

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4025035号
(P4025035)

(45) 発行日 平成19年12月19日(2007.12.19)

(24) 登録日 平成19年10月12日(2007.10.12)

(51) Int. Cl.	F I
CO7K 16/38 (2006.01)	CO7K 16/38 ZNA
CO7K 1/22 (2006.01)	CO7K 1/22
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 521

請求項の数 7 (全 15 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-226122 (P2001-226122)</p> <p>(22) 出願日 平成13年7月26日 (2001.7.26)</p> <p>(62) 分割の表示 特願平10-181319の分割 原出願日 昭和63年7月22日 (1988.7.22)</p> <p>(65) 公開番号 特開2002-97200 (P2002-97200A)</p> <p>(43) 公開日 平成14年4月2日 (2002.4.2)</p> <p>審査請求日 平成13年7月26日 (2001.7.26)</p> <p>審判番号 不服2005-5762 (P2005-5762/J1)</p> <p>審判請求日 平成17年4月4日 (2005.4.4)</p> <p>(31) 優先権主張番号 123753</p> <p>(32) 優先日 昭和62年11月23日 (1987.11.23)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 590004567 ファルマシア・コーポレーション アメリカ合衆国63141ミズーリ州セントルイス、メリビル・センター・ドライブ575</p> <p>(73) 特許権者 597025806 ワシントン・ユニバーシティ Washington University School of Medicine アメリカ合衆国63130ミズーリ州セントルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ</p> <p>(74) 代理人 100066692 弁理士 浅村 皓</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 組織因子抑制因子に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織因子抑制因子(TFI)の、図3および図4に示されるアミノ酸31-53の配列からなる領域に結合する、組織因子抑制因子(TFI)に対する結合特異性を有する単離精製された抗体。

【請求項2】

以下からなる群から選択されるポリペプチドに結合しない請求項1の抗体：

牛塩基性プロテアーゼ抑制因子前駆体、

牛初乳トリプシン抑制因子、

牛血清塩基性プロテアーゼ抑制因子、

食用カタツムリ・イソ抑制因子K、

紅海ウミガメ塩基性プロテアーゼ抑制因子、

ウエスタン・サンド毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子I、

リンガルス毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II、

ケープ・コブラ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II、

ルッセル毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II、

サンド毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子III、

イースタン・グリーン・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子Iホモログ、

ブラック・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子B、E、IおよびK、

- 1 - ブンガロトキシンB鎖(マイナー)、

- 1 - ブンガロトキシシン B 鎖 (メジャー)、
- 2 - ブンガロトキシシン B 鎖、
- ウマ・インター - トリプシン抑制因子 (アミノ酸 1 ~ 57 ; 58 ~ 123)、
- ブタ・インター - トリプシン抑制因子 (アミノ酸 1 ~ 57 ; 58 ~ 123)、
- ウシ・インター - トリプシン抑制因子 (アミノ酸 1 ~ 57 ; 58 ~ 123)、
- ヒト - 1 - マイクログロブリン/インター - トリプシン抑制因子前駆体 (アミノ酸 227 ~ 283 ; 284 ~ 352)。

【請求項 3】

ポリクロナル抗体である請求項 1 または 2 の抗体。

【請求項 4】

図 3 および図 4 に示されるアミノ酸 31 - 53 からなる T F I ペプチドで精製される請求項 1 または 2 の抗体。

【請求項 5】

イムノアフィニティーマトリックスに結合した請求項 1 または 2 の抗体。

【請求項 6】

前記イムノアフィニティーマトリックスが「セファロースTM 4 B」である請求項 5 の抗体。

【請求項 7】

生物学的液体を、T F I に対して結合特異性を有する抗体を結合したイムノアフィニティーマトリックスと接触させ、それにより、該生物学的液体中の T F I 及び/又はその断片を、該抗体と結合させる工程を含む、生物学的液体から T F I 及び/又はその断片を精製する方法であって、

請求項 5 または 6 のイムノアフィニティーマトリックスを使用して、生物学的液体から T F I 及び/又はその断片を精製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、組織因子抑制因子 (T F I) あるいはリポタンパク質関連凝固抑制因子 (L A C I) として知られる凝固抑制因子に関する。更に詳細には、本発明は全長 T F I を本質的に表現している c D N A クローンに関する。

【0002】

哺乳動物の血液での凝固カスケードには、2つの異なるシステム、即ち内因性システムと外因性システムとがある。後者の外因性システムは、血液が組織スロンボプラスティン (第 III 因子) (以後、組織因子 (T F) と言う) にさらされることによって活性化される。この組織因子は、各種の細胞のプラズマメンブレン中で生じるリポタンパク質であり、特に脳及び肺において多く存在する。プラズマ第 VII 因子あるいはその活性体である第 VII a 因子が T F と接触すると、T F とともにカルシウム依存性複合体を形成し、これがタンパク加水分解作用を発揮して第 X 因子を第 X a 因子にまた第 I X 因子を第 I X a 因子に活性化する。

【0003】

T F によりイニシエイトされる凝固系の制御に関するこれまでの研究により、T F を血清とともにインキュベーション (粗組織スロンボプラスティン調製物中で) すると、その活性が *i n v i t r o* で抑制されまた T F をマウスに注入した時の致死効果が阻止されることが明らかにされている。H j o r t の精力的な研究によって、この分野におけるそれまでの研究成果が確認され更に研究が進められて、血清中の抑制成分が第 VII - T F 複合因子を認識することが結論として示された [S c a n d . J . C l i n . L a b . I n v e s t . 9 , s u p p l . 2 7 , 7 6 ~ 9 7 (1 9 5 7)] 。この結論は、プラズマ中で生じる T F の抑制には $C a^{2+}$ の存在が必要であり (第 VII / VII a 因子が T F に結合する際にも $C a^{2+}$ の存在が必要) T F の抑制は E D T A による 2 価のカチオンのキレート化によって阻止され及び/又は逆転されるという事実と符合している。

10

20

30

40

50

り、成熟 T F I 蛋白の先には約 28 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが存在することが明らかにされた。ここで言う“成熟” T F I とは、本明細書において記載する P 9 クローンの A T G 翻訳コドンによって T F I とメチオニル T F I との両者を含むように定義されるものであり、このことは以下の記載から理解することができよう。

T F I 蛋白には、A s n - X - S e r / T h r (X は普通の 20 個のアミノ酸のうちいずれでもよい) の配列を有する 3 個の N - 結合グリコシル化部位が存在する。これらの部位は、5 非コード領域の後の最初のメチオニンの位置をアミノ酸の位置 + 1 とした時、A s n 145 , A s n 195 及び A s n 256 の位置にある。

【0009】

T F I の翻訳されたアミノ酸配列により、該アミノ酸配列は、高度にマイナスに荷電した N 末端部分、高度にプラスに荷電したカルボキシ末端部分、及び K u n i t z 型酵素抑制因子の典型的配列を有する 3 個の相同ドメインからなる介在配列部分などのいくつかの識別可能な領域を有していることが明らかにされた。相同性についての研究から、T F I は塩基性プロテアーゼ抑制因子遺伝子スーパーファミリーに属するものと考えられる。

【0010】

c D N A クローン P 9 を開発するために用いた蛋白材料はヒト胎盤組織であり、この組織は通常の外科的手法による分娩後に広く入手することができる。本発明において用いられている g t 11 (l a c 5 n i n 5 c 1857 s 100) はよく知られたものであって、普通に入手することのできるラムダファージ発現ベクターである。その構成及び制限酵素地図は、Y o u n g と D a v i s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 80 , 1194 ~ 1198 (1983) に記載されている。

ノーザン・ブロット分析により、肝由来セルライン、即ち C h a n g リバー、H e p G 2 ヘパトーマ及び S K - H E P - 1 ヘパトーマは、T F I c D N A とハイブリダイズする 2 つの主要な m R N A (1 . 4 k b と 4 . 4 k b) を有していることが明らかにされた。

【0011】

本明細書に記載した如き、T F I のための c D N A のクローニング及びその全蛋白配列及び構造の解明により、詳細な構造 - 機能分析が可能となり、またその生合成的レギュレーションの研究のための基本的知識が得られる。

しかして本発明は、第 X a 因子及び第 V I I a / T F 酵素複合因子を抑制することのできる試薬についての血液凝固カスケード研究にとって重要なものである。

【0012】

図面の詳細な記述

本明細書においては、特許請求の範囲の記載によって本発明を形成すると考えられる対象が特に指摘され明白にクレームされているが、以下に記述する図面についての説明とともに本発明の好ましい態様についての記載により本発明がよりよく理解されるものとする。

【0013】

図 1 は、¹²⁵I - 第 X a 因子を用いた g t 11 クローンのスクリーニングを示したものである。

クローン化ファージの溶解物 (0 . 1 m l) を、ドット・プロット装置を用いたサクシオンによりニトロセルロースペーパー上にスポットし、次いでニトロセルロースペーパーを ¹²⁵I - 第 X a 因子でプローブし、以後に記述するようにしてオートラジオグラフィに付した。黒いスポットとして現われているクローンが ¹²⁵I - 第 X a 因子と結合したポジティブ・クローンである。コントロール g t 11 (下の右側のコーナー) 及び他のクローンは ¹²⁵I - 第 X a 因子と結合しなかった。

【0014】

図 2 は、部分的制限酵素地図及び P 9 のインサート配列の配列決定に用いた技法を示している。下に示したスケールはヌクレオチドの位置を示している。太い棒線はコード領域を示しており、細い棒線は 5 及び 3 非コード領域を示している。制限酵素部位は消化により確認した。矢印は c D N A の配列決走に用いたオーバーラッピング M 13 クローン

10

20

30

40

50

を示している。

【0015】

図3および4はヒトTFI_c DNAのヌクレオチド配列及び翻訳されたアミノ酸配列を示している。ヌクレオチドの番号は左側に示されており、アミノ酸の番号は右側に示されている。下線を引いた配列は、精製したTFI_c蛋白と、V₈プロテアーゼとトリプシンで消化したペプチドとを用いたアミノ酸配列分析によって独立に確認された配列である。+1のアミノ酸は、5'非コード領域のストップコドンの後にある最初のメチオニンである。N-結合グリコシル化部位は星印で示されている。

【0016】

図5は、TFI_cのアミノ酸配列における電荷分布を示すグラフである。電荷は最初のアミノ酸残基から*i*番目のアミノ酸残基までを計算したものであり、その電荷の値が*i*番目の残基に示されている。従って、*i*番目の位置の値は、最初のアミノ酸残基から*i*番目のアミノ酸残基までの全ての電荷を合計したものであり、*i*番目と*j*番目(*j* > *i*)のアミノ酸残基における値の差は、*i*番目から*j*番目までのアミノ酸残基の合計電荷を示すものである。

10

【0017】

図6は、TFI_cの疎水性プロファイルを示すグラフである。アミノ酸残基の疎水性の指数をアミノ酸残基が蛋白内に埋没された深さ(X線による結晶学的データから得られる)として定義するコンピュータープログラムによって、疎水性プロファイルを分析した〔Kinder et al., J. Protein Chem. 4, 23-55 (1985)〕。アミノ酸配列に沿った疎水性プロファイルは、IMSL LibraryのプログラムICSSCUを用いることによって、滑らかになった〔IMSL Library Reference Manual, 9th ed., Institute for Mathematical and Statistical Subroutine Library, Houston, Texas (1982)〕。

20

【0018】

図7は、TFI_cの塩基性プロテアーゼ抑制因子ドメインと他の塩基性プロテアーゼ抑制因子とのアラインメントを示す。TFI_c以外の他の全ての配列は、National Biomedical Research Foundationの蛋白配列データベース(Georgetown University, Washington, D.C., レリース13, June 1987)から得たものである。

30

- 1: 牛塩基性プロテアーゼ抑制因子前駆体;
- 2: 牛初乳トリプシン抑制因子;
- 3: 牛血清塩基性プロテアーゼ抑制因子;
- 4: 食用カタツムリ・イソ抑制因子K;
- 5: 紅海ウミガメ塩基性プロテアーゼ抑制因子 (1~79のアミノ酸のみ);
- 6: ウェスタン・サンド毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子I;
- 7: リンガルス毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II;
- 8: ケープ・コブラ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II;
- 9: ルッセル毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子II;
- 10: サンド毒ヘビ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子III;
- 11: イースタン・グリーン・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子Iホモログ;
- 12: ブラック・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子B;
- 13: ブラック・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子E;
- 14: ブラック・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子I;
- 15: ブラック・マーンバ毒の塩基性プロテアーゼ抑制因子K;
- 16: -1-ブンガロトキシシンB鎖(マイナー);
- 17: -1-ブンガロトキシシンB鎖(メジャー);
- 18: -2-ブンガロトキシシンB鎖;

40

50

- 19 : ウマ・インター - トリプシン抑制因子〔アミノ酸 1 ~ 57 (1) ; 58 ~ 123 (2)〕 ;
 20 : ブタ・インター - トリプシン抑制因子〔アミノ酸 1 ~ 57 (1) ; 58 ~ 123 (2)〕 ;
 21 : ウシ・インター - トリプシン抑制因子〔アミノ酸 1 ~ 57 (1) ; 58 ~ 123 (2)〕 ;
 22 : ヒト・ - 1 - マイクログロブリンノインター - トリプシン抑制因子前駆体〔アミノ酸 227 ~ 283 (1) ; 284 ~ 352 (2)〕 ;
 23 : T F I〔アミノ酸 47 ~ 117 (1) ; 118 ~ 188 (2) ; 210 ~ 280 (3)〕。

10

最良のアラインメントを達成するためには 16 , 17 , 18 にギャップが含まれていた。アミノ酸を示す標準的 1 文字コードを用いた。

【 0 0 1 9 】

図 8 は、3 個の肝由来セルラインから得た R N A のノーザン・プロット分析を示す。1 レーン当り 1 0 μ g のポリ (A) ⁺ R N A を用いた。

レーン 1 : c h a n g リバー細胞、

レーン 2 : S K - H E P - 1 ヘパトーマ細胞、

レーン 3 : H e p G 2 ヘパトーマ細胞。

本明細書においては、標準的生化学命名法を用いており、ヌクレオチド塩基は、アデニン (A) ; チミン (T) ; グアニン (G) ; シトシン (C) として表わされている。対応するヌクレオチドは、例えばデオキシグアノシン - 5 - トリホスフェート (d G T P) である。D N A ヌクレオチド配列は、便宜上慣用的に 1 本鎖のみで示されており、1 本鎖における A はその相補性塩基として T を内包しており、G は C を内包している。アミノ酸は、以下の表に示すように 1 文字あるいは 3 文字で示されている。

20

【 0 0 2 0 】

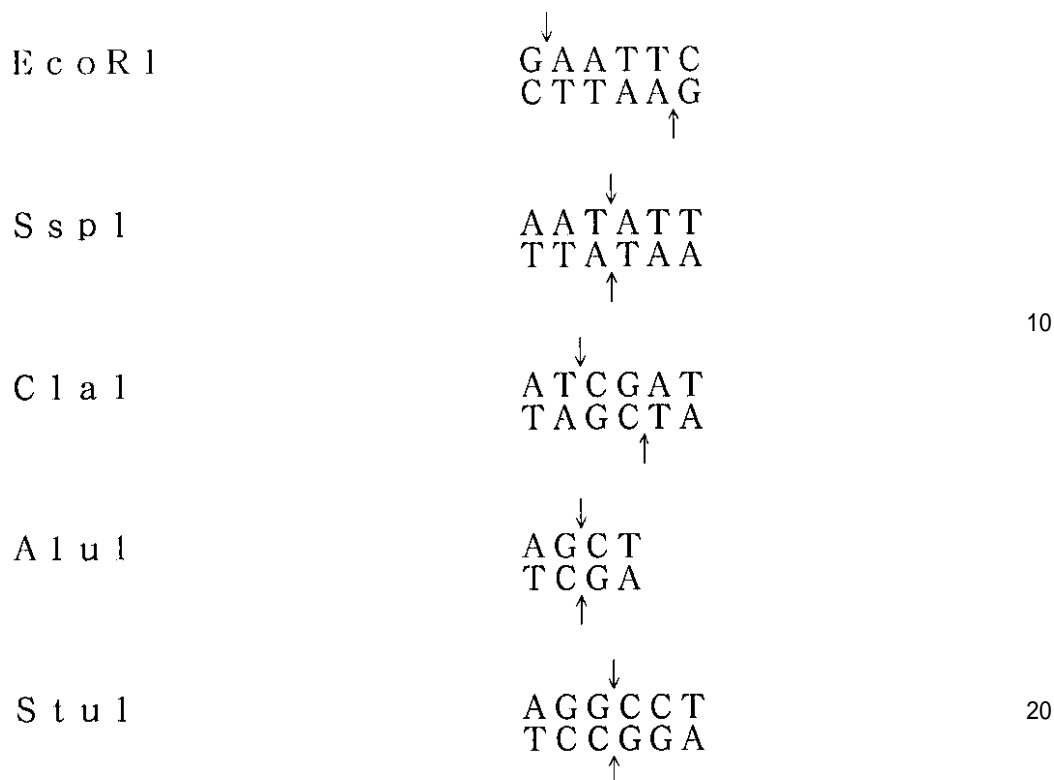
【 表 1 】

略号	アミノ酸	
A Ala	アラニン	
C Cys	システイン	
D Asp	アスパラギン酸	
E Glu	グルタミン酸	10
F Phe	フェニルアラニン	
G Gly	グリシン	
H His	ヒスチジン	
I Ile	イソロイシン	
K Lys	リシン	
L Leu	ロイシン	
M Met	メチオニン	20
N Asn	アスパラギン	
P Pro	プロリン	
Q Gln	グルタミン	
R Arg	アルギニン	
S Ser	セリン	
T Thr	スレオニン	
V Val	バリン	30
W Trp	トリプトファン	
Y Tyr	チロシン	

【0021】

本明細書において記載される普通に入手し得る制限酵素は、以下に示す制限配列及び開裂パターン（矢印で示した）を有している。

【化2】



【0022】

本発明の好ましい態様を更に詳細に説明するために、以下に記述する実験を実施した。

【0023】

例 1

材料

ヒト胎盤及び胎児肝 cDNA ライブラリーを Clontech から得た。プロトブロット (Protoblot) ・イムノスクリーニング・キットは Promega Biotech 30 から購入した。制限酵素は New England Biolabs から購入した。牛腸アルカリ・ホスファターゼ、T₄DNA リガーゼ、DNA ポリメラーゼ I (クレノー)、エキソヌクレアーゼ III 及び S1 ヌクレアーゼは、Boehringer Mannheim から購入した。dNTP は P. L. Biochemicals から購入した。5 - [- ³⁵S] - チオ - dATP (600 Ci/mol) は Amersham から購入した。配列決定用キット (Sequenase) は United States Biochemicals から購入した。Chang リバー細胞 (ATCC CCL13) 及び Hep G2 ヘパトーマ細胞 (ATCC HB8065) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得た。SK-HEP-1 ヘパトーマ細胞は、Sloan-Kettering Institute for Cancer Research の G 40 . Trempe によって 1971 年に肝アデノカルシノーマから誘導されたものであり、現在で広く容易に入手可能である。

【0024】

¹²⁵I - 第 Xa 因子は、ヨード源を用いて放射標識することにより調製した。この比活性は 2000 dpm/ng であった。放射活性の 97% 以上は 10% トリクロロ酢酸 (TCA) により沈澱可能であった。ヨード化蛋白は、Spectrozyme Xa (American Diagnostica 製) に対してその触媒活性を 80% 以上保持していた。

【0025】

抗 - TFI - Ig セファロースTM 4 B カラムは以下のようにして調製した。即ち、成熟 T 50

TFIのアミノ酸3-25の配列に相当する配列を含むペプチド(TFI-ペプチド)を、Biosystemの固相ペプチド合成システムを用いて合成した。TFI-ペプチド(5mg)を、グルタルアルデヒドによりキーホール(Keyhole)・リンペット(Lympet)・ヘモシアニン10mgに結合させてコンジュゲートを調製した。2匹のNew Zealandホワイト・ラビットに、フロイント・完全・アジュバンド1mlと、上記コンジュゲート1ml(TFI-ペプチド200 μ g)を含むホモジェネートを皮内注射して、それぞれ免疫化した。1ヶ月後に、フロイント・不完全・アジュバンド1mlとコンジュゲート1ml(TFI-ペプチド100 μ g)を含むホモジェネートで、2匹のラビットをそれぞれブースターした。3ヶ月の間、1週間毎に抗血清を採取し、1ヶ月毎にブースター注射を行なった。TFI-ペプチドに対する特異的抗体を単離するため、抗血清をTFI-ペプチドセファロース4Bカラムを用いたクロマトグラフィーに付した。カラムを、10倍量のPBS(0.4M NaCl-0.1Mベンズアミジン-1%トリトンTMX-100)及びトリトンX-100を含まない同様の溶液で洗った。0.1Mグリシン/HCl、pH2.2で抗体を溶出させ、直ちに1/10倍量の1Mトリス-OHを加えて中和し、次いで食塩水に対して透析した。単離された抗体を、シアノゲン・プロマイドで活性化させたセファロース4Bに製造業者(Pharmacia)の指針に従って結合させ、これを細胞培養培地からのTFIの単離に用いた。

10

【0026】

Changリバー細胞を、BrozeとMiletich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1886~1890(1987)に記載された方法に従って培養した。ならし培地を、抗-TFI-Igセファロース4Bカラムを用いたクロマトグラフィーに付した。次いでカラムを、10倍量のPBS-1%トリトンX-100とPBSで洗った。結合したTFIを0.1Mグリシン/HCl、pH2.2で溶出した。イムノ・アフィニティーにより単離したTFIを更に分離用ナトリウム・ドデシルスルフェート・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Savant apparatus)により精製した。最終取得物のアミノ酸を分析した所、米国同時係属出願Ser. No. 77, 366号明細書(出願日:1987年7月23日)に記載されたHePG2細胞から単離したTFIと同様のN末端アミノ酸配列を有していた。単離したChangリバーTFIを用いて、上記したと同じ免疫化プロトコールによりラビットを免疫化した。得られた抗血清は、2重免疫拡散法テストで約100 μ g/mlの力価を示した。この抗血清を用いて

20

30

【0027】

方法

cDNAクローンの単離

抗体を用いた胎盤及び胎児肝cDNAのスクリーニング法、プラーク精製法及び -ファージ溶解物とDNAの調製法はWunとKretzmer, FEBS LETT. 1, 11~16(1987)に記載されている。抗血清にあらかじめBNN97 g t 11溶解物を吸着させ、ライブラリーのスクリーニング用に1/500に希釈した。

【0028】

第Xa因子結合活性のスクリーニング

イソプロピル - チオガラクトシドによってイムノ・ポジティブ - ファージ溶解物あるいはコントロール g t 11から誘導される組換え蛋白について、その第Xa因子結合活性をスクリーニングした。 - ファージ溶解物(0.1ml)は、ドット-プロット装置(Bio Rad)を用いてニトロセルロースペーパーで濾過した。次いでニトロセルロースペーパーを、5mg/ml牛血清アルブミン及び2.5mg/ml牛ガンマグロブリンを含むリン酸緩衝化食塩水に浸し、室温で1時間激しく攪拌した。次いで、0.1mg/mlヘパリンを添加した同様の溶液に更に¹²⁵I-第Xa因子(1.0 \times 10⁶cmp/ml)を溶解した溶液で置換し、更に1時間激しく攪拌した。次いでニトロセルロースペーパーを、0.05% TweenTM20を含むリン酸緩衝化食塩水で洗った。洗浄緩衝液を5分毎に4回交換した。次いでニトロセルロースペーパーを空気中で乾燥し、Kod

40

50

a k X R 5 n フィルムを用いてオートラジオグラフィー用に調製した。フィルムを 1 週間さらした後に現像した。

【 0 0 2 9 】

ポリ(A)⁺RNAの調製及びノーザン・ブロットイング

L i z a r d i と E n g e l b e r g の ナ ト リ ウ ム ・ パ ー ク ロ レ ー ト 抽 出 法 [A n a l . B i o c h e m . 9 8 , 1 1 6 ~ 1 2 2 , (1 9 7 9)] に よ り 、 培 養 し た c h a n g r i バ ー 細 胞 、 H e p G 2 ヘ パ ト ー マ 細 胞 及 び S K - H E P - 1 ヘ パ ト ー マ 細 胞 か ら 全 R N A を 調 製 し た 。 製 造 業 者 の 指 針 に 従 い 、 オ リ ゴ (d T) - セ ル ロ ー ス (P - L B i o c h e m i c a 1 , タ イ プ 7 7 F) へ の バ ッ チ 吸 着 に よ り ポ リ (A) ⁺ R N A を 単 離 し た 。 ノ ー ザ ン ・ ブ ロ ッ ト 分 析 用 に 、 そ れ ぞ れ の ポ リ (A) ⁺ R N A 1 0 μ g を グ リ オ キ サ ー ル で 10 処 理 し [T h o m a s , M e t h o d s E n z y m o l . 1 0 0 , 2 5 5 ~ 2 6 6 (1 9 8 3)] 、 1 0 m M リ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 、 p H 7 . 0 を 含 む 緩 衝 液 で ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 気 泳 動 に 付 し た 。 B e t h e s d a R e s e a r c h L a b o r a t o r y の R N A ラ ダ ー (1 a d d e r) を 分 子 量 マ ー カ ー と し て 用 い た 。 R N A を ニ ト ロ セ ル ロ ー ス ペ ー パ ー 上 に プ ロ ッ ト し 、 次 い で 8 0 ° で 2 時 間 焼 い た 。 P 9 ク ロ ー ン の イ ン サ ー ト D N A を 、 ニ ッ ク ト ラ ン ス レ ー シ ョ ン に よ り ³² P で 放 射 標 識 化 し 、 プ ロ ー プ と し て 用 い た [M a n i a t i s ら 、 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M o d e l , C o l d S p r i n g L a b o r a t o r y H a r b o r , N . Y . , (1 9 8 2)] 。 5 0 % ホ ル ム ア ミ ド 、 5 X S S C , 5 0 m M リ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 、 p H 7 . 0 、 2 5 0 μ g / m l 変 性 サ ケ ス ペ ル マ D N A 及 び 1 X D e n h a r d 溶 液 を 含 む 溶 20 液 5 m l 中 の プ ロ ー プ (5 × 1 0 ⁶ c p m) で 4 2 ° で 1 6 時 間 ハ イ ブ リ ダ イ ズ さ せ た 。 フィルターを、 0 . 1 % ナ ト リ ウ ム ド デ シ ル ス ル フ ェ ー ト (S D S) 、 2 X S S S で 室 温 で 3 回 、 そ れ ぞ れ 5 分 間 洗 っ た 。 次 い で ニ ト ロ セ ル ロ ー ス ペ ー パ ー を 空 気 中 で 乾 燥 し 、 K o d a k X A R - 5 フィルム及び増感板を用いて - 7 0 ° で 3 日 間 オ ー ト ラ ジ オ グ ラ フ ィ ー に 付 し た 。

