

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500405

研究課題名（和文）

主要抗原領域欠失型HBsAg蛋白質で形成される中空ナノ粒子の表面構造解析

研究課題名（英文）

Surface structure analysis of hollow nano-particle formed by HBsAg proteins with deletion of major antigenic region.

研究代表者

多田 宏子 (TADA HIROKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：60271061

研究成果の概要： ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）のエンベロープ蛋白質（HBsAg）が形成する中空ナノ粒子は、ヒト肝細胞特異的な薬物送達キャリアとして開発が進められている。我々はHBsAg蛋白質による粒子構造形成機構の解明のために、まず粒子を形成しうる必要最小限の配列を明らかにした。その最小配列HBsAg粒子の表面構造を調べるために粒子の精製を行い、野生型粒子同様の大きさと形状を持つ事を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：蛋白質工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学（1301 B）

キーワード：ドラッグデリバリーシステム、バイオナノ粒子、蛋白質工学、ウイルスエンベロープ蛋白質

1. 研究開始当初の背景

「ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）のエンベロープ蛋白質（HBsAg）のみを動物細胞や酵母で発現させると、HBsAg蛋白質は宿主細胞の小胞体由来脂質二重膜を取り込みつつ凝集出芽し、ウイルス様粒子を形成する。申請者らはこのHBsAg粒子の直径約100nmの中空粒子構造に注目し、遺伝子や薬剤を包んで選択的に標的細胞に運ぶカプセルとしての開発を進めている（Yamada T et al, Nature Biotechnol. 21(8),

885-890, 2003)。この粒子は標的型薬物伝達システムに必要な2つの領域、粒子形成領域（S領域）と標的細胞認識領域（PreS領域）から成る。我々は、S領域による粒子構造形成メカニズムを解明する事を最終的な目的として、研究を進めて来た。

組換え型HBsAg粒子は、1980年代にまずHBVワクチンとして開発され、すでに実用化もされている。それにもかかわらず、HBsAg粒子の構造解析については、極低温顕微鏡解析に

よるおおまかな形状が報告されているのみであり、粒子中のHBsAg分子の立体構造は未だ解明されていない。また、HBsAg蛋白質がどのように粒子構造を形成するのかというメカニズムも判っていない。構造解析が進まない理由としては、1) HBsAg粒子(平均110個のHBsAg分子を含む)は均一な構造を持っていないため、そのままでは結晶化は困難であり、2) HBsAg蛋白質は少なくとも3回の膜貫通領域を持つ膜蛋白質であり、しかも14個のCys残基がすべてSS結合を形成する複雑な構造のため、モノマーあるいはダイマーレベルでの立体構造解析も困難である事が考えられる。そこで我々はHBsAg蛋白質の欠失実験を行い、HBsAg蛋白質配列から粒子形成に関与しない不必要な配列を除去する事で、HBsAg蛋白質モノマーの構造の単純化を図った。その結果、HBsAg蛋白質(S領域、226残基)の内のC末端側54残基と中央部の粒子外部親水性領域(major antigenic region, MAR)55残基とを同時に欠失させた変異体が粒子構造形成能を保持する事を解明していた。

2. 研究の目的

HBsAg蛋白質の最大の特徴は、HBsAg蛋白質単独で脂質二重膜を取り込みつつ中空ナノ粒子を形成する事である。それにより、形成されるナノ粒子が「蛋白質の堅牢さとリポソームの柔らかさを併せ持つ」というユニークな性質を持つため、様々な応用展開が期待されている。本研究では不必要配列が除去され、構造が単純化された欠失型HBsAg変異体粒子の表面構造解析を通じて、HBsAg蛋白質による粒子構造形成の分子メカニズムの解明にアプローチすると同時に、欠失型変異体粒子の有用性を示す事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物細胞を用いた一過性発現系による

各種HBsAg欠失変異体粒子の評価

① C末端に検出用のFLAG-tag配列を融合した種々の欠失型HBsAg変異体遺伝子を作製し、動物細胞用発現ベクターを構築した。

② サル腎由来Cos7細胞を用いた一過性発現系を用いて、上記の各種欠失型HBsAg変異体を発現させ、培養上清中に分泌されたウイルス様粒子量を抗HBsAg抗体を用いた酵素免疫測定法あるいは抗FLAG抗体を用いた酵素免疫測定法により測定した。

③ 培養上清中のHBsAg量が多い変異体については、ショ糖密度勾配上での超遠心解析により、野生型と同様の粒子構造を有するかどうかを調べた。

④ 最も活発な粒子分泌を示した欠失型変異体と最も短い変異体とを、抗FLAG抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびショ糖密度勾配遠心により各々精製した。

⑤ 精製した欠失型変異体について、透過型電子顕微鏡観察(ネガティブ染色)した。

(2) 酵母を用いたHBsAg変異体大量生産系の検討

① 欠失型HBsAg変異体粒子を大量生産するために、C末端とMAL部を欠失した変異体遺伝子を酵母用発現ベクターに組換え、酒造酵母(*Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株)へ導入し、高発現クローンをスクリーニングした。

