

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3837518号
(P3837518)

(45) 発行日 平成18年10月25日(2006.10.25)

(24) 登録日 平成18年8月11日(2006.8.11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-289564 (P2002-289564)	(73) 特許権者	304026696
(22) 出願日	平成14年10月2日(2002.10.2)		国立大学法人三重大学
(65) 公開番号	特開2004-121086 (P2004-121086A)		三重県津市栗真町屋町1577
(43) 公開日	平成16年4月22日(2004.4.22)	(74) 代理人	100072051
審査請求日	平成15年3月20日(2003.3.20)		弁理士 杉村 興作
審査番号	不服2005-17817 (P2005-17817/J1)	(74) 代理人	100101096
審査請求日	平成17年9月15日(2005.9.15)		弁理士 徳永 博
特許法第30条第1項適用	平成14年4月4日 日本	(74) 代理人	100107227
蚕糸学会主催の「2002日本蚕糸学会第72回学術講演会」において文書をもって発表			弁理士 藤谷 史朗
早期審査対象出願		(74) 代理人	100114292
			弁理士 来間 清志
		(74) 代理人	100119530
			弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板凝集阻害活性を有するブラジルサシガメ由来のTi-4蛋白質

(57) 【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(-22)-156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) 血小板凝集阻害活性を有し、(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】

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1-156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) 血小板凝集阻害活性を有し、(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】

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 1-644 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) 血小板凝集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、血小板凝集阻害剤。

【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、血小板凝集阻害活性を有する Ti-4 蛋白質、及び当該 Ti-4 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、血小板凝集阻害剤によって治療したり予防することができる。その様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は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。なお、本発明の Ti-4 蛋白質、及び当該 Ti-4 蛋白質をコードする遺伝子は新規のものであるが、昆虫を主とする吸血動物の唾液中の生理活性物質に関する知見が、例えば非特許文献 1 と非特許文献 2 において総説としてまとめられている。

20

【0003】

【非特許文献 1】

リベイロ・ジェイ・エム (Ribeiro JM.), アニュアル・レビュー・エントモロジー (Ann u Rev Entomol), 1987年, 32巻, p463-78. "Role of saliva in blood-feeding by arthropods."

30

【非特許文献 2】

バサノバ・エイ・ブイ (Basanova AV), バスコバ・アイ・ピー (Baskova IP), ザバロバ・エル・エル (Zavalova LL) バイオケミストリー (Biochemistry), 2002年, 67巻, p143-50. "Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals."

【0004】

【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血小板凝集活性を有する蛋白質を採取することが求められていた。その様な蛋白質は、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。

40

【0005】

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、血小板凝集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。

【0006】

【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 (-22)-156 で示されるアミノ酸配列からな

50

ることを特徴とする、ブラジルサシガメ由来のTi-4蛋白質である。血小板凝集阻害活性を有し、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1に示す、アミノ酸番号1-156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-4蛋白質である。血小板凝集阻害活性を有し、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。

【0008】

更に本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-644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-4遺伝子である。血小板凝集阻害活性を有し、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。

【0009】

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小板凝集阻害剤である。

【0010】

【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。

【0011】

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血小板凝集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40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を得て、全塩基配列を決めた。得られたTi-4遺伝子の塩基配列およびその遺伝子がコードするTi-4蛋白質のアミノ酸配列を図1に示す。

【0012】

そのうちの16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Ti-4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、血小板凝集に及ぼす作用を検討した。

【0013】

目的とする物質をヒトの洗浄血小板に加え、コラーゲンで血小板凝集を惹起し、10分後の透光度を測定することにより血小板凝集阻害作用の検討を行った。その結果、Ti-4蛋白質は血小板のコラーゲン凝集を濃度依存的に抑制した。よって本発明のTi-4蛋白質は血小板凝集を阻害する作用を有し、血小板凝集阻害剤として有効であることが示された。そのために、Ti-4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。

【0014】

Ti-4蛋白質は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号(-22)-156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

10

20

30

40

50

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、血小板凝集を阻害するTi-4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、-22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1-156で示される156個のアミノ酸からなっている。

【0015】

また、Ti-4遺伝子は上記のTi-4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1-644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21-554に相当する部分を読み枠であり、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

【0016】

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、血小板凝集を阻害するTi-4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

【0017】

本発明におけるTi-4蛋白質は、Ti-4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-4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。

30

【0018】

また本発明におけるTi-4蛋白質は、Ti-4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-4蛋白質のcDNAを増幅し、pMAL-c2g等のプラスミドに組み込んだマルトース結合タンパク質 (MBP) 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MBP融合Ti-4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MBP融合Ti-4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MBP融合Ti-4蛋白質を、アミロースレジン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

