

(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

(P 2 0 0 3 - 1 1 6 5 6 8 A)

(43)公開日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09	ZNA	A61P 7/04	4B024
A61K 38/55		9/10	4C084
A61P 7/04			103 4H045
9/10		11/00	
	103	C07K 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(P 2001 - 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 T i - 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固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。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ノンを分離した。
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XI
a 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 (ac
tivated 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アフォルニカ (Autograp
ha californica) の核多角体ウイルス (AcNPV) に組込
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。

【 0 0 1 9 】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。

【 0 0 2 0 】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。

【 0 0 2 1 】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。

【 0 0 2 2 】

【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。

【 0 0 2 3 】(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

< 1 1 0 > 三重大学長

< 1 2 0 > 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。

【 0 0 2 4 】(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Bam HI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。

【 0 0 2 5 】(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 μ l に対し、50 mM TrisHCl , PH7.0 , 150mM NaClに溶解した精製Ti-1を20 μ l加え、37 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 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・シー・メディカル社製) により計測した。

【 0 0 2 6 】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。

【 0 0 2 7 】

【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。

【 0 0 2 8 】

【配列表】

7
 < 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 AAAC TAAGGG TAACGATCAA 240
 ATACTTGTCG GTGACGGATA TTA CTCTGTTT AATGGTGGAA CATTCTACTT TACAGTTCGT 300
 TGTAAGAGGC TGCCAAATAA GGAAGTCAA AAACCACTGC AATTTACCTG CACTCAAAAA 360
 AGTACTGACG ACCCGAGCAA GATGTTTAAA TTCCAACCTG AGGTTACTAT TCTTGACACA 420
 GACTATGCTA ACTATGCTGT AATGTATAGA TGTGTCCAGT TTCCCGAGCA ACTTGGGTCA 480
 CATTTTGAAG ATAATACTTT GCTATTACAC CGGAATCCAG ACCAACTAGT TGACGAAAAAT 540
 CAAGTTGAAA GAAAAC TCAA TTTGTCGTTT GATTCATTCA GATCCAGGGA GGATGTTGTA 600
 GACGGTTGTC CAAAGCTTCC ATCAAAAAAG AAAAATAAAG CGTCATAAAC CTAGTATATC 660
 TAATACAAAT AAATTGACAT TGCAAAAAAA ATAAAAATTT GCGGAACTTA AAAAAAAA 720
 AAAAAAAA AAAAAAAA AA 742

【図面の簡単な説明】

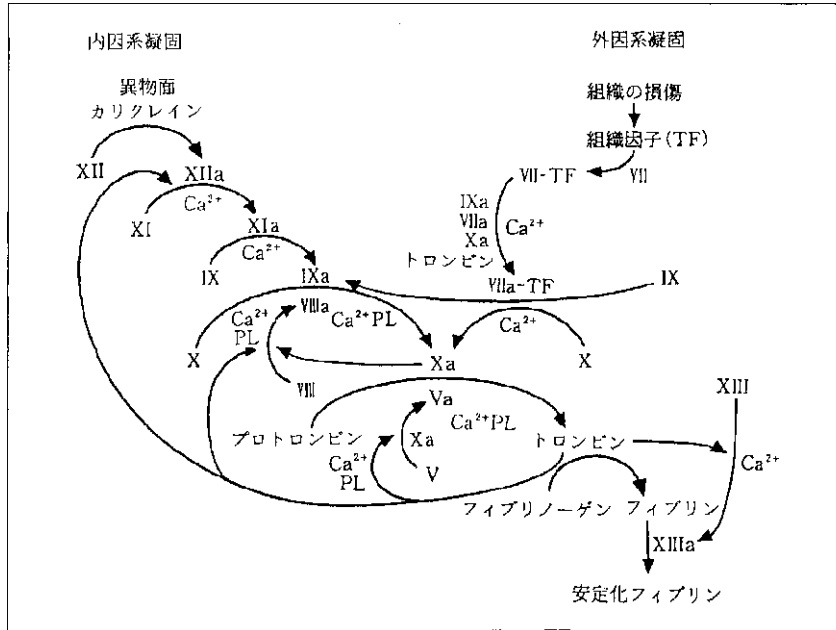
【図 1】 図 1 は、血栓形成へと至る、血液凝固のカスケード系を示す図である。

