

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業

新規機能を付与した人工プロトロンビン製剤の開発に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 森田 隆司

平成13(2001)年4月

目次

I. 総括研究報告書	1
新規機能を付与した人工プロトロンビン製剤の開発に関する研究 森田隆司	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	6

新規機能を付与した人工プロトロンビン製剤の開発に関する研究

主任研究者 森田 隆司 明治薬科大学 生体分子学教室 教授

研究要旨 トロンビンは、フィブリノーゲン切断など血液凝固の中心的役割をになう分子であるが、同時に抗凝固作用に働くプロテインCやt-PAの活性化にも作用する。そこで、本研究ではフィブリノーゲンの切断活性をほとんど持たない、メイゾトロンビン（プロトロンビンの活性化中間体）を安定化するため、プロトロンビン遺伝子に変異を導入した。また、血液製剤としての利用を目的としてプロトロンビンの培養細胞での発現系を構築した。さらに発現した組換えプロトロンビンの活性化を行い、酵素としての機能が保持されていることを確認した。

A. 研究目的

本研究はプロトロンビンの活性化中間体であるメイゾトロンビンの持つ抗血液凝固の促進作用に注目し、プロトロンビン遺伝子に変異を導入し安定なメイゾトロンビンを大量発現させ、ウィルス汚染などの危険の少ない

抗血栓製剤を開発することを目的としている。また、遺伝子変異導入によりプロトロンビンの寿命を制御することにより、持続的効果を期待できる血液製剤の開発を目的とするものである。図1にはプロトロンビンの活性化反応のプロセスを図示した。

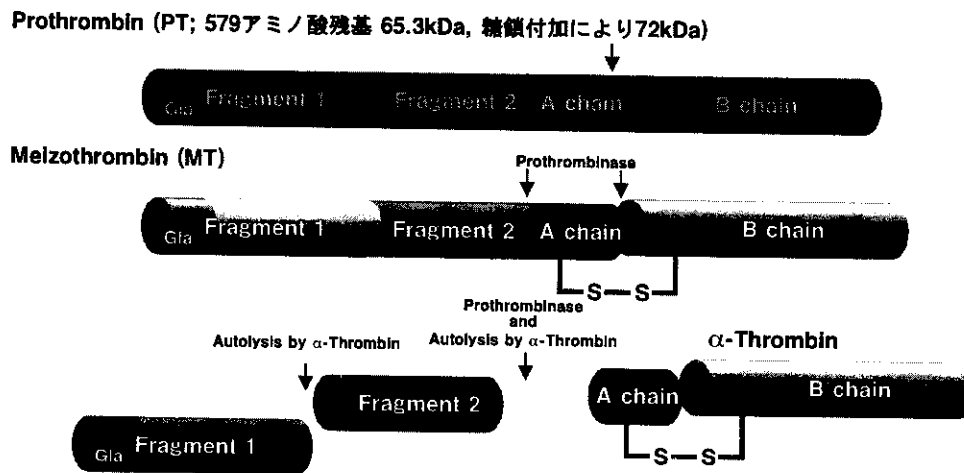


図1 プロトロンビンの活性化過程

B. 研究方法

1. ヒトプロトロンビン遺伝子への変異導入

ヒト肝臓の cDNA ライブラリーをテンプレートとして、ヒト血液凝固第 II 因子 (Genbank Accession No. NM_000506) の全長 cDNA クローニングを行った。実際のクローニングは翻訳領域である開始メチオニンから停止コドンまでの 1.9 kb 領域を、PCR 法によりプロトロンビン cDNA を増幅し、増幅産物をクローニングベクター (pUC19) に組み込んだ。作製した pUC19/prothrombin (pUC/PT) コンストラクトの挿入塩基配列部分を DNA シークエンサーで決定し、ヒトプロトロンビン遺伝子であることを確認した。

次に、pUC/PT をテンプレートとして停止コドン部分に変異を導入したプライマーを用いて PCR を行い、発現プロトロンビンの C 末端に検出・精製用タグとして *myc*-tag ならびに His-tag を導入した (図 2A; pUC/PT-tag)。さ

らに、pUC/PT-tag をテンプレートとし、部位特異的変異導入法を利用して、プロトロンビンの Gla ドメインと Kringle 1 を含むフラグメント 1 と Kringle 2 を持つフラグメント 2 の切断部位である 155 番目のアルギニン残基を、グリシンもしくはアラニン残基にそれぞれ変異導入をおこなった (図 2D)。同時にフラグメント 2 とトロンビン A 鎖の切断点である 271 (同時に 284) 番目のアルギニン残基をグリシンもしくはアラニン残基にそれぞれ変異導入をおこなった (図 2C)。両変異体の塩基配列を確認し、変異が導入されているクローンとして 155 番目のアルギニンがアラニン、271 と (284 番目) のアルギニンがアラニンに置換されているクローンを得た (PT-RA155, PT-RA271)。さらに PT-RA271 の 155 番目のアルギニン残基をアラニンに置換し、155、271、284 番目のアルギニン残基がすべて置換されている PT-Double を得た (図 2B)。図 2B-D に

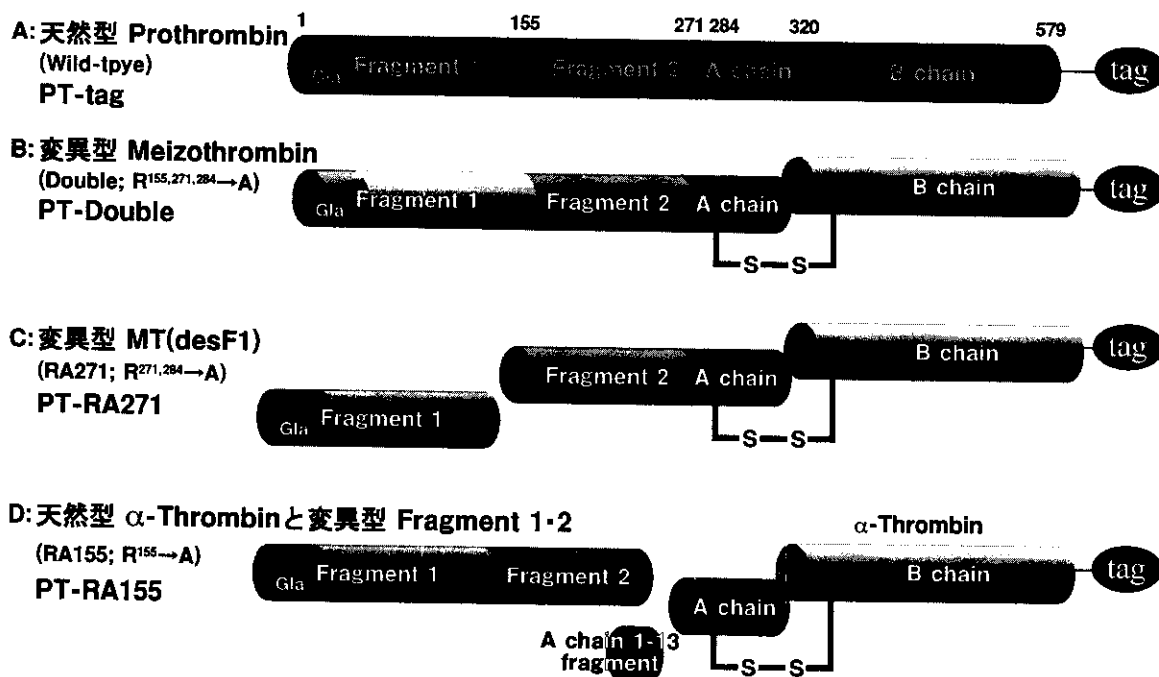


図 2 活性化時の変異プロトロンビンの構造

は Double, RA271, RA155 変異型の活性化された構造を示した。

2. 変異導入プロトロンビンの発現

1. で作製したプロトロンビンコンストラクトを哺乳動物細胞株にて発現させるために、哺乳動物細胞で発現可能な CMV プロモーターの下流にプロトロンビン遺伝子を組みこんでコンストラクトを作製した。ベクターには SV40 トランスフォーム細胞で高複製される SV40 *ori* をもつ発現用プラスミドを使用した。

以上の操作を 4 クローン (PT-tag, PT-RA155, PT-RA271, PT-Double) すべてに対しておこない、作製した発現コンストラクト (pEXP/PT-tag, PT-RA155, PT-RA271, PT-Double) をアフリカミドリザル腎臓由来で SV40 でトランスフォームされたの線維芽細胞株である COS-7 細胞に一過性に導入し、組換えタンパク質の発現をおこなった。発現した組換えプロトロンビンは、プロトロンビン本来の持つシグナル配列を利用して培地中に分泌されるため、遺伝子導入後の COS-7 細胞を無血清培地で 48 時間ごとに培地を交換して発現したプロトロンビンを回収した。同様に他の変異プロトロンビンコンストラクトについても COS-7 細胞に発現させ、電気泳動、免疫染色をおこなって確認した。発現した組換えプロトロンビンの N 末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーを用いて決定した。

また、発現タンパク質を含む培地をヘビ毒由来のプロトロンビンアクチベーターであるエカリン (ecarin) を用いて 37°C、15 分間活性化し、Boc-Val-Pro-Arg-pNA を用いた切断

活性を測定した。

エカリンはサメハダクサリヘビ毒よりゲルろ過、陽イオン交換及びブルーセファロースクロマトグラフィーにより精製した。

3. 発現プロトロンビンの精製

血漿中の天然型プロトロンビンの性質と最も近いと思われる PT-tag 発現無血清培地を出発材料とした。精製には ÄKTA システムを利用し、組換えプロトロンビンの C 末端に導入した His-tag を利用して、金属アフィニティーカラムクロマトグラフィーをおこなった。溶出にはイミダゾールの濃度勾配を用いた。

C. 研究結果と考察

1. ヒトプロトロンビン遺伝子への変異導入

本研究でクローニングしたプロトロンビン遺伝子はデータベースに報告されている配列と 2 塩基の置換が見られた。しかし、アミノ酸配列上はまったく変化がなく、SNP (single nucleotide polymorphism) であると思われる。変異体作製はアルギニン残基のグリシンとアラニンへの置換を試みたが、グリシン置換体を得ることは出来ず、アラニン置換体のみを得た。いずれの変異によっても、各ドメイン間が切断されなくなるため、アラニン置換体とグリシン置換体の間には本質的な差はないと思われる。

2. 変異導入プロトロンビンの発現

動物細胞で発現し、回収したプロトロンビンを電気泳動し、抗 *myc*-tag 抗体を利用した

免疫染色法により、プロトロンビンの発現を確認したところ、COS-7 細胞では培地を 48 時間おきに 3 回交換した時点でもまだプロトロンビンの発現がみられた (図 3)。組換えプロトロンビン遺伝子の一過性発現においても、6 日間連続して発現が見られたので、導入した遺伝子はかなり安定して細胞内で働いているものと思われる。また、一過性発現を用いた理由としては、発現プラスミドに存在する SV40ori の高複製による発現量の増加を目的としたものである。

プロトロンビン組換え体を発現した際に、PT-tag と PT-RA271 は同じ泳動度を示した。一方、PT-RA155 組換え体と PT-Double 組換え体は若干泳動度の低下を示した (図 4)。PT-tag

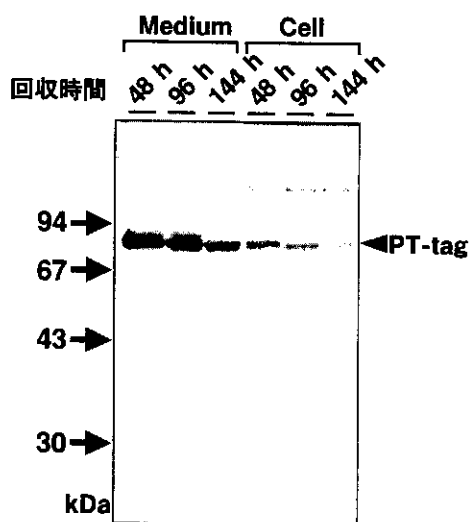


図 3 組換えプロトロンビンの発現

(もしくは PT-RA271) と PT-RA155 (PT-Double) の分子量の違いは約 4 kDa 程度あった。この原因として、成熟過程での切断部位が異なるかどうかを検討するため発現産物の N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、血漿中に分泌されたプロトロンビンの N 末端アミノ酸配列は Ala-Asn-… でありプロトロンビンの

それとまったく同一配列であり、4 変異体のシグナル配列領域の切断部位に変化はないことが判明した。従って、フラグメント 1 と 2 の間に変異を導入することにより変化した分子量は、糖鎖修飾などの成熟過程で生じたものと思われ、現在その原因を解析している。

発現後、回収したすべての組換え体についてエカリンによる活性化能と Boc-VPR-pNA 切断活性を有しており、変異体のプロテアーゼ活性は保たれていることを確認した (図 5)。

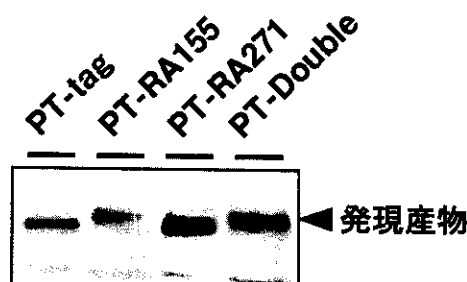


図 4 変異体間の電気泳動度の差異

D. 結論

平成 12 年度の目標である、プロトロンビン遺伝子のクローニング、変異体作製及び動物細胞を利用した発現に成功し、変異プロトロンビンの作製と発現は達成できた。また、変異体間において見られた分子量変化については、これまでに見出されていない知見であり、プロトロンビンの成熟過程の解明に非常に役立つものと考えている。

