaga actgtccaaa ggaactgat gcttgtcagt cccaacctg tcaacaacat
2941 ggaacctgta ctcccaaac tggagagatc cactgtccct gccctccagg ccttgtgggg
3001 ctacgtgtgt agggagacgt ggaagagtg ctggaccagc cctgccaccc caccaggcct

```

【図 101】

図 101

Figure 101

```

1 atgcagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctg tgcctgctatg tgcctcagtg
61 gtcagaccga gagggtgct gctgaggagt tccacagaac cctgtgccaa tggagggcac
121 tgcctgagcc tgtctctggg acaaggagac tgcacagctg cccctggctt cctgggtgag
181 acgtgccagt ttcctgaccc ctgccagaac gccacgctct gccaaaatgg aggcagctgc
241 caagccctgc ttcctgctcc ctgagggtcc cccagctctc cctctccatt gacacccagc
301 tctctgtgca ctgctctccc tggcttcaat ggtgagagat gccaggccaa gcttgaagac
361 cctgtctctc cctcctctct tcccaaaagg ggcctgctcc acatccagac cctgggcgcg
421 ccaagtgctc cctgcatgct tggatggaca ggtgagcagt gccagctctg ggaactctgt
481 tcaacccaac catgtgttaa tggaggggtg tgtctgacca cataccccca gatccagctg
541 cactgcccac cgggtcttga gggccatgct tctgagctgc gggcaggacc cctgctctct
601 gaccaggagc cctgccccaa aggcacctcc tgcataaaca ccttgggctc cttccagctg
661 ctctgccccg tggggcagga gggctcact tctgagctgc gggcaggacc cctgctctct
721 aggggtgctt cgaatggggg cactgtccag ctgagctcag agaaagactc cactcttcc
781 ctctgctctc gtcccccaag ttctataggc ctagactgtg aggtgaaatc agacactgt
841 ctgagccacc agtgcagaa tgggggcaat tgcacagatg ggtctggaga cctacagctg
901 ctctgcccag aaactggac aggtgggac tgcctcagag atgtgagatg ggtgagacat
961 cagggtcccc ctcaactgac aaacgggggc acctgccaaga actctgtctg tagctttcac
1021 tgggtgtgtg tgaatggctg gggcgccaca agctgtgagg agaaccttga tgaacttatt
1081 gctgccacct gtgccccggg atccacctg attgacctgg tgggtcttt cctccgctcc
1141 tgcaccactg gacgcacagg actcctgtgc caactggaag acatgtgctt gaggcagcgg
1201 tgcaccactg atgcccactg cagcaaccaac cccctccagc cctccacact ctgctgtgtg
1261 cagcctggct attcgggggc cactgtccac caggacctgg acgagtgctt gatggccag
1321 caaggcccaa gctcctgtga acatggcgtt tctgtcctca acactcctgg cctcttcaac
1381 tgcctctctc cactgtgcta caccggctcc cgttgtgagg ctgatacaca tgaagtctcc
1441 tcccagccct gccaccaggt aagcactctg ctggaccctc tgcacacctt ccaactgtcc
1501 tgcocggccag gcttagaagg gcaagctctg gagggtgaga ccaatgagtg cctgacagt
1561 cctgtcctga accacggcga tctgcatgac ctgctcaacg gcttccagtg catctcctg
1621 cctggtattt ccggcaccgg atgtgagga gatatactg aggatctgg cccggcgag
1681 cccaaatctt gtgacaaaac ccaacatgct ccaactgtcc cagcaactga actcctgggg
1741 ggaacgtcag tctctctc cccccacaaa cccaaggaca cctcraagt ctcccggacc
1801 cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagtcaaac
1861 tgttacgttg accgctggtt cagctctctc acctctctgc accaggactg gctgaatgg
1921 aacagcacgt accgtgtggt cagctctctc acctctctgc accaggactg gctgaatgg
1981 aaggagtcaca agtgcaggct cctcaacaaa gccctccacg ccccatcgga gaaaacatc
2041 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaaaca caggtgtaca cctgcccc cctccgggat
2101 gagctgacca agaaccaggt cagctgaccc tgcctggtca aaggtctcta tcccaggac
2161 atcgccgtgg agtgggagag caatggggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
2221 gtgtggact ccgacggctc ctctctctc taccgaagc tcaactgtga caagagcagg
2281 tggcagcagg ggaacgtctt cctactgtcc gtgatgcagt aggtcttgca caaccactac
2341 acgcagaaga gccctctctc gctcccggtt aaatga

```

【図 102 A】

図 102A

Figure 102A

```

1 atgcaagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctgc tgcctgctatg tgcctcaagg
61 gtcagagccga gagggtcgtc gtcggggagt tccccagaac cctgtgccaa tggaggcacc
121 tgcctgagcc tgctctctgg acaaaggacc tgcacgtgtg cccctggctt cctgggtgag
181 acgtgccaat tccctgaccc gccccagaaac cccacgtctc gccaataatg aggcactgtg
241 caagccctgc tccccctccc cctagggtcc cccagctctc cctctccatt gacaccagac
301 tctctgtgca ctgctctccc tggctctcact ggtgagagat gccaggccaa gcttgaagac
361 cctctctctc cctctctctg tcccaaaaag ggcctgctgc acatccaggc ctcggggccc
421 ccaactgctc cctgctctga tgggtggaca ggtgagcagt gccagcttcg gactctctgt
481 ccaagcaaac catgtgttaa tggaggggtg tgtctggcca catacccccga gatccagtgc
541 caactgcccac ggcctctcga ggcctcctgc tctgaacctg tctgaacctg tctccactgc
601 gaccacagac cctgccccaa aggcacctcc tgcataaaca cctctgggctc cttccagtgc
661 cctctgcccgt tggggcagga ggcctccact tctgaacctg tctgaacctg tctccactgc
721 aggggctgct cgaatggggg cactctgccc ctgatgcagc agaaagactc cactctccac
781 cctctgcccgt tctcccccag tctccatagg ccaactgtgt aggtgaatcc agacaactgt
841 gtcagccccc atgtgcagaa tgggggacac tgcacagagt ggtctggacc ctacacctgc
901 cctctgcccgt ccaactgccc aaacgggggg acctgtccag acctgtctgt tagcttccac
961 cagggtccccc ccaactgccc aaacgggggg agctgtgagc agaaacttga tgaactgtat
1021 tgcctgtgctg tgaatgggtg gggggcagaa agctgtgagc atgtaccggg tgggtctctt cctctgcttc
1081 gctgcccactc gtgcccctgg atccactctg atgtaccggg tgggtctctt cctctgcttc
1141 tgcctgcccgt gacgcacagc acctctgctc cacttgggag acatgtgtct gaggccagcc
1201 tgcctgcccgt atgcccactg cagccacacg cccctccacg gctccacact ctgctctgct
1261 cagctgcccgt atgcccactg cactctgccc caggacctgt acgagtgtct gatggcccag
1321 caaggcccac tgcctgtgta acatggcgtc tctgctctca acactctggt cctctctgct
1381 tgcctgtgct cactctgcta cagggtctcc cgttgtgagg ctgatccaca tgaatgcttc
1441 tccagcccctc gccaccccag aagcactctg ctggaactac tgcctcactc cactctgctc
1501 tgcctgcccgt gcttgaagag gcaatctctg gaggcagaga ccaacagagt tgcctcactc
1561 cctgctgcta accagcggga tgcctatgac ctgctcaacg gcttccactg catctgctc
1621 cctggtatctc cgggcacccc atgtgaggag galatcgatc agtgacagag cctctcactc
1681 gcaatgggtg ggcagtgcga ggcacagcct ggaactctcc actgcaagtc cctccacagg
1741 tttgaagggtc cactgtgcta aacagaggtg gatgagtgcc tgaatgacct atgtctcctt
1801 gggagcagct ccttctgact tccaggagcc tctcttctgc tctgcccctc tgggttccaa
1861 gggcagctctc gtaggttctc cctgtgtgct cccaactctg gccaccccac gacagatctg
1921 aaggacagga aagacaaagg cactgctcct tctctctgat gaagcctgtg cctgtgcccac
1981 cctgagggaca atcgcctctg cccacccagg cactgcccga gatcctcact tctgtgtgac
2041 gctgggttga cggggcccga gttgagga gaactagggg gctgactctc tgcacccctg
2101 gcaatgggtg ggggtgcta gctccagccc tctgtgctca actgcaactc tgcacccagg
2161 tacaagaggt ccaactgtat tggaggagc agactgtctc actgcaactc atgtctcact
2221 ggggtgctct gcaactgtat cctgagagc tactactaga cctgctctcc aagccacaca
2281 ggggcccagt gccaaacagc cactgactac tgtgtgctgc cctgctctcc caatggggg
2341 acctgtgtga caggcctgtc cactctctcc tgcctctgct cactgggtct ccaagggtgc
2401 cctgtgtgagc gaaagctccc cccagctgtg cagacagacc cctgtaggaa tagggccacc
2461 tgcacagaca gccctcaggc tcccctgctc cctgcccaca ctgctacac cggagggacc
2521 tgcacagactc tgaatggact atgtgcccag aagcctctgc cagcaaatc cactgctctc
2581 caactgggtg cctctctcca ctgctgtgc cctcagggat ggaactggcc tctctgctc
2641 cctcactgtc cctctgcca gaagctgcca ctgagcccag gcaatagact cctctctctc
2701 tgcacaaagt gaggctctg tgtgacagc ggcctctctc atctctgcca cctgcccctc
2761 ggaatccaaag cagactgtg cagactgcca gtagaacccag atctgtggcc gggcagagcc
2821 aaactctgtg acaaaactca cactgccc cctgtcccag cactgactc cctgggggga
2881 cctgactgtc tctctctccc cccaaacccc aaggacaccc tcatgatctc cctggacccc
2941 gactgacac cgtgtgtgt ggcagtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gtcactgtg
3001 tactgtgagc gctgtgaggt gcaatagtc aagacaaagg cctggaggga cagactacac
3061 acacgtacc gttgtgtcag cgtctctacc gactctgccc gaatggcagc

```

【図 103】

図 103

Figure 103

