

# カイコ蛹を利用した遺伝子組換えタンパク質の 発現と凝固試薬への適用

## － 完全長ウシ組織因子原料の開発と特性 －

奥田 昌宏<sup>\*1</sup>, 谷口 友邦<sup>\*1</sup>, 吉田 和代<sup>\*1</sup>, 熊野 穰<sup>\*1</sup>, 岸 浩司<sup>\*1</sup>,  
長屋 英和<sup>\*2</sup>, 村山 宗司<sup>\*2</sup>, 柿 宏樹<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup> シスメックス株式会社 診断薬開発本部

<sup>\*2</sup> 片倉工業株式会社 生物科学研究所

### はじめに

血液凝固検査試薬の開発は、先天性出血性疾患や凝固因子の発見に伴って進んできた。1920年代に、牧草の肥料としていたクローバーを食べた牛が出血するというスイート・クローバー病が北米で発生した。一方、ムラサキウシゴヤシ（ビタミンK含有）を食べていた牛では出血が止まる作用も知られていた。こうした経験を基に、クローバーからクマリン誘導体が抽出され、今日の抗凝固薬ワルファリンが

合成された<sup>1,2)</sup>。同時代には、プロトロンビン（第II因子）を測定するQuick一段法（今日のPT試薬）が開発されており、図1に記載した初期の凝固カスケードが提唱されていた。欧州では、1943年にPT測定で臨床症状に合致しない先天性プロトロンビン欠損症患者が見つかったことがきっかけとなり、Paul Owren（オスロ大学；ノルウェー）が上述のQuick一段法を改良して第V因子とフィブリノゲン濃度に影響を受けないトロンボテスト試薬を開発した<sup>3)</sup>。

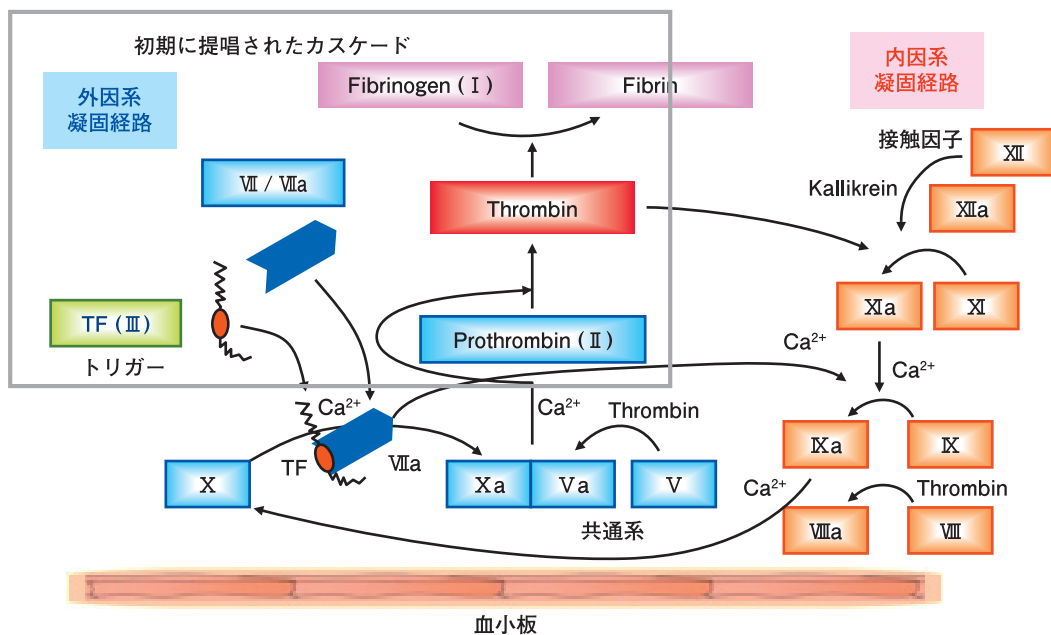


図1. 血液凝固カスケードの概略

## 開発の背景

トロンボテスト試薬は、日本をはじめスカンジナビア地方、ベネルクス三国、オーストリアやロシアなどの欧州で、経口抗凝固薬ワルファリンのモニタリングに利用されており<sup>3,4)</sup>、主原料にウシ大脳由来の組織因子を用いる凝固検査薬である。我々は、1990年に国産で初めて、ウシ大脳原料を用いた複合因子・T<sup>「ロクサイ」</sup>を開発してきた<sup>5)</sup>。近年、世界的に狂牛病（BSE）が発生し、動物由来原材料であるウシ大脳の国内での供給および輸入規制による海外からの供給が困難となってきている。そこで、BSE感染の危険部位であり、原材料調達リスクが高いウシ大脳原料を、遺伝子組換え体に置き換えることにより、生産環境の改善と製品安定供給を目的として、トロンボチェック TTO リコンビナント（以下、TTO リコンビナント試薬）の開発を行った。

## 技術

我々は、独自の遺伝子組換えタンパク質生産技術を基盤として片倉工業社が提供する *KaikoExpress*<sup>6)</sup> に着目し、その実用化および原料の安定供給に関する検討を重ねた。その結果、カイコ蛹で生産した遺伝子組換えウシ組織因子（以下、rbTF）が高い機能性と生理活性を有することを見出し、rbTFの安定供給体制の確立に成功した。

### 1. 組織因子の機能

組織因子（Tissue factor；以下、TF）は第Ⅲ因子（factor Ⅲ）とも呼ばれ、生体組織の全てに存在し、特に脳や肺、胎盤に多い。TFの一次構造は、1987年に Broze らにより報告<sup>7)</sup>されており、263のアミノ酸から成る分子量が約43kDaのアポタンパク質である。N末端から219残基までの可溶性の細胞外ドメイン、23残基から成る膜貫通ドメイン、21残基から成る細胞内ドメインが存在する（**図2**）。TFは、血管損傷に伴う突発的な血液流出を防ぐためのトリガーとして、止血・凝固機能を果たしている。

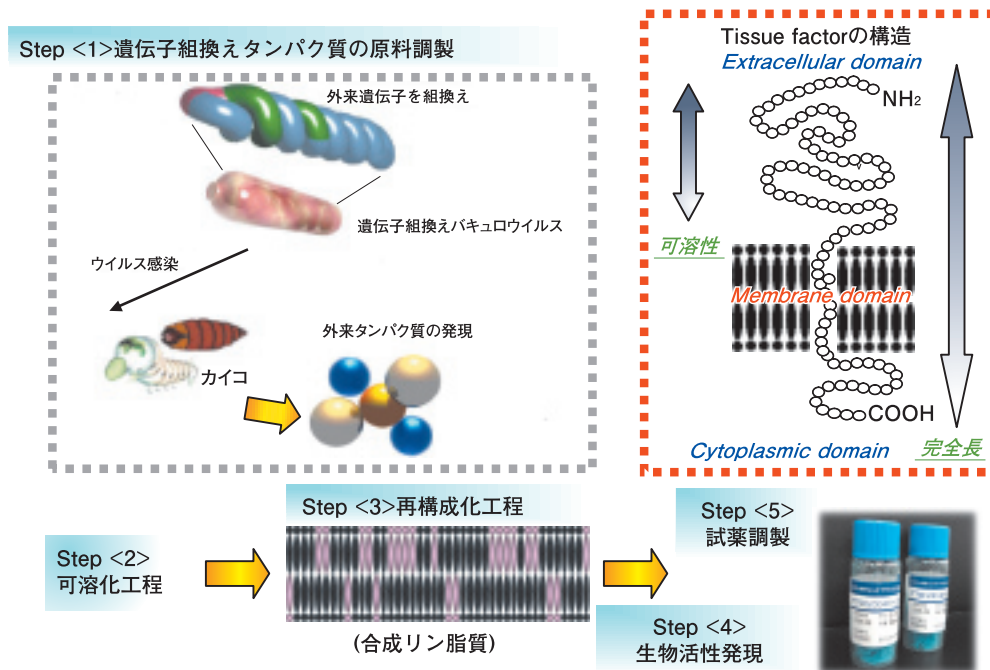


図2. 遺伝子組換えタンパク質の発現方法と試薬の調製方法

## 2. ウシ TF の cDNA のクローニング

ウシ脳の cDNA ライブラリー (クローンテック社) から PCR 法により、完全長のウシ TF をコードした cDNA をクローニングした (図 3)。PCR 法での遺伝子増幅には、BglII 切断配列を有する forward プライマー (5'-agatctatggcgacccccacgggcc-3') と EcoRI 切断配列を有する backward プライマー (5'-acttaagaatcgtcgcaactcgccgc-3') を使用した。得られた完全長のウシ TF をコードする遺伝子断片は、制限酵素処理後、クローニングベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。

## 3. ウシ TF の cDNA クローンのシーケンス確認

クローニングした cDNA は、シーケンサー (4200 型, ライカ社) により、その塩基配列を解析し、データベースに公開されているウシ組織因子のタンパク質をコードする DNA であることを確認した (図 4)。この塩基配列より翻訳されるウシ TF のアミノ酸配列を図 5 に示す。

## 4. rbTF のハイスループット生産システムの構築 (KaikoExpress)

*KaikoExpress* は、片倉工業社が提供するカイコとバキュロウイルスを組み合わせて利用した遺伝子組換えタンパク質生産システムである (図 2, 6)。カイコは、短期間に体重が約一万倍となるほど、非常に高速でタンパク質を生産しながら成長する。この高い生産効率をタンパク質生産工場として実用化したものである。一方、バキュロウイルスもまた、非常に高速でタンパク質を発現する性能を有している。これらを組み合わせて利用することで、品質の良い組換えタンパク質が大量に獲得できる利点がある (図 7)。また、バキュロウイルスは、カイコガなどのリン翅目昆虫以外には感染しないため、ヒトへの感染などの危険性がない、非常に安全性の高いウイルスである。

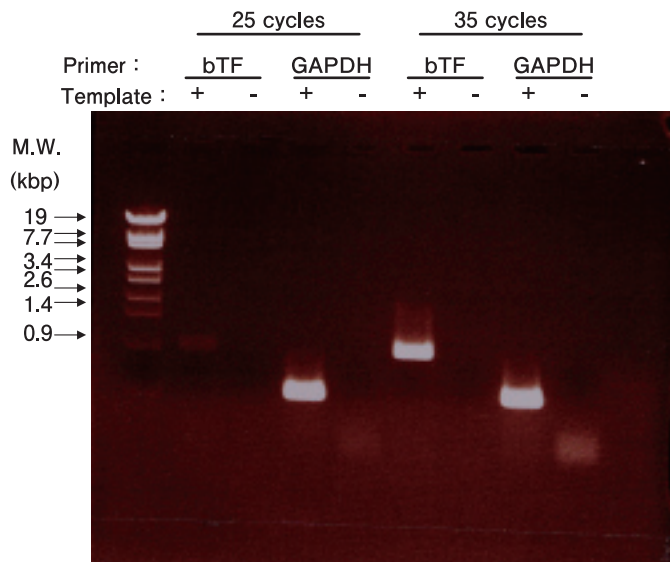


図 3. PCR によるウシ TF cDNA のクローニング  
 プライマーにはウシ TF (bTF) と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素) を用いた。

```

b-TF : ATGGCGACCCCCAACGGGCCCGGGTGCCTGCCCCAGGCGCAGTCGCTCGGGCTCTTCTATTCGGCTTAGTCCTCATCCAGGGGGCCGAGTCGCGC 100
クローン : ATGGCGACCCCCAACGGGCCCGGGTGCCTGCCCCAGGCGCAGTCGCTCGGGCTCTTCTATTCGGCTTAGTCCTCATCCAGGGGGCCGAGTCGCGC 100
*****

b-TF : GCACACTACAGATGAGTGGTAGCATATAATAAATACTTGAAGTCAACTAATTTCAAGACCATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCATCAATCATGTCTACAC 200
クローン : GCACACTACAGATGAGTGGTAGCATATAATAAATACTTGAAGTCAACTAATTTCAAGACCATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCATCAATCATGTCTACAC 200
*****

b-TF : TGTTTCAGATAAGCCCTAGATTAGGAAACTGAAAAACAATGCTTTTACACAACAACACGGAGTGTGATGTCAGTATGAGATTGTGAAAAATGTGAGA 300
クローン : TGTTTCAGATAAGCCCTAGATTAGGAAACTGAAAAACAATGCTTTTACACAACAACACGGAGTGTGATGTCAGTATGAGATTGTGAAAAATGTGAGA 300
*****

b-TF : GAGACATATTTGGCGAGAGTCCTTTCTACCCCGCAGACACTAGCAGTTCACAGTGGAGCCTCCGTTTACCAACTCCCGGAGTTCACACCCCTACCTAG 400
クローン : GAGACATATTTGGCGAGAGTCCTTTCTACCCCGCAGACACTAGCAGTTCACAGTGGAGCCTCCGTTTACCAACTCCCGGAGTTCACACCCCTACCTAG 400
*****

b-TF : AGACAAACCTTGGACAGCCAACAATTAGAGTTTCAACAAGTTGGGACAAAAGTGAATGTGACGGTACAAGATGCACGTACGTTAGTCAGAGCGCAACAG 500
クローン : AGACAAACCTTGGACAGCCAACAATTAGAGTTTCAACAAGTTGGGACAAAAGTGAATGTGACGGTACAAGATGCACGTACGTTAGTCAGAGCGCAACAG 500
*****

b-TF : CGCATTCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTGAATTACACACTTTTACTGGAAGCTTCCAGTACAGGAAAGAAAAAGGCCACGACAAC 600
クローン : CGCATTCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTGAATTACACACTTTTACTGGAAGCTTCCAGTACAGGAAAGAAAAAGGCCACGACAAC 600
*****

b-TF : ACTAATGGGTTTTGATTGATGTGGATAAAGGCGAAAACATTGTTCCATGTTCAAGCAGTGATTCTATACGAAAGGGAACCAAGAGTCCAGAAA 700
クローン : ACTAATGGGTTTTGATTGATGTGGATAAAGGCGAAAACATTGTTCCATGTTCAAGCAGTGATTCTATACGAAAGGGAACCAAGAGTCCAGAAA 700
*****

b-TF : GTCCCATCAAGTGCAGTACGCCACGAGAAAGTCTGTCCACAGAACTTTCTTCATCATTGGCACAGTGTGCTGGTATCATCATCTTCATCGTCTCT 800
クローン : GTCCCATCAAGTGCAGTACGCCACGAGAAAGTCTGTCCACAGAACTTTCTTCATCATTGGCACAGTGTGCTGGTATCATCATCTTCATCGTCTCT 800
*****

b-TF : GTCTGTGTCTCTGCACAAGTGCAGGAAGGTGAGAGCAGAGCGAAGTGGGAAGGAGAAACACGCCGCTCAACGCTGCATAA 879
クローン : GTCTGTGTCTCTGCACAAGTGCAGGAAGGTGAGAGCAGAGCGAAGTGGGAAGGAGAAACACGCCGCTCAACGCTGCATAA 879
*****
    
```

図4. ウシ TF の cDNA 配列

b-TF はウシ組織因子の DNA 配列, クローンは本発現系の DNA 配列を示した。  
\* は, b-TF と本クローンが一致している部分を示す。

Bovine	MATPNGPRVPCQAAVARALLFGLVLIQAGVAGTTDVVVAYNI TWKSTNFKTILEWEPK	60
Human	METPAWRVPRPETAVARTLLGWVFAQVAGSGTTNTVAAYNL TWKSTNFKTILEWEPK	60
Rabbit	MAPPTRLQVPRPGTAVPYTVLLGWLLAQVARAADTTG - RAYNL TWKSTNFKTILEWEPK	58
	* * * * *	
Bovine	PINHVVYTVQISPRLGNMKNKCFYTTNTECDVTDEIVKNVRETYLARVLSYPADTSSST - -	18
Human	PVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYTTDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGS	20
Rabbit	SIDHVVYTVQISTRLENMWSKCFLTAETECDLTDEVVKDVQGYMARVLSYPARNGNTTGF	18
	***** * * * * *	
Bovine	-VEPPFTNSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTCLNVTVDARTLVRANS AFLSLRDVFG	177
Human	AGEPLYENSPEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTQVNVTVEDERTLVRNNTFLSLRDVFG	180
Rabbit	PEEPPFRNSPEFTPYLDNLGQPTIQSFEQVGTCLNVTVDARTLVRRTGFLSLRAVFG	178
	* * * * *	
Bovine	KDLNYTLYYWKASSTGKKKATNTNGFLIDVDKGENYCFHVQAVILSR - RVNQKSPESPI	236
Human	KDLIYTLYYWSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSR - TVNRKSTDSPV	239
Rabbit	KDLNYTLYYWRASSTGKKATNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSR - KRKQRPESLTI	237
	* * * * *	
Bovine	KCTSHEKVLSTELFFIIGTVMLV I I FIVVLSVSLHKRKRVAERSGKENTPLNAA	292
Human	ECMGQEKGEFREIFYIIGAVV F V I I L V I I L A I S L H K R K A G V G S W K E N S P L N V S	295
Rabbit	ECTSREQGRAREMFFIIGAVV - VVALLIIVLSVTVYKCRKARAGPSGKESPLNIA	292
	* * * * *	

図5. 各種 TF のアミノ酸配列の比較

\* は, Bovine, Human, Rabbit いずれも同じアミノ酸配列である部分を示す。

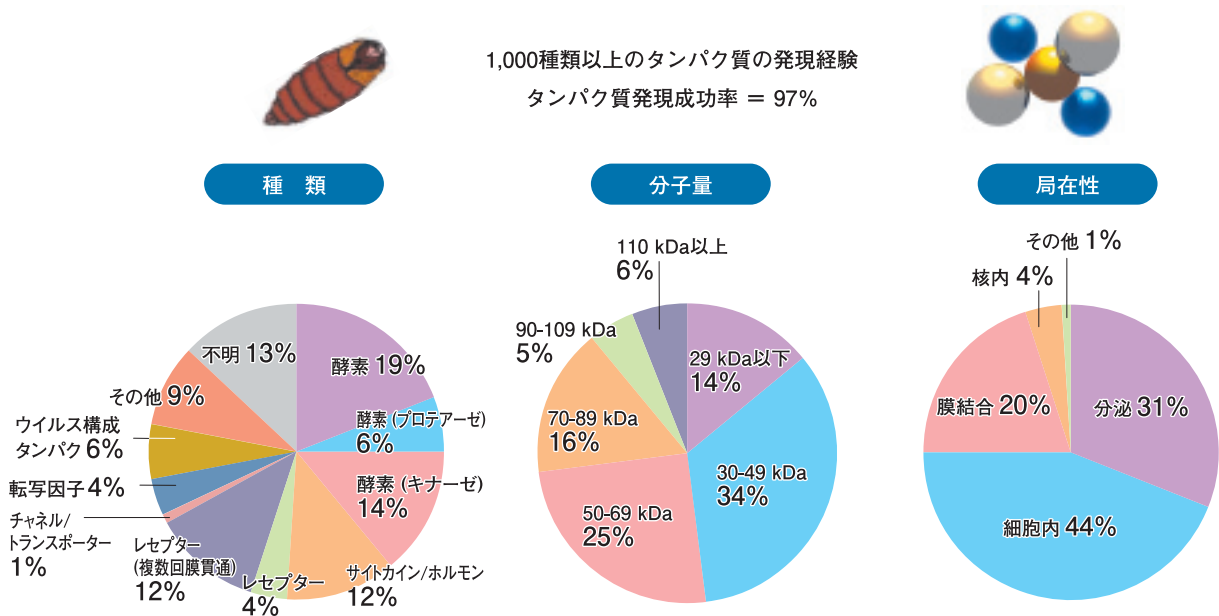


図6. KaikoExpress による遺伝子組換えタンパク質の発現実績


	従来原料 (ウシ大脳)	遺伝子組換え原料
(1) 原料	ウシ大脳 (60頭) = 約5,000g 	カイコ蛹 (30匹) = 約30g 
(2) 供給元	ニュージーランド産	国産 (片倉工業社)
(3) 製造工数	4日	1日
(4) リードタイム	1ヶ月	10日

図7. カイコ蛹による遺伝子組換えタンパク質の生産効率

我々がクローニングした cDNA を片倉工業社保有の特別なバキュロウイルスへと組み込み、ウシ TF を生産する組換えバキュロウイルス株を樹立した<sup>8)</sup>。これをカイコ蛹に注入し、25℃下で7日間感染させることで、カイコ蛹の細胞内に rbTF タンパク質を生産させた。rbTF タンパク質は、このカイコ蛹に Good's 緩衝液などを加えてホモジナイザーにより磨砕後、濾過および遠心分離して抽出した。さらに、

組換えバキュロウイルスの不活性化処理およびバキュロウイルス由来の核酸などの除去処理を施して rbTF 分画溶液とした。rbTF 分画の組換えバキュロウイルスの不活性化および残存するバキュロウイルス由来核酸の確認は、Reed-Munch 法<sup>9)</sup> および PCR 法により実施し、組換えバキュロウイルスが除去されたことを確認した。



## 5. 電気泳動による rbTF タンパク質の確認

生産した rbTF タンパク質は、ミニプロテイン II 電気泳動装置（日本バイオラッドラボラトリーズ社）を用いてポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE：50volt, 3hr）を行い、ゲルを銀染色キット（積水メディカル社）で染色して確認した。カイコ蛹磨碎液の泳動パターンから、42kDa 付近に出現したバンドが rbTF タンパク質に相当する画分であると推定された（**図8**）。

## 6. 生物活性発現

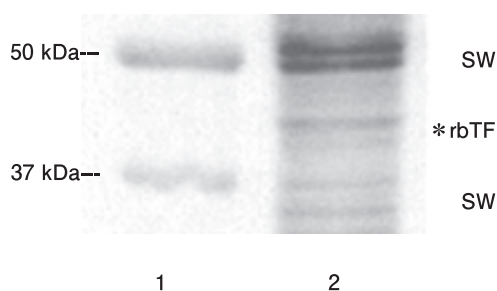
外因系凝固の TF と活性化第 VII 因子（FVIIa）による加水分解活性を合成基質（S-2288：Chromogenix 社）を用いて確認した<sup>10)</sup>。

天然ウシ大脳 TF（wbTF）には複合因子・T<sup>「コクサイ」</sup>（シスメックス社）で用いているウシ大脳トロンボプラスチン溶液<sup>5)</sup>を用いた。rbTF アポタンパク質は、合成リン脂質（PE/PC/PS）溶液<sup>11)</sup>と組み合わせて再構成を行った<sup>12)</sup>（**図2**）。

再構成化 rbTF は wbTF と近似した反応性を認め、反応時間経過とともに吸光度（Abs 405nm）の上昇が示された。一方、対照としたバキュロウイルス未感染カイコ蛹サンプルでは全く加水分解反応を示さなかった（**図9**）。ここには示していないが、未感染カイコ磨碎液は凝固因子活性や合成基質への反応性を示さない原料特性を持つことを確認した。この成績から、今回発現した rbTF は、FVII /FVIIa を介する外因系凝固のトリガーとしての TF の生物活性を持つことが認められた。

## 7. 原料保存期間

本 rbTF 分画溶液を -80℃ で凍結保存した結果、22 カ月まで安定した凝固時間（CV 0.62%）と ISI 値（CV 0.92%）を示し（**表1**）、短期保存で使用する従来の天然ウシ大脳原料よりも長期間の原料確保が可能であった。



**図8.** rbTF の SDS-PAGE

Lane 1：分子量マーカー， Lane 2：rbTF 可溶化分画

SW：カイコ蛹由来成分画分， \*rbTF：発現したウシ TF 画分

Gel：5-20% polyacrylamide, Buffer：25mM Tris and 192mM glycine containing 0.02% (w/v) SDS buffer (pH 7.5)

染色法：銀染色

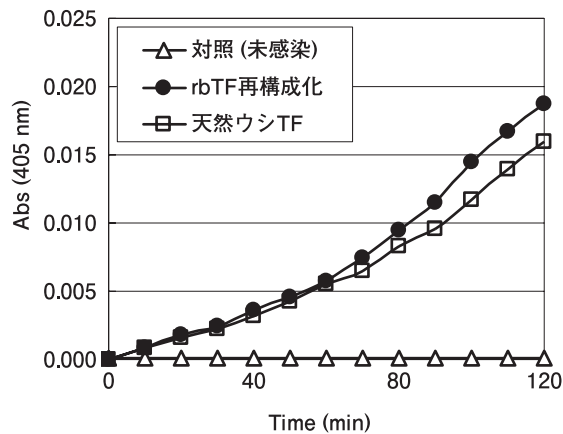


図9. TF と FVII /FVIIa による加水分解活性

△ 对照 (未感染) : ウイルス未感染カイコ蛹溶液  
 ● rbTF 再構成化 : リン脂質再構成化 rbTF 溶液  
 □ 天然ウシ TF : 天然ウシ大脳組織因子溶液  
 測定条件は、高宮らの方法<sup>10)</sup>に準じて、VersaMax プレートリーダー (モレキュラーデバイス社) で吸光度 (405nm) を経時的に計測した。

表1. 原料の保存期間

期間 (month)	保存期間 (月)						規格
	0	6	12	18	20	22	
正常血漿 (sec)	33.4	33.7	33.1	33.5	33.6	33.5	25-40 sec
ISI 値	0.96	0.97	0.96	0.98	0.97	0.98	1.00±0.10

保存条件: rbTF原料を-80℃メディカルフリーザーに保存した。rbTF原料を合成リン脂質と再構成化操作を行い、25mM塩化カルシウム溶液と等量混合し、PT測定に順じてCoagrex-800で凝固時間を測定した。正常血漿にはコアグトロールN (シスメックス社) を用いた。ISI値はAKキャリブラント (AK-A, AK-B, AK-C, AK-D) を用いて算出した。

## 8. TTO リコンビナント試薬の特性

### 1) 国際感度指数 (ISI)

TTO リコンビナント試薬を図2の工程で凍結乾燥品として調製し、WHO 国際参照物質 (International Reference Preparation : IRP) OBT/79<sup>13)</sup> を基準として、ワルファリン投与患者血漿にAKキャリブラント (シスメックス社)<sup>14)</sup> を用いて、全自動血液凝固分析装置 Coagrex-800 (シスメックス社) により算出したローカル ISI 値は 0.98 であった (図10-A)。

### 2) 原料ロット間差

20 ロットの rbTF 原料で調製した TTO リコンビナント試薬についてロット間差を調べたところ、各試薬の ISI 値は 0.92 ~ 1.04 の範囲で、CV 3.4% の均質な分布であった (図10-B)。この結果より、rbTF はワルファリンのモニタリングに適した試薬特性を持つ原料であることが確認された。

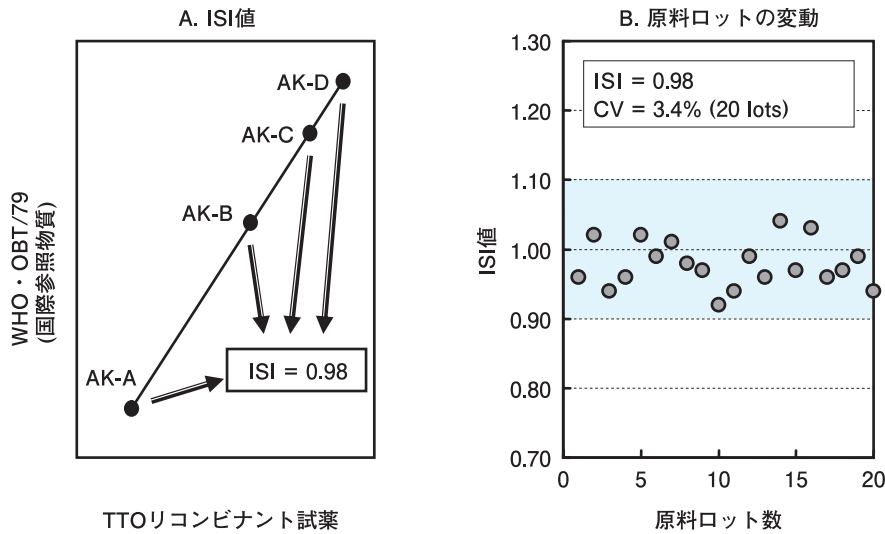


図 10. ISI 値と rbTF 原料のロット変動

- A : WHO の国際参照物質である OBT/79 を対照に用いた。AK キャリブラントの試料として AK-A, AK-B, AK-C および AK-D を用い、TTO リコンビナント試薬と WHO・OBT/79 の凝固時間 (秒) を対数プロットした。
- B : ISI 値は国際感度指数 (International Sensitivity Index) を意味する。

## おわりに

TTO リコンビナント試薬は、BSE による調達リスクが高いウシ大脳原料を利用せず、高い生産性と生物活性を有する遺伝子組換えタンパク質を原材料として開発した凝固検査薬である。従来の天然資源によるウシ大脳原料と比較して、カイコ蛹を利用した rbTF 原料は、生産性の側面において、原料頭数、リードタイム、製造工数、保存期間のいずれにも飛躍的に高い効率が得られた (図 7)。また、抗凝固薬ワルファリンのモニタリングにおいては国際標準比 (International Normalized Ratio : INR) による表記法が日本や海外で普及しつつあるが<sup>15, 16)</sup>、TTO リコンビナント試薬は ISI ≒ 1.0 の試薬特性を示すことから INR 表記法に適応する試薬であることが示された。

したがって、古典的製法に依存した生物原材料を利用せずに、安定供給、安全性、生産性に優れた手段の 1 つとして、我々は遺伝子組換えタンパク質を利用する新しい技術を確認することができた。

## 参考文献

- 1) 櫻川信男, 上塚芳郎, 和田英夫. 抗凝固薬の適正な使い方. 第 2 版. 東京: 医歯薬出版; 2008. 8-69.
- 2) 齋藤英彦. 抗凝固薬の歴史と展望. 日本血栓止血学会誌. 2008; 19: 284-286.
- 3) Owren PA. A quantitative one-stage method for the assay of prothrombin. Scand J Clin Lab Invest. 1949; 1 (1): 81-83.
- 4) 戸田恵理. 経口抗凝固薬の種類とその作用メカニズムの概略. 医学のあゆみ. 2009; 228 (10): 1019-1022.
- 5) 日裏久英, 西岡良訓, 奥田昌宏. 複合因子の測定. 臨床検査機器・試薬. 1990; 13 (4): 595-598.
- 6) Sugiura T et al. Serological diagnosis of equine influenza using the hemagglutinin protein produced in a baculovirus expression system. J Virol Methods. 2001; 98 (1): 1-8.
- 7) Broze GJ Jr et al. Purification of human brain tissue factor. J Biol Chem. 1985; 260 (20): 10917-10920.
- 8) Suzuki T et al. Efficient protein production using a Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus lacking the cyctein proteinase gene. J Gen Virol. 1997; 78: 3078-3080.



- 9) Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938 ; 27 : 493-497.
- 10) Takamiya O, Kimura S. Molecular mechanism of dysfunctional factor VII associated with the homozygous missense mutation 331Gly to Ser. *Thromb Haemost.* 2005 ; 93 ( 3 ) : 414-419.
- 11) Okuda M, Yamamoto Y. Usefulness of synthetic phospholipid in measurement of activated partial thromboplastin time : a new preparation procedure to reduce batch difference. *Clin Lab Haematol.* 2004 ; 26 ( 3 ) : 215-223.
- 12) Lawson JH. Extrinsic pathway proteolytic activity. *Methods Enzymol.* 1993 ; 222 : 177-195.
- 13) Hermans J et al. A collaborative calibration study of reference materials for thromboplastins. *Thromb Haemost.* 1983 ; 50 ( 3 ) : 712-717.
- 14) Moritz B, Lang H. Use of plasmas from donors under oral anticoagulant treatment for the expression of INR values. *Haematologica.* 1997 ; 82 ( 5 ) : 630-633.
- 15) Horsti J. Has the Quick or the Owren prothrombin time method the advantage in harmonization for the International Normalized Ratio system? *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002 ; 13 ( 7 ) : 641-646.
- 16) 能澤 孝, 井上 博. 血液凝固モニターをどう使うか - その実際と問題点 -. *Vascular Medicine.* 2007 ; 3 ( 1 ) : 24-30.