【0019】

本発明のTi-4蛋白質は、吸血性昆虫の唾液腺より血小板凝集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小板凝集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、蛋白質の血小板凝集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。

【0020】

また、本発明のTi-4蛋白質は血小板凝集阻害作用を有する医薬のリード化合物としても高

50

い有用性を有すると思われる。即ちTi-4蛋白質に種々の改変を行うことにより、より血小板凝集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-4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、更なる新規な抗血小板凝集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。

【0021】

【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。

【0022】

(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、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550クローン)を拾い上げ、QiAPrep 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 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 ver 8.5 (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25個のcDNAクローンが見出され、これをTi-4と命名した。

【0023】

(組換え蛋白質の大量発現と精製)

PCR法にて増幅したTi-4 cDNA全長を、プラスミドpAcYM1のBamHIの制限酵素サイトに組み込んだトランスファクターを作製し、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 Linearized Baculovirus DNA (Phaemingen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、組換えTi-4を大量発現させた。培養液中に分泌された組換えTi-4蛋白質は、MONO S (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。

【0024】

(血小板凝集)

血小板凝集はヒト洗浄血小板を用いて比濁法によって測定した。すなわち、ヒト洗浄血小板($6.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$)50 μl に対し、50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaClに溶解した精製Ti-3を40 μl 加え、37 °Cでインキュベートした。10分後、20 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲン(Chronolog社製)を10 μl 加え、さらに10分間インキュベートし、溶液の600 nmでの透光度をMicro Plate Reader MPR-A4i (東ソー社製)を用いて測定した。

【0025】

Ti-4が血小板のコラーゲン凝集に対して及ぼす影響を図2に示す。図2より、Ti-4は濃度依存的に血小板凝集を抑制した。すなわち、ブラジルサシガメ唾液腺由来蛋白質Ti-4は血小板のコラーゲン凝集を阻害する蛋白質であることが明らかとなった。

【0026】

【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-4蛋白質、及び当該蛋白質をコードするTi-4遺伝子が与えられた。Ti-4蛋白質は血小板凝集阻害活性を有するために、Ti-4蛋白質を有効成分として含有する医薬は、血小板凝集阻害剤として、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-4蛋白質は、医薬開発の場における血小板凝集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。

【0027】

【配列表】

10

20

30

40

<110>三重大学長

<120>血小板凝集阻害活性を有するブラジルサシガメ由来のTi-4蛋白質

<160>2

<210>1

<211>178

<212>アミノ酸

<213>Triatoma infestans

10

<400>1

-22

Met Lys Met Ile Ile Ser Leu Thr Phe Leu Gly Ile Leu Met Leu Ala	-7	
Phe Ala Glu Val Asn Ser Glu Thr Cys Thr Leu Met Glu Ala Ala Lys	10	
Asn Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Phe Asn Ile Pro Leu Ala Tyr Ala Thr	26	
His Ser Lys Asn Arg Glu Pro Glu Thr Asn Val Cys Arg Glu Tyr Ser	42	
Thr Ala Arg Gly Pro Asp Gly Lys Thr Val Thr Thr Phe Thr Ile Lys	58	20
Asp Lys Thr Leu Thr Ser Ala Val Lys Cys Thr Asn Thr Pro Ile Pro	74	
Gly Ser Asn Gly Gln Phe Ser Ser Asp Cys Glu Leu Ser Ala Gly Asn	90	
Arg Ile Thr Val Thr Thr Ser Ile Leu Ala Thr Asp Asn Glu Lys Tyr	106	
Ala Ile Leu Gln Arg Cys Pro Thr Ser Gly Pro Gly Asn Ile Leu Val	122	
Leu Gln Thr Asn Lys Asn Gly Val Glu Gln Gly Val Gln Asn Tyr Phe	138	
Asn Gln Lys Gly Trp Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ser Arg Thr Thr Val	154	
Gly Cys	156	30

