細胞レベルでの凝固因子遺伝子の発現

松下 正* 恵美 宣彦*

Mammalian Expression Systems for Human Blood Coagulation Factors

Tadashi MATSUSHITA* and Nobuhiko EMI*

Key words: blood coagulation, expression, retrovirus, vector, SV-40 virus

1. はじめに

凝固因子遺伝子クローニングが集中的に行われた1980年代以降、これらの遺伝子の細胞レベルでの発現が数多く検討されてきたが、近年、リコンビナント蛋白の臨床領域における利用も急速に広まり、この分野への関心が高まっている。高等動物細胞を用いた組み換えタンパク質の発現系は操作の煩雑性にも関わらず、天然に近い posttranslational modification が得られるなど、大腸菌によって発現されたものに比べ得がたい特徴を有する。

筆者らの研究室では、将来、遺伝子治療に適用できる技術であるレトロウイルスベクターを用いた凝固因子遺伝子の発現に関して検討している。一方、一過性に目的遺伝子を培養細胞に導入する方法として、DEAE-Dextran を用いた Transient expression も操作の簡便さという点でパイロット的な遺伝子発現の実験に適していると言える。本稿ではわれわれが実際に使用している高等動物細胞への遺伝子導入法のいくつかを紹介することとした。

2. COS-7細胞を用いた凝固因子遺伝子の一過性導入 (transient expression)

COS細胞はSV40のT抗原を発現することにより transform されており、これにSV40

ウイルスの複製開始点を持ったベクター (episomal vector) を導入した場合、ベクターは細胞内で episome として増殖し、プロモーターの下流に挿入された遺伝子は一過性に細胞内で発現する。この発現率はCOS細胞の代わりにCV1 (COS細胞の親株) を用いた場合に比して数百倍と言われている¹⁾。DEAE-Dextran 処理によるDNAの細胞内への取り込み及び核への輸送のメカニズムについてはあまりよくわかっていない。おそらくDNAとDEAE-Dextranの高分子複合体は細胞の endocytosis により取り込まれ易いものと考えられる。これらの vector は、それ自身が宿主細胞の染色体内に取り込まれる必要がないため、高い形質転換効率が得られるし、また Transfection 後の Vector DNA の回収が容易に行なえるため、いわゆる expression cloning に適している。ただし、あくまで細胞質内の episome として存在するだけなので、細胞ごとのベクターのコピー数が一定ではない点に注意する必要がある。

Fig. 1 に一過性発現ベクターの一例を掲げた。リコンビナント蛋白の発現はいくつかの要素により左右される。たとえば promoter の強さは転写効率に影響を与えるし、cDNA の直前の配列 (GC tail) は翻訳効率に影響を与えると言われる。ただし、promoter の強さは必ず

* 名古屋大学医学部第一内科〔〒496 名古屋市昭和区鶴舞町65〕: First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, 65-Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan.

Fig. 1 Structure of the transient expression vector pEUK-CI containing a cDNA of human blood coagulation factor VII

Factor VII is first transcribed by the SV 40 late promoter and spliced by VP 1 intron and SV 40 late polyadenylation signal. The vector has pBR322 origin and SV 40 origin for the replication in each cell. We transfected 1 μ g of the vector into COS-7 cells by DEAE-Dextran transfection. The cell supernatant following transfection contained human factor VII of 5 ~10% of normal human plasma⁴⁾.

しもその配列のみによって決まるのではなく、各細胞ごとで違う。また、cDNA の 3' 側の配列は転写された mRNA の安定性に関係があるといわれている。

2-1 Transient expression の実際 (文献 2 参照)

2-1-1 用意するものおよび試薬

- * COS-7 細胞
- * 3.5 cm plastic well (Falcon 社)
- * 培地: Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM, Gibco)-10%FCS
- * 50 mM Tris-IMDM (pH 7.4)
- * DEAE-Dextran (Pharmacia, 50 mg/ml の濃度に調整したもの、オートクレーブ可)
- * Chroloquine diphosphate (Sigma, 100 mM の stock solution を調整し、filter にて滅菌)

* トリプシン (0.25%) 溶液

* Phosphate buffered saline (PBS)

2-1-2 プロトコール

(1) COS-7 細胞をあらかじめ $1 \sim 3 \times 10^5$ 個/well になるように蒔き、IMDM-10%FCS にて 24 時間 5%CO₂ にて培養する。60~70% confluent の状態で、transfection を行うのがよい結果を得られる。