平成 13 年度は研究計画である組換え体の大量発現とその精製を試みる予定であり、現在大量発現系を構築している。また、平成 12 年度で観察された修飾の差については平成 13

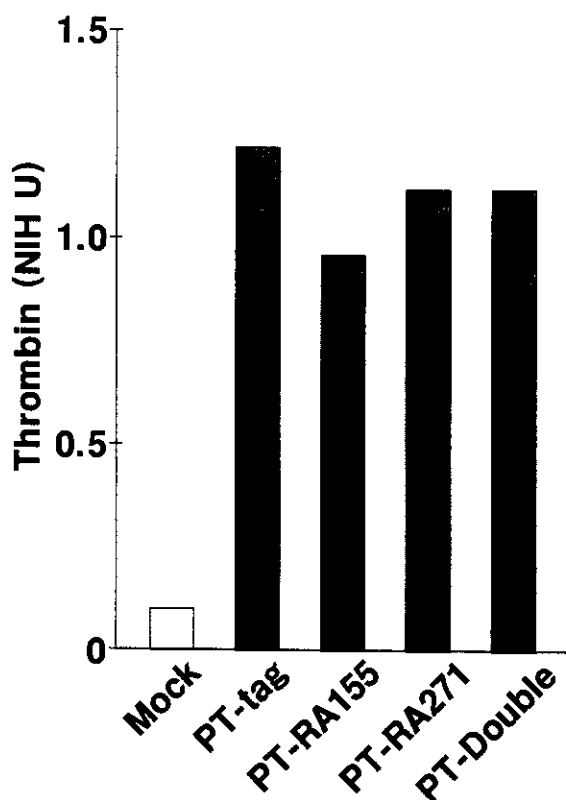


図 5 人工基質切断活性を指標としたプロトロンビン発現体の生物活性

年度に、平行して詳細な検討を行なう予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Mizuno, H., Fujimoto, Z., Atoda, H. and Morita, T., Crystal structure of anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, in press (2001)

2) Iwahashi, H., Kimura, M., Nakajima, N., Yamada, D. and Morita, T., The determination of plasma prothrombin level by Ca^{2+} -dependent prothrombin activator

(CA-1) during warfarin anticoagulation.

J. Heart Valve Dis. in press (2001)

3) Shikamoto, Y. and Morita, T., Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system.

FEBS Lett. 463, 387-389 (1999)

4) Yamazaki, Y., Shikamoto, Y., Fukudome, K., Kimoto, M. and Morita, T., Fibroblasts, glial, and neuronal cells are involved in extravascular prothrombin activation.

J. Biochem. 126, 655-661 (1999)

5) 工藤龍彦、田中朝志、山田大介、森田隆司：心臓手術後の抗凝固療法開始早期における正常プロトロンビン量(CA-1法)の変化

日本血栓止血学会誌、10、260-266(1999)

6) Yamada, D. and Morita, T., CA-1 method, a novel assay for quantification of normal prothrombin using a Ca^{2+} -dependent prothrombin activator, carinactivase-1.

Thrombosis Res. 94, 221-226 (1999)

2. 学会発表

1) 小池 恒、杉山 裕亮、森田 隆司

「線溶作用を亢進する変異トロンビンの発現」

日本薬学会 第121年会、2001年3月28日

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizuno, H., Fujimoto, Z., Atoda, H. and Morita, T.	Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X	Proc. Nat. Acid. Sci.	in press		2001
Iwahashi, H., Kimura, M., Nakajima, N., Yamada, D. and Morita, T.	The determination of plasma prothrombin level by Ca ²⁺ -dependent prothrombin activator (CA -1) during warfarin anticoagulation	J. Heart Valve Dis	in press		2001
岩橋英彦、 木村道生、 財津龍二、 本村慎、 森田隆司	高齢者に対するワーファリンによる抗凝固療法の検討	日本血栓 止血学会誌	印刷中		2001
Shikamoto, Y. and Morita, T.	Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system	FEBS Lett.	463	387-389	1999
Yamazaki, Y., Shikamoto, Y., Fukudome, K., Kimoto, M. and Morita, T.	Fibroblasts, glial, and neuronal cells are involved in extravascular prothrombin activation	J. Biochem.	126	655-661	1999
工藤龍彦、 田中朝志、 山田大介、 森田隆司	心臓手術後の抗凝固療法開始早期における正常プロトロンビン量(CA-1法)の変化	日本血栓 止血学会誌	10	260-266	1999
Yamada, D. and Morita, T.	CA-1 method, a novel assay for quantification of normal prothrombin using a Ca ²⁺ - dependent prothrombin activator, carinactivase-1	Thrombosis Res.	94	221-226	1999