

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

千葉靖典 産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門

A. 研究目的

B型肝炎はC型肝炎と比較して治療成績が低く、画期的な新規治療薬の開発が望まれている。国民のニーズの高いB型肝炎の画期的な新規治療薬の開発等を目指し、基盤技術の開発を含む創薬研究や、治療薬としての実用化に向けた臨床研究等を総合的に推進するためには、治療用も含め新たなワクチン開発が重要である。

我が国で使用されている主なHBVワクチン（HBs抗原）は酵母由来である。その製品としてはヘプタックス（Merck社、GenotypeAを認識）、ビーメゲン（化血研、GenotypeCを認識）があげられる。これらはHBs抗原のS領域を酵母で発現させており、糖鎖は付加されていない。近年、これらのワクチンを接種したにも関わらず、B型肝炎に罹患する例が増えてきている。その原因としてはHBVエスケープミュータントの発生の可能性もあるが、免疫源としたHBs抗原のS領域に対してできた抗体が、感染したB型肝炎ウイルスを十分に認識していない可能性が指摘されている。実際に免疫してできた抗体のエピトープ解析の結果では、糖鎖が付加されるS領域のループ構造に対して抗体ができていない。このことは、糖鎖を持ったB型肝炎ウイルスでは立体障害により抗体が結合できない可能性がある事を示唆している。従って、より天然に近いHBs抗原をワクチンとして利用する事により有効性が高くなる可能性がある。

研究分担者の千葉は、これまでに酵母によるタンパク質発現に関する研究を行ってきた。さらにヒトと同じ形の糖鎖を付加できる「ヒト型糖鎖含有タンパク質生産酵母」(天野、千葉、成

松ら PNAS 2008) を保有しており、これらの技術とツールを活用し、より効果の高いHBVワクチンの開発を検討する事を目的とする。

B. 研究方法

(1) HBs 抗原の発現

出芽酵母にHBs抗原の遺伝子を導入したクローンを前培養後、5Lの1xカザミノ酸-Ura培地（0.67%酵母ニトロゲンベース w/o アミノ酸、1%カザミノ酸、2%グルコース、40 μg/ml トリプトファン、40 μg/ml アデニン 1/2 硫酸塩）に植菌し、30、120時間培養を行なった。遠心により菌体を分離後、その上清の一部をSDS-PAGEに供し、PVDF膜に転写後、ウエスタンブロット解析により発現の確認を行なった。一次抗体としては市販の抗HBs抗体(抗PreS1モノクローナル抗体(マウス); 特殊免疫研究所、またはHepatitis B surface Antigen A, Goat Antibody; PROSPEC)を用い、二次抗体は抗マウスIgG抗体-ペルオキシダーゼ、または抗ヤギIg抗体-ペルオキシダーゼを使用した。検出はECL Western Blotting Detection Reagents (GE)を用いイメージアナライザー (GE LAS-1000)で行なった。

(2) HBs 抗原の精製

HBs抗原の精製については、従来報告のあるButyl-Sカラム、DEAEカラム、ゲルろ過カラム (GE)などを用いて検討した。また前処理の方法として、塩溶、尿素やグアニジン塩酸による変性と透析による精製、フィルター (Millipore) 処理などを検討した。

(3) 倫理面への配慮

本課題は産総研の組換え DNA 実験委員会の承認を得ている。本分担課題では、患者さんの遺伝子情報、細胞等には取り扱わない。また本年度実験動物は取り扱わないことから、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

昨年度までに、4種類のHBs抗原をコードする遺伝子を全合成し、酵母のプラスミドベクターに挿入し、野生型酵母の形質転換を行なった。現在上市されているB型肝炎ワクチンは、HBs抗原のS領域を酵母細胞内で発現している。これまでワクチンとしてL領域を発現させた例があまりないことから、pre-S1、pre-S2を含む全長を発現させた。さらに糖鎖構造がより天然に近いワクチンの方がエスケープミュータントの抑制に効果があると考えられたため、糖鎖付加が起こるようにシグナルを付加して、分泌経路を通過させて培地中に分泌させるようにした。その結果、Genotype A 1種類、Genotype C 1種類のHBs抗原を糖鎖が付加された形で発現させることに成功した。この培養上清に発現したHBs抗原は抗pre-S1抗体でも検出されたことから、L領域のN末端を含む形で発現していることが確認された。

