

主鎖環状化顆粒球コロニー刺激因子の結晶構造解析と天然構造安定化効果の評価

Crystal structure analysis and conformational stabilization in folded state of backbone-circularized granulocyte-colony stimulating factor

渋谷理紗¹、宮房孝光¹、本田真也^{1,2*}

¹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 中央第 6

²東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

Risa SHIBUYA¹, Takamitsu MIYAFUSA¹, and Shinya HONDA^{1,2*}

¹ Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

² 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

1 はじめに

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、好中球の分化・増殖を促進させるタンパク質の一種である。G-CSF はバイオ医薬品の一種でもあり、がん化学療法によって起こる好中球減少症の治療薬として用いられている。しかし、G-CSF には構造安定性および生体内安定性が低いという問題がある。バイオ医薬品の非天然構造の増加は、機能低下や免疫原性増大を引き起こす。そのため、G-CSF の天然構造を壊さずに G-CSF を改変し、構造安定化させる必要がある。

我々は、N 末端と C 末端を結合させるポリペプチド主鎖環状化を用いて、G-CSF を構造安定化させたことを報告した[1]。本実験では、作製した環状化 G-CSF の中で最も構造安定化した環状化 G-CSF (C166) の結晶構造を明らかにすることにより、主鎖環状化が G-CSF の天然構造と分子内相互作用に変化を与えたかどうか調べた。

2 実験

2-1. 使用した変異体

研究には、2 種類の G-CSF 変異体を使用した。環状化 G-CSF (C166) と、組換えヒト G-CSF の N 末端に Met を付加した G-CSF 製剤のフィルグラスチム (Neupogen, Amgen) のアミノ酸配列のうち、Cys17 を Ser17 に置換した直鎖状 G-CSF (L175) である。

2-2. 作製

C166 は、末端を共有結合でつなぐためのスプリットインテインを融合した状態で大腸菌 BL21 (DE3) 中で発現させた。C166 と L175 は大腸菌の不溶性画分に発現した。大腸菌破碎とリフォールディングのうち、三段階のカラム精製を経て C166 と L175 のタ

ンパク質溶液を取得した。精製したサンプルの純度は SDS-PAGE および質量分析を用いて確認した。

2-3. 結晶化

C166 の結晶化には 6 mg/mL のタンパク質溶液を使用した。100 mM 酢酸ナトリウム・三水和物 (pH 5.2)、20 mM 六塩化ロジウム (III) ナトリウム二水和物、27% (w/v) ポリエチレングリコール 1500、および 3% (v/v) (\pm)-2-メチルペンタジオール の条件下で結晶化した C166 を結晶構造解析に使用した。

2-4. エネルギー計算

平衡状態における C166 と L175 の構造安定性を評価し比較するために、結晶構造を初期構造として分子動力学 (MD) シミュレーションを行った。L175 の構造は、MODELLER 9.19 を使ったホモロジーモデリング[2]によって作製した。全ての MD 計算は myPresto の cosgene[3]と AMBER99 力場[4]を用いて行われた。300 K 一定の NVT 計算、TIP3P モデル、半径 35 Å の水球中で実行した。計算の過程で得られた C166 と L175 の非共有結合エネルギーの値を比較した。なお、この値は、平衡に達した後の全 MD 構造群の値を平均した。

3 結果および考察

3-1. 結晶構造解析結果

C166 は分解能 1.7 Å で構造決定できた(図 1)。C 末端の Gly166 と N 末端の Ser1 の結合が電子密度から確認できた(図 1b)。ヒト野生型 G-CSF [PDB code: 2D9Q, chain A] の 4 本のヘリックスと重ね合わせた結果、平均二乗誤差 (RMSD_{Ca}) は 0.86 Å であった。C166 はヒト野生型 G-CSF のヘリックスリッチな構造を保ったまま、主鎖環状化したことがわかった。

次に、C166 の構造安定化要因を調べるために、C166 とヒト野生型 G-CSF [PDB code: 2D9Q, chain A]

との分子内相互作用を比較した。その結果、水素結合に違いがみられた。C166の環状化末端には、ヒト野生型 G-CSF にはない二つの水素結合が形成されたことが分かった (図 1c)。さらに、環状化末端に近いヘリックス内部の水素結合数も増大していた。これらの水素結合が C166 の構造安定化をもたらしたと考えられる[5]。

3-2. エネルギー計算

C166 の安定化に寄与した因子を調べるために、C166 と L175 における MD 構造群の静電相互作用エネルギーとファンデルワールス相互作用エネルギーを比較した (図 2)。その結果、C166 の非共有結合エネルギーは L175 の非共有結合エネルギーより低くなった。さらに、水素結合エネルギーを含む静電相互作用エネルギーが C166 の構造安定化に寄与していた。C166 の天然構造における水素結合エネルギーの増大が、静電相互作用エネルギーの低下を導いたと考えられる[5]。

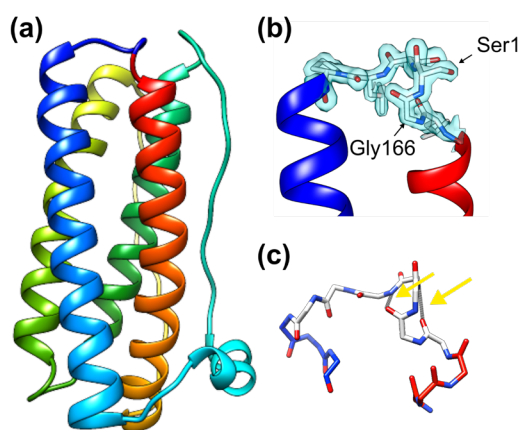


図 1 : C166 (PDB code: 5ZO6) の結晶構造 (c) の点線 (灰色) および矢印 (黄色) は水素結合を示す。C166 の Leu165(CO)-Ser2(NH)および Gly166(CO)-Leu3(NH)において、ヒト野生型 G-CSF にはない新たな主鎖間の水素結合が形成された。

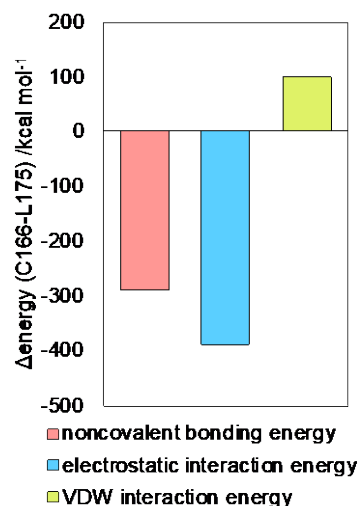


図 2 : AMBER99 力場を使った非共有結合エネルギー計算 非共有結合エネルギーは静電相互作用とファンデルワールス相互作用の合計である。縦軸は C166 の MD 構造群のエネルギー平均値から L175 の MD 構造群のエネルギーの平均値を引いた値を示す。赤色は非共有結合エネルギー、青色は静電相互作用エネルギー、緑色はファンデルワールス相互作用エネルギーを表す。

4 まとめ

結晶構造解析により、C166 は野生型 G-CSF の天然構造を維持したまま環状化されていることが明らかになった。また、C166 の天然構造における水素結合エネルギーが増大し、天然構造の構造安定化をもたらしていることがわかった。主鎖環状化による構造安定化は、G-CSF をはじめとするバイオ医薬品に応用できると期待される。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 23510273 の助成を受けて実施された。

参考文献

- [1] T. Miyafusa *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 12, 10 (2017).
- [2] T. Terada *et al.*, *J. Chem. Phys.* 116, 33 (2002).
- [3] Y. Fukunishi *et al.*, *J. Phys. Chem.* 107 (2003).
- [4] W. D. Cornell *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995).
- [5] R. Shibuya *et al.*, *FEBS journal.* 287, 8 (2020).

* s.honda@aist.go.jp