

# SAXS を用いた主鎖環状化顆粒球コロニー刺激因子の溶液構造と凝集体のサイズ解析

## Solution structure and aggregates of backbone-circularized granulocyte colony-stimulating factor by SAXS

渋谷理紗<sup>1,2</sup>、今村比呂志<sup>1,3</sup>、宮房孝光<sup>1,4</sup>、大石郁子<sup>1</sup>、本田真也<sup>1,2\*</sup>

<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 中央第 6

<sup>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>3</sup>立命館大学 生命科学部 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

<sup>4</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 中央第 6

Risa SHIBUYA<sup>1,2</sup>, Hiroshi IMAMURA<sup>1,3</sup>, Takamitsu MIYAFUSA<sup>1,4</sup>, Ayako Ooishi<sup>1</sup>, and Shinya HONDA<sup>1,2\*</sup>

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

<sup>2</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>3</sup> Department of Applied Chemistry, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

<sup>4</sup> Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan.

### 1 はじめに

バイオ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として用いられている。しかし、G-CSF は凝集しやすく、保管安定性および生体内安定性が低いという問題がある。凝集を抑制するために、G-CSF の構造安定化やコロイド安定化が求められる。我々はこれまでに、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 の機能とトポロジーを維持したまま構造安定化させたことを報告した [1, 2]。

本実験では、主鎖環状化が G-CSF のコロイド安定性に変化を与えるかどうか調べた。G-CSF は穏和な条件でも凝集しやすいため、コロイド安定性の定量的な評価が難しい。我々は SAXS (small-angle X-ray scattering) を用いて天然構造と変性構造、および凝集しやすさを調べることにより、主鎖環状化が G-CSF のコロイド安定化に影響を与えるかどうかを間接的に評価した。

### 2 実験

#### 2-1. 変異体の調製

研究には、2 種類の G-CSF 変異体を使用した。環状化 G-CSF 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 である (図 1)。

大腸菌で発現させた G-CSF を精製し、0–5 M グアニジン塩酸塩 (GdnHCl) を含む 20 mM トリス塩酸緩衝溶液 (pH 4) を用いて 4 °C で 20 時間透析した。透析後のサンプルをフィルターで遠心後、タンパク質濃度約 3 mg mL<sup>-1</sup> に希釈し測定に使用した。

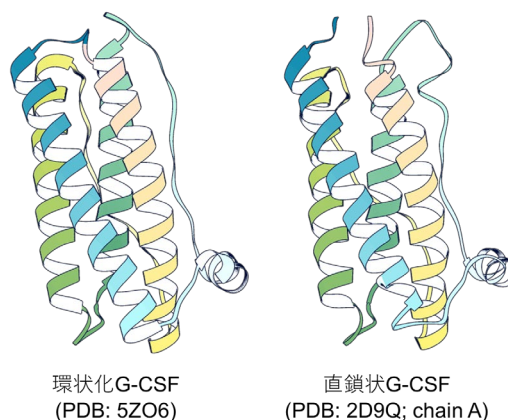


図 1 : 環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF の結晶構造

## 2-2. SAXS 測定

SAXS 測定は BL-10C と BL-6A のビームラインで行った。X 線の波長は 0.15 nm、カメラ長は 1005 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、BL-10C では PILATUS3 2M (DECTRIS Ltd., Switzerland)、BL-6A では PILATUS3 1M (DECTRIS Ltd.) で検出した。測定の温度は、 $25.0 \pm 0.1$  °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、15 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。

## 3 結果および考察

解析の結果 (図 2)、2.0–3.5 M GdnHCl 存在下で、凝集体を含む見かけの回転半径  $R_g$  ( $R_g^{\text{app}}$ ) に違いが現れた (図 2c)。環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF に比べて  $R_g^{\text{app}}$  の増大が抑制されたことが分かった。

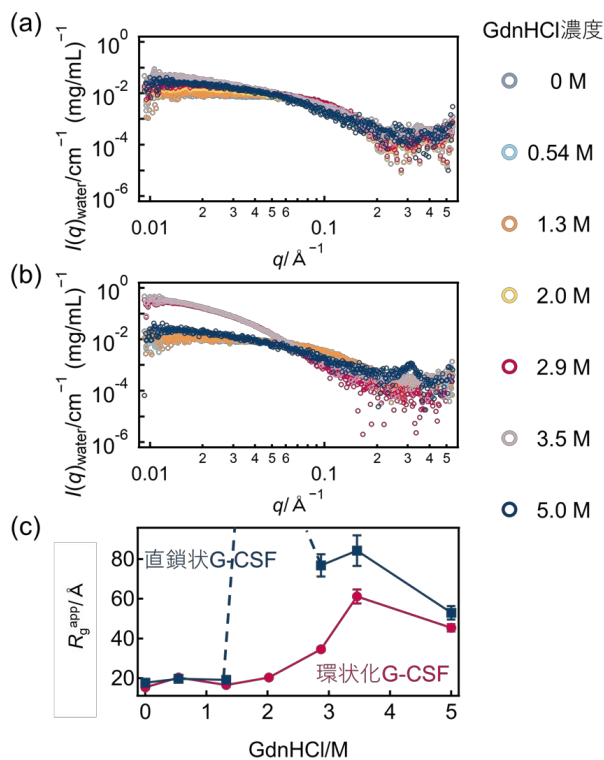


図 2 : SAXS 解析による G-CSF 変異体の凝集抑制評価

(a, b) 環状化 G-CSF および直鎖状 G-CSF の散乱曲線の GdnHCl 濃度依存性。GdnHCl 溶液の電子密度を考慮し、水中相当の散乱強度 ( $I(q)_{\text{water}}$ ) に補正した [4]。 (c)  $R_g^{\text{app}}$  の GdnHCl 濃度依存性。点線は、2.0 M GdnHCl 存在下の直鎖状 G-CSF が測定前の  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターろ過で除去されてしまったため測定できなかったことを示している。

また、超遠心分析を組み合わせた単量体の分子サイズの解析により、以下の 3 点が明らかになった。

- (1) GdnHCl 非存在下では環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF とともに同様の分子サイズの天然構造であった。
- (2) 5 M GdnHCl 存在下ではどちらの G-CSF 変異体も広がった変性構造であった。
- (3) 環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF に比べて、よりコンパクトな変性構造を取っていた。

(1)–(3) から、環状化 G-CSF は変性構造の溶媒への露出が抑えられたため、凝集が抑制されたと考えられる。このことは主鎖環状化により変性構造のコロイド安定性が向上したことを意味する [4]。

## 4 まとめ

G-CSF の主鎖環状化は変性構造をコンパクトにさせ、変性構造由来の凝集を抑えたことが分かった。主鎖環状化を用いた凝集抑制手法は、N 末端と C 末端の近いタンパク質に適用できると考えられる。

超遠心分析と SAXS の組み合わせにより、凝集しやすいタンパク質の間接的なコロイド安定性評価が可能である。

## 参考文献

- [1] T. Miyafusa *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **12**, 10 (2017).
- [2] R. Shibuya *et al.*, *FEBS J.* **287**, 8 (2020)
- [3] J. Ilavsky, *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 324 (2012)
- [4] R. Shibuya *et al.*, *Int. J. Pharm.* **605**, 10 (2021).

\* s.honda@aist.go.jp