

(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2008-520572

(P2008-520572A)

(43) 公表日 平成20年6月19日 (2008. 6. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/435 (2006. 01)	C O 7 K 14/435	2 G O 4 1
G O 1 N 27/447 (2006. 01)	G O 1 N 27/26 3 O 1 A	2 G O 4 5
G O 1 N 21/78 (2006. 01)	G O 1 N 21/78 C	2 G O 5 4
G O 1 N 27/62 (2006. 01)	G O 1 N 27/26 3 1 5 H	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 27/26 3 1 5 G	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-541403 (P2007-541403)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月15日 (2005. 11. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年7月2日 (2007. 7. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/041187
 (87) 国際公開番号 W02006/055488
 (87) 国際公開日 平成18年5月26日 (2006. 5. 26)
 (31) 優先権主張番号 60/628, 085
 (32) 優先日 平成16年11月15日 (2004. 11. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

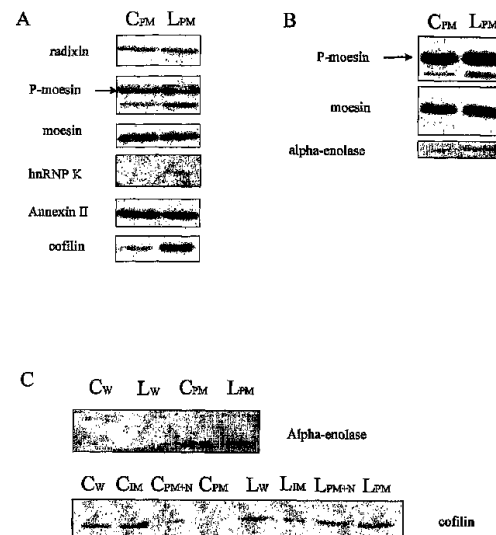
(71) 出願人 506064913
 (オーエスアイ) アイテック・インコーポ
 レーテッド
 アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・117
 47、メルビル、パインローン・ロード・
 41
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 窓開き構造のためのマーカー

(57) 【要約】

本発明は、窓開き構造を同定するための原形質膜マーカーに関する。本発明はまた、原形質膜マーカー及び光学顕微鏡を用いて窓開き構造を視覚化する方法にも関する。本発明はまた、窓開き構造に対する原形質膜マーカーを同定する方法にも関する。特に、本発明は、窓開き構造多孔板の成分としてのモエシンの特徴付けに関する。とりわけ、本発明は、原形質膜マーカーとしてのモエシンの使用に関する。内皮細胞の窓又は透過性の同定のための原形質膜マーカーとしてモエシンを使用し得る。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞及び一群の窓開き構造非誘導内皮細胞から原形質膜を単離する段階；

b) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞から単離された物質において 2 次元ゲル電気泳動を行う段階；

c) 一群の窓開き構造非誘導内皮細胞から単離された物質において 2 次元ゲル電気泳動を行う段階；

d) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞の二次元ゲルにおけるスポットの染色強度と一群の窓開き構造非誘導内皮細胞の二次元ゲルにおけるスポットの染色強度との間の倍数差を調べる段階；

e) スポットを切り出す段階；および

f) スポットに対して特定のタンパク質識別を割り当てるために、タンパク質の理論的トリプシン消化から、フィンガープリントのデータベースに対してスポットを解析する段階

を含む、内皮細胞系において窓開き構造に対するマーカーを同定する方法。

【請求項 2】

質量分析を利用して、切り出されたスポットに対して特徴的な質量フィンガープリントを生成させる段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

スポットの割り当てられたタンパク質識別を確認する段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

スポットのタンパク質識別を確認する段階が、候補タンパク質の関連する分画におけるイムノプロットング抗体を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

スポットの検出を確認する段階が、基準物としての誘導細胞における P V - 1 の特徴的なパターンに対する免疫蛍光法を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

内皮細胞系が、b E N D 5 内皮細胞系及び P y 4 . 1 内皮細胞系からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

内皮細胞系が脳内皮細胞腫株である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

原形質膜を単離する段階がシリカ単離法を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

a) 抗モエシン抗体で内皮細胞系を染色する段階；

b) 光学顕微鏡を用いて内皮細胞系を画像化する段階；

c) 内皮細胞系において、モエシンに結合する蛍光標識された抗モエシンのレベルに基づき窓開き構造を視覚化する段階

を含む、内皮細胞系において窓開き構造を視覚化するための方法。

【請求項 10】

抗モエシン抗体が蛍光標識されている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

内皮細胞系が、b E N D 5 内皮細胞系及び P y 4 . 1 内皮細胞系からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

内皮細胞系が脳内皮細胞腫株である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

モエシン、パラレミン、ラジキシン、コフィリン、トゥウィンフィリン、 α - エノラー

10

20

30

40

50

ゼ、アネキシン I I、ムスクリン、推定 R N A 結合タンパク質 3、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ B 及び h n R N P K からなる群から選択されるタンパク質を含む、内皮細胞系において窓開き構造を検出するためのマーカー。

【請求項 1 4】

マーカーが、窓開き構造に対する原形質膜マーカーである、請求項 1 3 に記載マーカー。

【請求項 1 5】

マーカーが、モエシン及びラジキシンからなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項 1 3 に記載のマーカー。

【請求項 1 6】

モエシン及び P V - I を含む、窓開き構造を検出するためのマーカーの組み合わせ。

【請求項 1 7】

モエシン及び P V - I を含むマーカーの組み合わせを視覚化する段階を含む、内皮細胞系において窓開き構造を同定するための方法。

【請求項 1 8】

モエシン及び P V - I を含むマーカーの組み合わせを視覚化する段階が光学顕微鏡を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

内皮細胞系が、b E N D 5 内皮細胞系及び P y 4 . 1 内皮細胞系からなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

内皮細胞系が脳内皮細胞腫株である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

P V - I 及びパラレミンを検出する段階を含む、内皮細胞系において窓開き構造を同定する方法。

【請求項 2 2】

減法プロテオーム分析を行う段階を含む、内皮細胞系において窓開き構造に対するマーカーを同定する方法。

【請求項 2 3】

進化ゲノミクスを行う段階をさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

進化ゲノミクスを行う段階を含む、内皮細胞系において窓開き構造に対するマーカーを同定する方法。

【請求項 2 5】

有窓の細胞系に対してモエシンのドミナントネガティブ型を投与する段階を含む、有窓細胞系において多孔板組成を変化させる方法。

【請求項 2 6】

有窓の細胞系が、N I H 3 T 3 細胞系及び b E N D 5 細胞系からなる群から選択される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 7】

モエシンのドミナントネガティブ型が融合タンパク質である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

モエシンのドミナントネガティブ型が、緑色蛍光タンパク質に融合させられたモエシンの N - 末端ドメインを含む融合タンパク質である、請求項 2 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本願は、米国仮出願第 6 0 / 6 2 8 , 0 8 5 号 (2 0 0 4 年 1 1 月 1 5 日提出) の優先

10

20

30

40

50

権を主張する。上記出願の教示全体を参照により本明細書中に組み込む。

【0002】

本発明は、窓開き構造に対するマーカーに関する。本発明はまた、マーカー及び光学顕微鏡を用いて窓開き構造を視覚化する方法にも関する。本発明はまた、窓開き構造に対するマーカーを同定する方法にも関する。特に、本発明は、窓開き構造に対するマーカーとしてモエシンの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

窓開き構造は、細胞間透過性を制御する、カベオラ、経内皮チャネル及び小胞血管細胞小器官とともにある、内皮細胞下の構造である。細胞間透過性は、内皮細胞を越える血漿成分の通過として説明される。血管-組織交流の正確な制御は、心臓血管系との器官生理学の適切な統合にとって重要である。したがって、自由な血液-組織交流に対する最初のバリアである微小血管の内皮細胞は、血管壁を横切る巨大分子及び液体の流れを媒介し監視するために、窓開き構造などの非常に特殊な特性を備えている。

10

【0004】

微細構造研究では、窓開き構造は、平均直径 $\sim 60\text{ nm}$ の細胞間循環孔（肝臓類洞内皮内では $\sim 125\text{ nm}$ という大きなものであり得る。）として説明される。窓開き構造は、内皮の最も薄い領域にあり、ここで、細胞プロファイルは 40 nm という小さなものであり、細胞膜の連続性を妨げることなく、細胞の全層に広がる。この孔を横切る物質は、細胞質の内容物と遭遇せず、迅速かつ、おそらくエネルギー効率のよい様式で輸送される。殆どの血管床において、窓開き構造は、中央の小塊において収束するおよそ8本の放射状の原繊維から構成される隔壁を含有し、それが孔を $5 - 6\text{ nm}$ の開口部へとさらに切り離す。

20

【0005】

窓開き構造は、「多孔板」（微小管が豊富な境界により取り囲まれている。）と呼ばれるおよそ $50 - 100$ のクラスターで生じることが知られている。多孔板内で、窓開き構造は、通常、各孔間が正確な間隔で、ほぼ直線的に配置されていることが分かっている。

【0006】

Palada及びSimionescuは、窓開き構造の隔壁の内腔で見られるグリコカリックス内でカチオン化フェリチン（CF）が選択的に蓄積することを示すことにより、1960年代、70年代、80年代に窓開き構造組成の研究を開拓した。最近の研究により、窓開き構造隔壁の最初の既知成分として、内皮細胞特異的タンパク質、原形質小胞1タンパク質（PV-I）が同定された。PV-Iは、隔壁の一次構成成分を構成するホモ二量体を形成すると考えられている、 60 kDa タイプII膜貫通型糖タンパク質である。PV-I及び隔壁は、窓開き構造に特徴的なものではない。PV-I及び隔壁はまた内皮細胞カベオラ及び経内皮チャネル内にも存在する。カベオラが豊富な細胞における相互研究では、PV-Iと結合する新しいタンパク質を同定することができなかった（Stan, R.V., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2004, 286(4): p. H1347-53）。

30

【0007】

窓開き構造の多孔板は特殊な膜構造であり、その分子組成について非常に興味をもたれてきたが、適切な研究ツールが存在せず、捕らえにくいままであった。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、一部、窓開き構造の多孔板の新規成分及び窓開き構造形成及び機能に関する新規成分の発見に基づく。特に、本発明は、窓開き構造多孔板に対するマーカーの発見に基づく。

【課題を解決するための手段】

【0009】

50

ある態様において、本発明は、窓開き構造多孔板に対するマーカーを同定する方法に関する。ある実施形態において、本方法は、プロテオミクスを含む。別の実施形態において、本方法は、進化的ゲノミクスを含む。ある実施形態において、本発明は、窓開き構造多孔板の成分としてのモエシンの特徴を調べる方法に関する。別の実施形態において、本発明は、窓開き構造多孔板の成分として、又は窓開き構造を形成するプロセスの成分としての、パラレミンの特徴を調べる方法に関する。

【 0 0 1 0 】

別の態様において、本発明は、窓開き構造を同定することにおける使用のためのマーカーに関する。ある実施形態において、このマーカーは、窓開き構造を同定するための原形質膜マーカーである。ある実施形態において、本発明は、窓開き構造を同定することにおける使用のための原形質膜マーカーとしてのモエシンに関する。ある実施形態において、本発明は、窓開き構造を同定することにおける使用のためのマーカーとしてのパラレミンに関する。

10

【 0 0 1 1 】

別の態様において、本発明は、窓開き構造を同定するためにマーカーを使用する方法に関する。ある実施形態において、本発明は、窓開き構造を同定するためにマーカーとしてモエシンを使用する方法に関する。別の実施形態において、本発明は、窓開き構造を同定するマーカーとしてパラレミンを使用する方法に関する。

【 0 0 1 2 】

別の態様において、本発明は、マーカー及び光学顕微鏡を用いて窓開き構造を視覚化する方法に関する。ある実施形態において、本発明は、マーカーとしてモエシン及び光学顕微鏡を用いて窓開き構造を視覚化する方法に関する。別の実施形態において、本発明は、窓開き構造に対するマーカーの組み合わせ及び光学顕微鏡を用いて窓開き構造を視覚化する方法に関する。ある特定の実施形態において、マーカーの組み合わせは、モエシン及び P V - I を含む。

20

【 0 0 1 3 】

モエシンは、P V - I を欠くがモエシンを含有する非隔壁化毛細血管床を探ることにおいて、その免疫反応性ゆえに有用であり得る。モエシンはまた、P V - I (抗モエシン標識と組み合わせるカベオラ及び窓開き構造に対する二重特異性を有するマーカーである。) に対する免疫反応性に基づき、より明瞭な窓開き構造の分類を行うために、窓開き構造に対するその特異性ゆえに有用であり得る。モエシンはまた、血管内皮増殖因子 (V E G F) 依存性の指標として、及び、内皮細胞における窓開き構造又は透過性の指標としても有用であり得る。モエシンはまた、病気の治療標的としても有用であり得る。

30

【 0 0 1 4 】

膜 - 細胞骨格アダプター、モエシンと窓開き構造との間の連結は、重要な機能的関連性を有し、窓開き構造の生物発生の研究において新しい道を拓く。窓開き構造の新規成分としてのモエシンの発見は、光学顕微鏡による窓開き構造の視覚化のための重要な段階である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 5 】

本発明は、窓開き構造の成分の同一性を決定する方法に関する。本発明はまた、窓開き構造の形成及び機能に関与する成分の同一性を決定する方法にも関する。特に、本発明は、孔の周縁又は窓開き構造多孔板を構成する分子を同定する方法に関する。窓開き構造誘導は、原形質膜への新規成分の補充に関与すると考えられている。

40

【 0 0 1 6 】

ある態様において、本発明は、インビトロ窓開き構造誘導及び細胞内プロテオーム分析を含む、内皮細胞系における窓開き構造に対するマーカーを同定する方法を提供する。特に、本発明は、減法プロテオーム分析を用いて、内皮細胞系において窓開き構造に対するマーカーを同定する方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

50

ある実施形態において、本発明は、内皮細胞系において窓開き構造に対するマーカーを同定する方法を提供し、この方法は、

a) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞及び一群の窓開き構造非誘導内皮細胞から原形質膜を単離する段階；

b) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞から単離された物質において２次元ゲル電気泳動を行う段階；

c) 一群の窓開き構造非誘導内皮細胞から単離された物質において２次元ゲル電気泳動を行う段階；

d) 一群の窓開き構造誘導内皮細胞の二次元ゲルにおけるスポットの染色強度と一群の窓開き構造非誘導内皮細胞の二次元ゲルにおけるスポットの染色強度との間の倍数差を調べる段階；

e) スポットを切り出す段階；および

f) スポットに対して特定のタンパク質識別を割り当てるために、タンパク質の理論的トリプシン消化から、フィンガープリントのデータベースに対してスポットを解析する段階を含む。

【００１８】

別の実施形態において、原形質膜を単離する段階は、シリカ単離法を含む。

【００１９】

別の実施形態において、本方法は、質量分析を利用して、切り出されたスポットに対して特徴的な質量フィンガープリントを生成させる段階をさらに含む。

【００２０】

別の実施形態において、本方法は、スポットの割り当てられたタンパク質識別を確認する段階をさらに含む。ある特定の実施形態において、スポットの割り当てられたタンパク質識別を確認する段階は、候補タンパク質の関連する分画におけるイムノブロッティング抗体を含む。別の特定の実施形態において、スポットの検出を確認する段階は、誘導細胞におけるPV-1の特徴的なパターンに対する免疫蛍光法を基準物として含む。別の特定の実施形態において、スポットの検出を確認する段階は、光学顕微鏡を含む。

【００２１】

別の態様において、本発明は、進化ゲノミクス（比較ゲノミクス）を含む、内皮細胞において窓開き構造に対するマーカーを同定するための方法を提供する。複数の種に対して利用可能な完全なゲノム配列を用いて、比較ゲノミクスアプローチを用いて、有窓の生物に特に存在する遺伝子を同定する。プロテオミクスから同定されたタンパク質と、比較ゲノミクスから同定された遺伝子を比較する。共通のものは、窓開き構造の組成又は形成プロセスに関与する可能性が高い遺伝子標的を示す。

【００２２】

ある実施形態において、内皮細胞系は脳内皮細胞腫株である。別の実施形態において、内皮細胞系は、bEND5内皮細胞系及びPy4.1内皮細胞系からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、内皮細胞系はbEND5内皮細胞系である。

【００２３】

本発明の別の態様は、光学顕微鏡用いた窓開き構造を視覚化する方法に関する。

【００２４】

本発明はまた内皮細胞系において窓開き構造を視覚化するための方法にも関し、この方法は、

a) 抗モエシン抗体で抗内皮細胞系を染色する段階；

b) 光学顕微鏡を用いて内皮細胞系を画像化する段階；

c) 内皮細胞系において、モエシンに結合する蛍光標識された抗モエシンのレベルに基づき窓開き構造を視覚化する段階を含む。

【００２５】

ある実施形態において、抗モエシン抗体は蛍光標識されている。

【００２６】

10

20

30

40

50

本発明はまた、窓開き構造を検出するための原形質膜マーカーにも関する。ある態様において、本発明は、内皮細胞系において窓開き構造を検出するためのマーカーに関する。別の態様において、本発明は、インビボで窓開き構造を検出するためのマーカーに関する。

【0027】

ある実施形態において、窓開き構造を検出するためのマーカーは、モエシン、パラレミン、ラジキシン、コフィリン、トゥインフィリン、 α -エノラーゼ、アネキシンII及びhnRNP K、ムスクリン、推定RNA結合タンパク質3ならびにヌクレオシドジホスフェートキナーゼBからなる群から選択されるタンパク質を含む。ある特定の実施形態において、窓開き構造を検出するための原形質膜マーカーはモエシンを含む。ある特定の

10

【0028】

本発明はまた、窓開き構造を検出するための原形質膜マーカーの組み合わせにも関し、この原形質膜マーカーの組み合わせはPV-I及びモエシンを含む。

【0029】

本発明はまた、窓開き構造を同定するために、原形質膜マーカーとしてモエシンを用いる方法にも関する。ある実施形態において、本発明は、内皮細胞系において窓開き構造を同定するために、原形質膜マーカーとしてモエシンを用いる方法に関する。別の実施形態において、本発明は、インビボで窓開き構造を同定するために、原形質膜マーカーとしてモエシンを用いる方法に関する。

20

【0030】

本発明のある実施形態は、内皮細胞系における窓開き構造の指標としてモエシンを使用する方法を提供する。本発明の別の実施形態は、内皮細胞系での透過性に対するマーカーとしてモエシンを使用する方法を提供する。本発明の別の実施形態は、内皮細胞系における疾患の治療標的としてモエシンを使用する方法を提供する。本発明の別の実施形態は、インビボの疾患の治療標的としてモエシンを使用する方法を提供する。

【0031】

ある実施形態において、細胞内プロテオーム分析の第一段階は、原形質膜を細胞の他の部分から単離することを含む。原形質膜の単離により、誘導の非特異的影響が除かれ、分析すべき混合物のタンパク質の複雑性を最小限にし、関連のある変化が起こる細胞分画に集中させる。

30

【0032】

ある実施形態において、原形質膜の単離の段階は、全体として原形質膜の物理化学的特性に基づくアフィニティー精製法を使用する。本方法は、負に荷電した原形質膜に対する陽イオン性コロイドシリカの高親和性を利用する。シリカの結合において、原形質膜は、細胞の残りの部分からそれらを分離するために使用できるユニークな密度を獲得する(Jacobson, B. S. 及び D. Branton, Science, 1977, 195 (4275): p. 302-4. Chaney, L. K. 及び B. S. Jacobson, J. Biol. Chem., 1983, 258 (16): p. 10062-72; Stolz, D. B. 及び B. S. Jacobson, J. Cell Sci., 1992, 103 (Pt 1): p. 39-51; Mason, P. W. 及び B. S. Jacobson, Biochim. Biophys. Acta., 1985, 821 (2): p. 264-76)。シリカは、負の電荷が特に高濃度であることから、膜の有窓の領域に誘引され得る。シリカはまた、負の電荷を適所に堅く保持することにより、膜の下部構造を安定化させ得る(Simionescu, N. M. Simionescu 及び G. E. Palade, J. Cell Biol., 1981, 90 (3): p. 605-13)。シリカ被覆は、分画化した原形質膜の小胞形成を防ぎ、シリカが化学的に不活性であるため、何れの成分も変化させることなく時空間的なタンパク質及び脂質関係を維持することが報告されている(Schnitzer, J. E. ら、Science, 1995, 269 (5229): p. 1435-9; Schnitzer, J. E. ら、Proc. Natl. A

40

50

cad Sci USA、1995、92(5): p. 1759-63)。陽イオン性コロイドシリカ単離法を行うことにより、全細胞ホモジェネートよりも原形質膜が顕著に濃縮される。

【0033】

陽イオン性コロイドシリカ原形質膜単離の例を、ラトルンクリ - 誘導及びビヒクル誘導 END 5 及び Py 4 . 1 細胞培養物に適用したが、これを図 1 で図式化して示す。

【0034】

単離手段の過程の後、この手段において様々な段階から試料を得て、SDS - PAGE 電気泳動及びウェスタンブロッティング後に、特定の細胞小器官マーカーの存在について生化学的に追跡する(図 2)。全細胞、細胞内膜、原形質膜及び核及び原形質膜分画に対するタンパク質の等量の比較から、VE - カドヘリン及びPV - I などの原形質膜マーカーが漸進的に濃縮されることが示される。全細胞に対する原形質膜分画におけるVE - カドヘリン及びPV - I の濃縮は約 5 倍から 40 倍であり、一方、GM 130 などのゴルジマーカーは約 2 倍から 20 倍の減少を示した。さらに、細胞内膜分画において原形質膜マーカーに対するシグナルは検出されず、このことから、そのユニークな新しい密度ゆえに、予測したように、第一の低速遠心段階の上清における原形質膜の損失及び核との原形質膜の共沈降がないか又は僅かであることが示された。

【0035】

TEM を用いて固定原形質膜ペレットからの薄片を調べることにより、微小構造的にシリカ単離法を確認した。非誘導及び誘導 b END 5 細胞の原形質膜ペレットからの低倍率画像から、「糸上のビーズ」のように見えるシリカ被覆原形質膜シートが両分画の主要な要素であることが示された(図 3)。生化学データ及び光学顕微鏡観察と一致して、ペレットにおいて全細胞が見られることもあった(図 4 A)。非誘導細胞からの原形質膜の高倍率画像により、単離された膜シートの細胞質側に付着するカベオラの存在が分かった(図 4 B)。全細胞中のカベオラ及び細胞内細胞小器官の両方が形態的に無傷であると思われる、シリカは細胞の外側に限定された。シリカ粒子のサイズは平均直径 20 から 50 nm であり、したがって、窓開き構造を含む膜そのものの、存在するあらゆる微小構造をマスクした(図 4 C 及び 4 D)。

【0036】

プロテオーム比較のために処理される物質の質を確認するために、光学顕微鏡により各誘導を確認し、各精製を生化学的に追跡した。単離プロトコルの開始時に培養ディッシュ中に含まれるカバースリップを固定し、隔壁マーカー、PV - I 及び微小管に対して免疫染色を行った。細胞骨格、カベオラ又は細胞内細胞小器官を欠く細胞の細い領域における PV - I 染色から、窓開き構造「多孔板」が示された。誘導 b END 5 及び Py 4 . 1 細胞において、チューブリン「スパーサー」により分けられた、密接に並んだ「島」のように特徴的な窓開き構造パッチが見られた(図 5 A)。

【0037】

各細胞タイプに対して、比較のためにラトルンクリン誘導物質及びビヒクル誘導物質を得た。b END 5 細胞の場合、ビヒクルによる何らかの相違を正確に特定することができるように、完全に非処理の細胞(C 1 と呼ぶ。)及び誘導開始時(時間 0)に原形質膜単離のために処理した細胞のさらなる対照を使用した。精製プロトコル進行の全過程にわたり様々な細胞内分画を一部採取し、PV - I の濃縮及びゴルジマーカー GS 28 などの細胞内成分の減少について調べた(図 5 B)。

【0038】

ある実施形態において、窓開き構造の成分を同定する方法は、減法 2 D - ゲル電気泳動分析の段階を含む。十分な物質をプールし、ビヒクル誘導及び非誘導 Py 4 . 1 細胞用の一群の 3 連ゲル及び、非処理、ビヒクル誘導及び誘導 b END 5 細胞に対する 3 連ゲル 3 セットを作製した(図 6 及び図 13)。ProGenesis^(R)ソフトウェア(ProLific, Inc. Newark, CA)を用いて細胞タイプごとに全てのゲルを集合的に分析し、誘導及び非誘導試料におけるスポットの染色強度間の倍数差を得て、S

10

20

30

40

50

t u d e n t の t 検定を用いてそれらの差に対する p - 値を得た (図 7) 。分析の第一回目において、1 以上の次の基準を満たすスポットを選択した：a) 染色強度の倍数増加が誘導試料において 2 を超える、b) 何らかの倍数増加に対して、p - 値が 0 . 0 5 未満である、c) スポットが誘導試料においてユニークである。質量分析のために選択した全スポットのまとめ倍数差及び p - 値を付随する。) を図 1 5 で示す。

【 0 0 3 9 】

ある実施形態において、窓開き構造の成分を同定する方法は、質量分析を用いて識別を割り当てる段階を含む。切り出したスポットをトリプシンで消化し、質量分析により分析して、各スポットに対して特徴的なペプチド質量フィンガープリントを生成させる (ただし、十分なタンパク質量が存在するならば) 。次に、各スポットに対して特定のタンパク質識別を割り当てるために、タンパク質の理論的トリプシン消化からのフィンガープリントのデータベースに対して、各質量フィンガープリントをマッチングさせる。得られたトリプシン断片による理論的タンパク質識別の % 範囲、その識別にマッチするトリプシン断片の分画、M O W S E スコア及び切り出したスポットの p I 及び分子量と理論的識別のそれとの間の関係などの情報を全て考慮した後、特定の識別を割り当てる。複数の識別が割り当てられた場合、その識別は、可能性のある識別間のトリプシン断片パターンの類似性、又はゲルにおける 1 つのスポット中に複数のタンパク質が存在することの何れかにより説明できる。さらに、特に、あるタンパク質の翻訳後状態の集合物を示すクラスターにおいて見られる場合、個々のスポットがしばしば同じタンパク質に相当した。各試料におけるスポットに対する割り当てタンパク質識別の詳細を図 1 4 に示し、その機能に従い図 1 6 でまとめる。図 1 6 は、その機能に従い分類された候補タンパク質をまとめた表である。複数の機能を有するタンパク質の場合、最もよく知られたもののみを示す。行った全てのタイプの分析に対して、倍数変化及び付随する p - 値を示す。総変化とは、試料における全てのゲルにわたる、対照細胞に対する誘導細胞のスポット強度の倍数変化を指す。カラム L 対 C 2 (1) 、L 対 C 2 (2) 及び L 対 C 2 (3) は、b E N D 5 細胞実験 1、2 及び 3 に対してそれぞれ行われた個々のバッチ分析におけるスポット強度の倍数変化を指す。複数のタンパク質識別を 1 つのスポットに割り当てることができ (例えば b E N D 5 4 0 0) 、同じタンパク質識別を複数のスポットに合わせることができる (例えば b E N D 5 5 2 6 及び 5 2 7) ことに留意されたい。ハイライトを付したものは、切り出し及びそれに続くタンパク質含量同定に対する特定スポットの選択を決定した倍数変化である。その細胞内局在又は機能について候補を分類するカテゴリーを図 8 においてパイチャートで説明する。

【 0 0 4 0 】

ある実施形態において、窓開き構造の成分を同定する方法は、標的確認の段階を含む。ある特定の実施形態において、標的確認は、候補タンパク質に対するイムノプロットティングを含んだ。別の特定の実施形態において、標的確認は免疫蛍光法を含んだ。

【 0 0 4 1 】

減法プロテオーム分析の所見を確認するために、候補タンパク質に対する抗体を用いて、関連する分画におけるイムノプロットティングを行った。2 種類の条件におけるタンパク質の等量を比較することにより、コフィリン、 α - エノラーゼ、ラジキシン、モエシン、アネキシン I I 及び h n R N P K のタンパク質レベルの変化を評価した (図 9 A 、 9 B) 。

【 0 0 4 2 】

調べた全ての誘導膜分画においてコフィリンが上方制御された。アネキシン I I は可变的に上方制御された。 α - エノラーゼ及び h n R N P K は両者とも、上方制御されたと思われた。モエシンのリン酸化型を主に認識する抗体を用いて調べることにより、モエシンのリン酸化型の増加が示される。モエシンに対する 2 d - ゲルスロットパターンは、「一連のスポット」の一部として現れ (図 7) 、複数のリン酸化状態において存在するタンパク質の特徴を示す。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

原形質膜濃縮が試料間の関連性のある差を明らかにするために必要であるという仮説と一致して、コフィリン濃縮は、非誘導細胞の原形質膜分画に対する誘導細胞の原形質膜分画の比較においてのみ明らかであり、一方で、全細胞ホモジェネートでの比較では存在しない(図9C)。主に細胞質性のタンパク質、 α -エノラーゼに対して同様のパターンが見られるが、非誘導細胞に対し、誘導細胞においてこのタンパク質のより多くの部分が原形質膜分画とともに同時精製される(図9C)。 α -エノラーゼの48kDaバンドに加えて、35kDaバンドは、bEND5及びPy4.1試料の両方において、対照及び誘導細胞の原形質膜分画でのみ常に現れる。

【0044】

次に、bEND5細胞における免疫蛍光法により、窓開き構造に関して、細胞内局在について、ウェスタンブロッティングにより確認された標的を調べた。誘導細胞におけるPV-Iに対する特徴的なパターンを、窓開き構造の存在及び出現に対する基準として使用した。

【0045】

アクチン結合タンパク質、コフィリン及びアネキシンIIは、窓開き構造パッチ間の隔壁として働く細胞の厚い領域と関連すると思われる(図10A-F)。対照及び誘導細胞の両方の核周辺領域において α -エノラーゼが主に濃縮されていた。膜-細胞骨格アダプターであるモエシン及びラジキシンは、誘導細胞においてPV-Iによりマークされる同じ窓開き構造パッチに再分布される(図10C、10D)。モエシン及びラジキシンに対するヤギポリクローナル抗体を用いて得られる染色パターンは、ほぼ完全にPV-Iに対するものと重複し、モエシンに対するマウスモノクローナル抗体を用いてモエシンについてこれを確認した。

【0046】

減法プロテオーム分析は、高分解能の全プロテオーム分析よりも、より少なく、より操作しやすい一連の候補タンパク質が得られるため、有利である。このような差次的発現アプローチにおいて、候補セットのサイズは、比較下の試料間の差の程度及び研究者が設定するストリンジェンシー基準により変化し得る。アクチン破壊剤での処理が異なる同一の細胞タイプでのこの比較において、ユニークであり処理試料において2倍を超えて上方制御されるか、又は処理試料において、 $p < 0.05$ の信頼区間で上昇するかの何れかのスポットのみを考慮し、一連の26個のユニークなタンパク質識別を得た。しばしば、同じスポットが複数の識別を有したが、これは、タンパク質データベースに対するアミノ酸配列ではなく、むしろ、質量フィンガープリントのマッチングに基づく、使用される識別割り当ての方法が絶対的ではないことに原因があり得る。2以上の識別の間のあいまいさが解決できなかった場合、識別割り当て法における限界及び2D-ゲルそのものの分解能を配慮し、それらは全て可能性ありとみなした。

【0047】

全体としては、26種類のタンパク質識別から、23種類が特徴的な遺伝子産物であり、2種類が機能的スクリーニングで既に同定されており(Ras抑制タンパク質1、インターフェロン活性化タンパク質205)、1つが既知のタンパク質(推定RNA結合タンパク質3)との構造類似性に基づき部分的に特徴が分かった。これらの報告された、又は場合によって推定の細胞内局在に基づくタンパク質の分類から、全部で54%が原形質膜及び同時精製細胞骨格と関連し、他の33%が様々な他の細胞質構造と関連していることが示された。一連の原形質膜関連タンパク質の中で、膜貫通領域を持つタンパク質はなく、代わりに、周辺に連結されているか、又は二重層に脂質を介して結合されていた。機能に関するタンパク質の分類から、候補の殆どが、膜のリモデリング又はエンドサイトーシスプロセスに関与し、一方、アクチン結合タンパク質、細胞骨格モーター及び転写又は翻訳に関与するタンパク質が殆どの割合を占めることが示された。

【0048】

窓開き構造に関して見た場合、候補タンパク質を2つのカテゴリーに分けることができる。即ち、構造成分及び窓開き構造発生のある段階に関与するもの、である。窓開き構造

10

20

30

40

50

形成における細胞骨格リモデリングの役割が報告されている。[24 - 28] コフィリンは、単量体及び繊維状アクチンの両方に結合し、それらの先端からフィラメントを脱重合することにより、及び、単量体 G D P 結合アクチンにおける自然なヌクレオシド交換を阻害することにより、アクチンフィラメント分解を増加させることが報告されている。[29、30]。トゥウィンフィリン (又はタンパク質チロシンキナーゼ 9) は、アクチン単量体を隔離し、ヌクレオシド交換を妨げる能力を有し、これは、単量体アセンブリーを阻害すると考えられている [30、31]。トランスゲリンは、あまり特徴が分からないアクチン結合タンパク質候補であるが、報告によると、一見したところコフィリン及びトゥウィンフィリンの役割とは逆に、架橋アクチンフィラメントを凝集させるのに関与する [32、33]。これらの内在性アクチン結合タンパク質は、おそらくこのプロセスを駆動する、外部から添加されるラトルンクリン A を補助するものとして、窓開き構造形成に必要なアクチンフィラメントの分解に関与し得る。

【 0049 】

ミオシン及びキネシンは、細胞内で働く、それぞれアクチンフィラメント又は微小管上を動く分子モータータンパク質である。両者とも、重鎖及び軽鎖のオリゴマーとして見られ、重鎖はモータードメインとして働き、軽鎖は、ミオシンの場合制御の役割を有し、又は、キネシンにおいては、細胞内局在及び輸送物の選択を決定する [34 - 36]。軽鎖のみがこのスクリーニングにおいて同定されたが、全タンパク質機能ユニットを考慮する。ミオシン及びキネシンは、有窓になろうとしている領域へ、又は領域から、小胞及び細胞小器官を運ぶことにより、このプロセスを触媒し得る。ラトルンクリン A は、カベオラの内在化及び微小管に沿ったそれらの動きを誘導することが報告されている [37]。

【 0050 】

細胞骨格分解及び細胞小器官の動きはさておき、窓開き構造発生の一部として、連続構造から、多数の孔により中断される非連続構造への、膜そのもののリモデリングが含まれる。原形質膜からある内部細胞小器官への膜サイクリングの手段として、エンドサイトーシスは、このような膜リモデリングに対する有望なメカニズムであり、これに関連して、腫瘍プロモーター N m 2 3 は、接着結合のダイナミン介在エンドサイトーシスに必要であることが分かっている [39]。パラレミンは、原形質膜活性及びその細胞増殖及びプロセス形成誘導能の部位での膜の細胞質面との結合を介した、原形質膜ダイナミクスに関わる別のタンパク質である [40]。E R M (エズリン - ラジキシン - モエシン) タンパク質ファミリーを代表するラジキシン及びモエシンは、膜 - 細胞骨格アダプターとしての役割を介して、アクチン分解及び原形質膜リモデリングの基本プロセスを結び付けることができる [41]。ウェスタンブロッティングを用いて、上方制御されているものとして、及び免疫蛍光法により、窓開き構造多孔板の一部であるものとしての両方で、候補タンパク質を確認した。

【 0051 】

接着斑成分の質量分析に基づく試験において、h n R N P などの R N A 結合タンパク質の同定は驚くべきものとなった。同じ試験において、免疫蛍光法によるこれらの候補タンパク質の確認から、接着斑アセンブリーの最初の段階における拡散開始部位の成分としての新規機能が浮き彫りとなった [44]。窓開き構造発生の過程において、基質への接着でもまたリモデリングが起こる。有窓の細胞からの接着斑の特徴である典型的なピンクリン染色がないことから、接着斑が分解される必要があることが示唆される。候補タンパク質 h n R N P K は、その新しく報告された機能の基本的に逆である、このようなプロセスに関与し得る。

