

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 10日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21500426  
 研究課題名（和文） 大腸菌を用いたウイルス様中空ナノ粒子の迅速大量生産システムの開発  
 研究課題名（英文） Rapid and large scale production system of virus-like hollow nano-particles using *Escherichia Coli*  
 研究代表者  
 多田 宏子（TADA HIROKO）  
 岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授  
 研究者番号：60271061

研究成果の概要（和文）：

ヒト B 型肝炎ウイルスの外被蛋白質が形成する「ウイルス様の中空ナノ粒子（HBsAg 様粒子）」は、ワクチンや診断用素材、薬物輸送担体等へ応用できる応用性の高いバイオ素材である。我々はこの HBsAg 様粒子を大腸菌で生産するシステムを確立し、生産された粒子を解析した。その結果、本粒子をより迅速大量安価に生産できるようになったとともに、生体認識配列を提示した HBsAg 様粒子など新規の応用粒子の開発が加速された。

研究成果の概要（英文）：

Envelope proteins of human hepatitis B virus form “virus-like hollow nao-particles (HBsAg-like partiles)” which are useful bio-material applicable to vaccines, carriers for diagnostic tests, and drug delivery systems. We established the production system of the particles by using *Escherichia Coli* as an expression system, and analyzed the resultant particles. As the results, this production system decreases the time and cost for the particle production and accelerates the development of new useful particles such as particles displaying recognition sequences for living substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード： 擬似ウイルス粒子，エンベロップ蛋白質，B型肝炎ウイルス，膜蛋白質，大腸菌発現系，蛋白質工学，薬物送達システム

1. 研究開始当初の背景

ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) のエンベロップ蛋白質 (HBsAg) を真核細胞で発現させると、宿主の小胞体脂質二重膜を取り込みつつ凝

集し、「直径数十 nm のウイルス様の中空ナノ粒子 (HBsAg 粒子)」を形成する。申請者らはこの粒子が脂質二重膜粒子 (リポソーム) の融通性と蛋白質粒子の安定性を併せ持

ち、さらに HBV 同様の標的細胞結合能を持つ事に着目し、標的細胞特異的 DDS 担体として開発を進めてきた (Yamada T et al, Nature Biotechnol. 21(8), 885-890, 2003)。この HBsAg 粒子生産には現在、動物細胞や酵母が使われているが、それは最も「迅速」「大量」「安価」な発現系である大腸菌では、HBsAg 粒子を生産できなかったからである。申請者自身も以前、大腸菌では HBsAg 蛋白質 (S 蛋白質) が活性構造を形成せず、ごくわずかに発現された不活性 HBsAg 蛋白質では活性構造形成 (folding = 粒子構造構成) ができない事を経験した。これは HBsAg 蛋白質の複雑な構造が、大腸菌や試験管内での粒子構造形成を阻んだためである。

近年申請者はこの HBsAg 粒子構造形成の機構解明に取り組み、N 末端 74 残基と C 末端 54 残基が同時に欠失され構造が単純化された HBsAg 変異体が、全長 HBsAg 蛋白質よりも効率的に HBsAg 粒子を分泌する事を見いだした。一方近年、大腸菌の発現系も開発が進み、以前には困難だった膜蛋白質の発現に適した菌株が市販されている。また、大腸菌体内で不活性封入体として発現された組換え蛋白質の folding 技術も飛躍的発展を遂げており、申請者自身も folding 補助試薬を開発するなど豊富な経験を有している (平成 6-7 年度 (一般研究 B) 「電荷を有するチオール」の保護試薬の創製および蛋白質工学への応用」等)。このような技術的背景から、構造が単純な欠失型 HBsAg であれば、大腸菌による生産および活性型立体構造への folding と粒子構造構成が可能と判断するに至った。

## 2. 研究の目的

まず、欠失型 HBsAg 変異体を用いて、大腸菌での HBsAg 粒子生産が可能かどうかを見極める。大腸菌でも活性型 HBsAg 粒子として発現された場合には、すでに確立された粒子精製方

法で粒子を精製する。発現条件や精製条件を精査して、欠失型 HBsAg 粒子の迅速大量生産系を確立する。また、得られた欠失型 HBsAg 粒子の性状を解析して、酵母由来野生型 HBsAg 粒子と比較し、粒子としての優位性を示す。また、上記の欠失型 HBsAg 変異体より tag 配列を除去して新たな標的細胞認識配列を付加した実用的な粒子を作製、生産し、ワクチン・診断用担体、薬物輸送用担体としての応用を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 欠失型 HBsAg 変異体発現用ベクターの構築

欠失変異体 HBsAg 蛋白質を大腸菌菌体内で発現させるために、N 末端 74 残基と C 末端 54 残基が同時に欠失された HBsAg 変異体 (s+d HBsAg と略す) および、N 末端 76 残基と C 末端 54 残基が同時に欠失された HBsAg 変異体 (dHBsAg と略す) の遺伝子の C 末端に検出用の FLAG-tag 配列と精製用の His-tag 配列を融合した遺伝子を、大腸菌用発現ベクター pET22b の T7-lac プロモータの下流に連結した。同様に全長 HBsAg 蛋白質発現用ベクターを構築した。さらに、より応用性の高い欠失変異体 HBsAg 蛋白質として、C 末端に抗体を認識する ZZ タグ配列を融合した変異体 (dHBsAg-ZZ と略す) 遺伝子発現用ベクターを構築した。構築した HBsAg 変異体蛋白質の構造を図 1 に示す。

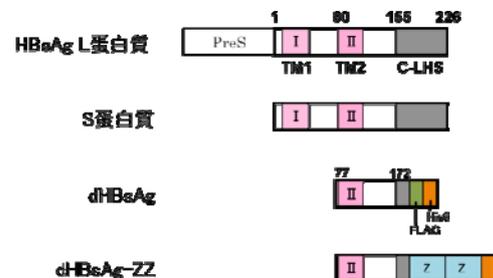


図1 dHBsAg および dHBsAg-ZZ の構造

## (2) 欠失型 HBsAg 変異体の発現培養

HBsAg のような膜タンパク質は一般に大腸菌に対して毒性を示し、高発現しない場合が多い。そこで、欠失型 HBsAg 変異体の発現宿主として、毒性遺伝子の発現に適しているとされる大腸菌 C41 (DE3) 株、C43 (DE3) 株を選んだ。また、HBsAg のように disulfide 結合を含む蛋白質の活性構造での発現に適している Origami2 (DE3) 株、並びに KRX 株も使用した。以上 4 株の大腸菌を上記の各種 HBsAg 変異体発現ベクターで形質転換し、翌日出現したコロニー数十個を、少量の LB 培地で 37°C で 2～5 時間振盪培養した。その前培養液を、400mL の LB 培地に植菌し、さらに 37°C、2～5 時間振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.8～1.0 になったところで発現誘導剤を加えて HBsAg 蛋白質発現を誘導した。発現誘導後、さらに 37°C で 4 時間若しくは 20°C で一晚 (低温培養時) 培養した後に菌体を回収した。

## (3) HBsAg 蛋白質の抽出

HBsAg 蛋白質の菌体内局在検討実験では、発現菌体をペリプラズム画分、超音波破碎後の可溶性画分 (界面活性剤非存在下)、0.5% TritonX-100 可溶性画分、および不溶性画分に分画した。

## (4) HBsAg 蛋白質の精製

### ① 欠失型変異体 dHBsAg の精製

発現菌体を Lysis Buffer に懸濁後、超音波破碎し、その遠心上清 (可溶性画分) を得た。抗 FLAG M2 Agarose カラムに上記の可溶性画分を添加し、4°C で 2 時間吸着反応後、数回洗浄し、Elution Buffer [1 mM EDTA-0.1 M Glycine-HCl (pH 3.5)] で溶出した (溶出画分 (1)～(8))。

### ② dHBs-ZZ 蛋白質の精製

欠失型変異体 dHBsAg と同様に、dHBs-ZZ 蛋白質発現菌体より可溶性画分を調製し、これ

を Ni-Srpharose カラムに添加し、室温で 5 分間反応後カラムを洗浄し、500mM イミダゾールを含む溶出用液で溶出させた (Ni カラム溶出画分)。

### (4) HBsAg 蛋白質の検出

蛋白質試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。泳動後のゲルをクマシーブルーリアントブルー染色して蛋白質バンドを検出した。あるいは、泳動後のゲルから蛋白質バンドを PVDF 膜に電気転写した後、HRP 標識化抗 FLAG 抗体、あるいは HisProbe™-HRP 結合体を各々用いたウエスタンブロッティングにより dHBsAg 蛋白質の C 末端部を検出し、ビオチン標識化抗 HBsAg 抗体とアルカリフォスファターゼ標識化抗ビオチン抗体により dHBsAg 蛋白質の N 末端側を検出した。

