

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4215827号  
(P4215827)

(45) 発行日 平成21年1月28日(2009.1.28)

(24) 登録日 平成20年11月14日(2008.11.14)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/705 (2006.01)

C O 7 K 14/705 Z N A

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C O 7 K 14/28 (2006.01)

C O 7 K 14/28

請求項の数 2 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願平10-536676  
 (86) (22) 出願日 平成10年2月18日(1998.2.18)  
 (65) 公表番号 特表2001-518077(P2001-518077A)  
 (43) 公表日 平成13年10月9日(2001.10.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/002257  
 (87) 国際公開番号 W01998/037096  
 (87) 国際公開日 平成10年8月27日(1998.8.27)  
 審査請求日 平成17年2月16日(2005.2.16)  
 (31) 優先権主張番号 08/803,364  
 (32) 優先日 平成9年2月20日(1997.2.20)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 09/024,198  
 (32) 優先日 平成10年2月17日(1998.2.17)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ユニバーシティ オブ メリーランド、ボ  
 ルチモア  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2120  
 1, ボルチモア, ウェスト ランバー  
 ド ストリート 520

(74) 代理人

弁理士 山本 秀策

(72) 発明者

ファサノ, アレシオ  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2104  
 2, エリコット シティ, チャービル  
 コート 3504

審査官 石丸 聡

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 閉鎖毒素レセプター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

精製されたVibrio cholera閉鎖毒素レセプターであって、該レセプターは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される見かけの分子量66kDaを有し、ここで該レセプターはそのN末端アミノ酸配列に、配列番号10の1~16位の配列を含み、ここで該Vibrio cholera閉鎖毒素レセプターは、細胞間密着結合の構造を調節することによって上皮の透過性の可逆的な増加を調節する、レセプター。

【請求項2】

以下の工程を含む、Vibrio cholera閉鎖毒素(ZOT)レセプターに結合する化合物のスクリーニングのための方法：

(A) 請求項1に記載の精製されたVibrio cholera閉鎖毒素レセプターを捕獲リガンドとして使用して、試験化合物の親和性結合アッセイを行う工程；および

(B) 該試験化合物がZOT生物学的活性を有するか否かを決定するために、該試験化合物に関してアッセイを行う工程であって、ここで該ZOT生物学的活性は、細胞間密着結合の構造を調節することによって、上皮の透過性を可逆的に増加させる能力である工程。

【発明の詳細な説明】

本発明の開発は、University of Maryland, Baltimore, Marylandによって支援された。本明細書に記載される発明は、National Institutes of Health(NIH AI35740; NIH DK 48373; およびNIH AI19716)からの資金に支持された。政府は一定の権利を有する。

発明の分野

本発明は、*Vibrio cholera*の閉鎖帯毒素 (zonula occludens toxin)、およびその使用を含む方法に関する。

#### 発明の背景

##### I. 腸管密着結合の機能および調節

密着結合 (本明細書中以下「tj」) または閉鎖帯 (本明細書中以下「ZO」) は、吸収および分泌上皮の顕著な特徴の1つである (Madara, *J. Clin. Invest.*, 83:1089-1094 (1989)); および Madara, *Textbook of Secretory Diarrhea*, Lebenthalら編, 第11章, 125-138頁 (1990))。先端区画と基底外側区画との間の障壁として、これらは、傍細胞経路によるイオンおよび水溶性溶質の受動拡散を選択的に調節する (Gumbiner, *Am. J. Physiol.*, 253 (Cell Physiol. 22):C749-C758 (1987))。この障壁は、経細胞経路に関連する経路の活性によって生じる任意の勾配を維持する (Diamond, *Physiologist*, 20:10-18 (1977))。

10

腸細胞形質膜の抵抗性は比較的高いので、経上皮 (transepithelial) コンダクタンスの変動は、通常、傍細胞経路の透過性の変化に起因し得る (Madara, 前出)。ZOは、この傍細胞経路における主要な障壁を表し、そして上皮組織の電気抵抗は、フリーズフラクチャー電子顕微鏡検査によって観察されるように、膜貫通タンパク質鎖の数、およびZOにおけるその複雑性に依存するようである (Madaraら, *J. Cell Biol.*, 101:2124-2133 (1985))。

一旦静的構造とみなされると、ZOは、実際には動的でありそして種々の発達状況 (Magnusonら, *Dev. Biol.*, 67:214-224 (1978); Revelら, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 40:443-455 (1976); および Schneebergerら, *J. Cell Sci.*, 32:307-324 (1978))、生理学的状況 (Gilulaら, *Dev. Biol.*, 50:142-168 (1976); Madaraら, *J. Membr. Biol.*, 100:149-164 (1987); Mazariegosら, *J. Cell Biol.*, 98:1865-1877 (1984); および Sardetら, *J. Cell Biol.*, 80:96-117 (1979))、および病理学的状況 (Milksら, *J. Cell Biol.*, 103:2729-2738 (1986); Nashら, *Leb. Invest.*, 59:531-537 (1988); および Shasbyら, *Am. J. Physiol.*, 255 (Cell Physiol., 24):C781-C788 (1988)) に容易に適応されるという豊富な証拠がある。この適応の基礎にある調節メカニズムは、まだ完全には理解されていない。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ の存在下で、ZOのアセンブリが、ZOエレメントの組織化されたネットワークの形成および調節を最終的に導く生化学的事象の複雑なカスケードを引き起こす細胞相互作用の結果であることは明らかであり、その組成物は、部分的にしか特徴づけられていない (Diamond, *Physiologist*, 20:10-18 (1977))。膜貫通タンパク質鎖の候補オクルディンが、最近、同定されている (Furuseら, *J. Membr. Biol.*, 87:141-150 (1985))。

20

30

6つのタンパク質が、膜接触の基礎をなす細胞質垂膜性プラークで同定されているが、その機能は確立されるべきままである (Diamond, 前出)。ZO-1およびZO-2は、特徴づけられていない130kDタンパク質 (ZO-3) との界面活性剤安定性複合体中でのヘテロダイマー (Gumbinerら, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:3460-3464 (1991)) として存在する。ほとんどの免疫電子顕微鏡研究によれば、ZO-1は、膜接触の正確に真下に局在した (Stevensonら, *Molec. Cell Biochem.*, 83:129-145 (1988))。他の2つのタンパク質である、チングリン (Citiら, *Nature (London)*, 333:272-275 (1988)) および7H6抗原 (Zhongら, *J. Cell Biol.*, 120:477-483 (1993)) は、膜からさらに局在化されており、そしていまだにクローニングされていない。低分子量GTP結合タンパク質Rab 13はまた、最近、結合領域に局在化されている (Zahraouiら, *J. Cell Biol.*, 124:101-115 (1994))。他の低分子量GTP結合タンパク質は、皮質細胞骨格を調節することが公知である。すなわち、rhoは、局所接触 (focal contact) でアクチン-膜付着を調節し (Ridleyら, *Cell*, 70:389-399 (1992))、そしてracは、増殖因子誘導性膜波打ち (ruffling) を調節する (Ridleyら, *Cell*, 70:401-410 (1992))。よりよく特徴づけられている細胞結合、局所接触 (focal contact) (Guanら, *Nature*, 358:690-692 (1992))、および接着結合 (Tsukitaら, *J. Cell Biol.*, 123:1049-1053 (1993)) におけるプラークタンパク質の公知の機能との類似に基づいて、tj結合プラークタンパク質は、細胞膜を横切って両方向でシ

40

50

グナルを伝達すること、および皮質アクチン細胞骨格への連結を調節することに関与すると仮定されている。

上皮が受ける多くの多様な生理学および病理学的攻撃に応じるために、ZOは、複雑な調節システムの存在を必要とする、迅速かつ同調した応答ができなければならない。ZOのアセンブリおよび調節に関与するメカニズムの正確な特徴づけは、現在活発な研究領域である。

現在、tjの構造的および機能的結合が、アクチン細胞骨格と吸収細胞のtj複合体との間に存在するという証拠の一群がある (Gumbinerら, 前出; Madaraら, 前出; およびDrenthら, *J. Cell Biol.*, 107:1037-1048 (1988))。アクチン細胞骨格は、その正確な構造がアクチン結合タンパク質の大きな骨組み (cadre) によって調節されるミクロフィラメントの複雑な網目構造から構成される。どのようにアクチン結合タンパク質のリン酸化の状態が、細胞形質膜に連結する細胞骨格を調節し得るかの1例は、ミリスチル化アラニンリッチCキナーゼ基質 (本明細書中以下「MARCKS」) である。MARCKSは、形質膜の細胞質面と会合する特異的プロテインキナーゼC (本明細書中以下「PKC」) 基質である (Adem, Elsevier Sci. Pub. (UK), 438-443頁 (1992))。その非リン酸化形態では、MARCKSは、膜アクチンに架橋する。したがって、MARCKSを介して膜に会合するアクチン網目構造は、比較的堅固であるようである (Hartwigら, *Nature*, 356:618-622 (1992))。活性化されたPKCは、MARCKSをリン酸化し、これは膜から放出される (Rosenら, *J. Exp. Med.*, 172:1211-1215 (1990); およびThelenら, *Nature*, 351:320-322 (1991))。MARCKSに連結したアクチンは、膜とは空間的に分離され、そしてより可塑性であるようである。MARCKSが脱リン酸化される場合、これは膜に戻り、そして膜で再度アクチンを架橋する (Hartwigら, 前出; およびThelenら, 前出)。これらのデータは、F-アクチンネットワークが、アクチン結合タンパク質 (MARCKSはそれらの1つである) を含むPKC依存性リン酸化プロセスによって再配置され得ることを示唆する。

種々の細胞内メディエーターは、tjの機能および/または構造を変えることが示されている。両生類胆嚢の密着結合 (Duffeyら, *Nature*, 204:451-452 (1981))、ならびに金魚 (Bakkerら, *Am. J. Physiol.*, 246:G213-G217 (1984)) およびヒラメ (Krasneyら, *Fed. Proc.*, 42:1100 (1983)) の両方の腸の密着結合は、細胞内cAMPが上昇するにつれて受動的イオン流に対する増強された抵抗性を示す。また、Ca<sup>2+</sup>イオノホアへの両生類胆嚢の曝露は、tj抵抗性を増強するようであり、そしてtj構造の変化を誘導する (Palantら, *Am. J. Physiol.*, 245:C203-C212 (1983))。さらに、ホルボールエステルによるPKCの活性化は、腎臓 (Ellisら, *C. Am. J. Physiol.*, 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32):F293-F300 (1992))、および腸 (Stensonら, *C. Am. J. Physiol.*, 265 (Gastrointest. Liver Physiol., 28):G955-G962 (1993)) 上皮細胞株の両方で傍細胞透過性を増加させる。

## II. 閉鎖帯毒素

コレラ毒素 (CT) をコードするctxA遺伝子を欠失することによって構築されるほとんどの *Vibrio cholerae* ワクチン候補物は、高い抗体応答を誘起し得るが、半分より多くのワクチンはまだ軽度の下痢を生じる (Levineら, *Infect. Immun.*, 56 (1):161-167 (1988))。CTの非存在下で誘導される下痢の大きさを考慮して、*V. cholerae* が他の腸毒素産生性因子を産生し、これがctxA配列を欠失した株にまだ存在すると仮定した (Levineら, 前出)。結果として、*V. cholerae* によって合成されそして残りの下痢の原因である、第2の毒素である閉鎖帯毒素 (本明細書中以下「ZOT」) が発見された (Fasanoら, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 8:5242-5246 (1991))。zot遺伝子は、ctx遺伝子に直に隣接して位置する。*V. cholerae* 株の中でのctx遺伝子とzot遺伝子との高い同時発生パーセント (Johnsonら, *J. Clin. Microb.*, 31/3:732-733 (1993); およびKarasawaら, *FEBS Microbiology Letters*, 106:143-146 (1993)) は、コレラにはよくある急性脱水性下痢の原因におけるZOTの可能な相乗的役割を示唆する。最近、zot遺伝子はまた、他の腸病原体で同定されている (Tschape, 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salmonellosis, 47 (要約) (1994))。

ウサギ回腸粘膜で試験される場合、ZOTは、細胞間tjの構造を調節することによって腸透過性を増加させることが、これまでに見い出されている(Fasanoら, 前出)。傍細胞経路の改変の結果として、腸粘膜がより透過性になることが見い出されている。ZOTは、Na<sup>+</sup>-グルコース共役能動輸送に影響を与えず、細胞傷害性ではなく、そして経上皮抵抗性を完全に破壊しないことも見い出された(Fasanoら, 前出)。

