

# タンパク質の高次構造評価技術に関する調査研究

七種和美\*

(2020年2月18日受理)

## A Survey on analytical techniques of higher order structures for proteins

SAIKUSA Kazumi

### Abstract

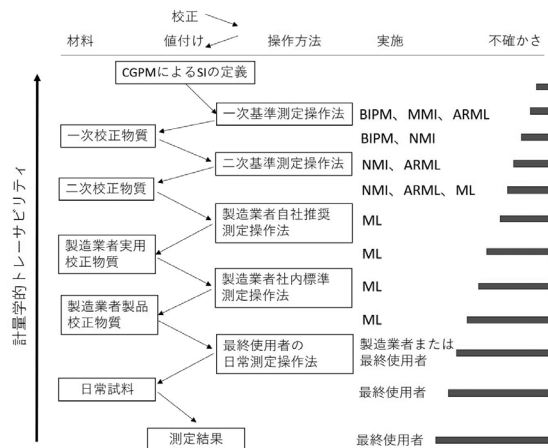
The structures of proteins and protein complexes are important for expressing their functions. In this survey, I conduct a survey of various methods for higher order structure of proteins that will be required for characterization of protein standards in the future. Also, the activities of some national metrology institutes for structural analysis are introduced. In addition, the future direction of evaluation technology for higher-order structural analysis in NMIJ is discussed.

### 1. 緒言

近年、定量分析は国民の生活に身近なものとなっている。病院や検査機関で行われる臨床検査は、血液中や尿中に存在する特定の成分を測定し、得られた結果と基準値との比較によって病状を診断する。その測定項目には肝細胞がんのバイオマーカーであるAFP (Alpha-fetoprotein) や糖尿病関連マーカーであるHbA1c (Hemoglobin A1c) などのタンパク質も含まれている。よって、患者の健康状態を推定するために、これらのタンパク質の量の基準となる標準物質が必要である。

臨床化学分野における標準物質は、図1に示すように、CGPM (General Conference on Weights and Measures (国際度量衡総会)) によるSI (International system of Units, 国際単位系) の定義を頂点とし、SIにトレーサブルな校正と値付けの連鎖による計量学的なトレーサビリティ体系を構築することが理想とされている<sup>1)</sup>。また、我々国家計量標準機関 (National Metrology Institute, NMI) はトレーサビリティ上位の測定操作法や標準物質を開発しているが、これら上位の標準の不確かさは下位の標準の不確かさに影響を与えるため、可能な限り正確な測定操

作法の開発と、それを適用した標準物質の開発が求められている。さらに、臨床化学分野では、BIPM (Bureau International des Poids et Mesures, 国際度量衡局)、IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 国際臨床化学連合)、WHO (World



CGPM: General Conference on Weights and Measures (国際度量衡総会)  
 BIPM: Bureau International des Poids et Mesures (国際度量衡局)  
 NMI: National Metrology Institute (国家計量標準機関)  
 ARML: Accredited Reference Measurement Laboratory (認定基準測定検査室)  
 ML: Manufacturer's Laboratory (製造業者研究室)

図1 ISO17511による計量学的トレーサビリティ連鎖の概念図

\* 物質計測標準研究部門バイオメディカル標準研究グループ

Health Organization, 世界保健機構), ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation, 国際試験所認定機構) が中心となって設立された JCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会) において, 医療計量における測定結果の国際的な等価性, 信頼性, 同等性の確保を支援することを目的とした, 高位 (最高位ではない) 標準物質や国際的に合意された標準測定法のリスタップなどの活動を行っている。その一環として作成されている JCTLM のデータベースに登録されているタンパク質の純物質系標準物質を表 1 に示す<sup>2)</sup>。この中で List I は SI トレーサブルあるいは国際的承認の得られた測定法により値付けされたもののリストであり, List II は非 SI トレーサブル標準物質もしくは国際的承認の得られた測定法が存在しない物質のリス

表 1 JCTLM データベースに登録されているタンパク質標準物質 (純物質系)

タンパク質	マトリックス	認証機関	量	認証値	リスト
Albumin	Aqueous solution	NMIJ <sup>a)</sup>	質量濃度	74.3 g/L	List I
Alphafoetoprotein	Purified alphafoetoprotein	JRC <sup>b)</sup>	質量	100 mg	List II
Alphafoetoprotein A I	Purified alphafoetoprotein A I	JRC	溶解後の 質量濃度	1.06 g/L	List II
Bovine serum albumin	Aqueous solution	NIST <sup>c)</sup>	質量濃度	71.57 g/L	List I
HbA1c	Buffer	JRC	質量比	0.0 mmol/mol to 1.0 153 mmol/mol	List I
Human cardiac troponin I	Aqueous solution	NIST	質量濃度	31.2 mg/L	List II
C-peptide	Lyophilized phosphate buffer	NMIJ	溶解後の 質量濃度	100 mg/L	List I
Total C-peptide	Lyophilized phosphate buffer	NMIJ	溶解後の 質量濃度	102 mg/L	List I
Prostate specific antigen	Purified prostate specific antigen	JRC	質量	70.8 mg	List II
Tyroglobulin (human)	Purified tyroglobulin	JRC	溶解後の 質量濃度	0.324 g/L	List II

a) NMIJ; National Metrology Institute of Japan (日本)

b) JRC; Joint Research Centre (欧州)

c) NIST; National Institute of Standards and Technology (米国)

トである。対象タンパク質の定義があいまいである等の理由により List II の標準物質が存在するが, 認証値としては, いずれも「タンパク質の濃度」が定められている。

タンパク質は, 約 20 種類の L-アミノ酸から構成されている生体高分子である。タンパク質の構造はアミノ酸配列 (一次構造) を基本として, 局所的な水素結合から生じる二次構造, それらが折りたたまれてできる三次構造, 場合によっては折りたたまれたタンパク質同士が相互作用することによって形成される四次構造の階層的な構造を持つ。タンパク質認証標準物質の濃度は SI トレーサブルであることが望ましいため, これまで多くの NMI においてタンパク質認証標準物質の特性値を決めるにあたっては, タンパク質の構成単位であるアミノ酸やペプチド, 窒素にまで分解して定量するといった, いわば一次構造情報をもとにして定量を行うといったアプローチが取られてきた。中でも, 一次標準測定法の一つである同位体希釈質量分析法を利用したアミノ酸分析によるタンパク質/ペプチド定量は最もオーソライズされた方法として多用されている<sup>3), 4)</sup>。アミノ酸分析では試料タンパク質を酸により完全加水分解することにより得られたアミノ酸を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) により定量する (図 2)<sup>1), 5)</sup>。このとき標準液作成に用いる標準物質として, 一次標準法で正確に値付けされたアミノ酸を用いることによって, 原理的に SI トレーサブルな測定が可能となる。また, 同位体希釈質量分析法で内標準物質として用いる安定同位体標識アミノ酸は, 天然アミノ酸と理論上ほぼ同一の挙動を示すため, 加水分解をはじめとした分析操作上の影響を最小限に抑えることができる。現在, 本方法を適用することにより NMIJ で開発・供給されているタンパク質・ペプチドの標準物質は, C-ペプチド, C 反応性蛋白, ヒト血清アルブミンなどがある<sup>6)</sup>。しかしながら, タンパク質が生体内において機能する場合は三次構造や四次構造といった高次構造を持ち, それに基づいた機能を発現する。例え

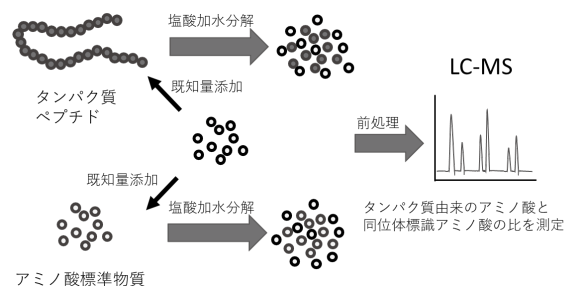


図 2 同位体希釈質量分析法を用いたアミノ酸分析

ば、酵素、ホルモン、抗体などは、それぞれに固有の生理活性（基質の加水分解、抗原との結合能など）を有しており、これらの特異的な性質を生かして、臨床検査やバイオ医薬品などの分野で様々な利用がなされている。そのため、今後のタンパク質に関連した産業における標準物質の開発・供給を考えると、これまでに行ってきたようなタンパク質の濃度・純度を求めるといった定量評価ばかりでなく、高次構造をはじめとした構造情報についての評価が求められるようになって考えられる。

具体的に、構造情報が評価された標準物質の需要が見込まれる研究分野として医薬品分野が挙げられる。2017年2月に Evaluate Pharma 社が報告した Orphan drug report（希少疾病用医薬品における報告）の中には、全医薬品におけるバイオ医薬品の割合と世界におけるバイオ医薬品の売上高が掲載されている<sup>7)</sup>。全医薬品におけるバイオ医薬品の割合では、2000年から2022年までの予想も含めた割合の推移が図示されており、2000年に6%であったバイオ医薬品の割合は報告された2016年までに17%まで増加し、その後2022年までには20%を超える割合となることが予想されている。一方、世界におけるバイオ医薬品の売上高はそれに伴って上昇傾向にある。医薬産業政策研究所の報告では、2016年の医療用医薬品世界売り上げの上位10品目のうち、8品目はバイオ医薬品であることが示されている（表2）。

バイオ医薬品の代表格である抗体医薬品は免疫グロブリンというタンパク質であり、2本のH鎖と2本のL鎖からなる<sup>8)</sup>。免疫グロブリンではIgG、IgM、IgA、

IgD および IgE の5つのクラスがあり、ヒトではそのうちのIgGが最も多い。ヒトでは、H鎖の違いによってさらに4つのサブクラスIgG1からIgG4に分類される。IgG1の基本骨格を図3に示す。H鎖およびL鎖のN末端から約110番目のアミノ酸残基部分は抗原特異性を決定する部分で可変部と呼ばれる。残りの部分は抗体で共通の構造となっており、定常部と呼ばれる。可変部では、翻訳後修飾や変異が起きやすいことが知られており<sup>8)</sup>、この部位が抗原特異性を決定している。そのため、抗体医薬品の品質評価には、可変部の抗原特異性の評価、抗体全体の構造安定性の評価が必要であると考えられる。よって、バイオ医薬品の開発には、定量的な評価だけでなく、高次構造に着目した品質評価のための技術が必要とされており、それらの技術の妥当性を評価するための標準物質が求められている。

また、このような構造解析に着目する動きは産業界においても世界規模でみられる。2012年には、バイオ医薬品産業における高次構造の特性についての役割を研究する Working group が CASSS (International Separation Science Society), IQ (International consortium for Innovation & Quality in Pharmaceutical development), AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists), NIST (National Institute of Standards and Technology) などの産業界から学術組織までの幅広い研究者によって設立された<sup>9)</sup>。その後、高次構造解析への関心が急速に高まったことから2013年3月には高次構造コンソーシアム (HOS Consortium) に発展した。現在までに、抗体医薬品が精製時に受けるストレスの評価<sup>10)</sup>、酸化によるタンパク質の安定性の評価<sup>11)</sup>などの4つの研究事例が報告されている。

このような世界規模の産業界における動向を踏まえ、本調査研究では、タンパク質の高次構造解析技術やそれ

表2 医療用医薬品世界売り上げ上位10品目（2016年）

	製品名	一般名
1	ヒュミラ	アダリムマブ
2	エンブレル	エタネルセプト
3	ハーボニー	ソホスビル+レジバシル
4	レミケード	インフリキシマブ
5	リツキサソ	リツキシマブ
6	レブラミド	レナリドミド
7	アバスタチン	ベバシマブ
8	ハーセプチン	トラスツズマブ
9	ランタス	インスリングルグルギン
10	ブレベナー13	沈降13価肺炎球菌結合型ワクチン

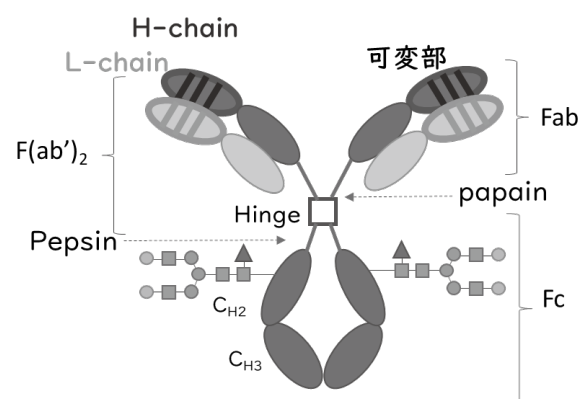


図3 IgG1の模式図

表3 構造解析の分析手法と特徴

分析手法	特徴	分解能	分析時間	必要量
X線結晶構造解析	結晶中のタンパク質の高分解能な高次構造を解析する	高	月～年	mg
核磁気共鳴	水溶液中のタンパク質の高分解能な高次構造を解析する	高	月～年	mg
クライオ電子顕微鏡	単粒子タンパク質の粗い高次構造や二次元結晶中での膜タンパク質等の高分解能な高次構造を解析する	中～高	月～年	mg
水素重水素交換質量分析	水溶液中のタンパク質のペプチドレベルでの構造を解析する	中～高	日～月	mg
円二色性スペクトル	水溶液中のタンパク質の二次構造を調べる	中	分	μg
赤外分光	水溶液中のタンパク質の二次構造量を調べる	中	分	μg
ラマン分光	溶液や粉末、結晶中のタンパク質の二次構造や芳香アミノ酸側鎖の構造を調べる	中	分	μg
ネイティブ質量分析	タンパク質の大まかな形状と分子量、成分の化学量論比を調べる	低～中	分	μg
X線、中性子小角散乱	水溶液中のタンパク質の大まかな形状を知る	低～中	日～月	μg
高速AFM	基板上のタンパク質1分子の形状を調べる	低～中	日	<ng
超遠心分析	水溶液中タンパク質の分子量と大まかな形状を調べる	低	日	mg
動的光散乱	水溶液中タンパク質の分子量を調べる	低	分	μg
電気泳動	水溶液中のタンパク質の大まかな大きさ、形、荷電を調べる	低	分	μg
液体クロマトグラフィー	水溶液中のタンパク質の大まかな大きさ、分子量を調べる	低	分	>mg

らを用いた各国のNMIにおける取り組みについて調査するとともに、今後の標準物質開発において必要な技術や方向性について検討した。

## 2. タンパク質の高次構造解析

タンパク質の高次構造解析は様々な分析手法によって




取り組まれている。これらの手法は表3のように「分解能」「分析時間」「必要量」によって分類することができる。分解能の低い分析手法では、得られる構造情報はタンパク質のサイズや形などの粗い情報となるものの、分析時間が短く、必要な試料量が少なく済むため、比較的分析に取り組みやすい。一方、高分解能な分析手法では、原子レベルでの構造解析が可能だが、分析時間が長く、多量の試料が必要となる。また、これらの分析手法にはそれぞれ分子量や構造特性などの制約があり、すべてのタンパク質を解析できるわけではない。このため、低分解能な構造解析手法であるネイティブ質量分析、X線小角散乱、高速AFMと計算化学を組み合わせ、タンパク質の高次構造を解析する取り組みもなされている<sup>12), 13)</sup>。本章では、これらの構造解析手法の中から高分解能な解析手法として分類されるX線結晶構造解析、核磁気共鳴、クライオ電子顕微鏡、水素重水素交換質量分析、計算化学と組み合わせることによって分解能の高い高次構造解析ができるネイティブ質量分析の一般的な測定原理と問題点について解説する。

### 2.1 X線結晶構造解析

X線結晶構造解析はタンパク質の高次構造を原子レベルで決定できる方法として最も広く用いられている<sup>14)</sup>。構造解析に用いられるX線は0.03 nmから0.3 nm程度の電磁波であり、X線が物質に当たるとX線が様々な方向に散乱される。物質の分子構造が規則的な三次元配列になっている結晶の場合、X線があたると相互に干渉しあい、ほとんどのX線は打ち消しあうが、ある特定の波長でX線は加算されて回折X線としての検出が可能となる。この検出可能な回折X線は回折点の強度から算出される振幅、X線源によって決まる波長、位相という3つの性質によって決まる。そのため、これら3つの性質を明らかにすることによって電子密度を取得し、タンパク質の高次構造情報を得ることが可能となる。

結晶可能なものであれば分子量の制限なく構造解析が可能だが、天然変性領域を持つタンパク質の解析が困難となっている。それはこの天然変性領域が様々な標的と相互作用することによって標的に応じた構造を誘起し機能する一方、単独で存在する場合は構造を持たない揺らいだ状態となるため、天然変性領域を除いた固い構造を持つ部分のみが解析されるためである。また、天然変性領域のような部位は結晶の状態によってはクリスタルパッキングなどによって構造が誘起されることもあるため注意が必要となる。

表 4 2D-NMR の種類

手法	相関 ○: $^1\text{H}$ , ●: $^{13}\text{C}$	特徴
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY		2 から 3 本の結合を隔てた J カップリングを有する プロトンの同種核シフト相関
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC		プロトン観測による結合を 1 本隔てた異種核カップ リング
$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC		プロトン観測によるロングレンジ異種核カップリン グ

## 2.2 核磁気共鳴

核磁気共鳴 (NMR) では、X 線結晶構造解析法と同じくタンパク質の高次構造解析を高分解能かつ原子レベルで解析できる<sup>15)</sup>。原子核は正電荷を持ち、自転している。外部磁場が存在すると、ランダムに配向していた核スピンは磁場と同じ向きか、逆向きに揃う。同じ向きのほうがエネルギー的にわずかに安定であり、このエネルギー差は外部磁場に依存している。このような配向した核がそのエネルギー差に対応したラジオ波で照射されると、エネルギーの吸収が起こり、低エネルギー状態から高エネルギー状態にスピン反転を起こす。この現象を NMR 現象という。このような NMR 現象を起こす核としては奇数の陽子を持つ核、奇数個の中性子を持つ核が条件として挙げられ、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  などがある。共鳴周波数は原子核の種類と核の存在する場所の磁場の強さによって決まるが、核の周りの電子が作る磁場の影響を受ける。この電子密度の違いによる共鳴周波数の差が化学シフトであり、構造や官能基による違いを反映しているため、化合物の構造を解析する上で重要な情報となる。タンパク質の構造解析に用いられる二次元 NMR (2D-NMR) には表 4 に示すような分子内に存在する核種間の相関やカップリングを観測する様々な手法が存在し、得られる情報からそれぞれの分子のつながりを追いかけることで立体的な構造情報が取得できる。

溶液中の構造解析ができるという点において NMR は優れた手法であり、X 線結晶構造解析では構造が得られない天然変性領域のようなゆらぎを持った構造であっても解析できるのが利点となっている。しかしながら、タンパク質の分子量が 20 kDa 以上となると解析が困難となる。現在までに NMR のハードウェア (高磁場磁石、クライオプローブ、コンピュータ) や方法論 (安定同位体やパルス手法など) の進展により、共鳴周波数 800 MHz から 900 MHz の NMR では 30 kDa から 50 kDa のタンパク質であってもタンパク質の NMR シグナ

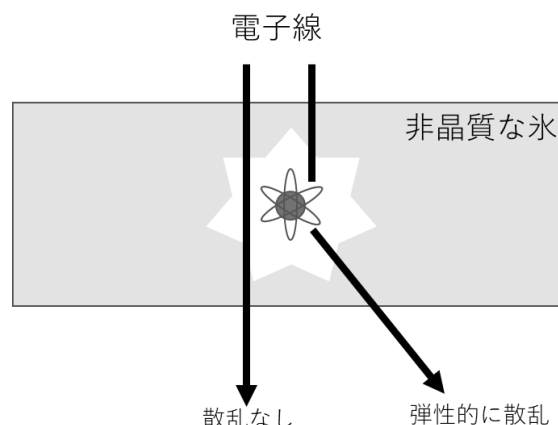


図 4 クライオ電子顕微鏡法のための氷包埋法によるサンプルの作成

ルを分離できるようになりつつある。しかしながら、多くの研究施設でこのような高磁場磁石を持つ NMR を簡単に導入できるわけではない。またこれらの装置の維持には大量の液体ヘリウムが必要であることから、方法論等の更なる発展が望まれる。

## 2.3 クライオ電子顕微鏡

これまでのタンパク質の構造解析手法としては上記に挙げた X 線結晶構造解析、NMR が絶対的な存在となっていたが、2017 年にノーベル化学賞を受賞したクライオ電子顕微鏡法を開発した研究者を中心とした多くの研究者の努力の結果として、クライオ電子顕微鏡法は第三のタンパク質の構造解析手法として認識されつつある<sup>16)</sup>。

この手法では図 4 に示す氷包埋法という方法で生体試料を急速凍結して薄い非晶質の水の膜中に閉じ込めることによって、低温で液中に固定されたままで電子顕微鏡内にセットされ、画像化される。そして、生体試料における電子線の低コントラストを補うために位相コントラストを用いて観察する。従来の電子顕微鏡による生体試料観察では、ネガティブ染色法などのように試料を酢酸ウランなどの重原子で染色し、試料を覆う重原子の濃淡を電子線の散乱の差 (散乱コントラスト) として観測していた。このため、試料内部の構造情報が得られなかった。しかしながら、上記に述べた氷包埋法を用いたクライオ電子顕微鏡法では、ネガティブ染色のような染色を行わないため、内部も含めた試料全体からの構造情報を取得でき、タンパク質の構造解析が可能となった。また、電子直接検出カメラの出現により得られる解像度が飛躍的に向上し、現在では原子構造解析が可能になったとい

える。今日最も多く使われるクライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質の構造解析の手法は単粒子構造解析である。この方法では、電子顕微鏡像の中に単一で向きの異なるタンパク質の粒子が多数記録されている像を多数集めてS/Nの高い像を導出する。その後、二次元平均像から高次構造を再構築することによって、原子分解能の三次元構造が再構築される。

これまでのX線結晶構造解析やNMRに比べて試料に対する制約が非常に少ない方法であるが、氷包埋法で作成する膜が非常に薄い膜であり、試料を作る過程で試料は壊れることが多く、空気と水の界面に存在するタンパク質は変性する可能性があるため、熟練した実験技術を必要とする。また、得られた像が溶液中にどの程度存在するかという情報は得られないため、いくつかの構造が得られる場合はネイティブ質量分析など他の手法と組み合わせることによって構造解析がなされている例もある<sup>17)</sup>。

## 2.4 水素重水素交換質量分析

表3に示したように、先に述べた3種類の構造解析手法とは異なり、ペプチドレベルの構造解析法であるが、現在バイオ医薬品等の開発現場で最も注目されている手法として水素重水素交換質量分析(HDX-MS)がある。

タンパク質の主鎖(ペプチド結合)のアミド水素は、高次構造上の位置する部位によって交換速度が異なる<sup>18)</sup>。タンパク質溶液に多量の重水(D<sub>2</sub>O)を加えると、タンパク質の表面や動きが激しい部位のアミド水素は容易に重水素に交換される。一方、二次構造形成部位や分子内部にあるアミド水素は重水素に交換されにくい。このように環境や構造によって水素が重水素に交換されやすさが異なる。この水素が重水素に交換(H/D交換)する際の質量変化を調べる手法がHDX-MSである。実際は、図5に示すようにタンパク質に過剰なD<sub>2</sub>Oを加えることによってH/D交換を行う。その際、経時的にpD(pHのHを重水素であるDとした標記)と温度を下げることによって反応を停止させる。その重水素に交換されたタンパク質をそのまま、または酵素消化するこ

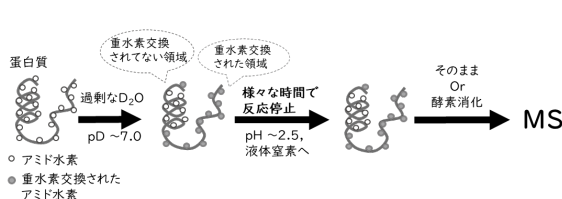


図5 HDX-MSの実験の流れ

とによって得たペプチドを質量分析によって測定する。HDX-MSのイオン化法として、ソフトなイオン化として知られるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)とエレクトロスプレーイオン化(ElectroSpray Ionization, ESI)の両方で手法が開発されてきたが、ESIをイオン化したLC-MSを用いる分析が主流となっている。現在では、H/D交換や酵素消化する作業を自動化するシステムも販売されている。

HDX-MSはペプチドマッピングなどで使用する質量分析装置を共用できる部分も多く、比較的取り組みやすい方法であると認識されている。原理的に分子量の制限もないため様々なタンパク質およびそれらの複合体に適用可能であるが、分子量が大きいタンパク質の場合は断片化する際に得られるペプチドが多く存在することになるのに加え、H/D交換されたフラグメントイオンは強度が低くなることから、LCでそれらを高分離するなど実験的なセットアップを慎重に行う必要がある。

## 2.5 ネイティブ質量分析

実験的に得られる構造情報は先に述べた手法よりも粗い情報ではあるが、計算化学と組み合わせることで分解能のよい構造情報が得られるものの一つにネイティブ質量分析がある。この手法では、質量によって成分を分離できるため、混合物でも目的イオンの構造情報を取得できるという利点がある。

ネイティブ質量分析は溶液中のタンパク質やタンパク質複合体の構造を保ったまま測定できる手法である<sup>19), 20)</sup>。測定溶媒として揮発性の塩の溶液である酢酸アンモニウムを用いるが、その塩濃度をタンパク質を精製する溶液と同じイオン強度とすることによってタンパク質における相互作用状態を保持したままの測定が可能となる<sup>21)</sup>。またイオン化として、エレクトロスプレーをキャピラリー内径が1 μmまでナノ化したnano-エレクトロスプレーイオン化(nano-ESI)を用いることによって、通常のESIよりも穏やかな脱溶媒としタンパク質やタンパク質複合体の構造を保ったイオン化を実現して

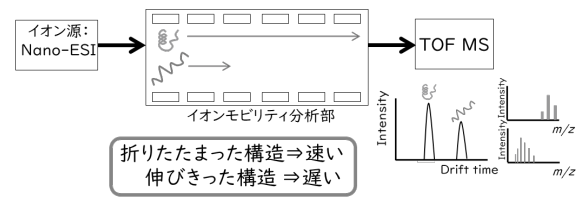


図6 イオンモビリティ質量分析装置

いる。このネイティブ質量分析をイオンモビリティ質量分析装置で行うことによって、タンパク質の構造解析が行われている。

イオンモビリティ質量分析装置は図6に示すように従来の質量分析装置にイオンモビリティ分析部と呼ばれる窒素などの気体で満たされた領域を備えている。このイオンモビリティ分析部にイオンが入るとイオンは気体と衝突しながらその領域を通過するため、イオンモビリティ質量分析を用いることで質量とともにイオンモビリティ分析部を通過する時間 (Arrival time) を取得できる。例えば、同じタンパク質であっても、折りたたまった構造と伸びきった構造が存在した場合、折りたたまった構造のほうが気体との衝突回数が少なくなるため、早く通過できる (図6)。また、この Arrival time をすでに衝突断面積がわかっているタンパク質でキャリブレーションすることによって、目的イオンの衝突断面積を算出できる。この衝突断面積は *pdb* 形式で表されるタンパク質であれば *Mobcal* と呼ばれるプログラムによって理論的な値が算出できるため、すでに *Protein Data Bank* に登録されたタンパク質や計算化学でシミュレーションされたタンパク質であれば衝突断面積を取得可能である。よって、目的イオンの構造を原子レベルで推定できる。このため、これまで分子動力学シミュレーションなどの計算化学とイオンモビリティ質量分析装置を用いたネイティブ質量分析によってヒストン多量体をはじめとする様々なタンパク質複合体の構造解析がなされてきた<sup>12), 22), 23)</sup>。さらに、質量分析装置でのパラメータであるコリジョンエネルギーを高くすることによって構造を不安定化するという現象をイオンモビリティ質量分析の Arrival time の変化によって検出する *Collision-Induced Unfolding (CIU)* によって、構造安定性の評価にも用いられている<sup>24)</sup>。

これまでネイティブ質量分析を用いてモデルタンパク質からウイルスまで分析が行われてきているが、測定溶媒に酢酸アンモニウムを用いることからタンパク質の構造安定性を損ねる可能性もある。現在この問題を解決するために、添加剤や使用するキャピラリーを工夫することによって不揮発性緩衝液下でも測定できる手法への改良が試みられている<sup>25), 26)</sup>。また、同様の手法を用いて細胞環境下での測定への適用も試みられており、構造解析の幅を広げつつある<sup>27), 28)</sup>。

### 3. NMI における取り組み

本章では、2章で示したタンパク質の高次構造解析を

用いた各国の NMI における取り組み状況について述べる。

#### 3.1 NIST における取り組み

NIST はその前身である NBS (National Bureau of Standard) の時代から、標準物質の重要性を認識し、様々なタンパク質およびペプチドの標準物質を開発してきた<sup>29)</sup>。2016 年にはヒト化抗体 IgG1 溶液である Reference Material (RM) 8671 通称 NISTmAB の供給をスタートしている。NISTmAB は抗体の物理化学的特性を評価する標準物質としての役割に加え、バイオ医薬品分析の技術開発やシステム適合性評価に利用可能な標準物質として認識されている<sup>30)</sup>。これまでの標準物質とは異なり、NISTmAB の認証書には濃度だけでなく、粒子サイズや粒子の含有量といった構造に関する情報も含まれている<sup>18)</sup>。また、この NISTmAB は学術界、産業界からの協力を得て、糖鎖解析や X 線結晶構造解析や X 線小角散乱などの高次構造解析も含めて ACS Book シリーズにそれらの結果をまとめて報告している<sup>31)</sup>。これは高次構造解析が緒言に述べたような抗体医薬品における品質を評価するために必須であることや構造解析に対する世界的な動向を受けての動きであると考えられる。さらに、2D-NMR と HDX-MS において分析手法の研究所間比較にも取り組むことでそれぞれの測定の再現性に寄与するパラメータを調査している<sup>32), 33)</sup>。

まず、2D-NMR では、国内外の 26 研究機関が参加して NISTmAB の可変部を含む NISTFab を用いて <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N または <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC を行っている。それぞれの測定から得られた化学シフトを主成分解析することによって、実験の温度やサンプルの安定同位体の割合などの実験条件を揃えることで再現性のよいデータを得られることが示唆されている。また、化学シフトのばらつきを評価する方法として、*Combined Chemical Shift Deviation* を用いて化学シフトのばらつきの標準偏差を見積ることを提唱しており、本アプローチにより研究所間でのばらつきが個々の測定精度の 5 ppb とほとんど同程度に抑えられることが示されている。NIST では、これまで NISTmAB や糖鎖修飾の構造変異体などを用いて 2D-NMR における構造解析を行っており<sup>34), 35)</sup>、それらのデータから NMR では化学シフトを評価する重要性を指摘しており、そのアプローチを研究所間比較にも適用したと考えられる。しかしながら、先に述べたように NMR では 2 万以上の分子量を持つタンパク質であると解析が困難となるため、同手法を分子量 150 kDa の NISTmAB へ展開していくためには高磁場 NMR の利用や特殊なアミノ酸に同

位体ラベルを挿入したサンプルの利用も検討していく必要があると思われる。

一方、HDX-MSでは、参加機関は15機関でNMRの際と同様のNISTFabを用いた研究所間比較を行っている。この比較実験では、すでにH/D交換したサンプルが用いられたため、各機関で測定されるNISTFabは同じ質量になると考えられる。そのため、各測定で観測されたペプチドの質量電荷比 ( $m/z$ ) のばらつきによって各機関が使用するシステムの安定性を評価することができる。また、測定における研究所間のばらつきを調べることで、実験に用いる温度が室温に近いほど安定な測定が可能であることや、ペプチドによってばらつき傾向が異なることが示唆されている。このことから、実験装置のセットアップや研究所間で比較できるペプチドを選択することがデータの再現性を向上させるために重要であると思われる。また、複数の研究所間で比較できるペプチドが少ないことが問題点として挙げられるが、これらに関してもサンプルのH/D交換だけでなく、その後の酵素消化の時間やLCの条件などを一定にするなど詳細な実験の条件を統一することが有効であると考えられる。しかしながら、HDX-MSではNMRのような分子量における制約などはない上、すでに装置を保有している施設が多いという点でバイオ医薬品の製造分野で特に注目されている分析手法となっており、今後の高次構造評価技術として発展させるべき手法であると思われる。

このようにNISTは自身の供給している標準物質を様々な構造解析のデータも含めて提供し、それを元にした場所でも同様の分析ができる構造解析手法を模索しているところである。このことから今後のタンパク質の標準物質を供給する上でその物質にあった構造解析手法を見出し、評価していくことが重要であると考えられる。

### 3.2 LGCにおける取り組み

LGC (The Laboratory of the Government Chemist) ではHDX-MSを用いた構造解析に取り組んでいる。2017年には、ヒト成長ホルモンやトランスフェリンといったモデルタンパク質を用いてHDX-MSを行う上での質量分析装置のパラメータについて検討している<sup>36)</sup>。さらに、最近、NISTmABを用いてHDX-MSにおけるペプシン消化の時間の条件検討などを行った研究成果を報告している<sup>37)</sup>。

NISTでは、NISTmABを供給する際にその構造特性を様々な分析手法を用いて明らかにしていた。それに対して、LGCは上記に挙げた論文において、抗体の製造過程において起こることが想定される変化や劣化を

HDX-MSとイオンモビリティ質量分析の解析を用いて検出できるかについて検討している。ここで使用するサンプルとしては劣化と相関があるとして知られている糖鎖修飾を2種類の酵素で切断した変異体を作製し、それらの局所的な構造変化をHDX-MSで、全体の構造変化をイオンモビリティ質量分析で解析している。それぞれの結果から、一部の糖鎖の切断でもHDX-MSでは構造変化が検出できること、HDX-MSで顕著な変化が見られた場合にはイオンモビリティ質量分析でも検出できたことからこれらの手法がバイオ医薬品の解析に適していると結論づけている。HDX-MSだけでは構造全体あるいは部分的にH/D交換された水素の数しかわからないため、X線結晶構造解析などの原子座標の構造が必要である。一方、イオンモビリティ質量分析では計算化学と組み合わせることによって原子座標の構造が推定可能である<sup>12), 22), 23)</sup>。このため、HDX-MS、イオンモビリティ質量分析を計算化学と組み合わせることで、構造変化を検出するというだけでなく、構造のどの部分に影響を与えるかなどより分解能の高い構造解析を行えるようにすることが可能であると考えられる。

### 4. まとめ

本稿では、今後のタンパク質・ペプチド標準物質開発で必要となる構造解析の重要性を医薬品分野を中心とした世界的な動向も踏まえて述べた上で、タンパク質の構造解析においてこれまで主に用いられてきた手法について調査した。また、NMIのうち、NIST、LGCの事例について紹介した。現在では、KRIS (Korea Research Institute of Standards and Science) などその他のNMIでも主にHDX-MSを用いた取り組みが開始されている<sup>38)</sup>。構造生物学の分野ではX線結晶構造解析やNMRなどの高分解能な解析が求められてきたが、このように様々なNMIの取り組みにHDX-MSが選ばれている背景には3.1でも述べたように一次構造解析の分析装置としてすでに各機関がHDX-MSの装置を保有している、または一次構造、高次構造ともに解析できる装置として導入しやすいということも挙げられる。また、迅速・微量でも解析できるという質量分析の強みが構造解析法を選択する上で重要な要因となっているとも考えられる。一方、LGCの取り組んでいたイオンモビリティ質量分析に用いられていたネイティブ質量分析は構造安定性の解析やストイキオメトリーなどHDX-MSでは得られない構造情報を取得することができる上、計算化学と組み合わせることによって原子レベルでの構造解析も可能であ



る。このように質量分析を用いた手法は今後の高次構造評価技術において中心的な存在になっていくと考えられ、これらの手法の発展が標準物質開発、さらには高次構造評価技術の構築に重要な要素となると思われる。今後は、NMIJにおける標準物質開発に高次構造評価を加えて供給することを目指し、質量分析を用いた高次構造解析技術の発展を先導していきたいと考えている。

## 謝辞

本調査研究をまとめるにあたり、全般に渡ってご指導・ご助言いただきましたバイオメディカル標準研究グループ長加藤愛博博士に深く感謝いたします。また、折に触れ様々な観点からご助言をいただきましたバイオメディカル標準研究グループの皆様にご心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 久保田正明編：化学分析・試験に役立つ 標準物質活用ガイド（丸善，2009）227-237.
- JCTLM database: Laboratory medicine and in vitro diagnostics. <http://www.bipm.org/jctlm/>
- W.I. Burkitt, C. Pritchard, C. Arsene, A. Henrion, D. Bunk, G. O'Connor: Toward Système International d'Unité-traceable protein quantification: from amino acids to proteins, *Anal. Biochem.*, 376 (2008) 242-251.
- M. Kato, H. Kato, S. Eyama, A. Takatsu: Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 3059-3064.
- T. Kinumi: タンパク質・ペプチドの高精度定量と標準物質, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 66 (2018) 210-213.
- NMIJ CRM, 6901-b C-peptide.
- EvaluatePharma: Orphan Drug Report 2017 4th Edition (2017). <http://info.evaluategroup.com/rs/607-YGS-364/images/EPOD17.pdf>
- N. Kawasaki: Monoclonal Antibody Drugs: Quality by Design Approach for the Drug Development *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 66 (2018) 150-153.
- J.P. Gabrielson, W.F. Weiss. IV: Technical decision-making with higher order structure data: starting a new dialogue, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 1240-1245.
- Y. Jiang, C. Li, J. Li, J.P. Gabrielson, J. Wen: Technical Decision Making with Higher Order Structure Data: Higher Order Structure Characterization During Protein Therapeutic Candidate Screening, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 1533-1538.
- K.K. Arthur, N. Dinh, J.P. Gabrielson: Technical Decision Making with Higher Order Structure Data: Utilization of Differential Scanning Calorimetry to Elucidate Critical Protein Structural Changes Resulting from Oxidation, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 1547-15544.
- K. Saikusa, S. Fuchigami, K. Takahashi, Y. Asano, A. Nagadoi, H. Tachiwana, H. Kurumizaka, M. Ikeguchi, Y. Nishimura, S. Akashi: Gas-Phase Structure of the Histone Multimers Characterized by Ion Mobility Mass Spectrometry and Molecular Dynamics Simulation *Anal. Chem.* 85 (2013) 4165-4171.
- T. Oroguchi, H. Hashimoto, T. Shimizu, M. Sato, M. Ikeguchi: Intrinsic dynamics of restriction endonuclease EcoO109I studied by molecular dynamics simulations and X-ray scattering data analysis, *Biophys. J.*, 96 (2009) 2808-2822.
- 西村善文編：生命科学のための機器分析実験ハンドブック（羊土社，2007）198-202.
- 西村善文編：生命科学のための機器分析実験ハンドブック（羊土社，2007）145-156.
- C. Song, K. Murata: クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の動的構造解析, *J. Comput. Chem. Jpn.*, 17 (2018) 38-45.
- K. Mayanagi, K. Saikusa, N. Miyazaki, S. Akashi, K. Iwasaki, Y. Nishimura, K. Morikawa, Y. Tsunaka: Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT, *Sci. Rep.*, 9 (2019) 10183.
- S. Akashi, K. Takio, 重水素交換と MS を組み合わせたタンパク質の高次構造解析, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 48 (2000) 94-100.
- A.C. Leney, A.J.R. Heck: Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 28 (2017) 5-13.
- H. Hernández, C.V. Robinson: Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry, *Nat. Protoc.*, 2 (2007) 715-726.
- N.J. Kershaw, H.J. McNaughton, K.S. Hewitson, H. Hernández, J. Griffin, C. Hughes, P. Greaves, B. Barton, C.V. Robinson, C.J. Schofield: ORF6 from the clavulanic

