

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5437378号
(P5437378)

(45) 発行日 平成26年3月12日(2014.3.12)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013.12.20)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 9/74 (2006.01)

A 6 1 K 38/48 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 K 9/19 (2006.01)

A 6 1 K 9/70 (2006.01)

C 1 2 N 9/74 Z N A

A 6 1 K 37/547

A 6 1 P 7/04

A 6 1 K 9/19

A 6 1 K 9/70 4 O 1

請求項の数 10 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-528159 (P2011-528159)
 (86) (22) 出願日 平成21年3月4日(2009.3.4)
 (65) 公表番号 特表2012-503477 (P2012-503477A)
 (43) 公表日 平成24年2月9日(2012.2.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2009/000230
 (87) 国際公開番号 W02010/034176
 (87) 国際公開日 平成22年4月1日(2010.4.1)
 審査請求日 平成23年6月14日(2011.6.14)
 (31) 優先権主張番号 200810223433.8
 (32) 優先日 平成20年9月27日(2008.9.27)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 511077269
 コンランズ ファーマシューティカル カ
 ンパニー リミテッド
 中華人民共和国 100085 ペキン
 ハイディアン ディストリクト シャン
 ディ ストリート 3 ナンバー9 ジア
 ホア ビルディング ビルディング A
 7 1 2
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒャップダ由来のヘモコアグララーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒャップダ蛇毒由来のヘモコアグララーゼであって、
 α サブユニットと β サブユニットとにより形成され、前記 α サブユニットと前記 β サブ
 ユニットとが 7 つのジスルフィドで結合され、
 前記 α サブユニットは、129 個のアミノ酸を含有し、配列番号 1 に示すアミノ酸配列
 を有し、
 前記 β サブユニットが 123 個のアミノ酸を含有し、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を
 有することを特徴とするヒャップダ蛇毒由来のヘモコアグララーゼ。

【請求項 2】

セリンプロテアーゼであり、ヒトフィブリノーゲンの α 鎖を加水分解可能であることを
 特徴とする請求項 1 に記載のヒャップダ蛇毒由来のヘモコアグララーゼ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のヘモコアグララーゼを含むことを特徴とする薬物。

【請求項 4】

凍結乾燥散剤、止血パッチ、又は液状噴霧剤の剤型である請求項 3 に記載の薬物。

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載のヒャップダ蛇毒由来のヘモコアグララーゼを精製する方法であっ
 て、

蛇毒を前処理する工程 (1) と、

前処理した蛇毒溶液を前平衡された D E A E - セファロース高流速アニオン交換クロマトグラフィーカラムに注入し、0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で溶出し、次いで 0 M ~ 1 M の N a C l を含む 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で段階的に溶出し、0.06 M の N a C l 溶液の溶出ピーク際の溶出液を収集する工程 (2) と、

前記収集された N a C l 溶出液を、適当に濃縮するか又は数回希釈してから限外濾過濃縮した後に透析し、N a C l を除く工程 (3) と、

透析後の溶液を前平衡された D E A E - セファロース高流速クロマトグラフィーカラムに注入し、0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で溶出し、次いで 0 M ~ 1 M の N a C l を含有する 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で段階的に溶出し、0.06 M の N a C l 溶液の溶出ピーク際の溶出液を収集する工程 (4) と、

10

前記収集された溶出液を適当に濃縮した後、蒸留水で透析し、又はセファデックス - G 2 5 カラムを利用して N a C l を除く工程 (5) と、
を備えることを特徴とするハッポダ蛇毒由来のヘモコアグラゼの精製方法。

【請求項 6】

工程 (1) における蛇毒の前処理が、蛇毒を予冷された 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で溶解し、遠心分離した後、得られた上清液を透析するか、又は数回希釈して限外濾過濃縮する方法である請求項 5 に記載のハッポダ蛇毒由来のヘモコアグラゼの精製方法。

【請求項 7】

工程 (1) における蛇毒の前処理が、
数グラムの蛇毒を採取する工程と、

20

蛇毒の質量の 5 倍 ~ 10 倍相当の容積の予冷された 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S に前記蛇毒をクロマトグラフィー箱中で 4 ~ 8 で 30 分間 ~ 60 分間攪拌しながら溶解させる工程と、

その後、4 ~ 8 で遠心力 5,000 g ~ 10,000 g で 10 分間 ~ 20 分間遠心分離する工程と、

得られた上清液を透析袋に入れる工程と、

遠心分離による沈澱物に再び蛇毒質量の 5 倍 ~ 10 倍の容積の予冷された前記 P B S を加えて攪拌した後、再度遠心分離する工程と、

2 回の遠心分離により得られた上清液を透析袋に集め、4 ~ 8 のクロマトグラフィー箱中で、0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S を利用して 12 時間 ~ 24 時間透析し、その間、P B S 換液を 2 回 ~ 4 回行う工程；又は、蛇毒を蛇毒質量の 10 倍 ~ 20 倍の体積の予冷された 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で溶解し、P B S を繰り返し加えることにより希釈と分画分子量 5,000 D ~ 10,000 D の限外濾過膜での限外濾過とを繰り返す工程と、

30

によって、工程 (1) での蛇毒の前処理を行う請求項 6 に記載のハッポダ蛇毒由来のヘモコアグラゼの精製方法。

【請求項 8】

工程 (2) 及び工程 (4) において、D E A E セファロース高流速クロマトグラフカラムを 0.01 M、pH 7.0 ~ 7.5 の P B S で前平衡したものを使用し、試料を注入する請求項 5 から 7 のいずれかに記載のハッポダ蛇毒由来のヘモコアグラゼの精製方法。

40

【請求項 9】

工程 (5) で得られた脱塩後の溶液を直接凍結乾燥するか、又は坑凍結剤を添加して凍結乾燥する工程を更に含む請求項 5 から 8 のいずれかに記載のハッポダ蛇毒由来のヘモコアグラゼの精製方法。

【請求項 10】

分画分子量 5,000 D ~ 10,000 D の限外濾過膜で限外濾過濃縮して目的蛋白質溶出液の体積を減量してから、透析して脱塩するか；又は、分画分子量 5,000 D ~ 10,000 D の限外濾過膜で、溶出液を繰り返して希釈し、そして限外濾過して脱塩と目

50

的蛋白質の濃縮とを行う請求項5から9のいずれかに記載のハッポダ蛇毒由来のヘモコアグララーゼの精製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、セリンプロテアーゼに関し、特に蛇毒ヘモコアグララーゼ及びそれを単離及び精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

多くのマムシ亜科(Crotalinae)蛇毒に、通常、「トロンビン様酵素」(thrombin-like enzyme、「TLC」と略称する)と呼ばれる血液凝固に関連するプロテアーゼが存在することは国内外の文献で報告されている。トロンビン様酵素は、トロンビンと類似する効果を果たし、両者は、血漿におけるフィブリノーゲンをフィブリンに転化させて、「凝固」することができる。現在、30種類以上の蛇毒にトロンビン様酵素成分が発見され、単離し精製されたのは20種類以上であり、そのうち、10種類以上のトロンビン様酵素の全部又は一部のアミノ酸配列が解明されている。発見されたTLCの分子量の多くは29kDa~45kDaであり、ほとんどは酸性糖蛋白質である。

【0003】

従来発見された蛇毒TLCの蛋白質1次構造は一本鎖の場合が多い。カイサカ(Botrhrops atrox)蛇毒から単離されたトロンビンであるその代表的な製品「レプチラーゼ(Reptilase)」は、そのトロンビンの前駆体が255個のアミノ酸からなり、N端には24個のアミノ酸からなるリーダーペプチドを有し、活性酵素は、231個のアミノ酸を含む。また、相対分子質量が39kDa~43kDaの一本鎖糖蛋白質である。

【0004】

マムシ亜科蛇毒がジスルフィドで鎖間を結合する二本鎖構造を有するかもしれないことは、ここ十年の研究により発見された。また、1999年に、Xin Chengなど(中国科技大学所員)は、ハッポダ(Agkistrodon acutus)から「Agkisacutacin」と命名された「トロンビン様酵素」が単離されたことを報告した。この蛋白質は2本のペプチド鎖からなり、αサブユニットの分子量が15kDa、βサブユニットの分子量が14kDaである。Agkisacutacinは、フィブリノーゲンのα鎖を加水分解することができる。2004年に肖昌華(中科院昆明動物研究所の研究者)は、2種類の「トロンビン様酵素」をハッポダから単離した。これら酵素の分子構造はともに二本鎖構造である。そのうち、TLC IのAサブユニットは132個のアミノ酸を含み、分子量が16kDaであり、Bサブユニットは123個のアミノ酸を含み、分子量が14kDaであり、TLC Iの酵素比活性(ESA)が160u/mgである。TLC IIのAサブユニットは122個のアミノ酸を含み、分子量が15kDaであり、Bサブユニットは120個のアミノ酸を含み、分子量が13kDaであり、TLC IIの酵素比活性(ESA)が70u/mgである。薬理学の試験を行った結果、この2種類のTLCのいずれもが止血の効果を持っていることが確認されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