より最近では、腸薬物送達のための経口投薬組成物で用いられる場合、ZOTが腸粘膜でtjを可逆的に開口し得、したがって治療剤と同時投与される場合には、ZOTが治療剤の腸送達をもたらし得ることが見い出されている(WO 96/37196; 1995年5月24日に出版された米国特許出願第08/443,864号(現在許可); および1996年2月9日に出版された米国特許出願第08/598,852号(現在、米国特許第5,665,389号); これらのそれぞれは、その全体が参考として本明細書中に援用される)。ZOTが鼻粘膜において可逆的にtjを開口し得、したがって治療剤と同時投与される場合には、ZOTが治療剤の鼻吸収を増強し得ることが見い出されている(1997年1月9日に出版された米国特許出願第08/781,057号; これは、その全体が参考として本明細書中に援用される)。

本発明において、心臓、腸、および脳組織、ならびにCaCo2細胞由来のZOTレセプターを同定し、そして単離した。ZOTレセプターは、上皮の透過性の調節に関与する経路の最初の段階を示す。

#### 発明の要旨

本発明の目的は、心臓、腸、および脳組織、ならびにCaCo2細胞由来のZOTレセプターを同定することである。

本発明の別の目的は、ZOT類似体(アンタゴニストまたはアゴニスト)をスクリーニングする方法においてZOTレセプターを使用することである。

本発明のさらに別の目的は、前述の方法により入手可能なZOT類似体を提供することである。

本発明のこれらおよび他の目的は、本明細書中以下に提供される本発明の詳細な説明から明らかであり、Vibrio cholera ZOTレセプターによって1つの実施態様において満たされおり、ここで上記レセプターはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約45kDaを有し、そして配列番号1、配列番号2、および配列番号3からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有するか、または上記レセプターがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約66kDa、および配列番号10のN末端アミノ酸を有する。

さらに別の実施態様では、本発明の上記の目的は、以下の工程を包含する、Vibrio cholera ZOTのアンタゴニストのスクリーニングのための方法により満たされている:

(A) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約45kDaを有し、そして配列番号1、配列番号2、および配列番号3からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有する、実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕獲リガンドとして使用するか、またはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約66kDaを有し、そして配列番号10のN末端アミノ酸を有する、実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕獲リガンドとして使用し、試験化合物の親和性結合アッセイを行う工程;

(B) 上記試験化合物がZOT生物学的活性を有するか否かを決定するために、上記試験化合物のアッセイを行う工程。

ここで上記試験化合物は上記Vibrio cholera ZOTレセプターに特異的に結合し、しかしZOT生物学活性を有さない場合、上記試験化合物はVibrio cholera ZOTのアンタゴニストである。

さらに別の実施態様では、本発明の上記の目的は、以下の工程を包含する、Vibrio cholera ZOTのアゴニストのスクリーニングのための方法により満たされている:

(A) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約45kDaを有し、そして配列番号1、配列番号2、および配列番号3からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有する、実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕獲リガンドとして使用

10

20

30

40

50

するか、またはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される分子量約66kDaを有し、そして配列番号10のN末端アミノ酸を有する、実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕獲リガンドとして使用し、試験化合物の親和性結合アッセイを行う工程；および

(B) 上記試験化合物がZOT生物学的活性を有するか否かを決定するための、上記試験化合物のアッセイを行う工程。

ここで上記試験化合物が上記Vibrio cholera ZOTレセプターに特異的に結合し、そしてZOT生物学活性を有する場合、上記試験化合物はVibrio cholera ZOTのアゴニストである。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、PKCインヒビターCGP41251、およびその不活性な類似体CGP42700の、ウサギ回腸におけるpZ14上清により誘導された組織抵抗性(Rt)の変化に対する効果を示す。

図2Aおよび2Bは、細胞質(図2A)および膜(図2B)の細分画における、PKC活性に対する経時的なZOTの効果を示す。

図3は、ウサギ回腸における、精製したZOTのRTに対する用量応答曲線を示す。

図4は、ウサギ回腸における、精製したZOT( )、およびMBPコントロール( )と比較した、精製したMBP-ZOT( )のRTに対する効果を示す。

#### 発明の詳細な説明

上述のように、一実施態様において、本発明はVibrio cholera ZOTレセプターに関し、ここで、上記レセプターは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した分子量が約45kDaで配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるN末端アミノ酸配列を有するか、あるいはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した分子量が約66kDaであり、そして配列番号10のN末端アミノ酸配列を有する。

ZOTレセプターは、当該技術分野において周知の方法を用い、ポリクロナルまたはモノクロナルいずれかの抗体の作製に使用され得る(Abrams、Methods Enzymol.、121:107~119(1986))。

あるいは、ZOTレセプターは、アフィニティークロマトグラフィーによるZOTおよびその融合タンパク質の精製に使用され得る。

さらに、ZOTレセプターは、アンタゴニストまたはアゴニストのいずれかであるZOTの類似体のスクリーニングに使用され得る。

このように、別の実施態様において、本発明の上述の目的はVibrio cholera ZOTのアンタゴニストのスクリーニング法により達成され、この方法は、

(A) 実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕捉リガンドとして使用し、試験化合物の親和性結合アッセイを行う工程、および

(B) 上記試験化合物がZOT生物学的活性を有するか否かを調べるため、上記試験化合物についてアッセイを行う工程、

を含む。ここで、上記試験化合物が、上記Vibrio cholera ZOTレセプターに特異的に結合するがZOT生物学的活性を持たない場合、上記試験化合物はVibrio cholera ZOTのアンタゴニストである。

別の実施態様において、本発明の上述の目的はVibrio cholera ZOTのアゴニストのスクリーニング法により達成され、この方法は、

(A) 実質的に純粋なVibrio cholera ZOTレセプターを捕捉リガンドとして使用し、試験化合物の親和性結合アッセイを行う工程、および

(B) 上記試験化合物がZOT生物学的活性を有するか否かを決定するため、上記試験化合物についてアッセイを行う工程、

を含む。ここで、上記試験化合物が、上記Vibrio cholera ZOTレセプターに特異的に結合し、そしてZOT生物学的活性を有する場合、上記試験化合物はVibrio cholera ZOTのアゴニストである。

本明細書中において使用する「ZOT生物学的活性」は、細胞間tjの構造を変えることで上皮透過性を可逆的に増加させる能力を意味する。

ZOT生物学的活性を測定するためのアッセイは、本発明の本質を構成するものではない。

10

20

30

40

50

例えば、このアッセイは、(1) Fasanoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、8、5242～5246(1991)に記載のようなUssingチャンバに載置した回腸の組織抵抗(Rt)の低下をアッセイする工程；(2) 下記実施例3に記載のようなUssingチャンバ中の腸上皮細胞単層の組織抵抗(Rt)の低下をアッセイする工程；または(3) 国際公開第W096/37196；1995年5月24日出願の米国特許出願番号第08/443,864号(現在、特許許可)、1996年2月9日出願の米国特許出願番号第08/598,852号(現在、米国特許第5,665,389号)、および1997年1月9日出願の米国特許出願番号第08/781,057号に記載のような腸または鼻での治療薬の吸収の増強をアッセイする工程を含み得る。

従って、本発明は上述の方法により得られるVibrio cholera閉鎖帯毒素のアンタゴニストにも関連する。

10

ZOTのアンタゴニストは、腸透過性の亢進の兆候がみられる胃腸の状態、例えば、炎症性腹部疾患、タンパク質減少性(loosing)腸疾患、食物アレルギーおよび小児脂肪便症を治療するための抗炎症薬として使用し得る。

ZOTのアゴニストは、可逆的および再生産的にtjを速やかに開裂し、これにより、ZOTを腸または鼻での吸収増強因子として使用する場合と同様に、治療薬の腸または鼻での吸収増強因子として使用され得、これらは、国際公開第W096/37196；1995年5月24日出願の米国特許出願番号第08/443,864号(現在、特許許可)、1996年2月9日出願の米国特許出願番号第08/598,852号(現在、米国特許第5,665,389号)、および1997年1月9日出願の米国特許出願番号第08/781,057号に記載に記載されている。

20

このように、本発明は上述の方法により得られ得るVibrio cholera閉鎖帯毒素のアゴニストにも関連する。

以下の実施例は、単に例示する目的で示したのであって、本発明の範囲を限定するためものではない。

#### 実施例 1

##### 腸細胞細胞骨格に対するZOTの効果

小腸(Madaraら、J. Cell Biol.、97:125～136(1983))および腎細胞(Mezaら、J. Cell Biol.、87:746～754(1980))において、細胞骨格配列における病理生理学的変化は、閉塞tj抵抗、電荷選択性および構造の主要な変化を起こし得る。これらの特異的摂動により誘発される応答は、閉塞tj構造の拡大、および傍細胞カチオン選択性の変化からなる。これらのデータは、傍細胞経路が、ZOを調節する細胞表面構造の表現型の変化を生み出す細胞内事象により調節され得ることを示唆する。しかし、このようなtjの改変を起こす細胞内事象のカスケードは、まだほとんどとわかっていない。

30

##### A. 細胞骨格配置に対するZOTの効果

ZOTが、細胞骨格再配置に対する効果を有するか否かを評価するため、プラスミドpZ14で形質転換したV.cholerae CVD110株の培養後に得られたM<sub>r</sub>>10,000上清画分(本明細書中において「pZ14上清」と称する)を、IEC細胞の組織培養において試験した。

CVD110は、V.cholerae(EI Tor生物型)株であり、既知の毒素遺伝子(ctxA、ZOTおよびace遺伝子)をすべて欠失させている(Michalskiら、Infect. Immun.、61:4462～4468(1993))。

40

プラスミドpZ14は、誘導性tacプロモーターにより転写されるZOT遺伝子を含む。プラスミドpZ14は、pBB241をHindIIIで切断することにより構築した。pBB241は、全ZOT配列を含むClaI-XbaIフラグメントをプラスミドpUC19(Baudryら、Infect. Immun.、60:428～434(1992))でクローニングすることにより得た。5'突出末端にクレノウフラグメントを連結し、そして線状プラスミドをXbaIで切断し、1.5 kbのZOTフラグメントを作製した。このフラグメントを、ベクターpTTQ181(Amersham, Arlington Heights, IL)でクローニングした。ベクターpTTQ181は、Maniatisら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor(1989)に記載のpH

50

SG 2 7 4に見出されるKan<sup>R</sup>カセットによるAmp<sup>R</sup>遺伝子の割り込みにより改変されたものである。すなわち、pTTQ 1 8 1は、EcoRIで切断して遺伝子を挿入し、XbaIで切断したものである。1.5 kb XbaI zotフラグメントを、得られたベクターに正方向で連結し、これを「pZ 1 4」と命名した。

IEC 6細胞は、無菌ラット小腸の陰窩細胞に由来し(Quaroniら、Methods in Cell Biology, 第20章、2 1 B: 4 0 3 ~ 4 2 6 ( 1 9 8 0 ) )、そして細胞培養フラスコ(Falcon)中の完全培地で3 7 °C、9 5 %O<sub>2</sub>/5 %CO<sub>2</sub>雰囲気下で増殖させた。完全培地は、4.5 g/Lグルコースを加えたダルベッコ改変イーグル培地からなり、5.0 % (v/v) ウシ胎仔血清(放射線処理済み)、10 µg/mLのインスリン、4.0 mMのL-グルタミン、50 U/mLのペニシリンおよび50 µg/mLのストレプトマイシンを含むものとした。継代回数は1 5 と2 0 との間とした。

M<sub>r</sub> > 1 0 , 0 0 0 上清画分を、以下のように調製した。pZ 1 4で形質転換したCVD 1 1 0を3 7 °Cで一晩、50 µg/mLのカナマイシンを含有するLuria Bertani(以下、「LB」と称する)ブロス中で培養し、pZ 1 4プラスミドを含有するカナマイシン耐性株を選別した。次いで、培養液を希釈し、初期OD<sub>600</sub> 0.4 ~ 0.5を得た。次に、tacプロモーターからのZOTの発現を誘導するため、2.0 mMのイソプロピル-チオ-D-ガラクトピラノシド(IPTG)(5' - 3' Incorporation, Boulder, CO)を培養液に加え、これを3 7 °Cでさらに2時間インキュベートした。次に、培養培地を回収し、冷却、5,000 × gで10分間、4 °Cで遠心した。得られた液体を回収し、0.45 µmフィルター(Millipore)に通した。次いで、得られた培養液の上清を、10 kDaの分子カットオフサイズを有するCentriconフィルター(Vanguard International Corp., NJ)で限外濾過した。M<sub>r</sub> > 10 kDa画分をリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)(以下、「PBS」と称する)で2回洗浄し、PBSを加えてもとの体積とし、下記の細胞骨格再配置に対する活性を試験した。