- acid gene cluster of *Streptomyces clavuligerus* has ornithine acetyltransferase activity, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 2052-2059.
- 22) K. Saikusa, A. Osakabe, D. Kato, S. Fuchigami, A. Nagadoi, Y. Nishimura, H. Kurumizaka, S. Akashi: Structural Diversity of Nucleosomes Characterized by Native Mass Spectrometry, *90* (2018) 8217-8226.
- 23) K. Pagel, E. Natan, Z. Hall, A.R. Fersht, C.V. Robinson: Intrinsically disordered p53 and its complexes populate compact conformations in the gas phase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52 (2013) 361-365.
- 24) S.M. Dixit, D.A. Polasky, B.T. Ruotolo: Collision induced unfolding of isolated proteins in the gas phase: past, present, and future, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 42 (2018) 93-100.
- 25) K. Saikusa, D. Kato, A. Nagadoi, H. Kurumizaka, S. Akashi: Native Mass Spectrometry of Protein and DNA Complexes Prepared in Nonvolatile Buffers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 31 (2020) 711-718. in *Nonvolatile Buffers*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2020, <https://dx.doi.org/10.1021/jasms.9b00145>, in press
- 26) A.C. Susa, Z. Xia, E.R. Williams: Small Emitter Tips for Native Mass Spectrometry of Proteins and Protein Complexes from Nonvolatile Buffers That Mimic the Intracellular Environment, *Anal. Chem.*, 89 (2017) 3116-3122.
- 27) J. Gan, G. Ben-Nissan, G. Arkind, M. Tarnavsky, D. Trudeau, L.N. Garcia, D.S. Tawfik, M. Sharon: Native Mass Spectrometry of Recombinant Proteins from Crude Cell Lysates, *Anal. Chem.*, 89 (2017) 4398-4404.
- 28) G. Ben-Nissan, S. Vimer, S. Warszawski, A. Katz, M. Yona, T. Unger, Y. Peleg, D. Morgenstern, H. Cohen-Dvashi, R. Diskin, S.J. Fleishman, M. Sharon: Rapid characterization of secreted recombinant proteins by native mass spectrometry, *Comm. Biol.*, 1(2018) 213.
- 29) 加藤愛, タンパク質認証標準物質とその値付け方針の現状, *ぶんせき*, 3 (2010) 119-125.
- 30) NIST Monoclonal Antibody Reference Material 8671 <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/8671.pdf>
- 31) J.E. Schiel, D.L. Davis, O.V. Borisov Eds.; *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2015; Vol.1-3.
- 32) R.G. Brinson et al.: Enabling adoption of 2D-NMR for the higher order structure assessment of monoclonal antibody therapeutics, *mAbs*, 11 (2019) 94-105.
- 33) J.W. Hudgenes et al.: Interlaboratory Comparison of Hydrogen – Deuterium Exchange Mass Spectrometry Measurements of the Fab Fragment of NISTmAb, *Anal. Chem.*, 91 (2019) 7336-7345.
- 34) L.W. Arbogast, R.G. Brinson, J.P. Marino: Mapping Monoclonal Antibody Structure by 2D <sup>13</sup>C NMR at Natural Abundance *Anal. Chem.*, 87 (2015) 3556-3561.
- 35) L.W. Arbogast, F. Delaglio, J.E. Schiel, J.P. Marino: Multivariate Analysis of Two-Dimensional <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C Methyl NMR Spectra of Monoclonal Antibody Therapeutics To Facilitate Assessment of Higher Order Structure *Anal. Chem.*, 89 (2017) 11839-11845.
- 36) A. Cryar, K. Groves, M. Quaglia: Online Hydrogen-Deuterium Exchange Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry (HDX-IM-MS): a Systematic Evaluation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 28 (2017) 1192-1202.
- 37) K. Groves, A. Cryar, S. Cowen, A.E. Ashcroft, M. Quaglia: Mass Spectrometry Characterization of Higher Order Structural Changes Associated with the Fc-glycan Structure of the NISTmAb Reference Material, RM 8761, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 31 (2020) 553-564.
- 38) H.D. Yu, S. Ahn, B. Kim: Protein Structural Characterization by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Top-down Electron Capture Dissociation, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 34 (2013) 1401-1406.