

平成21年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

(平成21年度補正予算事業)

「各種タンパク質を内包できるバイオナノカプセルの酵母発酵を用いた汎用生産技術の開発」

## 研究開発成果等報告書

平成22年 3月

委託者 中国経済産業局

委託先 財団法人岡山県産業振興財団



## 目次

### 第1章 研究開発の概要

|                      |   |
|----------------------|---|
| 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標 | 2 |
| 1-2 研究体制             | 4 |
| 1-3 成果概要             | 6 |
| 1-4 当該プロジェクト連絡窓口     | 9 |

### 第2章 本論

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 2-1 タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討 | 10 |
| 2-2 タンパク質内包 BNC 産生酵母の培養の検討       | 11 |
| 2-3 タンパク質内包 BNC の精製法の検討          | 19 |
| 2-4 タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価       | 30 |

|          |    |
|----------|----|
| 最終章 全体総括 | 32 |
|----------|----|

## 第一章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

医薬品分野では、低分子化合物(例えば、アスピリンなど)を有効成分とする医薬品を第一世代の医薬品とすると、現在はタンパク質を有効成分とする第二世代の医薬品が全盛期を迎えている。既に市場へ投入されたタンパク質医薬品(例えば、インターフェロンや抗体医薬)は細胞表面の受容体や抗原を認識することによりその薬理作用を示す。

一方、近年、細胞内のタンパク質に作用するタンパク質を医薬品として開発しようとする新しいコンセプトに基づく試みが始まっている。即ち、タンパク質の多くは細胞内に存在し、細胞内部で細胞機能の維持に関し重要な機能を担っているため、細胞内へ特定の機能を有するタンパク質を導入できれば、非常に多くの疾患に対する治療薬剤を開発できる可能性がある。しかし、タンパク質は細胞膜を透過できないため、細胞内部へ目的タンパク質を導入するには特殊な技術が必要である。タンパク質を細胞内へ導入するための技術や試薬は既に幾つか存在するが、これらは何れも導入時に細胞にダメージを与えるため、生理的条件下での観察は困難であり、まして医薬品としての利用は不可能である。以上のことから、タンパク質の細胞内導入を可能とする新しい薬物送達システム(DDS: Drug Delivery System)の技術が必須である。

(株)ビークルはバイオナノカプセル(BNC: Bio-Nanocapsule)という素材を用いて DDS 技術を開発しているが、BNC は細胞内への内包物導入能を有しているため、BNC 内へタンパク質を内包できれば、細胞内へのタンパク質の導入が可能となる。そのため川下企業(製薬企業や試薬企業)から、BNC 内へタンパク質が内包できないかという要望が強い。最近、(株)ビークルとの共同研究機関である岡山大学は、新規のタンパク質内包 BNC 製造技術を見出し、その成果を2009年5月に発表した。本法はその原理から判断し、汎用性が高く、実用性の高い製造技術であると判断された。本研究開発は、新たに岡山大学によって発見されたウイルスタンパク質の性質を利用したタンパク質の BNC への内包法を発展させ、タンパク質を内包する BNC の製造技術を開発することを目的とする。なお、本研究開発の成果は、次世代の医薬品である「細胞内で作用するタンパク質医薬品」における創薬研究の新規のツールとして、また、将来的には医薬品用の必須技術として利用されることが考えられ、社会的にも経済的にも大きなインパクトを与えると信ずる。

(株)ビークルは BNC の細胞認識能と内包物細胞内導入能を利用して薬物送達システム(DDS)技術を開発して来ている。既に、低分子化合物や低分子核酸に関しては体内の標的細胞への導入に成功している。既述の様に岡山大学は BNC へのタンパク質内包技術を見出した。本方法は、D 型肝炎ウイルスの機能を用いたもので、BNC 産生細胞へ内包する目的タンパク質を発現させることにより BNC へ内包させるものである(図1参照)。

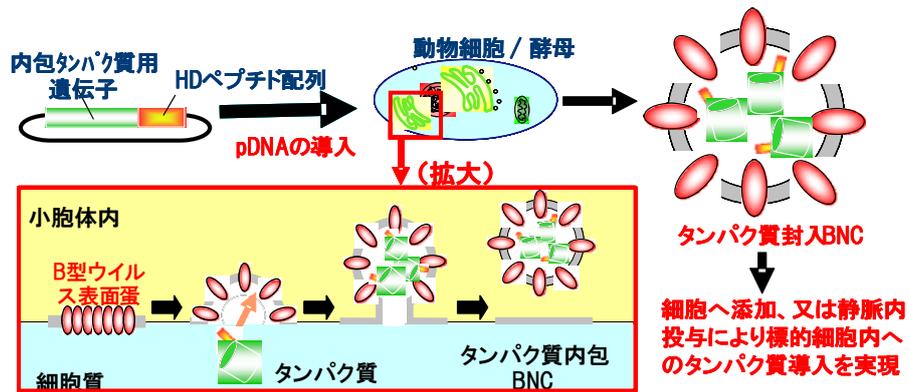


図1. タンパク質内包 BNC の製造方法の概念図

本技術を効率良く実現するためには、以下のステップが必要である。(図2参照)

1. BNC 生産酵母へ予め調製した目的タンパク質発現用遺伝子を含むプラスミド DNA を導入する。この遺伝子を導入した酵母がタンパク質内包 BNC の生産酵母となる。
2. 本酵母を培養し、その培養した菌体からタンパク質内包 BNC を精製する。
3. 得られたタンパク質内包 BNC の機能を確認するため、これを細胞へ適用し、内包タンパク質を細胞内に導入できることを確認する。

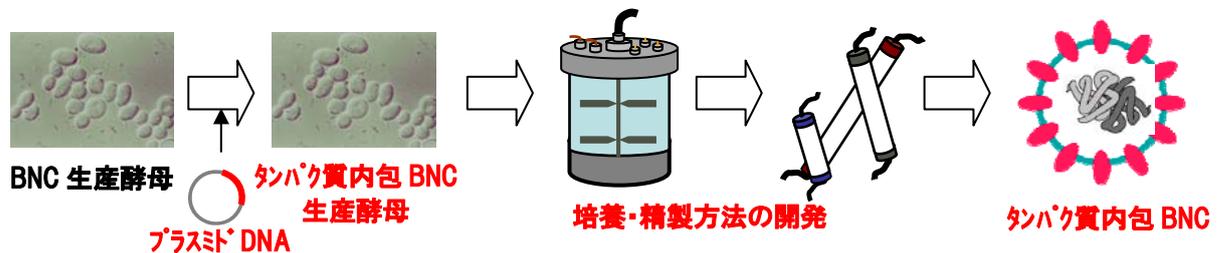


図2. タンパク質内包 BNC の製造工程の概念図

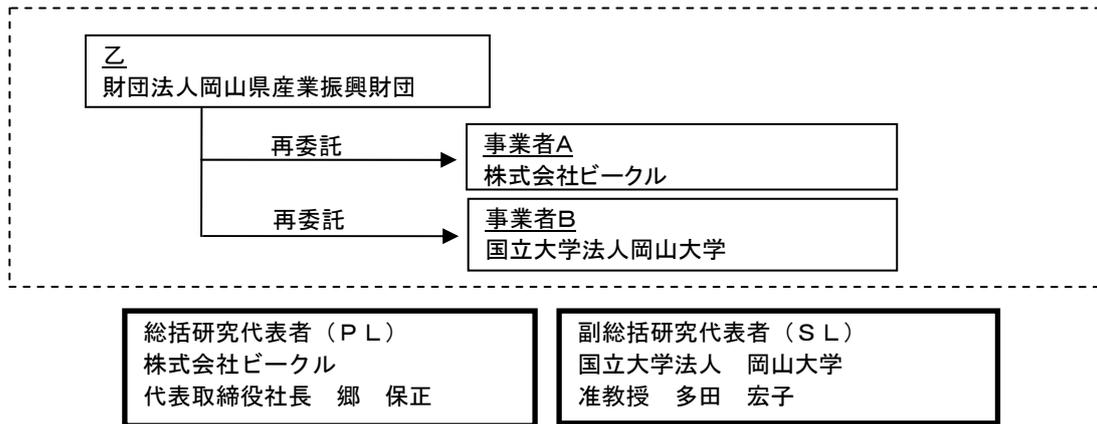
本研究開発は、上記の一連のステップを実現可能なものとするための最初の研究開発内容として、後述する(1-3 成果概要)4種のサブテーマについて、それぞれ目標を設定し、開発を行うものである。

なお、本研究開発事業が終了後も、研究開発を引き続き推し進め、早い段階で創薬研究用の試薬としての事業化を目指すと共に、更に多種のタンパク質について、内包化、純度、封入効率の向上、製造のスケールアップ、機能性評価などに関する研究開発を進め、医療用への応用を目指す。

1-2 研究体制(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

(1) 研究組織及び管理体制

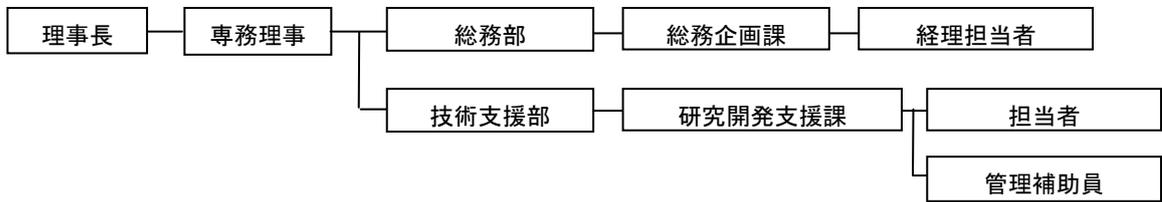
1) 研究組織(全体)



2) 管理体制

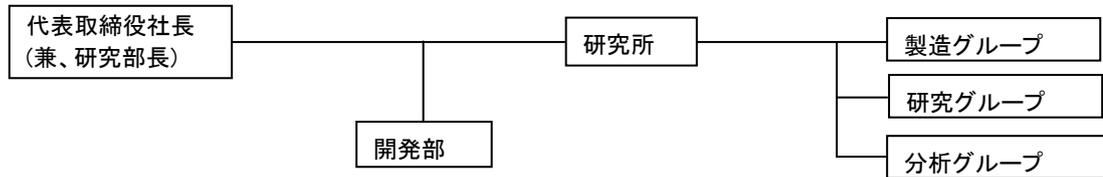
① 事業管理者

財団法人 岡山県産業振興財団

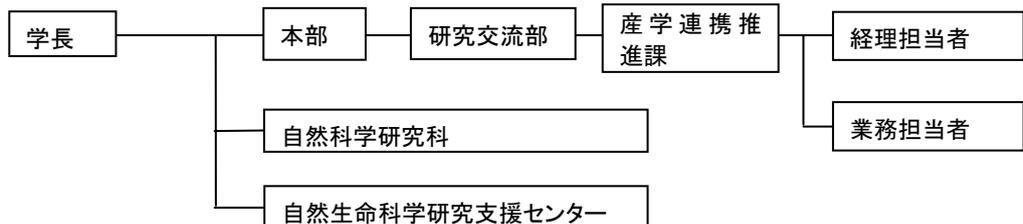


② 再委託先

株式会社ビークル



国立大学法人 岡山大学



(2) 管理員及び研究員

管理員：【事業管理者】財団法人岡山産業振興財団

| 氏名     | 所属・役職            |
|--------|------------------|
| 三島 佳洋  | 技術支援部 部長         |
| 横田 尚之  | 技術支援部 研究開発支援課長   |
| 宮内 隼   | 技術支援部 研究開発支援課 主事 |
| 綱澤 知則  | 技術支援部 研究開発支援課 主事 |
| 間宮 真理子 | 総務部 総務企画課 主事     |
| 猪口 陽平  | 技術支援部 研究開発支援課 主事 |

研究員：【再委託先】株式会社ビークル

| 氏名     | 所属・役職        |
|--------|--------------|
| 郷 保正   | 代表取締役、兼、研究部長 |
| 日詰 信吾  | 開発部 開発部長     |
| 織田 康則  | 研究所 研究グループ   |
| 山田 一郎  | 研究所 製造グループ   |
| 芝 文雄   | 研究所 製造グループ   |
| 中山 壮一郎 | 研究所 分析グループ   |
| 小西 明雄  | 研究所 研究グループ   |
| 河合 利将  | 研究所 製造グループ   |
| 塩川 つぐみ | 研究所 分析グループ   |

研究員：【再委託先】国立大学法人 岡山大学

| 氏名    | 所属・役職             |
|-------|-------------------|
| 多田 宏子 | 自然生命科学研究支援センター准教授 |
| 妹尾 昌治 | 自然科学研究科 教授        |
| 高村 賢司 | 自然科学研究科           |

