

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF によるウイルスベクター粒子の特性解析

著者

Wendi A. Hale and
Christopher M. Colangelo
Agilent Technologies, Inc.,
Lexington, MA, USA

Roy Hegedus and
Norman Garceau
Lake Pharma,
Worcester, MA, USA

概要

このアプリケーションノートでは、インタクトアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）の重要品質特性（CQA）の解析と測定、ならびにキャプシドタンパク質の翻訳語修飾（PTM）同定のワークフローについて解説します。ワークフローは Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせた Agilent 1290 Infinity II LC で構成され、データ分析には Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアを使用しました。

はじめに

AAV は、遺伝子治療の主要ウイルスベクターであり、遺伝性網膜疾患や脊髄性筋萎縮症の治療で大きな成果を上げています。AAV は、約 4.7 kb の一本鎖ゲノムを含む 20 面体のタンパク質の殻で構成されています。インタクト AAV は、オリゴヌクレオチド治療薬を保護して送達する運搬役を務めます。さまざまな種類の細胞に形質導入する、治療の選択性を広げる 13 種の血清型があることが知られています。AAV は治療送達プラットフォームとして開発が続けられ、治療薬のすべての CQA の維持に欠かせない要素です。ウイルスキャプシドタンパク質の特性解析には、いくつかの課題があります。このタンパク質の殻は、VP1、VP2、VP3 の 3 種のキャプシドタンパク質で構成されています。この 3 種のキャプシドタンパク質が、1 ウイルスあたり 60 キャプシド、1:1:10 の割合で 3.9 メガダルトンの構造を形成しています。VP1 と VP2 の低モル比に加え、3 種のタンパク質すべての配列が C 末端でオーバーラップします。従来、キャプシドタンパク質の分子量の特定に SDS-PAGE が用いられていますが、この技法で得られるのはおおよその分子量で、血清型の違いを識別することはできません。質量分析 (MS) は、この課題の克服とキャプシドタンパク質の CQA 測定を可能にする有望なメソッドです。本アプリケーションノートでは、ウイルスキャプシドタンパク質の PTM 同定を含む、インタクト分析とペプチドマッピングのためのワークフローについて解説します。このワークフローで使用したツールは、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせた 1290 Infinity II LC です。データ解析には MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアを使用しました。

実験方法

装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC は以下の構成です。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)。インタクト分析用 20 μ L ループ、ペプチドマッピング分析用 40 μ L ループを装着
- Agilent 1290 Infinity II サーモスタット付きカラムコンパートメント (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

試料調製

AAV8 は Lake Pharma (ウースター、マサチューセッツ州、米国) 製です。分子量分画フィルタとトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) は Millipore Sigma から購入しました。トリプシンと rAsp-N は Promega から購入しました。

サンプル前処理

インタクト分析を行うため、10 kDa 分子量フィルタによる、AAV のバッファ交換を 10,000 g で 3 回行いました。バッファは、5 mM TCEP、80 % H₂O と 0.1% 酢酸を含む 20% アセトニトリル (v/v) の溶液でした。サンプルは、回収後、注入に先立って室温でインキュベートしました。ペプチドマッピングを行うため、AAV の変性、還元、アルキル化と消化を行いました。この実験に用いた酵素はトリプシンと rAsp-N でした。

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、1290 Infinity II LC とデュアル Agilent Jet Stream イオン源付き 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを組み合わせて実施しました。インタクト分析には、Agilent MassHunter Acquisition (B.09.00) ワークステーションソフトウェアの高分子 SWARM オートチューン機能を使用しました。装置をさらにキャリブレーションし、標準質量モードで動作させました。ペプチドマッピングのワークフローには、反復 MS/MS 機能を使用しました。

データ処理

すべての MS データは MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアで処理しました。

表 1. インタクト分析の液体クロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m
移動相 A	水、0.1 % 酢酸
移動相 B	アセトニトリル、0.1 % 酢酸
流量	0.4 mL/min
注入量	20 μ L
グラジエント	0 ~ 30 分: 30 ~ 40 % B 30 ~ 38 分: 40 ~ 90 % B 38 ~ 39 分: 90 % B 39 ~ 40 分: 90 ~ 30 % B 40 ~ 45 分: 30 % B
ポストタイム	0 分
カラム温度	60 °C

表 2. インタクト分析の Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF のパラメータ

パラメータ	設定値
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	325 °C
ガス流量	13 L/min
ネプライザ	35 psig
シースガス温度	375 °C
シースガス流量	12 L/min
VCap	5,000 V
ノズル	500 V
フラグメンタ	180 V
取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	922.0098

表 3. ペプチドマッピング分析の液体クロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 \times 150 mm
移動相 A	水、0.1 % 酢酸
移動相 B	アセトニトリル、0.1 % 酢酸
流量	0.4 mL/min
注入量	40 μ L
グラジエント	0 ~ 3 分: 3 % B 3 ~ 50 分: 3 ~ 35 % B 50 ~ 60 分: 35 ~ 97 % B 60 ~ 62 分: 97 % B 62 ~ 62.5 分: 97 ~ 3 % B 62.5 ~ 65 分: 3 % B
ポストタイム	5 分
カラム温度	60 °C

表 4. ペプチドマッピング分析の Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF パラメータ

パラメータ	設定値
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	325 °C
ガス流量	13 L/min
ネブライザ	35 psig
シーガス温度	275 °C
シーガス流量	12 L/min
VCap	4,000 V
ノズル	0 V
フラグメンタ	170 V
取り込みレート	MS および MS/MS の場合、5/3 スペクトル/秒
リファレンス質量	121.0509, 922.0098

結果と考察

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF でのインタクト分析

SDS-PAGE は AAV キャプシドタンパク質の分子量をすばやく簡単に確認できる方法ではあるものの、アセチル化やリン酸化と未修飾型といった、異なるプロテオフォームを分解する方法としては十分とは言えません。高分解能の Q-TOF MS なら、高感度の分析が行え、PTM を分離でき、タンパク質の正確なインタクト分子質量も測定できます。さらに、これを支えるのが、キャプシドタンパク質の質量分析器全体での通過性を向上させて優れた感度をもたらす、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の高

分子 SWARM オートチューン機能です。また、TOF の超高真空 (e^{-8} torr) によってタンパク質分子の平均自由行程が長くなるため、スペクトルの明確性も向上します。

LC/MS に先立つサンプル前処理は、高品質の質量スペクトルを得るのに欠かせない工程であり、この AAV 分析でその重要性がより一層際立っています。図 1 には、キャプシドタンパク質のトータルイオンクロマトグラム (TIC) と未加工の質量スペクトルを、サンプル前処理実施の有無別に示しています。サンプルのオリジナルのバッファ溶液は質量分析器に汚染をもたらします。さらに、キャプシドタンパク質間の分離もバッファ交換によって改善します。未加工のデータでは、タンパク質の感度は 1.5 倍と大幅に向上し、スペクトルの明確

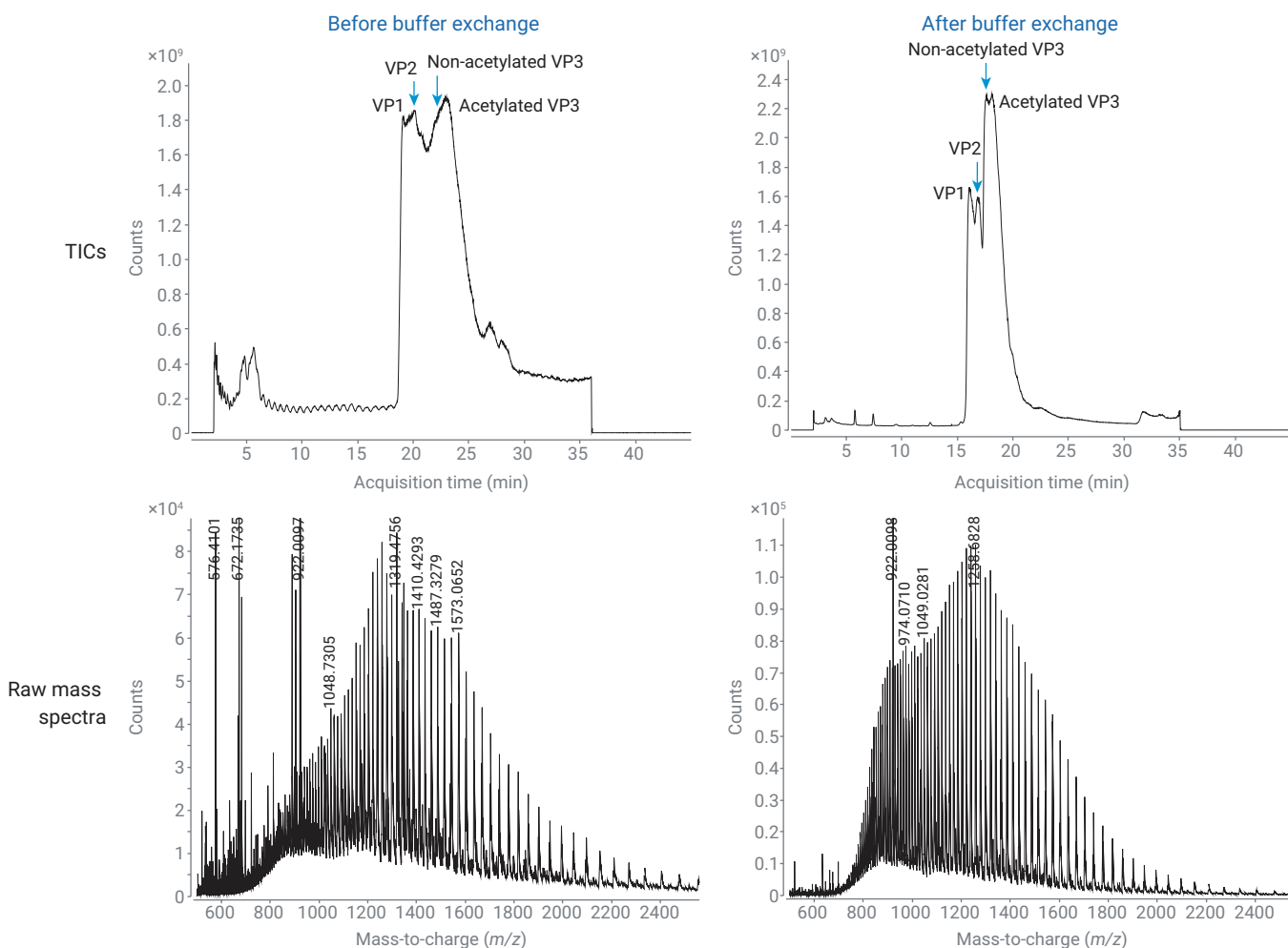


図 1. AAV キャプシドタンパク質の TIC と VP1 の未加工スペクトル (サンプル前処理がある場合とない場合)

性も大幅に向上しています。デコンボリュートしたデータはここには示していませんが、ナトリウム付加物やカリウム付加物がないためにスペクトルがより明確となり、データの解釈も非常に簡単です。加えて、ワークフローの堅牢性の向上により、機器のメンテナンス間隔も伸びます。

図 2 には、VP1 の未加工のスペクトルとデコンボリュートしたスペクトルを示しています。このワークフローでは、VP1 の 3 つのリン酸化部位を検出でき、誤差は 10 ppm 未満でした。測定された精密質量データから、VP1 は N 末端のアミノ酸残基がなく、新たな N 末端がアセチル化されていることが裏付けられました。AAV キャプシドタンパク質については、VP1 のリン酸化といった PTM 分析に関する報告が極めて少ないというのが現状です。VP2 は、クロマトグラフィーによって VP1 から分離できます。質量分析器はこれらのタンパク質を質量によって分離できますが、クロマトグラフィー

による分離を用いることで、この 2 種の含有量の低いタンパク質のイオン抑制を低減できます。精密質量データから、VP2 に少なくとも 2 カ所のリン酸化部位があることが裏付けられました。また、図 3 では 3 カ所目の可能性が示されています。図 4 は、VP3 の未修飾型の大半が、アセチル化された VP3 からクロマトグラフィーによって分離されていることを示しています。さらに、デコンボリュートしたスペクトルから、アセチル化された VP3 と未修飾の VP3 のいずれについても高い質量精度を示していることが確認できます。タンパク質の N 末端のアセチル化は一般的な PTM であり、タンパク質の安定性、折り畳みや他のタンパク質との相互作用に関係します。VP1 は完全にアセチル化されていた一方で、VP3 でアセチル化されていたのはおよそ 70 % でした。现阶段では VP 3 が完全にアセチル化されない理由は明確になっていませんが、これが、ウイルスのキャプシド殻の全体的な構造に影響を及ぼしている可能性があります。高分子 SWARM オートチューン機能と組み合わせた 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の真空状態の向上によって得られたスペクトルの明確性によって、PTM された 全3 種のウイルスキャプシドタンパク質がすべてのプロテオフォームに対して 10 ppm 未満という高い質量精度で示されています。

