

平成22年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

「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23年12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

第一章 研究開発の概要.....	4
1.1. 研究開発の背景・研究目的及び目標.....	4
1.2. 研究体制(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者).....	5
1.3. 成果概要.....	8
1.4. 当該プロジェクト連絡窓口.....	9
第二章 本論.....	10
要旨.....	10
試験目的.....	11
試験結果.....	12
1. 改良型 BNC 発現ベクターの構築.....	12
1.1. 改良型 BNC 遺伝子の合成.....	12
1.2. 改良型 BNC 発現ベクターの作製.....	12
2. 酵母の形質転換と形質転換株のスクリーニング.....	13
2.1. 酵母の形質転換.....	13
2.2. 形質転換株の一次スクリーニング.....	13
2.3. 形質転換株の二次スクリーニング.....	14
2.4. 酵母株の保存.....	15
3. 改良型 BNC 発現株の 5L ファーマンターによる培養.....	15
3.1. プレート培養.....	15
3.2. 種培養.....	15
3.3. 前培養.....	15
3.4. 本培養と集菌.....	16
4. 改良型 BNC の精製.....	16
4.1. BNC-S1 の精製・精製品の保存.....	16
4.2. BNC-S2 の精製・精製品の保存.....	18
4.3. BNC-M の破碎・精製・精製品の保存.....	21
4.4. BNC-L2 の精製・精製品の保存.....	24
4.5. BNC-XT2 の酵素処理による調製.....	26
5. 改良型 BNC の物理化学的基礎評価.....	27
5.1. タンパク質濃度.....	27
5.2. SDS-PAGE 銀染色.....	28
5.3. ウェスタンブロッティングによる S、Pre-S2、及び Pre-S1 ドメインの確認.....	28
5.4. ELISA による S、Pre-S2、及び Pre-S1 ドメインの確認.....	29
5.5. キャピラリー電気泳動による純度測定.....	30
6. 改良型 BNC の内包量推定に関する評価.....	32
6.1. 粒子径.....	32
6.2. リン脂質.....	33
6.3. 内包タンパク質の分析方法の開発(岡山大学).....	33
6.4. 内包量に関する考察.....	33
7. 改良型 BNC の導入能に関する評価.....	34

7.1. 評価方法.....	34
7.2. 導入能の評価結果.....	34
8. 新型の抗体結合型BNCの抗体結合能の評価.....	36
第三章 全体総括.....	38

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、これらはど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。

本方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への内包法を進展させ、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に導入することに成功している。既述のように岡山大学は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)。

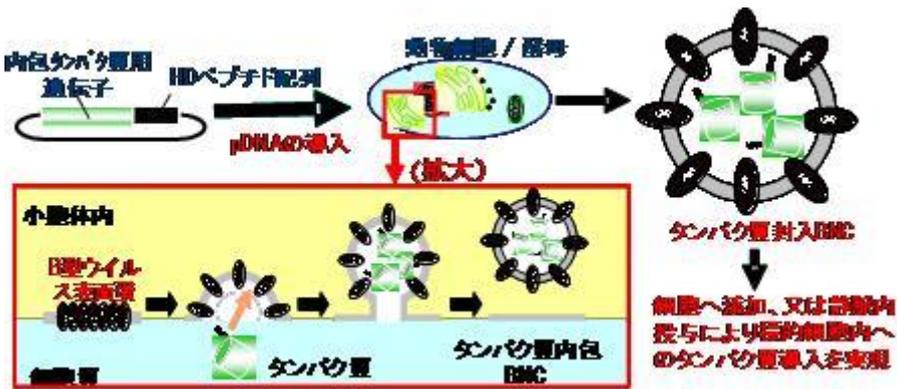


図1. タンパク質内包 BNC の製造方法の概念図

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、細胞へ適用しタンパク質を導入できることを確認する。

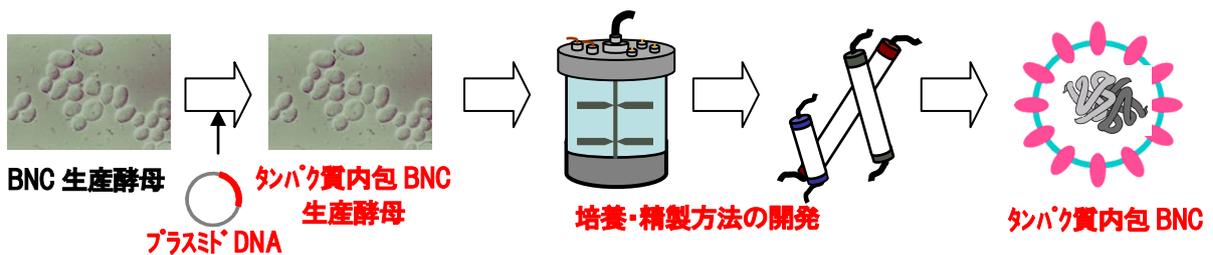


図2. タンパク質内包 BNC の製造工程の概念図

平成 21 年 12 月より計画の一部を、平成 21 年度の補正予算事業で内包目的とするタンパク質 GFP 1 種を用いて検討した。その結果、酵母において、実施計画の目標値を大きく上回る生産量及び内包効率を示す GFP 内包 BNC の製造に成功したが、これらの成果を持って、川下ユーザーである製薬会社数社へ技術紹介したところ、次のような新たな課題が見出された。

- ① 細胞内へ導入されるタンパク質量は多いほど、タンパク質の機能を強く発揮でき、また、使用するタンパク質内包 BNC 量を減らせるため、良いと判断される。従って、現時点で製造可能なものは細胞内への導入効果の点で、更に改良の余地がある。
- ② タンパク質内包 BNC は肝細胞以外の各種細胞へ適用可能なことが重要である。それを可能とするために、抗体による細胞認識能を利用できる抗体結合型 BNC を利用できるが、既存の抗体結合型 BNC は利用できる抗体種に制限があり、ユーザーの利用し易さを考慮した場合、利用する抗体に制限のないものとするべきであり、この点を改善する必要がある。

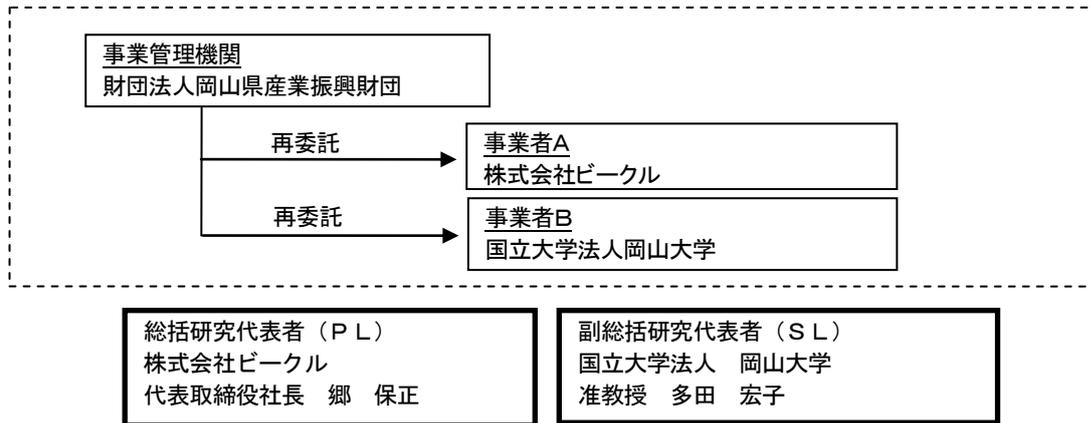
本提案は、以上の様に、平成 21 年度の補正予算事業で実施した成果を踏まえ、実用的なタンパク質内包 BNC の製造技術を開発するために、①内包したタンパク質の細胞

内導入量を更に高めること、及び②利用可能な抗体種に制限のない新たな抗体結合型 BNC の開発を目的として行うものである。

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

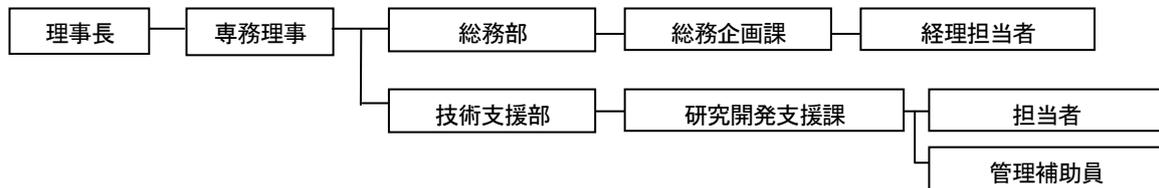
1) 研究組織(全体)



2) 管理体制

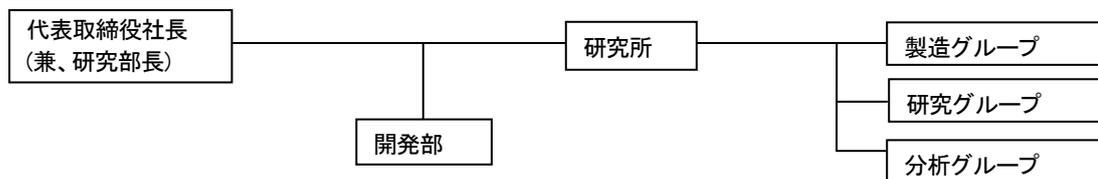
① 事業管理者

財団法人 岡山県産業振興財団

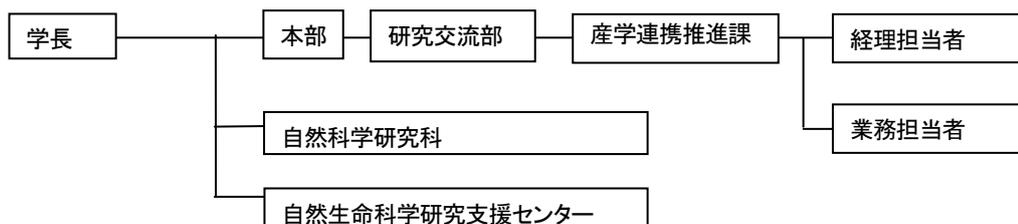


② 再委託先

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
深井 康光	技術支援部 部長
横田 尚之	技術支援部 研究開発支援課 課長
衛藤 貴志	技術支援部 研究開発支援課 主任
三竿 真紀	技術支援部 研究開発支援課 主事
廣田 良二	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 主任研究員
山田 一郎	研究所 研究員
芝 文雄	研究所 研究員
兒玉 なつみ	研究所 研究員

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

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
①Pre-S 領域を削除した BNC 生産酵母株の開発	1. BNC の Pre-S 領域の変異体として、3 種以上を検討する。 2. 導入能の検討に必要な発現量として BNC 3 種の各精製品で 0.01g を確保する。 3. Pre-S 領域を削除された BNC の細胞導入能を確認する。
②S 領域を改変した BNC 生産酵母株の開発	1. S 領域の変異体 (Pre-S 領域の変異を含む) として 3 種以上を検討する。 2. 評価に必要な量として、精製品として各変異体 10mg を確保する。 3. タンパク質内包量を評価推定する。
③Pre-S 領域を改良した新規抗体結合型 BNC 生産酵母株の開発	1. 既存の抗体結合型 BNC(BNC-ZZ)と比較してより幅広い抗体種との結合能を示すこと。 2. 評価に必要な精製量として 0.01g を確保する。

以上、目標毎に成果を記載する。

①Pre-S 領域を削除した BNC 生産酵母株の開発

目標達成度： 100%

細胞内導入能を高める目的で Pre-S 領域の一部又は全部を削除した変異体として、3 種の BNC 生産株を開発し、それぞれ 10mg 以上の精製 BNC を製造した。また、製造した改変 BNC を酵素処理して改変した BNC を 1 種製造した。これら 4 種の BNC の細胞内導入能を確認した所、Pre-S 領域の全部を削除した変異体 (BNC-S1、BNC-S2) は元の BNC (BNC-L) より約 4 倍程度導入能が上昇していることが分かった。Pre-S 1 領域の全部を削除した変異体 (BNC-M) では導入能は BNC-L の約半分へ低下していたが、Pre-S 1 領域の全部と Pre-S2 領域の一部を削除したもの (BNC-X) では導入能は 2~4 倍へ上昇した。

②S 領域を改変した BNC 生産酵母株の開発

目標達成度： 100%

BNC の内包量を高める目的で、S 領域に変異 (1 から 16 変異) を入れた BNC の生産株を 4 種開発し、それぞれ 10mg 以上の精製 BNC を製造した。これらの BNC について内包量を検討した所、1 変異を入れたものでは推定内包量は僅かな上昇を見せたもの (BNC-M 等) から 3 倍程度 (BNC-S1) まで上昇したものがあり、16 変異を入れたものでは 32 倍まで上昇した。実用性も考慮すると約 3 倍まで上昇した BNC-S1 が最高であった。

③Pre-S 領域を改良した新規抗体結合型 BNC 生産酵母株の開発

目標達成度： 50%

抗体結合型 BNC の抗体結合種を広げる目的で、Pre-S 領域に新しい抗体結合ドメインを入れた BNC 生産株に確立を目指した。そのため酵母に当該 BNC を発現させるためのベクターを 2 種

製造した。1 種について酵母の形質転換を行っても株が生存せず、今の所、新型の抗体結合型 BNC の生産株は出来ていない。一方、新型 BNC ができた場合に備えて各種抗体に対する結合能を調べるための評価系の確立を行い、成功した。

1.4. 当該プロジェクト連絡窓口

(事業管理者)

財団法人岡山県産業振興財団

(経理担当者) 技術支援部 研究開発支援課 主任 衛藤 貴志

(業務管理者) 技術支援部長 深井 康光

(再委託先)

株式会社ビークル

(経理、業務管理者) 開発部長 日詰 信吾

国立大学法人 岡山大学

(経理担当者) 研究交流部 産学連携推進課 総括主査 石部 利幸

(業務管理者) 研究交流部 産学連携推進課長 田口 博之

第二章 本論

要旨

タンパク質内包バイオナノカプセル (BNC) の細胞内導入能向上、タンパク質内包量増加、更に幅広い抗体との結合能を有したものを製造することを目標に、① Pre-S 領域を削除した BNC 生産酵母株、②S 領域を改変した BNC 生産酵母株、及び③Pre-S 領域を改良した新規抗体結合型 BNC 生産酵母株の検討を行った。検討した延べ 10 種 (6 種) の改変 BNC の製造を試みた結果、抗体結合型 BNC 1 種の製造は試験期間中に成功しなかったが、導入能や内包量増加を目指した 5 種の BNC の製造に成功した。これらを評価した結果、導入能は約 4 倍まで上昇し、内包量は実用性も考慮すると約 3 倍まで増えるものと思われた。両者を合わせると凡そ 12 倍まで細胞へのタンパク質導入量が増加する可能性があることが分かった。

試験目的

タンパク質内包バイオナノカプセル（BNC）の細胞内導入能向上、タンパク質内包量増加、更に幅広い抗体との結合能を有したものを製造することを目標に、①Pre-S 領域を削除した BNC 生産酵母株の開発、②S 領域を改変した BNC 生産酵母株の開発、及び③Pre-S 領域を改良した新規抗体結合型 BNC 生産酵母株の開発を行う。

具体的には、pre-S1 領域の全部又は一部を削除した BNC 4 種、S 領域に変異を加えた 5 種、そして Pre-S 領域に抗体結合部位を挿入したもの 1 種、延べで 10、2 領域に変異を加えたものを考慮して、合計で 6 種の改変 BNC の製造を行い、それぞれについて適切な評価を行うことを目指した（図 1）。

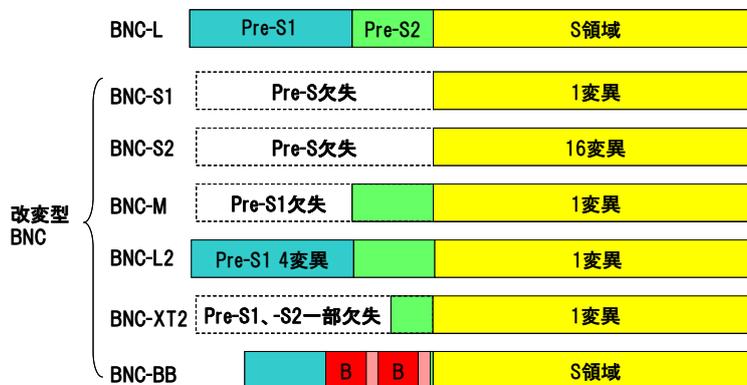


図 1 検討目的としたバイオナノカプセルの各種改変体

試験結果

1. 改良型 BNC 発現ベクターの構築

1.1. 改良型 BNC 遺伝子の合成

改良型 BNC (BNC-S1, BNC-S2, BNC-M, BNC-L2, BNC-BB) の遺伝子配列及びアミノ酸配列を以下に示した。それぞれの遺伝子の両末端には、発現ベクターへ挿入するために必要な XhoI 制限酵素サイトを付加し、BNC タンパク質コード領域の下流には、酵母内での発現に必要な PGKt (3-phosphoglycerate kinase terminator) 配列を配置した。各遺伝子は GenScript 社 (米国) にて合成し、その塩基配列は同社にて全長配列を解析し、設計通りであることを確認した。

合成した遺伝子は以下の通りである。

① BNC-S1 用遺伝子

名称: BNC-S1 / PGK t

塩基: 全長; 997 bp, BNC-S1 コード領域; 681 bp

② BNC-S2 用遺伝子

名称: BNC-S2 / PGK t

塩基配列: 全長; 997 bp, BNC-S2 コード領域; 681 bp

③ BNC-M 用遺伝子

名称: BNC-M / PGK t

塩基配列: 全長; 1144 bp, BNC-M コード領域; 828 bp

④ BNC-L2 用遺伝子

名称: BNC-L2 / PGK t

塩基配列: 全長; 1537 bp, BNC-L2 コード領域; 1221 bp

⑤ BNC-BB 用遺伝子

名称: BNC-BB / PGK t

塩基配列: 全長; 1681 bp, BNC-BB タンパク質コード領域; 1365 bp

1.2. 改良型 BNC 発現ベクターの作製

合成した 5 種の改良型 BNC 遺伝子 (BNC-S1, BNC-S2, BNC-M, BNC-L2, BNC-BB) を酵母用発現ベクター pGLD (図 2 に模式図を示す。) の XhoI 制限酵素サイトにそれぞれ挿入し、大腸菌を形質転換した。形質転換された大腸菌のコロニーの中から、改良型 BNC 遺伝子が挿入されたベクターを保有するクローンを選択し、得られたクローンを培養した。培養して得られた大腸菌から 5 種の発現ベクター (pGLD-BNC-S1, pGLD-BNC-S2, pGLD-BNC-M, pGLD-BNC-L2, pGLD-BNC-BB) をそれぞれ精製した。

作製した発現ベクターを制限酵素 XhoI で消化後アガロース電気泳動し、挿入された遺伝子のサイズを解析した。その結果、それぞれの発現ベクターにおいて、挿入遺伝子部分のサイズは設計通りであることが確認できた。

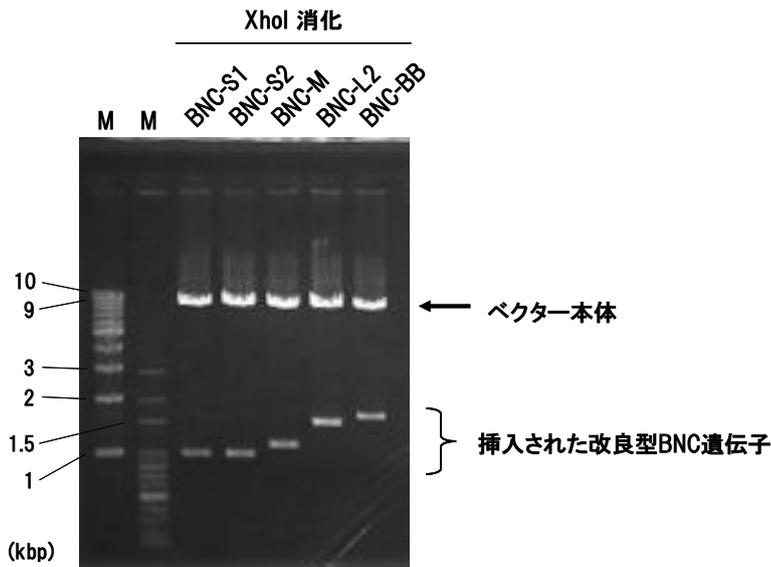


図3. 作製した改良型 BNC 発現ベクターのアガロース電気泳動像
 作製した 5 種の発現ベクター (pGLD-BNC-S1, pGLD-BNC-S2, pGLD-BNC-M, pGLD-BNC-L2, pGLD-BNC-BB) を、制限酵素 XhoI で消化後、アガロース電気泳動した。M: DNA サイズマーカー

2. 酵母の形質転換と形質転換株のスクリーニング

2.1. 酵母の形質転換

スフェロプラスト法を用いて 5 種の発現ベクター (pGLD-BNC-S1, pGLD-BNC-S2, pGLD-BNC-M, pGLD-BNC-L2, pGLD-BNC-BB) を酵母株 (*Saccharomyces cerevisiae* AH22R- 株) に形質転換した。なお、スフェロプラストによる形質転換法は成書 (酵母分子遺伝学実験法、1996、大嶋泰治著、株式会社学研出版センター) に記載されている方法に準じて行った。

酵母親株を YPDA 寒天培地に播種し、30°C で 3 日間静置培養した。生育した菌体を YPDA 液体培地に播種し、30°C、100rpm で 1 日間振盪培養した。この培養菌体を Zymolyase (終濃度 0.1 mg/mL) で懸濁、30°C で 1~1.5 時間静置することにより酵母をスフェロプラスト化させた。この細胞懸濁液に発現ベクター (pGLD-BNC-S1, pGLD-BNC-S2, pGLD-BNC-M, pGLD-BNC-L2, pGLD-BNC-BB) を加え室温で 15 分間静置後、未凝固の Overlay 寒天培地と混合し、Y-Tf (-Leu) 寒天培地の上に流し込み、Overlay 寒天培地の凝固を確認後、30°C で静置培養した。培養期間中、コロニーの出現を随時確認し、得られたコロニーは次の工程 (一次スクリーニング) へ移行した。寒天培地中における生育コロニーの出現は、各遺伝子や実験毎に異なり、一定の関係は認められなかったが、3~10 日間の範囲であった。表 1 に示すように、合計で 9 回の形質転換を行った。

2.2. 形質転換株の一次スクリーニング

生育したコロニーを滅菌した棒で突き、それを SD(-Leu)寒天培地に塗りつけることで播種した。播種した寒天培地は 30°C で 3~12 日間静置培養し、コロニーの出現を随時観察した。用いたベクターにマーカーとして組み込まれた LEU2 遺伝子によって、ロイシン非要求性株に形質転換されている。従って、SD(-Leu)寒天培地中にて増殖が確認されたコロニーはベクターが機能していると判断することが出来る。本培地内で出現したコロニーは、さらに SD(-Leu)寒天培地に継代して 30°C で 3~7 日間静置培養し、増殖が確認された酵母株を陽性株と判断し、次の二次スクリーニングに移行した (表 1)。BNC-S1、BNC-S2、BNC-M、BNC-L2 については、それぞれ数十株を二次スクリーニングに移行できた。しかし、BNC-BB は 1,019 コロニーを一次

スクリーニングにかけたが、安定して増殖する株を得ることができなかった。

表 1. 一次スクリーニングのまとめ

	形質転換回数									合計
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	7回目	8回目	9回目	
BNC-S1	17/124	22/124	0/26					27/127	9/9	75/410
BNC-S2	0/280	1/280	0/128	0/37	0/15	5/416	1/208	4/114	4/6	15/1484
BNC-M	1/280	1/280	1/195	4/13	1/3	7/260	2/208			17/1239
BNC-L2	1/280	0/280	1/137	8/18	2/8	2/208	6/97			20/1028
BNC-BB	0/280	0/228	0/256	0/5	0/18	0/156	0/76			0/1019
合計	19/1244	24/1192	2/742	12/73	3/44	14/1040	9/589	31/241	13/15	127/5180

各数値は二次スクリーニングへ移行したコロニー数/SD 寒天培地へ播種したコロニー数を示す。

2.3. 形質転換株の二次スクリーニング

二次スクリーニングにおける評価は、①液体培地での増殖、②菌体抽出液を用いたウェスタンブロット解析、③ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法による S 抗原力価解析に基づいて行った。

一次スクリーニングで増殖が確認された酵母株全部を、先ず High-Pi 培地にて 30°C で 1~2 日間、最終 OD600 = 6~11 になるまで試験管にて振盪培養 (30°C、200rpm) した。次いで 8S5N-P400 培地へ継代し、30°C で 2~3 日間、最終 OD600=13~27 になるまで試験管にて同様の条件で振盪培養した。表 2 に示すように、二次スクリーニングへ移行した株全てが液体培地で増殖した。

試験管培養で得られた培養菌体は回収し、0.85%食塩水で洗浄後、遠心分離 (日立 R15A、7000rpm、5 分間、4°C) により回収し、評価まで-80°Cで凍結保存した。なお、回収された菌体量は 0.08~0.25g であった。評価に先立って凍結菌体に細胞破碎抽出用バッファー [Buffer A (100 mM リン酸ナトリウム、15mM EDTA、7.5M 尿素) に 2mM PMSF と 0.1% Tween-80 を添加したもの]を加えよく混合し、次いでガラスビーズ入り 1.5mL チューブ内で強く振盪することによって細胞を破碎した。遠心分離 (エッペンドルフ 5415 R、13000rpm、1 分間、4°C) 後、破碎液より上清を BNC 抽出液とし、ウェスタンブロット解析及び、ELISA 解析に用いた。

抗 S 抗体、抗 Pre-S1 抗体または抗 Pre-S2 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、全ての株において期待通りの結果が得られた (表 2)。

ELISA 法を用いて S 抗原活性を測定した結果、株によって S 抗原活性は大きく異なり、その範囲はおおよそ 0.5~300 μ unit/g 菌体であった。なお、ELISA 法による S 抗原力価の測定には、Enzygnost HBsAg 5.0 (DADE BEHRING) を用いた。

ELISA 解析の結果から発現量の高いと判断された、2 株の BNC-S1 発現株、3 株の BNC-S2 発現株、3 株の BNC-M 発現株、3 株の BNC-L2 発現株を候補株として選択した。

表 2. 二次スクリーニングのまとめ

	検討株数	増殖株数	ウェスタンブロット			S抗原活性(ELISA) (μ Unit/g菌体)*	候補株数
			抗S	抗PreS-2	抗PreS-1		
BNC-S1	75	75	○	—	—	9.3~34.8	2
BNC-S2	15	15	○	—	—	1.6~53.7	3
BNC-M	17	17	○	○	—	1.0~141	3
BNC-L2	20	20	○	○	○	0.5~295**	3

* : S 抗原活性 (Enzygnost で測定) の 1 μ Unit は BNC-XT 1 μ g の示す S 抗原活性と定義

** : BNC-L2 の S 抗原活性値 (295 μ Unit/g 菌体) は、測定上限以上であったため、>295 である。

これらの内、最終選抜株は S 抗原活性の高さと増殖性の観点から、BNC-S1-10、BNC-S2-6、BNC-M-11、BNC-L2-19 とした。なお、これらの株の S 抗原活性は BNC-L2 発現株が非常に高く、次いで、BNC-M 発現株、BNC-S1 発現株と BNC-S2 発現株では低かった。

最終選抜株の抽出液で確認したウェスタンブロッティング像を図4に示した。それぞれ発現した改良型 BNC タンパク質は、BNC-S1 及び BNC-S2 は抗 S 抗原抗体に、BNC-M は抗 S 抗原抗体と抗 Pre-S2 抗原抗体に、BNC-L2 は抗 S 抗原抗体、抗 Pre-S2 抗原抗体、及び抗 Pre-S1 抗原抗体によって検出された。また、検出された各改良型 BNC タンパク質は、期待される分子量を示したことから、各発現株は目的 BNC タンパク質を発現していると推察された。

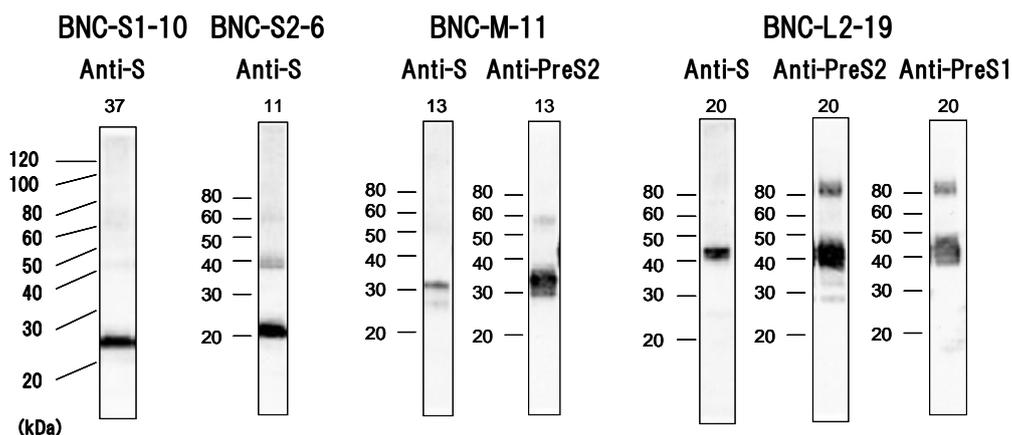


図4. 最終候補株の粗抽出液のウェスタンブロッティング解析

2.4. 酵母株の保存

一次スクリーニングで選抜された全ての株はそれぞれグリセロール 20%含有する YPDA ストック溶液に懸濁し、一次ストック溶液として-80℃で保存した。二次スクリーニングにより最終選抜された株については、一次ストック溶液を利用して SD(-leu)寒天培地で3～4日間培養した後、YPDA ストック溶液で、OD600=100 (±10) となるように調整した菌体懸濁液を調製し、20μL ずつ分注後、マスターセルとして-80℃フリーザー内で凍結保存した。

3. 改良型 BNC 発現株の 5L フェアメンターによる培養

最終選抜した酵母株を 5L フェアメンター (Bioneer500-5L、丸菱バイオエンジニアリング株式会社) により培養し、集菌、菌体破碎を行った。その手順は以下の通りである。

3.1. プレート培養

最終選抜した酵母株のストック溶液 (マスターセル) を SD(-leu)寒天培地に播種し、30℃にて3～4日間静置培養した。

3.2. 種培養

寒天培地上で生育した酵母をフラスコにて High-Pi 培地 100mL に播種し、SHAKER CABINET を 100rpm にセットして 30℃で振盪培養した。培養は OD600 値で 5 以上若しくは増殖が停止するまで行った。培養に要した期間はおよそ 1 日であった。

3.3. 前培養

種培養液 36mL をフラスコの High-Pi 培地 324mL に播種し、SHAKER CABINET を 100rpm にセットして 30℃で振盪培養した。培養は OD600 値で 4.5 以上若しくは増殖が停止するまで行った。培養に必要な期間は 1～2 日であった。

3.4. 本培養と集菌

前培養液 350mL を 8S5N-P400 培地 3.15L に播種しファーメンターを用いて 30°C で 2~3 日間攪拌培養した。なお、培養中は培地の pH 変化（菌体の増殖に伴い、pH が酸性側に変化）で増殖をモニターし、集菌時に OD600 を測定した。培養終了後、回収した培養液を遠心分離（himac CR 22G、R10A3、5000rpm、5 分間、4°C）して菌体を集菌し、0.85% 食塩水を加えて懸濁後、再度遠心分離（himac CR 22G、R10A3、7000rpm、10 分間、4°C）することで洗浄した。洗浄した菌体はプラスチック袋に空気を抜いて充填後シールし-80°C で保存した。各培養工程の詳細な結果を表 3 に示した。各酵母株において、7~10 間の培養工程で、培養液 1L 当たりおよそ 20~30g の菌体を得ることができた。

表 3. ファーメンター培養データ

酵母株	培養回数/培養期間	各工程期間				菌体量/培養液量 (g/L)
		プレート培養	種培養	前培養	本培養	
BNC-S1-10	1回目/10日間	95hr	28hr	40hr	67.5hr	22.5
	2回目/9日間	72hr	30hr	41hr	70hr	23.6
	3回目/10日間	88hr	31hr	41hr	70hr	23.2
BNC-S2-6	1回目/8日間	72hr	23hr	24hr	64.5hr	23.5
BNC-M-11	1回目/7日間	67hr	24hr	26hr	46hr	25.1
	2回目/7日間	64hr	23.5hr	25hr	47hr	31.2
BNC-L2-19	1回目/7日間	62hr	27hr	28hr	50hr	17.2

4. 改良型 BNC の精製

BNC-L2、BNC-M、BNC-S1 及び BNC-S2 の各改良型 BNC について、破砕から精製品の保存までの工程を各 BNC 毎に以下に記載する。なお、BNC-L2 は既存の精製方法で精製することができたが、BNC-M は既存の精製方法の一部を改良する必要があった。また、BNC-S1 及び BNC-S2 は既存の精製方法では精製できなかったため、新たに別の方法を開発し精製した。

4.1. BNC-S1 の精製・精製品の保存

BNC-S1 の破砕から精製過程を操作順に従って以下に示す。

破砕：

冷凍保存した酵母菌体を 6.5M 尿素、2mM PMSF、5mM DTT、10 unit/mL Benzonase Nuclease を含むトリスバッファー溶液で懸濁し、ビードビーターにて破砕した。続いて、破砕液を約 60 mL ずつ分注し、氷水中で冷却しながら超音波による破砕（TOMY UD-201, Out put: 10, 3 分間）を分注液に対して 4 回行った。超音波処理した破砕液は次の処理まで氷上で冷却した。

酸沈殿：

破砕液を遠心(himac CR22G、R12A3、12000rpm、30 分間、4°C)した上清に塩酸を加え pH2.5 ~pH3 に調整し、遠心分離(himac CR22G、R12A3、12000rpm、30 分間、4°C)によって不要な成分を除去した。上清に NaOH 溶液を加え約 pH8 に調整した。

加水濃縮：

得られた上清を限外ろ過膜（Pellicon XL50, PXB500C50, Millipore）を用いて 6.5M 尿素を含むトリスバッファーによる加水濃縮を行い、低分子不純物を除去した。

CsCl 密度勾配遠心分離：

濃縮後 CsCl (5~30%, w/v) 密度勾配分離を超速心機(himac CP70MX、P28S、24000rpm、16時間、16°C)を用いて実施し、BNC タンパク質を含む分画を集めた(図5)。得られた分画を限外ろ過膜(Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore)で約50 mLまで濃縮後、DTT及びCsCl濃度を低下させる目的で、250 mLの6.5M尿素を含むリン酸バッファーで加水濃縮した。

ショ糖密度勾配遠心分離：

次いで、ショ糖(5~30%, w/v)を用いた密度勾配遠心分離(himac CP70MX、P28S、24000rpm、14時間、16°C)にて同様にBNCタンパク質を含む分画を分取した(図6)。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー1：

得られた分画を、6.5M尿素を含むPBSで平衡化したゲル濾過カラム(Sephacryl S-500 HR, GEヘルスケア)を用いて分画した(図7)。

バッファー交換：

得られたBNC溶液を限外ろ過膜(Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore)を用いて濃縮後、1%ショ糖を含むPBSで平衡化したゲルろ過カラム(PD-10, GEヘルスケア)に2回かけ、バッファー交換を行い、精製BNC-S1を得た。

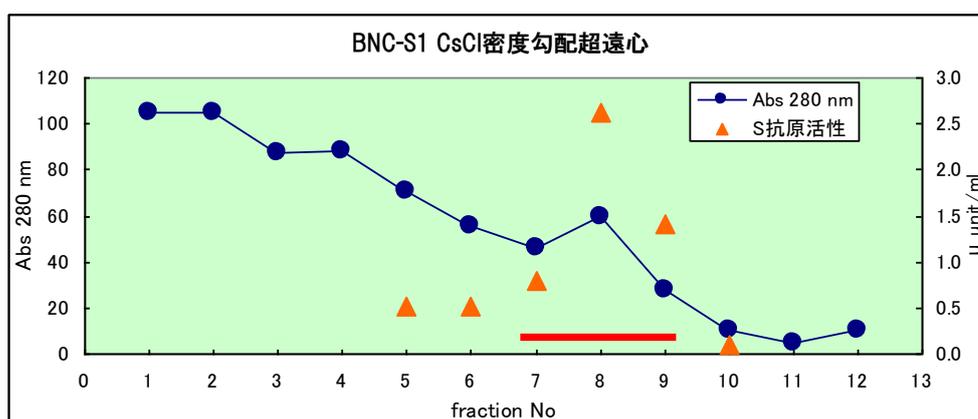


図5. CsCl 密度勾配遠心
赤いバーは回収した分画を示す。

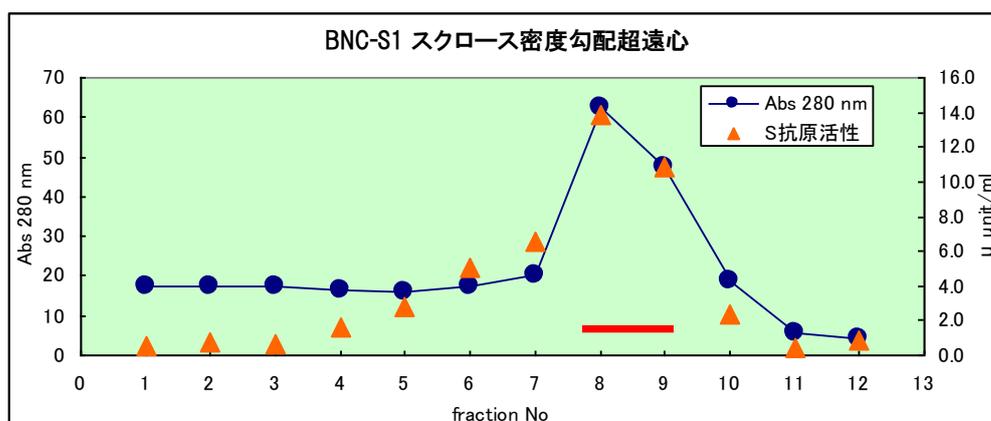


図6. スクロース密度勾配遠心
赤いバーは回収した分画を示す。

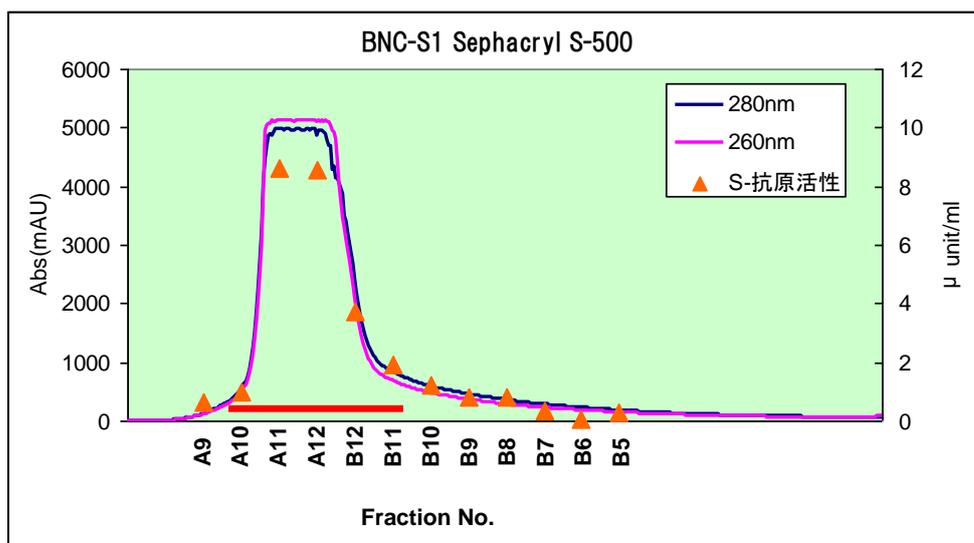


図7. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。フラクション A11、A12 のピークはスケールオーバーしている。

表4. BNC-S1 の精製結果まとめ

	総タンパク質量 (mg)	総S抗原活性 (mUnit)	比活性 (μ Unit/mg)	回収率 (%)	備考
抽出液	23849	8.784	0.368	-	240.3g 菌体から精製
酸処理後	13428	11.858	0.883	100.0	
CsCl密度勾配後	656	0.486	0.741	4.1	
スクロース密度勾配後	177	0.368	2.082	3.1	
ゲルろ過後	101	0.291	2.881	2.5	
凍結保存前 (バッファー交換後)	111	0.922	8.306	7.8	

本精製表は全工程終了後に各工程の保存サンプルを一度に測定して作成した。タンパク質量の測定は抽出液から CsCl 密度勾配遠心までは BCA 法により、スクロース密度勾配遠心以降は BCA-SDS 法で行った。

BNC-S1 の精製過程の結果を表4にまとめた。酵母菌体 240.3g から最終的に 111 mg の BNC-S1 を精製することができ、S 抗原活性の回収率は 7.8%であった。

精製品溶液のタンパク質量を測定し、このタンパク質量に基づいて、滅菌 PBS (1% ショ糖を含む) を加え、タンパク質濃度 $400 \mu\text{g/mL}$ 、ショ糖 1% に調製したものを凍結し、 -20°C で保存した。本保存条件は、精製した BNC-S1 が -20°C の保存で少なくとも 2 週間は粒子径に変化はなく、且つ、凍結融解を 2 回繰り返しても沈殿物が出現しなかったことから決定した条件である。

4.2. BNC-S2 の精製・精製品の保存

BNC-S2 の破碎から精製過程を、項目毎に操作順に従って示す。

破碎：

冷凍保存した酵母菌体を 6.5M 尿素、2mM PMSF、5mM DTT、10 unit/mL Benzonase Nuclease を含むトリスバッファー溶液で懸濁し、ビードビーターにて破碎した。破碎液を約 60 mL ずつ分注し、氷水中で冷却しながら超音波による破碎 (TOMY UD-201, Out put: 10, 3 分間) を各分注液に対して 4 回行った。なお、超音波処理した破碎液は次の処理まで氷上で冷却した。

酸沈殿：

破碎液を遠心 (himac CR22G、R12A3、12000rpm、30 分間、 4°C) した上清に塩酸を加え pH2.5

～pH3 に調整し、遠心分離(himac CR22G、R12A3、12000rpm、30 分間、4℃)によって不要な成分を除去した。上清に NaOH 溶液を加え約 pH8 に調整した。

加水濃縮：

得られた上清を限外ろ過膜 (Pellicon XL50, PXB500C50, Millipore) を用いて 6.5M 尿素を含むトリスバッファーによる加水濃縮を行い、低分子不純物を除去した。

CsCl 密度勾配遠心分離：

濃縮後、CsCl (5～30%, w/v) を用いた密度勾配遠心分離を超速心機(himac CP70MX、P28S、24000rpm、16 時間、16℃) を用いて実施し、BNC タンパク質を含む分画を集めた (図 8)。得られた分画を限外ろ過膜 (Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore) を用いて約 50 mL まで濃縮後、DTT 及び CsCl 濃度を低下させる目的で、250 mL の 6.5M 尿素を含むリン酸バッファーを加水し濃縮した。

