

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3668880号
(P3668880)

(45) 発行日 平成17年7月6日(2005.7.6)

(24) 登録日 平成17年4月22日(2005.4.22)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C07K 14/435

C07K 14/435

C07K 7/08

C07K 7/08

C12N 15/09

C12N 15/00 Z N A A

請求項の数 14 (全 53 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平7-512187 | (73) 特許権者 | ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ ファウンデーション |
| (86) (22) 出願日 | 平成6年10月19日(1994.10.19) | | アメリカ合衆国, 84108 ユタ州, ソ ルト レイク シティ, ワカラ ウェイ 421, スイート 170 |
| (65) 公表番号 | 特表平10-509415 | (74) 代理人 | 弁理士 鶴沼 辰之 |
| (43) 公表日 | 平成10年9月14日(1998.9.14) | (74) 代理人 | 弁理士 熊澤 繁 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US1994/011927 | (74) 代理人 | 弁理士 吉岡 宏嗣 |
| (87) 国際公開番号 | W01995/011256 | (74) 代理人 | 弁理士 石井 博樹 |
| (87) 国際公開日 | 平成7年4月27日(1995.4.27) | | |
| 審査請求日 | 平成13年10月9日(2001.10.9) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 08/137,800 | | |
| (32) 優先日 | 平成5年10月19日(1993.10.19) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コノトキシン (conotoxin) ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Xaa₁ が Arg - Thr - Leu であり、アミノ酸が Gly - Cys - Cys - Cys - Asn - Pro - Ala - Cys - Gly - Pro - Asn - Tyr - Gly - Cys - Gly - Thr - Ser - Cys - Ser - Xaa₁ (配列番号:10) である A - 血統のコノトキシン ペプチド。

【請求項2】

Gly - Cys - Cys - Ser - Asp - Pro - Arg - Cys - Ala - Trp - Arg - Cys (配列番号:12) と、Xaa₁ が Pro 又は望ましくはヒドロキシ - Pro である Arg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Tyr - His - Pro - Thr - Cys - Asn - Met - Ser - Asn - Pro - Gln - Ile - Cys (配列番号:13) と、Xaa₁ 又は Xaa₂ が Pro 又はヒドロキシ - Pro であり Xaa₃ が Asp 又は - カルボキシアルパラギン酸である Gly - Cys - Cys - Ser - His - Xaa₁ - Ala - Cys - Ser - Val - Asn - Asn - Xaa₂ - Xaa₃ - Ile - Cys (配列番号:14) と、

Xaa₁ 又は Xaa₂ が Pro 又はヒドロキシ - Pro である Glu - Cys - Cys - Thr - His - Xaa₁ - Ala - Cys - His - Val - Ser - His - Xaa₂ - Glu - Leu - Cys (配列番号:15) と、

Asp - Tyr - Cys - Cys - His - Arg - Gly - Pro - Cys - Met - Val - Trp - Cys (配列番号:16) と、

Xaa₁ が Ser 又は Asn である Gln - Asn - Cys - Cys - Ser - Ile - Pro - Ser - Cys - Trp - Glu - Lys - Tyr - Lyr - Cys - Xaa₁ (配列番号:17) と、

Gly - Cys - Cys - Ala - Ile - Arg - Glu - Cys - Arg - Leu - Gln - Asn - Ala - Ala - Tyr - Cys - Gly - Gly - Ile - Tyr (配列番号:18) と、

10

20

Xaa₁がPro又はヒドロキシ - ProであるGly - Cys - Cys - Ser - Asn - Xaa₁ - Val - Cys - His - Leu - Glu - His - Ser - Asn - Leu - Cys (配列番号:19) と、

Xaa₁又はXaa₂がPro又はヒドロキシ - ProでありXaa₃がGlu又は - カルボキシグルタミン酸であるGly - Gly - Cys - Cys - Ser - Phe - Xaa₁ - Ala - Cys - Arg - Lys - Tyr - Arg - Xaa₂ - Xaa₃ - Met - Cys - Gly (配列番号:20) と、

Xaa₁又はXaa₂がPro又はヒドロキシ - ProでありXaa₃がGlu又は - カルボキシグルタミン酸であるAla - Cys - Cys - Ser - Tyr - Xaa₁ - Pro - Cys - Asn - Val - Asn - Tyr - Xaa₂ - Xaa₃ - Ile - Cys - Gly - Gly - Arg (配列番号:21) と、

Asn - Gly - Cys - Cys - Arg - Asn - Pro - Ala - Cys - Glu - Ser - His - Arg - Cys - Gly (配列番号:22) と、

Asn - Val - Val - Val - Thr - Ser - Phe - Glu - Pro - Thr - Thr - Leu - Ala - Pro - Val - Pro - Ser - Asp - Cys - Cys - Gln - Val - Ser - Ser - Cys - Trp - Asn - Leu - Tyr - Gly - Leu - Glu - Cys - Thr - Gly - Ile - Thr - Arg - Arg - Arg - Thr - Leu (配列番号:23) と、

Asn - Val - Ala - Ile - Thr - Ser - Phe - Glu - Pro - Thr - Thr - Leu - Ala - Pro - Val - Pro - Ser - Asp - Cys - Cys - Gln - Val - Ser - Ser - Cys - Trp - Asn - Leu - Tyr - Gly - Pro - Glu - Cys - Thr - Gly - Ile - Thr - Arg - Arg - Arg - Thr - Leu (配列番号:24) と、

Xaa₁がPro又はヒドロキシ - ProであるArg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Tyr - His - Pro - Thr - Cys - Asn - Met - Ser - Asn - Pro - Gln - Ile - Cys (配列番号:31) と、

Xaa₁がPro又はヒドロキシ - ProであるArg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Ser - Asn - Pro - Ala - Cys - Asn - Val - Asn - Asn - Pro - Gln - Ile - Cys (配列番号:32) とで構成されるグループから選択されたA - 血統のコノトキシン ペプチド。

【請求項3】

配列Gly - Cys - Cys - Ser - Asp - Pro - Arg - Cys - Ala - Trp - Arg - Cys (配列番号:12) を有する請求項2に記載したA - 血統のコノトキシン ペプチド。

【請求項4】

Xaa₁がPro又はヒドロキシ - Proである配列Gly - Cys - Cys - Ser - Asn - Xaa₁ - Val - Cys - His - Leu - Glu - His - Ser - Asn - Leu - Cys (配列番号:19) を有する請求項2に記載したA - 血統のコノトキシン ペプチド。

【請求項5】

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26) であるGln - Lys - Glu - Leu - Val - Pro - Ser - Val - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Arg - Cys - Thr - Asn - Ser - Cys - Pro - Thr - Lys - Pro - Lys - Lys - Pro - Xaa₁ (配列番号:25) と、Xaa₁がGlu又は - カルボキシグルタミン酸でありXaa₂がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26) であるAla - Pro - Xaa₁ - Leu - Val - Val - Thr - Ala - Thr - Thr - Asn - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asn - Pro - Met - Thr - Ile - Cys - Pro - Pro - Cys - Met - Cys - Thr - Tyr - Ser - Cys - Pro - Pro - Lys - Arg - Lys - Pro - Xaa₂ (配列番号:27) と、

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号26) であるGlx - Thr - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Thr - Cys - Met - Cys - Asp - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ (配列番号:28) と、

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - His (配列番号:30) であるAla - Pro - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Ser - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Met - Cys - Asn - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ (配列番号:29) と、

Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, 及びXaa₅がPro又はヒドロキシ - ProであるGly - Cys - Cys - Gly - Pro - Tyr - Xaa₁ - Asn - Ala - Ala - Cys - His - Xaa₂ - Cys - Gly - Cys - Lys - Val - Gly - Arg - Xaa₃ - Xaa₄ - Tyr - Cys - Asp - Arg - Xaa₅ - Ser - Gly - Gly (配列番号:33) とで構成されるグループから選択されたA - 血統のコノトキシン ペプチド。

【請求項6】

10

20

30

40

50

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である配列Gln - Lys - Glu - Leu - Val - Pro - Ser - Val - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Arg - Cys - Thr - Asn - Ser - Cys - Pro - Thr - Lys - Pro - Lys - Lys - Pro - Xaa₁ (配列番号:25)を有する請求項5に記載したA - 血統のコノトキシ
ンペプチド。

【請求項7】

Xaa₁がGlu又は - カルボキシグルタミン酸でありXaa₂がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である配列Ala - Pro - Xaa₁ - Leu - Val - Val - Thr - Ala - Thr - Thr - Asn - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asn - Pro - Met - Cys - Thr - Tyr - Ser - Cys - Pro - Pro - Lys - Arg - Lys - Pro - Xaa₂ (配列番号:27)を有する請求項5に記載したA - 血統のコノト
キシ
ンペプチド。

10

【請求項8】

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である配列Glx - Thr - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Thr - Cys - Met - Cys - Asp - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ - (配列番号:28)を有する請求項5に記載したA - 血統のコノトキシ
ンペプチド。

【請求項9】

Xaa₁がdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - His (配列番号:30)である配列Ala - Pro - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Ser - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Met - Cys - Asn - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ (配列番号:29)を有する請求項5に記載したA - 血統のコノトキシ
ンペプチド。

20

【請求項10】

1以上のPro残分がヒドロキシ - Proであることを特徴とする請求項1乃至9のいずれか1項に記載したA - 血統のコノトキシ
ンペプチド。

【請求項11】

Glu残分が - カルボキシグルタミン酸であることを特徴とする請求項2、4、5、6、7、8、9のいずれか1項に記載したA - 血統のコノトキシ
ンペプチド。

【請求項12】

プライマー5' - TCTGCGAATGGGCATGCGGATGATGTT - 3' (配列番号:52)及び5' - TGCTCCAACGTCGTGGTTCAGAGGGTC - 3' (配列番号:53)を使用してコヌスの核酸を増幅し、約240塩基対の増幅した核酸を分離し、増幅した核酸を配列決定し、A - 血統のコノトキシ
ンペプチドを暗号化している核酸を識別することによりA - 血統のコノトキシ
ンペプチドを識別することを包含する、A - 血統のコノトキシ
ンペプチドを識別するための方法。

30

【請求項13】

配列5' - TCTGCGAATGGGCATGCGGATGATGTT - 3' (配列番号:52)を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項14】

配列5' - TGCTCCAACGTCGTGGTTCAGAGGGTC - 3' (配列番号:53)を有するオリゴヌクレオチド。

40

【発明の詳細な説明】

本発明は、メリーランド州ベセスダにある国立保健研究所 (National Institutes of Health) から交付された研究助成番号GM - 22737の下に政府の援助を受けてなされたものである。米国政府はこの発明に対する権利を保有する。

発明の背景

本発明は比較的短いペプチドに係り、特に長さで約10個の残分から約45個の残分間のペプチドに関する。このペプチドは、自然界ではイモガイの毒液の中で少量利用可能なものであるか或いは自然界で利用可能なペプチドの類似品であり、2乃至3個の環化ジスルフィド結合を備えている。ここに開示するペプチドは、1つの血縁家族、“A - 血統”のコ
ノトキシ
ンペプチド。

50

ノトキシン (conotoxin) ペプチドに属している。

本発明の背景を明らかにするためにここに使用される出版物及びその他の材料は、特に実践に関しての詳細の追加的な記述の提供の場合には、引用することによって関連付けを採り、便宜上以下のテキスト中に及び付録の文献目録の中にそれぞれにグループ分けしてある参照番号によって引用する。

コヌス (Conus) 属の軟体類は強い毒性の毒液を作り出し、この毒液がこれらのユニークな食肉性ライフスタイルの実践を可能にしている。餌食は、高度に特化された毒液装置、即ち自由に使用できる中空の歯を使って注入する毒液のために動けなくされるが、この中空の歯は組織切取器及び皮下針の両方の使用法に対して機能する。

生体間のいくつかの相互作用には、毒液分泌動物と被毒物注入犠牲者との間の相互作用よりももっと驚くべきものがある。毒液は、餌食を捕捉するための主要な武器として或いは防御機構として使用され得る。これらの毒液は被毒液注入動物内の不可欠器官を崩壊させるが、これらの毒液の多くは神経筋システムのレセプタ及びイオンチャンネルに向かって行く分子を包含する。

10

食肉性イモガイ (コヌス) はユニークな生物学的な戦略を発展させた。彼らの毒液は比較的小さなペプチドを含み、このペプチドは種々の神経筋レセプタを標的に定めており、植物アルカロイド又は微生物の2次代謝産物に匹敵するような薬理学的多様性を秘め得るものとなっている。これらのペプチドの多くは、定義されたコンフォメーションを有する最小核酸暗号化翻訳の製品の中にあり、従って何処か普通のものと異なっている。このサイズ範囲のペプチドは通常多くのコンフォメーションの中で平衡している。固定されたコン

20

フォメーションを有する蛋白は一般には遥かに大きい。一般にコノトキシン又はコノトキシンペプチドと云われるこれらの有毒ペプチドを生産するイモガイは、約500の種を持つ大きな有毒腹足類属である。全てのイモガイ種は、餌食を捕捉するために毒液を注入する捕食動物であり、又属が全体として毒物注入を行い得る動物のスペクトルは幅が広い。使用される狩猟戦略は、幅が広く多様性に富む。しかしながらそれぞれのコヌス種は基本的には同一ベースの毒物注入パターンを使用する。