### 1-3 成果概要

本研究開発を行うに当たって、以下の様な目標を設定した。

#### <目標値>

| 開発テーマ                           | 目標値                                   |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| ①目的タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討 | 3種類以上の目的タンパク質の遺伝子を選択しプラスミド DNA を調整する。 |
| ②タンパク質内包 BNC 産生酵母の培養の検討         | タンパク質内包 BNC の生産量を 0.01g/5L(培養液)とする。   |
| ③タンパク質内包 BNC の精製法の検討            | 精製のタンパク質内包 BNC の内包率は 80%以上とする。        |
| ④タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価         | 細胞内へ目的タンパク質が導入され、その機能が観察できることを証明する    |

なお、本事業期間の実施計画書中では、実施期間を考慮し、上記目標の内、目標①においては 1 種以上のタンパク質を選択し、引き続き検討で 3 種以上の内包化を試みること、目標③においては、50%以上の内包率の達成を目指し、引き続き検討で 80%以上の内包率を達成することとした。

以下に目標毎に成果を記載する。

#### ①目的タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討

内包目的のタンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP:Green Fluorescent Protein)を選択し、発現ベクターとしては性質の異なる 2 種類のベクター(vector 1、及び vector 2)について検討した。用いる GFP 遺伝子としては、改良型 GFP 遺伝子である EGFP(Enhanced GFP)遺伝子と yEGFP(Yeast Enhanced GFP)遺伝子の 2 種類を用いた。まず、GFP 遺伝子に、それを BNC 内へ内包させるために必要な D 型肝炎ウイルスのコアタンパク質 C 末端 19 アミノ酸ペプチド配列(以下、DAg と略記)を結合した遺伝子を設計し、それをベクターに挿入した。EGFP 遺伝子については 2 種のベクターへ挿入したものを調製したが、yEGFP 遺伝子については先行して検討した EGFP 遺伝子の結果から、発現効率の良い vector 1 に挿入したものを調製した(下表参照)。なお、これらは核酸配列を確認した結果、設計どおりであることを確認した。

表 1. 調製した GFP-DAg 発現ベクター

| 発現ベクター名            | ベクター内容  |
|--------------------|---|
| Vector 1-EGFP-DAg  | EGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 1 へ挿入したものの。  |
| Vector 2-EGFP-DAg  | EGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 2 へ挿入したものの。  |
| Vector 1-yEGFP-DAg | yEGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 1 へ挿入したものの。 |

目標達成度: GFP タンパク質に DAg 配列を融合させた修飾 GFP 遺伝子を発現させるために、性質の異なる 3 種のベクターを設計・調製した。よって、1 種類のタンパク質について目標を達

成した。なお、3種のベクターを調製したことにより、相互の比較が可能となり、最終目標である GFP 内包 BNC を製造するために必要な条件を検討することが可能となった。

## ②タンパク質内包 BNC 産生酵母の培養の検討

これらのベクターを酵母へスフェロプラスト法(酵母の細胞壁を溶解してスフェロプラスト化し、ポリエチレングリコール存在下で DNA を取りこませる方法)を使用して、酵母へ導入した(表2参照)。用いた親株である酵母は、ビークルが保有する4種類の BNC-ST 発現酵母を用い、合計 10 種の遺伝子導入(形質転換)を行った。その結果を下表にまとめた。なお、これら4種の酵母株(BNC-ST-A, BNC-ST-B, BNC-ST-C, BNC-ST-D 株)の BNC-ST 発現量は異なることが分かっている。

表2 GFP-DAg 発現ベクターを用いた BNC-ST 株の形質転換

| 発現ベクター名                | 形質転換株数<br>(BNC-ST 株)                         | 選抜<br>クローン数                  | 大量培養<br>株数               | BNC 発現量<br>(mg/5L) | コメント  |
|------------------------|--|------------------------------|--------------------------|--------------------|---|
| vector 1-<br>EGFP-DAg  | A : 25 株<br>B : 60 株<br>C : 29 株<br>D : 22 株 | 17 株<br>57 株<br>21 株<br>20 株 | 1 株<br>0 株<br>0 株<br>0 株 | 8~9                | EGFP 発現:弱い<br>大量培養したものは<br>精製ステップへ移行。                 |
| vector 2-<br>EGFP-DAg  | A : 48 株<br>C : 48 株                         | 48 株<br>48 株                 | 0 株<br>0 株               |                    | 形質転換による増殖<br>抑制が見られたため、<br>大量培養が出来ず。                  |
| vector 1-<br>yEGFP-DAg | A : 11 株<br>B : 35 株<br>C : 15 株<br>D : 15 株 | 2 株<br>4 株<br>13 株<br>10 株   | 0 株<br>1 株<br>0 株<br>1 株 | 77.1<br>145        | yEGFP 発現:良好<br>大量培養した株の内、<br>BNC-ST-B 株を精製<br>ステップへ移行 |

- vector 1-EGFP-DAg では、136 株で形質転換が見られたが、培養に耐えたものは 121 クローンであった。これらのクローンについて液体培養で培養した後、GFP タンパク質を検出したが、発現量が低いと想定された。比較的 GFP の発現の高かった BNC-ST-A 株の内 1 クローンについて 5L スケールの培養を行い、次の精製工程も行ったが、結果として、GFP の発現が弱く、弱い蛍光が確認されたに過ぎなかった。なお、BNC の発現量は約 9 mg/5L であった。
- vector 2-EGFP-DAg では、合計 96 株で形質転換が見られ、総てが初期段階の培養に耐えたが、大量培養に移行する前の液体培養では増殖が抑制され、液体培養、大量培養とも実施出来なかった。本ベクターは今回用いた酵母株では適用が困難であると判断した。なお、本株でも GFP の発現を確認できた。
- vector 1-yEGFP-DAg では、合計 76 株に形質転換が見られ、その内、培養に耐えるクローンは 27 株であった。これらの GFP 発現を観察したところ酵母自体も強く蛍光を発するなど、非常に高い発現が見られた。GFP の発現量の高い BNC-ST-B 株と BNC-ST-D 株の各 1 株ずつを用い大量培養を行った。その結果、これらの株における BNC の発現量は

各々77.1、145mg/5Lであった。なお、大量培養した菌体の破碎液を用いて、抗 BNC 抗体による免疫沈降実験を行った結果、BNC を回収すると GFP による強い蛍光も一緒に回収されることがわかり、BNC 内へ GFP が内包されているものと判断された。

目標達成度： GFP を発現させても酵母の増殖能と BNC の生産量は変わらず、現行の培養法が最も良い培養条件であることがわかった。また、GFP 内包 BNC の酵母による生産量(発現量)は最大で 0.145 g/5L であり、目標とした 0.01 g/5L を大きく超えた。

### ③タンパク質内包 BNC の精製法の検討

#### 1) vector 1-EGFP-DAg 導入 BNC-ST-A 株より精製

BNC の精製方法として、アフィニティーカラムを用いるアフィニティー・ゲルろ過法を用いて検討した。精製度は 600 倍以上になり、精製品として 2.3 mg の BNC を得た。本精製品は上記した様に、GFP の発現が低く、GFP 内包 BNC の評価を行うには不十分であったため、その後の検討を中止した。但し、精製工程において本精製法が利用可能であることがわかった。

#### 2) vector 1-yEGFP-DAg 導入 BNC-ST-B 株より精製

アフィニティー・ゲルろ過法と密度勾配遠心・ゲルろ過法、何れの方法によっても 550 倍以上の精製に成功し、それぞれタンパク量として約 8.4mg、3.3mg の高純度の精製 BNC を得た。なお、最終精製品を解析したところ、見られる蛍光強度は密度勾配遠心・ゲルろ過法の方が高く、アフィニティー・ゲルろ過法の過程で蛍光が若干弱まっている可能性が示唆された。また粒子径や BNC の肝細胞への親和性の指標となる pre-S1 の比活性は通常の BNC とほぼ同じであり、内包タンパク質による影響を殆ど受けていないことが示された。GFP の内包率は 85%を超え、また、BNC の 1 粒子あたり 8~12 分子の GFP が内包されていることが分かった。

目標達成度： GFP 内包 BNC の精製法を検討し、タンパク質純度も非常に高く、内包率も 85%を超えるものを得ることが出来た。このことは、D 型肝炎抗原由来のペプチド配列を用いる手法が、BNC 内へタンパク質を内包するために非常に優れた手法であることを改めて示したものであると言える。

### ④タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価

上記 2 種の精製法を用いて得られた GFP 内包 BNC を用いてヒト肝細胞への導入能を検討した。用いた 4 種のヒト肝細胞(SK-HEP-1、HepG2、HuH-7、NuE)全てにおいて GFP に由来する蛍光が細胞内に観察され、ヒト肝細胞への導入能を有することが分かった。なお、蛍光強度は GFP 内包 BNC の蛍光強度を反映し、密度勾配遠心・ゲルろ過法によって精製された GFP 内包 BNC の方が強かった。

目標達成度：精製した最終標品の GFP 内包 BNC を用いて細胞内導入能を検討した結果、GFPに由来する蛍光が細胞内で見られ、BNCは内包するGFPを細胞内へ導入する能力があることが分かった。達成率は100%であった。

#### 1-4 当該プロジェクト連絡窓口

管理法人：財団法人岡山県産業振興財団

〒701-1221 岡山市北区芳賀 5301 テクノサポート岡山 3F

連絡担当者名・所属役職：技術支援部 研究開発支援課 課長 横田 尚之

TEL: 086-286-9651 FAX: 086-286-9676

E-mail: [nyokota@optic.or.jp](mailto:nyokota@optic.or.jp)

## 第2章 本論

D型肝炎ウイルスのコア蛋白質由来ペプチド(DAgと略す)はBNCを構成するLタンパク質と相互作用することが知られている。そこで、DAg配列を融合した任意のタンパク質を BNC 産生酵母株に共発現させることで、任意のタンパク質を内包した BNC の作製を試みた。以下にその検討の詳細と作製したタンパク質内包 BNC の評価結果を示す。

### 2-1 目的タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討

#### (1) BNC に内包するタンパク質の選択

本事業の最終目標がタンパク質の細胞内導入の証明であることから、BNC に内包するタンパク質としては、可視化が容易である緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) を用いることが有効と考え、これを選択した。発現させる GFP 遺伝子としては、Enhanced GFP (EGFP) 遺伝子と Yeast-Enhanced GFP (yEGFP) 遺伝子を用いた。EGFP 遺伝子は、オワンクラゲから同定された天然の GFP よりも蛍光強度の強い変異体であることが知られている。また、yEGFP 遺伝子は、酵母内で高発現するように改良された GFP 遺伝子である。これら2種の遺伝子がコードする GFP タンパク質の C 末端側に DAg配列を融合するように発現ベクターをデザインした。

#### (2) 発現用プラスミドベクターの選択

酵母用発現ベクターとして特徴の異なる2つのベクターを用いた(表1-1)。大きな相違点は、vector-1 が導入した遺伝子を恒常的に発現するようにデザインされているのに対し、vector-2 によって導入した遺伝子は通常の増殖用培地では導入遺伝子が発現せず、培地にガラクトースを添加した時に初めて発現誘導されるという点である。

表1-1 使用した発現ベクターの種類と特徴

| ベクター     | プロモーター | 複製起点     | 主な特徴   |
|----------|--------|----------|--|
| Vector-1 | ADH1   | CEN/ARS  | ADH1プロモーターによる恒常的発現。CEN/ARS による安定で自立的な複製。                               |
| Vector-2 | GAL1   | 2-micron | 培地の糖成分をグルコースからガラクトースに変換することで、GAL 1プロモーターを介した高発現を誘導。2-micron による自立的な複製。 |

#### (3) GFP-DAg 発現用プラスミドベクターの作製

PCR 法により、EGFP 遺伝子または yEGFP 遺伝子に DAg配列を連結させたcDNA を作製した。作製した EGFP-DAg cDNA 及び yEGFP-DAg cDNA を、2種のベクター(vector-1, vector-2)

ヘライゲーション反応により連結させ、表1-2に示す3種の GFP-DAg 発現ベクターを作製した。

表1-2 作製した GFP-DAg 発現ベクター

| 発現ベクター名            | ベクター内容                                       |
|--------------------|--|
| Vector 1-EGFP-DAg  | EGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 1 へ挿入したもの。  |
| Vector 2-EGFP-DAg  | EGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 2 へ挿入したもの。  |
| Vector 1-yEGFP-DAg | yEGFP 遺伝子に DAg 配列を結合した遺伝子を vector 1 へ挿入したもの。 |

