

厚生科学研究費補助金

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13年度 総括研究報告書

主任研究者 森田 隆司

平成14(2002)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	7

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 プロトロンビンの活性中間体であるメイゾトロンビンは、酵素活性はあるもののフィブリノーゲン凝固活性は α -トロンビンと比べて、1/10しかない。しかし、メイゾトロンビンのプロテインCアクチベータ活性はトロンビンよりも10倍高い。そこで、本年度の研究ではメイゾトロンビン様の安定な中間体を創製するために、プロトロンビン遺伝子に変異を導入した。さらに、当初の計画以外のフィブリノーゲンとの相互作用に必須な部位にも変異を導入することにより、フィブリノーゲン凝固活性が全くないメイゾトロンビンの創製に成功した。

A. 研究目的

本研究はプロトロンビン遺伝子に変異を導入し、活性化中間体メイゾトロンビンを安定かつ大量に発現させ、抗血栓製剤を創薬開発することを目的とする。また、今年度はフィブリノーゲンの相互作用部位に変異を導入し、メイゾトロンビンにわずかに存在するフィブリノーゲン凝固活性を消失させ、より安全なゲノム創薬のための基礎研究を行なう。図1には研究に使用したプロトロンビン遺伝子の変異導入部位と活性化後の構造

模式図を示した。

B. 研究方法

1. ヒトプロトロンビン遺伝子の変異導入とその発現

今年度は、プロトロンビン分子のトロンビン領域の2カ所即ち、 α -トロンビンのNa⁺結合部位である Asp⁵⁵⁴ 残基と Tyr⁵⁵⁷ 残基を、部位特異的変異導入法により、それぞれ Ala 残基と Leu 残基へ、また Tyr⁵⁵⁷ を Pro 残基へ置換した。これらのそれぞれの変異体は PT-DA554、PT-DL554、PT-YP557 と命名した (図2)。また9アミノ酸残基からなる Glu⁴⁶⁶ から Lys⁴⁷⁴ は自己消化領域として知られているが、その欠失変異体では Na⁺ 結合性の低下が報告されている。この知見を参考にし、今回、Glu⁴⁶⁶-Lys⁴⁷⁴ (PT- Δ 474) と Glu⁴⁶⁶-Thr⁴⁶⁹ (PT- Δ 469) の欠失変異体も作製した。(図2)。

今年度は、これらの新規の

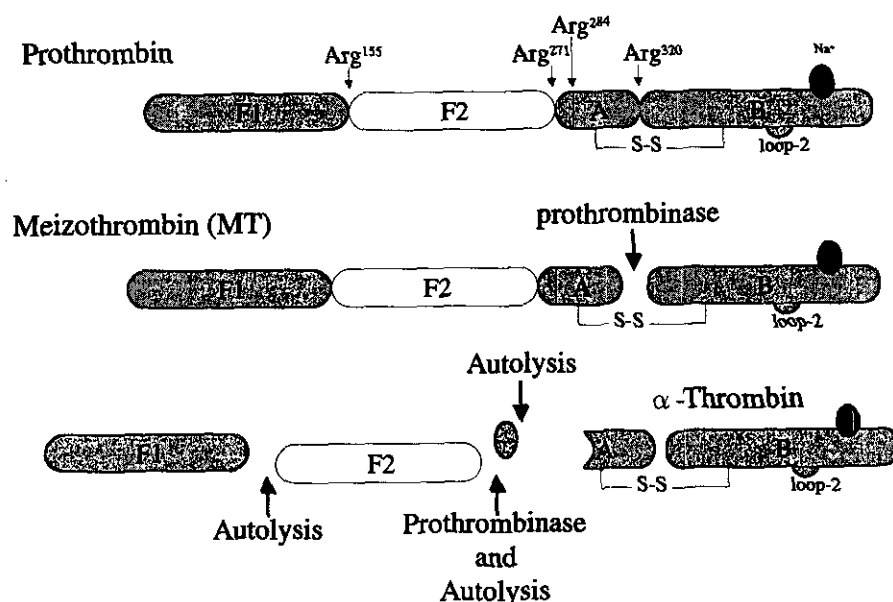


図1 プロトロンビンの活性化過程

変異プロトロンビン4種を加えて、合計9種のプロトロンビン遺伝子をCMVプロモータ下流に組み込んだ発現コンストラクトを作製し、COS-7細胞にトランスフェクションした。なお、C末端

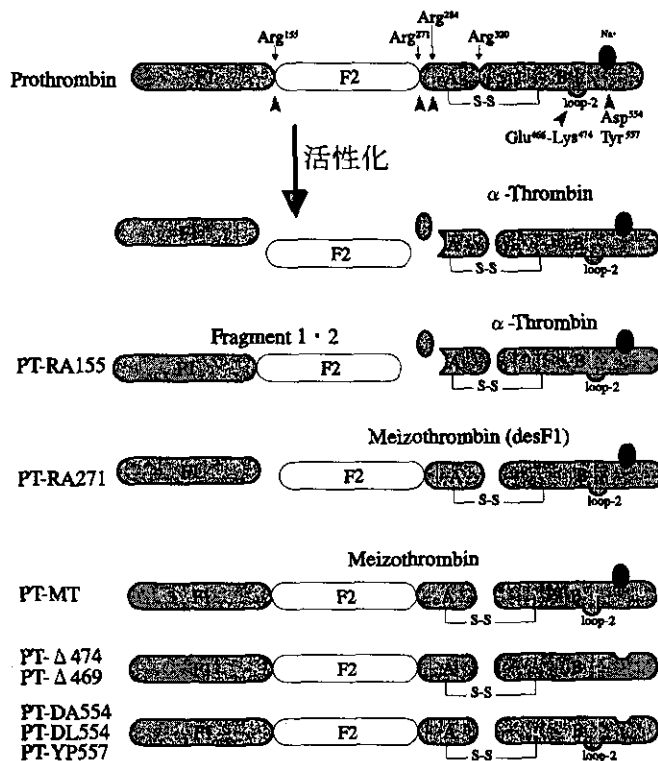


図2 組換えプロトロンビンの活性化産物

には検出・精製のために myc-tag, His-tag を導入してある。発現した組換えプロトロンビンは培地中に分泌されるため、精製を容易にするためにトランスフェクション後24時間の時点で無血清の培地に交換して、さらに48時間ごとに培地を回収・交換して発現タンパク質を回収した。培地の一部分をSDS-PAGE、イムノブロットにより発現を確認した後、His-tagを利用してNi-NTAカラムによる精製を行なった。

2. 発現プロトロンビンの生理機能解析

精製組換え体(終濃度20 nM)をサメハダクサリヘビ(*Echis carinatus*)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)を用いて活性化(37℃、15分)し、トロンビン合成基質(Boc-Val-Pro-Arg-pNA)の水解を指標として組換え体のトロンビン合成基質水解活性につい

て測定した。また、活性化した組換え体については、SDS-PAGE、イムノブロットによりその活性化の有無を評価した。

次にトロンビンの生理的基質であるフィブリノーゲンの凝固活性について、フィブリノーゲン濃度を生理的条件下と同一にして、生成したトロンビン誘導体のフィブリノーゲン凝固活性を測定した。また、プロテインCの活性化能については、組換え体(終濃度2 nM)をエカリンにより37℃、60分活性化した後、プロテインC(終濃度80 nM)を37℃、30分活性化させ、プロテインCの特異的合成基質であるBoc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCAを用いて測定した。プロテインC活性化反応溶液には組換えトロンボモジュリントリポソーム(リン脂質小胞)をそれぞれ終濃度40 nM、100 μMとなるように加えた。

C. 研究結果

1. ヒトプロトロンビン遺伝子への変異導入と発現

変異導入した組換えプロトロンビンをCOS-7細胞にて発現し、Ni-NTAカラムで精製した結果を図3に示した。ここでは野生型PT-tagの結果を示してあるが、他の変異体についても同様の結果であった。

2. 発現プロトロンビンの生理機能解析

① プロトロンビンの活性化様式

精製した組換えプロトロンビンをヘビ毒由来プロトロンビンアクチベーター(エカリン)で活性化した後、SDS-PAGE、イムノブロットした結果を図4に示した。還元条件下では全ての組換え体はエカリン処理により活性化され、B鎖が検出された。前駆体のプロトロンビンである全長はほとんど検出されなかった。一方、未還元条件下ではPT-tag、PT-RA155ではα-トロンビン、PT-RA271ではフラグメント1が除去されたメイゾトロンビン(des F1)が検出された。そしてPT-MTと

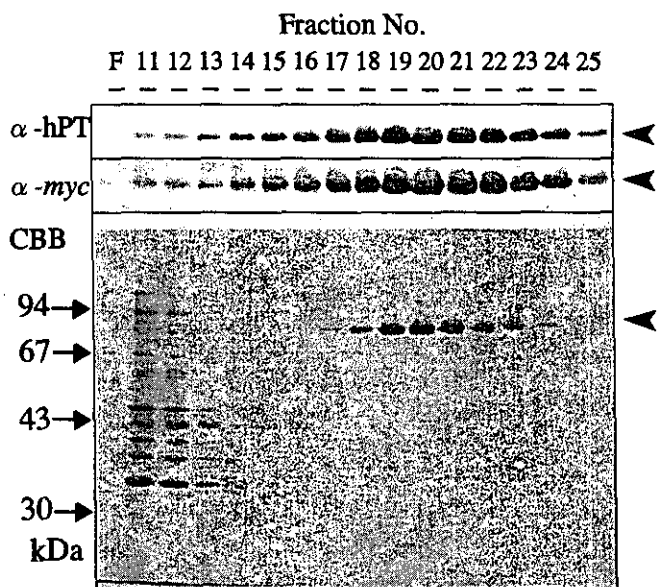


図3 組換えプロトロンビンの精製

その派生変異体では何れもプロトロンビンと大きさが変わらないメイゾトロンビンが検出された。このことから組換えプロトロンビンに対するエカリンの基質特異性は変化せず、予想された活性化型に活性化されることが明らかとなった。

② 活性化型組換え体の生理機能

精製組換え体をエカリンで活性化した後、Boc-VPR-pNAを用いた合成基質水解活性を測定した(図5)。水解活性は α -トロンビンに活性化されるPT-tag、PT-RA155ならびにメイゾトロンビン

ン(des F1)に活性化されるPT-RA271については、標準のヒトプロトロンビンと同程度であった。一方、メイゾトロンビンに活性化されるPT-MTはヒトプロトロンビンに対して約40%であり、PT-DA554、PT-DL554、PT- Δ 469はいずれも約20%程度であった。PT-YP557とPT- Δ 474にはBoc-VPR-pNA水解活性が全く見られなかったことより、プロテアーゼとしての機能を失ったものと考えられる。したがって、フィブリノーゲン凝固活性とプロテインC活性化能の検討を行なう実験には、 α -トロンビンとなるPT-tag、メイゾトロンビン(des F1)となるPT-RA271、そしてメイゾトロンビンとなるPT-MT、PT-DA554、PT-DL554、PT- Δ 469の6種を用いた。

表1にフィブリノーゲン凝固活性とプロテインC活性化能についての結果を示した。PT-tagはヒトプロトロンビンと同様のフィブリノーゲン凝固活性とプロテインC活性化能を有していた。メイゾトロンビン(des F1)となるPT-RA271はプロテインC活性化能が野生型より1.3倍高くなり、フィブリノーゲン凝固活性が1/6程度に減少し、相対的なプロテインC活性化能は野生型の約8倍に上昇した。メイゾトロンビンとなるPT-MTではプロテインC活性化能が14倍と

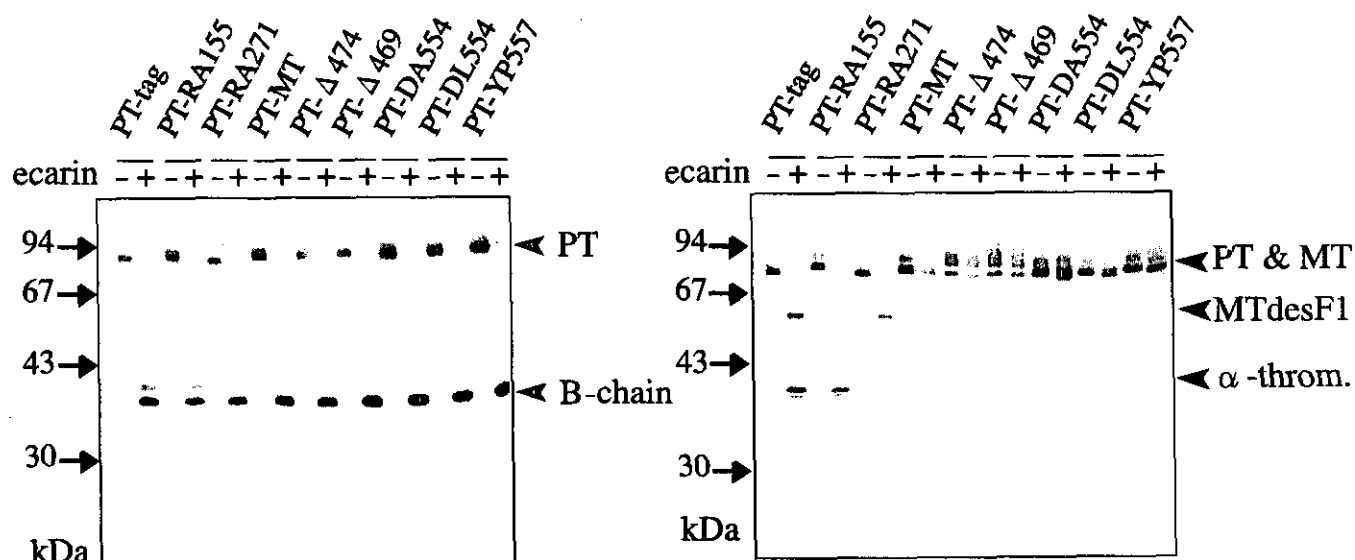


図4 組換えプロトロンビンの活性化様式

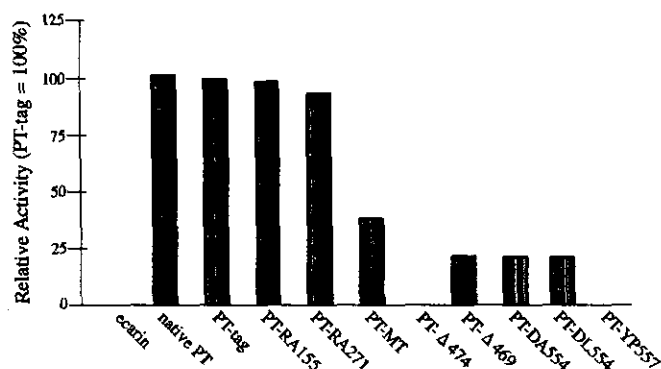


図5 活性化組換え体の合成基質水解活性

著しく上昇し、フィブリノーゲン凝固活性が 1/10 に減少したため、相対プロテイン C 活性化能は 124 倍と非常に高くなった。さらに、Asp⁵⁵⁴ に変異を導入した PT-DA554 と PT-DL554 では、フィブリノーゲン凝固活性がさらに低下したことにより、相対プロテイン C 活性化比は、それぞれ 140 倍、260 倍に上昇した。最後に自己消化部位であり、また Na⁺ 結合にも関与する Glu⁴⁶⁶-Thr⁴⁶⁹ の領域を欠失した PT-Δ469 では、プロテイン C 活性化能は 16 倍程度の上昇であるが、フィブリノーゲン凝固活性が 1% 以下と非常に低いため、相対プロテイン C 活性化比は 1600 倍へと著しい上昇を示した。

また、プロテイン C 活性化をトロンボモジュリンもしくはリン脂質小胞の非存在下で行なった。その結果、トロンボモジュリン非存在下に比べ、トロンボモジュリン存在下の組換え体による

プロテイン C 活性化能は 20-30 倍程度の上昇であった。

D. 考察

昨年度は、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーより単離したヒトプロトロンビン遺伝子に、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を応用した部位特異的変異導入法 (Site-directed Mutagenesis) を利用して、プロトロンビン遺伝子の Arg¹⁵⁵ 残基 (フラグメント 1・2 切断部位)、Arg²⁷¹ 残基 (フラグメント 2・A 鎖切断部位)、Arg²⁸⁴ 残基 (A 鎖内切断部位) をそれぞれ Ala 残基に置換した変異体を作製したことを報告した。

組換えプロトロンビンの精製は C 末端に導入した His-tag を利用することにより、一回の精製操作でほぼ単一にまで精製され、血漿プロトロンビン精製に比べ非常に簡便であった。また、精製過程でプロトロンビン組換え体の活性化や分解が起こりにくく、取り扱いが容易となった。これは、メイソトロンビンとその派生変異体は活性化後もフラグメント 1 を保持するため、フラグメント 1 に存在する Gla ドメインがリン脂質小胞と相互作用し、リン脂質小胞上により積極的にメイソトロンビンを局在化させているものと推察される。

また、PT-DA554 と PT-DL554 についても、

表1 組換え体のフィブリノーゲン凝固活性とプロテイン C 活性化能

Name	Chromogenic Activity (PT-tag=100%)	Clotting activity (PT-tag=100%)	PC activator activity (PT-tag = 100%)	RAP*
native	102	97.9	118	1.2
PT-tag	100	100	100	1.0
PT-RA271	94.0	15.5	127	8.2
PT-MT	38.4	11.4	1410	124
PT-Δ469	21.8	<1.0	1610	>1610
PT-DA554	21.5	8.2	1150	140
PT-DL554	21.3	6.2	1630	263

* 相対プロテイン C 活性化能 (RAP) : PC activator activity/Clotting activity

他のフィブリノーゲン相互作用部位に変異を導入することで、同様の活性を有する変異体を作製出来るものと考えている。さらに、トロンボモジュリンとの相互作用部位についてはより相互作用を強める変異を導入することにより、さらにプロテインC活性化能を上昇させ得ることが期待できる。

最終年度には、組換えプロトロンビン遺伝子をアデノウイルスベクター発現の実験系と組み合わせることにより、簡便な動物個体内での発現系を構築する。現在、組換えプロトロンビン遺伝子をシャトルベクターに組換えなおし、非自己増殖性アデノウイルスゲノムへの組換えを行なっている。作製した組換えプロトロンビン発現アデノウイルスは、マウス等への投与により、最終年度（平成14年度）の計画にある、*in vivo*における組換え体の評価に使用することができると考えている。

E. 結論

以上の結果から、今回新規に作成したPT-Δ469は当初の研究目的であるフィブリノーゲン凝固活性を持たず、且つプロテインC活性化能を有するプロトロンビン変異体の創製目的に完全に合致するものであることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Naraki T, Kohno N, Saito H, Fujimoto Y, Ohhira M, Morita T and Kohgo Y, Gamma-carboxy glutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma- carboxy prothrombin.
Biochem. Biophys. Acta, **in press**

2) 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. Natl. Acad. Sci. USA (2001) **98**, 7230-7234

3) Hirotsu S, Mizuno H, Fukuda K, Ma C Q, Matsui T, Hamako J, Morita T and Titani K, Crystal structure of bitiscetin, a von Willebrand factor-dependent platelet aggregation inducer.

Biochemistry (2001) **40**, 13592-13597

4) Iwahashi H, Kimura M, Nakajima N, Yamada D and Morita T, The determination of plasma prothrombin level by Ca²⁺-dependent prothrombin activator (CA-1) during warfarin anticoagulation.

J. Heart Valve Dis. (2001) **10**, 388-392

5) 岩橋英彦、木村道生、財津龍二、木村禎、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 (2001) **12**, 144-148

6) Inoue-Suzuki K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, Yatomi Y, Ohmori T, Tanaka T, Satoh K and Morita T, Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin $\alpha_2\beta_1$).

J. Biol. Chem. (2001) **276**, 1643-1652

7) Shin Y, Okuyama I, Hasegawa J and Morita T, Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin-A, which inhibits platelet aggregation.

Thrombosis Res. (2000) **99**, 239-247

8) Fukuda K, Mizuno H, Atoda H and Morita T, Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers.

