

博士論文

主鎖環状化末端のデザインが  
蛋白質に与える安定化効果の解明

渋谷 理紗



## 略語

略語	正式名称
ASA	accessible surface area
$\langle \lambda \rangle$	average emission wavelength
CD	circular dichroism
$C_M$	concentration at transition midpoint
$\Delta \Delta G$	difference in Gibbs free energy change between the two variants
$K$	equilibrium constant of the structural transition
$F(\lambda)$	fluorescence intensity at $\lambda$
$\lambda$	fluorescent wavelength
$F$	folded state
$f$	fraction
$\Delta G$	Gibbs free energy change
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GdnHCl	guanidine hydrochloride
$I$	intermediate state
MD	molecular dynamics
$m$	$m$ -value
PDB	Protein Data Bank
$Q$	relative ratio of the integrated fluorescence intensity
RMSD	root mean squared deviation
SAXS	small-angle x-ray scattering
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPR	surface plasmon resonance
$U$	unfolded state

## 目次

第 1 章 序論.....	1
1. 蛋白質医薬品について .....	1
2. 蛋白質の安定性について .....	1
3. 主鎖環状化について .....	2
4. 主鎖環状化に用いた酵素インテインについて .....	2
5. 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) について .....	3
5-1. G-CSF の機能 .....	3
5-2. G-CSF の構造 .....	4
5-3. G-CSF の安定性 .....	4
6. 環状化 G-CSF のデザインについて .....	5
7. 本論文の研究目的と論文構成について .....	15
第 2 章 環状化 G-CSF の作製と構造評価.....	16
1. 方法.....	16
1-1. プラスミド作製.....	16
1-2. 蛋白質発現 .....	21

1-3. 蛋白質精製 .....	21
1-4. 作製した G-CSF の構造と機能の評価 .....	22
2. 結果.....	27
2-1. G-CSF の発現と精製後の産物確認.....	27
2-2. 表面プラズモン共鳴 (SPR)による G-CSF 受容体結合活性測定 .....	30
2-3. 環状化 G-CSF の天然構造と変性構造の評価.....	32
第 3 章 構造安定性の評価.....	45
1. 方法.....	45
1-1. 円偏光二色性 (CD) による熱変性実験.....	45
1-2. 蛍光測定による化学変性実験.....	45
1-3. 三状態遷移モデルを使った平衡論解析.....	46
1-4. 三状態遷移モデルの解析に使用した条件の仮定 .....	48
1-5. 二状態遷移モデルを使った平衡論解析と条件の仮定.....	48
2. 結果.....	50
2-1. 熱変性実験 .....	50
2-2. 化学変性実験.....	51

2-3. 熱力学的安定性の解析 .....	52
第 4 章 凝集性の評価.....	56
1. 方法.....	56
1-1. 円偏光二色性 (CD) による耐熱性試験 .....	56
1-2. 長期凝集性試験.....	56
1-3. X 線小角散乱測定 .....	56
1-4. X 線小角散乱解析 .....	57
2. 結果.....	58
2-1. 熱耐性実験 .....	58
2-2. 長期凝集性試験.....	61
2-3. SAXS 解析 .....	61
第 5 章 安定化に寄与した因子の評価.....	66
1. 方法.....	66
1-1. 分子動力学シミュレーション .....	66
1-2. 分子内相互作用計算 .....	66
1-3. エネルギー計算.....	67

2. 結果.....	68
2-1. 分子内水素結合 .....	68
2-2. エネルギー計算 .....	72
第 6 章 デザインの評価.....	76
1. C166 局所構造の $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$ .....	76
2. C166 局所構造の分子内水素結合 .....	81
3. C166 のターン構造 .....	82
第 7 章 考察 .....	83
1. 環状化による構造安定性の改善.....	83
2. 分子内水素結合の増大によるエンタルピー効果.....	83
3. 環状化蛋白質と直鎖状蛋白質の変性構造の水和状態の比較 .....	86
4. 凝集性の改善 .....	86
5. 多段階のアプローチに基づく蛋白質デザインの可能性 .....	88
6. 治療薬としての主鎖環状化蛋白質.....	89
第 8 章 総括 .....	91
参考文献.....	92
謝辞.....	99

## 第1章 序論

### 1. 蛋白質医薬品について

蛋白質はアミノ酸がペプチド結合で連なってできた生体高分子である。蛋白質は生体内で様々な役割を持って作用する。低分子では代替できないような高い反応の特異性と活性を持つため、蛋白質を治療薬に応用するための蛋白質工学に関心が高まっている[1-3]。細胞培養技術などを利用して作られる蛋白質を主成分とする医薬品は、バイオ医薬品と総称される。

しかし、低分子と比較して、蛋白質は分解しやすく、また凝集しやすいという傾向がある[4]。さらに、バイオ医薬品は、製造や輸送、保管の過程で攪拌、加熱、低 pH などの様々な物理的または化学的ストレスにさらされる。これらのストレスは蛋白質の変性、ミスフォールディングや凝集を導く[5]。非天然構造を含む蛋白質医薬品は天然構造より機能が低いと考えられているため、保管安定性や生体内安定性低下、および免疫原性の恐れを招く[6,7]。よって、効果的で安全な治療薬を開発するために、蛋白質の安定性の改善が重要である[5,8]。

### 2. 蛋白質の安定性について

ここでは、一定の立体構造を持った状態で生体内に作用する蛋白質について記述する。蛋白質の天然構造はペプチド結合とジスルフィド結合からなる共有結合と、疎水性相互作用、水素結合、静電相互作用をはじめとする非共有結合によって維持されている。蛋白質が天然構造と変性構造の二つのみの状態（二状態遷移）をとる場合、蛋白質溶液中では天然構造と変性構造の間で平衡状態が存在し、天然構造と変性構造の間には自由エネルギー差（ $\Delta G$ ）が存在する。 $\Delta G$ の大きさは、蛋白質の構造安定性を議論するための指標になる。

$\Delta G$ は $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ とあらわされる。ここで、 $\Delta H$ は天然構造と変性構造のエンタルピー差であり、蛋白質の天然構造で形成されている非共有結合に由来する。 $\Delta S$ は天然構造と変性構造のエントロピー差を表す。変性構造は天然構造に比べてエントロピーが大きく、このエントロピー増大が蛋白質の天然構造を不安定化させる。よって、蛋白質の天然構造を非共有結合によって安定化させ、変性構造のエントロピーを安定化させることができれば $\Delta G$ が増大、すなわち蛋白質を安定化させることができる。しかし、これらは簡単とは言えない。一般に、蛋白質の $\Delta G$ は数十 kJ/mol である[9]。これは水素結合数個分のぎりぎりの安定性で維持されていることを意味する。蛋白質の天然構造は有益な相互作用と不利益な相互作用のバランスの上で成り立っており、蛋白質構造と安定化に対する理解を一層難しくしている。

蛋白質の構造安定性は、凝集しやすさに関与する。変性などによって蛋白質自身が持つ Aggregation Prone Regions (APR) (蛋白質内部に埋もれていた疎水性領域) が露出する



と、APR を介した蛋白質間の凝集が起きる[10]。さらに、凝集は蛋白質の天然状態および蛋白質の溶解限界濃度より下の濃度においても起こり得る[11,12]。また、自身の蛋白質表面の形状や電荷等、または溶媒の pH、塩濃度、温度によって分散のしやすさが変化する。分散しやすさはコロイド安定性と表現される。コロイド安定性が高いほど分子間斥力が大きく、溶解度が高いことを示す。

これらの蛋白質の安定性や凝集への理解、およびこれらを制御できるようなデザイン手法が求められている。

### 3. 主鎖環状化について

蛋白質構造を安定化させるデザインには様々な手法がある。例えば、疎水性コアの増大[13]、親水性表面の増大[14]、親水性のタグの付加、ジスルフィド結合の導入[15]などがあげられる。実際に、アミノ酸や糖鎖の改変、またはポリエチレングリコールや別の蛋白質を融合させた改変型のバイオ医薬品が開発され、臨床に利用されている[16]。蛋白質改変体を治療薬に応用する場合には、生物学的活性の変化や免疫原性の恐れがないか、注意深く試験する必要がある。

蛋白質の N 末端と C 末端が近い場合、主鎖環状化が蛋白質の安定性を上げる手法として有効である [17–21]。一般的に、主鎖環状化は変性状態の蛋白質の鎖エントロピーが減少し、天然状態と変性状態の間の自由エネルギー差が増大するために安定化すると考えられている [18,22]。主鎖環状化は蛋白質の配列を最小限の改変に抑えられるので、従来の構造や機能に影響を与えることなく蛋白質を安定化できると推測される。しかし、主鎖環状化を用いた蛋白質構造の合理的デザインは完全に確立されていない。N 末端と C 末端を結合することは新しいループやターンをデザインすることとみなされる。ループやターンの三次構造は多様であり  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートと異なるため、蛋白質の安定化のためのロバストなデザインは未だ困難である。実際に、主鎖環状化は必ずしも構造安定性をもたらすとは限らない。たとえば、Schumann らは溶液 NMR を用いた主鎖環状化 N-terminal Src homology 3 (SH3) の天然構造とダイナミクスを調べている[23]。環状化 SH3 の天然構造は直鎖状 SH3 の天然構造と概ね同様であり、環状化末端を含む主鎖のフレキシビリティはサブナノ秒スケールで制限されていた [23]。しかし、天然状態の主鎖のひずみと必須残基を置換したことによって、環状化 SH3 の熱力学的安定性は改善しなかった [23,24]。より信頼性が高く効果的なデザインを行うには、主鎖環状化が蛋白質に与える影響をより詳細に理解する必要がある。

### 4. 主鎖環状化に用いた酵素インテインについて

一般的な環状化の手法として、ソルターゼなどの酵素を用いる方法、化学試薬を用いる方法、ジスルフィド結合を導入する方法がある。これらのうち、ソルターゼは酵素の認識配列を 5 アミノ酸付加する必要がある。また、化学試薬を用いる方法では、試薬を除く精

製工程を増やしてしまう。ジスルフィド結合を導入する方法についても、ジスルフィド結合を介して凝集しやすい蛋白質にとって、システインを増やすことは適切ではない。対して、インテインは最低1アミノ酸の付加のみで主鎖環状化が可能である。インテインは自己スプライシングを行う酵素で、細胞内で自発的に反応が進行して目的配列（エクステイン）を結合させる。

インテインは機能の面からNインテインとCインテインに分けることができる。一部のインテインは異なるスプリットインテインとして分かれて存在する。本研究では、スプリットインテインを目的配列（エクステイン）の両端に置き、環状化させるSICLOPPS法を利用した[18]。まず、エクステインを挟むように位置するNインテインとCインテインが、相互作用により会合する（Figure 1-1 ①）。次に、目的ペプチドのC末端側のシステインとNインテインのN末端の主鎖のNでN-Sアシルシフトを起こし、チオエステル結合が形成する（Figure 1-1 ②）。形成されたチオエステル結合のカルボニル基に目的ペプチドのN末端側のアミノ酸側鎖（S or O原子）が求核攻撃し、ラリアット構造を形成する（Figure 1-1 ③）。目的ペプチドのN末端側にあるアスパラギンが遊離してインテインが離れ、目的配列はラクトン構造を取る。ラクトン構造は環状ペプチドと平衡状態を取る（Figure 1-1 ④）。

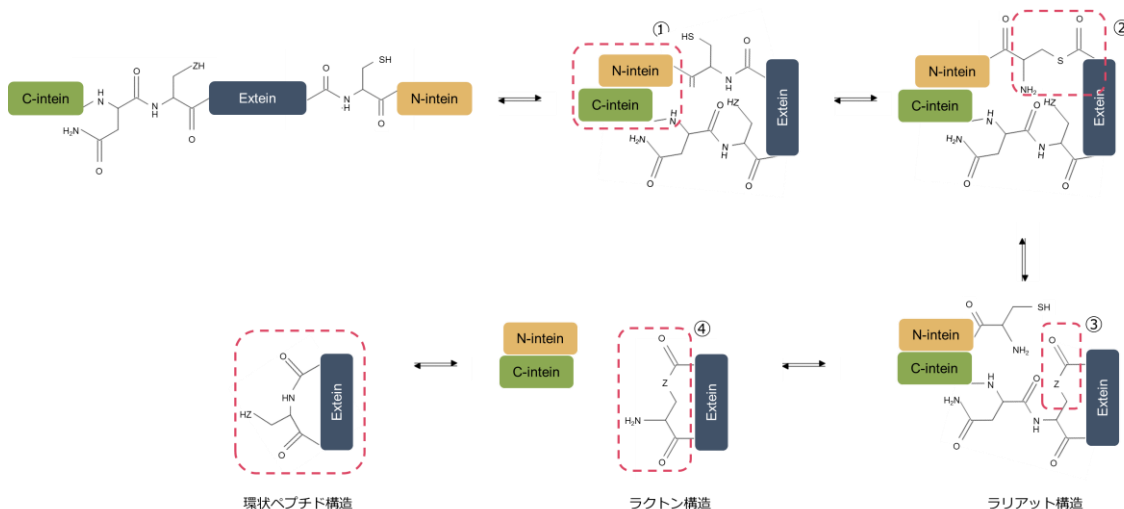


Figure 1-1. インテインを用いた蛋白質の環状化反応 反応により変化のある個所を赤線で囲み、インテインの反応に関わるアミノ酸は構造式で示した。

## 5. 顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）について

主鎖環状化の対象蛋白質として、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を選択した。

### 5-1. G-CSF の機能

G-CSF はサイトカインの一種であり、生体内で好中球量を維持する役割を担う [25]。G-CSF は G-CSF 受容体に結合して JAK/STAT 経路、Ras/ERK 経路を活性化する。これらの

シグナルカスケードによって、好中球の分化、増殖が促進される。組換え G-CSF は好中球減少症の治療薬として広く使われている [26,27]。

## 5-2. G-CSF の構造

野生型 G-CSF は計 175 アミノ酸からなり、4 本のヘリックスを有する 4-ヘリックスバンドル構造である (Figure 1-2) [28]。G-CSF は G-CSF 受容体と結合し、G-CSF と G-CSF 受容体の複合体が二量体を形成する [29]。G-CSF の受容体結合部位は大きく分けて二か所ある。Lys16, Glu19, Glu20, Arg22, Lys23, Leu108, Asp109, Asp112 と、Phe144, Arg147, Tyr39, Leu41, Glu46, Val48, Leu49, Ser53 である (Figure 1-2 緑色) [29]。

## 5-3. G-CSF の安定性

G-CSF は構造安定性およびコロイド安定性が低いことが分かっている [30]。このことが、組換え G-CSF 製剤の生体内不安定性の要因の一つになっていると考えられている。より安定性の高い G-CSF の開発が試みられているが [31,32]、商用利用に至った例はない。よって、G-CSF の安定性向上が課題となっている。G-CSF は N 末端と C 末端が近接しており、かつ末端が G-CSF 受容体結合部位と離れているため、主鎖環状化に適している構造である。また、主鎖環状化にインティンを用いることは、G-CSF の特性に適している。野生型の G-CSF は 17 残基目にフリーのシステインを一つ持つ。G-CSF はシステインにより不可逆な凝集が起きることが分かっている [33]。Cys37 は本来 Cys47 とジスルフィド結合を組むが、25%がフリーのシステインとして存在し、S-S スクランプリングが起きているという報告もある [34]。そこで、主鎖環状化を用いた G-CSF の構造安定性とコロイド安定性の向上を目指した。



Figure 1-2. G-CSF の構造 緑色は G-CSF 受容体結合部位を示す。図中の N と C はそれぞれ N 末端と C 末端を表す。

## 6. 環状化 G-CSF のデザインについて

当研究室では、適切な環状化末端の長さ（アミノ酸数）を特定することが主鎖環状化蛋白質の安定化に効果的であると考え、蛋白質構造データバンク（PDB）に登録されているヘリックス-ターン-ヘリックス構造の統計解析を行っていた（Figure 1-3）。具体的には以下の方法で解析が行われた。まず、78545 個のヘリックス-ターン-ヘリックス構造を蛋白質構造データバンク（PDB）（2015 年 12 月 3 日）からデータセットを抽出した。抽出したヘリックス-ターン-ヘリックス構造のヘリックス領域とヒト G-CSF（PDB code: 2D9Q; chain A; Leu169-Leu172 と Gln12-Leu15）の末端のヘリックス領域間の  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を計算した。ヒト G-CSF のヘリックス領域と類似（ $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha} \leq 1 \text{ \AA}$ ）したヘリックス-ターン-ヘリックス構造が 57 個（Table 1-1）抽出された。次に、ターンの長さ、すなわちターン領域のアミノ酸残基数を調べた。ターンの長さには偏りが見られた。ターンの長さは 2-10 残基の範囲に分布していた。特に、5, 2, 9 アミノ酸のターンの順番に多く存在することがわかった。

本研究はその解析結果を受けて、これらのアミノ酸のターンを G-CSF のターン領域に適用することが、安定性の高い環状化 G-CSF のデザインを実現できると推測した。よって、2, 5, 9 アミノ酸のターンを環状化 G-CSF に適用した（Figure 1-4）。ターンの長さは、ヒト野生型 G-CSF の長い N 末端を切断することによって調節した。異なる長さのセグメント（コネクター）を持つ複数の環状化 G-CSF を作製し、コネクター長が蛋白質の安定性に与える影響を調べた。2, 5, 9 アミノ酸のターンを持つ環状化 G-CSF は C163、C166、C170 と名付けた。末端を調節していない 16 アミノ酸のターンを持つ環状化 G-CSF は C177 とした。これらの環状化 G-CSF を本研究に使用した。

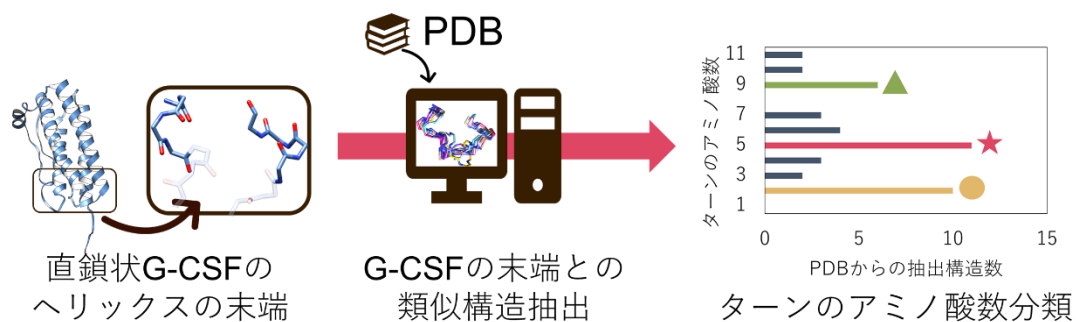


Figure 1-3. G-CSF と類似した末端を持つ構造の抽出と、ターンのアミノ酸数の統計解析

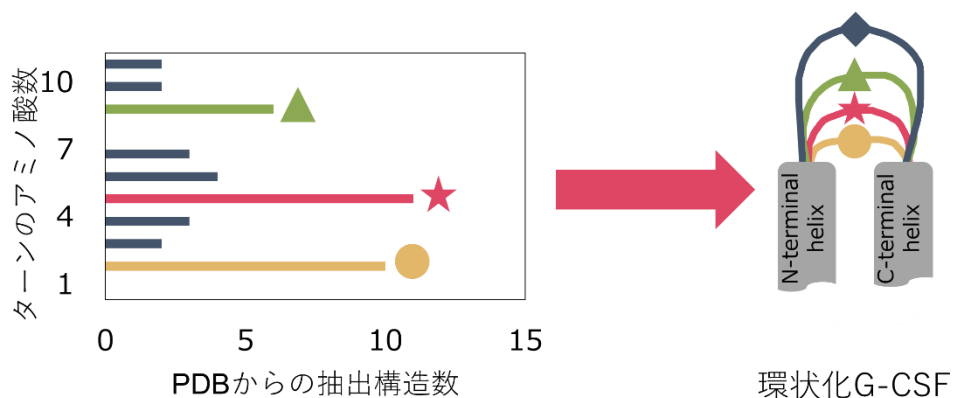


Figure 1-4. ターンの統計解析結果と環状化末端のデザイン ●は2アミノ酸のターン、★は5アミノ酸のターン、▲は9アミノ酸のターン、◆は長さを調節せずに環状化した16アミノ酸のターンを表す。

Table 1-1. PDB から抽出したヘリックス-ターン-ヘリックス構造

PDB id	chain	length	from	to	RMSD (Å)	Resolution (Å)	Uniprot ID	Protein name	sequence
1AXN	A	2	233	234	0.918	1.78	P12429	annexin III (shows differences with annexin V)	IKGE LS GHFE
1AXN	A	2	77	78	0.929	1.78	P12429	annexin III (shows differences with annexin V)	LKGD LS GHFE
1DM5	F	2	302	303	0.947	1.93	P26256	annexin VII E105K homohexamer	IADD CS GDYK
2IE7	A	2	302	303	0.952	1.75	P14668	annexin V under 2.0 M Pa pressure of nitrous oxide	IKGD TS GDYK
1W3W	A	2	311	312	0.956	1.99	P13928	annexin A8	IMED TS GDYK
1DM5	C	2	302	303	0.963	1.93	P26256	annexin VII E105K homohexamer	IADD CS GDYK
1YII	A	2	73	74	0.975	1.42	P17153	annexin V in complex with Ca <sup>2+</sup> (chicken annexin)	LKSE LT GKFE

2IE7	A	2	71	72	0.978	1.75	P14668	annexin V under 2.0 M Pa pressure	MKSE	LT	GKFE
								of nitrous oxide			
1DM5	C	2	71	72	0.979	1.93	P26256	annexin VII E105K homohexamer	LKSE	LS	GNYE
1DM5	E	2	71	72	0.980	1.93	P26256	annexin VII E105K homohexamer	LKSE	LS	GNYE
1AXN	A	2	308	309	0.988	1.78	P12429	annexin III (shows differences with annexin V)	IKSD	TS	GDYE
1YII	A	2	304	305	0.988	1.42	P17153	annexin V in complex with Ca <sup>2+</sup> (chicken annexin)	IQKD	TS	GDYR
1AVC	A	2	493	494	0.999	2.90	P79134	annexin VI (bovine, calcium-bound)	LSSD	TS	GHFK
4ADY	B	3	197	199	0.960	2.70	P32565	26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT RPN2	AITT	VTN	SKFR
4ADY	A	3	197	199	0.973	2.70	P32565	26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT RPN2	AITT	VTN	SKFR
3HV0	B	3	524	526	0.998	2.42	Q5CYP8	Tryptophanyl-tRNA synthetase from	LRFL	MED	DEKL

								Cryptosporidium parvum			
3U1F	A	4	714	717	0.917	2.20	Q38C91	Methionyl-tRNA synthetase	TLLL	SPIL	PRKS
3UG7	D	4	111	114	0.938	2.90	Q58542	arsenical pump-driving ATPase	LKAQ	IEEN	PFLG
2X1L	B	4	466	469	0.977	2.30	A0R3E2	METHIONYL-TRNA SYNTHETASE	SLLL	QPVM	PEST
3CAX	A	5	224	228	0.668	2.43	Q8U2Y3	uncharacterized protein PF0695	LLRK	REEMP	WEEF
3HVE	A	5	129	133	0.745	2.80	Q9H2C0	SPOP-substrate complex	LEGC	IAAEN	CIGI
4NBO	B	5	126	130	0.772	2.81	Q9HD15	human steroid receptor RNA activator protein carboxy-terminal domain	LEDC	RGHTR	KQVC
3C3W	A	5	122	126	0.783	2.20	P9WMF9	Mycobacterium tuberculosis hypoxic response regulator DosR	VGAG	RSLLD	NRAA
1WU7	B	5	190	194	0.799	2.40	Q9HLX5	histidyl-tRNA synthetase from	IIDR	YHKIS	REEF



								thermoplasma			
								acidophilum			
								histidyl-tRNA			
1WU7	A	5	190	194	0.852	2.40	Q9HLX6	synthetase from thermoplasma	IIDR	YHKIS	REEF
								acidophilum			
2QX5	A	5	821	825	0.861	2.50	P34077	nucleoporin Nic96	AGMI	QYRMP	RETY
2QX5	B	5	821	825	0.884	2.50	P34078	nucleoporin Nic97	AGMI	QYRMP	RETY
								uncharacterized			
3E0S	A	5	270	274	0.928	2.09	Q8KE09	protein from Chlorobium tepidum	LRLL	NGVFD	PEKT
								methionyl-tRNA			
1RQG	A	5	561	565	0.951	2.90	Q9V011	synthetase from Pyrococcus abyssi	ILNY	MAKGN	PEGA
								beta-lactam			
1JGT	A	5	431	435	0.960	1.95	P0DJQ7	synthetase	RAAM	ADALP	AETV
								enoyl-CoA			
								hydratase/isomeras			
4K3W	C	5	228	232	0.988	2.31	A1U4G2	e from Marinobacter	LLHR	VGHEA	MAGL
								aquaeolei			
4K3W	B	5	228	232	0.992	2.31	A1U4G3	enoyl-CoA hydratase/isomeras	LLHR	VGHEA	MAGL

1JGT	B	5	431	435	0.993	1.95	P0DJQ7	e from Marinobacter aquaeolei beta-lactam synthetase	RAAM	ADALP	AETV
3P0K	A	5	127	131	0.996	1.47	P41480	Baculovirus sulfhydryl oxidase Ac92	MVYT	RDKSS	LDFV
3QTM	A	6	159	164	0.757	2.15	Q9USJ7	Uncharacterized protein C4B3.07	AQLG	LDAPGN	ESRL
3MSV	B	6	159	164	0.774	2.18	Q9USJ7	Nuclear import adaptor, Nro1	AQLG	LDAPGN	ESRL
3QTM	B	6	159	164	0.782	2.15	Q9USJ7	Uncharacterized protein C4B3.07	AQLG	LDAPGN	ESRL
2R5U	A	6	146	151	0.896	1.90	P9WMR3	Replicative DNA helicase	YGYA	GAEGAD	VAEV
4IFP	A	6	397	402	0.909	1.99	Q9C000	NACHT, LRR and PYD domains- containing protein 1	LDKL	HGQVLS	QEQY
4IFP	B	6	397	402	0.911	1.99	Q9C000	NACHT, LRR and PYD domains- containing protein 1	LDKL	HGQVLS	QEQY

4JYK	A	6	84	89	0.971	1.70	P0ACU2	HTH-type transcriptional regulator RutR	PLKA	FREDFA	PLAA
3CQY	B	7	51	57	0.877	2.30	Q8EHB5	Anhydro-N- acetylmuramic acid kinase	GLQR	LCLPGTD	EINR
4MO4	A	7	48	54	0.899	1.67	Q9I5Q5	Anhydro-N- acetylmuramic acid kinase	DILA	LCVPGPD	EIAR
4MO4	B	7	48	54	0.918	1.67	Q9I5Q5	Anhydro-N- acetylmuramic acid kinase	DILA	LCVPGPD	EIAR
3QKC	B	7	127	133	0.940	2.20	Q6QLV2	Geranyl diphosphate synthase small subunit	MARS	MDPTRNN	PDRI
4EWC	A	9	352	360	0.492	2.70	Q8V3T7	the infectious salmon anemia virus nucleoprotein	LTSA	LKISDGENK	FQRI
4JZA	B	9	515	523	0.565	2.58	D3HMN4	Legionella phosphoinositide phosphatase	VLES	ALGTATIFD	YAGR

4JZA	A	9	515	523	0.572	2.58	D3HMN4	Legionella phosphoinositide phosphatase	VLES	ALGTATIFD	YAGR
1M0K	A	9	192	200	0.761	1.43	P02945	bacteriorhodopsin K intermediate	VWLI	GSEGAGIVP	LNIE
3QBG	A	9	232	240	0.824	1.80	P15647	anion-free blue form of pharaonis	VWAL	GVEGVAVLP	VGYT
2EI4	A	9	197	205	0.827	2.10	P29563	halorhodopsin trimeric complex of archaerhodopsin-2	LWIV	GTEGAGVVG	LGIE
3QBG	B	9	232	240	0.837	1.80	P15647	anion-free blue form of pharaonis	VWAL	GVEGVAVLP	VGYT
3QBG	D	9	232	240	0.853	1.80	P15647	halorhodopsin anion-free blue form of pharaonis	VWAL	GVEGVAVLP	VGYT
3UG9	A	9	272	280	0.962	2.30	Q8RUT8	halorhodopsin closed state of channelrhodopsin	LFIL	GPEGFGVLS	VYGS
2JAF	A	10	217	226	0.865	1.70	B0R2U4	HALORHODOPSIN	VWAV	GVEGLALVQS	VGAT
1KPL	D	10	68	77	0.991	3.00	Q8ZRP8	putative CIC family, chlorine transport protein	RIGA	LVQVADHAFL	LWPL