これらの魚狩猟用のイモガイ毒液の中の主な麻酔性ペプチドは識別され特性を空かされた最初のものであった。コヌスゲオグラフィス (C. Geographus) 毒液中には、3つのクラスのジスルフィド潤沢ペプチドが発見された。即ち (ニコチンアセチルコリンレセプタを標的と定めてブロックする) μ -コノトキシンペプチドと、(骨格筋Na⁺チャンネルを標

30

的と定めてブロックする) μ -コノトキシンペプチドと、(シナプス前部のニューロンのCa²⁺チャンネルを標的と定めてブロックする) μ -コノトキシンペプチドとである。しかしながら、各トキシンのクラスには多重相同体が存在し、例えば、コヌスゲオグラフィス毒液の中だけでも少なくとも5つの違ったコノトキシンペプチドが存在する。配列の中では可成りの変動のあることが明らかであり、異種のコノトキシンペプチド配列が最初に比べられた時には、ジスルフィド結合の中に含まれるシステイン残分と1個のグリシン残分とのみが増減しないことが発見された。コヌスゲオグラフィス毒液の中に発見されるコノトキシンの他のクラスには、若いマウスには眠りを誘い、年よりのマウスには機能亢進をもたらすコナントキン (conantokins) と呼ばれるコノトキシンがあり、NMDAレセプタに標的が設定されている。各イモガイの毒液は、異なるコノトキシン配列の

40

独自の特色のあるグループ又は使用法を持つように見える。

発明の概要

本発明はA-血統のコノトキシンペプチドに向けられている。A-血統のコノトキシン

50

ペプチドは、信号配列及び - コノトキシン ペプチドの中の配列に対する遺伝子コード化の3 - 非翻訳領域における強い相同性を有するコノトキシン ペプチドである。A - 血統のコノトキシン ペプチドは、信号配列及び3 - 非翻訳領域に基礎を置くプライマーを使用しての毒液管のmRNAの逆転写で用意されるコヌスCDNAライブラリー又はCDNAのポリメラーゼ配列反応(PCR)増幅を実行することによって識別され得る。A - 血統のコノトキシン ペプチドは、 - コノトキシン ペプチド、 - コノトキシン様ペプチド、及び更に後述する - コノトキシン ペプチドを包含する。

- コノトキシン ペプチドは一般に“核”配列モチーフを共有する。この核配列は 3/5核と名付けられ、Cys - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配列番号:1) で表わされる。この核配列は、更にアミノ酸の初期グループがXaa₁ - Pro - Ala 10 であると定義され得る。ここにXaa₁はAsn又はHisである。

- コノトキシン様ペプチドは一般には 4/7核と名付けられた核配列を共有し、Cys - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配列番号:2) で表わされる。 - コノトキシン ペプチドは一般に - 7/2/1/3核と名付けられた核配列を共有し、Cys - Cys - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配列番号:3) で表わされる。これらは共通核配列であるにも拘らず、更に下記するように、各グループのいくつかのメンバーには或る変動が起こり得る。例えば、U002は 4/3の核配列を持ち得る。

A - 血統のコノトキシン ペプチドの中のペプチド グループは異なった薬理的活性を有する。 - コノトキシン ペプチドは、神経筋連結でのシナプス伝達の効力のある抑制因子である。これらのペプチドは、一般にはニコチン アセチルコリン レセプタ遮断薬 20 である。 - コノトキシン ペプチドは電圧感受性のカリウム チャネル又はナトリウムチャネルに対して活性を有する。

好適な実施例の詳細説明

魚を狩猟するイモガイはその餌食への毒物注入用に多種多様な麻痺性ペプチドを使用する。最初に分離され特性を明らかにされたコヌス ペプチドはコヌス ゲオグラフィスの毒液、 - コノトキシンGIは、脊椎動物の神経筋連結にあるニコチン アセチルコリン レセプタを抑制する。 - コノトキシンは、餌食の神経筋連結をブロックするために多くの魚狩猟コヌス種で使用される。3種類の異なる魚狩猟コヌス種からの6個の - コノトキシンが生化学的特徴を明らかにされた。 30

今日までにコヌス毒液から精製された全ての - コノトキシン(テーブルIに示す)がいくつかの共通の構造的特徴を有する。即ち、高親和性 - コノトキシンに対する最小機能ユニットを定義する12の“核”アミノ酸の存在と、テーブルに示す6個の異なる - コノトキシンからの一致配列とである。最も例外的な - コノトキシンは、コヌス ストリアトウスからの - コノトキシンSIIである。この - コノトキシンSIIの中には追加ジスルフィド結合が1個存在する。しかしながら全ての - コノトキシンの核配列の中には2個のジスルフィド結合と多数の他のアミノ酸とが高度に保存されている。

| <u>テーブル I</u> | | |
|------------------------|----------------------|-------------|
| α -コノトキシシン ペプチド | | |
| <u>ペプチド</u> | <u>配列</u> | <u>配列番号</u> |
| GI | ECCNPACGRHYSC* | 4 |
| GIA | ECCNPACGRHYSCGK | 5 |
| GII | ECCHPACGKHFSC* | 6 |
| MI | GRCCHPACGKNYSC* | 7 |
| SI | ICCNPACGPKYSC* | 8 |
| SIA | YCCHPACGKNFDC* | 9 |
| SII | GCCCNPACGPNYGC GTSCS | 10 |
| 一致 <u>核配列</u> | N F CCHPACGXXYXC | 11 |

*C-末端はアミノ化されている。

コヌス ゲオグラフィスからの α -コノトキシシンに対する予測前駆体構造は、最近、CDNAクローン
20
を暗号化する α -コノトキシシンGI及びその相同性の配列分析から決定された。GIの前駆体は64個のアミノ酸のプレプロペプチド (prepropeptide) である。一般にはコヌス
ペプチドに対して信号配列及びオープンリーディングフレームに隣接する3非翻訳領域が高度に保存されている。PCRプライマーは、他のコヌス毒液からの追加の
コノトキシシン相同体配列を引き出す目的で、これらの α -コノトキシシンGI配列を使用して作る。この戦略は、特別の
コヌス毒液管からのメッセンジャーRNAかcDNAライブラリーかのいずれかからスタートし、
コノトキシシンに関する配列を選択的に増幅することにある。

PCR戦略の結果は以下に更に詳述される。後で説明するように、ペプチドの顕著な多様性が
30
 α -コノトキシシンに非常に近い血族関係を有することを明らかにする。 α -コノトキシシンGIに非常に近い関係を有するペプチドの小さなセットのみが識別されるものと期待された。しかしながら (特別にA-血統のコノトキシシンペプチド) コヌスペプチド血統と名付けられた大きな進化のグルーピングは現われることがなかった。 α -コノトキシシンペプチドを含む血統はコヌスペプチドの潤沢な構造的薬理学的多様性を備えている。更には、この血統はコヌス進化の初期に充分に確立されたものであり、この血統に所属するペプチドは全てのコヌス種の毒液中によく発見され得るものであることが明らかとなる。しかしながら、殆どのこれらのペプチドは、テーブルIの α -コノトキシシンペプチドに対して引き出される一致配列からは、多かれ少なかれ、有意な差異を生じている。

本発明はA-血統のコノトキシシンペプチドに向けられている。A-血統のコノトキシシン
40
ペプチドは、信号配列及び α -コノトキシシンペプチドの中の配列に対する遺伝子コード化の3非翻訳領域における強い相同性を有するコノトキシシンペプチドである。A-血統のコノトキシシンペプチドは、信号配列及び3非翻訳領域に基礎を置くプライマーを使用しての毒液管のmRNAの逆転写で用意されるコヌスcDNAライブラリー又はcDNAポリメラーゼ配列反応 (PCR) 増幅を実行することによって識別され得る。A-血統のコノトキシシンペプチドは、
 α -コノトキシシンペプチド、
 α -コノトキシシン様ペプチド、及び更に後述する
 α -コノトキシシンペプチドを包含する。

α -コノトキシシンペプチドは一般に“核”配列モチーフを共有する。この核配列は3/5核と名付けられ、Cys - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配列番号:1) で表わされる。この核配列は、更にアミノ酸の初期グループがXaa - Pro - Alaであると定義され得る。ここにXaaはAsn又はHisである。
50
 α -コノトキシシン様ペプチドは

一般には 4/7核と名付けられた核配列を共有し、Cys - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配列番号:2) で表わされる。 - コノトキシ
ン ペプチドは一般に - 7/2/1/3核と名付けられた核配列を共有し、Cys - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Cys - Xaa - Cys - Xaa - Xaa - Xaa - Cys (配
列番号:3) で表わされる。これらは共通核配列であるにも拘らず、更に下記するように、各グループのいくつかのメンバーには或る変動が起こり得る。例えば、U002は 4/3の核
配列を持ち得る。

A - 血統のコノトキシ
ン ペプチドの中のペプチド グループは、異なった薬理学的活性を有する。 - コノトキシ
ン ペプチドは、神経筋連結でのシナプス伝達の効力のある抑制因子である。これらのペプチドは、一般にはニコチン アセチルコリン レセプタ遮断
薬である。 - コノトキシ
ン ペプチドは電圧感応性のカリウム チャネル又はナトリウム チャネルに対して活性を有する。

10

更に特記すれば、本発明は以下の A - 血統のコノトキシ
ン ペプチドに向けられている。即ち、

SII:Gly - Cys - Cys - Cys - Asn - Pro - Ala - Cys - Gly - Pro - Asn - Tyr - Gly - Cys - Gly - T
hr - Ser - Cys - Ser - Xaa₁ (配列番号:10)。Xaa₁はArg - Thr - Leuであり得る。

U002:Gly - Cys - Cys - Ser - Asp - Pro - Arg - Cys - Ala - Trp - Arg - Cys (配列番号:12)。

C - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

CE - 1:Arg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Tyr - His - Pro - Thr - Cys - Asn - Met - Ser - Asn - Pro
- Gln - Ile - Cys (配列番号:13)。Xaa₁はPro又は望ましくはヒドロキシ - Proであり得る
し、C - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

20

BN - 1:Gly - Cys - Cys - Ser - His - Xaa₁ - Ala - Cys - Ser - Val - Asn - Asn - Xaa₂ - Xaa₃ - I
le - Cys (配列番号:14)。Xaa₁又はXaa₂はPro又はヒドロキシ - Proであり得るし、Xaa₃は
Asp又は - カルボキシ アスパラギン酸であり得る。C - 末端は望ましくはアミノ化さ
れて欲しい。

BN - 2:Glu - Cys - Cys - Thr - His - Xaa₁ - Ala - Cys - His - Val - Ser - His - Xaa₂ - Glu - Le
u - Cys (配列番号:15)。Xaa₁又はXaa₂はPro又はヒドロキシ - Proであり得る。C - 末端
は望ましくはアミノ化されて欲しい。

BN - 3:Asp - Tyr - Cys - Cys - His - Arg - Gly - Pro - Cys - Met - Val - Trp - Cys (配列番号:
16)。C - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

30

CR - 1:Gln - Asn - Cys - Cys - Ser - Ile - Pro - Ser - Cys - Trp - Glu - Lys - Tyr - Lys - Cys
- Xaa₁ (配列番号:17)。Xaa₁はSer又はAsnであり得る。

CR - 2:Gly - Cys - Cys - Ala - Ile - Arg - Glu - Cys - Arg - Leu - Gln - Asn - Ala - Ala - Tyr
- Cys - Gly - Gly - Ile - Tyr (配列番号:18)。

MG - 1:Gly - Cys - Cys - Ser - Asn - Xaa₁ - Val - Cys - His - Leu - Glu - His - Ser - Asn - Leu
- Cys (配列番号:19)。Xaa₁はPro又は望ましくはヒドロキシ - Proであり得る。C - 末端
は望ましくはアミノ化されて欲しい。

SL - 1:Gly - Gly - Cys - Cys - Ser - Phe - Xaa₁ - Ala - Cys - Arg - Lys - Tyr - Arg - Xaa₂ - Xa
a₃ - Met - Cys - Gly (配列番号:20)。Xaa₁又はXaa₂はPro又はヒドロキシ - Proであり得る
し、Xaa₃はGlu又は - カルボキシグルタミン酸であり得る。C - 末端は望ましくはアミ
ノ化されて欲しい。

40

SL - 2:Ala - Cys - Cys - Ser - Tyr - Xaa₁ - Pro - Cys - Asn - Val - Asn - Tyr - Xaa₂ - Ile - Cy
s - Gly - Gly - Arg (配列番号:21)。Xaa₁又はXaa₂はPro又はヒドロキシ - Proであり得る
し、Xaa₃はGlu又は - カルボキシグルタミン酸であり得る。C - 末端は望ましくはアミ
ノ化されて欲しい。

ST - 1:Asn - Gly - Cys - Cys - Arg - Asn - Pro - Ala - Cys - Glu - Ser - His - Arg - Cys - Gly
(配列番号:22)。

OC - 1:Asn - Val - Val - Val - Thr - Ser - Phe - Glu - Pro - Thr - Thr - Leu - Ala - Pro - Val
- Pro - Ser - Asp - Cys - Cys - Gln - Val - Ser - Ser - Cys - Trp - Asn - Leu - Tyr - Gly - Leu
- Glu - Cys - Thr - Gly - Ile - Thr - Arg - Arg - Arg - Thr - Leu (配列番号:23)。

50

OC - 2:Asn - Val - Ala - Ile - Thr - Ser - Phe - Glu - Pro - Thr - Thr - Leu - Ala - Pro - Val - Pro - Ser - Asp - Cys - Cys - Gln - Val - Ser - Ser - Cys - Trp - Asn - Leu - Tyr - Gly - Pro - Glu - Cys - Thr - Gly - Ile - Thr - Arg - Arg - Arg - Thr - Leu (配列番号:24)。