## 2-2 タンパク質内包 BNC 産生酵母の培養の検討

### (1) タンパク質内包 BNC 産生酵母の作製・培養方法

2-1項で作製した3種の GFP-DAg 発現プラスミドベクターを以下に示した手順で BNC 産生酵母株に導入し、GFP-DAg と BNC が共発現する酵母株の作製を試みた。

#### ①発現プラスミドベクター導入による BNC 産生酵母の形質転換

2-1項で構築した3種の発現プラスミドベクターを用いて、4種の BNC-ST 発現酵母株 (BNC-ST-A、BNC-ST-B、BNC-ST-C、BNC-ST-D) にそれぞれ形質転換 (スフェロプラスト法) し、寒天選択培地で数日間培養して形質転換体を得た。なお、用いた4種の BNC 発現酵母株は、BNC-ST-A < BNC-ST-B < BNC-ST-C < BNC-ST-D の順に BNC の産生量が増加することが分かっている。BNC 発現量の異なるこれら4種の株を検討に用いたのは、BNC 発現量と導入する GFP-DAg の発現量の比が内包率に影響すると考えたからである。

#### ②タンパク質内包 BNC 産生酵母株の選抜

1次選抜: 上記①で得られたコロニーを寒天選択培地プレートに播種し、数日間培養した。ここで生育した形質転換体を GFP-DAg と BNC が共発現する酵母株 (GFP-DAg/BNC 発現株) の候補とした。

2次選抜: GFP-DAg/BNC 発現候補株を液体培地で数日間培養し、菌体を得た。この菌体中に含まれる BNC と GFP-DAg を表2-1に示した方法で検定した。BNC と GFP-DAg の共発現が確認された株を GFP-DAg/BNC 発現株とした。

#### ③培養条件の最適化

上記②により得られた GFP-DAg/BNC 発現株を、通常の BNC 発現酵母株の培養条件を元にして3段階の培養を行い、培養菌体を得た。菌体中に含まれる BNC 発現量を

PreS1-ELISA 法で、GFP 発現量をウエスタンブロット法でそれぞれ求めることで評価した。また別法として、酵母細胞内に発現している GFP の発現を蛍光観察法(表2-1 参照)によっても評価した。BNC に内包された GFP の検出は免疫沈降・蛍光観察法(表2-1 参照)により行った。

**表2-1 BNC と GFP の検出方法**

| 検出物質    | 方法             | 詳細  |
|---------|----------------|---|
| BNC     | PreS-1 ELISA 法 | BNC を構成する L-タンパク質の Pre-S1 領域を認識する抗 Pre-S1 抗体を用いて BNC を検出定量する方法。                                       |
| GFP     | ウエスタンブロット法     | 電気泳動したタンパク質を抗 GFP 抗体を用いて検出する方法。   |
| GFP     | 蛍光観察法          | 酵母細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより、酵母内に発現している GFP を検出する方法。  |
| BNC/GFP | 免疫沈降・蛍光観察法     | 抗 PreS-1 抗体を結合したビーズと酵母抽出液をインキュベーションし、BNC をビーズに結合させる。このビーズを蛍光顕微鏡で観察することにより BNC に内包された GFP-DAg を検出する方法。 |

(2)タンパク質内包 BNC 産生酵母の作製・培養検討結果

2-1 項で作製した3種の発現プラスミドベクター (vector 1-EGFP-DAg、vector 2-EGFP-DAg、vector 1-yEGFP-DAg)を用いたそれぞれの検討結果について以下に示す。

2-1) vector 1-EGFP-DAg による形質転換及び GFP-DAg/BNC 発現菌体の作出

発現プラスミドベクター-vector 1-EGFP-DAg を4種の BNC 発現酵母株に形質転換し、得られた形質転換体をプレート培養及び液体培養することにより GFP-DAg/BNC 発現株の1次、2次選抜を行った。結果のまとめを表2-2に示す。

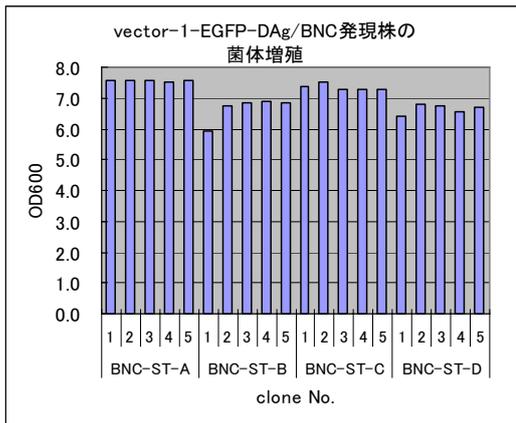
4種の BNC 発現酵母株に形質転換した結果、22~60 株の形質転換体を得られ、1次選抜では 17~57 の候補株が得られた。これらの中から任意の 5 株ずつについて 2次選抜を行った結果、全ての株において酵母の増殖は良好であった(図2-1A)。また、全ての株で BNC と GFP の発現が確認され、BNC 発現酵母株種内での BNC、GFP の発現はほぼ同様であった(図2-1B、C)。なお、BNC の発現量は形質転換していない宿主酵母と同程度であり、BNC の発現量は、BNC-ST-A 株 < BNC-ST-B 株 =

BNC-ST-C 株 < BNC-ST-D 株の順であった(図2-1B)。

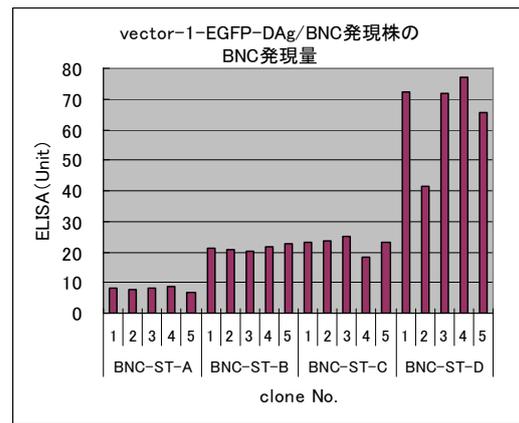
表2-2 GFP-DAg/BNC 発現株の選抜 (vector 1-EGFP-DAg)

| BNC 発現酵母株<br>の名称 | 1次選抜 (プレート培養) |              | 2次選抜 (液体培養) |                |                     |
|------------------|---------------|--------------|-------------|----------------|---------------------|
|                  | 形質転換<br>体数    | 選択培地<br>生育株数 | 検討<br>株数    | 増殖良好で<br>あった株数 | GFP-DAg/BNC<br>発現株数 |
| BNC-ST-A         | 25            | 17           | 5           | 5              | 5                   |
| BNC-ST-B         | 60            | 57           | 5           | 5              | 5                   |
| BNC-ST-C         | 29            | 21           | 5           | 5              | 5                   |
| BNC-ST-D         | 22            | 20           | 5           | 5              | 5                   |

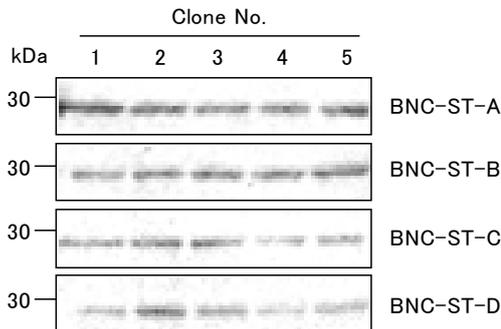
ウエスタンブロット法では GFP の発現が確認された(図2-1C)が、蛍光観察法では酵母内に発現した GFP の蛍光は、どの株でも検出されなかった。よって、GFP の発現は極めて低いことが示唆された。



(A) 菌体増殖



(B) PreS-1ELISA 法による BNC の検出



(C) ウエスタンブロット法による GFP の検出

図2-1 GFP-DAg/BNC 発現株の2次選抜 (vector 1-EGFP-DAg/BNC)

Clone No. 1~5 は1次選抜した株から任意に選んだ5株の番号を示す。

発現している BNC により効率的に GFP を内包するためには、GFP-DAg と BNC の発

現量の比 (GFP-DAg/BNC) が高いほどより効率的であると考えられる。従って、発現量の比 (GFP-DAg/BNC) が最も高い株、すなわち BNC 発現量がより低い株である EGFP-DAg/BNC-ST-A 株を 5L スケール培養検討に用いることにした。結果を表 2-3、図 2-2 に示す。

表 2-3 EGFP-DAg/BNC-ST-A 株 (vector 1-EGFP-DAg) の 5L スケール培養結果

| 酵母株の名称                   | 菌体量/培養液<br>(g/L-culture) | BNC 発現量 #<br>(Unit/5L-culture) | BNC 発現量 *<br>(mg/5L-culture) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| EGFP-DAg/BNC-ST-A (培地 A) | 15.91                    | 11175                          | 7.45                         |
| EGFP-DAg/BNC-ST-A (培地 B) | 15.52                    | 13502                          | 9.00                         |
| BNC-ST-D                 | 31.03                    | 280918                         | 187                          |

#Pre-S1ELISA 法によって測定された値

\* Pre-S1ELISA 法によって測定された値を基に算出された BNC の発現量

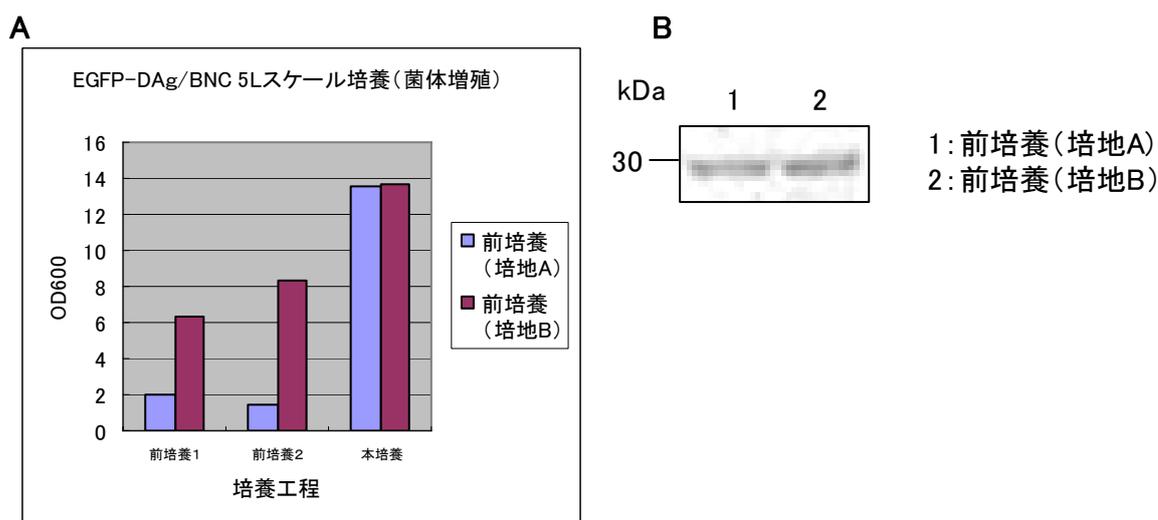


図 2-2 5L スケール培養での検討 (EGFP-DAg/BNC-ST-A 株)

A: 前培養に培地 A または B を用いた時の酵母の増殖 (縦軸 OD600 は培地中の菌体濃度を示す。)

B: 本培養によって得られた菌体中の GFP をウエスタンブロット法により検出。

EGFP-DAg/BNC-ST-A 株の中から 1 クローンを用いて、5L スケール培養の検討を行った。まず、2 段階の前培養を経て菌体量を増加させ、2 段階目の前培養で得られた菌体を用いて最終的に 5L 培養液での本培養を行った。BNC の生産に通常用いている BNC 発現酵母株 (BNC-ST-D 株) を前培養する時に用いる培地 A を用いて EGFP-DAg/BNC-ST-A 株を前培養したところ、BNC-ST-D 株を培養する時と比較して菌体の増殖が良好ではなかった。そこで、前培養の 1、2 段階目に用いる培地を栄養

源のより豊富な培地 B に変更したところ、培地 A を用いた時と比較して数倍の増殖が確認された(図2-2A)。本培養で得られた菌体重量を比較すると、いずれの場合も同程度であったが、前培養に培地 B を用いることによって BNC 発現量に改善がみられた(表2-3)。また、5Lスケールの培養でえられた菌体中の GFP 発現をウエスタンブロット法によって確認した(図2-2B)。

## 2-2) vector 2-EGFP-DAg による形質転換及び GFP-DAg/BNC 発現菌体の作出

発現プラスミドベクターvector 2-EGFP-DAg を2種の BNC 発現酵母株に形質転換し、得られた形質転換体をプレート培養及び液体培養することにより GFP-DAg/BNC 発現株の1次、2次選抜を行った。結果のまとめを表2-4に示す。

**表2-4 GFP-DAg/BNC 発現株の選抜(vector 2-EGFP-DAg)**

| BNC 発現<br>酵母株の名称 | 1次選抜 (プレート培養) |              | 2次選抜 (液体培養) |          |                    |                     |
|------------------|---------------|--------------|-------------|----------|--------------------|---------------------|
|                  | 形質転換<br>体数    | 選択培地<br>生育株数 | 検討<br>方法    | 検討<br>株数 | 増殖良好<br>であった<br>株数 | GFP-DAg/BNC<br>発現株数 |
| BNC-ST-A         | 48            | 48           | A           | 20       | 0                  | 未検討                 |
|                  |               |              | B           | 4        | 0                  | 4                   |
| BNC-ST-C         | 48            | 48           | A           | 20       | 0                  | 未検討                 |
|                  |               |              | B           | 4        | 0                  | 4                   |

2種の BNC 発現酵母株に形質転換した結果、それぞれ 48 株の形質転換体を得られ、1 次選抜の結果全ての株が候補株として得られた。2次選抜は以下に示す2種類の培養方法を検討した。なお、形質転換に用いたプラスミドベクター vector 2-EGFP-DAg は培地にガラクトースを加えることで GFP-DAg を発現するようにデザインされているため、グルコース添加培地からガラクトース添加培地に転換する必要があった。

方法 A: まずグルコース添加培地で培養し増殖させ、続いてガラクトース添加培地で培養し、GFP-DAg 発現を誘導させる。

方法 B: まずグルコース添加培地で培養し増殖させ、続いて低グルコース添加培地で培養後、短時間ガラクトース添加培地で培養し、GFP-DAg の発現を誘導させる。

まず方法 A を試みたが、用いた全ての形質転換株がガラクトース添加培地で培養中に増殖を停止してしまい、得られた菌体量は形質転換していない株(BNC-ST-A または BNC-ST-C)の 1/50 以下であり、十分な菌体量が得られなかった(図2-3)。

方法 B でも途中で増殖が停止してしまい、形質転換していない株 (BNC-ST-A または BNC-ST-C) の 1/10 以下であり、十分な菌体量が得られなかった (図 2-4A)。一方、少量の菌体を用いてウエスタンブロット法により GFP の発現量を検定したところ、発現誘導因子であるガラクトース依存的な発現が観察された (図 2-4B)。

以上の結果より、プラスミドベクター-vector 2-EGFP-DAg を用いた GFP の発現方法では生産に必要な菌体量が得られないと判断した。

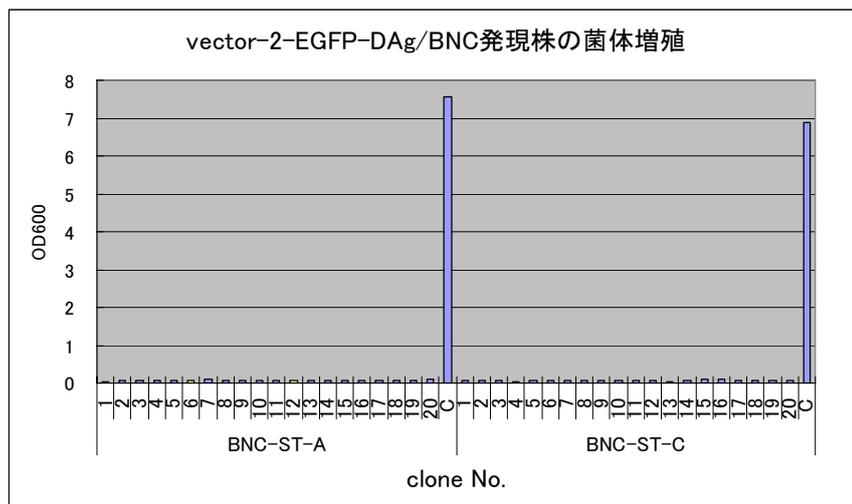
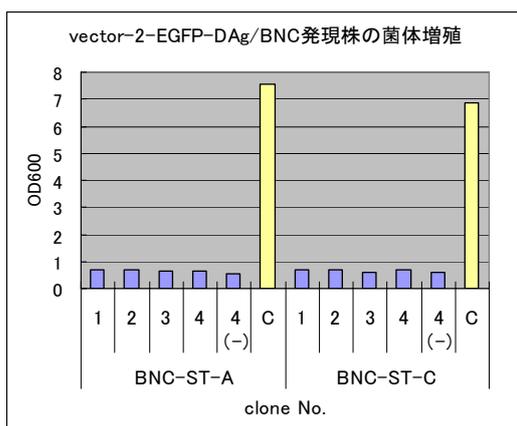


図 2-3 GFP-DAg/BNC 発現株 (vector 2-EGFP-DAg) の評価 (2次選抜、方法 A)

Clone No.は検討に用いた形質転換株の番号、C は形質転換していない BNC 発現株を示す。OD600 は培地中の菌体濃度を示す。

(A)



(B)

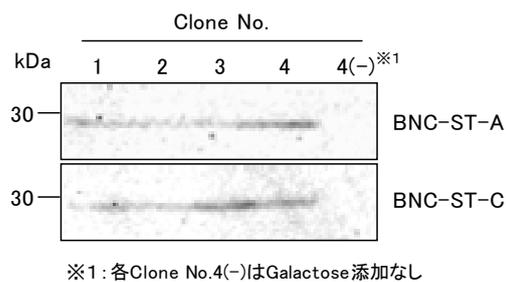


図 2-4 GFP-DAg/BNC 発現株 (vector 2-EGFP-DAg) の評価 (2次選抜、方法 B)

(A) 菌体増殖の評価 OD600 は培地中の菌体濃度を示す。

(B) ウエスタンブロット法による GFP の検出

Clone No.4 (-) はガラクトース無添加培地で培養した条件を示す。

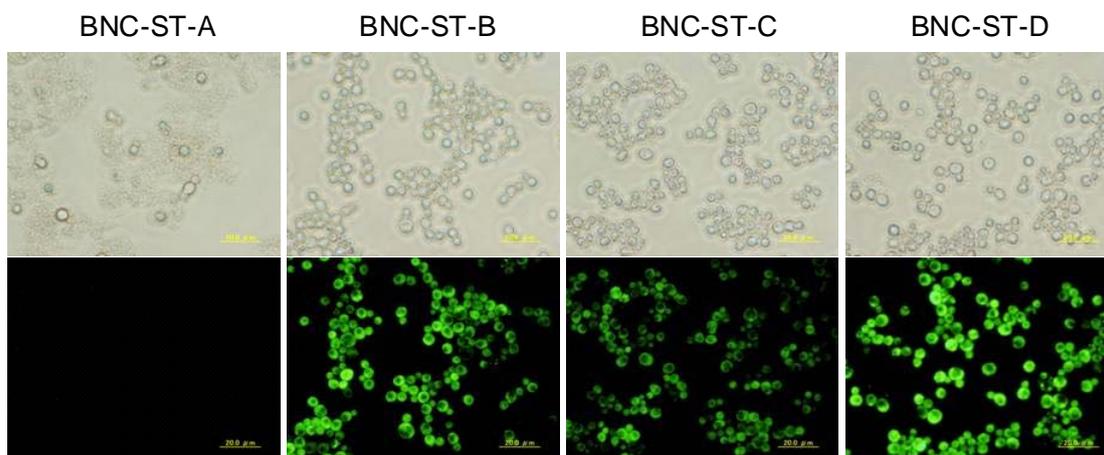
2-3) vector 1-yEGFP-DAg による形質転換及び GFP-DAg/BNC 発現菌体の作出

発現プラスミドベクターvector 1-yEGFP-DAg を4種の BNC 発現酵母株に形質転換し、得られた形質転換体をプレート培養及び液体培養することにより GFP-DAg/BNC 発現株の1次選抜を行った。上記 2-1)、2-2)の結果より、2次選抜実施した株は全て GFP の発現が確認され、また各選抜株の発現量に差がみられなかったことから、2次選抜は省略した。結果のまとめを表2-5に示す。

表2-5 GFP-DAg/BNC 発現株のスクリーニング(vector 1-yEGFP-DAg)

| 酵母株の名称   | 1次選抜(プレート培養) |                |
|----------|--------------|----------------|
|          | 形質転換体数       | 選択培地生育 Clone 数 |
| BNC-ST-A | 11           | 2              |
| BNC-ST-B | 35           | 4              |
| BNC-ST-C | 15           | 13             |
| BNC-ST-D | 15           | 10             |

4種の BNC 発現酵母株に形質転換した結果、それぞれ11~35株の形質転換体を得られ、選択培地による1次選抜の結果、2~13の候補株が得られた。これらの候補株の中から任意に1株選択し、液体培養後に得られた菌体を蛍光顕微鏡で観察し GFP の発現を検出した(図2-5)。3種の BNC 発現株(BNC-ST-A、BNC-ST-C、BNC-ST-D)の形質転換体で緑色蛍光が観察されたが、BNC-ST-A の形質転換体では蛍光が観察されず、かつ増殖も良好ではなかった。また、BNC-ST-C の形質転換体は蛍光が観察されるものの増殖が良好ではなかった。以上の結果から、強い蛍光を示しかつ増殖が良好であった BNC-ST-B、BNC-ST-D の形質転換株について5Lスケールの培養を検討した。結果を表2-6に示す。



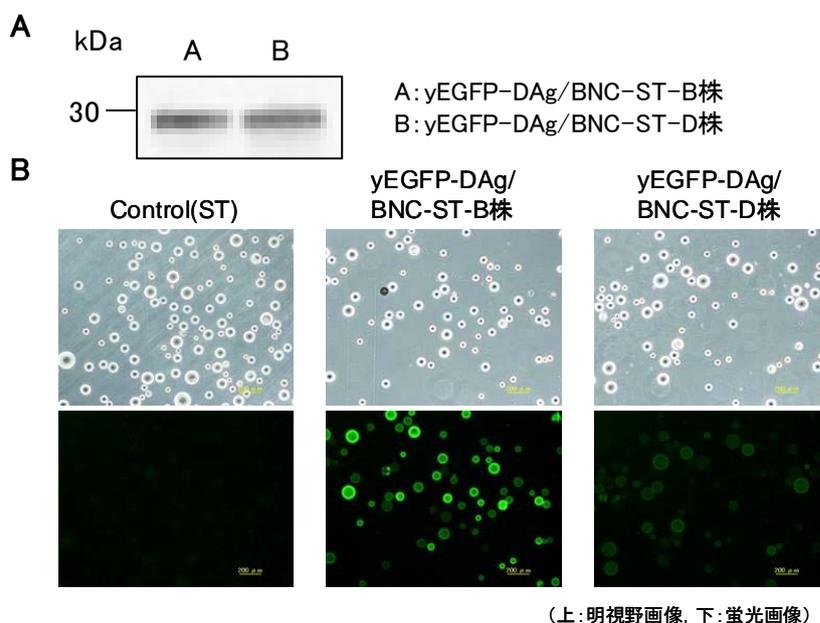
(上:明視野画像, 下:蛍光画像)

図2-5 GFP-DAg/BNC 発現株の蛍光画像 (vector 1-yEGFP-DAg)

表2-6 GFP-DAg/BNC 発現酵母株 (vector 1-yEGFP-DAg) の 5L スケール培養結果

| 酵母株の名称             | 菌体量/培養液<br>(g/L-culture) | BNC 発現量<br>(Unit/5L-culture) | BNC 発現量<br>(mg/5L-culture) |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| yEGFP-DAg/BNC-ST-B | 29.24                    | 115634                       | 77.1                       |
| yEGFP-DAg/BNC-ST-D | 27.79                    | 217535                       | 145                        |
| BNC-ST-D           | 31.03                    | 280918                       | 187                        |

その結果、yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株、yEGFP-DAg/BNC-ST-D 株のいずれの形質転換体においても、通常の BNC の生産に用いている BNC-ST-D 株と同様の菌体量が得られた。また、5 L 培養当たりの BNC 発現量はそれぞれ、77.1 mg (yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株)、145 mg (yEGFP-DAg/BNC-ST-D 株) であり、目標値の 10 mg を大きく上回る結果となった。また、ウエスタンブロット法によって、それぞれの菌体中の GFP の発現を確認した (図 2-6A)。最後にこれらの菌体で発現している GFP が BNC に内包されているかどうかを免疫沈降・蛍光観察法 (表 2-1 参照) を用いて確認した (図 2-6B)。その結果、yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株、yEGFP-DAg/BNC-ST-D 株のいずれにおいても緑色蛍光が観察されたが、yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株の方がより蛍光強度が高かった。すなわち、GFP の発現量においては両株でほとんど差はないが、BNC に内包されている GFP の量は yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株の方が多と考えられた。従って、GFP 内包 BNC の精製には yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株を用いることにした。