### (5) HBsAg 蛋白質の性状解析

#### ① 粒子様構造の解析

精製された大腸菌発現欠失型 HBsAg 蛋白質がウイルス様粒子構造を取るかどうかを、Sucrose 密度勾配遠心解析、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡観察、および走査型プローブ顕微鏡により観察した。比較対象として、酵母にて作製した野生型 HBsAg (L 蛋白質) 粒子 (BNC) あるいは野生型 HBsAg の N 末端に ZZ タグ配列を融合した粒子 (BNC-ZZ) を用いた (いずれも、ビークル社製)。

#### ② 大腸菌発現 dHBsAg-ZZ の抗体認識能

dHBsAg-ZZ の抗体認識能は、ウサギ血清 IgG を固相化しスキムミルクでブロッキングしたマイクロウェルプレートと HRP 標識化ウサギ IgG とを用いた酵素免疫測定法あるいは水晶発振子極微量天秤法により測定した。

#### ③ HBsAg-ZZ のトリプシン切断実験

精製 HBsAg-ZZ 粒子に、TPCK-トリプシンを加えた後、34°C で、20 分、2 時間若しくは 16 時間消化反応を行った後、反応液を SDS-PAGE で解析した。クマシー染色により全

消化断片を、ウエスタンブロッティングによりC末端側あるいはN末端側配列を含む切断断片を各々検出することで、粒子表面に露出されている領域を検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸菌による欠失型HBsAg粒子生産

##### ①大腸菌における欠失型HBsAgの発現

pETシステムを用いて野生型のHBsAg (S蛋白質) を大腸菌で発現させた後、菌体内の発現誘導バンドを電気泳動で解析した。その結果、いずれの菌株でも明瞭な発現誘導バンドが認められず、発現量が極めて低かった。N末端74残基とC末端54残基を欠失させ構造を簡略化したHBsAg変異体 (s+dHBsAg) でも同様に、発現量が極めて低かった。しかし、N末端76残基とC末端54残基を欠失させたHBsAg変異体 (dHBsAg) では、約21kDaに発現誘導バンドが明瞭に観察され (図2)、その発現量は特にOrigami 2 (DE3)株で高かった。発現されたdHBsAgは、菌体破碎後の可溶性画分と界面活性剤抽出画分と不溶性画分とに分配したが、培養温度を通常の37°Cから20°Cに下げると、可溶性画分への発現が増加した。発現誘導バンドが目的のdHBsAgである事は、N末端側を認識する抗HBsAgおよびC末端側を認識する抗His抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

野生型HBsAgおよびs+dHBsAgには典型的な

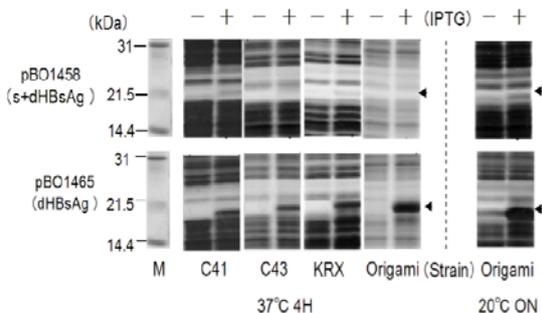


図2 各種大腸菌株による s+dHBsAg および dHBsAg の発現

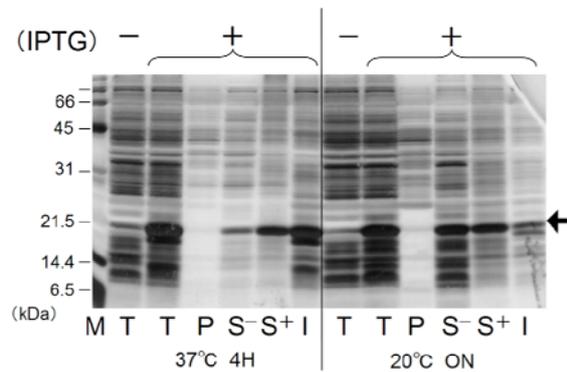


図3 発現されたdHBsAgの菌体内局在。  
T: 全産, P: ペリプラズム, S: 可溶性画分, S+: 界面活性剤可溶性画分, I: 不溶性画分, M: 分子量マーカー。