#### 1. 蛍光顕微鏡分析

2.0 × 10<sup>4</sup> IEC 6細胞/mLを、直径13 mmのカバーガラスに接種し、そして30 µLのpZ 1 4上清(1:33希釈)またはネガティブコントロールとして30 µLのPBSに24時間3 7 °Cで曝露した。次に、細胞を3.7 % (v/v)ホルムアルデヒド含有PBS(pH 7.4)中で、10分間室温で固定した。同緩衝液で洗浄後、細胞に、0.5 % (v/v) Triton X-100(Sigma)含有PBS(pH 7.4)を10分間室温で透過させた。次いで、得られた固定化細胞を、5.0 µg/mLのフルオレセイン-ファロイジン(Sigma)とともに3 7 °Cで30分間インキュベートした。最後に、細胞をPBSで洗浄し、カバーガラスを1:1グリセロール-PBS(pH 8.0)でマウントし、各条件の細胞200個について、Nikon Optiphot蛍光顕微鏡による分析を3連で、盲検方式で行い、細胞のFアクチン細胞骨格網目構造(ストレスファイバーと呼ばれる)を可視化した。

PBSネガティブコントロールでインキュベートした細胞内では、ストレスファイバーの正常な分布が観察された。しかし、IEC 6細胞をpZ 1 4上清でインキュベートした場合には、細胞骨格の完全な再配置が観察され(24時間インキュベーション時にピークに達した)、ストレスファイバーは細胞辺縁部に再分布していた。

pZ 1 4倍溶液上清への曝露の48時間後に、Fアクチン構造は24時間曝露の場合から変化していないままであった。ネガティブコントロールでのFアクチン構造は、48時間にわたる試験期間中、変化はなかった。

#### 2. 走査型電子顕微鏡分析

平行実験において、pZ 1 4上清またはPBSネガティブコントロールとともにインキュベートしたIEC 6細胞を、走査型電子顕微鏡検査により分析した。

より具体的には、IEC 6細胞を、5.0 × 10<sup>9</sup>細胞/ウェルで、24ウェルプレートのウェルに挿入した直径13 mmのカバーガラスに接種した。30 µLのpZ 1 4上清または30 µLのPBSネガティブコントロールに24時間3 7 °Cで曝露させた後、細胞を、2.5 % (v/v) グルタルアルデヒド含有0.1 Mカコジル酸塩緩衝液(pH 7.4)により、20分間室温で固定した。1.0 % (w/v) OsO<sub>4</sub>で30分間後固定した後、細胞を高品質(graded)エタノールで脱水し、CO<sub>2</sub>雰囲気下で、臨界点乾燥し、スパッタリングにより金被覆

10

20

30

40

50

した。試料を、Cambridge走査型電子顕微鏡により検査した。  
PBSネガティブコントロールの場合と比較すると、ZOT曝露細胞の表面には変化が見られた。  
すなわち、ZOTは、中央部分は保存され、主に細胞辺縁部の微絨毛の減退を誘導した。  
これらの表面変化は、上述の蛍光顕微鏡分析で観察されたZOT誘導性Fアクチン再分布と一致する。

### 3. ウサギ回腸研究

次に、細胞骨格再組織化における実験を、Fasanoら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、8:5242~5246 (1991) に記載のように、Ussingチャンバに載置したウサギ回腸を用いて行った。

より具体的には、2~3 kgの成体雄ニュージーランド白ウサギを頸椎脱臼法により屠殺した。回腸20 cmを切除し、リンスして腸内の内容物を空にし、腸間膜の境界線に沿って切開し、そして筋肉および漿膜層を除去した。このようにして準備した8枚の粘膜を、ルーサイトUssingチャンバ(開口部1.12cm<sup>2</sup>)に載置し、電圧制御装置(EVC 4000 WPI、Saratosa, FL)に接続し、そして53mM NaCl、5.0mM KCl、30.5mM マンニトール、1.69mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.25mM CaCl<sub>2</sub>、1.1mM MgCl<sub>2</sub>および25mM NaHCO<sub>3</sub>を含む新鮮に調製したリンゲル溶液に浸漬した。浸漬溶液を、恒温循環ポンプに接続した水ジャケットタンク(water-jacketed reservoir)で37℃に維持し、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>に曝気した。

300 μLのpZ14上清を粘膜面に加えた。300 μLのpZ14上清をまた漿膜面に加え、浸透圧のバランスを維持した。電位差(PD)を10分毎に測定し、ショート電流(I<sub>sc</sub>)および組織抵抗(R<sub>t</sub>)を上述のFasanoらに記載のように算出した。組織変動性のため、データを、R<sub>t</sub>(X時間でのR<sub>t</sub>) - (0時間でのR<sub>t</sub>)として計算した。各実験の最後に、0.5 mMグルコースを各チャンバの粘膜面に加えた。グルコース(組織変動性を示す)に応答してI<sub>sc</sub>が増加した組織のみについて分析を行った。

一旦、インキュベーションの60分後にZOTのR<sub>t</sub>に対する最大効果が得られると、pZ14上清またはPBSネガティブコントロールに曝露された組織を固定し、上述のように、フルオレセイン-ファロイジンでF-アクチンを染色した。

コントロールウサギ回腸を、刷子縁の均一な蛍光染色、および隣接する腸細胞の間のアクチンマイクロフィラメントの円柱的な分布により特徴付けた。pZ14上清に曝露させたウサギ回腸は、刷子縁は不均一に染色され、下層の細胞質内でのF-アクチンの再分布が部分的に観察された。これらの変化は、分化の程度の低い陰窩細胞と比べ、絨毛先端の成熟細胞においてより顕著であった。

### 4. アクチンプールの評価

アクチンは、細胞骨格網目構造の主要成分の1つであり、可溶性単量体G-アクチンプールとフィラメント状F-アクチンプールとの間のシフトは、アクチン組織の変化を示す(Drenchahnら、J. Cell Biol., 107:1037~1048)。したがって、G-アクチンプールおよびF-アクチンプールにおけるZOTの効果を評価した。

より具体的には、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手したATCC番号209CCLのウシ肺動脈内皮細胞(Goldblumら、J. Cell Physiol., 157, 197~205 (1993))を、50U/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンの存在下、20% (v/v) 熱不活性化(56℃で30分)ウシ胎仔血清(HyClone Laboratories, Logan UT)、4.0mM L-グルタミン、非必須アミノ酸およびビタミンを含むダルベッコ改変イーグル培地中で、37℃で、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で増殖させた。単一形態により、および市販の<sup>3</sup>H-ベンジル-Phe-Ala-Pro基質(Ventrex Laboratories, Inc., Portland, ME)を用いたアンギオテンシン変換酵素活性の定量測定により、培養物が内皮であることを確認した。3~7回継代した細胞のみ使用した。

内皮F-アクチンについて、上述のGoldblumら(前出)に記載のような蛍光分析を行った。より具体的には、50U/mLのペニシリンおよび50 μg/mLのストレプトマイシンの存在下、20% (v/v) 熱不活性化(56℃で30分)ウシ胎仔血清(HyClone Laboratories, Logan UT)、4.0mM L-グルタミン、非必須アミノ酸およびビタミンを含む、ダルベッコ改変イーグル培地2.0mLで増殖させた5.8 × 10<sup>5</sup>の内皮細胞を、6ウェルプレートのウェルに播種し、9

10

20

30

40

50



5%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、72時間、37℃で培養した。単層を、30μLのpZ14上清(1:33に希釈)に24時間曝露した後、75mM KCl、3.0mM MgSO<sub>4</sub>、1.0mMエチレンジアミン四酢酸(EGTA)、10mMイミダゾール、0.2mMジチオトレイトール(DTT)、10μg/mLアプロチニン、および0.1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)を含む緩衝液で2回洗浄し、3.7%(v/v)ホルムアルデヒドで15分間固定した。次に、単層を、0.2%(v/v) Triton X-100含有の上記緩衝液で5分間、室温にて透過させ、 $1.65 \times 10^{-7}$  MNBD-ファリシジン(Sigma)で20分間染色し、そして氷冷メタノールで一晩-20℃で抽出した。染色および抽出は暗所で行った。抽出物をキュベットに捕集し、そして内皮内の蛍光をPerkin-Elmer LS30発光分光分析器により、室温で励起波長465nm(10nmスリット)、蛍光波長535nm(10nmスリット)で測定し、全内皮細胞タンパク質1mg当たりの任意の蛍光単位で表した。

10

NBD-ファリシジンを固定透過内皮単層に適用した結果、蛍光分析した場合、プローブは細胞に78.8%透過し、一回のメタノール処理で99.8%の細胞内プローブが抽出された。アクチン再組織化は、可溶性単量体G-アクチンプールおよびフィラメント状F-アクチンプールにおける可逆的な変化に関与し得るが、全アクチンプールは変化しない。G-アクチンプールおよびF-アクチンプールを測定する上述の方法は、固定、透過、および抽出の手順を含み、同じウシ肺動脈内皮単層のタンパク質の分析は含まない。したがって、G-アクチンおよびF-アクチン測定値の標準化の目的で、全タンパク質の決定のためにさらなる細胞を同時にプレートし、F-アクチンプールおよびG-アクチンプールについてアッセイした単層と同じ条件下で培養した。

より具体的には、6ウェルプレートのウェルに入れたコンフルエント後期のウシ肺動脈内皮単層を、PBS(pH7.4)で2回洗浄し、ゆっくりと攪拌しながら0.5mg/mLのトリプシンに1~2分間曝露することでプレートからゆっくりと剥離し、速やかに上述のPBS含有ダルベッコ培地で中和した。細胞を600×gで10分間4℃で遠心分離し、再度PBS(pH7.4)で2回洗浄し、3.0%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1.0mM DTT、10mM PMSF、1.0mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)および50mM Tris-HCl(pH8.0)を含むライセート緩衝液で溶解した。次に、ライセートを、標準Bio-Rad DC Proteon Assay(Bio-Rad Chemical、Richmond、CA)を用い、タンパク質濃度についてアッセイした。

20

内皮G-アクチンを、上述のGoldblumらに記載のように、DNaseI阻害アッセイを用いて測定した。より具体的には、ウシ脾臓DNaseI(Sigma)を、0.125M Tris-HCl(pH7.5)、5.0mM MgCl<sub>2</sub>、2.0mM CaCl<sub>2</sub>、1.0mM NaN<sub>3</sub>、および0.1mM PMSFに、濃度10mg/mLで、安定性が増加するように溶解した。次に、ストック溶液を、20mMイミダゾール(pH7.5)、30mM NaCl<sub>2</sub>および15%(v/v)クリセロールで100倍希釈した。酵素溶液を2時間毎に調製し直し、氷上で保持した。ウシ胸腺DNA(タイプ1、Sigma)をDNaseIの基質として使用した。繊維状DNA調製物を微細片に切断し、0.1M Tris-HCl(pH7.5)、4.0mM MgSO<sub>4</sub>、1.8mM CaCl<sub>2</sub>に、濃度80mg DNA/mLで懸濁した。DNAをゆっくりと4℃で48時間攪拌することにより溶液とした後、溶液を、孔径0.45μmおよび0.22μmのフィルターに段階的に通し、4℃で貯蔵した。最終基質の260nmでの吸光度は、1.05と1.15の間で変動した。さらに、DNaseIを、Gilford応答分光測光器(Ciba Corning Diagnostics)のキュベット内のDNA基質と混合し、260nmでのODの直線部の傾きを記録した。20mM Tris-HCl(pH7.5)、1.0M酢酸ナトリウム、1.0mM CaCl<sub>3</sub>、1.0mMアデノシン三リン酸(ATP)、0.75Mグアニジン-HClに溶解した精製ウシ骨格筋アクチン(Sigma)をG-アクチン標品として使用し、アッセイの調整を行った。

30

6ウェルプレートで増殖させたウシ内皮単層を、30μLのpZ14上清に曝露させた。単層を、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まないダルベッコPBSで洗浄し、そして1.0%(v/v) Triton X-100、2.0mM MgCl<sub>3</sub>、2.0mM EGTA、0.2mM ATP、0.5mM DTT、0.1mM PMSFを含有するハンス平衡塩溶液を含むライセート緩衝液0.5mL/ウェルを5分間透過させた。次に、G-アクチン含有上清を、標準的なカーブの直線部に対応する阻害活性(すなわち30~70%阻害)を生じるDNaseI阻害アッセイにおいて試験した。この阻害活性をG-アクチン濃度に換算し、これを全内皮細胞タンパク質1mgにおける発現G-アクチンμgの算出に使用した。

40

30μLのpZ14上清に曝露させた単層を15分間煮沸し、ZOTのRtに対する効果を消失させ、そしてpTTQ181(Amersham、Arlington Heights、IL)で形質転換したV.cholera CVD株(Mich

50

alskiら、上述)由来上清(以下、「pTTQ181上清」と呼ぶ)30  $\mu$ Lをネガティブコントロールとして使用した。

pZ14上清は、pTTQ181上清または煮沸pZ14上清と比較すると、G-アクチンプールにおける有意な減少(-27%)およびF-アクチンプールにおける可逆的な増加(+22%)を誘導した(下記表1参照)。このG-アクチンからF-アクチンへのシフトは、アクチン重合と一致する。この効果は、pZ14上清を15分間煮沸することにより完全に消失した。

表 I

G-アクチン及びF-アクチンアッセイ及び  
PKCインヒビターCGP41251のアクチン重合における効果

株 (N)*	G-アクチン ( $\mu$ g/mg タンパク質)	P 値	F-アクチン (U/mg タンパク質)	P 値
pTTQ181 (20)	106.1 (3.92)***	-	341.34 (5.28)***	-
pZ14 (38)	76.0 (4.16)	0.0001	415.73 (22.03)	0.0036
CGP41251 + pZ14 (30)	108.6 (7.2)	0.7803	335.67 (12.1)	0.673
CGP42700 + pZ14 (30)	84.8 (4.0)	0.0011	446.17 (18.5)	0.0001

\* 実験数

\*\* pTTQ181 ネガティブコントロールとの比較

\*\*\* 標準誤差 (S.E.)