(上: 明視野画像, 下: 蛍光画像)

図2-6 GFP-DAg/BNC 発現酵母株 (vector 1-yEGFP-DAg) における GFP の発現解析

A: ウエスタンブロット法による GFP の検出

B: 免疫沈降・蛍光観察法による GFP 内包 BNC の検出

### 2-3 タンパク質内包 BNC の精製法の検討

前項2-2で発現ベクターの種類、形質転換に使用する BNC 発現株の種類を検討した結果、発現ベクターvector 1-yEGFP-DAgと BNC 発現株 BNC-ST-B の組み合わせが GFP 内包 BNC(BNC/GFP)の発現に最も適していると考えられた。従って、得られた形質転換株(yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株)を精製の検討に用いた。精製方法としては、BNC の大量生産に通常用いているアフィニティー・ゲルろ過法(表3-1参照)と、密度勾配遠心・ゲルろ過法(表3-2参照)の 2 種類の精製方法を検討した(本項の(2)、(3)に記載)。また、yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株の作出に先立って得られていた vector 1-EGFP-DAg 形質転換酵母株(EGFP-DAg/BNC-ST-A 株)は、十分な GFP の発現を示さなかったが、BNC/GFP 精製の予備検討用として用いた(本項の(1)に記載)。また、精製過程の各分画や精製標品中の BNC や GFP の評価方法を表3-3に記載した。

**表3-1 精製方法(アフィニティー・ゲルろ過法)**

| 精製ステップ          | 方法   |
|-----------------|--|
| 1. 菌体破碎         | 5L スケール培養で得られた菌体を、尿素入り緩衝液に懸濁後、小粒子ガラスビーズと共に激しく攪拌し菌体を破碎した。                     |
| 2. 高速遠心分離       | 高速遠心分離機を用いて菌体破碎液を遠心分離することで不溶物を取り除き、抽出液を得た。                                   |
| 3. 透析           | PBSE(リン酸緩衝液)に対して透析し、尿素を除去した。   |
| 4. 熱処理          | 70℃、30 分間の熱処理を行い、酵母由来の不要なタンパク質を熱変性させた。                                       |
| 5. 高速遠心分離       | 高速遠心分離機を用いて熱処理後の抽出液を遠心分離することで熱変性によって不溶化した不要なタンパク質を取り除いた。                     |
| 6. アフィニティーカラム精製 | 抽出液をアフィニティーカラムにかけ、抽出液中の BNC をカラムに吸着させた。カラムを洗浄後、高塩濃度の溶出液でカラムに吸着した BNC を溶出させた。 |
| 7. ゲルろ過精製       | ステップ6で得られた溶出画分をゲルろ過カラムにかけ、さらに BNC を精製した。                                     |

**表3-2 精製方法(密度勾配遠心・ゲルろ過法)**

| 精製ステップ    | 方法   |
|-----------|--|
| 1. 菌体破碎   | 5L スケール培養で得られた菌体を、尿素入り緩衝液に懸濁後、小粒子ガラスビーズと共に激しく攪拌し菌体を破碎した。 |
| 2. 高速遠心分離 | 高速遠心分離機を用いて菌体破碎液を遠心分離することで不溶物を取り除き、抽出液を得た。               |
| 3. 透析     | PBSE(リン酸緩衝液)に対して透析し、尿素を除去した。                             |
| 4. 密度勾配遠心 | 遠心管の中に、塩化セシウム溶液を用いて密度勾配層を作製し、その上にス                       |

|                  |  |
|------------------|--|
| 分離（塩化セシウム）       | テップ3で得られた抽出液を重層した。14 時間遠心分離を行い、比重の違いによるタンパク質の分離を行った。                                 |
| 5. 透析            | 透析法により塩化セシウムを除いた。  |
| 6. 密度勾配遠心分離（ショ糖） | 遠心管の中に、ショ糖溶液を用いて密度勾配層を作製し、その上にステップ 5 で透析した分画を重層した。14 時間遠心分離を行い、比重の違いによるタンパク質の分離を行った。 |
| 7. ゲルろ過精製        | ステップ6で得られた BNC 画分をゲルろ過カラムにかけ、さらに BNC を精製した。  |

**表3-3 GFP 内包 BNC の精製検討に用いた評価方法一覧**

| 検出物質         | 方法              | 詳細  |
|--------------|-----------------|---|
| BNC          | PreS-1 ELISA 法  | BNC を構成する L-タンパク質の Pre-S1 領域を認識する抗 Pre-S1 抗体を用いて BNC を検出定量する方法。                                       |
| BNC（L-タンパク質） | SDS-PAGE 法      | 精製分画をアクリルアミドゲル電気泳動し、ゲル中のタンパク質を染色後にバンドとして検出する方法。   |
| BNC（L-タンパク質） | ウエスタンブロット法      | 電気泳動したタンパク質を抗 Pre-S1 抗体を用いて検出する方法。  |
| GFP          | ウエスタンブロット法      | 電気泳動したタンパク質を抗 GFP 抗体を用いて検出する方法。   |
| GFP          | 蛍光測定法           | 精製分画中の蛍光強度を蛍光測定装置をもちいて測定することで GFP を検出する方法。  |
| BNC/GFP      | 免疫沈降・蛍光観察法      | 抗 PreS-1 抗体を結合したビーズと精製分画をインキュベーションし、BNC をビーズに結合させる。このビーズを蛍光顕微鏡で観察することにより BNC に内包された GFP を検出する方法。      |
| BNC/GFP      | 免疫沈降・ウエスタンブロット法 | 抗 PreS-1 抗体を結合したビーズと精製分画をインキュベーションし、BNC をビーズに結合させる。このビーズから BNC を溶出し、電気泳動後にウエスタンブロット法によって GFP を検出する方法。 |

(1) vector 1-EGFP-DAg 形質転換酵母 (EGFP-DAg/BNC-ST-A 株)を用いた精製の検討

2-2項 2-1)に記載した vector 1-EGFP-DAg 形質転換酵母 (EGFP-DAg/BNC-ST-A 株)の5L スケール培養で得られた菌体を用いて、GFP 内包 BNC (BNC/GFP)の精製を試みた。精製方法は通常の BNC の生産に用いている方法(アフィニティー・ゲルろ過法)を用いた。

熱処理後の酵母抽出液を精製ステップ6のアフィニティーカラムにかけ、BNC 溶出画分(No.1~5)を得た(図3-1)。なお、GFP-DAgをBNCと共発現させた場合でも、BNC の溶出ピーク形状は通常の BNC の溶出ピーク形状と同様であった。これらの BNC 溶出画分を集め、ステップ7のゲルろ過カラムにかけた結果を図3-2に示した。各分画(No.1~12)中の BNC 量と GFP 量をそれぞれ Pre-S1 ELISA 法、蛍光測定法(表3-3 参照)で検定した結果、BNC の溶出ピークに対応した GFP の溶出ピークが観察された。なお、分画の後半(分画 No.9~12)で観察される GFP のピークは、BNC の分子量よりも小さいと考えられるので、BNC に内包されていない遊離の GFP と考えられた。各精製ステップにおける総タンパク質量および総 Pre-S1unit(Pre-S1 ELISA 法によって測定した値。BNC の含有量を示す。)を表3-4に示した。本精製方法により、菌体破碎液中に含まれる約 20gのタンパク質から、2.3 mg の精製標品 BNC/GFP が得られ、精製倍率は 1571 倍であった。

以上の結果から、通常の BNC の生産に用いている精製方法(アフィニティー・ゲルろ過法)によって、GFP 内包 BNC を精製可能であると結論付けた。

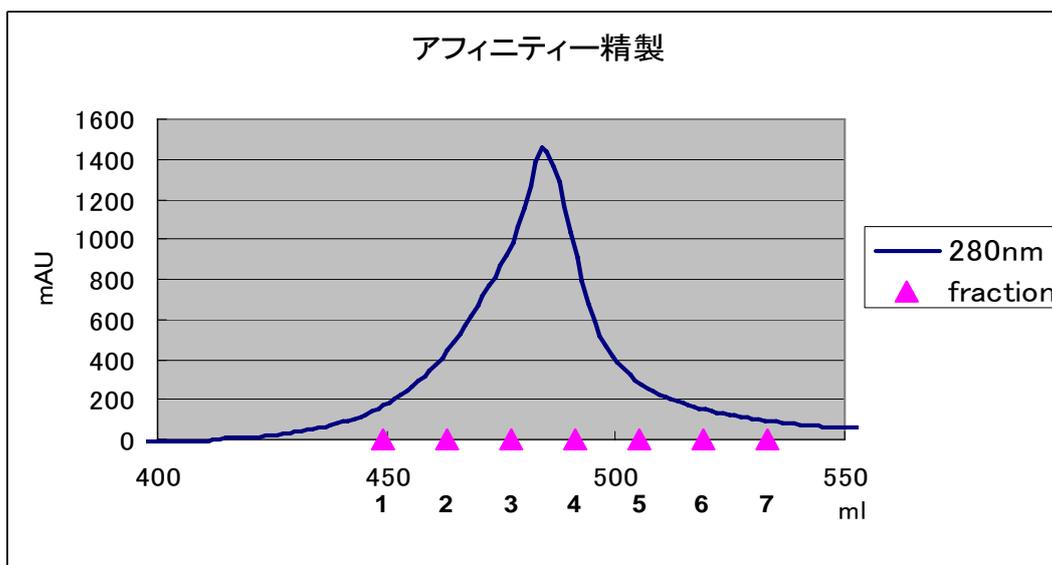


図3-1 アフィニティーカラムによる BNC/GFP の精製(精製ステップ6)

青線は 280 nm の吸光度、横軸の数字(1~7)は分画番号を示す。

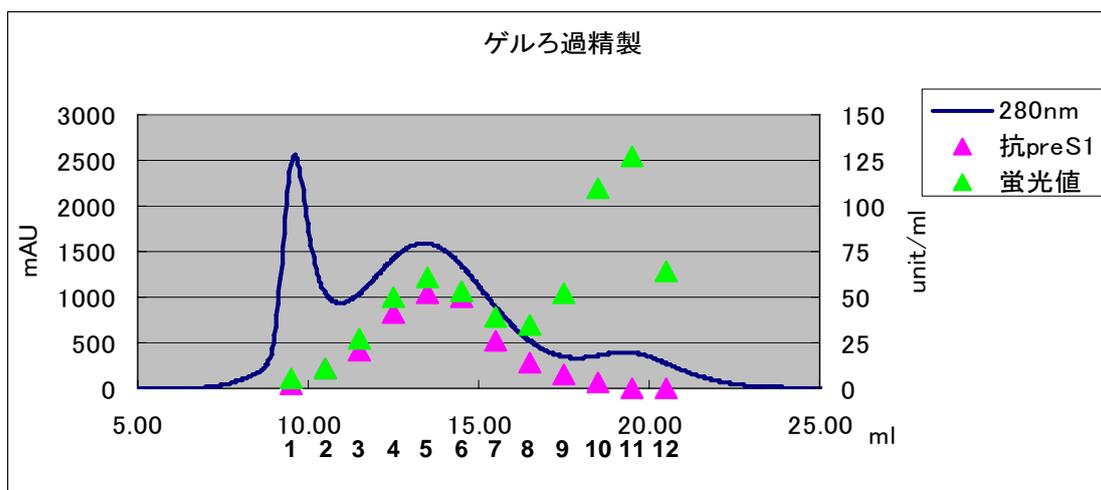


図3-2 ゲルろ過カラムによる BNC/GFP の精製(精製ステップ7)

青線は 280 nm の吸光度、横軸の数字(1~12)は分画番号を示す。△(ピンク)は Pre-S1 ELISA 法で測定した BNC の溶出パターンを、△(緑)は蛍光測定法で測定された GFP の溶出パターンを示す。

表3-4 アフィニティー・ゲルろ過法による BNC/GFP の精製工程評価

| 精製ステップ    | 総タンパク質量<br>(mg) | 総 PreS-1<br>(unit) | preS1/protein<br>(unit/mg) | 精製率  |
|-----------|-----------------|--------------------|----------------------------|------|
| 菌体破砕液     | 20211           | 3472               | 0.172                      | 1.00 |
| 透析後       | 7862            | 2074               | 0.264                      | 1.54 |
| 熱処理後      | 5416            | 1896               | 0.350                      | 2.04 |
| アフィニティー精製 | 55.3            | 941                | 17.0                       | 99.1 |
| ゲルろ過精製    | 2.30            | 621                | 270                        | 1571 |

(2) vector 1-yEGFP-DAg 形質転換酵母(yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株)を用いた精製検討(アフィニティー・ゲルろ過法)

2-2項 2-3)に記載した vector 1-yEGFP-DAg 形質転換酵母(yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株)の5L スケール培養で得られた菌体を用いて、GFP 内包 BNC (BNC/GFP)の精製を試みた。精製方法は通常の BNC の生産に用いている方法(アフィニティー・ゲルろ過法)を用いた(表3-1参照)。

熱処理後の酵母抽出液を精製ステップ6のアフィニティーカラムにかけ、BNC 溶出分画(No.2~7)を得た(図3-3)。また、蛍光測定法によって検出した GFP の溶出ピークは、BNC の溶出ピークと一致していた。続いて、BNC 溶出分画(分画2~7)を集め、ゲルろ過カラムにかけた結果を図3-4に示した。各分画(No.1~12)中の BNC 量と GFP 量をそれぞれ Pre-S1 ELISA 法、蛍光測定法(表3-3参照)で検定した結果、BNC の

溶出ピークと一致した GFP の溶出ピークが検出された。また、SDS-PAGE 法によって各分画を解析した結果、ほとんど不純なタンパク質を含まない高純度の精製品が得られたことを確認した(図3-5)。得られた精製 BNC/GFP(ゲルろ過分画 3~7)を精製標品 BNC/GFP-A とした。

各精製ステップにおける総タンパク質量および総 Pre-S1unit(Pre-S1 ELISA 法によって測定した値。BNC の含有量を示す。)を表3-5に示した。菌体破碎液中に含まれる約 37gのタンパク質から、8.43 mg の精製標品 BNC/GFP-A が得られ、精製倍率は 684 倍であった。

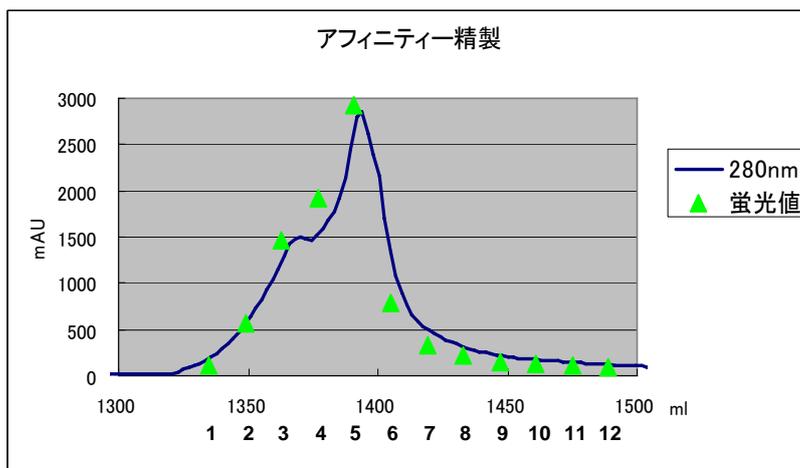


図3-3 アフィニティーカラムによる BNC/GFP の精製(精製ステップ6)

青線は 280 nm の吸光度、横軸の数字(1~12)は分画番号を示す。△(緑)は蛍光測定法で測定された GFP の溶出パターンを示す。

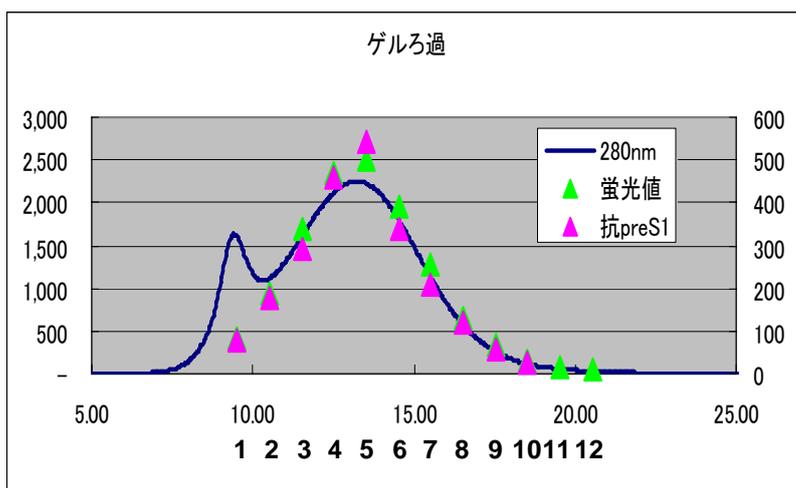


図3-4 ゲルろ過カラムによる BNC/GFP の精製(精製ステップ7)

青線は 280 nm の吸光度、横軸の数字(1~12)は分画番号を示す。△(ピンク)は Pre-S1 ELISA 法で測定した BNC の溶出パターンを、△(緑)は蛍光測定法で測定された GFP の溶出パターンを示す。

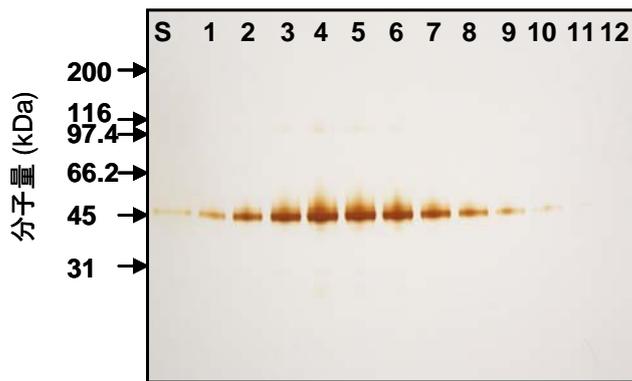


図3-5 ゲルろ過によって得られた各分画の SDS-PAGE 法による解析

横の数字はゲルろ過クロマトグラフィーの分画番号、Sは精製BNC標準品を示す。検出されているバンドはBNCを構成するL-タンパク質である。

表3-5 アフィニティー・ゲルろ過法による BNC/GFP の精製工程評価

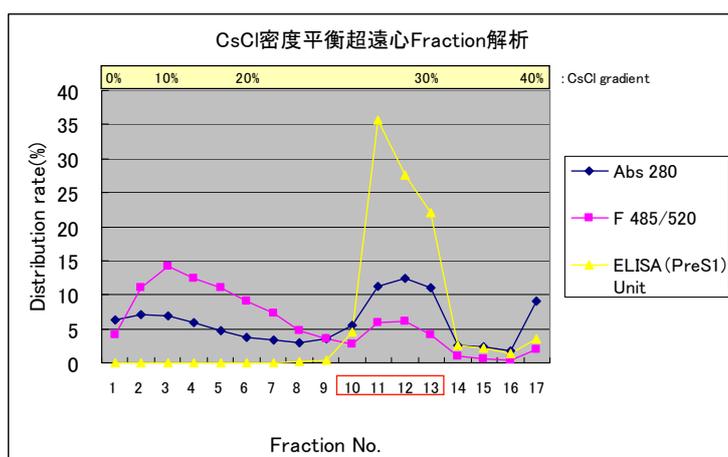
| 精製ステップ    | 総タンパク質量<br>(mg) | 総 PreS-1<br>(unit) | preS1/protein<br>(unit/mg) | 精製率  |
|-----------|-----------------|--------------------|----------------------------|------|
| 菌体破碎液     | 36925           | 83982              | 2.27                       | 1.00 |
| 透析後       | 8902.7          | 63058              | 7.08                       | 3.11 |
| 熱処理後      | 3310.4          | 29985              | 9.06                       | 3.98 |
| アフィニティー精製 | 73.1            | 21144              | 289                        | 127  |
| ゲルろ過精製    | 8.43            | 13110              | 1555                       | 684  |

(3) vector 1-yEGFP-DAg 形質転換酵母 (yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株) を用いた精製検討 (密度勾配遠心・ゲルろ過法)

2-2項 2-3) に記載した vector 1-yEGFP-DAg 形質転換酵母 (yEGFP-DAg/BNC-ST-B 株) の 5L スケール培養で得られた菌体を用いて、GFP 内包 BNC (BNC/GFP) の精製を試みた。精製方法は塩化セシウム密度勾配遠心分離法、ショ糖密度勾配遠心分離法、ゲルろ過法を組み合わせた方法で行った (表3-2参照)。

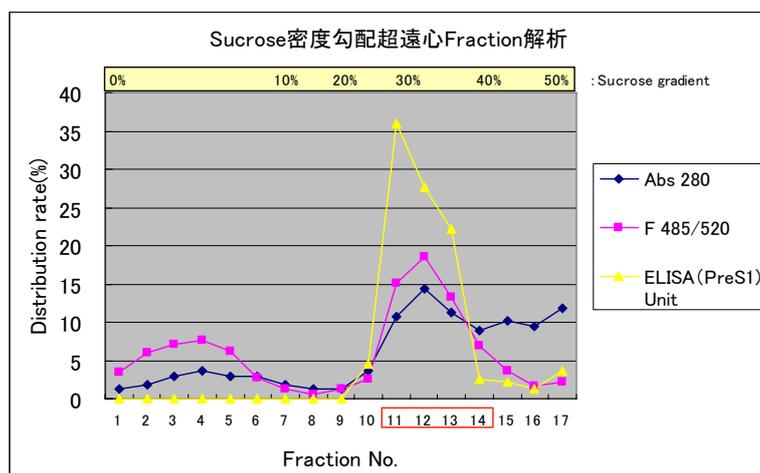
酵母抽出液を精製ステップ4の密度勾配遠心分離 (塩化セシウム) につけ、得られた分画中の BNC 量と GFP 量をそれぞれ Pre-S1 ELISA 法、蛍光測定法 (表3-3参照) で検定した結果を図3-6に示した。BNC は分画 10~13 に検出され、これらの分画には GFP も検出された。よって、これらの分画を合わせ BNC/GFP 画分とした。また、GFP は分画 1~9 にも検出されたが、これらの分画には BNC が検出されないため、分画 1~9 には遊離の GFP が含まれると考えられた。続いて、BNC/GFP 画分をステップ6の密度勾配遠心分離 (ショ糖) で更に精製した結果を図3-7に示す。BNC は分画 10~17

に検出され、これらの分画には GFP も検出された。比較的 BNC が多く含まれる分画 10～14 を合わせ BNC/GFP 画分とした。これをゲル過カラムでさらに精製した結果を図3-8に示す。各分画(No.1～12)中の BNC 量と GFP 量をそれぞれ Pre-S1 ELISA 法、蛍光測定法(表3-3参照)で検定した結果、BNC の溶出ピークと一致した GFP の溶出ピークが検出された。また、SDS-PAGE 法によって各分画を解析した結果、ほとんど不純なタンパク質を含まない高純度の精製品が得られたことを確認した(図3-9)。得られた精製 BNC/GFP(ゲルろ過分画3～7)を精製標品 BNC/GFP-B とした。



**図3-6 塩化セシウム密度勾配遠心分離法による BNC/GFP の精製**

3 色の点(線)はそれぞれ、280 nm の吸光度(Abs280)、蛍光測定法で測定された GFP (F 485/520)、Pre-S1 ELISA 法で測定した BNC(ELISA PreS1unit)を示す。



**図3-7 ショ糖密度勾配遠心分離法による BNC/GFP-DAg の精製**

3 色の点(線)はそれぞれ、280 nm の吸光度(Abs280)、蛍光測定法で測定された GFP (F 485/520)、Pre-S1 ELISA 法で測定した BNC(ELISA PreS1unit)を示す。

各精製ステップにおける総タンパク質量および総 Pre-S1unit (Pre-S1 ELISA 法によって測定した値。BNC の含有量を示す。)を表3-6に示した。菌体破碎液中に含まれる約 37gのタンパク質から、3.33 mg の精製標品 BNC/GFP-B が得られ、精製倍率は 559 倍であった。

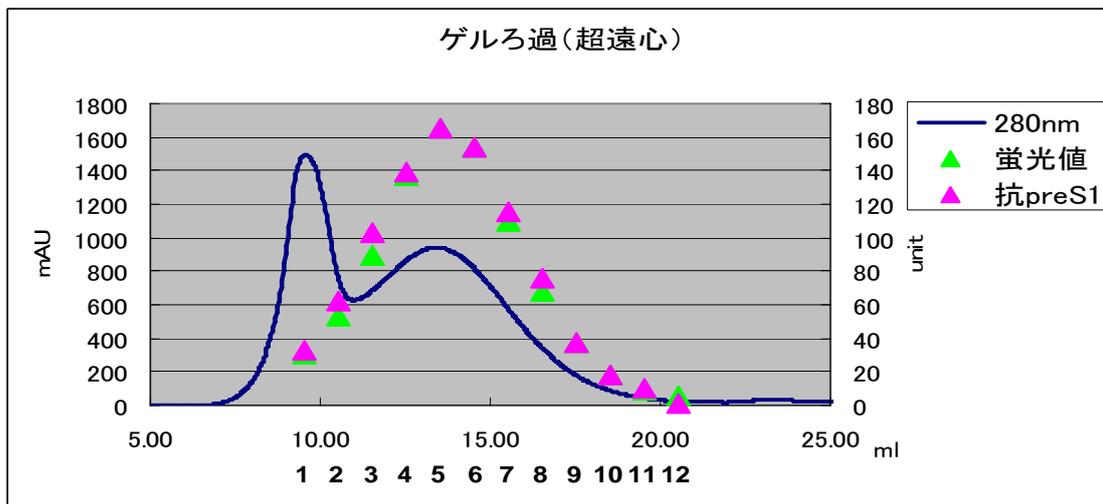


図3-8 ゲルろ過法による BNC/GFP の精製

青線は 280 nm の吸光度、横軸の数字は分画番号(1~12)を示す。△(ピンク)は Pre-S1 ELISA 法で測定した BNC の溶出パターンを、△(緑)は蛍光測定法で測定された GFP の溶出パターンを示す。

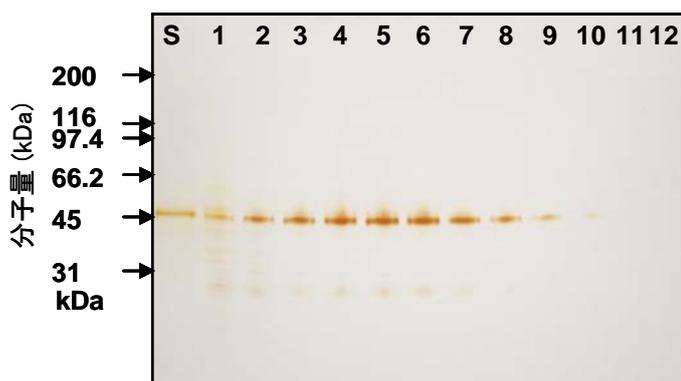


図3-9 ゲルろ過によって得られた各分画の SDS-PAGE 法による解析

横の数字はゲルろ過の分画番号、Sは精製 BNC 標準品を示す。検出されているバンドは BNC を構成する L-タンパク質である。

表3-6 密度勾配遠心・ゲルろ過法による BNC/GFP の精製工程評価

| 精製ステップ              | 総タンパク質量<br>(mg) | 総 PreS-1<br>(unit) | PreS-1/protein<br>(unit/mg) | 精製率  |
|---------------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|------|
| 菌体破碎液               | 36925           | 83982              | 2.27                        | 1.00 |
| 透析後                 | 8902.7          | 63058              | 7.08                        | 3.11 |
| 密度勾配超遠心<br>(塩化セシウム) | 1661.1          | 22758              | 13.7                        | 6.02 |
| 透析                  | 648.0           | 17546              | 27.1                        | 11.9 |
| 密度勾配超遠心<br>(ショ糖)    | 118.3           | 13106              | 111                         | 48.7 |
| ゲルろ過精製              | 3.33            | 4240               | 1272                        | 559  |

(4) BNC/GFP 精製標品の評価

本項の(2)(3)で得られた2種の精製標品を評価した結果を表4-1に示す。

表4-1 精製標品の評価結果

|                             | BNC/GFP-A     | BNC/GFP-B    |
|-----------------------------|---------------|--------------|
| 精製方法                        | アフィニティー・ゲルろ過法 | 密度勾配遠心・ゲルろ過法 |
| 精製タンパク質量<br>(mg/5L 培養)      | 8.43          | 3.33         |
| 粒子径 (nm)                    | 60.6          | 66.0         |
| PreS-1/protein<br>(unit/mg) | 1555          | 1272         |
| 免疫沈降・イムノブロット法<br>による評価      | +             | +            |
| 免疫沈降・蛍光観察法によ<br>る評価         | +             | ++           |
| 相対蛍光値 (%)                   | 52            | 100          |
| GFP 分子数/BNC 粒子              | 8.41          | 12.6         |
| GFP 内包率 (%)                 | >85.1         | >86.8        |

精製タンパク質量を比較した場合、BNC/GFP-A のタンパク質量は BNC/GFP-B の2倍以上であった。また、タンパク質当たりの Pre-S1 unit (BNC を構成する L-タンパク質の量)はそれぞれ 1555(BNC/GFP-A)、1272 (BNC/GFP-B)であり、BNC/GFP-A の方が若干高い値を示した。BNC 精製標品の Pre-S1 unit 値は約 1500 であるので、得られた 2 種の精製標

品は通常の精製で得られたBNCとほぼ同量のL-タンパク質を含有していると評価した。各精製標品の粒子径は、精製 BNC の粒子径(約 55 nm)よりもわずかに大きい値を示し、BNC/GFP-Bの方がBNC/GFP-Aよりも約5 nm大きかった(図4-1)。

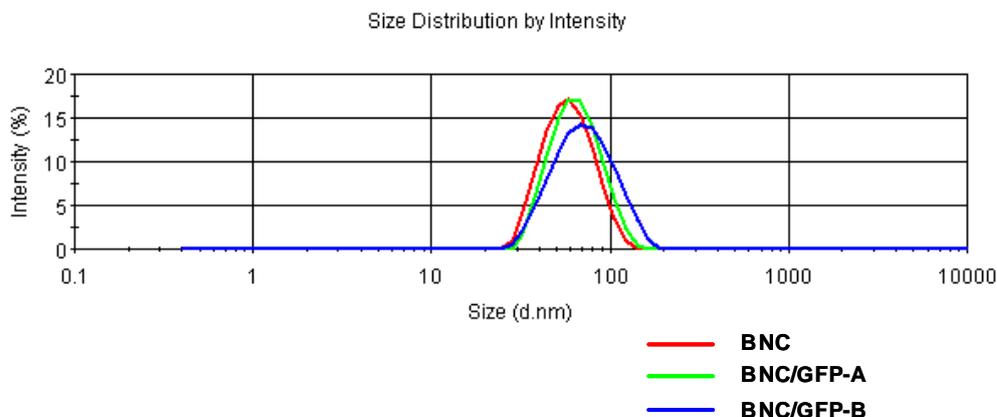


図4-1 精製標品 BNC/GFP の粒子径測定結果

精製標品に含有するL-タンパク質、GFPをSDS-PAGE法、ウエスタンブロット法によって検出した結果を図4-2に示す。検出された各バンドは単一であり、プロテアーゼ等によって分解されたL-タンパク質やGFPがほとんど含まれていないと評価した。イムノブロット法で検出されたL-タンパク質、GFPを定量し、BNC1粒子当たりの内包GFP分子数を算出したところ、BNC/GFP-Aが8.41分子、BNC/GFP-Bが12.6分子と算出されBNC/GFP-Bの方が若干高い値を示した。

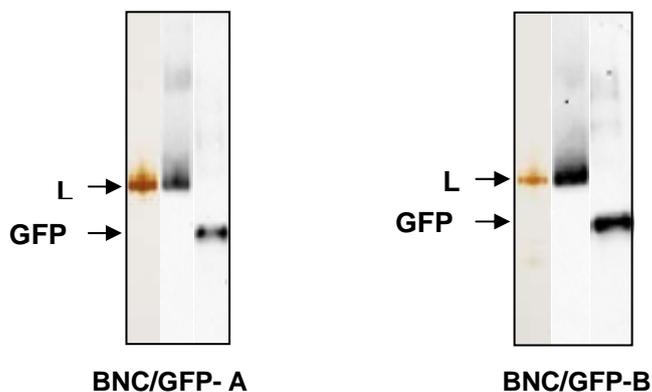


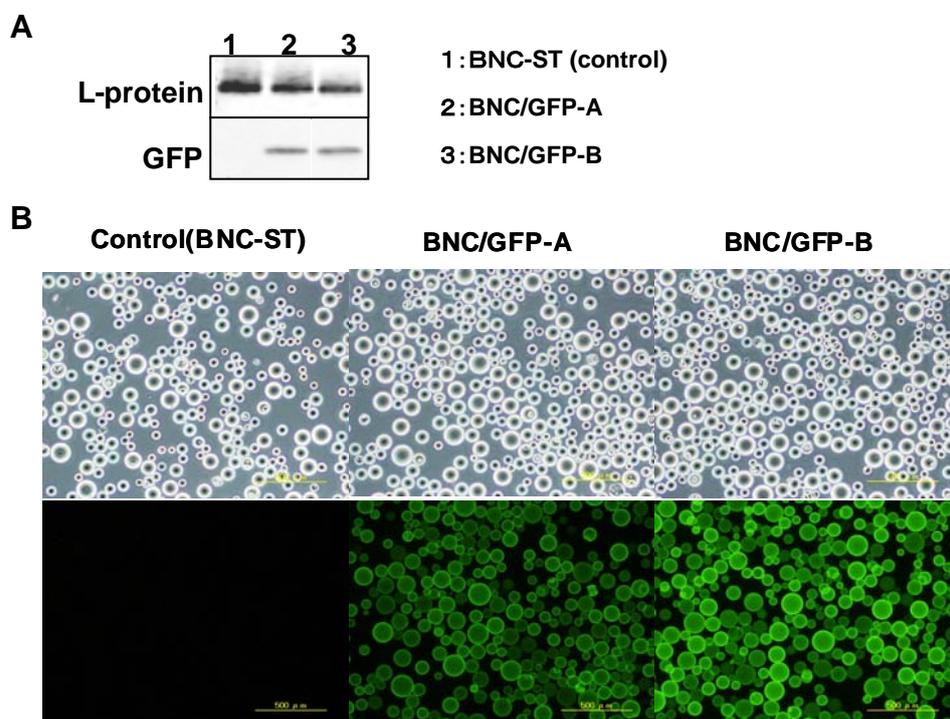
図4-2 SDS-PAGE法、ウエスタンブロット法による精製標品 BNC/GFP の評価

- レーン左: SDS-PAGE法によるL-タンパク質の検出
- レーン中: ウエスタンブロット法(抗 Pre-S1 抗体)によるL-タンパク質の検出
- レーン右: ウエスタンブロット法(抗 GFP 抗体)によるGFPの検出

精製標品の蛍光値を測定したところ、BNC/GFP-Bの方がBNC/GFP-Aの約2倍の値を示した。BNC当たりの内包GFP数の違いがこの結果の原因の一つと考えられる。また、免疫

沈降・ウエスタンブロット法、免疫沈降・蛍光観察法によって2種の精製標品を解析した結果、抗 Pre-S1 抗体による免疫沈降物中に GFP が検出され(図4-3A)、かつ免疫沈降ビーズは緑色蛍光を示していた(図4-3B)。以上の結果より、2種の精製標品中の BNC は GFP を内包していると評価した。

GFP の内包率を検定するために、各精製標品をゲルろ過法によって解析した。なお、この方法によって BNC に内包された GFP と遊離の GFP を分離することが出来る(図4-4)。各分画における GFP の蛍光値を測定したところ、2種の精製標品中の GFP の大部分は BNC 溶出分画である分画3~5に溶出された。一方、遊離の GFP 標品は分画6~8に溶出された。以上の結果は、2種の精製標品中の GFP の大部分が BNC に内包されていることを示している。GFP 内包率はそれぞれ 85.1%以上(BNC/GFP-A)、86.8%以上(BNC/GFP-B)であり、ほぼ同等であると評価した。



**図4-3 免疫沈降法・ウエスタンブロット及び免疫沈降・蛍光観察法による精製標品の評価**

A: 免疫沈降・ウエスタンブロット法による L-タンパク質と GFP の検出

B: 免疫沈降・蛍光観察法による GFP 内包 BNC の蛍光観察

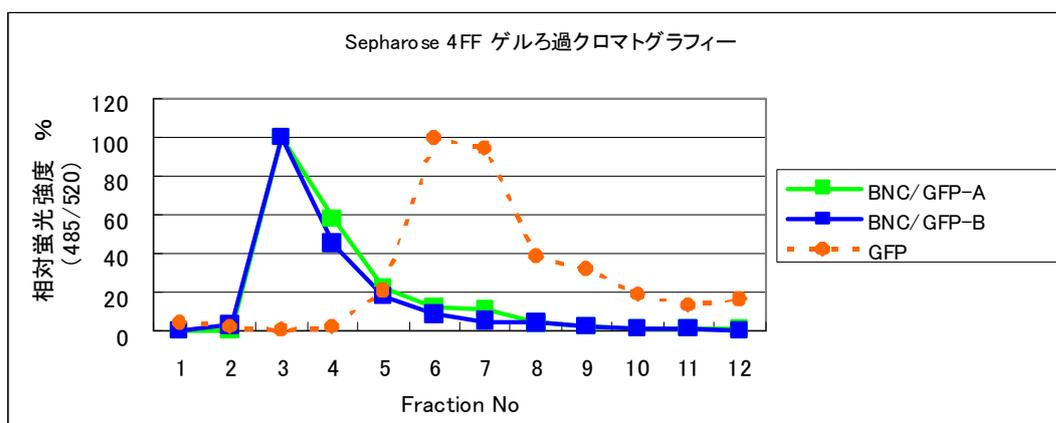


図4-4 ゲルろ過法による精製標品の GFP 内包率の評価

各点(線)は精製標品 BNC/GFP-A または BNC/GFP-B をゲルろ過法で分離した時の各画分の蛍光値を示す。点線は BNC に内包されていない GFP 標準品の解析結果を示す。

#### 2-4 タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価

2-3項で得られた精製標品 BNC/GFP-A、BNC/GFP-B をヒト肝臓由来の 4 種の培養細胞 (SK-HEP-1, HepG2, HuH-7, NuE) に添加し、細胞内に導入された GFP を共焦点レーザー顕微鏡で検出することによって、各精製標品の導入能を評価した(図5-1)。各精製標品の添加濃度は  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  とし、添加後 4 時間で細胞を洗浄して観察した。その結果、精製標品 BNC/GFP-A、BNC/GFP-B を添加した全ての細胞で GFP の緑色蛍光が観察された。従って、得られた2つの精製標品は細胞内導入能を有すると評価した。

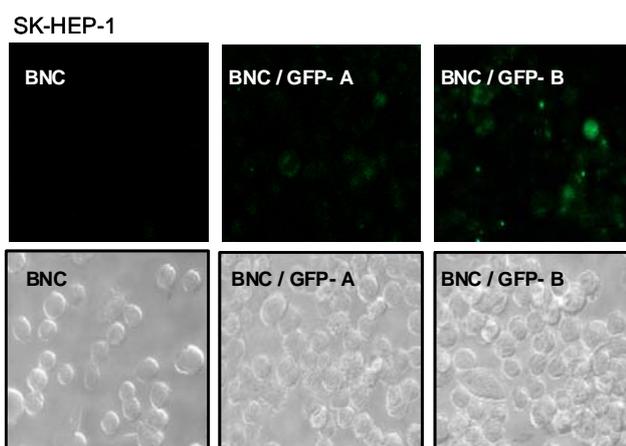


図5-1 BNC/GFP-A、BNC/GFP-B の細胞導入能の評価

ヒト肝臓由来培養細胞である SK-HEP-1、HepG2、HuH-7、NuE に各精製標品を添加し ( $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、4時間後に細胞を洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP の蛍光を検出した。また、BNC 標品をコントロールとして用いた  
 パネル上: 蛍光画像      パネル下: 明視野画像

2つの精製標品を比較すると、全ての細胞種において、BNC/GFP-B を添加した方がより強い蛍光が観察された。このように細胞内蛍光強度に差がみられるのは、BNC/GFP-B の方がBNCタンパク質当たりの蛍光強度が約2倍高いことが一つの原因と考えられる。また、4種の細胞の中でも特に NuE に強い蛍光が観察されたことから精製標品の細胞内導入能は細胞種によって異なる可能性が示唆された。

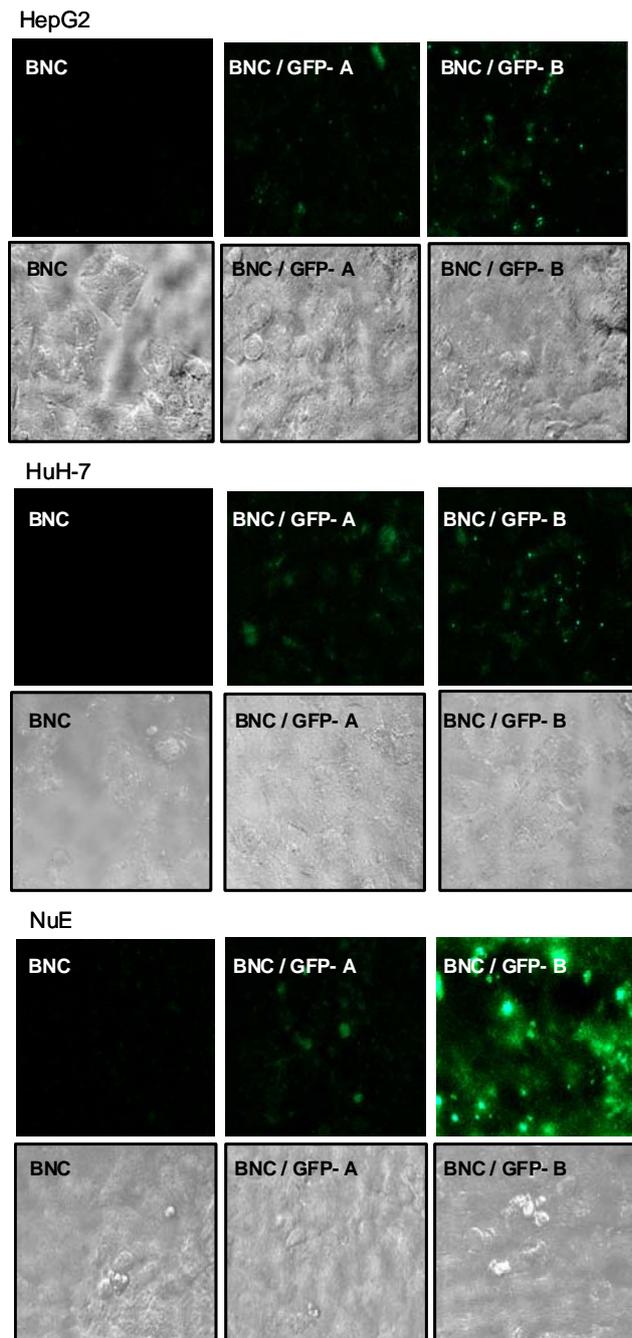


図5-1(続き) BNC/GFP-A、BNC/GFP-B の細胞導入能の評価

パネル上： 蛍光画像      パネル下： 明視野画像

## 最終章 全体総括

バイオナノカプセルは B 型肝炎ウイルスの表面抗原である L タンパク質を酵母で発現させることによって形成されるナノサイズの粒子であり、脂質 2 重膜中に L タンパク質を提示した中空の粒子の形態をとる。バイオナノカプセル(BNC)は L タンパク質の働きにより、ヒト肝細胞を特異的に認識し、またウイルス由来の機能として内包物を細胞内へ導入する能力を有する。また、BNC の中空部分やリポソームとの融合体を用いることによって、遺伝子や低分子化合物を封入させることが出来るため、医療用や研究用の薬物送達システム(DDS)として極めて優れた特長を有している。

タンパク質を細胞内へ導入することは、細胞内で作用するタンパク質医薬と言う新しい医療分野を拓くものとして大きな注目を浴びている。タンパク質を細胞内へ導入する手段の一つとして BNC の有する性質を利用することが可能である。即ち、BNC 内へタンパク質を内包できれば、BNC の細胞内導入能や細胞認識能を用いて特異的に細胞内へタンパク質を導入することが出来る。因みに BNC は、ほぼ同じものがワクチンとして長年医療分野で利用されている他、siRNA や低分子化合物において医療応用へ向かった開発が進められている。

以上のことから、タンパク質を内包できるバイオナノカプセルの製造方法を、内包タンパク質として GFP を用いて検討した。本製造法は、B 型肝炎ウイルスに寄生して増殖する D 型肝炎ウイルスのタンパク質が B 型肝炎ウイルスの表面抗原の C 末にあるペプチド配列を介して結合する性質を利用するものであり、内包を目的とするタンパク質に本ペプチド配列を結合したものを BNC 生産酵母で発現させることにより、製造するものである。

本研究開発においては、4 つの開発テーマに沿って検討を行った。

### ①目的タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討

目的タンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)を選択し、GFP 遺伝子としては EGFP 遺伝子と yEGFP 遺伝子の2種類を用いた。これらの遺伝子に DA<sub>g</sub>ペプチド配列をコードする DNA を結合させ、発現用プラスミド DNA(ベクター)にこれらを挿入し、合計 3 種類の GFP 発現ベクターを設計・調製した。

### ②タンパク質内包 BNC 生産酵母の培養の検討

3 種のベクターを 4 種の BNC 生産酵母株、合計 261 株へ導入し、その結果 240 株のクローンを得た。その内、酵母の増殖性、GFP の発現が良好であった 3 株において 5L の大量培養を行った。この時の、BNC 発現量はクローンにより異なったが、8~145mg/5L であった。なお、GFP の発現は vector 1 が良好であり、GFP 遺伝子の中では yEGFP 遺伝子が良好であった。

### ③タンパク質内包 BNC の精製法の検討

3 株の 5L 培養を行って得た培養菌体を材料にして、2 種の精製法によって精製を行った。GFP の発現量が高かった 1 株においてアフィニティー・ゲルろ過法と密度勾配遠心・ゲルろ過法で精製したところ、精製工程は良好で、それぞれ、8.4mg、3.3mg の精製した GFP 内包 BNC を得た。これらの精製品の解析を行った結果、粒子径、純度やその他の性質も BNC とほぼ同じで

あり、良好であった。なお、GFP の内包率は 85%を超え、BNC の 1 粒子に内包されている GFP は 8~12 分子であると計算された。

#### ④タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価

2 種の精製法で得られた精製 GFP 内包 BNC を 4 種のヒト肝細胞へ適用した所、何れの肝細胞でも GFP に由来する蛍光が細胞内に認められ、BNC が内包した GFP を細胞内へ導入する能力があることが示された。

以上のように、本研究開発の実施計画書で設定した目標値、即ち、①目的タンパク質発現用プラスミド DNA の設計と調製法の検討においては、「1種類以上の目的タンパク質の遺伝子を選択しプラスミド DNA を調整する」、②タンパク質内包 BNC 産生酵母の培養の検討においては、「タンパク質内包 BNC の生産量を 0.01g/5L(培養液)」、③タンパク質内包 BNC の精製法の検討においては、「精製のタンパク質内包 BNC の内包率は 50%以上とし、引き続き検討で 80%以上を達成する」、及び、④タンパク質内包 BNC の細胞内導入能の評価では、「細胞内へ目的タンパク質が導入され、その機能が観察できることを証明する」は総て達成され、特に、生産量と内包率においては当初の目標を大幅に超えて達成した。

本事業の成果として、重要な技術開発の成果は、①酵母を用いた BNC 生産系においてもタンパク質内包 BNC を製造することが可能である、②その場合、酵母へ導入するためのベクターとしては vector 1 が生産性の点で優れていること、③タンパク質を内包した BNC の性質はオリジナルの BNC と性質が大きく異ならず、BNC の利点をそのまま利用可能であること、④BNC へ内包されているタンパク質の内包率は高いこと、④細胞内への内包タンパク質の導入は良好であり、1 粒子の BNC 当たり10分子程度内包されているため、細胞内へかなりの量が導入できると想定されることである。これらの結果は、本製造法が他のタンパク質へも応用が可能であり、タンパク質内包 BNC を製造することにより細胞内へタンパク質を効率的に導入することが可能であることを示唆し、本プロジェクト開始時のコンセプトが正しいことを示す。

今後の課題として、本手法によるタンパク質の細胞内導入が、本来の目的である創薬研究や医療用としての利用価値を真に見極める必要がある。そのためには、高次機能を有するタンパク質を内包する BNC の製造方法を確立し、そのタンパク質機能が細胞内で発揮されることを確認する必要がある。具体的には、抗体など細胞内の内在性タンパク質と相互作用を示すタンパク質を内包する BNC の生産技術を開発し、生産したタンパク質内包 BNC を用いた評価を行うことが必須であり、本研究開発を更に進めることによって、本事業で開発した生産技術の応用が可能となると思われる。

以上、結論として、本研究開発事業により、タンパク質内包 BNC を製造するための基盤的技術が完成した。また、本タンパク質内包 BNC により、細胞内へタンパク質を効率的に導入可能であることが証明された。以上のことから、今後、他の機能性タンパク質への本技術の応用研究開発を更に進める行うことにより、本技術の創薬や医療への応用が期待される。