

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

分担課題：日本人の不育症におけるプロテイン Z と  
プロテイン Z 依存性プロテインインヒビターの解析

研究分担者 一瀬 白帝 山形大学医学部 分子病態学講座 教授

研究要旨

新しいプロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(Protein Z-dependent Protease Inhibitor; ZPI)のアッセイ系を開発する為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞の樹立を試みたところ、特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって哺乳類細胞と昆虫細胞の培養系で明らかな発現が確認された。今後、本抗体を用いて新 ELISA アッセイ系を構築する予定である。また、前年度の研究により、ZPI とプロテイン Z(PZ)の血中レベルが妊娠期に上昇することが発見されたので、両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステロンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。従って、エストロゲンとプロゲステロンの ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を更に追究する必要がある。

A. 研究目的

目的:妊娠期における ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズム、それらが妊娠維持に果たす役割、意義を解明し、不育症の診断や予防に貢献する。

背景:前年度の研究により、ZPI と PZ の血中レベルが妊娠期に上昇すること、不育症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理的意義、不育症における因果関係は不明である。そこで、本年度は妊娠時に増加する女性ホルモンの両遺伝子の発現調節機構に対する影響を解析した。

また、PZ はほぼ全て ZPI と結合して血中に存在するが、ZPI の一部は遊離型として単独で存在する。因みに、PZ-ZPI 複合体は活性型 X 因子を、遊離 ZPI は活性型 XI 因子を阻害することが知られている。従って、妊娠期の抗凝固状態の変動を理解する為には、PZ-ZPI 複合体と遊離 ZPI の濃度やバランスを知ることが不可欠である。ところが、PZ 濃度は mg/ml と絶対値で測定結果を出すことができるが、ZPI 濃度は正常人の血漿プールを 100%とした相対値でしか表せないのので、PZ-ZPI 複合体や遊離 ZPI 濃度も計測できない。そこで、本年度は、ELISA 系に用いるための ZPI タンパク質の標

準物質を作製した。

B. 研究方法

1) RT-PCR による PZ および ZPI 発現量の解析

ヒト由来肝癌細胞株 HepG2 を用いてエストラジオールおよびプロゲステロン添加時における PZ および ZPI の発現への影響について調べた。エストラジオールおよびプロゲステロンは  $1 \mu\text{g/mL}$  濃度で培養液に添加し、48 時間後に RNA を抽出し発現の変化を調べた。HepG2 よりの RNA の抽出は、グアニジンチオシアネート法を用い、オリゴ(dT)20 プライマーおよび M-MLV 逆転写酵素を用いて逆転写を行った。得られた cDNA および PZ、ZPI および GAPDH の特異プライマーを用いて PCR をおこない各成分の発現を調べた。用いたプライマーは下記の通りである。

PZ センス:

5' -CACCGGATCTACAGGACCTC-3'

PZ アンチセンス:

5' -CATGGACGTGCGTTATCTTG-3'

ZPI センス:

5' -CATGGAGAAAATGGGTGACC-3'

ZPI アンチセンス:

5' -AGTGCCCTTTCATCAACTTC-3'  
GAPDH センス:

5' -CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'  
GAPDH アンチセンス:

5' -TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3'

PZ, ZPI および GAPDH はそれぞれ、28, 25, および 18 サイクルの PCR を行った後に、PCR 産物を 2.0%アガロースゲル泳動にて検出した。デンストメーターを用いて各バンドの濃さを半定量的に測定した。

## 2) PZ 発現調節のルシフェラーゼアッセイによる解析

プロゲステロンがPZの発現に寄与する機構を明らかにするため、PZ遺伝子の 5' -上流領域(-3058/+11)を挿入したpGL3-basicルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ活性測定をおこなった。10  $\mu$ g のレポーターベクターおよび  $\beta$  ガラクトシダーゼベクターを 3 x 10<sup>5</sup>個のHepG2細胞にトランスフェクトし、24時間培養した後に 1  $\mu$ g/mLの濃度となるようプロゲステロンを添加し、48時間後にルシフェラーゼアッセイに供した。

## 3) 組換え ZPI の哺乳類細胞と昆虫細胞での発現

新しい ZPI のアッセイ系を開発し、標準タンパク質として用いる為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞の樹立を試みた。DsRed タグとの融合 ZPI cDNA を BHK 細胞に一過性に導入し、無血清培地で 24 時間インキュベートした後に回収した培地および細胞溶解物を、抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 (共同研究者より供与されたもの) あるいは H-137 (市販のもの) を用いたウエスタンブロットにより解析した。

安定発現株を樹立する為に、BHK 細胞に ZPI 発現ベクターを導入後 G418 で選別し、得られたクローンの培養上清を抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析によりスクリーニングした。BHK-ZPI の培養上清 (0.2% BSA-DMEM) 1 mL に硫酸、PEG をそれぞれ 45, 75%, 10, 20% になるように加えて、生じた沈殿を溶解後ウエスタンブロット解析した。次に、BHK-ZPI の培養上清 90 mL から 75%硫酸で沈殿したタンパク質を透析脱

塩後、Heparin-Sepharose カラム (0.5 mL) にアプライした。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で洗浄後、0.1-1 M リン酸緩衝液の濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。

バキュロウイルス発現系でより大量の組換えタンパク質を得る為に、組換え型ウイルスを作製した。組換えウイルスを Sf21 細胞に感染後、3 日間血清フリー培地で培養して培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行った。

## 4) ヒト血漿からの ZPI 蛋白質精製の検討

Han らによって報告されている精製手順 (Proc Natl Acad Sci USA, 1998) を参考にし、

Step 1: クエン酸バリウム沈殿によるビタミン K 依存性タンパク質の除去

Step 2: 硫酸分画 (45-75%画分)

Step 3: ポリエチレングリコール(PEG)分画 (7.5~18%画分)

Step 4: 陽イオン交換クロマトグラフィー (Phosphocellulose)

Step 5: ヘパリンセファロース

について、一部のステップを組み合わせて別々に実施し、精製効率の検討を行った。

Step 3 については、ヒト凍結血漿 10 mL をクエン酸バリウム吸着後、上清について硫酸分画を行った。沈殿を 10 mL の 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM diisopropylfluorophosphate (DFP) に溶解した。次に、各硫酸画分に PEG を添加して分画した。沈殿は 5 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解した。Step 4 については、90 mL の凍結血漿をバリウム吸着後、30-75%硫酸画分、7.5-18% PEG 画分を順次回収し、40 mL の 0.1% Tween 20, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解したものを Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。Step 5 については、Phosphocellulose 画分 (6-10) を 0.1% Tween 20 で 3 倍に希釈後、Heparin-Sepharose カラム (4 mL) にアプライした。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4) で洗浄後、20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出

した。

各精製のステップの前後で、ZPI を抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 を用いたウエスタンブロットにより検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の組換え DNA 実験については山形大学遺伝子組換え実験安全委員会の、動物実験については山形大学動物実験委員会の審議と承認を得て行う。

## C. 研究結果

### 1) PZ および ZPI の発現量に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

PZ および ZPI のエストラジオールおよびプロゲステロンによる発現の変化を調べたところ、PZ は、エストラジオールの添加では有意な発現の増加が見られなかったが、プロゲステロンの添加により有意に発現が亢進した ( $p < 0.05$ )。エストラジオールとプロゲステロンを同時に添加すると、更に発現が亢進する傾向が見られた。一方、ZPI は、エストラジオールおよびプロゲステロンを添加しても、その発現に有意な差が見られなかった。

### 2) PZ 遺伝子発現に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

ルシフェラーゼアッセイの結果でも、RT-PCR と同様に、PZ 遺伝子を導入した細胞をプロゲステロンで処理すると有意に発現活性が亢進することが観察された ( $p < 0.005$ )。一方、エストラジオール添加では有意な差は見られなかった。

### 3) 組換え ZPI の哺乳類細胞及び昆虫細胞での発現

抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 によって、DsRed 融合 ZPI が約 80 KDa の位置にウエスタンブロットで培養上清中に検出された。別の H-137 を用いたウエスタンブロットでも、DsRed 融合 ZPI が約 80 KDa の位置に検出されたが、やや感度は低かった。これにより、哺乳動物細胞発現系で分泌型組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。次に、安定発現細胞株を樹立して、組換えタンパク質をより多く発現するクローン

を得た。組換え ZPI は、0-45%より 0-75%硫酸分画に多く、0-20%よりも 0-10%PEG 分画に多く得られた。Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、組換え ZPI はフラクション 4-7 に溶出された。

単離した組換えバキュロウイルス (rbvZPI) を感染させた Sf21 細胞の培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量約 58kDa と哺乳類細胞で発現した組換え ZPI よりやや小さかった。これは、昆虫細胞では、炭水化物付着部位に糖の付加がされていないためと思われる。

### 4) ヒト血漿からの ZPI 蛋白質精製

硫酸分画では、0-45%、45-75%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、Han らの報告と異なり 0-45%により多く得られた。PEG 分画では、0-7.5%、7.5-17.5%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、0-7.5%により多く得られた。Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでは、フラクション 7-10 に ZPI タンパク質が溶出された。Heparin-Sepharose クロマトグラフィーでは、フラクション 6-8 に ZPI タンパク質が溶出された。ただし、フラクション 4, 5 にも大量のアルブミンの干渉を受けたと思われるバンドの痕跡が認められた。

## D. 考察

前年度の研究により、ZPI と PZ の血中レベルが妊娠期に上昇すること、不育症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理的意義、不育症における因果関係は不明であり、妊娠時に増加する女性ホルモンの両遺伝子の発現調節機構に対する影響も全く解明されていない。

両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。更に、エストロゲンとプロゲステロンの ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を追究する必要がある。

哺乳動物細胞発現系及びバキュロウイルス発現系の両方で、組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。昆虫細胞で発現された組換え ZPI のバンドの分子量は約 58kDa と哺乳類細胞で発現されたものよりやや小さかったが、炭水化物付着部位に糖の付加がないためと思われ、このバンドは目的の ZPI タンパク質であることを示していると考えられた。

血漿からの ZPI タンパク質の精製の各ステップの条件検討を行ったところ、それらしい分子量のバンドが特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出された。今後、精製組換え ZPI を用いて、より特異性の高い抗体を検索もしくは作製し、その抗体と本抗体を用いて新 ELISA アッセイ系を構築する予定である。

ただし、ウェスタンブロッティングによるスクリーニングでは、ZPI がアルブミンとほぼ同じ移動度を示すため、膜への転写効率が低下し検出に影響があることも明らかである。従って、極力早い段階でアルブミンと分離することや、ZPI の抗凝固活性を指標とすることも検討したい。血漿 ZPI 濃度は~3 mg/L であるので、各ステップの収率から概算すると、数百 mL の血漿が必要と思われる。

#### E. 結論

妊娠期における ZPI と PZ の血中レベルの変動に関与する女性ホルモンのそれぞれの遺伝子の発現機構に対する影響の一端が明らかになり、病態の解明に一步前進した。

また、ZPI の組換えタンパク質の生合成に成功し、これを検出する特異的抗体も確認したので、新 ELISA アッセイ系の開発に着手することが可能になった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A: Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin

K-dependent and warfarin-sensitive secretion. *Blood* 2009, 113(6): 3857-3864.

- 2) 一瀬白帝: 不育症と凝固XIII因子. *日本血栓止血学会誌*, 2009 ; 20(5) : 519-526.
2. 学会発表
  - 1) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 正常妊娠と不育症におけるプロテインZおよびプロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第9回TTMフォーラム学術集会, 東京: 2009年3月7日
  - 2) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 妊娠および不育症におけるプロテインZおよびプロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第32回日本血栓止血学会学術集会, 北九州; 2009年6月4-6日
  - 3) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Nakagaki T, Ichinose A:  $\gamma$ -Glutamyl carboxylase is a cargo receptor for vitamin K-dependent proteins. XXII International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress with 55th Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, July 11-16, 2009, Boston, MA, USA
  - 4) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 翻訳後修飾反応を触媒する $\gamma$ グルタミルカルボキシラーゼは基質タンパク質の細胞内輸送における積荷受容体として働く. 第17回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2009年12月16日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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
Souri M, Iwata H, Zhang WG, <u>Ichinose A</u>	Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood	113(6)	3857-3864	2009
<u>一瀬白帝</u>	不育症と凝固 XIII 因子.	日本血栓止血学会誌	20(5)	519-526	2009