```

1 atgcaagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctgc tgcctgctatg tgcctcaagg
61 gtcagagccga gagggtcgtc gtcggggagt tccccagaac cctgtgccaa tggaggcacc
121 gaccgggttg gctctctctg ctgctctccc ccaactggac gccacagact cctgtgcccac
131 ttcgaagaca tgcctctcag ccaagcgtgt cccatggagt ccaactgac caccacccc
241 ctacacagct ccaacactctc cctgtgctag cctgtgctcact gggggcctac gctccacagc
301 gactggagag aggtccactg aggcacagaa ggcctgagtc cctgtgacca tgggggtccc
361 tgcctcaaca cctctctctg ctccactctc cctgtgacca cctgtgacca aggtctcctg
421 tgtgagagct atacaaatg cctctctccc cagcctgccc acccaggaag cactctctg
481 gactcactct ccaactctccc ctgcccctgc cgcctagagt tagaaggaga gctctgtgag
541 gtagagacca acgagtgcga ccaactctcc ggcctgaacc accgggattg ccatgactgc
601 ccaacagctc tccagtgcac ctgcccctgc gactctctcc gcccccactg tggaggagat
661 accgactgag gcaatgctgc actgtgctgc atgtgggaga agtgccnaga cagactggga
721 gctcctcact gcaatgctgc ccaactgctc gaaggagacc gctgtgacca agagtgatg
781 gactgctgca gtagagcact cctgctgcca gcaactgtgc tgcctctccc agagagcttc
841 tctgctctct gctcctctg tctccagga ccaactgtgt aggtctctcc gtagctctcc
901 aacccctgct agcccagga galatgaa gacacagaa acaaaggcca cgtctctgtg
961 cctgagtga gctctgctg tgcctctccc gaggacactc cactctgcca ccaagggtac
1021 tgcacagact cctcactgtg gttgtgctg ggttgagagc ggcacaggtg tggaggagag
1081 ctagggggtc gcatctctc actgtgctgc catgggggga cctgtgctcc cagactctcc
1141 gctcctcact gcaatgctgc tcaagagctc acaagagcca cctgtgacca agagatgga
1201 gctgctcact gtagagcact cctgctgcca gcaactgtgc tgcctctccc agagagcttc
1261 tctgctctct gctcctctg tctccagga ccaactgtgt aggtctctcc gtagctctcc
1321 aacccctgct agcccagga galatgaa gacacagaa acaaaggcca cgtctctgtg
1381 cctgagtga gctctgctg tgcctctccc gaggacactc cactctgcca ccaagggtac
1441 gacagcctcc ctgagtagat ggaactctgc caggacagcc ccaagctccc cctgctctcc
1501 tgcctcactc gcatctctc aggtgctgc cactgtgctc gtagctctg tgcctagagc
1561 cctgctcact gcaatgctgc tcaagagctc acaagagcca cctgtgacca agagatgga
1621 gactgctgca gtagagcact cctgctgcca gcaactgtgc tgcctctccc agagagcttc
1681 tctgctctct gctcctctg tctccagga ccaactgtgt aggtctctcc gtagctctcc
1741 cctcctcact cctgctgctg cctcctgga tcccaaggga gctgtgcca ggaactgctg
1801 aacccctgct agtcagagcc tgcacagaa ggggacactc gactgccc cccacgtggg
1861 tctctctgct agtagagcc aggtcactg gacacagact gctcaaggga accctgctc
1921 tgcactgctc aacccctgca cactgctgca cactgctgca ccaactgctg agagatctcc
1981 tgcctgctc cctcagctc tgcctgctc cgtgtgagc gaaactgga agagatgga
2041 gacagcctc gcaactgctc aggtcagga gctgtgctc cctgtgcca tgcctctc
2101 tgcctgctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2161 agtcacactc gctcagctc aggtcagga gctgtgctc cctgtgcca tgcctctc
2221 tgcctgctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2281 gctcagctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2341 aagctgctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2401 cctcagctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2461 tgcctgctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2521 gctcagctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2581 cctgctgctc gctcagctc tgcctgctc gctgtgagc gaaactgga agagatgga
2641 aagacacccc tctgactc cggagcactc gaggcactc gctgtgagc gaggctgagc
2701 cagcaagacc ctgaggtgca gttcaactg tctgtgagc gctgtgagc gactcaagcc
2761 aagacacccc cgggggagga gcaagacac agacactgct gctgtgagc gctcctccc
2821 gctcctgctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc
2881 cctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc
2941 gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc
3001 cctgctgctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc
3061 gacacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc
3121 agacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc cagacacccc
3181 cctgctgctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc gctcagctc
3241 tga

```

【図 102 B】

図 102B

Figure 102B

```

3121 gactgacaagt gcaaggtctc caacaaaagg cctccagccc ccatcgagaa aacatctccc
3181 aaagccaaa ggcaccccag aagacacacg gtagacaccc tgcctccatc cgggagatgag
3241 ctgacaaa gacaggtcag cctgacactc ctggtaaa gcttctatcc cagcagatcc
3301 gctgagagc gggagagcaa tgggagcccg gagaacacac aagagacacac gctcctgctg
3361 ctgagactcc agcgtctctc ctctctctac cctgtggaca cgtgaggtgag
3421 cagcagggca acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg cctctgacaa ccaactacac
3481 cagaagagg tctctctctc tccgggttaa tga

```

【図 104】

図 104

Figure 104

```

1 atgcaagcccc ctccactgct gctgctgctg ctgctgctgc tgcctgctatg tgcctcaagg
61 gtcagagccga gagggtcgtc gtcggggagt tccccagaac cctgtgccaa tggaggcacc
121 tgcctgagcc tgctctctgg acaaaggacc tgcacgtgtg cccctggctt cctgggtgag
181 acgtgccaat tccctgaccc gccccagaaac cccacgtctc gccaataatg aggcactgtg
241 caagccctgc tccccctccc cctagggtcc cccagctctc cctctccatt gacaccagac
301 tctctgtgca ctgctctccc tggctctcact ggtgagagat gccaggccaa gcttgaagac
361 cctctctctc cctctctctg tcccaaaaag ggcctgctgc acatccaggc ctcggggccc
421 ccaactgctc cctgctctga tgggtggaca ggtgagcagt gccagcttcg gactctctgt
481 ccaagcaaac catgtgttaa tggaggggtg tgtctggcca catacccccga gatccagtgc
541 caactgcccac ggcctctcga ggcctcctgc tctgaacctg tctgaacctg tctccactgc
601 gaccacagac cctgccccaa aggcacctcc tgcataaaca cctctgggctc cttccagtgc
661 cctctgcccgt tggggcagga ggcctccact tctgaacctg tctgaacctg tctccactgc
721 aggggctgct cgaatggggg cactctgccc ctgatgcagc agaaagactc cactctccac
781 cctctgcccgt tctcccccag tctccatagg ccaactgtgt aggtgaatcc agacaactgt
841 gtcagccccc atgtgcagaa tgggggacac tgcacagagt ggtctggacc ctacacctgc
901 cctctgcccgt ccaactgccc aaacgggggg acctgtccag acctgtctgt tagcttccac
961 cagggtccccc ccaactgccc aaacgggggg agctgtgagc agaaacttga tgaactgtat
1021 tgcctgtgctg tgaatgggtg gggggcagaa agctgtgagc atgtaccggg tgggtctctt cctctgcttc
1081 gctgcccactc gtgcccctgg atccactctg atgtaccggg tgggtctctt cctctgcttc
1141 tgcctgcccgt gacgcacagc acctctgctc cacttgggag acatgtgtct gaggccagcc
1201 tgcctgcccgt atgcccactg cagccacacg cccctccacg gctccacact ctgctctgct
1261 cagctgcccgt atgcccactg cactctgccc caggacctgt acgagtgtct gatggcccag
1321 caaggcccac tgcctgtgta acatggcgtc tctgctctca acactctggt cctctctgct
1381 tgcctgtgct cactctgcta cagggtctcc cgttgtgagg ctgatccaca tgaatgcttc
1441 tccagcccctc gccaccccag aagcactctg ctggaactac tgcctcactc cactctgctc
1501 tgcctgcccgt gcttgaagag gcaatctctg gaggcagaga ccaacagagt tgcctcactc
1561 cctgctgcta accagcggga tgcctatgac ctgctcaacg gcttccactg catctgctc
1621 cctggtatctc cgggcacccc atgtgaggag galatcgatc agtgacagag cctctcactc
1681 gcaatgggtg ggcagtgcga ggcacagcct ggaactctcc actgcaagtc cctccacagg
1741 tttgaagggtc cactgtgcta aacagaggtg gatgagtgcc tgaatgacct atgtctcctt
1801 gggagcagct ccttctgact tccaggagcc tctcttctgc tctgcccctc tgggttccaa
1861 gggcagctctc gtaggttctc cctgtgtgct cccaactctg gccaccccac gacagatctg
1921 aaggacagga aagacaaagg cactgctcct tctctctgat gaagcctgtg cctgtgcccac
1981 cctgagggaca atcgcctctg cccacccagg cactgcccga gatcctcact tctgtgtgac
2041 gctgggttga cggggcccga gttgagga gaactagggg gctgactctc tgcacccctg
2101 gcaatgggtg ggggtgcta gctccagccc tctgtgctca actgcaactc tgcacccagg
2161 tacaagaggt ccaactgtat tggaggagc agactgtctc actgcaactc atgtctcact
2221 ggggtgctct gcaactgtat cctgagagc tactactaga cctgctctcc aagccacaca
2281 ggggcccagt gccaaacagc cactgactac tgtgtgctgc cctgctctcc caatggggg
2341 acctgtgtga caggcctgtc cactctctcc tgcctctgct cactgggtct ccaagggtgc
2401 cctgtgtgagc gaaagctccc cccagctgtg cagacagacc cctgtaggaa tagggccacc
2461 tgcacagaca gccctcaggc tcccctgctc cctgcccaca ctgctacac cggagggacc
2521 tgcacagactc tgaatggact atgtgcccag aagcctctgc cagcaaatc cactgctctc
2581 caactgggtg cctctctcca ctgctgtgc cctcagggat ggaactggcc tctctgctc
2641 cctcactgtc cctctgcca gaagctgcca ctgagcccag gcaatagact cctctctctc
2701 tgcacaaagt gaggctctg tgtgacagc ggcctctctc atctctgcca cctgcccctc
2761 ggaatccaaag cagactgtg cagactgcca gtagaacccag atctgtggcc gggcagagcc
2821 aaactctgtg acaaaactca cactgccc cctgtcccag cactgactc cctgggggga
2881 cctgactgtc tctctctccc cccaaacccc aaggacaccc tcatgatctc cctggacccc
2941 gactgacac cgtgtgtgt ggcagtgagc cagcaagacc ctgaggtcaa gtcactgtg
3001 tactgtgagc gctgtgaggt gcaatagtc aagacaaagg cctggaggga cagactacac
3061 acacgtacc gttgtgtcag cgtctctacc gactctgccc gaatggcagc

```

【 図 1 0 5 】

図 105

Figure 105