【 0052 】

エクソソームと呼ばれるいくつかの小型のエキソサイトーシス小胞のプロテオームに関する報告から、この試験において同定された候補タンパク質の多くについて、独立して確認を行った [45]。38 種類の同定タンパク質のリスト中のミオシン、E R M タンパク質、キネシン、 α - エノラーゼ、翻訳開始因子及びアネキシン I I とともに隔壁タンパク質 P V - I が存在することから、窓開き構造の構造への同様の構造的状況におけるそれら

の間の関係が示唆される。

【 0 0 5 3 】

この試験は、このような細胞小器官のタンパク質補体を定義するために、同じ細胞の細胞小器官欠乏状態と、細胞小器官が豊富である状態との減法プロテオミクス比較を最初に使用するものであった。この試験はまた、窓開き構造多孔板のタンパク質を発見し、確認することに最初に成功した試みであった。しかし、P V - Iと同様に、モエシン及びラジキシンは、窓開き構造に対してユニークではなく、様々な他の細胞構造の一部を形成する。同定された、E R Mタンパク質と窓開き構造との間の関係は、我々の知識を広げるためのベースとなり得る。

【 0 0 5 4 】

本明細書中に記載の窓開き構造多孔板の新たに同定された成分のうちの2つであるモエシン及びラジキシンは、E R M (エズリン - ラジキシン - モエシン) タンパク質ファミリーのメンバーであり、これらは、表層細胞骨格と原形質膜との間のアダプターとして働くことが知られている [6 6]。3種類の密接に関連があるタンパク質である、エズリン [6 7]、ラジキシン [6 8] 及びモエシン [6 9] は、関連タンパク質メルリン [7 0、7 1] とともに E R M ファミリーを形成し、より大きな、4 . 1 タンパク質スーパーファミリーに属し、このメンバーは、そのアミノ末端の F E R M (4 . 1、エズリン、ラジキシン、モエシン) ドメインを特徴とする [7 0、7 2 - 7 4]。E R M タンパク質の N 末端ドメインは、およそ 8 5 % の相同性を有していて、保存性が高く、内在性膜タンパク質と直接又は間接的に相互作用することに関与している [7 5、7 6]。~ 3 0 0 残基 N 末端ドメインに続き、伸長した α - ヘリカルドメイン、その後、~ 8 0 残基の C 末端繊維状アクチン (F - アクチン) 結合ドメインが続き、これらは、E R M タンパク質の中で保存があまり高くない領域を表す [7 5、7 6]。神経線維腫症 2 腫瘍抑制遺伝子の産物であるメルリン [7 0、7 1] は、N 末端 F E R M ドメインを含有し、原形質膜において E R M 相互作用因子 (i n t e r a c t o r) の一部を共有するが、F - アクチン結合ドメインをその C 末端において欠く [7 5]。それにもかかわらず、やはり F E R M ドメイン中のアクチン結合領域を介して F - アクチンと相互作用することが報告されている [7 7、7 8]。

【 0 0 5 5 】

報告された機能的冗長性は、E R M タンパク質間の構造類似性が高いことと一致する。E R M タンパク質は、培養細胞において同時発現される [6 6、7 6、7 9、8 3]。構成的に活性のある [8 4 - 8 6] 又はドミナントネガティブ [8 7 - 8 9] なタンパク質型の使用から、細胞極性及び形態形成におけるそれらの重要な役割が説明される。E R M タンパク質は、細胞の形の決定、接着、運動性、細胞質分裂、食作用から、シグナリングカスケードとの膜輸送の統合にわたる領域の機能に関わる [7 5]。関連タンパク質メルリンは、先述の機能の多くを共有している [9 0]。

【 0 0 5 6 】

E R M タンパク質機能の制御は、これらの構造のレベルで起こると考えられ、次いで、特定の細胞内局在へと移る。F E R M ドメインと C 末端ドメインとの間の阻害相互作用により、E R M タンパク質を単量体として維持し、これらを細胞質に閉じ込める [9 1、9 2]。F E R M ドメインを介したホスファチジルイノシトール 4 , 5 - ビスホスフェート (P I P 2) との相互作用が起こり、その後、C 末端ドメインの保存的スレオニン残基でリン酸化が起こることにより、膜及びアクチン結合部位の両方がマスクされると考えられる [9 3 - 9 5]。分子間ならびに分子内で阻害相互作用が起こり得るが、オリゴマー状態の重要性は現在のところ不明である [8 5、9 1、9 6]。リン酸化及びリン脂質結合は、R h o シグナルカスケードの下流にあると考えられている [9 3、9 7 - 9 9] が、一方、R a c の下流の E R M 機能もまた報告されている [1 0 0]。E R M タンパク質もまた、正 [1 0 1] 又は負 [1 0 2] の制御因子の何れかとして、R h o 上流で機能することが分かっており、このことから、フィードバックメカニズムの存在が示唆される。

【 0 0 5 7 】

出願者らは、窓開き構造多孔板の新規成分の特徴を述べる。インビトロ及びインビボにおいて、窓開き構造内の E R M タンパク質モエシンの存在を支持する証拠が蓄積された。b E N D 5 細胞系において、細胞内分布、リン酸化状態及びタンパク質の界面活性剤溶解性を評価した。さらに、窓開き構造形成のタイムコース及び免疫沈澱実験により、窓開き構造発生におけるモエシンの潜在的役割を検討した。

【 0 0 5 8 】

殆どの培養細胞において全 E R M ファミリーメンバーが存在すること、及び窓開き構造の形成を起こしやすい細胞系における特異的な E R M ファミリーメンバーの共存から、各膜の細胞内分布における研究が促進された (図 1 1)。エズリン、ラジキシン、モエシン又は関連タンパク質メルリンに対して、ラトルンクリン誘導 b E N D 5 細胞を免疫染色した。窓開き構造局在を解明するために、多孔板をマークする対比染色として抗 P V - 1 (M E C A - 3 2) を使用した。報告されている機能的冗長性にもかかわらず、多孔板に局在した E R M メンバーは、モエシン (図 1 1、A - C) 及びラジキシン (図 1 1、J - L) のわずか 2 種類であった。対照的に、エズリン (図 1 1、D - F) 及びメルリン (図 1 1、G - I) は、多孔板から排除されていると思われ、代わりに、これらの間の細胞質アームに限定されていた。

10

【 0 0 5 9 】

培養内皮細胞において窓開き構造に対して E R M ファミリーメンバー及びメルリンにより示される特異性が、インビボでの有窓の毛細血管床の分析において反映された。眼の脈絡毛細管枝は、隔壁タンパク質 P V - I に対する免疫染色により視覚化できる隔壁のある窓開き構造 [1 0 3、1 0 4] を有するので、これを分析の適切な組織として選択した。眼切片の 3 重染色において (図 1 2)、2 種類の異なる組織がすぐに見えた：即ち、既に報告されているような [1 0 5、1 0 6] エズリンに対する免疫反応のある網膜色素上皮 (図 1 2 B、F) 及び、P V - I 及びモエシンの両方に対する免疫反応のある有窓の脈絡毛細管枝 (図 1 2 A、C、E、G) である。低倍率 (図 1 2 D) 及び高倍率 (図 1 2 H) 両方における 3 種類全てのチャネルの重ねあわせから、同じ細胞タイプ内でモエシン及び P V - I が共局在すること、及びエズリンが排除されていることが示された。

20

【 0 0 6 0 】

その二重結合特性を考慮すると、モエシンは、窓開き構造発生内のコーディネーターとして作用し得、細胞骨格の調節を、原形質膜のリモデリングへと進ませる。あるいは、窓開き構造多孔板におけるモエシンの構造上の寄与は、T 細胞シナプス [1 0 7] 及び有足細胞足突起 [1 1 5] において生じるように、特定のタンパク質を特別な膜微小ドメインに限定することに関与し得る。モエシンはまた、そのオリゴマー化特性を介して、有窓領域の細胞骨格の支持を与えること、又は、頂端と基底原形質膜との間の密接な連立を維持することにおいて、足場の役割も行い得る。興味深いことに、E R M タンパク質に関連する特別な細胞表面構造の圧倒的多数が、負の膜湾曲の共通特性を有する。腸の微絨毛、不動毛、有足細胞足突起及び膜を裏打ちする窓開き構造の全てが、鋭い負曲率を有する。

30

【 0 0 6 1 】

別の態様において、本発明は、進化的ゲノミクス (比較ゲノミクス) を含む、内皮細胞系において窓開き構造に対する原形質膜マーカーを同定する方法を提供する。利用可能な複数の完全なゲノミクス配列を用いて、比較ゲノミクスアプローチを使用して、有窓の生物において特異的に存在する遺伝子を同定する。比較ゲノミクスから同定された遺伝子を、プロテオミクスから同定されたタンパク質と比較する。共通するものは、窓開き構造の組成又は形成プロセスに関与する可能性が高い遺伝子標的を示す。

40

【 0 0 6 2 】

大量の局所的液体又は巨大分子の交換が必要である生物において窓開き構造が見られ始めた。ヒルの他に、何れの無脊椎動物でも窓開き構造は見られていなかった (C a s l e y - S m i t h , J . R . T h e p h y l o g e n y o f t h e f i n e s t r u c t u r e o f b l o o d v e s s e l s a n d l y m p h a t i c s : s i m i l a r i t i e s a n d d i f f e r e n c e s . L y m p h o l o g y ,

50

1987.20: p. 182 - 188)。窓開き構造が見られているか否かに従い、2種類のクラスに生物を分けた: 即ち、有窓生物及び非有窓生物である。有窓生物には、ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ及びヒルが含まれる。非有窓生物には、酵母、シロイヌナズナ、C.エレガンス(センチュウ)及び*Drosophila*(ショウジョウバエ)が含まれる。図17は、窓開き構造特異的遺伝子を濃縮するための、比較アプローチのVenn Diagramを示す。 10^{-10} のカットオフE値でマッチするもの全てを見出すために、NCBI-BLASTPにより、ヒトのゲノムとゼブラフィッシュのゲノムを比較した。次に、NCBI-BLASTPにより、このマッチをシロイヌナズナゲノムと比較し、 10^{-10} のカットオフE値でマッチするもの全てを排除した。残りの遺伝子を窓開き構造関連遺伝子である可能性のあるものとして標識する。次いで、残りの遺伝子をショウジョウバエ、酵母及びC.エレガンスのゲノムと比較し、 10^{-10} のカットオフE値でマッチするものを排除して、窓開き構造に関与する遺伝子のリストを狭めた。図18は、有窓及び非有窓生物の比較を示す表である。比較ゲノム法及びプロテオミクス法の両方で、ムスクリン、推定RNA結合タンパク質3、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼB及びパラレミンが同定された(図19)。

10

20

30

40

50

【0063】

別の態様において、本発明は、多孔板成分を変化させるための方法に関する。ある実施形態において、多孔板成分を変化させるための方法は、モエシンのドミナントネガティブ型を投与することを含む。ある特定の実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型は、融合タンパク質である。別の特定の実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型は、緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合したモエシンの短縮N末端ドメインを含有する融合タンパク質(N-モエシン/GFP)である、別の特定の実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型をNIH3T3細胞に投与する。別の特定の実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型をbEND5細胞に投与する。

【0064】

ある実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型をbEND5細胞に投与することにより、細胞表面から生じる不規則で分枝した突起の形成を起こす。別の実施形態において、モエシンのドミナントネガティブ型をbEND5細胞に投与することにより、内在性モエシン又は内在性アクチンを欠失させる。

【0065】

図20は、多孔板組成とモエシンのドミナントネガティブ型(N-モエシン/GFP)を関連付ける実験を説明する。最初に、N-モエシン/GFPを誘導NIH3T3又は非誘導bEND5細胞に導入した。原形質膜全体でN-モエシン/GFPが発現され、それにより、細胞表面から生じる不規則で分枝した突起の形成が起こった。N-モエシン/GFPにより、また、細胞が内在性モエシン又はアクチンを欠くようになった。ラトルンクリンAで誘導したbEND5細胞に第二のN-モエシン/GFPを導入し、窓開き構造を形成させたところ、融合タンパク質の発現レベルに依存して、光学顕微鏡により一連の表現型が観察された。

【0066】

低発現細胞では規則的な多孔板が形成され、これは、微小管が豊富な境界に囲まれ、PV-I、モエシン及びアクチンフィラメントの不連続ネットワークを含有した。細胞表面全体でN-モエシン/GFPが発現され、これは、PECAMの存在と一致した。

【0067】

高発現細胞では、内在性モエシン(図20、A-C)、PV-I(図20、D-F)又はアクチンフィラメントの不連続ネットワークを欠く多孔板が形成された。N-モエシン/GFPは、多孔板と形態的に類似した細胞膜の領域に限定された(図20A、20D、20G、20J)。細胞周辺の細い領域で多孔板が生じ、それらを取り囲む、微小管及び細胞小器官が豊富な境界とははっきりと分かれた(図20J-L)。細胞表面全体でのPECAMの発現(図20、G-I)は変化しなかった。

【0068】

図 20 M - O は、光学顕微鏡により見られる影響が G F P のみの存在によるものでないことに對して判断を下す実験を説明する。G F P 含有プラスミド骨格を b E N D 5 細胞で発現させ、窓開き構造を誘導した。高発現誘導細胞において、G F P は、細胞質全体に分布し、多孔板間に存在する微小管及び細胞小器官が豊富な領域に選択的であった（図 20、M）。さらに、多孔板は、P V - I（図 20、M - O）、モエシン及び繊維状アクチンの不連続ネットワークを含有する、定まった組成を与えた。

【0069】

不必要な血管形成及びその他の心血管系疾患と関連して、本来は非有窓である血管床において、窓開き構造が観察される。腫瘍の血管新生、糖尿病性網膜症の網膜血管及び炎症を起こした組織の毛細血管（関節リウマチなど）での窓開き構造の出現は、血管漏出及び浮腫に対する臨床的及び実験的所見と一致し、これにより、窓開き構造が血管透過性の脱制御に關与することが示唆される。窓開き構造直径もまた、肝硬変などの肝機能障害と併せて、及び、子癇前症などの腎臓疾患において変化することがわかった。

10

【0070】

本明細書中で上述したように、窓開き構造の理解に対する最初の細胞生物学的アプローチにおいて、窓開き構造多孔板の新規成分の特徴を調べた。膜 - 細胞骨格アダプター - モエシンと窓開き構造との間の関係は重要な機能的意味を有し、この細胞小器官の発生の研究において新しい道筋を開く。光学顕微鏡による窓開き構造の視覚化に対する重要な段階を遂行した。後で具体的に述べる抗モエシン標識と組み合わせ、P V - 1（カベオラ及び窓開き構造に対して二重特異性を有するマーカー）に対する免疫反応性に基づく窓開き構造の分類がより明確となり得る。さらに、モエシン免疫反応性は、P V - 1 を欠くがモエシンを含有する、隔壁がない毛細血管床を調べるのに有用であり得る。

20

【0071】

実施例

次の実施例は、本発明のある有用な実施形態及び態様を説明するものであり、その範囲を限定するものとして解釈すべきものではない。同様の結果を得るために、代替物及び代替法を利用することができる。

【0072】

試薬

化学物質は全て、別段の断りがない限り、S i g m a - A l d r i c h 及び F l u k a から購入した。カルシウム又はマグネシウム不含のリン酸緩衝食塩水（P B S）、L B 培地、L B - 寒天、E D T A、トリプシン/ヴェルセン、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、L e i b o v i t z L - 15 培地は、C R U K 又は E y e t e c h R e s e a r c h C e n t e r c e n t r a l s e r v i c e s より提供された。

30

【0073】

哺乳動物組織培養

【実施例 1】

【0074】

哺乳動物細胞系の維持

別段の断りがない限り、培地及び関連製品は全て、I n v i t r o g e n より得た。細胞系及び培養条件を表 3 で示す。

40

【0075】

【表 1】

表 3

細胞系	種	由来	継代数	培養条件
bEND5	マウス	脳内皮腫	13-25	ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、4mM L-グルタメート、ペニシリン/ストレプトマイシン、5μM β-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸含有DMEM高グルコース、10%CO ₂ の37℃インキュベーター。
Py4.1	マウス	耳及び尾部血管腫		ピルビン酸ナトリウム、2%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン含有DMEM高グルコース、10%CO ₂ の37℃インキュベーター。
NIH3T3 (ATCC)	マウス	胚		ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、4mM L-グルタメート、ペニシリン/ストレプトマイシン、1.5g/L重炭酸ナトリウム、5%CO ₂ の37℃インキュベーター。
HUVEC (Cascade Biologicals)	ヒト	臍静脈	3-5	M200、少量添加成長血清、ペニシリン/ストレプトマイシン (Cascade Biologicals)。5%CO ₂ の37℃インキュベーター。
SVEC4-10 (ATCC)	マウス	リンパ節	3-5	ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、4mM L-グルタメート、ペニシリン/ストレプトマイシン、1.5g/L重炭酸ナトリウム、10%CO ₂ の37℃インキュベーター。
MEF (マウス胚繊維芽細胞)	マウス	胚	2-3	ピルビン酸ナトリウム、10%FBS Tet system approved (Clontech)、4mM L-グルタメート、2xペニシリン/ストレプトマイシン、1.25μg/mLフンギゾ、10%CO ₂ の37℃インキュベーター。
MEF 3T3 Tet-Off 細胞株 (Clontech)	マウス	胚	3	ピルビン酸ナトリウム、10%FBS Tet system approved (Clontech)、4mM L-グルタメート、ペニシリン/ストレプトマイシン、10%CO ₂ の37℃インキュベーター。

10

20

30

【0076】

トリプシン/ヴェルセン溶液を用いて細胞系を全てトリプシン処理した。あるいは、DMEMで1:1希釈した10xトリプシンEDTA溶液 (Invitrogen) が必要なbEND5及びPy4.1細胞以外は、1xトリプシンEDTA溶液 (Invitrogen) を用いて細胞系をトリプシン処理した。

40

【0077】

9体積の液中でアンプルの内容物を希釈することにより細胞を凍結融解し、300gで細胞を沈殿させ、適切な体積の完全培地でペレットを再懸濁した。10%FBS、20%ウシ胎仔血清 (FBS) 及び完全培地70%中で細胞を凍結し、液体窒素中で保存した。