<210>2

<211>644

<212>核酸

<213>Triatoma infestans

<400>2

-20

40

GCAAATTTTA CTCTTCCAAC ATGAAGATGA TTATTTCTCT GACATTTCTT GGAATACTGA 60

```

TGCTTGCATT TGCAGAGGTT AACTCTGAAA CATGCACACT TATGGAAGCT GCGAAAAACT 120
TTGATGAAAA CAAGTATTTT AACATTCTCTC TTGCGTATGC GACACATTCG AAGAATCGAG 180
AGCCAGAAAC AAATGTGTGC CGAGAATATA GACTGCAAG AGGACCAGAT GGCAAGACAG 240
TTACAACTTT CACAATTAAG GATAAGACAC TTACTTCTGC TGTCAAATGT ACCAATACGC 300
CCATACCTGG TAGTAACGGC CAGTTTTTCTT CAGATTGCGA ACTATCAGCT GGCAATAGGA 360
TCACAGTAAC TACATCAATT CTTGCTACAG ACAATGAAAA ATATGCTATA CTTCAAAGAT 420
GCCCTACGTC TGGACCAGGT AATATTTTGG TATTGCAAAAC GAATAAAAAAT GCGGTAGAAC 480
AAGGAGTTCA AAATTATTTT AATCAAAAAG GTTGGGATAT AAGCACATGG CTTTCCAGAA 540
CCACTGTTGG TTGTTGAAAC ATCCAGAACT AAACCTGAAA AAAGAAAAAT ATAAAGAATT 600
ATTATTTTAA ATAACTGGC ATTAAGCA AAAAAAAAAA AAAA 644

```

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、Ti-4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2】 図2は、Ti-4蛋白質がコラーゲン凝集に対して及ぼす影響を示すグラフである。

20

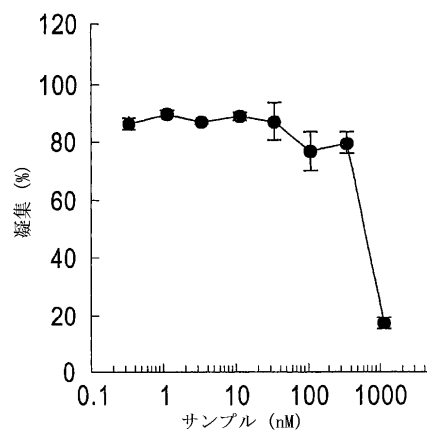
【図1】

```

10      20      30      40      50      60
GCAAAATTTACTCTTCCAACATGAAGATGATTATTTCTCTGACATTTCTTGAATACTGA
M K M I I S L T F L G I L M
70      80      90      100     110     120
TGCTTGCATTGTCAGAGGTTAACTCTGAAAACATGCACACTTATGGAAGCTGCGAAAAACT
L A F A E V N S E T C T L M E A A K N F
130     140     150     160     170     180
TTGATGAAAAACAAGTATTTCAACATTCCTCTTGCATGCGACACATTCGAAGAATCGAG
D E N K Y F N I P L A Y A T H S K N R E
190     200     210     220     230     240
AGCCAGAAACAATCTCTCCAGAAATATACTACTGCAAGAGACCAGATGGCAAGACAG
P E T N V C R E Y S T A R G P D G K T V
250     260     270     280     290     300
TTACAACTTTCACAATTAAGATAAGACACTTACTTCTGCTGTCAAATGTACCAATACGC
T T F T I K D K T L T S A V K C T N T P
310     320     330     340     350     360
CCATACCTGGTAGTAACGGCCACTTTTCTTCCAGATTGCGAACTATCAGCTGGCAATAGGA
I P G S N G Q F S S D C E L S A G N R I
370     380     390     400     410     420
TCACAGTAACTACATCAATTTCTTGCACAGCAATGAAAAATATGCTATACTTCAAAGAT
T V T T S I L A T D N E K Y A I L Q R C
430     440     450     460     470     480
GCCCTACGTCGGACCAGGTAATATTTGGTATTGCAACGAATAAAAAATGGCGTAGAAC
P T S G P G N I L V L Q T N K N G V E Q
490     500     510     520     530     540
AAGGAGTTCAAAATTTATTTAATCAAAAAGGTTGGGATATAAGCACATGGCTTTCCAGAA
G V Q N Y F N Q K G W D I S T W L S R T
550     560     570     580     590     600
CCACTGTGGTGTGCAACATCCAGAATAAATTTGAAAGAAAAAATAAAGAATT
T V G C *
610     620     630     640     650
ATTATTTTAAATAAATCTGGCATTAAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

【図2】



フロントページの続き

- (72)発明者 森田 明広
三重県津市上浜町1丁目270 サンシティ上浜303
- (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
- (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 織戸 由貴
三重県鈴鹿市江島町12-6 サンビレッジ白子C-202号
- (72)発明者 鎮西 康雄
三重県津市河辺町3510-3

合議体

審判長 佐伯 裕子

審判官 富永 みどり

審判官 種村 慈樹

(56)参考文献 特表平7-506959(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

JSTPlus(JOIS)

C12N15/00-15/90