ZOTのF-アクチンにおける効果、およびtj複合体を含むIEC細胞の先端切片でのZO-1タンパク質分布について、対比実験を行った。

より具体的には、カバーガラス上の培養物 1 ml 当たり  $2.0 \times 10^4$  IEC6細胞を、30  $\mu$ L の pZ14 上清とともに 37℃ で 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、3.7% (v/v) ホルムアルデヒド含有 PBS (pH7.4) で 10 分間室温にて固定した。同緩衝液で洗浄後、細胞を、0.5% (v/v) Triton X-100 含有 PBS (pH7.4) を 10 分間室温にて透過させた。次に、細胞を、5.0  $\mu$ g/mL のフルオレセイン-ファロイジンおよび 2.0  $\mu$ g/mL の抗 ZO-1 抗体 7445 (Zymed Laboratory Inc., South San Francisco, CA) の両方とともに、37℃ で 30 分間インキュベートした。最後に、細胞を PBS (pH7.4) で洗浄し、カバーガラスにグリセロール - PBS (1 : 1 希釈) (pH8.0) をマウントし、そして各条件について、Nikon Opti phot 蛍光顕微鏡により、三連で、盲検方式で、200 細胞を分析した。結果を、細胞骨格再構成を示した細胞のパーセントで表示した。

ネガティブコントロールとして、IEC6細胞のF-アクチンフィラメントの複合体網目構造 (フルオレセイン - ファロイジンで染色) を、30  $\mu$ L の pTTQ181 上清で 24 時間インキュベートした。

ZO-1 の両異性体を認識する抗 ZO-1 抗体 7445 でプローブした同細胞内での ZO-1 の免疫蛍光位置は、細胞 - 細胞境界に沿った部分に限り、均一で連続的な ZO-1 の染色を示した。これに対し、pZ14 上清は、中央に位置する細胞質貫通アクチンフィラメントの消失、ならびに細胞 - 細胞界面からの ZO-1 の再分散を誘導した。ZO-1 タンパク質の、tj 複合体からの再分散は、そのチロシンホスホリル化と関連しなかった。

これらすべての結果から、ZOT により誘導されるアクチン重合化は、tj 複合体からの ZO-1 タンパク質の再分散に機械論的に関連していることが示される。したがって、ZO-1 は、ZO T 誘導性アクチン再組織化と tj の開裂とを関連づけるものであり得る。

## 実施例 2

### ZOT の細胞内メディエーター

数個の細胞内メディエーターは、tj 透過性の変化に機構的に関連しており、cAMP、 $Ca^{++}$ 、および PKC を含む (Madara、前出；および Balda ら、J. Membrane Biol., 122:193~202 (1991))。しかし、V. cholerae 395 上清 (CT および ZOT 両方を含む) に予め曝露したウサギ回腸におけるテオフィリン (ホスホジエステラーゼインヒビター) に対する応答が、ネガティブコントロールに曝露した組織において誘導されると同様な Isc でのピーク応答を誘導する観察は、組織透過性における ZOT 誘導変化が cAMP により媒介されないことを示唆する (Fasano ら、前出)。ZOT 含有上清単独、または精製した CT と併用で試験される場合にも同様の結果を得た。これらの結果は、コントロールまたは ZOT 曝露組織における細胞内 cAMP の総量が同程度であることを示唆する。従って、PKC が ZOT 活性を媒介するか否かを決定するために、ウサギ小腸および IEC6 細胞を PKC インヒビターであるスタウロスポリンに曝露した。 (MacLeod ら、Amer. Physiol. Soc., 192:C950-C955 (1992))

#### A. ウサギ小腸

さらに詳細には、筋肉層と漿膜層とを剥離したウサギ回腸をユッシング (Ussing) チャンバーにマウントして、次いで単独または pZ14 上清への曝露 10 分前および曝露期間中に添加した、10nM スタウロスポリンと併用して、300  $\mu$ l (1 : 33 希釈) の pZ14 上清に曝露した。次いで、Rt の変化を 10 分間隔で記録した。

10nM スタウロスポリンが、pZ14 上清により誘発される Rt の減少を完全に予防することを発見した。スタウロスポリンは、強力であるが非選択的な PKC 活性のインヒビターであるので (Meyer ら、Int. J. Cancer, 43:851~856 (1989))、スタウロスポリン誘導体、すなわち、PKC を選択的に抑制する CGP41251 (Meyer ら、前出) を、ZOT 誘導性のアクチン再構成および組織透過性に関して試験した。

とくに詳細には、筋肉層と漿膜層を剥離したウサギ回腸をユッシングチャンバーにマウントして、次いで単独または pZ14 上清への曝露 10 分前または曝露期間中に添加した、10nM CGP41251 と併用して、300  $\mu$ l (1 : 33 希釈) の pZ14 上清に曝露した。

10mM の不活性スタウロスポリン類似体、すなわち CGP42700 (Meyer ら、前出) に、予め 10

分間およびpZ14上清への曝露期間中に曝露したユッシングチャンバーをネガティブコントロールとして使用した。次いで、Rtの変化を10分間隔で記録した。結果を図1に示す。

図1に示すように、10nM CGP41251による前処理は、不活性類似体であるCGP47200と異なり、pZ14上清により誘導されるRt変化を阻止した。同様な方法で組織をpTTQ181上清に曝露した場合には有意な変化は観察されなかった。

ホルボールエステルはPKCアクチベーターである。従って、ホルボールエステル12-テトラデカノイルホスボール-13-アセテート(TPA)を、ZOTがPKCを介して作用することを確認するために試験した。

より詳細には、筋肉層と漿膜層とを剥離したウサギ回腸をユッシングチャンバーにマウントして、単独、またはpZ14上清への曝露10分前または曝露期間中に添加した、 $10^{-8}$  M TPAと併用して、300  $\mu$ l (1:33希釈)のpZ14上清に曝露した。次いで、Rtの変化を10分間隔で記録した。

pTTQ181上清と比較してpZ14上清では有意なRt減少が誘導された ( $-7.33 \pm 2.55$  対  $-2.57 \pm 1.51$  m $\cdot$ cm $^2$ ;  $p < 0.005$ )。同一組織に添加した場合、pZ14上清とTPAとを併用するとRtの減少をもたらした (総Rt変化:  $-7.37 \pm 3.2$  m $\cdot$ cm $^2$ ) が、これはTPA単独の場合と相違しなかった。これらの結果は、ZOTおよびTPAの腸管透過性は非相加的であることを実証し、それら両方ともPKCを介して作用することを示唆する。

#### B. IEC6 細胞

次いで、PKCインヒビターの存在下におけるIEC6細胞のアクチン細胞骨格に対するZOT効果を評価した。

詳細には、30  $\mu$ lのpZ14上清への曝露前または曝露期間中に、 $2.0 \times 10^5$  IEC6細胞を10nM CGP41251または10nM CGP42700で30分間前処理した。37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベーション後、カバーガラス上に培養した $2.0 \times 10^4$  IEC6細胞/mlをPBS (pH7.4) 中、3.7% (容量/容量) ホルムアルデヒドで室温において10分間固定した。同一緩衝液中で洗浄後、細胞をPBS (pH7.4) 中、室温で10分間0.5% TritonX-100 (容量/容量) で透過処理した。次いで、細胞を、5.0  $\mu$ g/ml フルオレセイン-ファロイジンとともに37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。最後に細胞をPBS (pH7.4) で洗浄して、カバーガラスをグリセロール-PBS (1:1希釈) (pH8.0) でマウントして、各条件について200細胞をNikon Optiphot 蛍光顕微鏡を使用して三重盲検様式で分析した。結果を、細胞骨格再構成を表示する細胞の百分率で表現した。

pZ14上清を添加した場合、62%の細胞が細胞骨格の再構成を示したが、PBSに曝露した細胞では27%、およびpTTQ181上清に曝露した細胞では21%が影響を受けたのみであった。10nM CGP41251による前処理は、その不活性類似体CGP42700と異なり、ZOTの細胞骨格効果をブロックした (それぞれ31%対58%の影響を受けた細胞)。

さらに、ZOT誘導によるアクチン重合、すなわち、Gアクチンプールの減少およびFアクチンプールの増加は、ウシ肺動脈内皮細胞を上記のように試験し、そして10nMのCGP412512で前処理した場合に、有意にブロックされ、一方10nM CGP42700での前処理はそのようなブロックを生じなかった (上記表Iを参照のこと)。

これらの結果を合わせると、ZOTがPKCを活性化し、そしてこの活性化がアクチン重合およびtjの最終開口の両方に近接に発生すること示される。

#### C. PKCの状態

PKCは、全ての細胞において2種の状態、すなわちこのキナーゼが細胞質と会合している不活性状態、およびこの分子が細胞質から膜へ転位されている活性状態で存在する (Thomasら、Methods Enzymol., 1410:399~435 (1987))。従って、PKCの状態を、pZ14上清に曝露したIEC6細胞において直接測定した。

より具体的には、コンフルエントはIEC6の単層を30  $\mu$ lのpZ14上清 (1:33希釈) で、時間間隔の増加について (0、3分、10分) 処理した。ZOT曝露後、IEC6細胞を機械的破壊により溶解して (3回の25ゲージ針への強制通過)、細胞質画分および膜画分を4 $^{\circ}$ Cで30分間13,000  $\times$  gでの遠心分離により分離し、そして [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPからの $^{32}$ Pのヒストン1への $^{32}$ Pの取り込みを測定することによりPKC活性についてアッセイした (Ellisら、Am

10

20

30

40

50

. J. Physiol. 263:F293~F300 (1992) )。コントロールとして、PKC活性はまた、Yasudaら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 166:1220 (1990) により記載されるアセチル化ミエリン塩基性タンパク質のリン酸化の測定に基づくPKCアッセイ系 (Gibco BRL、Grand Island、NY) を使用して測定した。正味のPKC活性値は、PKC19-26、すなわちPKC偽基質インヒビター (Yasudaら、前出) の存在下と非存在下との間のPKC活性の差異を反映する。総PKC比活性 (pmol/分) を総タンパク質に対して規準化した。結果は図2A-2Bに示す。

図2A-2Bに示すように、pZ14上清は、膜性PKC活性の有意な増加 (1.72倍) (図2B) および、程度は低いサイトゾルPKC活性の増加 (図2A) を誘導した。3回の実験を平均すると、このZOT誘導によるPKC活性の増加は、3分でピークとなり (134.0pmol/分/mgタンパク質に対して基準線値は77.6pmol/分/mgタンパク質)、10分で基準線に戻った (65.4pmol/分/mgタンパク質)。これらのデータは、組織透過性に対するZOT効果がPKCにより媒介されることを直接証明する。

#### D. PKCアイソエンザイム

PKCの分子クローニングおよび配列分析によって、異なった生理的特性を有するいくつかの密接に関連するが、異なるアイソエンザイムをコードする遺伝子ファミリーの存在が証明されている (Azzaiら、Eur. J. Biochem., 208:547~557 (1992))。スタウロsporinおよびそのより特異的な誘導體であるCGP41251は、Ca<sup>2+</sup>非依存性グループBアイソエンザイムと比較してCa<sup>2+</sup>依存性グループA PKCアイソエンザイムを優先的に抑制する (McGlynnら、J. Cell Biochem., 49:239-250 (1992) ; およびMarteら、Cell Growth and Differ., 5:239~247 (1994))。その結果、回腸腸細胞内で記載される唯一の検出可能なCa<sup>2+</sup>依存性PKCアイソエンザイムである、PKC- $\alpha$  に焦点をあてた実験を行った (Hyunら、Comp. Biochem. Physiol., 108C:171-178 (1994))。

より詳細には、前記に説明するように得た15~30  $\mu$ gタンパク質/レーンサイトゾル性膜分画を、8.0% (重量/容量) SDS-PAGEにより分離した。分離したタンパクを、Trans-Blot E lectrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) 中でナイロン膜 (N-Immobilon、Millipore) に移した。膜を0.05% (容量/容量) Tween 20を含むPBS (本明細書中以下「PBS-T」) 中でリンスして、そして5.0% (容量/容量) 脱脂乳を含むPBS-T中で室温で1時間ブロックした。アフィニティー精製した抗PKC- $\alpha$  および抗PKC抗体 (Gibco BRL) を希釈して、0.83% (容量/容量) 脱脂乳を含むPBS-T中での至適飽和条件 (1:500希釈) を得、そして膜とともに4℃で16時間インキュベートした。インキュベーションに引き続いて、膜をまず、PBS-T中の5.0% (容量/容量) 脱脂乳で洗浄して (15分間3回)、次いでPBS-Tで洗浄 (15分間1回) し、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合体化したヤギ抗ウサギIgGの1:30,000希釈液とともに室温で2時間インキュベートした。PBS-T中の5.0% (容量/容量) 脱脂乳でよく洗浄後、増強した化学発光 (Amersham) を使用して、免疫反応性バンドを発色した。

それぞれのPKCイソ型のアミノ酸配列を有するイソ型特異的合成ペプチド (Gibco BRL) をコントロールとして使用した。この合成ペプチドは、- PKCのV<sub>3</sub>領域:

(Ala-Gly-Asp-Lys-Val-Ile-Ser-Pro-Ser-Glu-Asp-Arg-Arg-Gln、配列番号4)、および

- PKCのV<sub>3</sub>領域:

(Lys-Gly-Phe-Ser-Tyr-Phe-Gly-Glu-Asp-Leu-Met-Pro、配列番号5)

中の独特な配列に基づいた。

免疫プロットにより決定される場合、pZ14上清によるIEC6細胞の急性 (3分) 処理は、サイトゾルから細胞膜へのPKC- $\alpha$  アイソエンザイムの有意な転位を誘導した。この減少は、10分のインキュベーション後に部分的に反転した。10<sup>-7</sup> M TPAは、同様であるがより持続的 (2時間まで) なサイトゾルPKC- $\alpha$  の減少を誘導し、このイソ型のダウンレギュレーションは、24時間のインキュベーション後に観測された。PKC- $\alpha$  調節サブユニットの連続的、時間依存性蓄積が細胞サイトゾル内に観察された。pZ14上清に曝露した細胞から収得された膜分画またはTPAポジティブコントロールのいずれにおいても、PKC- $\alpha$  の有

10

20

30

40

50

意な増加は検出されなかった。

これらの結果は、PKC- $\alpha$  がZOT誘導によるアクチン再構成およびtj分解の細胞内メディエーターである強力な証拠を提供する。

#### E. セリンリン酸化

PKCリン酸化の基質を同定するために、細胞膜またはサイトゾル画分の両方における標的タンパク質のセリンリン酸化を測定するためにIEC6細胞において実験を行った。

より詳細には、 $2.0 \times 10^5$  IEC6細胞/ウェルを、漸増時間間隔（0、15分、30分、45分）で、 $10^{-10}$  Mの精製MBP-ZOT（実施例 5にて得た）に曝露した。反応を冷PBS（pH7.4）で停止して（3回洗浄）、そして細胞を掻き取って、そして上記のように溶解した。次いでサイトゾル画分および膜画分を、上記のように得た。20~30  $\mu$ gのそれぞれの調製物を8.0%（重量/容量）SDS-PAGEで分離した。分離したタンパク質を、Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell（Bio-Rad）中でナイロン膜（N-Immobilon、Millipore）に移した。膜をリンスして、そして5.0%（容積/容積）脱脂乳を含むPBS-T中で室温で1時間ブロックした。モノクローナル抗セリン抗体（Sigma Immunochemicals）を希釈して、0.83%（容積/容積）脱脂乳を含むPBS-T中での至適飽和条件（1:1000希釈）を得、そして膜と4で16時間インキュベートした。インキュベートに引き続いて、膜をまず、PBS-T中の5.0%（容積/容積）脱脂乳で洗浄して（15分間3回）、次いでPBS-Tで洗浄（15分間1回）し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼと結合体化したヤギ抗ウサギIgG抗体1:30,000希釈液と室温で2時間インキュベートした。PBS-T中の5.0%（容積/容積）脱脂乳でよく洗浄後、増強した化学発光（Amersham）を使用して、免疫反応性バンドを発色した。

結果は、精製MBP-ZOTが、見かけ上100~120kDaの分子量を有する細胞質タンパクの時間依存性セリンリン酸化を誘導することを示した。本タンパク質は、ZOTにより誘導されるPKCリン酸化の標的を代表し得、そしてtj開口部へと導く細胞内シグナル伝達に参与し得る。

#### 実施例 3

##### ZOT作用の選択性

tjに対するZOT効果を研究するための至適インビトロ系を確立するために、いくつかの細胞株をZOT応答性についてスクリーニングした。これはユッシングチャンバーアッセイが、感受性であるが、多数の試料のスクリーニングには適さないからである。代替系の検索において、ZOTについての組織培養アッセイを開発した。

##### A. 種々の細胞株におけるZOTの特異的效果

ZOTがtj制御に対して選択的效果または広範囲の効果のいずれを発揮するかを確認するために、いくつかの細胞株を、ZOT応答性について試験した。より詳細には、ヒト結腸ガン細胞株HT-29 CI 19A（Van Den Bergheら、Biochem. J., 258:673-679（1992））およびCaCo2（Nathら、J. Diarrhoeal Dis., 8:133-142（1990））を、細胞培養フラスコ（Falcon）中の10%（容積/容積）胎児仔ウシ血清、40  $\mu$ g/lペニシリンおよび90  $\mu$ g/lストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地内で95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ の加湿雰囲気下で37で増殖させた。細胞が70~80%コンフルエンスに達した時点で、5日毎にトリプシン処理後に1:5の表面比率で細胞を継代培養した。本試験に使用した細胞の継代数は、15~30の間で変化した。

HT-29 CI 19AまたはCaCo2の単層を、ポリスチレンリング（直径6.4mm、Transwell Costar）に堅固に取り付けた組織培養用処理ポリカーボネートフィルター上にコンフルエンスになるまで（1:2.5の表面比率でプレーティングした12~14日後）増殖させた。フィルターを、改変されたUssingチェンバーの漿膜および粘膜画分を分離するしっかりと取り付けした挿入物内に配置し、そしてウサギの腸に関して上記で記載したように実験を実施した。30  $\mu$ lのpTTQ181上清ネガティブコントロールに曝露した単層と比較した場合、30  $\mu$ lのpZ14上清に曝露したHT-29 CI 19A単層（試験した各試料について3時間までn=4）（33:1希釈）におけるRtの有意な変化は、得られなかった。一方、CaCo2細胞単層で試験した場合、30  $\mu$ lのpZ14上清はRtの有意な減少を誘導し、これらの2種の細胞株の間でZOTに対する感受性が異なることを示唆した。

## B. F-アクチン構成

F-アクチン構成に対するZOTの効果を試験するために、IEC6およびLLC-PK<sub>1</sub> (HuIIら、In Vitro、12:670-677 (1976)) 細胞培養を、同様の様式で試験した。

LLC-PK (すなわちブタ腎臓皮質) 細胞 (HuIIら、前出) を、細胞培養フラスコ (Falcon) 内で、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>の雰囲気において37℃で増殖させた。培養培地は、10% (容積/容積) ウシ胎児血清を補充したダルベッコ改変必須培地からなっていた。細胞が70~80%コンフルエントな単層に達した時点で、0.02% (重量/容量) EDTA中で0.25% (重量/容量) トリプシンでトリプシン処理することにより、継代が185~200回の範囲の細胞を、1週間毎に継代した。

30 µlのpZ14上清に曝露し、引き続いて上記のようにフルオレセイン-ファロイジンでF-アクチンについてプローブしたIEC6細胞は、有意なアクチン再構成を示したが、LLC-PK<sub>1</sub>細胞については有意な変化は検出されなかった。

ZOTが、細胞骨格およびPKCの活性化に対するその効果と合わさった選択的透過効果 (おそらく、「感受性」細胞のみに存在する特異的細胞レセプターと相互作用する) を発揮することについての観察は、ZOTが、tjに直接作用するのではなく、細胞内経路を通して作用することを示す。

### 実施例 4

#### ZOT活性におけるホスホリパーゼCの役割

ホスホリパーゼC (本明細書では以下「PLC」) は、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (本明細書では以下「PIP<sub>2</sub>」) をイノシトール三リン酸 (本明細書では以下「IP<sub>3</sub>」) およびジアシルグリセロール (本明細書では以下「DAG」) に転換する酵素である。PLCは、ZOのアセンブリおよびシーリング、ならびにその調節に関係し得る。ZOに対するPKCの効果は、IP<sub>3</sub> (Ca<sup>2+</sup>経路) およびDAGの両方により誘導されるPKCの活性化に対して二次的である (Berridgeら、Nature、341:197-205 (1989))。

細胞骨格再配列、アクチン重合、および組織の透過性の変化に対するZOTの効果は、PKC活性化を含み得ることが上記で示されている。ZOTの主な標的がPKCであるかまたはPLCであるかを確認するために、上記の実施例 1 に記載したIEC6細胞およびUssingチェンバーにおける実験を繰り返したが、試料は、100mMネオマイシン硫酸とともに10分間、およびpZ14上清への曝露の間中、予めインキュベートした。ネオマイシンは、PIP<sub>2</sub>に結合し、そしてPLCによるIP<sub>3</sub>およびDAGへの転換を防止する物質である。

100mMネオマイシンで前処置し、次いでpZ14上清に曝露したIEC6細胞培養物は、ZOTのみに曝露した細胞培養物 (49.0 ± 9.23; p < 0.05) と比較して、細胞骨格再配列を示す細胞の百分率がより低いことを示した (12.0 ± 5.17)。100mMネオマイシン硫酸ヘウサギ回腸を予め曝露することは、未処理組織におけるZOTにより誘導される組織透過性の増加を部分的に防止した。

これらの結果は、膜貫通PLCがZOT誘導性アクチン再構成および組織透過性において役割を果たし得ることを示す。

### 実施例 5

#### ZOTの精製

5000mlのpZ14上清を、10kDaの分子量カットオフを有する層流フィルターを使用して1000倍に濃縮し、次いで8.0% (重量/容量) SDS-PAGEに供した。タンパク質バンドを、SDS-PAGEゲルのクーマシーブルー染色により検出した。同様の様式で処理したコントロールのpT TQ181上清と比較して、ZOTに相当するタンパク質バンドは検出可能ではなかった。従って、たとえば、zot遺伝子をpZ14内において高度に誘導性の強力なtacプロモーターの後部に配置したとしても、1000倍濃縮したpZ14上清におけるタンパク質のレベルは、クーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルによって依然として検出可能でなかった。

#### A. MBP-ZOT

産生されるZOTの量を増加させるために、zot遺伝子を、マルトース結合タンパク質 (本明細書では以下「MBA」) 遺伝子とインフレーションに融合して、MBP-ZOT融合タンパク質を作製した。

MBPベクター-pMAL-c2 (Biolab) を使用して、E. coli のmalE遺伝子にzot遺伝子を融合することにより、ZOTを発現および精製した。この構築物は、クローン化zot遺伝子の高レベルの発現を生じるための強力な誘導性tacプロモーターおよびmalE翻訳開始シグナルを使用する。ベクター-pMAL-c2は、融合タンパク質の細胞質発現を導くmalEシグナル配列の正確な欠失を有する。MBPについてのアフィニティークロマトグラフィ精製を使用して、融合タンパク質の分離を促進した (Biolab)。

より詳細には、ベクター-pMAL-c2を、EcoRI (malE遺伝子の3' 端において切断する) で線状化して、クレノーフラグメントを用いてフィルインし、そしてXbaI (pMAL-c2ポリリンカーにおいて単一部位を有する) を用いて消化した。ZOTをコードするorfを、プラスミドpBB241 (Baudryら、前出) からサブクローン化した。プラスミドpBB241を、BssHIIで消化し、クレノーフラグメントを用いてフィルインし、そしてXbaIを用いて消化した。次いで、平滑末端化XbaIフラグメントを、pMAL-c2内にサブクローン化してpLC10-cを得た。挿入物およびベクターのいずれも平滑末端および付着末端を有するので、malEの3' 端が挿入物の5' 末端に融合した、適切な方向が得られた。次いで、pLC10-cを、E. coli DH5 株内にエレクトロポレーションした。pBB241において、BssHII制限部位はzot orf内に存在する。従って、ZOTのアミノ酸1~8は、MBP-ZOT融合タンパク質においては失われている。MBP-ZOT融合タンパク質を精製するために、0.2% (重量/容量) グルコースおよび100 µg/ml アンピシリンを含むLuria Bertaniブロス10mlに、pLC10-cを含む単一コロニーを接種し、そして37 °Cで振盪しながら一晩インキュベートした。培養物を、1.0mlの同一新鮮培地内で1 : 100希釈し、そして約 $1.0 \times 10^8$ 細胞/mlまで振盪しながら37 °Cで一晩インキュベートした。次いで、MBP-ZOT発現を誘導するために0.2mM IPTGを添加し、そして培養物を37 °Cでさらに3時間インキュベートした。次いで、細菌をペレット化し、そして20mM Tris-HCl、0.2M NaCl、1.0mM EDTA、10mM 2ME、1.0mM NaN<sub>3</sub>を含む氷冷「カラム緩衝液」20ml中に再懸濁した。細菌懸濁液を、フレンチプレス処理により溶解し、そして4 °Cにて13,000 × gで30分間遠心分離した。上清を収集し、カラム緩衝液で1 : 5希釈し、そしてカラム緩衝液で予め平衡化したアミロース樹脂の1 × 10カラム (Biolabs、MBP-融合物精製システム) にロードした。カラムを5容量のカラム緩衝液で洗浄した後、MBP-ZOT融合タンパク質を、カラム緩衝液中の10mMマルトースを10mlロードすることにより溶出した。1.0ml培養物からの代表的な収量は、2~3mgのタンパク質であった。

次いで、精製したMBP-ZOT融合タンパク質のMBP融合パートナーを、20 µgのMBP-ZOT当たり1.0 µgの第Xa因子プロテアーゼ (Biolabs) を使用して切断した。第Xa因子プロテアーゼは、ZOTのアミノ末端の直前で切断する。このようにして得られたZOTタンパク質を、8.0% (重量/容量) SDS-PAGEゲルに流し、そして電気分離チェンバー (Schleicher & Schuell、Keene、NH) を使用してゲルから電気溶出した。Ussingチェンバーにおいて試験した場合、得られた精製ZOTは、 $7.5 \times 10^{-8}$  MのED<sub>50</sub>でRtの用量依存性減少を誘導した (図3)。

次いで、精製したMBP-ZOT融合タンパク質のMBP融合パートナーを、20 µgのMBP-ZOT当たり1.0 µgの第Xa因子プロテアーゼ (Biolabs) を使用して切断した。第Xa因子プロテアーゼは、ZOTのアミノ末端の直前で切断する。このようにして得られたZOTタンパク質を、8.0% (重量/容量) SDS-PAGEゲルに流し、そして電気分離チェンバー (Schleicher & Schuell、Keene、NH) を使用してゲルから電気溶出した。

Ussingチェンバーにおいて試験した場合、得られた精製ZOTは、 $7.5 \times 10^{-8}$  MのED<sub>50</sub>でRtの用量依存性減少を誘導した (図3)。

#### B. 6 × His-ZOT

zot遺伝子を、pBB241プラスミド (Baudryら、前出) DNAをテンプレートとして使用し、Dep Ventポリメラーゼ (New England Biolabs) を使用してPCRによって増幅した。使用した正方向プライマーおよび逆方向プライマーは、それぞれ、以下の通りである：5' -CGGG ATCCCGTATGAGTATCTTT-3' (配列番号6)；および5' -CCCAAGCTTGGGTCAAAATATACT-3' (配列番号7)であった。これらのオリゴヌクレオチドの5' テイルは、それぞれ、BamHI制限部位およびHindIII制限部位を含む。得られたアンプリコン (1.2kb) を、8.0% (重量/容量) アガロースゲル電気泳動により分析し、そしてXtremeスピンカラム (Pierce) を使用して塩および遊離ヌクレオチドから精製した。次いで、上記の2種類の制限酵素を使用して精製アンプリコンを消化し、次いで得られた消化アンプリコンを、BamHIおよびHindIIIで予め消化したベクター-pQE30 (Quiagen) に挿入して、プラスミドpSU113を得た。pQE30は、6ポリヒスチジンタグ (6 × His) を有する組換えタンパク質の高レベルの発現を提供する発現ベクターである。従って、プラスミドpSU113の発現産物は、6 × His-ZOT融合タンパク質である。次いで、pSU113を、E. coli DH5 内に形質転換した。



6 × His-ZOT融合タンパク質を精製するために、得られた形質転換されたE. coliを、2.0 % (重量/容量) グルコース、25 µg/mlのカナマイシン、および200 µg/mlのアンピシリンを含むLuria Bertaniブロス150ml中で、 $A_{600}$ が約1.10になるまで、37 °Cで一晩増殖させた。次に、75mlの一晩培養物を、2.0 % (重量/容量) グルコース、25 µg/mlのカナマイシン、および200 µg/mlのアンピシリンを含む1000mlのLuria Bertaniブロスに添加し、 $A_{600}$ が約0.7~0.9になるまで、激しく振盪しながら37 °Cで約3時間インキュベートした。次いで、IPTGを2.0mMの最終濃度まで添加し、そして増殖を37 °Cで5時間継続させた。次に、4000 × gで20分間遠心分離することにより細胞を収集し、細胞を、6.0M GuHCl、0.1Mリン酸ナトリウム、および0.01M Tris-HCl (pH8.0)を含む緩衝液Aの湿重量1 gあたり5.0 mlで再懸濁し、そして室温で1時間攪拌した。次いで、混合物を10,000 × gで30分間、4

にて遠心分離し、そして得られた上清をSUPERFLOW樹脂 (QIAGEN) の50 % スラリーの湿重量1 gあたり4.0~5.0ml添加し、そして室温で1時間攪拌を実施した。得られた樹脂を、1.6 × 8.0カラムにロードし、これを緩衝液A、8.0M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、および0.01M Tris-HCl (pH8.0)を含む緩衝液B、ならびに8.0M尿素、0.1Mリン酸ナトリウムおよび0.01M Tris-HCl (pH6.3)を含む緩衝液Cで連続して洗浄した。フローズルーの $A_{600}$ が0.01未満になるまで、各洗浄を実施した。6 × His-ZOT融合タンパク質は、250mMイミダゾールを含む20mlの緩衝液Cを使用してカラムから溶出した。次いで、6 × His-ZOT融合タンパク質を含む画分を、Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964) によって記載される手順、およびクーマシーブルーによるゲル染色を使用してSDS-PAGEによりチェックした。6 × His-ZOT融合タンパク質を含む画分を、8.0M尿素に対して透析し、合わせ、次いでPBS中で100倍希釈した。次に、SUPERFLOW樹脂の50 % スラリー4.0mlを添加し、攪拌を室温で2時間実施し、そして得られた樹脂を1.6 × 8.0カラムにロードし、次いでこのカラムを50mlのPBSで洗浄した。6 × His-ZOT融合タンパク質を、250mMイミダゾールを含む10mlのPBSを用いてカラムから溶出した。得られた溶出液をPBSに対して透析し、そして6 × His-ZOT融合タンパク質を上記の通りにSDS-PAGEによりチェックした。

#### 実施例 6

##### 抗ZOT抗血清の生成

特異的抗血清を得るため、キメラグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) -ZOTタンパク質を発現および精製した。

より具体的に言えば、オリゴヌクレオチドプライマーを使用し、テンプレートDNAとしてプラスミドpBB241 (Baudryら、同上) を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりzot orfを増幅した。前向プライマー (TCATCACGGCGCGCCAGG, 配列番号8) は、zot orfのヌクレオチド15~32に相当し、後向プライマー (GGAGGTCTAGAATCTGCCCCGAT, 配列番号9) は、ctxA orfの5' 末端に相当した。従って、ZOTのアミノ酸1~5は、その結果生じる融合タンパク質で欠損していた。増幅産物をpGEX-2T (Pharmacia, Milwaukee, WI) のGST遺伝子の末端に位置するポリリンカー (SmaI部位) に挿入した。pGEX-2Tは、Schistosoma japonicumのGSTを有する融合タンパク質として、クローン化された遺伝子が発現させる融合タンパク質発現ベクターである。融合遺伝子は、tacプロモーターの制御下にある。IPTGでの誘導により、抑制解除が起こり、GST融合タンパク質が発現される。

その結果生じる組換えプラスミドをpLC11と呼び、E. coli DH5 にエレクトロポレートした。GST-ZOT融合タンパク質を精製するため、100 µg/mlアンピシリンを含むLuria Bertaniブロス10mlにpLC11含有単一コロニーを接種し、振とうしながら、37 °Cで一晩インキュベートした。培養物を同じ新鮮培地1.0ml中に1:100に希釈し、振とうしながら37 °Cで増殖させ、約 $1.0 \times 10^8$ 細胞/mlにした。次に、0.2mM IPTGを添加し、GST-ZOT発現を誘導し、その培養物を37 °Cでさらに3時間インキュベートした。次に、細菌をペレット化し、氷冷PBS (pH7.4) 20mlに再懸濁した後、フレンチプレス法により溶解した。GST-ZOT融合タンパク質は、細菌ペレット画分で沈降したように、これらの条件下では可溶性ではなかった。従って、ペレットを0.00625M Tris-HCl (pH6.8)、0.2M 2-ME、2.0 % (w/v) SDS、0.025 % (w/v) プロモフェノールブルーおよび10 % (v/v) グリセロールを含むLaemli溶解緩衝液に再懸濁し、8.0 % (w/v) PAGE-SDSゲルで電気泳動を行った後、クーマシーブリリアン

トブルーで染色した。融合タンパク質に相当する約70kDa (GSTの26kDa + ZOTの44kDa) のバンドを電気分離チャンパー (Schleicher & Schuell、Keene、NH) を使用してゲルから電気溶出した。

その結果生じる溶出タンパク質 (10 ~ 20  $\mu$ g) の10  $\mu$ gを等容量のフロイント完全アジュバントと混合してウサギに注射した。4 および 8 週間後に 2 回、追加抗原用量をフロイント不完全アジュバントと共に投与した。一ヶ月後、ウサギを放血させた。

特異的抗体生成を測定するため、二つの融合タンパク質、MBP-ZOTおよびGST-ZOTと共に、 $10^{-10}$ M ZOTをナイロン膜上に移し、1:5000希釈したウサギ抗血清と穏やかに振とうしながら 4 晩でインキュベートした。次に、フィルターをPBS-Tで15分間、4 回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼに接合したヤギ抗ウサギIgGの1:30,000希釈物と室温で 2 時間インキュベートした。フィルターを再度、0.1% (v/v) Tweenを含むPBSで15分間、4 回洗浄し、免疫反応性バンドを強化ケミルミネッセンス (Amersham) を使用して検出した。免疫プロットにより、ウサギ抗血清は、ZOTならびにMBT-ZOTおよびGST-ZOT融合タンパク質を認識するが、MBPネガティブコントロールは認識しないことを見出された。

さらに、適当な抗ZOT抗体の生成を確認するため、中和実験をUssingチャンパーで行った。pZ14上清と37 で60分間、前インキュベートしたとき、ZOT特異的抗血清 (1:100希釈) は、Ussingチャンパーに取り付けたウサギ回腸のZOTにより誘導されたRtの減少を完全に中和し得た。

#### 実施例 7

#### ZOTレセプターの精製

##### A. 結合研究

*Yersinia pseudotuberculosis*のMBP-浸潤融合タンパク質は、哺乳類細胞のインテグリンレセプターと結合でき、MBP-浸潤融合タンパク質を生成するプラスミドを有する非病原性 *E. coli* に侵入性表現型を付与する (Leongら、The EMBO J., 9 (6) :1979-1989 (1990))。結果として、実験を行い、上の実施例 5 で得られたMBP-ZOT融合タンパク質が特異的腸結合部位を認識するかどうかを決定し、そして組織透過性を増加させる能力を保持した。より具体的に言えば、ウサギ回腸の筋肉層および漿膜層をはがし、Ussingチャンパーに取付けた後、 $10^{-10}$ M精製MBP-ZOTまたは精製ZOTのいずれかに、共に組織の粘膜側に添加して暴露した。 $10^{-10}$ M MBPをネガティブコントロールとして使用した。次に、RTの変化を10分間隔で記録した。結果を図 4 に示す。

図 4 に示すように、精製MBP-ZOT融合タンパク質 ( ) は、ウサギ回腸におけるRT低下を誘導することが見出された。これは、精製ZOT ( ) による誘導と同等であったが、MBPネガティブコントロール ( ) により誘導された変化と比較したとき、有意に異なっていた。精製されたMBP-ZOTおよびZOTのRTに及ぼす効果は共に、この部分を回収後、24時間で容易に反転し得た。これらのデータは、MBP-ZOT融合タンパク質のZOT成分がなおZOTレセプターを認識し、これと結合し得ることを示すものである。

