

## 顆粒球コロニー刺激因子の溶液小角 X 線散乱 Solution small angle X-ray scattering of granulocyte colony-stimulating factor

渋谷理紗<sup>1</sup>, 今村比呂志<sup>2</sup>, 八桁清樹<sup>2</sup>, 本田真也<sup>1,2\*</sup>

東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5<sup>1</sup>  
産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1<sup>2</sup>

Risa Shibuya<sup>1</sup>, Hiroshi Imamura<sup>2</sup>, Seiki Yageta<sup>2</sup>, and Shinya Honda<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences,  
The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

<sup>2</sup> Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

### 1 はじめに

タンパク質医薬品が薬効を発揮するためには、天然構造が維持されている必要がある。製造や保管プロセスには、天然構造を不安定化させる様々なストレスが存在する。タンパク質医薬品の天然構造を維持させ、医薬品としての高い品質を確保するためには、各過程の溶液条件下における構造や安定性を把握する必要がある。代表的なタンパク質医薬品の一種である顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、がん化学療法によって起こる好中球減少症の治療薬である。G-CSF は体内の生理的条件下で薬効を発揮するが、製剤ではより安定性が高い酸性溶液で調製されている [1, 2]。

我々は、異なる pH 条件下における G-CSF の高次構造と安定性との相関の有無を理解するため、まず pH 8 における小角 X 線散乱 (SAXS) を測定し、G-CSF の高次構造を解析した。

### 2 実験

SAXS 測定は BL10C のビームラインで行った。X 線の波長は 0.1488 nm、カメラ長は 1047 mm とし、ベヘン酸銀の散乱パターンを用いて較正した。X 線散乱は、PILATUS3 2M (DECTRIS Ltd., Switzerland) で検出した。大腸菌で発現させた G-CSF を精製し、20 mM トリス塩酸緩衝溶液 (pH 8) を用いて 4 °C で透析したサンプル約 2 mg/mL を測定に使用した。測定の温度は、25.0 ± 0.1 °C に設定した。1 枚の画像データにつき 2 秒の X 線露光を行い、30 枚のデータを取得した。画像の一次元化は Nika [3]を用いて行い、X 線損傷の影響のあるデータは除外した。測定データは、既存の PDB データベースの構造と比較した。結晶構造 (PDB code: 2D9Q; pH 4.8) をホモロジーモデリングによって非構造領域を追加した PDB ファイルと、NMR により構造決定された PDB ファイル (PDB code: 1GNC; pH 3.5) を用いて、理論散乱曲線を算出した。理論散乱曲線の計算には CRY SOL プログラム [4] を使用した。

### 3 結果および考察

G-CSF の測定散乱曲線ならびに理論散乱曲線から作成したクラツキープロットでは、各プロットのピーク位置 ( $q = 0.09\text{--}0.10 \text{ \AA}^{-1}$ ) が互いに一致した。G-CSF の溶液構造 (pH 8) は、結晶中の構造 (pH 4.8) および NMR から得た溶液構造 (pH 3.5) と回転半径レベルで同一であることがわかった。今後は、各 pH 条件下における散乱曲線を測定する。また、全体構造および局所構造の詳細な解析を進め、高次構造と安定性の相関を調べる。

### 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金基盤研究 (C) 「後続バイオ医薬品開発を目指した環状化サイトカインの分子設計と合成」 (平成 23 年度～平成 25 年度) の支援によって行われた。

### 参考文献

- [1] Krishnan S *et al.*, *Biochem.* **41**, 6422-6431 (2002).
- [2] Chi E Y *et al.*, *Protein Sci.* **12**, 903-913 (2003).
- [3] Ilavsky J, *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 324 (2012).
- [4] Svergun D, Barberato C, Koch M. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768-73. (1995)

\* s.honda@aist.go.jp