ショ糖密度勾配遠心分離：

次いで、ショ糖 (5～30%, w/v) を用いた密度勾配遠心分離(himac CP70MX、P28S、24000rpm、14 時間、16℃) にて同様に BNC タンパク質を含む分画を分取した (図 9)。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー 1：

得られた分画を、6.5M 尿素を含む PBS で平衡化したゲル濾過カラム (Sephacryl S-500 HR, GE ヘルスケア) を用いて分画した(図 10)。

バッファー交換：

得られた BNC 溶液を限外ろ過膜 (Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore) を用いて濃縮後、1%ショ糖を含む PBS で平衡化したゲルろ過カラム (PD-10, GE ヘルスケア) に 2 回かけ、バッファー交換を行い、精製 BNC-S2 を得た。

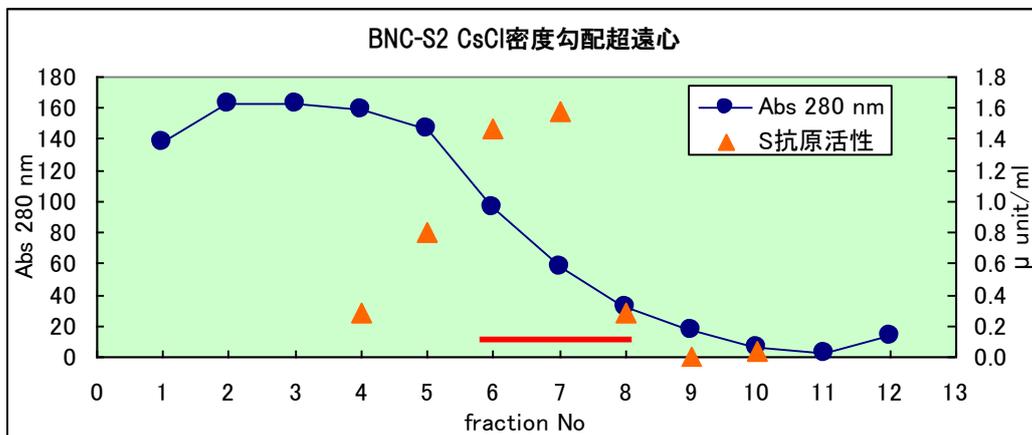


図 8. CsCl 密度勾配遠心
赤いバーは回収した分画を示す。

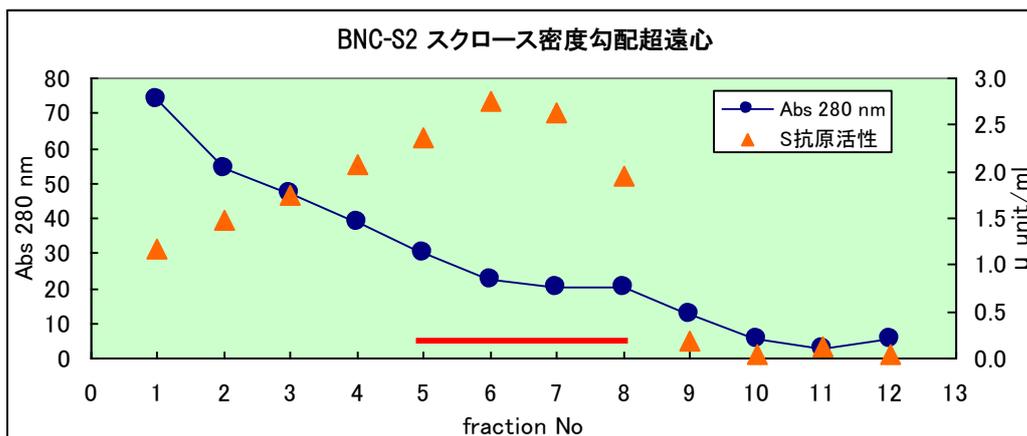


図9. スクロース密度勾配遠心
赤いバーは回収した分画を示す。

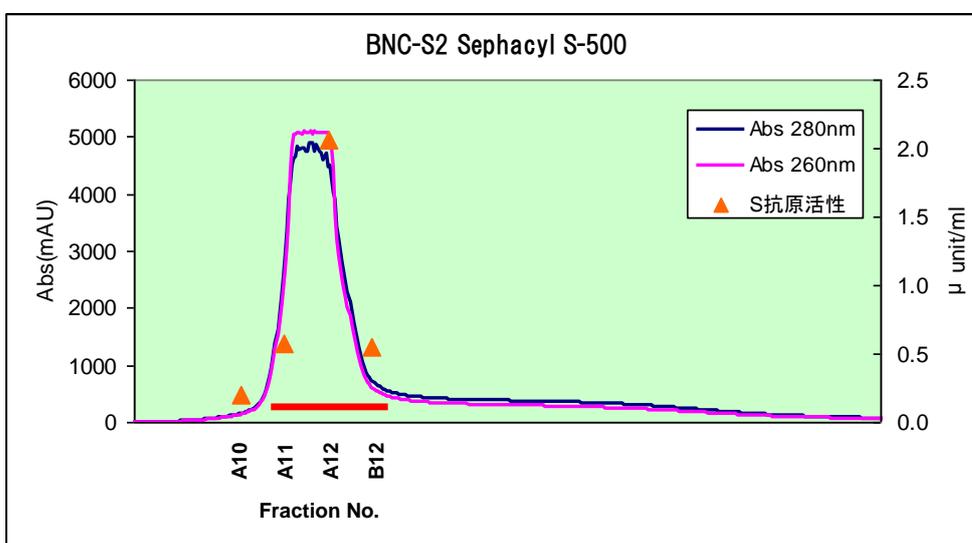


図10. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。フラクション A11、A12 のピークはスケールオーバーしている。

表5. BNC-S2 の精製結果まとめ

	総タンパク質量 (mg)	総S抗原活性 (mUnit)	比活性 (μ Unit/mg)	回収率 (%)	備考
抽出液	28360	4.953	0.175	-	327.2g 菌体から精製
酸処理後	19027	9.495	0.499	100.0	
CsCl密度勾配後	1073	0.187	0.174	2.0	
スクロース密度勾配後	312	0.218	0.701	2.3	
ゲルろ過後	76.8	0.200	2.601	2.1	
凍結保存前 (バッファー交換後)	69.4	0.140	2.011	1.5	

タンパク質の定量は抽出液から CsCl 密度勾配遠心までは BCA 法により、スクロース密度勾配遠心以降は BCA-SDS 法によって測定した。

BNC-S2 の精製過程の結果を表5にまとめた。酵母菌体 327.2g から最終的に 69.4 mg の BNC-S2 を精製することができた。S 抗原活性の回収率は 1.5% であり、同じ精製方法を用いた BNC-S1 と比較して悪かった。

精製品溶液のタンパク質量を測定し、このタンパク質量に基づいて、滅菌 PBS (1% ショ糖を含む) を加え、タンパク質濃度 400 μg/mL、ショ糖 1% に調製したものを凍結し、-20°C で保存

した。本保存条件は、精製した BNC-S2 が -20℃の保存で少なくとも 2 週間は粒子径に変化はなく、且つ、凍結融解を 2 回繰り返しても沈殿物が出現しなかったことから決定した条件である。

4.3. BNC-M の破碎・精製・精製品の保存

BNC-M の破碎から精製過程を、各項目毎に操作順に従って示す。

破碎：

冷凍保存した酵母菌体 437.8 g に対し、細胞破碎抽出用バッファー [Buffer A (100 mM リン酸ナトリウム、15mM EDTA、7.5M 尿素) に 2mM PMSF と 0.1%Tween-80 を添加したもの] を加えて菌体を懸濁し、これをビードビーター (Biospec Product Inc Model 1107900) の破碎容器に入れ、175ml のガラスビーズを加えて、氷冷下にて破碎した。破碎条件は 2 分間破碎と 2 分間冷却をワンクールとする操作を 5 回繰り返す、その後 1 分間破碎と 1 分間冷却をワンクールとする操作を 2 回繰り返した。破碎後上記抽出用バッファーでガラスビーズを洗浄し、破碎液に加えた。

透析：

破碎液を透析用セルロースチューブを用いて、外液 (1mM EDTA 含有 PBS) に対して攪拌しながら 4℃で一晩透析した。透析後の尿素濃度は尿素窒素 B テストワコー (和光純薬) を用いて 10 mg/mL 以下であることを確認した。

熱処理：

透析サンプルを 50ml のプラスチック遠心管に入れ、予め 70 °C にしておいた恒温槽で温浴させ、5 分に一回程度転倒混和しながら、20 分間熱処理した。熱処理後、遠心分離 (himac CR 22G、R12A3、12000rpm、30 分間、4℃) し、上清を回収した。

加水濃縮：

限外ろ過膜 (Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore) を用いて透析サンプルに、リン酸バッファー (10mM リン酸ナトリウム、10mM NaCl +1 mM EDTA pH5.5) を加水液とした加水限外ろ過を行い低分子不純物を除去すると同時に濃縮した。

硫酸化セルファインカラムクロマトグラフィー：

限外ろ過により得られたサンプルを 0.8 μm のフィルターに通した後、平衡化した硫酸化セルファインカラム(Chisso corp.) に吸着させた。次いで図 11 に示したように、平衡化バッファーにて洗浄後、0.5M NaCl を含むリン酸バッファーにてステップワイズで溶出させた。S 抗原活性のある分画を集め、先ず大型の限外ろ過膜 (Pellicon XL50, PXB100C50, Millipore) で濃縮後、次いで小型の限外ろ過膜 Amicon Ultra (NMWL 100K, Millipore)を用いて更に濃縮した。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー①：

濃縮したサンプルを 0.45 μm のフィルターに通した後、図 12 に示したように PBS で平衡化したゲル濾過カラム(Sephacryl S-500 HR, GE ヘルスケア)で分画した。

イオン交換カラムクロマトグラフィー：

得られた分画を Q sepharose HP カラムにロードし、非吸着画分を洗浄した後、図 13 に示すように NaCl にてリニアグラジエント溶出させ分画を得た。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィー②：

S 抗原活性のある分画を Amicon Ultra (NMWL 100K, Millipore) により濃縮し、図 14 に示すよ

うに PBS で平衡化したゲルろ過カラム (Sephacryl S-500, GE ヘルスケア) にて分画すると同時にバッファー交換を行った。

濃縮：

得られた分画の内、比較的活性の高い画分を集め Amicon Ultra(NMWL 100K, Millipore) により 1 mg/mL 以上になるまで濃縮した。

なお、上記のカラムクロマトグラフィーは全て AKTA System (GE ヘルスケア) を用いて行い、各フラクションの S 抗原活性は当社開発の S-ELISA を利用して測定した。

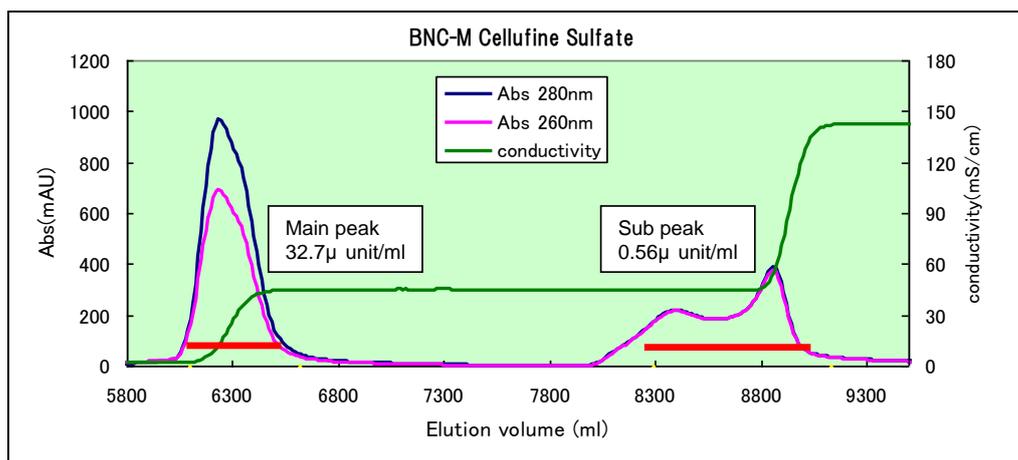


図 11. 硫酸化セルファインカラムクロマトグラフィー

フラクションコレクター不調のため、予備検討で判明している活性分画 (6062ml~6621mL) をまとめて回収し活性を測定した結果、32.7 μ Unit/ml であった。なお、8000~9300mL 分画の活性は 0.56 μ Unit/ml と低かった。

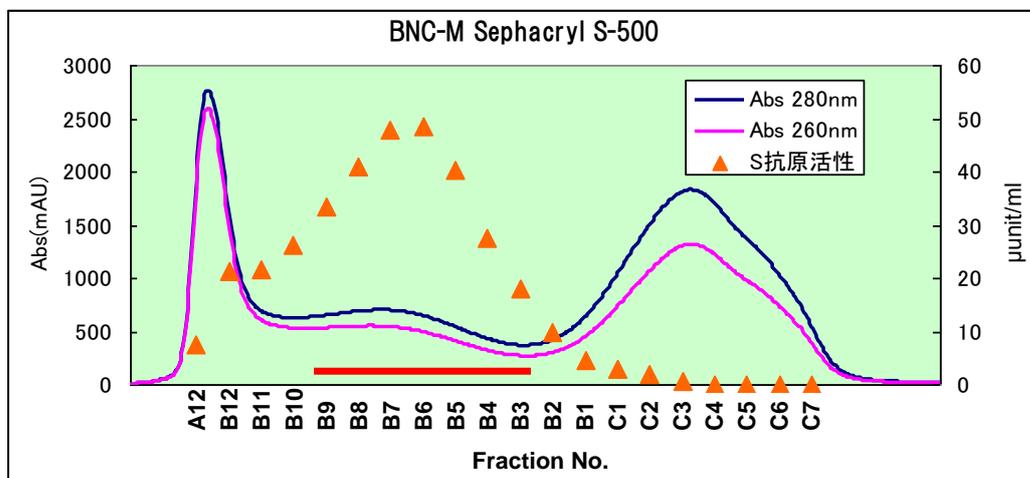


図 12. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー①

赤いバーは回収した分画を示す。

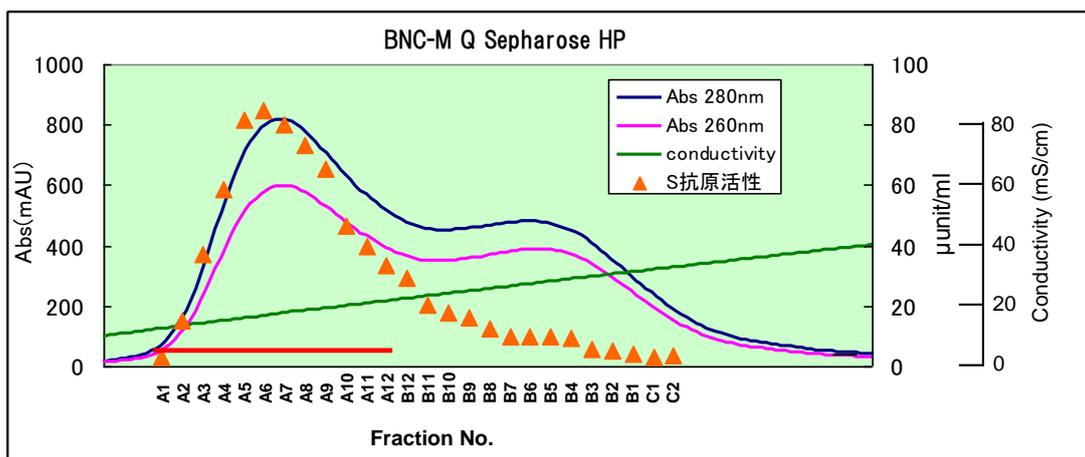


図 13. イオン交換クロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。

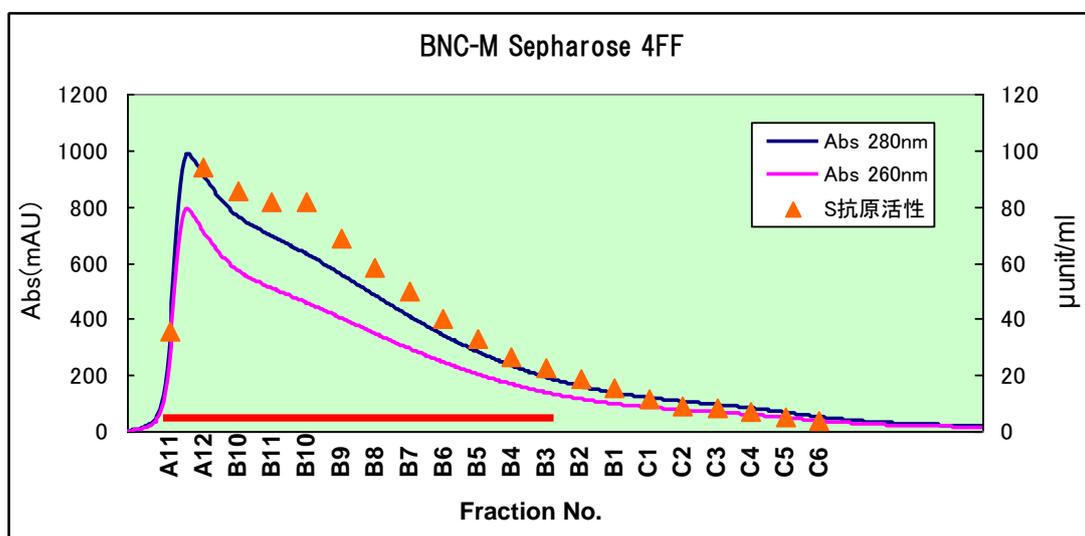


図 14. ゲルろ過クロマトグラフィー②
赤いバーは回収した分画を示す。

表 6. BNC-M の精製結果のまとめ

	総タンパク質量 (mg)	総S抗原活性 (mUnit)	比活性 (μ Unit/mg)	回収率 (%)	備考
抽出液	18445.7	23.8	1.3	-	菌体437.8gから精製
透析後	16520.0	26.9	1.6	100.0	
熱処理後	4996.4	16.2	3.2	60.2	
SCカラム後	1562.8	15.0	9.6	55.7	
ゲルろ過①後	87.6	9.0	102.4	33.3	
イオン交換後	25.3	6.3	250.3	23.5	
ゲルろ過②後	12.3	5.3	433.8	19.9	
凍結乾燥前	12.3	5.5	445.2	20.4	精製品12.3mg

本精製表は全工程が終了後に、保存してあった各工程のサンプルを一度に測定して作成したものである。総タンパク質量は抽出液から熱処理までは BCA 法により測定し、SC カラム以降は BCA-SDS 法によって測定した値を採用した。S 抗原活性は Enzygnost で求めた値である。

BNC-M の精製過程の結果を表 6 にまとめた。酵酵母菌体 437.8g から最終的に 12.3 mg の BNC-M を精製することができた。S 抗原活性の回収率は 20.4%であり、BNC-S1 や BNC-S2 と比較して良好であった。なお、酵母菌体からの抽出液よりも透析後の方が S 抗原活は大きかつ

たため、回収率は透析後からの値で示した。

精製品溶液を 0.22 μ m フィルターで滅菌しタンパク質量を測定した。このタンパク質量に基づいて、滅菌 PBS と 50% ショ糖溶液を加え、タンパク質濃度 400 μ g/mL、ショ糖 1% に調製したものを凍結乾燥機 (LABCONCO) にかけて、乾燥したものを -20°C で保存した。

4.4. BNC-L2 の精製・精製品の保存

BNC-L2 の破碎から精製過程を、各項目毎に、操作順に従って示す。

破碎：

冷凍保存した酵母菌体 120.4 g に対し、細胞破碎抽出用バッファー [Buffer A (100 mM リン酸ナトリウム、15mM EDTA、7.5M 尿素) に 2mM PMSF と 0.1% Tween-80 を添加したもの] を加えて菌体を懸濁し、ビードビーター (Biospec Product Inc Model 1107900) の破碎容器に入れ、175ml のガラスビーズを加えて、氷冷下にて破碎した。破碎条件は 2 分間破碎と 2 分間冷却をワンクールとする操作を 5 回繰り返す、その後 1 分間破碎と 1 分間冷却をワンクールとする操作を 2 回繰り返した。破碎後上記抽出用バッファーでガラスビーズを洗浄し、破碎液に加えた。

透析：

破碎液を透析用セルロースチューブを用いて、外液 (1mM EDTA 含有 PBS) に対して攪拌しながら 4°C で一晩透析した。透析後の尿素濃度は尿素窒素 B テストワコー (和光純薬) を用いて 10 mg/mL 以下であることを確認した。

熱処理：

透析サンプルを 50ml のプラスチック遠心管に入れ、予め 70 °C にしておいた恒温槽で温浴させ、5 分に一回程度転倒混和しながら、20 分間熱処理した。熱処理後、遠心分離後(himac CR 22G, R12A3, 12000rpm, 30 分間、4°C)、上清を回収した。

硫酸セルファインカラムクロマトグラフィー：

得られた上清を 0.8 μ m のフィルターに通した後、10 mM リン酸緩衝液 pH 7.2 + 0.15 M NaCl で平衡化した硫酸化セルファインカラム(Chisso corp.) に吸着させ、図 15 に示すように平衡化したバッファーでカラムを洗浄後、0.5M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液にてステップワイズに溶出させた。溶出分画の内、S 抗原活性のあるものを集め、Amicon Ultra (NMWL 100K, Millipore)を用いて濃縮した。

ゲルろ過クロマトグラフィー：

濃縮したサンプルを 0.45 μ m のフィルター (MILLEX-HV #SLV033RS, Millipore) に通した後、PBS で平衡化したゲル濾過カラム (Sephacryl S-500 HR, GE ヘルスケア) で図 16 に示した条件で分画した。分画の内、S 抗原活性のあるものを集めた。

イオン交換カラムクロマトグラフィー：

得られた分画を 10mM HEPES バッファーで 2 倍希釈して Q Sepharose HP カラムにロードし、非吸着分画を洗浄した後、図 17 に示すような条件で NaCl 溶液にてリニアグラジエント溶出させ、その内、S 抗原活性のある分画を集めた。

バッファー交換：

得られた分画を Amicon Ultra (NMWL 100K, Millipore) により 2 mg/mL 以上になるまで濃縮し、PBS で平衡化したゲルろ過カラム (PD-10, GE ヘルスケア) にかけてバッファー交換を行った。なお、上記のカラムクロマトグラフィーは全て AKTA System (GE ヘルスケア) を用いて行い、

各フラクションの S 抗原活性は当社開発の S 抗原活性測定用 ELISA を利用して測定した。

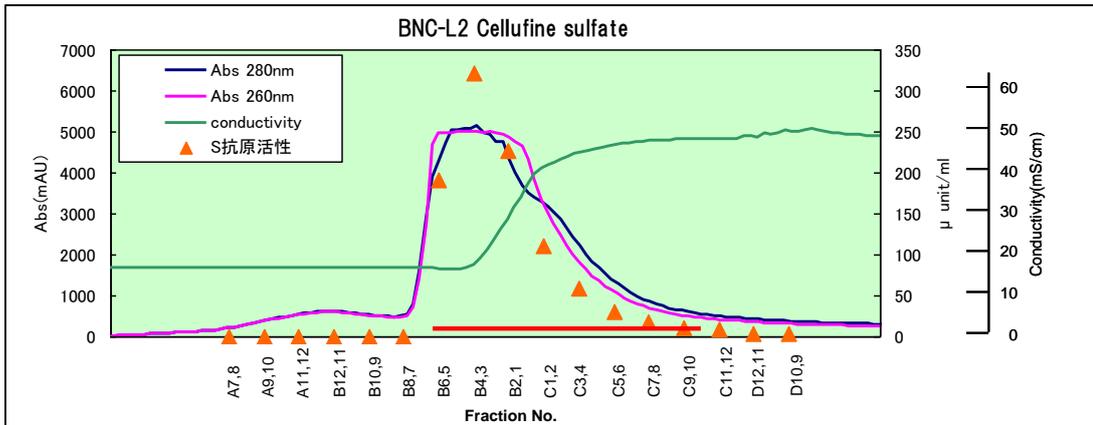


図 15. 硫酸化セルファインカラムクロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。

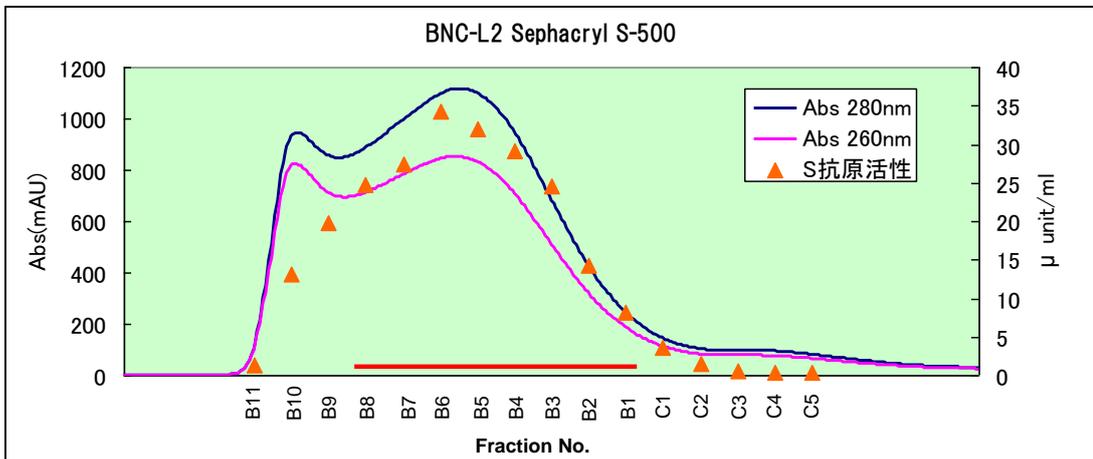


図 16. ゲルろ過カラムクロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。

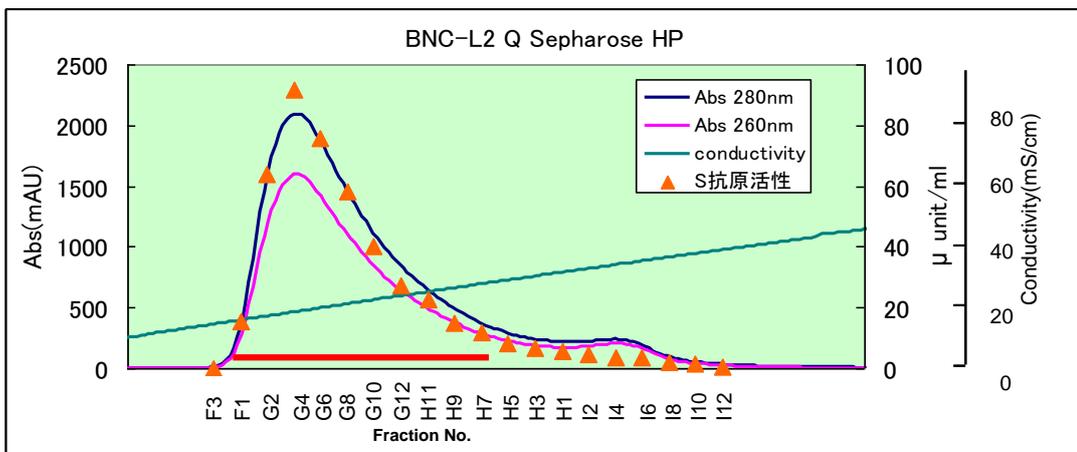


図 17. Q Sepharose HP カラムクロマトグラフィー
赤いバーは回収した分画を示す。

表 7. BNC-L2 の精製結果まとめ

	総タンパク質量 (mg)	総S抗原活性 (mUnit)	比活性 (μ Unit/mg)	回収率 (%)	備考
抽出液	5682.8	45.6	4.0	-	菌体120.4gから精製
透析後	5509.7	63.1	5.7	100.0	
熱処理後	872.8	49.6	28.4	78.5	
SCカラム後	96.6	36.3	188.1	57.6	
ゲルろ過後	54.2	24.4	225.0	38.7	
イオン交換後	49.7	20.4	205.3	32.3	
凍結乾燥前	47.0	18.4	195.5	29.1	

本精製表は全工程が終了後に、保存してあった各工程のサンプルを一度に測定して作成したものである。総タンパク質量は抽出液から熱処理までは BCA 法により測定し、SC カラム以降は BCA-SDS 法によって測定した値を採用した。S 抗原活性は Enzygnost で求めた値である。

BNC-L2 の精製過程の結果を表 7 にまとめた。菌体 120.4g からスタートして、47.0 mg の精製 BNC-L2 タンパク質を得た。S 抗原活性の回収率は 29% であり、精製した改良型 BNC の中で最も良好であった。なお、酵母菌体からの抽出液よりも透析後の方が S 抗原活性が大きかったため、回収率は透析後からの値で示した。

精製品溶液を 0.22 μ m フィルターで滅菌しタンパク質量を測定した。このタンパク質量に基づいて、滅菌 PBS と 50% ショ糖溶液を加え、タンパク質濃度 400 μ g/mL、ショ糖 1% に調製したものを凍結乾燥機 (LABCONCO) にかけて、乾燥したものを -20°C で保存した。

4.5. BNC-XT2 の酵素処理による調製

精製 BNC-L2 を出発材料として BNC-XT2 を作製した。以下にその手順を示す。

精製した BNC-L2 タンパク質を、トリプシン (Sequencing Grade Modified Trypsin Frozen, Promega) 溶液中で 37°C にて 1 時間反応させた。反応液を PBS にて平衡化したベンズアミジンカラム (GE ヘルスケア) でトリプシンを除去した。トリプシン除去後の溶液を Amicon Ultra-15 (NMWL 100K, Millipore) にて濃縮及び加水濃縮後、PBS で平衡化したゲルろ過カラム (Sephacryl 4 Fast Flow, GE ヘルスケア) で分画した。各分画を 282nm の吸収と SDS-PAGE (銀染色) により評価し、BNC-XT2 で構成される分画を回収した。回収した分画を 0.22 μ m フィルターを用いてろ過滅菌した後、タンパク定量し、それを 37°C で 3 日間インキュベートし BNC-XT2 とした。フィルター滅菌後のタンパク量に基づいて、滅菌 PBS と 50% ショ糖溶液を加え、タンパク質濃度 400 μ g/mL、ショ糖 1% に調製したものを凍結乾燥機 (LABCONCO) にかけて、乾燥したものを -20°C で保存した。

精製工程とその回収率を表 8 に示した。30 mg の BNC-L2 を材料として 14.6 mg の BNC-XT2 を製造できた。タンパク質の回収率 49% であり、トリプシンによる切断領域を考慮すると良好な結果であった。

各製造段階の試料を電気泳動解析した結果、BNC-L2 の約 45kDa のメインバンド (モノマー) は、トリプシン分解後に約 28kDa となった (図 18)。また、モノマー位置のバンドの濃さとダイマー (モノマーの約 2 倍の分子量を示す薄いバンド) 位置のバンドの濃さがトリプシン処理前後で平行的な変化をしていることから、BNC-L2 のモノマーとダイマータンパク質の両者ともに均等にトリプシンによる分解を受けていることが考えられる。なお、その後の製造工程で、タンパク質バンドに変化はなかった。

BNC-XT2 のトリプシン切断部位が予想通りであることを確認するために、製造した BNC-XT2 の N 末端配列をエドマン分解法で解析を行った (図 19)。その結果得られた配列は「Gly-Leu-

Tyr-Phe-Pro-Ala] であり、予想通り BNC-L2 の Pre-S2 領域の 18 番目のアミノ酸であるアルギニン部位で切断されていることが確認された。

表 8. BNC-XT2 製造工程と回収率

	タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
出発材料(BNC-L2)	30	100
トリプシン処理・除去→ ゲルろ過→フィルター滅菌	14.6	49

注：糖鎖修飾を無視したタンパク質の分子量を基にした理論値からは BNC-L2 からその一部を切断して BNC-XT2 を得る場合、100%回収は 67%に相当するので、表中の 49%回収は 73%の回収と考えることが出来る。

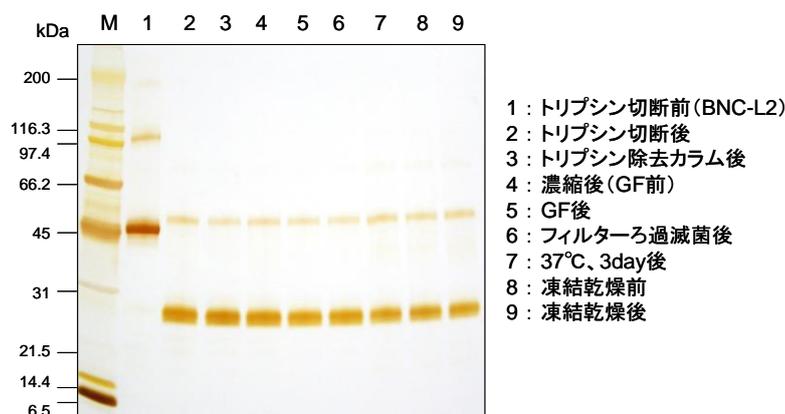


図 18. BNC-XT2 製造工程の各段階における電気泳動像

Gly-Leu-Tyr-Phe-Pro-Ala

図 19. BNC-XT2 の N 末アミノ酸解析結果
分析は岡山大学にて実施した。

5. 改良型 BNC の物理化学的基礎評価

精製した BNC が目的のものであり、期待通りの性質を示すことなどを確認するため、タンパク質濃度、SDS-PAGE 電気泳動後銀染色、ウェスタンブロッティング、ELISA による 3 種の抗原活性の測定、及び、純度について検討した。

5.1. タンパク質濃度

BNC は脂質粒子であるため、そのままタンパク定量を行っても脂質が発色反応を阻害することによって極めて低い不正確な値となる。このため脂質の影響を減じるために SDS と熱処理を加えた BCA-SDS 法により BNC のタンパク質濃度を測定した。即ち、各サンプルに 10%SDS を一定量加え(終濃度 4%)、95°C で 90 分加熱処理し、BCA Protein Assay Kit (Pierce) にてタンパク質濃度を測定した。得られた結果を表 9 に示した

表 9. 精製 BNC のタンパク質濃度

	タンパク質濃度 ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)		
BNC-S1	358.8	\pm	14.1
BNC-S2	429.9	\pm	15.8
BNC-M	392.6	\pm	6.1
BNC-L2	366.9	\pm	12.7
BNC-XT2	377.6	\pm	6.0

5.2. SDS-PAGE 銀染色

5 種の精製 BNC を還元剤含有 SDS-PAGE 用 Sample Buffer と混合・熱処理後、10%-20% リニアグラジエント SDS-PAGE 用ゲル(アトー, e-PAGEL, E-T1020L)で電気泳動した後、泳動後のゲルを Silverstain II Kit Wako (和光純薬工業社)を用いて銀染色した。結果を図 20 に示す。

何れの BNC も理論値と一致した分子量部位に銀染色バンドを示した。なお、BNC 毎に濃淡はあるものの、単量体の BNC タンパク質が会合したダイマー若しくはテトラマーと思われるバンドも認められた。この現象は他の BNC でも観察されるものである。

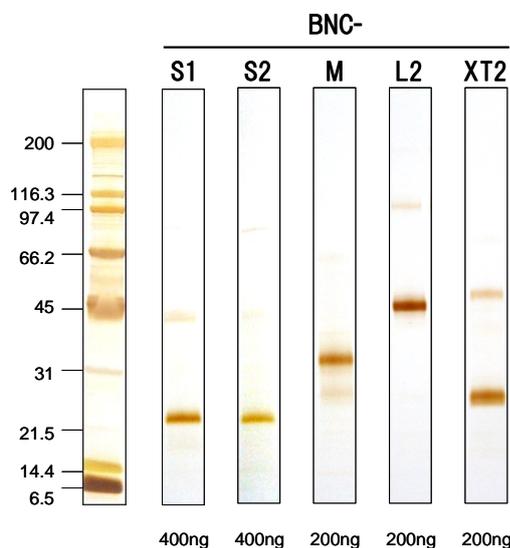


図 20. 製造した 5 種の BNC の電気泳動 (銀染色) 結果

5.3. ウェスタンブロッティングによる S、Pre-S2、及び Pre-S1 ドメインの確認

得られた 5 種の BNC について、S、Pre-S2、及び Pre-S1 ドメインに対する抗体、即ち、抗 S 抗体、抗 Pre-S2 抗体、抗 Pre-S1 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い適切なドメインが発現していることを確認した (図 21)。

BNC-S1 と BNC-S2 は 20 kDa より僅かに大きい所に抗 S 抗体による染色バンドが見られ、このバンドは銀染色した場合のメインバンドと一致した。また、銀染色像と一致してダイマーと思われる位置にも薄い染色像が見られた。これらの BNC では抗 Pre-S1 及び抗 Pre-S2 抗体による染色は認められなかった。BNC-M では、抗 S 抗体と抗 Pre-S2 抗体により銀染色像と一致してモノマーのメインバンド及びダイマーと思われる位置に染色バンドが見られ、抗 Pre-S1 抗体では染色は全く観察されなかった。BNC-L2 では抗 S、抗 Pre-S1、及び抗 Pre-S2 抗体の何れによっても L タンパク質のモノマー及びダイマーの位置に染色像が認められた。BNC-XT2 ではモノマー及びダイマーと思われる位置に抗 S 抗原抗体による染色が観察された。

以上、各 BNC は適切に各ドメインを保有していることが分かった。

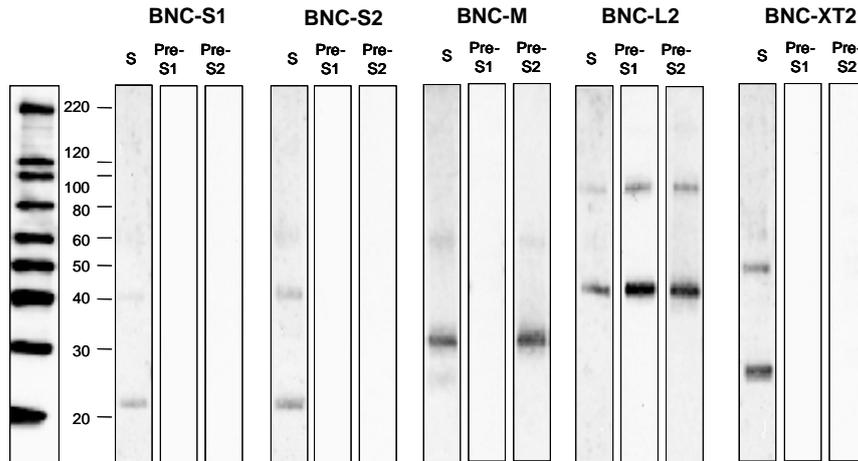


図 21. 各種抗体を用いたウェスタンブロッティング

S:抗 S 抗体、Pre-S1:抗 Pre-S1 抗体、Pre-S2:抗 Pre-S2 抗体。注：多くの抗 S 抗体を用いたレーンにおいて 60 kDa 付近に不明瞭な染色像が見えるが、陰性対照レーンでも認められたため、非特異的な染色と考えられる。

5.4. ELISA による S、Pre-S2、及び Pre-S1 ドメインの確認

S 抗原力価の測定には当社開発の S-ELISA を用いて測定した。検量線には BNC-XT を利用した。Pre-S2 抗原力価の測定には新たに開発した Pre-S2 測定用のサンドイッチ ELISA 法にて測定した。検量線には BNC-L を利用した。Pre-S 1 抗原力価の測定には自社で開発した Pre-S 1 測定用のサンドイッチ ELISA 法にて測定した。検量線には BNC-L を利用した。これらの測定精度は下図に示すように良好であった。

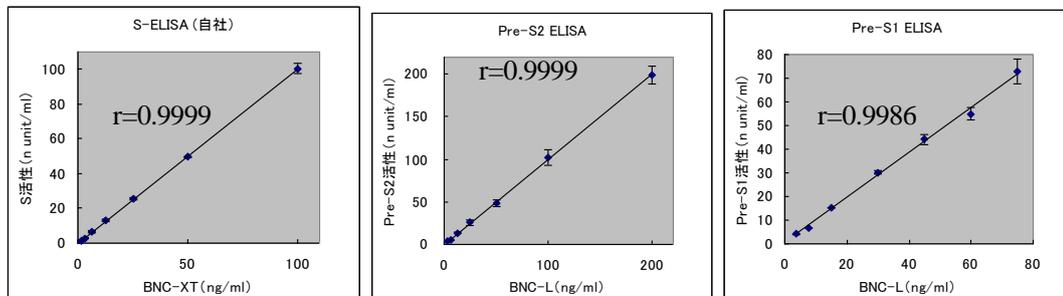


図 22. 各 ELISA 系の測定精度の確認結果

製造した 5 種の BNC の S、Pre-S1、Pre-S2 活性を測定した結果を図 23 に、その結果から比活性を求めたものを表 10 に示す。

ELISA S で測定したそれぞれの活性値は、対応する 3 種のドメインが機能を有した構造を持って BNC に発現している状態を示すと考えられる。S 領域のみで構成される BNC-S1 と BNC-S2 は S 抗原活性のみを示し、これらが S 領域で構成され、他の領域を有していないことを意味する。但し、両者の間では大きな活性の違いがあり、BNC-S2 では BNC-S1 の 1/250 程度の活性を示したに過ぎなかった。この値は他の S 領域を有する BNC より遥かに小さく BNC-S2 が特異な性質を有していることを示唆する。Pre-S2 領域を含む BNC-M や BNC-L2 では Pre-S2 活性も示し、更に、これに加えて Pre-S1 領域を有する BNC-L2 は Pre-S1 活性を示した。なお、BNC-L2 を酵素的に処理した BNC-XT2 は Pre-S2 領域を一部有していることから Pre-S2 活性を

示した。なお、本 BNC では極めて弱い Pre-S1 活性も見られるため未切断の BNC-L2 が若干残っている可能性が否定できない。

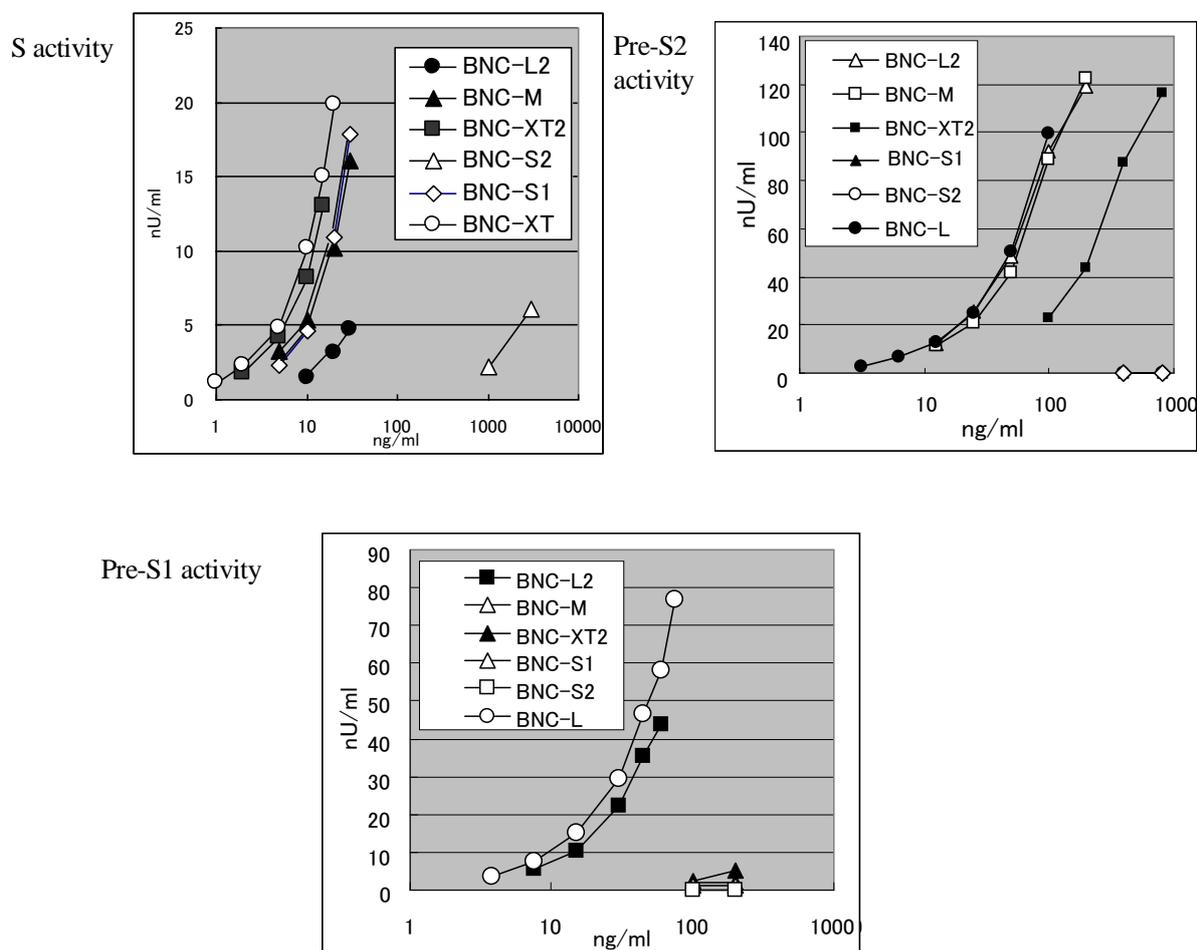


図 23. 各 ELISA を用いた検討結果

表 10. 各 ELISA から得られた比活性のまとめ

	比活性 (μ unit/mg)		
	S	Pre-S2	Pre-S1
BNC-S1	535.7	<3.90	<18.8
BNC-S2	2.1	<3.90	<18.8
BNC-M	525.2	855.0	<18.8
BNC-L2	156.1	970.7	750.8
BNC-XT2	846.5	222.6	26.8
BNC-L	-	997.4	1008.4
BNC-XT	1003.8	-	-

5.5. キャピラリー電気泳動による純度測定

タンパク質用キャピラリー電気泳動装置 (PA800 plus、Beckman-Coulter) を用いて純度測定を行った。

分子量マーカーとしては BNC-L と BNC-XT を用いた。純度は、構成成分毎に下式によって相対面積を計算し、その合計を各 BNC の純度とした。

相対面積(%)=陽性判定されたピークの面積/総ピーク面積×100

得られた結果は、BNC 毎に移動度からモノマーピーク、ダイマーピーク、その他のピークに分類された。各 BNC について得られた泳動像を図 24 に、結果のまとめを表 11 に示す。

図 24 に示したように、BNC-L2 と BNC-XT2 のキャピラリー電気泳動像のメインピークは 2 つに分離していた。また、BNC-L でもショルダーが存在することが分かった。BNC-L では、主としてマンノースとグルコサミンの 2 種の糖鎖による修飾があることが分かっており、BNC-M も同じ糖鎖が観察され、糖鎖修飾の違いにより、37kDa と 34kDa タンパク質が存在するとされている。従って、BNC-L2 (BNC-XT2 も含む) や BNC-L も糖鎖修飾による違いがショルダーの出現となって現れていると考えられる。なお、BNC-M ではショルダーは見られなかったが、メインピークの幅が広いことから 2 種のピークが重なっている可能性がある。また、BNC-S2 を除く BNC ではダイマーと思われるピークが明らかに認められ、それらはウェスタンブロッティングで陽性のためこれらを含めたものを純度と見なした。また、BNC-M については、ウェスタンブロッティングで抗 S 抗原抗体に陽性の 28kDa 付近のバンドが本解析の X1、X2 ピークに相当すると判断し、BNC-M として純度に組み入れた。

以上の結果、BNC-S2 (75.8%) を除き、93~97%の純度を示した。なお、対照である BNC-L と BNC-XT は 96%前後の値を示した。

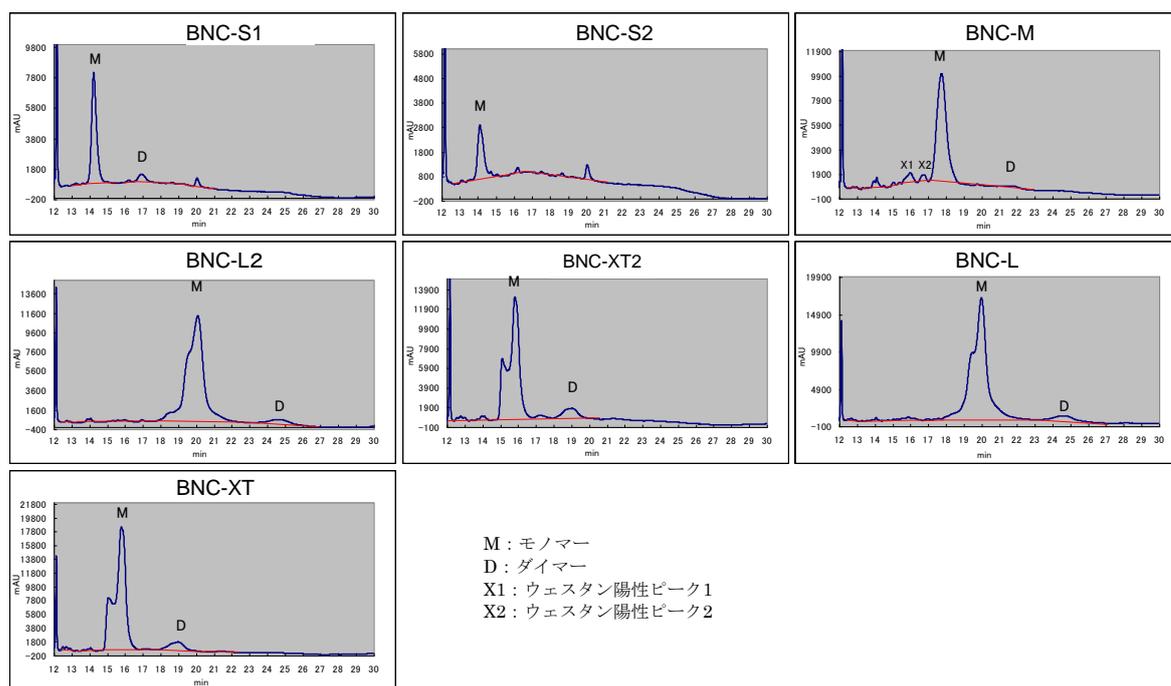


図 24. キャピラリー電気泳動結果

基線の変動があったため、図中の赤線を基線として総面積と各ピーク面積を求めた。

表 11. キャピラリー電気泳動による純度測定結果

抗原	純度(%)	構成成分(%)			
		モノマー*	ダイマー	X1**	X2**
BNC-S1	93.3	84.7	8.7	-	-
BNC-S2	75.8	75.8	-	-	-
BNC-M	93.7	83.1	2.3	5.4	2.9
BNC-L2	97.1	91.2	5.9	-	-
BNC-XT2	94.8	85.9	8.9	-	-
BNC-L	96.3	90.7	5.6	-	-
BNC-XT	96.0	87.3	8.7	-	-

*：モノマーに相当するメインピークとそのショルダー部分の面積

**：X1 と X2 は BNC-M のウェスタンブロッティングで観察されたモノマーより分子量が僅かに小さい陽性のバンドがこれらのピークに相当すると判断し、BNC-M のタンパク質として取り扱った。

6. 改良型 BNC の内包量推定に関する評価

BNC の内包量を推定する評価方法として粒子径、脂質含量を測定すると共に、直接的に内包タンパク質を定量する手法についても検討した。

6.1. 粒子径

5 種の BNC 溶液を 40 μ g/mL に PBS で希釈し、ゼータサイザー (Malvern 社製, Nano-ZS) にて動的光散乱法により粒子径を測定した。対照として BNC-L、BNC-XT を用いた。得られた粒度分布図を図 25 に、平均粒子径を表 12 に示す。

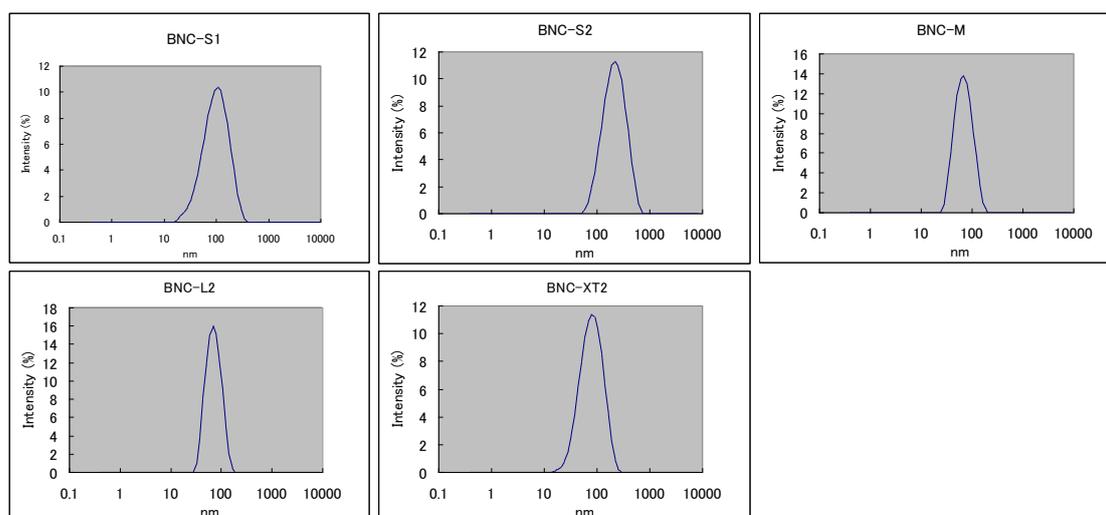


図 25. . 各精製 BNC の粒度分布

表 12. 粒子径測定値

	平均粒子径 (nm)	Pdl
BNC-S1	83.6	0.219
BNC-S2	189.8	0.192
BNC-M	62.5	0.129
BNC-L2	65.6	0.109
BNC-XT2	69.5	0.182
BNC-L	59.7	0.144
BNC-XT	58.9	0.209

Pdl(Polydispersity Index): 粒子径の分散を示す指数

BNC-M、BNC-L2、BNC-XT2 は 60~70 nm の平均粒子径を示し、対照として測定した BNC-

L、BNC-XT の粒子径とほぼ同等の値を示した。BNC-S2 の平均粒子径は BNC-M、BNC-L2、BNC-XT2 と比較して約 3 倍の約 190nm であった。BNC-S1 の粒子径は 84 nm であり、BNC-S2 よりは遥かに小さいものの、BNC-M、BNC-L2、BNC-XT2 より僅かに大きかった。なお、PdI は何れも 0.2 前後或いは以下であり、粒子径の分布が均一であることを示している。

6.2. リン脂質

5 種の BNC 溶液についてリン脂質 C-テストキットワコー（和光純薬）を用いてホスファチジルコリンを定量した。なお、対照として、BNC-L を用いた。結果を表 13 に示す。

リン脂質含量は BNC-S2 において非常に高く、次いで BNC-S1 で多少高い値を示した。他の BNC では約 200 μ g/mg 前後の脂質含量を示した。なお、対照として用いた BNC-L の脂質含量は過去の測定データとほぼ一致した。

表 13. リン脂質定量結果

	リン脂質含量 (μ g/mg)
BNC-S1	252.6
BNC-S2	310.1
BNC-M	209.4
BNC-L2	208.8
BNC-XT2	224.8
BNC-L	178.6

6.3. 内包タンパク質の分析方法の開発（岡山大学）

内包タンパク質を直接測定し、内包量を求めることは重要な試験方法である。そこで、2 種の方法、即ち、ペプチドシーケンサー法と質量分析法によって内包タンパク質を測定する方法を検討した。

質量分析法は、BNC 粒子を構成する BNC タンパク質と BNC に内包された EGFP を変性・可溶化させ、質量分析機を用いて両者を直接定量する方法であるが、未だ、可溶化等前処理条件の設定が難しくまだ定量には至っていない。

ペプチドシーケンサー法は BNC タンパク質と BNC に内包された EGFP を N 末端解析したが、検出感度が低いためか、BNC タンパク質は検出されるものの、EGFP の検出・定量には至っていない。今後、内包量が大きく増加した粒子を用いることで検出が可能となると思われる。

6.4. 内包量に関する考察

粒子径は直径を示すため、これを各粒子が均一の球体を形成していると仮定し、体積比を求めると、BNC-L を 1 とした場合、BNC-S1 で約 3 倍、BNC-S2 では約 32 倍に増加していることが想定された（表 14）。なお、リン脂質含量は粒子径の大きいものほど高い傾向を示しており、BNC の脂質部分が增大した大型の粒子を形成しているとの想定と一致する。

以上の様に、BNC-S1 では多少大きなものが、BNC-S2 では極めて大きな粒子径のものが製造できた。粒子形を大きくするために、前者では S 領域に 1 変異、後者では 16 変異を挿入したが、1 変異では体積的には凡そ 3 倍、16 変異では 32 倍に増加した。16 変異入れたものでは粒子径が 180nm を超えており、DDS 用に利用する上限粒子径の目安である 150nm を超えた。一方、1 変異入れた BNC-S1 では体積と内包量がパラレルな関係があるとすれば、約 3 倍に内包量が増えることとなる。理論的には 1 つの BNC には約 100 個の表面タンパク質が発現しているため、総てのタンパク質に内包目的のタンパク質が結合するとすれば、凡そ 100 個のタンパク質分子

を内包できることとなる。先に行った実験では内包されたタンパク質分子は凡そ 13 個であるのでこの 7.5 倍程度のタンパク質を内包できると考えることが出来る。

体積のみが内包量を決定する訳ではないと思われるが、仮にそうした前提で考えた場合、1 変異より多く、16 変異より少ない変異を挿入し、体積的に 7.5 倍程度のものを作るとすれば、計算上、粒子径は 118nm 程度の大きさに収まるため、DDS 用にも充分理想的な粒子径ということが出来る。

表 14. 粒子径から推定した内包可能体積

	体積比
BNC-S1	2.75
BNC-S2	32.13
BNC-M	1.15
BNC-L2	1.33
BNC-XT2	1.58
BNC-L	1.00
BNC-XT	0.96

7. 改良型 BNC の導入能に関する評価

7.1. 評価方法

BNC を用いた核酸や低分子化合物の細胞質内への移行のメカニズムから判断し、タンパク質内包 BNC が細胞質内へタンパク質を導入する機構は、先ず、エンドサイトーシスによってタンパク質内包 BNC 自体が細胞内へ取り込まれ、その後、エンドゾームよりタンパク質が脱出することで細胞質内へタンパク質が導入されると考えられる。なお、BNC の有するウイルス機能は、エンドゾームより脱出する際に働くと考えられる。

これらのことから、改良 BNC の細胞内への導入能の評価は、蛍光標識した BNC の細胞内への取り込みを見ることによって評価した。方法は以下の通りである。

先ず製造した改良 BNC を蛍光色素 (Dil) にて蛍光標識した。即ち、タンパク質量として 200 μ g の各 BNC を Dil で標識し、その後、ゲルろ過カラムにて標識 BNC のみを回収、回収タンパク質量と標識量を測定した。蛍光色素の標識量は表 15 に示すように BNC 毎に大きく異なったため、この数値を考慮して検討した。

蛍光標識した BNC を BNC の標的であるヒト肝細胞由来の HEP-G2 細胞に適用し、蛍光の取り込みを蛍光顕微鏡で観察することによって評価した

表 15. 導入実験に用いた標識改良 BNC の蛍光値

	蛍光値	
	測定値	相対比
BNC-S1	132.6	0.25
BNC-S2	178.1	0.35
BNC-M	349.6	0.51
BNC-L2	375.3	0.53
BNC-XT2	375.8	0.57
BNC-L	600.3	1.00

7.2. 導入能の評価結果

各標識 BNC は種類毎に 2.5、5、10、20 μ g/ml の濃度で適用し、適用後 12 時間後に除去して細胞内へ取り込まれた BNC を観察した。図 26~27 に撮影した写真を示す。各写真でオレンジ

ジ色に光って見えるのは BNC が取り込まれた細胞を示しており、光が強いほど、光る面積が大きいほど、多くの BNC が取り込まれたことを示す。何れの BNC でも適用濃度に依存して細胞の蛍光強度が強くなっていることが分かる。

BNC 種の導入能を、オリジナルの BNC である BNC-L を基準に、各改良 BNC の蛍光強度を目視にて光具合を比較することによって判別した。以下にその結果を述べる。

1. BNC-S1 と S2 の導入能は BNC-L の少なくとも 4 倍程度上昇
2. BNC-M の導入能は BNC-L の 1/2 以下に低下
3. BNC-L2 の導入能は BNC-L とほぼ同じ
4. BNC-XT2 の導入能は BNC-L の 2~4 倍に上昇

以上の観察結果をまとめると次の様な結論が導き出せる。即ち、PreS 領域削除の効果としては①PreS1 のみの欠失では導入能が減少する (BNC-M)、②PreS1 と PreS2 の約半分を欠失させると導入能が上昇する (BNC-XT2)、③PreS1 と PreS2 の両方を欠失させると導入能が上昇する (BNC-S1, S2)。また、S 領域改変の効果としては、S 領域を 16 変異させた BNC-S2 と 1 変異の BNC-S1 の導入能はほぼ同じであり、S 領域の改変は細胞内導入能に関しては殆ど効果がない。

導入能の推定値をまとめると表 16 のようになる。即ち、PreS 領域の削除による効果が顕著であり、PreS 領域を全て削除した BNC-S1, S2 の導入能が最も高く、凡そ 4 倍まで上昇した。

表 16. 導入能観察結果のまとめ

種類	BNC-Lを基準とした相対導入納
BNC-S1	4
BNC-S2	4
BNC-XT2	2~4
BNC-L	1
BNC-L2	1
BNC-M	1/2以下

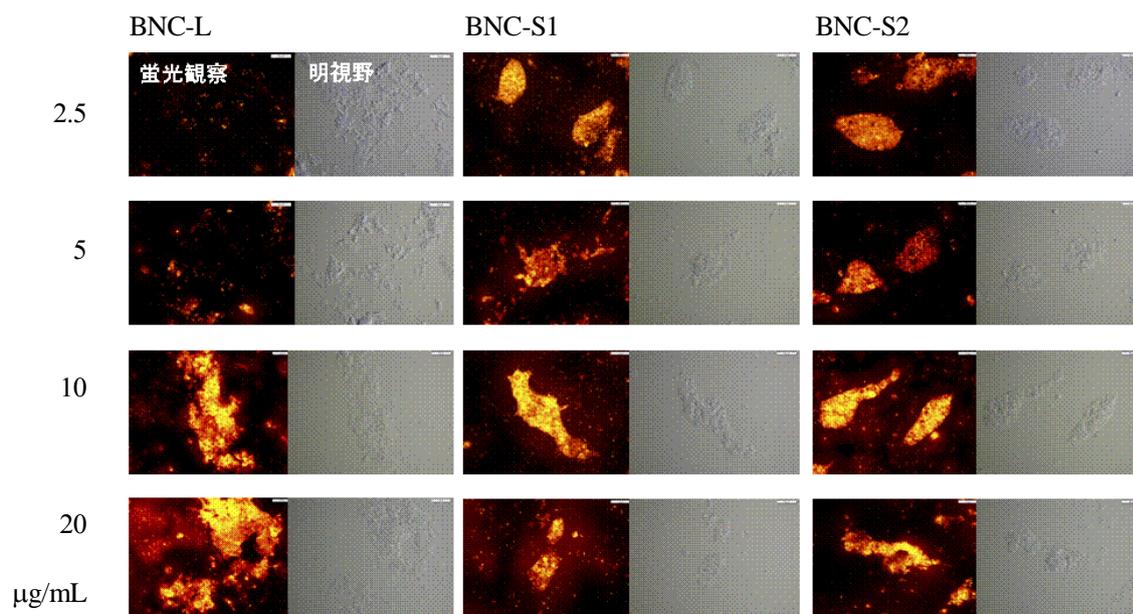


図 26 蛍光標識した改良 BNC の細胞内への取り込み－1
 図の左の数値は細胞へ適用した BNC の濃度を示す。

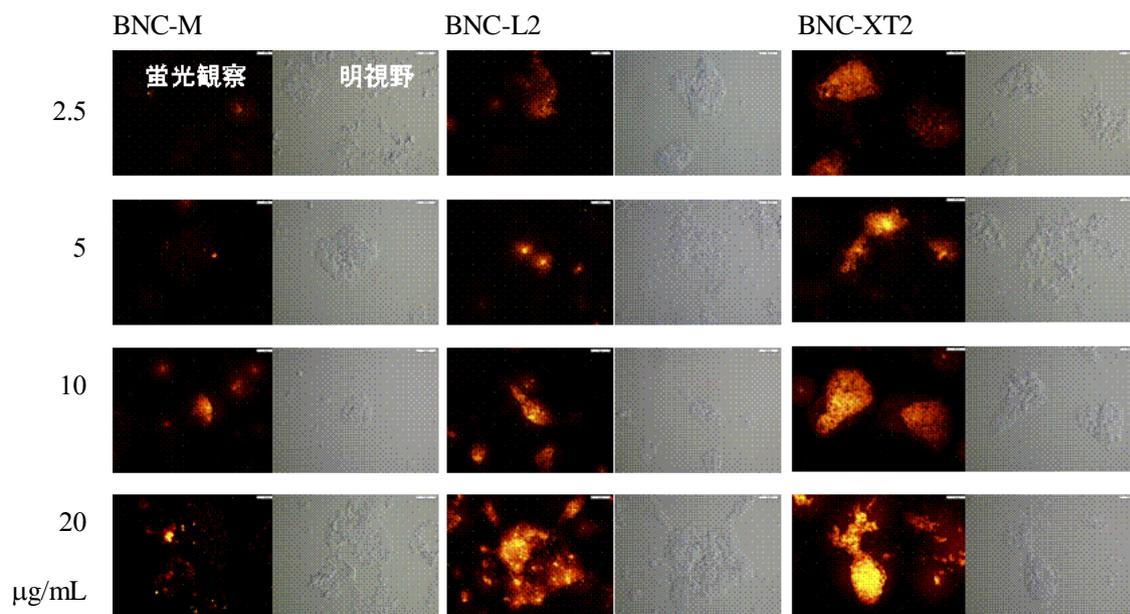


図 27 蛍光標識した改良 BNC の細胞内への取り込み－2
 図の左の数値は細胞へ適用した BNC の濃度を示す。

8. 新型の抗体結合型 BNC の抗体結合能の評価

新型の抗体結合型の BNC-BB は製造することが出来なかった。本事業期間中には来るべき新型の抗体結合型 BNC の製造に備えて、現有の抗体結合型 BNC を用いて評価系の確立を行った。

評価には QCM (Quartz Crystal Microbalance : 水晶天秤) を用いた。本装置は図 28 に示すように水晶発振子上に分析対象のタンパク質(今回は BNC-ZZ)を結合させ、その後、結合させる物質 (今回は抗体) が結合すると質量が増加するため、水晶発振子の振動周波数が減少すると

いう現象を利用して測定するものである。

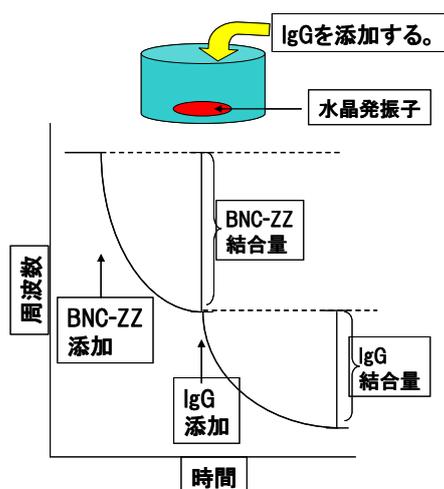


図 28 QCM による測定法

図 28 に示すように、単独では高い周波数で振動していた発振子は BNC-ZZ が結合すると周波数が低くなり、一定の周波数で安定する。ここに BNC-ZZ に抗体を添加し、抗体が BNC-ZZ と結合すると更に周波数は低下する。この周波数の低下と質量とは一定の関係があることが分かっているので、周波数の低下量から結合した抗体量を測定することが出来る。

BNC-ZZ に対する抗体の結合能を調べるため、ヒト全 IgG、ウサギ全 IgG、マウス全 IgG、マウス IgG1、ヤギ全 IgG、ラット全 IgG と用いて検討した所、図 29 に示すように、結合が良いことがわかっているヒトやウサギ及びマウス全 IgG では高い結合を示したものの、結合が悪いマウス IgG1、ヤギ全 IgG、ラット全 IgG では低い値を示した。今回の実験から IgG/BNC-ZZ のモル比が約 0.02 以下の場合には結合が明らかに弱いと結論されると思われた。

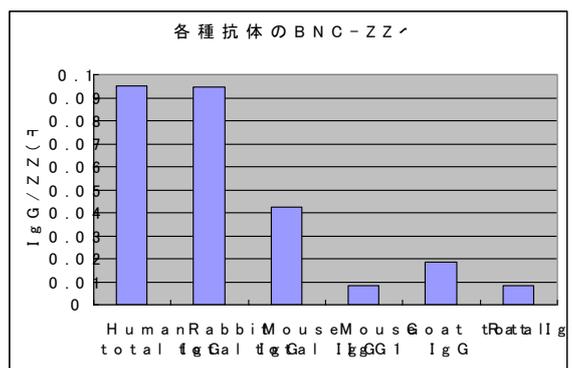


図 29. QCM を用いた BNC-ZZ の各種抗体結合能

第三章 全体総括

タンパク質内包バイオナノカプセル (BNC) の細胞内導入能向上、タンパク質内包量増加、更に幅広い抗体との結合能を有したものを製造することを目標に、具体的には、pre-S1 領域の全部又は一部を削除した BNC 4 種、S 領域に変異を加えた 5 種、そして Pre-S 領域に抗体結合部位を挿入したもの 1 種、延べで 10 種 (合計 6 種) の改変 BNC の製造を行い、それぞれについて評価を行うことを目標に試験を開始した。

目標とした 6 種の内、Pre-S 領域に抗体結合部位を挿入したもの 1 種については形質転換酵母が得られず、ベクターの設計を変えて検討を続けている他は、目標とする BNC の製造に成功した。導入能を高めるため Pre-S 領域の改変体を製造した結果、Pre-S1 領域のみを欠失した場合には導入能は低下したが、Pre-S1 領域と Pre-S2 領域を欠失させると導入能は高まることが分かり、最大で 4 倍程度の上昇が見られた。内包量を増やすため S 領域を改変した場合、BNC の粒子径が大きくなり、変異を 1 つ入れた場合には体積として約 3 倍、16 入れた場合は約 30 倍へ体積の増加が見られた。なお、理論的にも利用法の観点からも、粒子径で 110 程度が理想的であると考えられた。

新型の抗体結合型 BNC の開発は今回達成できなかったが、抗体結合能を確認する簡便な評価法を確立した。

以上、今回の成果を、実際に利用する際、導入能の増大と内包量の増大はそれぞれ、4 倍、3 倍程度であったが、BNC-S1 では両方の効果が見られているため、導入量としては 12 倍の増大が見られる可能性があり、今回の実験の成果を実際に確認する価値が大きいと思われる。

今回の試験で BNC-S1 では内包量増大と導入能増大によって導入量が 12 倍程度に増大する可能性を見出した。また、内包量に関しては S 領域への変異数を例えば 4 程度に抑えることで、理想的な内包量を有した BNC が製造できる可能性が見出された。今後、これらの結果を踏まえて、実際にタンパク質内包 BNC を製造し、その成果を明らかにしてゆきたい。

一方、BNC-BB は製造未完のため、引き続き補完研究等で検討を進める予定である。

その他、本タンパク質内包 BNC の新しい応用方法に関する検討も行いたい。