Biochemistry (2000) **39**, 1915-1923

9) 森田隆司、新しい血液凝固の仕組み.
循環制御 (日本循環制御医学会誌) (2000) 21,
482-484

2. 学会発表

1) **Construction, Expression and Characterization of Recombinant Prothrombins:**
Koike H, Sugiyama Y and Morita T, XVIIIth Congress
of the International Society on Thrombosis and Haemo-
stasis, 2001/7, Paris, France

2) **Crystal Structure of Ca²⁺- and Mg²⁺-bound Gla Domain of Factor IX Complexed with its Binding Protein:** Shikamoto Y, Morita T, Fujimoto Z and Mizuno H, XVIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2001/7, Paris, France

3) 線溶作用を亢進する変異トロンビンの発現:
小池 恒、杉山裕亮、森田隆司、日本薬学会第 121
年会、2001/3、札幌

4) プロトロンビン変異体による新規生理機能の
探索:小池 恒、奥田大樹、杉山裕亮、森田隆司、
第 74 回日本生化学会大会、2001/10、京都

5) 血液凝固反応と血小板凝集の分子メカニズム:
血液凝固 IX 因子タンパク質と IX 因子 Gla ドメ
イン複合体の結晶構造解析: 鹿本泰生、藤本瑞、
水野洋、森田隆司、第 74 回日本生化学会大会、
2001/10、京都

6) ワルファリン減量におけるプロトロンビン濃
度の検討: 岩橋英彦、木村道生、財津龍二、本村
禎、森田隆司、第 24 回日本血栓止血学会学術集
会、2001/11、京都

7) 抗凝固療法モニタリングのための新規プロト
ロンビン定量法の開発研究: 森田隆司、第 27 回
日本応用酵素協会研究発表会、2001/11、大阪

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
Naraki T, Kohno N, Saito H, Fujimoto Y, Ohhira M, <u>Morita T</u> and Kohgo Y	Gamma-carboxy glutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin.	<i>Biochem Biophys. Acta</i>		in press	2002
Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H and <u>Morita T</u>	Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	98	7230-7234	2001
Hirotsu S, Mizuno H, Fukuda K, Ma C Q, Matsui T, Hamako J, <u>Morita T</u> and Titani K	Crystal structure of bitiscetin, a von Willebrand factor-dependent platelet aggregation inducer.	<i>Biochemistry</i>	40	13592-13597	2001
Iwahashi H, Kimura M, Nakajima N, Yamada D and <u>Morita T</u>	Determination of plasma prothrombin level by Ca ²⁺ -dependent prothrombin activator (CA-1) during warfarin anticoagulation.	<i>J. Heart Valve Dis.</i>	10	388-392	2001
岩橋英彦、木村道生、財津龍二、木村禎、 <u>森田隆司</u>	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	12	144-148	2001
Inoue-Suzuki K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, Yatomi Y, Ohmori T, Tanaka T, Satoh K and <u>Morita T</u>	Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GP Ia/IIa, Integrin $\alpha_2\beta_1$).	<i>J. Biol. Chem.</i>	276	1643-1652	2001
<u>森田隆司</u>	新しい血液凝固の仕組み	循環制御 (日本循環制御医学会誌)	21	482-484	2000
Shin Y, Okuyama I, Hasegawa J and <u>Morita T</u>	Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin-A, which inhibits platelet aggregation.	<i>Thrombosis Res.</i>	99	239-247	2000

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
Fukuda K, Mizuno H, Atoda H and <u>Morita I</u>	Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers.	<i>Biochemistry</i>	39	1915-1923	2000

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森田隆司 井上敬介	血液凝固因子・II因子(プロトロンビン)	長澤滋治	廣川タンパク質化学第5巻「血漿タンパク質I」	廣川書店	東京	2001	149-155
森田隆司 井上敬介	血液凝固因子・X因子	長澤滋治	廣川タンパク質化学第5巻「血漿タンパク質I」	廣川書店	東京	2001	176-181
森田隆司、 阿刀田英子	血液凝固因子・IX因子	長澤滋治	廣川タンパク質化学第5巻「血漿タンパク質I」	廣川書店	東京	2001	170-176
阿刀田英子 森田隆司	血液・造血器疾患	橋本隆男 佐藤隆司 豊島聡	疾病と病態生理	南江堂	東京	2001	173-199
森田隆司	ヘビ毒蛋白質の多量体形成による蛋白質機能の多様化	内山竹彦 中嶋暉躬 名取俊二 正木春彦	蛋白質核酸酵素	共立出版	東京	2001	463-469