中国には、蛇毒研究資源が豊かである。本発明者は中国のハッポダから、今まで発見されていなかった高活性のヘモコアグララーゼを単離及び精製することを図る。

本発明は、ハッポダの蛇毒から単離されたトロンビン様酵素である蛇毒ヘモコアグララーゼを提供することを目的とする。

また、本発明は、前記ヘモコアグララーゼを単離及び精製する方法を提供することを目的とする。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明にかかるヘモコアグラーゼは、中国のヒャップダの蛇毒から単離された高活性ヘモコアグラーゼである。この酵素は、以下の特性を有する。

(1) 前記酵素は、252個のアミノ酸を含み、分子量が29.3kDa～29.5kDaであり、等電点pIが5.5である。

(2) 前記酵素は、αサブユニットとβサブユニットとからなり、これらサブユニットの鎖間は7つのジスルフィドで結合されている。

(3) 前記αサブユニットが129個のアミノ酸を含み、分子量が15kDであり、そのアミノ酸配列は配列番号1に示す通りであり、前記βサブユニットが123個のアミノ酸を含み、分子量が14.5kDであり、そのアミノ酸配列は配列番号2に示すとおりである。

(4) 酵素活性をフッ化フェニルメタンスルホニル(PMSF)によって完全に抑制することができ、これは、前記酵素がセリンプロテアーゼであることを示している。

(5) 前記酵素は、ヒトフィブリノーゲンのα鎖を加水分解することができる。

【0008】

本発明における前記ヘモコアグラーゼを単離及び精製する方法は、

蛇毒を前処理する工程(1)と、

前処理した蛇毒溶液を前平衡されたDEAE-セファロース高流速(DEAE-Sepharose FAST FLOW)アニオン交換クロマトグラフィーカラムに注入し、0.01M、pH7.0～7.5のPBSで溶出し、次いで0M～1MのNaClを含有する0.01M、pH7.0～7.5のPBSで段階的に溶出し、0.06MのNaCl溶液の溶出液を収集する工程(2)と、

前記収集した溶出液を、適当に濃縮した後に透析して前記NaClを除くか又は数回希釈してから限外濾過処理して前記NaClを除く工程(3)と、

透析後の溶液を再度、前平衡されたDEAE-セファロース高流速クロマトグラフィーカラムに注入して、0.01M、pH7.0～7.5のPBSで溶出し、次いで0M～1MのNaClを含む0.01M、pH7.0～7.5のPBSで段階的に溶出し、0.06MのNaCl溶液の第2溶出ピーク際の溶出液を収集する工程(4)と、

前記溶出液を適当に濃縮した後、蒸留水で透析し、又はセファデックス-G25(Sephadex-G25)カラムにより脱塩する工程(5)と、を含む。

【0009】

そのうち、工程(1)における蛇毒の前処理は、蛇毒を予冷された適量な0.01M、pH7.0～7.5のPBSで溶解し、溶液を遠心分離し、得られた上清液を透析し(分画分子量が7,000D～10,000Dである透析袋を使用)、又は接線流れ限外濾過する(限外濾過膜の分画分子量が5,000D～10,000D)方法を利用して、前記上清液を何度も繰返し希釈し、限外濾過濃縮することにより行われる。このような前処理によって、不溶性の不純物及び低分子のポリペプチドを除去し、溶液のイオン強度を下げるができる。

【0010】

具体的には、下記の通りに蛇毒を前処理する。

数グラムの蛇毒を採取し、前記蛇毒の質量の5倍～10倍の体積の予冷された0.01M、pH7.0～7.5のPBSに4～8℃温度のクロマトグラフィーの装置内で30分間～60分間攪拌しながら前記蛇毒を溶解させ、4～8℃で遠心力5,000g～10,000gで10分間～20分間遠心分離し、得られた上清液を透析袋に入れ、蛇毒質量の5倍～10倍体積の予冷されたPBSを沈殿物に加え、攪拌した後、再度遠心分離する。低分子のポリペプチドの除去及び溶液のイオン強度を低減するため、このように2回の遠心分離により得られた上清液を透析袋(分画分子量7,000D～10,000D)に集め、4～8℃のクロマトグラフィー装置において0.01M、pH7.0～7.5のPBSで12時間～24時間透析し、その間、2回～4回のPBS換液を行う。

【 0 0 1 1 】

このように、各透析処理の代わりに接線流れ限外濾過（限外濾過膜の分画分子量が 5 , 0 0 0 D ~ 1 0 , 0 0 0 D ）方法を利用し、P B S 希釈、限外濾過濃縮、再度希釈、及び限外濾過することで、溶液が脱塩されると共に、低分子のポリペプチドが除去され、イオン強度を低減することができる。

【 0 0 1 2 】

また、工程（ 2 ）及び工程（ 4 ）において、まず、D E A E - セファロース高流速クロマトグラフカラムを 0 . 0 1 M、p H 7 . 0 ~ 7 . 5 の P B S で前平衡させ、そして、試料を注入する。