II型シグナルアンカー配列 (SAII配列、膜蛋白質の膜貫通配列を膜に効率的に組み込むマシナリーが認識する配列) が保存されているが、dHBsAgでは保存されていない。真核生物のSAII配列は大腸菌のSAII配列と少し特徴が異なるため、真核生物のSAII配列の菌体内強制発現が大腸菌の膜タンパク合成を拮抗阻害したと考えられる。またdisulfide 結合を含む蛋白質の活性構造での発現のために開発されたOrigami 2 (DE3)株での発現量が高い事、可溶性画分へ発現する事、しかも低温培養で可溶性画分への発現が増加する現象から、dHBsAgが活性構造すなわち粒子として大腸菌菌体内に発現されている事が推測された。

##### ② dHBsAgの精製と性状解析

dHBsAgを発現させたOrigami 2 (DE3)株の可溶性画分を抗FLAG抗体カラムクロマトグラフィーに供する事により、純度80%以上のdHBsAgを取得した。得られた精製dHBsAgをシヨ糖密度勾配遠心解析した結果、dHBsAgは動物細胞で産生させた「野生型HBsAg粒子」と同様の沈降を示した事から、モノマーとしては約20kDaのdHBsAgが自己凝集して、HBsAg粒子と同様の複合体構造を形成している事が示唆された。同様に、透過型電子顕微鏡観察で、dHBsAg精製品に野生型HBsAg粒子と同様の直径の粒子構造が観察された (図4)。

##### (2) ZZtag付加dHBsAg粒子の生産

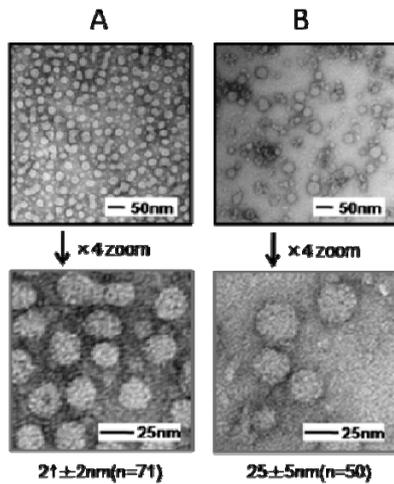


図4 市販精製HBsAg粒子(A)とdHBsAg粒子 (B)の電子顕微鏡写真

### ① 大腸菌によるdHBsAg-ZZの発現と精製

上記dHBsAgのC末端に抗体認識配列（ZZtag配列）を付加した融合遺伝子（dHBsAg-ZZ）を構築し、大腸菌Origami 2 (DE3)株を用いて発現させた。菌体可溶性画分より、Ni-カラムを用いてdHBsAg-ZZを精製し、純度70%を超える精製物を取得した。このdHBsAg-ZZ発現用ベクターでの大腸菌形質転換操作からニッケルカラム精製終了までの所要時間は約4日であった。従来の酵母を用いた生産法では、スクリーニングを含めて最低1ヶ月程度必要だった事を考慮すると、極めて迅速かつ簡便にdHBsAg変異体や融合体を試作する事ができた。

### ② dHBsAg-ZZ粒子の性状解析

dHBsAg-ZZも野生型HBsAgやdHBsAgと同様の粒子構造を取る事は、ショ糖密度勾配遠心と透過型電子顕微鏡観察により確認した。さらに粒子径を動的光散乱を用いて測定した結果、dHBsAg-ZZ粒子は酵母由来ZZ-HBsAg粒子よりも多分散係数は0.376と高く粒子径は不均一化していたが、粒子個数でみると酵母由来ZZ-BNCとほぼ同じ大きさの直径28 nm前後の粒子が主に含まれていた。また原子間力顕微鏡観察では、dHBsAg-ZZ粒子は高さが6.7-15.5nm、直径は28.7-57.4nmであり、酵母

表1 Zeta sizerによるdHBsAg粒子径の解析

試料	平均粒子径 Z-Average (d. nm)	多分散係数 PDI	平均粒子径 視野像に基く(nm)
dHBsAg-ZZ粒子 (E. Coli)	310	0.376	28.9
ZZ-HBsAg粒子 (酵母)	48.2	0.156	28.1

で作製した野生型ZZ-HBsAg粒子と類似した大きさであった。通常、脂質二重膜の厚さは5 nm程度である事から、10nm以上の厚さを示すdHBsAg-ZZ粒子では、脂質二重膜が2層重なっていると考えられ、従来のHBsAg-ZZ粒子と同様に、中空球状物の構造を有することが考えられる。

### ③ dHBsAg-ZZ粒子の抗体結合力

精製HBsAg-ZZ粒子をトリプシンで処理したところ、C末端側のZZ配列が迅速に消化されるのに対して、N末端側のHBsAg配列側が消化されにくかった事から、ZZ配列を外側に露出した粒子構造を取る事が示された。HBsAg-ZZがウサギ抗体に結合する事は、ウサギ抗体を固相に用いた酵素免疫測定法で確認された。dHBsAg-ZZ へのヒトIgG, ラットIgG, ウサギIgGの結合量を水晶発振子極微量天秤により測定した結果、1モルのdHBsAg-ZZあたり14モルのヒトIgGが結合すると判断された。なお、ZZタグと結合できないラットIgGは、dHBsAg-ZZとも結合できず、両方に結合するウサギIgGはdHBsAg-ZZとも同様に結合できた。

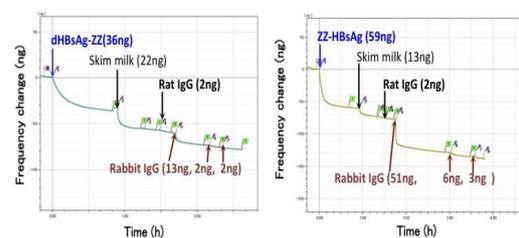


図5 水晶発振子極微量天秤による dHBsAg-ZZ粒子への抗体分子結合測定

### (3) 位置づけと展望

以上より、本研究により初めて、ウィルスエ

ンヴェローブ粒子様の性質を有する中空ナノ粒子の大腸菌による迅速生産が可能となった。また、その表面に生体認識配列 (ZZタグ) を提示した融合型粒子も極めて簡便迅速に作製・評価できる事を実証した。ZZタグ配列提示粒子 (dHBsAg-ZZ) については、その抗体結合能も確認した。生体分子認識粒子開発については今後、様々な認識配列の融合や認識配列を配向性良く、より高密度に粒子上に提示するための設計などの検討により、様々な診断応用 (標的分子の配向的高密度提示によるセンサーの高感度化など) が期待される。そのような様々な粒子の試作検討に、本研究の簡便迅速な大腸菌生産システムは威力を発揮する。さらに粒子への薬物封入については、dHBsAg-ZZ粒子へ薬物を封入する従来法の他に、我々が開発した可逆性S-カチオン化試薬で強制的に可溶化したdHBsAg蛋白質を薬物封入リポソーム上でfoldingする方法を検討しており、可逆性S-カチオン化試薬の可溶化能についてはすでに確認した。今後薬物封入法の検討を進め、薬物送達システムへの応用へ展開したい、

#### 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] (計2件)

① Hidenori Yamada (4番目、他4名), Polyethylenimine-cationized beta-catenin protein transduction activates the Wnt canonical signaling pathway more effectively than cationic lipid-based transduction. Biotechnol. J. (査読有), vol. 5, No. 4, 2010, pp. 14-20.

[学会発表] (計3件)

① 多田宏子、蛋白質の質量分析におけるS-カチオン化試薬の有用性、日本蛋白質科学会、2011年6月7日

② 二見 淳一郎, 山田 秀徳. 変性タンパク質の可溶化技術と工学的応用, 第9回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月18日、札幌

③ 栗木政徳、小坂恵、二見淳一郎、山田秀徳、妹尾昌治、多田宏子、ヒトD型肝炎ウイルス形成メカニズムを利用したHBsAg粒子内部への機能蛋白質封入法, 第9回 日本蛋白質科学会年会, 2006年5月20日、熊本

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ウィルス粒子様ナノカプセル  
発明者: 多田宏子、妹尾昌治、黒田俊一  
権利者: 岡山大学、名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-162596  
出願年月日: 平成 23 年 7 月 25 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

該当無

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 宏子 (TADA HIROKO)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授  
研究者番号: 60271061

(2) 研究分担者

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

(3) 研究協力者

黒田 俊一 (KURODA SHUN' ICHI)  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号: 60263406