[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

水素重水素交換質量分析法による カルモジュリンのコンフォメーション特性決定

Joomi Ahn, Martha Stapels, Michael Eggertson, Keith Fadgen, and Ying Qing Yu
Waters Corporation, Milford, MA, U.S.

アプリケーションの利点

水素重水素交換法と高分解能質量分析（MS）法を併用して、アポカルモジュリンとホロカルモジュリンとの間にみられるコンフォメーションの変化を明らかにします。

ウォーターズのソリューション

nanoACQUITY UPLC® HDX テクノロジー搭載システム
Xevo® QTof MS
ProteinLynx Global SERVER ™ ソフトウェア

キーワード

水素重水素交換質量分析法、HDXテクノロジー、タンパク質コンフォメーション

はじめに

タンパク質療法の適切な生物学的機能を得るには、正しいタンパク質コンフォメーションが不可欠です。生物薬剤分野ではタンパク質コンフォメーションの変化が大きな関心を集めており、コンフォメーション特性の決定は難しい課題となっています。タンパク質の高次構造の研究には、円偏光二色性（CD）、示差走査熱量測定法（DSC）および超遠心法（AUC）など、多くの分析手法が用いられています。しかしながら、このような方法はタンパク質の全般的なコンフォメーションを知るものであり、コンフォメーションの変化が起こっている位置を特定することはできません。高い分解能を持った核磁気共鳴（NMR）や X 線結晶回折法によって、タンパク質構造を明らかにすることは可能ですが、いずれの方法にも相当量の試料が必要であり、多大な時間と労力を要するため、生物薬剤製品のルーチン分析に用いられてはいません。

水素重水素交換（HDX）または水素 - 重水素交換質量分析法（HDX-MS）は、タンパク質の動態およびタンパク質のコンフォメーションの変化についての知見を得るうえで有用な分析方法であることが知られています [1]。HDX 分析を行なうには、0℃でクロマトグラフィーによる迅速分離を行うことが可能でかつ、重水素標識した微量のタンパク質およびペプチドの質量を正確に測定することができる LC/MS システムが必要になります [2]。

UPLC® 分離テクノロジーおよび高分解能 MS を用いて HDX 分析を行うことで、微細なコンフォメーションの変化を明らかにし、ペプチドレベルでこのような変化が起こった位置を決定することが可能になります。

図 1. HDX テクノロジー搭載 nanoACQUITY UPLC システム。上から順に、HDX マネージャ、バイナリーソルベントマネージャ（BSM）およびオグジャリーソルベントマネージャ（ASM）。HDX マネージャは重要な構成品として、オンラインでペプシン消化を行い、HDX MS に必要な低温（0℃）を維持します。

実験方法

タンパク質調製:	Sigma社製ウシカルモジュリン
タンパク質緩衝液:	20 mM HEPES 水溶液pH 7.40（50m molカルシウム添加有りと無し）[3]
D_2O標識溶液:	20 mM HEPES 99.99% D2O pD 7.40（50m molカルシウム添加有りと無し）[3]
冷却溶液:	33 mM HCl 水溶液pH 2.50

分析条件

LC条件:

LCシステム:	Waters nanoACQUITY UPLC HDX システム
ペプチド分析用カラム:	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 1.7 µm 1.0 x 100 mm
インタクトプロテイン分析用カラム:	ACQUITY UPLC BEH C_4 1.7 µm 2.1 x 50 mm
トラッピングカラム:	ACQUITY VanGuard®プレカラム、BEH C_{18}, 2.1 x 5 mm
脱塩カラム:	MassPREP™ 脱塩カラム、2.1 x 5 mm
カラム温度:	0℃
オンライン消化用カラム:	Applied Biosystems社製固定化ペプシンカラム2.1 x 30 mm
流速:	40 µL/分
移動相A:	0.1 %ギ酸水溶液　pH 2.1
移動相B:	0.1%ギ酸アセトニトリル溶液　pH 2.1
グラジエント:	3-40% B/7分
補助移動相	
フェーズA:	酵素消化フロー用として0.05%ギ酸水溶液　pH 2.50
トラッピング条件:	100 µL/分で3分

MS条件:

MSシステム:	Waters Xevo QTof MS
イオン化モード:	ESI+
キャピラリー電圧:	3.0 kV
コリジョンエネルギー:	6 V
コーン電圧:	35 V
ソース温度:	80℃
脱溶媒温度:	175℃
ロックマス溶液:	グルフィブリノペプチド100 fmol（0.1%ギ酸添加50%アセトニトリル溶液）
ロックマス流速:	5µL/分
データマネージメント:	MassLynx 4.1ソフトウェア、ProteinLynx Global SERVER(PLGS)ソフトウェア

この革新的なテクノロジーを使用することで、タンパク質コンフォメーション研究がさらに実践的なものになります。nanoACQUITY UPLC HDX テクノロジーは、タンパク質医薬品の高次構造を研究している生物工学研究者たちにとって効果的な分析手段として採用されています。高次構造の特性決定は、創薬段階および早期開発段階での重要な因子のひとつであり、このテクノロジーを用いることによって、生物薬剤の安全性および効果を理解するうえで特筆すべき利益が得られると考えられます。

本アプリケーションノートでは、HDX テクノロジーを搭載した nanoACQUITY UPLC システムを紹介します（図 1）。システムは、nanoACQUITY UPLC バイナリーソルベントマネージャ（BSM）、オグジャリーソルベントマネージャ（ASM）および HDX マネージャによって構成されています。HDX マネージャは 0℃条件下で、オンラインでの迅速なタンパク質消化、脱塩および高分解能クロマトグラフィーを行なうことが可能です。分析中の重水素の損失を減少させるには、0℃で操作することが必要です。このシステムを用いることで、きわめて再現性の高い HDX 条件で、重水素取り込みのわずかな差を適切に測定することができます。ProteinLynx Global SERVER(PLGS) ソフトウェアと、あわせて MS^E を用いることの出来る Xevo QTof MS を使用することは、正確な質量分析および信頼性のある酵素消化ペプチドの帰属を行なう上で理想的な手段といえます。

このテクノロジーについて明らかにするために、ウシカルモジュリン（CaM）のコンフォメーションの変化を検討しました。カルモジュリンは重要な細胞内カルシウム受容体であり、カルシウム結合下でコンフォメーションを変化させることが知られています [3]。この変化が目的タンパク質の生物活性の調整に関与していることが知られています。本アプリケーションでは、コンフォメーションの変化を調べる実験手順を示すために、タンパク質レベルおよびペプチドレベルで HDX テクノロジーを搭載した nanoACQUITY UPLC システムを用いた HDX ワークフローについて記載します。

結果および考察

試料調製

カルシウム添加したものと、しないものそれぞれのタンパク質緩衝液を用いて、ウシのホロカルモジュリンおよびアポカルモジュリンを調製しました。それぞれのタンパク質を 20 倍に希釈した D_2O 溶液で標識し、室温で 10 秒、1 分、10 分、60 分および 240 分インキュベートしました。標識反応は、冷却溶液を添加して急冷し、0℃、pH 2.5 にの条件に保ちました。

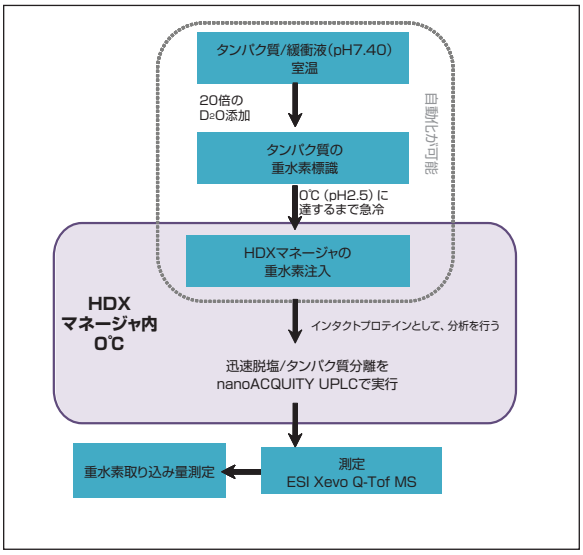

図 2. インタクトプロテイン分析の HDX ワークフロー。目的タンパク質を 0℃（pH 2.50 ）に達するまで急冷し、HDX マネージャに注入。オンライン脱塩および分離は 0℃で行われています。

インタクトプロテインの HDX 分析

HDX 分析を行なう際、分析対象タンパク質と対照タンパク質の重水素取り込みを比較することによって、全体的なコンフォメーションの変化に関する情報が得られます。図 2 にインタクトプロテインの HDX ワークフロー図示しました。タンパクの重水素標識は、10 秒～ 4 時間の範囲内で時間を選択してインキュベーションを行ないます。

溶液中で交換反応が起こっている間に、タンパク質主鎖にあるアミド水素が交換されます。このときの速度は、重水素に対する接触のしやすさと水素結合によって決まります。高次構造に差がある場合、時間毎にみた重水素取り込みは、コントロールタンパク質と分析対象タンパク質との間で異なると考えられます。交換反応は、低温かつ酸性（pH 2.50）の緩衝液を用いて急冷したのち、HDX マネージャに迅速注入します。HDX マネージャ内の温度は 0℃に設定して逆交換を最小限に抑えます。100%H_2O を含む LC 移動相で重水素を水素に逆交換することが起きうるため、この逆交換を管理する必要が求められます。逆交換を最小限に抑えるには低温、酸性 pH およびごく短時間で分析を行なう必要があります。HDX マネージャと nanoACQUITY UPLC システムとの組み合わせは、0℃での迅速な操作など特殊な HDX 分析に要求される条件を満たすように設計されています。

ウォーターズ HDX システムは、試料調製の完全自動化を可能にしています。（図 2, 点線内）。重水素によるインキュベート、測定時間、急冷操作および注入など、煩雑な試料調製段階は、自動化されています。このシステム構成によって、ラボにおけるハイスループット分析および、実験自体の時間短縮を実現しました。

アポカルモジュリンはカルシウムと結合しない開放構造であることが知られています（図 3, 左上図）。カルシウムイオンがカルモジュリン（ホロカルモジュリン）に結合するとき、このタンパク質はさらに小型のコンフォメーションを選択します（図 3, 左図下）。重水素取り込み曲線は、相対重水素量を示し、各標識時間の違いでのアポとホロとの差を比較しています（図 3, 右図）。アポからホロへ構造が変化したのち、ホロカルモジュリンに少量の重水素化が認められ、アポ状態と比較して交換から保護されるアミド水素が少ないことが示されています。

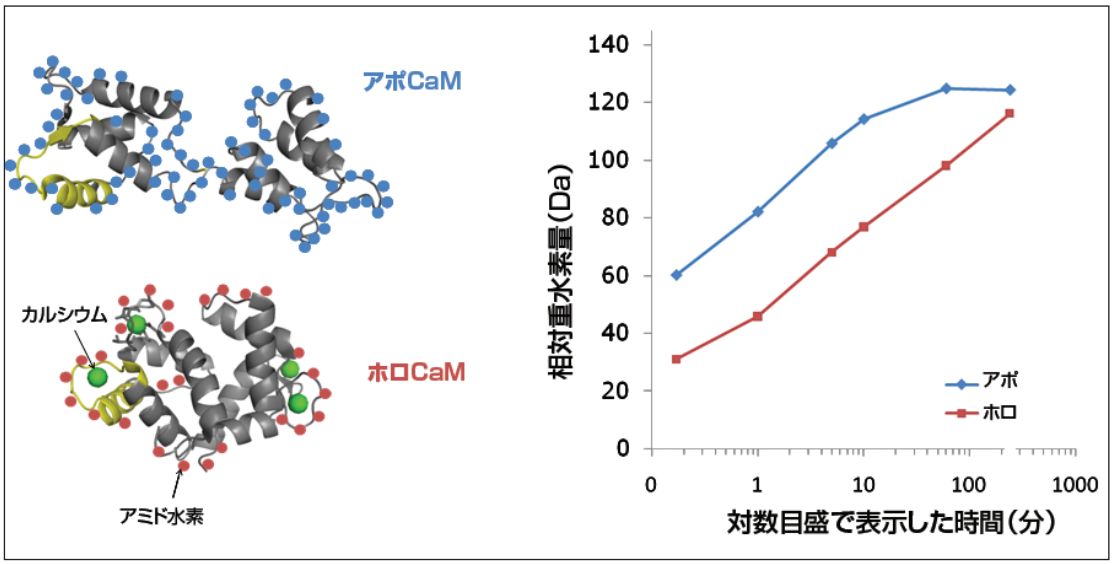

図 3. アポカルモジュリンおよびホロカルモジュリンの重水素取り込み曲線と、結晶回折法や NMR によって明らかにされた各三次構造。青色および赤色の点はそれぞれ、アポおよびホロにおいて重水素との交換に利用可能なアミド水素を示しています。閉鎖されたコンフォメーションであったため、ホロカルモジュリンの方が重水素取り込み量は少なくなっていました。

ペプチドの HDX 分析

重水素がタンパク質に取り込まれた位置を特定するために、標識し急冷したタンパク質を酸性プロテアーゼ（ペプシン）によって消化し、ペプチドを断片化します。非重水素化試料のペプシン消化を行い、ペプチドマップを作成します。このペプチドワークフロー（図 4）では、HDX システムがオンラインで効果的なペプシン消化を行い、UPLC によってペプチドを分離し、Xevo QTof MS から MS^E モードで MS スペクトルが収集されます。最終的に、ProteinLynx Global SERVER（PLGS）ソフトウェアにより MS^E データを処理し、ペプシンによって産生されたペプチドを同定します。この UPLC/MS^E 分析によって、典型的な HPLC/MS と比較していくつもの独自の利点が得られます。

- 頑健性を持ったオンラインペプシン消化
- 0℃で 5 分未満～ 6 分間の、高速ペプチド分離
- 巨大タンパク質由来の複雑なペプチド断片を分離することができる UPLC の高い分離能
- ペプシン消化および UPLC 分離のために独立した温度管理システム
- MS^E および PLGS による信頼性のある消化性ペプチド同定

本試験では 94% のシーケンスカバレッジが認められました。ペプシンは、HDX の急冷条件に適した低 pH で活性を示し、低温で活性を維持します。さらにペプシンは、重水素取り込みの位置を特定するのに有用な多数のオーバーラップペプチドおよび短いペプチドを産生します。オンラインペプシン消化によって再現性のあるカルモジュリンのペプチドを用いてペプチドマップを作成しました。図 5 に示したこのようなペプチドは、アポ試料およびホロ試料の消化すべてにみられました。重水素化したアポ試料およびホロ試料を用いて同じペプチドの重水素取り込みを比較する場合、再現性のあるペプチドの同定が必要とされ、より頑健性のある分析が求められます。

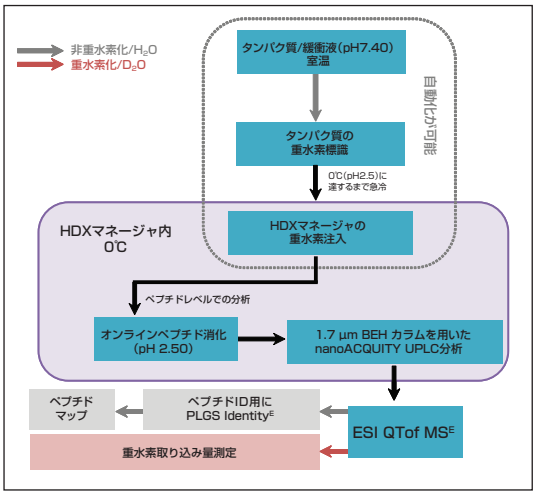

図 4. ペプチド同定のワークフロー。非重水素化ペプチド同定ステップは灰色、重水素化ペプチドの分析は赤で示しています。ペプチド同定のステップは、オンライン消化中に生じるペプチドを確認し、カバレッジマップを作成するのに必要です。

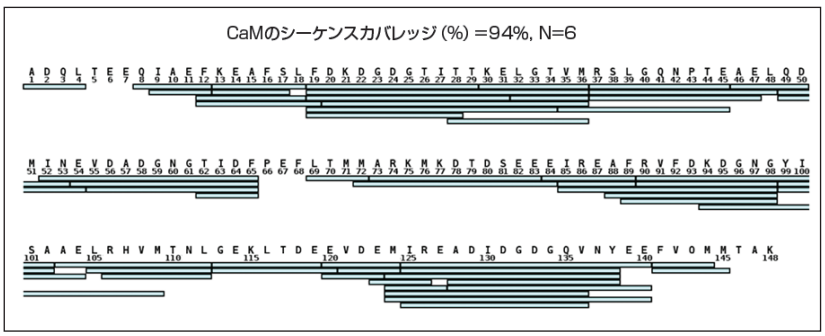

図 5. カルモジュリンのオンラインペプシン消化ペプチドのシーケンスカバレッジマップ。シーケンスの下にある各バーは、同定されたペプチドを示しています（N = 6）。

重水素化タンパク質は、非重水素化タンパク質と同じ方法を用いて 0℃で消化させ分離しました（図 4, 赤色の矢印）。各標識時間始めから終わりまで、再現性のあるクロマトグラムが得られました（図 6, 左図）。重水素への長時間曝露の結果として、MS スペクトルに予想通りの質量増大（*m/z*）が認められました（図 6, 右図）。各同位体エンベロープの強度加重平均質量から、非重水素化タンパク質と比較を行いました。

ペプチド HDX データの解釈

アポカルモジュリンおよびホロカルモジュリンについて、各消化性ペプチド内への重水素取り込みを比較しました。このデータは、特定のペプチドの重水素取り込み時にアポ型からホロ型への変化がみられたことを示しています。図 7 に例を挙げています。黄色の矢印は、標識 10 分後に、あるペプチドにみられたさまざまな重水素取り込みを示しています。

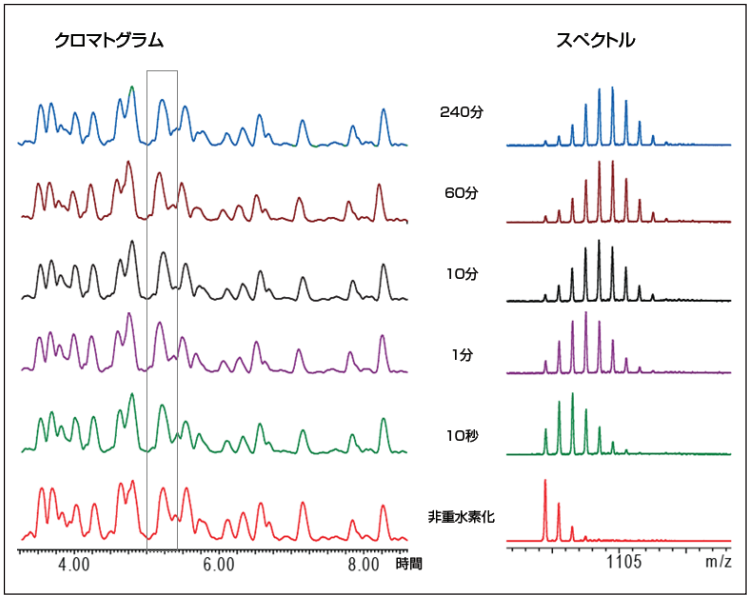

図 6. オンラインペプシン消化後のカルモジュリンペプチドの再現クロマトグラム。良好な再現性が得られています（左図）。右図は 10 秒～ 240 分標識したペプチド（ADIDGDGQVNY）のスペクトルを示しています。m/z は、重水素に長時間曝露した結果増大しています。

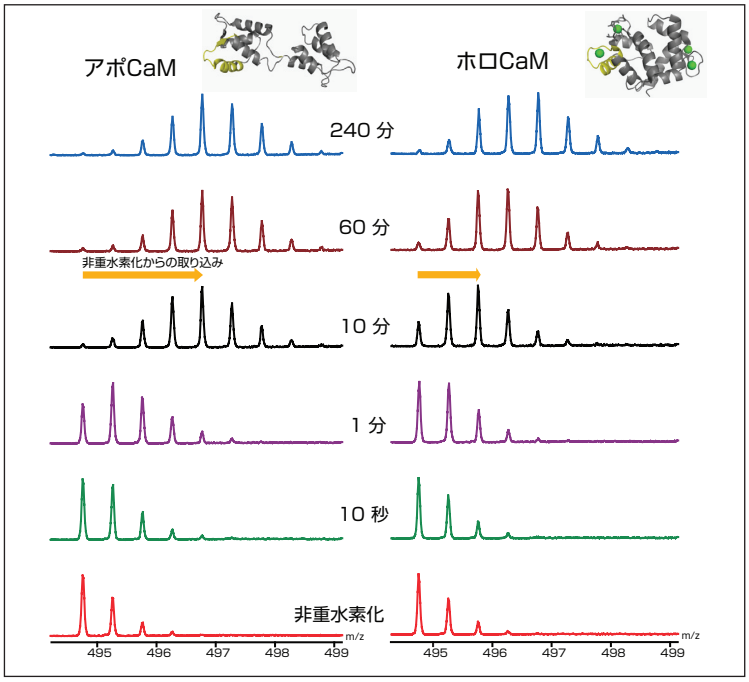

図 7. アポ CaM およびホロ CaM にみられる同じペプチドのさまざまな重水素取り込み。標識時間 10 分で、このペプチド（FKEAFSLF, 12-19）はアポ（左図）の方がホロ（右図）よりも重水素取り込み量が多いことがわかりました。

ペプチド HDX 分析は通常、タンパク質のサイズに応じて何百もの消化性ペプチドが生じるため、各ペプチドの重水素取り込みを手動で測定するのは時間のかかるプロセスです。専用ソフトウェアを使用することで、データ解釈が自動化されるため、データ処理時間を大幅に短縮することができます。

測定した重水素取り込み量は、各ペプチド毎に重水素取り込み曲線として示すことができます（図 8）。このグラフは、ペプチドすべてについて、重水素取り込み量の差が認められる場合と認められない場合を示しています。図 9 は、HDX 分析の一例です。重水素取り込みの相対率は 3D 構造で色分されているため、アポカルモジュリンおよびホロカルモジュリンの経時的な立体構造の変化を容易に比較することができます。三次元（3D）構造から、重水素取り込みに大きな差があるペプチドは主としてカルシウム結合部位に位置していることが確認されました。

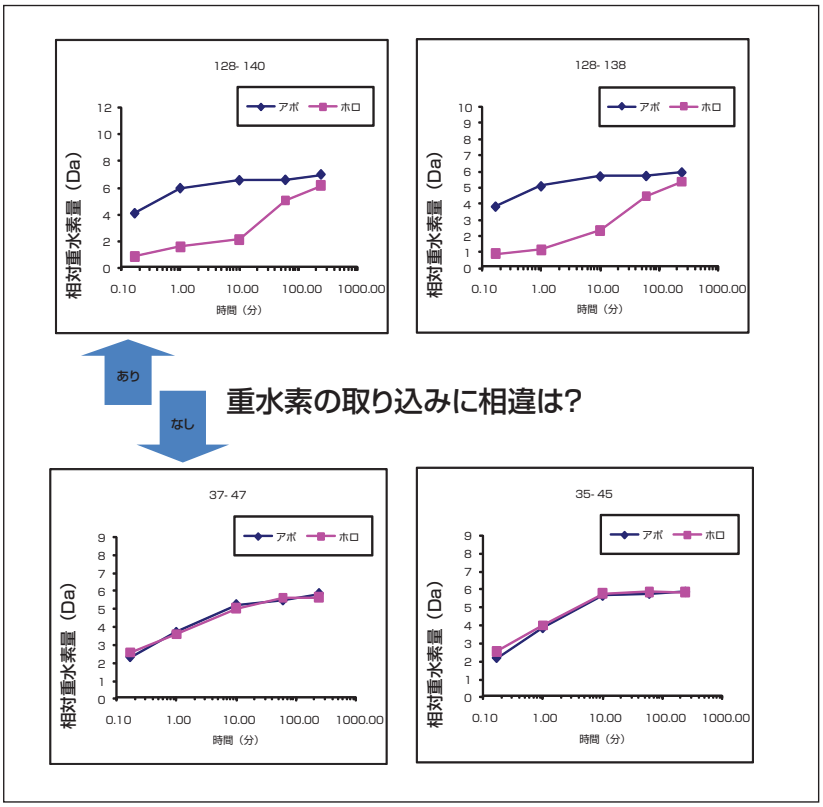

図 8. アポカルモジュリンおよびホロカルモジュリンの重水素取り込み曲線の例。上の曲線（128 ～ 140 および 128 ～ 138 を適用範囲とするオーバーラップペプチド）は、アポカルモジュリンとホロカルモジュリンとの間に重水素取り込みの異なる変化がみられることを示しています。下の曲線（ペプチド 37 ～ 47 および 35 ～ 45）は、アポカルモジュリンとホロカルモジュリンとの間に重水素取り込みの変化はないことを示しています。図 5 に示した各ペプチドに、それぞれ取り込み曲線があります。

たとえば、図 9 左側の色分けしている部分では、アポカルモジュリンの重水素取り込みが 32% であるのに対して、ホロ型の同じペプチド領域では標識時間 10 秒での重水素取り込みは 8% にすぎませんでした。図 10 は、各 3D 構造を示したデータの別の例です。この HDX ヒートマップはシーケンス上の重水素化と重なります。X 線結晶回折法または NMR によって得られた 3D 構造があれば、HDX の結果を補完することが可能です。

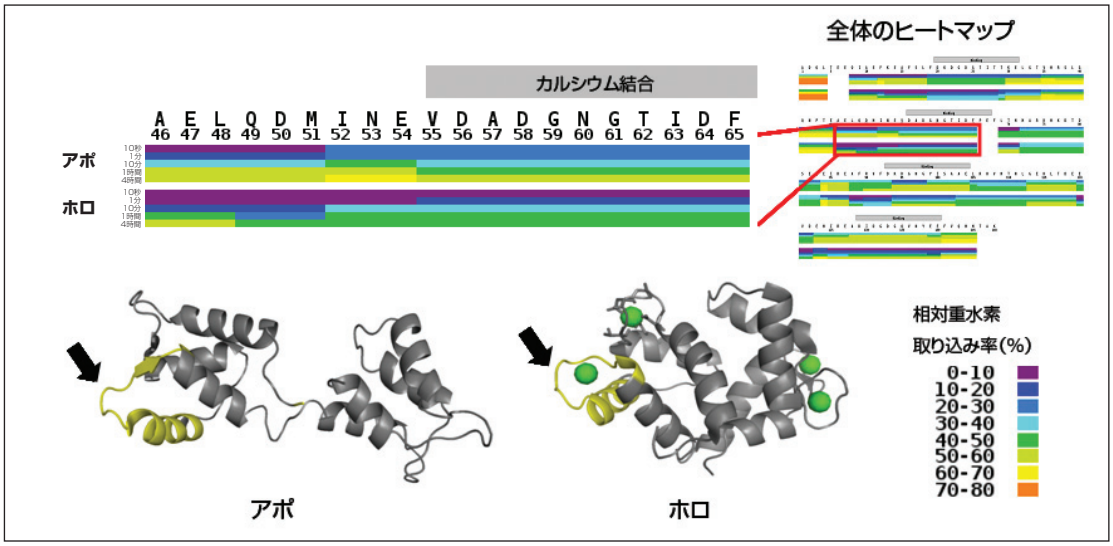

図 9. 限定された領域（46 ～ 65）でのコンフォメーションの差を評価するため、HDX ヒートマップを表示しています。2 セットの色分けしたヒートマップのバンドは、アポ（上のバンド）およびホロ（下のバンド）カルモジュリンの重水素取り込み率を示しています。寒色になるほど交換が少ないことを示しており、交換から大きく保護されていることになります。黒色の矢印で示した 3D 構造は、表示したヒートマップの該当領域です（46 ～ 65）。この図に示されているホロ領域は、早い時点で（たとえば 10 秒）ほとんどが紫およびダークブルーなど、アポカルモジュリンよりも強い寒色となっています。

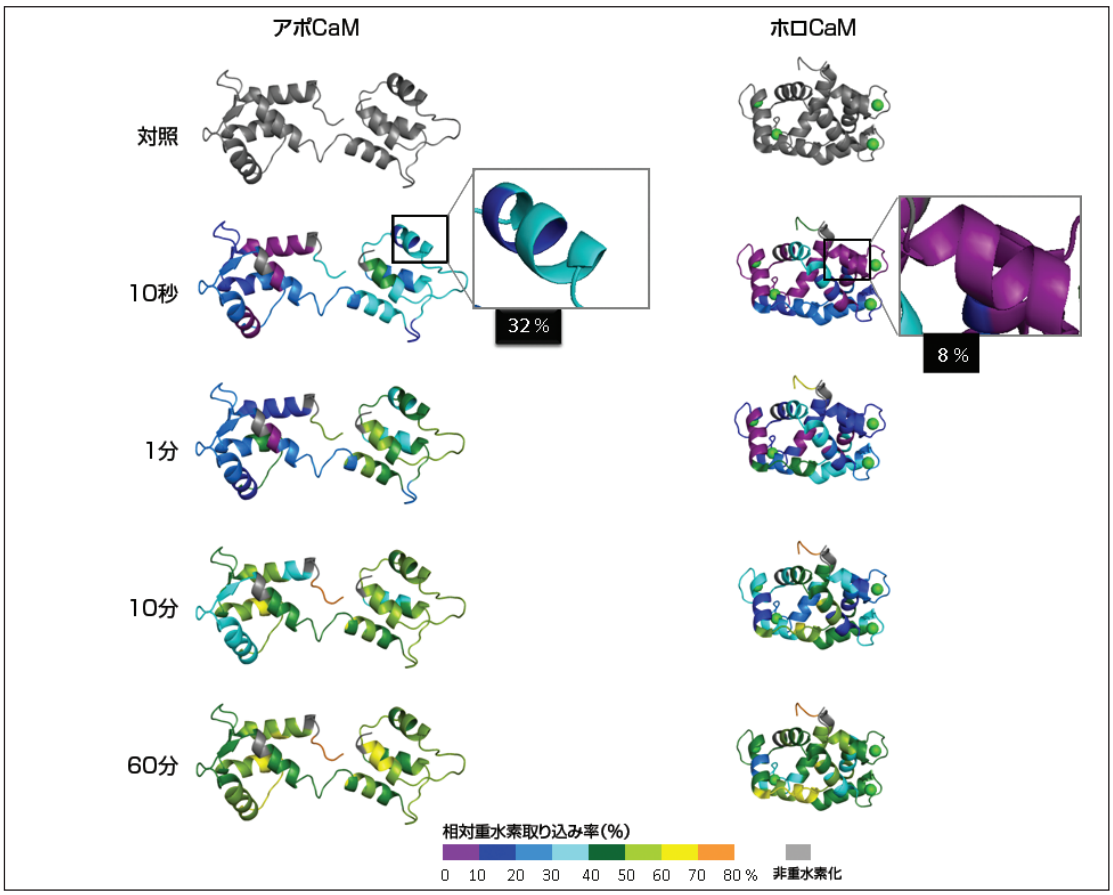

図 10. カルモジュリンのアポ 3D 構造およびホロ 3D 構造における重水素取り込みに関する情報（アポ = 1CFD.pdb, ホロ = 1PRW.pdb.）。枠で囲んでいる二箇所の部位について、標識時間 10 秒での比較を行いました。全体的に、アポ構造の方が、カルシウム結合がなくタンパク質の柔軟性が高いため、交換速度が速くなっています。

まとめ

HDX テクノロジーを搭載したウォーターズ nanoACQUITY UPLC システムと、高分解能 MS を併用した、カルシウム結合下でカルモジュリンのコンフォメーションにみられる変化を効果的に測定することを実現しました。このシステムの持つ独自性は、HDX 分析の質を改善するものです。

- インタクトプロテインおよびペプチドの HDX 分析を可能にした HDX ワークフロー
- 頑健性を保ったオンラインペプシン消化
- 0℃での再現性のある迅速 UPLC 分離
- MS^E および PLGS によるペプシン消化ペプチドの正確な同定
- 自動化された HDX データ処理

ウォーターズの HDX テクノロジーでは、全体的および部分的なタンパク質コンフォメーションとタンパク質の構造変化に関する試験を容易に行うことができます。得られた情報は、タンパク質の機能およびそれに関連する生物活性を理解するのに有用な情報を提供します。HDX システムは、バイオ医薬品の探索および開発に有益な分析手段と言えるでしょう。

参考文献

1. Engen JR. Analysis of Protein Conformation and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange MS. Anal. Chem. 2009: 81; 7870-75.
2. Wales TE, Fadgen KE, Gerhardt GC, Engen JR. High-Speed and High-Resolution UPLC Separation at Zero Degrees Celsius. Anal. Chem. 2008: 80; 6815-20.
3. Zhu MM, Rempel DL, Zhao J, Giblin DE, Gross ML. Proving Ca2+-Induced Conformational Changes in Porcine Calmodulin by H/D Exchange and ESI-MS: Effect of Cations and Ionic Strength. Biochemistry. 2003: 42; 15388-97.

ソリューション

カルモジュリンタンパク質コンフォメーションの水素重水素交換 MS 分析。
Waters Technology Brief. 2010: 720003668en.

水素 / 重水素交換質量分析による酸化インターフェロン α 2B にみられるコンフォメーションの変化に関する研究。
Waters Poster. 2010: 720003550en.

生物学的薬物のコンフォメーションの変化を捕捉するための水素 / 重水素交換質量分析システム。
Waters Poster. 2010: 720003334en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、UPLC、nanoACQUITY UPLC、VanGuard および Xevo は Waters Corporationの登録商標です。
ProteinLynx、Global SERVER、MassLynx、MassPREP および The Science of What's Possibleは Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Produced in Japan. 2012 年 9 月 720003864 JA PDF