1KPL	B	10	68	77	0.991	3.00	Q8ZRP8	putative ClC family, chlorine transport protein	RIGA	LVQVADHAFL	LWPL
------	---	----	----	----	-------	------	--------	---	------	------------	------

---

PDB は 2015 年 12 月 3 日のデータセットを使用した。length はアミノ酸数、sequence は抽出したヘリックス-ターン-ヘリックスのアミノ酸配列を示し、左からそれぞれヘリックス（ヒト G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A)の C 末端側のヘリックス Leu169–Leu172 との  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を計算した配列）、ターン（アミノ酸数を分類した配列）、ヘリックス（ヒト G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A)の N 末端側のヘリックス Gln12–Leu15 との  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を計算した配列）の配列を示す。

## 7. 本論文の研究目的と論文構成について

本博士論文は、以下の3つの目的の達成のために行った。

I. G-CSF の生体内安定性および保管安定性の向上を目指して、G-CSF の構造安定性とコロイド安定性を向上させることを目的とした。本論文では G-CSF を主鎖環状化させることにより、構造安定性とコロイド安定性の向上を目指した。第2章では、G-CSF の安定化に適した環状化末端の長さがあると推測し、4種の環状化 G-CSF を作製した。作製した G-CSF は精製後、質量分析、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)、結晶構造解析、超遠心分析を用いて、天然構造と変性構造を評価した。

第3章では、第2章で作製した主鎖環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF (L175) の構造安定性を評価した。熱変性実験および変性剤変性実験を用いて、溶液中における構造安定性を比較した。

第4章では、C166 と L175 を中心に、G-CSF 間の凝集性を比較した。CD およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた熱に対する凝集性、および X 線小角散乱を用いた変性剤による凝集性を定性的に評価することによって、変性構造のコロイド安定性の違いについて議論した。

II. 安定化蛋白質の合理的設計戦略の確立に向けて、主鎖環状化が蛋白質に与える安定化効果の解明を目的とした。本論文の第5章において、最も構造安定化した主鎖環状化 G-CSF (C166) およびヒト野生型 G-CSF の結晶構造の分子内水素結合数と位置を比較した。また、C166 と L175 の分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、平衡状態における天然構造の構造安定性と構造安定化に寄与した因子を調べた。

III. 安定化蛋白質の合理的設計戦略の確立に向けて、作製した環状化 G-CSF のデザイン手法の検証を目的とした。本論文の第6章では、デザインした G-CSF 構造と G-CSF のデザインに使用したテンプレート構造の主鎖環状化末端及び分子内水素結合を比較することによって、デザイン手法の検証を行った。検証には、主鎖環状化末端のターンの  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$ 、水素結合の形成位置と形成頻度、ターン構造の比較を行った。この検証は、未だに困難であるターン構造のデザイン手法確立の実現へ向けた第一歩となると考えられる。

第7章では、上記3つの研究目標と第2章～第6章の結果を踏まえて考察を行った。

第8章では、第2章～第6章の結果と第7章の考察の総括を行った。

## 第2章 環状化 G-CSF の作製と構造評価

本章では、G-CSF を安定化させることを目標として、主鎖環状化 G-CSF の作製を行った。G-CSF の安定化に適したコネクターの長さがあると推測し、コネクターの長さの異なる 4 種の環状化 G-CSF を作製した。作製した G-CSF は精製後、質量分析、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)、結晶構造解析、超遠心分析を用いて、天然構造と変性構造を評価した。環状化 G-CSF は、直鎖状 G-CSF と同様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。一方、環状化 G-CSF の変性構造は、直鎖状 G-CSF に比べてコンパクトな構造であった。このコンパクトな変性構造が変性構造のエントロピー差を大きくし、 $\Delta G$  を増大させていると考えられる。

### 1. 方法

#### 1-1. プラスミド作製

本論文では、直鎖状 G-CSF と環状化 G-CSF 4 種を使用した。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 に置換した蛋白質を直鎖状 G-CSF (L175) とした。L175 をコードする遺伝子は、大腸菌合成に最適なコドンに改良し、化学合成した G-CSF をコードする遺伝子 (TAKARA) を購入し、PCR で増幅させた。

環状化 G-CSF をコードする遺伝子は、L175 をコードする遺伝子を鋳型として、ヘリックスを結合する非構造領域が 2, 5, 9, 16 アミノ酸となるように調節したプライマー (Table 2-1) を使用して増幅させた。作製した変異体にはインテインに必要な末端および NheI と NdeI の制限酵素部位を入れ、研究室保有の *Nostoc punctiforme* 由来インテインベクターに挿入した (Figure 2-1)。インテインのアミノ酸配列を Table 2-2 に示す。

インテインの反応には N 末端または C 末端のどちらか一方にセリンまたはシステインを付加する必要がある。当研究室による 2 アミノ酸で結合した環状化 G-CSF (C163) のデザインにおいて、N 末端にセリン、C 末端にグリシンを付加した場合に最も自由エネルギーが低いことが計算で示されていた。そのため、今回作製した変異体の末端にも上記のアミノ酸を採用した。

プラスミド作製後、シーケンサー (ABI3500) を用いて適切な配列であることを確認した。

変異体の名称は、それぞれの環状化 G-CSF を構成するアミノ酸の数をもとに、2 アミノ酸のコネクターを持つ計 163 アミノ酸の環状化 G-CSF を C163 (circularized G-CSF with 163 amino acid residues)、5 アミノ酸のコネクターを持つ計 166 アミノ酸の環状化 G-CSF を C166 (circularized G-CSF with 166 amino acid residues)、9 アミノ酸のコネクターを持つ計 170 アミノ酸の環状化 G-CSF を C170 (circularized G-CSF with 170 amino acid residues)、コネクターを調節していない、16 アミノ酸のコネクターを持つ計 177

アミノ酸の環状化 G-CSF を C177 (circularized G-CSF with 177 amino acid residues) とした。作製した環状化 G-CSF、L175、ヒトおよびウシ野生型 G-CSF のアミノ酸配列を以下に示した (Figure 2-2)。



Table 2-1 変異体作製に使用したプライマーの塩基配列

プライマー名	配列
forward primer for L175	TATACCATGGCACCATTAGGTCCAGCGAGCAGCCTGCCGCAGAGCTTT
back primer for L175	ATGGATCCTTACGGCTGGGCCAGAT
forward primer for C177	AAAGCTAGCAATAGCATGGCACCATTAGGTCCA
back primer for C177	AAAAATTCATATGATAAACAGCCCGGCTGGGCCAGATG
forward primer for C170	AAAGCTAGCAATAGCGGTCCAGCGAGCAGC
back primer for C170	AAAAATTCATATGATAAACAGCCCAGATGACGCAGCACACG
forward primer for C166	AAAGCTAGCAATAGCAGCCTGCCGCAG
back primer for C166	AAAAATTCATATGATAAACAGCCCAGATGACGCAGCACACGATAG
forward primer for C163	AAAAAAGCTAGCAATAGCCAGAGCTTTCTGCTGAAA
back primer for C163	AAAAATTCATATGATAAACAGCCCAGATGACGCAGCAC

下線部は G-CSF の配列を示す。

Table 2-2 スプリットインテインのアミノ酸配列

	配列
C インテイン	MGIKIATRKYLKGKQNVYDIGVERDHNFALKNGFIASN
N インテイン	CLSYETEILTVEYGLLPIGKIVEKRIECTVYSVDNNGNIYTQPVAQ WHDRGEQEVFEYCLEDGSLIRATKDKHKFMTVDGQMLPIDEIFER ELDLMRVDNLPNLEGHHHHH

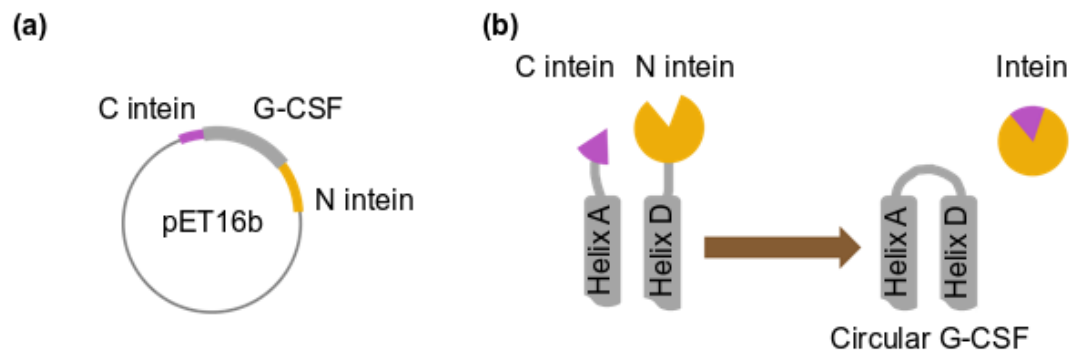


Figure 2-1. スプリットインテイン法を使った主鎖環状化 (a) 環状化 G-CSF のプラスミドマップ。環状化 G-CSF をコードする配列は、スプリット DnaE インテインの入った pET16b 発現ベクターにある NheI と NdeI の制限酵素サイトに挿入することによってクローニングした。(b) スプリットインテインによる主鎖環状化反応。C インテインと N インテインが近づくと、大腸菌の細胞内で G-CSF の N 末端と C 末端でペプチド結合を形成する。

Figures (a) and (b) reprinted with Fig. 2 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

**Circularized G-CSF (C163)** SQSFLLKSLEQVRK  
**Circularized G-CSF (C166)** SSLPQSFLLKSLEQVRK  
**Circularized G-CSF (C170)** SGPASSLPQSFLLKSLEQVRK  
**Circularized G-CSF (C177)** SMAPLGPASSLPQSFLLKSLEQVRK  
**Non circularized (linear) G-CSF (L175)** MAPLGPASSLPQSFLLKSLEQVRK  
**Human G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A)** T**PLG**PASSLPQSFLLK**C**LEQVRK  
**Human G-CSF (PDB code: 1RHG; chain A)** T**PLG**PASSLPQSFLLK**C**LEQVRK  
**Bovine G-CSF (PDB code: 1BGC)** T**PLG**PARSLPQSFLLK**C**LEQVRK

QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGL  
 QADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLRHSLGIPQAPLSSCSQSLQLRGCLNQLHGGLFLYQGL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVL  
 LQALAGISPELAPTLDLQLDVTDFTNWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPFTTSAFQRRAGGVL  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLG  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLG  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLG  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLA**QPG**  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLA**Q**P  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLA**Q**P  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLA**Q**P  
 VASHLQSFLEVSYRVLRLHLA**Q**P  
 VASQLHRFLELAYRGLRYLA**EP**

Figure 2-2. 環状化 G-CSF、直鎖状 G-CSF、ヒトおよびウシ野生型 G-CSF の配列 コネクターまたは末端の変性領域を太字で、低電子密度の領域を青、ヒト G-CSF と L175 のアミノ酸の違いを黄色、ウシ G-CSF と L175 のアミノ酸の違いを桃色で示した。

Figure adapted with Fig. 1 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

## 1-2. 蛋白質発現

発現には、大腸菌 (BL21 (DE3)) を用いた。イソプロピルチオ $\beta$ -D-ガラクトシド IPTG で 3 時間誘導して 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿を回収した。沈殿は、溶解緩衝液 (1% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム (DOC)、25 mU/mL ベンゾナーゼ、1 $\times$  PBS (0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM NaCl)) に溶解した (200 mL 培養液あたり全量 10 mL)。溶解した菌体を 10 分間 (30 秒につき 15 秒静置) 超音波破碎した。破碎後、10000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。G-CSF は大腸菌の不溶性画分に発現するため、沈殿を回収した。

## 1-3. 蛋白質精製

大腸菌破碎後の沈殿は三段階で洗浄した (洗浄緩衝液 1 : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、EDTA (5 mM)、Tween20 (2%)、洗浄緩衝液 2 : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、1% (w/v) DOC、洗浄緩衝液 3 : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、1 M NaCl) (200 mL 培養液あたり 20 mL)。遠心分離後の沈殿をボルテックスで各洗浄溶液に溶解し、10000 $\times$ g で 10 分遠心分離した。洗浄後、沈殿に可溶化緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、6 M 塩酸グアニジン) を入れ、16 時間常温で攪拌して変性させた。

リフォールディングには希釈法を用いた。6 M グアニジン塩酸塩による変性後、10000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上清を濃縮した。濃縮後、10 倍量の巻戻し緩衝液 (100 mM Tris-HCl 緩衝液、2 mM EDTA、400 mM L-アルギニン塩酸塩、0.1 mM 酸化型グルタチオン、1 mM 還元型グルタチオン) に 4 $^{\circ}$ C 下で滴下した。リフォールディング溶液は 4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。攪拌後、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で透析し、カラム精製に用いた。各段階で Millex HV フィルター (MILLIPORE) でろ過をしながら操作を行った。

精製には以下の 3 種のカラムを利用した。

### 1-3-1. HiTrap Q HP カラム陰イオン交換クロマトグラフィー

20 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) カラムに、透析したサンプルをアプライした。30 mL 同緩衝液を流した後、同緩衝液の直線濃度勾配による溶出 (0-500 mM NaCl, 100 mL) を行った。

### 1-3-2. Hiload 16/600 75 pg カラムゲルろ過クロマトグラフィー

HiTrap Q カラム精製で回収した画分を 1 mL または 5 mL に濃縮し、500 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Hiload 16/600 75 pg (GE healthcare) カラムにアプライした。同緩衝液で 120 mL 溶出した。

### 1-3-3. MonoQ 5/50 GL カラム陰イオン交換クロマトグラフィー

20 mM Tris-HCl 緩衝液で一晩透析後、蛋白質量が 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように調節した。蛋白質溶液 1 mL を 25 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した MonoQ 5/50 GL (GE healthcare) カラムにアプライし、緩衝液中の NaCl の直線濃度勾配 (25–60 mM NaCl, 30mL) による溶出を行った。これにより副生成物を除去した。

精製画分は SDS-PAGE で純度を確認後、透析チューブ (Snake skin dialysis tubing (Molecular weight cutoff 7000) (Thermo scientific)) を用いて 1×PBS に透析し、実験に使用した。

### 1-4. 作製した G-CSF の構造と機能の評価

#### 1-4-1. 純度検定と環状化効率 (SDS-PAGE) の算出

200 ng 相当の蛋白質溶液、サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8)、25% グリセロール、0.01% ブロモフェノールブルー (Bromophenol blue; BPB)、2% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS)、2-メルカプトエタノールを含む全量 10  $\mu\text{L}$  の泳動サンプルおよび 0.2  $\mu\text{L}$  分子量マーカー (Bio-Rad SDS-PAGE Standards broad range) を、90°C で 5 分間加熱した。加熱後、サンプルを冷ましてから 4-20% precast gel (Bio-Rad) にアプライし、泳動バッファー (Tris 0.6 g、Glycine 2.88 g、SDS 0.2 g / 200 mL) 中で 200 mA, 400 V で 30 分間泳動した。泳動後、染色液 (Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad)) で 1–1.5 時間振盪させた。染色後、Chemidoc (Bio-Rad) を用いてバンドを確認した。

蛋白質濃度はモル吸光係数を用いて 280 nm の UV 吸収によって決定した。(Abs 0.1% (=1 g/l) C163 : 0.894, C166 : 0.879, C170 : 0.864, C177 : 0.832, L175 : 0.838)。

#### 1-4-2. 質量分析

主生成物と副生成物の確認、およびジスルフィド結合の形成を確認するために、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を行った。質量検出器はハイブリッドエレクトロスプレー四重極飛行時間型質量分析計 (Synapt G2 HDMS; Waters, Manchester, UK) を用いて行った。非還元サンプルは終濃度 0.025% の RapiGest<sup>TM</sup> SF 試薬 (Waters) を各 G-CSF サンプルに添加し、かつ 60°C で 60 分間熱処理した。還元したサンプルは、熱処理する前に 10 mM のジチオトレイトールを添加した。両方のサンプルは 100 mM の炭酸アンモニウム (pH 8) で 90  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  に希釈した。その後、サンプルの 2  $\mu\text{L}$  を Acquity UPLC BEH 300 C4 カラム (2.1×50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 300 Å) (Waters) にインジェクトし脱塩した。キャリブレーションは 2  $\mu\text{L mL}^{-1}$  の 2-プロパノール/水 (1/1) を含むヨウ化セシウム溶液によって生じた一価のイオンを使って行った。データ解析は MassLynx 4.1 (Waters) を使用した。

#### 1-4-3. SPR による G-CSF レセプター結合活性の評価

測定機器は Biacore T200 (GE healthcare) を使用した。SeriesS SensorChip CM5 (GE healthcare) センサーチップにアミンカップリング法により 10  $\mu\text{g/mL}$  プロテイン A (ナカライテスク) を固定化させた (プロテイン A によるレスポンスの増大: 1468.8 RU)。次に、ランニング緩衝液 (150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20 を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)) 下で Fc 融合 G-CSF レセプター (SYMANSYS) をプロテイン A に固定化した (Fc 融合 G-CSF レセプターによるレスポンスの増大: 946.6 RU)。レセプターを固定後、ランニング緩衝液を流速 30  $\mu\text{L/min}$  で 20 分間流すことによってレセプターが剥がれないことを確認した。各サンプルの結合活性はシングルカインेटィクス法で調べられた。サンプル濃度は 1.25–20 nM、流速は 30  $\mu\text{L/min}$  で行った。各サンプルは計 2 回ずつ測定した。

#### 1-4-4. 円偏光二色性 (CD) の測定

測定には  $\Phi 1.0 \times 0.2$  cm のセル (Jasco) を使用し、機器は Jasco J-805 spectropolarimeter (Jasco) を用いた。各サンプルの濃度を 100  $\mu\text{g/mL}$  に調製し、緩衝液は PBS (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM 塩化ナトリウム) を使用した。波長 195–260 nm における G-CSF のスペクトルを測定した。測定温度は 20°C に設定し、測定波長間隔は 0.1 nm、速度は 20 nm/min とした。測定は計 4 回行い、積算した値を結果として使用した。

#### 1-4-5. エキソプロテアーゼ耐性の評価

25  $\mu\text{g/mL}$  の蛋白質溶液に終濃度 2.5 ng / mL のカルボキシペプチダーゼ Y (Thermo Fisher) を混合した。37°C で 4 時間処理し、1 時間間隔で G-CSF の分解量を調べた。分解量は、SDS-PAGE の蛍光強度により算出した。分解後、残存率と半減期を算出した。

#### 1-4-6. 結晶構造解析のための結晶作製方法

環状化 G-CSF の環状化の確認および安定性向上の理由を調べるため、結晶構造解析を行った。測定に用いる結晶を作製するために、結晶化スクリーニングを行った。

24 ウェルのプレートに 500  $\mu\text{L}$  の各母液を分注し、母液とサンプルを 4–6 mg/mL に調製した蛋白質溶液を 1  $\mu\text{L}$  添加したカバーを被せて 20°C で静置した。結晶化には Crystal Screen, Crystal Screen2 (HAMPTON RESEARCH Corp., Aliso Viejo, CA, USA) をはじめとするスクリーニングキットを使用した。

##### 1) 条件検討 1. (市販キットを用いた一次スクリーニング)

Crystal Screen, Crystal Screen2 (HAMPTON RESEARCH) を用いた計 96 条件で検討を行った。

## 2) 条件検討 2. (沈殿剤に追加する塩・緩衝液条件の二次スクリーニング)

94 条件のうち、沈殿剤である 30%ポリエチレングリコール (PEG) 1500 のみの条件において結晶化したため、30% PEG 1500 450  $\mu$ L、Crystal Screen の溶液 50  $\mu$ L を混合して毛検討した。

## 3) 条件検討 3. (沈殿剤の濃度検討)

PEG 1500 の濃度の最適化をはかるため、計 4 条件の検討を行った。PEG1500 の濃度は 15%, 20%, 25%, 30%とした。

## 4) 条件検討 4. (結晶核を添加した沈殿剤の濃度検討)

PEG 1500 の濃度 20%, 30%で結晶化したため、シード溶液 (第 1 章 1. 方法 1-4-6. 結晶構造解析のための結晶作製方法 7)) を用いた検討を行った。濃度は 5%, 10%, 15%, 20%とした。

## 5) 条件検討 5. (結晶核を添加した、塩・緩衝液・沈殿剤の濃度スクリーニング)

条件検討 2. で得られた結晶のうち、大きく厚みのある結晶の得られた母液 (Crystal Screen No. 1, No. 24, No. 44) を用いて、さらなる検討を行った。沈殿剤は、PEG1500 と他の沈殿剤の濃度比を統一し、計 15%, 20%, 25%, 30%となるように混合した。緩衝液の pH は、pH 3.6 から 0.4 刻みで pH 5.6 までの 6 条件とし、計 24 条件で結晶化のスクリーニングを行った。使用した緩衝液の種類、塩濃度の組成を以下に示す。また、0.8  $\mu$ L 蛋白溶液に 0.2  $\mu$ L シード溶液を添加して結晶化させた。

### 5-1) Crystal screen No. 1 をもとにした条件検討

緩衝液：100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 3.6-5.6)

沈殿剤：13.5%, 18%, 22.5%, 27% PEG 1500 および 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 2-メチル-2,4-ペンタジオール

塩：2 mM 塩化カルシウム二水和物

### 5-2) Crystal screen No. 24 をもとにした条件検討

緩衝液：100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 3.6-5.6)

沈殿剤：13.5%, 18%, 22.5%, 27% PEG 1500 および 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 2-プロパノール

塩：20 mM 塩化カルシウム二水和物

### 5-3) Crystal screen No. 44 をもとにした条件検討

緩衝液：100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 3.6-5.6)

沈殿剤：15%, 20%, 25%, 30% PEG 1500

塩：20 mM ギ酸マグネシウム二水和物

#### 6) 条件検討 6. (結晶核を添加した、沈殿剤の濃度および緩衝液の pH 条件スクリーニング)

条件検討 5. では No. 1 の pH 5.2 において 2 条件で結晶化したため、付近の pH でより詳細な pH 条件検討を行った。pH を pH 4.0 から 5.1 まで 0.1 間隔とし、沈殿剤の濃度およびその他の条件についても条件検討 4. と同様とした。

#### 7) シード溶液の作製 (micro seeding)

初期に得られた結晶を Seed Beads Kits (Hampton Research) で破碎し、シード溶液を作製した。5~10  $\mu\text{L}$  ずつ母液をピペットマンで吸い、結晶を含むタンパク溶液のピペッティングを数回行った。ピペッティングした溶液を回収する作業を 5 回繰り返した。Seed beads 用のエッペンチューブに回収し、30 秒間ボルテックスを行い、30 秒間氷冷した。この操作を 6 回繰り返し、結晶のシード溶液とした。作製したシード溶液は少量ずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  下で保存した。使用時は、milliQ 水で 1000 倍希釈した。0.2  $\mu\text{L}$  のシード溶液を、結晶用サンプル 0.8  $\mu\text{L}$  に添加して用いた。

#### 1-4-7. 結晶構造解析

得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器機構(茨城県つくば市)の Photon Factory にあるビームライン BL-1A または BL-5A で測定を行った。測定時は 95K の窒素ガスおよび 30-95 K のヘリウムガス充填下で行った。回折画像 (diffraction images) のスポットについて、iMosfilm[35]および SCALA を用いて使用する回折スポットおよび結晶の空間群を決定した。次に Phaser[36]を用いて、得られた電子密度に対して分解能が高い野生型 G-CSF の構造 (PDB code; 1BGC) を用いて分子置換を行った。分子置換後、Wincoot[37]と refmac5[38]を用いて R-factor が 0.2 付近になるまで構造精密化を行った。精密化後のモデルの妥当性は、Procheck[39]で評価した。

#### 1-4-8. 超遠心分析

超遠心分析の沈降速度法によって、天然構造と変性構造の形状および凝集体の存在を調べた。C166 と L175 のサンプルは 0 M または 5 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に一晩透析したのち、蛋白質濃度を 0.8 mg/mL に調整した。測定前に 3000 rpm の回転速度で、ローターの中心位置からの距離のキャリブレーション (ラジカルキャリブレーション) を行った。測定は 60000 rpm の回転速度および 318 K で ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) を用いて行った。光路長 12 mm のアルミニウムのダブルセクターセルを使用して、測定範囲 5.8–7.3 cm における 280 nm の吸収を測定した。1 時間当たり 15 回、8 時間、計 120 回データを収集した。測定データは



SEDFIT プログラム[40]を用いて沈降係数の分布を解析した。蛋白質の偏比容、溶媒の粘度と密度の算出には SEDNTERP プログラム[41]を用いた。C166 と L175 の偏比容はそれぞれ 0.7279 mL/g と 0.7295 mL/g、0 M または 5 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) の粘度はそれぞれ  $1.43 \times 10^{-2}$  mPa · s と  $1.02 \times 10^{-2}$  mPa · s、密度はそれぞれ 1.00 g/cm<sup>3</sup> と 1.12 g/cm<sup>3</sup> の値を解析に使用した。

SEDFIT による解析では、Continuous Sedimentation Coefficient Distribution c(s)モデルを使用した。摩擦比 ( $f/f_0$ ) の初期設定を 1.3、沈降係数の解析範囲を 0–10 S として、蛋白質の偏比容、溶媒の密度と粘度を代入した。フィッティングポイントは 100 でフィッティングした後、200 に増やして RMSD が OD<sub>280</sub> の 1%以内になるまでフィッティングを行った。

## 2. 結果

### 2-1. G-CSF の発現と精製後の産物確認

G-CSF はリフォールディングののち三種類のカラムを用いた精製を行った。精製後、精製物の純度を確認するために、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。L175 は副生成物を含まないことがわかった (Figure 2-3 (a))。一方、C163 を除く環状化 G-CSF は副生成物が観察された。先行研究から、SDS-PAGE における主生成物よりもわずかに後ろに現れる副生成物は、非環状化産物と考えられる[19,42,43]。実際に、C177 の主生成物と副生成物を質量分析した結果、副生成物が非環状化産物であることがわかった (Figure 2-4)。副生成物は、MonoQ カラムを使った陰イオン交換クロマトグラフィーによって主生成物と分離できた (Figure 2-3 (a))。SDS-PAGE の蛍光強度と MonoQ による精製時のクロマトグラフから得たピーク面積から、環状化効率を算出した (Table 2-3)。末端のセグメントが短くなるしたがって、環状化効率は向上した。特に、C163 は副生成物を含まずに環状化したことが分かった。

主生成物が正しく環状化していることを確かめるために、基質特異性の広いエキソプロテアーゼであるカルボキシペプチダーゼ Y に対する耐性を評価した (Table 2-3, Figure 2-3 (b))。L175 と購入したフィルグラスチム (グラン) はほとんど分解された (残存率はそれぞれ 12.4%と 19.7%であった)。すべての環状化主生成物はプロテアーゼ耐性を持つことがわかった (それぞれ 102.6% (C177)、82.1% (C170)、103.2% (C166)、75.5% (C163)であった)。

また、非還元および還元した C166、C177、L175 の質量分析を行った。還元したサンプルは非還元のサンプルに比べて 4 Da 大きかった。これは、2 つのジスルフィド結合が還元されて 4 つのチオール基に変化したことを示す。作製した G-CSF は、野生型 G-CSF が持つ 2 つのジスルフィド結合を形成していることがわかった (Figure 2-5)。この結果は、環状化 G-CSF が正しく作製および精製できたことを示す。

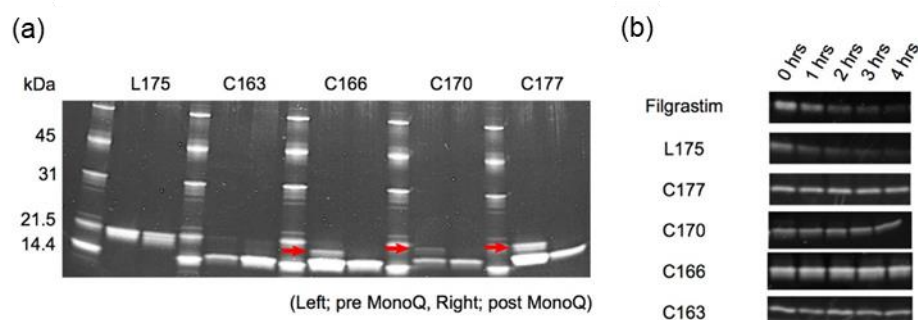


Figure 2-3. SDS-PAGE による精製度の確認とエキソプロテアーゼ耐性の測定 環状化産物の SDS-PAGE に純度確認 (a) 直鎖状 G-CSF (副生成物) は MonoQ カラムを使った精製により取り除いたことを確認した。 (b) カルボキシペプチダーゼ Y による分解実験

Figures (a) and (b) reprinted with Figure 2 in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696 <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00776>  
Copyright © 2017 American Chemical Society.

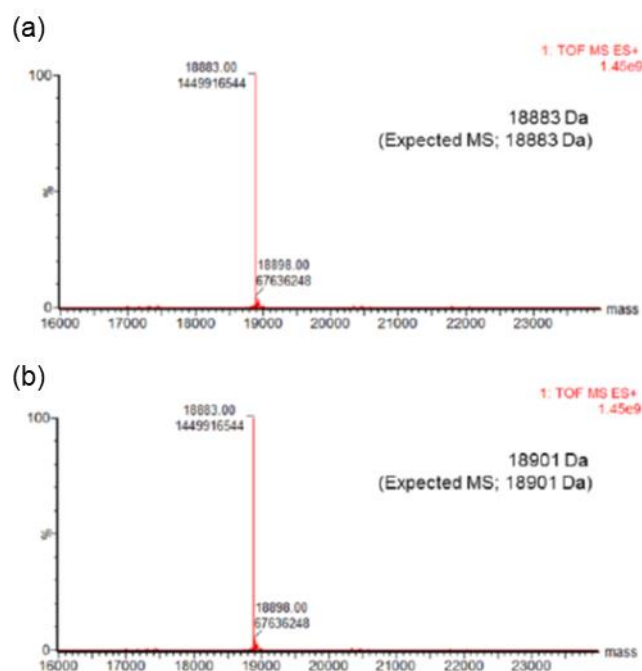


Figure 2-4. デコンボリューションした C177 の質量スペクトル (a) C177 の主生成物を示す。(b) C177 の副生成物を示す。すべてのスペクトルは MaxEnt1 ソフトウェアを用いて得られた。デコンボリューションは 1 Da の分解能で行った。C177 の主生成物と副生成物の平均分子質量はそれぞれ 18882.7 Da と 18900.7 Da であった。

Figure (a) and (b) reprinted with Figure S2 in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696 <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00776>  
Copyright © 2017 American Chemical Society.

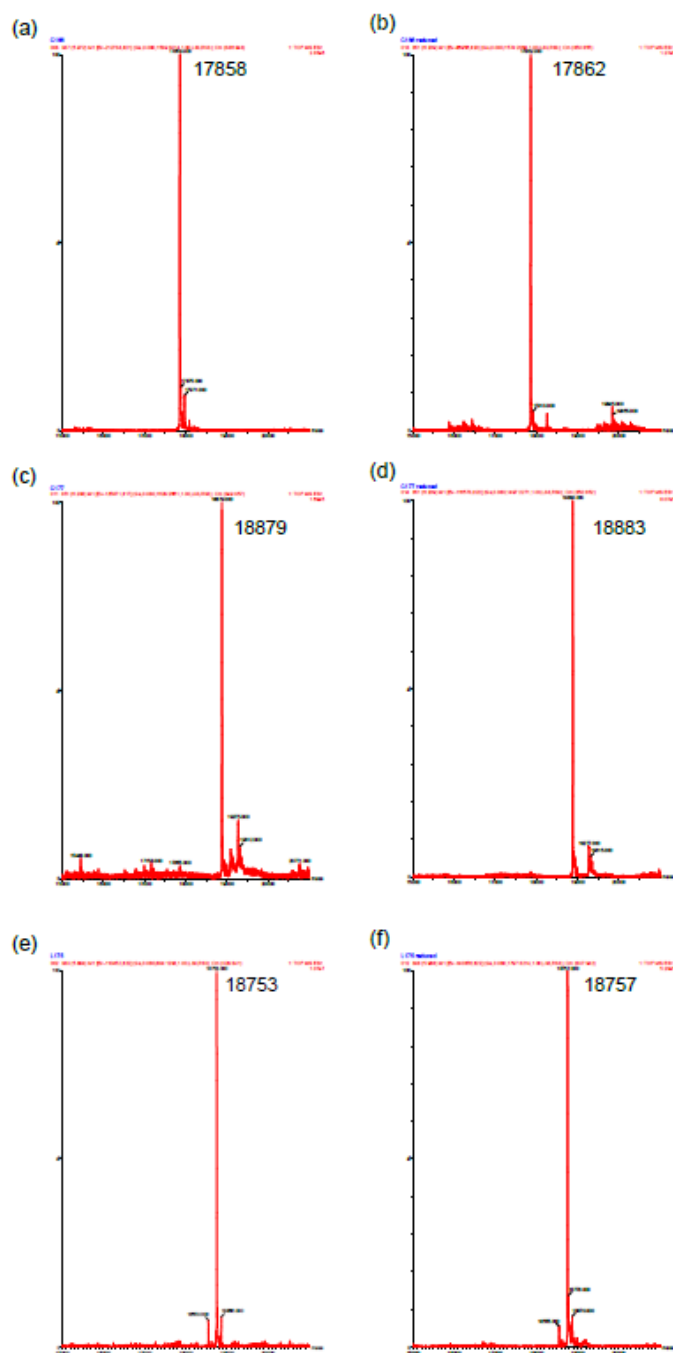


Figure 2-5. デコンボリューションした C166、C177、L175 の G-CSF 変異体の質量スペクトル 還元したサンプル (b, d, f) の質量は非還元のサンプル (a, c, e) に比べて 4 Da 大きかった。C166, C177, L175 の理論的な分子質量はそれぞれ 17861.7 Da, 18882.9 Da, および 18756.8 Da であった。

Figures (a)–(f) reprinted with Fig. 3 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

## 2-2. 表面プラズモン共鳴 (SPR)による G-CSF 受容体結合活性測定

環状化 G-CSF が機能を維持しているかどうかを調べるために、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を使って G-CSF 受容体結合活性を測定した。 $R_{\max}$  はリガンドの固定量から算出した理論値が 180 RU に対し、測定により算出された  $R_{\max}$  は 50–60 RU であった。リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合する 1:1 結合モデルにより算出した解離定数 ( $K_D$ ) は、C177, C170, C166, C163 でそれぞれ 67.2, 50.2, 60.0, 102 pM であった (Table 2-3 および Figure 2-6)。これらの値はフィルグラスチムと L175 と同程度の大きさであった (それぞれ 273 と 81.6 pM)。よって、環状化 G-CSF は G-CSF 受容体結合表面を維持していると結論付けた。

Table 2-3. 作製した G-CSF の環状化効率とエキソペプチダーゼ処理後の残存率と半減期、G-CSF レセプター結合活性

	環状化効率% (SDS-PAGE) (chromatogram)	エキソペプチダーゼ処理 4 時間後の残存率% 半減期 ( $t_{0.5}$ ) (hour)	G-CSF レセプター 結合活性 $K_D$ (pM)
L175		$12 \pm 12$ 1.2	$82 \pm 1.1$
C177	$77 \pm 6.7$ $76 \pm 18$	$10 \times 10^2 \pm 12$ 255	$67 \pm 0.1$
C170	$81 \pm 0.7$ $75 \pm 3.1$	$82 \pm 26$ 13	$50 \pm 2.0$
C166	$89 \pm 0.8$ $90 \pm 0.4$	$1.0 \times 10^2 \pm 21$ -	$60 \pm 1.8$
C163	$1.0 \times 10^2$ $1.0 \times 10^2$	$76 \pm 3.9$ 11	$1.0 \times 10^2 \pm 1.0$
filgrastim		$20 \pm 6.4$	$2.7 \times 10^2 \pm 10$

C166 はエキソペプチダーゼで分解が確認されなかったため、半減期は算出していない。

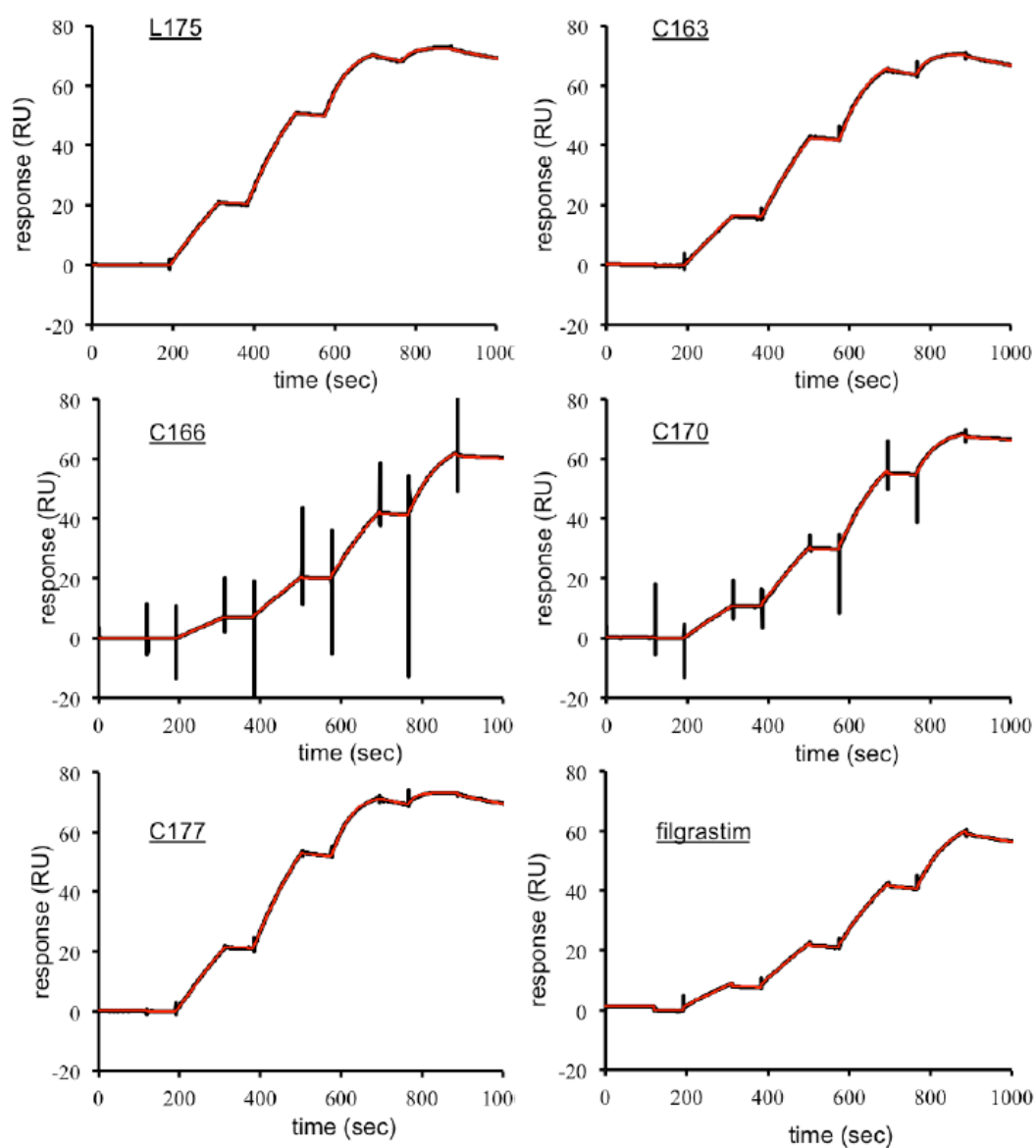


Figure 2-6. 環状化 G-CSF の G-CSF 受容体に対するアフィニティーの SPR センサグラム  
 プロテイン A をセンサーチップに固定化し、Fc 融合 G-CSF 受容体を捕捉した。G-CSF  
 変異体はシングルサイクルでインジェクトした。測定カーブを黒色、フィッティングカー  
 ブを赤色で示す。

Figures reprinted with Fig. S3 in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting  
 Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acschembio.7b00776>

Copyright © 2017 American Chemical Society.

## 2-3. 環状化 G-CSF の天然構造と変性構造の評価

### 2-3-1. CD スペクトル測定

環状化 G-CSF と L175 の二次構造を比較するために、円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。環状化 G-CSF と L175 のスペクトルは同様であった (Figure 2-7)。先行研究の G-CSF スペクトルともほぼ同一であった[44,45]。主鎖環状化は G-CSF の二次構造に影響を与えないことが分かった。

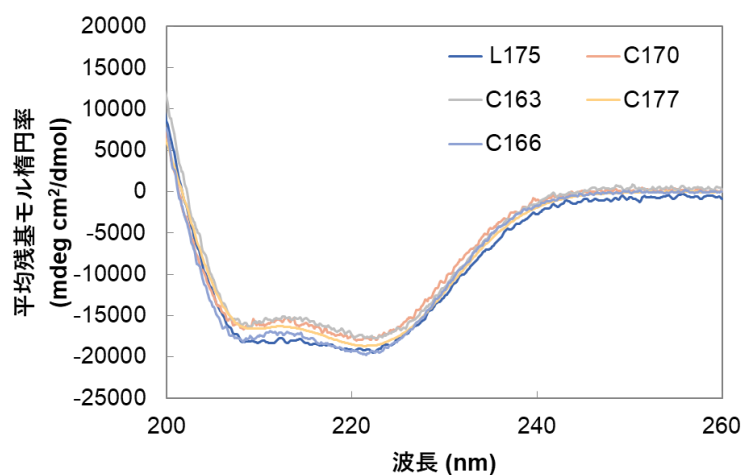


Figure 2-7. 環状化 G-CSF と L175 の CD スペクトル

Figure adapted with Figure 3 in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00776>

Copyright © 2017 American Chemical Society.

### 2-3-2. 結晶化スクリーニング

最も熱安定性の向上した C166 の結晶構造解析を行うため、結晶化条件のスクリーニングを行った。

#### 2-3-2-1. 条件検討 1. (市販キットを用いた一次スクリーニング)

Crystal Screen、Crystal Screen 2 を用いた計 96 条件のスクリーニングを行った結果、1 条件で結晶化した。

結晶化条件 1. (Figure 2-8)

30% PEG 1500

#### 2-3-2-2. 条件検討 2. (沈殿剤に追加する塩・緩衝液条件の二次スクリーニング)

結晶化の母液 500  $\mu\text{L}$  のうち、すべてのクリスタルスクリーンの溶液 50  $\mu\text{L}$  に 30% PEG 1500 を 450  $\mu\text{L}$  を混合した。計 48 条件で検討を行った。その結果、計 7 条件で結晶化した。以下に結晶化条件および結晶の写真を示す（カッコ内は Crystal Screen の母液番号を示す）。

結晶化条件 2. (1.) (Figure 2-9)

0.02 M 塩化カルシウム二水和物

0.01 M 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

3% v/v (+/-)-2-メチル-2,4-ペンタジオール

27% PEG 1500

結晶化条件 3. (24.) (Figure 2-10)

0.02 M 塩化カルシウム二水和物

0.01 M 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

2% v/v 2-プロパノール

27% PEG 1500

結晶化条件 4. (44.) (Figure 2-11)

0.02 M ギ酸マグネシウム二水和物

27% PEG 1500

結晶化条件 5. (10.) (Figure 2-12)

0.02 M 酢酸アンモニウム

0.01 M 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

3% w/v PEG 4000

27% PEG 1500

結晶化条件 6. (37.) (Figure 2-13)

0.01 M 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

0.8% w/v PEG 4000

27% PEG 1500

結晶化条件 7. (42.) (Figure 2-14)

0.005 M リン酸水素二カリウム

2% w/v PEG 8000

27% PEG 1500



結晶化条件 8. (26.) (Figure 2-15)

0.02 M 酢酸アンモニウム

0.01 M 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

2% v/v 2-プロパノール

27% PEG 1500

#### 2-3-2-3. 条件検討 3. (沈殿剤の濃度検討)

ポリエチレングリコール 1500 の濃度の最適化をはかるため、計 4 条件の検討を行った。その結果、25%, 30%の濃度で結晶化した。25%のほうがより結晶形成速度が遅く、大きい結晶が形成された。

結晶化条件 9. (Figure 2-16)

25% PEG 1500

#### 2-3-2-4. 条件検討 4. (結晶核を添加した沈殿剤の濃度検討)

条件検討 3. に加えて、シード溶液を加えた上でポリエチレングリコールの濃度を下げて結晶化するかを調べた。5%, 10%, 15%, 20%で濃度を振った結果、1 条件で結晶化した。

結晶化条件 10. (Figure 2-17)

5% PEG 1500

#### 2-3-2-5. 条件検討 5. (結晶核を添加した、塩・緩衝液・沈殿剤の濃度スクリーニング)

条件検討 2. で結晶化した条件のうち、大きく厚みのある結晶の母液条件 (1, 24, 44) を用いてスクリーニングを行った。計 72 条件でスクリーニングを行った結果、条件で結晶化した。このうち、以下の 2 条件で結晶化した。

結晶化条件 11. (Figure 2-18)

100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH5.2)

0.02 M 塩化カルシウム二水和物

27% PEG 1500, 3%2-メチル-2,4-ペンタジオール

結晶化条件 12. (Figure 2-19)

100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH5.2)

0.02 M 塩化カルシウム二水和物

13.5% PEG 1500, 1.5%2-メチル-2,4-ペンタジオール

2-3-2-6. 条件検討 6. (結晶核を添加した、沈殿剤の濃度および緩衝液の pH 条件スクリーニング)

結晶化条件 1. の緩衝液の pH を細かく振り、計 48 条件で条件検討を行った。その結果、1 条件で結晶化した。

結晶化条件 13. (Figure 2-20)

100 mM 酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.6)

0.02 M 塩化カルシウム二水和物

13.5 % PEG 1500, 1.5% 2-メチル-2,4-ペンタジオール

以上の 268 条件のうち、結晶化条件 10 の結晶を X 線結晶構造解析に用いた。

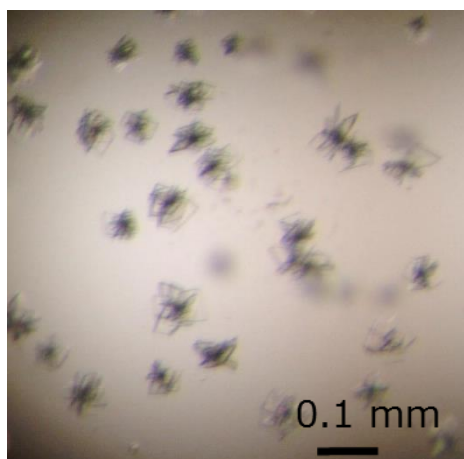


Figure 2-8. 結晶化条件 1 の結晶

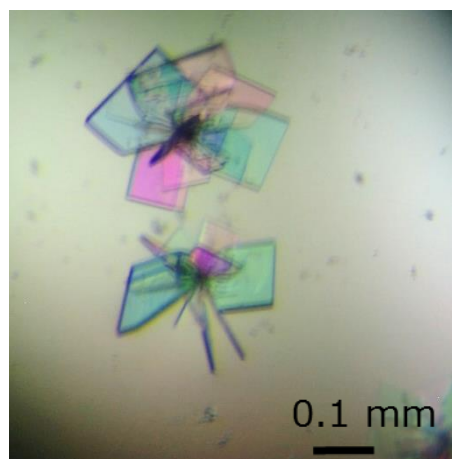


Figure 2-9. 結晶化条件 2 の結晶

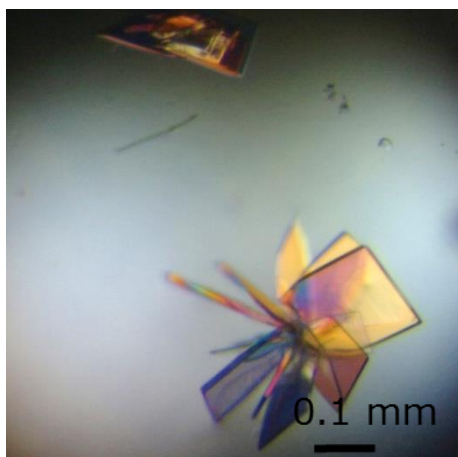


Figure 2-10. 結晶化条件 3 の結晶

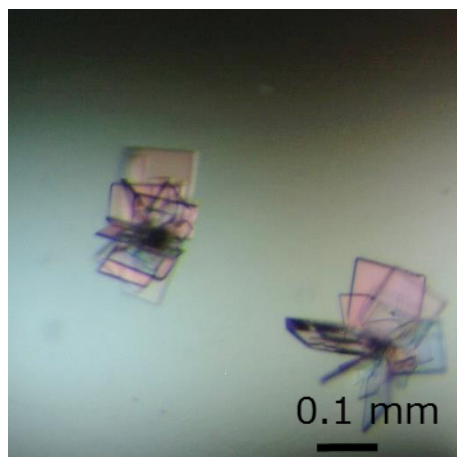


Figure 2-11. 結晶化条件 4 の結晶

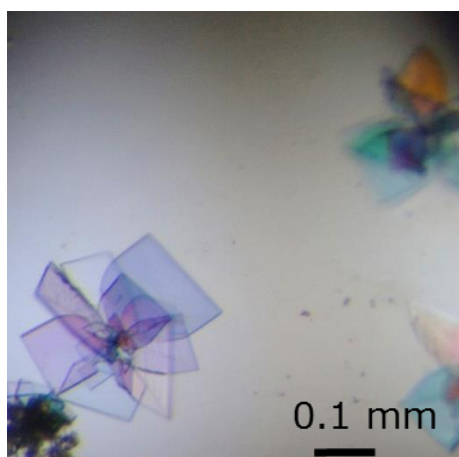


Figure 2-12. 結晶化条件 5 の結晶

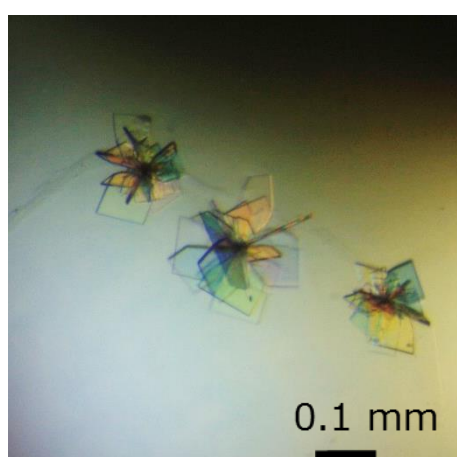


Figure 2-13. 結晶化条件 6 の結晶

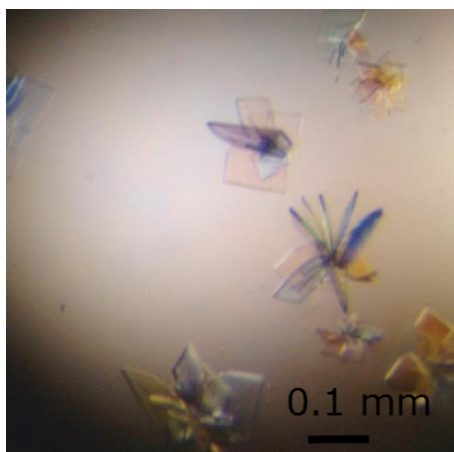


Figure 2-14. 結晶化条件 7 の結晶

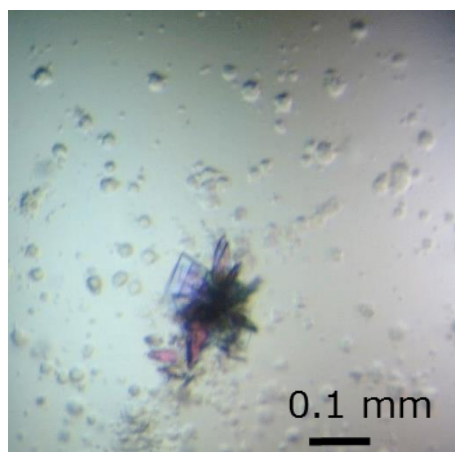


Figure 2-15. 結晶化条件 8 の結晶

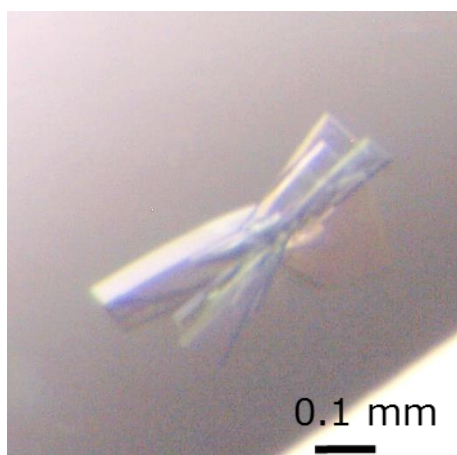


Figure 2-16. 結晶化条件 9 の結晶

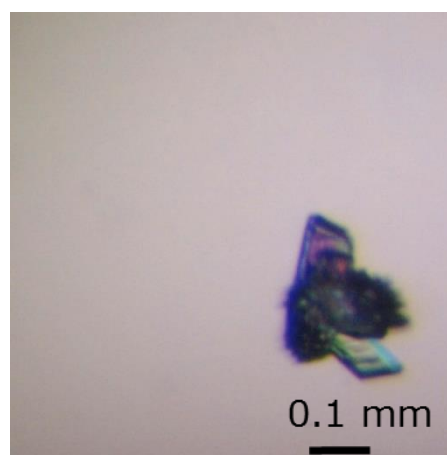


Figure 2-17. 結晶化条件 10 の結晶

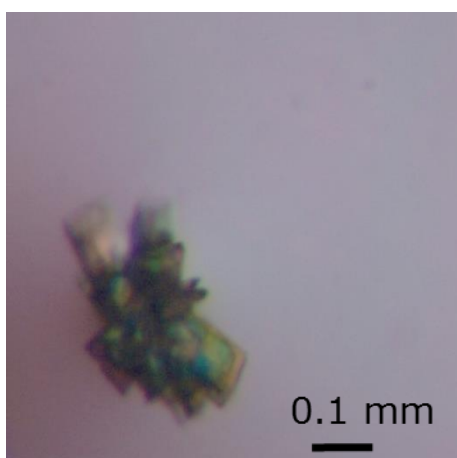


Figure 2-18. 結晶化条件 11 の結晶

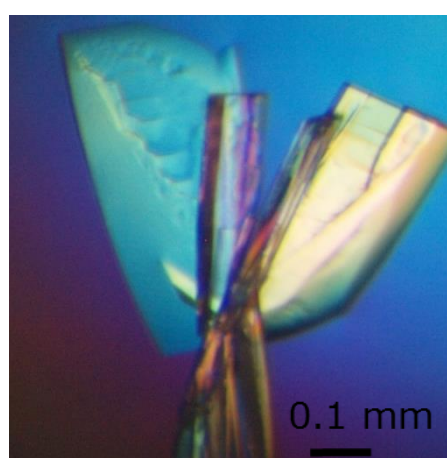


Figure 2-19. 結晶化条件 12 の結晶

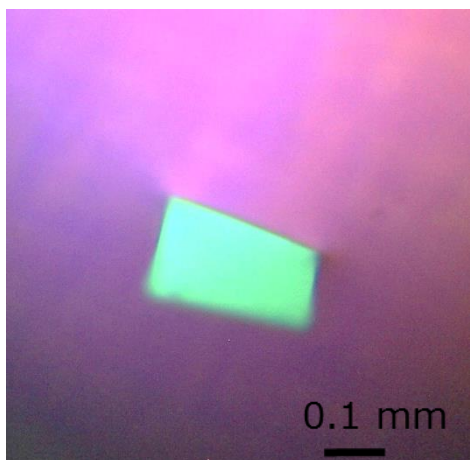


Figure 2-20. 結晶化条件 13 の結晶

### 2-3-3. 結晶構造解析

主鎖環状化が環状化 G-CSF の三次構造に影響を与えたかどうか調べるために、X 線結晶構造解析を行った。C166 の結晶を用いて、分解能が 1.7 Å の結晶構造を決定した (Figure 2-21 および Table 2-4)。非対称単位には単量体が含まれており、全 166 残基をモデリングすることができた。Ser57–Leu63 のループ領域の電子密度が不明瞭だったが、ヒト G-CSF [PDB code: 2D9Q; chain A] の該当領域も温度因子が高く、他のヒト G-CSF [PDB code: 1RHG; chain A] の該当領域は電子密度が見えていない。そのため、このループ領域は主鎖環状化に関わらずフレキシブルな領域と考えられる。C166 の 2Fo-Fc マップから、Gly166 と Ser1 の間のコネクター領域の電子密度が確認された (Figure 2-21(b))。C166 の結晶構造をヒト G-CSF の結晶構造 (PDB code: 2D9Q; chain A) と比較した。C166 とヒト G-CSF の 4 本のヘリックス領域における  $\alpha$  炭素 ( $C_\alpha$ ) の平均二乗誤差 ( $\text{RMSD}_{C_\alpha}$ ) は 0.86 Å であった (Figure 2-21(c))。C166 はヒト G-CSF の主鎖構造を維持したまま環状化したことを確認できた。

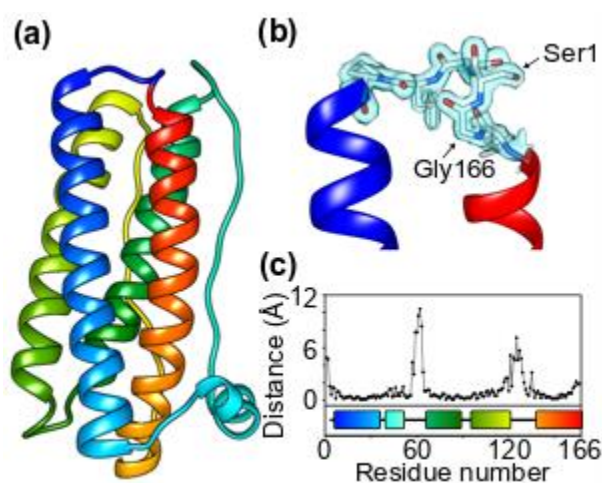


Figure 2-21. C166 の結晶構造 (a) C166 の全体構造 (b) コネクター領域の拡大図。6 残基 (Leu165–Pro4) を主鎖の原子を棒モデルで表示した。電子密度は 1.5  $\sigma$  で表示した 2Fo-Fc マップを示す。 (c) C166 とヒト G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A) の間の  $\text{RMSD}_{C_\alpha}$ 。図下部の長方形と棒はそれぞれヘリックスとループを表す。ヘリックスの色は (a) の部位に対応している。

Figure (a)–(c) reprinted with Fig. 6 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc..

Table 2-4. C166 の結晶構造解析データ

Data collection	
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell	
Dimensions (Å)	$a = 47.18, b = 48.05, c = 54.96$
Angles (°)	$\alpha, \beta, \gamma = 90$
Wavelength (Å)	1.0000
Resolution range (Å)	47.15–1.70
Total observation	98491
Unique observations	14235
I/ $\sigma$ (I)	21.8 (7.3)
Completeness (%)	99.7 (100)
$R_{\text{merge}}$ (%)	5.7 (25.0)
Multiplicity	6.9 (7.1)
Refinement	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	16.7 / 21.7
Number of protein chains	1
Number of protein residues	166
Number of protein atoms	1269
Number of ligands	0
Number of water molecules	105
B-factor protein (Å <sup>2</sup> )	20.7
B-factor waters (Å <sup>2</sup> )	24.5
RMSD bonds (Å)	0.019
RMSD angles (°)	1.88
Coordinate error <sup>1</sup> (Å)	0.07
Ramachandran plot (%)	
Favored	98.2
Allowed	1.8
Outliers	0
PDB code	5ZO6

<sup>1</sup> 最尤法による残差に基づく分子置換パラメーターの不確かさ（推定標準偏差）を示す。

#### 2-3-4. 超遠心分析

溶液中における環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF の分子量を調べるために、0 M および 5 M GdnHCl 存在下における C166 と L175 の超遠心分析を行った (Figure 2-22 および Table 2-5-2-9)。GdnHCl 非存在下において、C166 と L175 はそれぞれ 4 つおよび 2 つのピークが観測された。C166 と L175 の 4 つのピークのうち、沈降係数が 1 番小さいピーク (Peak 1) の沈降係数はそれぞれ 1.9 S と 1.8 S であり (Table 2-6)、全体のそれぞれ 95%、100% を占めていた。また、分子量がそれぞれ 17036 Da および 17344 Da (Table 2-7) で、理論値 (C166: 17861.69 Da, L175: 18756.76 Da) と類似していた。よって、一つ目のピークが単量体であると解釈した。分子の形状は摩擦比 ( $f/f_0$ ) によって評価できる。もし蛋白質が完全な球状であれば、 $f/f_0$  は 1.0 になる。1.0 からのずれは非対称性の増大や分子の水和の増大を表す。一般的に、球状蛋白質の  $f/f_0$  は 1.05–1.35 の値を示す[46]。C166 と L175 の沈降係数 (Table 2-6)、 $f/f_0$  (C166: 1.2, L175: 1.2) (Table 2-9)、流体力学半径 (C166: 2.0 nm, L175: 2.1 nm) (Table 2-8) は同様だったので、GdnHCl 非存在下の溶液中では同様の構造を持っていると考えられる。5% 未満ながら Peak 1 より沈降係数の大きい 3 つのピーク (Peak 2, Peak 3, Peak 4) も観察された。一般的に、G-CSF は GdnHCl 非存在下の酸性条件において凝集しないと考えられている[47,48]。しかし、GdnHCl 非存在下の酸性条件においても G-CSF は微量の凝集物を形成することがわかった。

5 M GdnHCl 存在下では、C166 と L175 でそれぞれ 5 つのピークが観察された。0 M GdnHCl のサンプルと同様に、最も沈降係数の小さいピーク (Peak 1) がそれぞれ全体の 97%、94% であった。また、分子量がそれぞれ 19106 Da および 20269 Da (Table 2-7) だったので、Peak 1 が単量体のピークと考えられる。沈降係数は GdnHCl 非存在下における沈降係数に比べて小さくなり、C166 と L175 の Peak 1 の沈降係数はそれぞれ 0.65 S, 0.58 S (Table 2-6) であった。また、C166 と L175 の Peak 1 の  $f/f_0$  はそれぞれ 2.1 および 2.4 (Table 2-9) であり、GdnHCl 非存在下のサンプルに比べて大きくなった。よって、5 M GdnHCl 存在下の C166 と L175 は GdnHCl 非存在下に比べて変性した構造であることを示唆する。さらに、L175 より C166 の沈降係数が大きく、 $f/f_0$  が小さかった。この結果は、C166 の方が L175 に比べてコンパクトな三次構造であることを示す。C166 と L175 の流体力学半径 (C166: 3.8 nm, L175: 4.4 nm) (Table 2-8) から同様のことがいえる。C166 と L175 の Peak 2–5 はそれぞれ全体の 3% および 6% で、GdnHCl 非存在下と同程度量の凝集物を含むことが分かった。

よって、溶液中の L175 と C166 は、GdnHCl 非存在下、すなわち天然状態において同様の三次構造であること、および 5 M GdnHCl 存在下、すなわち変性状態において C166 のほうがコンパクトな三次構造であることが明らかになった。



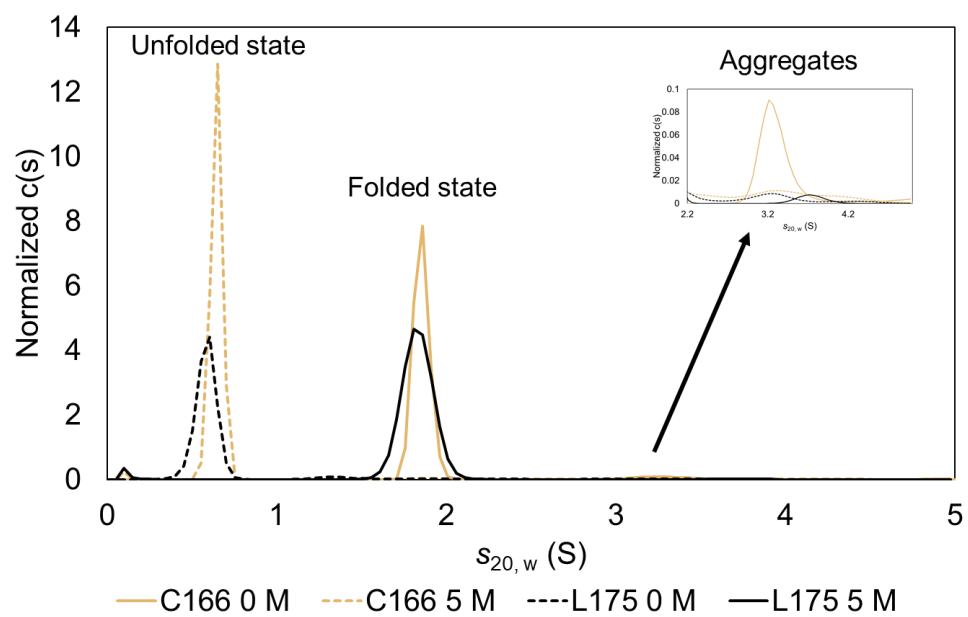


Figure 2-22. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の沈降係数の分布 すべての実験は 0 M または 5 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した 0.8 mg/mL の蛋白質溶液を用いて行った。

Table 2-5. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の c(s)のピーク面積の分布

	GdnHCl (M)	Peak 1 (%)	Peak 2 (%)	Peak 3 (%)	Peak 4 (%)
C166	0	95	3.7	1.1	
	5	97	1.3	1.2	0.53
L175	0	$1.0 \times 10^2$	0.30		
	5	94	3.6	1.3	0.84

Table 2-6. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の沈降係数の分布

	GdnHCl (M)	Peak 1 (S)	Peak 2 (S)	Peak 3 (S)	Peak 4 (S)
C166	0	1.9	3.3	5.9	
	5	0.6	2.1	3.6	6.2
L175	0	1.8	3.7		
	5	0.6	1.4	2.0	3.2

Table 2-7. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の分子量の分布

	GdnHCl (M)	Peak 1 (Da)	Peak 2 (Da)	Peak 3 (Da)	Peak 4 (Da)
C166	0	$1.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	
	5	$1.9 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$5.6 \times 10^5$
L175	0	$1.7 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$		
	5	$2.0 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$

Table 2-8. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の流体力学半径の分布

	GdnHCl (M)	Peak 1 (nm)	Peak 2 (nm)	Peak 3 (nm)	Peak 4 (nm)
C166	0	2.0	2.7	3.6	
	5	3.8	6.7	8.9	12
L175	0	2.1	3.0		
	5	4.4	6.8	8.2	10

Table 2-9. 0 M GdnHCl および 5 M GdnHCl 溶液中における C166 と L175 の摩擦比

	GdnHCl (M)	$f/f_0$
C166	0	1.2
	5	2.1
L175	0	1.2
	5	2.4

### 第3章 構造安定性の評価

本章では、第1章で作製した主鎖環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF (L175) の構造安定性を評価した。熱変性実験および変性剤変性実験を用いて、溶液中における構造安定性を比較した。その結果、G-CSF は主鎖環状化によって構造安定化したことが明らかになった。さらに、環状化 G-CSF の中で構造安定性が異なることがわかった。環状化 G-CSF のコネクタ一長の違いが構造安定性に影響していると考えられる。

#### 1. 方法

##### 1-1. 円偏光二色性 (CD) による熱変性実験

大きさが  $\Phi 1.0 \times 0.2$  cm セル (Jasco) を使用し、測定機器は Jasco J-805 spectropolarimeter (Jasco) を用いた。各サンプルの濃度を 100  $\mu\text{g/mL}$  に調製し、緩衝液は PBS (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM 塩化ナトリウム) を使用した。222 nm における昇温時の変化を調べた。測定温度は 10-90°C (10°C 1 分、1 °C/分 90 分、90°C 5 分ののちゆるやかに冷却し、20°C) とした。測定後、二状態転移のフィッティングを行い、変性中点温度 ( $T_m$ ) を算出した。解析ソフトには Igor Pro 8 (wavemetrics) を使用した。

##### 1-2. 蛍光測定による化学変性実験

まず、0 M または 7 M のグアニジン塩酸塩 (GdnHCl) を含む 100 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を準備した。この2つの溶液をストック溶液とした。これらを混ぜ合わせることで GdnHCl の濃度が異なる計 30 点の溶液を作製した。計 90  $\mu\text{L}$  の溶液を 1/2 AreaPlate-96 F (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA) に分注した。2つの溶液中の GdnHCl 濃度は 25°C における屈折率と Denaturant Concentration Calculator (<http://sosick.uchicago.edu/gdncl.html>) [49] を使って算出した。屈折率は屈折計 (Automatic Digital Refractometer RX-5000  $\alpha$  (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan)) を用いて決定した。混合した後の体積の変化は無視できると判断した。

次に、アンフォールディング実験とリフォールディング実験を行うために、G-CSF 変異体の天然状態と変性状態のサンプルを同様の二つのストック溶液を使って準備した。1 mg  $\text{mL}^{-1}$  の蛋白質溶液を計 30 通りの GdnHCl を含む溶液に 10  $\mu\text{L}$  加え、4°C で 3 時間平衡に達するまで静置した。3 時間経過後、25°C 下におけるサンプルの蛍光スペクトルを EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) を使って測定した。溶媒のスペクトルもバックグラウンドとして 25°C で測定した。蛋白質溶液と溶媒は 280 nm で励起し、300–450 nm における蛍光スペクトルを測定した。解析の前に、溶媒のスペクトルはそれぞれのサンプルのスペクトルから差し引いた。

スペクトル重心波長 ( $\langle \lambda \rangle$ ) は蛍光スペクトルの形状を表すパラメーターとして計算した。 $\langle \lambda \rangle$  は以下のように定義される。

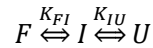
$$\langle \lambda \rangle = \Sigma F(\lambda) \lambda / \Sigma F(\lambda)$$

ここで、 $\lambda$  は蛍光波長で、 $F(\lambda)$  は  $\lambda$  における蛍光強度である [50]。

EnSpire multimode plate reader を使って得られたスペクトルの波長は正確性に欠けていたため、 $\langle \lambda \rangle$  の補正を行った。EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) と JASCO FP-6500 (Jasco) の間の実験値は直接相関を示した。よって、2 つの値をプロットした直線の傾きを補正係数として補正した。この補正係数は二つの機器を使ってそれぞれのサンプル (C166, C177, L175) について独立に測定し決定した。

### 1-3. 三状態遷移モデルを使った平衡論解析

以前、Narhi ら [51] および Brems ら [52] は、中間状態を含む三状態遷移モデルを使って野生型 G-CSF のフォールディング/アンフォールディング平衡を解析した。本論文では同様のモデルを使って G-CSF の解析を行った。フォールディング/アンフォールディング平衡は以下のように記述される。



ここで、 $F$ 、 $I$  および  $U$  はそれぞれ天然状態、中間状態、および変性状態である。 $K_{FI}$  および  $K_{IU}$  は天然状態から中間状態への構造遷移 ( $F$ -to- $I$ ) の平衡定数、および中間状態から変性状態 ( $I$ -to- $U$ ) への平衡定数である。

平衡定数は以下の式で定義される。

$$G_I - G_F = \Delta G_{FI} = -RT/\ln K_{FI}$$

$$K_{FI} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{FI}}{RT}\right)$$

$$G_U - G_I = \Delta G_{IU} = -RT/\ln K_{IU}$$

$$K_{IU} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{IU}}{RT}\right)$$

$\Delta G_{FI}$ および $\Delta G_{IU}$ は天然状態と比較した中間状態のギブスの自由エネルギー変化、および中間状態と比較した変性状態のギブスの自由エネルギー変化である。さらに、 $\Delta G_{FI}$ および $\Delta G_{IU}$ は以下のように表される。

$$\begin{aligned}\Delta G_{FI} &= \Delta G_{FI}^0 - m_{FI}[\text{GdnHCl}] \\ \Delta G_{IU} &= \Delta G_{IU}^0 - m_{IU}[\text{GdnHCl}]\end{aligned}$$

$\Delta G_{FI}^0$ と $\Delta G_{IU}^0$ はそれぞれ GdnHCl 非存在下の $\Delta G_{FI}$ および $\Delta G_{IU}$ である。 $m_{FI}$ および $m_{IU}$ は F-to-I や I-to-U 遷移における  $m$  値であり、GdnHCl 濃度のギブスの自由エネルギー変化の依存性を示す。一般的に、 $m$  値は蛋白質の構造遷移の協同性を表す。 $\langle \lambda \rangle$ は以下の理論式によってあらわされる(式 1)：

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\langle \lambda \rangle_F + \frac{K_{FI}}{Q_{R,FI}} \langle \lambda \rangle_I + \frac{K_{FI}}{Q_{R,FI}} \frac{K_{IU}}{Q_{R,IU}} \langle \lambda \rangle_U}{1 + \frac{K_{FI}}{Q_{R,FI}} + \frac{K_{FI}}{Q_{R,FI}} \frac{K_{IU}}{Q_{R,IU}}} \quad \dots (1)$$

ここで、 $\langle \lambda \rangle_F$ 、 $\langle \lambda \rangle_I$ 、 $\langle \lambda \rangle_U$ は天然、中間、変性状態の $\langle \lambda \rangle$ である。 $Q_{R,FI}$ は中間状態と比較した天然状態の蛍光強度の和の比である。 $Q_{R,IU}$ は変性状態と比較した中間状態の蛍光強度の和の比である。 $Q_{R,FI}$ と $Q_{R,IU}$ の使用は $\langle \lambda \rangle_F$ 、 $\langle \lambda \rangle_I$ 、 $\langle \lambda \rangle_U$ の蛍光強度をノーマライズすることを意味する [53]。 $\langle \lambda \rangle_F$ 、 $\langle \lambda \rangle_I$ 、 $\langle \lambda \rangle_U$ は GdnHCl 濃度に直線の相関があると仮定した。

非線形回帰分析は、熱力学的パラメーターを算出するために実験値から算出した $\langle \lambda \rangle$  ( $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ ) に式 1 に示した理論 $\langle \lambda \rangle$  ( $\langle \lambda \rangle_{\text{calc}}$ ) をフィッティングすることによって行った。非線形回帰分析には補正した $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ を使用した。フラクションは以下のように定義される。

$$\begin{aligned}f_F &= \frac{1}{1 + K_{FI} + K_{FI}K_{IU}} \\ f_I &= \frac{K_{FI}}{1 + K_{FI} + K_{FI}K_{IU}} \\ f_U &= 1 - f_F - f_I\end{aligned}$$

$f_F$ 、 $f_I$  および  $f_U$ はそれぞれ天然状態、中間状態、変性状態のフラクションである。すべてのフィッティング計算は、IGOR pro (Wavemetrics, Eugene, OR, USA) を用いて行った。

#### 1-4. 三状態遷移モデルの解析に使用した条件の仮定

本研究では解析のために、いくつかの状態を仮定した。0 M および 6 M GdnHCl における G-CSF の  $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$  はほぼ同様であり、天然状態と変性状態の蛍光スペクトルは変異体間で同一と仮定した。また、野生型 G-CSF の *F*-to-*I* 遷移の間の局所的な変化を表す Trp58 近傍は環状化 G-CSF のコネクター領域と離れているため、G-CSF の環状化は *F*-to-*I* 遷移の Trp58 近傍の構造変化に影響を及ぼさないと仮定した。それゆえに、変異体間の中間状態の蛍光スペクトルも同一と仮定した。この仮定は、変異体間の  $\langle \lambda \rangle_F$   $\langle \lambda \rangle_I$  および  $\langle \lambda \rangle_U$  (Table 3-1) のベースラインの *y* 切片が同一であることを仮定する。加えて、*F*-to-*I* 遷移の熱力学的パラメーターは変異体間で同一と仮定した。

蛍光スペクトルの形状の GdnHCl 濃度依存性について、本論文では天然状態と中間状態のピュアスペクトルは変性剤濃度に依存せず、変性状態のピュアスペクトルは変性剤の濃度によって変化すると仮定した。この仮定は、 $\langle \lambda \rangle_F$  と  $\langle \lambda \rangle_I$  のベースラインの傾きをゼロに固定すること、および  $\langle \lambda \rangle_U$  のためにベースラインの傾きとして変異体間で同一の値として使うことを示す (Table 3-1)。

式 1 を用いて非線形回帰分析を行うために、二つのパラメーターの値を固定した。天然状態と比較した中間状態の蛍光強度の和の比 ( $Q_{R,FI}$ ) および中間状態と比較した変性状態の蛍光強度の和の比 ( $Q_{R,IU}$ ) である。0–2 M GdnHCl 存在下において、蛍光スペクトルの蛍光強度の和は各変異体で変化せず、*F*-to-*I* 遷移の間で蛍光強度の和が一定であることを示した。よって、 $Q_{R,FI}$  の値はすべての変異体で 1 と固定した (Table 3-1)。一方で、4 M GdnHCl における変異体間の蛍光強度の和は、2 M GdnHCl の蛍光強度の和より数倍大きかった。よって、C166, C177, L175 の  $Q_{R,IU}$  はそれぞれ 4.5, 5.0, 4.2 に固定した (Table 3-1)。  $Q_{R,IU}$  は 4–6 M GdnHCl 存在下における蛍光強度の平均値を 0–2 M GdnHCl 存在下における蛍光強度の平均値で割ることによって取得した。

#### 1-5. 二状態遷移モデルを使った平衡論解析と条件の仮定

G-CSF は *F*-to-*I* 遷移の間の蛍光スペクトル変化が小さい。そのため、三状態遷移モデルを使用したフィッティング解析には、複数の仮定と固定値を含んでいる。先行研究では、二状態遷移で行っている例もある [30,48]。二状態遷移モデルでも同様の結果であることを確かめるために、本論文においても二状態遷移モデルも使って G-CSF 変異体を解析した。フォールディング/アンフォールディング平衡は以下のように表される。



ここで、*F* および *U* はそれぞれ天然状態および変性状態である。 $K_{FU}$  は天然状態から変性状態 (*F*-to-*U*) への平衡定数である。

平衡定数は以下の式で定義される。

$$G_U - G_F = \Delta G_{FU} = -RT \ln K_{FU}$$

$$K_{FU} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{FU}}{RT}\right)$$

$\Delta G_{FU}$ は天然状態と比較した変性状態のギブスの自由エネルギー変化である。さらに、 $\Delta G_{FU}$ は以下のように表される。

$$\Delta G_{FU} = \Delta G_{FU}^0 - m_{FU}[\text{GdnHCl}]$$

$\Delta G_{FU}^0$ はそれぞれ GdnHCl 非存在下の  $\Delta G_{FU}$  である。 $m_{FU}$ は  $F$ -to- $U$  遷移における  $m$  値であり、GdnHCl 濃度のギブスの自由エネルギー変化の依存性を示す。一般的に、 $m$  値は蛋白質の構造遷移の協同性を表す。 $\langle \lambda \rangle$ は以下の理論式によってあらわされる(式 2)。

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\langle \lambda \rangle_F + \frac{K_{FU}}{Q_{R,FU}} \langle \lambda \rangle_U}{1 + \frac{K_{FU}}{Q_{R,FU}}} \dots (2)$$

ここで、 $\langle \lambda \rangle_F$ および $\langle \lambda \rangle_U$ は天然状態と変性状態の $\langle \lambda \rangle$ である。 $Q_{R,FU}$ は変性状態と比較した天然状態の蛍光強度の和の比である。この比をノーマライズに使用した [53]。 $\langle \lambda \rangle_F$ および $\langle \lambda \rangle_U$ は GdnHCl 濃度に直線の相関があると仮定した。

式 2 に示した $\langle \lambda \rangle_{\text{calc}}$ を $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ にフィッティングすることによって非線形回帰分析を行い、熱力学的パラメーターを算出した。非線形回帰分析には補正した $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ を使用した。フラクションは以下のように定義される。

$$f_F = \frac{1}{1 + K_{FU}}$$

$$f_U = 1 - f_F$$

$f_F$ および $f_U$ はそれぞれ天然状態、および変性状態のフラクションである。すべてのフィッティング計算は、IGOR pro (Wavemetrics, Eugene, OR, USA) を用いて行った。



## 2. 結果

### 2-1. 熱変性実験

作製した G-CSF の構造安定性を調べるために、222 nm でモニターした CD 測定を使って熱変性実験を行った (Figure 3-1)。すべての変異体において、ヘリックス構造は昇温によって減少し、不可逆に変性した。よって、この実験を経て得られる変性中点温度 ( $T_m$ ) は、変異体間の相対的な安定性の違いを比較できる見かけの  $T_m$  値であるものの、先行研究で報告された G-CSF の見かけの  $T_m$  値と L175 の見かけの  $T_m$  値 (57°C) はほぼ同一だった[44,54]。C177, C170, C166, C163 の見かけの  $T_m$  値は C166 ( $69 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ) > C170 ( $64 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ) > C177 ( $61 \pm 1.4^\circ\text{C}$ ) > C163 ( $58 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) > L175 ( $57 \pm 0.0^\circ\text{C}$ ) の順に熱に安定であり、C177, C170, C166, C163 は L175 に比べてそれぞれ 4.2°C, 7.9°C 12.9°C, および 1.8°C 上昇したことが分かった。よって、主鎖環状化が構造安定性の向上に効果的であることを示した。環状化変異体の間で、コネクター長のデザインを行った C166 と C170 は、コネクター長をデザインしていない C177 に比べて構造安定性が高かった。一方で、C163 は C177 よりも低い見かけの  $T_m$  値を示した。C163 は環状化した末端の長さが許容範囲を超えて短かったため、末端にひずみが発生し、構造を不安定化したと考えられる[55]。

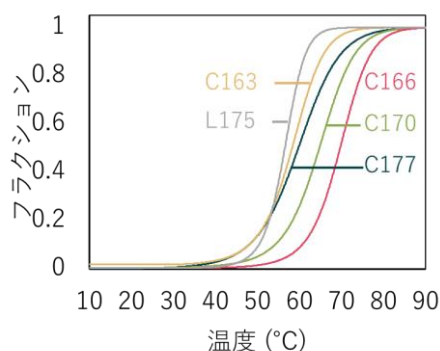


Figure 3-1. CD を用いた昇温測定による熱安定性 図中のフラクションは、変性状態のフラクションを表す。全ての実験は蛋白質濃度 0.1 mg/mL として、10 mM PBS (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM 塩化ナトリウム) 緩衝液 (pH 7.4) を用いて行った。

Figure adapted with Figure 4(A) in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00776>

Copyright © 2017 American Chemical Society.