さらなる実験で、ZOTは、空腸および回腸においてのみ透過性効果を発揮するが、結腸では影響しないことが見出された。ZOTの局所効果が腸内細胞表面におけるZOTレセプター分布に関連するかどうかを明確にするため、空腸、遠位回腸および結腸を含む異なる腸のセグメントを4.0% (v/v) パラホルムアルデヒド中に固定し、包埋した後、切片を作製した。次に、切片をMBP-ZOTまたはMBPネガティブコントロールのいずれかと30分間インキュベートした。試料をPBSで三回洗浄し、1.0% (w/v) ウシ血清アルブミンでブロックした後、ウサギポリクローナル抗MBP抗体 (New England Biolabs) (希釈1:500) と1時間インキュベートした。次に、試料をPBSで洗浄した後、ヤギ抗ウサギIgG-FITC接合抗体 (Sigma) (希釈1:100) と30分間インキュベートし、次に、エバンスブルー (希釈1:2000) と10分間インキュベートした。最後に、切片を蛍光顕微鏡 (Optiphot:Nikon Inc., Melville, NY) で分析した。

Rtの減少を示したセグメント、すなわち、空腸および遠位回腸は、組織表面上に有意な数の蛍光粒子を示したが、ネガティブコントロールに暴露した同じ腸管では結合は観察されなかった。蛍光染色は、絨毛尖で最大であり、絨毛軸にそって減少した。ZOTに暴露した

10

20

30

40

50

結腸セグメントには、有意な染色は、観察されなかった (Fioreら、Gastroenterology, 110: A323 (1996))。

これらの結果は、ZOTレセプター分布が腸内で異なることを示し、空腸および遠位回腸で多く、絨毛陰窩軸に沿って減少する。この分布は、Rtに及ぼすZOTの局所効果と一致し、また、絨毛成熟細胞におけるZOTにより誘導される選択F-アクチン再分布と一致することから、ZOTレセプターの局所分布と試験を行った種々の腸管に及ぼすZOTの異なる透過効果の一致を示唆するものである。陰窩領域における少数のZOTレセプターは、この領域が、さらに成熟した絨毛尖上皮と比較して、すでに漏出性であるという事実 (Marcialら、J. Membr. Biol., 80: 59-70 (1984)) を反映し得るため、調節される必要がない。

コレラに冒された成人の腸粘膜超微構造変化が、近頃報告された (Mathanら、Gastroenterology, 109: 422-430 (1995))。この疾病の急性期中に得た空腸生検は、外側細胞間領域 (lateral intercellular space) の著明な拡大を認めた。この領域は、絨毛の上部三分の一にだけ存在し、絨毛尖で最大であり、絨毛中央にかけて徐々に減少した。接着小帯付近の随伴性接合周囲アクチン濃縮もまた認められた。これらの形態学的変化はすべて、中等度疾病患者と比較して、重篤な疾病患者でより異常であった (Mathanら、同上)。従って、本発明では、Mathanら、同上により観察された変化は、絨毛の成熟腸内細胞に及ぼすZOTの選択的効果に関連し、従って、ヒトでのZOTレセプター分布は、ウサギに記載のものと類似すると考えられる。

また、結合実験を、IEC6細胞、CaCo2、T84 (Nathら、同上)、MDCK、およびウシ内皮細胞を含むいくつかの細胞株で行った。より具体的に言えば、これらの細胞の各々  $2.0 \times 10^5$  個を異なる時間間隔 (5分間、30分間、60分間) および温度 (4 または 37 ) で、 $5 \times 10^{-9}$  M MBP-ZOT または  $5.0 \times 10^{-9}$  M MBPネガティブコントロールのいずれかとインキュベートした。次に、細胞を冷メタノールで固定し、PBSで三回洗浄した後、1.0% (w/v) ウシ血清アルブミンでブロックし、次に、ウサギポリクローナル抗MBP抗体 (New England Biolabs) (希釈1:500) と1時間インキュベートした。次に、試料をPBSで洗浄し、ヤギ抗ウサギIgG-FITC結合抗体 (Sigma) (希釈1:100) と30分間インキュベートした後、エバンスブルー (希釈1:2000) と10分間インキュベートした。最後に、細胞を蛍光顕微鏡 (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY) により分析した。

MBP-ZOT融合タンパク質に暴露したとき (種々の温度および時間間隔で試験した)、IEC6、CaCo2およびウシ内皮細胞単層は、MBPネガティブコントロールに暴露した細胞と比較して、蛍光粒子数の有意な増加を示した。逆に、MBP-ZOTとインキュベートしたとき、T84またはMDCK細胞で有意な染色は、認められなかった。これらの結果は、ZOTが、異なる細胞株間で分布が変化する特異的表面レセプターと相互作用することを示唆する。

同じタイプの実験を  $10^{-10}$  M MBP-ZOT融合タンパク質に 4 で60分間暴露したIEC6単層を使用して繰り返した後、1:500希釈抗ZOT抗血清 (上の実施例6で述べたようにして得たもの) とインキュベートした。次に、単層をPBSで洗浄し、ヤギ抗ウサギIgG-FITC結合抗体 (Sigma) (希釈1:100) と30分間インキュベートした後、エバンスブルー (希釈1:2000) と10分間インキュベートした。最後に、細胞を蛍光顕微鏡 (Optiphot: Nikon Inc., Melville, NY) で分析した。

再度、MBP-ZOT融合タンパク質に暴露した細胞 (上記と同じ時間間隔および温度で) は、MBPネガティブコントロールと比較して有意な数の蛍光粒子を示した。これらの結果より、リガンドが、MBPを含有するがZOTを含有しない分解産物でなく、MBP-ZOT融合タンパク質から成ることが確認される。

類似の結果が、精製ZOT並びに上記で試験した同じ細胞株および実験条件を使用し、細胞単層を上述のように抗ZOT抗血清とインキュベートしたときに得られた。

ZOTレセプターの性質を特徴づけるため、IEC6細胞単層をプロテアーゼ ( $2.5 \mu\text{g/ml}$  プロテアーゼ K または  $1.25 \mu\text{g/ml}$  プロナーゼ E) で37 で30分間前処理し、ZOTの結合親和性を上述のように測定した。さらに、 $1.0 \mu\text{g/ml}$  ZOTを1.0mMスクロースまたは1.0mMマンノースのいずれかと37 で30分間前処理した後、ZOTをIEC6単層表面上に適用した。ZOTについての結合親和性を上述のように、再度決定した。IEC6細胞へのZOTの結合は、細胞単層の

10

20

30

40

50

どちらのプロテアーゼに対する前処理によってもブロックされ、ZOTをスクロースで前処理してもブロックされるが、マンノースで前処理しても遮断されないことが見出された (Fioreら、同上)。これらの結果に基づくと、ZOTレセプターは、糖タンパク質であるようである。

#### B. MBP-ZOTを使用するZOTレセプター精製

精製したMBP-ZOT (上の実施例 5 において記載のように得たもの) 1.0mgを予め活性化したゲル (Aminolink, Pierce) に室温で一晩固定化することによって、MBP-ZOTアフィニティークラムを調製した。このカラムをPBSで洗浄した後、 $10^6$  IEC6細胞 (ラット小腸細胞) (Quaroniら、Methods in Cell Biology、第20章、21B:403-426 (1980)) ; またはCaCo2細胞 (ヒト腸細胞) (Nathら、J.Diarrhoeal Dis., 8:133-142 (1990)) のいずれかを使用して得た粗製細胞溶解物をロードした。溶解物は、細胞を25ゲージの針に三回通すことによって調製した。室温で90分間インキュベートした後、カラムをPBS各14mlで三回洗浄し、そしてMBP-ZOT-カラムに結合したタンパク質を、50mMグリシン (pH2.5)、150mM NaCl、および0.1% (v/v) Triton X-100を含む溶液4.0mlでカラムから溶出した。溶出した画分1.0mlのpHを、1.0N NaOHで直ちに中和した。次に、この画分を還元条件下で8.0% (w/v) SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは、Davis、Ann.N.Y.Acad.Sci., 121:404 (1964) によって記載されるように行い、そしてゲルをComassieブルーで染色した。

IEC6およびCaCo2細胞溶解物からの溶出画分をMBP-ZOTアフィニティークラムにロードし、そしてSDS-PAGEに供し、還元条件下で66kDaの $M_r$ の単一のタンパク質バンドを得た。次いで、各細胞株由来の単一のタンパク質バンドを、(3-[シクロヘキシルアミノ]-1プロパンスルホン酸) 10×100ml、メタノール100ml、蒸留水800mlを含むCAPS緩衝液を使用して、ニトロセルロースフィルターに移した。次に、各細胞株由来の単一のタンパク質バンドをフィルターから切り出し、そしてHunkapiller, Methods of Protein Microcharacterization、Shibley編、第11~12章, Humana Press, 315-334 (1985) によって記載されるように、Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatusモデル494を使用してN末端配列決定に供し、そして以下のN末端配列を有することを認めた:

CaCo2細胞 - ヒトZOTレセプター:

Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gln Glu (配列番号10);

IEC6細胞 - ラットZOTレセプター:

Ala His Lys Ser Glu Ile (配列番号11)。

BLASTを使用して、CaCo2細胞から得られるZOTレセプターのN末端配列をNCBI配列データベースと比較することによって、ヒト血清アルブミンのN末端領域との類似性 (85%同一、85%類似)、およびヒト -1-キマエリン (chimaerin) のN末端領域との類似性 (46%同一、69%類似) を認めた (以下の表 2 を参照)。

10

20

30

表 II

CaCo2 ZOT	レセプター	Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp Leu	(配列番号 :12)
アミノ酸	2-14		
ヒト血清アルブミン		Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu	(配列番号 :13)
アミノ酸	20-31		
α-1-キマエリン		Val His Lys Ser Lys Gln Glu Gly Arg Gln Gln Asp Leu	(配列番号 :14)
アミノ酸	17-29		
ラットZOT	レセプター	Ala His Lys Ser Glu Ile	(配列番号 :11)
アミノ酸	2-7		

○ は同一を示す ; + は類似を示す

-1-キマエリンは、Ras関連rhoサブファミリーのメンバーのp21racのニューロン特異的GTPase活性化タンパク質である (Dong, Eur. J. Biochem., 227:636-646 (1994))。この小さなGTP結合タンパク質は、種々の刺激に応じて哺乳動物細胞におけるアクチンフィラメントおよび細胞骨格機構の調節に関与する (Ridley, Cell, 70:389-399 (1992))。

B. 6xHis-ZOTを使用するZOTレセプターの精製

精製した6xHis-ZOT (上の実施例5において記載されるように得たもの) 1.0mgを予め活性化したゲル (Aminolink, Pierce) に室温で一晩固定化することにより、6xHis-ZOTアフィ

10

20

30

40

50

ニティークラムを調製した。カラムをPBSで洗浄した後、ヒト腸、心臓または脳由来の組織15 gを使用して得られた粗製細胞溶解物をロードした。溶解物は、組織を25ゲージの注射針に三回通すことによって調製した。室温で90分間インキュベートした後、カラムをPBS各14mlで三回洗浄し、そして6xHis-ZOTカラムに結合したタンパク質を、50mMグリシン (pH2.5)、150mM NaCl、および0.1% (v/v) Triton X-100を含む溶液4.0mlでカラムから溶出した。溶出画分1.0mlのpHを、直ちに1.0N NaOHで中和した。次に、この画分を還元条件下で8.0% (w/v) SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは、Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404 (1964) によって記載されるように行い、そしてゲルをComassieブルーで染色した。

腸、心臓、および脳組織溶解物から溶出した画分を、6xHis-ZOTアフィニティークラムにロードし、そしてSDS-PAGEに供した。これらはすべては、還元条件下で、45kDaの $M_r$ の単一のタンパク質バンドを与えた。次に、各組織の単一のタンパク質バンドを、(3-[シクロヘキシルアミノ]-1プロパンスルホン酸) 10 × 100ml、メタノール100ml、蒸留水800mlを含むCAPS緩衝液を使用して、PVDF膜 (Biorad) に移した。次に、各組織からの単一のタンパク質バンドをフィルターから切り出し、そしてこれをHunkapiller、Methods of Protein Microcharacterization、Shibley編、第11~12章, Humana Press, 315-334 (1985) によって記載されるように、Perkin-Elmer Applied Biosystems Apparatusモデル494を使用して、N末端配列決定に供し、そして以下のN末端配列を有することを認めた：

ヒト脳ZOTレセプター：

Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Gly Val Gly His Lys Tyr (配列番号 1)；

ヒト腸ZOTレセプター：

Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly (配列番号 2)；

ヒト心臓ZOTレセプター：

Xaa Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg Arg Gln (配列番号 3)。

BLASTを使用して、ヒト脳から得られるZOTレセプターのN末端配列をNCBI配列データベースと比較することによって、CalprotectinのN末端領域との類似性を示した (72% 同一、72% 類似) (以下の表 3 を参照)。