【実施例2】

【0078】

50

内皮細胞における窓開き構造誘導

内皮細胞において窓開き構造形成を誘導するための方法は、米国暫定特許第60/627,981号(その全体を参照により本明細書中に組み込む。)に記載されている。PBS中の1%ゼラチン(Sigma)溶液で室温にて30分間、カバースリップ及びディッシュを被覆した。100mmディッシュあたり 1.5×10^6 個細胞に相当する密度で、内皮細胞を一晩播種した。10 μ MのサイトカラシンB(Sigma)を用いて2時間、2.5 μ MのラトルンクリンA(Molecular Probes)で3時間、又は組み換えマウス75ng/mL VEGF(R&D Systems)で6から72時間及び10 μ MサイトカラシンBで2時間を組み合わせて、培養物に対する誘導を行った。誘導後すぐに、生化学又は形態学試験のために細胞を処理した。

10

【0079】

窓開き構造形成中のタンパク質合成を阻害するために、10 μ g/mLシクロヘキシミド(Sigma)とともに30分間、細胞をインキュベートし、次いで、VEGF(75ng/mL)で6時間、及びサイトカラシンB(10 μ M)で最後の2時間、誘導を行った。

【0080】

タンパク質技術

【実施例3】

【0081】

タンパク質濃度決定

マイクロタイタープレートにおいて、Bio-Radタンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を求めた。水中で希釈した試料及び水中で希釈したウシ血清アルブミン(BSA)標準物及び試料希釈液をBio-Radタンパク質アッセイ試薬とともに室温にて5分間インキュベートし、分光光度計においてOD₅₉₅で吸収を測定した。BSA標準物質の吸収に基づき標準曲線を作成し、これを使用して、試料に対してタンパク質濃度を決定した。高濃度の界面活性剤を含有する緩衝液中のタンパク質に対して、界面活性剤適合Bio-Radタンパク質アッセイを用い、試料又は標準物を用いて同様にを行い、OD₅₉₅で吸収を測定した。

20

【実施例4】

【0082】

タンパク質沈殿

-80にて80%アセトン(v/v)中でタンパク質を一晩沈殿させ、続いて、4にて30分間、21000gで遠心分離した。所望の体積の緩衝液中でペレットを再懸濁した。

30

【実施例5】

【0083】

陽イオン性コロイドシリカを用いた原形質膜単離

本方法中の全段階を氷上又は予め4に冷却した遠心機中で行った。カルシウム及びマグネシウムを含有するPBS(Invitrogen)で2回、及びコーティング緩衝液(20mM MES、135mM NaCl、0.5mM CaCl₂、1mM MgCl₂、pH5.5)で1回、150mmディッシュ上で増殖させた細胞を洗浄した。次いで、コーティング緩衝液中の1%陽イオン性コロイドシリカ溶液(Donna Stolz教授(University of Pittsburgh)より供与)8mLで2分間、細胞をコーティングした。コーティング緩衝液で1回洗浄した後、pH6.0から6.5に調整したコーティング緩衝液中の1mg/mLポリアクリル酸(Aldrich)溶液8mLで1分間、細胞をオーバーコーティングした。コーティング緩衝液で1回及び細胞溶解緩衝液(完全EDTA不含プロテアーゼ阻害剤錠剤、Rocheを添加した、2.5mM イミダゾール、pH7.0)で1回、細胞を洗浄した後、細胞溶解緩衝液中で15分間インキュベートした。誘導細胞の細胞溶解緩衝液に、2.5 μ MラトルンクリンAを添加し、インキュベーション中、有窓の表現型を維持した。総量2mLの細胞溶解緩衝液

40

50

中で細胞を剥離し、きついペストル付きの7 mL ダウンス型組織グラインダー (Wheaton) 中で20回出し入れすることにより細胞溶解を行った。位相差顕微鏡によって細胞を調べることににより、細胞溶解物を確認した。シリカ被覆原形質膜及び核を900 gで10分間沈殿させた。細胞内膜を得るために、Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman Coulter) のTLA 100.3 ローター中で100,000 gで30分間上清を遠心分離した。Benzonase グレードII (Merck BDH) 20 μ L を添加した細胞溶解緩衝液1 mL 中で原形質膜及び核ペレットを再懸濁し、ダウンス型組織グラインダーにおいて細胞溶解緩衝液中の100% Nycodenz 1 mL とともにホモジェナイズした。細胞溶解緩衝液中の70% Nycodenz の0.5 mL クッション上にホモジェネートを重ね、さらに2 mL 細胞溶解緩衝液の層を加え、その後、Optima L-80 Ultracentrifuge (Beckman Coulter) のSW55 Ti ローター中で60,000 gで30分間、沈殿させた。シリカ被覆原形質膜を含有するペレットを細胞溶解緩衝液で3回洗浄し、シリカ細胞溶解緩衝液 (3.4% SDS、120 mM Tris pH 6.8) 中で15分間シリカ被覆膜を沸騰させることにより、膜タンパク質を可溶化した。残ったシリカを21000 gで沈殿させ、可溶化原形質膜を含有する上清をスナップ凍結し、-80 にて保存した。品質管理の目的で、精製の途中で様々な分画から試料を採取し、シリカ細胞溶解緩衝液中で可溶化し、シリカ被覆原形質膜ペレットとして処理した。150 mm ディッシュをPBSで2回洗浄し、剥離し、細胞を200 gで沈殿させ、上述のような300 μ L シリカ細胞溶解緩衝液中でペレットを細胞溶解することにより、全細胞溶解物を調製した。可溶化細胞分画の等量に、それぞれ0.1 M 及び5%の最終濃度までDTT 及びグリセロール (EM Science) を添加し、SDS-PAGE ゲル電気泳動で分離した。

10

20

【実施例6】

【0084】

細胞の段階的抽出 (differential extraction)

60 mm ディッシュで増殖させた細胞をPBSで素早く洗浄し、次いで、抽出緩衝液 (10 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、2 mM EDTA、完全EDTA - 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤、Roche 及び0.1%、0.2%、0.5% 又は1% Triton X100、EM Science) 0.5 mL を用いて氷上で30分間抽出した。細胞を剥離し、4 にて30分間21000 gで遠心分離することにより、不溶性物質を沈殿させた。界面活性剤可溶物質をアセトン沈殿させ、沈殿可溶性物質又は不溶性物質の何れかから回収したペレットを同体積の1x SDS 試料緩衝液中で再懸濁し、SDS-PAGE ゲル電気泳動で分離した。

30

【実施例7】

【0085】

免疫沈降

100 mm ディッシュで増殖させた細胞をPBSで素早く洗浄し、次いで免疫沈降緩衝液1 mL とともに氷上で30分間インキュベートした。次の免疫沈降緩衝液を用いた：

IP 緩衝液1：20 mM Tris HCl pH 7.5、0.1% Triton X100 (EM Science)、10% グリセロール (EM Science)、完全EDTA - 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤 (Roche)；

IP 緩衝液2：10 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% NP-40、1 mM DTT、完全EDTA - 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤 (Roche)；

RIPA 緩衝液：10 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1% Triton X100 (EM Science)、0.5% SDS、5% デオキシコル酸ナトリウム、完全EDTA - 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤 (Roche)；

段階的抽出緩衝液：10 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、2 mM EDTA、完全EDTA - 不含プロテアーゼ阻害剤錠剤 (Roche)、0.1% Tr

40

50

iton X100 (EM Science)。

【0086】

細胞を剥離し、4 にて30分間21000gで遠心分離することにより、不溶性物質を沈殿させた。上清のタンパク質濃度を測定し、細胞溶解物500μgを抗体5μgとともに4 にて一晚インキュベートした。免疫沈降緩衝液でタンパク質GセファロースTM 4 Fast Flow (Amersham Biosciences) ビーズを3回洗浄し、1:20 (v/v) 希釈で、細胞溶解物を4 にて1時間インキュベートした。4 にて16000gで5分間遠心分離することにより、免疫複合体及びビーズを分離した。このビーズを免疫沈降緩衝液で3回洗浄し、2xSDS試料緩衝液40μLとともに10分間沸騰させることにより、免疫複合体を溶出させ、SDS-PAGEゲル電気泳動により分離した。

10

【実施例8】

【0087】

V1.6.1次元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Bio-Radミニゲルアセンブリキット及びNational Diagnosticからのアクリルアミド溶液を用いて、1から1.5mmの厚さでゲルを注いだ。分離ゲルを次のように調製した(表4参照)：

【0088】

【表2】

20

表4

最終アクリルアミド 濃度	ProtoGel (ml)	分解緩衝液 (mL)	脱イオン化H ₂ O (ml)
6%	2	2.5	5.39
8%	2.67	2.5	4.72
10%	3.33	2.5	4.06
12%	4	2.5	3.39
15%	5	2.5	2.39

30

【0089】

ゲル溶液10mLにつき、10%APS (Sigma) 100μL及び10μL TEMED (Sigma) を添加して、重合化を促進した。

【0090】

1.3mL ProtoGel、2.5mL ProtoGelスタッキング緩衝液、6.1mL 脱イオン化H₂O及び同量のAPS及びTEMEDを上述のように混合することにより、スタッキングゲルを調製した。

40

【0091】

0.35M Tris HCl、pH6.8、10%SDS、0.6M DTT、30%グリセロール及び0.012%プロモフェノールブルーを含有する6x保存溶液として、SDS試料緩衝液を調製した。1x又は2x試料緩衝液中で95 にて5分間試料を煮沸した後、ゲルに載せた。

【0092】

Tris-グリシン緩衝液(25mM Tris、250mMグリシン、pH.3、0.1%SDS)中で、70-180Vでゲルの泳動を行った。

【実施例9】

50

【0093】

ウェスタンブロッティング

電気泳動による分離後、セミドライブロッター (Bio-Rad) を用いて、タンパク質を HybondTM (Amersham Biosciences) ニトロセルロース膜上にブロットした。トランスファー緩衝液 (400 mL の総体積中、80 mL MeOH、32 mL Tris - グリシン緩衝液、10% SDS 溶液 0.4 mL) 中に20分間、膜及びWhatmanペーパー片を予め浸漬しておいた。トランスファー緩衝液中でゲルを短時間インキュベートした後、6枚のWhatmanペーパーの間に、膜を電気ブロッティング装置の陽極に向けて、ゲル及び膜をサンドイッチ状に挟んだ。ゲルあたり120 mA で1時間 (1 mm の厚さのゲル) 又は1.5時間 (1.5 mm の厚さのゲル)、トランスファーを行った。ブロッティング緩衝液 (PBS 中5% 非脂肪ドライミルク) とともに、室温にて2時間、又は4 にて一晩、ブロットをインキュベートした。ブロッティング緩衝液中で一次抗体を希釈し、室温にて1 - 2時間、又は4 にて一晩、一次抗体を適用した。次の一次抗体を用いた：マウス抗GS28 (1:100; BD Biosciences)、ウサギ抗PV1 (1:1000; CRUK)、ラット抗MECA-32 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗チューブリン (1:5000; Sigma)、マウス抗アクチン (1:2000; クローンAC-74; Sigma)、マウス抗カベオリン1 (1:1000; BD Biosciences)、ヤギ抗モエシン (1:1000; Santa-Cruz)、マウス抗モエシン (1:1000; BD Biosciences)、ヤギ抗ラジキシン (1:1000; Santa-Cruz)、マウス抗エズリン (1:1000; Sigma)、ウサギ抗p-モエシン (1:1000; Santa-Cruz)、ウサギ抗コフィリン (1:1000; Cytoskeleton)、マウス抗アネキシンII (1:1000; BD Biosciences)、ヤギ抗エノラーゼ α (1:100; Santa-Cruz)、ヤギ抗hnRNP K (1:100; Santa-Cruz)、ウサギ抗メルリン (1:1000; Dr. Wallace Ip (University of Cincinnati) より供与)、マウス抗GM130 (1:250; BD Biosciences)、ラット抗VE-カドヘリン (1:1000; BD Biosciences)。ブロッティング緩衝液中で5分間の洗浄を3回行った後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体を同様に希釈し、室温にて1時間適用した：ヒツジ抗マウスIgG (1:1000; Amersham Biosciences)、ロバ抗ウサギIg (1:1000; Amersham Biosciences)、ヤギ抗ラット (1:1000; Amersham Biosciences)、ウサギ抗ヤギ (1:2000; Jackson ImmunoResearch)。ブロッティング緩衝液中でブロットを2回洗浄し、最後にPBSで1回洗浄した。強化化学発光 (Amersham Biosciences) によりHRP反応産物を検出した。WINDOWS用のScion Image (Scion Corporation) を用いて、バンドの密度定量を行った。

10

20

30

【実施例10】

【0094】

40

等電点電気泳動及び二次元SDS-PAGE電気泳動

シリカ被覆原形質膜から溶出させたタンパク質をアセトン沈殿させ、40 mM Tris、7 M 尿素、2 M チオ尿素及び1% 一般用界面活性剤、pH 10.4 (細胞膜及び細胞小器官膜溶解試薬; Sigma) 中で可溶化し、トリブチルホスフィンで還元し、10 mM アクルアミド (acrlamide) で室温にて90分間アルカリ化した。2回目のアセトン沈殿後、7 M 尿素、2 M チオ尿素及び2% CHAPSでペレットを可溶化し、11 cm pH 3 - 10 固定化pH勾配 (IPG) ストリップ (Proteome Systems, Sydney, NSW, Australia) において、タンパク質40 μ g をIEFにかけた。IEF後、6 M 尿素、2% SDS、50 mM Tris - アセトン緩衝液 (pH 7)、0.01% プロモフェノールブルー中でIPGストリップを平衡化し、

50

6 - 15 % Gel ChipsTM (Proteome Systems) におけるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルは全て、Sypro^(R) Ruby (Molecular Probes) 中で染色し、蛍光撮像装置 (Alpha Innotech) においてCCDカメラにより撮像した。

【実施例 11】

【0095】

タンパク質消化、MALDI分析及びバイオインフォマティクスデータベース検索

タンパク質スポットを自動的に検出し、Xcise装置 (Shimadzu Biotech) を用いて切り出した。150 μ L 25 mM重炭酸アンモニウム、pH 8.2、50 % v/vアセトニトリルでゲル片を2回洗浄し、次いで、100 %アセトニトリルを添加することにより脱水し、風乾した。20 μ g/mol重炭酸アンモニウムの2 mM中のトリプシン (Promega) を各ゲル片に添加し、30 にて16時間インキュベートした。超音波破碎によりペプチドを抽出した。溶液を自動的に脱塩し、Xcise装置上でZip Tips (Millipore) を用いて濃縮し、Axima (Kratos) MALDI 標的プレート上にスポットティングした。Axima CFR (Kratos) を用いてマトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) により、トリプシン処理ペプチドのペプチド質量フィンガープリントを作製した。

10

【0096】

バイオインフォマティクスツールのBioinformatics統合スイート (Proteome Systems) により、スペクトルを自動的に分析した。NCBIの理論的トリプシン消化物を含むデータベース及びSwiss Prot配列データベースとピークリストを比較することにより、タンパク質識別を割り当てた。%範囲、MOWSEスコア、ペプチドマッチの数、ピーク強度及び、2Dゲル上のタンパク質の位置とのpI及び分子量の一致を基にして、タンパク質の同一性を評価した。

20

【0097】

免疫標識

【実施例 12】

【0098】

固定又は非固定マウス切片における免疫組織化学

- 20 のメタノール中でスライドを10分間透過処理し、湿度室でブロッキング溶液 (10 % ロバ又はヤギ血清 (Sigma)、0.5 % Triton X100、1 % ウシ血清アルブミン (Sigma)、PBS) 中で30分間ブロッキングした。次の一次抗体を使用した：ヤギ抗モエシン (1 : 25 ; Santa-Cruz)、ウサギ抗エズリン (1 : 100 ; Upstate)、ラット抗MECA-32 (1 : 100 ; Developmental Studies Hybridoma Bank)、ラット抗マウスCD31 (1 : 300 ; クローンMEC13.3 ; BD Biosciences)。一次抗体溶液80 μ Lを各スライドに湿度室にて1時間適用した。各5分ずつ3回、血清不含のブロッキング溶液中でスライドを洗浄した。二次抗体Alexa488 - 標識ヤギ抗ウサギ又は抗ラットIgG (1 : 1000 ; Molecular Probes)、Alexa633 標識ヤギ抗ラットIgG (1 : 500 ; Molecular Probes) 及びCy3 - 標識ロバ抗ヤギIgG (1 μ g/mL、Jackson ImmunoResearch) に対して、同じように行った。ネガティブ対照として、一次抗体を省き、通常の方法で二次抗体インキュベーションを行った。3回洗浄した後、DAPI入りのベクタシールド (Vector Laboratories Inc.) を用いてスライドを載せた。

30

40

【実施例 13】

【0099】

カバースリップでの免疫蛍光法

- 20 メタノール中で8分間、又は室温にて4 % パラホルムアルデヒドで15分間の

50

何れかで、カバースリップ上の細胞を固定した。パラホルムアルデヒド固定した細胞の場合、固定後、PBS中で5回洗浄し、PBT(0.1% Triton X100、PBS)中で3分間透過処理した。ブロッキング溶液(10%ヤギ又はロバ血清(Sigma)、0.2%魚皮ゼラチン(Sigma)、PBS)中でカバースリップを15分間ブロッキングした。次のように、ブロッキング溶液中で一次抗体を希釈した：ラット抗MECA-32(1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗チューブリン(1:500; Sigma)、マウス抗アクチン(1:200; クローンAC-74; Sigma)、マウス抗カベオリン1(1:100; BD Biosciences)、ウサギ抗カベオリン(1:100; BD Biosciences)、ヤギ抗モエシン(1:50; Santa-Cruz)、マウス抗モエシン(1:100; BD Biosciences)、ヤギ抗ラジキシン(1:25; Santa-Cruz)、ウサギ抗エズリン(1:100; Upstate)、マウス抗エズリン(1:100; Sigma)、ウサギ抗p-モエシン(1:100; Santa-Cruz)、ウサギ抗コフィリン(1:100; Cytoskeleton)、マウス抗アネキシンII(1:100; BD Biosciences)、ヤギ抗エノラーゼ α (1:100; Santa-Cruz)、ヤギ抗hnRNP K(1:100; Santa-Cruz)、ヤギ抗nm23H2(1:100; Santa-Cruz)、ウサギ抗メルリン(1:100; Dr. Wallace Ip (University of Cincinnatiより供与)、マウス抗GM130(1:100; BD Biosciences)。パラフィルム片上の一次抗体溶液50 μ Lにカバースリップを裏返しにして載せ、室温にて30分間インキュベートし、最後に各5分間ずつ3回、血清不含のブロッキング溶液中で洗浄した。次の二次抗体に対して同様の手段を行った：Alexa488標識ヤギ抗ラット、抗マウス、又は抗ウサギIgG(1:1000; Molecular Probes)、Alexa633標識ヤギ抗ラット又は抗マウスIgG(1:500; Molecular Probes)、Alexa546標識ヤギ抗ウサギIgG(1:500; Molecular Probes)、Cy3標識ロバ抗ヤギIgG(1 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch)、Cy3標識ロバ抗ラットIgG(0.5 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch)。F-アクチンを視覚化するために、Alexa546-、Alexa488-又はAlexa633標識ファロイジン(1:50; Molecular Probes)を二次抗体調製物に添加した。Alexa488標識DNaseI(1:500; Molecular Probes)を用いてG-アクチンを検出した。ネガティブ対照として、一次抗体を省き、二次抗体インキュベーションを通常通り行った。血清不含のブロッキング溶液中で各5分間ずつ3回洗浄した後、DABCO(Sigma)入りのMOWIOL(Calbiochem)を用いてスライドにカバースリップを載せた。

