

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業））
分担研究報告書（平成25年度）

HBV（HBs抗原）の糖鎖解析

| | |
|------|-------------------------|
| 梶 裕之 | 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター |
| 久野 敦 | 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター |
| 伊藤浩美 | 福島県立医科大学・医学部・生化学講座 |
| 田尻和人 | 富山大学附属病院・第三内科診療部門 |
| 是永匡紹 | 国立国際医療研究センター・肝炎免疫研究センター |

研究要旨：HBV感染におけるHBV自身に存在する糖鎖の機能を理解するために、HBsタンパク質の糖鎖構造情報を、2つの異なるアプローチによって取得することを計画し、それぞれの分析条件を確立した。ひとつは、富山大学から提供いただいた抗HBsモノクローナル抗体を用いることで、血清からHBVウイルス粒子を効率よくエンリッチし、レクチンアレイ解析するまでのプロトコルを確立した。微量患者血清中HBV粒子の解析が可能となり、質量分析による解析結果と一致する糖鎖プロファイルを得た。質量分析では、B型肝炎患者プール血清より精製されたサブバイラルパーティクル(SVP)を構成するHBsタンパク質の解析から、Pre-S1、Pre-S2、およびS領域にそれぞれ1カ所のN型糖鎖付加部位が同定された。このうち、M型HBs(Pre-S2)、S型HBs(S)にはシアリル化2本鎖複合型糖鎖が結合していることを同定した。

A. 研究目的

HBVウイルス粒子エンベロープに局在する表面抗原分子HBsは糖タンパク質であり、この糖鎖付加部位の変異、糖鎖欠失によってパッケージ不全が生じるなど、HBV粒子の形成や感染、増殖に糖鎖が関連している報告があるが、その詳細は不明である。B型肝炎治療薬を開発するにあたり、HBVにおける糖鎖の機能を理解することは重要であり、HBsタンパク質の糖鎖構造から、最終的には未変性HBVウイルス粒子における糖鎖集合状態を含めた構造特性を明らかにし、創薬の基盤情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

1. レクチンマイクロアレイによるHBV粒子の

糖鎖プロファイリング：患者血液中のHBVウイルス粒子上の糖鎖構造を迅速かつ簡易に解析するためには、(1)超遠心器などに頼らない簡便な前処理手法、(2)ナノグラムオーダーで糖鎖構造情報を入手可能な解析手法が必須となる。昨年度有用な抗体を入手することができなかったため、抗体の検討を継続した。本年度は富山大学医学部田尻和人博士が作成した複数の抗HBsモノクローナル抗体を対象に、ウェスタンブロット(WB)、免疫沈降(IP)、および抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法(LA)に利用可能な抗体を精査した。一次評価実験においては、大阪赤十字病院より提供いただいたHBV患者プール血清から超遠心により分離分画したHBV粒子(加熱不活性化済み)および健常者血清に一定量の本HBV粒子を混入し

た溶液を用いた。二次評価実験では、HBsAgのカウントが10,000 IU/mLを超えるジェノタイプCのHBV感染患者血清を用いた。なお、本患者血清は国立国際医療研究センター肝炎情報研究センターより提供され、同施設にて前処理およびウイルスの不活性化が行われたのちに処々の分析に使用した。

2. HBs タンパク質の質量分析による糖鎖構造解析：はじめに、B型肝炎患者プール血清より精製したサブバイラルパーティクル(SVP)からPNGase、およびアルカリ性脱離反応によって、N型及びO型糖鎖を順次遊離し、質量分析で構造解析した。ついで、HBs タンパク質における糖鎖構造を明確に規定するため、HBs ペプチドと糖鎖が結合した状態で構造解析し、どの部位にどのような糖鎖が結合しているかをLC/MS(質量分析法)によって分析した。はじめにN型糖鎖付加部位を同定するため、SVPタンパク質(ヒト血清由来)を還元アルキル化の後、プロテアーゼ消化し、糖ペプチドを親水性クロマトグラフィーにより精製した。糖ペプチド画分を糖鎖切除処理(IGOT標識)後、LC/MS分析により、糖鎖付加部位を決定した。さらに糖ペプチドのままLC/MS分析し、糖鎖構造情報を収集した。S-HBsでは、S領域にN型糖鎖は一カ所結合しているため、ゲル電気泳動によってS-HBsを精製し、糖鎖分析を行った。また、Pre-S1/S2領域における糖鎖構造解析のためには、SVPを還元、変性することなく糖ペプチド部分をプロテアーゼにより遊離させ、構造解析を行った。