今年度は、まず酵母の培養上清からのHBs抗原の精製を検討した。培地の条件検討を行ったところ、YPAD培地や2xカザミノ酸培地に比較し、比較的低栄養源である1xカザミノ酸培地が適していると考えられた。一方、過去に報告のあったスクロースと無機塩を含む合成培地では生産が確認されなかった。次に1xカザミノ酸培地でHBsAg発現酵母を培養し、培養上清を透析した後、硫酸塩析の条件検討を行った。10%飽和硫酸の条件でもHBsAgは沈殿してくることが判明したため、培養上清に10%飽和となるように硫酸を添加し、遠心により得られた沈殿

を10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)に溶解して-20℃で保存することとした。以後はこの溶液から適宜HBsAgを精製することとした。

次に培養時間の検討を行った。24時間毎、120時間まで培養を行ない、経時的にサンプリングして、ウエスタンブロット解析を行なった。その結果、120時間まで発現が増加し、またポリクローナル抗体を用いた分析でも分解も見られなかったことから、120時間培養を行なうこととした。また15000rpmで遠心を行なうとHBsAgは沈殿することから、微粒子またはタンパク質複合体として存在していることが示唆された。そこで、遠心機の回転数を変化させて沈殿する条件を検討したところ、3000rpmでも沈殿することがわかった。このHBsAgを含む沈殿物はsonicationでは可溶化しないことが示されたため、尿素やグアニジン塩酸を用いていったん変性させ、その後徐々に透析することでHBsAgを回収することを検討した。その結果、8M尿素、6Mグアニジン塩酸で処理することによりHBsAgは可溶化することがわかった。一方、0.5M NaClでは可溶化されなかった。このサンプルを透析後、0.45μmのフィルター処理を行なったが、HBsAgはフィルターを通過することが確認された。以上の結果から、培養上清を遠心後、8M尿素による変性、透析、フィルター処理という、HBsAgをカラム精製するための前処理法を確立した。またSDS-PAGE後の染色はCBBにより行なっていたが、より感度よく検出するため、Oriole Gel染色法を用いることとし、その染色条件を確定した。

前処理したサンプルをまず陰イオン交換カラムであるHitrap DEAEに供し、NaClによるグラジエントによりHBsAgを溶出した。ウエスタンブロットの結果から、HBsAgは0.2-0.45M NaCl溶出画分に溶出されていることが示唆された。しかしながら、Oriole染色では多

数のバンドが確認されたため、次に 1 M 尿素を添加したバッファーで精製を試みた。尿素を添加しないときと比較し、ピークがシャープになり、またクロマトパターンもシンプルになった。そこで DEAE 樹脂を初期精製用のカラムとして選択し、シグナルが確認されたフラクションを集めて、0.86 M の硫酸を添加し、Butyl-S カラムに供した。

疎水性カラムである HiTrap Butyl-S カラムによる精製のため、まず硫酸アンモニウム（硫酸）での塩溶限界を調べた。その結果、20%飽和硫酸では沈殿しないものの、30%飽和硫酸では沈殿することが確認された。次に 20%飽和硫酸（0.86 M）にしたサンプルをカラムにかけ、0%硫酸のバッファーでグラジエント溶出を行なったが、HBsAg の溶出は確認されなかった。そこで、1 M 尿素、0.86 M 硫酸を含むバッファーを用い、0%硫酸のバッファーでグラジエント溶出を行なったが、残念ながら HBsAg の溶出は確認されなかった。カラムを洗浄する目的で H₂O による溶出を行なったところ、ポリクローナル抗体（ANT-163）を用いたウエスタンブロットでのみ HBsAg のシグナルを確認することが出来た。条件検討をさらにに行い、初期バッファー：1 M 尿素、1 M 硫酸、0.2% Tween-20 を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）溶出を H₂O とすることにより、Butyl-S カラムでの HBsAg 精製が可能となることを確認した。

次にゲルろ過を検討するため、分子量マーカー（フェリチン、チログロブリン、ブルーデキストラン）を HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR カラムに供し、それぞれの溶出位置を確認した。次に HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR カラムに Butyl-S の溶出画分を供した。クロマトパターンはブロードなシングルピークであったが、SDS-PAGE による純度確認を行なったところ、残念ながら全てのフラクションにシグナルが出

ており、また原因不明のタンパク質の混入が観察されたため、ゲルろ過での精製については再検討が必要である。

次にスケールを 5 倍とし、カラムサイズも 5 倍量で検討した。培養液から沈殿させた HBsAg 溶液 80 ml 分を用いて、前処理、DEAE カラム、Butyl-S カラムでの精製を連続して行なってみた。最終的に得られた画分はタンパク質濃度が低く、初期の処理量を増やすことが必要であることが示唆された。そこで、再度サンプルを調製し、同様の精製を行なったところ、最終的に Butyl-S 溶出画分にシグナルが観察されたものの、それ以外の夾雑タンパク質も以前残っており、この方法では精製が難しいと考えられた。

次に 5L のジャー培養を行ない、硫酸添加により粗 HBsAg を回収した。その際、大量調製に合わせて条件の改変を加えた。まず粗 HBsAg の溶解に必要なバッファー量を増加させることで、回収量の向上が可能となった。また培養ロット間によって、酵母の色が変化することがあり、特に赤色を示すと HBsAg の生産量が増加することが示唆された。酵母が赤色を呈する場合、培地中のアデニンが不足している場合が多い。以前にも貧栄養培地で HBsAg の生産が多く見られたが、一方無機塩では酵母が生育しなかったため、培地の条件検討も今後の課題であると考えられた。

これらを並行して複数ロットで進め、HBsAg の大量調製を試みた。得られた HBsAg について電気泳動を行ない、その純度を確認したが、まだまだ複数のタンパク質のバンドが見られたため、初期カラムを Butyl-S とし、次に DEAE カラムの順番で精製を行なうことにより精製度は高くなった。しかし 50kDa 付近のタンパク質が依然残っており、現在の方法では除くことは困難であると考えられた。次に非還元条件でのウエスタンブロット解析を行なったところ、HBsAg のシグナルが 250 kDa 以上の高分子側

に現れたことから、100 kDa cut off のフィルターを用いて濃縮することを検討した。膜へ吸着が見られたため、膜を濃縮液でよく洗い流して回収することで回収率を向上させられた。また依然 50kDa 付近のタンパク質が残っているものの、目的の HBsAg 以外の多くの 100 kDa 以下のタンパク質が除去できたため、フィルター処理が有効であることが示唆された。

D. 考察

今年度は HBs 抗原の精製について様々な条件検討を行った。当初考えていたよりも HBs 抗原の培養液中での挙動が不明な点が多く、精製も困難を極めた。

培養条件については、比較的低栄養源の 1x カザミノ酸-Ura 培地が適していると考えられた。また 120 時間培養まで HBs 抗原の発現の上昇が確認された。さらに長期間の培養についても今後の検討が必要であると考えられた。

培養液中では、HBs 抗原は微粒子またはタンパク質複合体として存在していることが示唆された。通常固液分離を行なう場合は、遠心法またはフィルターを用いる場合が多い。遠心法の場合、酵母菌体自体も 3000 rpm では沈殿するため、効率よい回収のためにはより回転を遅くして菌体との分離を行なうか、あるいは別の分離条件が望ましいと考えられた。またポアサイズ 1 μm のフィルターやグラスフィルター等の処理などを試みたが、酵母菌体と HBs 抗原をきれいに分離することが出来なかった。この点については今後更なる検討が必要である。

次に前処理の方法であるが、過去に報告された pre-S2 を含む HBs 抗原の精製方法として尿素による変性が報告されており、本研究でも尿素やグアニジン塩酸による変性と、その後の透析で HBs 抗原のフィルター処理を可能とした。これによりカラムによる精製が可能となった。

カラム処理では、当初安価な DEAE カラムを

初期精製に用い、次に Butyl-S カラム、ゲルろ過の精製行程を検討したが、前処理から脱塩操作なしで精製行程へ持ち込むことが出来る Butyl-S カラムを初期精製に用い、その後 DEAE カラムとフィルター処理を行なうことで HBs 抗原を精製することとした。ゲルろ過については大量精製には不向きであることに加え、今回の精製においては新たな不純物の混入もあったため、使用を中断した。最後にフィルター処理であるが、非還元条件で SDS-PAGE を行なったところほとんどゲルに入らず、泳動されなかったため、かなり高分子の複合体あるいは粒子状になっていると考えられた。従って 100 kDa cut off のフィルターはかなり効果的であった。しかし依然 50 kDa の分子量を有するタンパク質が混入しているため、前処理の段階でもう少し効率よく除く方法を検討することが必要である。またこのタンパク質を同定し、可能であれば遺伝子破壊を行なって混入を抑制することも検討したい。

E. 結論

2 種類の HBs 抗原を酵母で発現し、その培養上清から糖鎖付加された HBs 抗原の精製を試みた。培養条件、前処理法、カラムによる精製、フィルター処理等を行ない、HBs 抗原の精製方法を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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