【 0 0 1 3 】

また、工程（ 3 ）及び工程（ 5 ）において、溶液中の N a C l を除去することを目的とする。溶出液の濃縮は、限外濾過濃縮方法を利用する。少量の濃縮液の場合は、直接透析してもよく、あるいは別法として、P B S 希釈、限外濾過濃縮、再度希釈、及び再度限外濾過濃縮することにより少量の濃縮液を処理して、蛋白質を濃縮し、N a C l を除去してもよい。最終的に、精製された酵素濃縮液は、セファデックス - G 2 5 カラムで直接に脱塩できる。

【 0 0 1 4 】

脱塩後の溶液を直接凍結乾燥させてもよく、又は抗凍結剤を添加し凍結乾燥させてもよい。前記抗凍結剤としては、例えば低分子量のデキストラン、マンニット、スクロース、グリセリン、ゼラチン、ヒト血漿アルブミンなどが挙げられる。抗凍結剤の添加量は、1 % ~ 5 % (w / v) である。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法で精製されたヘモコアグラージェにおいては、比活性が 1 8 0 u / m g 蛋白質以上であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ P A G E ）方法で 1 本の蛋白質のバンドが検出され、還元ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ S D S - P A G E ）方法で 2 本のバンドが検出される。高速液体クロマトグラフィー（ H P L C ）分析の精度は、9 5 % 以上であり、蛇毒原料の重量に対する収率は、0 . 7 % ~ 0 . 8 % である。

【 0 0 1 6 】

本発明のヘモコアグラージェは、良好な凝集活性を有するため、様々な止血薬物の製造に適用できる。例えば、本発明のヘモコアグラージェを所定の酵素活性ユニットになるように希釈してから、抗凍結剤（低分子量のデキストラン 2 0 又はヒト血漿アルブミン）を添加し、ウィルス膜で濾過した後、凍結乾燥し、外科手術及び他の臨床出血症状に用いる止血用凍結乾燥粉末状注射薬を製造することができる。本発明のヘモコアグラージェはまた、外用止血貼り薬、粉剤又は液状噴霧剤に製造してもよい。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明にかかるヘモコアグラージェがヒトフィブリノーゲンを加水分解することを示す図である。そのうち、4 h、2 h、1 h、0 . 5 h はそれぞれヘモコアグラージェがヒトフィブリノーゲンを加水分解する時間を示し、F はヒトフィブリノーゲンの対照試料の場合を示し、M は蛋白質の分子量標準物質を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 8 】

以下、実施例により本発明を説明するが、これらの実施例に限定されたものではない。本発明の趣旨及び実質を逸脱しない限り、本発明の方法、工程又は条件に対しての修正又は取り換えることも、全て本発明の範囲に属する。

特に指定しない限り、実施例における技術手段は、すべて当業者が公知的な技術手段である。

【 0 0 1 9 】

特に説明しない限り、本明細書において「 % 」は質量 % であるが、溶液の百分率とは、

10

20

30

40

50

特に指定しない限り、100 mL の溶液に含まれる溶質の質量を示す。各液体間の百分率とは、20 での各容量の比率である。本明細書において、「蛇毒の質量の10倍体積」という用語について、その質量と体積の単位はそれぞれ g 及び mL である。

【実施例】

【0020】

実施例1 ヘモコアグラゼの精製

ヒャッポダ由来の蛇毒粉末（ロット番号：20061001、中国広西蛇毒研究所製）30 g を、蛇毒質量の10倍体積の予冷された0.01 M、pH 7.4 のPBSに4 のクロマトグラフィーの装置中で30分間攪拌しながら溶解させ、4 で遠心力10,000 g で10分間遠心分離を行い、得られた上清液を透析袋に移し、遠心分離沈澱物に蛇毒重量の10倍体積の予冷されたPBSを加え、再度攪拌した後、再び遠心分離した。2回の遠心分離によって得られた上清液を透析袋（分画分子量7,000 D）に集め、4 のクロマトグラフィーの装置中で0.01 M、pH 7.4 のPBSを利用して24時間透析し、その間、PBS換液を3回行った。前処理された蛇毒溶液を、0.01 M、pH 7.4 のPBSで前平衡されたDEAE - セファローズ高流速アニオン交換クロマトグラフィーカラムに注入し、0.01 MのpH 7.4 のPBSで溶出し、次いでそれぞれ0.02 M、0.06 M及び1.0 MのNaClを含む0.01 M、pH 7.4 のPBSで段階的に溶出し、0.06 MのNaCl溶液の溶出ピーク際の溶出液を収集した。

【0021】

酵素活性測定（添付の配列表を参照）及び電気泳動分析によって、目的物が0.06 MのNaCl溶液の溶出ピークに現れたことが分かる。溶出液を集め、合計で2,220 mLの溶出液を得た。ミリポアペリコン2（Millipore pellicon2）の接線流れ限外濾過器（0.1 M²の分画分子量5 kDaの膜）で前記2,220 mL溶液を220 mLに限外濾過濃縮した。この220 mL限外濾過濃縮液を透析袋（分画分子量7,000 D）に注入し、0.01 M、pH 7.4 のPBS 5,000 mLを用いて4 で24時間透析し、その間、換液を3回行った。透析後の酵素溶液を前平衡されたDEAE - セファローズ高流速アニオン交換クロマトグラフィーカラムに注入して、0.01 M、pH 7.4 のPBSで溶出した。そして、それぞれ0.02 M、0.04 M、0.06 M及び1.0 MのNaClを含む0.01 M、pH 7.4 のPBSで段階的に溶出して、0.06 MのNaCl溶液の第2溶出ピークでの溶出液2を収集して1,050 mLの溶出液を得た。酵素活性測定とPAGE方法で1本の蛋白質バンドが検出されたので、精製されたことがわかる。ミリポアペリコン2接線流れ限外濾過機（0.1 M²で分画分子量5 kDaの膜）で前記1,050 mL溶出液を限外濾過して135 mLに濃縮した。この135 mL濃縮液を透析袋に移し、純水で24時間透析し、その間、5 mLの換液を3回行った。透析後の酵素溶液においては、体積が159 mLであり、総蛋白質が合計240 mgであり、酵素の比活性が195 u/mg蛋白質であることが測定され、最終収率は0.8%である。HPLC分析により検出された純度が98.2%で、還元SDS - PAGEにより2本の蛋白質の分子量がそれぞれ約15 kDa及び14.5 kDaであることがわかった。等電点電気泳動により検出されたこの酵素の等電点pIは5.5である。

【0022】

De novo法で測定されたアミノ酸配列において、上記2つのバンドのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1及び配列番号2で示される。αサブユニット（配列番号1）は、129個のアミノ酸を含んで、アミノ酸だけで計算すると分子量が14660.7ダルトンとなる。βサブユニット（配列番号2）は、123個のアミノ酸を含み、アミノ酸だけで計算すると分子量が14,551.8ダルトンとなる。αサブユニットとβサブユニットのいずれもが7つのシスチン残基を含む。

【0023】

実施例2 蛇毒ヘモコアグラゼの精製

ヒャッポダ蛇毒粉末（ロット番号：20061001、中国広西蛇毒研究所製）30 g を300 mLの予冷された0.01 M、pH 7.4 のPBSに、4 のクロマトグラフィ

10

20

30

40

50

一の装置で60分間攪拌しながら溶解させた。得られた溶液を4 で遠心力1,000gで15分間遠心分離を行って、得られた上清液を透析袋に移し、遠心分離沈澱物に300mLの予冷されたPBSを添加し、再度攪拌し懸濁させた後、再び遠心分離した。2回の遠心分離によって得られた上清液を透析袋(分画分子量10,000D)に集め、4 のクロマトグラフィーの装置で0.01MのpH7.4のPBSを利用して24時間透析し、その間、PBS換液を3回行った。

【0024】

実施例1の方法と同様に、前記の前処理された蛇毒溶液を、第1回目のDEAE-セファロース高流速カラムクロマトグラフィー処理した。酵素活性測定及び電気泳動分析によって、目的物が0.06MのNaCl溶液の溶出ピークに現れたことが分かる。溶出された収集液を集め、合計で2,262mLの溶出液が得られた。ミリポアペリコン2接線流れ限外濾過器(0.1M²の分画分子量5kDaの膜)で前記2,262mL溶出液を限外濾過して200mLに濃縮した。上記200mL限外濾過濃縮液を透析袋(分画分子量10,000D)に移し、0.01M、pH7.4のPBSを5,000mL用いて24時間透析し、その間、PBS換液を3回行った。透析後の酵素溶液をDEAE-セファロース高流速カラムに注入し、実施例1と同様の方法で第2回のクロマトグラフィー処理を行った。ヘモコアグラゼは、0.06MのNaCl溶液の第2溶出ピークに現れ、この溶出ピーク際の溶出液を集めて956mLの溶出液を得た。酵素活性測定及びPAGE方法で1本の蛋白質バンドが検出されたため、精製されたことがわかる。ミリポアペリコン2接線流れ限外濾過器(0.1M²の分画分子量5kDaの膜)で前記956mL溶出液を限外濾過して192mLに濃縮した。この192mL濃縮液をセファデックス-G25カラムに注入して、純水で溶出し脱塩して、溶出ピーク際の322mLの溶出液を得た。当該溶出液を直接に凍結乾燥し、総量が235mgである蛋白質を得た。得られた蛋白質の比活性が200u/mg蛋白質で、最終収率が0.78%である。HPLC分析により純度が99%で、クロマトグラムが実施例1と同様であり、還元SDS-PAGEにより検出された蛋白質バンドが2本で、その分子量がそれぞれ約15kDa及び14.5kDaである。

