

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590069

研究課題名(和文) 水素/重水素交換反応及び質量分析法による糖タンパク質の高次構造解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of technique for higher order structure of glycoprotein by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry

研究代表者

橋井 則貴 (Hashii, Noritaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号：20425672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖タンパク質の高次構造解析技術を開発する一環として、糖タンパク質のモデルとして抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品を用いて、ヒト可溶性TNF- $\alpha$ との相互作用解析を水素重水素交換/質量分析(HDX/MS)を行った。4種類の抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品について解析した結果、いずれの抗体との相互作用においても、重水素交換率が減少する内部領域があることを明らかにし、抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品は、共通のTNF- $\alpha$ 高次構造変化を利用して薬理作用を発現している可能性を見出した。また、それぞれの抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品のエピトープとなりうる領域を特定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, as part of development of technique for higher order structure of glycoprotein, structural analysis of the anti-TNF- $\alpha$  agents/human soluble TNF- $\alpha$  interaction was performed by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry (HDX/MS). HDX/MS of the TNF- $\alpha$  with or without anti-TNF- $\alpha$  agents was revealed that the 4 agents protected common internal regions of TNF- $\alpha$ . This result suggested that anti-TNF- $\alpha$  agents exhibit pharmaceutical effects via common structural changes of TNF- $\alpha$ . Additionally, characteristic epitopes of these anti-TNF- $\alpha$  agents were also identified by HDX/MS analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：水素重水素交換/質量分析 糖タンパク質 高次構造 抗TNF- $\alpha$ 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が発現するタンパク質の半数以上は糖タンパク質である。糖タンパク質の機能を理解するためには、糖鎖を含めた分子全体の高次構造を明らかにすることが重要である。タンパク質の高次構造解析は、一般に核磁気共鳴法 (NMR) やX線結晶構造解析法などにより行われているが、それらの手法は、技術的な課題や、必ずしも生体内における高次構造を反映していない場合があること等に留意する必要がある。そのため、分子生物学、糖鎖生物学の分野で糖鎖のタンパク質機能発現における重要性が次々と明らかにされているものの、糖タンパク質の高次構造解析の技術開発は発展途上にあるのが現状である。

抗TNF- $\alpha$ 抗体医薬品は、ヒトの炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ を標的とする分子標的薬であり、関節リウマチ、炎症性腸疾患、及び乾癬などの自己免疫が介在する炎症性疾患の治療に用いられている。抗TNF- $\alpha$ 抗体の作用機序については、TNF- $\alpha$ の機能抑制やTNF- $\alpha$ 産生細胞への細胞傷害性などの関与が明らかにされているが、TNF- $\alpha$ の捕捉とその機能阻害の構造的な機序については不明な点が多い。既存の抗TNF- $\alpha$ 抗体医薬品のエピトープ、及び結合により誘起される構造変化を明らかにすることは、新規抗TNF- $\alpha$ 抗体や抗TNF- $\alpha$ 抗体後続品の開発において、有用な情報をもたらすものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖タンパク質の高次構造解析技術の開発を検討するとともに、その機能の構造的背景を解明することを目的として、糖タンパク質のモデルとして抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品を用いて、水素重水素交換/質量分析 (HDX/MS) によりヒト可溶性TNF- $\alpha$ との相互作用解析を行った。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1. 試料等

抗TNF- $\alpha$ 抗体関連医薬品 (抗TNF- $\alpha$ 薬) として、アダリムマブ (アボットジャパン)、インフリキシマブ (田辺製薬)、ゴリムマブ (ヤンセンファーマ)、エタネルセプト (武田薬品工業)、及びヒト可溶性TNF- $\alpha$  (Miltenyi Biotech) を使用した。

### 3 - 2. 抗TNF- $\alpha$ 薬固相化ゲルの作成

HDX 反応後に抗TNF- $\alpha$ 薬をTNF- $\alpha$ から分離し、TNF- $\alpha$ のペプチドマッピングを容易にする目的で、抗TNF- $\alpha$ 薬を固相化した。

4種類の抗TNF- $\alpha$ 薬の5mg相当を脱塩コラム (PD-10 MiniTrap G-25 column, GE Healthcare) で脱塩後、1mLの1Mリン酸緩衝液 (pH 8) に溶解した。この液を、乾燥重量約125mgの活性型レジン (Toyopearl AF-Tresyl-650M, TOSOH) に添加した後、4°Cで約16時間混和して固相化した。反応終了後、0.1M Tris-HCl、0.5M塩化ナトリウム溶液で未反応活性基のブロッキングを行った。

### 3 - 3. TNF- $\alpha$ のHDX反応

上記の方法で抗TNF- $\alpha$ 薬を固相化したビーズの約1/40量を10mM酢酸アンモニウム緩衝液で洗浄し、5 $\mu$ gのヒトTNF- $\alpha$ と共に100 $\mu$ Lの10mM酢酸アンモニウム緩衝液中で一晩混和し、TNF- $\alpha$ と固相化抗TNF- $\alpha$ 薬を結合させた。これを0.005% Triton X-100、100mM酢酸アンモニウム溶液で10分間洗浄して非特異吸着TNF- $\alpha$ を除去し、10mM酢酸アンモニウム緩衝液で平衡化した後、1/5量を取り、液相を60 $\mu$ Lの10mM酢酸アンモニウム重水溶液に置換して25°Cで重水素化を行い、所定時間ののち予冷した250mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl) 水溶液60 $\mu$ Lを加えて、クエンチを行った。ろ過によりビーズを除去して、LC/MS分析試料とした。

### 3 - 4 . LC/MS

回収した重水素化 TNF- $\alpha$  をペプシンカラムで断片化したのちに ,LC/MS で各ペプチドの質量を測定し ,TNF- $\alpha$  の各領域での重水素化率を決定した . 分析条件は以下の通りである .

#### (1) ペプシン消化及び LC

装置: Acquity nano UPLC (Waters)

ペプシンカラム: Poroszyme immobilized pepsin cartridge 2.1  $\times$  30 mm (Applied Biosystems)

トラップ及び分析カラム: Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  5 mm (trap), and 1.0  $\times$  100 mm (analytical column) (Waters)

分析試料 (50  $\mu$ L) を注入し , 流速 100  $\mu$ L/min , pH 2.5 のギ酸水で 2 分間にわたりペプシンカラムとトラップカラムを通過させた . 直後に 8 分間の 0.1%ギ酸 , 8–40%アセトニトリルの直線勾配で , 流速 40  $\mu$ L/min で分離を行った . ペプシンカラムは 20°C , トラップカラムおよび分析カラムは 0°C に保ったチャンパー内に設置した .

#### (2) 質量分析

装置: Synapt G2-S (Waters)

キャピラリー電圧 2.5 V , キャピラリー温度 80°C , 脱溶媒温度 175°C でエレクトロスプレーイオン化を行った . 衝突誘起解離でプロダクトイオンを生成し , プリカーサー・プロダクトイオン共に分解能 18000 で  $m/z$  50–2000 の範囲を観測した .

#### (3) 重水素数の算出

ペプチドの帰属には重水素化時間 0 分の試料を用い , Protein Lynx Global Server software (Waters) で検索した . 重水素化時間 0 分での各ペプチドの重量平均分子量を基準に , 重水素化時の増加質量を取り込み重水素数とした . 重水素数の計算には DynamX DS (Waters) を使用した .

## 4 . 研究成果

### 4 - 1. 本研究で使用した抗 TNF- $\alpha$ 薬

インフリキシマブ , アダリムマブ , ゴリムマブはヒト TNF- $\alpha$  を標的とするモノクローナル抗体である . インフリキシマブはマウスの相補性決定領域とヒトの定常領域を持つキメラ抗体 , 他 2 種は完全ヒト抗体である . エタネルセプトは , ヒト TNF 受容体 2 の細胞外ドメインとヒト抗体の Fc ドメインからなる融合タンパク質であり , TNF 受容体の結合部位 (図 1A) に結合すると考えられる . いずれも約 150 kDa の可溶性タンパク質である . なお , TNF- $\alpha$  を 80°C で 30 分加熱したところ , インフリキシマブ , アダリムマブ , ゴリムマブ , エタネルセプトのいずれに対しても結合性が消失したことから , 本研究で使用した抗 TNF- $\alpha$  薬の標的認識はすべて , 高次構造依存的であると考えられる .

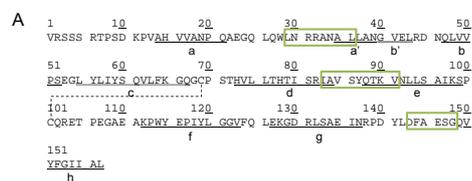


図1 ヒト可溶性TNF $\alpha$ の構造  
A. ヒト可溶性TNF $\alpha$ の一次構造(UniProt: P01375). 下線は結晶構造(図1B)中で $\beta$ -ストランドを形成する領域.  
□はTNF受容体への結合領域であり, 受容体はTNF $\alpha$ 三量体の1つのモ/マーの23–36および143–148と隣接するモ/マーの83–91の3箇所にもたれられる形で結合するとされる. エタネルセプトも同じ部位に結合すると考えられる.  
B. ヒト可溶性TNF $\alpha$ 三量体の結晶構造(PDB: 1TNF). TNF受容体結合領域を緑色で示す.

### 4 - 2. TNF- $\alpha$ のペプチドの帰属

TNF- $\alpha$  のペプシン消化および LC/MS を行い , 重水素数の算出に利用可能なペプチドを確認した . TNF- $\alpha$  の C 末端の 3 残基を除く全域が検出され , 配列の約 97% がカバーされた . ほとんどの残基について互いにオーバーラップする複数のペプチドを得たこと , また 8.5 分以内にペプチドが溶出されたことから , 本分析条件により HDX/MS が可能であることが確認された .

### 4 - 3. 抗 TNF- $\alpha$ 薬結合時・非結合時の TNF- $\alpha$ の HDX/MS

固相化抗 TNF- $\alpha$  薬に結合させた状態で TNF- $\alpha$  の HDX 反応を 1, 10, 100, 1000 分間行い, 抗 TNF- $\alpha$  薬非存在時の重水素取り込みと比較した . 抗 TNF- $\alpha$  薬結合時の重水素化率の変動の経時変化を図 2, 各時点での , 抗 TNF- $\alpha$  薬による重水素取り込み量の変化を図 3 示す . いずれも抗 TNF- 薬非存在時の重水素数を 1.0 としている . 以下でこれらの結果について詳述する .

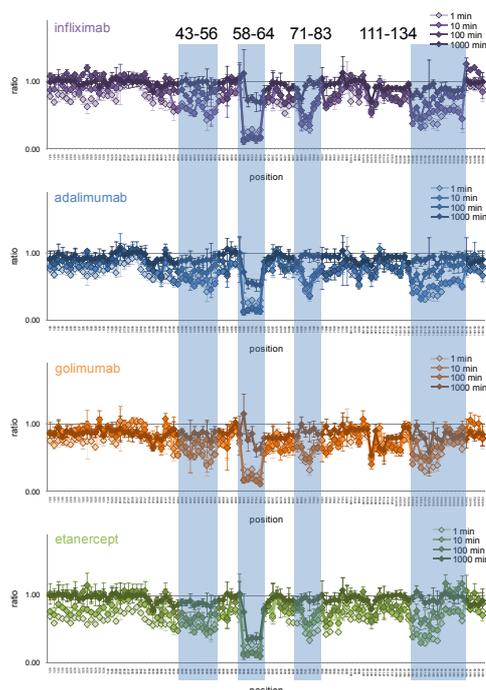


図 2. 抗 TNF- $\alpha$  薬結合時の重水素化率の変動の経時変化

#### 4 - 3 - 1. 共通した重水素化率変化

主な重水素化率に変化がみられた領域は 58-64, 71-83, 111-134, 及び 43-56 の 4 つの領域であり, 4 種の抗 TNF- $\alpha$  薬でいずれも減少傾向がみられた .

抗 TNF- $\alpha$  薬の結合に伴い重水素数が減少する領域には, 次の 2 種類があり得る .

- (1) 抗 TNF- $\alpha$  薬により直接, 溶媒から遮蔽される領域, すなわち抗 TNF- $\alpha$  薬結合部位
- (2) 抗 TNF- $\alpha$  薬は結合しないが, 結合に伴う TNF- $\alpha$  の高次構造変化によって溶媒から遮蔽される領域

図 2 で特に減少率が大きかった 58-64 は,

TNF- $\alpha$  の結晶構造中で 3 量体内部に位置し, また  $\beta$ -ストランドを形成しており, 他のタンパク質との結合領域とは考えにくい . 71-83, 111-134, 及び 43-56 についても, 大部分は  $\beta$ -ストランドであり, 結合領域になりにくいと考えられる . また, インフリキシマブについては過去に, エピトープを示唆する報告がなされているが, これらの領域はそのいずれとも異なる . エタネルセプトはヒト TNF 受容体の配列を持つので, 同様に TNF- $\alpha$  の受容体結合部位を認識するはずであるが, これらは受容体結合部位(図 1A)とも一致しない .

以上より, 4 種類の抗 TNF- $\alpha$  薬で共通の減少領域 58-64, 71-83, 111-134, 及び 43-56 は, 抗 TNF- $\alpha$  薬の結合に伴うアロステリックな高次構造変化によって, 溶媒から遮蔽される領域である可能性が高い . 前述のように, 抗 TNF- $\alpha$  薬の作用の一部は TNF- $\alpha$  の薬物の結合に伴う高次構造変化に依存していることから, この結果は抗 TNF- 薬が作用を発現する際に, いずれも共通する TNF- $\alpha$  の高次構造変化を利用している可能性を新規に示すものである .

#### 4 - 3 - 2. 異なった重水素数変化

主な重水素化率変化が 4 種類のいずれが結合した場合でも共通して見られたのに対し, それぞれの抗 TNF- $\alpha$  薬に固有の変化も, 変化の幅はやや小さいながらも検出された . 図 3 で確認された抗 TNF- $\alpha$  薬間の差異が見られた箇所を以下に挙げる .

135-143 を含むペプチドにおいては, インフリキシマブ(紫)とアダリムマブ(青)の結合時にのみ, 重水素数の減少が大きくなった . この領域は主にループ構造からなり, 前項の 4 領域より結合領域として可能性が高い . また以前の報告において, 変異させるとインフリキシマブ結合性が消失することが明らかにされた 3 残基, 138, 140, 及び 141 を含んでいる . 従って 135-143 での重水素化率減少は,

この領域がインフリキシマブとアダリムマブの結合領域を含んでいる可能性を示す。ただし、インフリキシマブとアダリムマブの間にも 145-154 で重水素化率変化に差が見られたことから、両者の結合領域と高次構造変化が完全に同一ではないことも示唆される。

ゴリムマブ(橙)の結合時には、99-110 及び 65-81 を含むペプチドで、重水素数減少が見られた。エタネルセプト(緑)結合時には、73-87 を含むペプチドにおいて反応時間 1 分で減少が見られたほか、アミノ末端側の 1/3 ほどのペプチド 1-26 から 41-48 にかけても、1~10 分の時点で僅かに重水素化率が低下する傾向が見られた。

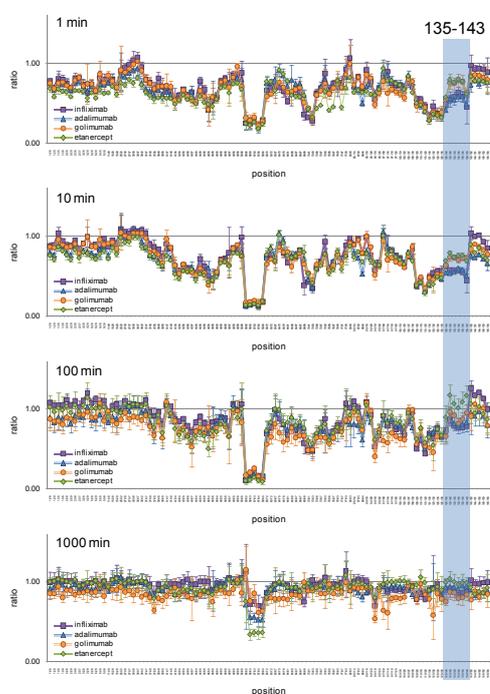


図 3. 各 HDX 反応時間での、抗 TNF- $\alpha$  薬による重水素取り込み量の変化

以上の各抗 TNF- $\alpha$  薬に固有の変化部位のうち、インフリキシマブの 135-143 とエタネルセプトの 73-87 については、結合が示唆されている残基を含んでおり、結合領域での直接的な重水素数減少を検出した可能性が高い。また、それ以外の箇所、および結合領域に関する知見が無いアダリムマブとゴリム

マブに関しては、変化部位は結合領域の候補と考えられる。

本研究では、4 種類の抗 TNF- $\alpha$  薬の結合に伴う、TNF- $\alpha$  の溶媒との接触の変化を HDX/MS により解析した。その結果、4 種類のいずれが結合した場合でも、類似した重水素化率変化が起こることを明らかにするとともに、異なる抗 TNF- $\alpha$  薬が共通の TNF- $\alpha$  高次構造変化を利用して薬理作用を発現している可能性を見出した。また、エピトープ候補となる、それぞれの抗 TNF- $\alpha$  薬に固有の重水素化率変化を数ヶ所で検出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) Nakazawa, S., Ahn, J., Hashii, N., Hirose, K., Kawasaki, N.: Analysis of the local dynamics of human insulin and a rapid-acting insulin analog by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* 1834, 1210-1214 (2013). 査読有
- 2) Nakazawa, S., Hashii, N., Harazono, A., Kawasaki, N.: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 420, 61-67 (2012). 査読有

[学会発表](計 7 件)

- 1) 橋井則貴, 水素 / 重水素交換質量分析を用いたバイオ医薬品の高次構造解析, 第 5 回生体相互作用解析フォーラム (2014.4)
- 2) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ: 水素 / 重水素交換および質量分析法を利用し

た tumor necrosis factor alpha(TNF $\alpha$ )アン  
タゴニストと TNF $\alpha$  の相互作用解析, 日  
本薬学会第 134 年会(2014.3)

- 3) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ: Analysis of interaction between TNF $\alpha$  and anti-TNF $\alpha$  agents using hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, 第 86 回日本生化学会(2013.9)
- 4) Nakazawa, S., Hashii, N., Kawasaki, N., Analysis of interaction between TNF-alpha and anti-TNF-alpha agents using hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry, 61<sup>st</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (2013.6)
- 5) 橋井則貴, 中澤志織, Joomi Ahn, 廣瀬賢治, 川崎ナナ, 水素重水素交換 / 質量分析によるヒトインスリンアナログの多量体安定性に関する部位の特定 .第 85 回日本生化学会大会(2012. 12)
- 6) 橋井則貴, 中澤志織, Joomi Ahn, 廣瀬賢治, 川崎ナナ, 水素 / 重水素交換質量分析によるヒトインスリンアナログの多量体安定性解析 . Biological Mass Conference (2012. 11)
- 7) Nakazawa, S., Hashii, N., Kawasaki, N. Analysis of interaction between TNF- $\alpha$  and anti-TNF- $\alpha$  agents by hydrogen deuterium exchange/mass spectrometry. 19th International Mass Spectrometry Conference (2012. 9)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

橋井 則貴 (HASHII Noritaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・  
室長

研究者番号 : 20425672

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし