

ノロウイルス VLP の精製及びSEC-MALS 分析

● 緒言

遺伝子治療薬、ウイルスベクター、新規ワクチン、ドラッグデリバリー等の各分野において「バイオナノ粒子」の応用研究は急拡大しており、昨今最も注目される新モダリティ領域である。これらのバイオプロセスによる生産や品質評価においては、その複雑な構造や特異なサイズ等から、既存バイオ医薬品に比べてもより一層多面的な分析手法の集約が求められる。

代表的なバイオナノ粒子である「ウイルス様粒子」(virus like particle; VLP) は、特にワクチンへの応用において、感染性・増殖性を持たず、かつ本来のウイルスのサイズ・形態を再現することで効果的に免疫応答を惹起することができる優れたプラットフォームとして、実用化・研究開発が進んでいる。本稿では、ノロウイルス表層タンパク質由来 VLP (NVLP) のクロマトグラフィ精製メソッド開発を一例とし、バイオナノ粒子領域におけるサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) 分析の有用性やカラム選択のポイント、他の分析手法との組み合わせによる効果的なメソッド開発の評価等について紹介する。

● NVLP 粗抽出物からの精製と解析

1. CIM® モノリスアニオン交換カラムを用いた NVLP粗抽出物からの精製

カイコバキュロウイルス系によりノロウイルス GII-4 の表層タンパク質である VP1 タンパク質 (59 kDa) を発現させ、得られたカイコ個体を磨砕、超音波処理にて抽出した後、遠心し、その上清を 0.8 µm のフィルタにて濾過し、NVLP 粗抽出物を取得した。

精製には、バイオナノ粒子に対し高い分離能と結合容量を有し、低圧・高流速運用が可能で知られる CIM® モノリス陰イオン交換カラム (BIA セパレーションズ社製) を用いた。その結果を図1に示す。カラムに結合せずに溶出したフロースルー画分 (FT)、およびステップグラジエントによる各塩濃度条件で溶出回収した各画分 (Frc 1, 2, 3) を、以下に示す手法で解析した。

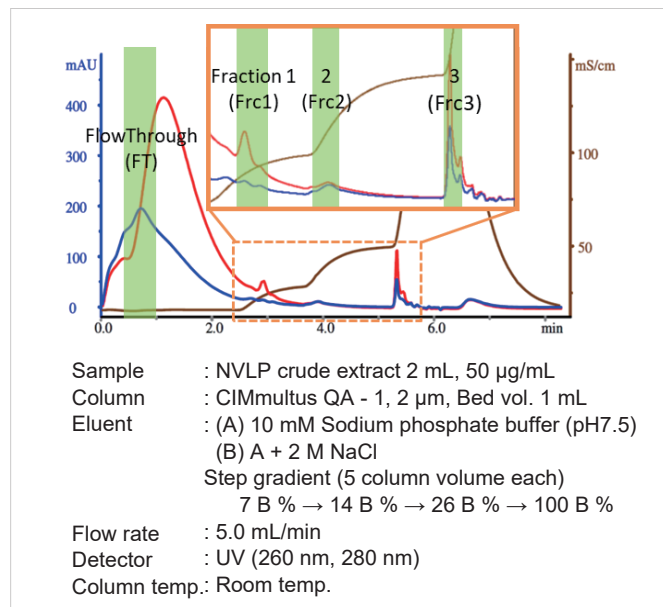


図1. NVLP 粗抽出物精製の UV クロマトグラム

2. 各精製画分の SDS-PAGE 解析

1. で得られた NVLP 粗抽出物、及び各精製画分を少量分取し、還元煮沸処理後、SDS-PAGE により解析した。その結果を図2に示す。crude には NVLP を構成する VP1 タンパク質と推定されるバンド (59 kDa、橙矢印) が検出された。26 % B (第二ステップ) の塩濃度で溶出した画分 (Frc2) にも、同位置にほぼ単一のバンドが検出された。一方、FT 画分には VP1 タンパク質 (推定) 以外のバンドが検出された。これより、CIM®モノリス陰イオン交換カラムに NVLP 粗抽出画分をロードした際、大部分の不純物はカラムに結合せずに溶出されるが、NVLP はリークすることなくカラムに結合し、26 % B の塩濃度条件で溶出し、回収できることが確認された。また、100 % B (第三ステップ) の最も高い塩濃度で溶出した画分 (Frc3) は、クロマトグラム上では強い UV 吸収が検出されているにもかかわらず、SDS-PAGE では顕著なバンドが見られないことから、粗抽出物中に含まれるタンパク質以外の不純物、例えば宿主ゲノム由来の DNA 等を主成分とすることが推測された。

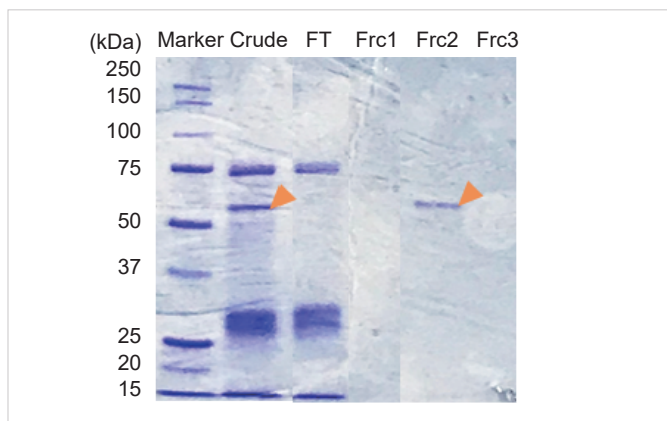


図2. NVLP 粗抽出物、及び各精製画分の SDS-PAGE

3. 各精製画分の SEC-MALS 解析

1. 得られた NVLP 粗抽出物、及び各精製画分を SEC-MALS により解析した。カラムは Shodex® OHPak® SB-805 HQ を、LS 検出器は Wyatt 社の DAWN8+ (国内輸入元 昭光サイエンス (株)) を用いた。その結果を図 3 に示す。SDS-PAGE では NVLP を構成する VP1 タンパク質がほぼ単一バンドとして検出されたが、Frc2 の UV クロマトグラム (図 3 (a) : 茶、(b) : 緑) では、8 min 付近にメインピークが検出されたほか、さらに 9.5 min、10.5 min 付近にもピークが検出された。一方、MALS クロマトグラム (図 3 (b) : 赤) では、UV メインピークである 8 min 付近にのみ、明瞭なピークが検出された。MALS における光散乱強度は、対象分子サイズが大きい程、顕著に高くなるという特徴があり、特に VLP のようなナノ粒子に対してはこのように明瞭なレスポンスを示す。8 min 付近の散乱光より得られる rms 半径値は約 22 nm と、正常に構成された NVLP から期待される粒子サイズとも概ね近い値が得られた。このように MALS は、UV のみでは識別の難しい、バイオナノ粒子のピークの帰属・追跡に有力なツールとなる。またサブピークに対応するタンパク質性成分は SDS-PAGE ではほぼ認められていないことから、おもにタンパク質以外の成分、例えば宿主由来のゲノム核酸断片等に由来することが推測された。

また Frc3 の SEC クロマトグラム (図 3 (a) : 緑) からも見取れる通り、この精製画分にも SDS-PAGE では著明なタンパク質成分は認められない一方、SEC のクロマトグラム上では、目的 NVLP の分子サイズの前後にも広く UV 吸収が分布しており、これらも同様に核酸断片等に由来すること、また粗抽出物中のナノスケール成分は必ずしも NVLP のみではないことが推測された。

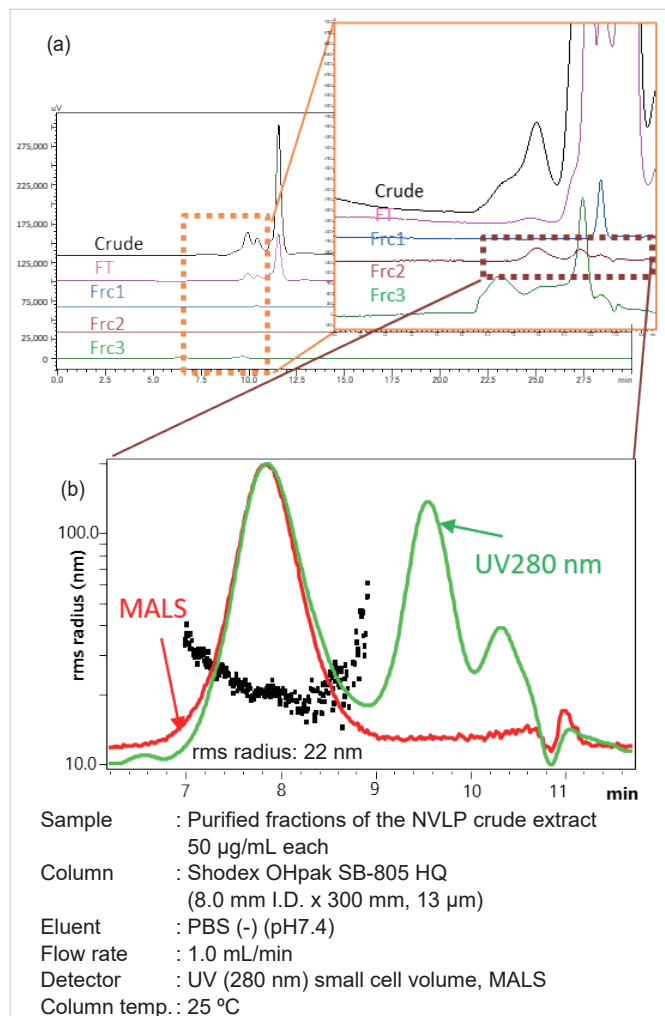


図3. NVLP 粗抽出物、及び各精製画分の SEC-MALS 解析

4. 精製画分 Frc 2 の電子顕微鏡観察

NVLP 粗抽出物の精製画分 (Frc 2) を支持膜貼付メッシュに附着させ、ネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。その結果を図 4 に示す。MALS による推定半径約 22 nm とよく一致する、直径約 40 nm 前後の粒子状の像が認められ、NVLP が、期待されるウイルス様粒子として高次構造を良好に保ったまま精製できていることが確認された。

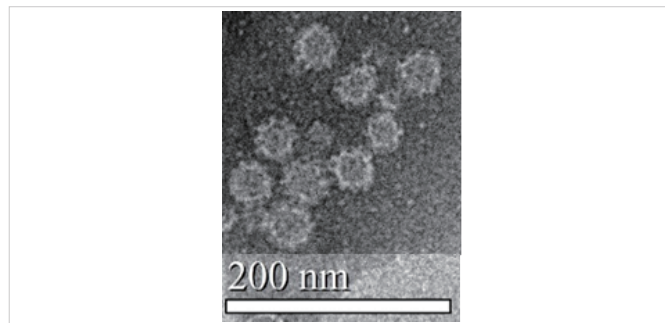


図4. NVLP 粗抽出物の精製画分 Frc 2 の TEM 観察

5. SEC-MALS の有用性について

バイオナノ粒子の精製メソッド開発においては、精製過程におけるターゲットの追跡が煩雑である点が課題となる。ナノスケールの対象は光学顕微鏡等では観察できず、またタンパク質等を主成分とすることから、通常用いられる UV 検出では多様な培養由来不純物との識別が困難である。他方、タンパク質性ターゲットを選択的に検出する ELISA 法や、TEM による観察、超遠心分析 (AUC) など、作業性や所要時間・コスト・定量性等それぞれ課題がある。

本事例では、SEC-MALS の導入により、簡便なクロマトグラフィのみで短時間でナノターゲットの追跡が可能となることを示した。また SDS-PAGE の結果との組み合わせにより、各画分におけるターゲットの存在を特定するだけでなく、精製メソッド改良への打ち手に貴重な示唆を与える不純物成分についての知見も得ることができる。今回の目的物溶出画分における低分子側 UV ピーク成分は、宿主ゲノム由来核酸等を主成分とすることが推定され、核酸をターゲットとした工程改良、例えばさらに精細なグラジエントによる分画の検討、ヌクレアーゼ処理による核酸成分の低減などが、次の有力な改良点となると考えられる。

6. 分析 SEC カラムの選択について

従来、バイオ分野において、SEC (サイズ排除クロマトグラフィ) は、その通称のとおり、実験室的には、主にターゲットのサイズ排除による分取に用いられてきた。数十～数百 nm のサイズを持つバイオナノ粒子が、培養液や試料溶液中のタンパク質等の主要な宿主由来・培養成分由来不純物に比べ比較的大きいことから、目的粒子をクロマトの最前端に排除溶出させて分別精製することを期待する手法である。

一方、本事例にも示唆されるとおり、実際の精製初期の試料には、ゲノム由来核酸や、そのタンパク質とのコンプレックス等、目的とするバイオナノ粒子と同等ないしはさらに大きいサイズの不純物も著量含まれることが通常に見られる。こうした成分を含む精製工程の効果を適切に把握することを目的とする分析 SEC においては、高分子量成分を排除する機能だけでは不十分であり、バイオナノ粒子の前後のサイズ領域も十分にカバーする分画分子量範囲を持つ分析 SEC カラムの選択が求められる。異なる分画分子量域を持つ SEC カラムによる、前記 NVLP 粗抽出物の分析比較を図5 に示した。カラムAは、対象とする分画分子量範囲が小さすぎることにより、ターゲットとする VLP のサイズをカバーしきれず、ターゲットそのものが一部排除溶出している一例であり、目的ピークの定量性を損なうほか、サイズの大きい不純物成分の存在も適切に把握することができない。

一方、カラム B は、対象分画分子量の範囲が大きすぎることにより、目的 VLP 前後の分解能が不足し、低分子側の主要不純物ピークとの分離が得られていない。

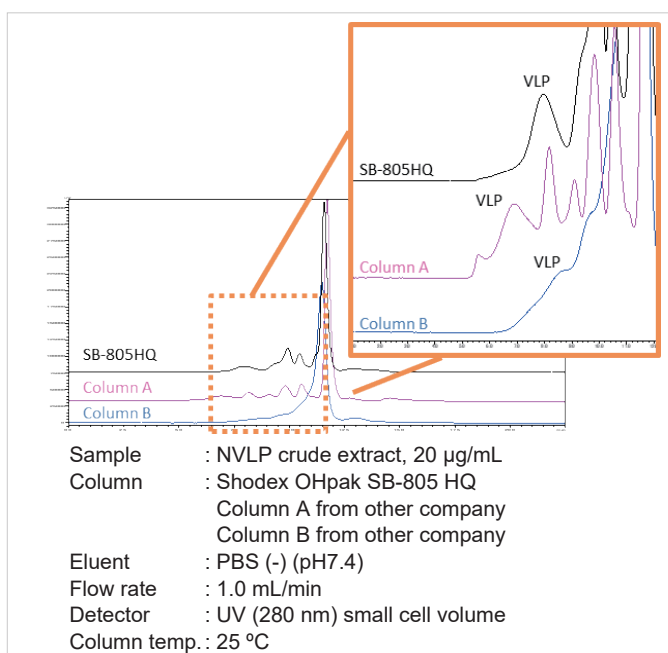


図5. NVLP 粗抽出物の UV クロマトグラムのカラム間比較

実際の分析 SEC カラム選定には、分画分子量範囲のほか、対象の定量性 (回収率) に影響する目的物の吸着性なども考慮する必要がある。Shodex® OHPak® SB-805 HQ は、その高度な親水性をもつ基材設計と、今回の目的物である数十 nm の目的物前後を十分にカバーする分画分子量範囲により、VLP のプロファイリングに好適な選択となった。

● まとめ

適切な分画分子量範囲、かつその領域での良好な分離能を持つ分析 SEC カラムの選択と、適切な物理化学的・生化学的な分析手法との組み合わせが、バイオナノ粒子精製における適切なプロファイル把握に重要である。特に、MALS の活用は、精製工程検討において不純物との判別の難しいバイオナノ粒子の追跡を容易にし、培養・精製工程開発の効率を大きく改善する。

<https://www.shodex.com/>

昭和電工株式会社

技術情報中の数値及び記載内容は、お客様におけるカラム選択のために記載したものであり、保証値ではなく、また、お客様での用途への適合性を保証するものではありません。

GJ. NO. 015. © 20. D. OCT. P