

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3648545号

(P3648545)

(45) 発行日 平成17年5月18日(2005.5.18)

(24) 登録日 平成17年2月25日(2005.2.25)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 38/55

A 6 1 P 7/02

A 6 1 P 7/02

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/10

C O 7 K 14/435

C O 7 K 14/435

A 6 1 K 37/64

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-317156 (P2001-317156)
 (22) 出願日 平成13年10月15日(2001.10.15)
 (65) 公開番号 特開2003-116570 (P2003-116570A)
 (43) 公開日 平成15年4月22日(2003.4.22)
 審査請求日 平成13年10月15日(2001.10.15)

(73) 特許権者 304026696
 国立大学法人三重大学
 三重県津市上浜町1515
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (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
 (72) 発明者 岩永 史朗
 兵庫県神戸市垂水区上高丸3-1 13-
 46

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固阻害活性を有するフタトゲチマダニ由来のHI-3蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フタトゲチマダニ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(-19)-61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)のアミノ酸の5個以下が欠損、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】

フタトゲチマダニ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1-61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)のアミノ酸の5個以下が欠損、置換若しくは付加された蛋白質。

【請求項4】

フタトゲチマダニ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。

10

20

(e) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1-243 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) の塩基の 5 個以下が欠損、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、吸血昆虫であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の唾液腺に由来し血液凝固阻害活性を有する HI-3 蛋白質、及び当該 HI-3 蛋白質をコードする遺伝子に関する。

10

【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、トロンビン阻害活性を有する。

20

【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、吸血昆虫であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) 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ような蛋白質の大量供給を可能とすることにある。

30

【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 (-19)-61 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、フタトゲチマダニ由来の HI-3 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。

40

【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 1-61 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、フタトゲチマダニ由来の HI-3 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 1-243 で示される塩基配列からなることを特徴とする、フタトゲチマダニ由来の HI-3 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。

50

【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フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*:HI) に注目し、フタトゲチマダニ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。フタトゲチマダニ約30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、トランスファーベクターに組み込んで唾液腺cDNAライブラリーを作製した。HI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。1889個の配列を決め、重複を除いて分泌シグナルを持つもの93個のcDNAを得た。このうち、12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ーベ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HI-3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、HI-3蛋白質は内因系凝固時間および外因系凝固時間の両者を濃度依存的に延長した。よって本発明のHI-3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、HI-3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】

HI-3蛋白質は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-19)-61で示されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

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HI-3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、-19から-1の部分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1-61で示される61個のアミノ酸からなっている。

【0016】

また、HI-3遺伝子は上記のHI-3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1-243で示される塩基配列からなることを特徴とする。なお、なお、その塩基配列全体が読み枠であり、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HI-3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ェントな条件下で、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HI-3蛋白質は、HI-3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、HI-3蛋白質のcDNAをオートグラフィアカリフォルニカ(*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HI-3蛋白質は、HI-3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、HI-3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HI-3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株等を挙げる事ができる。そして、大腸菌体内において誘導されたGST融合HI-3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HI-3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HI-3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

10

20

30

40

50

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HI-3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HI-3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HI-3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)

フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) 胸部より唾液腺を摘出した。これより、Microprep 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1889クローン) を拾い上げ、QIA Prep spin miniprep kit (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の塩基配列をABI PRISM 310 Genetic analyer (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 MAC ver7.3 (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8個のcDNAクローンが見いだされ、これをH1-3と命名した。

【0024】

(組換え蛋白質の大量発現と精製)

HI-3の予想される分泌シグナル配列部分を除いたcDNAをPCR法にて増幅した後、プラスミドpGEX6-1 (Amersham pharmacia社製) のクローニングサイトに組み込んだglutathione-S transferase (GST) 融合蛋白発現ベクターを作製し、定法に従い組み換え蛋白質を大腸菌BL-21株にて発現させた。超音波処理した大腸菌破砕物からのGST融合HI-3蛋白質の回収は、glutathione Sepharose 4B (Amersham pharmacia社製) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。さらに回収したGST融合HI-3をMono-Q (Amersham pharmacia社製) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、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およびプロトロンビン時間の計測)

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 μ l に対し、50 mM TrisHCl pH7.0, 150mM NaClに溶解した精製HI-3を20 μ 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) あるいはトロンボプラスチン (商品名: オーソプレートトロンボプラスチン、オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社製) を35 μ l 加えさらに2分間インキュベートした。最後に25mM CaCl₂を25 μ 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・シナ・メディカル社製) により計測した。

【0026】

HI-3がAPTTとPTに対して及ぼす影響を図3に示す。図3において、 \square はAPTTを、 \triangle はPTを示す。HI-3は濃度依存的にAPTTおよびPTを延長させる活性を示した。すなわち、フタトゲチマダニ唾液腺由来蛋白質HI-3は内因系凝固反応と外因系凝固反応双方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】

