

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-116568  
(P2003-116568A)

(43) 公開日 平成15年4月22日 (2003. 4. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 P 7/04	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/55		9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/04			1 0 3 4 H 0 4 5
9/10	1 0 3	11/00	
		C 0 7 K 14/435	
		審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 9 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2001-316835(P2001-316835)

(22) 出願日 平成13年10月15日 (2001. 10. 15)

(71) 出願人 391012431

三重大学長

三重県津市上浜町1515

(72) 発明者 鎮西 康雄

三重県津市河辺町3510-3

(72) 発明者 油田 正夫

三重県津市栗真町屋町1661-4 大てつユ

ニマンション413号

(74) 代理人 100072051

弁理士 杉村 興作 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固阻害活性を有するブラジルサシガメ由来のTi-1蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 血液凝固阻害作用を有する新規な蛋白質を提供することが、本発明の課題である。

【解決手段】 本発明により、ブラジルサシガメ (Triatoma infestans) 由来の新規な蛋白質であるTi-1蛋白質、及び当該蛋白質をコードするTi-1遺伝子が与えられた。Ti-1蛋白質は血液凝固阻害活性を有するために、Ti-1蛋白質を有効成分として含有する医薬は、血液凝固阻害剤として、心筋梗塞、肺梗塞、脳梗塞の治療及び予防に有効である。またTi-1蛋白質は、医薬開発の場における血液凝固阻害剤のリード化合物としてもまた、大きな可能性を有している。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** ブラジルサシガメ由来の蛋白質であり、以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-18)-188で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

(b) 血液凝固阻害活性を有し、(a)の一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質。

**【請求項2】** 請求項1記載の蛋白質をコードする遺伝子。

**【請求項3】** ブラジルサシガメ由来の蛋白質であり、以下の(c)または(d)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

(c) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-188で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

(d) 血液凝固阻害活性を有し、(c)の一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質。

**【請求項4】** ブラジルサシガメ由来の蛋白質をコードし、以下の(e)または(f)に示す塩基配列からなることを特徴とする遺伝子。

(e) 配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-742で示される塩基配列からなることを特徴とする遺伝子。

(f) 血液凝固阻害活性を有する蛋白質をコードし、(e)の一部が欠損、置換若しくは付加された遺伝子。

**【請求項5】** 請求項3記載の蛋白質を有効成分として含有する、血液凝固阻害剤。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【発明の属する技術分野】**本発明は、吸血昆虫であるブラジルサシガメ(*Triatoma infestans*)の唾液腺に由来し、血液凝固阻害活性を有するTi-1蛋白質、及び当該Ti-1蛋白質をコードする遺伝子に関する。

**【0002】**

**【従来の技術】**高齢化社会を迎え、成人病がますます重要な社会問題となってきた。成人病に起因する症状、特に血液関連の疾病、例えば高血圧症、肺高血圧症、心筋梗塞、脳梗塞、肺梗塞、クモ膜下出血後の血管攣縮などのように、血管が細くしかも硬くなることによって起こる疾病を治療したり、予防することは、高年齢層の社会では重要な課題である。これらの疾病は、血管弛緩拡張剤や血液凝固阻害剤によって治療したり予防することができる。そのような目的に使用が可能である抗凝固活性を有するペプチドとしては、ヒルの唾液腺由来のヒルジンがこれまでに知られていた。ヒルジンは吸血するムシの唾液腺から同定された抗凝固活性ペプチドであり、トロンピン阻害活性を有する。

**【0003】**

**【発明が解決しようとする課題】**しかし、上記のヒルジ

ンは合成が困難であり、副作用を有するという欠点を有していた。そのために大量に得て安全な医薬として用いるには、これらの問題を解決する必要がある。そこで、合成が容易であり、かつ副作用を有さない抗凝固活性を有する蛋白質を採取することが求められていた。そのような蛋白質は、抗血栓剤のリード化合物として有用であり、創薬の分野において高い有用性を有するものと考えられる。

**【0004】**そこで本発明の目的は、吸血昆虫であるブラジルサシガメ(*Triatoma infestans*)の唾液腺から単離され、血液凝固阻害活性を有する蛋白質を提供することにある。そして、更にはバキュロウイルスの系を用いてその様な蛋白質の大量供給を可能にすることである。

**【0005】**

**【課題を解決するための手段】**前記の課題を解決するために、本出願において以下の発明を提供するものである。本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-18)-188で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ブラジルサシガメ由来のTi-1蛋白質である。血液凝固阻害活性を有し、その一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質もまた、本発明の範囲内である。

**【0006】**更に本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-188で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ブラジルサシガメ由来のTi-1蛋白質である。血液凝固阻害活性を有し、その一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質もまた、本発明の範囲内である。

**【0007】**更に本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-742で示される塩基配列からなることを特徴とする、ブラジルサシガメ由来のTi-1遺伝子である。血液凝固阻害活性を有し、その一部が欠損、置換若しくは付加されたポリペプチドをコードする遺伝子もまた、本発明の範囲内である。

**【0008】**更に本発明は、上記の蛋白質を有効成分として含有する血液凝固阻害剤である。

**【0009】**

**【発明の実施の形態】**吸血性昆虫やダニの類の唾液腺には動物の血液や血管に対して特異な活性をもつ物質が含まれている。本発明者らは、唾液腺から抗凝血作用を持つ活性物質を同定し、単離・精製し、それらの有効成分の性状を解析することにより、また、遺伝子cDNAのクローニングを行うことにより、バキュロウイルス発現系によって血管弛緩機能を持つ蛋白質を多量に製造できることを明らかにして本発明を完成するに至った。

**【0010】**即ち、本発明者らは吸血昆虫であるブラジルサシガメ(*Triatoma infestans*:Ti)に注目し、ブラジルサシガメ由来の抗凝結活性を有する蛋白質を採取することを試みた。ブラジルサシガメ約25匹から唾液腺を摘出し、全RNAを抽出し、poly(A)+RNAとしてリバーストランスクリプターゼによりdsDNAを合成し、トランス

ファクターに組み込んで唾液腺cDNAライブラリーを作製した。Ti唾液腺cDNAライブラリーからランダムにコロニーをピックアップして、塩基配列の解析を行った。550個の配列を決め、重複を除いて分泌シグナルを持つもの44個のcDNAを得た。このうち、16個の全塩基配列を決めた。

【0011】そのうちの15個について、バキュロウイルス(AcNPV)を用いた蛋白質発現系で発現させるためのトランスファクターコンストラクトを作製し、ウイルスにトランスフェクトし、多核体を作らない、即ち挿入蛋白質を発現しているウイルスクローンを分離した。蛋白質の発現をSDS-PAGEにより確認し、HPLCによるゲル濾過・イオン交換クロマトグラフィーにより精製することにより、本発明のTi-1蛋白質を採取した。そして上記の方法により採取した本発明の蛋白質が、血液凝固に及ぼす作用を検討した。

【0012】ところで、血液が凝固する過程はその開始機序の違いから、内因系凝固反応と外因系凝固反応の2つの経路が知られている。内因系凝固反応は、血液が異物面に接触することにより惹起される反応である。血液凝固のカスケード系を、図1において示す。図1に示されるように、異物面との接触により生成した活性化第XIa因子は、カルシウム存在下で第IX因子を活性化させてIXaを生じ、それが引き金となってフィブリンが生成して血栓が形成する。一方、外因系凝固反応は、組織因子(TF)が第VIIa因子と複合体を形成することにより開始され、第IX因子、第X因子をともに活性化することが引き金となって血栓が形成される。

【0013】目的とする物質をヒトの血漿に加え、凝固するまでの時間を測定することにより血液凝固阻害作用の検討を行うことが、一般的に行われている。しかし、この方法では最終的なフィブリン形成による凝固を観察するため、血液凝固阻害剤の具体的な作用点および作用機構の詳細については判断できない。すなわち、血液凝固反応は複雑な連鎖反応であるので、反応経路の一部が阻害されれば、結果的にそれ以降の反応は進行せず、凝固は完結しないことになるからである。

【0014】そこで本発明においては、血液凝固能を評価するために、活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time:APTT)と、プロトロンビン時間(prothrombin time:PT)の測定を行った。前者は内因系凝固時間を、後者は外因系凝固時間をそれぞれ反映する。その結果、Ti-1蛋白質は内因系凝固時間を濃度依存的に延長した。よって本発明のTi-1蛋白質は血液凝固を抑制する作用を有し、血液凝固阻害剤として有効であることが示された。そのために、Ti-1蛋白質は、心筋梗塞、肺梗塞、脳梗塞等の治療薬や予防薬に有効であると思われる。

【0015】Ti-1蛋白質は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-18)-188で示されるアミノ酸配列に

より特定される。本願明細書において、配列番号1に示す蛋白質の一部が欠失、置換若しくは付加された蛋白質とは、配列番号1に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換された蛋白質である。また、その様な蛋白質と配列番号1に示すアミノ酸配列とは、95%以上、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様な蛋白質も、血液凝固を阻害するTi-1蛋白質としての機能を有する限り、本発明の範囲内である。なお、配列表の配列番号1において、-18から-1の部分にはシグナルペプチドであり、プロセッシングを受けた結果、成熟蛋白質はアミノ酸番号1-188で示される188個のアミノ酸からなっている。

【0016】また、Ti-1遺伝子は上記のTi-1蛋白質をコードしており、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-742で示される塩基配列からなることを特徴とする。なお、塩基配列中の塩基番号28-645に相当する部分が読み枠であり、上記の蛋白質をコードしている。遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

【0017】即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、その様な遺伝子と配列番号2に示す塩基配列とは、95%以上、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様な遺伝子も、血液凝固を阻害するTi-1蛋白質としての機能を有する蛋白質をコードする限り、本発明の範囲内である。また、その様な遺伝子はストリンジントな条件下で、配列表の配列番号2に示す遺伝子とハイブリッドを形成する。

【0018】本発明におけるTi-1蛋白質は、Ti-1蛋白質のcDNAを組みこんだバキュロウイルス発現系で多量に製造することができる。それらの一例を次に挙げる。カイコ(Bombyx mori)の核多角体ウイルス(BmNPV)を用い、カイコの培養細胞BmN4又はカイコの幼虫を用いて発現させることができ、それぞれ培養液又はカイコ体液からクロマトグラフィーにより単離できる。また、Ti-1蛋白質のcDNAをオートグラフィカリフォルニカ(Autographa californica)の核多角体ウイルス(AcNPV)に組み込み、ヨトウムシ(Spodoptera frugiperda)のSF9細胞、あるいはイラクサギンウワバ(Trichoplusia ni)

のTn5細胞で発現させ、培養上清から同様にクロマトグラフィーにより精製することができる。

【0019】また本発明におけるTi-1蛋白質は、Ti-1蛋白質のcDNAを組みこんだ大腸菌による発現系を用いることによっても多量に製造することができる。その様な目的のために、Ti-1蛋白質のcDNAを増幅し、pGEX6P-1、pGEX-2T、pGEX-3X等のプラスミドに組み込んだglutathione-S transferase(GST)融合蛋白質発現ベクターを作製することができる。そして、その発現ベクターにより大腸菌を形質転換し、IPTGを含む培地中で培養することにより、大腸菌においてGST融合Ti-1蛋白質の発現を誘導することができる。この様な目的のために使用可能な大腸菌株としては、例えばBL21株、DH5株、NM522株等を挙げることができる。そして、大腸菌体内において誘導されたGST融合Ti-1蛋白質を、大腸菌を破碎することにより回収することができる。その様にして回収されたGST融合Ti-1蛋白質を、グルタチオンビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、精製することができる。

【0020】本発明のTi-1蛋白質は、吸血性昆虫の唾液腺より血液凝固阻害作用を持つ活性物質を同定し、単離・精製し、その遺伝子cDNAのクローニングを行うことにより、バキュロウイルス発現系により血液凝固阻害作用を持つ蛋白質を多量に製造できるものである。また、蛋白質の血液凝固阻害作用に起因する活性部位を究明し、構造解析が進めば、分子設計手法で活性物質を一般の化学合成手法で製造することも可能である。

【0021】また、本発明のTi-1蛋白質は血液凝固阻害作用を有する医薬のリード化合物としても高い有用性を有すると思われる。即ちTi-1蛋白質に種々の改変を行うことにより、より血液凝固阻害作用の高い物質を得ることができる可能性がある。本発明のTi-1蛋白質は、その様な検討の基礎となる生理活性物質を与えるものであり、更なる新規な抗凝血物質を得るためのリード化合物としても大きな有用性を有するものである。

【0022】

【実施例】次に本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0023】(遺伝子の採取方法)ブラジルサシガメ(*Triatoma infestans*)胸部より唾液腺を摘出した。これより、Mlicroprep mRNA Purification kit(Amersham pharmacia社製)を用いて、唾液腺mRNAを抽出・精製した。次にこのmRNAをテンプレートに用い、Superscript Plasmid system(Life technologies社製)で唾液腺cDNAライブラリーを構築した。このライブラリーからランダムにクローン(総数550クローン)を拾い上げ、QIA Prep Spin miniprep(QIAGEN社製)にてプラスミド抽出・精製した。このプラスミドに組み込まれているcDNAの

<110>三重大学長

<120>血液凝固阻害活性を有するブラジルサシガメ由来のTi-1蛋白質

塩基配列をABI PRISM 310 Genetic analyzer(PE biosystems社製)を用いて解読した。解読されたcDNAの塩基配列は、Genetyx ver8.5(Software development社製)を用いて解析した。その結果、同一の塩基配列を有する6個のcDNAクローンが見いだされ、これをTi-1と命名した。

【0024】(組換え蛋白質の大量発現と精製)PCR法にて増幅したTi-1cDNA全長を、プラスミドpAcYMIのBamHI制限酵素サイトに組み込んだトランスファーベクターを作製し、Plasmid mini kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。このプラスミドベクターとBaculoGold LinerLized Baculovirus DNA(Pharmingen社製)の混合物を、1ipofectin reagent(life technologies社製)を用いて昆虫培養細胞Sf-9に導入し、組換えバキュロウイルスを作製した。この組換えウイルスを別の昆虫培養細胞Tn-5に感染させ、組み換えTi-1蛋白質を大量発現させた。培養液中に分泌された組換えTi-1蛋白質は、RESOURCES(Amersham Pharmacia社製)を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーおよびTSK2000SW(東ソー社製)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによる二段階の精製を行うことで純化し、以下の実験に供した。

【0025】(活性化部分トロンボプラスチン時間の計測)ヒト血漿標品(商品名:カリプラズマインデックス100, bioMerieux社製)20 $\mu$ lに対し、50mM TrisHCl, PH7.0, 150mM NaClに溶解した精製Ti-1を20 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。5分後、1/10に希釈したアクチン(商品名:データファイ・APTT, CYSMEX社製)を35 $\mu$ l加えさらに2分間インキュベートした。最後に25mM CaCl<sub>2</sub>を25 $\mu$ l加え、これより凝固が完了するまでの時間をAmelung KC-10A micro(エム・シー・メディカル社製)により計測した。

【0026】Ti-1がAPTTに対して及ぼす影響を図3に示す。Ti-1は濃度依存的にAPTTのみを延長させる活性を示した。すなわち、ブラジルサシガメ唾液腺由来蛋白質Ti-1は内因系凝固反応を阻害する蛋白質であることが明らかとなった。

【0027】

【発明の効果】本発明により、ブラジルサシガメ由来の新規な蛋白質であるTi-1蛋白質、及び当該蛋白質をコードするTi-1遺伝子が与えられた。Ti-1蛋白質は血液凝固阻害活性を有するために、Ti-1蛋白質を有効成分として含有する医薬は、血液凝固阻害剤として、心筋梗塞、肺梗塞、脳梗塞の治療及び予防に有効である。またTi-1蛋白質は、医薬開発の場における血液凝固阻害剤のリード化合物としてもまた、大きな可能性を有している。

【0028】

【配列表】

< 1 6 0 > 2  
 < 2 1 0 > 1  
 < 2 1 1 > 2 0 6  
 < 2 1 2 > アミノ酸  
 < 2 1 3 > Triatoma infestans  
 < 4 0 0 > 1  
 -18

Met Lys Thr Ile Leu Ala Val Ile Phe Phe Gly Ile Leu Ala Phe Ala	-3
Phe Ala Asp Tyr Pro Ser Ile Glu Asn Cys Thr His Pro Pro Ala Met	14
Ala Asn Phe Asn Gln Lys Lys Phe Leu Glu Gly Lys Trp Tyr Val Thr	30
Lys Ala Lys His Gly Ser Asn Ser Thr Val Cys Arg Glu Tyr Arg Ala	46
Lys Thr Lys Gly Asn Asp Gln Ile Leu Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Ser	62
Phe Asn Gly Gly Thr Phe Tyr Phe Thr Val Arg Cys Lys Arg Leu Pro	78
Asn Lys Glu Val Gln Lys Pro Leu Gln Phe Thr Cys Thr Gln Lys Ser	94
Thr Asp Asp Pro Ser Lys Met Phe Lys Phe Gln Leu Glu Val Thr Ile	110
Leu Asp Thr Asp Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Met Tyr Arg Cys Val Gln	126
Phe Pro Glu Gln Leu Gly Ser His Phe Glu Asp Asn Thr Leu Leu Leu	142
His Arg Asn Pro Asp Gln Leu Val Asp Glu Asn Gln Val Glu Arg Lys	158
Leu Asn Leu Ser Phe Asp Ser Phe Arg Ser Arg Glu Asp Val Val Asp	174
Gly Cys Pro Lys Leu Pro Ser Lys Lys Lys Asn Lys Ala Ser	188