## 2-2. 化学変性実験

C166、C177、L175 の構造安定性を比較するために、GdnHCl を用いた化学変性実験を行った。溶媒の pH は以下の二つの理由により、pH 4 で行った。一つ目の理由として、フィルグラスチム (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) を含む G-CSF 製剤は、pH 4 に調整されていることが挙げられる。よって、pH 4 における G-CSF 変異体の安定性の評価は、医薬品の保管安定性の改善に役立つと期待される。また、野生型 G-CSF は中性 pH で凝集しやすいことがわかっているため、平衡状態における熱力学的安定性を評価することが困難である。一方で、pH 4 における天然の G-CSF は、中性 pH に比べて高い構造安定性とコロイド安定性を持ち、凝集性も低いことがわかっている[30,56]。よって、pH 4 の溶媒における測定はこれらの変異体の安定性の評価に適していると判断した。

これらのサンプルを 0–6 M を含む 100 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 下に置き、3 時間 4°C で静置した。すべての G-CSF 変異体は二つのトリプトファン残基 (Trp58 と Trp118) を含む。よって、G-CSF の三次構造変化を GdnHCl 濃度依存的な蛍光スペクトル変化を測定することによってモニターした。スペクトルの変化を解析するために、蛍光スペクトルのスペクトル重心波長 ( $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ ) を算出した。

L175 の蛍光スペクトルは全ての GdnHCl 濃度で単一ピークを示した。L175 のアンフォールディングとリフォールディングカーブは重なったので (Figure 3-2(a))、スペクトル変化はこの実験条件下で可逆であることを示唆した。0–1.5 M (低濃度) GdnHCl において、L175 のスペクトルは短波長側にシフトした (すなわち、 $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$  は減少した)。対照的に、1.5–4 M (中濃度) GdnHCl において、L175 のスペクトルは長波長側にシフトした (すなわち、 $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$  は増大した)。

野生型 G-CSF の同様の測定が、Narhi らによって報告されている [51]。野生型 G-CSF 構造変化の可逆性が GdnHCl 存在下かつ酸性条件下において観察された。野生型 G-CSF の蛍光スペクトルは二方向にシフトし、短波長および長波長側へのシフトはそれぞれ天然状態から中間状態への構造遷移 ( $F$ -to- $I$ )、および中間状態から変性状態への構造遷移 ( $I$ -to- $U$ ) とみなされた。本実験においても、これらの二つの構造変化がほぼ同様の GdnHCl 濃度で起きていた。よって、以前に報告された野生型 G-CSF と同様に、L175 が三状態遷移を経てフォールドまたはアンフォールドすると結論付けた。

野生型 G-CSF は以下のような過程を経ての三状態遷移すると考えられている [51,52]。低 GdnHCl 濃度では、 $F$ -to- $I$  によって Trp58 の近傍の残基が局所的に構造変化するため、Tyr85 から Trp58 へのエネルギー移動が減衰する。その変化は蛍光スペクトルのより短い波長側へのシフトとして観察される。中間 GdnHCl 濃度では、野生型 G-CSF の Trp58 と Trp118 は  $I$ -to- $U$  によって溶液中にさらされ、全体分子の構造はグローバルに壊れる。この二つ目の変化は蛍光スペクトルの長波長側へのシフトとして観察される。野生型 G-CSF の化学変性は、CD スペクトルの変化でモニターした[51]。CD データの比較は、野生型 G-CSF の  $I$ -to- $U$  の遷移は GdnHCl 濃度が野生型 G-CSF の CD スペクトル変化と同様であ

ることを示した。加えて、*F*-to-*I*遷移が起こったスペクトルに近い GdnHCl 濃度では CD スペクトル変化は観察されなかった [51]。

C166 と C177 における GdnHCl 濃度の $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ の依存性を L175 の GdnHCl 濃度の $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ の依存性と比較した。L175 と同様に、環状化 G-CSF は可逆で三状態遷移を示している (Figure 3-2)。GdnHCl 非存在下では、全ての変異体の $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ は同様 (348–350 nm) であることがわかった。天然状態における二つの Trp 残基の近傍の三次構造は、環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF の間で同様であることを意味する。中間 GdnHCl 濃度では、環状化 G-CSF の $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ は、L175 と同様に、GdnHCl の濃度が増大するにしたがって顕著に増大した。しかし、環状化 G-CSF における $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ の増大は L175 のそれに比べて GdnHCl 濃度が高かった。さらに、C166 で観察された GdnHCl 濃度は C177 で観察された GdnHCl 濃度よりも高かった。長波長側へのシフトは *I*-to-*U* の構造遷移とみなされるので、より高い GdnHCl 濃度は中間構造の高い安定性を示唆する。4–6 M (高濃度) GdnHCl では、全ての変異体の $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ は同様の値に達した (358–360 nm)。この結果から、L175 と環状化 G-CSF の変性構造における 2 つのトリプトファン残基の近傍の構造は同様であることを示唆した。

### 2-3. 熱力学的安定性の解析

非線形回帰分析を使用して実験値から得たスペクトル重心波長 ( $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ ) に式 1 の $\langle \lambda \rangle_{\text{calc}}$ の理論値をフィッティングすることによって、G-CSF 変異体の熱力学的安定性を評価した。効率よく計算するために、いくつかの仮定を使用した (第 3 章 1. 方法 1-4. 三状態モデルの解析に使用した条件の仮定 参照) (Table 3-1)。

Figure 3-2 と Table 3-1 には、非線形回帰分析の結果を示す。 $\langle \lambda \rangle_{\text{calc}}$ の理論カーブはよく $\langle \lambda \rangle_{\text{obs}}$ にフィットした (Figure 3-2a)。トータルのギブスの自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0_{FU}$ ) (GdnHCl 非存在下における天然状態のギブスの自由エネルギーと比較した中間状態の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0_F$ ) と、GdnHCl 非存在下における中間状態のギブスの自由エネルギーと比較した変性状態の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0_U$ ) の合計) は、C166 (34 kJ mol<sup>-1</sup>) > C177 (32 kJ mol<sup>-1</sup>) > L175 (23 kJ mol<sup>-1</sup>) の順に減少した。C166 は 3 つの変異体の中で最も熱力学的に安定であることが示された。一方で、3 つの変異体の *m* 値の合算値、すなわち *m<sub>F</sub>* と *m<sub>U</sub>* の合計は同様だった (C166、C177、L175 でそれぞれ 17, 17, 16 kJ mol<sup>-1</sup> M)。この結果は、変性状態の構造の溶媒露出面積 (ASA) は 3 つの変異体間で変わらないことを示唆する。

非線形回帰分析から得た熱力学的パラメーターから、*f<sub>F</sub>*、*f<sub>I</sub>*、および *f<sub>U</sub>* のフラクシオンを算出した (Figure 3-2b)。*f<sub>F</sub>* と *f<sub>I</sub>* は G-CSF 変異体の *F*-to-*I* 遷移に伴って緩やかに変化し、*f<sub>U</sub>* はシャープに *I*-to-*U* 遷移に伴って変化した。

二状態遷移モデルを用いて同様の解析を行った結果、GdnHCl 非存在下における変性状態のギブスの自由エネルギーと比較した中間状態の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^0_{FU}$ ) は、

C166 ( $23 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ )  $\cong$  C177 ( $23 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ )  $>$  L175 ( $18 \pm 1.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) の順に減少した。C166 と C177 の間の値は三状態遷移モデルを用いた解析結果に比べて小さくなったものの、全体として同様の結果が得られた。

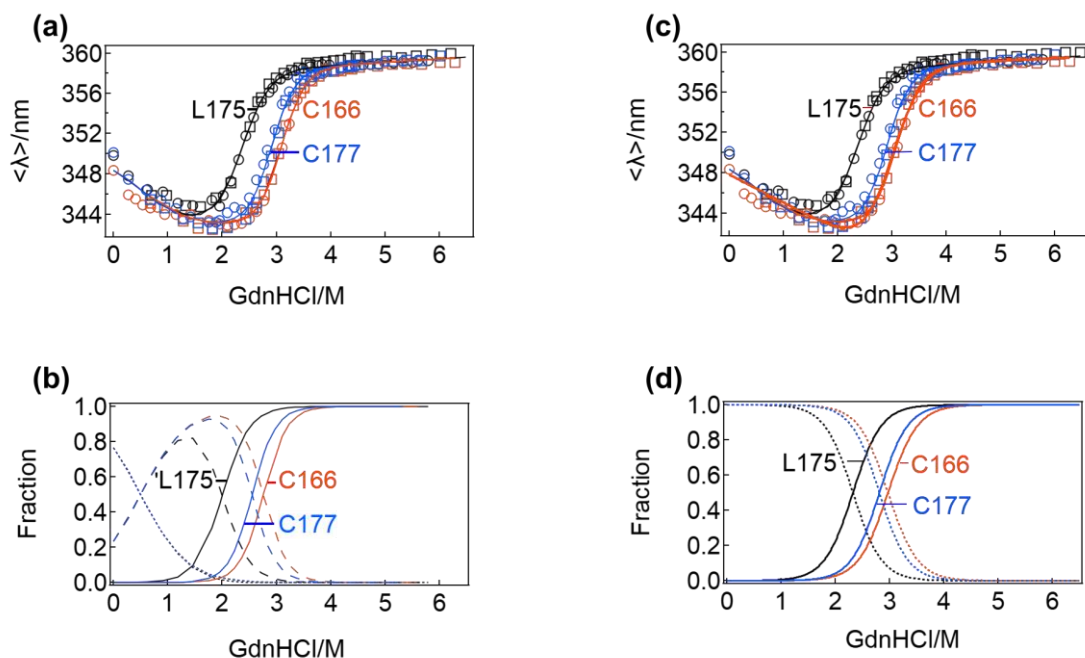


Figure 3-2. 三状態遷移および二状態遷移モデルに基づく GdnHCl 変性による蛋白質の三次構造変化 三状態遷移モデル (a, b) および二状態遷移モデル (c, d) とスペクトル重心波長 ( $\langle \lambda \rangle$ ) を使って解析した。(a, c) GdnHCl 濃度に対してアンフォールディング過程 (丸) とリフォールディング過程 (四角) の  $\langle \lambda \rangle$  をプロットし、 $\langle \lambda \rangle$  に対してフィッティングを行った。(b, d) フィッティングパラメーターから計算したフラクシオン。天然状態のフラクシオン ( $f_F$ ) を点線、中間状態のフラクシオン ( $f_I$ ) を破線、変性状態のフラクシオン ( $f_U$ ) を実線で示す。全ての実験は 0–6 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した 0.1 mg/mL 蛋白質溶液を用いて行った。

Figures (a)–(d) reprinted with Fig. 5 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc..

Table 3-1. 化学変性実験から得て三状態遷移モデルを使って解析した G-CSF の熱力学的パラメーター

	C166	C177	L175
天然構造のベースラインの傾き	0 (fixed value)	0 (fixed value)	0 (fixed value)
天然構造のベースラインの切片	$3.5 \times 10^2$ (fixed value)	$3.5 \times 10^2$ (fixed value)	$3.5 \times 10^2$ (fixed value)
中間構造のベースラインの傾き	0 (fixed value)	0 (fixed value)	0 (fixed value)
中間構造のベースラインの切片	$3.4 \times 10^2 \pm 0.22$	$3.4 \times 10^2 \pm 0.22$	$3.4 \times 10^2 \pm 0.22$
変性構造のベースラインの傾き	$0.33 \pm 0.09$	$0.33 \pm 0.09$	$0.33 \pm 0.09$
変性構造のベースラインの切片	$3.6 \times 10^2 \pm 0.31$	$3.6 \times 10^2 \pm 0.31$	$3.6 \times 10^2 \pm 0.31$
$\Delta G^0_{FI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$2.9 \pm 0.40$	$2.9 \pm 0.40$	$2.9 \pm 0.40$
$m_{FI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M)	$5.8 \pm 0.68$	$5.8 \pm 0.68$	$5.8 \pm 0.68$
$C_{M, FI}$ (M)	0.50	0.50	0.50
$Q_{R, FI}$	1.0 (fixed value)	1.0 (fixed value)	1.0 (fixed value)
$\Delta G^0_{IU}$ (kJ mol)	$31 \pm 1.9$	$29 \pm 1.8$	$20 \pm 1.3$
$m_{IU}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M)	$11 \pm 0.61$	$11 \pm 0.60$	$9.9 \pm 0.53$
$C_{M, IU}$ (M)	2.8	2.6	2.0
$Q_{R, IU}$	4.5 (fixed value)	5.0 (fixed value)	4.2 (fixed value)
$\Delta G^0_{FU}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$34 \pm 2.3$	$32 \pm 2.1$	$23 \pm 1.6$
$m_{FU}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M)	$17 \pm 1.2$	$17 \pm 1.3$	$16 \pm 1.2$

<sup>1</sup> 変性中点濃度 ( $C_M$ ) は  $\Delta G^0/m$  から得られた。ここで、 $\Delta G^0_{FU}$  は  $\Delta G^0_{FI}$  と  $\Delta G^0_{IU}$  の合計である。

全ての実験は 0–6 M を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に透析した 0.1 mg/mL の蛋白質溶液を用いて行った。

エラーはフィッティング解析の標準誤差を示す。

Table 3-2. 化学変性実験から得て二状態遷移モデルを使って解析した G-CSF の熱力学的パラメーター

	C166	C177	L175
天然構造のベースラインの傾き	$-2.8 \pm 0.16$	$-2.8 \pm 0.16$	$-2.8 \pm 0.16$
天然構造のベースラインの切片	$3.5 \times 10^2 \pm 0.19$	$3.5 \times 10^2 \pm 0.19$	$3.5 \times 10^2 \pm 0.19$
変性構造のベースラインの傾き	$0.21 \pm 0.09$	$0.21 \pm 0.09$	$0.21 \pm 0.09$
変性構造のベースラインの切片	$3.6 \times 10^2 \pm 0.45$	$3.6 \times 10^2 \pm 0.45$	$3.6 \times 10^2 \pm 0.45$
$\Delta G_{FU}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$23 \pm 1.2$	$23 \pm 1.3$	$18 \pm 1.1$
$m_{FU}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M)	$9.0 \pm 0.39$	$9.6 \pm 0.43$	$9.4 \pm 0.47$
$C_M$ (M)	2.6	2.4	1.9
$Q_{R,FU}$	4.5 (fixed value)	5.0 (fixed value)	4.2 (fixed value)

全ての実験は 0–6 M を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に透析した 0.1 mg/mL の蛋白質溶液を用いて行った。

エラーはフィッティング解析の標準誤差を示す。

## 第4章 凝集性の評価

本章では、CD およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた熱に対する凝集性、および X 線小角散乱を用いた変性剤による凝集性を評価することによって、環状化 G-CSF (C166 と C177) と L175 の凝集性を比較した。その結果、環状化 G-CSF、特に C166 が L175 に比べて凝集性が改善したことが明らかになった。C166 と L175 の凝集性の違いは、構造安定性および中間構造と変性構造におけるコロイド安定性の違いを反映していると考えられる。

### 1. 方法

#### 1-1. 円偏光二色性 (CD) による耐熱性試験

測定機器は分光旋光計 (Jasco J-805 spectropolarimeter (Jasco))を用いた。100 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  のサンプル (C166, C177, L175) を 10, 40, 55, 60, 65, 70°C で 3 時間熱処理し、その後 10°C で冷却した。0.1 cm の光路長で 195–260 nm の範囲でサンプルの CD スペクトルを測定した。熱処理前の 222 nm の平均残基モル楕円率で熱処理後の 222 nm の平均残基モル楕円率を割ることによって、二次構造残存率を算出した。

#### 1-2. 長期凝集性試験

熱保存期間に対する凝集性を比較するために、一定温度で数日間保管した後の単量体残存量の測定 (長期凝集性試験) を行った。C166 と L175 を 5% ソルビトールおよび 0.004% Tween80 を含む 10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に一晩透析した。透析および 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター処理後、サンプル濃度を 0.3 mg/mL に調節した。濃度調節したサンプルは 100  $\mu\text{L}$  ずつ 15 本に分注し、50°C で保管した。

保管から 0–5 日経過後の単量体の量を Superdex75 10/300 カラムを用いて測定した。カラム用の緩衝液は 50mM Tris 100mM NaSO<sub>4</sub> (pH7.5)、流速を 0.8 ml/min、測定波長は 214 nm として、クロマトグラムのピーク面積を計算した。インジェクト量を 0, 2.5, 5, 7.5, 10  $\mu\text{L}$  に変化させたときのピーク面積をプロットし、ピーク面積とインジェクト量 (蛋白質量) は比例していた。よって、クロマトグラムのピーク面積を単量体量として計算した。インジェクト量は 10  $\mu\text{L}$  とし、50°C 保管前 (保管から 0 日経過後) の単量体のピーク面積を 100% として、単量体の残存率を算出した。

#### 1-3. X 線小角散乱測定

高濃度の C166 と L175 を 0–5 M の GdnHCl 溶液を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液に 4°C で一晩透析した。サンプルと透析外液のフィルターろ過後、透析外液でサンプルの蛋白質濃度を 3 mg/mL になるように希釈した。透析外液は緩衝溶液として解析に使用した。透析外液の GdnHCl 濃度は 25°C における屈折率と Denaturant Concentration

Calculator (<http://sosick.uchicago.edu/gdncl.html>) [49]を使って算出した。屈折率は Automatic Digital Refractometer RX-5000  $\alpha$  (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて決定した。

SAXS 測定は高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の Photon Factory (PF) にある BL-10C または BL-6A のビームラインで行った。カメラ長は (1005 mm) は標準資料としてベヘン酸銀の散乱パターンを使って校正した[57]。X 線の波長は 0.15 nm、サンプルのビームスポットは 4 mm (width)  $\times$  5 mm (height) とした。サンプルを入れるセルは光路長が 0.125 mm の石英セルを使用した。X 線散乱は、PILATUS3 1M (DECTRIS, Baden-Daettwil, Switzerland) で検出した。測定の温度は、 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  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、濃度条件毎に 15 枚のデータを取得した。画像の次元化には Nika[58]を用いた。

#### 1-4. X 線小角散乱解析

それぞれの散乱強度  $I(q)$  の吸収係数は、それぞれの溶媒の X 線透過光を使って取得した。また、実験のセットアップのスタンダードとして水の散乱を使って絶対強度化した。緩衝溶液の散乱強度を蛋白質の散乱強度から差し引き、水のゼロ角度外挿した散乱強度を使って絶対強度  $I(q)$  ( $\text{cm}^{-1} (\text{mg/mL})^{-1}$ ) に変換した[59,60]。  $q$  は散乱パラメーターであり、散乱ベクトル  $(q)$  は以下のように与えられる。

$$q = |\mathbf{q}| = 4\pi \sin\theta / \lambda$$

ここで、 $2\theta$  は散乱角であり、 $\lambda$  は X 線の波長である[61]。

回転半径 ( $R_g$ ) と原点散乱強度 ( $I(0)$ ) は、散乱曲線の  $qR_g < 1.3$  を満たすギニエ領域 ( $0 < q < 1/R_g$ ) においてギニエ近似を行うことによって決定できる[61]。

$$I(q) \approx I(0) \exp\left(-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right)$$



## 2. 結果

### 2-1. 熱耐性実験

G-CSF は熱に対して不可逆に変性する。主鎖環状化が G-CSF の熱に対する凝集性を改善するかどうか明らかにするために、C166、C177、および L175 の熱耐性を CD スペクトル測定によって調べた。

まず、熱処理前の 10°C 下における CD スペクトルを測定した。続いて、サンプルを各温度で 3 時間熱処理した後、10°C に急冷した。熱処理後のサンプルの CD スペクトルを 10°C で測定した。その結果を Figures. 4-1a–4-1g に示す。G-CSF の耐熱性は二次構造残存率に基づいて評価した。二次構造残存率は 222 nm における熱処理前の CD 強度に対する熱処理後の CD 強度の比率によって定義した (Figure 4-1h)。

熱処理前の CD スペクトルは、Figure 1-7 と同様であった (Figure 4-1a)。実験に使用したサンプルが 208 nm と 222 nm に極小値を持つヘリックスリッチな蛋白質であることを確かめた。222 nm における熱処理前の CD 強度を、100% の二次構造残存率とした。

10°C および 40°C で熱処理したサンプルの二次構造に変化はなかった (Figures. 4-1b および 4-1c)。しかし、55°C 以上で熱処理した L175 はその特徴を失った (Figure 4-1d)。これは変性構造がリフォールディングせずに不可逆に凝集したことを示唆する。55°C で熱処理した C166 と C177 は熱処理前のスペクトルと同様だった (Figure 4-1d)。60°C で熱処理した C166 の二次構造残存率は 95% 以上だった一方で、C177 の二次構造残存率はおおよそ 78% になった (Figure 4-1e)。また、65°C で熱処理した C166 の二次構造残存率も 95% 以上であったが、C177 の二次構造残存率はほぼ完全に消失した (Figure 4-1f)。熱処理後の 3 つの変異体の二次構造残存率の比較によって、C166 がもっとも高い熱耐性を持つことがわかった (Figure 4-1h)。耐熱性は、C166、C177、L175 の順であった。

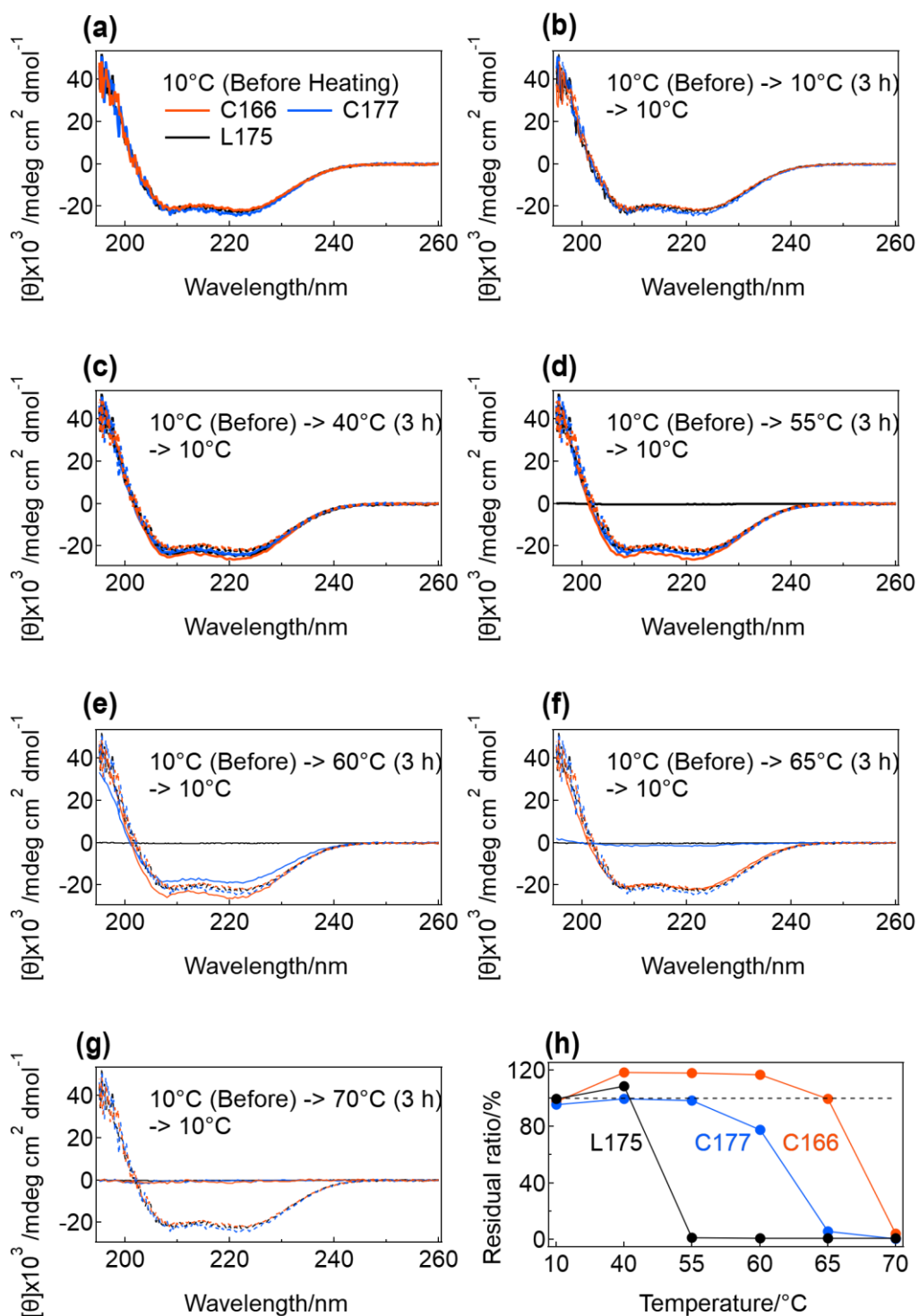


Figure 4-1. 熱処理による二次構造変化 (a) 熱処理前の C166、C177、L175 の CD スペクトル。 (b)–(g) 各温度で熱処理後の CD スペクトル (実線) と熱処理前の CD スペクトル (破線)。 (h) 222 nm における CD 強度を基に計算した二次構造残存率。全ての実験は

100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した 0.08 mg/mL 蛋白質溶液を用いて行った。

Figures (a)–(h) reprinted with Fig. 4 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

## 2-2. 長期凝集性試験

熱耐性の実験によって、G-CSF の主鎖環状化が 3 時間の熱処理に対して安定性を向上させることが分かった。次に、熱保存期間に対する耐熱性の違いがあるかどうかを調べるために、C166、C177、L175 の長期凝集性試験を行った。50°C で 0-5 日間熱処理を行い、C166 と L175 の単量体量が減少する時間経過を測定した (Figure 4-2)。

L175 の単量体量は、0.5 日後に 97%、1 日後に 88%、1.5 日後に 73%、2 日後に 38%、3 日後に 13% に減少した。一方、C166 と C177 の単量体は 0-5 日間で 94% 以上を維持していた。よって、L175 に比べて C166 と C177 の長期凝集性が低いことがわかった。

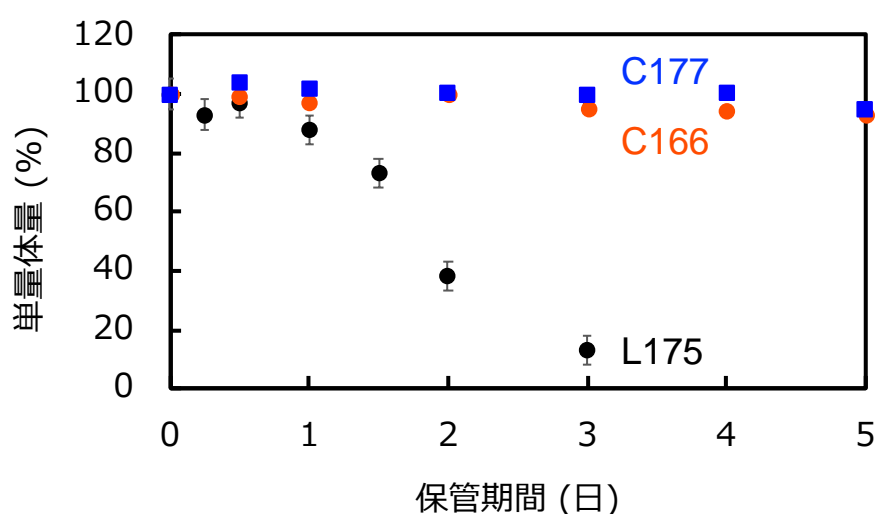


Figure 4-2. 長期凝集性試験の結果 プロットした値は平均値であり、誤差は計 5 回測定した値の標準誤差を表す。

## 2-3. SAXS 解析

各 GdnHCl 濃度における C166 と L175 の分子サイズを調べるために、SAXS 測定を行った (Figure 4-3 および Table 4-1)。

まず、GdnHCl を含まない 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に透析した L175 の散乱曲線 [ $I(q)$  vs.  $q$ ] を両対数表示でプロットした (Figure 4-3(b))。L175 の散乱曲線は球状蛋白質の特徴を示した。次に、低角領域におけるギニエ近似から回転半径 ( $R_g$ ) を求めた。ギニエ近似によって  $I(0)$  も求めることができる。 $I(0)$  は分子量に比例する [61] ので、同じ分子量のサンプルが共に分散していれば、 $I(0)$  は同様の値になる。よって、同じ分子量のサンプルの  $I(0)$  を比較することによって、測定条件に依存するサンプルの分散性を評価できる。しかし、前述の超遠心分析によって、0.8 mg/mL 以上の C166 と L175 は 0 M GdnHCl 存在下においても 5% 未満の凝集体を含みうることが分かった。よって、蛋白質濃

度決定が不正確であり、 $I(0)$ の値の信頼性も低いと考えられる。さらに、GdnHCl 濃度に依存して溶媒の電子密度が上がるため、溶媒を差し引いたタンパク質溶液の  $I(q)$  および  $I(0)$  は低下する。よって、 $I(0)$ の比較は分散性の単純比較にならない。これらの理由から、本論文では  $I(0)$ を用いた比較は困難と判断した。一方、見かけの  $R_g$  は蛋白質濃度に依存しない。よって、本論文では見かけの  $R_g$ を用いた単量体および凝集体の分子サイズの比較を行った。凝集体も含むサンプルの見かけの  $R_g$ の算出のために、 $q = 0.025\text{--}0.045$  を本論文のギニエ領域とした。見かけの  $R_g$ の変化は Table 4-1 に示す。GdnHCl 非存在下における L175 の見かけの  $R_g$  は  $18 \pm 0.3 \text{ \AA}$  であった。

0.5 M GdnHCl 存在下および 1.5 M GdnHCl 存在下における見かけの  $R_g$  は、10%以内の上昇に留まった（それぞれ  $20 \pm 0.43 \text{ \AA}$ ,  $20 \pm 0.72 \text{ \AA}$ ）。散乱曲線もグアニジン非存在下における散乱曲線と重なった（Figure 4-3(b)）。2.0 M GdnHCl 存在下では、白濁が観察された。白濁を除去するための  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルター操作によりサンプルが消失したため、測定できなかった。観察された白濁は、フィルターの孔径である  $0.22 \mu\text{m}$  より大きいサイズの凝集体であったと考えられる。2.8 M GdnHCl 存在下において、見かけの  $R_g$  が  $77 \pm 5.6 \text{ \AA}$  に大きくなった。さらに、3.4 M GdnHCl 存在下においても、見かけの  $R_g$  が  $84 \pm 7.7 \text{ \AA}$  であった。散乱曲線も傾きが大きいグラフになった。5.0 M GdnHCl 存在下において散乱曲線は変性構造の特徴を示した（Figure 4-3(b)）。見かけの  $R_g$  は  $53 \pm 3.4 \text{ \AA}$  であった。

この見かけの  $R_g$  の変化はギニエプロット [ $I(q)$  vs  $q^2$ ]からも観察できる（Figure 4-3(d)）。ギニエプロットの直線の傾きは見かけの  $R_g$  に比例する。0–1.5 M GdnHCl 存在下においてはほぼ同一の直線であった一方で、2.8 M および 3.4 M GdnHCl 存在下では  $I(q)$ の傾きである見かけの  $R_g$  の上昇が観察された。見かけの  $R_g$  の増大は凝集の存在を示唆している。

クラツキープロット [ $q^2 I(q)$  vs.  $q$ ]は、蛋白質が球状分子か変性構造かを見分けることができる[61]。GdnHCl 非存在下における L175 のクラツキープロットは極大値を一つ持つ単一ピークであり、球状蛋白質の特徴を示した（Figure 4-3(f)）。しかし、GdnHCl 濃度が上昇するにつれて極大値は見かけの  $q$  の低角度側に移動した。これはサンプルの分子サイズが増大したことを示す。

5 M GdnHCl 存在下においては GdnHCl 非存在下のような特徴は消失し、変性構造に特徴的なスペクトルを示した。

C166 についても同様に測定した。GdnHCl 非存在下において、C166 の散乱曲線は L175 と同様であり（Figure 4-3(a)）、見かけの  $R_g$  もそれぞれ  $16 \pm 0.5 \text{ \AA}$  で L175 と類似していた。この結果は、CD スペクトル解析、超遠心分析、蛍光スペクトル解析の結果と合わせて、溶液中における C166 と L175 の天然構造（二次構造および三次構造）は同様であることを示す。

0.5–2.0 M GdnHCl 存在下において、C166 は GdnHCl 非存在下の散乱曲線の特徴を維持していた（Figure 4-3(a)）。また、見かけの  $R_g$  は  $16\text{--}20 \text{ \AA}$  であり、0 M GdnHCl の値と大

きな変化はなかった。特に、2.0 M GdnHCl 存在下において明確な凝集体が見られなかったことから、C166 の GdnHCl に対する凝集性は L175 に比べて低いことがわかった。

2.8 M および 3.4 M GdnHCl 存在下において、C166 の見かけの  $R_g$  はそれぞれ  $35 \pm 1.1$  Å、 $61 \pm 3.5$  Å であった。また、C166 の散乱曲線は L175 の散乱曲線と比べて変化は小さかった (Figure 4-3(a))。2.8M および 3.4 M GdnHCl 存在下における C166 の凝集体の分子サイズは、L175 の分子サイズより小さいことが分かった (Table 4-1)。

5.0 M GdnHCl において、C166 の散乱プロファイルは、部分変性構造の特徴を示した。見かけの  $R_g$  は  $46 \pm 1.8$  Å であり、L175 より小さかった (Figure 4-3(a))。

C166 のギニエプロットの変化も観察した (Figure 4-3(c))。見かけの  $R_g$  の比較の結果と同様に、0–2 M および 5 M GdnHCl 存在下において傾きの増大は観察されなかった。2.8 M および 3.4 M GdnHCl 存在下において凝集が見られたが、L175 に比べて傾きの増大が抑えられていた。

C166 のクラツキープロットは、L175 のような極大値の変化は観察されず、GdnHCl 濃度が上がるにつれて徐々に球状蛋白質の特徴を消失した (Figure 4-3(e))。しかし、5 M GdnHCl 存在下においても極大値をわずかに維持していた。C166 は環状化によって変性構造がコンパクトになり、部分変性構造の特徴を示したと考えられる。この結果は、超遠心分析による結果とも一致する (Figure 2-22)。

よって、C166 は L175 よりも 2.0 M–3.4 M GdnHCl 濃度のときに凝集性が低いことがわかった。GdnHCl に対する構造安定性の違いと、中間構造および変性構造のコロイド安定性の違いが凝集性の違いに反映されていると考えられる。C166 の凝集性の改善については、考察で議論する。

Table 4-1. C166 と L175 の各 GdnHCl 濃度に対する見かけの  $R_g$  の変化

GdnHCl(M)	$R_g / \text{\AA}^{-1}$	
	C166	L175
0.00	$16 \pm 0.54$	$18 \pm 0.33$
0.54	$20 \pm 0.20$	$20 \pm 0.43$
1.3	$17 \pm 0.74$	$19 \pm 0.72$
2.0	$20 \pm 0.56$	n.d.
2.9	$35 \pm 1.1$	$77 \pm 5.6$
3.5	$61 \pm 3.5$	$84 \pm 7.7$
5.0	$46 \pm 1.8$	$53 \pm 3.4$

全ての実験は 0–5 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した 3 mg/mL 蛋白質溶液を用いて行った。

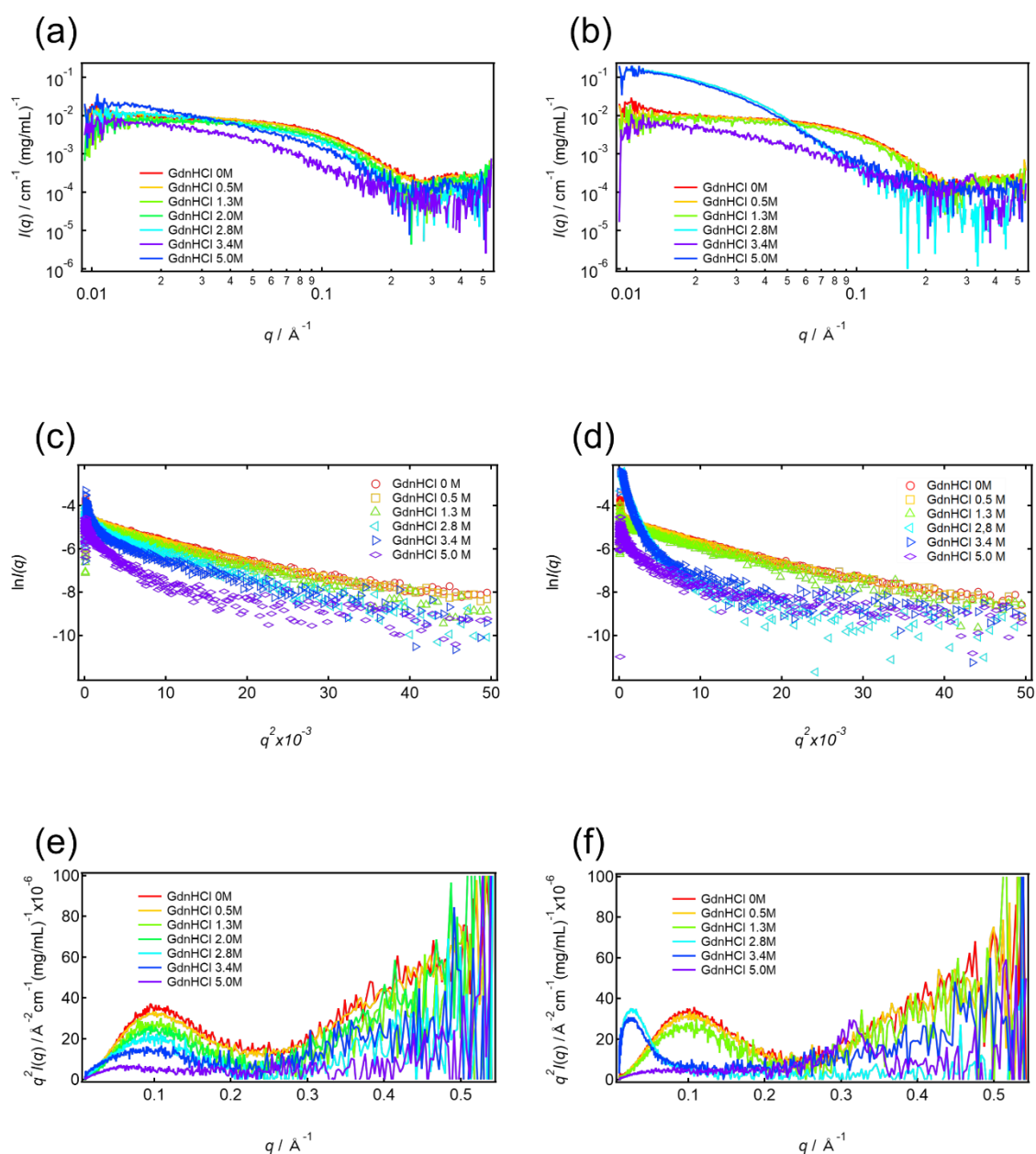


Figure 4-3. SAXS による凝集性の評価 C166 の結果 (a, c, e) と L175 の結果 (b, d, f)。(a, b) 散乱曲線  $[I(q) \text{ vs } q]$ 。両軸は対数プロットで示している。(c, d) ギニエプロット  $[\ln I(q) \text{ vs } q^2]$ 。(e, f) クラツキープロット  $[q^2 I(q) \text{ vs } q]$ 。全ての実験は 0–5 M GdnHCl を含む 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析した 3 mg/mL 蛋白質溶液を用いて行った。



## 第 5 章 安定化に寄与した因子の評価

3 章および 4 章の解析によって、環状化 G-CSF の構造安定性の向上と凝集性の減少が明らかになった。本章では、最も構造安定化した主鎖環状化 G-CSF (C166) および L175 の平衡状態における天然構造の構造安定性と構造安定化に寄与した因子を調べた。その結果、C166 は主鎖環状化による変性構造のエントロピー減少と、分子内水素結合による天然構造のエントルピー増大の相乗効果によって安定化したことがわかった。

### 1. 方法

#### 1-1. 分子動力学シミュレーション

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 MD シミュレーションを行った。L175 の三構造は、MODELLER 9.19 を使ったホモロジーモデリング[62]によって作製した。テンプレート構造を三種の G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A, 1BGC および 1RHG; chain A)、およびターゲット配列を L175 のアミノ酸配列とした。直鎖状 G-CSF の三構造は、それぞれ異なる結晶化条件と電子密度が不明瞭なディスオーダー領域を持つので、互いに同一ではない。初期構造に依存しないロバストな結果を得るために、L175 の三構造を個別に解析した後、平均化した。結晶構造に含まれない水素結合は myPresto の tplgeneX version Feb 12, 2017[63]を使って付加した。

すべての計算は myPresto の cosgene[63]と AMBER99 力場[64]を用いて行った。温度は Hoover-Evans 法[64]による NVT 計算を使って維持された。水分子は陽に扱い、TIP3P モデルを使用した。シミュレーションは半径 35 Å の水球中で実行した。長距離の静電相互作用とファンデルワールス相互作用は高速多重極展開 (FMM)法 [65,66]を用いて計算した。エネルギーは再急降下法を用いて収束させた。蛋白質と水分子を含むすべてのシステムは SHAKE 法 [67]を用いてエネルギー最小化を行った。蛋白質の三次構造は SHAKE 法を用いて温度は 300 K とし、2 フェムト秒の時間刻みで 1000000 回計算を行うことにより計 2 ナノ秒の MD シミュレーションを行った[68]。RMSD の計算は VMD 1.9.4[69]を使用した[69]。L175 の RMSD の値は、L175 の 3 構造を個別で計算した後に平均した。C166 と L175 の両方の RMSD が平衡状態に到達したとされるトラジェクトリーを、平衡状態の天然構造を維持する C166 と L175 の MD 構造セットとして抽出した。この MD 構造セットを分子内水素結合数と天然構造のエネルギーの計算に使用した。

#### 1-2. 分子内相互作用計算

C166 とヒトおよびウシ G-CSF の結晶構造、および C166 と L175 の MD 構造セットを用いて分子内水素結合数を計算した。水素結合は tplgeneX (version Feb 12, 2017)[63]を用いて構造に付加した。水素結合の解析は VMD 1.9.4[69]を用いて行った。水素結合の定義

は、ドナーとアクセプターの原子の距離およびアクセプター-ドナー-水素原子間の角度はそれぞれ 3.5 Å および 30° 以下とした。

G-CSF の二次構造は DSSP プログラム[70]を使って決定した。ヘリックス領域の残基は、全ての G-CSF のヘリックス領域は同じ長さになるように微調整した。コネクター領域は N 末端と C 末端の非構造領域の間のセグメントと定義した。定義したヘリックス領域とコネクター領域は Table 5-1 に示した。疎水性相互作用、イオン間相互作用、芳香環芳香環相互作用、芳香環-硫黄相互作用、およびカチオン- $\pi$ 相互作用は PIC サーバー [71]を用いて検出した。初期構造間の違いから生じるアーティファクトを最小化するために、L175 の 3 つの MD 構造セットを個別に解析し、平均化した値を C166 の値と比較した。MD 構造セットの水素結合については、MD 構造セットの 40%以上に形成された水素結合を平衡状態に形成された安定な水素結合と判断した。

主鎖の二面角は VMD 1.9.4 [69]を用いて計算し、コネクター領域のターンの種類は Wilmot and Thornton [72]の定義に従って分類した。二面角は定義の理想的な角度から 30°、うち一つの角度が 45° までのずれを許容して  $\beta$ -ターンを分類した[41]。

Table 5-1. C166 と L175 の Helix A-D およびコネクター領域または末端変性領域の定義

	C166	L175
Helix A	Gln5-Lys34	Gln12-Lys41
Helix B	Gln64-Ile89	Gln71-Ile96
Helix C	Leu93-Gly119	Leu100-Gly126
Helix D	Ala137-Leu165	Ala144-Leu172
Connector or terminus disordered region	Leu165-Gly166-Ser1-Gln5	Leu172-Pro175 and Met1-Gln12

### 1-3. エネルギー計算

C166 と L175 の構造安定性を比較するために、三つの力場を使って様々なエネルギーを計算した。AMBER99 力場[64]を用いて計算したファンデルワールス相互作用や静電相互作用からなる非共有結合エネルギーは、全 MD 構造セットの値を平均した。一方、CHARMM 力場[73]と FoldX 力場[74]により算出したエネルギーについては、MD 構造セットの中から 100 ピコ秒毎に構造を抽出して計算した。

FoldX 力場[74]により決定された 13 種の  $\Delta G$ を用いて、C166 と L175 の  $\Delta G$ の違い( $\Delta \Delta G = \Delta G_{C166} - \Delta G_{L175}$ )を計算し、主鎖環状化が蛋白質の構造安定性に与える効果を評価した。すべての力場の計算において、L175 のデータは L175 の三構造を個別に解析した後に平均した値である。

## 2. 結果

### 2-1. 分子内水素結合

C166 の構造安定性を理解するために、C166 とヒト G-CSF (PDB code: 2D9Q; chain A) の結晶構造の分子内結合と分子内相互作用 (i.e., 水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用、芳香環-芳香環相互作用、芳香環-硫黄相互作用、およびカチオン- $\pi$  相互作用) の数を PIC server を用いて調べた [71]。分子内相互作用を解析する方法は第 5 章 1. 方法 4-1-2. 分子内相互作用計算に示した。C166 とヒト G-CSF の水素結合数は異なっていた。C166 のコネクター領域 (Leu165-Gly166-Ser1-Gln5, Table 5-1) に、ヒト G-CSF の該当領域 (Leu172-Pro175 and Ser8-Gln12) には (電子密度が欠けているために) 見えない、二つの水素結合が観察された。二つの水素結合 [Leu165(CO)-Ser2(NH) および Gly166(CO)-Leu3(NH)] は主鎖間に形成されていた (Figure 5-1 および Table 5-1)。C166 の他の領域の水素結合数 (分子全体、Helix D, 4 本のヘリックス) (Table 5-1) もヒト G-CSF の水素結合数と比較してそれぞれ 17, 4, 8 個増大していた (Table 5-2)。比較に用いたヒト G-CSF の結晶構造 (PDB code: 2D9Q; chain A) の水素結合数はヒトおよびウシ G-CSF の結晶構造 (PDB code: 1RHG; chain A and 1BGC) より少なかった (Table 5-2)。よって、他の二つの G-CSF の結晶構造と C166 の水素結合数も比較し、同様の結果であることを確かめた。

水素結合以外の他の結合や相互作用数や位置は、C166 とヒトおよびウシ G-CSF の間で明確な違いはなかった。これらの観察はコネクター領域の水素結合数増大により得られた天然構造のエンタルピー減少が、C166 の天然構造の安定化に寄与していることを示唆した。

C166 とヒト野生型 G-CSF は結晶化条件が異なる。また、結晶構造にはクリスタルパッキングや結合のアーティファクトを含むおそれがある。このようなおそれを取り除き、C166 と L175 の構造を同一条件で比較するためには、C166 と複数のヒトおよびウシ野生型 G-CSF の結晶構造を同一条件で MD シミュレーションを行った後に統計的な比較を行う必要がある。さらに、実験の結果と比較するために、野生型 G-CSF のアミノ酸配列を L175 のアミノ酸配列と同一にした上で MD シミュレーションを行った。C166 の天然構造が分子内水素結合によって安定化したかどうかを調べるために、水中および室温条件下の MD シミュレーションを使って C166 と L175 の構造セットを作成した。L175 の初期構造の作成方法は第 5 章 1. 方法 1-1. 分子動力学シミュレーションに記載した。シミュレーション中における C166 と L175 の全原子のトラジェクトリーの RMSD は Figure 5-2a に示した。C166 および L175 の RMSD は 1-2 ナノ秒で平衡に達した (Figure 5-2a)。よって、平衡状態における天然構造を維持していると考えられる 1-2 ナノ秒 (計 1000 構造) のトラジェクトリーを、C166 と L175 の MD 構造セットとして抽出した。

C166 と L175 の MD 構造セットに含まれる平均水素結合数は、C166 およびヒト G-CSF の結晶構造と異なっていた (Figure 5-2(a))。これは MD シミュレーションから得た構造

揺らぎやヒト G-CSF の結晶構造が低分解能であったためと考えられる。C166 の MD 構造セットにおける平均水素結合数は L175 の平均水素結合数よりも多かった。C166 の平均水素結合数は、L175 の平均水素結合数に比べて、分子全体、4 本のヘリックスの合計、ヘリックス D、および変性した N 末端および C 末端領域 (Leu172–Pro175 and Met1–Gln12) に比べてそれぞれ 4.6, 4.2, 4.4 および 0.93 個多かった (Figure 5-2(b), Table 5-1 および Table 5-2)。結晶構造と同様に、C166 は L175 に比べてコネクター領域とヘリックス D の水素結合数が多かった。C166 の天然構造は水素結合を多く含む安定な構造であり、クリスタルパッキングによるアーティファクトではないことを示した。

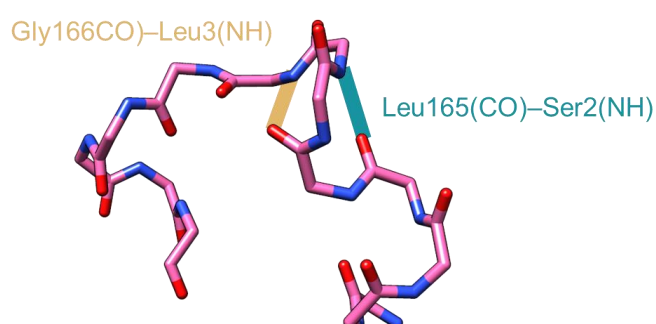


Figure 5-1. C166 結晶構造のコネクター領域に形成された水素結合 水素結合を棒線で表す。

Figure adapted with Fig. 7 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

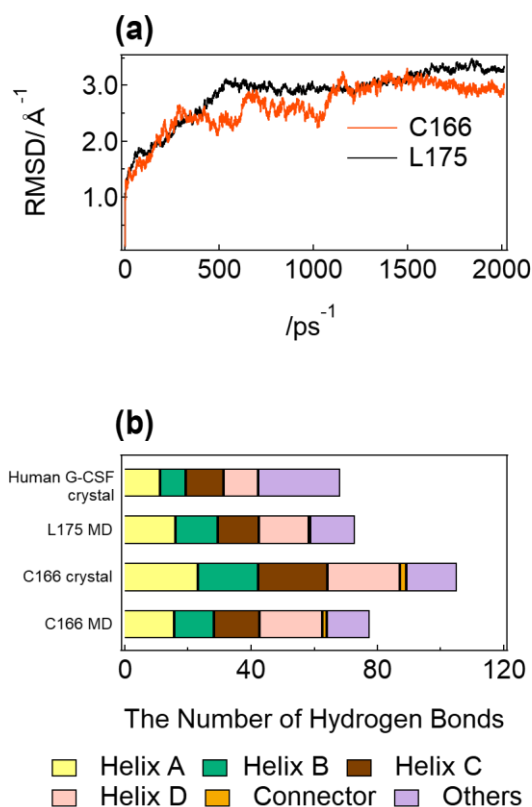


Figure 5-2. 結晶構造と MD 構造を使った C166 とヒト G-CSF または L175 の間の分子内水素結合数の比較 (a) C166 と L175 の 2 ナノ秒分の MD シミュレーションの RMSD プロット (b) C166 と L175 における MD 構造セットの分子内水素結合数の平均値を示す。4 本のヘリックスは Helix A-D とした。Helices A-D と末端の変性領域およびコネクター領域の定義は、Table 4-1 に記載した。

Figures (a) and (b) reprinted with Fig. 8 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc..

Table 5-2.ヘリックス、コネクター領域、末端の変性領域、分子全体に含まれる結晶構造と MD 構造セットの分子内水素結合数

	Crystal structures				MD structural sets	
	C166	Human G-CSF		Bovine G-CSF	C166	L175
		PDB code: 2D9Q; chain A	PDB code: 1RH G; chain A	PDB code: 1B GC		
Helix A <sup>1</sup>	24	12	22	22	16 ± 0.13	17 ± 0.17
Helix B <sup>1</sup>	18	7	14	17	12 ± 0.10	12 ± 0.13
Helix C <sup>1</sup>	22	12	20	21	15 ± 0.13	13 ± 0.15
Helix D <sup>1</sup>	23	11	19	19	20 ± 0.14	16 ± 0.16
All helices	87	42	75	79	62 ± 0.26	58 ± 0.30
Connector or the terminal disorder ed region <sup>1</sup>	2	0	0	0	1.3 ± 0.05	0.30 ± 0.02
Entire structure	105	68	86	88	77 ± 0.29	73 ± 0.26

<sup>1</sup> Helices A–D、コネクター領域および末端の変性領域の定義は Table 5-1 に示した。パラメーターの値とエラーはそれぞれ MD 構造セットの平均値と標準誤差である。

## 2-2. エネルギー計算

C166 の安定化に寄与したエネルギーの種類を調べるために、C166 と L175 の静電相互作用エネルギーとファンデルワールスエネルギーを AMBER99 [64] と CHARMM22 [73] 力場を使って計算した。エネルギー計算の方法は第 5 章 1. 方法 1-3. エネルギー計算に記載した。二種の力場を使った計算は同様の経過を示した (Figure 5-3)。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。非共有結合エネルギーは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の総和であり、前者が C166 と L175 において優位であった。上述のセクションで明らかにしたように、C166 の天然構造における水素結合エネルギーの増大が、二種の力場で見られた静電相互作用エネルギーの低下を導いたと考えられる。ここで、水素結合エネルギーは二種の力場において静電相互作用エネルギーに分類される。

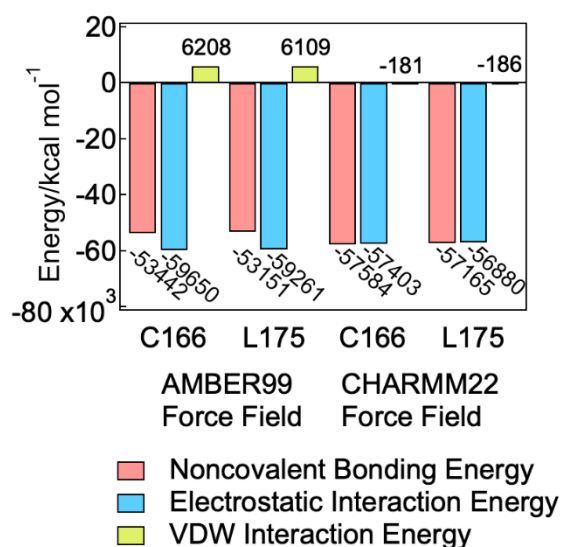


Figure 5-3. AMBER99 力場と CHARMM22 力場を使った非共有結合エネルギー計算 非共有結合エネルギーは静電相互作用とファンデルワールス相互作用の合計である。

AMBER99 力場を使ったパラメーターは MD 構造セットの平均値を示す。C166 の非共有結合エネルギー、静電相互作用エネルギー、ファンデルワールス相互作用エネルギーはそれぞれ  $-5.3 \times 10^4 \pm 14$ ,  $-6.0 \times 10^4 \pm 12$ ,  $6.4 \times 10^3 \pm 7.1$  kcal/mol であった。一方 L175 は、それぞれ  $-5.3 \times 10^4 \pm 33$ ,  $-5.9 \times 10^4 \pm 28$  および  $6.1 \times 10^3 \pm 16$  kcal/mol であった。CHARMM22 力場を使ったパラメーターは MD 構造セットから 100 ピコ秒毎に構造を抽出し分子力学計算した平均値を示す。C166 の非共有結合エネルギー、静電相互作用エネルギー、ファンデルワールス相互作用エネルギーはそれぞれ  $-5.7 \times 10^4 \pm 38$ ,  $-5.7 \times 10^4 \pm 47$ ,  $-1.8 \times 10^2 \pm 6.1$  kcal/mol であった。一方 L175 は、それぞれ  $-5.3 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^2$ ,  $-5.9 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^2$ ,  $-1.8 \times 10^2 \pm 24$  kcal/mol であった。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。

Figure adapted with Fig. 8 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.



続いて、FoldX 力場を用いて、C166 と L175 の 13 種の  $\Delta G$  を計算した [74]。C166 の構造安定化の寄与を C166 と L175 の  $\Delta G$  の違い ( $\Delta \Delta G = \Delta G_{\text{C166}} - \Delta G_{\text{L175}}$ ) を使って調べた。エネルギー計算の方法の詳細は第 5 章 1. 方法 1-3. エネルギー計算に記載した。

$\Delta \Delta G_{\text{total}}$  の値は負の値を示した (Figure 5-4)。C166 は L175 よりも自由エネルギー的に安定であることが示唆された。 $\Delta \Delta G_{\text{total}}$  を構成する 13 種の  $\Delta \Delta G$  の中で、主鎖のエントロピーによる  $\Delta \Delta G$  が最も  $\Delta \Delta G_{\text{total}}$  の減少に寄与していた。二番目に安定化に寄与していたのは親水性残基の埋没による寄与 ( $\Delta \Delta G_{\text{solvP}}$ ) であった。 $\Delta G_{\text{solvP}}$  および  $\Delta \Delta G_{\text{solvP}}$  は常に疎水性残基による寄与 ( $\Delta G_{\text{solvH}}$  および  $\Delta \Delta G_{\text{solvH}}$ ) と絶対値が同程度であったことから、両者の値は互いに打ち消しあう働きをしていると考えられる。三番目に安定化に寄与していたのは主鎖の水素結合による  $\Delta \Delta G$  であった。これらの結果は C166 の構造安定化が二つの因子、すなわち変性構造の主鎖のエントロピーの減少と、天然構造における主鎖の水素結合エネルギー増大によるエンタルピーの減少の相乗効果によって実現できたことを意味する。

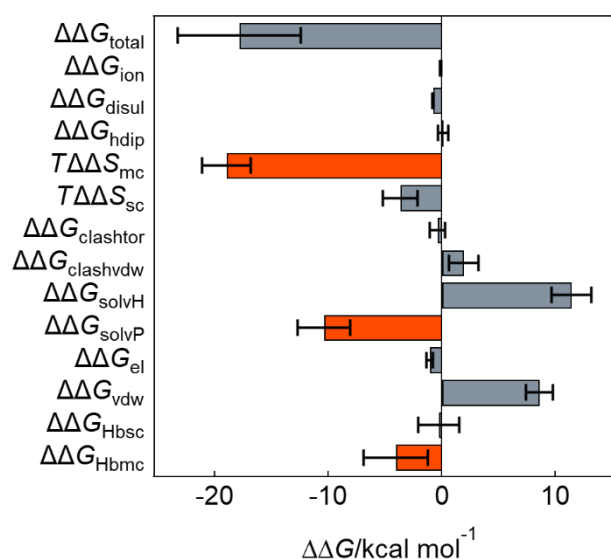


Figure 5-4. FoldX 力場を使って計算した C166 と L175 の間の  $\Delta G$  の違い 13 種の  $\Delta \Delta G$  のうち、 $\Delta \Delta G_{\text{total}}$  の減少に主に寄与した因子を赤色で示している。エラーバーは標準誤差を示す。 $\Delta \Delta G_{\text{total}}$ , 構造全体の安定性;  $\Delta \Delta G_{\text{ion}}$ , イオン化エネルギーの寄与;  $\Delta \Delta G_{\text{disul}}$ , ジスルフィド結合の形成による安定性;  $\Delta \Delta G_{\text{hdip}}$ , ヘリックス双極性の静電的な寄与;  $T\Delta \Delta S_{\text{mc}}$ , 主鎖構造を維持するエントロピーコスト;  $T\Delta \Delta S_{\text{sc}}$ , 側鎖構造を維持するエントロピーコスト;  $\Delta \Delta G_{\text{clashtr}}$  分子内のファンデルワールス相互作用によるひずみによる不利益;  $\Delta \Delta G_{\text{clashvdw}}$ , 分子間のファンデルワールス相互作用によるエネルギーの不利益;  $\Delta \Delta G_{\text{solvH}}$ , 疎水性残基の寄与;  $\Delta \Delta G_{\text{solvP}}$ , 親水性残基の埋没による不利益;  $\Delta \Delta G_{\text{el}}$ , 静電相互作用の寄与;  $\Delta \Delta G_{\text{vdw}}$ , ファンデルワールス相互作用の寄与;  $\Delta \Delta G_{\text{Hbsc}}$ , 側鎖の水素結合の寄与;  $\Delta \Delta G_{\text{Hbmc}}$ , 主鎖の水素結合の寄与

Figure modified with Fig. 9 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc..