```

1 atgcagcccc cttcactgct gctgctgct ctgctgctg tctgctatg tctctcagtg
51 gtcagagcccc gagggctgct gtgctgctc gctcctctg tgaacacagc ggaattgcat
121 gacccgggtggt gctctctctc ctgctctgc ccaactctg gcaacaggat cctgtgccc
181 tggagagaca tggctctgag ccaagcctgc catggggatg cccaatgcag caccacccc
241 ctcacaggct ccaactctgt cctgtgctg cctggctatt cggggcccac ctgccaccag
301 gacctggagc agtgtctgat ggcccacga gccccaagtc cctgtgaaca tggcgcttcc
361 tctctcaaca cctctggctc ctccaactgc cctgtctcac ctgtgtacac aggtccctgt
421 tgtgagctgt atcaacaatg gtgctctccc cagccctgcc acccaggaag cactgtctgt
481 gacctacttg ccaacttcca ctgctctgc ccgccaggct tagaagggca gctctgtgag
541 gtggaganda acaggtgtgc ctcaegtccc tgcctgaacc acgctgattg ccatgacctg
601 ctaaacggct tccagtgcat ctgctctgct gattctctcc gcaaccgatg tgaggaggat
661 atcgatgagt gcagaagctc tccctgtgac aatggtgggc agtgccagga ccagcctgga
721 gcttccactt gcaagtgtct cccaggcttt gaagggccc gctgtcaaac agagggtggt
781 gaagtgcctga gtgacctatg tccctgtgga gccagctgcc ttgatcttcc agggaccttc
841 ttttgcctct gccctctctg tttccacagg cagctctgtg aggttccctt gtgtctctcc
901 aacctgtgct agcccacagca gatattgaag gaccagaaag acaaggccaa ctgctctctg
961 cctgatggaa gccctgtgct tgccccacct gaggacaact gcaactgccca ccaaggggac
1021 tggcagagat cctcatgtgt gtgtgactgt ggttgacgg ggccagagtg tgaggcagag
1081 ctagggggct goactctgct accctgtgac catgggggga cctgtacctc ccaggcctct
1141 ggtctacaact gacacctgcc tacaagctgc acaggaacca cctgtagtga ggaagtgtga
1201 gcttgtaact cagggtgctt tctcaatgac ggctcctgca accctagccc tggagggtac
1261 tactgcaact cgcctccaa gcaacacagg cccagtgccc aaaccagcac tgactctgt
1321 gtgtctgccc cgtgtctcaa ggggggtacc tgtgtgaaca ggcttgacc ctctctctgt
1381 cctgtgccc tgggtctcca gggggcgggc tgtgagga aaagtctgccc cagtgtgca
1441 gacagccct gtaggaatag ggaacacctc caggacagcc ctcaaggatcc cgtgtgctc
1501 tgcctcactg gctcaacagg aggcagctgc cagactctga tggactatg tggccagaa
1561 cctgcccac gcaattccca ctgctccag actgggccc ctctccactg ctgtgtgctc
1621 cagggaatgga cgggctctct ctccaacttc ccaactgtct cctgtcagaa ggctgactg
1681 agccaagga ttagcgtctc ttcctttgc cacaatggag gctctgtgt cgcagcaggc
1741 cctctctatt tctgcccact cccccttga tcccaaggca gctgtgtgca ggaatcagg
1801 aaaccagatc tggcccggg cggagcccga tcttggaca aaactcaac atgcccactg
1861 tgcccagcac ctgaactctt ggggggagcc tgaattcttc tcttcccacc aaaccacag
1921 gacacccca tgaactctcc gacccctgag gtcacatgct tgggtgtgga cgtgagcac
1981 gaagaccctt aggtcaagtt caactgttac gtggagcgct tggagtgtga taagtccaag
2041 aacaaagccc gggagggagca gtaccaacgc actgaccgtg tggtagcgtt cctcagctc
2081 ctgacacagg acttggtgaa tggcaaggag tacaagtcca aggtctccaa caaagccctc
2091 cagagccccc tggagaaaac catctccaaa gccaaaggcc agncccgaga accaagccctc
2101 tacacccctg ccccatcccg ggaatgactt accaagaacc aggtcagctt gacttcgctg
2161 tctcaagggt tctatccag cagatctgct tggagtggtt agagcaatgg gtcagcggag
2221 acaactaca agaccagcc tccctgtgct gactccagc gctctcttct cctctacagc
2281 aagctcacc gtagcaagag cagggtgcag cagggaagc tcttctcatg cctcgtgctg
2341 catgaggttc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct cctgtctctc gggtaaatga

```

【 図 1 0 7 】

図 107

Figure 107

```

1 atgcagcccc cttcactgct gctgctgct ctgctgctg tctgctatg tctctcagtg
51 gtcagagcccc gagggctgct gtgctgctc gctcctctg tgaacacagc ggaattgcat
121 gacccgggtggt gctctctctc ctgctctgc ccaactctg gcaacaggat cctgtgccc
181 gaggatagct atcagtgtag aagctctccc tgtgccaatg gtggcgagtg ccaaggaccag
241 cctaggagctt cctgagaaac gtgtctctcc gcccttgaag ggccacagct tccaaacagag
301 gtggatgagt gcttgagtga cccatgtccc gttggagcca gctgcttga tcttccagga
361 gcttcttttt gctctctccc cctcgtgttc acaggccagc tctgtgaggt tcccctgtg
421 gcttcccaacc tgttccagcc caggcagata tgaaggacc agaagagcaa ggcccaactgc
481 cctgttctct atggaagccc tggctgtgcc ccaactgagg acaactgcac ctgccaccac
541 gggcactgccc agagatcttc atgtgtgtgt gacgtgggtt ggaaggggcc agagtgtag
601 gcagagctag ggggctgcat ctctgcaccc tgtgcccabg gggggacctg ctaccccag
661 cctctgggctt acaactgcac ctgcccata ggtacacag gaccacactg tagtgaggag
721 atgacagctt gtcactcagg gccatgtctc aatggcgctt cctgcaaccc tagccttga
781 ggctactact gcaactgccc tccaagccc acagggcccc agtgcaacac cagcactgac
841 tactgttgtt ctgcccctgt ctccaatgg ggtacctgtg tgaacaggcc tggcaccctc
901 tctgtctctt gtgcccagg ctccaaggcc ccgctgtgtt agggaaagct ccgcccaccg
961 tgtgcagaca gcccctgtag gaatagggca acctgcagg acagccctca ccttctccgc
1021 tgcctctgct ccaactgcta cccggaggcc agtgcagaga cctgtatgga cttatgtgct
1081 cagaagcccc gcccacgcaa tcccactgc ctccagactt ggccctctct ccaactgtgt
1141 tgcctcagg gatgacagg gctcctctcc aaacctccac tgtctctctg ctagaaggct
1201 gactgagcc aaggcataga cgtctctccc ctttgacaca atggaggctt ctgtctcag
1261 agcggcctct cttattctct ccaactgtcc cctggatccc aaggcagctt gtcgagagt
1321 cactgagcc cagacttggg cccggggag cccaactctt gtagcaaac tcaacatgc
1381 ccaactgtgc cagcactgca actcctggg gaaacctcag tcttctctt ccccacaaa
1441 cccaaggaga cctcatgat cctccggacc cctgaggtca catgcttgtt ggtgcaactg
1501 agccacagaa accttgaggt caagtccaac tggtagctgt accgcttga ggtgcaactt
1561 gccaaagaaa agcccgagg gtagcagtac aacagacact accgtctgtt cagctctctt
1621 accgtctctc ccccatcctg gaataatcca tccaaagcca aaggcgagcc cccagacaaa
1681 gctctcccc actctgcccc atcccgggt gagctgacca agaaccaggt cagctctctt
1741 cactgtgtca aaggtctcta tcccagcag atcgccgtgt agtgaggag caaaggccctg
1801 cgggagaaca cctggaacag cagcctctcc gtgtgagact ccgacggctc cctctctctc
1921 tcaagcagc tcaactgtga caagagcag tggcagcag ggaactctct cctatgctcc
1981 gtgtgctat aggtcttcca caacactac acagaaaga gctctctctt gcttccgggt
2041 aatatga

```

【 図 1 0 6 】

図 106

Figure 106

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctctctctg gctgtgctg tcaacagcac tctctgcaat
51 gccagggtga ttgctgccc ctgtgcccgg ggaatccact gcaatgaccc ggtgtgctct
121 tctctctgct tctgcccacc tggagcaca ggaactctgt gcaacttga agacatgtgt
181 ctgagccagg cgtgcccatt ggaatgccaa tgcagcaca acccctcac aggtctccaa
241 cctgctctgt gtcagcttg ctattctggg cccacctgce accagagact ggcagagtgt
301 ctgatggccc agcaaggccc aagctcctgt gaacatggcg gttcctgctt caacactctt
361 ggctcttcca actgctctgt tccactgccc tacaacaggt cccgttgtga ggtgtatcac
421 aatgagtgcc tctccagccc ctgccaccca ggaagcaact gcttgacctt acttgccacc
481 tccactgccc tctgcccggc aggttagaa gggcagctct gtgaggtgga gaccaacgag
541 tctgctcag ctccctgctt gaaccacgg gatgtccat accgtctcaa cggcttccag
601 tgcacttccc tgcctggatt ctccggcacc cagatgtagg aggatctga tgaagtccaga
661 agctctctct gtcgcaatgg tggcgactgc caggaccagc ctggagcctt ccaactgcag
721 tgcctccag gcttgaagg gccacgctgt caaacagagg tggatgagtg cctgagtgac
781 ccatgtccc tggagccag ctgcttgat cttccaggag ccttcttctt cctctgcccc
841 tcttggttca caggcagctt cctgtgtgt cctccaaact gtcacagccc gtcacagccc
901 aagcagatct gtaaggacca gaagacagc cctgctgctt tctgtctga tggagacctt
961 ggtgtgccc cactggagg caactgacc tgcacacag gcaactgcca ggaattctca
1021 tgtgtgtgtg acgtgggttg gacggggcca gagtgtagg cagagctagg gggctgcat
1081 tctgcaact gtgccccttg ggggacrtgc taeccccagc cctctggcta caactgacc
1141 tgcctcacag gctacacagg acccaactgt agtgaggaga tgcagcttg taactcagg
1201 ccatgtctca atggcgcttc ctgcaacact agccttgagg gctactactg cactgcccct
1261 ccaagcaca caggcccaca gtgccaacac agcactgact actgtgtgtc tggcctgctg
1321 tccaatgggg gtaactgtgt gaacaggctt ggcacctctt cctgctctgt tgcactgggc
1381 tcccaaggcc cgcctgtgga gggaaagctt gcgccactgt gtgcagagac cccctgtagg
1441 aataggggca cctgcagga cagccctcag ggtcccctgt gctctgccc ccaactgcat
1501 accggaggca gctgcccag tctgatgag ttatgtgccc agaagccctg cctacgcaat
1561 tccactgccc tccagactgg gccctcttcc cactgctgtt gcttccagg atgacacgg
1621 cctctctgca accctccact gctcctctg cagaaggctt cactgagcca aggcataagac
1681 gtctcttccc tttggcaca tgaggacctt tgtgtgaca cgtgcccctc ctattctctg
1741 cactgcccc ctggaatcca aggcagctgt tctgtgagc agctgacccc agatctgac
1801 cggggcgag ccaaatctt tgaacaaact cacaactcac acccgtgccc acccactgaa
1861 cctctgggg gacgtcagt cttctcttc ccccacaaa ccaaggacac cctcatgctc
1921 tcccggacc ctgaggtcac atgctgtgt gtggactgga gccacagaa cctgaggttc
1981 aagttcaact ggaactgga cggctggag gtgcataatg tcaagacaaa ccccgaggag
2041 gaggactaca cagcagctga cgttgtgct agcctcttca cgtctctgca ccaagactgt
2101 ctgaatggca aggaagctc tccaacagc cctccagag cctccagag cctccagag
2161 aaaaactct ccaagccca cggagacccc aggtgacac aggtgacac cctgcccctc
2221 tcccggagt agctgacaaa gaacacagtc agctgacctt cgtgtgtcaa aggtctctat
2281 cctccagaca tgcctgtgga gtggagagg aatggggcag cccagagccc ccaagacccc
2341 agcctctccc tgcgtgactt cagcggctcc tcttctctct accagaaagt caccgtgagc
2401 aagagcagt ggcagcagg gaaactctt ctaactctg tgaatgata ggtctctgac
2461 aacactaca cgcagaagag cctctcctgt tctccgggta aatga

```

【 図 1 0 8 】

図 108

Figure 108

```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctctctctg gctgtgctg tcaacagcac tctctgcaat
51 gccagggtga ttgctgccc ctgtgcccgg ggaatccact gcaatgaccc ggtgtgctct
121 tctctctgct tctgcccacc tggagcaca ggaactctgt gcaacttga agacatgtgt
181 ctgagccagg cgtgcccatt ggaatgccaa tgcagcaca acccctcac aggtctccaa
241 cctgctctgt gtcagcttg ctattctggg cccacctgce accagagact ggcagagtgt
301 ctgatggccc agcaaggccc aagctcctgt gaacatggcg gttcctgctt caacactctt
361 ggctcttcca actgctctgt tccactgccc tacaacaggt cccgttgtga ggtgtatcac
421 aatgagtgcc tctccagccc ctgccaccca ggaagcaact gcttgacctt acttgccacc
481 tccactgccc tctgcccggc aggttagaa gggcagctct gtgaggtgga gaccaacgag
541 tctgctcag ctccctgctt gaaccacgg gatgtccat accgtctcaa cggcttccag
601 tgcacttccc tgcctggatt ctccggcacc cagatgtagg aggatctga tgaagtccaga
661 agctctctct gtcgcaatgg tggcgactgc caggaccagc ctggagcctt ccaactgcag
721 tgcctccag gcttgaagg gccacgctgt caaacagagg tggatgagtg cctgagtgac
781 ccatgtccc tggagccag ctgcttgat cttccaggag ccttcttctt cctctgcccc
841 tcttggttca atgggggtac ctgtgtgaa aggcctggga ccttctctgt cctctgtgct
901 atgggttccc agggccctgg ctgtgaggga aagctctgce ccaactgtgt agacagcccc
961 gctaggaata gggcacaact ccaaggacag cctcagggtc cccgtgctct cctgcccact
1021 gctacacagc gaggcagctg ccaagactgt atggacttat gtcgccagaa gctctgctcc
1081 cgaacttccc actgcttcca gactgggccc tcttccactt cctgctgctt ctagaaggct
1141 accgggcttc tctgcaactt tccactgccc tctgcccaga aggtctgact gaggccaagg
1201 atagactctt cttccctgtt ccaacaatga ggcctctgt tgcagagcgg cctctctat
1261 cctcgccact gcccccctgt attccaagg agcctgtgct aggatcactt gaacctgact
1321 ctggggccgg gcagcccaca atcttgtac aaaaactcca catgcccac cgtcccagca
1381 cctgaactcc tggggggacc gtaactctt cttctcccc caaaacccaa ggaacacctc
1441 atgactcccc ggaacttga cgtggaggt gtggagggtt acaatgaca gaaagacctt
1501 gaggtcaagt tcaactgga cgtggaggt gtaggggtgt cctcactgt cctgacccc
1561 cggaggagc agtacaacag cagctacgt gtggtcaggt tccactactt cctgacccc
1621 actgctgtga atggcaagga gtacaaagtg aaggttcca caaagctctt cccagcccc
1681 actgagaaaa ccatctccaa agccaagggt caggcccag aaccacaggt gtaacacctg
1741 cccccctccc ggaatgagct gacaaagag caggtcagcc tgaactgctt gaaacaaagg
1801 tctctacca cgcacatcgc cgtggagtgt gagagcaagt ggcagccgga gaaacacctg
1861 aagacacgc cctccgtgtt ggaactccag gctctcttct tctctcagc caactctacc
1921 gtggacaaga caggtggga gagggggaa gttctctcat gctcctgtat ctagaggtct
1981 ctcacacac actacacga gaagagcttc tctctctctt cgggttaagt a