SVIII A:Gln - Lys - Glu - Leu - Val - Pro - Ser - Val - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Arg - Cys - Thr - Asn - Ser - Cys - Pro - Thr - Lys - Pro - Lys - Lys - Pro - Xaa₁ (配列番号:25)。Xaa₁はdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である。Xaa₁がdes - Xaa₁のときC - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

MVIII:Ala - Pro - Xaa₁ - Leu - Val - Val - Thr - Ala - Thr - Thr - Asn - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asn - Pro - Met - Thr - Ile - Cys - Pro - Pro - Cys - Met - Cys - Thr - Tyr - Ser - Cys - Pro - Pro - Lys - Arg - Lys - Pro - Xaa₂ (配列番号:27)。Xaa₁はGlu又は -カルボキシグルタミン酸であり、Xaa₂はdes - Xaa₂又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である。Xaa₂がdes - Xaa₂のときC - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

SM - 1:Glx - Thr - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Thr - Met - Cys - Pro - Thr - Cys - Met - Cys - Asp - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ (配列番号:28)。Xaa₁はdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - Asp (配列番号:26)である。Xaa₁がdes - Xaa₁のときC - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

SM - 2:Ala - Pro - Trp - Leu - Val - Pro - Ser - Thr - Ile - Thr - Thr - Cys - Cys - Gly - Tyr - Asp - Pro - Gly - Ser - Met - Cys - Pro - Pro - Cys - Met - Cys - Asn - Asn - Thr - Cys - Lys - Pro - Lys - Pro - Lys - Lys - Ser - Xaa₁ (配列番号:29)。Xaa₁はdes - Xaa₁又はGly - Arg - Arg - Asn - His (配列番号:30)である。Xaa₁がdes - Xaa₁のときC - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

U007:Arg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Tyr - His - Pro - Thr - Cys - Asn - Met - Ser - Asn - Pro - Gln - Ile - Cys (配列番号:31)。Xaa₁はPro又は望ましくはヒドロキシ - Proであり得る。C - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

U008:Arg - Asp - Xaa₁ - Cys - Cys - Ser - Asn - Pro - Ala - Cys - Asn - Val - Asn - Asn - Pro - Gln - Ile - Cys (配列番号:32)。Xaa₁はPro又は望ましくはヒドロキシ - Proであり得る。C - 末端は望ましくはアミノ化されて欲しい。

U011:Gly - Cys - Cys - Gly - Pro - Tyr - Xaa₁ - Asn - Ala - Ala - Cys - His - Xaa₂ - Cys - Gly - Cys - Lys - Val - Gly - Arg - Xaa₃ - Xaa₄ - Tyr - Cys - Asp - Arg - Xaa₅ - Ser - Gly - Gly (配列番号:33)。Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄及びXaa₅はPro又は望ましくはヒドロキシ - Proである。

コヌス種から精製されたコノトキシン ペプチドは、一般には多くのプロリル残分の処にProの代わりにヒドロキシ - Proを包含する。Pro又はヒドロキシ - Proは、この中で識別されるペプチドのどのプロリル残分又はヒドロキシ - プロリル残分の処にでも使用され得るし、これらは同等の働きをするものと考えられる。かくて、例えば、SVIII A.MVIII.Sm - 1又はSm - 2のような -コノトキシン ペプチドは望ましくは全てヒドロキシ - Pro残分を含んでいて欲しい。プロリル残分をヒドロキシ - Proに改変するためのコノトキシン ペプチドの翻訳後の処理に加え、他の残分も又イモガイの中で翻訳後の改変を受ける。これらの残分は、それぞれ -カルボキシグルタミン酸又は -カルボキシアスパラギン酸に改変され得るGlx又はAsxを包含する。このような改変は、残分がコノトキシン ペプチドのN - 末端にある時に見られる。この改変の1例は、位置3にあるXaa₁が望ましくは -カルボキシグルタミン酸になっているMVIIIの中に見出される。付加的な翻訳後の改変は、特に成熟ペプチドの位置7及び/又は8にある -コノトキシン ペプチドにおいて、Ser及び/又はThr残分の糖化を包含し得る。従ってこれらの改変を行ったコノトキシン ペプチドは上記で特定した配列の等価物と考えられる。

2つのコヌス ゲオグラフィスの -コノトキシン ペプチドのプレプロペプチド構造の明示は、他のペプチドのメッセンジャーRNA配列における重要な相同性識別の機会を提供した。信号配列の相同性と -コノトキシン ペプチドに対する3 非翻訳領域における相

10

20

30

40

50

同性との両者を条件とするPCRのアプローチが、明らかに非常に近い進化の血族関係を共有するが構造的にも薬理的にも多様性を有するペプチドグループを露にした。このグループは、当初から解明されている - コノトキシシ ペプチドのきっちりと定義された家族を包含するばかりでなく、全体として構造的にも薬理的にも - コノトキシシ ペプチドに関係なさそうに見える成熟ペプチドをも包含する。上述のように、その前駆体及びメッセンジャーRNA配列における強力な相同性を有するコノトキシシ ペプチドのグループ全体は、コヌス ペプチドの幾つかの構造クラスと薬理的な家族とを包含して(- コノトキシシ ペプチドの後ではこの血統の中に発見された最初のペプチド家族である) “A - 血統” と命名された。

- コノトキシシ ペプチドに関係するコヌス ペプチドの識別に使われるPCRプライマーは、コヌス ゲオグラフィス毒液からのcDNAクローンを暗号化する - コノトキシシ ペプチドGI配列に基礎を置くものである。テーブルIに示すごとく、 - コノトキシシ ペプチドは、又、コヌス ストリアトウス及びコヌス マグス (C. Magus) から分離された。プライマーが他のコヌス種からの誠実な - コノトキシシ ペプチドのクローンであることを識別することを確かめるために、上述のPCR増幅技術は、十分に特性が明らかにされている - コノトキシシ ペプチドと共にこれらの2つの魚狩獵種に対して初めて適用された。これらの分析から引き出された成熟ペプチドの配列は、テーブルIIの中に示されている。従来型の生化学的アプローチで特徴づけられている - コノトキシシ ペプチドのcDNAクローンは、期待通りにコヌス ストリアトウスからのcDNAライブラリーのPCR増幅で識別された。 - コノトキシシ ペプチドSI及びSIIの予測された前駆体配列は、前駆体のプレプロ (prepro) 領域の最初の42個のアミノ酸において - コノトキシシ ペプチドGIの前駆体の対応する配列と事実上一致している (93%)。等価配列がテーブルIIIの中で比較されている。

10

20

テーブル II

予測されるコヌス ストリアトウス及びビコヌス マグスからの成熟コノトキシン配列

| ペプチド | 配列 | 配列番号 | 分析されたクロロンの数 第1 PCR | 第2 PCR |
|-------------|---|------|-----------------------|----------------|
| コヌス ストリアトウス | | | | |
| SI | EICCNPACGPKYSC* | 34 | 2 ¹ | 2 ¹ |
| SII | GCCCNPACGPNYGGTSCSRTL | 10 | 1 ² | 0 ² |
| ST-1 | NGCCRNPAESHRCG | 22 | 5 ¹ | 3 ¹ |
| SVIII | QKSLVPSVITTCGGYDPTMCPPCRCTNSC* | 35 | 4 ² | 0 ² |
| SVIIIA | QKELVPSVITTCGGYDPTMCPPCRCTNSCPTKPKKPGRRND ³ | 25 | 1 ² | 0 ² |
| コヌス マグス | | | | |
| MG-1 | GCCSNPVCHLEHSNLC* | 19 | 2 ¹ | 1 ¹ |
| MVIII | APELVVTATTNCCGYNPMTICPPCMCTYSCPPKPKKPGRRND ³ | 27 | 1 | 1 |

* C-末端はアミノ化される。

1 ハワイ

2 フィリピン

3 開裂はアンダーラインのアミノ酸残分の間に期待される。

テーブル III

α-コノトキシシン ペプチドのプレプロペプチド配列

| <u>ペプチド</u> | <u>配列</u> | <u>配列番号</u> |
|-------------|--|-------------|
| GI | MGMRMMFTVFLVVLATTVVVSPFSEASDGRDDTAKDEGSDM-EKLVKKE-CCNPACGRHYSCGR----- | 36 |
| SIB | MGMRMMFTVFLVVLATTVVVSPFSDRASDGRDDDEAKDERSDMHESD--RKEICCNPACGPKYSCGR----- | 37 |
| SIIA | MGMRMMFTVFLVVLATTVVVSPFSDRASDGRDDDEAKDERSDMHESDRNCRGCCCNPACGPNYCGTSCSRTL | 38 |

10

20

30

40

しかしながら、コヌス ストリアトウス毒液のPCR増幅は、ゲル電気泳動によって容易に分離可能な明白に2つに分解されたバンドを生み出す。迅速移動バンドからは、12個のクローンの全部が2回の独立したPCR増幅によって配列された。即ちこれらの中の8個は -コノトキシシン ペプチドSIIに対する前駆体であり、4個は暗号化された -コノトキシシン ペプチドSIであることが証明された。cDNAクローンによって予測された成熟トキシシンは、 -コノトキシシン ペプチドSIのN-末端に余分のグルタミン酸残分を有しているものの、それ以外は配列が一致する。成熟形態へ向けてmRNAの中に暗号化されているペプ

50

チドの更なる予想外の処理が存在するかさもなくばクローン配列が - コノトキシン ペプチドSIの多形性異変体であるかのいずれかである。

より大きな分子量のPCR増幅製品も又クローン増殖されて3つの独立のクローンが分析された。これらの全てがペプチド標識を付けた - コノトキシン ペプチドSVIII Aに暗号化されたが、この - コノトキシン ペプチドSVIII Aは - コノトキシン ペプチドSI又はSIIの予測成熟ペプチド配列よりも可成り長いものである。更には、SVII Aは、コヌス ストリアトゥス毒液から最近特性を明らかにされたペプチド、 - コノトキシン ペプチドSVIIIと配列において殆ど一致しており、このSVIIIは、コヌス ストリアトゥス毒物注入時に観察される非可動化初期の段階での重要な刺激性トキシンである。しかしながら、多くの小さな配列上の差異が存在した。即ち、 - コノトキシン ペプチドSVIIIの中のSer - 3はSVIII Aの中のGluで置換されている。もっと驚くべきことは、 - コノトキシン ペプチドSVIIIのC - 末端のCysが - コノトキシン ペプチドSVIII Aの中で更に12個のアミノ酸で延ばされていることである。

これらの差異を消散する意図の下にコヌス ストリアトゥス毒液管からのmRNAの直接増幅が行われた。原型のcDNAライブラリーがハワイからもたらされたコヌス ストリアトゥス種を使って作られる一方で、毒液管のmRNAのPCR増幅が(- コノトキシン ペプチドSVIIIIが精製された毒液源でもある)フィリピンからの種を使って行われた。mRNAからの迅速移動PCR増幅バンドからの6個のクローンが分析された。即ち、4個は - コノトキシン ペプチドSIIで、1個は暗号化 - コノトキシン ペプチドSIであった。しかしながら、第6番目のクローンは新しいペプチドST - 1を暗号化しており、ST - 1の予測配列がテ

ーブルIIに示されている。

緩速移動PCRバンドは、 - コノトキシン ペプチドSVIIIに厳密に対応する予測されたプレプロペプチドを暗号化するクローンを生み出した。かくて - コノトキシン ペプチド配列を使って行われたPCR増幅から作られたクローンを分析することにより、コヌス ストリアトゥスのみから5つの異なったコヌス ペプチドが得られた。これらの中の2つ、 - コノトキシン ペプチドSI及びSIIのみは回収が予測された。又、全般的は - コノトキシン ペプチドと構造上の類似性を有するが、以前には決して特性を明らかにされることのなかったペプチドMG - 1が発見され、それにまったく関係のない家族、 - コノトキシン ペプチドに属する2つの既知のペプチド配列も見付かった。結果は又、ハワイ形とフィリピン形との間の - コノトキシン ペプチド配列における多形現象の存在を示唆している。即ち、1個のアミノ酸置換があり、又ハワイ種には長いC - 末端部が存在するのに対してフィリピン種には存在しない。かくてコヌス ストリアトゥス内でPCRによって採取された - コノトキシン ペプチド一家に関してはペプチドの多様性が期待以上に複雑であることが証明された。

又、コヌス マグスからのPCR製品のより限定的な分析が行われた。11個のクローンは2つの独立した増幅で配列され、全てのクローンは2つのクラスの中の1つに組入れられた。最も多い方のクラス(11クローン中の9つ)は、テーブルIIに示した - コノトキシン ペプチドMVIIIに本質的に一致している予測された配列を生み出した。加えて、構造的に - コノトキシン ペプチドにより近い関係にあるペプチドも又回収された。コヌス マグス毒液からの - コノトキシン ペプチド、 - コノトキシン ペプチドMIを暗号化したクローンは回収されなかった。

cDNA配列と精製 - コノトキシン ペプチドMVIIIの実際の配列との比較で出て来た1つの複雑現象は、最後の5個のアミノ酸がアミノ化されたC - 末端を付与するために切除されていることの発見であった。C - 末端配列は通常は蛋白分解性開裂の対象になることを予測されていないことに注目すべきである。 - コノトキシン ペプチドMVIII及びMVIII Aの尤もらしい真のC - 末端がテーブルIIに矢印で示されている。

コヌス マグス及びコヌス ストリアトゥスの両方の毒液は、 - コノトキシン前駆体配列を使って得られる全てのクローンの重要な部分としての - コノトキシン ペプチド前駆体を有することを証明した。 - コノトキシン ペプチドは、飲み込む前に餌食にもりを打ち込んで魚を狩猟するイモガイ(“もり打ち”)にとって重要な構成要素であると信

10

20

30

40

50

じられるので、魚を狩猟するものと信じられているがしかし未だ餌食にもりを打ち込むのを観察されていない他のコヌス種を試験することが望まれた。魚を食するものと信じられているあまり知られていない2つのコヌス種はコヌス オルクロレウクス (C. orchroleucus) 及びコヌス スルカトウス (C. sulcatus) である。PCR増幅がコヌス オクロレウクス (C. ochroleucus) のmRNA及びコヌス スルカトウス のcDNAライブラリーから行われた。

結果をテーブルIVに示す。コヌス スルカトウス からの19個のクローン及びコヌス オルクロレウクス からの9個のクローンが2つの独立の増幅によって配列された。コヌス スルカトウス の中では同一配列 (SL - 1) が18/19クローンに対して明らかになり、近い関係にある1つのペプチド (SL - 2) が識別された唯一の他のクローンであった。対照的に、コヌス オクロレウクス のクローンは、相当に長くてお互いに相同性を有する2つのペプチド (OC - 1 及びOC - 2) を暗号化した。

テーブル IV

コヌス スルカトウス、コヌス オルクロレウクス及び
コヌス ステルクスムスカルムからの予測成熟コノトキシニン配列

| <u>ペプチド</u> | <u>配列</u> | <u>配列番号</u> | <u>分析されたクローンの数</u> <u>第1 PCR</u> | <u>第2 PCR</u> |
|-----------------------|---|-------------|-------------------------------------|---------------|
| <u>コヌス スルカトウス</u> | | | | |
| SL-1 | GGCCSFACRKYRPEMCG* | 20 | 12 | 6 |
| SL-2 | ACCSYPPCNVNYPEICGGR* | 21 | 0 | 1 |
| <u>コヌス オルクロレウクス</u> | | | | |
| OC-1 | NVVVTSFEPTTLAPVPSDCCQVSSCWNLGLECTGITRRRTL | 23 | 3 | 4 |
| OC-2 | NVAITSFEPTTLAPVPSDCCQVSSCWNLGPECTGITRRRTL | 24 | 1 | 1 |
| <u>コヌス ステルクスムスカルム</u> | | | | |
| SM-1 | ZTWLVPSTITTCGGYDPGTMCTMCDNTCKPKPKSGRRND | 28 | 2 | 2 |
| SM-2 | APWLVPSTITTCGGYDPGSMCPPCMCNNTCKPKPKSGRRNH | 29 | 1 | 2 |

* C-末端がアミノ化される。

コヌス スルカトウス及びコヌス オルクロレウクスからの予測成熟トキシンは長さが非常に違う（コヌス スルカトウスのは19~20個のアミノ酸であり、コヌス オルクロレウクスのは42アミノ酸である）けれども、それにも拘らずペプチドは核配列においては同一の占有空間を示している。最初のCys残分から最後に至る迄ペプチドの全てが核モチーフCC4C7Cを有する。この同一モチーフは、又、テーブルIIに示すコヌス マグスからのコノトキシニン様ペプチド、MG-1の中にも見付かった。コヌス オルクロレウクス ペプチ

10

20

30

40

50

ドは、コヌス スルカトゥス ペプチドやコヌス マグス ペプチドに比べて延ばされた N - 末端部及び C - 末端部を有することを主な原因として遥かに長くなっている。これらの種の中には - コノトキシシ ペプチドが露にされなかったことに注目すべきである。もり打ちとして知られる第 3 の魚狩獵 コヌス も又分析された。コヌス ステルクスムスカルム (C. Stercusmuscarum) は - コノトキシシ ペプチドの分離がなされていない種である。7 個のクローンの全体が配列された。即ち、2 つの予測された配列が明らかにされた。相同性により、これらが - コノトキシシ ペプチド SmVIII 及び - コノトキシシ ペプチド SmVIII A と名付けられた - コノトキシシ ペプチドであることは事実上確かであるように思える。かくて、コヌス ストリアトゥス 及び コヌス マグス のようなもり打ちである コヌス ステルクスムスカルム の中で - コノトキシシ ペプチドが、使用された PCR 増幅プロトコルによって識別される。

10

上述の結果は、進化論的に - コノトキシシ ペプチドに近い関係にある筈のペプチドが、試験される全ての魚狩獵種の毒液管の中で見出されることを示唆する。このペプチドグループが非魚狩獵種の中にも見出され得るか否かの調査がなされた。500 コヌス 種の殆どが非魚狩獵種であるが、腹足類軟体類や多毛類動物虫を獲る 2 つの他の大きなグループが存在する。それ故軟体類捕食 コヌス 種、コヌス バンダヌス (C. Bandanus) 及び食虫種、コヌス カラクテリスティクス (C. Characteristicus) からの PCR 増幅が実施され、これらの増幅からのクローンの分析結果はテーブル V に示されている。

テーブル V
コヌス バンダヌス及びコヌス カラクテリスティクスからの予測成熟コノトキシニン配列

| <u>ペプチド</u> | <u>配列</u> | <u>配列番号</u> | <u>分析されたクローンの数</u> 第1 PCR | <u>第2 PCR</u> |
|-----------------------|----------------------|-------------|------------------------------|---------------|
| <u>コヌス バンダヌス</u> | | | | |
| BN-1 | GCCSHPACSVNPPDIC* | 14 | 18 | 1 |
| BN-2 | ECCTHPACHVSHPELC* | 15 | 0 | 1 |
| BN-3 | DYCCHRGPCMVWC* | 16 | 1 | 1 |
| <u>コヌス カラクテリスティクス</u> | | | | |
| CR-1 | QNCCSIPSCWEKYKCS | 17 | 1 | 3 |
| CR-2 | GCCAIRECRLQNAAYCGGIY | 18 | 2 | 1 |

10

20

30

40

コヌス バンダヌスからの22個のクローンが分析された。これらの中で19個の単一ペプチド (BN - 1) を暗号化し、1個は近い関係の配列 (BN - 2) を暗号化することが判明した。これらのペプチドは又、上述の特性 4/7 (CC4C7C) の核モチーフを示した。第3のペプチド配列 (BN - 3) は他の2つに関係がなく、4/3核配列を示した。7個のクローンがコヌス カラクテリスティクスから配列され、2つの別々の予測された成熟ペプチドを暗号化することが判明した。3個のクローンは 4/7ペプチド (CRは1)

50

を暗号化し、一方7個の中の4個は、4/5核配列モチーフを持った - コノトキシン様ペプチド (CR - 2) を暗号化した。 - コノトキシン ペプチド様配列が コヌス バンドヌス 及び コヌス カラクテリスティクス のいずれのPCR適用クローンからも検出されなかったことに注目すべきである。

A - 血統のメンバーとして見出される最も驚異的なトキシンは、成熟ペプチドのアミノ酸配列において、 - コノトキシン ペプチドに対する明白な相同性を有せず、Cys残分配列すら全く異にする - コノトキシン ペプチドであった。更には、 - コノトキシン ペプチドはアセチルコリン レセプタには作用せず、電圧感応のカリウム チャネル又はナトリウム チャネルのいずれかを標的に定める。かくて - コノトキシン ペプチドと - コノトキシン ペプチドとの間には信号配列と3 非翻訳領域との両方において検出される激強な相同性の発見を期待することは出来ない。

10

- コノトキシン ペプチド及び - コノトキシン ペプチドのアミノ酸配列の全ての比較をテーブルVIに示す。これらの配列は、同一性が最大になるように整列した。 - コノトキシン ペプチドを採取する - コノトキシン ペプチド プライマーの能力は、2つの信号配列の事実上の同一性で説明される。

テーブル VI

κ-コノトキシシン プレプロペプチドと α-コノトキシシン プレプロペプチドとの比較

| ペプチド | 配列 | 配列番号 |
|---------|--|------|
| SI | MGMRMFTVFLLVLATTVVVFPSDRASDGRDDEAKDERSDMHESD--RKEICCNPACGPKYSCGR----- | 39 |
| SVIII | MGMRMFTVFLLVLATVNVVSTPDRASDGRNAAVHERQKSLVPSVITTT-CCGYDPGTMCPPCRTCNSCG----- | 40 |
| SVIIIA | MGMRMFTVFLSVVLATTVVSTPDRASDGRNAAVHERQKELVPSVITTT-CCGYDPGTMCPPCRTCNSCFTKPKKPGRRND | 41 |
| MVIII | MGMRMFTVFLLVLATTVVSI PSDRASDGRNAVHERAPELVV-TATTNCCGYNPMTICPPCMCTYSCPPKRK-PGRRND | 42 |
| SmVIII | MGMRMFTVFLLVLATTVVSI PSDRASDGRNAAVNERQTWLVVPSVITTT-CCGYDPGTMCPTCMCDNTCKPKKSGRRND | 43 |
| SmVIIIA | MGMRMFTVFLLVLATTVVSI PSDRASDGRNAAVNERAPWLVVPSVITTT-CCGYDPGSMCPMCMCNNTCKPKKSGRRNH | 44 |

10

20

30

40

前駆体のPro領域において可成りの相同性（全体的同一性に非ず）が存在するが、プレプロペプチドの成熟トキシシン領域における有意な同一性は存在しない。信号配列とペプチドと成熟トキシシンとの間の推定される縁が示される。成熟トキシシンは構造的にも薬理学的にも相互間の関係がないけれども、
 -コノトキシシン ペプチド及び
 -コノトキシシン ペプチドの前駆体家族には進化論的血統によって事実上は極めて近い関係が存在する。

-コノトキシシン ペプチドに加え、
 -コノトキシシン ペプチドに対してより近い関係

50

にある追加のペプチドの変種が又同一のPCRプライマーを使って識別された。これらの幾つかは、β-コノトキシン様ペプチドの結合力のある家族の中に整列され得るものであり、このβ-コノトキシン様ペプチドはジスルフィド結合の間に異なる長さのループを持つことで規範的なβ-コノトキシンペプチドとは違うものになっている。かくて、テーブルIのβ-コノトキシンペプチドの全てが(上述の)典型的な3/5核を有する一方、PCRによって識別された追加のペプチドの大部分は4/7核を有する。更には、4/7モチーフを伴うペプチドを整列させると、多くは、コヌス オブスクルス(*C. obscurus*)及びコヌス トゥリパ(*C. tulipa*)の毒液から予め識別されたペプチドと驚く程の相同性を有する。これらの配列はテーブルVIIに示されている。コヌス オブスクルスペプチド及びコヌス トゥリパペプチドには、翻訳後に改変されるアミノ酸、β-カルボキシグルタミン酸が第2ループの中に存在する。PCR法によって予測された4/7ペプチドは、これらのペプチドとの大いなる相同性を示し、天然ペプチドは実際はグルタミン酸ではなくβ-カルボキシグルタミン酸を相同位置に有すると云うのがもっともらしく見える。コヌス バンダヌスからのペプチドの1つはその位置にアスパラギン酸の置換を有するので、この残分も又翻訳後に改変され得るのではないと云う、気になる示唆が存在する。

テーブル VII

αコノトキシシン ペプチドとαコノトキシシン様ペプチドとの間の相同性

| ペプチド | 配列 | 配列番号 |
|------|--|------|
| αGI | MGMRMMFTVFLVLLVLAATTVVVSFPSEASDGRDDTAKDEGSDM-EKLVEKK-----ECCN-PACGRHYS--CGR | 45 |
| BN-1 | MGMRMMFTMFLVLLVLAATTVVVSFASDRASD--GRNAAA--KDK-ASDLV-ALTVKGCCSHPACSVNPPDICG | 46 |
| CR-2 | MGMRMMFTVFLVLLVLAATTVVVSFTSDRASE--GRNAAA--KDK-ASDLV-ALTVRGCCCAIRECRLQNAAYCGGIY | 47 |
| MG-1 | MGMRMMFTVFLVLLVLAATTVVVSFPDDRASD--GRNAAAN--DK-ASD-VITLALKGCCSNPVCHLEHSNLCGRRR | 48 |
| SL-1 | MGMRMMFTVFLVLLVLAATTVVVSFNDDRDPALGGRNAAAIAADKIAS----TLRRGGCCSFPACRKYRPEMCCGRRR | 49 |
| CR-1 | MGMRMMFTVFLVLLVLAATTVVVSFTSDRASDGRNAAANA--FDLIALIAR-----QNCCSIPSCWEKYK--CS | 50 |
| BN-2 | MGMRMMFTVFLVLLVLAATAVLPVTLDRASDGRNAAANAKTPLRIAPFIR-----DYCCHRGPCMVW-----CG | 51 |

(20)

JP 3668880 B2 2005.7.6

10

20

30

40

最後に、互いに密着したクラスに属していないA - 血統所属の他のペプチド グループが存在する。これらは、コヌス ストリアトゥス、コヌス パンダヌス及びコヌス カラクテリスティクスからの - コノトキシシン様ペプチド、ST - 1、BN - 3 及びCR - 1を包含し、この - コノトキシシン様ペプチドは 3/5及び 4/7以外の核モチーフを有する。かくて

50

A - 血統は又、全く多用で、殆ど確実に少なくとも2つの構造クラスと幾つかの薬理学的家族とを囲い込んでいる。更に、A - 血統は、コヌス毒液中に明らかに広く分布している。その理由は、この研究において最初の - コノトキシン ペプチドが分離された魚狩猟種に加えて、巻貝狩猟コヌス及び蠕虫狩猟コヌスの両方からもA - 血統ペプチドが識別されたからである。

例えば精製と配列分析、PCR増幅、組み換えDNA技術その他によってコノトキシン ペプチドのアミノ酸配列を識別した後に、成熟コノトキシン ペプチドは更に以下に述べるような従来の技術を使って合成され得る。

一般にA - 血統のコノトキシン ペプチドと呼ばれるこれらのペプチドは、化学合成されるべく、十分に小さいものである。前述のA - 血統のコノトキシン ペプチドを準備するための一般的化学合成方法が、A - 血統のコノトキシン ペプチドの1つの特殊化学合成に沿って、又、その化学合成製品の生物学的活性を指示することによって以下に記述される。これらのA - 血統のコノトキシン ペプチドの種々なものは、米国特許番号第4,447,356(11)又はオリベラ他(2)の中に記載された技術を使って特別なコヌス種から精製分離され得る。これらの文献の開示内容は引用することによって、本文中に結合されるものとする。例えばペプチドU007,U008及びU011はコヌス エルミネウス(Conus ermineus)の精製により入手された。

A - 血統のコノトキシン ペプチドは列挙されたイモガイからの精製によって入手可能であるけれども、個々のイモガイから入手可能なA - 血統のコノトキシン ペプチドの量は余りにも少ないので、望みの実質的に純粋なA - 血統のコノトキシン ペプチドを、実際に市場価値のある量で入手するためには化学合成によるのが一番よい。例えば単一のイモガイからのA - 血統のコノトキシン ペプチドの生産量は約10µg以下かも知れない。“実質的に純粋な”は、同一タイプの他の生物学的分子が実質的に存在しない処にペプチドが存在することを意味する。即ち、ペプチドは、望ましくは少なくとも約85重量%の量で存在し、望ましくは少なくとも同一タイプのこのような存在する生物学的分子(即ち、水、緩衝剤及び無毒の小分子が存在し得る)が少なくとも95%の量で存在していて欲しい。生物学的に活性なA - 血統のコノトキシン ペプチドの化学合成は、勿論アミノ酸配列を正しく決定することに依存する。

A - 血統のコノトキシン ペプチドは、又、当業界では良く知られている組換えDNA技術によっても生産され得る。このような技術は、サンプルック他(3)によって記述されている。この方法により生産されたペプチドは分離され、必要なら修復され、正しいジスルフィド結合形成のために酸化される。

本発明のA - 血統のコノトキシン ペプチドの中にジスルフィド結合を形成する1方法は、冷室温で長期間にわたって線状ペプチドを空気酸化させることである。この手順は、相当量の生物学的に活性なジスルフィド結合のペプチドの生成をもたらす結果となる。酸化ペプチドは、別の結合配列を有するペプチド分離のために逆相高速液体クロマトグラフィ(HPLC)その他を用いて分別される。その後、これらのペプチドの分画を天然材料の溶解と比較することによるか、或いは単純分析法の利用によるかのいずれかによって、最大の生物学的効力を発揮するための正しい結合を有する特別の分画を有する酸化製品は、線状ペプチド又は1分画より多い分画を有する酸化製品は、生体内で起こる交差結合及び/又は配列変更が生物学的に効力のあるコノトキシン分子を生成することを承知しているので、時には、生体内投薬に使用され得る。しかしながら、生物学的効力のより少ない他の分画の存在によってもたらされる希釈のせいで、いくらかより高い投薬判定量が要求され得る。

本発明のA - 血統のコノトキシン ペプチドの中にジスルフィド結合を形成する第2の方法は、A - 血統のコノトキシン ペプチド合成中に第2及び第5システイン上での保護作用物質としてアセトアミドメチル(Acm)を使用することを包含する。これら2つの残分上でのAcmの使用は、他のA - 血統のコノトキシン ペプチドの中でのジスルフィド架橋との類似性に根拠を置いている。Acmに保護されたシステインを伴うペプチドは、室温で夜通し酸化される。双環式のペプチドは、HPLCによって分離され、望みの異性体が分離さ

10

20

30

40

50

れる。最終的なジスルフィド架橋はヨウ素によって実施される。望ましくない異性体は、線状ペプチドへの整復によって効率的に再循環される。望みの異性体は局部減圧分析(4)によって決定される。この分析において、双環式の前駆体のサンプルは、線状ペプチドと一重架橋中間体とを生み出すべくトリス・〔2-カルボキシエチル〕ホスフィンで処理される。後者のペプチドはヨードアセトアミドと反応し、アルキル化システイン残分の部位は配列分析によって確立される。

ペプチドは、例えば専占的固相技術、部分的固相技術、断片縮合、又は古典的な溶液結合等の適切な方法によって合成される。近年開発された組換えDNA技術の使役は、これらのペプチド、特に翻訳後の処理ステップを必要としない天然のアミノ酸残分のみを含むより長いペプチドの準備に利用され得る。

従来型の液相ペプチド合成では、ペプチドチェーンは、構成要素を構成するアミノ酸を望みの配列で成長ペプチドチェーンに加える一連の結合反応によって準備し得る。種々なN-保護グループ、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド又はカルボニルジイミダゾールと、種々な活性エステル、例えばN-オキシフタルイミド又はN-オキシ-サクシニイミドと、溶液中の反応で中間生成物を分離、精製させるための種々の開裂試薬との使用が、よく知られた古典的なペプチド精製法である。古典的な溶液合成法は論文“(ホウベン-ボイルの)有機化学的方法:ペプチド合成”(5)の中に詳述されている。専占的固相合成技術は、テキスト“固相ペプチド合成”(6)に述べられており、米国特許番号第4,105,603号(7)の開示の中に例示されている。断片縮合合成法は、米国特許番号第3,972,859号(8)の中に例示されている。他の利用可能な合成法は、米国特許番号第3,842,067号(9)及び第3,862,925号(10)の中に例示されている。最終的に取り除かれる迄存在部位で化学反応が起こるのを阻止する適切な保護グループによって種々なアミノ酸成分の不安定側鎖グループを保護することはこのような化学反応に共通である。実体がカルボキシグループと反応する間、及びそれに続いてその場所での反応が行われるべく、-アミノ保護グループが選択的に除去される迄の間中のアミノ酸又は断片上の-アミノグループの保護も、又、通常共通している。従って、不安定な側鎖を有する種々な残分の側鎖と結合させた適切な側鎖保護グループと一緒にペプチドチェーンの望みの配列の中に配置されているそれぞれのアミノ酸残分を含んだ中間生成化合物がこのような合成におけるステップ毎に生成されることも共通している。

側鎖アミノ保護グループの選択に関しては、合成中における-アミノグループの保護解除期間に取除かれることのない1つが一般には選択される。しかしながら、或るアミノ酸、例えばHisに対しては一般に保護は必要ない。ペプチド合成に使用される特別な側鎖保護グループの選択には、次の一般ルールが適用される。即ち、(a)保護グループは、望ましくは保護特性を保護し、結合条件下では割除されることはない。(b)保護グループは、各合成ステップにおける-アミノ保護グループ除去のために選択された反応条件の下で安定でなければならない。(c)側鎖保護グループは、ペプチドチェーンの望ましくない変更をすることのない反応条件の下での望みのアミノ酸配列を含む合成処理完成時には除去し得るものでなければならない。

これらのペプチドの多くは、或いは全てさえもが、組換えDNA技術を使って準備することが可能であるべきである。しかしながら、ペプチドをそのようにして準備できないときは、ペプチドはメリフィールドの固相合成法を使って準備するのが望ましいけれども、前述したような当業界に知られているその他の同等の化学的合成法も又使用することが可能である。固相合成法は、適切な樹脂に保護された-アミノ酸の結合によってC-末端から開始される。このような開始材料は、クロルメチル化樹脂又はオキシメチル樹脂へのエステル結合、或いはベンズヒドリルアミン(BHA)樹脂又はパラメチウベンズヒドリルアミン(MBHA)樹脂へのアミドボンドにより-アミノに保護されたアミノ酸を添加することによって準備される。オキシメチル樹脂の準備法はボタンスキ他(11)によって記述されている。クロルメチル化樹脂はバイオラドラボラトリーズ(Bio Rad Laboratories)(カルフォルニア州リッチモンド)から及びラボラトリーシステムズインコーポレイテッド(Lab.Systems, inc.)からの市販品を利用できる。このような樹脂の準備法はス

10

20

30

40

50

チュワート他(6)によって記述されている。BHA樹脂サポート及びMBHA樹脂サポートは、市販品の利用が可能であり、一般には合成された望みのポリペプチドがC-末端に非置換アミドを有する場合に利用される。このようにして、固体樹脂サポートは、式-O-CH₂-樹脂サポート、-NH-BHA樹脂サポート、又は-NH-MBHA樹脂サポートを有するもののような当業界に知られているもののどれかであり得る。非置換アミドが欲しい場合には、開裂が直接的にアミドに生ずるのでBHA樹脂又はMBHA樹脂の使用が望ましい。N-メチルアミドが欲しい場合には、N-メチルBHA樹脂から作ることが可能である。その他の置換アミドが要望される場合には、米国特許番号第4,569,967号(12)の教訓が使用可能であり、或いは、遊離酸以外の他のグループが尚C-末端に所望される場合には望ましくはハウベン-ボイルのテキスト(5)に記述されているような古典的な方法を使ってペプチド合成することが可能であって欲しい。

10

C-末端に遊離酸を有するペプチドを合成する時には、K.堀木他(13)の文献中に記述された手順に従い、約60℃で24時間、攪拌しているDMFの中に入れたKFを使って、もし適切ならBoc及び側鎖保護グループにより保護されているC-末端アミノ酸を最初にクロルメチル化樹脂に結合させることが可能である。Boc-保護付アミノ酸を樹脂サポートに結合した後、塩化メチレン中のトリフルオル酢酸(TFK)又は単独のTFAを利用する方法のようにして、-アミノグループは除去される。保護介助は約0℃と室温との間の温度で実施される。例えばジオキサソンのHC1のような他の標準的開裂試薬及び特別な-アミノ保護グループの除去条件は、シュローダー及びルプケの文献(14)の中に記述されたようなものが使用され得る。

20

この-アミノ保護グループを除去した後、残りの-アミノ保護付及び側鎖保護付のアミノ酸は、前記で定義した中間生成化合物を得るために望みの順序で一段一段結合が行なわれ、或いは合成中に別々に各アミノ酸を添加する代りとして、これらのアミノ酸のいくつかは固相反応装置の中で添加される前に相互に結合され得る。適切な結合試薬の洗濯は技術者の腕にかかっている。N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)は結合試薬として特に適している。

ペプチドの固相合成で使用される活性化試薬はペプチド技術ではよく知られている。適切は活性化試薬の例は、例えば、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミドやN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドのようなカルボジイミドである。他の活性化試薬及びペプチド結合に使用される方法は、シュローダー及びルプケ(14)及びカプ

30

ール(15)によって記述されている。各々の保護されたアミノ酸又はアミノ酸配列は、約2倍以上余計に固相反応装置の中に導入され、ジメチルホルムアミド(DMF):CH₂Cl₂(1:1)の溶媒の中で、或いはDMF又はCH₂Cl₂単独の溶媒の中で結合が実行され得る。中間的な結合が発生する場合には、次のアミノ酸結合に先立つ-アミノ保護グループ除去以前に結合手順が繰り返される。手作業の場合には、できればカイザー他(16)によって記述されているようなニンヒドリン反応によって合成の各段階での結合反応の成功を監視して欲しい。結合反応は、リビエル他の文献(17)に報告されたようなプログラムを使って、ベックマン(Beckman)990自動合成装置上でのように自動的に行なわせることが可能である。

望みのアミノ酸配列が完成された後、遊離酸形態のペプチドを得るためにペプチドを樹脂から開裂するばかりでなく、もし事前に除去されていないなら全ての残留側鎖保護グループやN-末端の-アミノ保護グループをも開裂する液体弗化水素のような試薬で処理することによって中間生成ペプチドは樹脂サポートから除去され得る。もしMetが配列中に存在するなら、HFによるペプチドの樹脂からの開裂に先立ち、潜在的なS-アルキル化を排除するためにトリフルオル酢酸(TFA)/エタンジチオールを用いてBoc保護グループを最初に除去して欲しい。開裂用弗化水素の使用時には、アニソール、クレゾール、硫化ジメチル、及び硫化メチルエチルのような1以上のスカベンジャーが反応塔内に含まれる。Cys残分間の結合形成のためには、ペプチド樹脂の一部になっている間のペプチドの環化を妨害するようにして線状ペプチドの環化が行なわれて欲しい。このようなジスルフィド環化結合を効果あるものにするためには、後で適切に環化され保護解除をされる全面保護

40

50

されたアミド中間生成物を生み出すため、当業界ではよく知られているように、アンモノリシスによってオキシメチル化樹脂サポート又は塩化メチル化樹脂サポートから全面保護付のペプチドを開裂することが可能である。代替案としては、ペプチドの保護解除と共に上記の樹脂又はベンズヒドリルアミン（BHA）樹脂或いはメチルベンズヒドリルアミン（MBHA）からのペプチドの開裂を弗化水素酸（HF）と一緒に0で行なうことが可能であり、続いて上述のように酸化が行なわれ得る。

以下の実施例はSIIの化学合成を記述する。ここに開示されるコノトキシシン ペプチドは上述の従来形技術を使って、同じ様に合成される。

実施例

本発明は異化の実施例を引用して記述する。以下の実施例は、説明手法により提供するものであって、どのようなものであれ発明を制約する意図を持つものではない。当業界で良く知られている標準的技術又は以下に記述する特殊技術が利用された。

10

実施例 1

- コノトキシシンSIIの精製と分析

コヌス ストリアトゥス毒液からのコノトキシシン精製

コヌス ストリアトゥス毒液からのペプチド精製は、前に記述（18）したように、セファデックス（Sephadex）G - 25の上でのクロマトグラフィによる最初の構成要素のサイズ分割を包含し、それに引き続いて半準備的な逆相C₁₈カラム上の高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を実施した（ウルトロパック（Ultropac）TSK ODS - 120T, 7.8 × 300mm, 10 μm; 又はVYDACC₁₈, 10 × 250mm, 5 μm; 0.1%トリフルオル酢酸（TFA）中のアセトニトリル勾配が使

20

コノトキシシンの配列分析

ペプチドSVIIが還元されてカルボキシメチル化され、それから前述（19）の如きスピニング - カップ シーケンサー内の分析がなされた。

- コノトキシシン ペプチドSIIの精製と特性の明確化

- コノトキシシン ペプチドSI及びSIAの精製中に、魚の中での麻痺を引き起こす追加の分画が識別された。これらの活動の1つは、SI及びSIAにぴったりくっついて溶離することである。この麻痺性分画は > 90% 同質に精製され、そのアミノ酸組成が決定された。アミノ酸配列の展開は、テーブルIに示す配列を持つ19個のアミノ酸ペプチドと一致する結果をもたらした。テーブルIの中の配列指定が、決定されたアミノ酸組成に適合した。更に配列指定の確認が高速原子衝撃（FAB）質量分析法によってなされた。FAB質量分析法の決定は、予測される遊離カルボキシ末端を伴う19個のアミノ酸ペプチドに一致するMW（MH⁺1790.56）を付与した。このペプチドは、特性を明確化された限りの他の - コノトキシシン ペプチドよりも大きいけれども、 - コノトキシシン ペプチドSIと驚くべき程の相同性を有している。このペプチドは、それ故、 - コノトキシシン ペプチドSIIと名付けられた。天然ペプチド配列を確認するため、又、更なる特性明確化用に、より余計のペプチドを使えるようにするべく、 - コノトキシシン ペプチドSIIが合成された。

30

- コノトキシシン ペプチドSIIは、一般にはコヌス ストリアトゥスの中に - コノトキシシンSI、又は主要な - コノトキシシンSVIAより少ないレベルで見出される。しかしながら、1つの毒液サンプルから別の毒液サンプルに移るに従ってトキシシン レベルの変動が相当にある。SIとSIIのレベルが1つの毒液サンプルの中でほぼ同等であることが見出されたとしても、より典型的には - コノトキシシン ペプチドSIIは - コノトキシシン ペプチドSIの約20%、 - コノトキシシン ペプチドSVIAの約10%であることが見出される。

40

実施例 2

- コノトキシシンSIIの合成

- コノトキシシンSIIの合成

合成がメリフィールド（20）の固相手順により、続いてグレイ他（21）の一般プロトコルによって実施された。2グラムの t - Boc - L - セリン樹脂（ベガ バイオテクノロジー

50

ズ インコーポレイテッド (Vega Biotechnologies Inc.) ;0.60mモル置換/g) が開始サポートとして使用され、Bocアミノ酸がバッケム (Bachem) から購入された。Boc - Glyを除く全てのBocアミノ酸はL - 配列のものであった。側鎖はCys (Mob) ,Ser (Bzl) ,Thr (Bzl) として保護された。1つの例外があるが、結合は溶剤としてのジクロロメタンと結合剤としてジイソプロピルカルボジイミドとを使用して実行された。溶剤としてのジメチルホルムアミドを使用してアスパラギンが側鎖保護なしに結合され、側鎖反応を最小化するために2当量のオキシベンゾトリアゾールが加えられた。Pro残分が、ニンヒドリン試験 (16) を反応完成に対する信頼性の乏しいガイドにしてしまう時には、結合が何回も繰り返された。

ペプチドは、保護を解除され、SerのC - 末端としてタム他 (22) の低 - 高HF手順を使って (2.0gのペプチド - 樹脂の) 樹脂から除去された。

10

整復されたSIIの抽出と精製

HFとスカベンジャーの大部分とを完全に蒸留除去した後に、混合剤が ~ 200mlのエーテル / 1%の -メルカプトエタノール (ME) で抽出された。ペプチドが ~ 200mlの5%のHOAc / 1%の MEで抽出され、それから形成された沈殿物除去のために0.5 μ mのミリポア (Millipore) 膜フィルターを通してろ過された。

ろ液は、凍結乾燥によって ~ 40mlに迄濃縮され、溶出緩衝剤としての0.1%のトリフルオル酢酸 (TFA) の中に入れた30%のアセトニトリルを使ってフロー レート2.5ml/minでHL - 20カラム上に搭載された。全部で80のチューブに対して3分毎に分画が収集され、ニンヒドリン試験で陽性を示すこれらの分画は、溜められて凍結乾燥された。

20

SIIの酸化と精製

凍結乾燥されたペプチド (0.611g) がpH9.0の10mlの6モルのグアニジン塩化水素 / 10mモルのDTTで処理され、55 °Cで1時間培養された。冷却後の透明な黄色の溶液は、それから滴下によりpH8.08の (予めN₂で1.5時間泡立てられた41の0.05モルのNH₄CO₃に加えられた)。反応フラスコは紙の薄織物でやんわりと覆われ、混合剤は、チオールに対するエルマン試験 (Ellmans Test) の陰性になる迄室温で (磁気攪拌をされながら) 空気酸化されるのに任された。

酸化された混合剤は、氷酢酸でpH5.5になる迄調整され、それから (ワットマン (Whatman) 番号1のろ紙) のブッフナー (Buchner) のファンネル上でろ過された。ろ過物はC₁₈のRPウォーター ス カustom (Waters Custom) Prep Pak HPLCカラム (デルタ (Delta) PacC₁₈、細孔サイズ300 - A° , 15 μ m) を使って色層分析され、pH6.0のTEAシステムの直線勾配 (23) を使ってフロー レート40ml/minで50分間溶離された。280nmで監視された分画は30秒毎に手で収集された。正しく折りたたまれたペプチドは、尖頭からの10 ~ 20 μ Lの各分画を使ったTFA/アセトニトリル中での溶離時間の天然SIIペプチドに対する比較分析のHPLCにより識別された。更には、ペプチド精製が半準備カラム及びTFA/アセトニトリル緩衝液のシステムを使って行われた。

30

ペプチドは上記で詳述した標準的方法により合成された。ペプチドは、2gのBoc - Ser樹脂から始められて、メリフィールドの手順によって手で合成され、HFを使って樹脂から開放され、約0.6gの複製されたペプチドが取得された。ペプチドは大きな量 (4L) での4 におけるゆっくりした空気酸化によって酸化された。5日後酸化ペプチドはHPLCによって精製された。

40

合成及び天然ペプチドはHPLC上で一挙動をなし、これからのペプチドは魚に対して同じ様な効果を示した。同じような麻痺及び到死時間が3種類の投与量 (一匹当り0.5, 1.0及び5 .0Nモル) 試験によって観察された。かくて全ての規範を使って、配列指定の直接的な確認に対しても、生来のペプチドと合成ペプチドとは相互に一致する。ペプチドは、魚に対しては効力のある麻痺性トキシンではあるけれども、年令2週間のマウスでは一匹当り20Nモルの投与ですら明白な影響が観られないことは注目に値する。

実施例 3

- コノトキシンSIIの生物学的活性

生物学的分析

50

魚及びマウスの注射が既述(18)のように行われた。

前述(24)されているようにして、シナプス反応がラナピピエンス(*Rana pipiens*)からの胸の皮膚神経筋プレパラートを使って細胞外で記録された。端的に云えば、外側の第3筋が切り取られて四角のシルガード(Sylgard)溝にピン止めされた。シナプス反応は、端板ポテンシャルを活動ポテンシャルの発生に必要なしきい値より下のレベルでブロックするために、0.2 μ モルの α -バンガロトキシン(bungarotoxin)で処理したプレパラートからの白金線電極を使って記録された。コノトキシンペプチドには、溶液をトキシン含有溶液で置換した浴が適用された。 α -コノトキシンSIIは、かえるの神経筋連結プレパラートにおいて電氣的に換気されたシナプス後部反応を可逆的にブロックした。

SIIがアセチルコリンレセプタに影響を及ぼすか否かを試験するために、自然発生の小型端板ポテンシャル(mepps)上のトキシン効果が測定された。自然発生の小型端板ポテンシャル(mepps)は、シルガード-コートを施されたガラスのカバースリップ上にピン止めされた胸の皮膚筋から細胞内での記録がなされ、それから蛍光顕微鏡の載物台に固定されている部屋の中に置かれた。トキシンが焦点を結ぶ位置で(5 μ モルの)テトラメチルロータミン-リゾチーム共役を含む溶液の中へ供給された。この溶液の蛍光が、吹出しピペットから放出されるトキシンと端板領域との接触を確実にするための溶液位置の監視を可能ならしめる。吹出しピペットの撤回に続く浴のまき散らしによってトキシンは端板から洗い流される。吹出しピペットから供給されたSII(20 μ モル)はmeppの振幅の45%を減じたが、この45%の減少は(n>20の)トキシン洗い出しに従って回復された。この結果は、アセチルコリンレセプタがトキシンによって可逆的にブロックされた事を示している。

電気生理学的データは、ナショナルインスツルメンツ(Lab NB)又はGWインスツルメンツ(Mac-ADIOS adio)いずれかからのA/D変換器ハードウェアに適したマッキントッシュのコンピュータ上の仮想計器ソフトウェアで入手できる。

¹²⁵I標識をつけた α -バンガロトキシンと α -コノトキシンSIIとの間の結合競争

かえるの神経筋連結での結果、即ち、上記の小型端板ポテンシャル(mepps)の遮断と共に α -コノトキシンペプチドSIIの配列分析によって明らかになった相同性は、このペプチドの脊椎動物の神経筋連結にあるアセチルコリンレセプタへの結合を強力に示唆する(が結論的な証拠ではない)。このレセプタの課題を確認するために、 α -コノトキシンペプチドSIIのラジオアイソトープ標識を付けた α -バンガロトキシンに対する部位競争競争能力を評価し、これによって α -コノトキシンペプチドSIIがニコチンアセチルコリンレセプタのリガンド結合部位に結合するかどうかを調査した。

結合実験はトルペドカリフォルニカ(*Torpedo California*)の電函から分離したシナプス後部膜分画のろ過分析を用いてなされた。(2,000Ci/mモルの)¹²⁵I- α -バンガロトキシンは、1分析当たり約10⁵cpmで使用された。使用条件下での100%結合は20,000cpmである。標識を付けない1 μ モルの α -バンガロトキシンでの事前培養で決定された非特定結合は差し引かれた。この実験の結果は、 α -コノトキシンペプチドSIIが、¹²⁵I- α -バンガロトキシンの結合を、トルペドの電気器官から見出された充分特性の明らかになっているニコチンアセチルコリンレセプタで完全に置換するであろうことを証明した。使用の結合条件の下では、 α -コノトキシンペプチドSIIに対する見掛けのIC₅₀は8 μ モルであった。事前に特性を明らかにされた α -コノトキシンペプチドSIに対する同様な分析は、これらの条件の下で1 μ モルのIC₅₀値を生み出した。それ故、これらのデータは、 α -コノトキシンペプチドSIIがリガンド結合部位でニコチンアセチルコリンレセプタと相互作用を持つことを直接的に証明するものである。かくてこの生理学的データと結合データとの両方は、神経筋連結にあるアセチルコリンレセプタと結合するアセチルコリンを抑制する α -コノトキシンのクラスに属している α -コノトキシンペプチドSIIのそれと一致する。