② 高発現クローンを大量(1L)培養し、野生型HBsAg粒子と同様の精製方法であるいは抗FLAG抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー等で精製した。

4. 研究成果

(1) 動物細胞を用いた一過性発現系による各種HBsAg欠失変異体粒子の評価

我々は以前の研究で、HBsAg蛋白質のC末端疎水領域と粒子外親水性領域について欠失可能な配列(=粒子形成に不要な配列)を解明

したが、さらにN末端領域の欠失可能領域も組み合わせる事によって、粒子を形成分泌しうる最も短い配列を探った。様々な欠失領域を組み合わせた変異体(図1)をCos7細胞で発現させたところ、PreS配列およびS領域のN末端74残基(TM1と粒子内親水性領域全域)とC末端疎水性領域とを同時に欠失させた変異体($\Delta n74-c54$)が野生型L粒子の100倍という極めて高いHBsAg分泌を示した。さらに主要抗原領域(MAL)を欠失させた変異体($\Delta n74-MAL-c54$)でも高い分泌が認められた。興味深い事に、C末端のみを欠失させた変異体は分泌を示したが、N末端74残基のみを欠失させた変異体はほとんど分泌を示さなかった事から、N末端部がC末端部の構造を支えている可能性が示された

そこで、 $\Delta c54$ 変異体と $\Delta n74-c54$ 変異体と $\Delta n74-MAL-c54$ 変異体について、さらに性状を解析した。各変異体を発現させたCos7細胞

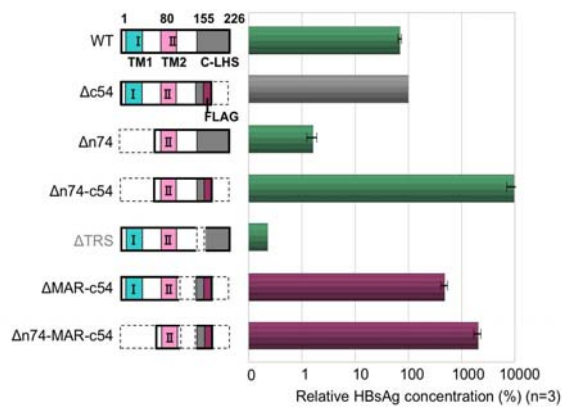


図1 各種HBsAg欠失変異体粒子の分泌

各種HBsAg欠失変異体発現ベクターを導入し、4日培養後のCos7細胞培養上清中に分泌されたHBsAg量を、抗HBsAg抗体を用いたEIAにより測定した(n=3)。野生型L蛋白質(WT)発現ベクター導入時のHBsAg抗原分泌濃度を100%として、各種変異体分泌濃度を相対HBsAg抗原濃度%とした。

胞の培養上清中に分泌された粒子をシヨ糖密度勾配遠心法で解析した結果を図2に示す。 $\Delta c54$ 変異体は野生型と同様の沈降を示した。また最も高い分泌を示した $\Delta n74-c54$ 変異体

も野生型HBsAg粒子よりやや遅いが、通常可溶性蛋白質(human IgG)よりは速い位置に沈降ピークを示した事から、野生型同様の粒子構造をとることが示唆された。しかし、 $\Delta n74-MAL-c54$ 変異体はやや遅い位置に幅広い分布の沈降を示し、野生型HBsAg粒子とは異なる沈降パターンを示した。

分泌量の多い $\Delta n74-c54$ 変異体と主要抗原領域(MAL)を欠失させた $\Delta n74-MAL-c54$ 変異

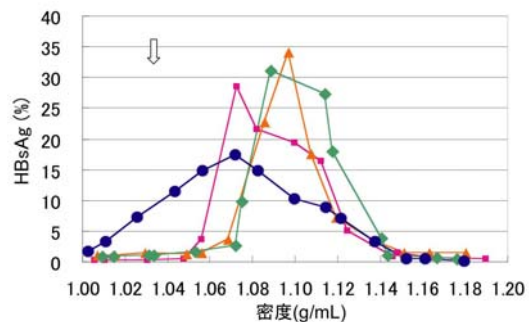


図2. 培養上清中に分泌されたHBsAg欠失変異体のシヨ糖密度勾配遠心解析

◆, 精製野生型HBsAg粒子(酵母L粒子); ▲, $\Delta c54$ 変異体粒子; ■, $\Delta n74-c54$ 変異体粒子; ●, $\Delta n74-MAL-c54$ 変異体粒子の沈降パターンを示す。ヒト抗体(IgG)のピーク位置を矢印で記入した。HBsAg変異体量は抗HBsAg抗体を用いたEIAで測定し、抗体IgGは280nmにおける吸光度で測定した。

体とを、シヨ糖密度勾配遠心法とアフィニティークロマトグラフィーで各々精製した。SDS-PAGE解析の結果、 $\Delta n74-c54$ 変異体精製試料には $\Delta n74-c54$ 変異体蛋白質バンドのみが認められ(図3-A)、野生型HBsAg粒子と同様に単一の蛋白質で粒子が形成されている事が示された。しかし、 $\Delta n74-MAR-c54$ 変異体を同様の精製法で単一蛋白質に精製する事はできなかった(データ不載)。

精製 $\Delta n74-c54$ 変異体粒子を電子顕微鏡で観察した結果、 $\Delta n74-c54$ 変異体粒子は野生型HBsAg粒子と同様の球形の粒子が認められた(図3-B)。観察像における野生型粒子の平均直径が 22 ± 2.2 nmに対して、 $\Delta n74-c54$ 変異体粒子は 23.1 ± 4.1 nmとほぼ同等であつ

た。

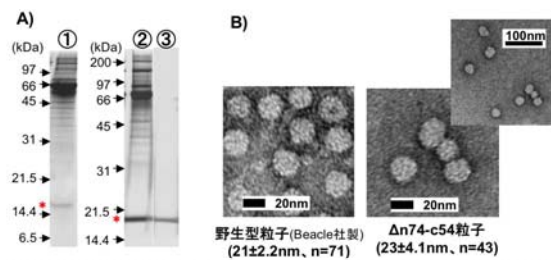


図3. 精製 $\Delta n74-c54$ 変異体粒子の SDS-PAGE 解析 (A) と透過型電子顕微鏡解析 (B)。

(A) レーン① 変異体発現 Cos7 細胞培養上清、② ショ糖密度勾配遠心画分、③ 抗 FLAG 抗体カラム溶出画分を各々電気泳動した後、銀染色した。(B) 精製精製 $\Delta n74-c54$ 変異体粒子試料(③)をネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡観察した。

$\Delta n74-c54$ 変異体は、粒子形成領域である S 蛋白質 226 残基のうちの中央部約 100 残基のみから成っており、膜貫通ヘリックス (TM2) と粒子外親水性領域 (MAR) と C 末端疎水性配列の一部のみにその構造が単純化されている。このうち TM2 配列は、典型的な膜貫通ヘリックス配列であり、脂質二重膜への蛋白質を挿入する役割を担うと予想される。一方、C 末端疎水性配列には、特徴的な両親媒性ヘリックス構造が推測されており、この配列が粒子形成に重要な蛋白質間相互作用に関与するものと考えられる。 $\Delta n74-c54$ 変異体は、MAR は保持しているが、膜貫通領域を含む 74 残基が欠失した単純化された配列であることから、HBsAg 蛋白質による粒子構造形成機構解明の材料として非常に有用と考えられる。

(2) 酵母を用いた HBsAg 変異体大量生産系の検討

欠失変異体粒子の構造について、詳細な構造解析を行うためには mg オーダーの精製粒子が必要である。そこで、野生型 HBsAg 粒子同様に酵母を発現宿主とした大量生産を検討した。C 末端疎水性領域と MAR とを欠失させた ($\Delta MAR-c54$) 欠失変異体を酵母で発現さ

せたところ、1L 培養液あたり 0.5mg 程度の発現株が得られた。その菌体抽出液をショ糖密度勾配遠心解析した結果、野生型と同様の粒子構造を示す事が示唆されたが、発現量が少ない事および分解が激しい事のために、精製は困難であった。立体構造解析に十分な量の精製変異体粒子試料を取得するためには、より発現の良い変異体をより発現量の高い発現系で生産する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (2 件)

- 1) Tsutsui Y, Tomizawa K, Nagita M, Michiue H, Nishiki T, Ohmori I, Seno M, Matsui H. Development of bionanocapsules targeting brain tumors. *J Control Release* 122(2):159-64, (2007), 査読有
- 2) Nagaoka T, Fukuda T, Yoshida S, Nishimura H, Yu D, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada H, Tada H, Seno M. Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. *J Controlled Release* 118(3):348-56. (2007), 査読有

[学会発表] (3 件)

- 1) 栗木政徳、多田宏子、遠部圭佑、小坂 恵、二見淳一郎、妹尾昌治、山田秀徳。中空ナノ粒子形成に対する HBV エンベロープ蛋白質粒子内部領域の影響。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 2008 年 12 月 12 日、神戸。

- 2) 遠部圭佑, 多田宏子, 栗木政徳, 小坂恵,
二見淳一郎, 妹尾昌治, 山田秀徳。B型
肝炎ウイルスエンベロープ蛋白質による
ウイルス様粒子形成にTM1ヘリックスは
不必要である。第8回蛋白質科学会年
会, 2008年6月10日、東京。
- 3) 多田宏子, 宮崎望美, 下光翔子, 山田一
朗, 栗木政徳, 二反田有沙, 近藤昭彦, 谷
澤克行, 黒田俊一, 上田政和, 小坂恵,
二見淳一郎, 山田秀徳, 妹尾昌治 粒子
形成に必要なヒトB型肝炎ウイルスエン
ベロープ蛋白質配列の特定 第7回日本
蛋白質科学会年会, 2007年5月26日、
仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 宏子 (TADA HIROKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 60271061

(2) 研究分担者

妹尾 昌治 (SENOO MASAHARU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 90243493

山田 秀徳 (YAMADA HIDENORI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 80037613