

氏名 太田 周志

題目 : Analysis of the Protein Behavior in Molecular Crowding Environments Investigated by Raman Spectroscopy

(ラマン分光法による分子混雑環境中のタンパク質挙動解析)

本研究では、分子混雑環境中のタンパク質の振る舞いを詳しく理解するために、ラマン分光法を用いて、高濃度/分子混雑環境中のタンパク質の挙動を詳細に解析・考察した。

Chapter 1: General Introduction. (序論)

細胞内のように様々な分子が混み合って存在している分子混雑環境 (Molecular Crowding Environment) 中では、タンパク質は最もコンパクトで安定な構造を有していると考えられてきたが、最近の研究では、分子混雑環境中でのタンパク質の挙動は、試験管内 (in vitro) とは異なることが報告され始めている。分子混雑環境中では、分子間の距離が分子の大きさと同程度になり、排除体積効果に加え、近接した分子表面間の近距離相互作用により誘起される相互作用も顕著になると予想される。したがって、分子混雑環境中でのタンパク質の挙動を把握するためには、これらの相互作用を総合的に理解する必要がある。応用的には、近年、抗体医薬品を中心とするバイオ医薬品では、高濃度製剤化が進められており、高濃度/分子混雑環境中の分子の挙動を理解することは、最適な製剤条件の模索に重要な知見を与える可能性がある。

高濃度中のタンパク質分子を直接測定できる簡便な手法は多くない中で、ラマン分光法は、分子の二次・三次構造の知見から、各官能基単位の詳細な情報を詳しく解析することができる有効な手法である。本研究では、ラマン分光法に着目し、高濃度/分子混雑環境中のタンパク質分子を官能基単位で解析し、その挙動の詳細な理解を得ることを試みた。

Chapter 2: The Molecular Interaction of a Protein in Highly Concentrated Solution Investigated by Raman Spectroscopy. (ラマン分光法による高濃度タンパク質溶液中の分子間相互作用)

これまでの多くのラマン分光法によるタンパク質の研究では、変性などに伴う構造変化とスペクトルの変化を対応させながら議論を進める例が多かったが、高濃度に伴う排除体積効果や分子間相互作用がスペクトルにどのような影響を与えるかを議論した例はほとんどなかった。本章では、高濃度により誘起される構造の変化がスペクトルに与える影響を詳しく調べるため、構造情報やその他の様々な知見が数多く蓄積されているニワトリ卵白リゾチーム (Hen egg-white lysozyme (HEWL)) をモデルタンパク質として用い、濃度依存性測定 (2.5-300 mg/mL) を行った。分子の二次構造の指標となる Amide I バンド ( $1650\text{ cm}^{-1}$ )、嵩高く強い疎水性を示す Trp バンド ( $1555\text{ cm}^{-1}$ )、また周辺の水和環境の目安となる Tyr のダブルレットバンドの強度比 ( $I_{856}/I_{837}$ ) に着目して解析を行った。スペクトルの解析結果から、濃度増大に伴い Trp の半値幅の増大

が観測され、これは高濃度での排除体積効果を示唆していることがわかった。また、Tyr の強度比の変化が観測され、高濃度では Tyr 周辺の微視的環境に変化があることがわかった。これは、濃度増大に伴い分子が近接することにより生じる近距離相互作用によるものと考えられる。これら一連の結果は、濃度増加に伴い、分子間相互作用のうち、排除体積効果が支配的な領域から、近距離相互作用が支配的になる様子を示唆している。以上の結果から、濃度効果を反映するラマンバンドとして疎水性残基 (Trp と Tyr) が有効であることと、その基本的な解釈を明らかにした。またこの結果は、高濃度の分子論では、希釈系でよく用いられるコロイダルな近似法に加え、個々の官能基の情報に基づいた構造情報の知見が重要になることを示唆するものである。

### Chapter 3: The Behavior of Bovine Serum Albumin Molecules in Molecular Crowding Environments Investigated by Raman Spectroscopy. (ラマン分光法による分子混雑環境中の BSA 分子挙動)

HEWL の系で明らかにした主要なラマンバンドの知見をもとに、Bovine serum albumin (BSA) 分子の高濃度中、また分子混雑環境中の挙動を調べた。BSA 分子は pH7 ではパッキングの効果が強く、剛直な荷電粒子としての性質が強いが、pH3 では分子全体のパッキングが緩み、柔らかくなることが知られている。この性質を利用し、異なる pH 条件で濃度依存性測定を行い、分子の剛直さと混雑環境の関係を調べた。両 pH 条件で、Amide I バンドにはほとんど変化がないことから、分子全体の構造には大きな変化はなかったが、疎水性残基 (Tyr と Phe) の挙動には違いが見られた。Tyr の強度比 ( $I_{850}/I_{825}$ ) の解析結果から、pH3 では排除体積効果により緩んだパッキングが再び締め、pH7 のときと同様な天然体に近い構造をとっている可能性が示された。また、Phe のバンド強度 ( $I_{1002}/I_{1450}$ ) の解析結果から、近距離相互作用により誘起される Phe 周辺の疎水性界面同士の会合に起因する変化が示された。また、CH と OH 伸縮振動 ( $2800-4000\text{ cm}^{-1}$ ) の領域の解析結果から、pH7 と pH3 ではタンパク質の水和水の挙動に違いがあり、pH3 では水和水全体の量が多いが、界面水がほとんど存在しないことが示された。この結果は、分子構造と水和水が関連していることを示唆するものである。以上の結果をまとめると、剛直な分子は分子混雑環境に伴う排除体積効果などの影響を受けにくく、柔らかい分子は受けやすいことが明らかになった。

さらに、分子構造の揺らぎと排除体積効果の関係を詳細に調べるために、別の超好熱菌由来タンパク質存在下で、BSA 分子の H-D 置換の温度依存性測定を行い、その挙動を比較した。Amide I バンドの D 化によるシフトの変化の midpoint ( $T_i$ ) を比較したところ、超好熱菌由来タンパク質存在下では、 $T_i$  が  $5^\circ\text{C}$  程度上昇していることが確認できた。これは超好熱菌由来タンパク質添加による排除体積効果により、分子表面付近で H-D 交換が抑制された影響であることが示唆される。

以上の結果、排除体積効果、近距離相互作用による効果と分子構造、水和状態は密接に関連していることが明らかになった。

### Chapter 4: The Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution Investigated by Raman Spectroscopy (ラマン分光法による高濃度抗体溶液のタンパク質間相互作用の評価)

抗体医薬品などのバイオ医薬品は従来の低分子医薬品では治療できない難病の治療薬として注目されている。これらは注射や点滴で体内に投与する溶液製剤であるため、体内で適切な濃度になるように高濃度 ( $\geq 100\text{ mg/mL}$ ) に調製されることが多い。しかし、高濃度になるとタンパク質は構造変化や凝集し、薬効の低下や副作用の発症につながっている。特に高濃度中では、タンパク質間相互作用 (近距離相互作用) が顕著になり、凝集に強く関わることを示唆されている。本章では、HEWL や BSA の系で得られた知見をもとに、高濃度抗体溶液中の分子挙動を解析し、抗体分子間の相

相互作用の評価を行った。実験には、ウサギ由来抗体をモデル抗体として用い、濃度依存性測定 (10-200 mg/mL) を行った。Amide I、Trp ( $1555\text{ cm}^{-1}$ )、Tyr ( $I_{856}/I_{830}$ )、Phe ( $I_{1002}/I_{1240}$ ) のバンドを詳しく解析した結果、濃度増加に伴い、高濃度溶液中で誘起されるタンパク質間相互作用により、疎水基周辺の微視的環境に変化が生じていることが示された。また CH と OH 伸縮振動の領域の解析結果からは、疎水基の変化と相関して、界面水が減少している様子が観測された。

以上の結果、高濃度のウサギ抗体溶液では、構造の変化を伴わない分子会合体 (凝集体) が形成されており、Tyr と Phe のバンドの変化を解析することで、会合体形成の状態を推測できることがわかった。そこで、製剤化における応用展開に向けて、pH 依存性、塩濃度依存性、保管試験の際の解析事例もさらに示した。

#### Chapter 5: Conclusions. (総括と結論)

本研究では、ラマン分光法を用いて分子混雑環境中のタンパク質の挙動を理解するために、HEWL を用いてラマンバンドの基本的な解析方法を構築した。その知見をもとに、分子混雑環境中での BSA の挙動を解析し、排除体積効果、近距離相互作用などの効果と分子構造、水和状態が密接に関連していることを明らかにした。最後に応用として、高濃度抗体溶液のタンパク質間相互作用の評価に、ラマン分光法が応用可能であることと、その具体事例を示した。本研究で確立したラマン分光法による高濃度/分子混雑環境中のタンパク質の挙動の解析手法は、今後のより詳細で複雑な分子混雑環境中のタンパク質の挙動解析に役立つとともに、抗体製剤をはじめとするバイオ医薬品の製剤最適化に大きく貢献することが期待される。