【実施例14】

【0100】

走査電子顕微鏡のための生細胞標識

カバースリップ上の細胞を素早く氷上に移し、ブロッキング溶液(Leibovitz L-15培地、0.2%グリシン、1.5% FBS)とともに30分間インキュベートし、その後、抗体希釈液(L15培地、1% BSA、0.25%魚皮ゼラチン)中の一次抗体を用いて30、免疫標識した。次の一次抗体を用いた：ウサギ抗PV1(1:400; CRUK)、ラット抗マウスPECAM(1:100; クローンMEC13.3; BD Biosciences)。L15培地中で細胞を3回洗浄し、次のように、抗体希釈液中で希釈した二次抗体とともに45分間インキュベートした：EMヤギ抗ウサギIgG10nm Gold(1:40; BBI International)、EMヤギ抗ラットIgG5nm Gold(1:40; BBI International)。L15培地中で3回洗浄した後、0.08Mカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中の3%グルタルアルデヒド及び1%パラホルムアルデヒド中で細胞を2時間固定した。

【実施例15】

【0101】

ペプチド競合

抗体に対するペプチドの10000:1モル比で、抗体を作製したペプチド(モエシンペプチド; BD Biosciences)又は無関係のペプチド(SNAP-25; BD Biosciences)を用いて抗体をインキュベートすることにより、マウス抗モエシン抗体のペプチド競合を行った。室温にて4-5時間、穏やかに回転させながら複合体をインキュベートし、Optima TLX 超遠心機(Beckman Coulter)のTLA 100.3ローターにおいて、16にて1時間、100000gで遠心分離した。上述のように免疫蛍光法に対して上清を使用した。

【実施例16】

【0102】

光学顕微鏡

次の機器及びソフトウェアパッケージを用いて画像を捉えた:

- 1) LSM510レーザー走査共焦点顕微鏡(Zeiss); 63x1.40 NA Plan-Achromat油浸対物
- 2) TCS SP2スペクトル共焦点顕微鏡(Leica); 40x1.25 NA Plan-Achromat油浸対物; 63x1.4 NA Plan-Achromat油浸対物; 100x; Leica共焦点ソフトウェアバージョン2.5
- 3) Widefield DMRA4顕微鏡(Leica); orca ER2カメラ(浜松フオトニクス); Metamorphソフトウェア(Universal Imaging Corporation)
- 4) MZFL IIII蛍光実体顕微鏡(Leica); Retiga Camera (Q-Imaging); OpenLab3.1.7 (Improvision, Inc.)

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.)を用いてデジタル画像を処理した。

【0103】

電子顕微鏡

【実施例17】

【0104】

走査電子顕微鏡

2%パラホルムアルデヒド(EMグレード; Electron Microscopy Sciences)、2.5%グルタルアルデヒド(Sigma)、0.1M カコジル酸ナトリウム中で室温にて1時間、カバースリップ上の細胞を固定し、その後、2%パラホルムアルデヒド、0.1M カコジル酸ナトリウム中で維持した。処理の準備ができた後、0.1M カコジル酸ナトリウム中でそれらを2回洗浄し、カコジル酸緩衝液中の1%四酸化オスミウム(Agar Scientific Ltd.)中で後固定した。蒸留水中で2回洗浄した後、一連のエタノール溶液(50%、60%、70%、80%、90%、100%、100%、それぞれ5分ずつ)で脱水した。ヘキサメチルジサラザン(HMDS; Sigma)中に5分間、2回浸漬し、フィルターペーパー上に置いて、乾燥させた。

【0105】

1%四酸化オスミウム水溶液を用いて、生細胞標識後に固定した細胞を1時間、後固定し、水中で1回洗浄し、濃度が上昇していく一連のエタノール(50%、70%、90%、100%、100%、100%、それぞれ5分ずつ)により脱水した。上述のようにHMDSを用いて乾燥させた。

【0106】

カーボン接着マウント(Agar Scientific Ltd)を用いて、10mmスタブ(Agar Scientific Ltd)にカバースリップを載せた。シルバダグ(Silver dag) (Agar Scientific Ltd)を片方

10

20

30

40

50

の端に添加した。Polaron SC7640 High Resolution Sputter Coater中の金又は、Gatan 681 Ion Beam Coater中のカーボンで標本を被覆し、JEOL JSM-6700電界放出走査EM下で調べた。

【0107】

透過型電子顕微鏡

【実施例18】

【0108】

ホールマウントTEM

二塩化エチレン(Gilder; Electron Microscopy Sciences)中の0.5%Formvar(Ted Pella, Inc.)溶液中で400メッシュニッケルグリッド(Gilder; Electron Microscopy Sciences)を被覆することによりホールマウントTEMに対するFormvarグリッドを用意した。カバースリップ上にグリッドを置き、BAF400D High Vacuum Freeze-Etching System(Balzers)においてカーボン被覆し、細胞培養において使用する前にUV殺菌した。

【0109】

0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液中の1.25%グルタルアルデヒド(Electron Microscopy Sciences)及び2.5%パラホルムアルデヒド(Electron Microscopy Sciences)中で細胞を室温にて1時間、又は4にて一晚固定した。0.2Mカコジル酸ナトリウム中で5分間の洗浄を3回行った後、カコジル酸緩衝液中の1%四酸化オスミウム(Electron Microscopy Sciences)中で30分間細胞を後固定した。0.2Mカコジル酸ナトリウム中でさらに2回洗浄し、蒸留水中で2回洗浄した後、濃度が上昇していく一連のエタノールで細胞を脱水した。この脱水は、50%、70%及び85%エタノール中で5分間のインキュベーションを1回、及び95%及び100%エタノール中で5分のインキュベーションを2回行うことにより行った。HMDS中に3分間カバースリップを浸漬し、風乾させた。AMTデジタル捕捉システムを備えたJEOL1010TEM下でグリッドを調べた。

【実施例19】

【0110】

薄片のTEM

予め65に温めた寒天(Electron Microscopy Science s)に5µLガラスピペットを浸し、氷上で冷却することにより寒天チューブを調製した。細胞溶解緩衝液及び2×EM固定液(5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド、0.2Mカコジル酸ナトリウム)の等量中で4にて20分間、900gで遠心分離することにより、シリカ被覆原形質膜を固定した。膜ペレットを再懸濁し、処理の準備ができるまで、2%パラホルムアルデヒド、0.2Mカコジル酸ナトリウム中で保存した。900gで30分間遠心することにより、保存した膜を0.2Mカコジル酸ナトリウム中で2回洗浄した。寒天チューブ中に膜を置き、温かい寒天で密封した。膜の入ったチューブを0.2Mカコジル酸ナトリウムで10分間洗浄し、0.1Mカコジル酸ナトリウム中の1%四酸化オスミウムで1時間、後固定した。0.2Mカコジル酸ナトリウムで10分間、2回洗浄し、蒸留水で1回洗浄した後、濃度が上昇していく一連のアセトン(50%、70%、85%、95%及び100%)で標本を脱水した。インキュベーションを7分間続け、一方で、95%及び100%アセトン段階を2回行った。2部のアセトン及び1部の凍結spurs樹脂の混合物を用いて45分間、次いで、1部のアセトン及び2部の凍結spurs樹脂の混合物を用いて60分間、標本の浸透を行った。最後に、100%の新鮮なspurs樹脂を用いて室温にて一晚浸透を行った。モールドにチューブを置き、60にて一晚インキュベートを行った。Ultracut UCT(Leica)を用いて切った70-100nm厚の切片を200又は300メッシュの銅グリッド(G

10

20

30

40

50

ilder; Electron Microscopy Sciences) 上に置いた。酢酸ウラニル (Ted Pella, Inc.) で 20 分間及び Reynolds 染色 (硝酸鉛 (Ted Pella, Inc.) 及びクエン酸ナトリウム (Sigma) から調製。) で 2 分間、グリッドを染色し、その後、TEM 下で調べた。

【実施例 20】

【0111】

電子顕微鏡に対する立体学

10000 の倍率で 20 から 30 の SEM 画像を捉えた。カバースリップの中央から開始して、一方向にそって系統的に無作為にサンプリングし、200 μm ごとに画像を捉えた。細胞構造の占有が 50 % 未満である画像を消去した。グリッド (2 cm x 2 cm 四方) を各画像に重ね、多孔板上にあるグリッドの点の数 (1 群中 10 個を超える窓開き構造) に対して、何らかの細胞構造上にあるグリッドの点の数を数えた。次の式を用いて、窓開き構造の存在量を概算した：窓開き構造でカバーされる原形質膜の割合 = 多孔板上にあるグリッドの点の数 / 何らかの細胞構造上にあるグリッドの点の数。

【0112】

窓開き構造の密度を測定するために、10 個の無作為多孔板中の μm^2 あたりの窓開き構造の数を計算した；窓開き構造によりカバーされる原形質膜の割合をこれに乘じ、 μm^2 原形質膜あたりの窓開き構造の密度を概算した。

【0113】

ホールマウント TEM を用いた窓開き構造定量に対して、25000 の倍率で画像を捉えた。ニッケルグリッドあたり 12 の画像を得て、試験あたり 3 つのニッケルグリッドを調べた。Adobe Photoshop 7.0 で画像を開き、169 個の点がある 15 mm グリッドを各画像に重ねた。SEM に対する立体的アプローチにおけるものとして、窓開き構造の存在量を計算した。

【実施例 21】

【0114】

比較ゲノミクス

10^{-10} のコンピュータプログラム NCBI-BLASTP (Altschul, S. F. ら、Gapped BLAST 及び及び PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997. 25 (17): p 3389 - 3402) を使用してアラインメントを行い、blosum62 アミノ酸置換行列 (Henikoff, S. 及び J. G. Henikoff. Amino acid substitution matrices from peptide blocks. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. 89: p 10915 - 10919) を用いた。ホモサピエンス、ゼブラフィッシュ、C. エレガンス、ショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) のタンパク質配列データベースを Ensembl (Hubbard, T ら、Ensembl 2005. Nucleic Acids Res. 2005. 33: p D447 - D453) からダウンロードした。窓開き構造形成の有無により、これらの生物をグループ分けした。 10^{-10} のカットオフ E 値で BLASTP を用いて、ヒトにおけるタンパク質全てをゼブラフィッシュのタンパク質と比較した。この比較から、26476 遺伝子のデータセットが得られた。次に、これらのタンパク質をシロイヌナズナ、酵母、C. エレガンス及びショウジョウバエのタンパク質全てと比較した。非有窓生物においてマッチがある遺伝子を候補から除外し、有窓生物に存在し、かつ、非有窓生物に存在しない遺伝子のみを残した。有窓生物に特異的な代表的遺伝子として、6661 個の遺伝子が同定された。次に、遺伝子データセットをプロテオミクス研究により同定されたタンパク質と比較した。 10^{-10} の E 値カットオフで BLASTP プログラムを用いた。比較ゲノミクスとプロテオミクス法との間で、次の 4 種類のタンパク質が共通であるとして同定された：ムスクリン、推定 RNA 結合タンパク質 3、ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ B 及びパラレミン。

【 0 1 1 5 】

【 表 3 】

参考文献

1. Stan, R.V., M. Kubitza, and G.E. Palade, *PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13203-7.
2. Stan, R.V., *Multiple PV1 dimers reside in the same stomatal or fenestral diaphragm*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(4): p. H1347-53. 10
3. Ghitescu, L.D., P. Crine, and B.S. Jacobson, *Antibodies specific to the plasma membrane of rat lung microvascular endothelium*. Exp Cell Res, 1997. **232**(1): p. 47-55.
4. *Subcellular Fractionation, in Cells A Laboratory manual*. 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 34.1-34.9.
5. Jacobson, B.S. and D. Branton, *Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads*. Science, 1977. **195**(4275): p. 302-4.
6. Chaney, L.K. and B.S. Jacobson, *Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 10062-72. 20
7. Stolz, D.B. and B.S. Jacobson, *Examination of transcellular membrane protein polarity of bovine aortic endothelial cells in vitro using the cationic colloidal silica microbead membrane-isolation procedure*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 1): p. 39-51.
8. Mason, P.W. and B.S. Jacobson, *Isolation of the dorsal, ventral and intracellular domains of HeLa cell plasma membranes following adhesion to a gelatin substrate*. Biochim Biophys Acta, 1985. **821**(2): p. 264-76.
9. Simionescu, N., M. Simionescu, and G.E. Palade, *Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I. Preferential distribution of anionic sites*. J Cell Biol, 1981. **90**(3): p. 605-13. 30
10. Schnitzer, J.E., et al., *Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1435-9.
11. Schnitzer, J.E., et al., *Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1759-63.
12. Rout, M.P., et al., *The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 635-51. 40
13. Garin, J., et al., *The phagosome proteome: insight into phagosome functions*. J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 165-80.

14. Mootha, V.K., et al., *Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria*. Cell, 2003. **115**(5): p. 629-40.
15. Andersen, J.S., et al., *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 570-4.
16. Kleffmann, T., et al., *The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions*. Curr Biol, 2004. **14**(5): p. 354-62.
17. Andersen, J.S., et al., *Directed proteomic analysis of the human nucleolus*. Curr Biol, 2002. **12**(1): p. 1-11. 10
18. Dreger, M., et al., *Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 11943-8.
19. Bell, A.W., et al., *Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5152-65.
20. Fialka, I., et al., *Subcellular fractionation of polarized epithelial cells and identification of organelle-specific proteins by two-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1997. **18**(14): p. 2582-90.
21. Stolz, D.B., G. Bannish, and B.S. Jacobson, *The role of the cytoskeleton and intercellular junctions in the transcellular membrane protein polarity of bovine aortic endothelial cells in vitro*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 1): p. 53-68. 20
22. Oh, P., et al., *Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy*. Nature, 2004. **429**(6992): p. 629-35.
23. Durr, E., et al., *Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(8): p. 985-92.
24. Steffan, A.M., J.L. Gendrault, and A. Kim, *Increase in the number of fenestrae in mouse endothelial liver cells by altering the cytoskeleton with cytochalasin B*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1230-8. 30
25. Braet, F., et al., *Structure and dynamics of the fenestrae-associated cytoskeleton of rat liver sinusoidal endothelial cells*. Hepatology, 1995. **21**(1): p. 180-9.
26. Braet, F., et al., *Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B*. Hepatology, 1996. **24**(3): p. 627-35.
27. Eriksson, A., et al., *Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability*. Circulation, 2003. **107**(11): p. 1532-8. 40
28. Yokomori, H., et al., *Rho modulates hepatic sinusoidal endothelial fenestrae via regulation of the actin cytoskeleton in rat endothelial cells*. Lab Invest, 2004. **84**(8): p. 1079.
29. Bamburg, J.R., *Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 185-230.

30. Paavilainen, V.O., et al., *Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(7): p. 386-94.
31. Palmgren, S., M. Vartiainen, and P. Lappalainen, *Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 5): p. 881-6.
32. Lawson, D., M. Harrison, and C. Shapland, *Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines*. Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **38**(3): p. 250-7.
33. Shapland, C., et al., *Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein*. J Cell Biol, 1993. **121**(5): p. 1065-73. 10
34. Tuxworth, R.I. and M.A. Titus, *Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay*. Traffic, 2000. **1**(1): p. 11-8.
35. Sellers, J.R., *Myosins: a diverse superfamily*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 3-22.
36. Endow, S.A., *Kinesin motors as molecular machines*. Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1212-9.
37. Mundy, D.I., et al., *Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 22): p. 4327-39. 20
38. Gatmaitan, Z., et al., *Studies on fenestral contraction in rat liver endothelial cells in culture*. Am J Pathol, 1996. **148**(6): p. 2027-41.
39. Palacios, F., et al., *ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 929-36.
40. Kutzleb, C., et al., *Paralemmmin, a prenyl-palmitoyl-anchored phosphoprotein abundant in neurons and implicated in plasma membrane dynamics and cell process formation*. J Cell Biol, 1998. **143**(3): p. 795-813.
41. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 586-99. 30
42. Lopez-Aleman, R., M. Suelves, and P. Munoz-Canoves, *Plasmin generation dependent on alpha-enolase-type plasminogen receptor is required for myogenesis*. Thromb Haemost, 2003. **90**(4): p. 724-33.
43. Moscato, S., et al., *Surface expression of a glycolytic enzyme, alpha-enolase, recognized by autoantibodies in connective tissue disorders*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3575-84.
44. de Hoog, C.L., L.J. Foster, and M. Mann, *RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers*. Cell, 2004. **117**(5): p. 649-62. 40
45. Hegmans, J.P., et al., *Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1807-15.

46. Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud, *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1054-70.
47. Molloy, M.P., et al., *Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis.* Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 701-4.
48. Ferro, M., et al., *Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins.* Electrophoresis, 2000. **21**(16): p. 3517-26.
49. Luche, S., V. Santoni, and T. Rabilloud, *Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis.* Proteomics, 2003. **3**(3): p. 249-53. 10
50. Chevallet, M., et al., *New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis.* Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1901-9.
51. Pedersen, S.K., et al., *Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins.* J Proteome Res, 2003. **2**(3): p. 303-11.
52. Ferro, M., et al., *Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11487-92. 20
53. Wasiak, S., et al., *Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics.* J Cell Biol, 2002. **158**(5): p. 855-62.
54. Simpson, R.J., et al., *Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): development of a membrane protein database.* Electrophoresis, 2000. **21**(9): p. 1707-32.
55. Galeva, N. and M. Altermann, *Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis as a separation tool for proteomic analysis of rat liver microsomes: cytochromes P450 and other membrane proteins.* Proteomics, 2002. **2**(6): p. 713-22.
56. Farsad, K. and P. De Camilli, *Mechanisms of membrane deformation.* Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 372-81. 30
57. Thiele, C., et al., *Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 42-9.
58. Ostrowski, S.G., et al., *Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during Tetrahymena mating.* Science, 2004. **305**(5680): p. 71-3.
59. Musacchio, A., et al., *Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography.* Mol Cell, 1999. **3**(6): p. 761-70.
60. Bi, X., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat.* Nature, 2002. **419**(6904): p. 271-7. 40
61. Takei, K., et al., *Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals.* Nature, 1995. **374**(6518): p. 186-90.

