

糖鎖修飾を受けた HBs 抗原の大量精製

研究分担者 千葉 靖典 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 佐藤 隆 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 梅谷内 晶 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 主任研究員
研究分担者 安形 清彦 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員
研究分担者 成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

研究要旨:本分担課題ではヒト型糖鎖を発現する酵母を用い HBs 抗原の大量精製を進めるとともに、現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来の HBs 抗原と比較しより有効なワクチンの開発に繋げることを目的としている。本年度は、酵母での HBs 抗原 L-タンパク質 (L-HBs) の調製、動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質 (M-HBs) の調製を行なった。また化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。これらの糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。糖鎖付き PreS1 ペプチド及び市販の糖鎖なし L-HBs や M-HBs 免疫マウス血清を用い、各種抗原(L-HBs, S-HBs, PreS1, PreS2)に対する反応性を S-HBs 抗原と比較解析した。糖鎖なし L-HBs 免疫血清はどの抗原に対しても反応性が亢進し、特に PreS1 の反応が比較的良く、中和抗体であればワクチンとしての有用性が示唆された。

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バックス(Merck社、GenotypeAを認識)、ビームゲン(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や、Genotypeの異なるウイルスの水平感染が指摘されている。また免疫源とした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ある。実際にボランティアにビームゲンを免疫して得られ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ますが、これらの抗体は糖鎖を持ったHBs抗原に対して反

応性を示さないことが当研究班の研究結果より明らかになった。このことは天然の B 型肝炎ウイルスに対し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。

そこで本課題では、天然の HBs 抗原と同様に糖鎖を有する HBs 抗原の大量精製を行うことを目的とする。現在ワクチン用に使用されている通常の酵母由来の HBs 抗原と比較し、より有効なワクチンの開発に繋げる。

B. 研究方法

(1) 酵母による HBs 抗原の調製 : H25 年度までに開発した L-HBs 抗原発現酵母を培養し、菌体内から抽出する条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。次に KBr 密度勾配超遠心法、およびシュクロース密度勾配超遠心法による精製条件を検討し、精製法を確立した。計 2.4 L の培養を行ない、52 g の菌体から確立した方法で L-HBs を精製した。

(2) リコンビナント M-HBs の発現 : 免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs を、培養細胞系を用いて作製した。H25 年度に開発した S-HBs の高効率発現法に倣い、genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクター pFLAG-CMV3(Sigma-aldrich) に導入した。作製した発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、抗 FLAG 抗体-agarose(Sigma-aldrich) を用いてリコンビナント M-HBs をアフィニティ精製した。抗 FLAG 抗体からの溶出は、FLAG ペプチド用いて競合溶出した。

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 : Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド

(GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNN PDWDFNPNKDHWPANQV) および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドを化学合成した。また S 領域の糖鎖付加部位を含む領域 (CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドも作製した。一方、市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断、精製し、オキサゾリン化反応を行って糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した。

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認 : マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確立するために、ビームゲン(リコンビナント S-HBs タンパク質) を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した。次に、L-HBs 抗原、M-HBs 抗原をマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。さらに免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し、あらかじめ産総研の組換え DNA 実験委員会、および動物実験委員会の承認を得ている。

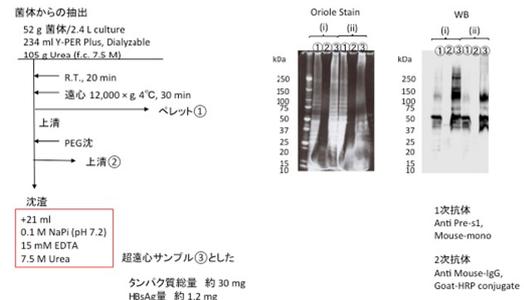
C. 研究結果

(1) 酵母による HBs 抗原の調製 :

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。

昨年度までは、培養上清中から糖鎖付加型の L-HBs 精製を試みていたが、除ききれないタンパク質の混在があり、また生産量もごく微量で使いにくいと判断した。そこで今年度は培養した酵母菌体からの HBs 抗原の精製を検討した。培地は 1x カザミノ酸培地を用い、昨年度と同様の条件で培養した。培養した菌体から容易に L-HBs を調製するため、市販の菌体溶解液 (Y-PER Plus, Dialyzable ; Pierce 社) を用い、抽出できるかどうか、またその抽出条件 (抽出バッファー、溶解温度、遠心分離条件) を検討した。その結果、7.5 M の尿素を含め Y-PER Plus を抽出バッファーとし、室温、20 分で抽出を行うのがよいことが示された。この抽出を行った後に 12,000 x g で遠心、上清を PEG 沈した沈殿物に L-HBs が多量に含まれていることが確認された (図 1)。この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH

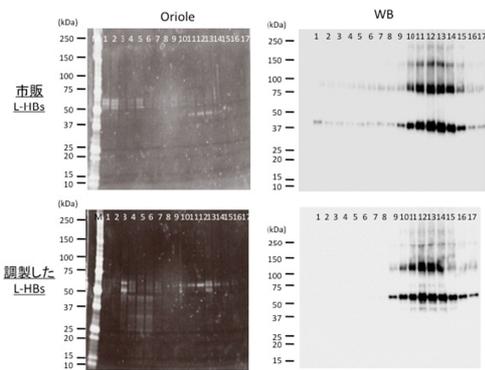
7.2) で溶解し、粗抽出液とした。



(図 1) 酵母からの抽出条件の検討

次に超遠心による精製条件を検討した。既報に従い、10-40%の臭化カリウム (KBr) による密度勾配を設定し、Beckman SW 55 Ti ローターで $m73,000 \times g$ 、4、16 時間超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。夾雑タンパク質が比較的多い (KBr 密度の軽い) 画分を除き、抗体反応陽性のフラクションを回収した。この溶液を PEG 沈し、この沈殿物を 7.5 M 尿素、15 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.2) で溶解して次の超遠心に供した。

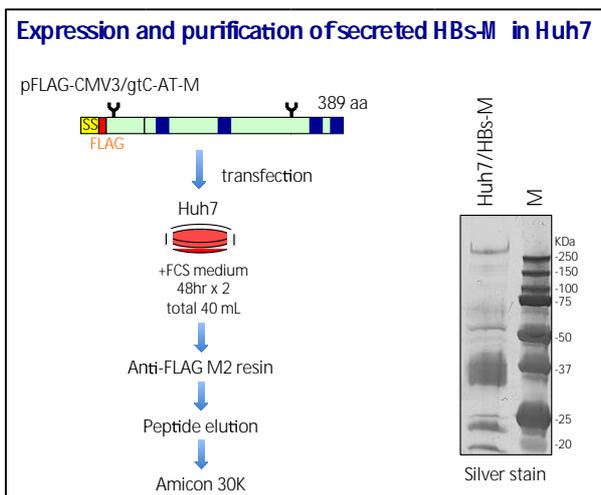
次のステップとして、5-50%のシュクロース密度勾配を設定し、上記と同条件で超遠心を行なった。チューブの上層から溶液を 0.3 ml ずつ回収し、各フラクションについて SDS-PAGE を行い、Oriole 染色 (Bio-Rad 社) と抗 PreS1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、密度の高いフラクションにモノマー、ダイマーのシグナルが確認された。また Oriole 染色によりほぼ均一に精製されていると考えられた (図 2)。



(図2) シュクロース密度勾配遠心後の各フラクションの SDS-PAGE (Oriole 染色) とウエスタンブロット解析

(2) リコンビナント M-HBs の発現 :

免疫抗原に用いるリコンビナント M-HBs について培養細胞系を用いて作製した。genotype C の M-HBs をコードする遺伝子を分泌発現用ベクターに導入、作製した発現ベクターを Huh7 細胞にトランスフェクションして、48 時間後に培養上清を回収し、リコンビナント M-HBs をアフィニティ精製した。およそ 40 mL の培養上清を用いて 18.6 μg のタンパク質が精製できた。精製した M-HBs を SDS-PAGE で展開し、銀染色した結果、37 KDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった (図 3)。



(図3) M-HBs の調製方法と精製した M-HBs の銀染色

(3) ハイブリッド合成法による糖鎖付加 HBs 抗原部分ペプチドの調製 :

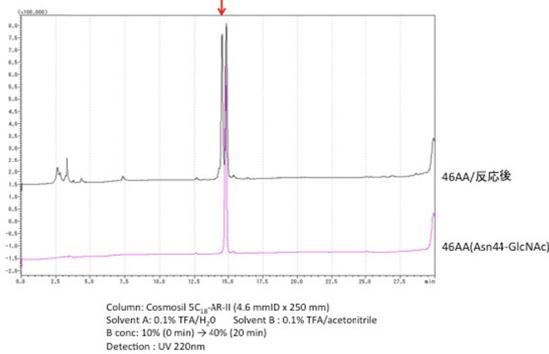
免疫原やスクリーニングで必要となる、HBs の各領域のペプチド、糖ペプチドについて合成を検討した。ペプチド部分は化学的合成法、糖鎖部分の転移は酵素を利用する、いわゆるハイブリッド合成により目的物の調製を検討した。

Pre-S1 の糖鎖付加部位を含む 46AA のペプチド (GTNLSVNPPLGFFPDHQLDPAFGANS NNPDWDFNPNKDHWPANQV) および 3 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドはペプチドシンセサイザーにより化学合成した。ペプチドシンセサイザーによるペプチドの合成は 40 残基程度が一般的であり、それ以上は収率が落ちることが予想された。また GlcNAc を含む糖ペプチドの調製には Thr-GlcNAc-Fmoc が必要となる。これらのことから糖ペプチドの合成経験を有する産総研北海道センターの清水に協力を依頼し、合成を進めた。清水らが開発したマイクロ波を利用した合成法により 46 残基のペプチドの合成に成功した。一方、S 領域の糖鎖付加部位を含む領域

(CTKPSDG(A)NCTK-Biotin) についてジスルフィド結合を利用して環状化したペプチド、および 8 番目の N に GlcNAc を付加した糖ペプチドについては、外部委託により作製した。

次に糖ペプチドに転移する糖鎖の調製を検討した。既に当研究班の梶らにより、HBs が有する N-型糖鎖の構造は、α2,6 結合のシアル酸を還元末端に持つ二分岐複合型糖鎖であることが示されている。そこで同じ構造の糖鎖であり、大量に入手可能な市販の Sialyl Glycopeptide から ENGase を用いて糖鎖を切断し、グラファイトカーボンカラムを用いて精製した。さらに既報に従い、還元末端のオキサゾリン化を行うとともに、千葉らが開発したオキサゾリン化糖鎖の大量精製法を用いて糖鎖ドナーを調製した。この糖鎖ドナーと化学合成した糖ペプチドを混合

し、Glycosynthase を添加してトランスグリコシレーション反応を行った。得られた糖鎖転移産物を逆相カラムで分離することで均一な糖鎖を有する HBs 抗原の部分糖ペプチドを調製した(図4)。

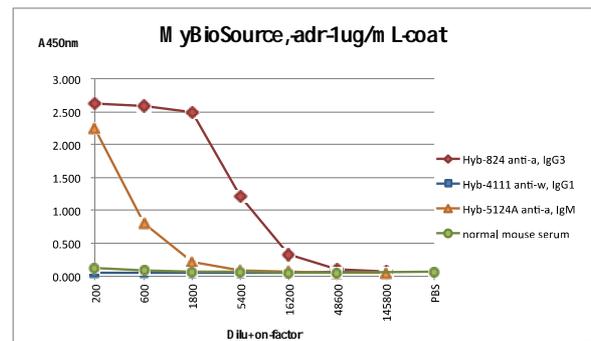
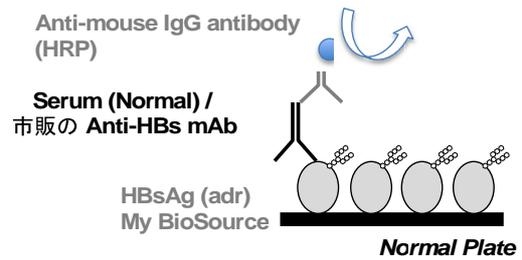


(図4) α 2,6 シアル酸付加二分岐複合型 Pre-S1 糖ペプチドの精製

(4) HBs 抗原免疫マウスにおける抗体価上昇の確認:

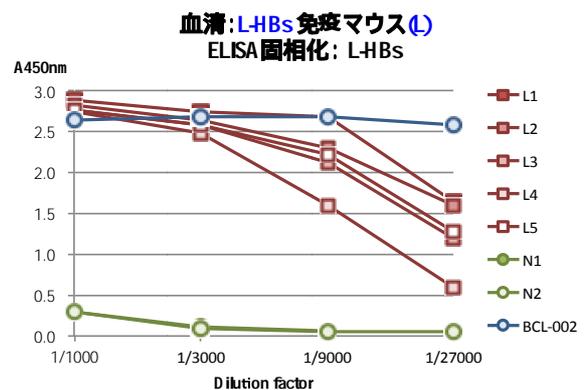
まず、マウスに対する免疫手法ならびに抗体価の測定方法を確認するために、ビームゲン(リコンビナント S-HBs タンパク質)を Balb/c マウスに免疫し、その免疫マウス血清を用いて抗 HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築を行った。市販の各種抗 HBs 抗体(特殊免疫研究所・anti-HBs mAb: Hyb-824、Hyb-4111、Hyb-5124A、特殊免疫研究所・anti-Pre-S1 mAb: Hyb-T0606、Beacle・anti-Pre-S1 mAb-2: BCL-AB-002、など)のうち、陽性コントロールとして使用可能なものがあるかどうかを検討した結果、anti-HBs mAb (Hyb-824) や Pre-S1 mAb-2 (BCL-AB-002)などが十分な反応性を示し、陽性コントロールとして使用可能であることが分かった(図5)。またビームゲンに対する抗体価が上昇していることも観察された。これは従来からの知見通りであった。

ELISA & (HBs antigen recombinant protein, 227aa)



(図5) HBs 抗原抗体の ELISA 測定系の構築

次に、L-HBs 抗原(Beacle 社製)を 5 匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。L-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ(図6)、いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

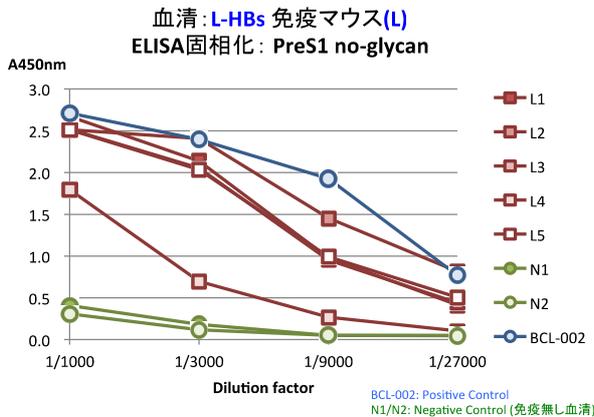


↑ (L) 群: Lの免疫で、L-HBs(免疫原)への反応を示す

(図6) L-HBs 抗原に対する抗体価測定

また、同免疫マウス血清を使用して、Pre-S1 ペプチドに対する反応を確認したところ、やはり同様にいずれのマウスにおいても抗体の反応を

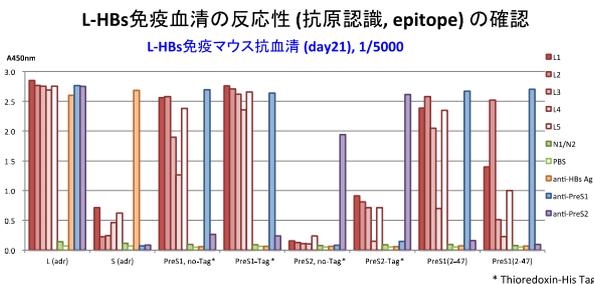
認めた（多少の個体差があった）（図7）。



↑ (L) 群：L-HBsの免疫で、Pre-S1への反応性も良い

（図7）Pre-S1 ペプチドに対する反応性

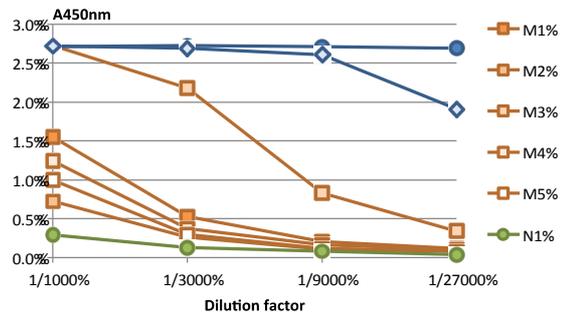
この L-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した（図8）。その結果、L-HBs 免疫マウス抗血清での傾向としては、L-HBs（免疫原）は反応性良いこと、Pre-S1 領域が特に強く反応していること（つまり抗原性が高いことを意味すると考えられる）Pre-S1 領域に比べると弱い S 抗原や Pre-S2 領域でもちゃんと反応性が有ること、が明らかとなった。全ての領域で反応性が見られたことは、L-HBs 抗原のワクチンへの応用が有用であることを示していると考えられた。



（図8）L-HBs 免疫血清の反応性の確認

次に、M-HBs 抗原(前述)を5匹のマウスに免疫し、その抗体価の上昇を観察した。M-HBs 抗原に対する抗体価を測定したところ（図9）いずれのマウスにおいても抗体価上昇を観察した。

血清：M-HBs免疫マウス (M), day21
ELISA固相化：L-protein

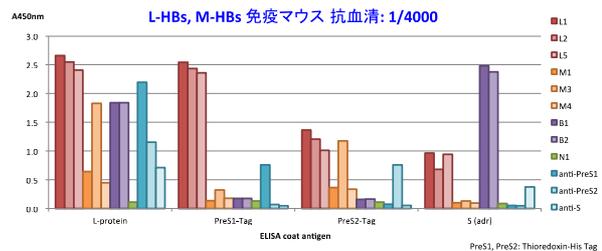


↑ (M)群：M&HBsの免疫で、Lproteinへの弱い反応有り

（図9）M-HBs 抗原に対する抗体価測定

この M-HBs 免疫マウス血清を用いて、HBs 抗原における領域ごとの反応性を検討した（図10）。その結果、M-HBs 免疫マウス抗血清での傾向として、M-HBs は前述の L-HBs と比較して抗体価が上がりやすく、マウスによってばらつきあるようであった。また、M-HBs は L-HBs 免疫に比べると、PreS2 に対する抗体価も低めであり、且つ、S-HBs に対する抗体価も L-HBs よりも低いことが明らかとなった。

M-HBs免疫血清の反応性 (抗原認識, epitope) の確認



（図10）M-HBs 免疫血清の反応性の確認

現在、得られた L-HBs 免疫マウス血清あるいは M-HBs 免疫マウス血清を使用して、各種抗原に対する反応性について生化学的な解析を進めているところである。

D. 考察

（1）今回の結果では、酵母の菌体内から L-HBs 抗原が調製できることが確認された。超遠心の

条件等についてはほぼ確定したものの、一方で各工程後の PEG 沈で回収率を下げていることが示唆された。加えて超遠心後のサンプルの濃縮も重要であり、この工程でもロスが見られるため、今後クロスフローによる限外ろ過や透析、凍結乾燥の条件等も検討する必要がある。また大量調製のためには、培養条件と抽出条件の再検討が必要であるため、免疫実験の結果を見ながら今後改良を進めていく必要がある。なお得られた L-HBs については、H27 年度に免疫を行ない、抗原としての有効性を評価する予定である。

(2) 今回の結果から、37 KDa 付近にメインのバンドが観察され、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることがわかった。M-HBs は粒子状の構造を保持していることが考えられるが、免疫抗原としては問題ないと思われた。

(3) 糖転移反応後の精製において、産物の溶出時間がわからないのがひとつの課題である。すなわち HPLC 上で見られるピークの内、産物に対応するものがどれかを MS 解析して確認後、ピークの回収を行わなければならない。LC-MS などの活用も今後重要になると思われる。なお得られた糖ペプチドは免疫実験での抗体価の上昇の確認や、エピトープ決定、目的の抗体のスクリーニングなどにより利用される予定である。

(4) L-HBs 免疫血清はどの抗原に対しても反応性が亢進し、特に PreS1 の反応が比較的良く、中和抗体であればワクチンとしての有用性が示唆された。

E. 結論

(1) 酵母での HBs 抗原 L-タンパク質(L-HBs)の調製法を検討し、L-HBs の調製を行なった。

得られた L-LBs は電気泳動場で均一であった。

(2) 動物培養細胞を用いた HBs 抗原 M-タンパク質(M-HBs)の調製を行なった。精製した M-HBs はメインのバンドと、さらに複数のタンパク質バンドも含まれていることが示唆されたが、免疫抗原としては問題ないと判断した。

(3) 化学-酵素ハイブリッド合成法を用いて、Pre-S1 領域、S-領域の糖鎖付加部位を含む部分領域について糖鎖構造を均一化した糖ペプチドの合成法を確立し、調製を行なった。

(4) (2) ~ (3) の糖タンパク質、糖ペプチドを用いてマウスへの免疫実験を行い、抗体生産能の評価を行なった。L-HBs 免疫血清はどの抗原に対しても反応性が亢進し、特に PreS1 の反応が比較的良好であった。

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

特記すべき情報なし。

2. 学会発表

特記すべき情報なし。

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。