

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3648548号

(P3648548)

(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 7/04

A 6 1 P 7/04

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 9 頁)

(21) 出願番号 特願2001-317330 (P2001-317330)
 (22) 出願日 平成13年10月15日(2001.10.15)
 (65) 公開番号 特開2003-116573 (P2003-116573A)
 (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 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固阻害活性を有するハマダラカ由来のAs-1蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハマダラカ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(-21)-80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10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】

ハマダラカ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1-80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10個以下が欠損、置換若しくは付加された蛋白質。

【請求項4】

ハマダラカ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1-456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10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、吸血昆虫であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の唾液腺に由来し、血液凝固阻害活性を有するAs-1蛋白質、及び当該As-1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、吸血昆虫であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*) 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(-21)-80で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ハマダラカ由来の蛋白質である。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。更に当該蛋白質をコードする遺伝子もまた、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1-80で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ハマダラカ由来の蛋白質である。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

【0007】

更に本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-456で示される塩基配列からなることを特徴とする、ハマダラカ由来のAs-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。 50

【 0 0 0 9 】

【 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。

【 0 0 1 0 】

即ち、本発明者らは吸血昆虫であるハマダラカ (*Anopheles stephensi*:As) に注目し、ハマダラカ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。ハマダラカ約50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。As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。1280個の配列を決め、重複を除いて分泌シグナルを持つもの38個のcDNAを得た。このうち、27個の全塩基配列を決めた。

10

【 0 0 1 1 】

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As-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。

20

【 0 0 1 2 】

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。

30

【 0 0 1 3 】

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。

【 0 0 1 4 】

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、As-1蛋白質は内因系凝固時間及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As-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、As-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。

40

【 0 0 1 5 】

As-1蛋白質は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-21)-80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

50

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As-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、-21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1-80で示される80個のアミノ酸からなっている。

【0016】

また、As-1遺伝子は上記のAs-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1-456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33-335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。

10

【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As-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。

20

【0018】

本発明におけるAs-1蛋白質は、As-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、As-1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*)に組込み、ヨトウムシ(*Spodoptera frugiperda*)のS F9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。

30

【0019】

また本発明におけるAs-1蛋白質は、As-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、As-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As-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As-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As-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。

40

【0020】

本発明のAs-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。

50

【0021】

また、本発明のAs-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As-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As-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)

ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) 胸部より唾液腺を摘出した。これより、Mlicroprep mRNA purification (Amersham pharmacia社製) を用いて、唾液腺mRNAを抽出・精製した。次にこのmRNAをテンプレートに使い、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1280クローン) を拾い上げ、QIAPrep 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 analyser (PEbiosystems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26個のcDNAクローンが見いだされ、これをAs-1と命名した。この様にして得られたcDNAの塩基配列及び推定アミノ酸配列を図2に示す。

【0024】

(組み換え蛋白質の大量発現と精製)

As-1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pGEX6P-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As-1蛋白質の回収は、glutathione Sepharose 4B (Amersham pharماسia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。回収された蛋白質は、プレジジョンプロテアーゼ (Amersham pharmacia社製) にてGSTとAs-1蛋白質とを切り離した。これを、再びglutathione Sepharose 4Bに通してGSTを除き、さらにRESOURCE Q (Amersham Pharmacia社製) 用いた陰イオン交換クロマトグラフィー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、50mM TrisHCl, pH7.0, 150mM NaClに溶解した精製As-1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・シー・メディカル社製) により計測した。

【0026】

As-1がAPTTに対して及ぼす影響を図3に、As-1がPTに対して及ぼす影響を図4に示す。これらの結果より、As-1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、ハマダラカ唾液腺由来蛋白質As-1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】

本発明により、ハマダラカ唾液腺由来の新規な蛋白質であるAs-1蛋白質、及び当該蛋白質

10

20

30

40

50

をコードするAs-1遺伝子が与えられた。As-1蛋白質は血液凝固阻害活性を有するために、As-1蛋白質を有効成分として含有する医薬は、新規な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As-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】

<110>三重大学長

<120>血液凝固阻害活性を有するハマダラカ由来のAs-1蛋白質

<160>2

10

<210>1

<211>101

<212>アミノ酸

<213>Anopheles stephensi

<400>1

-21

Met Ala Ser Lys Val Ile Val Ile Ala Leu Leu Cys Ile Ala Leu Ala	-6	20
Ala Phe Val Gln Gly Ala Pro Gln Tyr Thr His Gly Glu Glu Pro Glu	11	
Tyr Asp Glu Asp Asp Gly Ala Asp Glu Pro Val Gln Pro His Ser Ser	27	
Ser Asn His Ala Asp Thr Glu Asp Asp Phe Asp Leu Ser Leu Leu Asp	43	
Lys Pro Tyr Ala Asn Ala Pro Glu Asn Ala Asp Pro Gly Arg Arg Pro	59	
Glu Phe Leu Lys Gln His Asn Asn Glu Asn Gln Ser Asp Ser Ser Ser	75	
Gly Ser Thr Glu Asn	80	