10

20

30

40

50

本発明により、フタトゲチマダニ由来の新規な蛋白質であるHI-3蛋白質、及び当該蛋白質をコードするHI-3遺伝子が与えられた。HI-3蛋白質は血液凝固阻害活性を有するために、HI-3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HI-3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】

<110>三重大学長

<120>血液凝固阻害活性を有するフタトゲチマダニ由来のHI-3蛋白質

10

<160>2

<210>1

<211>80

<212>アミノ酸

<213>Haemaphysalis longicornis

<400>1

-19

20

Met Lys His Phe Val Ile Leu Ile Leu Ala Val Val Ala Ser Ala Val -4

Val Met Ala Tyr Pro Glu Arg Asp Ser Ala Lys Asp Gly Asn Gln Glu 13

Lys Glu Arg Ala Leu Leu Val Lys Val Gln Glu Arg Tyr Gln Gly Asn 29

Gln Gly Asp Tyr Asp Glu Tyr Asp Gln Asp Glu Thr Thr Pro Pro Pro 46

Asp Pro Thr Ala Gln Thr Ala Arg Pro Arg Leu Arg Gln Asn Gln Asp 61

<210>2

<211>243

30

<212>核酸

<213>Haemaphysalis longicornis

<400>2

ATGAAGCACT TCGTAATTTT GATTCTTGCT GTTGTGGCCA GTGCCGTGGT GATGGCATA 60

CCGGAGAGAG ATTCAGCAAA GGACGGCAAC CAAGAGAAAG AGAGAGCTCT GCTAGTTAAA 120

GTACAAGAAC GCTATCAAGG TAATCAAGGT GACTACGATG AATATGACCA AGATGAGACC 180

ACTCCTCCTC CGGATCCAAC TGCACAACT GCAAGACCAC GGCTTCGACA AAATCAGGAT 240

40

TGA

243

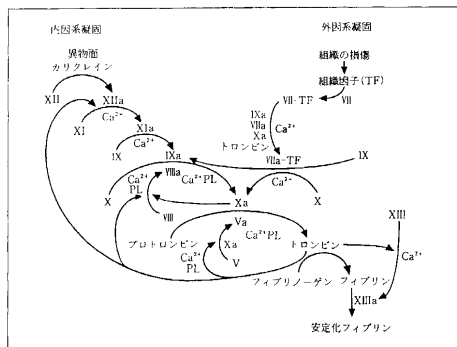
【図面の簡単な説明】

【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、HI-3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、HI-3蛋白質が活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）プロトロンビン時間（PT）に及ぼす影響を示すグラフである。

【 図 1 】



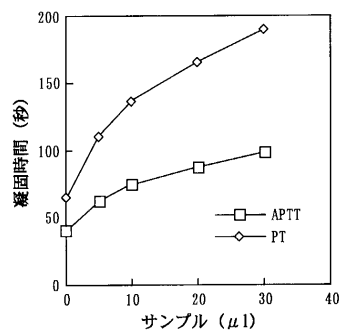
【 図 2 】

```

ATGAGCACTTCGTAAATTTGGATTCCTGCTGTGCGCCAGTCGGCTGTGATCGCATAC
MetlySHisPheValIleLeuAlaValAlaSerAlaValAlaMetAla.Tyr
CGGGAGAGATTCGACCAAGCCGCGCACCAAGCAAGCAAGAGAGAGAGCTTCTGCTTAAA
ProGUARGAspSerAlaLysAspGlyAsnGlnGluLysGluArgAlaLeuLeuValLys
GTACAGAGCGCTATCAGGTATCAAGGTGACTACGATGATATGACCAGATGAGCC
ValGlnGluAraGlyTyrGlnGlyAsnGlnGlyAspTyrAspGluTyrAspGlnAspGluThr
ACTCTCTCTCCGGATCCAACTGCCAACAACCTGCCAAGCCAGGGCTTCGACAAAATCAAGAT
ThrProProAspProThrAlaGlnThrAlaLeuArgProArgLeuArgGlnAsnGlnAsp
  
```

250
TGA

【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 伊澤 晴彦

三重県津市一身田中野76-1 コーポバロン中野201号

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 特開平09-067396(JP,A)

国際公開第00/011172(WO,A1)

特開2003-116569(JP,A)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998年, 95, p.14290-14295

Biochim. Biophys. Acta., 2000年, 1482 [1-2], p.110-118

J. Biol. Chem., 2000年, 275 [9], p.6636-6641

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07K 14/00-14/825

C12N 15/00-15/90

C12P 1/00-41/00

A61K 38/00-38/58

A61P 7/00-9/14

BIOSIS/WPI(DIALOG)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq