

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16335

研究課題名（和文）タンパク質泡気液界面評価系を用いたタンパク質の界面変性の解析

研究課題名（英文）Elucidation of structural perturbation of proteins at air-water interface by protein foam assay

研究代表者

鳥巢 哲生 (Torisu, Tetsuo)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：10730492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：バイオ医薬品開発における課題の一つであるタンパク質の界面変性について、タンパク質溶液の泡化と水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)を組み合わせた新規分析法を確立し、詳細な（ペプチド（アミノ酸数残基）レベルの高い分解能での）解析を行った。ヒト血清アルブミンを用いて測定を実施したところ、気液界面への吸着によって、ヒト血清アルブミンの疎水性の高い領域が露出することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ医薬品は有効性が高く、広く用いられていますが、タンパク質の凝集などバイオ医薬品特有の問題も存在している。タンパク質の界面変性はタンパク質凝集を引き起こす要因の一つとして知られているが、界面上のタンパク質を解析方法が限られていたことから、これまで詳細な界面変性に関する構造解析は行われていなかった。本研究では、新規分析法を確立し、タンパク質の界面変性をペプチドレベルの分解能で明らかにした。この結果および確立した方法は、より安全なバイオ医薬品の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Structural instability of proteins at air-water interfaces is one of the challenges during developments of biopharmaceuticals. A novel analytical method combining foaming of protein solution and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) was developed in this study to analyze structural change of proteins at air-water interface in detail (peptide (several amino acid residues) level), and applied to human serum albumin as a model protein. The result suggested that adsorption of human serum albumin to the air-liquid interface results in exposure of highly hydrophobic regions.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：気液界面 タンパク質 構造解析 質量分析

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品はその有効性や安全性の高さから積極的に開発されているが、一方で、バイオ医薬品に特有の課題も指摘されている。バイオ医薬品には、不純物としてタンパク質の凝集体が含まれている。タンパク質凝集体は免疫原性を持ち、薬効の低下やアナフィラキシーショックのような重篤な副作用を引き起こすことが知られているため、タンパク質の凝集を抑制する必要がある。バイオ医薬品の製造や輸送、保存中に生じるありとあらゆるストレス（光や振動など）がそれぞれ異なる機序でタンパク質の凝集を引き起こすことから、凝集を効果的に抑制するためには、各ストレスの凝集体生成機序を明らかにすることが肝要である。例えば、輸送時の物理的ストレスによる凝集の場合、製剤容器内壁（固体）やヘッドスペース（気体）との界面へ吸着し、タンパク質が変性することが重要ステップであると考えられている。しかしながら、界面変性については適切な評価系がなく、界面変性に伴う凝集体制生機序の詳細が明らかになっていなかった。また、そのため界面変性に対する安定性が十分に改善されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで解析されていないタンパク質の界面での立体構造変化を詳細に明らかにし、より高品質なバイオ医薬品開発への足がかりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

界面に存在するタンパク質は、溶液全体に存在するタンパク質のごく一部である。また、界面変性したタンパク質同士が何らかの刺激によって衝突すると容易に凝集するため、界面変性タンパク質の選択的なサンプリングや濃縮は困難である。このような理由から、分析に必要な量の界面変性タンパク質を得ることは難しい。その上、界面変性（単量体状態での構造変化）を正確に解析するためには、分析中に凝集が起こらないよう注意が必要である。

本研究では、以下の工夫によってこれらの課題を解決し、気液界面凝集過程における重要ステップである界面でのタンパク質の立体構造変化を明らかにする。

(1) タンパク質泡気液界面評価系

泡の状態は、溶液の状態と比べて表面積が大きい。そのため、泡状態では、大部分のタンパク質が界面に存在するが、大きな表面積によって界面変性タンパク質同士の衝突を抑制することができる。したがって、タンパク質溶液を泡の状態にすることで、分析に十分な量の界面変性タンパク質を単量体の状態で得ることができると考えた。そこではじめに、泡立てに適したタンパク質溶液（モデルタンパク質としてヒト血清アルブミン（Human Serum Albumin, HSA）を用いた）条件（濃度、塩濃度、等）を決定した。その後、泡立て器を用いてタンパク質溶液を泡化したものを気液界面モデルとして用いた。

(2) 水素/重水素交換質量分析による立体構造解析

本研究では、水素/重水素交換質量分析（Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry, HDX-MS）を用いて界面での構造変化を詳細に解析した。HDX-MSは、タンパク質を重水素溶液に溶解した際に起こるアミド水素の重水素交換速度を質量分析により測定する方法で、重水素交換速度は、アミド水素周辺の環境によって変化するため、立体構造の変化が重水素交換速度の差として検出される。得られる立体構造の解像度はアミノ酸数残基レベルであり、ラマン分光法などの分光学的手法よりも解像度の点で優れている。また、HDX-MSは、分析するタンパク質の分子量に制限なく実施可能である。水素/重水素交換は、泡の状態でも実施可能であり、界面

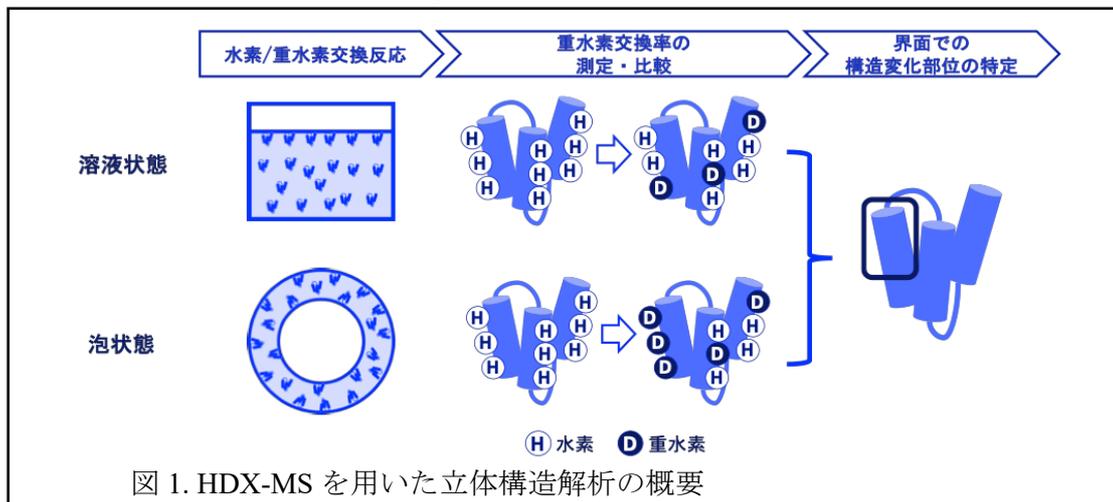


図 1. HDX-MS を用いた立体構造解析の概要

変性タンパク質の凝集につながる可能性のあるサンプリングや前処理は不要である。これらの HDX-MS の特徴は、X 線結晶構造解析や核磁気共鳴法などの従来の構造解析手法には無い特徴であり、気液界面での立体構造変化を明らかにする目的において効果的であった。本研究では、泡状態と溶液状態での重水素交換速度を HDX-MS を用いて比較し、界面での立体構造変化部位を解析した (図 1)。

4. 研究成果

(1) タンパク質泡気液界面評価系の最適化および分析

実験計画法により、タンパク質泡 HDX-MS 分析の実施条件を統計的に最適化し、HSA 濃度、緩衝液の種類、緩衝液の濃度、pH はそれぞれ、10 mg/ml、リン酸緩衝液、100 mM、pH 7 に決定した。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、90 分の泡化時間までは凝集体が増加しないことを確認した。そこで次に、重水素化時間 0, 1, 10, 30, 90 分において溶液状態、泡状態での HDX-MS 分析を実施し、ペプチドごとの重水素交換速度の比較から、気液界面における構造変化を推定した。また、先行研究で報告されている手法により、構造変化のギブズ自由エネルギー変化 (ΔG_{op}) を溶液状態と泡状態それぞれについて算出し、その差を $\Delta\Delta G_{op}$ ($=\Delta G_{op}(\text{泡})-\Delta G_{op}(\text{溶液})$) として評価した (図 2)。この結果から、泡の気液界面において露出される領域が特定された。また、算出した $\Delta\Delta G_{op}$ の値によって HSA の結晶構造を色分けすることで、疎水性薬物結合サイト II として知られる疎水性パッチが気液界面において露出することが示された。このように本研究では、ペプチドレベル (アミノ酸数残基) の構造分解能でタンパク質の界面変性を世界で初めて明らかにした。また、本研究で確立した分析法は、HSA 以外のタンパク質にも適用可能であり、今後、様々なタンパク質について界面変性の詳細な解析を行うことが可能となった。

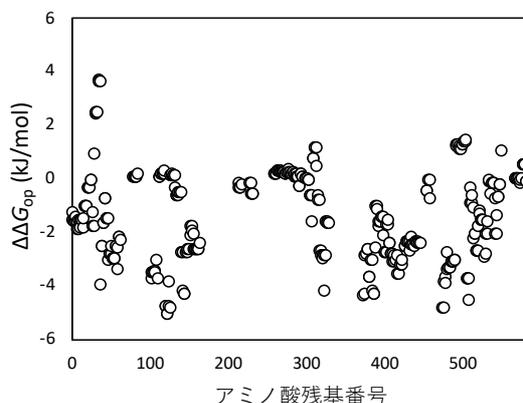


図 2. HDX-MS により算出した各ペプチドの $\Delta\Delta G_{op}$

(2) HDX-MS 分析結果の検証

HDX-MS 分析の結果を、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により検証した。CD スペクトル測定においては、測定上の制限から、HSA 溶液を 1-90 分間泡化した後、溶液に戻してから測定を実施した。その結果、泡化の有無による CD スペクトルの差は見られなかった (図 3)。したがって、HDX-MS 分析の結果も考慮すると、界面上での HSA の構造変化は可逆的で、泡状態から溶液中に戻ると、元の構造に戻ることが示唆された。

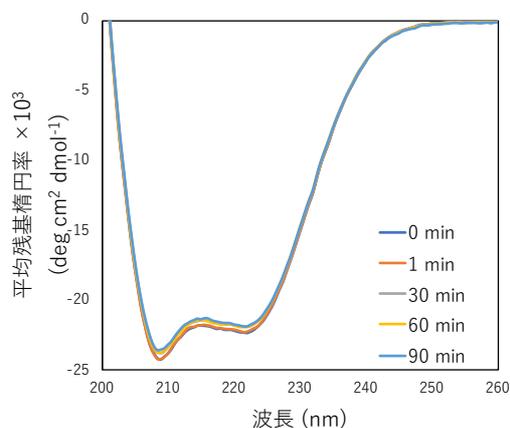


図 3. 消泡後の HSA 溶液の CD スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本敢太、鳥巢哲生、内山進
2. 発表標題 Structural analysis of a therapeutic protein at air-liquid interface
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎本敢太、鳥巢哲生、内山進
2. 発表標題 水素/重水素交換質量分析を用いた気液界面における治療用タンパク質の構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第141会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------