実施例 4

コノトキシンペプチドのPCR増幅

種々なコヌス種からのA-血統のコノトキシンペプチドの緊急な見付け方は、このクラ

10

20

30

40

50

スのペプチドを暗号化するcDNAの中に高度に保存されている核酸の存在を使うことによつて可能になった。特に、A - 血統のプレプロペプチドの信号配列、Pro領域、5 非翻訳領域及び3 非翻訳領域を暗号化する配列は、種々な分子技術を使つてのこれらのペプチドのアクセス手段の提供に充分な程に、よく保存されていることが発見された。 - コノトキシン ペプチドGI cDNAの保存部分に相同性を有するPCRプライマーを使つてのA - 血統のプレプロペプチド配列のPCR増幅に基礎を置くA - 血統のコノトキシン ペプチドの発見に対する高度な効率的な戦略は、テーブルII乃至VIIの中で既述したペプチドの識別の活用であった。この戦略においては、1つのPCRプライマーがGIプレプロペプチドの信号配列部分を暗号化する保存核酸を含み、第2のPCRプライマーがGI cDNAの3 非翻訳領域からの保存核酸を含んでいる。それ故、これらの対をなす2つのプライマーは保存核酸配列を目標に定めており、この核酸配列が、A - 血統のコノトキシン ペプチドのクラスを暗号化するcDNA配列に側面を接してコヌス毒液管のcDNAのいずれかの適切なテンプレートからの配列を暗号化するA - 血統のプレプロペプチドのPCR増幅を支援する。PCR増幅はテーブルSVIIIの中に識別されているコヌス種上で行なわれる。従来型のPCR技術(25,26)は、オリゴヌクレオチドDH0G506及びDH0G507を目標に定める血統に対してテーブルII乃至VIIに記載のペプチドを識別するために利用された。オリゴヌクレオチドDH0B506(5' - TCTGCGAATGGGCATGCGGATGATGTT - 3') (配列番号:52)は、PCR製品を適切なDNAベクトルにサブクローン化することを容易にする7 - 塩基対の5'延長部分と共に(ボールド体で示された) - コノトキシン ペプチドGIの信号配列を暗号化する最初の20塩基対をも包含している。オリゴヌクレオチドDH0B507(5' - TGCTCCAACGTCGTGGTTTCAGAGGGTC - 3') (配列番号:53)は、サブクローン化することを容易にする7 - 塩基 - 対の5'延長部分と共に(ボールド体で示された) - コノトキシン ペプチドGI cDNAクローンの3'非翻訳領域からの20塩基対をも包含する。コヌス バンダヌス毒液管cDNAの存在の中でのPCRプライマー対としてのオリゴヌクレオチドDH0G506及びDH0G507の使用が、アガロース ゲルの中に見掛けサイズ約240塩基対を有する増幅製品を生じさせた。この増幅された材料のサブクローン化及び配列決定は、A - 血統のプレプロペプチドを暗号化する数個の別個のcDNAの存在を表したものである。これらのcDNAの1つは、次の配列を持つ60アミノ酸プレプロペプチドを暗号化するクローンであった。即ち配列はMGRMMST - MFLLVVATVVSFASDAS DGRNAAKDK - ASDLVALT VKGCCSH PACSVNNPDICG (配列番号:45)である。このプレプロペプチドのC - 末端領域は、CC4C7CのパターンでA - 血統のコノトキシンを明白に形成するアミノ酸を包含する。成熟コノトキシンのN - 末端アミノ酸の識別は、二重シスチン残分に対する基本アミノ酸残分(リシン)の2個のアミノ酸のN - 末端の存在によって行なう。それ故に、このコヌス バンダヌスのcDNAから明白に予測された成熟トキシンの配列は、コヌス バンダヌスBN - 1コノトキシン ペプチドと呼ばれるGCCSH PACSVNNPDIC* (配列番号:14; * = C - 末端アミノ化)である。

10

20

30

テーブル VIIIコヌス種のPCR増幅

| <u>種</u> | <u>餌食</u> | <u>増幅された核酸源</u> | <u>配列クローン数</u> | <u>検出クローンタイプ数</u> |
|----------------|-----------|--------------------|----------------|-------------------|
| コヌス ストリアトウス | 魚 | cDNAライブラリー | 23 | 5 |
| コヌス マグス | 魚 | mRNA cDNAライブラリー | 11 | 2 |
| コヌス ステルクススカルム | 魚 | mRNA | 7 | 2 |
| コヌス オルクロレウクス | 魚(?) | mRNA | 9 | 2 |
| コヌス スルカトウス | 魚(?) | cDNAライブラリー | 19 | 2 |
| コヌス バンダヌス | 巻き貝 | mRNA | 22 | 3 |
| コヌス カラクテリスティクス | 蠕虫 | mRNA | 7 | 2 |

10

20

30

40

実施例 5U002の生物学的活性

コノトキシン ペプチドU002の生物学的活性は、かえるの胸の皮膚筋の自然発生的meppsへの効果測定と、実施例3に上述したような - バンガロトキシンとの競争能力の測定と

50

によって決定された。(205mモルの)U002は、トキシンの洗い流しによって回復される me pp 振幅の30% 整復されて吹き出しパイプから供給された。U002は50 μ モルで結合する - バンガロトキシンの70%をブロックすることが判明した。

実施例 6

- コノトキシン ペプチドの生物学的活性

生物学的な分析が - コノトキシン ペプチドの電気生理学的活性決定のために使用された。この分析で新たに解剖されたかえるの(胸の皮膚筋の)神経筋連結のプレパラートが(約30 μ l)の小さな記録室の中に置かれ、規定のかえるリンゲル液で浴された。神経の電気刺激は、かえるの筋から細胞外で記録された単一作用のポテンシャルを生む結果となる。(約100nモル乃至は1 μ モルの)トキシスが、神経筋のプレパラートに供給された。トキシ供給は、神経への単一電気刺激に反応する繰り返し作用のポテンシャルを生む結果となる。その結果として筋は自然発生的にけいれんし始めるが、(自然発生的な)作用非喚起ポテンシャルが記録され得る。(繰り返し作用のポテンシャルの)トキシン効果は、非可逆的であると思われる(効果は24時間の神経筋プレパラート洗滌後も尚存在する)。浴に対するクラレの追加は、繰り返し作用のポテンシャルを誘起した - トキシンをブロックし、(全部でないとしても)大部分のトキシン効果が神経的に仲介されることを示している。これらの効果は、カリウム チャネル遮断又はナトリウム チャネル活性化のいずれかと殆ど一致する。

- コノトキシン ペプチドは、又、コヌス毒液HPLC分画をふるい分けるための上述の電気生理学的分析を使って分離することが可能である。活性分画は更に均一製品が得られる迄精製される。

本発明の方法と組成とは、種々な実施例の形に結合され得るが、その中の少数のみがここに開示されていることを理解されたい。他に複数の実施例が存在し、それが本発明の精神を離れるものではないことは、技術者には明らかであろう。かくて、記載の実施例は説明的なものであって制約的に解釈するべきものではない。

引用文献リスト

1. B.M.オリベラ(1984年)。米国特許第4,447,356号。
2. B.M.オリベラ他(1984年)。コヌス ゲオグラフィクス毒液からのシナプス前部ペプチドトキシンの精製と配列。生化学 23:5087~90頁。
3. J.サンプルック他(1979年)。分子のクローン化:研究マニュアル第2版。コールドスプリング ハーバー研究所、ニューヨーク州コールド スプリング ハーバー研究所、ニューヨーク州コールド スプリング ハーバー。
4. W.R.グレイ(1993年)。多環化システイン ペプチド:ジスルフィド分析新法。アルバータ エドモントンの第13回米国ペプチド シンポジウム要約書。
5. “有機化学的方法(ハウベン-ボイル):ペプチド合成”。E.ブンシュ(発行人)、ゲオルク ティーメ出版社、ドイツシュツットガルト(1974年)。
6. スチュワート及びヤング、固相ペプチド合成。フリーマン社、カルフォルニア州サンフランシスコ(1969年)。
7. ベール他(1978年)。米国特許第4,105,603号。
8. 米国特許第3,972,859号(1976年)。
9. 米国特許第3,842,067号(1974年)。
10. 米国特許第3,862,925号(1975年)。
11. ボダンスキー他(1966年)。化学工業 38:1597~98頁。
12. 米国特許第4,569,967号。
13. K.堀木他(1978年)。化学通信165~68頁。
14. シュローダー及びルプケ(1965年)。ペプチド1:72~75頁。アカデミック新聞、ニューヨーク。
15. カプール(1970年)。薬理科学学会誌 59:1~27頁。
16. カイザー他(1970年)。生化学分析 34:595頁。
17. J.R.リビエル他(1978年)。バイオポリマー17:1927~38頁。

- 18.G.C.ザファレラ他(1988年)。生化学 27:7102~7105頁。
 19.P.エドマン及びベッグ(1967年)。生化学欧州学会誌 1:80~91頁。
 20.R.B.メリフィールド(1963年)。米国化学協会誌 85:2149~12251頁。
 21.W.R.グレイ他(1983年)。生物化学学会誌 258:12247~12251頁。
 22.J.P.タム他(1983年)。米国化学協会誌 105:6442~6445頁。
 23.J.リビエラ他(1984年)。クロマトグラフィ 学会誌 288:303~328頁。
 24.D.吉神他(1989年)。カルシウム チャネル及びシナプス上でのオメガ - コノトキシンの抑制効果。ニューヨーク アカデミー協会年報 560:230~48頁。
 25.PCR工学。H.Aエリック、発行人、ストックトン新聞、ニューヨーク州ニューヨーク(1989年)。

10

配列の一覧

(1) 一般情報:

(i) 出願人:Olivera,Baldomero M.

Cruz,Lourdes J.

Hillyard,David R.

McIntosh,J.Michael

Santos,Ameurfin D.

(ii) 発明の名称:コノトキシン ペプチド

20

(iii) 配列の数:53

(iv) 連絡先住所:

(A) 宛名:Venable,Baetjer,Howard & Civiletti

(B) 所番地:1201 New York Avenue N.W.,Suite 1000

(C) 市名:Washington

(D) 州名:DC

(F) 郵便番号:20005

(v) コンピュータ読取形式:

(A) 媒体のタイプ:フロッピーディスク

(B) コンピュータ:IBM PC コンパチ

(C) OS:PC - DOS/MS - SOS

(D) ソフトウェア:Wordperfect 5.1 Windows

30

(vi) 出願データ:

(A) 出願番号:PCT

(B) 出願日:19 - OCT - 1994

(C) 分類:

(viii) 代理人情報:

(A) 氏名:hnen,Jeffrey L.

(B) 登録識別番号:28,957

(C) 整理番号:24260 - 107763

40

(ix) 電話連絡先情報:

(A) 電話番号:202 - 962 - 4810

(B) ファクシミリ番号:202 - 962 - 8300

(2) 配列番号:1:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:12 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:YES

50

- (iv) アンチセンス:NO
- (v) 断片タイプ: 内部
- (vi) 発生源:
- (A) 生体: コヌス
- (xi) 配列記述: 配列番号:1:

Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10

- (2) 配列番号:2:に関する情報:

- (i) 配列特性:

(A) 長さ:15 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

- (ii) 分子タイプ: ペプチド

(iii) 仮説基準: YES

(iv) アンチセンス:NO

(v) 断片タイプ: 内部

(vi) 発生源:

(A) 生体: コヌス

- (xi) 配列記述: 配列番号:2:

Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

Xaa Cys

15

- (2) 配列番号:3:に関する情報:

- (i) 配列特性:

(A) 長さ:12 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

- (ii) 分子タイプ: ペプチド

(iii) 仮説基準: YES

(iv) アンチセンス:NO

(v) 断片タイプ: 内部

(vi) 発生源:

(A) 生体: コヌス

- (xi) 配列記述: 配列番号:3:

Cys Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10

Cys Xaa Xaa Xaa Cys

15

- (2) 配列番号:4:に関する情報:

- (i) 配列特性:

(A) 長さ:13 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) トポロジー: 線状

- (ii) 分子タイプ: ペプチド

(iii) 仮説基準: NO

(iv) アンチセンス:NO

10

20

30

40

50

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス ゲオグラフィス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 4 :

Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Arg His Tyr Ser Cys

1

5

10

(2) 配列番号 : 5 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 15 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス ゲオグラフィス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 5 :

Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Arg His Tyr Ser

1

5

10

Cys Gly Lys

15

(2) 配列番号 : 6 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 13 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス ゲオグラフィス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 6 :

Glu Cys Cys His Pro Ala Cys Gly Lys His Phe Ser Cys

1

5

10

(2) 配列番号 : 7 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 14 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス マグス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 7 :

10

20

30

40

Gly Arg Cys Cys His Pro Ala Cys Gly Lys Asn Tyr

1 5 10

Ser Cys

(2) 配列番号:8:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:13 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

10

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:8:

Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Pro Lys Tyr Ser Cys

1 5 10

(2) 配列番号:9:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:13 アミノ酸

20

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:9:

Tyr Cys Cys His Pro Ala Cys Gly Lys Asn Phe Asp Cys

1 5 10

30

(2) 配列番号:10:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:20 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

40

(ix) 特徴

(A) 名称/キー:改変部位

(B) 位置:19..20

(D) その他情報:/注記 = "XaaはArg - Thr - Leu"

(xi) 配列記述:配列番号:10:

Gly Cys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Pro Asn Tyr

1 5 10

Gly Cys Gly Thr Ser Cys Ser Xaa

15

20

50

(2) 配列番号:11:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:12 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:YES

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: 改変部位

(B) 位置:3..10

(D) その他情報:/注記 = Xaa (3) はHis又はAsn;Xaa (10) はTyr又はPhe"

(xi) 配列記述: 配列番号:11:

Cys Cys Xaa Pro Ala Cys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

1

5

10

10

(2) 配列番号:12:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:12 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス インペリアリス (imperialis)

(xi) 配列記述: 配列番号:12:

Gly Cys Cys Ser Asp Pro Arg Cys Ala Trp Arg Cys

1

5

10

20

30

(2) 配列番号:13:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:18 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス エルミネウス

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: 改変部位

(B) 位置:3..4

(D) その他情報:/注記 = " XaaはPro又はヒドロキシ - Pro"

(xi) 配列記述: 配列番号:13:

40

Arg Asp Xaa Cys Cys Tyr His Pro Thr Cys Asn Met

1 5 10

Ser Asn Pro Gln Ile Cys

15

(2) 配列番号:14:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:16 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

10

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス パンダヌス

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー:改変部位

(B) 位置:6..14

(D) その他情報:/注記 = " Xaa (6) はPro又はヒドロキシ - Pro; Xaa (13) はPro又はヒドロキシ - Pro; Xaa (14) はAsp又はベーターカルボキシアスパラギン酸 "

