

## 改変型 G-CSF の構造解析 Structural analysis of the modified G-CSF

宮房孝光<sup>1</sup>、本田真也<sup>1,\*</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

Takamitsu Miyafusa<sup>1</sup>, Shinya Honda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, 305-8561, Japan

### 1 はじめに

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; G-CSF) は、顆粒球産出の促進や好中球の機能を高めるサイトカインである。G-CSF を有効成分とするバイオ医薬品は、癌化学療法に伴う発熱性好中球減少症などの治療に広く利用されている。しかし、G-CSF は代謝半減期が 4 時間程度と短く、不安定であることが課題である。G-CSF の安定性向上を目指した研究開発は盛んに進められており、現在までに、N 末端領域の配列を改変したナルトグラスチム、PEG 化改変体であるペグフィルグラスチムなどが製造承認されている。

我々は、上記の改変手法とは異なる戦略に基づき安定性向上改変体の構築に取り組み、改変体の合成、精製、*ex vivo* 安定性評価に成功している。本申請では、改変体の合理的な最適化を進めるための情報基盤として、X 線結晶構造解析によって改変型 G-CSF の立体構造モデルを構築することを目指した。

現在までに、改変型 G-CSF の結晶化に成功し、BL-5A において X 線回折実験を実施した。分解能 3.2 Å の回折データを収集し、分子置換法による位相決定に取り組んでいる。本レポートにおいては、結晶化及び回折実験結果について報告する。

### 2 実験

改変型 G-CSF の発現にはベクターとして pET16b を、宿主として大腸菌 BL-21(DE3) 株を用いた。IPTG によって発現誘導後 2 時間培養した菌体を超音波破碎し、不溶性画分からの巻戻しを経て、目的タンパク質を回収した。精製には、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーを用いた。精製度の確認には、SDS-PAGE を実施した。精製した改変型 G-CSF は 10 mM Tris-HCl (pH 8.0, 298 K) に透析し、3.2 mg/ml まで濃縮した後、結晶化実験に使用した。

結晶化は、Crystal Screen (HAMPTON RESEARCH) などを用いたスクリーニングの後、条件の最適化を進めた。200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、100 mM Tris-HCl (pH 8.4)、20% (w/v) PEG 4000 を母液とした条件において、単結晶を得ることに成功した(図 1)。ビームラインにおいて、30% (w/v) グリセロールを含む母液にソーキングした後、X 線回折実験に供した。X 線回折実験は BL-5A で実施した。

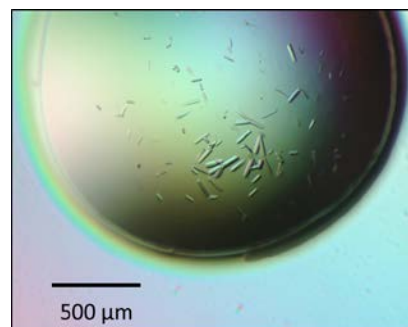


図 1 : 改変型 G-CSF の結晶写真

### 3 結果および考察

X 線回折データは、ビームラインの HKL2000 を用いて処理した(表 1)。分子置換には、サーチモデルとして PDB code ; 1BGC を使い、Phaser 及び molrep を使って位相決定を試みた。現在までのところ有効な解は得られていない。サーチモデルの選択など分子置換に関する検討に加えて、より高分解能のデータ取得に向けて結晶化条件の検討を進めている。

表 1: X 線回折データ

Beamline	BL-5A
Space group	I222
Unit cell Parameters (Å)	$a = 73.2$
	$b = 95.9$
	$c = 151.9$
(°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90.0$
Resolution	50.0-3.2 (3.26-3.20)
Rmerge(%)	12.8 (52.1)
Completeness (%)	99.1 (99.8)
Multiplicity	8.8 (9.0)
Average I/σ	32.5 (4.5)

### 4 まとめ

改変型 G-CSF の結晶化に成功し、分解能 3.2 Å のデータ取得に成功した。今後、更なる条件検討を進めて立体構造を解析し、改変型 G-CSF の最適化へと応用したい。

\*s.honda@aist.go.jp