

20021049

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

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14年度 総括研究報告書

主任研究者 森田 隆司

平成15(2003)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
III. 研究成果の刊行物・別刷	7

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)  
総括研究報告書

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 $\alpha$ -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、昨年度までの研究でプロトロンビン遺伝子に変異を導入、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。本年度は組換えプロトロンビンの *in vivo* での抗凝固活性を検討するため、組換えプロトロンビン遺伝子を組み込んだアデノウィルスベクター発現系の確立を試みた。その結果、簡便な動物個体内での発現系を構築することができた。

**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と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、ゲノム創薬の安全性を検討するための基礎研究を行なう。表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を示した。

**B. 研究方法**

1. ヒトプロトロンビン遺伝子への変異導入とその発現

プロトロンビン分子のトロンビン領域のNa<sup>+</sup>結合部位である Asp<sup>554</sup> 残基を、部位特異的変異導入法により、それぞれ Ala 残基または Leu 残基へ置換した。これらのそれぞれの変異体はPT-DA554及びPT-DL554と命名した(図1)。また9アミノ酸残基からなる Glu<sup>466</sup> から Lys<sup>474</sup> は自己消化領域として知られているが、その欠失変異体をし作製

表1 ヒトプロトロンビンとその変異体活性型の変異部位

Precursor	Thrombin/FXa-cleavage sites			Loop-2 <sup>1)</sup>	Na <sup>+</sup> -binding site	Activated forms
	Arg <sup>155</sup>	Arg <sup>271</sup>	Arg <sup>284</sup>	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp <sup>554</sup> 2)	
plasma prothrombin	Arg	Arg	Arg	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp	$\alpha$ -Thrombin
PT-tag	Arg	Arg	Arg	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp	r- $\alpha$ -Thrombin
PT-RA155	<b>Ala</b>	Arg	Arg	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp	r- $\alpha$ -Thrombin
PT-RA271/284	Arg	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp	rMT(desF1)
PT-RA155/271/284	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	Asp	rMT
PT-DA554	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	<b>Ala</b>	rMT-DA554
PT-DL554	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	Glu <sup>466</sup> – Thr <sup>469</sup>	<b>Leu</b>	rMT-DL554
PT $\Delta$ 466-469	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>deleted</b>	Asp	rMT $\Delta$ 466-469

1) Autolytic loop-2 (Glu<sup>146</sup> to Lys<sup>149c</sup>, chymotrypsin numbering)

2) Asp<sup>222</sup> (chymotrypsin numbering)

し、更に Glu<sup>466</sup>-Thr<sup>469</sup> (PTΔ466-469) の欠失変異体も作製した(図1)。

これらの新規の変異プロトロンビン4種を加えて、合計7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 末端には

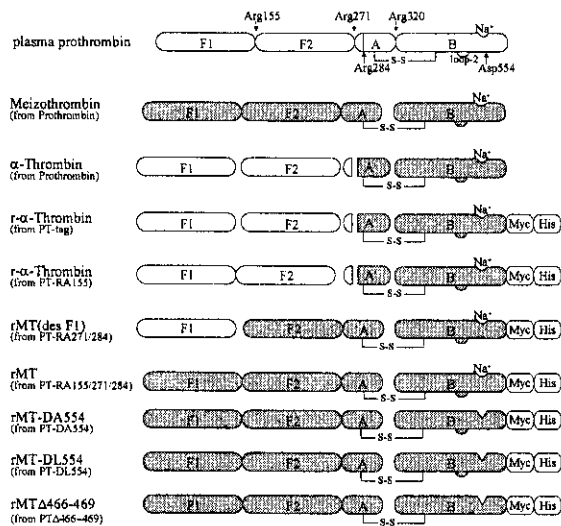


図1 組換えプロトロンビンの活性化産物

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。培地の一部分の 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°C、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ーノーゲンの凝固活性について、フィブリー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ー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°C、60 分活性化した後、プロテイン C(終濃度 80 nM)を 37°C、30 分活性化させ、活性型プロテイン 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とリポソーム(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

本年度の計画を遂行する過程で、将来の動物実験や臨床実験を考えると、凝固活性をさらに低下させた人工プロトロンビンの遺伝子のコンストラクトとその発現を試みるのが得策と考えた。従って、新しい構想で、さらに5種の新規人工プロトロンビン誘導体の構築、発現、単離とその諸性質の解析を行なった。

