

HBV（HBs 抗原）の糖鎖解析

研究分担者 梶 裕之 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 研究チーム長
研究分担者 久野 敦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 上級主任研究員
研究分担者 伊藤 浩美 福島県立医科大学 医学部 生化学講座 助教
研究分担者 田尻 和人 富山大学 医学薬学研究部 第三内科 助教
研究分担者 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 肝疾患研修室長

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、実サンプルの分析を行った。レクチンアレイでは、まず昨年度確立したプロトコルのうち、血清から HBV 粒子のエンリッチの工程をブラッシュアップし、取得物の精製度及び取得データの再現性を向上させた。その後、HBV 感染患者血清の取扱機関である国際医療研究センターへ技術移転し、HBV 感染患者 16 症例の 24 サンプルの血清よりそれぞれ HBV 粒子をエンリッチし、レクチンアレイにより比較糖鎖解析を行った。その結果、得られたアレイシグナルパターンは大きな傾向は一致しているものの、HBs 抗原量や DNA 量などに応じてシグナルが増減するレクチンがいくつか確認された。質量分析では、B 型肝炎患者プール血清より精製された 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 型糖鎖が、また、Pre-S2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖の付加が同定された。N 型糖鎖は二本鎖構造、O 型糖鎖はコア 1 (T 抗原) を主成分としていた。この他、M 型 HBs (Pre-S2) の N 末端 Met にアセチル化、L 型 HBs (Pre-S1) の N 末端 Gly にミリスチル化修飾を検出した。

A. 研究目的

HBV ウィ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ング不全が生じるなど、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 の糖鎖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 HBV ウィルス粒子の糖鎖集合状態

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：各患者血清中 HBV ウィルス粒子のエンリッチ、および取得 HBV 粒子の糖鎖プロファイリングは、昨年度確立した手法に従った。まず、血清中の磁気ビーズへ

非特異的に結合するタンパク質を事前に除去した。血清を予め反応バッファー(1%Triton X-100入り Tris-buffered saline (TBSTx))で3回洗浄したストレプトアビジン固定化磁気ビーズ(SAビーズ)溶液に加えて溶液調整し、4で30分間振盪反応した。反応後、磁石によりSAビーズを1カ所にトラップし、残存溶液を別の1.5 mL容チューブに回収した。回収した溶液に、ビオチン化抗体とSAビーズを加え、4で3時間振盪しながら抗原体反応を行った。なお、抗体は田尻らが樹立した抗HBs抗原抗体(HB0116)を用いた。反応後、抗原-抗体複合体と結合した磁気ビーズを磁石で回収し、溶液を除去後、ビーズを反応バッファー500 μ Lで3回洗浄した。トラップされたHBV粒子を溶出するために、0.2% SDSを含むTBS10 μ Lを加え、95で5分加熱し、不活性化されたHBV粒子を遊離した。磁気ビーズを磁石で1カ所にトラップし、溶出画分溶液を回収した。取得液中に夾雑する不活性化HB0116抗体は、新しいSAビーズと再度反応させることで完全に除去された。得られた溶液HBV粒子-IP産物(20 μ L)とした。

HBV粒子-IP産物試料を5 μ Lとり、レクチンアレイ反応バッファーである1%Triton X-100含有Phosphate-buffered saline (PBSTx)により、60 μ Lに調整した。この溶液をレクチンマイクロアレイの各反応槽へ添加し、20で10時間以上相互作用反応した。反応後、ブロッキング剤を加え、30分反応させた。60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した後、ブロッキング剤含有PBSTx溶液を加え、若干攪拌した後に、検出用ビオチン化116抗体を100 ng加え、20で1時間反応させた。抗原抗体反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄し、次いでCy3標識ストレプトアビジン200 ng含有PBSTx溶液を加え、さらに30分、20で反応した。反応後、60 μ LのPBSTxで各反応槽を3回洗浄した

後、レクチンアレイスキャナーGlycoStation™によりスキャンを行った。スキャンデータは画像解析ソフトで数値化され、以後の比較糖鎖解析に用いられた。

(2)HBsタンパク質Pre-S1/Pre-S2領域の糖ペプチド解析：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)を変性剤処理、還元アルキル化することなく、トリプシン消化し、限外濾過法で遊離ペプチドを捕集した。これをアミド80カラムに通し、糖ペプチドと非糖ペプチドに分画した。糖ペプチド画分は酸性条件下で加熱してシアル酸除去処理し、LC/MS分析した。この質量値より糖鎖組成を推定した。非糖ペプチド画分も同様にLC/MS分析し、Mascot検索により、糖鎖付加以外の翻訳後修飾の状況を分析した。Pre-S1領域における糖鎖修飾とミリスティル化の関連を分析するために、合成ミリスティル化ペプチドをトリプシンおよびV8プロテアーゼ消化し、LC/MSでの検出を行った。また、Pre-S2領域におけるO型糖鎖の状態を分析するために、SVPをトリプシン処理し、消化物をJacalinカラムに供し、O型糖ペプチドを捕集した。これをLC/MS分析し、構造解析した。

なお、上述の(1)(2)に用いた全ての血清サンプルは、インフォームドコンセントにより患者から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

C. 研究結果

(1)HBV患者血清中HBV粒子の比較糖鎖解析：Genotype C HBV感染患者15症例(急性肝炎2例、慢性肝炎8例、無症候性キャリア5例)の血清(HBsAg:3000 IU/mL以上、HBV DNA:100コピー以上)よりHBV粒子をエンリッチし、レクチンアレイ解析を行った。その結果、2,6シアル酸修飾を末端に有する複合型N

型糖鎖に特徴的なレクチンシグナル(I群:SSA, SNA, TJA1, RCA120, DSA, PHAEなど)を得たと同時に、シアリルT抗原構造O型糖鎖に特徴的なシグナル(II群:Jacalin, MPA, ABA)も得た。II群のシグナルはGenotype C HBVのMタンパク質のPre-S2領域にあるとされる1つのO型糖鎖付加に由来すると予想される。実際、O型糖鎖付加位置が欠損しているGenotype A HBV感染慢性肝炎患者(1例)血清について検討した場合、N結合型糖鎖の特徴はGenotype Cのそれと同様であったが、O結合型糖鎖に由来するシグナルは全く得られなかった。つまり、I群レクチンシグナルとII群レクチンシグナルの割合を調べると、血清HBV粒子中のMタンパク質の割合が間接的に得られると考えた。そこで上述の15例の結果について、I群/II群シグナル比を調べたところ、その比は患者ごとに異なっており、Mタンパク質に特徴的なII群の割合がDNA量に応じて増減している傾向を示した。この割合の違いを、レクチンアレイ以外の手法でも確認するために、取得HBV粒子をSDS-PAGEし、メンブレントランスファー後に、I群のSSA及びII群のJacalinを用いたレクチンプロットを行った。その結果、Jacalinは、おもにMタンパク質(gp36およびgp33)を染色し、そのバンド強度はレクチンアレイの傾向に一致していた。

また、HBsAg量の下限を調べるために、先述のGenotype C HBV感染患者のうち3症例について、治療開始前、3か月後、12か月後の血清を用いて同様の実験を行った。結果、HBsAg量>2000 IU/mLの場合にHBV粒子に特徴的なレクチンシグナルパターンを得ることが確認できた。

(2)HBsタンパク質Pre-S1/Pre-S2領域の糖ペプチド解析:ヒト患者血清由来SVPを変性剤非存在下、トリプシン、Lys-Cエンドペプチダーゼ、およびV8プロテアーゼで消化し、生じ

た消化物を限外濾過して、遊離ペプチド画分を得た。これをアミド80カラムに供し、糖ペプチド画分を得、LC/MS法で分析した。以前に同定したPre-S1およびL-Pre-S2糖ペプチドのコアペプチド質量に2本鎖糖鎖質量を足したシグナルを探索した結果、それに該当するシグナルが検出され、L-HBsのPre-S1/S2領域には2本鎖糖鎖が主成分として結合していることが推定された。また、アミド80カラム分離の非糖ペプチド画分の分析では、ミリストイル化されたN末端ペプチド(GGWSSKPR)が同定された。これはオランウータン型ではなく、ヒト型のロングフォームのN末端Glyがミリストイル化されていることを示している。V8プロテアーゼのみで消化し、ミリストイル化Gly-2と糖鎖付加Asn-15の両方を含む糖ペプチドの検出を試みたが、検出できなかった。非糖鎖付加型のミリストイル化ペプチドも検出されていないので、これらの修飾の関連は未解決である。合成ミリストイル化ペプチドの分析から、消化位置、ミリストイル化ペプチドの溶出位置が決定できたので、これを今後の参考に探索を進める。同様に調製したトリプシン消化遊離ペプチド画分を酸処理の後、Jacalinカラムに供し、結合した糖ペプチド画分をLC/MS分析した結果、PreS2領域の既報の位置にT抗原と思われる(Hex(1)HexNAc(1))糖鎖が検出された。このペプチドがL-HBs、M-HBsのいずれか(あるいは両方)に由来するのかは不明であった。

D. 考察

レクチンアレイと質量分析による糖鎖解析の結果、ヒト患者血清由来HBsタンパク質には長さ(LMS)に応じ、1ないし3箇所のN型糖鎖付加部位が同定され、L-PreS1、L-PreS2、M-PreS2、およびSのS領域には2,6シアル酸を末端に有する2本鎖糖鎖が主要であることが判明し、残るLおよびMのS領域にも同様の糖鎖が付加

しているものと推定される。また PreS2 領域に 1 カ所の O 型糖鎖が存在し、その糖鎖構造はシアリル T 抗原と予想される。これらの情報を元に考察すると、新型ワクチンとして準備すべき抗原はこれらの糖鎖が付加したものであると思われる。

E. 結論

HBs 糖鎖付加部位の同定とそれらに結合している糖鎖構造から、今後、ワクチンの抗原とする HBs にはシアリル化された 2 本鎖糖鎖あるいはシアリル化 T 抗原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

特記すべき情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **久野敦**、「肝線維化の進展を定量的に判断するための糖鎖バイオマーカーの実用化」、医学のあゆみ特集「グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用」、249 巻 8 号 pp.666-70, 医歯薬出版(株)(2014)
- 2) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, **Kuno A**, **Korenaga M**, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. Elevated serum levels of *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* **60**(5), 1563-70 (2014).
- 3) **Kuno A**, Matsuda A, Unno S, Tan B, Hirabayashi J, Narimatsu H. Differential

Glycan Analysis of an Endogenous Glycoprotein: Toward Clinical Implementation-From Sample Pretreatment to Data Standardization. *Methods in Mol Biol* 1200, 265-85 (2014).

- 4) Zou X, Chi X, Pan Y, Du D, Sun H, Matsuda A, Li W, **Kuno A**, Zhang X, Narimatsu H, Niu J, Zhang Y. LecT-Hepa facilitates estimating treatment outcome during interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Clin Proteomics* **11**(1), 44 (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* agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 50(1), 76-84 (2015).
- 6) Tamaki N, Kurosaki M, **Kuno A**, **Korenaga M**, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology Research* in press.
- 7) Abe M, et al. *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2 binding protein as a predictor of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* in press.
- 8) Fujiyoshi M, **Kuno A**, Gotoh M, Fukai M, Yokoo H, Kamachi H, Kamiyama T, **Korenaga M**, Mizokami M, Narimatsu H,

Taketomi A. Clinicopathological characteristics and diagnostic performance of *Westeria floribunda* agglutinin positive Mac-2 binding protein as a preoperative serum marker of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* in press

- 9) Hirabayashi J, **Kuno A**, Tateno H. Development and application of the lectin microarray. *Top Curr Chem.* in press.
- 10) Sugahara D, Tomioka A, Sato T, Narimatsu H, **Kaji H**. Large-scale identification of secretome glycoproteins recognized by *Wisteria floribunda* agglutinin: a glycoproteomic approach to biomarker discovery. *Proteomics* in press.

2. 学会発表

- 1) **久野 敦**「Ultra-sensitive glycan profiling of circulating HBV particles in patient 's serum」, TAsL-Japan Hepatitis B Workshop (2nd) ,(2014/04/20、台北)
- 2) **梶裕之**「糖タンパク質の大規模同定と糖鎖バイオマーカー開発への応用」第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014.6.25、横浜)
- 3) **梶裕之**ら「糖鎖付加位置選択的グライコム解析技術の開発と応用」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2014.7.17、つくば)
- 4) 雄長誠ら「グライコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー

“ WFA(+)-CSF1R ” の開発」日本プロテオーム学会 2014 年会 (2015.7.17、つくば)

- 5) 雄長誠ら「血清糖鎖バイオマーカー WFA(+)-CSF1R の開発」日本糖質学会年会 (2014.8.10、名古屋)
- 6) 梶谷内晶ら「Alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a glycomarker for evaluation of liver cirrhosis.」第 73 回日本癌学会学術総会 (2015.9.25、横浜)
- 7) **梶裕之**ら「Development and application of a method for the glycopeptide-based site-specific glycomic analysis」HUPO 13th World Congress (2014.10.7、マドリッド)
- 8) 我妻孝則ら「モノクローナル HBs 抗体を用いた B 型肝炎ウイルス粒子高感度糖鎖プロファイリング」第 87 回日本生化学会大会 (2014/10/17、京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。