(2) transfection の直前に 1 mg/ml DEAE-

Dextran, 50 mM Tris-IMDM 溶液に plasmid, 1~10 μ g を調整する。

(3) 細胞を PBS にて洗浄し(2)の solution (3.5 cm well であれば 300 ~ 500 μ l ぐらいの volume) で well 上に完全に行きわたらせ、約 30 分インキュベートする。この時間はあまり長すぎても細胞のダメージにつながるの、それぞれの実験に於いて条件を設定する必要がある。

(4) 細胞を、50 mM Tris-IMDM で洗浄した後、100 μ M の chroloquine を含む 50 mM Tris-IMDM で 3~4 時間インキュベートする。chroloquine の長時間作用はやはり細胞に著しいダメージを与えるので、これも各実験ごとに調整する。

(5) 50 mM Tris-IMDM で細胞を二回洗浄し、1.5 ml の 10%FCS - IMDM にて 24~72 時間培養する。vitamin K 依存性凝固因子を発現しようとする場合には培養液中に vitamin K を添加する必要がある。vitamin K1 なら 5 μ g/ml 程度、vitamin K2 なら 100 ng/ml 程度の濃度がよい。血清中には微量ながらウシ由来の凝固因子が含まれていることがあり、培養上清中の凝固因子の活性化を検討する場合には注意が必要になると思われる。上清中の凝固因子を簡便に精製したい場合や、上清の clotting assay において血清の干渉を受けたくない場合などでは、24 時間後、血清を含まない IMDM に培地交換し、数日後、上清を採取する。血清非含有培地を用いた場合は、血清含有培地よりも上清中に発現される目的蛋白量が少なくなるが、後の解析が容易となる。

3. レトロウイルスベクターを用いた真核細胞への遺伝子導入

レトロウイルスは、ウイルスに対するレセプターが存在すれば、原理的にはどのような細胞にも感染する。ウイルスゲノム (proviral genome) は必ず 1 細胞 1 コピーずつ組み込まれ、レトロウイルスの LTR の間に組み込まれた目的蛋白質は宿主細胞において、安定して産生され、この方法は外来遺伝子を広く高等動物細胞に移入し、発現させる有用な方法の一つと

Fig. 2 Mode of infection and replication of retroviral vectors.

言える。しかもプライマリーの細胞に対してウイルスを感染させることによって *in vivo* において目的蛋白質を発現することが可能で、遺伝子治療の有用な手段の一つとして期待されている。

3-1. レトロウイルスの生産環

レトロウイルスは現在、単純（マウス白血病ウイルスなど）、複雑（ヒト T 細胞白血病ウイルスなど）の二つに分類されているが、レトロウイルスベクターの基礎になっているのはマウスのモロニー白血病ウイルス（MMLV）のプロウイルスである。ウイルス粒子は細胞表面にあるウイルス外被糖蛋白に対するレセプターに吸着し、細胞内に侵入する。そしてウイルス粒子内にある RNA 依存性 DNA 合成酵素の働きにより、ゲノム RNA は DNA に逆転写され、宿主細胞のゲノム DNA に取り込まれる。組み込まれた状態のウイルス DNA をプロウイルスと呼ぶ。一度プロウイルスが形成されると宿主細胞の転写、翻訳メカニズムを利用して、mRNA が発現し、蛋白が合成される。プロウイルスには3種の蛋白を合成するよう、gag（ウイルス粒子内の構造蛋白）、pol（逆転写酵素）、env（外被蛋白）の遺伝子が並んでおり、合成された核蛋白は細胞質周辺に集まり、RNA ウイルスゲノムをパッケージして発芽する。ウイルス RNA にはパッケージシグナルが存在しており、この部位がタグとなってアセンブリーの中核になる。

このレトロウイルスの性質を利用したのがレ

Fig. 3 Plasmid construction of the retroviral vector pL9RNL.

The MMLV-based retroviral vector pL9RNL contains the Neo-resistance (Neo^R) gene under control of the promoter of Rous sarcoma virus (RSV). A 1.4 kilobase pair (kb) human factor IX cDNA was inserted, giving rise to the construct pL9RNL.

トロウイルスベクターシステムである。このシステムはベクターとヘルパー細胞（パッケージング細胞）から成り立っている（Fig. 2）。ヘルパー細胞はウイルスの構造蛋白（gag, pol, env）を発現しているが、ウイルスゲノムのない細胞をいう。ベクター DNA はウイルスゲノムのようにウイルス粒子に取り込まれるためのパッケージングシグナルや LTR を持っているがウイルス複製に必要な遺伝子を持っておらず、代わりにその部分に人工的に移入したい遺伝子を入れることができる。したがって、任意の遺伝子を組み込んだベクター DNA をヘルパー細胞に入れることにより、ヘルパー細胞が作っているウイルス粒子蛋白と、ベクターゲノムがウイルス粒子を形成し、分泌される（この細胞を Producer 細胞と呼ぶ）。このようにして形成されたウイルス粒子はターゲット細胞に感染した後その細胞の核に組み込まれベクター内に挿入された遺伝子が発現する。ウイルス複製に必要な遺伝子（gag, pol, env）は挿入されていないので、子孫のウイルスは合成されず、感染はこれ以上広がらない。このことはベクター系の安全を考えるうえで大切なことである。Fig. 3 にわれわれが作成した第 IX 因子 cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターを示した³⁾。