< 2 1 0 > 2  
 < 2 1 1 > 7 4 2  
 < 2 1 2 > アミノ酸  
 < 2 1 3 > Triatoma infestans  
 < 4 0 0 > 2

ATACAACGCT TACTTCGGTT TCGCAATATG AAGACGATTT TGGCCGTGAT TTTTTTTGGA	60
ATTTTGGCGT TTGCATTTGC TGATTATCCA TCAATTGAAA ATTGCACTCA CCCTCCAGCT	120
ATGGCAAAC TTAATCAAAA AAAATTTTTA GAAGGAAAAT GGTATGTAAC AAAAGCAAAA	180
CATGGATCAA ATTCAACTGT TTGTCGAGAA TACAGAGCCA AAACAAAGG TAACGATCAA	240
ATACTTGTCG GTGACGGATA TTACTCGTTT AATGGTGGAA CATTCTACTT TACAGTTCGT	300
TGTAAGAGGC TGCCAAATAA GGAAGTTCAA AAACCACTGC AATTTACCTG CACTCAAAAA	360
AGTACTGACG ACCCGAGCAA GATGTTTAAA TTCCAACCTG AGGTTACTAT TCTTGACACA	420
GACTATGCTA ACTATGCTGT AATGTATAGA TGTGTCCAGT TTCCCGAGCA ACTTGGGTCA	480
CATTTTGAAG ATAATACTTT GCTATTACAC CGGAATCCAG ACCAACTAGT TGACGAAAAA	540
CAAGTTGAAA GAAAAC TTTGTGCTTT GATTCATTCA GATCCAGGGA GGATGTTGTA	600
GACGGTTGTC CAAAGCTTCC ATCAAAAAAG AAAAATAAAG CGTCATAAAC CTAGTATATC	660
TAATACAAAT AAATTGACAT TGCAAAAAAA ATAAAAATTT GCGGAACTTA AAAAAAAA	720
AAAAAAA AA	742

【図面の簡単な説明】

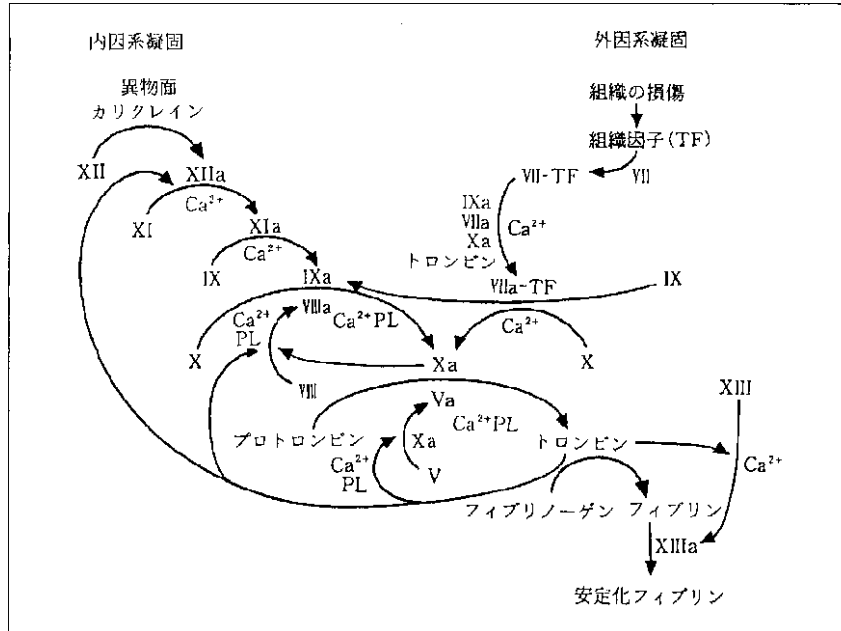
【図 1】 図 1 は、血栓形成へと至る、血液凝固のカスケード系を示す図である。

【図 2】 図 2 は、Ti-1 蛋白質及びそれをコードする遺

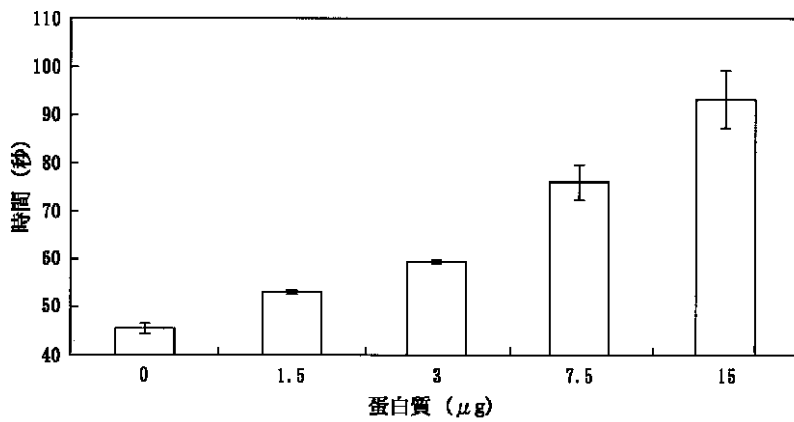
伝子の配列を示す図である。

【図 3】 図 3 は、Ti-1 蛋白質が活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) に及ぼす影響を示すグラフである。