【図 2】 図 2 は、Ti-1 蛋白質及びそれをコードする遺

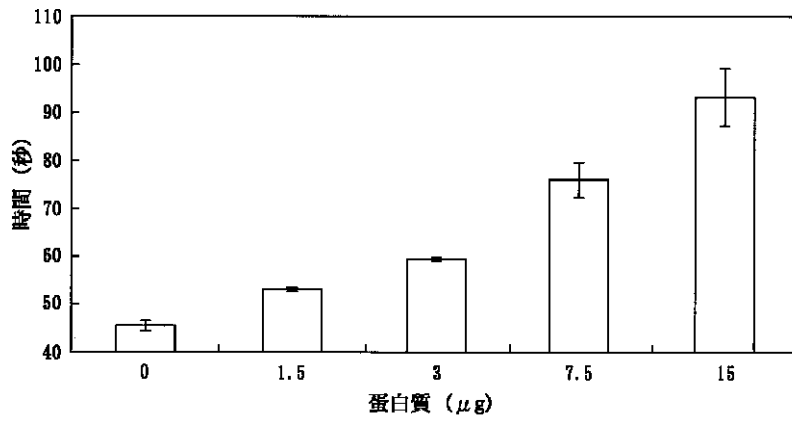
伝子の配列を示す図である。

【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
ATACAACGCTTACTTCGGTTTCGCAATATGAAGACGATTTTGGCCGTGATTTTTTTTGGGA
      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
ATGGCAAACCTTTAATCAAAAAAATTTTGTAGAAGGAAAATGGTATGTAAACAAAAGCAAAA
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
CATGGATCAAATTCAACTGTTTGTGCGAGAATACAGAGCCAAAACCTAAGGGTAAACGATCAA
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
ATACTTGTCGGTGACGGATATTACTCGTTAATGGTGGAACATTCTACTTTACAGTTTCGTT
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
TGTAAGAGCGCTGCCAAATAAGGAAGTTCAAAAACCCTGCAATTTACCTGCACTCAAAAA
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
AGTACTGACGACCCGAGCAAGATGTTTAAATCCAACCTGAGGTTACTATTCTTGACACA
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
GACTATGCTAACTATGCTGTAATGTATAGATGTGTCCAGTTTCCCGAGCAACTTGGGTCA
D Y A N Y A V M Y R C V Q F P E Q L G S

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

      550         560         570         580         590         600
CAAGTTGAAAGAAAACCTCAATTTGTCGTTTGATTTCATTGATCCAGGGAGGATGTTGTA
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
TAATACAAATAAATTGACATTGCAAAAAAATAAAAAATTTGCGGAACCTAAAAA
      AAAAAA

      730         740         750
      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【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シガメ由来の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 TTGCATTGTC TGATTATCCA TCAATTGAAA ATTGCACTCA CCCTCCAGCT 120
ATGGCAAAC TTAATCAAAA AAAATTTTTA GAAGGAAAAT GGTATGTAAC AAAAGCAAAA 180
CATGGATCAA ATTCAACTGT TTGTCGAGAA TACAGAGCCA AAAC TAAGGG TAACGATCAA 240
ATACTTGTGC GTGACGGATA TTA CTCTGTTT AATGGTGAA CATTCTACTT TACAGTTCGT 300
TGTAAGAGGC TGCCAAATAA GGAAGTTCAA AAACCACTGC AATTTACCTG CACTCAAAAA 360
AGTACTGACG ACCCGAGCAA GATGTTTAAA TTCCA ACTTG AGGTTACTAT TCTTGACACA 420
GACTATGCTA ACTATGCTGT AATGTATAGA TGTGTCCAGT TTCCCAGCA ACTTGGGTCA 480
CATTTTGAAG ATAATACTTT GCTATTACAC CGGAATCCAG ACCAACTAGT TGACGAAAAT 540
CAAGTTGAAA GAAA ACTCAA TTTGTCGTTT GATTCATTCA GATCCAGGGA GGATGTTGTA 600
GACGGTTGTC CAAAGCTTCC ATCAAAAAAG AAAAATAAAG CGTCATAAAC CTAGTATATC 660
TAATACAAAT AAATTGACAT TGCAAAAAAA ATAAAAATTT GCGGA ACTTA AAAAAAAAAA 720
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 742

```

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 P 11/00
C 0 7 K 14/435

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00
A 6 1 K 37/64

テ-マ-コ-ト* (参考)

Z N A A

(72) 発明者 伊澤 晴彦

三重県津市一身田中野76 - 1 コ-ポバロ
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