

Title	質量分析による遺伝子治療用アデノ随伴ウイルスベク ターの構造解析
Author(s)	尾山, 博章
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88007
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

質量分析による遺伝子治療用 アデノ随伴ウイルスベクターの構造解析

2022年3月

大阪大学 大学院工学研究科

生命先端工学専攻 生物工学コース 高分子バイオテクノロジー領域 内山研究室 尾山博章

略語	1
第一章 緒論	2
1-1. 遺伝子治療におけるウイルスベクター	
1-2. アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)	
1-3. AAV の血清型と組織指向性	
1-4. 野生型 AAV の生活環	
1-5. 組換え型 AAV を利用した遺伝子治療用医薬品の開発	
1-6. 本研究の目的	
第二章 インタクト質量分析を中心とした AAV ベクターの一次構造解析	17
2-1. 緒言: AAV ベクターを構成する VP 成分の分析における課題ならびに第二章	この位置づけ 17
2-2. 実験材料および実験方法	
2-2-1. AAV サンプル	
2-2-2. SDS-PAGE	
2-2-3. ペプチドマッピング	
2-2-4. VP レベルでの液体クロマトグラフィー-UV 検出-質量分析(liquid chroma	tography-UV
detection-mass spectrometry: LC-UV-MS)	
2-3. 結果	
2-3-1. SDS-PAGE および CGE を用いた VP 変化体の検出	
2-3-2. ペプチドマッピングによる VP3 変化体の N 末端領域の配列同定	
2-3-3. LC-UV-MS による VP レベルでの VP3 変化体の同定	
2-3-4. 低 pH ならびに高温条件により生産される VP 切断物	
2-3-5. SDS-PAGE, CGE, LC-UV-MS の結果に基づいた VP 構成比の決定	
2-4. 考察	
2-4-1. VP3 変化体の生成機序	

2-4-2. VP3 切断物の生成機序	44
2-4-3. VP 構成比の算出	49
2-5. 小括	50
第三章 HDX-MS を利用した AAV ベクターの高次構造解析51	
3-1. 緒言:AAV ベクターの高次構造解析の現状ならびに第三章の位置づけ	51
3-2. 実験材料および実験方法	59
3-2-1. AAV サンプル	59
3-2-2. 水素重水素交換質量分析(hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: HDX-MS)	59
3-2-3. HDX-MS のデータ解析	60
3-2-4. 変性開始温度(denaturing onset temperature, Tonset)の測定	61
3-2-5. ゲノム放出温度 (genome release out temperature, <i>T</i> _{out})の測定	61
3-2-6. ゲノム放出割合の測定	62
3-2-7. カプシド保持率の測定	62
3-3. 結果	63
3-3-1. HDX-MS による AAV2 完全粒子の高次構造解析	63
3-3-2. AAV2 空粒子とAAV2 完全粒子の高次構造比較	69
3-3-3. 加熱により AAV2 完全粒子に誘導されるゲノム放出	72
3-3-4. AAV2 完全粒子および AAV2 ゲノム放出後粒子の高次構造比較	76
3-4. 考察	79
3-4-1. AAV2 完全粒子の溶液中のダイナミクス	80
3-4-2. AAV2 完全粒子とAAV2 空粒子の高次構造の差異	81
3-4-3. ゲノム放出により AAV2 完全粒子に生じた構造変化	83
3-5. 小括	86
第四章 総括と今後の展望	
4-1. 本研究の総括	88

4-2. 今後の展望	
付録	91
引用文献	112
研究業績	117
学術発表論文	
学術雑誌または商業誌における総説	117
学会発表	117
国際会議における発表	117
国内会議における発表	
謝辞	119

略語

- AAV: adeno-associated virus, アデノ随伴ウイルス
- VP: viral protein, ウイルスタンパク質
- vg/mL: viral genome/mL, 1 mL に含まれるウイルスゲノム数(完全粒子のウイルス力価の単位)
- LC: liquid chromatography, 液体クロマトグラフィー
- MS: mass spectrometry, 質量分析
- PLA: phospholipase A, ホスホリパーゼ A
- Intact-MS: intact mass spectrometry, インタクトな状態のタンパク質を対象に実施する質量分析
- HDX-MS: hydrogen deuterium exchange mass spectrometry, 水素重水素交換質量分析
- SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリル

アミドゲル電気泳動

- CGE: capillary gel electrophoresis, キャピラリーゲル電気泳動
- DFA: difluoroacetic acid, ジフルオロ酢酸
- VR: variable region, 可変領域
- VP1u: VP1 unique region, VP1 特異的配列(AAV2 の残基番号で 1-137 の領域)
- VP2u: VP2 unique region, VP2 特異的配列(AAV2 の残基番号で 1-202 の領域)
- Tonset: denaturing onset temperature, 変性開始温度
- BCM: barycentric mean, 重心平均
- Tout: genome release out temperature, ゲノム放出温度
- SEC: size exclusion chromatography, サイズ排除クロマトグラフィー
- MVM: minute virus of mice, マウス微小ウイルス(AAV と同じパルボウイルス科のウイルス)

第一章 緒論

1-1. 遺伝子治療におけるウイルスベクター

人間の遺伝子に異常が生じることが原因となり,発症する病気を遺伝性疾患と呼ぶ.代表的な遺伝性疾 患としては,筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症が挙げられ,筋肉が萎縮・変形することで筋力低下や運動 機能障害を引き起こす.がんや拡張型心筋症も遺伝が原因となり生じた場合,広義では遺伝性疾患に該 当する.遺伝性疾患は人間の遺伝子にその原因があるため,手術での完治は困難である.日本において も,厚生労働省が指定する難病(発病の機構が明らかでなく,治療方法が確立していない病気)には,遺 伝性疾患が多く含まれている.近年,このような遺伝性疾患を根本から治療する方法として,治療用の遺伝 子を体内へ導入する遺伝子治療が注目を集めている.遺伝子治療は直接患者の体内へ正常遺伝子を導 入する *in vivo* の遺伝子治療と,患者から採取した細胞に正常遺伝子を導入し,細胞ごと体内へ戻す *ex vivo* の遺伝子治療に分類される(図 1a).どちらの手法においても,治療を進める上では遺伝子を運搬し 細胞へ導入する『運び屋』,ベクターが必要となる.

遺伝子治療におけるベクターには、組換え型のウイルスベクターが使用されることが多い、ウイルスは元 来、自身が保持する DNA あるいは RNA を宿主細胞に導入する性質をもつため、その組換え体は遺伝子 の運搬役として適している. ウイルスベクターは非ウイルスベクターと比較して、導入遺伝子の発現期間が 長く、遺伝子導入率が高いという特徴がある¹. 2018 年 12 月までの統計では、臨床試験が進んでいる 2,930 の遺伝子治療用医薬品のうち約 64%がウイルスベクターを使用しており(図 1b)²、ウイルスベクター の需要が高いことが伺える. ウイルスベクターの中で主に使用されているのは、アデノウイルス、レトロウイル ス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV)、単純ヘルペスウイルス、ポックスウ イルスである. これらの中で AAV は、臨床試験数では劣るものの、病原性が低い点および血清型により組 織指向性が異なる点で他のウイルスベクターより優れており、遺伝子治療用医薬品開発におけるリーディ ングプラットフォームの一つであるといえる.

(a)



図 1. 遺伝子治療におけるウイルスベクター

(a) 遺伝子治療の概略図

(b) 臨床試験が進行中の遺伝子治療用医薬品におけるウイルスベクターの割合

引用文献2より、2018年12月までの統計結果を元に作成した.

1-2. アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)

アデノ随伴ウイルス (AAV) はパルボウイルス科, ディペンドパルボウイルス属 (the genus *Dependoparvovirus* in the family *Parvoviridae*)に属するエンベロープを持たないウイルスである^{3,4,5}. AAV の粒子は正二十面体のカプシドに約 4.7 kb の一本鎖 DNA が内包された構造をとる(図 2a). 野生型 AAV のウイルスゲノムは両端にヘアピン構造をとる ITR (inverted terminal repeat)配列を有しており, それらに挟まれて Rep 遺伝子と Cap 遺伝子がコードされている. Rep 遺伝子は非構造タンパク質である Rep78, Rep68, Rep52, Rep40 の 4 つのタンパク質を生産する. Rep タンパク質はウイルスゲノムの複製やカプシド内へのパッケージング, ウイルスゲノムを宿主細胞の染色体へ組み込む等の役割を持つ. また Rep タンパク質は AAV を生産する細胞内あるいは野生型の AAV が感染した細胞内でのみ発現し, AAV のカプシドに組み 込まれることはない. 一方で, Cap 遺伝子は AAV のカプシドを構成する 3 種類のウイルスタンパク質 (viral protein: VP)をコードしている. AAV の VP は配列が長い順に VP1, VP2, VP3 と定義される. AAV の代表 的な血清型である AAV2 の残基番号を元にした, 各 VP 配列の概略図を図 2b に示す. VP1 および VP2 は C 末端側に VP3 の全配列(残基番号: 203-735)を有しており, VP2 の N 末端領域(残基番号: 138-203) も VP1 に同配列が含まれている.

AAV のカプシドは 60 個の VP が会合した正二十面体構造である. AAV カプシドの VP 構成比はモル 比にして VP1: VP2: VP3 = 1:1:10 と推定されており, 1 粒子のカプシドには 5 個の VP1, 5 個の VP2, 50 個 の VP3 が含まれていることになる(図 2c)⁶⁷. AAV の粒子の直径は約 20-25 nm であり, 分子量は DNA を 含めると約 5.3 MDa である⁸. 直径が約 20 nm と同程度で, 分子量が約 150 kDa である抗体と比較すると, AAV は密度が高い複雑な高次構造体であるといえる.

(a)



(b)



(c)



(Rose JA et al., J. Virol., 1971.)

図 2. AAV の概要

(a)野生型 AAV の概略図

(b) Cap 遺伝子にコードされる各 VP 配列の概略図(残基番号は AAV2 を元に記載)

(c) AAV 粒子のカプシドの概略図

1-3. AAV の血清型と組織指向性

AAV は 1960 年代にアデノウイルスの混入物として発見され, 現在に至るまで 100 種類以上の血清型が 報告されている⁶. AAV の血清型は慣習的に VP 配列の違いによって分類されており, 主な血清型は AAV1-AAV12 である. ただし, 血清型の正確な定義は『新しく単離された血清型が, 他のすべての既存の 血清型に特異的な中和抗体と効率的に交差反応しない』ことである. この定義に基づくと, AAV1-AAV12 のうち AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, AAV9 が真の異なる血清型であり, 他の血清型は変 異体という位置づけとなる⁶. 本博士論文ではこれ以降, AAV1-AAV12 を異なる血清型として扱うが, 正確 な定義とは異なることに注意が必要である. 主な血清型の AAV のうち AAV2, AAV3, AAV6 はヒト の血清から, 他の血清型は非ヒト霊長類の血清から発見された. 非ヒト霊長類の中でもアカゲザル (Rhesus monkey: rh)から単離された血清型は AAV rh10 のように表記される. 現在, 最も研究が進んでいる AAV の 血清型は最初にヒトの血清から単離された AAV2 である.

AAV の特徴として, 血清型により細胞侵入時に結合する細胞表面受容体の種類や, 内包遺伝子を導入 しやすい組織指向性が異なることがあげられる(表 1). AAV は主にプロテオグリカンを受容体として細胞に 侵入するが, AAV1, AAV4, AAV5, AAV6 はシアル酸, AAV2, AAV3 はヘパリン硫酸, AAV9 はガラクト ースといったように結合能を有するプロテオグリカンの糖鎖の種類が異なっている. また内包遺伝子を導入 しやすい組織についても, AAV2 は腎臓, AAV3 は肝臓といったように指向性が異なる. この組織指向性の 違いを利用することで, 組換え型の AAV ベクターは標的の臓器へ治療用の遺伝子を運搬するようデザイ ンすることが可能である.

本博士論文においては, 第二章では AAV1, AAV2, AAV6 の三つの血清型を, 第三章では AAV2 の 血清型を主なサンプルとして扱い, 研究を遂行した. AAV ベクターを利用した医薬品開発において, 臨床 研究数が最も多い血清型は AAV2 である. AAV2 は現在までに 40 以上の臨床試験が終了しており, 将来 的に遺伝子治療用医薬品として最も普及しうる血清型の 1 つである点から選択した ⁹. AAV1 はすでに上 市されている Glybera に使用された血清型であり, 2007-2014 年の臨床試験数が AAV2 に次いで多い点 から選択した⁹. AAV6 は臨床試験数では劣るものの, マウスの肺の気道上皮細胞¹⁰や心筋細胞¹¹におい て AAV2 よりも高い遺伝子導入率を示すことが確認されており, 嚢胞性線維症のような肺に関連する遺伝 性疾患や循環器系の遺伝性疾患に対する治療薬として期待される血清型である点から選択した.

Serotypes	Cell receptor	Tissue tropism
AAV1	Sialic acid	Central nervous system, Skeletal muscle
AAV2	Heparin sulfate proteoglycan	Kidney
AAV3	Heparin sulfate proteoglycan	Liver
AAV4	Sialic acid	Central nervous system, Retinal pigment epithelium
AAV5	Sialic acid	Central nervous system, Retinal pigment epithelium
AAV6	Sialic acid	Skeletal muscle
AAV7	Unknown	Skeletal muscle
AAV8	Unknown	Skeletal muscle, Heart, Pancreas
AAV9	Galactose	Skeletal muscle, Liver, Lung
AAV10	Unknown	Lumbar cistern
AAV11	Unknown	Spleen
AAV12	Unknown	Submandibular glands

表 1. AAV の主な血清型が結合能を有する受容体の種類と組織指向性 6, 12-14

補足

- Central nervous system: 中枢神経系
- Skeletal muscle: 骨格筋
- Retinal pigment epithelium: 網膜色素上皮
- Pancreas: すい臓
- Lumbar cistern: 腰椎
- Spleen: ひ臓
- Submandibular glands: 顎下腺

1-4. 野生型 AAV の生活環

ウイルスは自身のウイルスゲノムを宿主細胞に導入し増幅する生物種であるが、AAV も同様に内包する ゲノムを細胞に導入する性質を持つ.その過程は主に(1)細胞への侵入、(2)エンドサイトーシス経路から の脱出、(3)核への細胞内移動、(4)ウイルスゲノムのカプシドからの脱殻の4つに分けられる(図3)¹⁵.

AAV は主に細胞表面のプロテオグリカンを受容体として細胞表面に結合し、細胞へ侵入する. 前述の 通り、細胞外受容体との結合時に認識するプロテオグリカンの種類は AAV の血清型によって異なってい る. 細胞内へ侵入した AAV は、エンドサイトーシス経路に沿って細胞内を移動する. 通常、エンドサイトー シスによって取り込まれたタンパク質は最終的にリソソームまで運ばれて分解される. しかし、AAV はエンド ソームエスケープと呼ばれる機構を用いることでその分解から逃れることができる. エンドソームエスケープ は AAV がエンドソームの脂質二重層を分解することで達成される. AAV は VP1 の N 末端領域に、ホスホ リパーゼ活性をもつ PLA (phospholipase A)ドメインを有している³. PLA ドメインは生理的条件下ではカプ シドの内部に位置しているが、エンドサイトーシスが進むに伴って PLA ドメインが外在化し、エンドソームの 脂質二重層を分解することができる. この PLA ドメイン外在化の構造変化は、エンドソーム経路の進行に伴 った pH の低下により誘導されると提唱されている.

エンドソームから逃れた AAV は、宿主細胞の核まで移動しゲノムを放出する. 複数の先行研究により、 AAV は細胞内に取り込まれてから数時間で核の周囲に蓄積し、ゲノムが核に放出されることが確認されて いる. 一方で、エンドソームエスケープ後にどのように AAV が細胞内を輸送されるか、またどのように核で ゲノムを放出するかに関しては、未だに詳細なメカニズムは明らかになっていない¹⁵. 放出されたウイルス ゲノムは宿主細胞の核で複製される. さらに転写を経たウイルス由来の mRNA は細胞質へ運ばれ、AAV の会合やゲノムのパッケージングの役割を持つ Rep タンパク質およびウイルスタンパク質 (VP)が生産され る¹⁶. VP は配列上に核移行シグナルを有しており、再び細胞質から宿主細胞の核へ移動する. 核で新た なカプシドの会合と、複製されたウイルスゲノムのパッケージングが行われ、AAV が増殖する. 内包ゲノム を標的遺伝子に置換した組換え型の AAV ベクターの場合も、細胞導入から核までの輸送経路は同一で あり、(1)-(3)の過程を経て核まで到達する. その後、標的遺伝子の複製・転写・翻訳が進み、標的タンパク 質が生産される.



図 3. AAV の生活環の概要図

引用文献4を元に改訂した.

1-5. 組換之型 AAV を利用した遺伝子治療用医薬品の開発

遺伝子組換え技術の発展ならびに野生型 AAV の生物学的な理解が進むに伴い,組換え型の AAV が ヒト遺伝子治療における遺伝子の運搬役(ベクター)として開発されるようになった(図 4a)^{4,5,17}.野生型の AAV が内包している Rep 遺伝子および Cap 遺伝子を治療用遺伝子に置き換えることで,ウイルスは体内 で増殖することがなく,ベクターとしての役割のみを付与することができる.またウイルスゲノムを染色体に 組込む役割を持つ Rep タンパク質が生産されないため,導入した治療用遺伝子が標的細胞の染色体に組 み込まれることは,ほとんどない.さらに前述の通り,AAV は血清型によって組織指向性が異なるため,適 切なカプシド配列を選択することで治療用遺伝子を特定の組織に運搬させるようなベクターをデザインする ことが可能である.

組換之型の AAV ベクターは主に HEK293 細胞(ヒト胎児腎細胞, human embryonic kidney cell: HEK) あるいは Sf9 細胞(ツマジロクサヨトウ, spodoptera frugiperda: Sf)により生産される(図 4b). HEK293 細胞 を使用した生産手法においては、標的遺伝子を野生型 AAV 由来の ITR 配列にはさまれる形でコードした トランスジーンプラスミド, 野生型 AAV2 由来の Rep 遺伝子(Rep2)および特定のカプシド配列をもつ Cap 遺伝子(CapX)をコードした Rep-Cap プラスミド, アデノウイルス由来の AAV 生産に必要なタンパク質をコ ードしたヘルパープラスミドの三種類を細胞にトリプルトランスフェクションする. AAV はヘルパー依存型の 生産様式をとるウイルスであるため、その生産にはアデノウイルスをヘルパーウイルスとして共感染させるこ とが必要であった. 一方で, アデノウイルスを利用した AAV の生産方法では, 回収した細胞液から不純物 であるアデノウイルスを取り除く過程が必要になっていた.このような背景から、アデノウイルスを共感染させ るのではなく,アデノウイルス由来の AAV 生産に必要なタンパク質をコードしたプラスミド, ヘルパープラス ミドを導入する手法が開発された¹⁸. アデノウイルス由来の AAV 生産に必要なタンパク質は E1A (初期領 域, early region protein: E), E1B, E2A, E4, VA(ウイルス関連 RNA, virus associated-RNAs: VA)の5つ があげられる. HEK293 細胞で AAV を生産する場合, HEK293 細胞は E1A と E1B を元来生産するため, ヘルパープラスミドには E2A, E4, VA の 3 種類がコードされている¹⁶. HEK293 細胞による生産は, 生産 細胞がヒト由来である点や,異なる血清型のプラスミド構築が容易である点が利点としてあげられる.実際 に現在承認されている AAV ベクターを利用した遺伝子治療用医薬品(後述する Luxturna および Zolgensma)は、接着培養により培養した HEK293 細胞を使用して生産されている.しかし、浮遊培養での

生産系が確立されておらず, 生産過程が煩雑で多くの人件費が生じる点, スケールアップが困難な点が欠 点としてあげられる. そのため, 現状 AAV ベクターを利用した遺伝子治療用医薬品は薬価が非常に高価 であることが問題になっている¹⁷. Sf9 細胞を使用した AAV 生産手法においては, 組換え型のバキュロウイ ルスをベクターとして標的遺伝子と Rep-Cap 遺伝子を細胞内へ導入する. ベクターであるバキュロウイルス 自体がヘルパーウイルスの役割を果たすため, HEK293 細胞の AAV 生産で使用されているヘルパープラ スミドのように追加で生産に必要な成分を導入する必要はない. Sf9 細胞は浮遊培養系が確立されており スケールアップが容易である点が利点であるが, 生産細胞がヒト由来ではない点, 精製時にバキュロウイル スの除去が必要になる点, 細胞増殖に伴うバキュロウイルスベクターの安定性が不透明である点が欠点で ある¹⁶.

現在までに、AAV ベクターを利用したヒトへの遺伝子治療用医薬品は三品目承認されている(図 4c). 世界で初めて AAV を利用した遺伝子治療用医薬品が承認されたのは 2012 年の出来事であり、家族性リ ポタンパク質リパーゼ欠損症の治療薬として AAV1 製品の Glybera (uniQure)が ヨーロッパの EMA (European Medicines Agency)に承認された(ただし、2017 年に需要不足のため発売は中止されている). 続いて、網膜ジストロフィーの治療薬として AAV2 製品の Luxturna (Spark Therapeutics)が 2017 年にアメリ カの FDA (Food and Drug Administration)から、2018 年に EMA から承認された. さらに 2019 年には脊髄 性筋萎縮症の治療薬として AAV9 製品の Zolgensma (Novartis)が FDA に承認された. Zolgensma は日本 においても 2020 年 3 月に厚生労働省から承認され、アメリカについで二カ国目の承認となった. どの製品 も従来法では治療が困難であった遺伝性疾患を対象としており、画期的な医薬品であるといえる. 加えて、 前述の通り AAV ベクターを利用した医薬品は 100 品目以上の臨床試験が進行中である. 今後も医療技 術の発展に伴い遺伝子治療はますます普及していくと予想され、AAV ベクターの需要もさらに高まってい くと考えられる.



図 4. 組換え型 AAV を利用した遺伝子治療用医薬品

(a) 野生型 AAV と組換え型 AAV の相違点

(b) 組換え型 AAV の主な生産方法

(c)現在までに承認された AAV ベクターを利用した遺伝子治療用医薬品

写真の引用元を以下に記載する.

Glybera: https://www.fiercepharma.com/pharma/uniqure-gives-up-1m-gene-therapy-glybera

Luxturna: https://www.indiamart.com/proddetail/luxturna-injection-23724656155.html

Zolgensma: https://www.theguardian.com/society/2021/mar/08/nhs-use-worlds-most-expensive-drug-treat-spinal-muscular-atrophy-zolgensma

補足

- 家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症(Lipoprotein lipase deficiency): 中性脂肪であるトリグリセリドを 血中で分解するリポタンパク質リパーゼを生産する遺伝子が欠損していることが原因となり、血中の脂 質濃度が上昇する病気である. 急性すい炎や高脂血症が誘発される. Glybera は AAV1 ベクターにより、リポタンパク質リパーゼを生産する正常遺伝子を体内へ導入することで治療を行う.
- 網膜ジストロフィー(Retinal dystrophy):網膜の組織が萎縮・変形し視力障害が生じる病気である.
 Luxturna は光感受性物質を網膜色素上皮(Retinal pigment epithelium: RPE)で生合成する酵素の1
 つである RPE65 遺伝子変異が原因となり,網膜ジストロフィーを発症している患者に対して, AAV2 ベクターにより正常な RPE65 遺伝子を導入することで治療を行う.
- 脊髄性筋萎縮症(Spinal muscular atrophy):脊髄の運動神経細胞生存(Survival motor neuron: SMN) 遺伝子の変異が原因となり、筋肉が萎縮・変形する病気である.進行性で最終的には歩行や呼吸す ら困難となり、死に至ることも多い. Zolgensma は正常な SMN 遺伝子を AAV9 ベクターで導入するこ とで治療を行う.

1-6. 本研究の目的

ヒト遺伝子治療における AAV ベクターの安全性と有効性を担保するためには,遺伝子運搬役となる AAV ベクターの品質を管理する必要がある. AAV ベクターの品質管理項目はウイルス力価,カプシド構 造,治療用遺伝子を内包していない空粒子や部分的に内包した不完全粒子の混入率,カプシドの凝集性, 製造中および精製中に生じた不純物など多岐に渡る^{19,20}.本博士論文では,これらの品質管理項目のうち AAV カプシドの構造解析に焦点を当てる. AAV ベクターだけでなくバイオ医薬品全般において,主成分 であるタンパク質の構造はその機能と密接な関係を持つ. そのため,アミノ酸配列や糖鎖付加を含む翻訳 後修飾といったタンパク質の一次構造,ならびにカプシド構造全体のフォールディングや機能ドメインの立 体構造といったタンパク質の高次構造を適切に評価し,バイオ医薬品の有効性と安全性を担保する必要 がある.

一方で、AAV ベクターは大規模培養や精製が難しく、さらに濃縮できる濃度に制限がある. そのため、 AAV ベクターの品質管理には低濃度かつ少ないタンパク量で実施可能な分析法が要求される. 例えば、 遺伝子治療用の AAV ベクターである Luxterna はウイルス濃度 5.0×10¹² vg/mL (viral genome: vg), 液量 500 µL で処方されているが、ウイルス濃度をタンパク質濃度に換算すると約 30 µg/mL となる. VP 比が少な い VP1 や VP2 を検出することを考慮すると、AAV ベクターの構造解析には数マイクログラムのタンパク質 を検出できる高感度な手法が必要となる.

このような背景をもった AAV ベクターの品質管理に適した分析法として,キャピラリーゲル電気泳動 (capillary gel electrophoresis: CGE)と質量分析があげられる. CGE はキャピラリー内部に充填したゲル内 でタンパク質を電気泳動し,各泳動時間で分離された成分を吸光度で検出する手法である. CGE は従来 のスラブ型の電気泳動に比べ,測定が短時間で実施でき高感度な点,測定に必要な操作の多くが自動化 されている点が利点としてあげられ,抗体医薬品の純度試験にも用いられている手法である²¹.本博士論 文では,カプシドの VP 構成比の評価手法として CGE も併用するものの,AAV の主な構造解析手法として 質量分析を使用する. 質量分析はタンパク質またはペプチドをイオン化し,その m/z を測定する手法であ り,高感度かつ特異性の高い検出法である.本博士論文では,質量分析を中心とした AAV カプシドの構 造解析を推進し,AAV ベクターの適切な品質管理手法の開発に貢献することを研究目的とした. この目的 を達成するため,第二章では AAV カプシドの VP3 変化体(配列が通常より短い VP3)を含めた一次構造

解析および AAV カプシドの VP 構成比の定量方法の確立に取り組み, 第三章では溶液中における AAV カプシドの高次構造評価手法の確立に取り組んだ.

第二章では AAV カプシドの一次構造解析を実施し, 近年の報告で存在が示唆されていたものの, 配列 情報や生成機序が不透明であった未知成分の分析を試みた. AAV カプシドの VP 比はその遺伝子導入 率を変化させるため²⁰, カプシドに含まれる全ての VP 成分は正確に分析しその量比を管理する必要があ る. 第二章では、インタクト質量分析 (intact mass spectrometry: Intact MS)とペプチドマッピングを組み合わ せることで,未知成分が VP3 変化体であることを同定し,その生成機序を考察した. Intact MS はタンパク 質を酵素消化することなくインタクトな状態で質量分析を実施し,その質量を決定する手法である²³. AAV の場合,カプシドを構成する VP の状態で質量を決定することができる. さらに先行研究においては, 電気 泳動法を用いて AAV を構成する各 VP を分離し量比を定量する手法は提唱されながらも, 手法間の比較 や VP 比の詳細な導出方法については議論が行われてこなかった. 第二章では, Intact MS を実施する際 の LC-MS(LC クロマトグラムならびに MS デコンボリューション後のシグナル強度)を VP 比の定量手法に 加えその結果を議論し、VP3 変化体を含めた適切な VP 比の定量手法を提唱した. 質量分析装置には、 VP レベルの Intact MS に maXis II ETD ESI-QTOF mass spectrometer (maXis II, Bruker)を, ペプチドマッ ピングに Trapped ion mobility spectrometer with time-of-flight (TIMS-TOF, Bruker)を使用した. maXis II は TOF 型の質量分析装置としては非常に高い分解能 (>80,000)をもつため, 分子量が比較的大きなインタク トの状態の測定においても,正確な質量を得ることができる.そのため,AAVカプシドを構成する微量なVP 成分でも 30 ppm 以内の質量精度で正確に分子量を決定することができた. TIMS-TOF はイオンモビリティ ーを利用したサンプルの濃縮効果と, PASEF と呼ばれるイオンモビリティー分析時間中に高速で MS/MS 測定を実施できる技術により²⁴,1 μg 以下のタンパク量でも高感度に MS/MS 測定が実施できる. そのた め, 微量な VP 成分においても消化後のペプチドのアミノ酸配列および翻訳後修飾の同定を可能にした.

第三章では、水素重水素交換質量分析 (hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: HDX-MS) に よる AAV カプシドの高次構造解析を実施し、今まで明らかになっていなかった AAV カプシドの溶液中で のダイナミクスを世界で初めて測定可能とした.バイオ医薬品の高次構造はその機能と密接な関係を持つ ため²⁵、AAV ベクターにおいても高次構造の整合性を適切な手法で管理することが求められる.一方で、 溶液中における AAV カプシドの高次構造解析は従来法では困難であった. 第三章では、溶液中でのタン パク質の高次構造情報を取得できる HDX-MS を AAV カプシドへ応用し, 溶液中においては AAV の完全 粒子(遺伝子を内包しているカプシド), 空粒子(遺伝子を内包していないカプシド), 加熱ストレスを与えた 完全粒子(内包する遺伝子を放出したカプシド)の間で局所的な高次構造変化が生じていることを明らか にした. 第三章の結果より, HDX-MS を利用して AAV カプシドの高次構造の整合性が評価することが可 能であり, HDX-MS が遺伝子治療用 AAV ベクターの品質管理に有用であると結論付けた. HDX-MS の 質量分析装置には Q Exactive HF-X mass spectrometer (HF-X, Thermo)を使用した. HF-X はオービトラッ プ型の質量分析装置であり, 検出器に導入するイオン量を調整できる C-trap が備えられている. HDX-MS では C-trap でイオンを溜め込む時間を最適化することで, サンプル濃度が希薄な AAV サンプルにおいて も希釈過程を含む HDX-MS の測定を良好なカバー率で実施できた.

第四章では,第二章と第三章で得られた結果を総括するとともに,遺伝子治療用の AAV ベクターの品 質管理における今後の展望について記述した. 第二章 インタクト質量分析を中心とした AAV ベクターの一次構造解析

2-1. 緒言: AAV ベクターを構成する VP 成分の分析における課題ならびに第二章の位置づけ

2018 年に Bosma らは AAV5 のカプシドの VP 構成比が異なると, ウイルスの遺伝子導入率が変化する ことを報告した²². そのメカニズムは完全には明らかになっていないが, VP1 の特異的な N 末端配列に存 在する PLA ドメインがエンドソームエスケープに必須であるため^{26,27}, VP1 の取り込み量が少ない AAV 粒 子の遺伝子導入率が低下した可能性が高い. また生産・精製過程で各 VP の分解が生じると, 同様に VP1 の量比が減少し遺伝子導入率が低下するだけでなく, 体内で機能しない不完全な AAV 粒子が免疫原生 を誘発するリスクが高くなる^{28,29}. そのため, AAV カプシドを構成する VP 成分の VP 比は正確に定量し管 理する必要がある. VP 成分の分析手法としては, 従来からスラブ型のゲル電気泳動が利用されており, 加 えて質量分析も利用されるようになってきた.

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)を用いて分離された AAV の VP 成分は,高感度な分析が可能である銀染色 や SYPRO Ruby 色素を用いて染色されることが多い ³⁰⁻³². しかし,パンドの蛍光強度を利用してタンパク質 の化学量論比を決定するには,蛍光強度と実際のタンパク量の関係を解明する必要がある. AAV におい てその蛍光強度と各 VP 量の関係は明らかになっていないため,正確な量比の決定が難しい. 一方で,キャピラリーゲル電気泳動(capillary gel electrophoresis: CGE)は現在のバイオ医薬品の品質管理において 主流になりつつある分析手法であり,スラブの電気泳動よりも高い感度と分離能をもつ ³³. 分離されたタン パク質はペプチド結合の吸光または芳香族アミノ酸の吸光を用いて検出できるため,染色の過程を必要と しない. そのため,直接的に各 VP 成分の量を定量することができる. これらの電気泳動手法を用いた AAV ベクターの構成成分の分析は,現在までにいくつか報告されているが,そのうち複数の論文で従来の VP1, VP2, VP3 ではない,詳細不明の未知成分が検出されていた ^{31,32,34,35}. この VP 成分は VP3 より分子量が 少し小さい位置にバンドあるいはピークが検出されるが,その配列は解析されておらず,当然ながら生成機 構は不明である.

質量分析(mass spectrometry: MS)に関しては、報告例はそれほど多くないものの、AAV を分析する上 で幅広く利用されるようになってきていると見受けられる。例えば、酵素で消化することなくサブユニット単位 で質量を測定するインタクト質量分析(Intact MS)と、トリプシンなどの酵素でタンパク質をペプチドに消化し

てから質量分析を行うペプチドマッピングを組み合わせることで、VP1 と VP3 の N 末端はアセチル化修飾 を受けるが、VP2 の N 末端はアセチル化修飾を受けないことが複数の血清型 (AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV9, AAVrh10)で報告された³⁶. 親水性相互作用クロマトグラフィーを利用して Intact MS を実施 した研究例では、翻訳後修飾の度合いが AAV の生産ロットによって異なることが報告されている³⁷. このよ うに LC において VP 成分を分離し Intact MS を実施する手法は、各 VP の質量を測定できるため重要視 されてきた一方で、LC クロマトグラムを利用した VP 成分の定量や Intact MS による VP 変化体の分析を行 った研究例はない.

以上より、AAV には VP 成分の変化体が含まれる可能性が高いが、その分析は十分に行われていない こと、さらに VP 比の定量方法が確立されていないことが先行研究における課題としてあげられる. 遺伝子 治療用 AAV ベクターの VP 比を正確に定量するためには、VP1、VP2、VP3 だけではなく全ての VP 関連 成分を適切に分析する必要がある. 本章では、先行研究で存在が示唆されていた VP 変化体の配列を同 定し、さらにその生成機序を解明することを研究目的とした. まず電気泳動を用いた分析により、本章で用 いる AAV サンプルにおいても先行研究と同様の VP 変化体が含まれていることを確認した. 次に VP 変化 体の配列を同定するため、ペプチドマッピングと Intact MS を実施した. Intact MS を実施した際に、VP 変 化体とは別に VP の切断体が生じることを確認した. 最後に、VP 変化体ならびに VP 切断体の生成機序を 考察し、両者を含めて VP 構成比の定量を行う方法を結論付けた. 2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. AAV サンプル

AAV1 (5.82×10¹² vg/mL), AAV2 (1.46×10¹² vg/mL) および AAV6 (3.85×10¹² vg/mL) は次世代バイオ 医薬品製造技術研究組合 (Manufacturing Technology Association of Biologics, Tokyo, Japan)から提供さ れたものを用いた. すべての AAV は HEK293 細胞を利用したトリプルトランスフェクション法により生産さ れ,精製後サンプルの処方条件は 1×PBS pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) である. 以下, AAV サンプルの原液は AAV サンプル原液, 試薬を加えた後の混合液はサンプル溶液と記載する.

2-2-2. SDS-PAGE

AAV サンプル原液に 1×PBS pH 7.4 を加え、サンプル溶液に含まれる AAV 量が 2.0×10¹⁰ vg/10 µL とな るよう希釈した.サンプル溶液に 4×LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific)と 10×reducing agent (Thermo Fisher Scientific)が 5:2 になるよう混合した溶液を 12 µL 加えた.サンプル溶液を AAV1 は 80°C, AAV2 は 65°C, AAV6 は 75°C でそれぞれ加熱した.加熱温度はカプシドの変性温度をもとに決定した. サンプル溶液およびラダ 一溶液 (BenchMarkTM Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific)を 4-12% Bis Tris gel (Thermo Fisher Scientific)にアプライし、1×MOPS buffer (Thermo Fisher Scientific)を泳動液として、定 電圧設定 100 V で 100 分電気泳動した. 泳動後のゲルは SYPRO[®] Ruby 色素 (Thermo Fisher Scientific) で染色した.タンパク質のゲルへの固定化、染色、洗浄の過程は、SYPRO Ruby 色素の製造元のプロトコ ルに従い、実施した.染色後のゲルの蛍光強度は iBright 1500 装置 (Thermo Fisher Scientific)ならびに iBright Analysis Software ver 4.0.0 (Thermo Fisher Scientific)を使用して解析した.

3-2-2. キャピラリーゲル電気泳動(CGE)

AAV サンプルの CGE 測定は、ほとんどの部分を Zhang らが報告した論文 ³⁴を参考に実施した. AAV サンプル原液 10 μ L (~5.8×10¹⁰ vg)を使用し、参考論文のプロトコルに従い、サンプルの変性処理および バッファー交換を実施した. 回収したサンプル溶液に 70 μ L の脱イオン水を加え、CGE のサンプルとした. CGE の測定には PA800Plus system (Sciex, Framingham, MA)を使用した. サンプルの検出は PDA detector を使用して波長 214 nm で実施した.

2-2-3. ペプチドマッピング

AAV サンプル原液に 50 mM の炭酸水素アンモニウム(FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan), 6 M

のグアニジン塩酸塩 (FUJIFILM Wako Chemicals), 3 mM のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (FUJIFILM Wako Chemicals), ならびに 3 mM のヨードアセトアミド (FUJIFILM Wako Chemicals)を加えた. サンプル溶液は遮光し, 37°C で一時間インキュベートし,変性,還元およびアルカリ化の処理を実施した. サンプル溶液は MonoSpin C18 (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan)を用いて脱塩し,アセトニトリル (KANTO CHEMICAL Co.INC., Tokyo, Japan)にバッファー交換した. 回収したサンプル溶液を凍結乾燥 機 (Epsilon 2-4 LSCplus Freeze-Dryer, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany)を用いて凍結乾燥させた. 回収したペレットを 10%アセトニトリルに溶解させた後に,トリプシン (Promega, Madison, WI)を加えて 37°C で 30 分インキュベートし,タンパク質を消化した. 消化後のサンプル溶液を質量分析装置 (trapped ion mobility spectrometer with time-of-flight (TIMS-TOF), Bruker, Billerica, MA)が接続されたナノ LC (nanoElute UHPLC, CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) にインジェクトし, MS/MS 測定を実施した. 消化ペプチドの分離は C18 カラム (Aurora UHPLC column with CSI Fitting, 25cm×75µm, Bruker) によりカラムオーブン 50°C, 流速 0.4 µL/min で実施した.

2-2-4. VP レベルでの液体クロマトグラフィー-UV 検出-質量分析 (liquid chromatography-UV detection-

mass spectrometry: LC-UV-MS)

AAV サンプル原液に酢酸 (FUJIFILM Wako Chemicals)を 10% (w/v) になるよう加え,室温で 15 分イン キュベートした. 図 8 におけるカラム上での変性実験では,酢酸処理を実施していない AAV サンプル原液 そのままで測定を行った.サンプル溶液または AAV サンプル原液を質量分析装置 (maXis II ETD ESI-QTOF mass spectrometer, Bruker) が接続された HPLC (Nexra HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan) にインジェク トし, MS 測定を実施した. VP の分離は C4 カラム (ACQUITY BEH C4 column (300Å, 1.7 μ m, 2.1 mm×150 mm), Waters, Milford, MA)を用いて, カラムオーブン 80°C, 流速 0.2 mL/min で実施した. 移動相 A 溶液 および移動相 B 溶液には 0.1% ジフルオロ酢酸 (difluoroacetic acid: DFA, Waters)/MS 用蒸留水 (KANTO CHEMICAL), 0.1% DFA /アセトニトリル (KANTO CHEMICAL)をそれぞれ使用した. 移動相 A 溶液およ び移動相 A 溶液 95%と移動相 B 溶液 5%の混合液の pH は 1.93 および 1.90 であった. VP の溶出は移 動相 B 溶液 32-36%, 15 分間のグラジェントで実施した. LC の検出には UV 波長 280 nm と芳香族アミノ 酸の内因蛍光 (励起波長 280 nm, 蛍光波長 350 nm)を使用した. MS の測定はドライガス温度 300°C, 質 量範囲 (m/z) 900~6,000 で実施した. データ解析は Bruker Compass DataAnalysis software ver 5.1 (Bruker) を用いて実施した. デコンボリューションには Maximum Entropy を用いて, 質量範囲 40,000-90,000 Da を 選択して実施した.

これ以降,本博士論文では『LC による UV 280 nm での検出を使用した各 VP の分離』および『MS によるインタクトな VP 状態での分子量の決定』を連続で実施する手法を LC-UV-MS と記載する.

2-3. 結果

2-3-1. SDS-PAGE および CGE を用いた VP 変化体の検出

SDS-PAGE は AAV カプシドの各 VP の純度を評価する上で慣習的に使用されてきた手法である.本章 では AAV カプシドに含まれる微量成分まで検出するため, SYPRO Ruby による蛍光染色を実施した. AAV1, AAV2, AAV6 を SDS-PAGE で分析した結果, どの血清型においても 3 本のバンドが検出された (図 5a).分子量マーカーから推定した分子量が, それぞれの VP 成分とおおむねー致したことから, 3 本 のバンドは分子量が大きい順に VP1, VP2, VP3 であると判断した.

次に CGE 測定により VP 成分を評価した. CGE は SYPRO Ruby 染色を実施した SDS-PAGE よりも高い 分離能と感度を持つことが報告されている³⁵. 波長 214 nm で検出した CGE のエレクトロフェログラムを図 Sb に示す. SDS-PAGE の結果と異なり, CGE の結果では VP1, VP2, VP3 に対応するピークだけでなく, VP3 のピークの手前にマイナーピークが確認された. この VP3 付近のマイナーピークの存在は, CGE を利 用した複数の先行研究においても確認されており^{34,35},本章の結果もふまえると, AAV カプシドに他の VP 構成物が存在することが示唆された. 後述の LC-UV-MS で同定した VP1, VP2, VP3 の分子量をもとにし て,マイナーピークに対応する VP 変化体の分子量を推定すると, VP 変化体は VP3 より数千 Da 小さい分 子量を持つことが示唆された(図 S1).



図 5. 電気泳動を使用した VP 成分の評価

(a) AAV1, AAV2, AAV6を SDS-PAGE で分析したゲルを蛍光検出した結果

(b) AAV1, AAV2, AAV6をCGE で分析したエレクトロフェログラム

2-3-2. ペプチドマッピングによる VP3 変化体の N 末端領域の配列同定

電気泳動により存在が示唆された VP 変化体の配列を決定するため,トリプシン消化によるペプチドマッ ピングを実施した.先行研究により, AAV の VP3 において, N 末端のメチオニン残基は切断されており, 残 基番号 N+1 番目のアラニンは高度にアセチル化されていることが明らかになっている^{36,38}.一方で,ペプ チドマッピングの結果, VP3 の N 末端付近の配列に二種類のアセチル化ペプチドが同定された(図 6).

AAV1のVP3 配列(M203-L736)をもとにすると、一本目のアセチル化ペプチドの配列はA204から、トリ プシンによるVP3のN末端側における最初の切断部位であるR238であった(同定配列: A(Ac)SGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR、アセチル化残基を(Ac)で記載).先行 研究の通り、N末端のメチオニン残基が切断され二番目のアラニン残基がアセチル化されているため、こ の一本目のアセチル化ペプチドはVP3のN末端領域に該当すると判断した.AAV1だけでなく、AAV2、 AAV6においても同様のVP3のN末端に相当するペプチドが検出された(図 6a).

もう一本のアセチル化ペプチドは、A212がアセチル化されており、その配列はA212からR238であった (同定配列: A(Ac)DNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR).二本目のアセチル化ペプチドについて も、AAV1、AAV2、AAV6 すべての血清型で検出された(図 6b).注目すべきは、アセチル化ペプチドの一 残基前のアミノ酸がメチオニンであることであり(M211)、このメチオニンは VP3 の N 末端である M203 に 最も近い場所に位置している.N 末端のメチオニン残基の切断および N+1 番目の残基のアセチル化は真 核生物のタンパク質生産において一般的な翻訳後修飾であり、サンプル調製中に生じうる修飾ではない ^{39,40}.これらのことから、二本目のアセチル化ペプチドは M211 から翻訳が開始していることを示唆し、アセ チル化修飾を受けた A212 を N 末端残基として保有する VP3 変化体の存在が推察された.



図 6. アセチル化ペプチドの MS/MS クロマトグラム

(a) VP3 の N 末端である M203 に対応するアセチル化ペプチド

(b) VP3 の N 末端に一番近いメチオニンである M211 に対応するアセチル化ペプチド

2-3-3. LC-UV-MS による VP レベルでの VP3 変化体の同定

前項で実施したペプチドレベルでの解析に続いて、LC-UV-MS を用いて VP の状態でインタクト質量分 析を実施した. 波長 280 nm による UV 吸収により検出した LC クロマトグラムを図 7a に示す. VP 成分と推 定されるピークが、AAV1 と AAV6 では 4 つ、AAV2 では 2 つ検出された. 検出されたそれぞれのピークに ついてデコンボリューション解析を実施し、溶出した VP 成分の質量を決定した. 質量分析におけるデコン ボリューション解析は、生データの多価イオンのピークが級数的に並んだマススペクトルを、最適化アルゴリ ズム (本章では Maximum Enthropy 法)によって 1 価のスペクトルに変換し、ある特定の成分由来のピーク を分離・抽出する演算処理である. 各ピークのデコンボリューション後のマススペクトルを図 7b に、各ピーク から溶出した VP 成分のデコンボリューションによって求めた質量値を表 2 に示す. 図 S2 に示すように、表 2 にリストアップした以外の成分は今回のデコンボリューション解析で検出されなかった.



図 7. LC-UV-MS を利用した VP1, VP2, VP3, VP3 変化体 の分析 (a) LC クロマトグラム インジェクションピーク以外の位置に検出されたピークにつ いて, 溶出時間が早い順からピーク番号を記載した.

(b) 各ピークのデコンボリューション後のマススペクトル

AAV の血清型および LC クロマトグラムのピーク番号を右 上に、デコンボリューション解析により同定した各 VP 成分の 名称をピークの近傍に記載した. ラベル'p'および'o'はリン 酸化,酸化修飾を受けたピークにそれぞれ該当し、ショルダ ーピークが修飾体であることを示している. AAV1, AAV6 の ピーク No.4 のデコンボリューション結果に関しては、次項お よび図 9a に記載する.



Serotype	Peak	Tentative	Predicted amino	Actual amino	Measured	Theoretical	Mass
	No.	identities	acid sequence	acid sequence	mass (Da)	mass (Da)	accuracy (ppm)
AAV1	1	VP1	M1-L736	A2(Ac)-L736	81288.2	81285.9	29.0
	2	VP2	T138-L736	A139-L736	66094.6	66093.1	22.4
	3	VP3	M203-L736	A204(Ac)-L736	59517.1	59516.9	4.4
		VP3 variant	M211-L736	A212(Ac)-L736	58888.0	58888.2	3.7
	4	VP3 fragment	M203-D626	A204(Ac)-D626	47197.9	47197.1	18.5
		VP3 fragment	M203-D590	A204(Ac)-D590	43271.0	43270.6	10.1
AAV2	1	VP1	M1-L735	A2(Ac)-L735L	81857.3	81855.3	24.8
		VP2	T138-L735	A139-L735	66489.8	66488.2	24.1
	2	VP3	M203-L735	A204(Ac)-L735	59974.5	59974.0	8.2
		VP3 variant	M211-L735	A212(Ac)-L735	59302.2	59301.3	14.7
AAV6	1	VP1	M1-L736	A2(Ac)-L736	81324.2	81322.0	26.8
	2	VP2	T138-L736	A139-L736	66096.9	66095.2	25.8
	3	VP3	M203-L736	A204(Ac)-L736	59519.4	59519.0	7.0
		VP3 variant	M211-L736	A212(Ac)-L736	58890.6	58890.3	5.2
	4	VP3 fragment	M203-D626	A204(Ac)-D626	47177.0	47176.1	18.7
		VP3 fragment	M203-D590	A204(Ac)-D590	43222.1	43221.6	10.4

表 2. 各ピークで溶出した VP 成分についてデコンボリューションで決定した質量のリスト

アセチル化(Acetylation)をAcと記載している.

Serotype	Peak	Tentative	Measured	Theoretical	Mass shift	Dessible DTM	Relative peak
	No.	identities	mass (Da)	mass (Da)	(Da)	Possible P1M	ratio (%)
AAV1		VP1	81288.2	81285.9	-	-	100.0
	1		81364.9	81365.8	76.7	Phosphorylation	26.8
		VP2	66094.6	66093.1			100.0
	2		66173.3	66173.1	78.7 Phosphorylation		14.3
			66265.2	66269.1	170.6	Phosphorylation×2, oxidation	4.9
AAV2	1	VP1	81857.3	81855.3	-	-	100.0
			81935.6	81935.2	78.3	Phosphorylation	25.2
		VP2	66489.8	66488.2	-	-	100.0
			66568.8	66568.2	79.0	Phosphorylation	12.6
			66662.0	66664.2	172.2	Phosphorylation×2, oxidation	19.8
AAV6	1	VP1	81324.2	81322.0	-	-	100.0
	1		81401.8	81402.0	77.6	Phosphorylation	23.4
		VP2	66096.9	66095.2	-	-	100.0
	2		66173.9	66175.2	77.0	Phosphorylation	16.0
			66270.4	66271.2	173.5	Phosphorylation×2, oxidation	12.1

表 3. 各 VP 成分の翻訳後修飾レベルの評価

相対ピーク比(Relative peak ratio)は図 7b に示すデコンボリューション後のマススペクトルのピーク強度から,修飾を受けていないピークを 100%として算出し

た.

AAV1 と AAV6 の結果では VP1, VP2, VP3 が別々のピークとして溶出したのに対し, AAV2 の結果で は1つのピークから VP1と VP2 が共溶出していた. すべての血清型において, 修飾を受けていない VP1, VP2, VP3 の質量値は, 理論値と比較して 30 ppm 以内の質量精度 (2.5 Da 以内の差)で同定できた. デ コンボリューション後のスペクトルにおいて, メインピークの近傍に検出されている複数のピークは, VP 成分 が翻訳後修飾を受けていることを示唆した. 各 VP 成分の近傍ピークに対応する翻訳後修飾の種類と, メイ ンピークに対する修飾割合を表 3 に示した. VP1 と VP2 では, リン酸化修飾を受けた VP1, リン酸化修飾 を受けた VP2 ならびに 2 つのリン酸化修飾と酸化修飾を受けた VP2 がそれぞれ検出されたのに対して, VP3 では翻訳後修飾に対応するピークは確認できなかった. 修飾割合については, VP1, VP2 の単一のリ ン酸化修飾ピークの割合は血清型を通じてほぼ同じであった一方で, VP2 の 2 つのリン酸化修飾ならびに 酸化修飾を受けたピークの割合は血清型によって異なっていた.

LC クロマトグラムのメインピーク(AAV1 および AAV6 におけるピーク No.3, AAV2 におけるピーク No.2) をデコンボリューション解析すると、本章で使用したどの血清型の AAV においても、VP3 の低分子量側に マイナーピークが観測された(図 7b, 左側のパネル). このマイナーピークに対応する VP 成分は、VP3 より わずかに小さい質量を有していた. 質量から決定した配列は AAV1 と AAV6 において A212(Ac)-L736, AAV2 において A212(Ac)-L735 であった. 該当成分の N 末端残基は、前項のペプチドマッピングにより検 出された二本目のアセチル化ペプチドと一致していた. これらのことから、VP3 の翻訳が通常の M204 から だけでなく M211 からも開始され、C 末端の残基まで完了し、通常の VP3 より小さい分子量を持つ VP3 変 化体が生産されたことが示唆された. LC-UV-MS で決定した VP3 変化体の質量は、CGE 測定により推定 したマイナーピークの分子量におおむね一致した.
2-3-4. 低 pH ならびに高温条件により生産される VP 切断物

AAV1 と AAV6 の LC クロマトグラムにおいて, VP1 が溶出したピーク(No.1), VP2 が溶出したピーク (No.2), VP3 と VP3 変化体が共溶出したピーク(No.3)に加えて, 4 番目のピークが検出された. このピー クのデコンボリューション結果を図 8a に示す. 二種類の VP3 切断物, A204(Ac)-D590 および A204(Ac)-D626 が検出された. LC-UV-MS 測定で決定された VP3 の配列が A204(Ac)-L736 であることを考慮する と, D590 と P591, D626 と G627 の間でそれぞれ特異的な切断が生じたことが示唆された. VP3 切断物の 分子量はそれぞれ約 43.4 kDa ならびに約 47.2 kDa であるが, それらの分子量に対応するピークは SDS-PAGE や CGE では検出できなかった. 先行研究により, ヘキサペプチドや抗体をサンプルとして使用した 分析において, DP 配列あるいは DG 配列における切断は低 pH の条件で特異的に切断されやすいことが 報告されている⁴¹. また AAV で LC-MS を実施した報告でも, 同様の DP 切断物が検出されている⁴². 本 章においても, SDS-PAGE や CGE で VP3 切断物に対応するバンドもしくはピークは確認されなかったこと を考慮すると, 低 pH の移動相および高温のカラムオーブンで分離を行う LC システム上で, 特異的な切断 が生じた可能性が高いと考えられた.



図 8. VP3 切断物の検出およびカラムの保持時間が VP3 切断物の生成に与える影響の評価

(a) AAV1, AAV6 におけるピーク No.4 のデコンボリューションマススペクトル

AAV の血清型および LC クロマトグラム(図 8a)のピーク番号を右上に記載した.

(b)カラム内で異なる時間インキュベーションした AAV1 の LC クロマトグラム

黒色,青色,赤色の線はそれぞれ 0,30,60 分のインキュベーション時間を表す.本測定では,微量な 切断物のピークを検出するため,LC での検出には蛍光検出を用いた.

(c) 各 VP および VP3 切断物のピーク面積の比

ピーク面積は(b)の LC クロマトグラムをもとに算出した. 各マーカーは VP3(●), VP2(◆), VP1(■), VP3 切断物(×), VP 切断物の C 末端領域(○)を表す.

(d) グラジエント中の保持時間約4分の位置に出現したピークのデコンボリューションマススペクトル デコンボリューション解析にはカラム中のインキュベーション時間60分のデータを利用した.

この仮説を検証するため,LC-MS にインジェクトした AAV1 サンプル原液をカラム内で保持させ,異なる 時間インキュベートした後に溶出する実験を行った.カラムに保持された AAV1 は低 pH(5%の移動相 B, pH 1.9) および高温 (カラムオーブン, 80°C) にさらされる. 移動相 B が 5%の状態は LC-UV-MS 測定にお けるLCのグラジエントの初期条件であり、移動相A(0.1%DFA in MS grade water)が95%、移動相B(0.1% DFA in MS grade acetonitrile)が5% 混合された溶液がカラムの中を通過している状態をさす. カラム内で のインキュベーション時間を変化させた LC クロマトグラムを図 8b に示す. AAV1 サンプルのインジェクト後 すぐに溶出のグラジエントを開始した結果を黒色,30 分あるいは 60 分の間カラム内でインキュベートした 後に溶出させた結果を青色および赤色でそれぞれ示している.カラム内のインキュベーション時間が増加 するにつれて, 溶出時間 9 分付近の VP3 切断物のピーク面積が増加したことから(図 8c), VP 配列中の D590-P591 および D626-G627 の特異的切断は LC のカラム内で促進されることが示唆された. VP3 切断 物ピークの増加と同時に, 溶出時間 4 分付近にピークが出現した. 該当のピークをデコンボリューション解 析すると, 溶出した成分は VP 切断物の C 末端領域(P591-L736 および G627-L736)に対応することが明 らかになった(図 8d). VP1と VP2 はどちらも VP3 の全配列を含むこと, VP1と VP2 においてもピーク面積 は減少していることから、VP1とVP2に特異的なN末端を持つ切断物が生じていることが予想される.しか し VP1 と VP2 は量比が小さいことから, 切断物に対応するピークが検出できなかったと考えられた. 本項で の結果から、低 pH および高温条件がそろったカラム内でのインキュベーションは VP 配列中の特異的な切 断を誘導し、VP1、VP2、VP3の量比が減少する一方で、VP3切断物の量比が増加することが示唆された.

また AAV1 の VP3 において, DP 配列を含んだ特定のアミノ酸配列で合成ペプチド(AAV1 の残基番号 で F577-D609)を作製し, 同様の低 pH かつ高温のカラム条件で LC-MS 測定を実施した. その結果にお いても同様に, DP 配列の特異的切断が確認されたことから(図 S3), DP 配列はフォールディングの有無に 関わらず切断を受ける可能性が高いことが示唆された.

2-3-5. SDS-PAGE, CGE, LC-UV-MS の結果に基づいた VP 構成比の決定

AAV カプシドにおける VP 構成比を, SDS-PAGE の染色ゲルの発光密度, CGE のエレクトロフェログラ ムのピーク面積, LC-UV-MS の LC-UV クロマトグラムのピーク面積(LC-UV-MS, LC-UV)から, それぞれ 以下に記載する計算法に従って算出した. SDS-PAGE および LC-UV-MS, LC-UV では VP3 と VP3 変化 体が同一のバンドもしくはピークとして検出されたため、両測定では該当のバンド・ピークを VP3 として VP 構成比を計算し、VP3 変化体は不分離により VP 構成比を決定できないとして扱った. 異なる原理で実施 した手法の測定値を比較するため、各測定値を補正しモル比に換算する必要がある. SDS-PAGE では、ま ず蛍光染色液で利用した SYPRO Ruby が結合しやすいアミノ酸残基であると報告されている K, R, H, Y, W が⁴³, 各 VP に含まれている数を算出した. 次に測定値として得られた各 VP の発光密度を前述したアミ ノ酸残基の総数で割ることで, 測定値を補正した. CGE では, Kuipers ら4が報告した 214 nm における変 性状態での各アミノ酸残基およびペプチド結合のモル吸光係数から、各 VP のモル吸光係数を算出した. エレクトロフェログラムのピーク面積をモル吸光係数で割ることで,測定値を補正した.LC-UV-MS,LC-UV では 280 nm のおける変性状態での芳香族アミノ酸のモル吸光係数 45 から,各 VP のモル吸光係数を算 出した. LC-UV クロマトグラムのピーク面積をモル吸光係数で割ることで, 測定値を補正した. なお, モル 吸光係数を計算する際に, LC-UV-MS により明らかになった VP1 と VP3 における N 末端メチオニン残基 の切断, VP2におけるN末端スレオニン残基の切断を考慮した.加えて, LC-UV-MSのデコンボリューショ ンマススペクトルの各ピークのシグナル強度(LC-UV-MS, MS-deconvolution)からも VP 構成比を算出した. これら四種類の測定値から補正・算出した VP 構成比を表 4 に示す. 算出したどの VP 構成比も従来から 提唱されてきた VP1: VP2: VP3 = 1:1:10 にぴったり一致することはなかった. CGE により算出した VP 構成 比と提唱されてきた VP 構成比を比較すると、VP3 の取り込み量はすべての血清型において 10 より少なか った一方で、VP2の取り込み量は AAV1 と AAV2 において1より大きく、AAV6 において1より小さかった.

Serotype	Methods	Detection	VP1	VP2	VP3	VP3 variant	VP3 fragments
AAV1	SDS-PAGE	SYPRO [®] Ruby	1.0	0.5	9.3	ND*	ND
	CGE	UV 214 nm	1.0	1.4	8.2	0.5	ND
	LC-UV-MS, LC-UV	UV 280 nm	1.0	1.8	13.7	ND*	0.5
	LC-UV-MS, MS-Deconvolution	MS	1.0	1.7	12.0	0.2	0.9
	SDS-PAGE	SYPRO [®] Ruby	1.0	0.4	11.6	ND*	ND
AAV2	CGE	UV 214 nm	1.0	1.4	7.6	0.6	ND
		UV 280 nm	VP1	+VP2	10.5	ND*	ND
	LC-U v -MIS, LC-U v		2	2.0		ND.	ND
	LC-UV-MS, MS-Deconvolution	MS	1.0	1.8	19.7	1.2	ND
AAV6	SDS-PAGE	SYPRO [®] Ruby	1.0	0.3	9.2	ND*	ND
	CGE	UV 214 nm	1.0	0.8	8.1	0.3	ND
	LC-UV-MS, LC-UV	UV 280 nm	1.0	1.0	11.9	ND*	0.2
	LC-UV-MS, MS-Deconvolution	MS	1.0	0.7	8.3	0.2	0.6

表 4. SDS-PAGE, CGE, LC-UV-MS から算出した各血清型の AAV の VP 構成比

各手法において算出した VP1 のモル比を 1.0 と設定した. LC-UV-MS, LC-UV における AAV2 の VP2 の結果は, VP1 と VP2 が同じピークから共溶出したた め, その面積を足して 2.0 と設定した. ND は検出できなかった "not determined" を表し, ND* は VP の分離が不十分なため検出できなかった "not determined because of poor separation" を表す. 後述する本文中(2-4-2)では LC-UV-MS の結果より VP 構成比を算出する場合, VP3 切断物の量比は VP3 に含めるべきと 議論しているが, 本表では VP3 切断物生成の有無を他の手法と比較するため, 別々に記載した.

2-4. 考察

近年の AAV の VP 分析に関する報告から, VP1, VP2, VP3 以外の VP 成分の存在は示唆されていた ^{31,32,34,35}.本章においては, VP3 の転写開始点である M204 とは異なる M211 のメチオニンから翻訳が開始 された VP3 変化体が CGE および LC-UV-MS により検出され,特異的な DP 配列および DG 配列で切断 が生じた VP3 切断物が LC-UV-MS により検出された.本項では, VP3 変化体と VP3 切断物の生成機構 について考察した後に,両者を含めた VP 構成比の算出について議論する.

2-4-1. VP3 変化体の生成機序

VP3 変化体の生成を考察するため、まず組換え型 AAV の生産における各 VP の発現レベルの制御に ついて記述する. AAV のカプシドを構成する VP1, VP2, VP3 は, 選択的スプライシングとリーキースキャニ ングと呼ばれる機構を利用し, 単一の Cap 遺伝子から生産される(図 9a). 先行研究により, Cap 遺伝子の mRNA 前駆体は選択的スプライシングを受け、約 2.3 kb のメジャーmRNA と約 2.6 kb のマイナーmRNA の二種類が生成されることが示唆されている^{46,47}. 細胞に Cap 遺伝子が導入されてからの時間で mRNA 前駆体の量は変動するものの, 選択的スプライシングを受けた後のメジャーmRNA とマイナーmRNA の量 比は約 7:1 である ^{48,49}. マイナーmRNA のみが VP1 の転写開始コドンを保持しているため, VP1 の量比は 比較的小さくなる. 一方で, VP2 と VP3 はリーキースキャニングにより, 同じメジャーmRNA から翻訳が進 む.リーキースキャニングとは,細胞質における翻訳の過程でリボソームが mRNA 上の最も上流の翻訳開 始点に到達した際に,開始コドンが読み飛ばされる現象である. AAV のメジャーmRNA の場合, VP3 の開 始コドンは AUG のメチオニンであるのに対し, VP2 の開始コドンは非古典的な開始コドンである ACG に設 定されている(そのため, VP2 の N 末端アミノ酸はメチオニンではなくスレオニンである). つまりメジャー mRNA 上をスキャンするリボソームはまず上流にある VP2 の転写開始点に到達するが、開始コドンが非古 典的なコドンである ACG であるため, 大部分のリボソームは転写を開始することなく下流へ進む 50. その結 果, VP2 の量比は VP3 より小さくなる. これらの制御が根底にあり, 従来から提唱されてきた VP 構成比, VP1: VP2: VP3 = 1:1:10 に近い量比を持つ AAV カプシドが形成される.

本章では、ペプチドレベルならびにインタクト VP レベルの両方で VP3 変化体が検出された(AAV1 と AAV6 では M211-L736, AAV2 では M211-L735). RNA ウイルスはリーキースキャニングを利用して単一 の RNA から 3-4 つのタンパク質が生産されることを考慮すると⁵¹, AAV のマイナーmRNA の翻訳におい ても VP2 と VP3 の開始コドンの両者を逃し、M211 に対応する開始コドンに到達することは可能である. 転 写開始点付近に複数のメチオニン残基が存在する場合、コザック配列が VP3 と VP3 変化体の発現レベル を制御していると考えられている³⁶. Kozak は 2 つの翻訳可能な開始コドン AUG が転写物上で並んでい た場合、AUG の A の位置を+1 として-3 の位置が A, +4 の位置が G である開始コドンが優位に翻訳され ることを報告した ^{52,53}. 本章で扱った血清型の場合、VP3 の開始コドン(M204 に対応)は-3 位置が A, +4 位置が G である(図

S4). そのため, コザック配列では VP3 の翻訳が優位に進み, VP3 変化体は比較的微量のみが生産されたと考えられた.

主な血清型の AAV において, VP3 の N 末端領域の配列アラインメントの結果を図 9b に示す. AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8, AAV10とAAVrh10 は転写可能な2つ目のメチオニン残基を保持しており, VP3 変化体が生産されうる血清型である.本研究および Jin らの報告 ³⁶によって, VP3 変化体の有無が確認された血清型はメチオニン残基の位置をグレーで色づけした.少なくとも AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAVrh10 の血清型では VP3 変化体の存在が実験的に確認されており, これらの血清型の AAV において VP3 変化体は AAV カプシドに組み込まれている可能性が高い.

さらに本章では、CGE 測定において VP3 手前の位置に出現するマイナーピークが VP3 変化体に対応 することを示した. CGE と LC-UV-MS どちらの結果においても、VP3 変化体は VP3 と比較して微量成分と して検出されただけでなく、CGE の結果より推定された VP3 変化体の分子量は、LC-UV-MS により決定し た質量におおむね一致した. VP3 変化体のピークが CGE のマイナーピークに対応することを確認するた め、図 9b より 2 つ目の転写開始点を持たず VP3 変化体が生産されることがない AAV5 において、追加で CGE の測定を実施した. その結果、AAV5 においては VP3 変化体に対応するマイナーピークは確認され なかった(図 S5). したがって、CGE で同定した VP3 付近の分子量が小さい側に出現するマイナーピーク は VP3 変化体であることが検証された.

CGE および LC-UV-MS で VP3 変化体の存在が明らかになったものの, VP3 変化体が AAV ベクターの 活性を左右するか否かは明らかになっていない. VP3 変化体の含有量が AAV の遺伝子導入率へ与える 影響を解明するためには、さらなる研究が必要となる.一方で、VP3 の配列領域に M203L の変異を導入し たプラスミドを導入して AAV2 を生産すると、細胞内で VP は生産されるが、カプシドは会合しないことが報 告されている ⁵⁴. 該当の論文中で、ウエスタンブロットにより M203L 変異プラスミドにより生産された VP の 分子量を推定すると、VP3 より分子量が小さい VP3a が確認された. VP3a の配列は未確認であるが、リー キースキャニングにより本論文と同じ VP3 変化体が生じていた可能性が高い.以上より、VP3 変化体の含 有率が高いカプシドはカプシドの会合率が低下することが示唆される.遺伝子治療用 AAV ベクターの開 発段階において VP3 変化体の量比を定量し、含有量が低いカプシドを明らかにすることで、生産効率の高 い医薬品候補物を選抜することができると考えられる.

VP 変化体を AAV の製造過程で低減する方法として、まず AAV の VP をコードする Cap 遺伝子を含む Rep-Cap プラスミド構築の時点で、望ましくないタンパク質成分の翻訳が進みうる DNA 配列を消去すること が考えられる. 真核生物のリボソームが翻訳を開始できるコドンは、古典的な AUG に加えて、ACG および CUG である ^{s2}. VP2 のように意図的に非古典的なコドンを転写開始点にしている場合を除いて、各 VP の 転写開始点付近の AUG, ACG, CUG は、カプシドの会合率や遺伝子導入率に影響を与えない範囲で対 応する DNA 配列を変更しておくことで、想定外の VP 成分の発現を抑制できると考えられる. また AAV の 生産に必要な各プラスドの導入条件やプラスミド導入後の細胞培養条件、AAV カプシド生産後の精製条 件が VP 変化体の発現量に与える影響については現状明らかになっていない. 一方で、AAV の発現に必 要なアデノウイルス由来のタンパク質をコードしたヘルパープラスミドの導入量が VP の発現量を大きく左右 すること ⁵⁵、宿主細胞由来のプロテアーゼが VP 配列を切断しうることを考慮すると ⁵⁶、生産細胞へのヘル パープラスミドの導入量を正確に制御することや宿主細胞由来のプロテアーゼを精製過程で完全に取り除 くことが、望まない VP 成分を含んだ AAV 粒子の混入を防ぐ方法であるといえる.

(a)



(b)

Sorotypos	N-terminal region of VP3											
Serviypes	203							211				
AAV1		Μ	Α	S	G	G	G	Α	Ρ	Μ	А	
AAV2		Μ	А	Т	G	S	G	А	Ρ	М	А	
AAV3		Μ	А	S	G	G	G	А	Ρ	Μ	А	
AAV6		Μ	А	S	G	G	G	А	Ρ	М	А	
AAV8		Μ	А	А	G	G	G	А	Ρ	М	А	
AAV10		Μ	А	А	G	G	G	А	Ρ	Μ	А	
AAVrh10		Μ	А	А	G	G	G	А	Ρ	Μ	А	
AAV4		Μ	R	А	А	А	G	G	А	А	V	
AAV11		Μ	R	А	А	Ρ	G	G	Ν	А	V	
AAV12		Μ	R	А	А	Ρ	G	G	Ν	А	V	
AAV5		Μ	S	А	G	G	G	G	Ρ	L	G	
AAV9		Μ	А	S	G	G	G	А	Ρ	V	А	
AAV7		V	А	А	G	G	G	А	Ρ	Μ	А	

図 9. VP3 変化体の生成機構および VP3 変化体を生成しうる AAV の血清型

(a) VP1, VP2, VP3 および VP3 変化体が選択的スプライシングとリーキースキャニングにより生産される概
 要図 ^{46,49}

(b) 主な血清型の AAV における VP3 の N 末端領域の配列アラインメント

本研究および Jin らの報告³⁶によって, VP3 変化体の有無が確認された血清型はメチオニンの位置をグレーで色づけした.

2-4-2. VP3 切断物の生成機序

本章では LC の分析過程における低 pH(移動相の約 pH 2.0)ならびに高温(カラムオーブンの 80°C)が 原因となり、VP3 の特異的な配列で切断が生じた結果、VP3 切断物が生成することを示した. AAV の VP を LC-MS で分析する際は、分解能の高い MS スペクトルおよび正確なデコンボリューションマスを得るた めに、VP のピークを分離させることが重要である. AAV の VP は 25°C 付近では全く分離することができな いため(図 S6)、80°C 付近の高温を添加することが必要になる. また先行研究により、通常 LC-MS の移動 相に添加されることの多いギ酸では LC において VP を分離することが難しいが、DFA を添加することで VP の分離が向上することが報告されている ^{36,42}. すなわち、AAV の各 VP の分子量を正確に LC-MS で測定 するためには、高温かつ低 pH の条件が不可欠である. 一方で、その欠点として VP の特異的な配列部位 に切断が生じる. 本章においては、AAV1 と AAV6 の DP 配列および DG 配列での切断が確認された.

アミノ酸配列"DX", アスパラギン酸と任意のアミノ酸が並んだ配列は低 pH の条件で加水分解を駆動力 とした分解が生じることが報告されている 42. 本章において確認された特異的切断のメカニズムを説明する ため,DX 配列におけるアスパラギン酸の異性化ならびに加水分解の反応経路を図 10a に示す.タンパク 質中の配列におけるアスパラギン酸は、スクシンイミド中間体を介してイソアスパラギン酸に異性化すること が知られている. アスパラギン酸の状態では β-カルボキシ基を保持するのに対して, イソアスパラギン酸の 状態では α-カルボキシ基に変化し、カルボキシ基の酸解離定数 pKaの値が 0.8~1.7 単位低下する⁵⁷. カル ボキシ基の pKaは隣接する残基に影響を受けうるが、アスパラギン酸残基の pKaが α-カルボキシ基で pKal =1.88, β-カルボキシ基で pKa2=3.65 であることを考慮すると58, pH 2.0 付近では α-カルボキシ基を持つイ ソアスパラギン酸が主に電離していると考えられる. このイソアスパラギン酸の電離した α-カルボキシ基の求 核攻撃が発端となり,反応性の高いアスパラギン酸無水物中間体が形成される. その際に DX 配列の切断 が生じ, X のアミノ酸からC 末端側のタンパク質領域が放出される. 残った N 末端側のタンパク質領域の C 末端のアスパラギン酸無水物中間体は、引き続いて加水分解によりアスパラギン酸に戻る.一般的に、この DX 配列の切断は DP あるいは DG の配列で生じやすいことが報告されている 41. スクシンイミド中間体の 形成時に, DX 配列の X がプロリンの場合は窒素原子の塩基性が高いこと, DX 配列の X がグリシンの場 合は側鎖の立体障害が少ないことで、アスパラギン酸の異性化反応が進行しやすいことが、切断が生じや すい理由であると考えられる(図 10b)59,60. さらに, DP を含む配列は高度に切断されるためアレーニウスの

温度依存が確認されないが ⁵⁹, アスパラギン酸のスクシニル化は高温条件で加速されることが報告されて いる ^{61,62}. これらのことから, LC における pH 2.0 付近の低 pH と 80°C の高温がそろった条件において, 特 異的な DP 配列および DG 配列で切断が誘導されたといえる.

本章で用いた分析手法の中で, AAV が低 pH かつ高温の条件にさらされるのは LC-UV-MS の実験系 のみである. そのため, VP3 切断体は SDS-PAGE や CGE の実験系では確認されず, LC-UV-MS でのみ 検出されたと考えられる. しかし, LC-UV-MS は DP や DG の配列で切断が生じるとしても, VP の配列を確 認できる有効な手段であり, 切断物の生成量を補正することで VP 構成比の定量も可能である. 図 8 で示 した結果から, サンプルインジェクト後にすぐさまグラジエントを開始し溶出させた場合, VP3 切断物が生じ る割合はピーク面積で 2.5%以下であった. その場合においても, AAV サンプルはクロマトグラフィーのカラ ム上で VP3 の溶出時間である 8 分付近までは保持されている. 図 8c の結果から, カラム内のインキュベー ション時間による VP3 切断物の生成速度を推定すると, 約 0.23%/min であった. 概算ではあるものの, グラ ジェントをすぐに開始した場合もピーク面積で約 1.84%の VP3 切断物が生じる計算になり, LC-UV-MS 測 定を実施する前の AAV サンプルは DP や DG の配列での切断をほとんど受けていないことが示唆される. よって VP3 切断物の量比は, VP3 に含めて VP 構成比を議論するべきである.

前述したように、VP3 の切断が生じる原因の 1 つに低 pH が挙げられる. AAV ベクターの製造時におい て、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を実施した場合、AAV が低 pH にさらされる. アフィニティー クロマトグラフィーの精製中に DP あるいは DG 配列の切断が生じうるか否かを確認するため、AAV1 サン プルをアフィニティークロマトグラフィーで一般的に使用される溶出 Buffer (100 mM sodium citrate buffer, 100 mM NaCl, 0.001% (w/v) poloxamer, pH 3.5)⁶³で保管する追加実験を実施した. アフィニティークロマト グラフィーにおいて、溶出後のサンプルは Buffer 交換まで冷蔵保管されることを考慮し、サンプルは 4°C でインキュベーションし、異なるインキュベーション時間でサンプルを分取し、LC-UV-MS 測定を実施した. その結果、VP3 切断物の量比は全体の 2.5%を超えることはなかった (図 S7). よってアフィニティークロマト グラフィーの溶出 Buffer に AAV を暴露しても、前述の組成であれば 72 時間後まで DP ならびに DG 配列 の切断は促進されないことが示唆された. この結果は、VP3 切断物が LC-UV-MS の低 pH ならびに高温が そろった分析条件でのみしか生成されないという結論を支持した.

主な AAV の血清型において、VP3 の DP 配列および DG 配列が含まれる部分の配列アラインメントの

結果を図 10c に示す. DP 配列を持つ血清型は AAV1, AAV6, AAV8, AAV9, AAV10, AAVth10 であり, DG 配列は AAV5 以外の血清型で保有している. 本研究および Koza らの報告⁴²によって, VP3 切断物が 確認された血清型は DP 配列・DG 配列の位置をグレーで色づけした. AAV1, AAV6, AAV8 の血清型で は VP3 切断物が生じることが実験的に確認されているため, LC-UV-MS を実施する際には注意が必要で ある. (a)



Corotymoo	DP sequence			DG sequence	DP sequence
Serotypes	590 591			626 627	656 657
AAV1		T D P A		T D G H	A N P P
AAV2		RQAA		TDGH	A N P S
AAV3		ТАРТ		Т D G H	A N P P
AAV6		T D P A		T D G H	A N P P
AAV8		ΤΑΡQ		TDGN	A D P P
AAV10		TGPI		TDGN	A D P P
AAVrh10		ΑΑΡΙ		TDGN	A D P P
AAV4		NLPT		Т D G H	A N P A
AAV11		ΤΑΡΙ		ADGH	A N P A
AAV12		ТАРН		Т D G H	A N P N
AAV5		ТАРА		ТGАН	G N I
AAV9		AQAQ		TDGN	A D P P
AAV7		ΤΑΑQ		ΤΟΓΝ	A N P P

図 10. VP 切断体の生成機構および VP3 切断体を生成しうる AAV の血清型

(a) AAV の特定のアミノ酸配列部位におけるアスパラギン酸の異性化およびアスパラギン酸無水物の生成

による DX 配列切断の反応機構

(c)

アスパラギン酸あるいは DX 配列をはさんで N 末端側のアミノ酸領域を R₁, C 末端側のアミノ酸領域を R₂ と表した.

(b) DP 配列および DG 配列におけるアスパラギン酸の異性化の反応機構

本研究および Koza らの報告⁴²によって, VP3 切断物が確認された血清型は DP 配列および DG 配列 の位置をグレーで色づけした. 2-4-3. VP 構成比の算出

AAV カプシドは VP1, VP2, VP3 の 3 つの VP が約 1:1:10 の比で会合していると提唱されており, この 量比は電気泳動によって推定されたものである⁷. 一方で, 全てのカプシドを平均した VP 構成比は算出可 能であるが, カプシド 1 つ 1 つの VP 構成比は不均一であるという報告もある^{64,65}. たとえ VP 構成比がカ プシドごとに不均一であったとしても, 遺伝子治療用 AAV ベクターの品質を管理する上ではバルクの VP 構成比を決定することが必要である.

VP3 変化体を含めたすべての VP 構成比を決定するためには、分解能の高い分離手法が要求される. SDS-PAGE の測定では、VP3 変化体と思われるバンドが VP3 の下に検出されている報告もある一方で^{31,32}、 本章で実施した結果では VP3 とVP3 変化体のバンドが重なっていた.また SYPRO-Ruby を利用した蛍光 検出の結果から決定した VP 構成比は,特に VP2 が CGE で決定した値から外れていた.この理由は定か ではないが, 染色液の色素が各 VP に結合する量と実際のタンパク量との関係が不明瞭であることが原因 である可能性がある. LC-UV-MS の測定では, LC クロマトグラムを利用した各 VP の定量に加えて, MS で 測定した分子量から各 VP の配列を間接的に決定することができた. VP1 と VP2 が分離できている AAV1 とAAV6の結果では、VP1とVP2の量比は CGE の結果とおおむね一致していた.しかし、VP3の量比は 他の手法と比較して大きい傾向にあり、これは VP3 と VP3 変化体のピークが共溶出したことが原因である と考えられる. 一方で, LC-UV-MS (MS-Deconvolution)で求めた値は AAV1 と AAV6 において, CGE の 値より大きい傾向にあった. この差異は各 VP のアミノ酸配列により MS におけるイオン化効率が異なるた め生じたと考えられる. これらの点を踏まえると, すべての VP が1 つのピークで分離できている CGE が VP 構成比の定量に最も適しているといえる.しかし, CGE においては VP3 変化体を含めた各 VP の定量が可 能であるが, CGE のみでは各 VP の配列は決定することができない. 本論文では, CGE と LC-UV-MS を 組み合わせ, CGE で VP 成分の定量を実施しかつ LC-UV-MS で配列を確認することで, 正確かつ定量的 な VP の分析が可能であると結論付ける.

2-5. 小括

第二章では、先行研究で存在が示唆されていた従来の VP には該当しない VP 成分の同定および生成 機序の解明を研究目的として、SDS-PAGE、CGE、ペプチドマッピング、LC-UV-MS を用いて AAV1、 AAV2、AAV6の三種類の血清型の AAV の VP 成分を分析した.

第一に、AAV1、AAV2、AAV6 の全ての血清型において、通常の VP3 の転写開始点である M203 では なく M211 から転写が開始されたと考えられる VP3 変化体を、ペプチドマッピングおよび LC-UV-MS を用 いて同定した. VP3 変化体はリーキースキャニングにより、リボソームが通常の VP3 の転写開始点を逃れる ことで生産されたと考えられた. また同様の VP3 変化体が、AAV3、AAV8、AAV10、AAVrh10 のカプシド にも含まれている可能性がある. さらに VP3 変化体は、CGE の測定において VP3 の手前の位置にマイナ ーピークとして分離されることを示した.

第二に, AAV1 と AAV6 の血清型において, VP3 の C 末端側の D590 あるいは D626 で切断が生じた VP3 切断物を LC-UV-MS により検出した. VP3 切断物生成の原因となる DP 配列あるいは DG 配列の特 異的切断は, アスパラギン酸の異性化ならびにアスパラギン酸無水物中間体を介した加水分解反応が駆 動力となり生じたと考えられた. この切断は低 pH(pH 2.0)と高温(80°C)がそろった条件, 本章においては LC-UV-MS の LC 分離におけるカラム内でのみ進行した. そのため, LC-UV-MS の LC におけるピーク面 積から VP 構成比を算出する場合, VP3 切断物は VP3 の量比に加える必要がある.

最後に,異なる分析手法による VP 構成比の算出結果を比較した. VP 構成比の定量には各 VP を単一 のピークで分離できている CGE が適しているが, CGE のみでは各 VP の配列を決定することはできない. 遺伝子治療用 AAV ベクターの VP を適切に評価するためには, CGE と LC-UV-MS を組み合わせ, LC-UV-MS で得られた各 VP の質量および配列情報から CGE のピークをアサインする手法が有用である.

第三章 HDX-MS を利用した AAV ベクターの高次構造解析

3-1. 緒言: AAV ベクターの高次構造解析の現状ならびに第三章の位置づけ

遺伝子治療用のAAV ベクターだけではなく、バイオ医薬品の重要な管理項目の1つとして『高次構造』 があげられる.バイオ医薬品の主成分となるタンパク質の高次構造はその機能と密接な関係を持つため、 製造・輸送・保管などの過程で非天然な構造に劣化していることがないか、確認する必要がある.厚生労 働省が定めた生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物期限由来医薬品)の規格および試験方法の ガイドラインにおいても、評価すべき物理的化学的性質の中に高次構造が含まれている ⁶⁶. 一方で、分子 量が大きく複雑な構造を形成するバイオ医薬品の高次構造解析を溶液中でハイスループットに実施できる 技術は少ない.

一般的にタンパク質の高次構造解析には、円偏光二色性(circular dichroism: CD)測定, X線構造解析, 核磁気共鳴法(nuclear magnetic resonance: NMR), クライオ電子顕微鏡(cryo-electrom microscopy: Cryo-EM)などが用いられてきた. それぞれの構造解析手法の利点・欠点を表 5 に示す. CD の測定結果からは, タンパク質の分子全体の二次構造情報を得ることはできるが、タンパク質の局所的な構造変化部位は特定 することができない. X 線構造解析, NMR はタンパク質の高次構造情報をアミノ酸一残基レベルで検出で きる非常に強力な手法である.しかし,X 線構造解析はタンパク質サンプルの結晶化が必要である点, NMR は約 30 kDa 以上の分子量を持つタンパク質の測定が困難である点がそれぞれ欠点であり、溶液中 のバイオ医薬品の解析には適していない. クライオ電子顕微鏡は X 線構造解析や NMR に比べて試料に 対する制約が少なく、近年急速に発展している手法である.クライオ電子顕微鏡もタンパク質の位置情報を 原子レベルで決定できるが,あくまで非晶質の氷中でタンパク質構造を測定する手法であること,一般的に サンプル調製からデータ解析まで数週間の時間がかかることから、医薬品評価として常用するには課題が 残る. このような背景から, バイオ医薬品の高次構造評価手法は現状確立されていないといえる. 実際, 前 述した生物薬品の試験方法に関するガイドラインの中でも,高次構造と生物活性との適切な相関が証明さ れている場合, 高次構造評価は生物活性試験に置き換えても良いという旨の記載があり, 高次構造の評 価は生物活性により代替されることが多い、しかし、バイオ医薬品の高次構造をハイスループットで評価す る手法が欠如しており、直接的に評価できないという現状自体が課題であり、既存の分析法の改良および 新たな分析法の開発が望まれている.

前述したバイオ医薬品の高次構造評価における課題を解決可能な分析方法の一つとして、水素重水素 交換質量分析 (hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: HDX-MS) があげられる. HDX-MS はタ ンパク質の位置座標を決定することはできないが、溶液中のタンパク質の高次構造をペプチド単位で比較 可能な手法である. サンプルの分子量の制限がなく抗体やウイルスといった巨大分子でも測定が可能な点、 測定系が確立されていればデータ解析を含め数日で測定が終了する点、そして何より溶液中でのタンパク 質の高次構造を評価できる測定手法である点で、HDX-MS はバイオ医薬品の品質評価における汎用性 が高いといえる⁶⁷. 実際に HDX-MS をバイオシミラーの高次構造評価に用いた例が報告されており、抗体 医薬品であるインフリキシマブの先行品と後発品で高次構造に有意な差がないことが示された⁶⁸. さらに HDX-MS を利用することで、抗体の高次構造が処方条件や熱などのストレス条件によっても変化すること が示されており^{69,70}, HDX-MS が抗体医薬品の製造・輸送中に生じうる局所的な高次構造変化を検出でき ることが示唆された. 一方で、HDX-MS による AAV の高次構造解析の研究例はない.

AAV ベクターにおいても、カブシドの高次構造はその機能と密接な関係があるといえる¹¹.まずカブシド の二次構造について言及するため、VP3 モノマーの構造を図 11a に示す.各血清型の AAV で構造が保 存されている基本構造は、1本のα ヘリックス(αA)および9本のβストランド(βA-βI)である.特に8本のβ ストランド(βB-βI)から形成された逆平行のβバレル構造はその見た目からジェリーロールと呼ばれ、VP3 の構造の基幹となっている.反対に、血清型により構造が異なると報告されている領域は9本のループ領 域であり、可変領域(variable region: VR)と呼ばれる.これらのループ領域は配列の順で VR1~VR9 と定義 され、各 VR が遺伝子導入率や中和抗体との相互作用、細胞導入時に必要となるへパリン硫酸プロテオグ リカンとの結合等に関与することが報告されている(表 6).また VR 以外のループ領域として、βH とβI には さまれたループ領域であり、カプシドの会合に関与する HI ループが知られている¹².次にカプシドの四次 構造について説明するため、VP が 60 単位会合したカプシドの全体構造を図 11b および 11c に示す.AAV カプシドは幾何学的に三角形分画数1(icosahedric triangulation number: T, T=1)の正二十面対構造をとる ため、軸回りに回転した際に一周の間に3回構造が重なる3回対称軸と、一周の間に5回構造が重なる5 回対称軸が存在する.VR2 や HI ループに近い領域が5回対称軸のチャネルはエンドソームエスケー プ時の PLAドメインの外在化や、核におけるウイルスゲノムの放出が行われる通路であると提唱されており

⁷³,活性に関与する領域であるといえる.したがって,遺伝子治療用 AAV ベクターにおいてもカプシドの高 次構造の整合性を適切に評価し, AAV ベクターの機能を保証することは非常に重要であるといえる.

以上より,遺伝子治療用の AAV ベクターの高次構造評価はその有効性や安全性を担保する上で不可 欠であるが,開発・製造時に常用的に運用できる溶液中での分析法が確立されていないことが,先行研究 における課題であるといえる.本章では,この課題を解決する足がかりとなるため,HDX-MS により AAV カ プシドの局所的な高次構造変化を検出することを研究目的とした.AAV ベクターの品質管理におけるモデ ルケースとして,完全粒子(カプシド内に DNA が内包されたカプシド)と空粒子(カプシド内に DNA を含ま ないカプシド),完全粒子とゲノム放出後完全粒子の高次構造解析を試みた(図 12).AAV ベクターのゲノ ム放出に関する分子メカニズムは明らかになっていないものの,先行研究によって熱ストレスを与えた完全 粒子は内包するゲノムを放出することが示唆されている⁷⁴.本章ではゲノム放出を誘導する熱ストレス条件 を最適化した後に,ゲノム放出後完全粒子の高次構造を HDX-MS で評価した.

HDX-MS によるカプシドの構造解析では、まず AAV2 の完全粒子において HDX-MS の測定を実施し、 重水素交換率が AAV カプシドの高次構造を反映していることを示した.次に AAV2 の完全粒子と空粒子 で HDX-MS の結果を比較し、両者で局所的な高次構造が異なることを明らかにした.最後に AAV2 の完 全粒子とゲノム放出後完全粒子で HDX-MS の結果を比較した.加熱ストレスにより内包するゲノムの放出 が誘導されたカプシドは、5 回対称軸付近の構造が変化することが世界で初めて解明された.これらの結 果より、HDX-MS は AAV においても局所的な構造変化を検出できる強力なツールであること、また AAV の完全粒子は生産中に混入しうる不純物である、空粒子やゲノム放出後完全粒子とは局所的な高次構造 が異なるため、HDX-MS を遺伝子治療用 AAV ベクターの高次構造の整合性評価に応用できることが示さ れた.

表 5. タンパク質の高次構造解析手法の比較 75

Methods	Pros	Cons		
Circular dichroism (CD)	 ✓ High throughput ✓ Quantification of secondary structures 	✓ Undetectable of local structural change		
X-ray crystallography	✓ High resolution	✓ Requirement of crystallization		
Nuclear magnetic resonance (NMR)	 ✓ High resolution ✓ Measurable in solution state 	✓ Limitation of molecular weight (<30 kDa)		
Cryo-electron microscopy (Cryo-EM)	 ✓ High resolution ✓ Measurable in close to solution state 	✓ Low throughput		
Hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS)	 ✓ No limitation of molecular weight ✓ Medium throughput ✓ Measurable in solution state 	✓ Resolution in peptide level		

表 6. AAV2 の VR 領域ならびに報告されている機能 ^{71,73,76-79}

Variable region (amino acid residues)	Functional role(s) in AAV2	Reference(s)
VR1 (262-268)	Transduction, A20 and IVIG neutralization	73, 76, 77
VR2 (326-330)	Transduction	76
VR3 (380-388)	Transduction and A20 neutralization	73, 76, 77
VR4 (449-468)	HS and IVIG neutralization	73, 76
VR5 (487-504)	Transduction, HB, HS and IVIG neutralization	73, 76, 78, 79
VR6 (525-541)	Transduction, HS and IVIG neutralization	73, 76, 78, 79
VR7 (544-556)	A20, HS, and IVIG neutralization	76
VR8 (579-594)	HB, HS, and IVIG neutralization	76, 78, 79
VR9 (704-711)	Transduction, HB, A20, HS, and IVIG neutralization	73, 76, 77

IVIG: intravenous immunoglobulin G, HB: heparin binding, HS: human serum





図 11. AAV の VP3 の構造(PDB: 6U0V)

(a) VP3 モノマーの高次構造

定常領域である α ヘリックス(αA)を赤色および β ストランド ($\beta A \sim \beta I$)を緑色, 可変領域であるループ (VR1~VR9)をシアン色で示した.

(b) VP3 が 60 単位会合してカプシドを形成する概略図

(c) AAV カプシドの特徴的構造

カプシドの各領域は中心からの距離で色分けして表示した.カプシドにおける3回対称軸の位置を黒色の三角形で,5回対称軸の位置を黒色の五角形でそれぞれ記載した.







5 fold channel







1. Comparison between empty capsid and full capsid



 ✓ Structural changes due to the presence of the encapsidated genome

2. Comparison between full capsid and genome released full capsid



 ✓ Structural changes induced by genome release

図 12. HDX-MS で実施する高次構造比較の概略図

AAV の空粒子と完全粒子の比較を行うことで内包するゲノムの存在で生じるカプシドの構造変化を,完 全粒子とゲノム放出後完全粒子の比較を行うことでゲノム放出の過程で生じるカプシドの構造変化を,それ ぞれ検出することを試みた. 3-2. 実験材料および実験方法

3-2-1. AAV サンプル

AAV2 の完全粒子および空粒子はどちらも 2.0×10¹³ vg/mL の濃度のサンプルを, VIROVEK 社 (Hayward, CA)より購入した. AAV サンプルは VIROVEK 社が特許を保有する Sf9 細胞を利用した BAC システムにより生産されている⁸⁰. 完全粒子には DNA として GFP が含まれているものを利用した. 精製後の AAV サンプルの処方条件は 1×PBS, 100 mM sodium citrate, 0.001% pluronic F-68, pH 7.0 である. 以下, AAV サンプルの原液は AAV サンプル原液, 試薬を加えた後の混合液はサンプル溶液と記載する.

3-2-2. 水素重水素交換質量分析(hydrogen deuterium exchange mass spectrometry: HDX-MS)

HDX-MS はタンパク質の溶液中における構造のダイナミクスを測定できる手法である 67. その原理なら びに本測定で使用したメソッドの概要図は図S8に記載した. HDX-MSにおけるサンプル調製はHDX PAL システム(Trajan, Morrisville, NC) および Chronos ソフトウェア(ver 5.1.8, Trajan) による自動化プログラムを 利用した. AAV サンプル原液を最終濃度が 80%になるよう, H2O バッファーもしくは D2O バッファーで希 釈した. H2O バッファーは 10×PBS pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を 10 倍希釈し, 塩酸 (FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan)を用いて pH 7.0 に調製した. D₂O バッファーは H₂O バッファ ーを減圧乾燥機(CENTRIVAP, Labconco, Kansas, MO)で完全に乾燥させた後,同量の重水(Iwatani, Osaka, Japan)に再溶解させ作製した. 重水素化サンプルは 20°C の反応トレイで異なる反応時間(60, 180, 600, 3600, 14400 sec) インキュベートした. 重水素交換なしのコントロールおよびペプチドマッピングの測定 には、H2O バッファーで希釈したサンプルを使用した. 重水素交換反応は重水素化サンプルと Quench バ ッファーを等量混合することで停止させた. Quench バッファーは8 M GdnHCl (FUJIFILM Wako Chemicals) に 0.8%となるよう ギ酸 (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を加えて作製した. クエンチ後のサ ンプル溶液 200 µL はすぐさまインジェクトし,タンパク質をペプチドへ消化,ペプチドの脱塩および分離を 実施した. オンライン消化はペプシンカラム(Enzymate Protein Pepsin Column, 300Å, 5 µm, 2.1 mm X 30 mm, Waters, Milford, MA)を用いて, 流速 100 μL/min で4分間実施した. ペプシンカラムのカラムオーブ ンは 7℃ で設定し, 消化の移動相にはギ酸(TCI)により pH を 2.5 に調製した MS グレードの蒸留水 (KANTO CHEMICAL Co. INC., Tokyo, Japan)を使用した. 消化後のペプチドはトラップカラム(ZORBAX Eclipse XDB-C8, 2.1 mm X 20 mm, 1.8-Micron, 600 Bar, Agilent, Santa Clara, CA) にトラップ することで脱 塩し, 続いて分析カラム(Hypersil GOLDTM, Dim (mm) 50 X 1, Particle Sz (µ) 1.9, Thermo Fisher Scientific) で分離した. トラップカラムおよび分析カラムのカラムオーブンは 4°C に設定した. 移動相は 0.1%ギ酸-蒸 留水(KANTO CHEMICAL)の pH をギ酸(TCI)により pH 2.5 に調製した溶液を A 溶媒, 0.1%ギ酸-アセト ニトリル(KANTO CHEMICAL)を B 溶媒として用いた. 分離は流速 45 µL/min において, 15 分間のリニア グラジエント(B: 8-40%)で実施した. 消化・脱塩・分離は LC (Vanquish, Thermo Fisher Scientific)で制御し, MS (Q Exactive HF-X mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific)により測定を行った. MS の測定はキャ ピラリー温度 275°C, 分解能 120,000, 質量範囲 (m/z) 260-2,000 で実施した.

3-2-3. HDX-MS のデータ解析

重水素化を実施していないマッピングの解析は Proteome Discoverer[™] ver 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて, Precursor Mass Tolerance 10 ppm, Fragment Mass Tolerance 0.02 Da の設定で実施した. 翻訳後 修飾は Dynamic modification として, 先行研究で報告されている酸化, 脱アミド, リン酸化, N末端メチオニ ンの切断およびアセチル化を選択して解析を進めた 81.82. 重水素化したサンプルから交換率を算出する HDX の解析は HDExaminer ver 3.2.1 (Sierra Analytics, Modesto, CA)を用いて実施した. 同定したペプチ ド本数および VP1 配列のカバー率は, 完全粒子と空粒子の比較において 222 本, 77.4% (VP3 配列にお いて 216 本, 94.9%), 完全粒子と加熱後完全粒子の比較において 196 本, 72.5% (VP3 配列において 193 本,95.1%)であった.二条件比較における有意差領域を決定する際には、ボルケーノプロットを用いた 83. 有意差水準 α=0.01 で解析を行った結果, x 軸である ΔHX の信頼区間は完全粒子と空粒子の比較におい て 0.5278 Da, 完全粒子と加熱後完全粒子の比較において 0.4811 Da であった. 解析後の重水素交換率 のデータの立体構造へのマッピングは Pymol ver 2.4.0 (Schrödinger, New York, NY)を用いて実施した. AAV2 の VP3 の構造には PDB: 6U0V を使用した. AAV の VP1 特異的領域と VP2 特異的領域の共通部 分(1-202)ならびに VP3 の N 末端領域(203-216)を含んだアミノ酸配列 1~216 の領域は, VP1 と VP2 の コピー数が少ないことが原因となり、未だに立体構造が解かれていない³. そのため本章では AAV2 の配 列(1-216)をもとに、構造予測プログラム Alphafold⁸⁴で作成した構造モデルを HDX-MS の結果のマッピン グに使用した. Alphafold はイギリスの Alphabet 社によって開発された Web 上で無償公開されているニュ ーラルネットワークを用いたタンパク質の構造予測プログラムであり、タンパク質の配列情報のみから構造を 予測することができる. これ以降, 該当の VP1 特異的領域(VP1 unique regions)と VP2 特異的領域(VP2 unique regions)をそれぞれ VP1u-VP2u と記載し, AAV2 の配列領域(1-216)を VP1u-VP2u 領域, Alphafold で作成したモデルを VP1u-VP2u モデルと記載する.

3-2-4. 変性開始温度(denaturing onset temperature, Tonset)の測定

AAV カプシドの変性開始温度は Uncle (Unchained Labs, Pleasanton, CA)を用いて決定した. AAV サン プル原液 9 μL を専用の測定用ウェルである Uni にアプライし, 昇温速度 1°C/min の昇温条件下でトリプト ファン残基を中心とした芳香族アミノ酸残基由来の蛍光スペクトルを測定した. 加熱時のタンパク質の変性 は, 装置内蔵の 266 nm レーザーにより励起した芳香族アミノ酸由来の内因蛍光(主にトリプトファン⁸⁵)を検 出することでモニターすることができる. 熱変性が進むと, 内部にフォールディングされていたトリプトファン 等が外部に露出し, 芳香族アミノ酸残基周囲の環境が疎水性環境から親水性環境へと変化する. 芳香族 アミノ酸の蛍光波長は変性状態の親水性環境において長波長側へシフトする(レッドシフト)ことが分かって おり, このレッドシフトを検出することでタンパク質の変性状態への移行を分析する. カーブを取得する. 取 得したデータより, 温度を x 軸に, 蛍光スペクトルの 300-430 nm の重心平均(barycentric mean: BCM)を y 軸にプロットすることでタンパク質の変性カーブを取得できる. BCM のプロットの一次微分値が最大値の 10%に達する温度点を変性開始温度 Tonsetと定義し, 値を決定した.

3-2-5. ゲノム放出温度 (genome release out temperature, T_{out})の測定

AAV2 完全粒子のサンプル原液を 2.5×10¹² vg/mL になるように希釈し, 希釈後のサンプルに 20×になる よう SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific)を加えた. サンプル溶液を 96 ウェルプレート (Greiner Bio-One, Kremsmuenter, Austria) に 20 μL ずつアプライし, qPCR (QuantStudio3, Thermo Fisher Scientific) によりサ ンプル加熱過程における蛍光を測定した. 測定は 2°C 昇温させ蛍光を測定し, 5 分間保温した後に再度 加熱するサイクルを繰り返して実施した. データ解析では, 得られたデータ点をフィッティングし, 85°C で 10 分間の加熱により測定前に 100%ゲノムを放出させたサンプル測定の結果を用いて補正した. ゲノム放出 による蛍光増加のプロットの一次微分が最大値に達する点をゲノム放出温度 Tout と定義し, 値を決定した.

SYBR Gold は AAV が内包する一本鎖の DNA にも結合できる DNA 検出に用いられる色素であり, DNA との結合時にその蛍光が 1000 倍以上増強される ⁸⁶. この性質を利用して, AAV サンプルの加熱に より誘導されたゲノム放出に伴う蛍光値の増加を検出することで, AAV がゲノム放出量する温度を決定す ることができる. 3-2-6. ゲノム放出割合の測定

本測定のプロトコルは Bee らによる先行研究⁸⁷を参考にした. AAV サンプル原液を2.0×10¹⁰ vg/mL まで 希釈し, 各条件で加熱した後に室温で冷却した. 冷却後のサンプル溶液 180 µL に 20×に希釈した SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific)を 20 µL 加えて混合した. 混合後のサンプル溶液を 96 well プレート (Greiner Bio-One)にアプライし, プレートリーダー (SpectraMax i3x, Molecular device, Tokyo, Japan)により SYBR Gold の蛍光を測定した. 蛍光測定は励起波長 495 nm, 蛍光波長 530 nm で測定した. ゲノム放出 温度の決定においては AAV サンプルを加熱しながら蛍光を測定したが, 本測定では過熱後冷却した AAV サンプルを測定し, 放出したゲノム量を定量した.

ゲノム放出量の定量は、各濃度の AAV サンプル溶液が内包するゲノムをすべて放出させた最大量から 作成した検量線をもとに行った. ゲノムが最大量放出される条件を確認すると、85°C で 1 分間以上加熱す ることで放出量が最大量に達することが明らかになった(図 S9a). この結果から、本測定では 85°C で 10 分 間加熱したゲノム放出量を最大量として定めた. AAV サンプル原液を 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0×10¹⁰ vg/mL に希釈したサンプル溶液において、85°C で 10 分間加熱後のサンプルでゲノムの最大放 出量を測定した. 遊離の DNA として最初から含まれていたゲノム量を考慮するため、加熱なしのサンプル でも同様の測定を実施した. 加熱後の蛍光値から加熱なしの蛍光値を引いた値を用いて、ゲノム放出量の 検量線を作成した(図 S9b).

3-2-7. カプシド保持率の測定

加熱後の AAV サンプルのカプシド保持率を測定するため,サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography: SEC)による測定を行った.分析には HPLC (Nexra HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan) および 25°C のカラムオーブンに設置した SEC カラム (XBridge Protein BEH SEC Column, 450Å, 3.5 μ m, 7.8 mm×300 mm, Waters)を用いた. AAV サンプル原液を 1.0×10^{12} vg/mL に希釈した後に加熱し, カラムに 10 μ L インジェクトした.移動相は 10 mM リン酸 Buffer (FUJIFILM Wako Chemicals) に 350 mM の塩化カリウム (FUJIFILM Wako Chemicals)を加え,塩酸 (FUJIFILM Wako Chemicals)で pH 6.5 に調製した溶液を使用した.溶出は流速 0.6 μ L/min, アイソクラティック溶出で実施した.検出は芳香族アミノ酸の内因蛍光により実施し,励起波長 280 nm,蛍光波長 350 nm で実施した.

3-3. 結果

3-3-1. HDX-MS による AAV2 完全粒子の高次構造解析

HDX-MS はタンパク質の重水素交換率をペプチド単位で測定することで,溶液中のタンパク質の構造 のダイナミクスを決定できる手法である⁸⁸. AAV の HDX-MS 測定においては,カプシドの変性剤に対する 構造安定性が高いため(図 S10), AAV2 の場合グアニジン塩酸塩による変性処理が4 M の濃度で実施さ れるよう,サンプルとクエンチバッファーの混合量を設定することが重要である.本章では,まず AAV2 の完 全粒子をサンプルとして HDX-MS の測定を実施した.各重水素交換時間において,検出した全ペプチド の重水素交換率を VP3 モノマー(図 13a)ならびに構造予測プログラム Alphafold によって構造予測した VP1u-VP2u モデル(図 13b)にマッピングした結果を示す.重水素交換率は AAV の溶液中における構造 のダイナミクスを反映するため,その結果は AAV の高次構造の特性を理解する上で非常に有用である⁸⁹. VP3 領域において,重水素交換はジェリーロールを中心とした β ヘリックス領域では進みにくく,14400 sec 後においても 20%以下の重水素交換率であった.一方で,いくつかのループ領域は 60 sec の時点ですで に 20%以上の重水素交換率を示した.運水素交換反応が経時的に進みやすい部位は,同一の重水素交換時 間において重水素交換率が高い位置とおおむね一致していた.

完全粒子の構造中で溶液中のダイナミクスが大きい位置を特定するため,重水素交換時間 60 sec の結 果をもとに作成したウッドプロットを図 13c 示す.検出した 222 本のペプチドのうち約 10%に対応する 23 本 のペプチドが,25%以上の高い重水素交換率を示した(図 S11).これらの重水素交換反応が進みやすい ペプチドは,VP1u-VP2u 領域,VR2,VR4,HI ループ,VR9 に分布していた.カプシド構造においては,5 回対称軸チャネル領域(VR2,HI ループを含む)および 3 回対称軸隆起領域(VR4 を含む)が,高い重水 素交換を示した領域に対応した(図 13d).

(a)







3600 s







(b)







3600 s



14400 s








図 13. AAV2 完全粒子における HDX-MS の結果のマッピング

- (a) VP3 モノマーへのマッピング
- (b) VP1u-VP2u モデルへのマッピング

(c)重水素交換時間 60 sec の結果におけるウッドプロット(x 軸を AAV2 のアミノ酸配列, y 軸を重水素交

換率とおき,検出したペプチドの長さを棒の長さで表した変則的な棒グラフ)

VP1u-VP2u 領域を黄色, VR 領域を緑, HI ループを赤色で表示した.

(d) 重水素交換時間 60 sec の結果の VP ペンタマーおよびカプシド構造へのマッピング

3-3-2. AAV2 空粒子とAAV2 完全粒子の高次構造比較

AAV カプシドの高次構造評価における HDX-MS の有効性を示すため, AAV2 の空粒子と完全粒子の 高次構造を比較した. なお本章で用いた空粒子と完全粒子は VP 構成比および PTM の割合に大きな差 はなく、二次構造の差異が原因となり高次構造の差が生じた可能性は低い(図 S12). また HDX-MS の二 条件比較を実施する際には、ボルケーノプロットを用いた. HDX-MS 解析におけるボルケーノプロットは、 2019 年に Hageman らにより提案された x 軸に各ペプチドの重水素交換の差分 Δ HX を, y 軸に Welch の t 検定より算出した *p* 値をプロットする解析手法であり、有意水準 α =0.01 のもと実施することで解析による偽 陽性を低減できることが報告されている ⁸³.

ボルケーノプロットにより, 完全粒子と空粒子の比較した結果を図 14a に示す. 全体的に完全粒子は空 粒子より低い重水素交換率を示す傾向にあり, 22 本のペプチドは有意に重水素交換率が低かった(表 7). 有意差を示したペプチドの共通領域ならびに VP 配列を考慮すると, 完全粒子において有意に重水素交 換率が低かった領域は No.1: 49-73 および 101-131, No.2: 257-287, No.3: 314-339, No.4: 393-414, No.5: 444-469, No.6: 564-592 の 6 つに分類された. これらの領域を VP 構造にマッピングした結果を図 14b, 14c に示す. 有意差を示すペプチドが集中していた No.3 領域および No.4 領域は, 5 回対称軸のチャネル付 近の領域に該当していた. 他の有意差領域では, No.1 領域は VP1u-VP2u 領域, No.2 領域は VR1, No.5 領域は VR4 ならびに 3 回対称軸の隆起領域, No.6 領域は VR8 を含む領域にそれぞれ対応していた.

表 7. AAV2 空粒子と AAV2 完全粒子の高次構造比較において, 重水素交換率の有意差が検出された

領域

完全粒子において,全ての領域で空粒子より有意に重水素交換率が低かった.

Region	Sequence start	Sequence end	Time point (s)								
	49	73	600, 3600								
No.1: 49-73,	101	119	60, 180, 600, 3600								
101-131	105	119	60, 180, 3600								
	120	131	60, 180, 600								
No 2: 257 297	257	14400									
NO.2. 237-287	257	287	600, 14400								
	314	339	60, 180, 600, 3600, 14400								
	316	336	60, 180, 600, 3600, 14400								
	317	339	60, 180, 600, 3600, 14400								
	320	339	600, 3600, 14400								
No.3: 314-339	320	342	60, 180, 600, 3600, 14400								
	320	347	60, 180, 600, 3600, 14400								
	321	336	180, 3600								
	321	347	60, 180, 600, 3600, 14400								
	332	339	3600								
	393	408	14400								
No 4: 202 414	393	410	14400								
110.4. 393-414	396	408	14400								
	403	414	180								
No 5: 444-469	444	469	180, 3600, 14400								
110.5. 444-409	445	469	3600								
No.6: 564-592	564	592	600, 3600								



図 14. HDX-MS による AAV2 空粒子と AAV2 完全粒子の高次構造比較

(a) 空粒子と完全粒子の比較におけるボルケーノプロット

(b)空粒子と完全粒子の比較において,有意に重水素交換率が変化した部位の VP1u-VP2u モデルならびに VP3 構造へのマッピング

(c)空粒子と完全粒子の比較において,有意に重水素交換率が変化した部位の VP3 ペンタマーならびに VP3 カプシド構造へのマッピング 3-3-3. 加熱により AAV2 完全粒子に誘導されるゲノム放出

AAV の完全粒子は熱ストレスを与えると、カプシドの変性、すなわちカプシドの会合状態の崩壊が始まる 前に、内包するゲノムが放出されることが示唆されている⁷⁴. HDX-MS によりゲノム放出に関与する高次構 造変化を検出するため、熱ストレスに対する AAV カプシドの物理化学的安定性を評価し、本章で使用する AAV サンプルにおいて、カプシドが保持されたままゲノムを放出するような加熱条件を検討することを試み た.まずはカプシドの熱安定性を解明するため、AAV カプシドの変性開始温度 *T*onset (denaturing onset temperature)を測定した. AAV2 の完全粒子および空粒子の加熱時の変性曲線を図 15a に示す. 算出さ れた *T*onset は完全粒子で 69.6°C、空粒子で 70.3°C であり(図 15b)、70°C 以下の温度ではカプシドは変性 せず、会合状態が保持されている可能性が高いことが示唆された.

次に、完全粒子のゲノム放出温度 T_{out} (genome release out temperature)を測定した. AAV のゲノム放出 は DNA 結合性の SYBR Gold 色素を用いて、放出されたゲノムによる蛍光増加を検出し、評価することが できる. AAV2 の完全粒子の加熱時の蛍光変化を図 15c に示す. 算出された完全粒子の T_{out} は 54.0°C で あり(図 15d)、55°C 付近の加熱条件ではゲノム放出を誘導するような構造変化が生じていることが示唆さ れた.

さらに同様の SYBR Gold 色素を用いて、37-55℃ の異なる温度で 1、5、10、30、60 分間加熱した際の ゲノム放出に伴う蛍光増加を測定した.加えて、ゲノムの放出は 85℃ で 1 分以上加熱することで最大量に 達することが分かったため、各濃度における最大放出量を測定することで検量線を作成し(図 S9)、異なる 温度条件におけるゲノムの放出量を定量した(図 15e).興味深いことに、37℃ においても完全粒子のゲノ ムはある程度放出されることが明らかとなった.一方でどの温度においても、10 分間の加熱時間でゲノムの 放出量はほぼプラトーに達していた.最も高温な 55℃ の熱ストレスを与えた完全粒子においては、10 分後 には約 61.4%のゲノムを放出していた.さらにゲノム放出は不可逆に進む反応であり、ゲノム放出に必要な 構造変化も不可逆であることが示唆された(図 15f).なお、単なる不可逆な一次反応であれば放出量がプ ラトーとなる量が温度によって異なる結果が説明できないことから、ゲノム放出の程度、すなわち完全粒子 の外に DNA が露出する程度は各温度によって異なっている可能性が高いと考えられた.

最後に,サイズ排除クロマトグラフィー(size exclusion chromatography: SEC)により各温度で 10 分間加熱した後のカプシド保持率を測定した(図 15g).加熱によりゲノムが放出された後もカプシドは保持される

傾向にあり、55℃で10分間加熱した後も約85.4%のカプシドは凝集・分解することなく保持されていた(図15h).よって熱ストレスによるゲノム放出はカプシドの分解により生じるのではなく、カプシドの構造変化に 起因して生じることが示唆された.本項の結果より、55℃で10分間加熱したAAV2完全粒子のサンプル をゲノム放出後粒子として扱い、HDX-MSによる高次構造解析を実施した.



- 図 15. 加熱により AAV2 完全粒子に誘導されるゲノム放出
- (a) 完全粒子および空粒子の熱変性カーブ
- (b)完全粒子および空粒子の Tonset の値
- (c)完全粒子の加熱によるゲノム放出カーブ
- (d) 完全粒子の Tout の値
- (e)異なる温度における加熱による完全粒子のゲノム放出の定量

完全粒子は 37, 45, 50, 55°C においてそれぞれ 1, 5, 10, 30, 60 分加熱した.

(f)ゲノム放出反応が不可逆であることの確認

完全粒子を 37℃ で 10 分または 60 分の間加熱したサンプルを, 20℃ で 60 分間インキュベートした後

- にゲノム放出量を測定した.
- (g)加熱後の粒子の SEC クロマトグラム

完全粒子を 37,45,50,55℃ でそれぞれ 10 分間加熱したサンプルを測定した.

(h)加熱後の粒子のカプシド保持率の確認

3-3-4. AAV2 完全粒子および AAV2 ゲノム放出後粒子の高次構造比較

前項より, 完全粒子を 55℃ で 10 分間加熱することでカプシドを保持したままゲノムを放出させるような構造変化を誘導できることが分かった. コントロールの完全粒子と加熱後の粒子の高次構造を HDX-MS で比較することで, ゲノム放出時のカプシドの高次構造変化を検出することができる.

完全粒子とゲノム放出後粒子を比較したボルケーノプロットを図 16a に示す. 有意差検定の結果,9本のペプチドがゲノム放出後粒子において高い重水素交換率を示した一方で,2本のペプチドはゲノム放出後 粒子において低い重水素交換率を示した(表 8). ゲノム放出後粒子で有意に重水素交換率が高かった領 域は No.1: 105-131, No.2: 214-228, No.3: 317-339, No.4: 396-412 に分類され,反対に重水素交換率が低 かった領域は No.5: 348-369 に対応した. これらの領域を VP 構造にマッピングした結果を図 16b, 16c に示 す. ゲノム放出後粒子で有意に重水素交換が高かった領域では, No.1 領域が VP1u-VP2u 領域, No.2-No.4 の領域が5回対称軸チャネル領域に該当していた. 有意に重水素交換が低かった No.5 領域は, VR や対称軸付近の領域といったカプシドの特徴的な構造部位には一致しなかった. 表8. AAV2 完全粒子とAAV2 ゲノム放出後粒子の高次構造比較において,重水素交換率の有意差が検出された領域

ゲノム放出後粒子において、No.1-No.3 および No.5 の領域で完全粒子より有意に重水素交換率が高く、 No.4 の領域で完全粒子より有意に重水素交換率が低かった.

Bagion	Sequence	Sequence	Time point (a)
Region	start	end	rime point (s)
No 1: 105 121	105	119	3600
100.1.105-131	116	131	180
No.2: 214-228	214	228	60, 180, 600
	317	339	60
No 2: 217 220	320	339	3600
10.3. 317-339	320	342	3600
	321	339	180, 600, 3600, 14400
No. 4: 248 260	348	368	14400
110.4. 346-369	348	369	3600
No 5: 206, 412	396	412	60
110.5. 396-412	403	412	60



図 16. HDX-MS による AAV2 完全粒子と AAV2 ゲノム放出後粒子の高次構造比較

(a) 完全粒子とゲノム放出後粒子の比較におけるボルケーノプロット

(b)完全粒子とゲノム放出後粒子の比較において、有意に重水素交換率が変化した部位のVP1u-VP2uモ

デルならびに VP3 構造へのマッピング

(c)完全粒子とゲノム放出後粒子の比較において,有意に重水素交換率が変化した部位の VP3 ペンタマ

ーならびに VP3 カプシド構造へのマッピング

3-4. 考察

HDX-MS はタンパク質の溶液中における高次構造評価を行う上で最適な手法の一つである. HDX-MS を利用したウイルスの高次構造解析は、デングウイルス⁹⁰、マウス微小ウイルス(minute virus of mice: MVM) ⁹¹、カブクリンクルウイルス⁹²など複数のウイルスで実施され、ウイルスカプシドのような複雑な会合体におい ても溶液中の構造のダイナミクスを検出可能な手法であることが示されてきた. 一方で、AAV において先行 例はなく、AAV ベクターの製造や輸送の過程で生じうる高次構造変化を HDX-MS により検出できるか否 かは明らかになっていなかった. 本章では、世界で初めて HDX-MS による AAV カプシドの構造解析を実 施し、空粒子と完全粒子あるいは完全粒子とゲノム放出後粒子を比較すると、両者には局所的な高次構造 変化が生じていることを明らかにした. 本項では、AAV2 完全粒子の溶液中のダイナミクスについて議論し た後に、空粒子と完全粒子、完全粒子とゲノム放出後粒子に生じた高次構造変化について考察する. 3-4-1. AAV2 完全粒子の溶液中のダイナミクス

タンパク質中の各アミノ酸残基における重水素交換率は、それぞれの残基が形成する高次構造に影響 を受ける.二次構造を形成する領域はアミド水素が隣接する原子と水素結合を形成する可能性が高く、一 般的に重水素交換率が低い傾向にある⁹³.そのため、α ヘリックスやβシートを形成している領域と比較す ると、ループ構造の重水素交換率は高いといえる.本章では、AAV2 完全粒子において特に VP1・VP2 領 域(AAV2 の残基番号で 1-203)、VR2、VR4、HI ループ、VR9 の領域に分布するペプチドが高い重水素 交換率を示した.

VP1 領域に特異的に結合する A1 抗体を用いたドットブロット解析により, AAV の完全粒子において VP1u-VP2u 領域が室温付近ではカプシドの内部に存在していることが示唆されている 94.95. 一方で, VP1u-VP2u の領域は配列にグリシンの含有量が多いため,構造の自由度が高く変性しやすい領域である ことが知られている³. そのため, たとえカプシド内部に位置していたとしても, VP1u-VP2u の領域は重水素 交換率が高かったと考えられる. VR2 および HI ループは 5 回対称軸チャネルを形成あるいは近接してい る領域である. 5 回対称軸チャネルは, エンドソームエスケープにおいて VPlu 領域が外在化する通路とな ると考えられている⁷¹. また同じパルボウイルス科の MVM⁶⁶ や B19 ウイルス ⁹⁷ の内包されたゲノムが 5 回 対称軸のチャネルから放出されることを考慮すると、AAV においても5回対称軸チャネルからゲノムが放出 される可能性が高い.5回対称軸の高い構造の自由度が、カプシド内部からVPlu領域やウイルスゲノムを 通過させやすくすることに貢献していると考えられる. VR4 は高度に外部へ露出しており、3 回対称軸の隆 起を形成する領域である.3回対称軸の隆起領域は受容体との結合に関与すると報告されており78,98,3回 対称軸の高い構造の自由度が受容体の認識に寄与していることが示唆される.これらの5回対称軸および 3回対称軸において重水素交換率が高いという傾向は、MVM において 0℃ で実施された HDX-MS の結 果と一致しており ⁹¹, パルボウイルス科のウイルスにおいて共通する特徴である可能性が高い. VR9 が高 い重水素交換率を示した理由は定かではないが、先行研究で VR9 の領域に変異を加えた AAV2 の K706A 変異株は野生型と比較して感染力が低下した報告があり⁷², VR9 の高い構造の自由度は AAV2 が 細胞に感染する上でなんらかの役割を持つ可能性が示唆される.

3-4-2. AAV2 完全粒子とAAV2 空粒子の高次構造の差異

クライオ電子顕微鏡を用いた AAV の完全粒子と空粒子の構造比較を実施した先行研究では, AAV2 で 5 回対称軸付近のカプシド表面にわずかな差が確認されている一方で⁹⁴, AAV7, AAV8, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh10, AAVrh39 では両者の高次構造は実質的に差がない(主鎖の α 炭素の RMSD 値が 0.2-0.3 Å)と報告されている^{99,100}. しかし,本章で AAV2 の完全粒子と空粒子の高次構造を HDX-MS で比較 した結果,両者には明確な差が生じた. この差異は, クライオ電子顕微鏡は氷包されたタンパク質構造に 多様性はあるものの静止画像をもとにした測定手法であるのに対して, HDX-MS は溶液中のカプシド構造 のダイナミクスを反映した構造解析手法であることが原因となり生じたと考えられる¹⁰¹.

重水素交換率は全体的に完全粒子において低い傾向にあったことから,完全粒子は空粒子に比べ溶 液中のダイナミクスが低いことが明らかとなった. クライオ電子顕微鏡での結果と対比すると, 有意に重水素 交換率が低かった領域は VP1u-VP2u 領域に位置する No.1 領域, VR1 を含む No.2 領域, 5 回対称軸チ ャネルを形成する No.3 領域およびチャネル付近の No.4 領域, 3 回対称軸隆起を形成する No.5 および No.6 領域に位置していた. 内包するゲノムの有無だけではなく, 完全粒子と空粒子では 5 回対称軸付近 の電子密度分布が異なることが AAV8, AAV10, AAVrh39 を用いた論文で報告されている¹⁰⁰. この論文で は、AAV8、AAVrh39 では空粒子の 5 回対称軸内側部分に完全粒子にはない電子密度が確認されたこと、 5回対称軸チャネル内部の電子密度に VP3のN 末端領域のアミノ酸残基(AAV2の残基番号で 217-221) がモデル化され,その長さが空粒子の方が長いことから,完全粒子では VP1u-VP2u 領域が 5 回対称軸チ ャネルを通して外在化しており,空粒子でのみ内在化している可能性が議論されている¹⁰⁰.一方で, VP1u 領域に特異的に結合する A1 抗体を用いたドットブロットにより, 多くの血清型の AAV の完全粒子におい て生理的条件下では VP1u-VP2u 領域の外在化は確認されておらず ^{94,95}, AAV の VP1u-VP2u 領域はカ プシドの内部に位置するという解釈が一般的である. 本章の HDX-MS では, 完全粒子の方が VP1u-VP2u 領域ならびに 5 回対称軸付近の構造の自由度が低い結果となった. したがって, 完全粒子は空粒子と比 較して 5 回対称軸チャネルが開くような構造変化は生じておらず, VP1u-VP2u 領域は完全粒子において も内在化していると結論づけた. すなわち, 完全粒子はカプシド内部にゲノムが存在する分, VPlu-VP2u 領域が占めることのできる空間が狭く、 VP3のN 末端が位置する 5 回対称軸下部に押し込まれた構造をと った結果, VP1u-VP2u領域と5回対称軸チャネル領域の構造のダイナミクスが低下し, 重水素交換率が低

下したと考えられる. この解釈は, AAV2 の完全粒子は空粒子と比較して 5 回対称軸の外部表面が伸長し ていることを報告した先行研究と合致する⁹⁴. VR1 や 3 回対称軸付近の構造変化は, 5 回対称軸付近を中 心とした局所構造のダイナミクスが変化したことにより, カプシド構造全体が再構築され, アロステリックな構 造変化が誘導された結果であると考えられる. 3-4-3. ゲノム放出により AAV2 完全粒子に生じた構造変化

一般的にウイルスのゲノム放出はカプシドが崩壊して生じる分子機構¹⁰²とカプシドが保持されたまま生じ る分子機構⁷⁴の2つの可能性が想定されている. AAV の場合,カプシドは核内においても安定な状態で 蓄積されると報告されていることから^{103,104},ゲノム放出にはカプシドに何らかの構造変化が必要である可能 性が高い. したがって, AAV のゲノム放出におけるカプシドの高次構造変化の解明は, AAV のゲノム放出 の分子メカニズムの理解へとつながる.本章では図15の結果から,加熱により誘導される AAV のゲノム放 出はカプシド構造の崩壊より前に生じること, AAV のゲノム放出は不可逆な反応であること, AAV のゲノム 放出はカプシドの状態を保ったまま進行することが明らかとなった. これらの結果は, AAV がカプシドの会 合状態を保持したままゲノムを放出する分子機構を支持した. さらにゲノム放出は 37°C においても進行し ており, 55°C の熱ストレスは体内におけるゲノム放出の加速条件であることが示唆された(図 S13).

本章ではさらに, HDX-MS を利用してゲノム放出後のカプシドに生じた高次構造変化を検出した. ゲノ ム放出後粒子において,有意に重水素交換率が高かった領域は No.1: 105-131, No.2: 214-228, No.3: 317-339, No.4: 396-412 であり, VP1u-VP2u 領域, VP3 の N 末端領域, 5 回対称軸のチャネル付近の領 域が該当した. AAV のカプシドは,加熱時に VP1u-VP2u 領域が 5 回対称軸チャネルを通して外在化され ることが示唆されている ^{94,95,105}. 本章においても AAV2 完全粒子の VP1u-VP2u 領域がカプシド内部から 外部へ移動するような構造変化が起こり、VP1u-VP2u 領域と5 回対称軸のチャネル付近の領域の重水素 交換率が増加したと考えられる. また先行研究により, 立体構造は解かれていないものの, VP1u-VP2u 領 域につながる VP3 の N 末端領域(AAV2 の残基番号において 217-221 に対応する領域)が 5 回対称軸チ ャネル内部の電子密度におおまかに一致することが議論されている^{100,106}. この配列は No.2 領域に含まれ ており、構造の自由度が増加していることから、VP1u-VP2u領域の外在化によりVP3のN末端領域も外側 に開くような構造変化が生じたことが示唆される. すなわち, 完全粒子の状態では5回対称軸チャネルを埋 めるように位置していた VP3 の N 末端領域が、加熱による VP1u-VP2u 領域の外在化に伴い、カプシド外 部に露出するような構造変化が生じた結果,重水素交換率が増加した可能性が高い.その結果, VP3の N末端領域と5回対称軸チャネル領域の間の相互作用が減少し、重水素交換率が増加したと考えられる. またゲノム放出後粒子において,有意に重水素交換が低かった No.5:348-369の領域は,5回対称軸が開 く構造変化に伴い部分的なフォールディングが進んだ結果,重水素交換率が低下した可能性がある.

HDX-MS による空粒子と完全粒子,完全粒子とゲノム放出後粒子の高次構造比較の結果から作成した 各カプシドの構造モデルを図 17 に示す.空粒子と完全粒子の構造比較では,完全粒子において主に VP1u-VP2u 領域および 5 回対称軸チャネルの構造の自由度が低かった.これは内包するゲノムが VP1・ VP2 領域を 5 回対称軸付近に押し出し,両者のダイナミクスが分子間相互作用の形成により低下したこと が原因だと考えられる.一方で,完全粒子とゲノム放出後粒子の構造比較では,ゲノム放出後の完全粒子 において主に VP1u-VP2u 領域, VP3 の N 末端領域, 5 回対称軸チャネル領域の構造の自由度が高かっ た.これは熱ストレスにより,先行研究で示唆されている VP1u-VP2u 領域の外在化が誘導され,さらに付随 して 5 回対称軸チャネル内部に位置していた VP3 の N 末端領域が外部に露出するような構造変化が生じ たことが原因だと考えられる.その結果として, 5 回対称軸チャネル内部の空間が空き,チャネルが開いた ことでゲノム放出が誘導されたことが示唆される.

このように本章では、HDX-MS で得られた高次構造情報から溶液中での AAV カプシドの挙動を理解す ることができた.ただし、HDX-MS は構造の座標を決定できる手法ではないため、VP1u-VP2u 領域の正確 な配向や位置は特定することはできないことに注意が必要である.本章の結果より作成した構造モデルを より強固なものにするためにも、HDX-MS を含めた AAV カプシドの高次構造解析がさらに進んでいき、 VP1u-VP2u 領域や VP3 の N 末端を含めた高次構造情報が蓄積されることが望まれる.



図 17. HDX-MS より推定された AAV の高次構造モデル

青色は重水素交換率が有意に低下した部分を含む領域を,赤色は重水素交換率が有意に増加した部 分を含む領域を示す. 3-5. 小括

第三章では,遺伝子治療用 AAV ベクターの溶液中の高次構造評価における HDX-MS の有用性を示 すことを目的として, AAV2 の完全粒子,空粒子,熱ストレスを与えたゲノム放出後粒子において HDX-MS による高次構造解析を実施した.

HDX-MS により測定した完全粒子における重水素交換率は,カプシドの二次構造および高次構造を反映しており,HDX-MS は溶液中におけるカプシド構造のダイナミクスを適切に評価可能であることが示された.また AAV のカプシド構造の中でも5 回対称軸チャネル領域や3 回対称軸隆起領域の構造の自由度が高いという結果は MVM における先行研究と一致し,パルボウイルス科のカプシド構造に共通する特徴である可能性が示唆された.

次に、HDX-MS により空粒子と完全粒子の高次構造を比較した. 完全粒子は空粒子と比較して、VP1u-VP2u 領域および 5 回対称軸チャネル領域の構造の自由度が低下していた. 完全粒子は内包するゲノム の存在により、同じくカプシドの内部に位置している VP1u-VP2u 領域が 5 回対称軸方向に押し込まれるよ うな構造変化が生じた結果, VP1u-VP2u 領域と 5 回対称軸チャネル領域の構造の自由度が低下すると同 時に、3 回対称軸隆起領域を中心として構造のダイナミクスが低下するようなカプシド構造全体の再編成が 生じている可能性が示唆された.

最後に、AAV2 の完全粒子と 55°C で 10 分間加熱したゲノム放出後粒子の高次構造を比較した. 完全 粒子の熱ストレスに対する物理的安定性を分析すると、AAV は 55°C のような Tonset より低い温度で加熱す ることで、カプシドの会合状態を保ったまま不可逆なゲノム放出を誘導できることが示唆された. HDX-MS による高次構造比較の結果、ゲノム放出後粒子においては VP1u-VP2u 領域、VP3 の N 末端領域、5 回対 称軸チャネル領域の構造の自由度が増加していた. これは加熱により、カプシド内部に位置していた VP1u-VP2u 領域と5 回対称軸チャネル内部に位置していた VP3 の N 末端領域が、5 回対称軸チャネル を通して外在化するような構造変化が完全粒子に生じたためであると考えられた. この5 回対称軸チャネル が開く構造変化が、ゲノム放出に必要であることが示唆された.

これらの結果より, HDX-MS は AAV ベクターの溶液中における高次構造を評価できる強力なツールで あり, 製造過程で混入しうる空粒子や内包するゲノムが放出された粒子といった, 活性を持たないであろう 粒子を高次構造の観点から区別できることが示唆された. これらの望ましくない成分が完全粒子に混入し

た割合と, HDX-MS による高次構造変化の検出感度の相関は, 定量的な分析を行うためにはさらに検討 する必要である. 一方で, HDX-MS により従来法では困難であった AAV カプシドの溶液中における高次 構造解析が可能になり, 局所的な構造変化を定性的に評価できるようになった価値は大きいといえる. 第四章 総括と今後の展望

4-1. 本研究の総括

AAV ベクターを利用した遺伝子治療用医薬品は近年さかんに臨床研究が進む一方で, AAV カプシド 自体の構造的な理解は未だに完全ではなく, 明らかにするべき課題を残していた.本博士論文では, 質量 分析を用いて AAV ベクターの構造解析を推進し, 先行研究で未解明であった VP 変化体の配列同定お よび生成機序の考察と, 前例がなかった溶液中における AAV カプシドの高次構造解析に取り組んだ.

第二章では、インタクト質量分析を中心とした AAV を構成する VP 成分の一次構造解析の結果、いくつ かの血清型で AAV カプシドには VP3 変化体が含まれること、LC-MS による分析中に VP3 切断物が生じ ることの二点を示した. VP3 変化体はリーキースキャニングにより通常の VP3 の転写開始点が通過されるこ とによって生産された可能性が高い. 残基番号 211 付近にメチオニンを保有する血清型(AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8, AAV10, AAVth10)は VP3 変化体をカプシドに含んでいる可能性がある. 先行研 究を含めると、AAV1, AAV2, AAV6, AAV8 においてはその存在が確認されている. VP3 切断物は各 VP を LC で分離するのに不可欠な高温および低 pH がそろった分析カラム内部において、DP 配列あるいは DG 配列のアスパラギン酸の異性化反応が誘導されやすい配列で、特異的な切断が生じて生産されると考 えられた. 先行研究を含めると AAV1, AAV6, AAV8 では DP 配列での切断が生じることが確認されてい る. これらの特異的な切断は LC-MS での分析中でのみ生じるため、VP 構成比を LC クロマトグラムのピー ク面積から算出する場合、VP3 切断物の量比は VP3 の量比に加える必要がある. 本章で実施した AAV ベクターの VP 成分の分析手法の比較により、VP 構成比を定量するにはすべての VP 成分を単一のピー クで分離できる CGE が適しているが、LC-UV-MS で得られた分子量から配列情報を確認する必要がある ことが示された. また本章の結果より、AAV ベクターの遺伝子導入率を変化させるカプシドの VP 構成比を、 VP 変化体を含めて正確に定量することが可能になった.

第三章では、HDX-MS による溶液中での高次構造解析の結果、AAV2 の完全粒子、空粒子、加熱後の ゲノム放出後粒子は溶液中で局所的な高次構造が異なることを示した.完全粒子単体の解析の結果、他 の領域と比較して主に 5 回対称軸チャネル領域と 3 回対称軸隆起領域の構造の自由度が大きかった.こ れらの特徴は、先行研究で明らかになった他のパルボウイルス科のウイルスの高次構造にも共通していた. 異なる二状態のカプシドの高次構造を比較すると、完全粒子は空粒子に比べて内包するゲノムの存在に よりカプシド内側の VP1u-VP2u 領域が 5 回対称軸チャネル方向に押し込まれ, 主に VP1u-VP2u 領域や 5 回対称軸チャネル領域の構造の自由度が低下していた. さらに, ゲノムが放出された加熱後粒子は VP1u-VP2u 領域が外在化したことにより, 完全粒子に比べて 5 回対称軸チャネルや VP3 の N 末端領域 の構造の自由度が増加していた.本章の結果より, 製造過程で混入しうる空粒子やゲノム放出後粒子は溶 液中における局所的な高次構造が完全粒子とは異なるため, HDX-MS を利用することで AAV ベクターの 高次構造の整合性を評価できることが示唆された.

本研究により, AAV ベクターの VP3 変化体を含めた一次構造解析および AAV カプシドの溶液中にお ける高次構造解析が可能になった.両成果は遺伝子治療用 AAV ベクターの品質管理を実施する上で, そのまま活用できる分析手法開発であるだけでなく, AAV カプシドの分子構造を理解する上でも非常に価 値のある内容であるといえる. 4-2. 今後の展望

遺伝子治療用の AAV ベクターの臨床試験数は近年増加傾向にあり、今後も新規 AAV ベクターの開発 はますます進んでいくことが予想される. AAV ベクターを利用した医薬品が普及する上で、その品質管理 項目は適切に整備する必要がある. さらに AAV ベクターの有効性と安全性を担保するためには、未だに 不明点が多い AAV カプシド自体の分子構造や溶液中での物理化学的安定性は解明するべきである.

第二章において CGE を利用して定量可能であることを示した VP3 変化体は,実際の遺伝子治療用 AAV ベクターにも含まれている可能性が高い. VP3 変化体の含有量が AAV ベクターの遺伝子導入率に 与える影響は将来的に解明する必要がある. 一方で,もし VP3 変化体が AAV ベクターの遺伝子導入率に 影響を与えなかったとしても, AAV ベクターの VP 構成比は VP3 変化体を他の VP と分離でき,正確に全 VP 成分を定量できる手法で管理するべきである. また VP3 変化体の開始コドンに変異を導入することで, VP3 変化体を含まない AAV ベクターのデザインも可能である. VP3 切断物に関しても,特異的な切断配 列である DP 配列および DG 配列に変異を導入することで,分析中に切断物を生じることのない物理的安 定性を向上させた AAV ベクターが生産できると考えられる. このような品質管理の正確性を向上させる新 規 AAV ベクターの開発は,将来的に実現可能であり進めていくべきである.

第三章では、HDX-MS を利用した高次構造解析により、AAV ベクターの溶液中における局所的な高次 構造変化が検出可能であることを世界で初めて示した。HDX-MS を利用した分析は従来法では困難であ った溶液中での高次構造を評価できる点で優れており、空粒子やゲノム放出後粒子といった不純物の混 入を構造面から区別できる利点がある。一方で、空粒子の混入は AAV ベクターの遺伝子導入率を低下さ せること確認されているが¹⁰⁷、ゲノム放出後粒子の混入が遺伝子導入率へ与える影響は解明されておら ず、さらに両者が過剰な免疫反応を誘導する可能性も不明瞭である¹⁰⁸. これらの事柄が将来的に明らかに なれば、完全粒子の純度を確認する目的に加え、医薬品の安全性を担保するという側面からも、HDX-MS による高次構造評価を実施する重要性が増加する。他のバイオ医薬品においても HDX-MS による高次構 造評価の有用性は確認されていることから^{67,68}、遺伝子治療用 AAV ベクターの高次構造の品質評価試験 において HDX-MS が将来的に運用される可能性は高い. また HDX-MS は異なる分子間の相互作用領域 の検出においも秀でている技術であり¹⁰⁹、本博士論文の成果を皮切りに AAV ベクターと中和抗体や細胞 外受容体との相互作用部位を特定するような研究が進んでいくことが期待される.



Serotypes	Estimated Mw of VP variant (Da)
AAV1	55559.1
AAV2	55302.1
AAV6	55625.6

図 S1. CGE における VP 変化体ピークの分子量推定

LC-UV-MSで決定した VP1, VP2, VP3の分子量から検量線を作成した.赤色が AAV1, 青色が AAV2, 緑色が AAV6 を表す.溶出時間から算出した推定分子量の値から, VP3 変化体はどの血清型においても VP3 の分子量から数千 Da 低い分子量を持つことが示唆された.

付録



図 S2. 各溶出ピークのデコンボリューションスペクトルの全体表示の重ね合わせ

表3にリストアップした以外の成分は第二章のLC-UV-MSでは検出できなかった.



図 S3. VP3 合成ペプチド(AAV1, F577-D609 と同じアミノ酸配列, DP 配列を含む)の LC-MS による測定 結果

合成ペプチド(FGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQD)はBiologica Co.(Aichi, Japan)よ

り 87%以上の純度の製品を注文・購入した. LC-MS の測定には本文中の LC-UV-MS と同じ Nexra HPLC (Shimadzu)と maXis II ETD ESI-QTOF mass spectrometer (Bruker)の装置を使用した. LC の溶媒も同様 に, A 溶媒に 0.1% DFA/MS 用蒸留水, B 溶媒に 0.1%DFA/アセトニトリルを使用した. 分離にはカラムオ ーブン 80°C で保温した 18 カラム (an ACQUITY BEH C18 column, 300Å, 1.7 μm, 2.1 mm×150 mm, Waters) を使用し, 流速 0.2 mL/min において B: 5-40%の 45 分間のリニアグラジエントで溶出させた.

(a)合成ペプチドの分離時のトータルイオンクロマトグラム

合成ペプチドは配列上に芳香族アミノ酸が少ないため、グラジエント時間に伴った溶出成分の検出には 本文中で使用した UV や蛍光検出ではなく、トータルイオンクロマトグラムを使用した. 合成ペプチドの LC-MS 測定の結果、ピーク番号 1~4 に示す 4 成分が検出された.

(b) 各検出ピークの MS クロマトグラム

各ピークのモノアイソトピックマスおよび価数を記載した. モノアイソトピック質量で計算して, 合成ペプチ ドの質量は 3392.5388 Da, DP 配列で切断が生じた際の N 末端側の分解物の質量は 1458.6603 Da, C 末 端側の分解物の質量は 1951.8890 Da である. どのピークにおいても検出されている二価のスペクトルのモ ノアイソトピック質量を元に各ピークの溶出成分の質量を計算すると, ピーク1が 1458.6712 Da, ピーク2が 1951.903 Da, ピーク 3 が 3394.5576 Da, ピーク 4 が 3395.5544 Da と計算できた (プロトンの質量は 1.007 Da を使用して計算を行った). 理論値との比較およびトータルイオンクロマトグラムにおける量比を考慮す ると, ピーク 1 は DP 配列の特異的切断が生じた後の N 末端側成分, ピーク 2 は DP 配列の特異的切断 が生じた後の C 末端側成分, ピーク 3 は切断が生じていない合成ペプチド, ピーク 4 は生産時に混入した 合成ペプチドの不純物であると判断した.

合成ペプチドの測定においても DP 配列の特異的な切断が確認されたことから,構造のフォールディングの有無に関わらず DP 配列における切断は進行することが示唆された.

First initiation codon																										Second initiation codon									
AAV1		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	U	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	Α	U	G	G	С	А	
AAV2		А	С	G	Α	U	G	G	С	U	А	С	А	G	G	С	А	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAV3		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	U	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAV6		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	U	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAV8		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	G	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAV10		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	G	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	U	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAVrh10		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	G	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	U	С	С	А	A	U	G	G	С	А	
AAV4		G	А	G	Α	U	G	С	G	U	G	С	А	G	С	А	G	С	U	G	G	С	G	G	А	G	С	U	G	С	А	G	U	С	
AAV11		G	А	А	Α	U	G	С	G	U	G	С	А	G	С	А	С	С	G	G	G	С	G	G	А	А	А	U	G	С	U	G	U	С	
AAV12		G	А	G	Α	U	G	С	G	U	G	С	G	G	С	G	С	С	А	G	G	С	G	G	А	А	А	U	G	С	U	G	U	С	
AAV5		А	С	А	Α	U	G	Т	С	U	G	С	G	G	G	А	G	G	U	G	G	С	G	G	С	С	С	А	U	U	G	G	G	С	
AAV9		А	С	А	Α	U	G	G	С	U	U	С	А	G	G	U	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	G	U	G	G	С	А	
AAV7		А	С	А	G	U	G	G	С	U	G	С	А	G	G	С	G	G	U	G	G	С	G	С	А	С	С	А	A	U	G	G	С	А	

図 S4. 主な血清型の AAV における VP3 の N 末端付近の RNA 配列アラインメント

AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8, AAV10, AAVrh10が通常のVP3の開始コドンに加えて2つ目の開始コドンを持つ.本文中で論じたように,最初の開始コドンは-3がAかつ+4がGなためコザック配列的に優位に翻訳が進み,反対にVP3変化体に対応する2つ目の開始コドンからの翻訳は相対的な量比が小さくなると考えられている. AAV4, AAV5, AAV9, AAV11, AAV12は通常の開始コドンのみ保有する. AAV7 は他の血清型における2つ目の開始コドンに対応する位置に通常の開始コドンを持つが, CUGからも転写が開始されることが先行研究により示されている³⁶.



図 S5. AAV5 をサンプルとして使用した CGE のエレクトロフェログラム

AAV5(3.95×10¹² vg/mL)のサンプルも他の AAV サンプル同様, 次世代バイオ医薬品製造技術研究組 合から提供していただいた.本文中と同様のプロトコルで CGE による分析を実施した. AAV1, AAV2, AAV6 のサンプルとは異なり, VP3 変化体のマイナーピークは確認されなかった.



図 S6. AAV1 の LC-UV-MS をカラムオーブン 25°C で実施した結果

LC クロマトグラムにおいて,各線はサンプルを繰り返し測定した N1, N2, N3 の結果であることを表す. デコンボリューション解析は最も検出強度が高かった N1 の結果で実施した. LC-UV-MS を 80°C および 25°C でそれぞれ実施した結果の比較を表に示す. どちらの温度でも本文中のプロトコルに従い,等量のサンプル をインジェクトし,同一のグラジェント条件で溶出した. 25°C においては,溶出成分の検出強度が低く,17 分付近の VP3 のピークのみしかデコンボリューション解 析で VP 成分を同定できなかった. また 80°C と比較すると, VP1 や VP2 に対応するピークは検出できず,25°C では各 VP を分離できないことが示唆された.



図 S7. AAV1 をアフィニティークロマトグラフィーで利用される一般的な溶出バッファーで 72 時間まで保管 した際の VP3 切断物の生成量の比較

本文中で論じたように、2.5%以下の VP3 切断物は LC-UV-MS で生成しうるため、測定前のサンプルに は含まれていない可能性が高い. AAV1 は PBS、溶出バッファーのどちらで保管した場合も、72 時間後ま でに 2.5%以上の VP3 切断物の増加は確認できなかった. よって、アフィニティークロマトグラフィーの溶出 バッファーで AAV を保管した際も、4℃ で 72 時間までは VP3 切断物は生産されないことが示唆された.



(b)

 $\begin{array}{ccc} k_{\rm op} & k_{\rm ch} \\ {\rm NH}_{\rm closed} \rightleftarrows {\rm NH}_{\rm open} \xrightarrow{} {\rm Exchanged} \\ k_{\rm cl} & {\rm D}_2{\rm O} \end{array}$



(a)

(c)





図 S8. HDX-MS の原理 110,111 ならびに第三章の測定で用いたメソッドの概要

(a) 塩基触媒ならびに酸触媒により重水素交換反応が進む概略図ならびに重水素交換の反応速度係数

(*k*_{ch})の pH 依存

(b) Linderstrøm-Lang モデルを用いた重水素交換反応の概略図

(c) HDX-MS のワークフロー

(d) HDX-MS のサンプル調製の概要図

HDX-MSは、タンパク質を構成する各アミノ酸残基の主鎖のアミド水素における重水素交換をペプチドレベルで測定する。各アミノ酸において、炭素に結合した水素原子は重水素交換が生じない。反対に側鎖における水素の重水素交換は急速に進むため、アミド水素では重水素交換をクエンチできる条件においても、逆反応により水素に戻る。そのため、質量分析により重水素交換を測定可能な水素原子はアミド水素のみである。アミド水素を持たないプロリン以外のアミノ酸が重水素交換反応のプローブとなる。

溶液中のタンパク質において,各アミノ酸残基のアミド水素は水素交換反応により溶媒中の水素と交換 が進む.そのメカニズムは溶媒のpHによって異なり,塩基触媒(Base catalysis)と酸触媒(Acid Catalysis) に分類される(図 S7a).塩基触媒による水素交換反応では,まずOH-イオンの求核攻撃によりアミド基にお けるアミド水素が奪われ,アミド窒素のアニオンが形成される.引き続いて,アミド窒素アニオンが溶液中の 水から水素を奪い,水素交換反応が進む.酸触媒による水素交換反応では,そのメカニズムがさらにNプ ロトン化とOプロトン化の2つに分けられる.Nプロトン化の機構では,まず不対電子を持つアミド窒素が H₃O*イオンの水素原子を攻撃し,アミド窒素のカチオンが形成される.引き続いて,溶液中の水がアミド窒 素カチオンから水素を奪い,水素交換反応が進む.Oプロトン化の機構では,まず不対電子を持つアミド 窒素がH₃O*イオンの水素原子を攻撃し,一時的にイミド酸を形成する.引き続き,溶液中の水がアミド窒 素カチオンから水素を奪い,水素交換反応が進む.Cプロトン化の機構では,まず不対電子を持つアミド 酸素がH₃O*イオンの水素原子を攻撃し,一時的にイミド酸を形成する.引き続き,溶液中の水がアミド窒 素カチオンから水素を奪い,水素交換反応が進む.これらの水素交換反応は重水が過剰に含まれる溶媒 中では,溶液中の水素が重水素に置き換わって進む.そのため,サンプル溶液を重水素バッファーが過 剰(80-95%)に含まれるように希釈することで,特別な触媒を添加することなく重水素交換反応を誘導する ことができる.

アミド水素の重水素交換反応は高度に pH 依存する. モデルペプチドであるポリ-DL-アラニンにおいて、重水素交換反応の化学的速度定数を k_{ch}の pH 依存を図 S7a 下部に示す. 交換速度は pH 2.5-3.0 で 最小値をとることが分かっているため、重水素交換を停止させる Quench バッファーならびに反応停止後の 質量分析の移動相は pH 2.5 に合わせて逆反応を最小化する. 第三章の HDX-MS 測定は pH 7.0 で実施 したため、重水素交換反応は塩基触媒の機構で進んでいるといえる. k_{ch}は pH や温度, 隣接するアミノ酸 残基によって変化する.

重水素交換反応は、タンパク質のフォールディングを考慮した Linderstrøm-Lang モデルにより説明される(図 S7b 上部). タンパク質がフォールディングによりアミド水素が重水素交換できない状態を closed, タ

ンパク質が構造変化しアミド水素が重水素交換可能な状態を open, タンパク質が重水素交換した状態を Exchanged, タンパク質の構造が開くもしくは閉じる際の速度定数を *k*_{op}, *k*_{cl}と示している. タンパク質が Open, Close, Exchange する際の速度は以下の式で表される.

 $d[closed]/dt = -k_{op}[closed] + k_{cl}[open]$ (1)

 $d[\text{open}]/dt = k_{\text{op}}[\text{closed}] - k_{\text{cl}}[\text{open}] - k_{\text{ch}}[\text{open}]$ (2)

 $d[exchanged])/dt = k_{ch}[open]$ (3)

フォールディングしたタンパク質においては、Open な状態であることは常に少ないため、k_{cl}>>k_{op}と近似でき、d[open]/dt は無視できる.よって式(2)は

 $[open] = k_{op} [closed] / (k_{cl} + k_{ch}) \quad (4)$

と変形できる. 式(4)を式(3)に代入すると

 $d[exchanged])/dt = k_{ch}k_{op}[closed]/(k_{cl}+k_{ch})$ (5)

となる. ここで, 見かけの反応速度定数を kapp とおくと

 $k_{\rm app} = k_{\rm ch} k_{\rm op} / (k_{\rm cl} + k_{\rm ch}) \quad (6)$

となる. HDX-MS では、この kapp に従った重水素交換反応を検出している.

タンパク質の Open・Close の変化のタイムスケールと kchの関係より, 質量分析で特定できる重水素交換後の同位体分布パターンは二種類に分類される. 一つ目はタンパク質が Open な状態をとりやすい, すなわちフォールディングが遅い場合 (kcl<<kch) であり, この場合の重水素交換パターンは EX1 カイネティクスと呼ばれる. 式(6)を kcl<<kch の近似により変形すると

 $k_{\rm app} = k_{\rm op}$ (7)

となり,重水素交換反応の速度はタンパク質構造がオープンになる速度に等しくなる.この場合,アミド水素の重水素交換は完全に進むため,同位体分布は重水素交換前後で完全に分離した形となる(図 S7b 下部). EX1 カイネティクスはタンパク質が全体的にアンフォールディングした際に進む反応である.

ー方でタンパク質は生理的条件ではフォールディングした天然状態で安定であるため、一時的な Open・Close の変化は k_{ch} より早く生じる. この $k_{cl} >> k_{ch}$ の仮定のもと進む重水素交換パターンを、EX2 カイ ネティクスと呼ぶ. 式(6)を $k_{cl} >> k_{ch}$ の近似および Open・Close の平衡定数 K_{op} を用いて変形すると $k_{app} = k_{op}/k_{cl} \times k_{ch} = K_{op} \times k_{ch}$ (7)
となる. この場合, アミド水素の重水素交換は徐々に進んでいくため, 同位体分布はセントロイドした m/z が経時的に増加していく二項性の分布となる. EX2 カイネティクスは天然状態のタンパク質においても局所的な構造変化により進む反応である. HDX-MS で検出される重水素交換反応はほとんどがこの EX2 カイネティクスに従ったものであり, 本論文のデータ解析においても EX1 カイネティクスは同定できなかった.

EX2 カイネティクスにおいて、重水素交換反応に影響を与える因子は構造のアンフォールディングとリフ オールディング(K_{op}=k_{op}/k_{cl})ならびに化学的な重水素交換速度定数 k_{ch}である. HDX-MS の二状態比較 では同一のペプチドの重水素交換率を比較するため、k_{ch}がそろっている(同じ pH,温度で重水素交換、ク エンチ、LC-MS の測定が実施され、隣接するアミノ酸残基も同一).よって重水素交換率に差がある領域 は、局所的な構造変化が生じた領域(K_{op}が変化した領域)であるといえる.二条件比較において、重水素 交換率が有意に高い領域は k_{op}が大きい、つまり構造の自由度が増加し溶媒に露出するような構造変化が 生じた領域である.反対に低い領域は k_{cl}が大きい、つまり構造の自由度が低下し内部に保護されるような 構造変化が生じた領域である.



図 S9. AAV2 完全粒子のゲノム放出の定量

(a) AAV2 完全粒子がゲノムを最大量放出する条件の確認

AAV サンプル原液を 2.0×10¹⁰ vg/mL まで希釈し, 85℃ で 1, 5, 10, 30, 60 分加熱した. 蛍光は 1 分以 上の加熱時間で最大量に達したため,本論文では 85℃ で 10 分間の加熱を AAV の内包するゲノムがす べて放出される条件として定めた. なお本図では遊離分の DNA を考慮し,加熱なしの同サンプルの蛍光 値を差し引いてプロットしている.

(b) AAV2 完全粒子のゲノム放出を定量する検量線の作製

四角が加熱なしのサンプル(遊離の DNA による蛍光値), 丸が 85°C で 10 分間加熱したサンプル(遊離の DNA と AAV の内包されたゲノムが全て放出された蛍光値)の結果を表す.加熱ありの蛍光値から加熱なしの蛍光値を差し引いた値が, 各濃度における AAV カプシドが全ての内包されたゲノムを放出した際の蛍光値に相当する. その値をプロットしたものを検量線として,本文中では熱ストレス条件の AAV サンプルのゲノム放出量を定量した.



図 S10. AAV2 カプシドのグアニジン塩酸塩を含んだ Quench バッファーに対する化学的安定性 HDX-MS の Quench バッファーは pH を pH 2.5 付近まで低下させ、重水素交換反応を停止させると共 に、サンプル中のタンパク質構造を変性させペプシンカラムによるオンライン消化を促進する役割がある. HDX-MS において良好なカバー率を得るためには、Quench バッファーに含まれるグアニジン濃度を適切 に選択することが必要になる¹¹². そのため、AAV2 サンプル原液と本文中と同様の Quench buffer (8 M GuHCl, 0.8% FA)を異なる GuHCl 濃度となるよう混合し、Uncle の装置でトリプトファンの内因蛍光による変 性カーブを取得した (トリプトファンの内因蛍光による変性カーブの取得に関する詳細は本論 3-2-4 に記 載). 解析の結果、本測定条件下におけるグアニジン塩酸塩による化学変性濃度 Cm (AAV カプシドの半 分の割合が変性状態に変化する点) は完全粒子で Cm = 2.95 M、空粒子で Cm = 2.80 M であると分かっ た. 一方で、変性状態に完全に移行する濃度は 4 M 付近であったため、HDX-MS では 4 M の GuHCl 処 理が実施できるよう重水素化サンプルと Quench バッファーを混合した.



図 S11. AAV2 完全粒子の HDX-MS 結果, 重水素交換時間 60 s において検出されたペプチドの重水素 交換割合のヒストグラム

上位約10%のペプチドが25%以上の比較的高い重水素交換率を示した. 第三章では, 該当の23本のペプチドを重水素交換率が高いと定義し, 議論を進めた.



図 S12. AAV2 完全粒子, 空粒子, 加熱後粒子の二次構造解析

(a) CGE による VP 構成比の定量

CGE は第二章に記述したプロトコルに従い実施した. Full カプシドは Empty カプシドに対して VP1 および VP2 の取り込み量がわずかに小さい傾向にあった.

(b) ペプチドマッピングによる翻訳後修飾 (post translational modification: PTM)の割合の比較

ペプチドマッピングの解析には HDX-MS のプロトコルに従って取得した重水素化なしのデータを用いた. 翻訳後修飾の修飾割合を算出する解析には BioPharmaFinder ver 3.1 (Thermo Fisher Scientific)を用いた. 修飾割合は M235, M634 の酸化レベルが完全粒子において低く, M523 と M558 の酸化レベルが 空粒子において高かったが, それ以外の修飾割合はおおむね一致した.



図 S13. 完全粒子のゲノム放出の反応定数 k の温度依存

各温度におけるゲノム放出反応は x 軸を加熱時間, y 軸をゲノム放出量でプロットしたデータ(図 15c 左 側)に対し,反応定数を k, 切片を a と置いた y = k · ln (x) + a の式でフィッティングした. フィッティングは R² が 0.9 以上の精度を示し, ゲノム放出は複雑な分子メカニズムにより対数的な反応で進むことが示唆された. 各温度で算出した反応定数の値より, アレーニウスプロットを作成した. R² が 0.89 の直線性が確認され, 55℃ での反応が体内(37℃)で生じうる反応の加速条件であることが示された.





- 図 S14. HDX-MS 解析における代表的なペプチドの Uptake plot
- (a) 空粒子と完全粒子の比較において有意差を示した領域
- (b)空粒子と完全粒子の比較において有意差を示さなかった領域
- (c)完全粒子とゲノム放出後粒子の比較において有意差を示した領域
- (d) 完全粒子とゲノム放出後粒子の比較において有意差を示さなかった領域

ボルケーノプロットによる 99% 信頼区間を用いた有意差検定の結果,有意差が検出されたタイムポイント を*で示した.

引用文献

- Goker F, Larsson L, Del Fabbro M, *et al.* Gene delivery therapeutics in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: A State of the Art Review. Int J Mol Sci. 2019;20(14):3551.
- 2. Wang F, Qin Z, Lu H, et al. Clinical translation of gene medicine. J Gene Med. 2019;21(7):e3108.
- 3. Mietzsch M, Pénzes JJ, Agbandje-McKenna M. Twenty-five years of structural parvovirology. Viruses. 2019;11(4):362.
- 4. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(5):358-378.
- 5. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. BioDrugs. 2017;31(4):317–334.
- 6. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther. 2006;14(3):316-327.
- 7. Johnson FB, Ozer HL, Hoggan MD. Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. J Virol. 1971;8(6):860-863.
- Cole L, Fernandes D, Hussain MT, *et al.* Characterization of recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) for gene therapy using orthogonal techniques. Pharmaceutics. 2021;13(4):586.
- 9. Kuzmin DA, Shutova MV, Johnston NR, et al. The clinical landscape for AAV gene therapies. Nat Rev Drug Discov. 2021;20(3):173-174.
- Halbert CL, Allen JM, Miller AD. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. J Virol. 2001;75(14):6615-6624.
- 11. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, *et al.* Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart. Clin Transl Sci. 2010;3(3):81-89.
- Nance ME, Duan D. Perspective on adeno-associated virus capsid modification for duchenne muscular dystrophy gene therapy. Hum Gene Ther. 2015;26(12):786-800.
- 13. Guo Y, Wang D, Qiao T, *et al.* A single injection of recombinant adeno-associated virus into the lumbar cistern delivers transgene expression throughout the whole spinal cord. Mol Neurobiol. 2016;53(5):3235-3248.
- Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, *et al.* Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J Virol. 2008;82(3):1399-1406.
- Riyad JM, Weber T. Intracellular trafficking of adeno-associated virus (AAV) vectors: challenges and future directions. Gene Ther. 2021. doi: 10.1038/s41434-021-00243-z.
- Sha S, Maloney AJ, Katsikis G, et al Cellular pathways of recombinant adeno-associated virus production for gene therapy. Biotechnol Adv. 2021;49:107764.
- 17. Carter BJ. Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. Mol Ther. 2004;10(6):981-989.
- Aponte-Ubillus JJ, Barajas D, Peltier J, et al. Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102(3):1045-1054.
- Wright JF. Quality control testing, characterization and critical quality attributes of adeno-associated virus vectors used for human gene therapy. Biotechnol J. 2021;16(1):e2000022.
- 20. Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. Biotechnol Prog. 2012;28(3):608-622.
- 21. Zhu Z, Lu JJ, Liu S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: a review. Anal Chim Acta. 2012;709:21-31.
- 22. Bosma B, du Plessis F, Ehlert E, *et al.* Optimization of viral protein ratios for production of rAAV serotype 5 in the baculovirus system. Gene Ther. 2018;25(6):415-424.
- Donnelly DP, Rawlins CM, DeHart CJ, *et al.* Best practices and benchmarks for intact protein analysis for top-down mass spectrometry. Nat Methods. 2019;16(7):587-594.

- Meier F, Park MA, Mann M. Trapped ion mobility spectrometry and parallel accumulation-serial fragmentation in proteomics. Mol Cell Proteomics. 2021;20:100138.
- 25. Kesik-Brodacka M. Progress in biopharmaceutical development. Biotechnol Appl Biochem. 2018;65(3):306-322.
- Venkatakrishnan B, Yarbrough J, Domsic J, *et al.* Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking. J Virol. 2013;87(9):4974-4984.
- 27. Girod A, Wobus CE, Zádori Z, *et al.* The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. J Gen Virol. 2002;83(Pt 5):973-978.
- 28. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. J Pharm Sci. 2011;100(2):354-387.
- 29. van der Loo JC, Wright JF. Progress and challenges in viral vector manufacturing. Hum Mol Genet. 2016;25(R1):R42-52.
- Su Q, Sena-Esteves M, Gao G. Analysis of recombinant adeno-associated virus (rAAV) purity using silver-stained SDS-PAGE. Cold Spring Harb Protoc. 2020;2020(8):095679.
- 31. Penaud-Budloo M, Broucque F, Harrouet K, et al. Stability of the adeno-associated virus 8 reference standard material. Gene Ther. 2019;26(5):211-215.
- Lock M, McGorray S, Auricchio A, *et al.* Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material. Hum Gene Ther. 2010;21(10):1273-1285.
- 33. Lechner A, Giorgetti J, Gahoual R, *et al.* Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016-2018. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2019;1122-1123:1-17.
- Zhang CX, Meagher MM. Highly sensitive SDS capillary gel electrophoresis with sample stacking requiring only nanograms of adeno-associated virus capsid proteins. Methods Mol Biol. 2019;1972:263-270.
- 35. Zhang Z, Park J, Barrett H, *et al.* Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate with laser-induced fluorescence detection as a highly sensitive and quality control-friendly method for monitoring adeno-associated virus capsid protein purity. Hum Gene Ther. 2021;32(11-12):628-637.
- Jin X, Liu L, Nass S, *et al.* Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins. Hum Gene Ther Methods. 2017;28(5):255-267.
- 37. Liu AP, Patel SK, Xing T, *et al.* Characterization of adeno-associated virus capsid proteins using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2020;189:113481.
- Mary B, Maurya S, Arumugam S, et al. Post-translational modifications in capsid proteins of recombinant adeno-associated virus (AAV) 1-rh10 serotypes. FEBS J. 2019;286(24):4964-4981.
- 39. Wingfield PT. N-terminal methionine processing. Curr Protoc Protein Sci. 2017;88:6.14.1-6.14.3.
- 40. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, et al. The world of protein acetylation. Biochim Biophys Acta. 2016;1864(10):1372-1401.
- 41. Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. MAbs. 2011;3(3):253-263.
- 42. Koza SM, Zhang X, Yang H, *et al.* Applying liquid chromatography (LC) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) methods to the characterization and analysis of rAAV, LCGC North America, 2020;38(12):654-663.
- Steinberg TH, Chernokalskaya E, Berggren K, *et al.* Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. Electrophoresis. 2000;21(3):486-496.
- 44. Kuipers BJ, Gruppen H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. J Agric Food Chem. 2007;55(14):5445-5451.
- 45. Grimsley GR, Pace CN. Spectrophotometric determination of protein concentration. Curr Protoc Protein Sci. 2004; Chapter 3: Unit 3.1.
- 46. Trempe JP, Carter BJ. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. J Virol. 1988;62(9):3356-3363.
- 47. Cassinotti P, Weitz M, Tratschin JD. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. Virology. 1988;167(1):176-184.

- Stutika C, Gogol-Döring A, Botschen L, *et al.* A Comprehensive RNA sequencing analysis of the adeno-associated virus (AAV) type 2 transcriptome reveals novel AAV transcripts, Splice Variants, and Derived Proteins. J Virol. 2015;90(3):1278-1289.
- Mouw MB, Pintel DJ. Adeno-associated virus RNAs appear in a temporal order and their splicing is stimulated during coinfection with adenovirus. J Virol. 2000;74(21):9878-9888.
- 50. Becerra SP, Rose JA, Hardy M, *et al.* Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(23):7919-7923.
- 51. Firth AE, Brierley I, et al. Non-canonical translation in RNA viruses. J Gen Virol. 2012;93(Pt 7):1385-1409.
- 52. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene. 1999;234(2):187-208.
- 53. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 1987;15(20):8125-8148.
- 54. Warrington KH Jr, Gorbatyuk OS, Harrison JK, *et al.* Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. J Virol. 2004;78(12):6595-6609.
- 55. Weger S, Wistuba A, Grimm D, *et al.* Control of adeno-associated virus type 2 cap gene expression: relative influence of helper virus, terminal repeats, and Rep proteins. J Virol. 1997;71(11):8437-8447.
- 56. Galibert L, Savy A, Dickx Y, *et al.* Origins of truncated supplementary capsid proteins in rAAV8 vectors produced with the baculovirus system. PLoS One. 2018;13(11):e0207414.
- Piszkiewicz D, Landon M, Smith EL. Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. Biochem Biophys Res Commun. 1970;40(5):1173-1178.
- 58. Nelson DL & Cox MM, eds. Principles of Biochemistry. Germany: Springer-Verlag, 2001.
- 59. Volkin DB, Mach H, Middaugh CR. Degradative covalent reactions important to protein stability. Mol Biotechnol. 1997;8(2):105-122.
- 60. Oliyai C, Borchardt RT. Chemical pathways of peptide degradation. VI. Effect of the primary sequence on the pathways of degradation of aspartyl residues in model hexapeptides. Pharm Res. 1994;11(5):751-758.
- 61. Rehder DS, Dillon TM, Pipes GD, *et al.* Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceutics. J Chromatogr A. 2006;1102(1-2):164-175.
- 62. Xiao G, Bondarenko PV. Identification and quantification of degradations in the Asp-Asp motifs of a recombinant monoclonal antibody. J Pharm Biomed Anal. 2008;47(1):23-30.
- 63. Snyder RO, Moullier P, eds. Adeno-associated virus methods and protocols. Germany: springer science+business media, 2011.
- 64. Wörner TP, Bennett A, Habka S, et al. Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic. Nat Commun. 2021;12(1):1642.
- 65. Snijder J, van de Waterbeemd M, Damoc E, *et al.* Defining the stoichiometry and cargo load of viral and bacterial nanoparticles by orbitrap mass spectrometry. J Am Chem Soc. 2014;136(20):7295-7299.
- 66. 厚生労働省「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」(ICH ガイドライン Q6B)(平 成13年5月1日, 医薬審発第571号)
- 67. Engen JR, Botzanowski T, Peterle D, et al. Developments in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. Anal Chem. 2021;93(1):567-582.
- Fang J, Doneanu C, Alley WR Jr, *et al.* Advanced assessment of the physicochemical characteristics of Remicade[®] and Inflectra[®] by sensitive LC/MS techniques. MAbs. 2016;8(6):1021-1034.
- 69. Oyama H, Koga H, Tadokoro T, *et al.* Relation of Colloidal and Conformational Stabilities to Aggregate Formation in a Monoclonal Antibody. J Pharm Sci. 2020;109(1):308-315.
- 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.
- 71. Govindasamy L, Padron E, McKenna R, et al. Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. J Virol.

2006;80(23):11556-11570.

- 72. DiPrimio N, Asokan A, Govindasamy L, et al. Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly. J Virol. 2008;82(11):5178-5189.
- 73. Wu P, Xiao W, Conlon T, *et al.* Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. J Virol. 2000;74(18):8635-8647.
- Horowitz ED, Rahman KS, Bower BD, *et al.* Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. J Virol. 2013;87(6):2994-3002.
- Huang RY, Chen G. Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2014;406(26):6541-6558.
- Lochrie MA, Tatsuno GP, Christie B, *et al.* Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization. J Virol. 2006;80(2):821-834.
- 77. Wobus CE, Hügle-Dörr B, Girod A, *et al.* Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. J Virol. 2000;74(19):9281-9293.
- 78. Kern A, Schmidt K, Leder C, et al. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. J Virol. 2003;77(20):11072-11081.
- Opie SR, Warrington KH Jr, Agbandje-McKenna M, *et al.* Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. J Virol. 2003;77(12):6995-7006.
- Haifeng Chen, Castro Valley. Expression in insect cells of genes with overlapping open reading frames, methods and compositions therefor, United States Patent, Patent No. US 8,945,918 B2, 2015.
- Oyama H, Ishii K, Maruno T, *et al.* Characterization of adeno-associated virus capsid proteins with two types of VP3-related components by capillary gel electrophoresis and mass spectrometry. Hum Gene Ther. 2021;32(21-22):1403-1416.
- Giles AR, Sims JJ, Turner KB, *et al.* Deamidation of amino acids on the surface of adeno-associated virus capsids leads to charge heterogeneity and altered vector function. Mol Ther. 2018;26(12):2848-2862.
- Hageman TS, Weis DD. Reliable identification of significant differences in differential hydrogen exchange-mass spectrometry measurements using a hybrid significance testing approach. Anal Chem. 2019;91(13):8008-8016.
- 84. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 2021;596(7873):583-589.
- Ghisaidoobe AB, Chung SJ. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. Int J Mol Sci. 2014;15(12):22518-22538.
- Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, *et al.* Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. Anal Biochem. 1999;268(2):278-288.
- Bee JS, O'Berry K, Zhang YZ, *et al.* Quantitation of trace levels of DNA released from disrupted adeno-associated virus gene therapy vectors. J Pharm Sci. 2021;110(9):3183-3187.
- 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.
- 89. Narang D, Lento C, J Wilson D. HDX-MS: An analytical tool to capture protein motion in action. Biomedicines. 2020;8(7):224.
- 90. Lim XX, Chandramohan A, Lim XY, et al. Conformational changes in intact dengue virus reveal serotype-specific expansion. Nat Commun. 2017;8:14339.
- van de Waterbeemd M, Llauró A, Snijder J, *et al.* Structural analysis of a temperature-induced transition in a viral capsid probed by HDX-MS. Biophys J. 2017;112(6):1157-1165.
- 92. Ramesh R, Lim XX, Raghuvamsi PV, et al. Uncovering metastability and disassembly hotspots in whole viral particles. Prog Biophys Mol Biol. 2019;143:5-12.
- 93. Suchanova B, Tuma R. Folding and assembly of large macromolecular complexes monitored by hydrogen-deuterium exchange and mass spectrometry.

Microb Cell Fact. 2008;7:12.

- 94. Kronenberg S, Böttcher B, von der Lieth CW, et al. A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. J Virol. 2005;79(9):5296-5303.
- Lins-Austin B, Patel S, Mietzsch M, et al. Adeno-associated virus (AAV) capsid stability and liposome remodeling during endo/lysosomal pH trafficking. viruses. 2020;12(6):668.
- Cotmore SF, Tattersall P. Mutations at the base of the icosahedral five-fold cylinders of minute virus of mice induce 3'-to-5' genome uncoating and critically impair entry functions. J Virol. 2012;86(1):69-80.
- 97. Ros C, Baltzer C, Mani B, *et al.* Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. Virology. 2006;345(1):137-147.
- 98. Havlik LP, Das A, Mietzsch M, et al. Receptor switching in newly evolved adeno-associated viruses. J Virol. 2021;95(19):e0058721.
- Mietzsch M, Jose A, Chipman P, et al. Completion of the AAV structural atlas: Serotype capsid structures reveals clade-specific features. Viruses. 2021;13(1):101.
- 100. Mietzsch M, Barnes C, Hull JA, et al. Comparative analysis of the capsid structures of AAVrh.10, AAVrh.39, and AAV8. J Virol. 2020;94(6):e01769-19.
- Engen JR, Komives EA. Complementarity of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and cryo-electron microscopy. Trends Biochem Sci. 2020;45(10):906-918.
- 102. Škubník K, Sukeník L, Buchta D, et al. Capsid opening enables genome release of iflaviruses. Sci Adv. 2021;7(1):eabd7130.
- 103. Dhungel BP, Bailey CG, Rasko JEJ. Journey to the center of the cell: tracing the path of AAV transduction. Trends Mol Med. 2021;27(2):172-184.
- Johnson JS, Samulski RJ. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. J Virol. 2009;83(6):2632-2644.
- 105. Bleker S, Sonntag F, Kleinschmidt JA. Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. J Virol. 2005;79(4):2528-2540.
- 106. Penzes JJ, Chipman P, Bhattacharya N, *et al.* Adeno-associated virus 9 structural rearrangements induced by endosomal trafficking pH and glycan attachment. J Virol. 2021;95(19):e0084321.
- Gao K, Li M, Zhong L, *et al.* Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side-effects. Mol Ther Methods Clin Dev. 2014;1(9):20139.
- 108. Wright JF. AAV empty capsids: for better or for worse? Mol Ther. 2014;22(1):1-2.
- Kochert BA, Iacob RE, Wales TE, *et al.* Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry to study protein complexes. Methods Mol Biol. 2018;1764:153-171.
- Weis DD, Wales TE, Engen JR, *et al.* Identification and characterization of EX1 kinetics in H/D exchange mass spectrometry by peak width analysis. J Am Soc Mass Spectrom. 2006;17(11):1498-1509.
- 111. Hamuro Y. Tutorial: Chemistry of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 2021;32(1):133-151.
- 112. Xiao K, Zhao Y, Choi M, *et al.* Revealing the architecture of protein complexes by an orthogonal approach combining HDXMS, CXMS, and disulfide trapping. Nat Protoc. 2018;13(6):1403-1428.

研究業績

学術発表論文

- Noda M, Ishii K, Yamauchi M, <u>Oyama H</u>, Tadokoro T, Maenaka K, Torisu T, Uchiyama S. Identification of IgG1 aggregation initiation region by hydrogen deuterium mass spectrometry. J Pharm Sci. 2019;108(7):2323-2333.
- <u>Oyama H</u>, Koga H, Tadokoro T, Maenaka K, Shiota A, Yokoyama M, Noda M, Torisu T, Uchiyama S. Relation of colloidal and conformational stabilities to aggregate formation in a monoclonal antibody. J Pharm Sci. 2020;109(1):308-315.
- <u>Oyama H</u>, Ishii K, Maruno T, Torisu T, Uchiyama S. Characterization of adeno-associated virus capsid proteins with two types of VP3-related components by capillary gel electrophoresis and mass spectrometry. Hum Gene Ther. 2021;32(21-22):1403-1416. (本学位論文に関与する論文, 第二章の内容に対応)
 学術雑誌または商業誌における総説
- 1. Torisu T, <u>Oyama H</u>, Uchiyana S. Analysis of higher order structures of proteins by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry", J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2018;66(6):218-221.
- <u>尾山博章</u>,内山進.抗体医薬品開発における質量分析技術,日本薬学会構造活性相関部 SAR News, 2018;35:8-15.

学会発表

国際会議における発表

- <u>Oyama H</u>, Noda M, Yokoyama M, Maruno T, Uchiyama S. "Structural analysis of antibody in different buffers", The 1st International Conference on Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry, AstraZeneca R&D (Gothenburg, Sweden), May 2017.
- <u>Oyama H</u>, Uchiyama S. Stability and structural changes of an antibody in different buffers, 2nd International BMS Symposium, Shimadzu Co. (Kyoto, Japan), Oct 2018. (本発表は Student Symposium Award を受賞した.)
- 3. <u>Oyama H</u>, Enomoto K, Torisu T, Uchiyama S. Stability and structural changes of an antibody in different buffers, The 2nd International Conference on Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry, Banff

Centre (Alberta, Canada), May 2019.

国内会議における発表

- 1. <u>尾山博章</u>,野田勝紀,横山雅美,丸野孝浩,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の構造解析,第17回 日本蛋白質科学会年会,仙台国際センター(宮城),2017年6月.
- <u>尾山博章</u>,野田勝紀,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の安定性と構造変化,第18回日本蛋白質 科学会年会,朱雀メッセ(新潟),2018年6月.(本発表はポスター賞を受賞した.)
- 3. <u>尾山博章</u>,野田勝紀,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の安定性と構造変化,第12回バイオ関連化 学シンポジウム,大阪大学(大阪),2018年9月.
- <u>尾山博章</u>,榎本敢太,鳥巣哲生,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の安定性と構造変化,第67回質 量分析討論会,つくば国際会議場(茨城),2018年9月.
- <u>尾山博章</u>,榎本敢太,鳥巣哲生,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の安定性と構造変化の関係,第 19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会年会合同年次大会,神戸国際会議場(兵庫), 2019年6月.
- 6. <u>尾山博章</u>,古賀博己,鳥巣哲生,内山進.異なる緩衝剤中での抗体の安定性と構造変化の関係,第
 57回日本生物物理学会年会,シーガイアセンター(宮崎),2019年9月.(本発表は学生発表賞を受賞した.)

謝辞

本研究を進めるにあたって、日頃から暖かく親身になってご指導いただきました、大阪大学内山進教授 に深く感謝致します.また学位審査において、本博士論文を精読し有用なご助言を賜りました、大阪大学 福崎英一郎教授ならびに大阪大学大政健史教授に謹んで感謝の意を表します.

研究指導においては、AAV 製造分析グループの指導教官として、小生の突然の相談にも何度も心優し くご対応いただきました鳥巣哲生助教に厚く御礼申し上げます.また質量分析の助言だけでなく、小生が 愚痴をこぼした際にも毎回明るく励ましの言葉をいただきました石井健太郎特任助教に深く感謝致します. さらに、小生を研究面で常に支えていただきました丸野孝浩特任研究員に心から感謝致します.加えて、 小生に HDX-MS の基礎をご教示していただきました野田勝紀特任研究員、タンパク質構造のいろはをご 教示していただきました長谷川淳特任教授に感謝の意を表します.さらに、日頃より研究だけでなく研究室 生活全般にわたり、暖かいご援助をいただきました、杉山峰崇招へい教授、山根拓也招へい准教授、横山 雅美特任研究員、板東香林派遣研究員、露峰明子秘書に感謝申し上げます.

また本博士論文で使用した AAV サンプルをご提供していただいた,次世代バイオ医薬品製造技術研 究組合の皆様に深く感謝致します.その他,本論文に関与しない研究も含めて,共同研究等でお世話に なりました大学,民間企業,研究機関の皆様に感謝致します.

そして研究活動および研究室生活においては、博士後期課程の同期として手間のかかる小生の面倒を 6年間もみていただいた米田早紀修士、特に HDX-MS の測定に関して多大なご援助をいただいた山口 祐希修士、社会人博士後期課程の視点から研究や就職活動について的確なアドバイスをいただいた城慎 二修士、小生の苦手な統計やデータ処理の相談相手として頼りにさせていただいた榎本敢太修士、毎日 夜遅くまで一緒に残り研究へのモチベーションを高め合いながら切磋琢磨してきた大西一幸修士、AAV テーマの学生の中でもとりわけ実験面でお世話になりました山崎真澄学士ならびに古川美咲学士、同じ研 究室内グループの一員として小生を支えていただきました池田智彦学士ならびに野中三千花学士、研究 テーマが異なるにも関わらず隣の席で日頃から仲良くしていただいた本陽介学士をはじめとした、研究室 の学生の皆様、すでに卒業された先輩ならびに後輩の皆様、研究員の方々に心より感謝致します。

最後に,博士後期課程への進学を応援し支え続けてくれた家族,あたたかく見守ってくれた友人たちに 深い感謝の意を表して謝辞と致します.

119