【図1】



【図3】



【図2】

```

10      20      30      40      50      60
ATACAACGCTTACTTCGGTTTCGCAATATGAAGACGATTTTGGCCGTGATTTTTTTGGGA
                M K T I L A V I F F G

70      80      90      100     110     120
ATTTTGGCGTTTGCATTTGCTGATTATCCATCAATTGAAAATTGCACTCACCCCTCCAGCT
I L A F A F A D Y P S I E N C T H P P A

130     140     150     160     170     180
ATGGCAAACCTTAATCAAAAAAATTTTTAGAAAGGAAAATGGTATGTAACAAAAGCAAAA
M A N F N Q K K F L E G K W Y V T K A K

190     200     210     220     230     240
CATGGATCAAATTCAACTGTTGTCGAGAATACAGAGCCAAAACCTAAGGGTAACGATCAA
H G S N S T V C R E Y R A K T K G N D Q

250     260     270     280     290     300
ATACTTGTCCGGTGACGGATATTACTCGTTTAATGGTGGACATTCTACTTTACAGTTTCGT
I L V G D G Y Y S F N G G T F Y F T V R

310     320     330     340     350     360
TGTAAGAGGCTGCCAAATAAGGAAGTTCAAAAACCACTGCAATTTACCTGCACTCAAAAA
C K R L P N K E V Q K P L Q F T C T Q K

370     380     390     400     410     420
AGTACTGACGACCCGAGCAAGATGTTTAAATTCCAACTTGAGGTTACTATTCTTGACACA
S T D D P S K M F K F Q L E V T I L D T

430     440     450     460     470     480
GACTATGCTAACTATGCTGTAATGTATAGATGTGTCCAGTTCCCGAGCAACTTGGGGTCA
D Y A N Y A V M Y R C V Q F F E Q L G S

490     500     510     520     530     540
CATTTTGAAGATAAATACTTTGCTATTACACCGGAATCCAGACCAACTAGTTGACGAAAAT
H F E D N T L L L H R N P D Q L V D E N

550     560     570     580     590     600
CAAGTTGAAAGAAAACCTCAATTTGTCGTTTGATTTCATTTCAGATCCAGGGAGGATGTTGTA
Q V E R K L N L S F D S F R S R E D V V

610     620     630     640     650     660
GACGGTTGTCCAAAGCTTCCATCAAAAAAGAAAAATAAAGCGTCATAAACCTAGTATATC
D G C P K L P S K K K N K A S *

670     680     690     700     710     720
TAATACAAATAAATTTGACATTGCAAAAAAATAAAAAATTTGCGGAACTTAAAAAAA

730     740     750
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【手続補正書】

【提出日】平成13年10月15日(2001.10.15)

【補正方法】変更

【補正内容】

【手続補正1】

【0028】

【補正対象書類名】明細書

【配列表】

【補正対象項目名】0028

- <110>三重大学長
- <120>血液凝固阻害活性を有するブラジルサンガメ由来のTi-1蛋白質
- <160>2
- <210>1
- <211>206
- <212>アミノ酸

< 2 1 3 > Triatoma infestans

< 4 0 0 > 1

-18

Met Lys Thr Ile Leu Ala Val Ile Phe Phe Gly Ile Leu Ala Phe Ala -3  
Phe Ala Asp Tyr Pro Ser Ile Glu Asn Cys Thr His Pro Pro Ala Met 14  
Ala Asn Phe Asn Gln Lys Lys Phe Leu Glu Gly Lys Trp Tyr Val Thr 30  
Lys Ala Lys His Gly Ser Asn Ser Thr Val Cys Arg Glu Tyr Arg Ala 46  
Lys Thr Lys Gly Asn Asp Gln Ile Leu Val Gly Asp Gly Tyr Tyr Ser 62  
Phe Asn Gly Gly Thr Phe Tyr Phe Thr Val Arg Cys Lys Arg Leu Pro 78  
Asn Lys Glu Val Gln Lys Pro Leu Gln Phe Thr Cys Thr Gln Lys Ser 94  
Thr Asp Asp Pro Ser Lys Met Phe Lys Phe Gln Leu Glu Val Thr Ile 110  
Leu Asp Thr Asp Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Met Tyr Arg Cys Val Gln 126  
Phe Pro Glu Gln Leu Gly Ser His Phe Glu Asp Asn Thr Leu Leu Leu 142  
His Arg Asn Pro Asp Gln Leu Val Asp Glu Asn Gln Val Glu Arg Lys 158  
Leu Asn Leu Ser Phe Asp Ser Phe Arg Ser Arg Glu Asp Val Val Asp 174  
Gly Cys Pro Lys Leu Pro Ser Lys Lys Lys Asn Lys Ala Ser 188

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 7 4 2

< 2 1 2 > 核酸

< 2 1 3 > Triatoma infestans

< 4 0 0 > 2

ATACAACGCT TACTTCGGTT TCGCAATATG AAGACGATTT TGGCCGTGAT TTTTTTTGGA 60  
ATTTTGGCGT TTGCATTTGC TGATTATCCA TCAATTGAAA ATTGCACTCA CCCTCCAGCT 120  
ATGGCAAAC TTAATCAAAA AAAATTTTTA GAAGGAAAAT GGTATGTAAC AAAAGCAAAA 180  
CATGGATCAA ATTCAACTGT TTGTCGAGAA TACAGAGCCA AAAC TAAGGG TAACGATCAA 240  
ATACTTGTCG GTGACGGATA TTAATCGTTT AATGGTGGAA CATTCTACTT TACAGTTCGT 300  
TGTAAGAGGC TGCCAAATAA GGAAGTTCAA AAACCACTGC AATTTACCTG CACTCAAAAA 360  
AGTACTGACG ACCCGAGCAA GATGTTTTAA TTCCAACCTG AGGTTACTAT TCTTGACACA 420  
GACTATGCTA ACTATGCTGT AATGTATAGA TGTGTCCAGT TTCCCGAGCA ACTTGGGTCA 480  
CATTTTGAAG ATAATACTTT GCTATTACAC CGGAATCCAG ACCAACTAGT TGACGAAAA 540  
CAAGTTGAAA GAAAACTCAA TTTGTCGTTT GATTCATTCA GATCCAGGGA GGATGTTGTA 600  
GACGGTTGTC CAAAGCTTCC ATCAAAAAAG AAAAAATAAG CGTCATAAAC CTAGTATATC 660  
TAATACAAAT AAATTGACAT TGCAAAAAAA ATAAAAATTT GCGGAACTTA AAAAAAAAAA 720  
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 742

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 7	識別記号	F I	テ-マコ-ド (参考)
A 6 1 P 11/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/435		A 6 1 K 37/64	

(72) 発明者 伊澤 晴彦  
三重県津市一身田中野76 - 1 コーポパロ  
ン中野201号



Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02  
EA02 GA11 HA03  
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22  
CA49 CA53 DC50 ZA362  
ZA402 ZA542 ZA592  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA51  
EA20 EA50 FA74 GA22 GA23