3-2 レトロウイルスベクター使用上の注意点

(1) ベクター作製上の条件

ベクターゲノムがウイルス粒子に取り込まれ

るためには (1) LTR (long terminal repeat) によって両側を囲まれていること (2) パッケージングシグナルを持っていること (3) 5' LTR から 3' LTR までの大きさが 8~9 kb を越えないことが必要である。

(2) ヘルパー細胞の種類

現在汎用されているヘルパー細胞は ectropic (同種指向性) virus 由来の Ψ -2, GP+E-86, amphotropic (異種指向性) virus 由来の PA-317, PA-12 などがある。前者はマウス細胞のみに感染が成立し、後者はヒト, ラットなどにも感染する。

3-3 レトロウイルスベクターを用いた真核細胞生物への遺伝子導入

3-3-1 試薬および用意するもの

- * 3.5 cm plastic well (Falcon 社)
- * 24 well plate (Falcon 社)
- * 培地: IMDM-10%FCS
- * ヘルパー細胞 GP+E86 (ectropic)
PA317 (amphotropic)
- * ラット 208 F 細胞
- * マウス NIH3T3 細胞
- * Millipore 0.45 μ m の Filter
- * Polybrene (4 mg/ml の stock solution, filter にて滅菌)

* G418 (Geneticin®, GIBCO, 50 mg/ml の stock solution)

3-2 プロトコール

(1) ヘルパー細胞の調整は定法に従い, 5% CO₂ 下で培養し, transfection の前日に約 2×10^5 個/well (3.5 cm well) の濃度に調整する。

(2) 翌日これに対し, 通常のリソカルシウム法で, transfection を行う⁴⁾。ベクターは約 10 μ g あればよい。

(3) 37°Cで一晩インキュベートした後, 翌日上清を集め, 遠心後, 0.45 μ m の Filter を通してこれをやはり前日に用意しておいた別のヘルパー細胞の培養液とする (4 μ g/ml の Polybrene 存在下)。この時点で G418 selection に入ってもよいが, このように, 最初の transfection で一過性に出てきたウイルスを集めて感染させたほうが, よりウイルス力価 (Titer) の高いクローンが得やすい。

(4) さらに 24 時間後 500 μ g/ml の G418 で selection を開始する。約 2 週間後発育してきたコロニーを pick up して 24 well の plate にそれぞれ harvest し, confluent になったところで上清中の凝固因子活性を EIA などで測定し, 最も蛋白産生量の高いコロニーを選んで以後の実験に用いばよい。

(5) このようにして樹立された初代 Producer 細胞から産生される組み換えウイルスを他の細胞に感染させることができる。上清中のウイルス粒子の titer の測定は, 同様にヘルパー細胞の培養上清をラット 208F 細胞や, マウス NIH3T3 細胞に感染させ, 2 週間後の G418 resistant colony の数で判定する。得られたコロニーはそのまま組み換え蛋白質産生細胞として用いる。

4. 終わりに

昨今の PCR を初めとした遺伝子解析技術の急激な進歩によって, 遺伝子レベルにおいて多くの凝固因子異常が調べられている。細胞レベルでの異常遺伝子の発現のメカニズム, あるいはリコンビナント異常蛋白そのものの解析の手段としても, これら高等動物細胞に対する遺伝子導入の技術は有効な方法と言えるだろう。

文 献

- 1) Glunzman, Y.: SV-40 transformed simian cells support the replication of early SV 40 mutants. *Cell*, 23: 175~182, 1987.
- 2) Maruyama, K., Wang, H.M., Miyajima, A., Takebe, Y. & Arai, N.: Transfection of cultured mammalian cells by mammalian expression vectors. (Karam, J.D., Chao, I. & Warr, G.W.: *Methods in Nucleic Acids Res*) CRC press Boca Rator, Ann Arbor Boston, 1991, 283~305.
- 3) 恵美宣彦, 斉藤英彦: 遺伝子治療の可能性—血友病 B をモデルとして. *実験医学*, 9: 348~351, 1991.
- 4) Emi, N., Friedmann, T., Yee, J.K.: Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis. *J. Virol*, 65: 1202~1207, 1991.
- 5) Matsushita, M., Emi, N. & Saito, H.: 投稿中.