30

<210>2

<211>456

<212>核酸

<213>Anopheles stephensi

<400>2

CTTCATTCAT TATCTCAAAA AGCGGGGAAA TAATGGCATC CAAAGTGATC GTGATTGCGT	60	
TGCTGTGCAT CGCACTGGCA GCGTTTGTC AGGGAGCTCC GCAATATACG CACGGCGAGG	120	40
AGCCTGAATA TGACGAGGAT GATGGGGCAG ACGAACCGGT TCAGCCTCAT TCGAGTAGCA	180	
ATCACGCAGA CACTGAGGAT GATTTTGATC TGAGTCTTCT GGACAAGCCG TACGCTAATG	240	
CACCGGAGAA TGCCGATCCC GGACGACGTC CCGAGTTCCT TAAGCAACAC AACCAACGAAA	300	
ACCAGTCGGA TTCGTCTTCC GGATCGACCG AAAATTAGCA CGAAGCAATA CAACTCTGAC	360	
GTCCTTTGGA TCATTTAAAG TCGTATTGAA ATGAATATAC GCATCAATAA ATTTACGGAA	420	
ACGGTATTAC AAACCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	456	

50

【図面の簡単な説明】

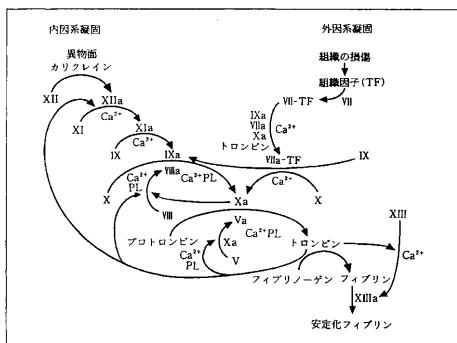
【図1】図1は、血栓形成へと至る、血液凝固のカスケード系を示す図である。

【図2】図2は、As-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、As-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4】図4は、As-1蛋白質がプロトロンピン時間（PT）に及ぼす影響を示すグラフである。

【図1】

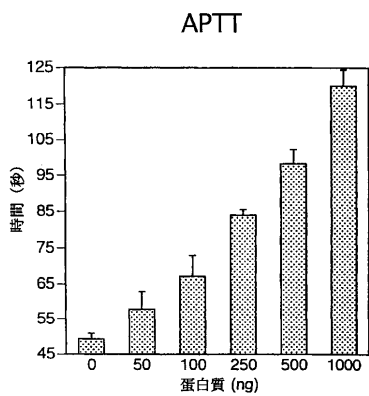


【図2】

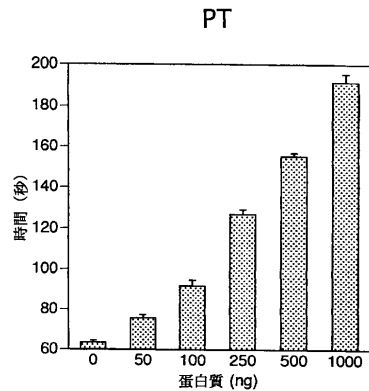
```

10      20      30      40      50      60
CTTCATTCATTATCTCAAAAAGCGGGGAATAATGGCATCCAAAGTGATCGTGATTCCT
          M A S K V I V I A L
70      80      90      100     110     120
TGCTCTGCATCCGACTGGCAGCGTTTGTCCAGGGAGCTCCGCAATATACCGCAGCGGAG
L C I A L A A F V Q G A P Q Y T H G E E
130     140     150     160     170     180
AGCCTGAATATGACGAGGATGATGGGGAGACCAACCGTTTCAGCCTCATTCGAGTAGCA
P E Y D E D D G A D E F V Q P H S S S N
190     200     210     220     230     240
ATCACGCAGACCTGAGGATGATTTTGAATCTGAGTCCTTGGACAAAGCCGTACGCTAATG
H A D T E D D F D L S L L D K P Y A N A
250     260     270     280     290     300
CACCGAGAAATGCCGATCCGGAGCAGCTCCGAGTCCCTTAAGCAACACACACAGGAA
P E H A D F G R R P E F L K Q H N N B N
310     320     330     340     350     360
ACCACTCGGATTCGCTCTCCGGATCCGACCGAAAATAGCAGCAAGCAATFCAACTCTGAC
Q S D S S S G S T E N *
370     380     390     400     410     420
GTCCTTGGATCATTFAAAGTCGTATTGAATGANTATACGCATCAATTAATTTACGGAA
430     440     450     460
ACGGTATTCAAACTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平09 - 067396 (JP, A)

国際公開第00 / 011172 (WO, A1)

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