



円二色性分光で生体分子の高次構造を紐解く 古くて新しい分光法の魅力

大山泰史 Taiji OYAMA

円二色性分光法は、タンパク質や核酸の高次構造を容易に評価できる手法として古くから利用されている。バイオ医薬品や核酸医薬品市場の拡大と、近年の円二色性スペクトルの解析技術のブレークスルーにより、円二色性分光法に改めて注目が集まっている。本稿では、古くて新しい円二色性分光法の最新の解析事例を紹介する。

円二色性分光法

円二色性 (circular dichroism; CD) 分光法は、左右の円偏光の吸収差を検出することで、タンパク質や核酸といった生体高分子の高次構造 (higher-order structure; HOS) の情報が得られる。CD 分光法では原子レベルの構造情報は得られないものの、試料濃度が $0.01\sim 10$ mg/mL 程度で測定可能で、数分程度でスペクトルを取得できる利点を持つ。この特長から、CD 分光法はバイオ医薬品の研究開発や品質管理において不可欠な分析手法として広く活用されている。

タンパク質の CD 分光法では、主に 190~250 nm と 250~340 nm の波長範囲の測定が行われ、おのおの遠紫外 CD、近紫外 CD と呼ばれる。遠紫外 CD スペクトルは、ペプチド結合の $n\rightarrow\pi^*$ 遷移 (215~225 nm), $\pi\rightarrow\pi^*$ 遷移 (190~215 nm), 芳香族アミノ酸側鎖 (250 nm) に由来し、二次構造の変化に対して鋭敏である¹⁾。図 1 に代表的な遠紫外 CD スペクトルを示す。 α -Helix を豊富に含むミオグロビンは約 190 nm に正の極大、208 nm と 222 nm に負の極小を示す。抗体に典型的に見られる β -sheet は、約 200 nm 近傍に正の極大、217

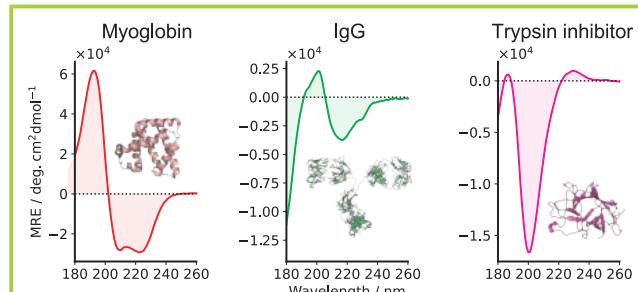


図 1 タンパク質の遠紫外 CD スペクトル

nm に負の極小を示す。一方、random coil が支配的なトリプシンインヒビターは、200 nm 近傍に負の極小を示す。

これらの遠紫外 CD スペクトルの“かたち”から各二次構造の存在比率を推定する二次構造解析の開発が盛んに行われている。1961 年に N. J. Greenfield と G. D. Fasman により最小二乗で二次構造を推定する手法が提案されたことに始まり²⁾、様々な機械学習の手法が考案されてきた³⁾。この間、大きな課題となっていたのは、 β -sheet の推定精度の向上であった。特に β -sheet を豊富に持つ IgG 抗体を有効成分とする抗体医薬品市場の拡大、アミロイドと神経変性疾患との関連が明らかになるにつれて、 β -sheet の推定精度向上への期待は高まった。一方で、 β -sheet の CD スペクトルが多様性を有することが明らかとなり、その多様な β -sheet の CD スペクトルをどう帰属するかが課題となっていた。

おおやま・たいじ
日本分光株式会社
〔経歴〕2009年北海道大学大学院理学院博士前期課程修了。同年日本分光株式会社入社。〔専門〕生体分子の分光学、機械学習。〔趣味〕ランニング。
E-mail: taiji.oyama@jasco.co.jp



二次構造解析アルゴリズム BeStSel

2015 年に、ブレークスルーとなるアルゴリズム

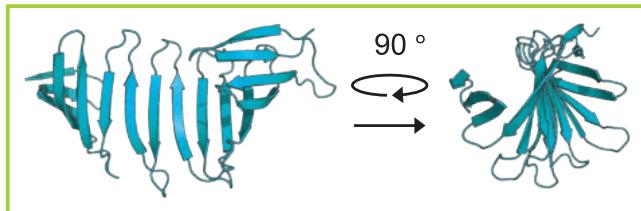


図2 ストランド間のねじれ (PDB ID: 6J48)

BeStSel が J. Kardos と A. Micsonai らによって報告された⁴⁾。従来の二次構造解析との違いは、二次構造の推定のアルゴリズムに β -sheet のストランド間のねじれ角が考慮されている点である (図2)。

BeStSel では、ストランド間のねじれ角によって逆平行 β -sheet が新たに 3 種類のサブタイプに分類され、拘束付き非線形最適化により二次構造の割合が推定される。1つ抜き交差検証による性能検証の結果、BeStSel によって推定された α -helix, β -sheet の比率は X 線結晶構造から求めた値に対して相関係数が各々 0.99, 0.97 であり、これまで報告された二次構造解析法の中で最も高い精度を示した⁵⁾。

抗体の安定性評価

ここでは、遠紫外 CD 測定と BeStSel による解析を利用して抗体医薬品の pH に対する安定性を評価した例を紹介する。抗体医薬品は、製造工程におけるウイルス除去・不活性化、アフィニティークロマトグラフィーのステップで pH 3~4 の酸性条件に一定時間暴露される。そのため、開発候補抗体の pH に対する HOS の安定性を評価することは重要である。乳がんの治療薬である trastuzumab を対象にして、pH に対する安定性を評価した。

図3 に、trastuzumab の各 pH 条件下における遠紫外 CD スペクトルと二次構造解析の結果を示す。pH 7 のスペクトルから推定された trastuzumab の二次構造は、 α -helix 1%, β -sheet 46%, Others 41% であり、X 線結晶構造解析の結果から計算された比率 (α -helix 5%, β -sheet 48%, Others 37%) とよく一致した。pH 3~10 の範囲では二次構造に顕著な変化は見られないが、pH 2 では抗体を構成する主要な二次構造である

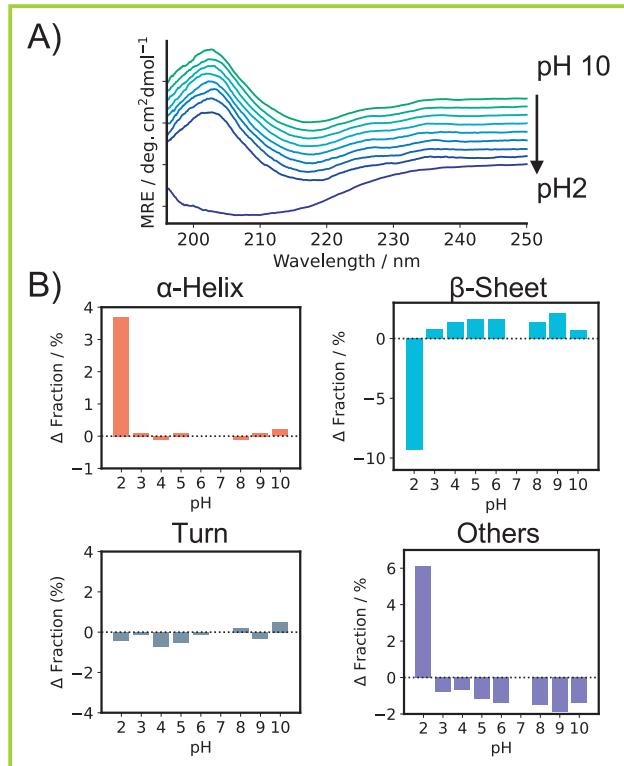


図3 pHによるtrastuzumabの二次構造変化

A) 遠紫外 CD スペクトル、B) 二次構造の比率を示す。縦軸は pH 7 の二次構造の比率からの変化を示す。

β -sheet の比率が減少し、 α -helix, Others の比率の上昇が観察され、pH によって抗体がアンフォールドしていることが示唆された。

近紫外 CD 測定と Structure fingerprint

近紫外 CD スペクトルは、トリプトファン (270~305 nm), チロシン (275~282 nm), フェニルアラニン (270 nm 以下) の局所環境が反映される。これらのアミノ酸残基は、タンパク質表面および疎水性コアの両方に位置するため、近紫外 CD スペクトルはタンパク質の三次構造のプローブとして機能する。図4に、近紫外 CD スペクトルの代表的な例を示す。ヒト血清アルブミンは 585 残基中にトリプトファンを 1 残基しか含まないため、約 290 nm 近傍の顕著なシグナルは観察されない。一方で、250~280 nm にはチロシンおよびフェニルアラニン由来のシグナルが観察される。リゾチームおよびキモトリプシンは複数のトリプト

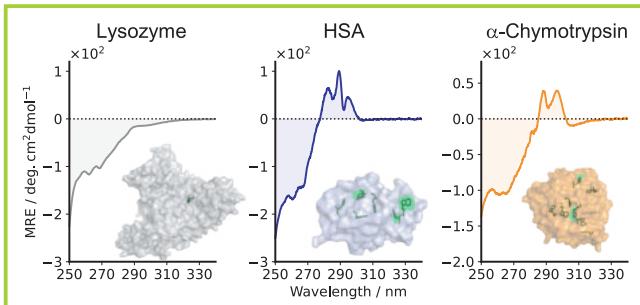


図4 タンパク質の近紫外CDスペクトル
トリプトファン残基を緑のスティックで示す。

ファンを表面および内部に有し、290 nm近傍に明瞭なシグナルを示す。リゾチームは290 nm近傍に3つの極大が観測される一方、キモトリプシンは、2つの極大と305 nm近傍に弱い極小が観測される。これらの差異は、トリプトファンのインドール環に由来する¹L_a, ¹L_b遷移が周囲の極性に対して鋭敏であることに起因する。

近紫外CDスペクトルは三次構造の変化に鋭敏であるが、解釈は複雑である。そのため、2025年現在までには、遠紫外CDのように、スペクトルからHOSの情報を数値化する手法は開発されていない。一方で近紫外CDスペクトルはタンパク質の構造指紋として解析に利用される。H. ShibataらおよびM. Kiyoshiらは、近紫外CD測定と統計解析を組み合わせることで、抗体医薬品のHOSを高感度に識別できることを報告した^{6,7)}。これらの報告では、スペクトルの違いを距離という単変量に変換することで同等性検定や有意差検定(Welchのt検定)の導入を可能とした。図5に、リンパ腫の治療薬であるrituximabの先行品とtrastuzumabの先行品、rituximabの先行品とバイオシミラーのHOSの同等性を比較した例を示す。異なる抗原を標的とするrituximabとtrastuzumabのスペクトルの違い(スペクトル間の距離)は、各サンプル内のばらつきよりも大きい。同等性検定によるp値は1.00を示し、Welchのt検定より得られたp値は0.05未満となり、両抗体の同等性は認められなかった。一方でrituximabの先行品とバイオシミラーのスペクトル間距離は小さく、同等性検定によるp値は0.05を下回り、Welchのt検定

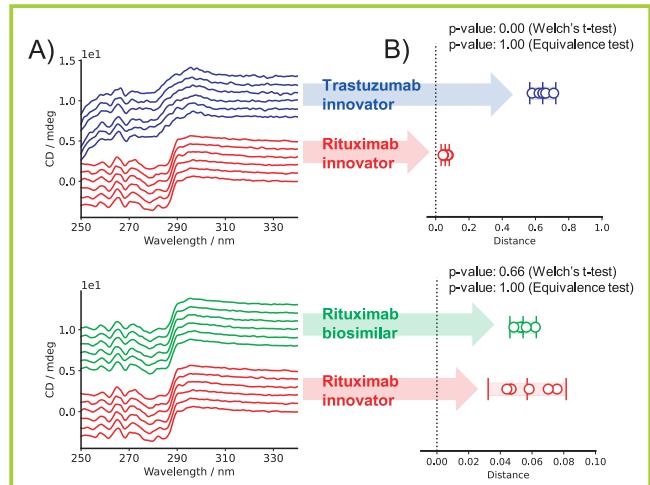


図5 抗体医薬品の同等性評価
A) 近紫外CDスペクトル, B) スペクトル距離と統計検定の結果を示す。

で得られたp値は0.66を示した。これらの結果より、先行品とバイオシミラーのHOSの同等性が示された。このように、CDスペクトルの差を数値化することで、タンパク質のHOSの違いを客観的に評価できる。

おわりに

CD分光法は成熟した技術であるが、解析技術のブレークスルーやハードウェアの進歩により、さらなる発展が期待される。また、AlphaFoldの登場によりタンパク質の一次構造からHOSを高精度に予測できるようになったことで、タンパク質や核酸の構造生物学において、今後CD分光法を利用した実験によるバリデーションの重要性が一層高まると考えられる。

- 1) A. J. Miles, R. W. Janes, B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 8400.
- 2) G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, **1996**.
- 3) N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **2000**, 287, 252.
- 4) A. Micsonai, F. Wien, L. Kerna, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112, E3095.
- 5) A. Micsonai, F. Wien, N. Murvai, M. P. Nyiri, B. Balatoni, Y.-H. Lee, T. Molnár, Y. Goto, F. Jamme, J. Kardos, *Nucleic Acids Res.* **2025**, 53, W73.
- 6) H. Shibata, T. Oyama, M. Kiyoshi, S. Suzuki, Y. Higuchi, Y. Saito, A. Ishii-Watabe, *J. Pharm. Sci.* **2025**, 114, 103865.
- 7) M. Kiyoshi, T. Oyama, H. Shibata, S. Suzuki, Y. Higuchi, K. Tsumoto, A. Ishii-Watabe, *Anal. Chem.* **2025**, 97, 12578.