```

【 図 1 0 9 】

図 109

Figure 109

```

1 atgcagcccc cttcactgct gctgctgctg ctgctgctgc tgcctgctat tgcctcagtg
61 gtcagaccca gaggctgct gtgtgcagag agccctgtga ggaatagggc aacctgccag
121 gacagccctc agggctcccc gctgctctgc cccacttgct acaccggagg cagctgccag
181 actctgatgg acttatgct ccagaaagccc tgcccagcca attccactgc cctccagact
241 gggcctctct tccactgct gtgcctccag ggaaggacag ggcctctctg caactctcca
301 ctgctctctc gccagaagcg tgactgagcg caaggcatag acgtctcttc cctttgccac
361 aatggaggcc tctgtctcga cagcgcccc tctattctct ggcactgccc ccttggattc
421 caaggcagcc tgtgccagga tcacgtgaac ccatgtgagt ccaggccttc ccagaaaggg
481 gccacctgca tggcccagcc cagtgggtat ctctgccagc gtgcccaggc ctacgatgga
541 cagaactgct caaaggaaat cgatgctgtc cagtcccaac cctgtccaaa ccatggaaac
501 tgtactccca aactggagg attccactgt gctgcccctc caggctttgt ggggtcacgc
561 tgtgagggag acgtggagca gtgtctggac cagccctgcc accccacagg cactgcagcg
601 tgccactctc tggccaatgc ctcttactgc cagtgtctgc ctggacacac agggcagtgg
721 tgtgaggtgg agatgagccc ctgcccacgc caacctgctc ttcactggag gacctgtgag
781 gccacagcag gatcacccct ggttttcact tgcccactgc ccaagggttt tgaaggcccc
841 acctgcagcg acaggggccc tttctcgagg tcccatcact gccaccagcg aggcctgtgt
901 ctggcctccc cttaaggcag ctctccacca cgtctgctct cctctctccc atgctataac
1021 cctgactguc tgaaccaccc agcccctaaa gctgtgagc ctctctctcc atgctataac
1081 aatggcagct gctcagagac caggggcttg gggggcccag gcttctgacg cctctgccc
1141 cacagctctc cagggcccgc gtgtcagaaa cccggagatc tgggcccagg cagagcccac
1201 tcttgggaca aaactccacc atgcccacgc tggcccagcc ctgacctctc ggggggagcg
1261 tcaagtcttc tcttctcccc aaaaaccuag yacaccccca tgaactctcc gacctctgag
1321 gtccatctcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagct caactgttac
1381 gtggcagcgc tggagggtga taatgcccag acaagccgcg gggaggagga gtaccaacagc
1441 acgtacccgt tggtagcagc cctcaccgtc ctgcaccagg actcgtcgaa tggcaaggag
1501 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccaca tccagaaaa catctccaaa
1561 gccaaaggcg agcccccaga accacaggtg tacacctctg ccccatcccg ggatgagctc
1621 accaagaaac aggtcagcct gacctgctgt gtccaaaggt tctatccccc agcatcggc
1681 gtggagtgga agtcacatgt gcagccggag aacaactaca agaccacgcg tccctgagc
1741 gactccgagc agtccattct ctctacagc aagctcaccg cagggtggag catgagggctc
1801 caggggaagc tctctctatg ctccgtgagc catgagggctc tgcacaacca ctacacccag
1861 aagagcctct cctctgtctc ggttaaatga

```

【 図 1 1 0 】

図 110

Figure 110

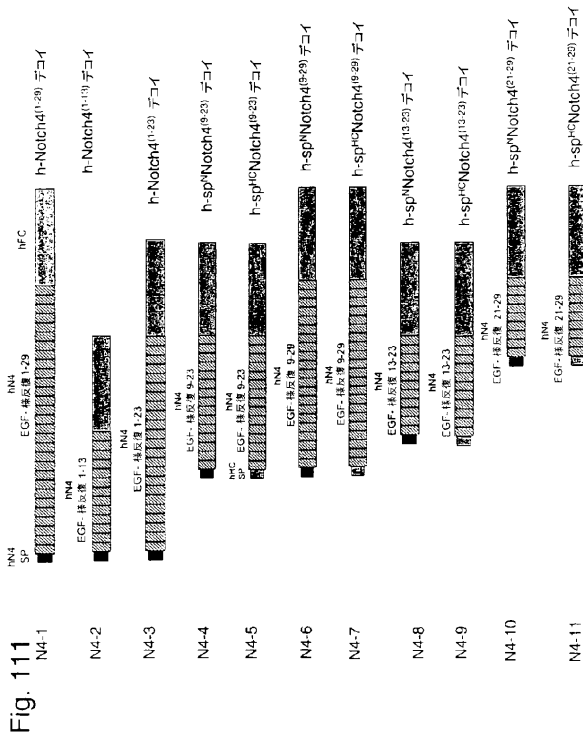
```

1 atgtgggggt ggaagtgcct cctctctctg gctgtgctgg tcacagccac tctctccact
61 gccagggtgt cagacagccc ctgtaggaaat agggcaacct gccaggacag cctctcaggt
121 ccccgctgct tctgcccac ttgtacaccc ggaaggcagct gccagactct gatggactta
181 tctgcccaga agcctgccc acgcaatccc cactgcccct agactgggct cctctccacc
241 tctctgtgct tccagggtat gacggggctt ctctgcaacc ttcactgtct cctctgccc
301 aaggtgtgac tgagccaagg catagacgtc tcttcccttt gccacaatgg aggcctctgt
361 gtgcagacgc gccctccta tttctgccac tgcctccctg gatccaagg cagcctctgc
421 caggatcagc tgaacccatg tgaatccagg ccttgccaga acggggccac ctgctatggc
481 cagcctcagt ggtatctctg ccagtgtgct ccaggctacg atggacagaa ctgctcaagg
541 gaactcagtg ctgtctcagt ccaacccctg cacaacctgt gaacctgtac tcccaaaact
601 ggaggatttc actgtgctg ccttccaggc ttltgtgggg taactgtgta gggagacgtg
661 gacgagtgtc tggaccagcc ctgcccaccc acagcagctg cagctgtcca ctctctggc
721 aatgctctct actgcccagt tctgcccagg caccagggcc agtgggtgta gggagagata
781 gacctctgct acagccaccc ctgcttctat ggaaggacct gtgaggccac agcagagata
841 cctctggggt tcatctgcca ctgcccacag gttttgaaag gccctcctg cagccacagg
901 gctctctct ggggttcca tcaaggccac cagcaggccc gtgtctgct cctcccaag
961 cagggctccc caccagctg tgcctgtctc actggtatgt ggggtctga ctgctgacc
1021 ccacacagtc ctaaaagctg tggcctccc tcccactgct taccacatgg cagctgtcca
1081 gagaccagcg gtttgggggg cccagctttt cgatgctctc gctcaccag ctctccagg
1141 cctcgggtgt agaaacccgc agactcggc cccggcgagc ccaaatctt tgcacaaact
1201 caccatgccc cactgtgccc agcactgaa cctctggggg gacgtcagt cctctctctc
1261 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgacc tcccagccc ctgagctgac atgctgggtg
1321 gtggagctga gccacgaaga ccttgagctc aagtccaact ggtacgtgga cggctggag
1381 gtgcataatg ccaagacaaa gccgggggag gacagctaca acagcagcta cgtgtggctc
1441 agcgtctcca cgtctctgca ccaggactgc ctgaatggca aggaatcaca gtgcaggctc
1501 tccaacaaaag ccttcccagc ccccatcgag aaaaacctct ccaaaagcaa agggcagccc
1561 cgagaacccc aggtgtacac cctgcccaca tcccgggatg agctgaccaa gaaccagctc
1621 agcctgacct gctgtgtcaa aggtctctat cccagcgaca tgcgctgga gtgggagagc
1681 aatggggcag cggagacaaa ctacaagacc acgctccgcg tgcgtgactc cgaagctctc
1741 tcttctctct acagcaagct caccgtggag aagagcaggt ggcagcaggg gaactctctc
1801 tcatgtctcg tcatgcatga ggcctgtgac aacctatata cgcagaagag cctctcctct
1861 tctccgggta aatga

```

【 図 1 1 1 】

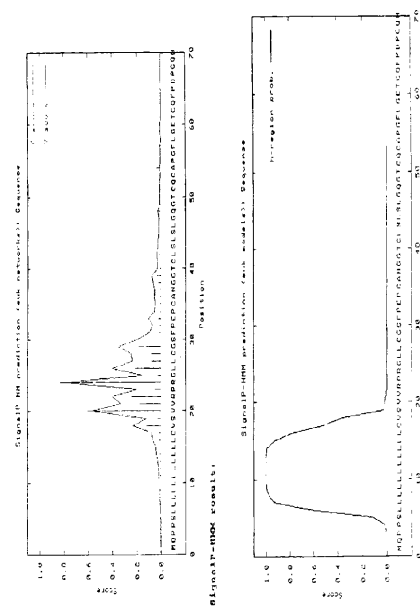
図 111



【 図 1 1 2 】

図 112

ヒトNotch4シグナルペプチド



【 図 1 1 4 】

图 114

Fig. 114

ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 1-29)
ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 9-29)
ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 21-29)

ヒト N4

```
cag aaa ccc gga (SEQ ID NO:106)
gtc ttt ggg cct (SEQ ID NO:107)
  Q   K   P   G   (SEQ ID NO:108)
```

BglII部位の付加

cag aaa ccc gga GAT CT (SEQ ID NO:109)
gtc ttt ggg cct CTA GA (SEQ ID NO:110)
Q K P G (SEQ ID NO:108)

N4 / FC 融合

```
cag aaa ccc gga GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO:111)
gtc ttt ggg cct CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO:112)
  Q   K   P   G   D   L   G   P (SEQ ID NO 113)
```

ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 1-13)

ヒト N4

```
gat atc gat gag (SEQ ID NO:114)
cta tag cta ctc (SEQ ID NO:115)
  D   I   D   E   (SEQ ID NO:116)
```

BamHI部位の付加

gat atc gat gag GAT CC (SEQ ID NO:117)
cta tag cta ctc CTA GG (SEQ ID NO:118)
D I D E (SEQ ID NO:116)

N4 / FC 融合

gat atc gat gag GAT CTG GGC
CCG (SEQ ID NO:119)
cta tag cta ctc CTA GAC CCG
GGC (SEQ ID NO:120)
D I D E D L G P
(SEQ ID NO:121)

【 図 1 1 6 】

图 116

Fig. 115

ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 1-23)
ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 9-23)
ヒトNotch4デコイ (EGF-LR 13-23)

ヒト N4

cac gtg aac cca (SEQ ID NO:122)
gtg cac ttg ggt (SEQ ID NO:123)
H V N P (SEQ ID NO:124)

BglIII部位の付加

cac gtg aac cca GAT CT (SEQ ID NO:125)
gtg cac ttg ggt CTA GA (SEQ ID NO:126)
H V N P (SEQ ID NO:124)

N4 / FC 融合

cac gtg aac cca GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO:127)
gtg cac ttg ggt CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO:128)
H V N P D L G P (SEQ ID NO:129)

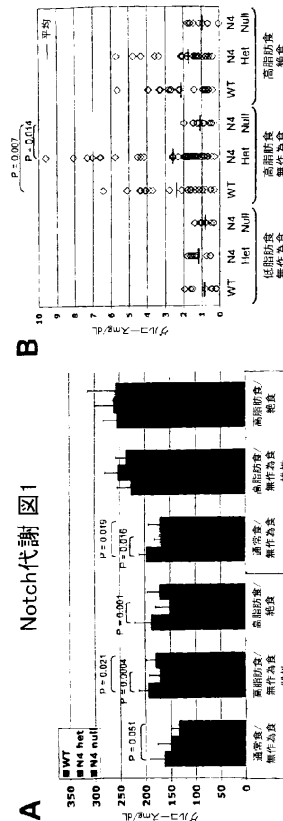
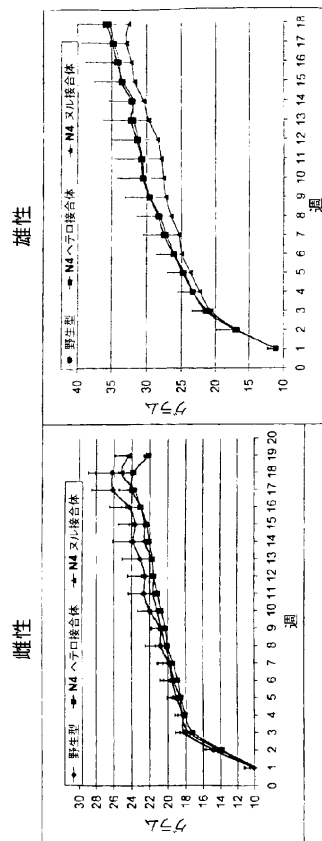