【0025】

実施例3 蛇毒ヘモコアグラゼの精製

工程(1)において、ハットポダ蛇毒の乾燥粉末(ロット番号:20061001、中国広西蛇毒研究所製)100gを4 ~ 8 のクロマトグラフィーの装置に入れ、2,000mLの予冷された0.01M、pH7.4のPBSに60分間攪拌しながら溶解させた。その蛇毒溶液を4 で遠心力10,000gで20分間遠心分離を行い、得られた上清液を3,000mLのビーカーに移した。そして、ミリポアペリコン2接線流れ限外濾過器(0.1M²の分画分子量8kDaの膜)で上清液を限外濾過し、500mLに濃縮し、さらに、予冷された0.01M、pH7.4のPBS溶液1,500mLを上記の濃縮液に添加し、そして、再度500mLまで限外濾過した。このように限外濾過濃縮を3回に繰り返した。

【0026】

工程(2)において、上記の500mL限外濾過濃縮液に0.01MのpH7.4のPBS溶液1,500mLを添加し、35mL/min~40mL/minの流量でDEAE-セファロースFFカラムに注入した。

【0027】

工程(3)において、注入後、70mL/min~80mL/minの流量で順次に0.02M、0.06M及び1.0MのNaClを含有する0.01M、pH7.4のPBSを使用して溶出処理を行った。

【0028】

工程(4)において、目的蛋白質が0.06MのNaCl溶出液に出現し、この溶出ピーク際の溶出液6,750mLを収集した。

【0029】

工程(5)において、この6,750mL溶出液をミリポアペリコン2接線流れ限外濾過器(0.1M²で分画分子量8kDaの膜)で限外濾過し、500mLに濃縮した。

【0030】

工程(6)において、前記500mLの限外濾過濃縮液に0.01M、pH7.4のPBS溶液1,500mLを添加し、再度500mLまで限外濾過した。このように限外濾過濃縮を3回に繰り返した。

【0031】

工程(7)において、前記500mL限外濾過濃縮液に0.01M、pH7.4のPBS溶液1,500mLを添加して、流量35mL/min~40mL/minでDEAE-セファロースFFカラムに注入した。

10

【0032】

工程(8)において、カラムに添加してから、それぞれ0.02M、0.04M、0.06Mおよび1.0MのNaClを含む0.01M、pH7.4のPBS溶液10Lを順次に利用し、流量70mL/min~80mL/minで溶出させた。

【0033】

工程(9)において、酵素活性測定によって、目的蛋白質が0.06MのNaCl溶液の第2溶出ピーク際の溶出液に現われ、この溶出液3,050mLを収集した。PAGEにより1本の蛋白質バンドが検出されたので、酵素が精製されたことがわかる。

【0034】

工程(10)において、前記3,050mL溶出液をミリポアペリコン2接線流れ限外濾過器(0.1M²で分画分子量8kDaの膜)で限外濾過し、300mLに濃縮した。当該300mLの濃縮液をセファデックス-G25カラムに注入し、純水で溶出して脱塩させ、溶出ピーク際の溶出液を490mL収集した。この溶出液中の総蛋白質量は752mgであり、比活性が183u/mg蛋白質であり、最終収率が0.75%である。HPLC分析により純度が98.0%で、クロマトグラムは実施例1と同様である。

20

【0035】

工程(11)において、濾液の体積に対して、抗凍結剤として1%の低分子量のデキストラン20を添加し、その後、ミリポアピレスルブNFPフィルターオプチスケール25(Millipore Viresolve NFP Filters OptiScale-25)ウィルス膜で濾過した。

30

【0036】

工程12において、濾液を直接容器に入れてから、凍結乾燥した。

【0037】

工程(13)において、凍結乾燥粉末は、PAGE方法により1本のバンドが検出され、還元SDS-PAGEによると2本の蛋白質バンドが検出され、また、各分子量がそれぞれ約15kDaと14.5kDaである。

【0038】

実施例4 蛇毒ヘモコアグラーゼのセリン蛋白質の属性試験

実施例2で単離されたヘモコアグラーゼをHPLCで更に精製して、HPLC3次元検査により求めた蛋白質純度が100%であり、また、酵素活性が10u/mLであるヘモコアグラーゼ溶液を得た。