C. 研究結果

1. 提供いただいたモノクローナル抗体6種から、WB, IP, LAを用いた抗体の一次評価により最適な抗体を1つ選抜した。抗体を固定し、各工程の条件を最適化した。前処理工程では、プレクリアの導入などにより、以後のWBやLA

解析に耐えうるだけの純度のウイルス粒子をエンリッチする条件を見出した。LAでは、今回の抗体の変更により、検出感度が向上し、そのLOQは5 ngであり、LODは1.25ngであった。その糖鎖プロファイルは、既報や本プロジェクトにて得られた質量分析による構造解析結果と一致するものであった。以上によりプロトコルが確立したため、二次評価実験として、患者血清由来のHBV粒子の解析を行った。その結果、HBsAgカウントに依存してレクチンシグナルの強度が変動した。現時点ではHBsAgカウントが10000 IU/mLの血清では、IPからLA, WBまでに15 µLが必要であった。

2. ヒト血清由来SVPをトリプシン、Lys-Cエンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ、キモトリプシンなどで消化し、生じた糖ペプチドの配列をIGOT-LC/MS法で分析した。電気泳動像ではS型HBsが主要成分であったが、S型だけでなく、LおよびM型HBsのPre-S1およびPre-S2領域に由来する糖ペプチドが同定され、S型では1箇所、M型では最大2箇所、L型では最大3箇所のN結合型糖鎖付加が認められた。糖ペプチド画分のLC/MS分析で、M-HBsのPre-S2領域には末端Met残基のアセチル化と酸化、と糖鎖付加が共存していることが判明し、翻訳後膜透過が生じていることが明らかとなった。またこの領域には2本鎖構造のみが検出され、他の骨格構造の糖鎖は見出されなかった。同様に、S-HBsのS領域にも2本鎖構造のみが検出された。

D. 考察

1. 昨年度より懸案事項となっていた本課題に有用な抗体を入手できた。興味深いことに今回WBによる検証に用いた抗体はいずれも、2つのS型HBsのうちp25にのみ反応を示した。一方、レクチンはP25には反応せず、gp28に反応することが判った。つまり、ウイルス粒子

の構成タンパク質が複合体形成してはじめてレクチンアレイ解析ができる、言い換えれば粒子からタンパク質分子を解離したのちにはアレイ解析ができないことになる。また複合体形成状態での解析は、クラスター効果により WB および LA におけるシグナル検出の感度を 100 倍近く高めることが判明した。

2. ヒト血清由来 HBs タンパク質には長さ(タイプ)に従い、1 ないし 3 箇所の糖鎖付加部位が同定された。S 型における電気泳動パターンより S 型 HBs に存在する糖鎖付加部位 1 箇所に於ける糖鎖占有率はおよそ半分であった。L 型 Pre-S1 領域に糖鎖付加が観察されたことから、Pre-S1 領域がウイルス粒子の外側に向けた配向の L-HBs の存在が示唆された。糖鎖構造解析からは 2 カ所から 2 本鎖のみが検出された。SVP から遊離された糖鎖全体の構造パラエティクから、他の部位に 2 本鎖以外の糖鎖がついている確率は低いと予想される。