【 0 0 3 0 】

他の組換えDNA法

クローン化 g t 1 1 D N A の 調 製 、 p U C 1 9 プ ラ ス ミ ド 及 び M 1 3 m p 1 8 ベ ク タ ー で の サ ブ ク ロ ー ニ ン グ 、 エ キ ソ ヌ ク レ ア ー ゼ III を 用 い た 消 化 に よ る 欠 失 、 及 び ジ デ オ キ 法 に よ る D N A 配 列 決 定 [S a n g e r ら 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 3 , 6 7 7 6 ~ 6 7 8 0 (1 9 7 7)] は 、 W u n と K r e t z m e r , F E B S 30 L e t t . 1 , 1 1 - 1 6 (1 9 8 7) に 記 載 さ れ た 方 法 に 従 っ て 実 施 し た 。

L i p m a m と P e a r s o n に よ っ て 書 か れ た プ ロ グ ラ ム F A S T P [s c i e n c e , 2 2 7 , 1 4 3 5 ~ 1 4 4 1 (1 9 8 5)] を 用 い て 、 N a t i o n a l B i o c h e m i c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n の 配 列 デ ー タ バ ン ク (レ リ ー ス 1 3 , 1 9 8 7 年 6 月) か ら 相 同 性 を 示 す 蛋 白 の フ ァ ミ リ ー を 同 定 し 、 該 フ ァ ミ リ ー 内 で 配 列 の ア ラ イ ン メ ン ト を 行 な っ た 。

【 0 0 3 1 】

結果 cDNAライブラリーのスクリーニング

多数のセルラインについて、そのならし培地中に T F I が 存 在 す る か 否 か を ス ク リ ー ニ ン グ し た 。 い く つ か の 肝 由 来 セ ル ラ イ ン 、 即 ち C h a n g r i バ ー 、 H e p G 2 ヘ パ ト ー マ 及 び S K - H E P - 1 ヘ パ ト ー マ が 培 地 中 に T F I を 分 泌 す る こ と が 見 出 さ れ た 。 初 め に 、 T F I に 対 す る 抗 血 清 を 用 い て ヒ ト 胎 児 肝 g t 1 1 c D N A ラ イ ブ ラ リ ー (1 0 ⁶ プ ラ ー ク ・ フ ォ ー ミ ン グ ・ ユ ニ ッ ト) を ス ク リ ー ニ ン グ し 、 1 5 個 の 免 疫 学 的 に ポ ジ テ ィ ブ な ク ロ ー ン が 得 ら れ た 。 次 い で 同 様 の 方 法 に よ り 胎 盤 g t 1 1 c D N A ラ イ ブ ラ リ ー を ス ク リ ー ニ ン グ し た 。 1 0 ⁶ プ ラ ー ク ・ フ ォ ー ミ ン グ ・ ユ ニ ッ ト の う ち 1 0 個 の 免 疫 学 的 に ポ ジ テ ィ ブ な ク ロ ー ン が 得 ら れ た 。 こ れ ら の ク ロ ー ン を プ ラ ー ク 精 製 し 、 精 製 ク ロ ー ン の 溶 解 物 に つ い て T F I の 機 能 活 性 を テ ス ト し た 。 イ ソ プ ロ ピ ル チ オ ガ ラ ク ト シ ド で 誘 導 し た フ ェ ー ジ の 溶 解 物 を ニ ト ロ セ ル ロ ー ス ペ ー パ ー に 吸 着 せ し め 、 ¹²⁵ I - 第 X a 因 子 結 合 活 性 を ス ク リ ー ニ ン グ し た 。 上 記 の 免 疫 学 的 に ポ ジ テ ィ ブ な ク ロ ー ン の い く つ か は 、 ニ ト 40 50

ロセルローズペーパー上の¹²⁵I - 第 X a 因子と結合する能力を示したことが、図 1 により証明されている。免疫学的にポジティブな胎児肝クローン 15 個のうち 3 個、及び免疫学的にポジティブな胎盤クローン 10 個のうち 4 個のクローンが¹²⁵I - 第 X a 因子結合活性を示した。これらの免疫学的に且つ機能的にポジティブなクローンを E c o R I で消化し、インサート配列のサイズをゲル電気泳動により調べた。胎盤ライブラリー (P 9) から得た 1 つのクローンは約 1 . 4 k b のインサート配列を有しており、他のすべてのクローンは約 1 . 0 k b のインサート配列を有していた。部分的 D N A 配列決定により、1 . 0 k b クローンはより長い 1 . 4 k b 胎盤クローンの 1 部分の配列と同じ配列を有していることが判った。従って、完全な D N A 配列決定を行なうために P 9 を選択した。

【 0 0 3 2 】

T F I c D N A 単離物のヌクレオチド配列及びその予想蛋白配列

P 9 クローンについて、制限酵素地図の作成、M 1 3 サブクローニング及び図 2 に示した技法を用いた配列決定を実施した。エキソヌクレアーゼ III 欠失法 [H e n i k o f f , G e n e 2 8 , 3 5 1 ~ 3 5 9 (1 9 8 4)] により、2 本のストランドの両者について全配列を決定し、1 4 3 2 個の塩基からなることが見出された。その配列は図 3 および 4 に示した通りである。該配列には、1 3 3 塩基の 5' 非コード領域、9 1 2 ヌクレオチドのオープン・リーディング・フレーム及び 3 8 7 ヌクレオチドの 3' 非コード領域が含まれている。最初の A T G は T A G A T G A 配列中のヌクレオチド 1 3 4 にあり、その直ぐ後の A C A A T G A 配列中のヌクレオチド 1 4 6 に第 2 の A T G がある。真核細胞のリボゾームによってイニシエートされるためのコンセンサス配列として提案された配列、A C C A T G G [K o z a k , C e l l , 4 4 , 2 8 3 ~ 2 9 2 (1 9 8 2)] とは、上記の配列は異なるが、これらはイニシエーション配列と考えられる。成熟蛋白の N 末端に相当する配列の前に 2 8 個のアミノ酸配列がある。これら 2 8 個のアミノ酸からなる疎水性セグメントの組成及び長さは、シグナルペプチドに典型的なものである [V o n H e i j n e , E u r . J . B i o c h e m . 1 3 3 , 1 7 ~ 2 1 (1 9 8 3) ; J . M o l . B i o l , 1 8 4 , 9 9 ~ 1 0 5 (1 9 8 5)] 。シグナルペプチドは A l a ₂₈ - A s p ₂₉ で開裂し、成熟蛋白を与えると考えられる。成熟 T F I として予想されるアミノ酸配列は、1 8 個のシステイン残基及び 7 個のメチオニンを含む 2 7 6 個のアミノ酸からなる。成熟 T F I の推定蛋白配列に基いて計算される分子量 3 1 , 9 5 0 ダルトンは、単離して得た蛋白についてナトリウムドデシルスルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた分子量 3 7 - 4 0 k D a よりもいく分小さい。この分子量の相違は、天然蛋白でのグリコシル化の移動性を反映したものと考えられる。成熟蛋白に相当する推定蛋白配列は、A s n - X - T h r / S e r の構成を有する 3 ケの N - 結合グリコシル化部位 (アミノ酸の位置 1 4 5 , 1 9 5 及び 2 5 6) を有している。精製した全長 T F I 及び加水分解された 2 つの単離体のアミノ酸分析の結果は、c D N A 配列から推定される蛋白配列 (図 3 および 4 の下線を引いた部分) と正確にマッチする。このことは、単離した c D N A クローンは T F I をコードしていることを示している。3' 非コード領域は A + T を豊富に含んでいる (7 0 % A + T) 。このクローンには、コンセンサス・ポリアデニル化シグナル、A A T A A A [P r o u d f o o t と B r o w n l e e , N a t u r e , 2 5 2 , 3 5 9 ~ 3 6 2 (1 9 8 1)] も、ポリ A テイルも見出されなかった。これは、ライブラリー構築の間に 3' 末端部分の 1 部分が失われたためと考えられる。

【 0 0 3 3 】

電荷分布、疎水性 / 親水性及び内部相同性

T F I の翻訳されたアミノ酸配列には、2 7 リシン、1 7 アルギニン、1 1 アスパラギン酸及び 2 5 グルタミン酸が含まれている。蛋白にそった電荷分布は図 5 に示したようになり高低のあるものである。シグナルペプチド領域には、2 6 個の中性残基とともに 2 個のプラスに荷電したリシンが含まれていた。成熟蛋白のアミノ末端領域には、高度にマイナスに荷電した配列が含まれていた。最初の 7 個の残基のうち 6 個はアスパラギン酸あるいはグルタミン酸であり、この後に更に高度にマイナスに荷電した 2 個のアミノ酸のダウンストリームがあり、その後にプラスに荷電したリシン残基がある。中心部分は一般的に

10

20

30

40

50

マイナスに荷電している。カルボキシ末端には高度にプラスに荷電したセグメントがある。TFIのアミノ酸265～293には、6 - 共役アルギニン+リシン残基を含むプラスに荷電した14個のアミノ酸がある。

【0034】

TFI蛋白の予想疎水性/親水性プロファイルは図6に示した通りである。シグナルペプチドには、予想されたように高度に疎水性の領域が含まれている。残りの部分はむしろ親水性である。

TFIの翻訳されたアミノ酸配列には、いくつかの区別し得るドメインが含まれている。高度にマイナスに荷電したN末端ドメイン及び高度にプラスに荷電したC末端ドメインに加えて、Kunitz型抑制因子の典型的配列(下記参照)を有する3個の相同ドメインからなる中心部分がある。

10

【0035】

他の蛋白との相同性

National Biochemical Research Foundationの配列データベースを調べた所、TFIのN末端ドメインとC末端ドメインとは、他の公知蛋白と有意な相同性を有していないことが見出された。しかしながら、3個の内部相同ドメインは、牛臍臓塩基性プロテアーゼ抑制因子(アプロチニン)、毒塩基性プロテアーゼ抑制因子、インター-トリプシン抑制因子(図7)などの他の塩基性プロテアーゼ抑制因子の配列とそれぞれ相同性を示した。これらすべての抑制因子にはジスルフィド結合溝造が高度に保持されており、これは注目すべき事実である。これらの相同性から明らか

20

【0036】

ノーザン・プロットング

TFI産生肝由来セルライン、即ちChangリバー、HepG2ヘパトーマ及びSK-HEP-1ヘパトーマ細胞からポリ(A)⁺RNAを精製した。変性アガロースゲル電気泳動によりポリ(A)⁺RNAを溶解し、ニトロセルロースペーパー上にプロットし、³²P-標識化TFI cDNA (P9)をプローブとして用いて調べた。図8に示したように、2つの主要なハイブリダイゼーションバンドが観察された。これらはテストした3つの全てのセルラインに見られる1.4 kb mRNA及び4.4 kb mRNAに対応するものである。検出し得る量のTFIを産生しない他のセルラインについてテストしたが、プローブとのハイブリダイゼーションは観察されなかった(データを示していない)。