40

生理食塩水で1%の牛フィブリノーゲン(シグマ社製)を調製した。

溶液濃度が4mg/mLになるようにイソプロパノールでフッ化フェニルメタンスルフォニル(PMSF、メルク社製)を溶解した。

【0039】

試験工程は下記の通りである。

工程(1)において、1%の牛フィブリノーゲン溶液2mLを37℃恒温で5分間放置した。

【0040】

工程(2)において、3つの試験管をそれぞれ1#、2#、3#のように表記し、蒸留

50

水で1倍に希釈されたヘモコアグラゼ溶液 $200\ \mu\text{L}$ ($5\ \text{u}/\text{mL}$) を各試験管に添加した。

【0041】

工程(3)において、1#試験管に蒸留水 $10\ \mu\text{L}$ を、2#試験管にイソプロパノール $10\ \mu\text{L}$ を、3#試験管にPMSFを $10\ \mu\text{L}$ 添加して、37 恒温の水浴で5分間放置した。

【0042】

工程(4)において、試験管の表記順番に応じて、それぞれ試験管ごとに凝集試験を行い、その結果を観測した。各試験管に恒温された1%の牛フィブリノーゲン $200\ \mu\text{L}$ を添加した直後に計時を始めるとともに、試験管を軽く振り、37 の水浴に放置し、試験管内の凝集状況を観測した。溶液が完全に凝固状態になったときに計時を停止した。

結果を表1に示す。

【0043】

【表1】

PMSFの凝集時間に対する影響

試験管 番号	1%のフィ ブリノーゲ ン溶液	ヘモコアグラゼ 溶液 ($5\text{u}/\text{mL}$)		凝集時間
1#	$200\ \mu\text{L}$	$200\ \mu\text{L}$	$10\ \mu\text{L}$ 蒸留水	50秒間
2#	$200\ \mu\text{L}$	$200\ \mu\text{L}$	$10\ \mu\text{L}$ イソプロ パノール	50秒間
3#	$200\ \mu\text{L}$	$200\ \mu\text{L}$	$10\ \mu\text{L}$ PMSF	600秒間 を超えた

【0044】

表1の試験結果により、以下の二つの結論に結びつける。

$100\ \text{ppm}$ 濃度のPMSFがヘモコアグラゼの活性を完全に抑制することにより、上記ハットダ蛇毒由来のヘモコアグラゼがセリンプロテアーゼであることがわかる。微量のイソプロパノールは上記凝集反応に影響を与えない。

【0045】

実施例5 ハットダ蛇毒由来のヘモコアグラゼでヒトフィブリノーゲンの加水分解試験

$50\ \text{mM}$ の $\text{Tris}-\text{HCl}$ ($\text{pH}\ 7.4$) 緩衝液を用いて、 $4\ \text{mg}/\text{mL}$ のヒトフィブリノーゲン溶液を調製し、そして、5つの試験管にそれぞれヒトフィブリノーゲン溶液 $0.5\ \text{mL}$ を添加した。そのうち、4つの上記試験管に1活性単位の精製ヘモコアグラゼを加え、37 の水浴にそれぞれ4時間、2時間、1時間、及び0.5時間という異なる保温時間で維持した。保温完了した直後にSDS-PAGE電気泳動を行い、ヒトフィブリノーゲンの加水分解度を観測した。一方、残った1つの $0.5\ \text{mL}$ のヒトフィブリノーゲン溶液を含む試験管を対照サンプルとし、37 の水浴中で4時間保温した。

【0046】

図1に示すように、ヘモコアグラゼで加水分解されなかったフィブリノーゲン対照サンプルの電気泳動スペクトルには、3本のバンドがあり、F列の3本のバンドは上から順番に α サブユニット、 β サブユニット、 γ サブユニットを示す。フィブリノーゲンをヘモコアグラゼ(1単位)で0.5時間及び1時間処理すると、 α サブユニットのバンドが

徐々に薄くなり、2時間又は4時間処理後では、 α サブユニットのバンドが完全に消失した。これにより、ヘモコアグラーゼがヒトフィブリノーゲンの α サブユニットを加水分解する効果を有することが確認できる。

【0047】

付 録

ハットダ蛇毒由来のヘモコアグラーゼ単位の定義及び活性測定方法

【0048】

牛フィブリノーゲン測定法

生理食塩水で調製した1.0%の牛フィブリノーゲン（シグマ社製）1 mLを試験管に加え、 37 ± 0.5 の水浴で3分間保温し、そして、さらに 37 ± 0.5 の予熱された酵素溶液1 mLを添加した直後に計時を始める。試験管を 120 ± 30 秒間振盪し、牛フィブリノーゲン溶液に白色フロックが発生すると、上記酵素溶液の活性単位が1 u/mLであることを確認できる。