20

(xi) 配列記述:配列番号:14:

Gly Cys Cys Ser His Xaa Ala Cys Ser Val Asn Asn

1 5 10

Xaa Xaa Ile Cys

15

(2) 配列番号:15:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:16 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

30

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス パンダヌス

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー:改変部位

(B) 位置:6..20

(D) その他情報:/注記 = " Xaa (6) はPro又はヒドロキシ - Pro; Xaa (13) はPro又はヒドロキシ - Pro "

40

(xi) 配列記述:配列番号:15:

Glu Cys Cys Thr His Xaa Ala Cys His Val Ser His

1 5 10

Xaa Glu Leu Cys

15

(2) 配列番号:16:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:13 アミノ酸

50

(B) 位置 : 6..14

(D) その他情報 : /注記 = “ Xaa (6) はPro又はヒドロキシ - Pro; Xaa (13) はPro又はヒドロキシ - Pro; Xaa (14) はGlu又はガンマ - カルボキシグルタミン酸 ”

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 21:

Ala Cys Cys Ser Tyr Xaa Pro Cys Asn Val Asn Tyr

1 5 10

Xaa Xaa Ile Cys Gly Gly Arg

15

(2) 配列番号 : 22: に関する情報 :

10

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 15 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス ストリアトウス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 22:

20

Asn Gly Cys Cys Arg Asn Pro Ala Cys Glu Ser His

1 5 10

Arg Cys Gly

15

(2) 配列番号 : 23: に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 42 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス オルクロレウクス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 23:

30

Asn Val Val Val Thr Ser Phe Glu Pro Thr Thr Leu

1 5 10

Ala Pro Val Pro Ser Asp Cys Cys Gln Val Ser Ser

15 20

40

Cys Trp Asn Leu Tyr Gly Leu Glu Cys Thr Gly Ile

25 30 35

Thr Arg Arg Arg Thr Leu

40

(2) 配列番号 : 24: に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 42 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

50

- (D) トポロジー：線状
- (ii) 分子タイプ：ペプチド
- (iii) 仮説基準:NO
- (iv) アンチセンス:NO
- (ix) 特徴：

- (A) 名称/キー：改変部位
- (B) 位置:3..4

(D) その他情報:/注記 = " XaaはPro又はヒドロキシ - Pro"

(xi) 配列記述：配列番号:31:

Arg Asp Xaa Cys Cys Tyr His Pro Thr Cys Asn Met Ser

1

5

10

10

Asn Pro Gln Ile Cys

15

(2) 配列番号:32:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ:18 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子タイプ：ペプチド

20

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス エルミネウス

(ix) 特徴：

(A) 名称/キー：改変部位

(B) 位置:3..4

(D) その他情報:/注記 = " XaaはPro又はヒドロキシ - Pro"

(xi) 配列記述：配列番号:32:

Arg Asp Xaa Cys Cys Ser Asn Pro Ala Cys Asn Val Asn

1

5

10

30

Asn Pro Gln Ile Cys

15

(2) 配列番号:33:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ:30 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子タイプ：ペプチド

40

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス エルミネウス

(ix) 特徴：

(A) 名称/キー：改変部位

(B) 位置:7..27

(D) その他情報:/注記 = " XaaはPro又はヒドロキシ - Pro"

(xi) 配列記述：配列番号:33:

Gly Cys Cys Gly Pro Tyr Xaa Asn Ala Ala Cys His Xaa
 1 5 10
 Cys Gly Cys Lys Val Gly Arg Xaa Xaa Tyr Cys Asp Arg
 15 20 25
 Xaa Ser Gly Gly
 30

(2) 配列番号:34:に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ:14 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:34:

Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Pro Lys Tyr Ser
 1 5 10
 Cys

(2) 配列番号:35:に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ:30 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:35:

Gln Lys Ser Leu Val Pro Ser Val Ile Thr Thr Cys Cys
 1 5 10
 Gly Tyr Asp Pro Gly Thr Met Cys Pro Pro Cys Arg Cys
 15 20 25
 Thr Asn Ser Cys
 30

(2) 配列番号:36:に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ:64 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

10

20

30

40

50

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val
 1 5 10
 Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Pro Ser Asp Arg
 15 20 25
 Ala Ser Asp Gly Arg Asp Asp Glu Ala Lys Asp Glu Arg
 30 35
 Ser Asp Met His Glu Ser Asp Arg Asn Gly Arg Gly Cys
 40 45 50
 Cys Cys Asn Pro Ala Cys Gly Pro Asn Tyr Gly Cys Gly 10
 55 60 65
 Thr Ser Cys Ser Arg Thr Leu
 70

(2) 配列番号:39:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:64 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド 20

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:39:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val
 1 5 10
 Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Pro Ser Asp Arg
 15 20 25 30
 Ala Ser Asp Gly Arg Asp Asp Glu Ala Lys Asp Glu Arg
 35
 Ser Asp Met His Glu Ser Asp Arg Lys Glu Ile Cys Cys
 40 45 50
 Asn Pro Ala Cys Gly Pro Lys Tyr Ser Cys Gly Arg
 55 60

(2) 配列番号:40:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:69 アミノ酸 40

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:40:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val
 1 5 10
 Val Leu Ala Thr Asn Val Val Ser Thr Pro Ser Asp Arg
 15 20 25
 Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Val His Glu Arg Gln
 30 35
 Lys Ser Leu Val Pro Ser Val Ile Thr Thr Cys Cys Gly
 40 45 50
 Tyr Asp Pro Gly Thr Met Cys Pro Pro Cys Arg Cys Thr 10
 55 60 65
 Asn Ser Cys Gly

(2) 配列番号:41:に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ:80 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO 20

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体:コヌス ストリアトゥス

(xi) 配列記述:配列番号:41:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Ser Val
 1 5 10
 Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Thr Pro Ser Asp Arg
 15 20 25
 Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Val His Glu Arg Gln 30
 30 35
 Lys Glu Leu Val Pro Ser Val Ile Thr Thr Cys Cys Gly
 40 45 50
 Tyr Asp Pro Gly Thr Met Cys Pro Pro Cys Arg Cys Thr
 55 60 65
 Asn Ser Cys Pro Thr Lys Pro Lys Lys Pro Gly Arg Arg
 70 75
 Asn Asp 40
 80

(2) 配列番号:42:に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ:79 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源 : 50

(A) 生体 : コヌス マグス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 42 :

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Ile Pro Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Val His Glu Arg Ala

30 35

Pro Glu Leu Val Val Thr Ala Thr Thr Asn Cys Cys Gly

40 45 50

Tyr Asn Pro Met Thr Ile Cys Pro Pro Cys Met Cys Thr

55 60 65

Tyr Ser Cys Pro Pro Lys Arg Lys Pro Gly Arg Arg Asn

70 75

Asp

(2) 配列番号 : 43 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 80 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス ステルクスムスカルム

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 43 :

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Ile Pro Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Val Asn Glu Arg Gln

30 35

Thr Trp Leu Val Pro Ser Thr Ile Thr Thr Cys Cys Gly

40 45 50

Tyr Asp Pro Gly Thr Met Cys Pro Thr Cys Met Cys Asp

55 60 65

Asn Thr Cys Lys Pro Lys Pro Lys Lys Ser Gly Arg Arg

70 75

Asn Asp

80

(2) 配列番号 : 44 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 80 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

10

20

30

40

50

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮説基準：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス ステルクスムスカルム

(xi) 配列記述：配列番号：44:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Ile Pro Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Glu Val Asn Glu Arg Ala

30 35

Pro Trp Leu Val Pro Ser Thr Ile Thr Thr Cys Cys Gly

40 45 50

Tyr Asp Pro Gly Ser Met Cys Pro Pro Cys Met Cys Asn

55 60 65

Asn Thr Cys Lys Pro Lys Pro Lys Lys Ser Gly Arg Arg

70 75

Asn His

80

(2) 配列番号：45:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：64 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮説基準：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス ゲオグラフス

(xi) 配列記述：配列番号：45:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Pro Ser Glu Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asp Asp Thr Ala Lys Asp Glu Gly

30 35

Ser Asp Met Glu Lys Leu Val Glu Lys Lys Glu Cys Cys

40 45 50

Asn Pro Ala Cys Gly Arg His Tyr Ser Cys Gly Arg

55 60

(2) 配列番号：46:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：65 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

10

20

30

40

50

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス バンダヌス

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Met Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Ala Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Ala Lys Asp Lys Ala

30 35

Ser Asp Leu Val Ala Leu Thr Val Lys Gly Cys Cys Ser

40 45 50

His Pro Ala Cys Ser Val Asn Asn Pro Asp Ile Cys Gly

55 60 65

10

(2) 配列番号:47:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ:68 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源：

(A) 生体：コヌス カラクテリスティクス

(xi) 配列記述：配列番号:47:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Thr Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Glu Gly Arg Asn Ala Ala Ala Lys Asp Lys Ala

30 35

Ser Asp Leu Val Ala Leu Thr Val Arg Gly Cys Cys Ala

40 45 50

Ile Arg Glu Cys Arg Leu Gln Asn Ala Ala Tyr Cys Gly

55 60 65

Gly Ile Tyr

20

30

40

(2) 配列番号:48:に関する情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ:68 アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子タイプ：ペプチド

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

50

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス マグス

(xi) 配列記述 : 配列番号 : 48 :

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Pro Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Ala Asn Asp Lys Ala

30 35

Ser Asp Val Ile Thr Leu Ala Leu Lys Gly Cys Cys Ser

40 45 50

Asn Pro Val Cys His Leu Glu His Ser Asn Leu Cys Gly

55 60 65

Arg Arg Arg

10

(2) 配列番号 : 49 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 70 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

(A) 生体 : コヌス スルカトウス

(xi) 配列既述 : 配列番号 : 49 :

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Asn Ser Asp Arg

15 20 25

Asp Pro Ala Leu Gly Gly Arg Asn Ala Ala Ala Ile Ala

30 35

Ser Asp Lys Ile Ala Ser Thr Leu Arg Arg Gly Gly Cys

40 45 50

Cys Ser Phe Pro Ala Cys Arg Lys Tyr Arg Pro Glu Met

55 60 65

Cys Gly Gly Arg Arg

70

20

30

40

(2) 配列番号 : 50 : に関する情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 62 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子タイプ : ペプチド

(iii) 仮説基準 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 発生源 :

50

(A) 生体: コヌス カラクテリスティクス

(xi) 配列記述: 配列番号:50:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Thr Val Val Ser Phe Thr Ser Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Ala Asn Ala Phe Asp

30 35

Leu Ile Ala Leu Ile Ala Arg Gln Asn Cys Cys Ser Ile

40 45 50

Pro Ser Cys Trp Glu Lys Tyr Lys Cys Ser

55 60

10

(2) 配列番号:51:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:62 アミノ酸

(B) タイプ:アミノ酸

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:ペプチド

20

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス バンダヌス

(xi) 配列記述: 配列番号:51:

Met Gly Met Arg Met Met Phe Thr Val Phe Leu Leu Val

1 5 10

Val Leu Ala Thr Ala Val Leu Pro Val Thr Leu Asp Arg

15 20 25

Ala Ser Asp Gly Arg Asn Ala Ala Ala Asn Ala Lys Thr

30 35 40

Pro Arg Leu Ile Ala Pro Phe Ile Arg Asp Tyr Cys Cys

45 50

His Arg Gly Pro Cys Met Val Trp Cys Gly

55 60

30

(2) 配列番号:52:に関する情報:

(i) 配列特性:

(A) 長さ:27 塩基対 (base pairs)

40

(B) タイプ:核酸

(C) 撚り状態:単独

(D) トポロジー:線状

(ii) 分子タイプ:DNA (ゲノムの)

(iii) 仮説基準:NO

(iv) アンチセンス:NO

(vi) 発生源:

(A) 生体:コヌス ゲオグラフス

(xi) 配列記述: 配列番号:52:

TCTGCGAATGGGCATGCGGATGATGTT

50

- (2) 配列番号:53:に関する情報 :
- (i) 配列特性 :
- (A) 長さ:27 塩基対 (base pairs)
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 撚り状態 : 単独
- (D) トポロジー : 線状
- (ii) 分子タイプ : DNA (ゲノムの)
- (iii) 仮説基準 : NO
- (iv) アンチセンス : NO
- (vi) 発生源 :
- (A) 生体 : コヌス ゲオグラフィス
- (xi) 配列記述 : 配列番号:53:
- TGCTCCAACGTCGTGGTTCAGAGGGTC

フロントページの続き

- (72)発明者 オリベーラ,バルドメロ,エム.
アメリカ合衆国,84108 ユタ州,ソルト レイク シティ,ブライアン アベニュー 13
70
- (72)発明者 クルーズ,ルアズ,ジェー.
アメリカ合衆国,84114 ユタ州,ソルト レイク シティ,#403 エム ストリート
31
- (72)発明者 ヒルヤード,デビッド,アール.
アメリカ合衆国,84124 ユタ州,ソルト レイク シティ,ジュノ サークル 3685
- (72)発明者 マッキントッシュ,ジェー.,マイケル
アメリカ合衆国,84108 ユタ州,ソルト レイク シティ,サウス 2000 イースト
1151
- (72)発明者 サントス,アミュルフィナ,ディー.
フィリピン国,ケソン シティ,ディリマン,ユー.ピー.キャンパス,ブローク アギナルド
7

審査官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 Biochemistry, Vol.31(1992),p.9919-9926

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C07K 14/435

C07K 7/06 ~ 08

CA(STN)

REGISTRY(STN)