10

20

表 III

ヒト脳 アミノ酸 (配列番号 :15)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly Val Gly His Lys Tyr	10
Calprotectin アミノ酸 (配列番号 :16)	Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr His Lys Tyr	20
	○ は同一を示す ; + は類似を示す	30
		40

Calprotectinは、分子量 8 ~ 14kDaを有するタンパク質であり、カルシウムに結合する (O dinkら、Nature,330:80-82 (1987) ; Lemarchandら、J.Biol.Chem.,267:19379-19382 (1992) ; およびSchaferら、Biol.Chem.Hoppe Seyler,372:1-4 (1991) )。

BLASTを使用して、ヒト腸から得られるZOTレセプターのN末端配列をNCBI配列データベースと比較することによって、プロテオリピドタンパク質 (リポフィラン (lipophilan) ) の内部領域との類似性を示した (92% 同一、92% 類似) (以下の表 4 を参照)。

表 IV

ヒト腸 アミノ酸	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile Gly (配列番号 :2)	1-13
プロテオリピド タンパク質 アミノ酸	Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly (配列番号 :17)	186-198
○ は同一を示す	; + は類似を示す	

プロテオリピドタンパク質 (PLP) は、分子量30.5kDaを有するタンパク質であり、そしてミエリンの多層構造の形成または維持において重要な役割を果たす、内在性膜タンパク質である (Diehlら、Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 83:9807-9811 (1986))。

BLASTを使用して、ヒト心臓から得られるZOTレセプターのN末端配列をNCBI配列データベースと比較することによって、クレアチンキナーゼのカルジリピン (cardilipin) 結合ドメインとの類似性を示した (100% 同一) (以下の表5を参照)。



表	△
---	---

ヒト心臓		Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala Asp Tyr	(配列番号 :18)
アミノ酸	2-15		
ヒトクレアラチン		Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala Asp Tyr	
キナーゼ, サルコメア		O O O O O O O O O O O O O O O	
ミトコンドリア	41-54		
アミノ酸			

---

○ は同一を示す ; +は類似を示す

ヒトクレアチンキナーゼサルコメアミトコンドリアタンパク質は、分子量46kDaを有するタンパク質であり、そしてエネルギー要求量が大きく変動する組織におけるエネルギー伝達において中心的役割を果たす。

本発明は、詳細に、かつその特定の実施態様を参照して記載されるが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく種々の変更および改変がなされ得ることは、当業者に明らかである。

配列表

(i) 出願人：ファサノ，アレシオ  
(ii) 発明の名称：閉鎖毒素レセプター  
(iii) 配列数：18  
(iv) 連絡住所：

10

(A) 媒体型：フロッピー ディスク  
(B) コンピューター：IBM PC 互換用  
(C) OS：PC-DOS/MS-DOS  
(D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0 . パージョン #1.25

20

(vi) 先願データ：

(viii) 代理人 / 事務所情報：

30

(A) 電話：(202) 293-7060  
(B) テレファックス：(202) 293-7860

( i ) 配列の特徴：

(B) 型：アミノ酸

40

( i i ) 配列の種類 : peptide

( iii ) ハイポセティカル配列 : NO

( xi ) 配列 : 配列番号 1 :

Xaa Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly  
1 5 10

Gly Gly Val Gly His Lys Tyr  
15

(2) 配列番号 2 の情報：

( i ) 配列の特徴：

50

- (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：peptide  
 (iii) ハイポセティカル配列：NO  
 (xi) 配列：配列番号 2：

**Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Xaa Ser Ala Ser Ile**  
 1 5 10

## Gly

- (2) 配列番号 3 の情報： 10  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：15アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：peptide  
 (iii) ハイポセティカル配列：NO  
 (xi) 配列：配列番号 3：

**Xaa Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser**  
 1 5 10

**Ala Asp Tyr** 20  
 15

- (2) 配列番号 4 の情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：14アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：synthetic peptide  
 (iii) ハイポセティカル配列：NO  
 (xi) 配列：配列番号 4：

**Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg** 30  
 1 5 10

## Arg Gln

- (2) 配列番号 5 の情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：12アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：synthetic peptide  
 (iii) ハイポセティカル配列：NO 40  
 (xi) 配列：配列番号 5：

**Lys Gly Phe Ser Tyr Phe Gly Glu Asp Leu Met Pro**  
 1 5 10

- (2) 配列番号 6 の情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：23塩基対  
 (B) 型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：synthetic DNA 50

(iii) ハイボセティカル配列：NO  
(iv) アンチセンス：NO  
(xi) 配列：配列番号 6：  
**CGGGATCCCG TATGAGTATC TTT**

23

(2) 配列番号 7 の情報：  
(i) 配列の特徴：  
(A) 長さ：24塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：synthetic DNA  
(iii) ハイボセティカル配列：NO  
(iv) アンチセンス：NO  
(xi) 配列：配列番号 7：  
**CCCAAGCTTG GGTCAAATA TACT**

24

(2) 配列番号 8 の情報：  
(i) 配列の特徴：  
(A) 長さ：18塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：synthetic DNA  
(iii) ハイボセティカル配列：NO  
(iv) アンチセンス：NO  
(xi) 配列：配列番号 8：  
**TCATCACGGC GCGCCAGG**

18

(2) 配列番号 9 の情報：  
(i) 配列の特徴：  
(A) 長さ：22塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：synthetic DNA  
(iii) ハイボセティカル配列：NO  
(iv) アンチセンス：NO  
(xi) 配列：配列番号 9：  
**GGAGGTCTAG AATCTGCCCG AT**

22

(2) 配列番号10の情報：  
(i) 配列の特徴：  
(A) 長さ：16アミノ酸  
(B) 型：アミノ酸  
(D) トポロジー：直鎖状  
(ii) 配列の種類：peptide  
(iii) ハイボセティカル配列：NO  
(xi) 配列：配列番号10：

10

20

30

40

**Xaa Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys**  
 1 5 10

**Asp Leu Gln Glu**  
 15

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 6アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

10

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号11:

**Ala His Lys Ser Glu Ile**  
 1 5

(2) 配列番号12の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

20

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号12:

**Leu His Lys Ser Glu Ala Ala His Arg Phe Lys Asp**  
 1 5 10

**Leu**

(2) 配列番号13の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13アミノ酸

30

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号13:

**Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp**  
 1 5 10

**Leu**

(2) 配列番号14の情報:

40

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号14:

Val His Lys Ser Lys Gln Glu Gly Arg Gln Gln Asp  
 1 5 10

Leu

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 18アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

10

(iii) ハイポセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号15:

Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Xaa Gly Gly  
 1 5 10

Gly Val Gly His Lys Tyr  
 15

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 18アミノ酸

20

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイポセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号16:

Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile  
 1 5 10

Asp Val Tyr His Lys Tyr  
 15

30

(2) 配列番号17の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイポセティカル配列: NO

(xi) 配列: 配列番号17:

Ser Ala Ile Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile  
 1 5 10

40

Gly

(2) 配列番号18の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 14アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: peptide

(iii) ハイポセティカル配列: NO

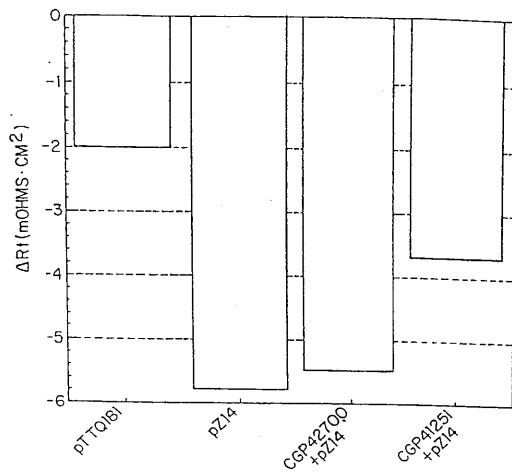
(xi) 配列: 配列番号18:

50

Val Arg Glu Gln Pro Arg Leu Phe Pro Pro Ser Ala  
 1 5 10  
 Asp Tyr

【図1】

FIG. 1



【図3】

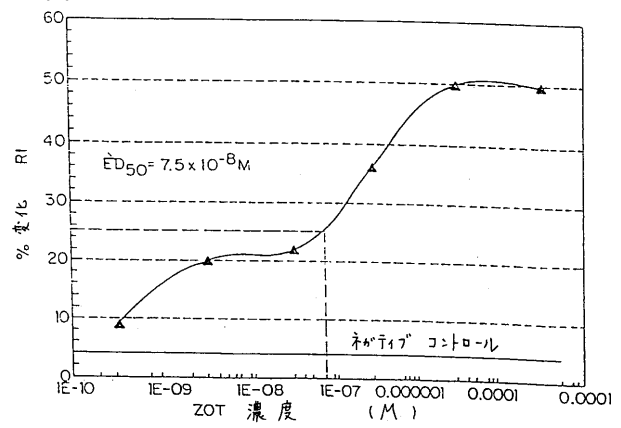
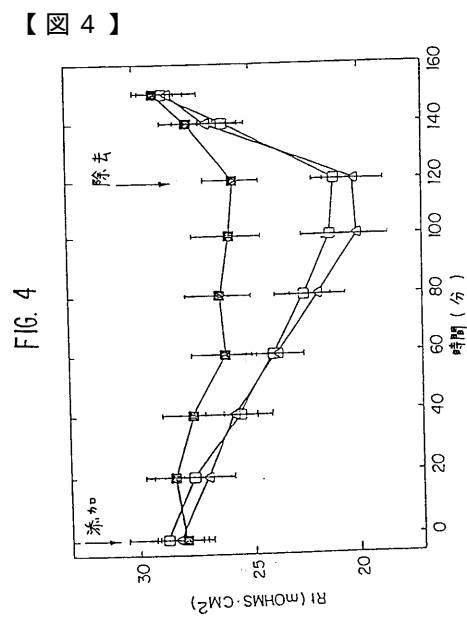
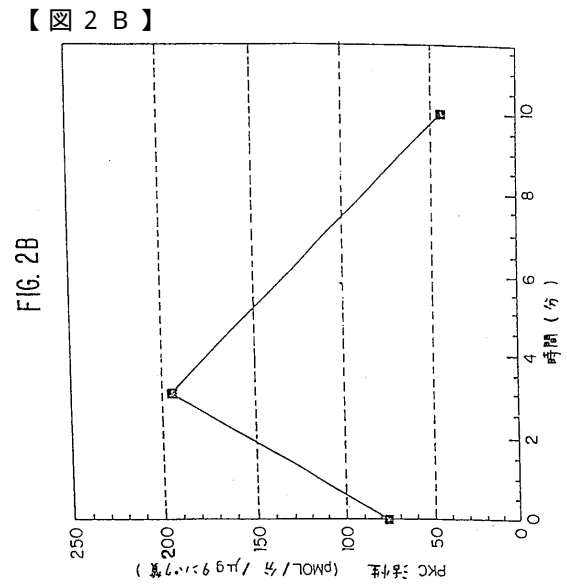
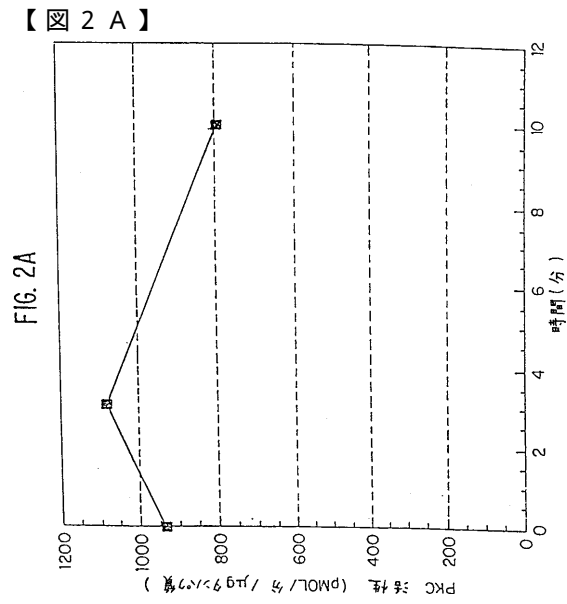


FIG. 3





---

フロントページの続き

- (56)参考文献 Gastroenterology, vol. 112, pp.839-846 (Mar. 1997)  
J. Neurochem., vol. 74, pp. 320-326 (2000)  
FEMS Microbiol. Lett., vol. 194, pp. 1-5 (2001)  
FEBS Lett., vol. 555, pp. 638-642 (2003)  
Gastroenterology, vol. 114, pp. A1160-A1161, G4750 (Apr. 1998)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/705  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)