62. Lebel, S. and Y. Raymond, *Lamin B from rat liver nuclei exists both as a lamina protein and as an intrinsic membrane protein*. J Biol Chem, 1984. **259**(5): p. 2693-6.
63. Ferro, M., et al., *Proteomics of the chloroplast envelope membranes from Arabidopsis thaliana*. Mol Cell Proteomics, 2003.
64. Brugiere, S., et al., *The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions*. Phytochemistry, 2004. **65**(12): p. 1693-707.
65. Schirmer, E.C., et al., *Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1380-2. 10
66. Sato, N., et al., *A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 1): p. 131-43.
67. Bretscher, A., *Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 425-32.
68. Tsukita, S. and Y. Hieda, *A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization*. J Cell Biol, 1989. **108**(6): p. 2369-82. 20
69. Lankes, W., et al., *A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation*. Biochem J, 1988. **251**(3): p. 831-42.
70. Trofatter, J.A., et al., *A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor*. Cell, 1993. **72**(5): p. 791-800.
71. Rouleau, G.A., et al., *Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 515-21.
72. Gould, K.L., et al., *cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1*. Embo J, 1989. **8**(13): p. 4133-42. 30
73. Lankes, W.T. and H. Furthmayr, *Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8297-301.
74. Funayama, N., et al., *Radixin is a novel member of the band 4.1 family*. J Cell Biol, 1991. **115**(4): p. 1039-48.
75. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 586-99.
76. Tsukita, S. and S. Yonemura, *Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34507-10. 40
77. Xu, H.M. and D.H. Gutmann, *Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton*. J Neurosci Res, 1998. **51**(3): p. 403-15.

78. Brault, E., et al., *Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain.* J Cell Sci, 2001. 114(Pt 10): p. 1901-12.
79. Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher, *Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells.* J Cell Sci, 1993. 105 (Pt 4): p. 1025-43.
80. Schwartz-Albiez, R., et al., *Differential expression of the microspike-associated protein moesin in human tissues.* Eur J Cell Biol, 1995. 67(3): p. 189-98.
81. Doi, Y., et al., *Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout.* J Biol Chem, 1999. 274(4): p. 2315-21.
82. Kitajiri, S., et al., *Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia.* J Cell Biol, 2004. 166(4): p. 559-70.
83. Amieva, M.R. and H. Furthmayr, *Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts.* Exp Cell Res, 1995. 219(1): p. 180-96.
84. Oshiro, N., Y. Fukata, and K. Kaibuchi, *Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures.* J Biol Chem, 1998. 273(52): p. 34663-6.
85. Gautreau, A., D. Louvard, and M. Arpin, *Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane.* J Cell Biol, 2000. 150(1): p. 193-203.
86. Pujuguet, P., et al., *Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation.* Mol Biol Cell, 2003. 14(5): p. 2181-91.
87. Amieva, M.R., et al., *Disruption of dynamic cell surface architecture of NIH3T3 fibroblasts by the N-terminal domains of moesin and ezrin: in vivo imaging with GFP fusion proteins.* J Cell Sci, 1999. 112 (Pt 1): p. 111-25.
88. Crepaldi, T., et al., *Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells.* J Cell Biol, 1997. 138(2): p. 423-34.
89. Allenspach, E.J., et al., *ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse.* Immunity, 2001. 15(5): p. 739-50.
90. Bretscher, A., et al., *ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. 16: p. 113-43.
91. Berryman, M., R. Gary, and A. Bretscher, *Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis.* J Cell Biol, 1995. 131(5): p. 1231-42.
92. Bretscher, A., R. Gary, and M. Berryman, *Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains.* Biochemistry, 1995. 34(51): p. 16830-7.

93. Matsui, T., et al., *Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association.* J Cell Biol, 1998. 140(3): p. 647-57.
94. Simons, P.C., et al., *C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 253(3): p. 561-5.
95. Fievet, B.T., et al., *Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin.* J Cell Biol, 2004. 164(5): p. 653-9.
96. Gary, R. and A. Bretscher, *Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10846-50.
97. Fukata, Y., et al., *Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase.* J Cell Biol, 1998. 141(2): p. 409-18.
98. Shaw, R.J., et al., *RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts.* Mol Biol Cell, 1998. 9(2): p. 403-19.
99. Kotani, H., et al., *Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells.* Oncogene, 1997. 14(14): p. 1705-13.
100. Mackay, D.J., et al., *Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins.* J Cell Biol, 1997. 138(4): p. 927-38.
101. Takahashi, K., et al., *Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein.* J Biol Chem, 1997. 272(37): p. 23371-5.
102. Speck, O., et al., *Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity.* Nature, 2003. 421(6918): p. 83-7.
102. Pino, R.M., *Restriction to endogenous plasma proteins by a fenestrated capillary endothelium: an ultrastructural immunocytochemical study of the choriocapillary endothelium.* Am J Anat, 1985. 172(4): p. 279-89.
104. Guymer, R.H., A.C. Bird, and G.S. Hageman, *Cytoarchitecture of choroidal capillary endothelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(6): p. 1660-6.
105. Hofer, D. and D. Drenckhahn, *Molecular heterogeneity of the actin filament cytoskeleton associated with microvilli of photoreceptors, Muller's glial cells and pigment epithelial cells of the retina.* Histochemistry, 1993. 99(1): p. 29-35.
106. Bonilha, V.L., S.C. Finnemann, and E. Rodriguez-Boulan, *Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium.* J Cell Biol, 1999. 147(7): p. 1533-48.

107. Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain, *Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin*. Immunity, 2001. 15(5): p. 691-701.
108. Tsukita, S., et al., *ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons*. J Cell Biol, 1994. 126(2): p. 391-401.
109. Vanni, C., et al., *Phosphorylation-independent membrane relocation of ezrin following association with Dbl in vivo*. Oncogene, 2004. 23(23): p. 4098-106.
110. Franck, Z., R. Gary, and A. Bretscher, *Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable*. J Cell Sci, 1993. 105 (Pt 1): p. 219-31. 10
111. Serrador, J.M., et al., *Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization*. J Cell Biol, 1997. 138(6): p. 1409-23.
112. Stickney, J.T., et al., *Activation of the tumor suppressor merlin modulates its interaction with lipid rafts*. Cancer Res, 2004. 64(8): p. 2717-24.
113. Amieva, M.R., K.K. Wilgenbus, and H. Furthmayr, *Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ*. Exp Cell Res, 1994. 210(1): p. 140-4. 20
114. Hugo, C., et al., *The plasma membrane-actin linking protein, ezrin, is a glomerular epithelial cell marker in glomerulogenesis, in the adult kidney and in glomerular injury*. Kidney Int, 1998. 54(6): p. 1934-44.
115. Takeda, T., et al., *Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton*. J Clin Invest, 2001. 108(2): p. 289-301.

【 0 1 1 6 】

参照による組み込み

30

本明細書中で参照する特許及び科学文献は、当業者にとって利用可能な知識を確立する。本明細書中で引用する、全ての交付済み特許、特許出願、公開外国出願及び参考文献は、それぞれが、その全体において参照により組み込まれることが具体的かつ個別に指示されるように同じ程度まで、本明細書中に参照により組み込まれる。

【 0 1 1 7 】

均等物

当業者は、常套的な実験以外のものを使用せずに、本明細書中で具体的に述べられる具体的な実施形態に対する数多くの均等物を認識するか、又は確認するであろう。かかる均等物は、次の特許請求の範囲に包含されるものとする。

【 0 1 1 8 】

この特許の書類は、カラーで作成された少なくとも1個の図面を含有する。カラー図面を伴うこの特許の複写は、リクエスト及び必要料金の支払いにより Patent and Trademark Office より提供される。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 9 】

【 図 1 】 図 1 は、陽イオン性コロイドシリカ単離プロトコールの概略図である。ディッシュ上で陽イオン性コロイドシリカの溶液により細胞を被覆し、続いてポリアクリレートによる被覆によってこれを中和する。次に、ダウンス型ホモジェナイザーを用いて低張緩衝液中で細胞を溶解し、様々な細胞成分を遠心分離する。次いで、ナイコデント勾配を介した超遠心分離段階により、核及びシリカ被覆原形質膜を含有する低速ペレットを分画化し

50

、シリカ被覆原形質膜のペレットを得る。

【図2】図2は、bEND5 (A) 及びPy4.1 (B) 細胞からの陽イオン性コロイドシリカ原形質膜単離の生化学的分析を示す。各分画からのタンパク質10 µgをSDS-PAGE電気泳動及び、指示されたタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにかける。bEND5 及びPy4.1 細胞両方の原形質膜分画において、原形質膜マーカー、PV-I 及びVE-カドヘリンが豊富であり、ゴルジマーカー、GM130 が乏しいことが分かる。

【図3】図3は、非処理 (A) 及びラトルンクリン処理 (B) 内皮細胞からの、原形質膜ペレットのTEM試験を示す。シリカ被覆原形質膜シートは、両ペレットにおいて主要な構造である。バー = 2 µm。

【図4】図4は、高倍率でのシリカ単離原形質膜ペレットのTEM試験を示す。(A) 原形質膜ペレットの全細胞混入物質を横切る横断面。(B) カベオラは、対照内皮細胞の原形質膜とともに損なわれずに単離される。(C) 及び(D) ラトルンクリン処理内皮細胞からの原形質膜の高倍率画像から、シリカマスクが全て膜の微小構造下にあることが示される。

【図5】図5は、免疫蛍光法 (A) 及びウェスタンブロッティング (B) によるプロテオーム分析前の単離原形質膜の品質管理を示す。bEND5 細胞に対する (A) で示される微小管を除く領域での窓開き構造パッチに対するPV-I の特徴的な染色により、窓開き構造誘導が成功したことを観察した。抗PV-1 標識 (i)、抗チューブリン標識 (ii) 及び重ねあわせ (iii) を示す。(B.) 対照 (C) 及びラトルンクリン誘導 (L) Py4.1 (a) 及びbEND5 (b) 細胞の全細胞ホモジェネートに対して、原形質膜及び核 (PM + nu) ならびに原形質膜 (PM) 分画において、PV-I が濃くなり、GS-28 が薄くなることにより、単離プロトコールの成功を観察した。bEND5 細胞において、時間0 (C1) で採取したさらなる対照をビヒクル誘導試料 (C2) と区別することができる。

【図6】図6は、bEND5 (A 及びB) ならびにPy4.1 (C 及びD) 細胞由来の、ビヒクル誘導対照 (A 及びC) 及びトルンクリン誘導 (B 及びD) 試料からの代表的な2Dゲルを示す。

【図7】図7は、Progenesisソフトウェアを用いたスポット強度計算を示す。(A) は、Py4.1 細胞分析からのスポット659を示し、対照試料 (480a、396a、560a、508a) と比較して、ラトルンクリン誘導試料 (520b、550b、561b) において1.772 倍高いものとして認識される。(B) は、Py4.1 細胞分析からのスポット401を示し、これは、ラトルンクリン誘導試料において3.8 倍高いことが認められるが、実際は、同じタンパク質の異なるリン酸化状態の特徴となる一連のスポットの一部である。

【図8】図8は、細胞内局在 (A) 及び機能 (B) に関する、候補タンパク質の分類を示す。複数のカテゴリーに分類されるタンパク質については、これらの間で値を分けた。同じタンパク質について複数のアイソフォーム又はポリペプチド鎖が同定された場合、タンパク質は一度だけカウントした。

【図9】図9は、ウェスタンブロッティングによる候補タンパク質の妥当性を示す画像を示す。CPM (対照細胞の原形質膜) 及びLPM (ラトルンクリン誘導細胞の原形質膜) からのタンパク質の等量をSDS-PAGE電気泳動で分離し、指示されるタンパク質をウェスタンブロッティングにより確認した。bEND5 細胞分析からの標的を (A) で示し、Py4.1 細胞分析からのものを (B) で示す。リン酸化モエシン、hnRNP K、コフィリン及びα-エノラーゼについて、誘導細胞での濃縮を確認する。α-エノラーゼ及びコフィリンについての、対照全細胞-ホモジェネートと誘導細胞の全細胞-ホモジェネートとの間の濃縮 (CW、LW) に対する、対照膜分画と誘導細胞膜分画との間の濃縮 (CPM、LPM) の比較を (C) で示す。細胞内膜 (CIM、LIM) 及び原形質膜及び核 (CPM + N、LPM + N) についてのバンドもまた、コフィリンに対して示される。

10

20

30

40

50

【図 1 0】図 1 0 は、免疫蛍光法による候補タンパク質の妥当性を示す画像を示す。P V - I (A 、 D 、 G 、 J) 及び次の候補タンパク質：コフィリン (B) 、 アネキシン (E) 、 ラジキシン (H) 及びモエシン (K) に対して、誘導 b E N D 5 細胞を染色した。対応する重ね合わせ (C) 、 (F) 、 (I) 、 (L) から、ラジキシン及びモエシンが、P V - I で標識される同じパッチに局在し、一方、コフィリン及びアネキシンがこれらの領域には存在しないことが示される。

【図 1 1】図 1 1 は、窓開き構造パッチ内の E R M ファミリーの分布を示す。モエシン (A) 、 エズリン (D) 、 メルリン (G) 及びラジキシン (J) について誘導 b E N D 5 細胞を免疫染色し、窓開き構造の位置をマークするために抗 P V - 1 (B 、 E 、 H 、 K) で対比染色を行った。抗体の組み合わせの重ね合わせを C 、 F 、 I 、 L で示す。モエシン (A) 及びラジキシン (J) は、P V - 1 染色とともに、窓開き構造 (B 、 C) 及び (K 、 L) にそれぞれ共局在すると思われ、一方、エズリン (D) 及びメルリン (G) は、それぞれ細胞 (E 、 F) 及び (H 、 I) の P V - I 陽性領域にはないと思われる (倍 = 2 0 μ m) 。

【図 1 2】図 1 2 は、インビボでの E R M ファミリーメンバーの分布を示す。モエシン (A 、 E) 、 エズリン (B 、 F) 及び P V - I (C 、 G) に対する抗体を用いて、マウスの眼の切片における免疫組織化学を行った。低倍率 (D) 及び高倍率 (H) の重ね合わせで見られるように、脈絡毛細管枝でモエシンが P V - I と共局在する一方で、エズリンは、網膜色素上皮層に限定される。脈絡毛細管枝下の強膜において、モエシンとエズリンはある程度一致すると思われる。

【図 1 3】図 1 3 は、プロテオーム分析に使用した試料をまとめた表である。

【図 1 4 A】図 1 4 は、減法プロテオーム分析からの、各試料におけるスポットについてタンパク質識別の割り当ての表である。

【図 1 4 B】図 1 4 は、減法プロテオーム分析からの、各試料におけるスポットについてタンパク質識別の割り当ての表である。

【図 1 5】図 1 5 は、質量分析のために選択し、切り出したスポットの強度を、付随の倍数差及び p 値とともにまとめた表である。

【図 1 6】図 1 6 は、機能により分類した候補タンパク質をまとめた表である。カラム L 対 C 2 (1) 、 L 対 C 2 (2) 及び L 対 C 2 (3) は、b E N D 5 細胞実験 1 、 2 及び 3 についてそれぞれ行われた個々のパッチ分析におけるスポット強度の倍数変化を指す。ハイライトを付したものは、切り出し及びそれに続くタンパク質含量同定に対する特定スポットの選択を決定する倍数変化である。

【図 1 7】図 1 7 は、窓開き構造特異的遺伝子に対する比較ゲノムアプローチを説明する V e n n D i a g r a m である。V e n n D i a g r a m は、ヒト、ゼブラフィッシュ及びシロイヌナズナゲノムを比較する。

【図 1 8】図 1 8 は、有窓及び非有窓生物の遺伝的比較を示す表である。この表は、ヒト遺伝子の数について、遺伝子の数及び % を比較する。

【図 1 9】図 1 9 は、比較ゲノミクス及びプロテオミクスの両方により同定されたタンパク質を示す表である。

【図 2 0】図 2 0 は、多孔板組成に対する、モエシンのドミナントネガティブ型 (N - モエシン / G F P) の実験を説明する。図 2 0 A - C は、多孔板を形成し内在性モエシンを欠く高発現細胞を示す。図 2 0 D - F は、多孔板を形成し、内在性を欠く高発現細胞を示す。図 2 0 A 、 2 0 D 、 2 0 G 及び 2 0 J は、N - モエシン / G F P が、多孔板と形態的に同様の細胞膜の領域に限定されたことを示す。図 2 0 J - L は、多孔板が細胞周囲の細い領域に生じ、それらを取り囲む、微小管及び細胞小器官が豊富な境界とは異なったことを示す。図 2 0 G - I は、細胞表面全体の P E C A M の発現が変化しなかったことを示す。図 2 0 M は、高発現誘導細胞において、G F P が細胞質全体に分布し、多孔板の間に存在する微小管及び細胞小器官が豊富な領域に選択的であったことを示す。図 2 0 M - O は、多孔板が P V - I 、モエシン及び繊維状アクチンの不連続ネットワークを含有する定まった組成を与えたことを示す。

10

20

30

40

50

- 【図 2 1】
 【図 2 2】
 【図 2 3】
 【図 2 4 A】
 【図 2 4 B】
 【図 2 4 C】
 【図 2 4 D】
 【図 2 5】

【図 1】

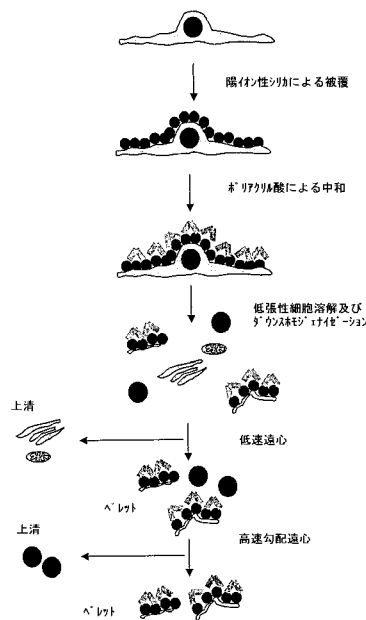


Figure 1

【図 2】

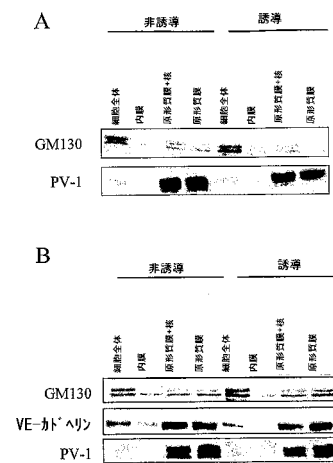


Figure 2

【 図 3 】

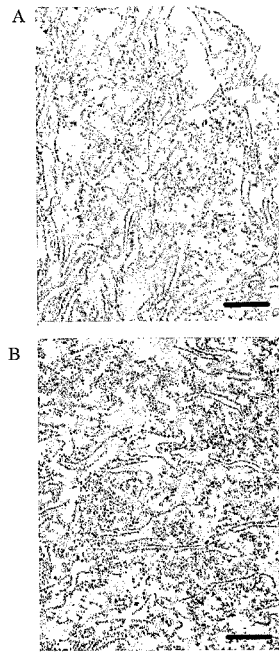


Figure 3

【 図 4 】

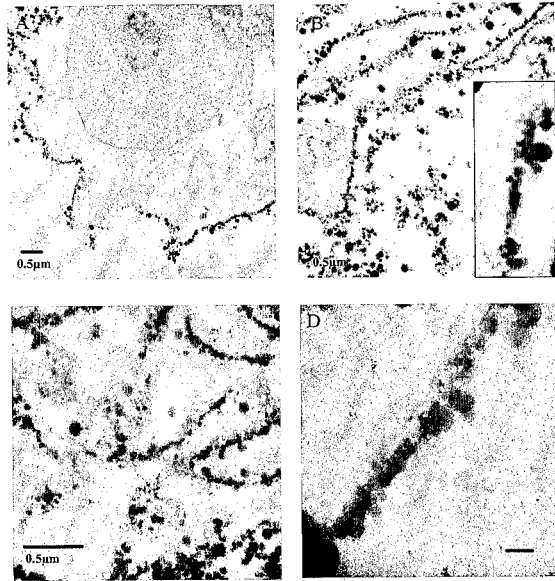


Figure 4

【 図 5 】

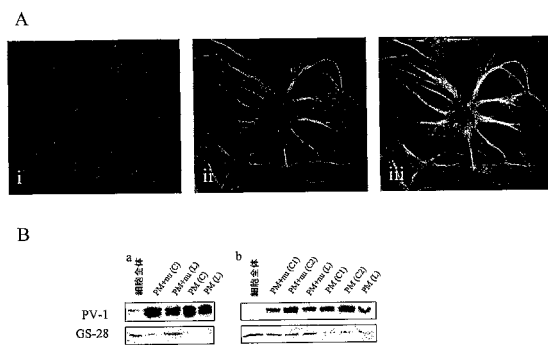


Figure 5

【 図 6 】

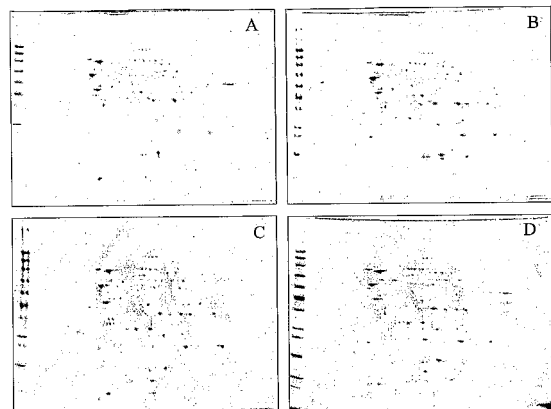


Figure 6

【図 7】



Figure 7

【図 8】

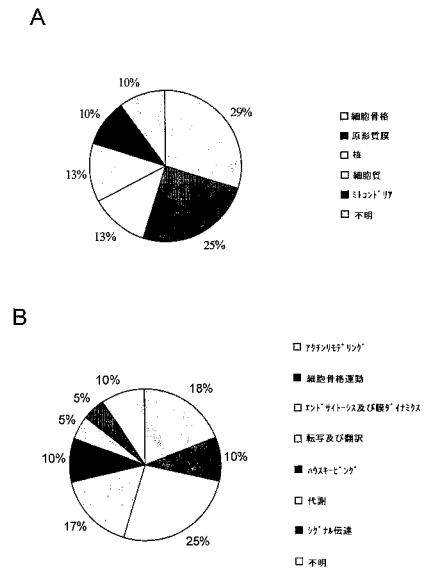


Figure 8

【図 9】

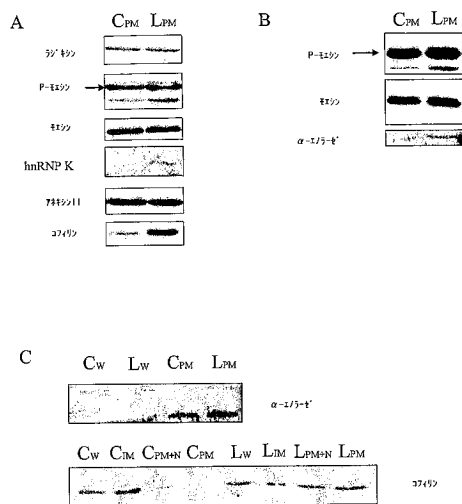


Figure 9

【図 10】

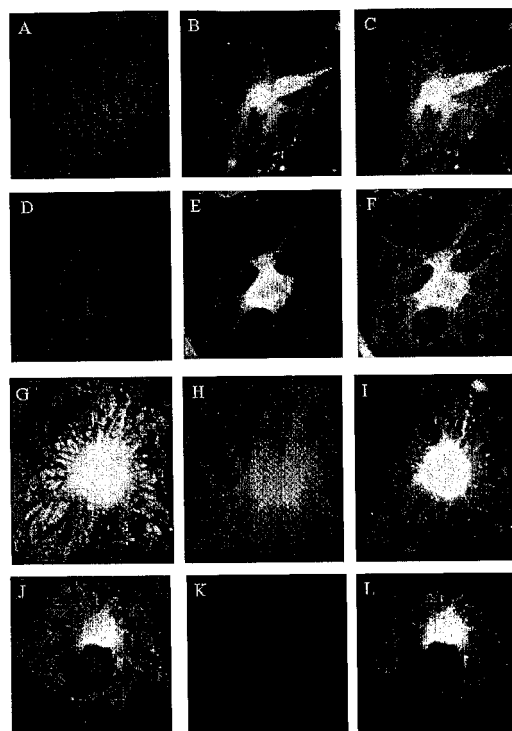


Figure 10

【図 1 1】

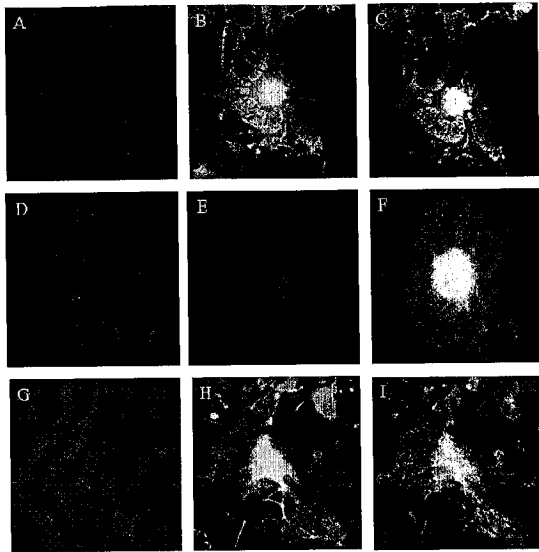


Figure 11

【図 1 2】

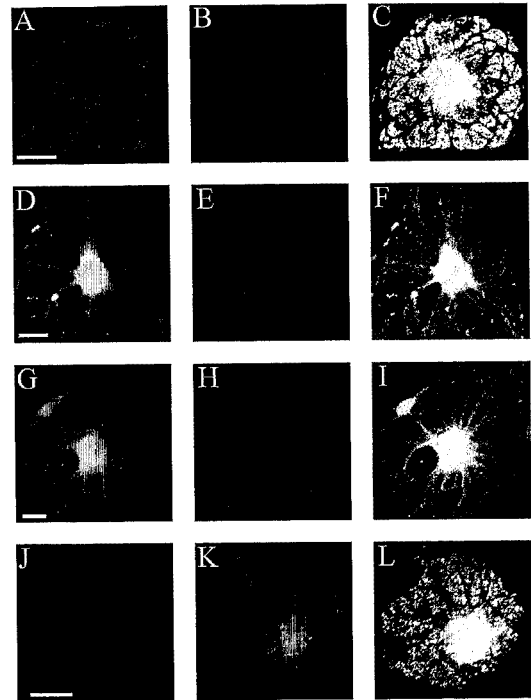


Figure 12

【図 1 3】

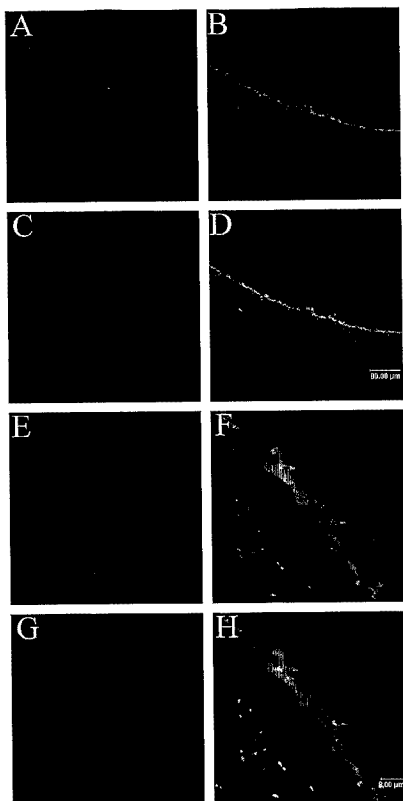


Figure 13

【図 1 4 A】

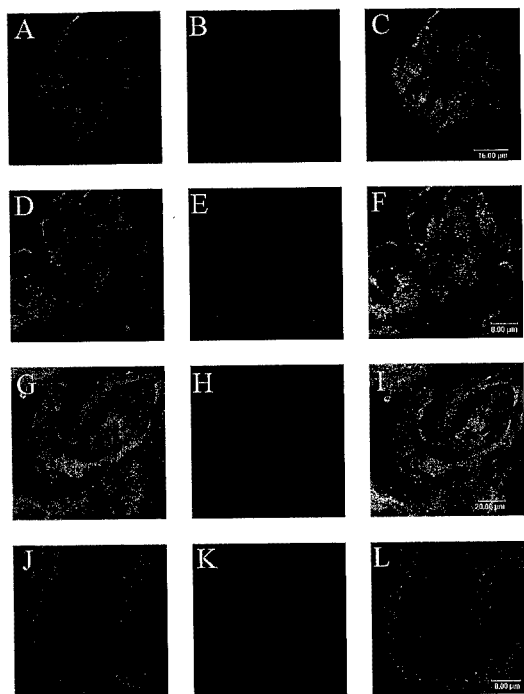


Figure 14 A

【図 14 B】

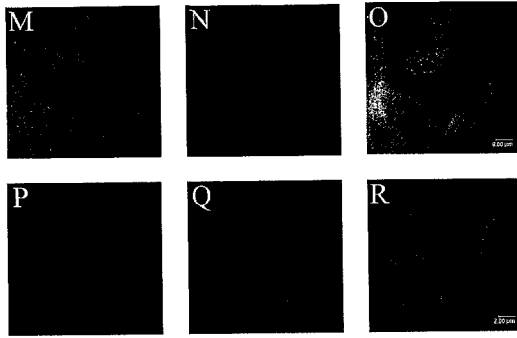


Figure 14 B

【図 15】

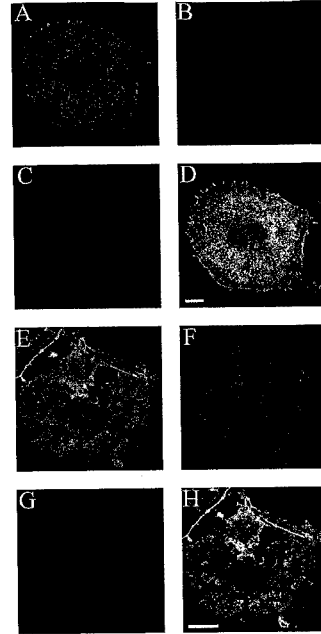


Figure 15

【図 16】

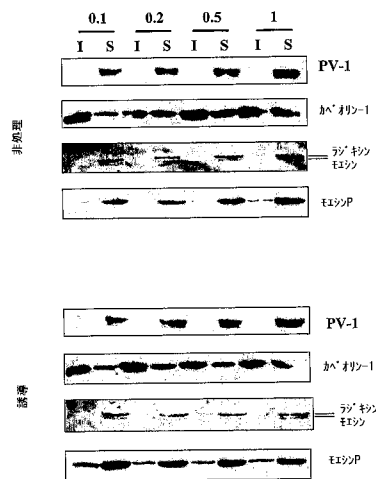


Figure 16

【図 17】

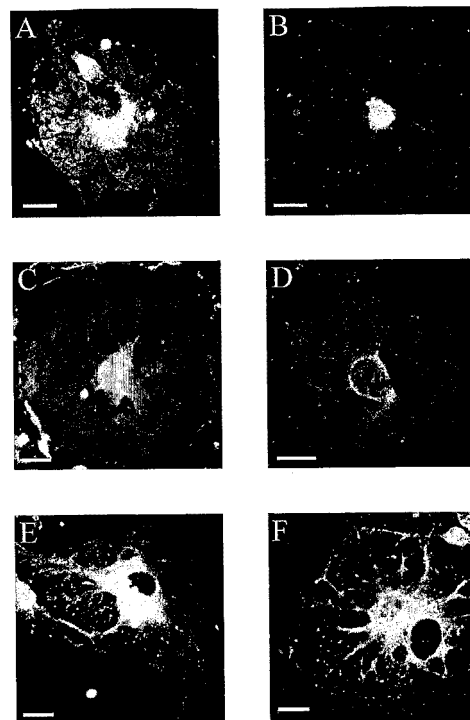


Figure 17

【 図 1 8 】

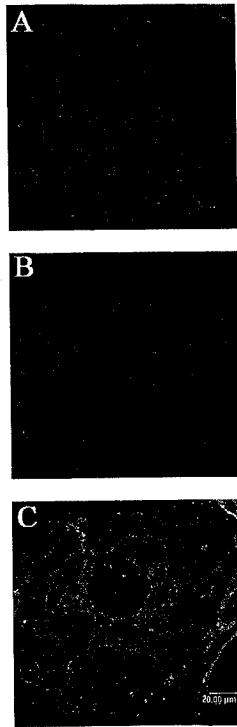


Figure 18

【 図 1 9 】

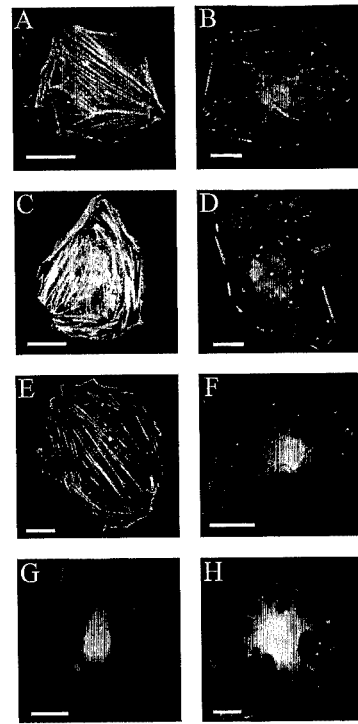


Figure 19

【 図 2 0 】

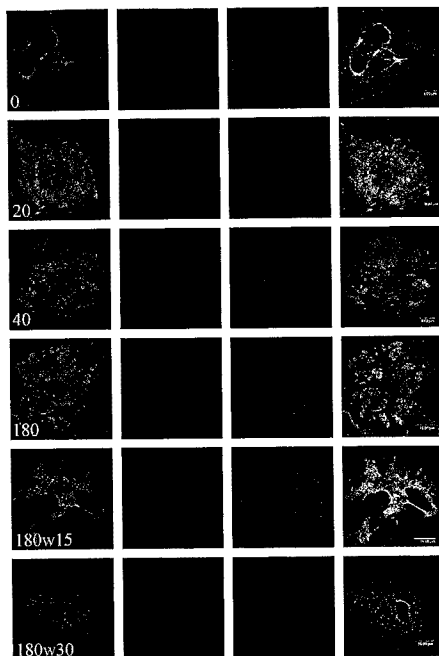


Figure 20

【 図 2 1 】

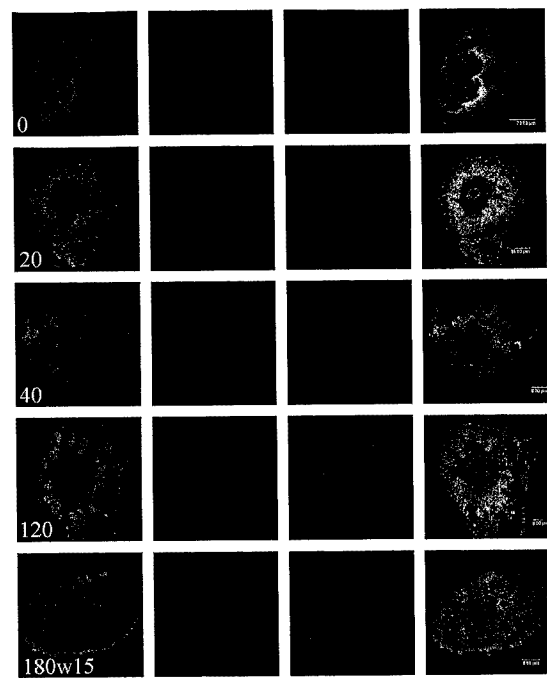


Figure 21

【図 2 2】

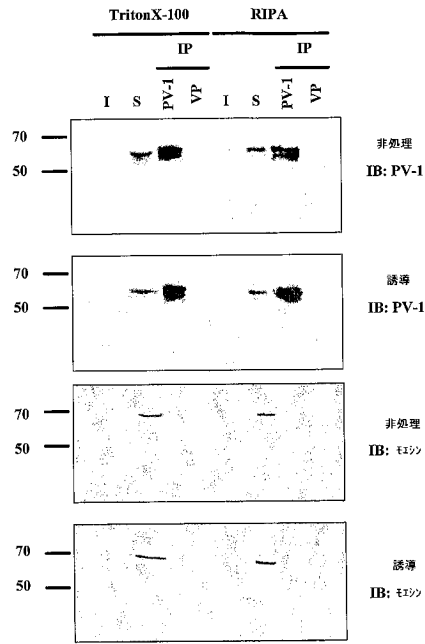


Figure 22

【図 2 3】

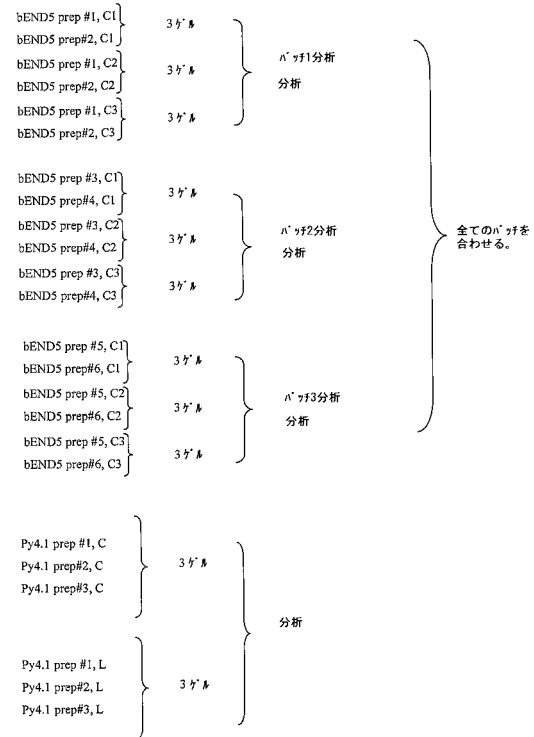


Figure 23

【図 2 4 A】

Figure 24A: タンパク質識別の割り当て

bEND5細胞上方向制膜されたタンパク質									
タンパク質	タンパク質の長さ (aa)	タンパク質名	受託者	種	MW (kDa)	pI	マウスのタンパク質	MOWSE スコア	%範囲
373	235	α -1.7.5-1	P17182.40	<i>Mus musculus</i>	46.9	6.4	6	60	22.4
373	257	真核細胞膜タンパク質4A様タンパク質	Q8BVY3.21	<i>Mus musculus</i>	46.7	6.64	9	102	28.95
		推定ATP依存性タンパク質	Q92VC3.62	<i>Mus musculus</i>	46.8	6.33	9	102	28.95
373	233	α -1.7.5-1	P17182.40	<i>Mus musculus</i>	46.9	6.4	10	124	34.64
552	486	コラーゲン、非筋肉、タイプ1A	P18760.16	<i>Mus musculus</i>	18.5	8.25	5	47	45.78
552	527	ミトコンドリア膜タンパク質、平滑筋	Q64119.35	<i>Mus musculus</i>	16.8	4.46	6	61	45.35
552	304	アチキン単量体結合タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	40.1	6.35	6	57	24.96
552	414	14-3-3タンパク質、 γ 型	P33215.28	<i>Mus musculus</i>	27.7	4.73	5	41	28.16
552	526	ミトコンドリア膜タンパク質 (OXA3L1)	Q64119.35	<i>Mus musculus</i>	16.8	4.46	5	42	34.67
473	478	ミトコンドリア膜タンパク質2-A	P13832.13	<i>Rattus norvegicus</i>	19.7	4.65	11	152	63.16
		ミトコンドリア膜タンパク質2-B	P13866.22	<i>Rattus norvegicus</i>	19.6	4.76	8	91	40.94
bEND5細胞上方向制膜されたタンパク質									
406	237	コラーゲン、非筋肉、タイプ1 (P18760)	Q8BVY3.21	<i>Mus musculus</i>	47	8.4	4	12	8.94

【図 2 4 B】

Figure 24B: タンパク質識別の割り当て

(続き)									
470	406	コラーゲン、非筋肉、タイプ1 (P18760)	Q8BVY3.21	<i>Mus musculus</i>	31.5	8.86	5	31	19.40
406	473	コラーゲン、非筋肉、タイプ2 (P18760)	Q8BVY3.21	<i>Mus musculus</i>	22.3	8.43	5	35	31.16
406	517	推定ATP依存性タンパク質3	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	16.5	7.04	3	11	28.76
bEND5細胞上方向制膜されたタンパク質									
470	138	真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	48.4	5.69	5	33	14.35
557	138	真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	48.4	5.69	14	180	25.76
		真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Homo sapiens, Rattus norvegicus</i>	50.9	5.25	13	163	30.6
541	146	真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	50.9	5.25	5	27	13.64
557	146	真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	50.9	5.25	13	165	31.25
		真核細胞膜タンパク質	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	48.4	5.69	14	182	36.45
541	153	真核細胞膜タンパク質	P19226.36	<i>Mus musculus, Rattus norvegicus</i>	60.9	5.92	7	68	15.71
541	215	ATPシンターゼ、 β サブユニット	Q80X09.24	<i>Mus musculus</i>	56.9	5.44	8	89	22.85
557	215	ATPシンターゼ、 β サブユニット	P56480.01	<i>Mus musculus</i>	56.2	5.19	13	175	34.78
541	334	アチキン単量体結合タンパク質 (P18760)	P07356.07	<i>Mus musculus</i>	38.5	7.69	4	18	11.24

【図 24C】

Figure 24C: タンパク質識別の割り当て

(続き)

557	334	7442211 (56*38711)	P07166.07	<i>Mus musculus</i>	38.5	7.69	4	19	14.5
557	400	高体細胞 脂質因子 4H	Q93918.2.49	<i>Mus musculus</i>	27.3	6.95	10	56	15.08
		ミミリン (脂形成 リドレクター)	Q88240.45	<i>Mus musculus</i>	21.5	9.45	6	44	28.36
541	517	推定RNA 結合 タンパク質3	Q89086.38	<i>Mus musculus</i>	16.5	7.04	4	31	30.07
470	517	推定RNA 結合 タンパク質3	Q89086.38	<i>Mus musculus</i>	16.5	7.04	6	57	51.59
		推定RNA 結合 タンパク質3	Q89086.38	<i>Mus musculus</i>	16.5	7.04	5	37	39.22
		ミミリン タンパク質 タンパク質 B	Q01768.25	<i>Mus musculus</i>	17.3	7.21	5	38	40.79
		推定RNA 結合 タンパク質3	Q89086.38	<i>Mus musculus</i>	16.5	7.04	5	41	33.99
557	517	ミミリン タンパク質 タンパク質 A	P15332.14	<i>Mus musculus</i>	17.1	7.1	5	36	38.16
		ミミリン タンパク質 タンパク質 B	P22392.19	<i>Homo sapiens</i>	17.2	8.56	4	21	31.58
		ミミリン タンパク質 タンパク質 A	P15332.14	<i>Mus musculus</i>	17.1	7.1	7	58	37.5
557	521	ミミリン タンパク質 タンパク質 B	Q01768.25	<i>Mus musculus</i>	17.3	7.21	11	125	69.74
541	521	ミミリン タンパク質 タンパク質 B	Q01768.25	<i>Mus musculus</i>	17.3	7.21	3	5	23.68

【図 24D】

Figure 24D: タンパク質識別の割り当て

(続き)

Py4.1細胞: 上方制御されたスプレット									
タンパク質	スプレット番号 (9*8)	タンパク質名	受託#	種	MW (kDa)	pI	マブしたペプチド数	MOWSEスコア	%富み
561	401	ラジリン	P26943.22	<i>Mus musculus</i>	68.4	5.82	11	120	21.78
		ミミリン	P26941.28	<i>Mus musculus</i>	57.5	6.23	19	246	31.6
561	658	神長因子 1-8*177	Q92890.40	<i>Mus musculus</i>	50	6.33	13	151	27
		αエラスチン	P11782.40	<i>Mus musculus</i>	46.9	6.4	18	240	46.42
561	793	タンパク質 タンパク質 タンパク質 9	Q01763.119	<i>Mus musculus</i>	40	6.26	8	90	32.29
561	659	αエラスチン	P04764.06	<i>Mus musculus</i>	46.9	6.18	7	80	27.71
		βエラスチン	Q92894.10	<i>Mus musculus</i>	41.5	4.79	5	42	21.41
		トリシン糖鎖	Q92812	<i>Rattus norvegicus</i>	55.8	6.16	5	46	19.01%

【図 25】

質量分析のために切り出したスプレットの強度

bEND5細胞分析からの切り出しスプレットに対する倍率変化									
スプレット番号	総LvsC2	p-値	Lvs C2 (1)	p-値	Lvs C2 (2)	p-値	Lvs C2 (3)	p-値	
138	1.883	0.1927	9.224	0.03162	-1.392	0.6478	1.495	0.1227	
146	1.71	0.1852	3.78	0.1096	1.199	0.771	1.381	0.04115	
193	-1.176	0.3662	不明	-1.381	0.2138	1.266	-	0.157	
215	1.358	0.377	1.074	0.343	-1.24	0.0295	1.641	0.0105	
233	1.826	0.02507	2.103	0.001633	2.447	0.1313	1.58	0.06104	
237	1.364	0.1417	1.595	0.02001	1.445	0.3797	1.273	0.4535	
304	1.671	0.02125	-1.064	0.8038	2.148	0.1855	3.067	0.01115	
334	1.193	0.3104	1.052	0.7728	-	不明	1.396	0.01084	
400	-1.012	0.9481	1.03	0.353	-1.394	0.1313	1.416	0.0122	
406	1.229	0.2888	1.32	0.00371	1.842	0.751	1.372	0.1275	
414	1.927	0.007195	3.415	0.1568	1.135	0.4678	2.575	0.00978	
475	-	不明	3.99	0.008421	-	不明	-	不明	
478	1.488	0.001198	1.345	0.00975	1.517	0.1585	1.842	0.122	
486	-	不明	19.635	不明	-	不明	-	不明	
517	1.251	0.03035	1.611	0.003646	-	不明	1.334	0.03647	
521	1.16	0.945	4.502	不明	-	不明	1.373	0.02915	
526	1.689	0.001765	-1.274	不明	1.503	0.02369	2.373	0.01236	
527	1.548	0.02631	1.265	0.2492	1.423	0.01114	2.269	0.02315	
65	1.267	0.4155	-1.846	0.05827	1.494	0.006652	1.682	0.007366	
125	1.928	0.1568	1.332	0.05748	1.255	0.04011	1.669	0.6696	
155	-1.364	0.7714	-	不明	-1.254	0.3465	1.463	0.0003429	
188	1.315	0.5625	1.397	0.01912	-	不明	-	不明	
200	1.448	0.01263	1.36	0.1691	1.492	0.1217	1.509	0.1035	
239	1.286	0.2898	-1.771	不明	1.293	0.7221	1.462	0.02508	
271	-	不明	-	不明	-	不明	-	不明	
292	1.145	0.3585	-1.08	0.5231	1.025	0.8736	1.494	0.01543	
366	2.972	0.1192	-	不明	1.442	0.000735	-	不明	
399	-1.008	0.08448	1.484	0.01762	-	不明	1.766	0.1215	
402	1.348	0.06779	1.847	0.008672	1.172	0.1945	1.146	0.7076	
410	1.144	0.3432	1.357	0.04608	-1.227	0.3891	1.395	0.1706	
411	1.385	0.1231	1.071	0.5587	1.049	0.4479	2.401	0.02249	
443	1.426	0.07064	2.311	0.01659	-1.116	0.7521	1.404	0.4977	
450	1.184	0.1214	2.12	0.02537	-1.857	0.5471	2.524	0.2558	
479	1.875	0.02106	2.043	0.3201	-1.007	0.1216	-	不明	
488	2.364	0.00418	3.019	0.0222	1.839	0.1587	-	不明	
491	1.475	0.5093	-	不明	-	不明	2.205	0.01431	

Py4.1細胞分析からの切り出しスプレットに対する倍率変化

スプレット番号	総LvsC	p-値
401	3.811	0.003184
658	2.038	0.002161
659	1.772	0.02662
793	2.258	0.004779

Figure 25

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/041187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV.: A61B10/00 G01N33/50		
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) G01N A61B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STAN RADU V ET AL: "PVI is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, vol. 15, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 3615-3630, XP002378015 ISSN: 1059-1524 abstract; figures 4,5 ----- -/--	1-28
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* 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 document 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 "I" 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		Date of mailing of the international search report
22 May 2006		10 NOV 2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mulder, Lonneke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/041187

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAMUELSSON S J ET AL: "Capillary fenestrae formation, structure and function" IOVS, vol. 45, no. Suppl. 1, April 2004 (2004-04), page U115, XP008063158 & ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION-FOR-RESEARCH-IN-VISION-AND-OPHTHALMOLOGY; FT LAUDERDALE, FL, USA; APRIL 24 -29, 2004 ISSN: 0146-0404	1-5,22, 23
Y	the whole document especially section 'methods'	7,8
Y	JACOBSON B S ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE LUMINAL PLASMALEMMA OF MICROVASCULAR ENDOTHELIUM FROM RAT LUNGS" EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT, STUTTGART,, DE, vol. 58, no. 2, January 1992 (1992-01), pages 296-306, XP000567841 ISSN: 0171-9335 page 296, right-hand column, last paragraph; page 305 left-hand column last paragraph to right-hand column first paragraph; figure 1; citation 15 abstract	8
Y	KAYA M ET AL: "Chemical induction of fenestrae in vessels of the blood-brain barrier" EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 142, no. 1, 1996, pages 6-13, XP002378017 ISSN: 0014-4886 abstract; page 6 right-hand column, paragraph 1 and 2	6,7
Y	LASCHINGER M ET AL: "Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 102, no. 1, 3 January 2000 (2000-01-03), pages 32-43, XP002376588 ISSN: 0165-5728 page 32 left-hand column page 33 section2.5	6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2005/041187**Box 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 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:

see additional 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:
1-18, 22, 23 (complete)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005/041187

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8, 22, 23 (complete)

method for isolating a marker for fenestrae using
subtractive proteomics

2. claims: 9-12, 16-20, 25-28 complete, claims 13-15 partial

the marker moesin and the use of marker moesin in analysing
fenestrae

3. claims: 13 and 14 partial, claim 21 complete

the marker paralemmin and the use of marker paralemmin in
analysing fenestrae

4. claims: 13-15 partial

the marker radixin and the use of marker radixin in
analysing fenestrae

5. claim: 13 and 14 partial

the marker cofilin and the use of marker cofilin in
analysing fenestrae

6. claim: 13 and 14 partial

the marker twinfilin and the use of marker twinfilin in
analysing fenestrae

7. claim: 13 and 14 partial

the marker alpha-enolase and the use of marker alpha-enolase
in analysing fenestrae

8. claim: 13 and 14 partial

the marker annexin II and the use of marker annexin II in
analysing fenestrae

9. claim: 13 and 14 partial

the marker muscudin and the use of marker muscudin in
analysing fenestrae

International Application No. PCT/ISA/ 210

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claim: 13 and 14 partial

the marker putative RNA-binding protein 3 and the use of
marker putative RNA-binding protein 3 in analysing fenestrae

11. claim: 13 and 14 partial

the marker nucleoside diphosphate kinase B and the use of
marker nucleoside diphosphate kinase B in analysing
fenestrae

12. claim: 13 and 14 partial

the marker hnRNP K and the use of marker hnRNP K in
analysing fenestrae

13. claim: 24 (complete)

method for isolating a marker for fenestrae using
evolutionary genomics

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/48	(2006.01)	G 0 1 N 27/62	V	
		G 0 1 N 33/53	Y	
		G 0 1 N 33/48	P	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. WINDOWS

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 シマ, デイビッド・テイー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02118、ボストン、トレモント・ストリート・603、
ナンバー・3

(72) 発明者 イオアンニドゥ, ソフィア

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02116、ボストン、ビーコン・ストリート・189、ア
パートメント・4・エフ

(72) 発明者 ロビンソン, グレゴリー・エス

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01887、ウイルミントン、フォーリー・ファーム・ロー
ド・4

(72) 発明者 シン, ホーミン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02466、ニュートン、スタニフオード・ストリート・8
3、ナンバー・3

F ターム (参考) 2G041 CA01 EA20 FA12 LA07

2G045 AA24 AA25 DA36 FB05 FB12

2G054 AA08 AB05 CA23 EA03

4H045 AA30 BA09 CA40 DA50 EA50 GA33

专利名称(译)	用于窗户开口结构的标记		
公开(公告)号	JP2008520572A	公开(公告)日	2008-06-19
申请号	JP2007541403	申请日	2005-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	伪指猴哲奎因企业每次忘川		
申请(专利权)人(译)	(伪眼) Aitetsuku , 每次团的Rete		
[标]发明人	シマデイビツドティー イオアンニドウソフィア ロビンソングレゴリーエス シンホームン		
发明人	シマ,デイビツド・ティー イオアンニドウ,ソフィア ロビンソン,グレゴリー・エス シン,ホームン		
IPC分类号	C07K14/435 G01N27/447 G01N21/78 G01N27/62 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/5064 G01N33/6803 G01N33/6842		
FI分类号	C07K14/435 G01N27/26.301.A G01N21/78.C G01N27/26.315.H G01N27/26.315.G G01N27/62.V G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA20 2G041/FA12 2G041/LA07 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/FB05 2G045/FB12 2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/CA23 2G054/EA03 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50 4H045/GA33		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	60/628085 2004-11-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于识别有孔结构的质膜标记物。本发明还涉及使用质膜标记物和光学显微镜使开窗结构可视化的方法。本发明还涉及鉴定有孔结构的质膜标记物的方法。特别地，本发明涉及作为具有有孔结构的多孔板的组分的Moesin的表征。特别地，本发明涉及膜突蛋白作为质膜标记物的用途。Moesin可用作内皮细胞窗的质膜标记或渗透性鉴定。