Figure 116

【図 1 1 7】

図 117



Notch4発現の低下は高脂肪食を与えたマウスにおける体重増加を抑制した

【図 1 1 8】

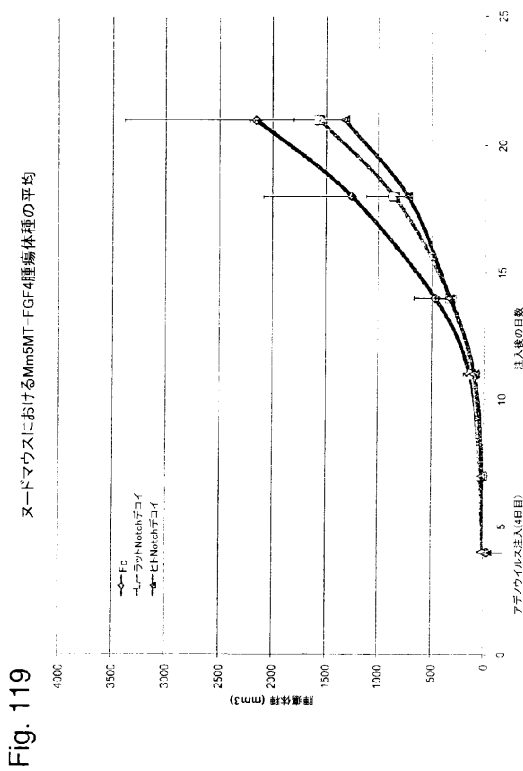
図 118

Fig. 118



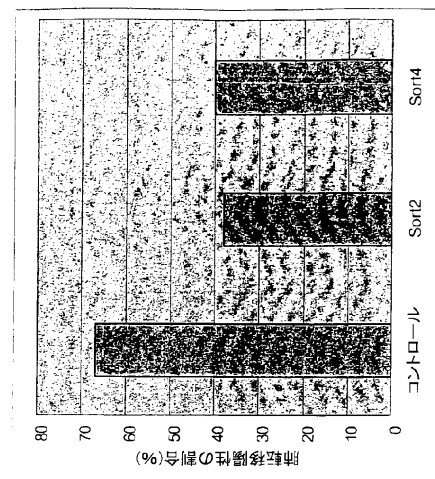
【図 1 1 9】

図 119



【図 1 2 0】

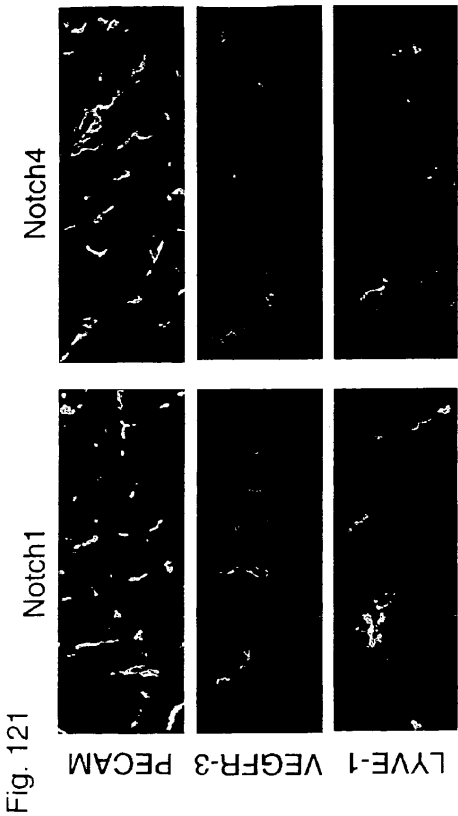
図 120



- コントロール
- — 12の陽性中の8
- ラットNotch1デコイs2: — 13の陽性中の5
- ラットNotch1デコイs4: — 100の陽性中の4

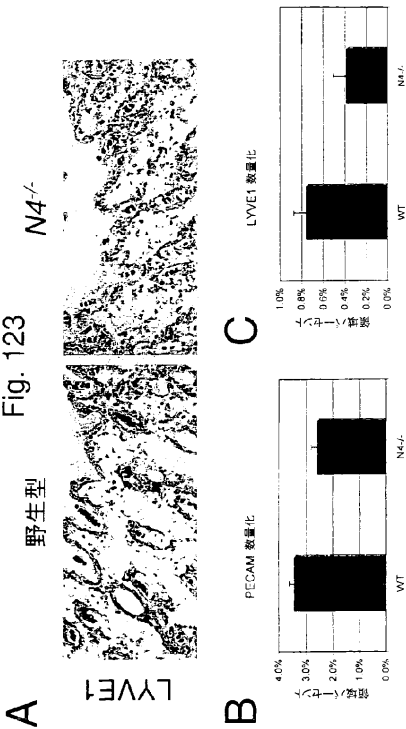
【図 1 2 1】

図 121



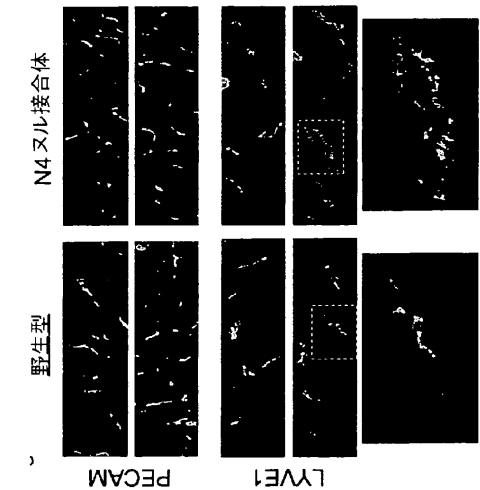
【図 1 2 3】

図 123



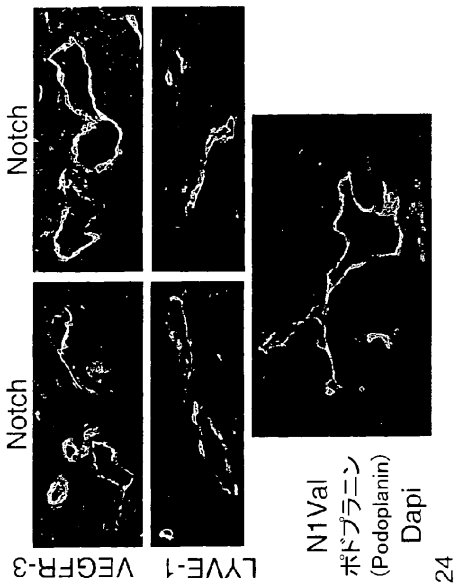
【図 1 2 2】

図 122



【図 1 2 4】

図 124



【配列表】

2010536855000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/10045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/705; C07K 16/46; A61K 39/385 (2009.01) USPC - 530/350, 530/391.1, 424/178.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 14/705; C07K 16/46; A61K 39/385 (2009.01) USPC - 530/350, 530/391.1, 424/178.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 514/12 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ Search terms: notch, notch1, notch\$, PDGF, construct, fusion, HER2/neu, platelet derived growth factor, angiogenesis, administ\$, signal, signaling, label, labeled,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y ----- A	US 2006/0030694 A1 (KITAJEWSKI et al.) 09 February 2006 (09.02.2006) para [0019]; para [0020]; para [0030]; para [0062]; para [0094]; para [0096]; para [0098]; para [0101]; para [0110]; para [0112]; para [0118]; para [0121]; para [0126]; para [0137]; Fig. 2.	1, 2, 6, 7, 11-18, 74, 75, 79, 80, 86, 87-90 ----- 76-78, 81-85, 91-101 ----- 26
Y ----- A	US 2006/0134121 A1 (THURSTON et al.) 22 June 2006 (22.06.2006) para [0018]; para [0023]; para [0053]; para [0054]; para [0063]; para [0073]; para [0107]; para [0110]; para [0118]; SEQ ID NO: 16.	91-94 ----- 26
Y	US 2005/0261477 A1 (CHAMPION et al.) 24 November 2005 (24.11.2005) para [0027]; para [0028]; para [0029]; para [0030]; para [0031]; para [0186]; para [0208]; para [0242]; para [0243]; para [0244]; para [0245]; para [0246]; para [0247]; para [0422]; para [0441]; para [0442]; para [0448]; para [0474]; para [0476]; para [0482]; para [0484].	76-78, 81-85, 99-101
Y	US 2007/0104746 A1 (FUJII et al.) 10 May 2007 (10.05.2007) para [0015]; para [0017]; para [0019]; para [0029].	95-98
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February 2009 (10.02.2009)		Date of mailing of the international search report 20 FEB 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/10045

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I claims 1, 2, 6, 7, 11-18 and 26-47 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto, wherein the Notch receptor protein is Notch1 receptor protein, with the extracellular domain of Notch1 receptor protein comprising 7 separate EGF-like repeats and the fusion protein comprising 22 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 54-75. For Group I the subspecies are the 7 the extracellular domains of Notch1 receptor protein comprising EGF-like repeats and the fusion protein comprising 22 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 54-75 resulting in 154 possible combinations. The first named invention of the first group is the Notch1 receptor protein with EGF-like repeats 1-38 and SEQ ID: NO: 54 and will be searched without an additional search fee.

(continued on extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 6, 7, 11-18, 26, 74-101 restricted to SEQ ID NO: 54.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/10045

continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

Group II claims 1, 3, 8, and 11 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch2 receptor protein. If so elected, a search of this group would be restricted to all instances of the Notch2 receptor protein.

Group III claims 1, 4, 9 and 11 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch3 receptor protein. If so elected, a search of this group would be restricted to all instances of the Notch3 receptor protein.

Group IV claims 1, 5, 10, 11, 19-25, and 48-73 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch4 receptor protein with the extracellular domain of Notch4 receptor protein comprising 7 separate EGF-like repeats and the fusion protein comprising 26 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 78-103. For Group IV, the subspecies are the 7 the extracellular domains of Notch4 receptor protein comprising EGF-like repeats and the fusion protein comprising 26 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 78-103 resulting in 182 possible combinations. If so elected, the first named invention of the fourth group that would be searched upon payment of additional fees would be the Notch4 receptor protein with EGF-like repeats 1-36 and SEQ ID: NO:54.

Claims 74-101 are generic with respect to any one invention above.

The special technical feature linking Groups I-IV is a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein, and an Fc portion of an antibody bound thereto.

However, Jan et al. (US 2006/0030694) teaches or makes obvious the fusion protein. Thus, the species do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 35/04	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100091351
弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(72)発明者 キタジュースキー、ジャン
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 0 7 4 5 0、リッジウッド、ヒルクレスト・ロード 3 2 3

(72)発明者 ショーバー、キャリー
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 0 7 6 7 6、タウンシップ・オブ・ワシントン、ビーチ・ストリート 4 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 BA80 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11
4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA02 BA41 CA53 MA02 NA14 ZA331
ZA361 ZA401 ZA451 ZA701 ZB261 ZC351 ZC412 ZC422
4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74