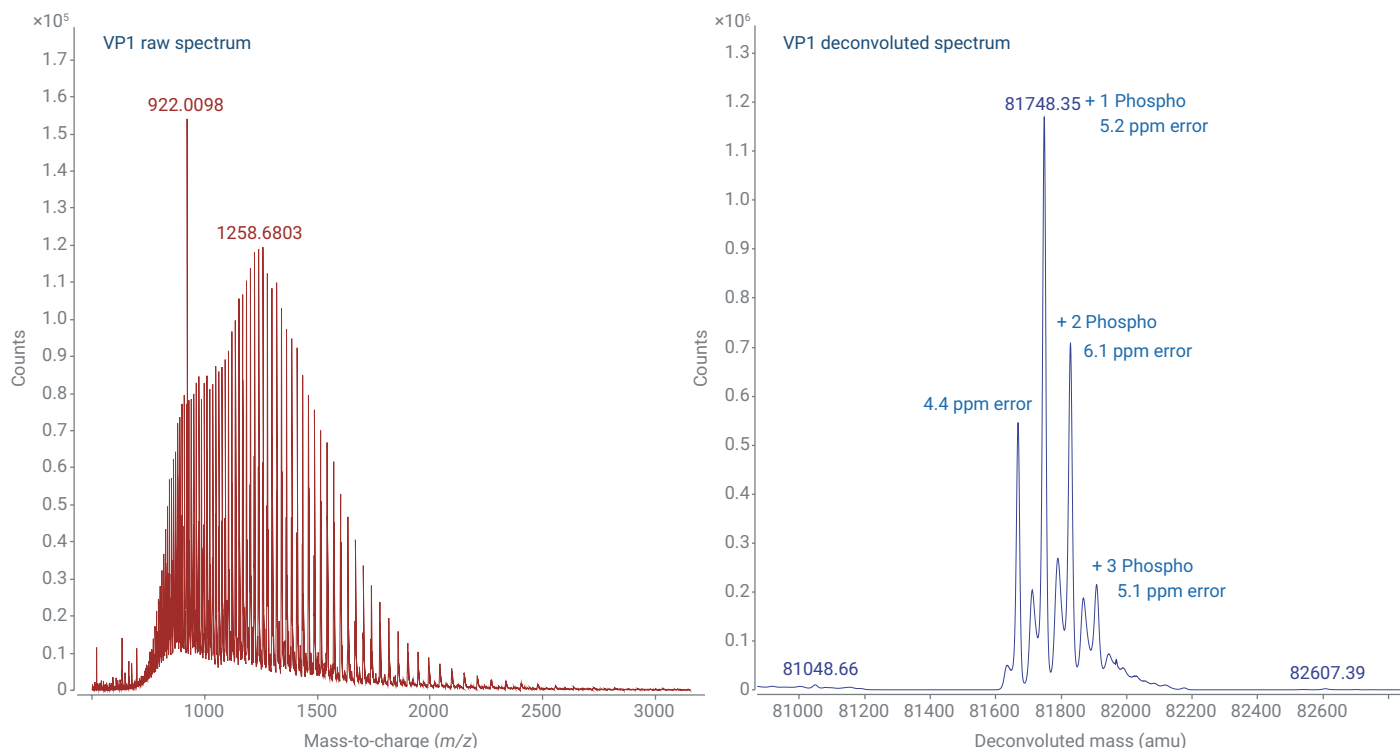


図 2. VP1 キャプシドタンパク質の未加工のスペクトルとデコンボリュートしたスペクトル。タンパク質の天然型とリン酸化型ともに優れた質量精度を示しています。

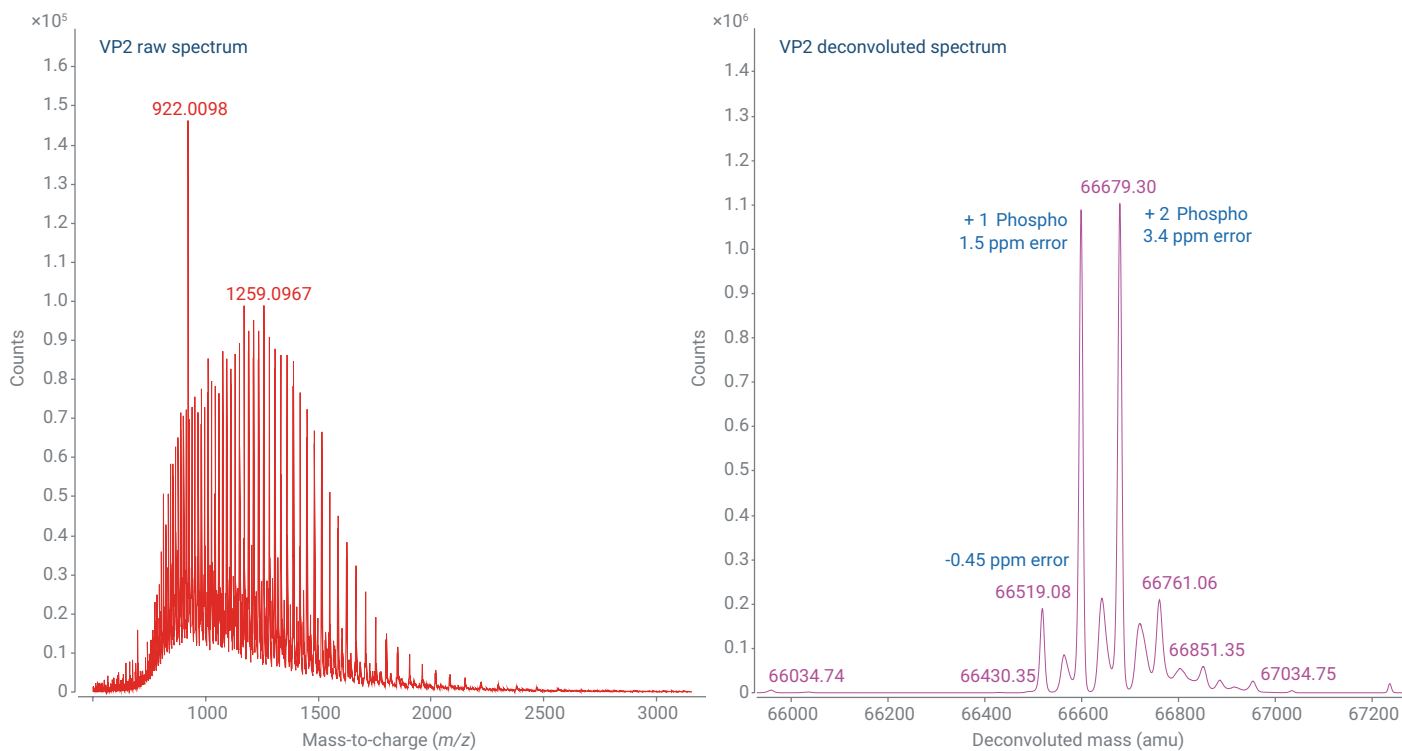


図 3. VP2 キャプシドタンパク質の未加工のスペクトルとデコンボリュートしたスペクトル。タンパク質の天然型、リン酸化型とともに 5 ppm 未満の誤差という優れた質量精度を示しています。

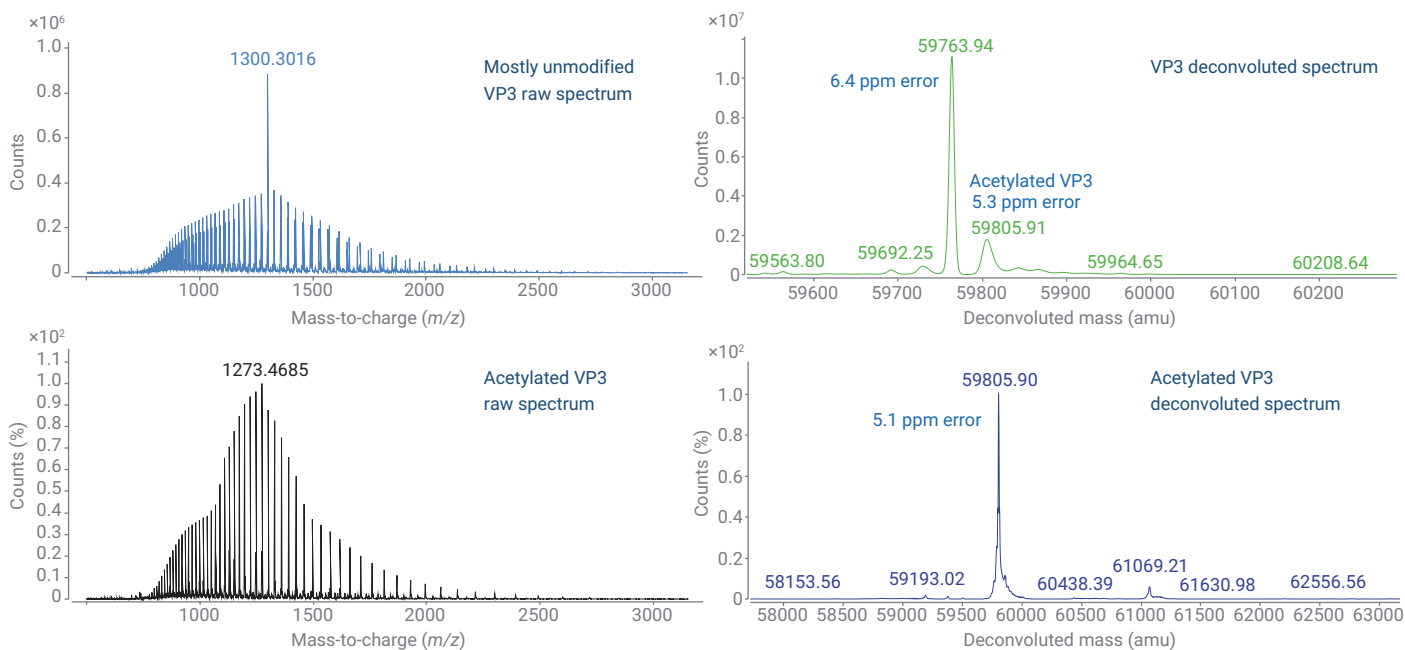


図 4. VP3 キャプシドタンパク質の未加工スペクトルとデコンボリュートしたスペクトル。クロマトグラフィーによって未修飾型とアセチル化型のほとんどが分離し、各プロテオフォームについても優れた質量精度を示しています。

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF でのペプチドマッピング

バイオ製剤のペプチドマッピングは、ICH、FDA や他の規制機関が求めるタンパク質配列や PTM の解読に欠かせないメソッドです。AVV による遺伝子治療は新興分野ではあるものの、キャプシドタンパク質のペプチドマッピングが将来必要とされる可能性も考えられます。2020 年 1 月時点で、FDA は、人間の遺伝子治療用原薬の PTM をはじめとする一次構造や二次構造に関する情報を提供するように推奨しています。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の反復 MS/MS 機能は、先に行った単離やフラグメンテーションのすべての分析からペプチドを除外できるため、含有量の低いペプチドの選択や検出が可能です。また、MassHunter BioConfirm 10.0 は複数の分析を選択して実行できるため、シーケンスカバレッジの総計が得られます。この機能は、反復 MS/MS 分析の結果をまとめることも、複数の酵素を用いることも可能なため有用です。

酸化や脱アミド化といった PTM の同定は、タンパク質安定性の解読に欠かせません。同定したすべてのペプチドの誤差は 10 ppm 未満であり、少なくとも 1 つの MS/MS スペクトルでペプチド配列を確認して PTM を特定し、ペプチドマッピングの信頼性を確保しました。さらに、偽発見率を 1% に設定しました。AAV8 の配列にはリジン残基とアルギニン残基が頻繁に現れる部位がいくつかあるため、トリプシン消化のみで完全な配列を得るのが難しくなっています。このため、完全なシーケンスカバレッジを得るために rAsp-N を用いました。

最も長いタンパク質である VP1 の総シーケンスカバレッジは、図 5 に示すとおり、97.7% でした。実線は、MS/MS によるペプチドの同定を表しています。青線と緑線は、トリプシン消化物の 2 回の反復分析の結果で、黒線と赤線は、rAsp-N 消化物の 2 回の反復分析の結果です。図 6 に示すように、MS/MS データから、部位特異的なリン酸化が裏付けられました。赤字のアノテーションは、リン酸化セリンを含むペプチドフラグメントを示しています。アスパラギンの脱アミド化やメチオニンの酸化といった他の一般的な PTM も存在するものの、予想どおり少量でした。BioConfirm

10.0 の相対定量機能による、これらの微量修飾の例を図 7 に示しています。VP2、VP3 のシーケンスカバレッジは、それぞれ、98.5% と 100.0% でした。AAV8 における N-グリコシル化の報告はこれまでいくつかあるものの、N-グリコシル化は確認できませんでした。この矛盾は、ベクター発現系の相違によるものと思われる。

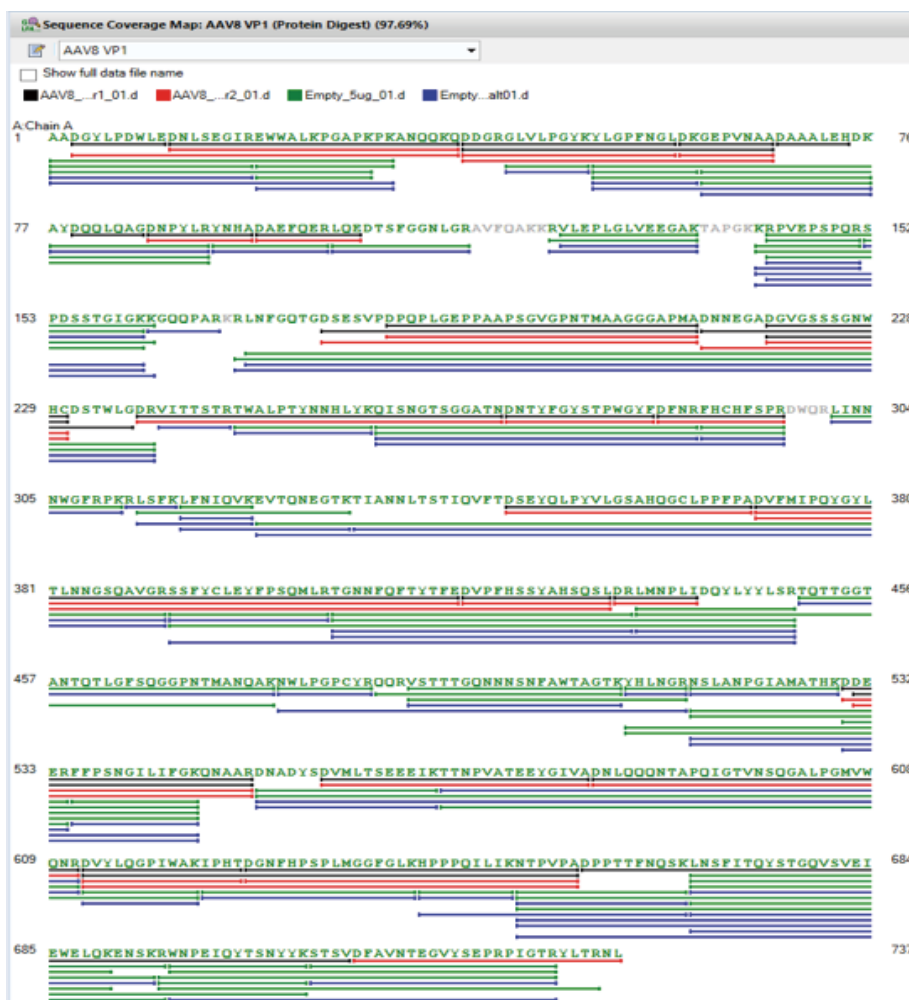


図 5. 補助酵素としてトリプシンと rAsp-N を用いた反復 MS/MS による VP1 のシーケンスカバレッジを示す Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 のスクリーンショット。このタンパク質のシーケンスカバレッジは 97.7% です。

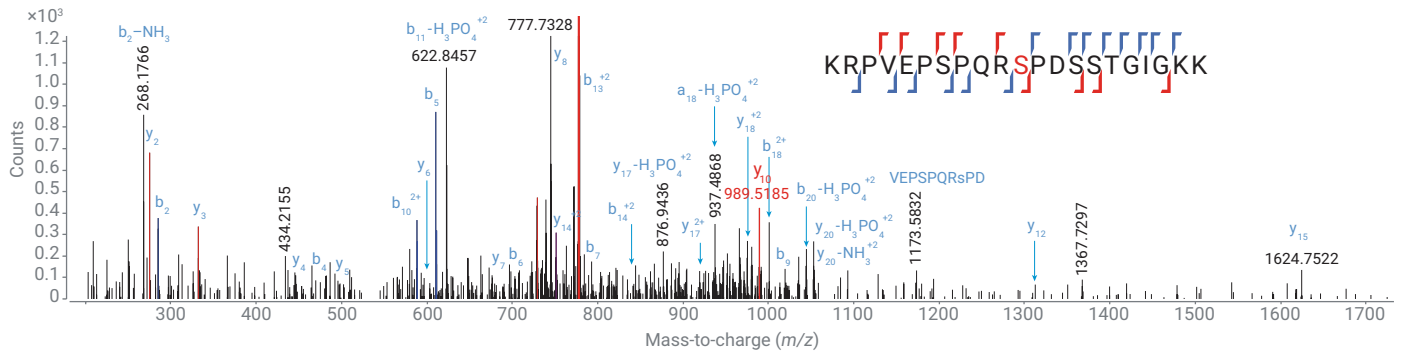


図 6. MS/MS 確認による部位特異的リン酸化の 1 例。リン酸化セリン残基が含まれる場合、アノテーション付きペプチドが赤くマーキングされます。

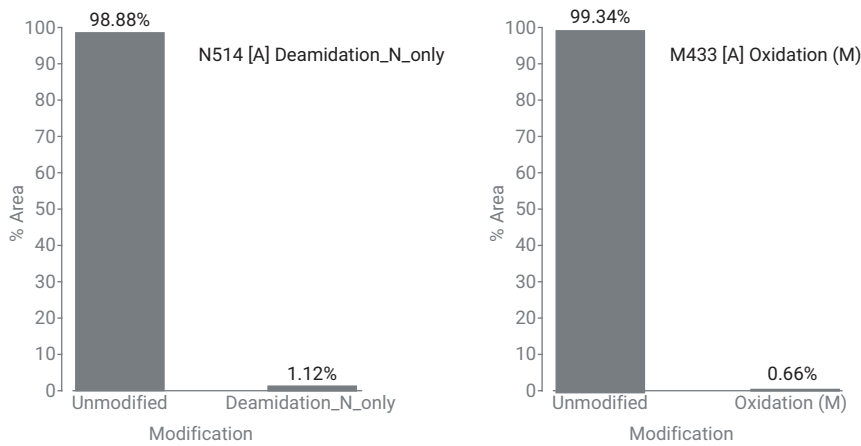


図 7. タンパク質の一般的な PTM の例:メチオニンの酸化とアスパラギンの脱アミノ化。予想どおり、いずれのペプチドも修飾は最小にとどまりました。

結論

遺伝子治療で AAV 粒子を運搬役に用いる方法は非常に有望であることから、医薬品承認プロセスにはキャプシドタンパク質の CQA 特性解析が不可欠となっています。本アプリケーションノートでは、サンプル前処理からデータ分析に至るワークフローを示しました。このデータ分析では、キャプシドタンパク質の正確な質量を測定し、PTM を同定します。MassHunter BioConfirm 10.0 搭載の 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせた 1290 Infinity II LC は、信頼性と精度に優れた、AAV キャプシドタンパク質分析ソリューションです。

参考文献

1. Dalkara, D. *et al.* *In vivo*-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*(189), 189ra76-189ra76.
2. Xie, Q. *et al.* The Atomic Structure of Adeno-Associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy. **2002**, *99*(16), 10405–10410.
3. Wu, Z.; Asokan, A.; Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* **2006**, *14*(3), 316–327.
4. Bui, H. *et al.* (2014) ASMS Poster WP-681.
5. Jin, X. *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.
6. Giles, A. R. *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.
7. Van Vliet, K. *et al.* Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application. *J. Virol. Methods* **2009**, *159*(2), 167–177.
8. Arruda, V. R. *et al.* It's All About the Clothing: Capsid Domination in the Adeno-Associated Viral Vector World. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*(1), 12–15.
9. Office of Medical Products and Tobacco, Center for Biologics Evaluation and Research. *Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Silver Spring, MD. **2020**, 28–29.

謝辞

サンプル前処理に取り組んでくださった Lake Pharma の Dominique Garceau 氏、Tristan Cano 氏、Caitlin Jaeger 氏、William Hermans 氏にアジレントから謝意を表します。さまざまなアイデアを共有してくれた Agilent Singapore の Brian Liao と Ravindra Gudihal にも感謝します。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, July 23, 2020
5994-1980JAJP
DE.4113541667