10

【0049】

標準ヒト血漿測定法

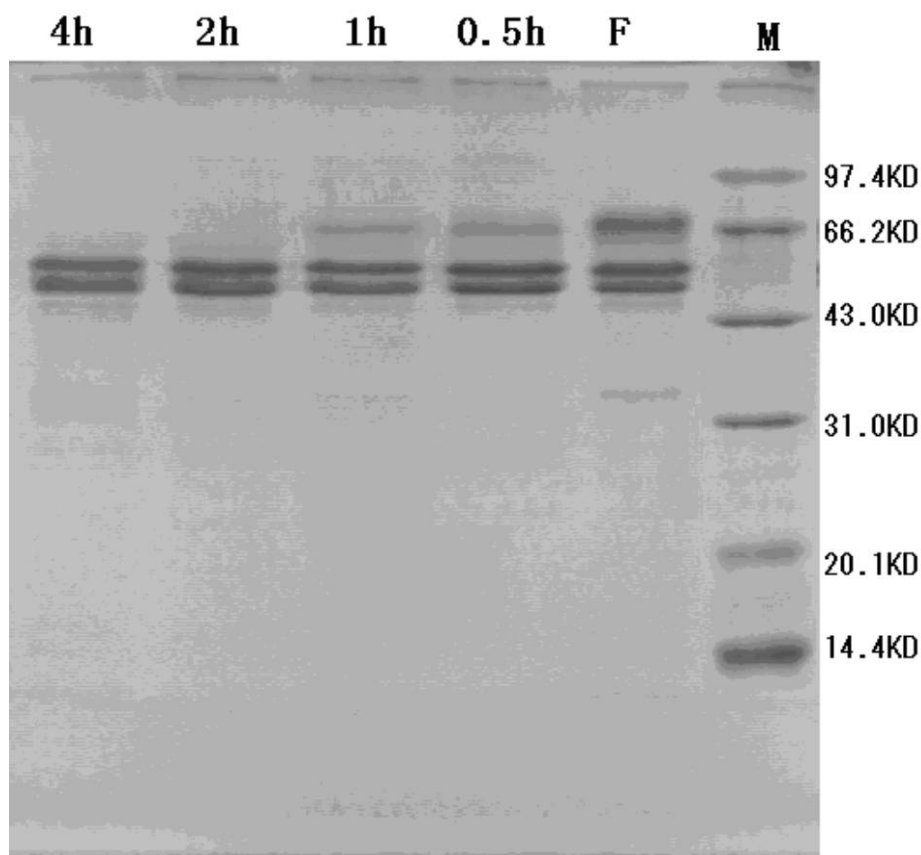
標準ヒト血漿1 mLを試験管に加え、 37 ± 0.5 の水浴で3分間予熱し、そして、さらに 37 ± 0.5 の予熱された酵素溶液1 mLを前記試験管に添加した直後に計時を始める。試験管を 60 ± 20 秒間振盪し、ヒト血漿に白色フロックが発生すると、この酵素溶液の活性単位が1 u/mLであることを確認できる。

【0050】

20

未知の高酵素活性溶液を測定する場合、純水で1 u/mLに希釈した後に測定する必要がある。希釈倍数は1 mLの原酵素溶液中の酵素活性単位である。

【図1】



【配列表】

0005437378000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K 9/12
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K	35/58	(2006.01)	A 6 1 K 35/58

(72)発明者 ディ・スン
 中華人民共和国 1 0 0 0 8 5 ペキン ハイディアン ディストリクト シャン ディ ストリ
 ート 3 ナンバー 9 ジアホア ビルディング ビルディング A 7 1 2

(72)発明者 シージュエン・ワン
 中華人民共和国 1 0 0 0 8 5 ペキン ハイディアン ディストリクト シャン ディ ストリ
 ート 3 ナンバー 9 ジアホア ビルディング ビルディング A 7 1 2

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 米国特許第 0 6 4 8 9 4 5 1 (U S , B 1)
 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 2 2 3 5 0 (U S , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 5 3 8 3 1 (U S , A 1)
 Biochemical and Biophysical Research Communications , 1 9 9 9 年 , Vol.265 , p.530-535
 Toxicol , 2 0 0 2 年 , Vol.40 , p.803-813
 Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography , 1 9 9 9 年 , Vol.55 , p.1
 193-1197

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C 1 2 N 9 / 0 0
 BIOSIS / MEDLINE / WPIDS / WPIX (STN)
 GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
 UniProt / GeneSeq