



日本学術振興会・産学協力委員会

R022 量子構造生物学委員会

第12回 研究会 資料

2023年12月5日（火）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

R022 量子構造生物学委員会 第 12 回研究会 プログラム

2023 年 12 月 5 日（火）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F
(現地会場で開催／オンライン接続はありません)

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:35 – 14:35 （講演 1）

司会：委員・難波啓一（大阪大学）

クライオ EM, ED と XFEL による電荷, 化学結合の計測

理化学研究所・放射光科学研究センター／東北大学・多元物質科学研究所
米 倉 功 治

14:35 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：委員・井上 豪（大阪大学）

蛋白質医薬品やウイルスベクター製品の品質管理の科学と技術

大阪大学・大学院工学研究科・生物工学専攻
自然科学研究機構・生命創成探究センター／（株）ユー・メディコ
内 山 進

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

クライオ EM、ED と XFEL による電荷、化学結合の計測

Measurement of charge and chemical bonding in single particle cryo-EM and 3D ED structures

理化学研究所 放射光科学研究センター／東北大学 多元物質科学研究所

米 倉 功 治

Koji Yonekura

RIKEN SPring-8 Center / IMRAM, Tohoku University

クライオ電子顕微鏡(EM)を用いた単粒子解析は、分子量の比較的大きなタンパク質の構造解析法として大きく発展した。試料の結晶化を必要とせず、生理的なイオン環境における詳細な構造を解析できるため、タンパク質の構造研究を一新させた。理想的な試料では、原子が分離して解像される分解能が達成されている。一方、氷中に分散した分子の電子顕微鏡像の処理は、小さな分子ほど難しくなる。分子量 10 万から数万未満のタンパク質や、有機化合物の構造解析には、試料の結晶化が必要である。ところが、結晶作成は難しいことも多く、微小な結晶やごく薄い結晶しか得られないこともよく経験される。X 線に比べ電子線は試料と 4-5 桁も強く相互作用するため、X 線回折にはサイズが満たないこのような結晶や化合物の結晶微粉末から回折点が得られ、原子分解能で構造決定できることも多い。水溶液や有機溶剤中、乾燥した粉末などいろいろな形態の微小結晶を扱える高い汎用性を持つことから、近年、特に、有機合成化学、低・中分子創薬、材料科学などの分野において、利用への期待が高まっている。

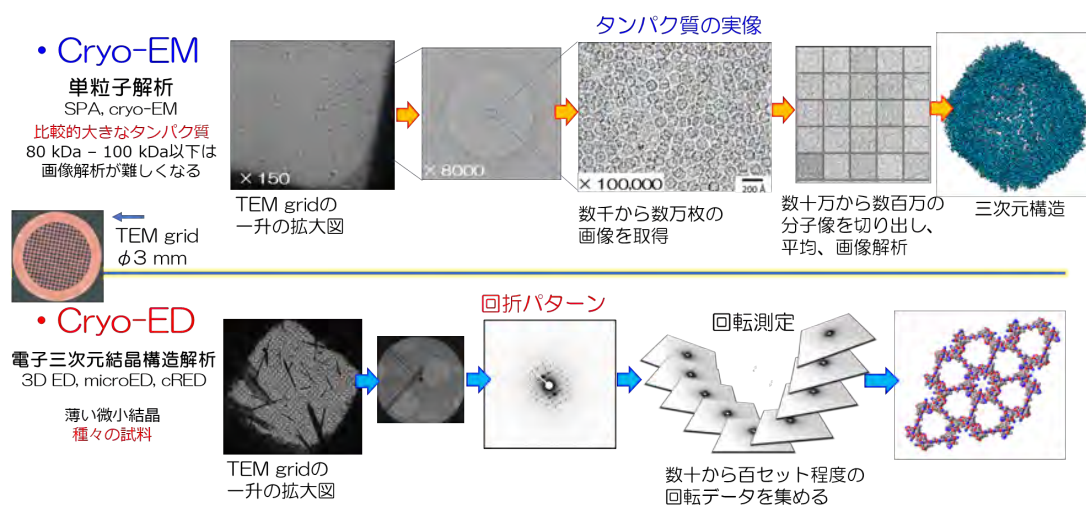


図1 単粒子解析と 3D ED の対象とする試料と測定法の比較

私たちは、この電子線三次元結晶構造解析（3D ED、マイクロ ED と呼ばれる）と単粒子解析を用いて、より詳細な化学情報を引き出すことに興味を持っている。図 1 に両測定と比較を示す。

X 線は原子核の周りの電子によって、電子線は、原子の周りのクーロンポテンシャルによって散乱される。価電子に対する感度は電子線のほうが格段に高い（図 2）。最近、電子線のこの特性を利用して、3D ED と高分解能単粒子解析による電荷の可視化と化学結合の測定について報告した（図 3, 4）[1, 2]。

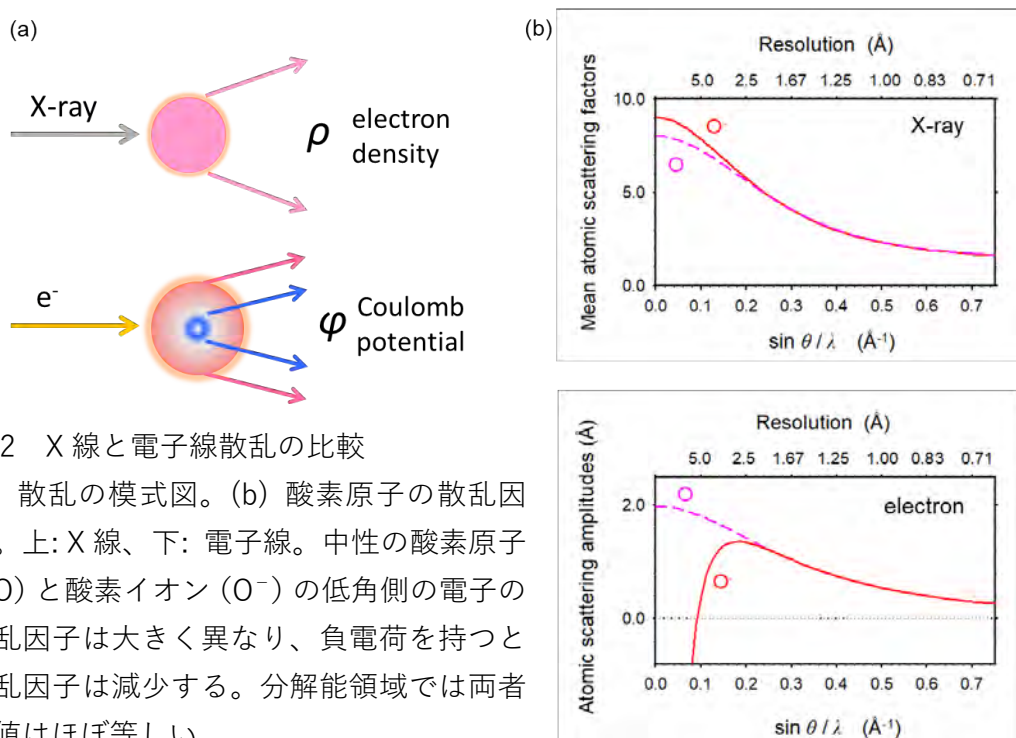


図 2 X 線と電子線散乱の比較

(a) 散乱の模式図。(b) 酸素原子の散乱因子。上: X 線、下: 電子線。中性の酸素原子 (O) と酸素イオン (O^-) の低角側の電子の散乱因子は大きく異なり、負電荷を持つと散乱因子は減少する。分解能領域では両者の値はほぼ等しい。

単粒子解析では、標準試料であるアポフェリチンの高分解能構造解析から、水素の化学結合の種類を判別する精度が得られ、電荷に関わる情報を抽出できることを示した [1]。タンパク質中の水素原子、電荷、化学結合の極性は、構造の安定化に重要な役割を果たすとともに、酵素触媒作用、エネルギー伝達、基質や薬剤との結合など、さまざまな機能と性質に大きな影響を及ぼすが、実験的に測定することは難しい。上記の結果から、単粒子解析によって試料の化学的性質・機能の理解をさらに深めることも期待できる。

この解析では、電荷の同定や座標誤差の計算に新しいアイデアを導入した [1]。測定では、電子顕微鏡制御の精度を上げる開発に繋がった。単粒子解析は多数の画像データを取得する必要があるが、視野の調整のため試料ステージの位置合

わせに失敗することが多く、大量の使用できないデータが蓄積されていた。そこで、従来の画像間の相関での位置合わせに代え AI を用いる測定技術を開発した [3]。これにより、単粒子解析の像撮影の際の視野調整に失敗することは皆無となった。現在、日本国内に限らず、世界で利用されるソフトウェアとなった。

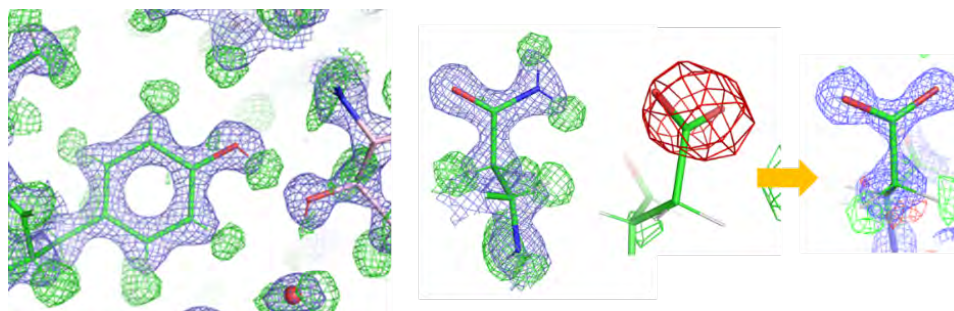


図3 タンパク質中のアミノ酸の詳細構造。緑と赤の網目は実験データとモデルとの重み付け差フーリエマップで、それぞれ水素原子と負電荷に対応 [1]。

3D ED では、回転測定法による測定と解析技術の開発を進めてきた。タンパク質 [4]だけでなく難病の ALS に関わるポリペプチドの野生型と変異型の構造 [5]、天然有機化合物で農薬候補物質の官能基の立体配置 [6]、薬剤候補物質の絶対構造（準備中）、ナノグラフェンの二重らせん構造 [7]、ディスオーダー領域が含まれた有機半導体の構造特性 [8]など、これまで構造が知られていない様々な試料に取り組み、解析結果を報告した。さらに、タンパク質と有機化合物のイオン結合部位と結合したイオンの電荷についても知見を得ている [2, 4, 9]。

電子回折パターンの測定においても、複数の結晶からのデータを統合するのが品質の向上に有効である。しかし、多数の微小結晶からのデータ測定では、試料ステージの機械的な精度の問題で、人間が関与しなければならない領域はまだ大きい。そこで単粒子解析の画像測定に導入した AI 技術を拡張し、人間の操作を減らすように機械学習させた [3]。現在、回折の自動測定でも効果を上げている [6]が、試料ごとに形状が異なる結晶や回折パターンに対してはさらなる精度の向上が必要である。この解決に、生成系 AI の利用を検討している。

一方、この手法において最大の問題となるのは、試料の厚みである。電子線に対する大きな散乱断面積は、試料への透過力を制限し、厚い試料への適用が著しく難しくなる。そこで、散乱断面積の差を補える強度の X 線パルスが得られる

X 線自由電子レーザー(XFEL)を利用して有機化合物の構造解析を行う技術を開発した [2]。これにより電子線と XFEL の両線源の特徴を活かした構造決定が可能となった。両手法による解析が、線源による水素位置の違いと化学結合の極性を判別する精度を持つことも示せた。このアプローチを様々な構造未知の試料に適用し、解析できる対象を拡大することができた (プレプリントサーバーに掲載及び投稿中)。他に、トモグラフィーのハイスループット解析 [10]なども進めている。



図4 蛍光分子ローダミン 6G の結晶構造の重ね合わせ。緑は XFEL、黄色は電子回折の測定データからそれぞれ得られた水素原子を表す。水素原子は、XFEL では結合相手の原子により近い位置に観察される。水素以外の原子位置 (灰色) はほぼ一致する [2]。

謝辞 上記の研究は、理研 放射光科学研究センターと東北大 多元物質科学研究所の皆様、多くの方々に支えられ可能になりました。ここに感謝申し上げます。

-
1. S. Mak-Yonekura, K. Kawakami *et al.*, Measurement of charges and chemical bonding in a cryo-EM structure. *Commun. Chem.* (2023).
 2. K. Takaba, S. Mak-Yonekura *et al.*, Structural resolution of a small organic molecule by serial X-ray free-electron laser and electron crystallography. *Nat. Chem.* (2023).
 3. K. Yonekura *et al.*, Machine learning-based real-time object locator / evaluator for cryo-EM data collection. *Commun. Biol.* (2021).
 4. K. Yonekura *et al.* Electron crystallography of ultra-thin 3D protein crystals: atomic model with charges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2015).
 5. N. Sekiyama, K. Takaba, S. Maki-Yonekura *et al.*, ALS mutations in the TIA-1 prion-like domain induce pathological structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2022).

6. Ono-Ogasawara *et al.*, Synthesis of (\pm)-zeapyranolactone, a noncanonical strigolactone isolated from maize, and determination of its overall relative configuration. *Tetrahedron Lett.* (2023).
7. K. Kato, K. Takaba, S. Maki-Yonekura *et al.*, Double-helix supramolecular nanofibers assembled from negatively curved nanographenes. *J. Am. Chem. Soc.* (2021).
8. S. Inoue *et al.*, Emerging disordered layered-herringbone phase in organic semiconductors unveiled by electron crystallography. *Chem. Mater.* (2022).
9. K. Yonekura and S. Maki-Yonekura, Refinement of cryo-EM structures using scattering factors of charged atoms. *J. Appl. Cryst.* (2016).
10. H. Aizawa, T. Sato, S. Maki-Yonekura *et al.*, Enantioselectivity of discretized helical supramolecule consisting of achiral cobalt phthalocyanines via chiral-induced spin selectivity effect. *Nat. Commun.* (2023).

蛋白質医薬品やウイルスベクター製品の品質管理の科学と技術

Science and Engineering of Quality Control for Biopharmaceuticals and Virus Vector Products

大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻
自然科学研究機構 生命創成探究センター
(株) ユー・メディコ

内 山 進

Susumu Uchiyama

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering,
Osaka University

Natural Institute of Natural Sciences,
Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS)

U-Medico, Inc.

タンパク質やタンパク質核酸複合体などの医薬品はバイオ医薬品とよばれるが、バイオ医薬品において避けられない課題として、純度を 100%あるいは現実的には 99%といった高純度にすることが難しい点がある。そもそも純度の定義が容易ではないが、医薬品の場合、期待する有効性と安全性を期待通りに発揮する成分が有効成分または目的物質と定義される。2000 年代に入り飛躍的な発展を遂げたバイオ医薬品である抗体医薬品においても一定量の不純物として、凝集体や修飾体が、精製直後であっても必ず含まれており、保存中にこうした不純物の割合は経時的に増加する。近年急速に開発と実用化が進んできたウイルスベクターにおいても同様である。不純物は有効性や安全性に影響をおよぼすため、計測を駆使した品質分析と安定に保存するための製剤技術、を基盤とした適切な品質管理が必要となる。品質管理は工学の研究分野ではあるが、バイオ医薬品の性質を基礎科学、例えば、物理化学や生化学、の観点から深く理解すること無しには適切な品質管理は難しい。こうした背景のもと、本発表では、前半は抗体医薬品における課題である凝集体について、後半ではウイルスベクターの品質分析と製造について、現状と今後の展望について紹介する。

1. 抗体医薬品の凝集体の評価法

抗体医薬品の有効成分は抗体分子であり、サイズは直径 15nm 程度である。抗体医薬品に含まれる凝集体は、数十ナノメートルから数百ミクロンと幅広いサイズに渡り、そのサイズ分布は溶媒組成や保存環境および時間に依存する。凝集体は免疫原性の原因となり得るため不純物として分類される [1]。現時点では、全てのサイズ領域の凝集体を測定可能な特定の手法はなく、サイズ領域に応じた手法を用いる必要がある。また、抗体凝集体の標準物質も無いため真値の決定が困難であり、サイズ領域ごとに複数手法での評価が必要となる。凝集体の計測手法は、100nm 以下（ナノメートル）、100nm 以上 1 μ m 以下（サブミクロン）、そして 1 μ m 以上（ミクロン）、の 3 つのサイズ領域に応じて異なる。100nm 以下ではサイズ排除クロマトグラフィーがある程度有効であるが、分析条件が限定される上に、カラムを通過できる最大粒径は 60nm 程度であるため正確な定量には超遠心分析による評価が欠かせない。一般に蛋白質は屈折率が溶媒である水と近い値を持つため透明性が高く、1 μ m の凝集体が 1mL あたり 100 万個程度含まれていても、溶液は透明であり目視での評価は困難である。そのため、1 μ m 以上の凝集体はフローイメージングとよばれる顕微鏡をベースとする分析法が有効であり、画像の機械学習と組み合わせることで医薬品に含まれるシリコンオイルなどとの区別も高い精度で可能となっている [2]。また、蛋白質凝集体と屈折率が近い合成高分子を材料とする標準粒子も今年になり登場し、より信頼性の高い精確な凝集体評価が可能となっている [3]。加えて、サイズの定量分析が難しかったサブミクロン領域についてもミー散乱と干渉を組み合わせた計測手法が登場し、全サイズ領域の凝集体定量分析が実現しつつある [4]。

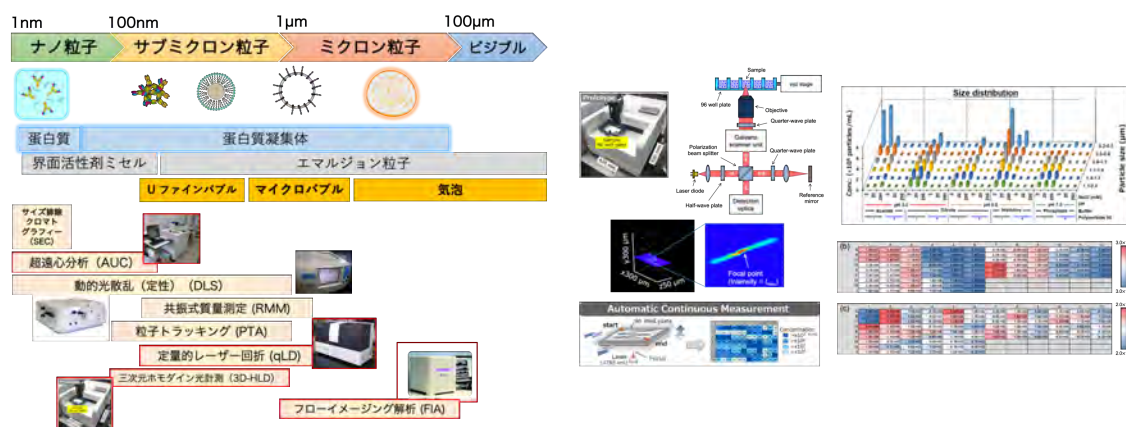


図1 (左) 蛋白質凝集体のサイズ領域と各サイズに応じた計測法 (右) 新規手法三次元ホモダイン光計測法によるサブミクロンサイズの定量計測。多検体の同時測定が可能のため溶媒組成ごとの結果が得られている。

2. 抗体医薬品の凝集体の発生原因と抑制のための手法

凝集体の発生を抑制するためには、抗体分子の構造安定性を高め（天然状態と変性状態の自由エネルギー差を大きくする）、コロイド安定性を高める（分子間に引力が働かないように、できるだけ斥力が働くようにして分散性を上昇させる）ことが有効であるとの考えのもと、発表者らを含め多くの研究者が製剤条件の最適化に取り組んできた [5, 6]。ところが、凝集体の計測手法の発展に伴って凝集体を正確に定量可能となったことで、界面を介した凝集が製造から保管に至る多くの場面で起こっており、構造安定性とコロイド安定性の構造だけでは凝集体発生を抑制できないことが分かってきた。界面を介した凝集は不可逆反応で速度論的支配を受け、さらに気液界面の移動の周波数や強度が反応速度に関係するため [7]、予測や再現が難しく、たとえば、輸送中に突如凝集体が発生し開発が中断する場合もある。しかしながら、そういった場合でも根本的原因の特定が困難なため、製造プロセスや製剤条件の見直しが必要になることがあった。こうした界面を介した凝集について、近年の研究により明確となりつつ事柄もあり、例えば、容器など素材への抗体の吸着と剥離が凝集体発生につながっていることが分かってきており、抗体の吸着メカニズムの研究を通じて、適度に疎水度が高い低吸着の材料を用いる、さらに界面活性剤を添加することで凝集体発生の抑制が可能となってきた [8]。最近の抗体医薬品開発のトレンドである次世代型抗体医薬品は安定性に課題がある場合が多く、従って、抗体分子、溶液組成、容器表面特性を総合的に考慮した開発が必要となる。

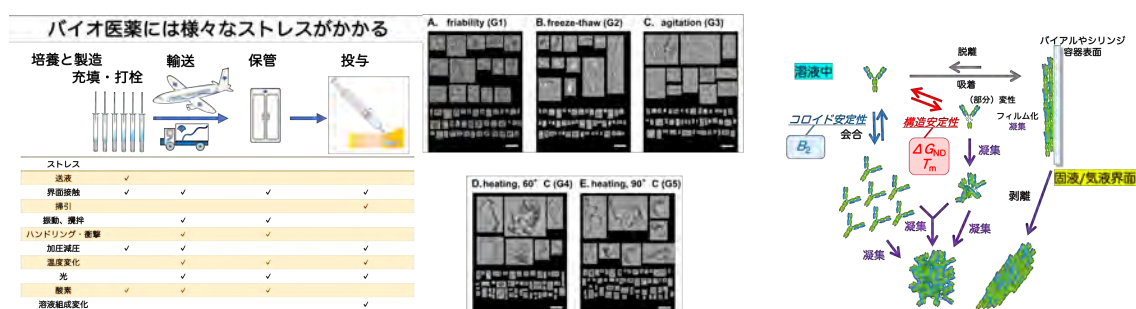


図2 抗体医薬品やベクター製剤などのバイオ医薬品においては、様々なストレスにより、幅広いサイズの凝集体が発生する。加熱や凍結融解に加えて振とうや送液などは凝集体の発生の1つの大きな原因であり、界面安定性の向上がバイオ医薬品の安定化には必須である。

3. ウイルスベクターの製造と品質分析

ウイルスベクターは、天然のウイルスを改変し治療目的に利用される組換え医薬品であり、ヒト細胞や昆虫細胞を使ったバイオテクノロジー技術により製造されるが、抗体医薬品と同様に有効性と安全性の担保のための品質分析が重要である。ウイルスベクターのうち、もっとも開発が進んでいるのは、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス（AdV）、レンチウイルス（LV）であるが、いずれも抗体と比べると産生量が大幅に少なく製造が難しいために分析技術も発展していなかった。ところが近年、製造管理がし易く、スケールアップが可能な製造法が登場し、さらに米国を中心にウイルスベクターが医薬品として上市するに伴い分析法の開発が進んできた。

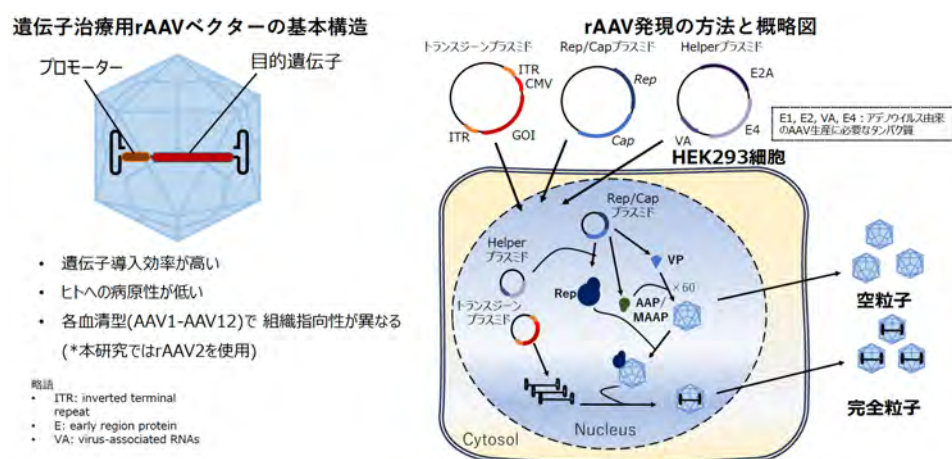


図3 遺伝子治療用アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの構造と HEK293 細胞による製造方法

同調して、米国の製薬企業や米国食品医薬品局（FDA）がリードするかたちで規制のガイドラインのハードルが上がってきている状況にある。ウイルスベクターは、抗体とは異なり繰り返し構造を持つために構造の一部が変化しても特性の差が現れにくく、さらに、ウイルスカプシドの内側の成分がカプシド表面の性質に大きな影響を及ぼさないため、そもそも単一成分までの精製が難しい。そのため混合物としての適切な分析が必要である。

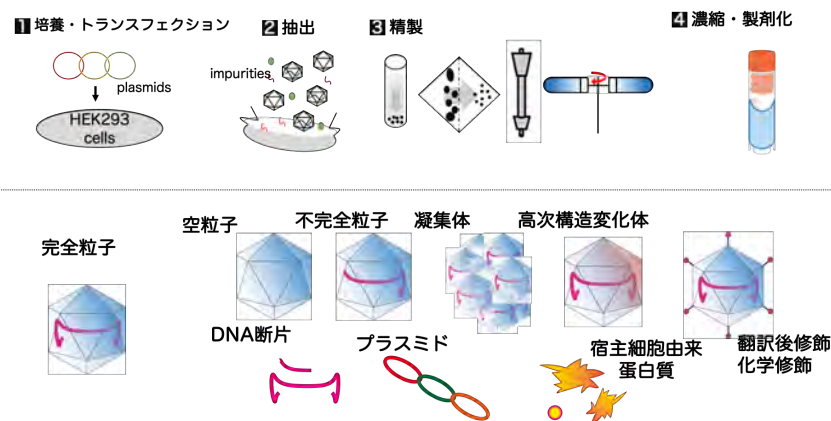


図4 現在よく利用されているアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの製造方法（上段）と精製後に含まれる代表的な不純物の例（下段）

発表者らは、組換え AAV（rAAV）を中心に分析法開発を進める加えて、研究室で恒常的に rAAV をフラスコやバイオリアクターを用いて製造するシステムを構築の上、製造ロット間でどの程度の品質のバラツキを持つかを包括的に研究してきた。最初に取り組んだ分析法は、完全粒子と空粒子を含む粒子のサイズ分布定量のための超遠心分析法の開発である。遠心力場での粒子の沈降挙動を記述する 2 階微分方程式の解析解は知られていない。そのため、古典的な超遠心分析では一定の仮定の下で粒子が経時的に形成する移動境界面から沈降係数や拡散係数を近似式を用いて求めていたが、多成分系の定量評価は困難であった。一方、2010 年頃からは数値解析を実現したプログラムによる移動境界面の直接解析による沈降係数分布の算出が可能となっており、2018 年には新型の超遠心分析装置 OPTIMA が登場した状況であった。そこで、OPTIMA の分光性能を最大限に利用して屈折率と 11 波長での吸光度による移動境界面の計測を行い、全ての結果について数値解析を行うことで、沈降係数が異なる成分ごとのモル吸光スペクトルが得られるようになり、スペクトルのデコンボリューションにより完全粒子と空粒子、さらにその他の粒子成分の構成成分の特定と定量が可能となった。この手法は多波長超遠心分析沈降速度法（MW-SV-AUC）とよばれ、試料量が比較的得られる製剤の評価に利用している [9]。加えて、バンド超遠心分析法（BS-AUC）では、粒子の沈降挙動に対して数値解析を実施することで微量での試料分析を実現し、プロセス中の試料や精製直後の試料の評価に利用している [10]。このようにサンプル量と開発ステージに応じたサイズ分布評価が

可能となっている。また、電荷検出質量分析、さらにクライオ電子顕微鏡と機械学習を組み合わせた解析などにより僅かな量の空粒子が含まれる試料であっても粒子サイズ分布の定量解析が可能となっている。

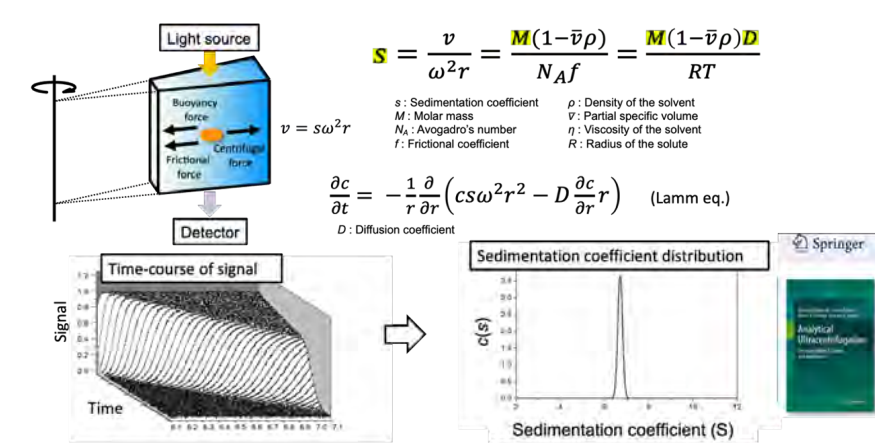


図5 遠心力場での粒子の沈降挙動を表す二階微分方程式（Lamm 方程式）と数値解析による沈降係数分布の算出例

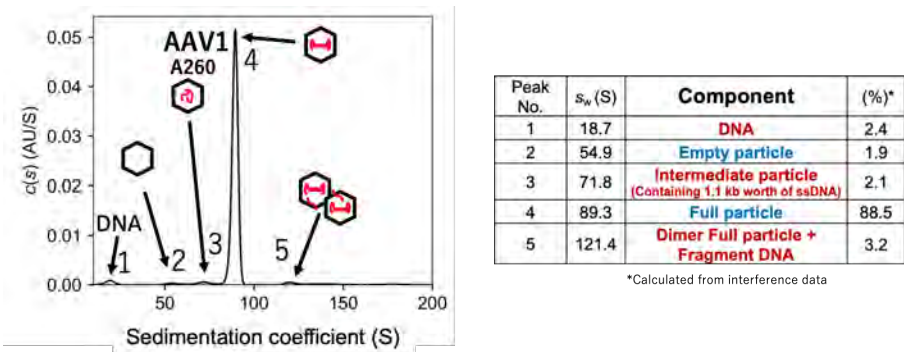


図6 遠多波長超遠心分析沈降速度法による精製後の AAV ベクターに含まれる粒子の分散状態の評価の例

カプシド蛋白質の分析については、rAAV のカプシドを構成する 3 種類の VP 蛋白質（VP1、VP2、VP3）の構成比の正確な定量を、キャピラリー電気泳動と高感度質量分析法を組み合わせた分析法により実現した [11]。開発した分析法を製造した rAAV に適用したところ、通常の工程により精製したウイルスベクターは、類似の性質の粒子の混合物となっていること、しかしながら、各粒子の僅かな性質の違いを利用した分画を行えば活性の異なるウイルスベクターを単離可能であることが見出された [12]。

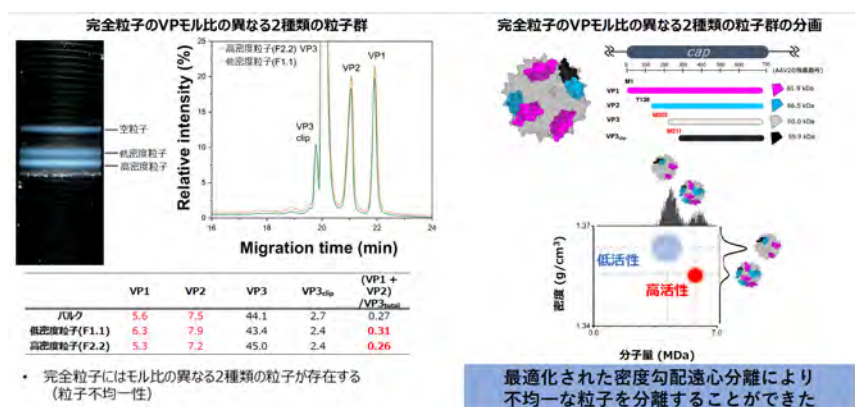


図7 AAVベクター完全粒子は2種類以上の capsid 蛋白質 (VP) 比が異なる粒子の混合物であり、VP1とVP2の量が多い (VP3の量が少ない) 完全粒子ほど生物活性が高いことが分かってきた。

このように、rAAVは有効性と安全性を品質の面から担保可能なモダリティとなりつつある。ただし、ウイルスベクターの製造量を抗体医薬品の場合と比較すると1,000倍から10,000倍少なく、その結果、極めて高価な医薬品となっていることから、医薬品として幅広く広がるためには、今後、製造におけるブレークスルーが必要である。

1. Krayukhina E, Uchiyama S., *et al.*, Assessment of the injection performance of a tapered needle for use in pre-filled biopharmaceutical products. *J Pharm Sci.* **109**, 515-523 (2020).
2. Gambe-Gilbuena A, Uchiyama S., *et al.*, Automatic Identification of the Stress Sources of Protein Aggregates Using Flow Imaging Microscopy Images. *J Pharm Sci.* **109**, 614-623 (2020).
3. Kurinomaru T, Uchiyama S., *et al.*, Optimization of Flow Imaging Microscopy Setting Using Spherical Beads with Optical Properties Similar to Those of Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* in press.
4. Fukuhara A, Uchiyama S., *et al.*, Plate Reader-Based Analytical Method for the Size Distribution of Submicron-Sized Protein Aggregates Using Three-Dimensional Homodyne Light Detection. *J Pharm Sci.* **110** (2021).
5. Uchiyama, S., Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta.* **1844**, 2041-2052 (2014).
6. Saito, S., Uchiyama S., *et al.*, Behavior of Monoclonal Antibodies: Relation between the Second Virial Coefficient (B2) at Low Concentrations and Aggregation Propensity and Viscosity at High Concentrations. *Pharm Res.* **29**, 397-410 (2012).

7. Kizuki S, Uchiyama S., *et al.*, Relationship between aggregation of therapeutic proteins and agitation parameters: Acceleration and frequency. *J Pharm Sci.* **112**, 492-505 (2023).
8. Yoneda S, Uchiyama S., *et al.*, Development of syringes and vials for delivery of biologics: current challenges and innovative solutions. *Expert Opin Drug Deliv.* **18**(4):459-470 (2021).
9. Maruno T, Uchiyama S., *et al.*, Comprehensive Size Distribution and Composition Analysis of Adeno-Associated Virus Vector by Multiwavelength Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *J. Pharm. Sci.* **110**, 3375-3384 (2021).
10. Maruno T Uchiyama S., *et al.*, Size Distribution Analysis of the Adeno-Associated Virus Vector by the c(s) Analysis of Band Sedimentation Analytical Ultracentrifugation with Multiwavelength Detection. *J Pharm Sci.* **112**, 937-946 (2023).
11. Oyama H, Uchiyama S., *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.* **32**, 1403-1416 (2021).
12. Ohnishi, K., Uchiyama S., *et al.*, Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development.* in press.