1. 発現プロトロンビンの生理機能解析: 精製組換え体をプロトロンビンアクチベーターで活性化し、活性化組換え体の生理機能を解析した。トロンビン合成基質(Boc-Val-Pro-Arg-pNA)の水解活性と血小板凝集に対する効果を解析した。

その結果、7種的人工プロトロンビンの一つ(PTΔ466-469)には凝固活性が全くなく、プロテインC活性化能が 16 倍に上昇した人工プロトロンビンが得られた。人工プロトロンビン PTΔ466-469 の活性化体メイゾトロンビン(rMTΔ466-469)による血小板凝集能・活性化能を解析したところ、トロンビンの 1000 万分の1以下であった。従って、この人工プロトロンビンは事実上、血栓を形成する活性は全くなく、当研究の目的の理

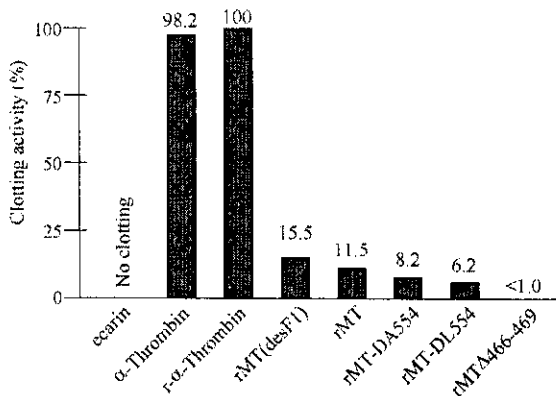


図2 活性型組換え体の凝固活性

想的なプロトロンビン誘導体を得られた。

## 2. 人工プロトロンビンの薬理活性効果に関する研究

現在、動物実験を行なうために、人工プロトロンビンの大量培養の条件化を検討中で、現在のところ1mg/培養液 L 程度の発現量である。安全性の動物実験を行なうためには、ラット1個体内に 100-200mg 注入するため大量の人工プロトロンビンを単離する必要がある。200mg という量は一研究室の規模を超えているが、大量培養の条件を検討し、できる限り大量の人工プロトロンビンを発現し、その単離を試みた。

一方、最終年度の計画課題である動物個体内における人工プロトロンビンの安全性と生理機能を明らかにするために、アデノウイルスによる個体内での強制発現の基礎研究を行なった。

アデノウイルスによる強制発現系は、一過的に大量の人工タンパク質そのものを注入する薬理実験に比べ、安全性評価において多数の検体数を施行出来る。これまで作製したプロトロンビン変異体 (PT-tag, PT-RA271/284, PT-RA155/271/284, PT-DA554, PT-DL554, PTΔ466-469) について、アデノウイルスを用いた発現系を構築した。CLONTECH 社の Adeno-X Expression System を用いて、変異型アデノウイルスゲノムにプロトロンビン変異体遺伝子を組込んだアデノウイルス発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターは、

HEK293 細胞に遺伝子導入し、変異型アデノウイルスのパッケージングとプロトロンビン変異体の発現を確認した。ついで、変異型アデノウイルスは COS-7 細胞に感染させて、プロトロンビン変異体の発現を確認し、また感染 COS-7 細胞から野生型アデノウイルスが増殖しないことを確認した。

現在、COS-7 細胞を用いて 300-400 μg 程度のプロトロンビン変異体 (PT-tag, PT-RA155/271/284, PTΔ466-469) の発現・精製を行ない、COS-7 細胞に直接遺伝子導入したものととの差異について検討している。概ね、COS-7 細胞で直接発現させた場合の、2-4 倍の発現量が細胞数あたり見込める、と思われる。さらにラットもしくはマウスを用いた *in vivo* 実験準備のため、プロトロンビン変異体遺伝子を組みこんだ変異型アデノウイルスを現在増殖させている。

## 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

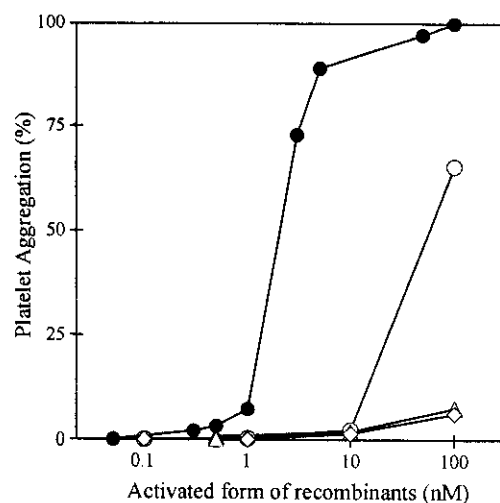


図3 活性型組換え体の血小板凝集活性  
●プロトロンビン組換え体、○OrMT (メイゾロンビン組換え体)、△rMT-DL554、◇rMTΔ466-469

表2 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

Activated Forms	Chromogenic Activity (mAbs/pmol/min)	Fibrinogen clotting activity (F) (10 <sup>2</sup> U/mg protein)	Protein C activator activity (P) (APC fmol/min)	RAP* (P/F)
α-Thrombin	20.0	11.1	23.1	1.2
r-α-Thrombin <sup>1)</sup>	20.0	11.3	19.6	1.0
r-α-Thrombin <sup>2)</sup>	19.9	ND	ND	ND
rMT(desF1)	18.8	1.75	24.9	8.2
rMT	7.7	1.30	275.9	123
rMT-DA554	4.3	0.93	225.7	140
rMT-DL554	4.3	0.70	319.1	263
rMTΔ466-469	4.4	<0.11	314.7	>1610

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

1) Recombinant thrombin derived from PT-tag.

2) Recombinant thrombin derived from PT-RA155.

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 Arg<sup>155</sup> 残基(フラグメント 1・2 切断部位)、Arg<sup>271</sup> 残基(フラグメント 2・A 鎖切断部位)、Arg<sup>284</sup> 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。これは、メイゾロンビンとその派生変異体は活性化後にもフラグメント 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ゾ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、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。

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ことができた。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、今回新規に作製した PTΔ466-469 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) Koike H, Okuda D and Morita T,

Mutations in the autolytic loop-2 and at Asp<sup>554</sup> of human prothrombin that enhance protein C activation by meizothrombin. *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 15015-15022

2) Okuda D, Koike H and Morita T, A new gene structure of disintegrin family: A subunit of dimeric disintegrin has short coding region. *Biochemistry* (2002) 41, 14248-14254

3) 岩橋英彦、木村道生、財津龍二、本村禎、森田隆司、抗凝固療法患者のプロトロンビン濃度から見た抗血小板薬との相互作用の検討。  
日本血栓止血学会誌(2002) 13、35-40

4) 岩橋英彦、木村道生、財津龍二、本村禎、森田隆司、心房細動患者と徐脈性心房細動にてペースメーカーを植え込まれた患者のプロトロンビン濃度(CA-1法)の比較。  
胸部外科(2002) 55、854-856

5) Atoda H, Kaneko H, Mizuno H and Morita T, Calcium-binding analysis and molecular modeling reveal echis coagulation factor IX/factor X-binding protein has the Ca-binding properties and Ca ion-independent folding of other C-type lectin-like proteins. *FEBS Lett.* (2002) 531, 229-234

6) Mizuguchi H, Yamazaki Y, Shikamoto Y, Shin Y, Sonoda J and Morita T, Prothrombin activation during carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Thrombosis Res.* (2002) 106, 257-261

## 2.学会発表

1) 抗凝固反応を亢進するヒトプロトロンビンの作製と機能解析:小池恒、奥田大樹、森田隆司、第3回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2002/6、東京

2) 変異導入によるヒトプロトロンビンの活性制御:小池恒、奥田大樹、森田隆司、第7回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会、2002/8、名古屋

3) ヒトプロトロンビン変異体の活性制御と機能相関:小池恒、奥田大樹、森田隆司、第75回日本生化学大会、2002/10、京都

4) Mg イオン及び Ca イオンが結合した血液凝固IX因子とその結合タンパク質複合体の結晶構造解析:森田隆司、第33回病態代謝研究会研究報告会、2002/10、東京

5) 本邦における後天性インヒビターの実態:嶋緑倫、川合陽子、辻肇、中村伸、田中一郎、森田隆司、第25回日本血栓止血学会学術集会、2002/11、神戸

6) 閉塞性動脈硬化症でのプロトロンビン濃度(CA-1法)のモニタリング:岩橋英彦、木村道生、財津龍二、本村禎、森田隆司、第25回日本血栓止血学会学術集会、2002/11、神戸

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許申請

特願 2002-208846

出願日 2002年7月17日

発明者 森田隆司ほか2名

発明の名称 ヒトプロトロンビン類似体およびヒトメイズトロンビン類似体

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
Koike H, Okuda D and <u>Morita T</u>	Mutations in the autolytic loop-2 and at Asp <sup>554</sup> of human prothrombin that enhance protein C activation by meizothrombin.	<i>J. Biol. Chem</i>	278	15015- 15022	2003



20021049

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.6の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。