



Successful synthesis of active human coagulation factor VII by co-expression of mammalian gamma-glutamyl carboxylase and modification of vit.K cycle in Drosophila Schneider S2 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長橋, ことみ メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3150

博士(医学) 長橋 ことみ

論文題目

Successful synthesis of active human coagulation factor VII by co-expression of mammalian gamma-glutamyl carboxylase and modification of vit.K cycle in *Drosophila* Schneider S2 cells

(ショウジョウバエシュナイダーS2 細胞における哺乳動物 γ -グルタミルカルボキシラーゼの共発現および vit.K サイクルの修飾による活性化ヒト凝固第 VII 因子合成の成功)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血液凝固第 VII 因子(FVII)はビタミン K(vit.K)依存性タンパク質であり、その N 末端 Gla 領域に存在するグルタミン酸が vit.K 依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)の触媒作用で γ カルボキシグルタミン酸に変換されることで活性をもつ。この反応に補因子として働く還元型 vit.K は、vit.K 2,3-エポキシドレダクターゼ(VKOR)が主要な役割を果たす vit.K サイクルで産生され、この酵素の遺伝子は vit.K エポキシドレダクターゼ複合体サブユニット 1(VKORC1)として同定されている。

組換え活性化ヒトFVII(rhFVIIa)は、血友病および先天性FVII欠損の治療薬として承認されており、産科領域では産後出血の凝固障害にも有用とされている。rhFVIIa および他の vit.K 依存性タンパク質の合成には、いくつかの哺乳動物細胞株が使用されているが、収率が低く、より効率的な大規模培養系が必要である。

ショウジョウバエ由来の *Drosophila melanogaster* Schneider2 細胞株(S2)は、CO₂を必要とせずに室温で急速に増殖するという特徴をもち、組み換えタンパク質を高度に発現しうることが実証されている。また、S2はGGCXを発現し、vit.K サイクルを有することも報告されている。本研究の目的は、ヒト FVII(hFVII)と共に哺乳動物 GGCX、VKORC1、および/またはタンパク質ジスフィルドイソメラーゼファミリーA、メンバー2(PDIA2)を発現させることができるいくつかの発現ベクターを開発し、S2 細胞での rhFVIIa 産生が可能か否かについて検討することである。

[材料ならびに方法]

はじめに以下の 5 種類のベクターを作成した。①MAK80:Bip(S2 細胞の分泌シグナル遺伝子)+hFVII、②MAK85:哺乳動物由来 GGCX+Bip+hFVII、③MAK86:哺乳動物由来 GGCX+VKOR+PDIA2+Bip+hFVII、④MAK132:哺乳細胞の分泌シグナルを含む hFVII 全長遺伝子、⑤MAK219:哺乳動物由来 GGCX+VKOR+Bip+hFVII の 5 種のベクターを作製した。S2 細胞は昆虫細胞用培地である ExpressFive SFM(Life Technologies Japan)に 10%ウシ胎仔血清および抗菌薬(ペニシリン、ストレプトマイシン)、抗真菌薬(アンホテリシン B)を添加した培養液を用いて 27°C で培養した。各遺伝子をリポフェクション法で S2 細胞に導入し、培養液中にピューロマイシンを添加することで形質転換細胞を選択した。また、継代中にウシ胎仔

血清の濃度を徐々に薄めていき、血清無添加培養液での培養を可能とした。それぞれの形質転換細胞を vit.K 存在下と非存在下で培養した。各培養上清において、FVII のタンパク質の発現量について SDS-PAGE、ELISA 法により検討した。また組換えヒト FVII(rhFVII)の活性を発色性合成基質法で測定した。

[結果]

培養液中での vit.K 存在の有無それぞれの条件において、CuSO₄を添加することにより安定な形質転換体を誘導した後、培養上清中の rhFVII をウェスタンブロット法で検討したところ、S2 / 80、S2 / 85、S2 / 86、および S2 / 219 の培養上清(以後 S2 / 80、S2 / 85、S2 / 86、S2 / 219)では vit.K の有無にかかわらず FVII の発現が検出されたが、S2 / 132 からの培養上清(S2 / 132)にシグナルは検出されなかった。

FVII 活性は、vit.K 存在下では S2 / 85、S2 / 86、および S2 / 219 に検出されたが、vit.K なしで培養された細胞の培養上清中には検出されなかった。FVII 活性レベルは、S2 / 86 で最も高かった。

[考察]

S2 / 80 は rhFVII を生成し分泌したが、vit.K 非存在下では活性が検出されず、ショウジョウバエ Ggcx が rhFVII の γ -カルボキシル化に寄与しないことが示された。さらに、S2 / 85 および S2 / 86 および S2 / 219 は、rhFVII を生成および分泌し、vit.K の存在時にのみ活性を有した。これらの結果は、S2 細胞における rhFVIIa の合成に哺乳動物 GGCX の共発現と vit.K の存在が不可欠であることを示した。S2 / 85 で rhFVIIa 合成可能であったことから S2 細胞のショウジョウバエ Vkor が機能したことは確認され、S2 / 219 の結果から哺乳類の VKORC1 が rhFVIIa 合成を強化することが示された。また、S2 / 86 で最も活性が高かったことより、哺乳動物 VKORC1 と PDIA2 の同時発現は相乗的に FVII 活性を増強した。PDIA2 は、vit.K エポキシドを vit.K ヒドロキノンへ還元することが知られており、外因性 PDIA2 が S2 細胞における vit.K サイクリングを促進した。

これまでの報告では、rhFVIIa の生成にはヒト GGCX を内在的に発現する HEK293 細胞にラット Vkorc1 を共発現させている。哺乳動物細胞は vit.K サイクルを有することから γ -カルボキシル化が可能であるが、組換えタンパク質の収率が比較的低いことを考えると、大量生産のためにはコストが大きな懸念事項となる。また、Sf9 細胞(別の昆虫細胞株)に hFVII とヒト GGCX を導入することによる rhFVIIa 生成も確認されているが、バキュロウイルス感染を必要としタンパク質産生で細胞種自体が死んでしまうため、安定した連続生産が困難であった。本研究での S2 細胞による rhFVIIa 生成は再現性も確認され、安定で大量生産が可能な新たな手法である。

S2 細胞における rhFVIIa 生成には哺乳動物 GGCX の共発現と vit.K の存在が必須であることが明らかになった。また S2 細胞において VKORC1 と、PDIA2 を共発現させることにより、vit.K サイクルの修飾が促進されることも確認した。

[結論]

本研究において、S2 細胞に VKORC1 と PDIA2 を共発現させることにより γ -カルボキシ化活性を有する rhFVIIa の新しい発現系作成に成功した。