30

本明細書の記載から、当業者にとっては本発明の思想及び範囲内にある他の各種の例が自明であろう。これらの例の全ては本明細書のクレームの範囲内のものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】¹²⁵I - 第Xa因子を用いたgt11クローンのスクリーニングを示した写真である。

【図2】部分的制限酵素地図及びP9のインサート配列の配列決定に用いた技法を示している。

【図3】ヒトTFI cDNAのヌクレオチド配列及び翻訳されたアミノ酸配列を示している。

40

【図4】ヒトTFI cDNAのヌクレオチド配列および翻訳されたアミノ酸配列。

【図5】TFIのアミノ酸配列における電荷分布を示すグラフである。

【図6】TFIの疎水性プロファイルを示すグラフである。

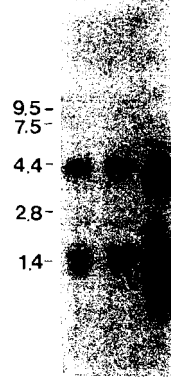
【図7】TFIの塩基性プロテアーゼ抑制因子ドメインと他の塩基性プロテアーゼ抑制因子とのアラインメントを示す。

【図8】3個の肝由来セルラインから得たRNAのノーザン・プロット分析を示す写真である。

【 7 】

1 PSLFNROPP1 PAARDPCL ERYTORCKA RIIRYFNWK AGLCDIYVQ 69 GFRANRNF SAEDQRTCG GATCPNKCTG GRAEERKQ
 2 FQTRDLCI LPAADPCKA AIIRYFNST SNAICBFTYV GCGNANRNF TIEKALRICE PRQDTKYS
 3 TERPDECI ERYTORCKA AIIRYFNWK AGCEFTYV GGRANRNF SAEDQRTCG CA
 4 QGRSFCN LPAETOPCKA SFRQYFNK SGGCQDFIYV GGRGNRNF TTRCQGVV
 5 QQKRDICR LPPEQPCKA RIRPYFNPA SRMCSEFIYV GCGNANRNF TAAECVNR PFERPVCPK TSPQICLLHG
 6 QDHPKCY LPADPCKA HIPRYFNDA SRNCKFIYV GCGNANRNF TMEGRITCG ASA
 7 RPDECE LPAETGLCKA YIRSFYHKA AQCLQFIYV GCGNANRNF TIDECHRTCV G
 8 RPDECE LPAETGLCKA RIRSFYHKA AQCLQFIYV GCGNANRNF TIDECHRTCV G
 9 RPDECE LPAESQCKA YIRSFYHKA SRNCKFIYV GCGNANRNF TMEGRITCG U
 10 QPRKLCI LPAADPCKA YIRSFYHKA SRNCKFIYV GCGNANRNF TMEGRITCG U
 11 QPRKLCI LHRNPRCVD KIPAFYFNK KQCEBFDMS GCGNANRNF TMEGRITCG U GGLQPR
 12 RPYACE LVAAGPCKA FISAFYYSK ANKCYFTYV GGRNANRNF TIEGRITCV V
 13 LQRTECK LPAEPCKA SIPAFYFNKA ANKCLFHYV GCGNANRNF TIEGRHACY V
 14 QPLRKLIC LHRNPRCVD KIPAFYFNK KQCEBFDMS GCGNANRNF TIEGRITCV RK
 15 AAKYCK LRLRIGPKR KIPAFYFNK ANKCLFHYV GCGNANRNF TIEGRITCV G
 16 RGRHDCD KPPDQCK G PYRAFYYTR LKTKAFNR GCGNANRNF TIEGRITCV YP
 17 RGRHDCD KPPDQCK Q TYRAFYYTPS AKRCYBFIYV GCGNANRNF TIEGRITCV YP
 18 RGRHDCD KPPDQCK Q TYRAFYYTPS AKRCYBFIYV GCGNANRNF TIEGRITCV YP
 19(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 20(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 21(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 22(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 23(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 24(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 25(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 26(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 27(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 28(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 29(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 30(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 31(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 32(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 33(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 34(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 35(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 36(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 37(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 38(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 39(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 40(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 41(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 42(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 43(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 44(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 45(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 46(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 47(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 48(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 49(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 50(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 51(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 52(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 53(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 54(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 55(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 56(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 57(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 58(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 59(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 60(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 61(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 62(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 63(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 64(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 65(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 66(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 67(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 68(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 69(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 70(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 71(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 72(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 73(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 74(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 75(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 76(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 77(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 78(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 79(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 80(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 81(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 82(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 83(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 84(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 85(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 86(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 87(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 88(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 89(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 90(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 91(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 92(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 93(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 94(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 95(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 96(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 97(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 98(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 99(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R
 100(1) KEDSCQ LDHAQPCCK MISRYFNCT SMACETFYV GCGNANRNF SKECEYCG IPGDGDEELL R

【 8 】



フロントページの続き

(74)代理人 100072040

弁理士 浅村 肇

(74)代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(72)発明者 ジョージ ジョン プロズ, ジュニア

アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, ウェストポイント レーン 15

(72)発明者 クニコ クサノ クレッツマー

アメリカ合衆国ミズリー州 エウレカ, パーシモン レーン 33

(72)発明者 ツェ - チェイン ウン

アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, ハントリィ ハイツ 613

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 阪野 誠司

審判官 光本 美奈子

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84 (1987), p. 1886 -
1890

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/38, 1/22