E. 結論

1. レクチンアレイによる糖鎖解析に使用する抗体を入手し、患者血清を対象とした解析プロトコルを確立できた。次年度はより多くの患者血液中の HBV 粒子の比較糖鎖解析を行い、HBV 粒子上の糖鎖に臨床パラメータと関連のある構造変化が生じるかを検証する。
2. HBs 糖鎖付加部位の同定と一部、糖鎖構造を解析し、同定した。今後、ワクチンの抗原とする HBs には 2 本鎖糖鎖(ただしシアリル化された構造)を付加させたものを用意し、現在使われている糖鎖無しの抗原と抗原性や産生される抗体の性状などを比較することが重要と考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **Kuno A**, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H. Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling. *Proteomics Clin Appl.* 7, 642-647 (2013).
- (2) **Kaji H**, Ocho M, Togayachi A, **Kuno A**, Sogabe M, Okura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J. Proteome Res.* 12, 2630-2640 (2013).
- (3) Tan B, Matsuda A, Zhang Y, **Kuno A**, Narimatsu H. Multilectin-assisted fractionation for improved single-dot tissue glycome profiling toward clinical glycoproteomics. *Mol. Biosys.* 10-2, 201-205 (2014).
- (4) Ocho M, Togayachi A, Iio E, **Kaji H**, **Kuno A**, Sogabe M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor is a glyco-biomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res.* 13-3, 1428-1437 (2014).
- (5) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, **Kuno A**, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, **Korenaga M**, Mizokami M, Nishie A, Aishima S,

Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. J Gastroenterol. Accepted (2014).

2. 学会発表

- (1) **久野 敦**ら. Lectin microarray assists development of the glycodiagnostic systems for direct measurement. The 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (2) **久野 敦**ら. Glycome mapping of mouse tissue samples by means of lectin microarray. 日本・オーストリア二国間セミナー. 理研鈴木梅太郎ホール (和光). 2013/07/02
- (3) **久野 敦**. Development of quantitative glyco-indices for hepatic diseases. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (4) **久野 敦**ら. Application of the lectin microarray system to glycome mapping of mouse FFPE tissue sections. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (5) 譚 斌斌ら. Improvement of lectin microarray-based tissue glycan profiling with lectin-assisted fractionation for glyco-biomarker discovery. 12th HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (6) **久野 敦**ら. It's coming to the end: Development of glyco-diagnostic kit for evaluating liver fibrosis. 5th ACGG Thailand. Khon Kaen. 2013/10/16
- (7) Yamasaki K ら. WFA⁽⁺⁾-M2BP is a new and unique glycobiomarker to predict the development of HCC in patients with chronic HCV infection. 64th Meeting of AASLD. Washington. 2013/11/01
- (8) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Development of glyco-biomarker for liver disease. 22nd International Symposium on Glycoconjugates. 大連. 2013/06/25
- (9) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Application of glycoproteomics for development of serum biomarker of liver disease. HUPO 12th. 横浜. 2013/09/15
- (10) 藤田 弥佳、**梶 裕之**、**久野 敦**、鹿内 俊秀、鈴木 芳典、澤木 弘道、成松 久. Large-scale identification of mouse and human N-glycoproteins and data sharing through an experimental-based glycoprotein database, GlycoProtDB. HUPO World Congress. 横浜. 2013/09/17
- (11) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Development of serum glycobiomarker of liver cirrhosis. 5th ACGG Conference. タイ王国. 2013/10/17
- (12) 雄長 誠、梅谷内 晶、**梶 裕之**、**久野 敦**、飯尾 悦子、曾我部 万紀、田中 靖人、池原 讓、溝上 雅史、成松 久. Application of the glycoproteomics-based strategy for development of serum biomarkers. 糖鎖プロテオミクスを基盤とした血清バイオマーカー開発戦略の応用. 日本生化学会. 横浜. 2013/09/13

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

[国内特許 登録]

- (1) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法
および糖タンパク質定量用試薬. 成松 久ら.
特 5441280. 2013/12/27

[国外特許 出願]

- (1) 糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイ
ソフォーム検出装置. 成松 久ら.
PCT/JP2013/071653 (WIPO) . 2013/08/09
- (2) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、
糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
14/051729 (米国) . 2013/10/11

[国外特許 登録]

- (1) 糖鎖あるいは複合糖質の解析装置, **久野 敦**
ら, 8597576 (米国) . 2013/12/03
- (2) 糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、
糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指
標糖鎖マーカー糖タンパク質. 成松 久ら.
8623608 (米国) . 2014/01/07

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし