

水素重水素交換質量分析を用いたバイオ医薬品の分析



技術解説

鳥 巢 哲 生*

Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry for Biopharmaceuticals

Key Words : Mass spectrometry, Hydrogen/deuterium exchange, Biopharmaceutical, Antibody

はじめに

バイオ医薬品とは、分子量が数千以上のペプチド、タンパク質またはそれらの誘導体を有効成分とし、バイオテクノロジーを活用して生産される¹⁾。タンパク質は多数のアミノ酸がペプチド結合で重合したポリペプチドで、ジスルフィド結合に加え、疎水性相互作用や水素結合などの非共有結合により三次元の立体構造をとる。タンパク質の活性は高次構造と関連しており、タンパク質の立体構造解析は、タンパク質の機能を理解するために重要である。また、バイオ医薬品の分析においては、品質確保の観点から、製造されたタンパク質の立体構造の確認は必須である。

タンパク質の高分解能での高次構造解析には、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法 (NMR)、クライオ電子顕微鏡がよく利用される。単純な質量分析では、質量の情報しか得られないため、タンパク質の立体構造解析に質量分析を用いることは難しいと思われるかもしれないが、ラベル化と質量分析を組み合わせたタンパク質立体構造分析法がある。その一つが水素重水素交換質量分析 (Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry ; HDX-MS) であり、HDX-MS では質量分析の前に重水素によるラベル化を行う。さらに、質量分析前にプロテアーゼによる消化を行うことで、アミノ酸数残基レベル (ペプ

チドレベル) の構造分解能でタンパク質の立体構造に関する情報を得ることができる。HDX-MS は他の方法と比較して、分子量が 100 kDa 以上の大きなタンパク質も分析可能である、様々な溶媒条件に対応できる、という特徴がある。また、HDX-MS はタンパク質複合体の立体構造解析にも利用されており、直接的に結合に関与する部位の特定はもちろんのこと、アロステリックな構造変化も解析可能である。また、前処理の自動化やソフトウェア、コンピュータの進歩・改善により、HDX-MS は身近な方法となり、ユーザーが増加している。

バイオ医薬品開発において HDX-MS は、エピトープマッピングや特性評価に活用されている。本稿では、HDX-MS の概要や原理について説明し、その後 HDX-MS を用いたバイオ医薬品の分析例を紹介する。

HDX-MS の概要

はじめに、現在良く利用されている液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography ; LC) とペプシンなどによる消化、HDX-MS を組み合わせたボトムアップ HDX-MS の一般的なワークフロー (図 1) について概説する。

ボトムアップ HDX-MS の測定では、はじめにタンパク質を重水素溶媒中に溶解し、重水素交換反応を行う。タンパク質が重水素溶媒中に存在するとき、硫黄、酸素、窒素などのヘテロ原子に結合した水素は、ヘテロ原子との電気陰性度の違いから同位体との交換反応が容易に起こる。一方で、炭素に結合した水素は通常の HDX-MS で測定可能な時間内には交換されない。主鎖アミド水素は、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造形成に重要な水素結合を形成するため、その重水素交換率はタンパク質立体構造の良い指標となる。そのため、タンパク質の



* Tetsuo TORISU

1984年10月生まれ
大阪大学大学院薬学研究科創成薬学専攻
(2018年)

現在、大阪大学 大学院工学研究科 生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域 准教授 博士(薬科学)
専門/タンパク質科学、薬系分析

E-mail : tetsuo.torisu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

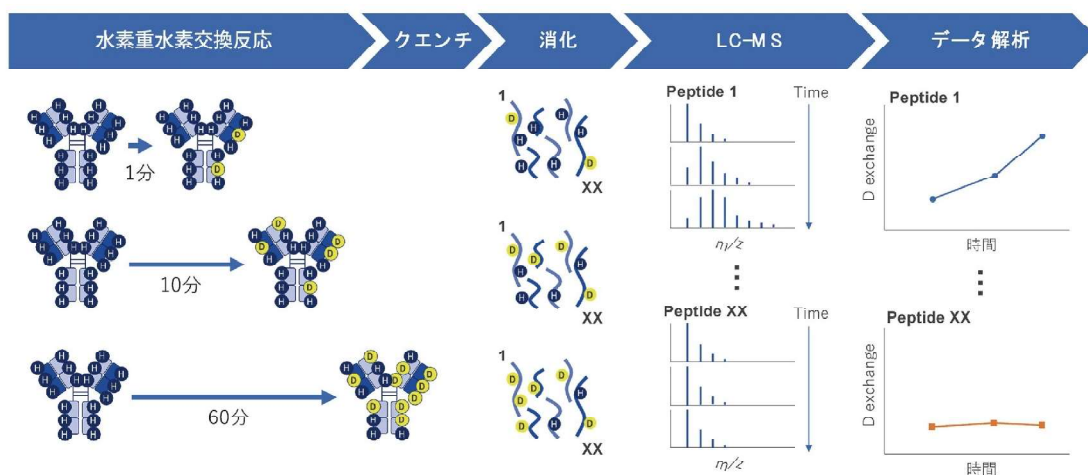


図1. ボトムアップ HDX-MS のワークフロー (例)

HDX-MS では、主に主鎖アミド水素の重水素交換率をモニターする²⁾。

重水素交換反応後、ペプシン等の酵素によってタンパク質をペプチドにまで切断する。得られたペプチドは LC-MS により分析する。この一連の操作を、様々な水素重水素交換反応時間で実施し、ペプチドごとに重水素交換の速さを評価し、タンパク質の立体構造や相互作用部位などについて考察を行う。

重水素交換後の工程での水素への逆交換反応を抑制するために、重水素交換反応後に交換反応をクエンチする必要がある。後述の通り、アミド水素の交換は、pH と温度に強く依存し、4℃ 以下、pH2.5 の条件にすると、分析に影響が出ない範囲まで反応速度を低下させることができる。また、酵素消化中の逆交換反応を防ぐために、消化にはペプシンなどの低温、pH 2.5 で活性を有する酵素が用いられる。

側鎖のヘテロ原子に結合した水素も重水素に交換され、その速度は pH や温度に依存するが、主鎖のアミド水素とは pH 依存性などが異なる。そのため、主鎖アミド水素の重水素交換反応のクエンチ条件 (一般に pH 2.5, 0℃) では、側鎖水素の水素重水素交換反応速度は、主鎖アミド水素よりも速くなり、クエンチ後に逆交換反応が起こる。

ペプチドやタンパク質の重水素取り込み量は、それぞれの交換時間における同位体分布の重心 (セントロイド) から重水素化処理を行っていないコントロールのセントロイド値を差し引いたものとして計算される。または、逆交換量に基づいて補正した以下の式により重水素取り込み量 D を計算する場合

もある。

$$D = [(m - m0\%)/(m100\% - m0\%)] \times N$$

ここで、m は各時点でのセントロイド質量、m0% および m100% はそれぞれ重水素化処理を行っていないコントロールおよび完全重水素化コントロールのセントロイド質量、N はペプチド中のアミドの数である。完全重水素化コントロールは、例えば、変性剤存在下、室温、pH3-4 で12-24 時間重水素化を行うことで調製することができる³⁾。タンパク質やペプチドの重水素取り込み速度は、横軸に時間、縦軸に重水素取り込み量をプロットしたもので表すことができる。リガンドの有無など異なる条件下での重水素取り込み速度を比較することで、各条件での立体構造や相互作用部位を考察する。

アミド水素の重水素交換速度は主に分子内水素結合と溶媒へのアクセス性に依存するため (後述)、水素結合状態の変化や、アミド水素の溶媒からの保護・暴露によって重水素交換速度が変化する。例えば、分子間相互作用に直接関与するアミド水素は、通常タンパク質の表面に位置しており、非結合状態では完全に溶媒和され、高速な重水素交換を示すと考えられる。一方で、結合状態では溶媒へのアクセス性が低下するためより遅い重水素交換速度となると考えられる。したがって、複合体形成時に重水素交換速度が減少したアミド水素は、結合界面に位置すると推察される。しかしながら、結合に伴って、結合部位以外の部分で構造変化が起こり、重水素交換速度が変化する可能性もある (重水素交換速度が減少したアミドが必ずしも結合界面でない可能性が

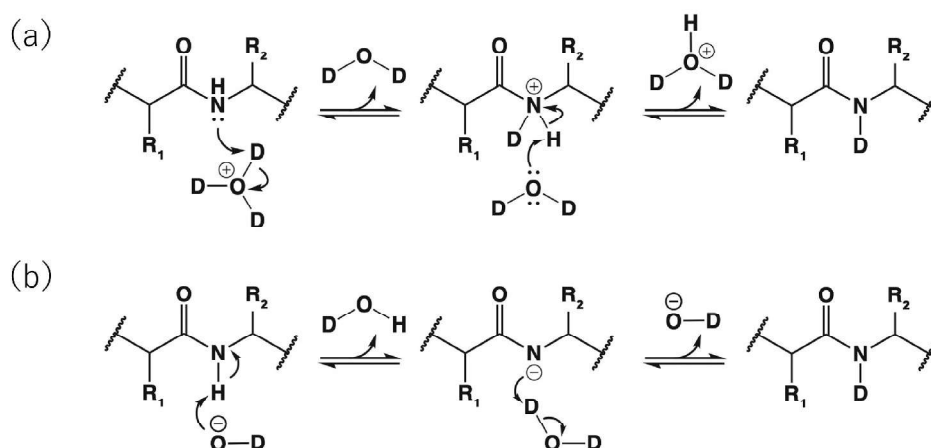


図2. 酸触媒反応 (a) と塩基触媒反応 (b)

ある)。そのため、HDX-MSの結果の解釈は慎重に行う必要がある。

アミド水素の重水素交換反応速度

アミド水素の重水素交換反応は主に、酸触媒反応、塩基触媒反応に分けられる (図2)。そのため、タンパク質の立体構造の影響を考慮しない場合、アミド水素の重水素への化学的交換速度定数 (k_{ch}) は次のように書くことができる。

$$k_{\text{ch}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]$$

ここで、 k_{H} と k_{OH} はそれぞれ酸触媒反応と塩基触媒反応の反応速度定数、 $[\text{H}^+]$ と $[\text{OH}^-]$ はそれぞれ水素イオンと水酸化物イオンの濃度である。20℃、低塩濃度条件下でポリ DL-アラニンに対して決定された速度定数は、 $k_{\text{H}} = 41.67 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{\text{OH}} = 1.12 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であった⁴⁾。これらから明らかのように、重水素交換反応は pH 依存的であり、 k_{ch} は pH 2.5-3.0 で極小値をとり、極小値をとる pH より高い pH では塩基触媒反応の寄与が高く、低い pH では酸触媒反応の寄与が大きくなる。タンパク質の研究がよく行われる pH > 4 の範囲での水素重水素交換反応は、主に塩基触媒反応である。生理的な pH に近い pH 7 付近で重水素交換反応をおこなった場合、pH を 2.5 まで下げると交換反応速度は 4 桁程度減少する ($1/10^4$ になる)。従って、pH を 2.5 付近にすることで、その後の LC-MS による重水素取り込み量の測定に必要な時間を確保することができる。

また、水素重水素交換反応速度は温度にも依存す

る。温度が上昇すると、水のイオン化定数が変化し、水酸化物イオンの濃度が上昇する。そのため、温度を上げると水素重水素交換反応速度は上昇し、温度を下げると低下する。水素重水素交換反応の温度依存性は、アレニウス式に基づいて考えることができる。つまり、 k_{ch} と温度の関係は指数関数的である。過去の報告によると、温度を 25℃ から 0℃ へ下げると、水素重水素交換反応速度は 10 倍程度低下する⁴⁾。したがって、pH 7、25℃ で重水素交換反応を行った後、pH 2.5、0℃ にすると、交換速度は約 5 桁減少する。

溶媒の組成も重水素交換反応速度に影響する。溶媒が完全な水系ではなく、有機溶媒を含む場合は、水のイオン化定数が減少するため、水酸化物イオンの濃度が低下し、重水素交換反応速度も低下する。したがって、一般的に用いられる逆相 LC-MS による分析においては、水系溶媒中よりも逆交換反応が起こりにくい。

pH、温度、溶媒組成に加えて、隣接するペプチド側鎖やイオン強度も重水素交換反応速度に影響することが知られているが^{4),5)}、ここでは詳細は割愛する。

HDX-MSの結果とタンパク質の構造の関係

立体構造をとらないペプチドのアミド水素は生理的条件下で速やかに重水素に交換される。一方で、三次元構造に折り畳まれた天然状態のタンパク質中のアミド水素の交換は遅く、半減期はミリ秒から数ヶ月である²⁾。

天然状態でのアミド水素の重水素交換反応の律速段階が、溶媒の水酸化物イオンによるプロトンの引き抜きであることを考慮すると、タンパク質中のアミド水素の交換速度は、アミドが分子内水素結合に関与しているか、溶媒へのアクセス性（溶媒に露出しているか、タンパク質内部に埋もれているか）によって決まる。

天然状態のタンパク質の表面にあり、特定の高次構造をとらず完全に溶媒和された（分子内で水素結合していない）アミド水素は急速に交換される。また、タンパク質の折り畳まれた部位においても、表面にある完全に溶媒和されたアミド水素は、立体構造をとっていないアミドと比較すると1-2桁程度遅いものの、比較的容易に重水素に交換される。一方で、構造部位のアミド水素が重水素へ交換されるためには、溶媒中の水酸化物イオンがタンパク質内部に埋もれたアミド水素へアクセスする必要があるため、タンパク質立体構造の変化が必要となる。1950年代にLinderstrøm-Langらによって、天然状態のタンパク質の立体構造ダイナミクスと水素重水素交換の理論的関係性が示された。天然タンパク質の構造部位におけるアミド水素の交換プロファイルは、ローカルおよびグローバルな構造の可逆的アンフォールディング（開閉）モデル（Linderstrøm-Langモデル（図3））によって説明できると考えられている。Linderstrøm-Langモデルでは、構造部位のアミド水素の交換は、Linderstrøm-Langによってタンパク質の呼吸運動と表現された構造の可逆的なゆらぎを通じて起こる。構造のゆらぎが起こりアミドの水素結合が失われると、水酸化物イオンがアミド水素へアクセスし水素を引き抜くことが可能となる。

Linderstrøm-Langモデルでは、折り畳まれたタンパク質の水素重水素交換反応が、先述の化学的交換反応速度だけでなく、構造ダイナミクス（立体構

造の開閉）の影響を受ける。このモデルにおいて、立体構造を考慮したタンパク質の水素重水素交換反応速度定数 k_{HDX} は以下の通り表すことができる。

$$k_{\text{HDX}} = (k_{\text{op}} \times k_{\text{ch}}) / (k_{\text{ch}} + k_{\text{op}} + k_{\text{cl}})$$

タンパク質が安定な条件であれば、 $k_{\text{op}} \ll k_{\text{cl}}$ であるため、上の式は、以下の通り簡略化できる。

$$k_{\text{HDX}} = (k_{\text{op}} \times k_{\text{ch}}) / (k_{\text{ch}} + k_{\text{cl}})$$

$k_{\text{cl}} \ll k_{\text{ch}}$ の場合、すなわちアミド水素が交換可能な（Open）状態で重水素交換に十分な時間存在する場合は、 $k_{\text{HDX}} = k_{\text{op}}$ とみなすことができる。この $k_{\text{cl}} \ll k_{\text{ch}}$ の場合の重水素交換反応はEX1反応と呼ばれる。一方で、 $k_{\text{cl}} \gg k_{\text{ch}}$ の場合は、EX2反応と呼ばれ、

$$k_{\text{HDX}} = (k_{\text{op}} \times k_{\text{ch}}) / k_{\text{cl}} = K_{\text{op}} \times k_{\text{ch}}$$

となる。ここで K_{op} はタンパク質の立体構造が開閉する反応の平衡定数である。生理的な条件下では、多くのタンパク質が天然状態で安定しており、Open状態からClose状態への変化は速い。そのため、EX2の重水素交換反応が主に観察される。

HDX-MSでは、EX1またはEX2反応を視覚的に区別することができる。EX2反応では、複数回の構造の開閉を通じてアミド水素が徐々に重水素化されるため、同位体プロファイルは二項分布のようなパターンとなり、同位体プロファイルから計算したセントロイド値は徐々に増加する。一方、EX1反応では、一度構造がOpen状態となると重水素化反応が完了するため、重水素化されているものとされていないものの二峰性の同位体パターンとなる。

EX2反応においては、 k_{HDX} がタンパク質の開閉反応の平衡定数に比例することから、ペプチドの重水素交換速度から構造の局所的な安定性を見積もることができる。タンパク質の可逆的アンフォールディング（開閉）に関する自由エネルギー（ ΔG_{op} ）は以下の式で表される。

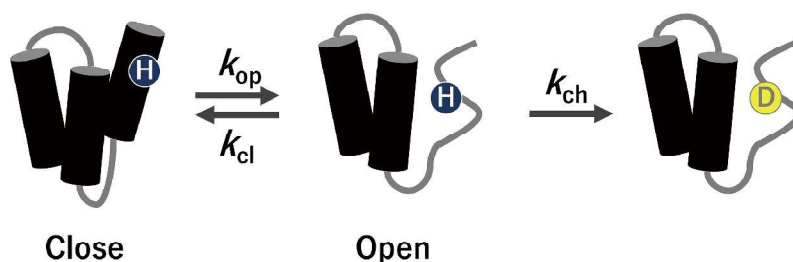


図3. Linderstrøm-Langモデル

$$\Delta G_{op} = -RT \ln K_{op} = RT \ln (k_{ch} / k_{HDX})$$

ここで、 R は気体定数、 T は絶対温度である。 k_{ch} / k_{HDX} は、プロテクションファクター (PF) と呼ばれ、構造を取らず完全に溶媒和したアミド水素では $PF = 1$ となる。立体構造をとるタンパク質の場合は、水酸化物イオンからアミドが保護されることから、 $PF > 1$ となる。タンパク質が2つの状態 A、B をとる場合、2つの状態の ΔG_{op} の差は以下の通りである。

$$\begin{aligned} \Delta \Delta G_{op} &= -RT \ln K_{op,B} + RT \ln K_{op,A} \\ &= -RT \ln (k_{HDX,B} / k_{HDX,A}) \end{aligned}$$

ここで、 $k_{HDX,B}$ と $k_{HDX,A}$ は状態 A と状態 B での立体構造を考慮したタンパク質の水素重水素交換反応速度定数である。

HDX-MS による抗体の分析

抗体医薬品は、バイオ医薬品の中でも特に開発が盛んである。以下では、HDX-MS を用いた抗体の分析に関する研究例を紹介する。

i) 抗体と Fc 受容体の相互作用に関する研究

医薬品として用いられる抗体 (免疫グロブリン G; IgG) の機能の中の一つに Fc γ 受容体 IIIa (Fc γ RIIIa) との相互作用を介した抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性がある。IgG と Fc γ RIII 間相互作用には、IgG の Fc 領域のみが関与していると考えられていたが、近年の研究で、Fab 領域も IgG-Fc γ RIII 相互作用に影響する可能性が示唆された⁶⁾。そこで、山口らは HDX-MS およびクロスリンク質量分析法を用いて、IgG-Fc γ RIII 複合体形成に伴う相互作用部位と構造変化を検証した⁷⁾。その結果、Fab 領域の CL ドメインが Fc γ RIIIa に近接しており、Fc γ RIIIa の D1 および D2 ドメインと特異的に相互作用していることが推察された。バイオレイヤー干渉法による相互作用解析の結果とも合わせ、IgG-Fc γ RIII 間相互作用は主に IgG-Fc 領域と Fc γ RIIIa-D2 ドメインとの結合によるものであるが、IgG-Fab 領域と Fc γ RIIIa との相互作用が複合体を安定化すると考えられた。さらに、IgG-Fc γ RIII 相互作用に対する抗原結合の影響についても HDX-MS 等で検討した結果、抗原結合により Fab 領域の結合部位以外の部分についても構造変化が起こることが示された。さらに興味深いことに、抗原結合に伴う構造変化は、IgG-Fc γ RIII

相互作用をより安定化することも明らかとなった。

ii) 抗体の凝集部位に関する研究

抗体を含むタンパク質は凝集しやすい性質を持っている。タンパク質凝集体は免疫原性を持ち、薬効の低下や副作用を引き起こす可能性があるため、医薬品製剤開発においては、凝集安定性の改善が一つの課題となっている。野田らは、抗体の凝集体形成について、HDX-MS を用いて、凝集反応初期に凝集を引き起こす領域を特定した⁸⁾。IgG を 65°C で 5 分間加熱し、生成した可溶性凝集体を分取精製し、HDX-MS で分析を行った。その結果、複数の領域で加熱に伴う構造安定性の変化が見られた。IgG を 40°C で 3 ヶ月加熱した試料については、凝集体の生成はみとめられなかったものの、HDX-MS ではいくつかの領域で構造安定性の変化が見られた。2つの HDX-MS の結果の比較から、65°C で 5 分間加熱した可溶性凝集体画分における構造変化部位の中で、40°C で 3 ヶ月加熱した試料の構造変化部位とは異なる部位 (Fc 領域の I257-W281) が明らかとなった。さらに、この部位は *in silico* による分析で凝集傾向が高いことが確認された。以上の結果から、Fc 領域の I257-W281 の露出が凝集体形成のトリガーであると考えられた。

iii) バイオシミラーの開発に関する研究

バイオ医薬品の特許が切れると、先行品と有効成分が「同等」な後発品 (バイオシミラー) が開発される。バイオシミラーの開発においては、先行品との同等性を示す必要があり、高次構造の同等性は重要な評価項目の一つとなっている⁹⁾。そこで、HDX-MS を活用した高次構造の同等性評価が検討されている。HDX-MS を用いて、抗体の相補性決定領域中のアスパラギン酸の異性化やメチオニンの酸化に伴う構造変化を特定した報告があり¹⁰⁾、HDX-MS は、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定や赤外分光法、ラマン分光法などの分光学的手法では特定できないような軽微で局所的な変化を検出することができると考えられる。そのため、先行品と後発品それぞれの重水素交換速度を比較し、タンパク質の全領域において先発品と有意な差がないことを示すことで、高次構造が同等であることをはっきりと示すことができる¹¹⁾。

おわりに

冒頭でも述べた通り、ハードウェアとソフトウェアの両方の改善により、HDX-MSは特別な分析法ではなく広く普及した方法となってきた。しかしながら、未だ課題や改善点もある。2022年4月に開催された3rd International Conference on Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDXMS 2022) では、HDX-MS in the Alpha Fold 2 world、HDX beyond the peptide unit、HDX Data sharingの3つのテーマについてディスカッションが行われた¹²⁾。これらのテーマからも分かるように、人工知能を用いたタンパク質の構造予測を活用したHDX-MSの進化が今後特に期待される。例えば、人工知能やコンピュータの発展は、データ解析によるHDX-MSの構造分解能の向上(HDX-MSのデータに基づく詳細な構造予測)につながると考えられる。また、そのようなソフトウェアの開発にはデータの共有が有用であると考えられるため、データ共有の仕組みを整備する必要がある。

また、HDX-MSのバイオ医薬品開発への活用も進んでいる。HDX-MSの普及と発展が、バイオ医薬品開発の加速や、より安全で効果の高いバイオ医薬品開発につながると期待している。

参考文献

- 1) 石井明子・川西徹・長野哲雄：「バイオ医薬基礎から開発まで」, 東京化学同人 (2020)
- 2) David D, Weis : 「Hydrogen Exchange Mass Spectrometry of Proteins」, Wiley (2016)
- 3) Masson GR, Burke JE, Ahn NG, et al. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat Methods*. 2019;16(7):595-602.
- 4) Bai Y, Milne JS, Mayne L, Englander SW. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins*. 1993;17(1):75-86.
- 5) Molday RS, Englander SW, Kallen RG. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Biochemistry*. 1972;11(2):150-158.
- 6) Yogo R, Yamaguchi Y, Watanabe H, et al. The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc γ receptor III. *Sci Rep*. 2019;9(1):11957.
- 7) Yamaguchi Y, Wakaizumi N, Irisa M, et al. The Fab portion of immunoglobulin G has sites in the CL domain that interact with Fc gamma receptor IIIa. *MAbs*. 2022;14(1):2038531.
- 8) Noda M, Ishii K, Yamauchi M, et al. Identification of IgG1 Aggregation Initiation Region by Hydrogen Deuterium Mass Spectrometry. *J Pharm Sci*. 2019;108(7):2323-2333.
- 9) 鳥巢哲生・尾山博章・内山進：水素/重水素交換質量分析法によるタンパク質の高次構造解析, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, Vol.66, No.6, pp.218-221 (2018)
- 10) Yan Y, Wei H, Fu Y, et al. Isomerization and Oxidation in the Complementarity-Determining Regions of a Monoclonal Antibody: A Study of the Modification - Structure - Function Correlations by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2016;88(4):2041-2050.
- 11) Fang J, Doneanu C, Alley WR Jr, Yu YQ, Beck A, Chen W. Advanced assessment of the physicochemical characteristics of Remicade® and Inflectra® by sensitive LC/MS techniques. *MAbs*. 2016;8(6):1021-1034.
- 12) 3rd International Conference on Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDXMS 2022): http://www.hdxms2022.org/resources/Programme_Final.pdf