## 第6章 デザインの評価

第3章と第4章において、C166が最も安定性の高い環状化 G-CSF であることがわかった。C166の5アミノ酸のターンは、第1章の統計解析において最も抽出構造数の多いターンのアミノ酸数であった (Figure 1-3)。C166の高い安定性の要因は、テンプレート構造を解析することによって明らかになると考えられる。本章では、このような推察をもとに、最も安定性の高かった C166 のコネクター領域の MD 構造セットと、PDB に登録されたヘリックス-ターン-ヘリックス構造を、構造学的アプローチで解析した。

その結果、C166のMD構造セットとヒット構造は、水素結合の形成位置と頻度に相関があり、同様のターン構造を形成していることがわかった。これは、ターンのアミノ酸数のみに着目した統計解析によって、安定性向上に寄与する水素結合とターン構造を抽出できていたことを意味する。

### 1. C166 局所構造の $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$

まず、C166 構造 (“outcome of design”) と ヒト G-CSF の構造 (“aim of design”) を比較した。Figure 2-21(c) に示すように、C166 の4本のヘリックス領域はヒト G-CSF の主鎖構造を維持していた。C166 のヘリックスの末端 (Leu162–Leu165 and Gln5–Leu8) と ヒト G-CSF のヘリックスの末端 (Leu169–Leu172 and Gln12–Leu15) の  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  は 0.91 Å だった (Figures. 6-1(a), 6-1(b))。分子全体と同様に、環状化末端の主鎖構造にひずみを持たないことがわかった。すなわち、C166 は環状化末端のデザインが妥当であったことが明らかになった。この結果は2アミノ酸のターンを持つ環状化 G-CSF (C163) と対照的である [55]。C163の結晶構造はヘリックスの末端にひずみがあることがわかっている。このひずみが C163 の構造安定性の低下を導いたと考えられる。今回のデザイン手法の改善にこの知見を生かすことができると考えられる。また、2アミノ酸のターンを持つヒット構造は、すべて同一の蛋白質ファミリー (アネキシン) に由来していた [55]。よって、局所構造の統計解析におけるバイアスを正確に除去することが、適したターンの長さの情報を得るために重要である。

さらなるデザインの評価のために、C166 の MD 構造セットと結晶構造を比較することによって C166 の局所構造を評価した。C166 の3つの領域 (ヘリックスの末端 (Leu162–Leu165 and Gln5–Leu8); コネクター領域 (Leu165–Gly166–Ser1–Gln5); ヘリックスの末端とコネクター領域を合わせた (combined) 領域 (Leu162–Gly166–Ser1–Leu8).) の構造セットについて、結晶構造と比較した  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を計算した。三領域とも、C166 の構造セットの  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  は 1 Å 未満に収まった (Figure 6-2 と Table 6-1)。この  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  の分布の範囲は、平衡状態における C166 の局所構造のゆらぎの許容範囲であると判断した。よって以下の構造評価でも、この  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  の範囲をゆらぎの許容範囲内と判断するための閾値として使用した。

C166 の結晶構造からの 5 アミノ酸のターンを持つヒット構造の分布についても、上記と同様に解析した。11 個のヒット構造について、C166 の結晶構造との  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を計算した。その結果、そのうち 6 構造 (1JGT, 1WU7, 2QX5, 3CAX, 3C3W および 4NBO) の値が C166 の MD 構造セットの揺らぎの範囲内に収まった (1JGT のヘリックスの末端の値を除く)。一例として、ヒット構造である *T. acidophilum* 由来ヒスチジル-tRNA シンターゼ (PDB code: 1WU7) の "combined" 領域の  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  は 0.58 Å であった (Figure 6-1 と Table 5-1)。これは 5 アミノ酸のターンを持つヒット構造の約半数が C166 の局所構造の揺らぎの範囲内に収まったことを示す。つまり、PDB から局所構造と適切に選択することは、"outcome of design" に一致した局所構造を見つけることによって可能であることを示唆する。

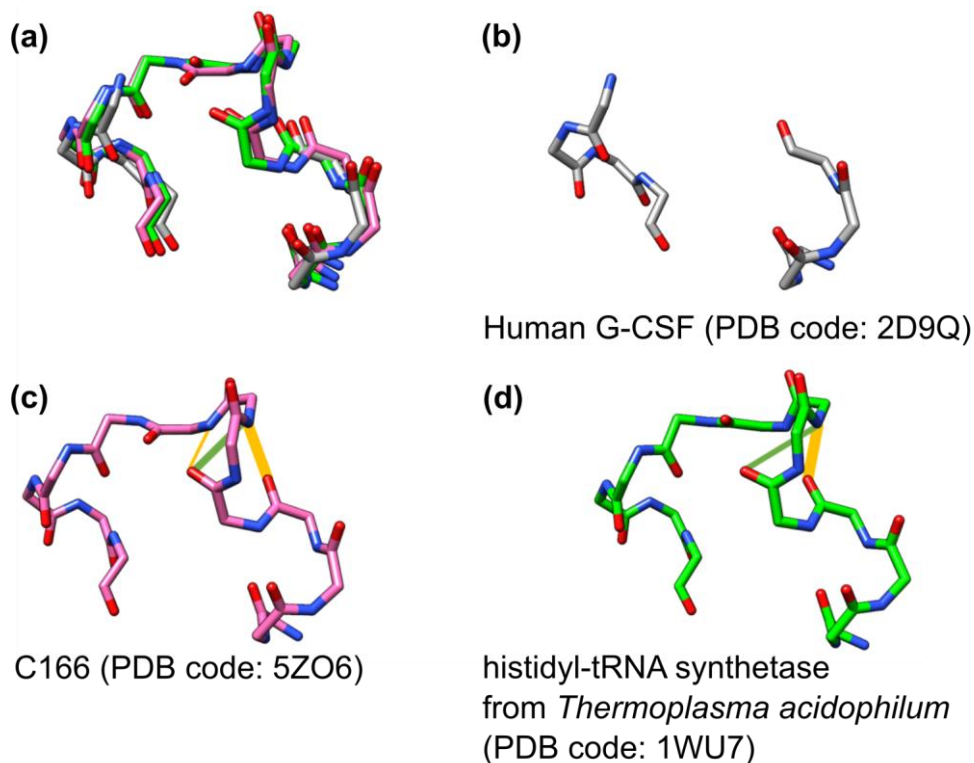


Figure 6-1. 局所構造の評価 (a) ヒト G-CSF のヘリックスの末端(Leu169-Leu172 および Gln12-Leu15, 白); C166 のコネクター領域とヘリックスの末端 (Leu162-Gly166-Ser1-Leu8, 桃); ヒット構造の一つである *Thermoplasma acidophilum* 由来のヒスチジル-tRNA シンターゼ (Ile186-Phe198, 緑)の重ね合わせ (b) ヒト G-CSF のヘリックスの末端 (c) C166 のコネクター領域とヘリックスの末端 (d) *Thermoplasma acidophilum* 由来のヒスチジル-tRNA シンターゼ。原子間を結ぶ直線はそれぞれ C166 の MD 構造セット(c) またはヒット構造 (d) における分子内水素結合を表す。線の太さは水素結合がアミノ酸の各ペアに形成された頻度を表す。緑色の線は  $\alpha$ -turn における水素結合を表し、黄色の線は  $\beta$ -ターンにおける水素結合を表す。C166 の結晶構造で観測された水素結合は(c)黄色の線であり、結晶中では  $\beta$ -ターンが形成されていたことを示す。

Figures (a)–(d) reprinted with Fig. 7 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

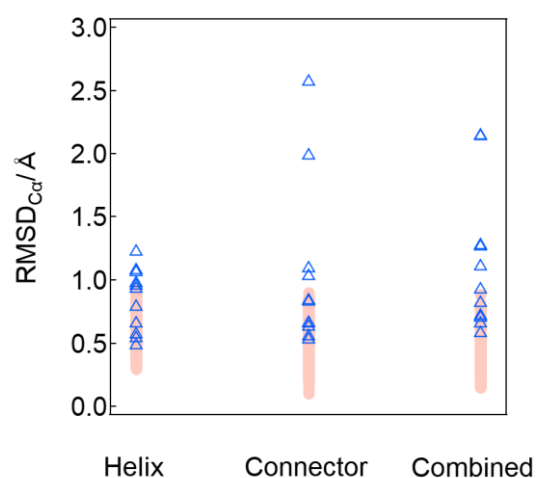


Figure 6-2. C166 の局所構造とヒット構造の揺らぎ方の比較 図中の Helix はヘリックスの末端領域、connector はコネクター領域、combined はヘリックスの末端領域とコネクター領域の足し合わせ、桃色の丸は C166 の MD 構造セットの  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$ 、青色の三角は 11 個のヒット構造の  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  を示す。

Figure reprinted with Fig. 11 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

Table 6-1. C166 の結晶構造からの  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  の比較と、 $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$  の  $\beta$ -turn と  $i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  における  $\alpha$ -turn の分子内水素結合

C166 or hit structures (PDB code)	Helix <sup>1</sup> (Å)	Connector <sup>2</sup> (Å)	Combined <sup>3</sup> (Å)	$\beta$ -Turn H-bond <sup>4</sup> at $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$	Type of $\beta$ -turn at $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$	$\alpha$ -Turn H-bond at $i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$
C166 (crystal structure)	0	0	0	Detected	I	N.d.
C166 (MD structural set)	0.149– 0.883	0.104– 0.898	0.295– 0.933	Detected (76%)	I (73%), IV (3%)	Detected
1JGT	0.931	0.554	0.817	Detected	I	N.d.
1RQG	1.074	1.984	2.139	N.d. <sup>5</sup>	-	N.d.
1WU7	0.537	0.529	0.577	Detected	I	Detected
2QX5	0.57	0.661	0.703	Detected	I	N.d.
3C3W	0.785	0.825	0.922	N.d.	-	N.d.
3CAX	0.482	0.654	0.716	Detected	I	N.d.
3E0S	0.975	1.093	1.266	N.d.	-	N.d.
3HVE	1.061	2.566	2.14	N.d.	-	N.d.
3P0K	0.955	1.031	1.272	Detected	IV	N.d.
4K3W	1.222	0.837	1.105	Detected	II	N.d.
4NBO	0.655	0.628	0.654	Detected	I	Detected

<sup>1</sup>Helix, ヘリックス領域の末端; <sup>2</sup>connector, コネクター領域; <sup>3</sup>combined, ヘリックスの領域の末端とコネクター領域; <sup>4</sup>H-bond 分子内水素結合; <sup>5</sup>N.d.;検出なし.

## 2. C166 局所構造の分子内水素結合

選択した 5 アミノ酸のターンを持つヒット構造は C166 の局所構造とほぼ同一であった。C166 はヒット構造と同様の水素結合をデザインされたことを示唆する。C166 で形成されたような新たな水素結合が局所構造の統計解析の段階で予測できれば、蛋白質を構造安定化するためのデザイン戦略に利用できると考えられる。水素結合が予測可能であったかどうかを調べるために、C166 のコネクター領域における水素結合パターンを解析した。

まず、C166 のコネクター領域における主鎖の間の水素結合 (Leu165–Gly166–Ser1–Gln5, *i* to *i*+6 と置く) を調べた。  $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$  および  $i+1(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  の 2 つの水素結合が C166 の結晶構造と MD 構造セットの両方で観測された一方、  $i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  の水素結合は、C166 の MD 構造セットのみで観測された (Table 6-1)。

次に、5 アミノ酸のターンを持つヒット構造について、主鎖間の水素結合を調べた。すべてのヒット構造 (11 個) のコネクター領域において、  $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$  および  $i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  の水素結合が観測された (Table 6-1)。水素結合パターンは C166 の MD 構造セットで観測された水素結合と同一だった。

C166 とヒット構造の両方において、  $i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$  の水素結合は最も高頻度で観測された (Figure 6-3 と Table 6-2)。この結果は、C166 のコネクター領域における水素結合の位置と頻度は、ヒット構造の解析によって予測できることを示唆する。

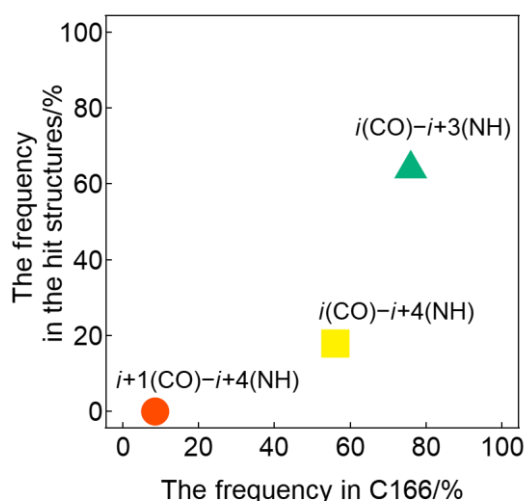


Figure 6-3. C166 の MD 構造セットとヒット構造における、水素結合の位置と形成頻度の関係 水素結合の形成頻度は、1000 構造または 11 構造のうち観測された水素結合の比率を表している。

Figure reprinted with Fig. 12 in Shibuya, R. *et al.* (2019). Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure, *FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.15092

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc..



Table 6-2. C166 の結晶構造及び MD 構造セットと、ヒット構造の水素結合の形成位置と形成頻度の比較

H-bond <sup>1</sup> type	H-bond accept or	H-bond donor	Crystal structure	MD structural set	Frequenc y of H- bond <sup>2</sup> in MD structural set (%)	Frequenc y of H- bond <sup>2</sup> in the hit structure s (%)
$i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$	Leu165	Ser2	Detected	Detected	76	64 (7/11)
$i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$	Leu165	Leu3	N.d. <sup>3</sup>	Detected	56	18 (2/11)
$i+1(\text{CO})-i+4(\text{NH})$	Gly166	Leu3	Detected	Detected	8.5	0 (0/11)

<sup>1</sup>H-bond, 分子内水素結合、<sup>2</sup>frequency of H-bond, 各ドナーとアクセプター間に形成された水素結合の頻度、<sup>3</sup>N.d.; 検出なし

### 3. C166 のターン構造

$i(\text{CO})-i+3(\text{NH})$  の水素結合を持つターンは  $\beta$ -ターンに分類される [72,75]。  $\beta$ -ターンは主鎖の二面角に基づいて 10 個のターンに分類される [72]。 C166 の MD 構造セットとヒット構造のターンの種類を調べた。 タイプ I の  $\beta$ -ターンが最も高頻度であった (Table 6-1)。 ヒット構造のうち、5 つのタイプ I の  $\beta$ -ターン (1JGT, 1WU7, 2QX5, 3CAX および 4NBO) は、C166 の構造セットの  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  の分布の範囲内にある構造と同じであった (第 6 章 1. 最終段落参照)。

$i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  の水素結合は C166 の構造セットで二番目に多く観察された水素結合である。  $i(\text{CO})-i+4(\text{NH})$  の水素結合を持つターンは  $\alpha$ -ターンとして分類される [75]。  $\alpha$ -ターンも、低い  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  かつタイプ I の  $\beta$ -ターンを持つ 1WU7 と 4NBO (第 6 章 1. C166 局所構造の  $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha}$  最終段落参照) で観測された (Figures. 7a, 7d; 緑線, Table 6-1 および Table 6-2)。

## 第7章 考察

### 1. 環状化による構造安定性の改善

作製した変異体の構造安定性を調べるために、中性条件下の昇温における 222 nm の強度を測定することによって熱安定性（見かけの  $T_m$  値）を調べた。全ての環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF に比べて安定性が高いことが分かった (Figure 3-1)。環状化 G-CSF の中でも見かけの  $T_m$  値に違いがあり、C166 ( $69 \pm 0.40^\circ\text{C}$ ) > C170 ( $64 \pm 0.40^\circ\text{C}$ ) > C177 ( $61 \pm 1.4^\circ\text{C}$ ) > C163 ( $58 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) > L175 ( $57 \pm 0.0^\circ\text{C}$ ) の順に高かった。C166 の  $T_m$  値の向上は、これまでに最も G-CSF 変異体の  $T_m$  値を向上させた G-CSF の疎水性コア領域の 10 アミノ酸に変異導入した研究例と同程度である[76]。

G-CSF は熱に対して不可逆に変性するため、熱変性実験では熱力学的パラメーターを用いて構造安定性を評価することが難しい。可逆にアンフォールディングする条件での熱力学的安定性を評価するために、酸性条件かつ GdnHCl を用いた化学変性実験を行った。蛍光スペクトルによって、二段階の構造変化が起こることを明らかにした (Figure 3-2)。先行研究[51,77]によると、第一ステップ ( $F$ -to- $I$  遷移) は Trp58 近傍の局所的な構造変化を反映しており、第二ステップ ( $I$ -to- $U$  遷移) は全体の三次構造の変化を反映している。N 末端および C 末端と、Trp58 とが離れているので、主鎖環状化が  $F$ -to- $I$  遷移に影響を与えないと仮定した。よって、 $I$ -to- $U$  遷移に焦点をあてて C166, C177, L175 の変異体の熱力学的安定性を評価した (Table 3-1)。熱力学的安定性は、熱安定性と同様の傾向を示した。C166, C177, L175 の  $C_{M, U}$  はそれぞれ 2.8, 2.6, 2.0 M であった。

生理的 pH (pH 8.0) の熱安定性と製剤 pH (pH 4.0) の熱力学的安定性を比較した結果、構造安定性の違いは pH に依存しないことがわかった。よって、より凝集しやすい中性 pH における構造安定性は、酸性 pH における構造安定性の違いを調べることによって定性的に評価できると言える。

G-CSF は主鎖環状化によって構造安定性が向上したことが明らかになった。さらに、構造安定性の向上に有利なコネクターの長さが存在することがわかった。

### 2. 分子内水素結合の増大によるエンタルピー効果

熱力学的安定性の増大は、天然状態と変性状態の間の  $\Delta G$  の増大に等しい。主鎖環状化蛋白質は、変性構造のエントロピーが減少することによって  $\Delta G$  が増大し、構造安定化すると考えられている[17,22]。しかし、最適なコネクターの長さを持つ主鎖環状化蛋白質の  $\Delta G$  がエンタルピー効果を含むかどうかは不明である。本論文では、天然構造における分子内相互作用数を調べることによって、主鎖環状化によるエンタルピー効果を評価した。

C166 の結晶構造を決定し、ヒト野生型 G-CSF の結晶構造と比較した。C166 は、ヒト G-CSF の主鎖の天然構造を維持したまま、新たに二つの水素結合が形成されていた (Figure 2-21 および Figure 5-1)。C166 とヒト野生型 G-CSF は結晶化条件が異なる。ま

た、結晶構造にはクリスタルパッキングや結合のアーティファクトを含むおそれがある。このようなおそれを取り除き、C166 と L175 の構造を同一条件で比較するために、C166 と複数のヒトおよびウシ野生型 G-CSF の結晶構造を同一条件で MD シミュレーションを行った後に、統計的な比較を行った。さらに、実験の結果と比較するために、野生型 G-CSF のアミノ酸配列を L175 のアミノ酸配列と同一にした上で MD シミュレーションを行った。

平衡状態における天然構造からなる MD 構造セットの比較は、C166 のコネクター領域とその近傍のヘリックス (Helix D) における水素結合数が L175 の同等の領域よりも増大していることが明らかになった (Figure 5-2 および Table 5-2)。水素結合数が熱安定性に正に相関するという報告 [78]もあることから、コネクター領域と Helix D の水素結合数の増大は、C166 の天然構造の構造安定化に貢献したと考えられる。

水素結合の安定化効果をさらに調べるためには、水素結合数だけでなくその強さも考慮する必要がある。その強さを決定するために、3つの力場を使って非共有結合エネルギーとギブスの自由エネルギーを比較した。AMBER99 力場と CHARMM22 力場を使った非共有結合エネルギーの比較は、C166 が静電相互作用によって構造安定化したことを明らかにした (Figure 5-3)。AMBER99 力場を使った C166 と L175 の間の違い ( $2.9 \times 10^2$  kcal/mol) はその標準偏差 (7–33 kcal/mol) より大きかった。さらに、C166 と 175 の間の値の違いは、蛋白質のぎりぎりの安定性を考慮すると十分高い値である。

FoldX 力場を用いた  $\Delta G$  の比較では、C166 は変性構造の主鎖のエントロピーの減少と、天然構造の水素結合エネルギーの増大によって構造安定化したことを明らかにした (Figure 5-4 および Figure 7-1)。二番目に安定化に寄与していた  $\Delta\Delta G_{\text{solvP}}$  については、 $\Delta\Delta G_{\text{solvH}}$  と常に打ち消しあうように連動した値をとっていた。 $\Delta\Delta G_{\text{solvP}}$  と  $\Delta\Delta G_{\text{solvH}}$  は、それぞれ天然構造における親水性残基と疎水性残基の埋没面積を評価している。 $\Delta\Delta G_{\text{solvP}}$  と  $\Delta\Delta G_{\text{solvH}}$  がそれぞれ負と正である結果は、分子量の小さい C166 が L175 に比べて親水性残基が埋没面積が少ないために不利益が少なく (C166 の安定化に寄与)、疎水性残基の埋没面積が少ないために利益が少ない (C166 の不安定化に寄与) ことを反映していると考えられる。

FoldX 力場の開発について記述した論文では、「FoldX 力場を使って評価した  $\Delta G$  の絶対値は誤差が大きい可能性があるが、野生型と変異体の間の  $\Delta G$  の違い ( $\Delta\Delta G$ ) は実験値とよく一致する」ということが示されている [74,79]。 $\Delta\Delta G$  の計算は水素結合数および非共有結合エネルギー計算の結果とも一致した。よって、C166 の構造安定化は水素結合の増大が寄与していたと結論付けた。Schumann ら [23]は本論文の結果と同様に、NMR を使って主鎖環状化 SH3 の主鎖間の分子内水素結合数の増大を示している。彼らは、分子内水素結合数の形成頻度は、主鎖環状化するコネクターの長さに依存して変化することを明らかにしている。

本論文では適切な環状化末端がエンタルピー効果による安定化をもたらすことを明らかにした。C166 の水素結合数はデザインした環状化末端にとどまらず分子全体にわたって水素結合数が増大していた (Figure 5-2. と Table. 5-2) 。C166 は Helix A と Helix D を維持しやすい環状化末端の長さを持つことによって、分子内全体の水素結合形成頻度が高まり、結果としてエンタルピー効果を獲得したと推測される。一方、エントロピー効果については FoldX 力場のみの解析にとどまっているため、エントロピー効果とエンタルピー効果のどちらがより C166 の安定化に影響を及ぼしたかはさらなる研究が必要である。方法として、複数の温度下で変性剤変性実験を行うことが挙げられる。各温度の結果に対して平衡定数  $K$  を算出後、 $1/T$  に対して  $\ln K$  をプロットすることにより、直線の傾きから  $\Delta H$  を求めることが可能である。

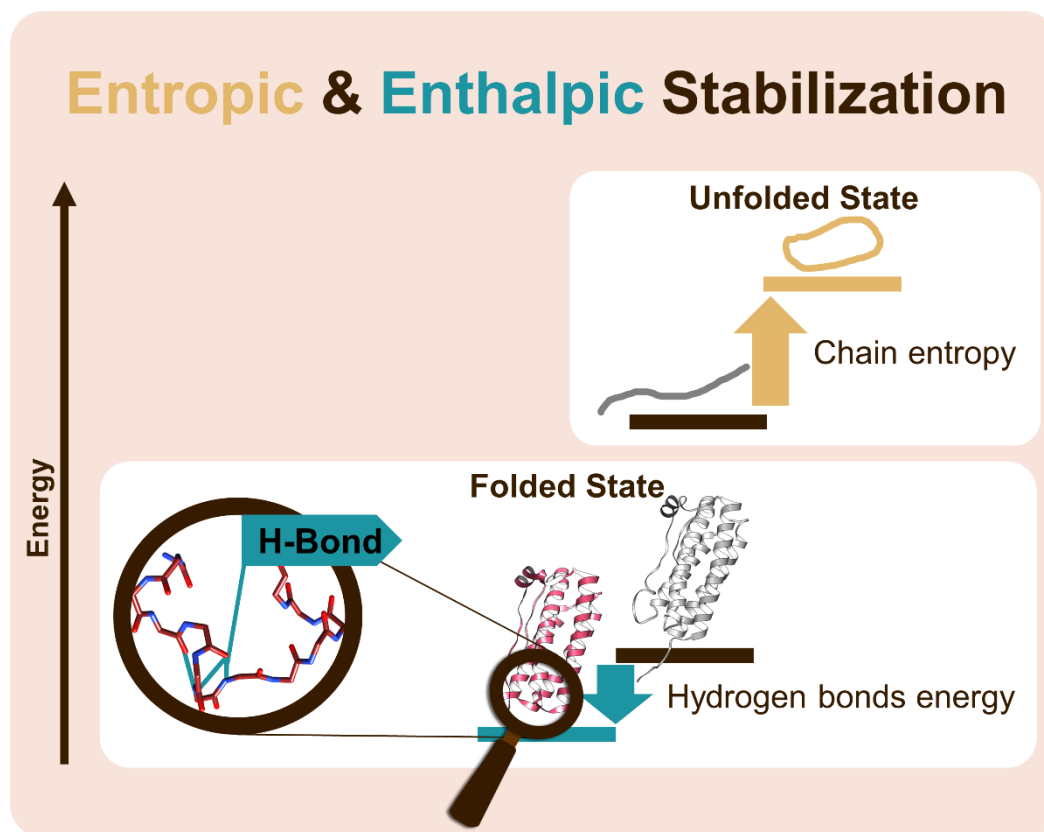


Figure 7-1. 環状化 G-CSF のエントロピーとエンタルピーによる構造安定化

### 3. 環状化蛋白質と直鎖状蛋白質の変性構造の水和状態の比較

超遠心分析および SAXS 解析では、環状化 G-CSF の方がコンパクトな変性構造であることを示した(Figure 2-22 および Figure 4-3)。これと対照的に、環状化 G-CSF の  $m_{IU}$  と  $m_{FU}$  は L175 の  $m$  値と同様であった (Table 3-1)。GdnHCl 変性実験から計算した  $m$  値は、変性による新たな溶媒露出面積 ( $\Delta ASA$ ) に比例すると考えられている [80]。一般的に、環状化蛋白質は直鎖状蛋白質に比べて変性状態の水和が減少するため、 $m$  値は小さくなる [21,24]。本研究の  $m$  値の比較によって、変性による環状化 G-CSF の  $\Delta ASA$  が、L175 の  $\Delta ASA$  と同程度であることが示唆された。この結果は、4–6 M GdnHCl 存在下の  $\langle \lambda \rangle$  の値が同様であるという結果とも一致する。これらをまとめると、環状化 G-CSF は L175 に比べてコンパクトな変性構造であるが、Trp 残基の近傍の局所構造の水和には変化がないと考えられる。

### 4. 凝集性の改善

G-CSF は GdnHCl および製剤 pH である pH 4 の条件下において凝集しないと考えられてきた[47,48]。しかし、超遠心分析の結果によって、超遠心分析で使用した蛋白質濃度 1 mg/mL 以上においては、5%未満の凝集物が含まれることが明らかになった (Figure 2-22)。0.1 mg/mL で測定した蛍光スペクトル解析においては可逆であったことから、G-CSF の凝集は蛋白質の濃度に強く依存すると考えられる。

環状化による G-CSF の凝集性への影響を調べるために、C166、C177、L175 の熱耐性の評価を行った。熱耐性は C166、C177、L175 の順に減少した (Figure 4-1)。この結果は、見かけの  $T_m$  値から評価した G-CSF 間の熱安定性の違い(Figure 3-1)と一致した。見かけの  $T_m$  値は可逆なアンフォールディングと不可逆な変性 (凝集) の情報を含んでいる。一方、熱耐性実験においては、変異体の CD スペクトルは冷却の後に測定しているので、可逆なアンフォールディングの情報は天然状態として表れる。言い換えれば、この実験は間接的に不可逆な凝集を評価しており、熱耐性は凝集耐性として読み替えることができる。つまり、C166 が C177 と L175 に比べて熱に対する凝集性が改善したことを示している。また、50°C で 5 日間保管したのちに単量体量を測定した長期凝集性試験では、C166、C177、L175 の順に単量体の量が多かった(Figure 4-2)。この結果から、L175 および C177 に比べて C166 の長期凝集性が抑えられたことが明らかになった。

SAXS を使って、C166 と L175 の GdnHCl に対する凝集性と凝集体の大きさの違いを調べた。L175 は特に 2–3 M GdnHCl 存在下において著しく凝集することが明らかになった (Figure 4-3)。C166 は、熱耐性の実験および長期凝集性試験の結果と同様に、L175 に比べて凝集体の形成が著しく抑えられていた (Figure 4-1 および Figure 4-2)。

野生型 G-CSF の凝集は、フリーの Cys17 を介した分子間の架橋や、正味荷電の減少による分子間の斥力の低下が影響する[30,48]。しかし、本論文で使用した G-CSF は凝集を避けるために、Cys17 を Ser17 にアミノ酸置換している。また、本論文で使用した G-

CSF の荷電性残基数は同一である（全て pI 5.65）。よって、環状化 G-CSF の凝集性の改善には別の要因があると考えられる。C166 と L175 の凝集性について、構造安定性の違い、および変性構造と中間構造の違いの 3 つの観点から考察した。

まず、構造安定性の観点において、L175 の凝集性においては、2–3 M GdnHCl 存在下で特に凝集性が高かった。2–3 M GdnHCl 存在下では、グアニジン非存在下に比べて、天然状態が不安定化し、相対的に中間状態および変性状態が安定化する（Figure 3-2）。中間状態および変性状態のフラクションが増大し、中間構造による凝集体の形成が導かれたと考えられる。5 M GdnHCl 存在下では、2–3 M GdnHCl 存在下で観察されたような分子サイズの凝集体は観察されなかった。中間状態や凝集状態よりも分散した変性状態のほうがより安定になったと考えられる。一方、C166 の凝集性においては、L175 と同様の傾向が見られたものの、凝集性が改善されていた。C166 は L175 に比べて天然状態が安定化し、変性構造が不安定化したために凝集しやすい中間構造および変性構造の形成が抑えられたと考えられる。

次に、変性構造からの観点について述べる。C166 は、L175 に比べて変性構造がコンパクトであった（Figure 2-22 および Figure 4-3、Table 4-1）。C166 は環状のまま変性するため、L175 に比べて Aggregation Prone Region の露出が小さくなったと考えられる。すなわち、変性構造のコロイド安定性の違いが反映されたと考えられる。

次に中間状態の観点について、Raso ら[48]の研究をもとに議論する。彼らは、中性条件（0.1 M MOPS 緩衝液（pH 7.0））かつ 37°C 下において、2 mg/mL の G-CSF 溶液の GdnHCl 濃度依存性を調べている。彼らの結果も本論文の結果と同様に、3.5 M 以上の GdnHCl 存在下よりも、1.5–2.5 M GdnHCl 存在下のほうが凝集しやすいことを示した。しかし、1.5–2.5 M GdnHCl 存在下における G-CSF の二次構造含有量の減少や疎水表面の増大には変化が見られなかった[48]。よって、中性条件かつ 1.5–2.5 M GdnHCl 存在下における G-CSF の構造は、天然構造が少し広がった中間構造であり、中間構造のコロイド安定性の低さが G-CSF の凝集しやすくしていると考察している[48]。今回測定した酸性かつ室温条件においても、同様の機構が働いていると考えられる。

上記の中間構造と変性構造の観点から、中間構造が凝集性の改善に影響を与えていると考えられる。しかし、主鎖環状化が中間構造に与えた影響は不明である。環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF の中間状態を比較できれば、主鎖環状化がフォールディング経路に与えた影響の有無を解明できると考えられる。さらには、凝集のメカニズムの凝集を抑える蛋白質のデザインにつながると予想される。中間構造をとらえるためには、MD シミュレーション等の手法を用いたフォールディング経路を明らかにすること等が有効と考えられる。MD シミュレーションを用いる場合、MD シミュレーションの変性構造はコンパクトになることが知られている[81]ので、超遠心分析などの実験値と合わせた考察や、変性構造を考慮して開発された力場の使用の検討[82]が必要である。熱耐性実験において、55–60°C における C166 の二次構造含有量の増大が観察された（Figure 4-1）。この温度条件

下における C166 は、熱処理によりサンプルが濃縮されたか、または分子内相互作用や分子間相互作用の増大によってヘリックス含有量が増大したと推測される。ヘリックス含有量が増大した場合、中間構造および変性構造の考察に使用できる可能性がある。

これらの構造安定性とコロイド安定性が相互に影響を及ぼしあうことによって、C166 の凝集性が改善したと考えられる (Figure 7-2)。

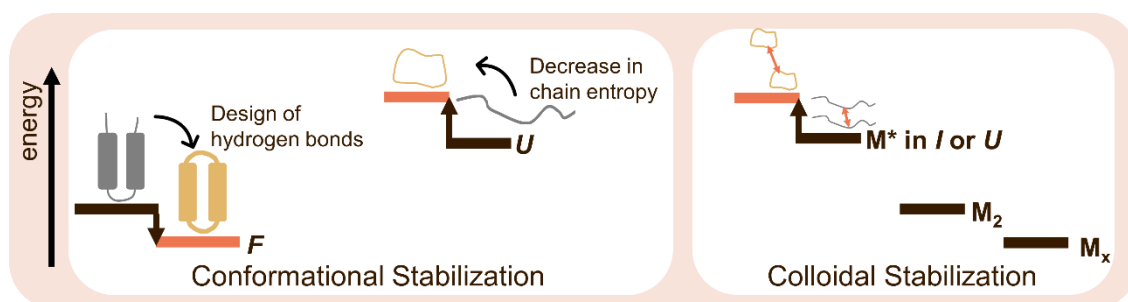


Figure 7-2. 凝集性の改善 橙色のイラストを C166、灰色のイラストを L175 で示す。縦軸はエネルギー、横棒は各状態のエネルギーの高さを表す。F は天然状態、I は中間状態、U は変性状態、M\* は凝集しやすい G-CSF の単量体を示す。

##### 5. 多段階のアプローチに基づく蛋白質デザインの可能性

第 3 章と第 4 章において、C166 が最も構造安定性の高い環状化 G-CSF であることがわかった。C166 の高い安定性は、テンプレート構造を解析することによって明らかになると考えられる。このような推察をもとに、第 6 章において、C166 のコネクター領域とデザインに使用したテンプレート構造を、構造学的アプローチにより解析した。その結果、環状化末端における主鎖間の水素結合とターン構造は予測可能であることがわかった。今後の環状化蛋白質をデザインするためには、選択したヒット構造のターンの種類を慎重に解析することが、コネクター領域の水素結合数を増大させるための効果的な戦略の一つになると考えられる。また、第 1 章の統計解析結果では、C166 のヒット構造が最も多く抽出されていた (Figure 1-3 および Figure 1-4)。このことは、コネクター領域をデザインするためには十分なヒット構造の数が必要であり、C166 のヒット構造の数 (11 個) はデザインするために十分な数であったと考えられる。

一般的に、環状化蛋白質の N 末端と C 末端はフレキシブルなループによって結合するため、天然蛋白質の機能を損なうことがないと考えられている[20]。しかし、環状化蛋白質の構造安定性 [19,83,84] や水素結合の頻度 [23] がループの長さによって変化している報告も存在する。本論文では二次構造をつなぐターンの長さが環状化蛋白質の構造安定性に影響を与えることを報告した。適切なターンの長さの選択は、1. 天然構造における水素結合数の増大を促すこと、2. 天然構造の水素結合数の増大が変性状態のエントロピー効果と相乗して大きな構造安定化を導くこと、そして 3. 水素結合数の増大は局所構造の統計解析から予測できることを示した。これらの知見は環状化蛋白質をデザインすることが安定

化に効果的なアプローチであり、今後のデザイン手法を改良するための指針の一つとなる。

蛋白質のデザインは主鎖の長さ、主鎖構造、側鎖の種類、側鎖構造と言った様々なパラメーターからなる多次元空間における最適化問題とみなされる。可能な組み合わせの数は大きく、全ての組み合わせを探索することは一般的に不可能である [85]。主鎖のパラメーターが側鎖のパラメーターと独立に最適化できれば、構造空間は大幅に減り、デザインすることが容易になる。本論文では、コネクター領域のアミノ酸数の最適化によって、主鎖間の水素結合数が増大し、環状化蛋白質の安定化を導いた (Figure 7-1)。これは主鎖の最適化と側鎖の最適化を分離することによって、多段階の構造探索を行うための可能性を広げることができることを意味する。

## 6. 治療薬としての主鎖環状化蛋白質

主鎖環状化は *in vitro* における安定性だけでなく *in vivo* における安定性も改善できる [86]。G-CSF は生体内でエンドプロテアーゼの一種であるエラスターゼによって分解される。エラスターゼに対する耐性を測定した結果、環状化 G-CSF のエラスターゼ耐性が向上したことがわかった (Figure 7-3)。さらに、プロテアーゼ耐性は環状化 G-CSF 間で異なっていた。このことは、プロテアーゼ耐性が、天然構造の分子内相互作用エネルギー、天然状態と変性状態の自由エネルギー差により決定される変性構造のフラクション、変性構造のフレキシビリティの複合的な影響を受けることを示唆する。また、共同研究者である産業技術総合研究所の宮房博士による研究では、作製したすべての環状化 G-CSF の環状化末端はエピトープになる可能性が低いことが分かっている。また、C177、C163、L175 間の細胞増殖活性とマウスの血中安定性を調べた結果、C177 と C163 の細胞増殖活性はわずかに増大した一方、代謝半減期には L175 と違いがなかった [87]。よって、環状化 G-CSF は細胞内および生体内でアゴニストとして働くと考えられる。特に、構造安定性とコロイド安定性の向上した C166 は細胞増殖活性や代謝半減期が向上していることが期待される。

バイオ医薬品として使われる 4-ヘリックスバンドル構造を持つサイトカインは、G-CSF のほかにも多数存在する [28]。その例として、インターロイキン-2 [88] やインターフェロン  $\alpha$ -2B [89] が挙げられる。4-ヘリックスバンドル構造を持つサイトカインは G-CSF と同様、構造安定性、コロイド安定性、および生体内安定性が低いという問題がある [56][90]。主鎖環状化による構造安定化メカニズムを解明することや分子デザイン戦略を確立することは、4-ヘリックスバンドル構造を持つサイトカインを含むバイオ医薬品の保管安定性や生体内安定性の向上につながる。

また、安全性もバイオ医薬品のためにも重要な因子である。アミノ酸配列を改変することなくコネクター領域のアミノ酸数のみを最適化することにより構造安定化させる技術は、バイオ医薬品の免疫原性のリスクを減らすための効果的なアプローチと考えられる。



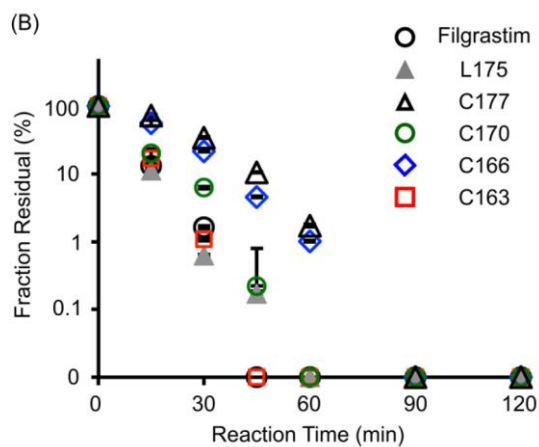


Figure 7-3. AlphaLISA により測定したエラスターゼ耐性の測定。PBS (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 150 mM 塩化ナトリウム) (pH 7.4) 緩衝液中における 10  $\mu\text{g/mL}$  の蛋白質溶液に 1  $\mu\text{g/mL}$  のエラスターゼ (Wako) を混合した。混合溶液は 37°C で 15, 30, 45, 60, 90, 120 分間熱処理し、終濃度 1 mM のフッ化フェニルメチルスルホニルを添加することによって反応を停止させた。EnVision-Alpha Reader (Perkin Elmer) 内の AlphaLISA テクノロジーおよびヒト G-CSF キット (Perkin Elmer) を用いて、未分解産物を定量した。全ての測定は  $n=3$  で行った。本実験は産業技術総合研究所の宮房博士により測定された。

Figure reprinted with Figure 4(B) in Miyafusa, T. *et al.* (2017). Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor, *Chemical Biology*. 12 (10) 2690-2696

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acscchembio.7b00776>

Copyright © 2017 American Chemical Society.

## 第 8 章 総括

主鎖環状化によって、G-CSF の構造安定性を向上させることができることが明らかになった。特に、最も安定性の高い主鎖環状化 G-CSF (C166) に着目することによって、主鎖環状化蛋白質がエントロピーとエンタルピーによる安定性を獲得できることがわかった。変性構造の数が制限されることによる鎖エントロピーの減少と、天然構造の分子内水素結合が増大することによるエンタルピーの増大の両方が、相乗的に自由エネルギー差を増大させた。環状化末端領域の構造と分子内水素結合の評価は、環状化末端と類似した局所構造を用いた蛋白質デザインが蛋白質の構造安定性を効果的に改善できることを明らかにした。

さらに、主鎖環状化は G-CSF の凝集性も顕著に低下させた。凝集性の違いには構造安定性の増大に加えて、中間構造と変性構造におけるコロイド安定性の増大が相互に影響を及ぼしていると考えられる。

プロテアーゼ耐性の結果や長期凝集性試験の結果と合わせて、主鎖環状化を用いた蛋白質のデザインは、生体内安定性や保管安定性の向上につながると考えられる。また、バイオ医薬品において安全性も重要な条件である。本来のアミノ酸配列を変えずに環状化末端の長さのみを最適化することにより蛋白質を安定化させる技術は、バイオ医薬品の免疫原性のリスクを低減する効果的なアプローチになりうる。主鎖環状化は、*in vivo* および *in vitro* で蛋白質の安定性を向上させるために有効と考えられる。

## 参考文献

- 1 Leader B, Baca QJ & Golan DE (2008) Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev.* 7, 21–39.
- 2 Tobin PH, Richards DH, Callender RA & Wilson CJ (2016) Protein engineering: a new frontier for biological therapeutics. *Curr Drug Metab.* 15, 743–756.
- 3 Caravella J & Lugovskoy A (2010) Design of next-generation protein therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 520–528.
- 4 Ciarán Ó Fágáin (1995) Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1252, 1–14.
- 5 Frokjaer S & Otzen DE (2005) Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature* 4, 298–306.
- 6 Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H & Jiskoot W (2004) Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm. Res.* 21, 897–903.
- 7 Rosenberg AS (2006) Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *Am. Assoc. Pharm. Sci.* 8, E501–E507.
- 8 Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ & Kimber I (2014) Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* 11, 99–109.
- 9 Williamson M (2016) *Essential タンパク質科学*. 南江堂.
- 10 Wang X, Das TK, Singh SK & Kumar S (2009) Therapeutic Monoclonal Antibodies in the Market. 1, 254–267.
- 11 Krishnan S, Chi EY, Webb JN, Chang BS, Shan D, Goldenberg M, Manning MC, Randolph TW & Carpenter JF (2002) Aggregation of Granulocyte Colony Stimulating Factor under Physiological Conditions : Characterization and Thermodynamic Inhibition † . , 6422–6431.
- 12 Kendrick BS, Carpenter JF, Cleland JL & Randolph TW (1998) A transient expansion of the native state precedes aggregation of recombinant human interferon-  $\gamma$  . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14142–14146.
- 13 Baldwin EP & Matthews BW (1994) Core-packing constraints, hydrophobicity and protein design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 396–402.
- 14 Strickler SS, Gribenko A V., Gribenko A V., Keiffer TR, Tomlinson J, Reihle T, Loladze V V. & Makhatadze GI (2006) Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry* 45, 2761–2766.
- 15 Winter G & Alan F (1992) Protein engineering. *Trends Biochem. Sci.* 17, 292–295.

- 16 堤康央、石井明子、早川堯夫 (2007) 6節 機能性人工タンパク質. In バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 pp. 369–399.
- 17 Aboye TL & Camarero JA (2012) Biological synthesis of circular polypeptides. *J. Biol. Chem.* 287, 27026–27032.
- 18 Charles PS, Ernesto A-S, Mark W, Daphne CW & Stephen JB (1999) Production of cyclic peptides and proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13638–13643.
- 19 Johan FT van L, Odette NPG, Wietse V, Antoni P, Willem, M de V, John van der O & Sotirios K (2012) Thermal stabilization of an endoglucanase by cyclization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2039–2053.
- 20 Popp MW, Dougan SK, Chuang T-Y, Spooner E & Ploegh HL (2011) Sortase-catalyzed transformations that improve the properties of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3169–3174.
- 21 Arai M, Kataoka M, Kuwajima K, Matthews CR & Iwakura M (2003) Effects of the difference in the unfolded-state ensemble on the folding of Escherichia coli dihydrofolate reductase. *J. Mol. Biol.* 329, 779–791.
- 22 Zhou HX (2004) Loops, linkages, rings, catenanes, cages, and crowders: entropy-based strategies for stabilizing proteins. *Acc. Chem. Res.* 37, 123–130.
- 23 Schumann FH, Varadan R, Tayakuniyl PP, Grossman JH, Camarero JA & Fushman D (2015) Changing the topology of protein backbone: the effect of backbone cyclization on the structure and dynamics of a SH3 domain. *Front. Chem.* 3, 27026–27032.
- 24 Camarero JA, Fushman D, Sato S, Girit I, Cowburn D, Raleigh DP & Muir TW (2001) Rescuing a destabilized protein fold through backbone cyclization. *J. Mol. Biol.* 308, 1045–1062.
- 25 Tetsuro K, Yoshinori K, Motoo Y, Susumu S, Hiromasa M, Tatsunari N, Moriyuki S, Yoshiharu Y, Makoto A, Masami O, Makoto M & Seiga I (1989) Mutagenesis of human granulocyte colony stimulating factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 103–111.
- 26 Hollingshead LM & Goa KL (1991) Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF). *Drugs* 42, 300–330.
- 27 Metcalf D (2010) The colony-stimulating factors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 425–434.
- 28 Hill CP, Osslund TD & Eisenberg D (1993) The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5167–5171.
- 29 Tamada T, Honjo E, Maeda Y, Okamoto T, Ishibashi M, Tokunaga M & Kuroki R (2006) Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3135–40.

- 30 Chi EY, Krishnan S, Kendrick BS, Chang BS, Carpenter JF & Randolph TW (2003) Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Sci.* 12, 903–913.
- 31 Cox GN, Chlipala EA, Smith DJ, Carlson SJ, Bell SJ & Doherty DH (2014) Hematopoietic properties of granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin (G-CSF/IgG-Fc) fusion proteins in normal and neutropenic rodents. *PLoS One* 9, e91990.
- 32 Sarkar CA, Lowenhaupt K, Horan T, Boone TC, Tidor B & Lauffenburger DA (2002) Rational cytokine design for increased lifetime and enhanced potency using pH-activated “histidine switching”. *Nat. Biotechnol.* 20, 908–913.
- 33 Raso SW, Abel J, Barnes JM, Maloney KM, Pipes G, Treuheit MJ, King J & Brems DN (2005) Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Sci.* 14, 2246–57.
- 34 Mo J, Tymiak AA & Chen G (2013) Characterization of disulfide linkages in recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 940–946.
- 35 Battye TGG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR & Leslie AGW (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 67, 271–81.
- 36 McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC & Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
- 37 Emsley P, Lohkamp B, Scott WG & Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
- 38 Vagin AA, Steiner RA, Lebedev AA, Potterton L, McNicholas S, Long F & Murshudov GN (2004) REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2184–95.
- 39 Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- 40 Schuck P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606–1619.
- 41 T.M. Laue, B.D. Shah TMR and SLP (1992) *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* Royal Society of Chemistry.
- 42 Iwai H & Plückthun A (1999) Circular  $\beta$ -lactamase: Stability enhancement by cyclizing the backbone. *FEBS Lett.* 459, 166–172.
- 43 Sanz JM & Fersht AR (1993) Rationally Designing the Accumulation of a Folding Intermediate of Barnase by Protein Engineering. *Biochemistry* 32, 13584–13592.

- 44 Kolvenbach CG, Narhi Lo, Philo JS, Li T, Zhang M & Arakawa T (2009) Granulocyte-colony stimulating factor maintains a thermally stable, compact, partially folded structure at pH 2. *J. Pept. Res.* 50, 310–318.
- 45 Feng Y, Minnerly JC, Zurfluh LL, Joy WD, Hood WF, Abegg AL, Grabbe ES, Shieh JJ, Thurman TL, McKearn JP & McWherter CA (1999) Circular permutation of granulocyte colony-stimulating factor. *Biochemistry* 38, 4553–4563.
- 46 Smith CA (1988) Estimation of sedimentation coefficients and frictional ratios of globular proteins. *Biochem. Educ.* 16, 104–106.
- 47 Herman AC, Boone TC & Lu HS (2002) Characterization, Formulation, and Stability of Neupogen® (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor. In pp. 303–328. Springer, Boston, MA.
- 48 Raso SW, Abel J, Barnes JM, Maloney KM, Pipes G, Treuheit MJ, King J & Brems DN (2005) Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Sci.* 14, 2246–57.
- 49 Sosnick Denaturant Concentration Calculator. <http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>.
- 50 Mohana-Borges R, Lima Silva J & de Prat-Gay G (1999) Protein folding in the absence of chemical denaturants. Reversible pressure denaturation of the noncovalent complex formed by the association of two protein fragments. *J. Biol. Chem.* 274, 7732–7740.
- 51 Narhi LO, Kenney WC & Arakawa T (1991) Conformational changes of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor induced by pH and guanidine hydrochloride. *J. Protein Chem.* 10, 359–367.
- 52 Brems DN (2002) The kinetics of G-CSF folding. *Protein Sci.* 11, 2504–2511.
- 53 Moon CP & Fleming KG (2013) Using tryptophan fluorescence to measure the stability of membrane proteins folded in liposomes. *Methods in Enzymology* 31, 1713–1723.
- 54 Natalello A, Ami D, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Tonon G, Scaramuzza S, Schrepfer R & Doglia SM (2012) Biophysical characterization of Met-G-CSF: effects of different site-specific mono-pegylations on protein stability and aggregation. *PLoS One* 7, e42511.
- 55 Miyafusa T, Shibuya R & Honda S (2018) Structural insights into the backbone-circularized granulocyte colony-stimulating factor containing a short connector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 224–228.
- 56 Ricci M, Sarkar C & Fallon E (2003) pH dependence of structural stability of interleukin - 2 and granulocyte colony - stimulating factor. *Protein Sci.* 12, 1030–1038.
- 57 Huang TC, Toraya H, Blanton TN & Wu Y (1993) X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 180–184.

- 58 Ilavsky J (2012) Nika: Software for two-dimensional data reduction. *J. Appl. Crystallogr.* 45, 324–328.
- 59 Orthaber D, Bergmann A & Glatter O (2000) SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *J. Appl. Crystallogr.* 33, 218–225.
- 60 Morimoto M, Imamura H, Shibuta S, Morita T, Nishikawa K, Yamamoto H, Tanaka R & Takanohashi T (2015) Asphaltene Aggregation Behavior in Bromobenzene Determined by Small-angle X-ray Scattering. *Energy and Fuels* 29, 5737–5743.
- 61 Svergun DI, Koch MHJ, Timmins PA & May RP (2013) *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules* International Union of Crystallography, Oxford Science Publications.
- 62 Terada T & Kidera A (2002) Generalized form of the conserved quantity in constant-temperature molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 116, 33.
- 63 Fukunishi Y, Mikami Y & Nakamura H (2003) The filling potential method: A method for estimating the free energy surface for protein-ligand docking. *J. Phys. Chem. B* 107, 13201–13210.
- 64 Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW & Kollman PA (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.
- 65 Greengard L & Rokhlin V (1987) A fast algorithm for particle simulation. *J. Comp. Phys.* 73, 325–348.
- 66 Greengard L (1988) The rapid evaluation of potential fields in particle systems. *Yale Univ. New Haven* 19, 1–101.
- 67 Van Gunsteren WF & Karplus M (1980) A method for constrained energy minimization of macromolecules. *J. Comput. Chem.* 1, 266–274.
- 68 Ryckaert J-P, Ciccotti G & Berendsen HJ. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341.
- 69 Humphrey W, Dalke A & Schulten K (1996) VMD : visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 7855, 33–38.
- 70 Kabsch W & Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- 71 Tina KG, Bhadra R & Srinivasan N (2007) PIC: protein interactions calculator. *Nucleic Acids Res.* 35, 473–476.
- 72 Wilmot CM & Thornton JM (1988) Analysis and prediction of the different types of  $\beta$  - turn in proteins. *J. Mol. Biol.* 203, 221–232.

- 73 Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S & Karplus M (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4, 187–217.
- 74 Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F & Serrano L (2005) The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 33, W382–388.
- 75 Toniolo C (1980) Intramolecularly hydrogen-bonded peptide conformations. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 9, 1–44.
- 76 Luo P, Hayes RJ, Chan C, Stark DM, Hwang MY, Jacinto JM, Juvvadi P, Chung HS, Kundu A, Ary ML & Dahiyat BI (2002) Development of a cytokine analog with enhanced stability using computational ultrahigh throughput screening. *Protein Sci.* 11, 1218–26.
- 77 Kolvenbach CG, Elliott S, Sachdev R, Arakawa T & Narhi LO (1993) Characterization of two fluorescent tryptophans in recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: comparison of native sequence protein and tryptophan-deficient mutants. *J. Protein Chem.* 12, 229–236.
- 78 Vogt G, Woell S & Argos P (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.* 269, 631–643.
- 79 Buß O, Rudat J & Ochsenreither K (2018) FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16, 25–33.
- 80 Myers JK, Pace CN & Scholtz JM (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* 4, 2138–48.
- 81 Piana S, Klepeis JL & Shaw DE (2014) Assessing the accuracy of physical models used in protein-folding simulations: Quantitative evidence from long molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24, 98–105.
- 82 Yu L, Li D & Bruschweiler R (2019) Balanced amino-acid specific molecular dynamics force field for the realistic simulation of both folded and disordered proteins. .
- 83 Deechongkit S & Kelly JW (2002) The effect of backbone cyclization on the thermodynamics of  $\beta$ -sheet unfolding: stability optimization of the PIN WW domain. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4980–4986.
- 84 Yu Y & Lutz S (2011) Circular permutation: a different way to engineer enzyme structure and function. *Trends Biotechnol.* 29, 18–25.
- 85 Floudas CA, Fung HK, McAllister SR, Mönnigmann M & Rajgaria R (2006) Advances in protein structure prediction and de novo protein design: a review. *Chem. Eng. Sci.* 61, 966–988.
- 86 Trabi M & Craik DJ (2002) Circular proteins--no end in sight. *Trends Biochem. Sci.* 27, 132–138.



- 87 本田真也、宮房孝光 環状化サイトカイン及びその製法. 特許 6525171号.
- 88 Shigekazu Nagata, Hideharu Taira, Alan Hall, Lorraine Johnsrud, Michel Streuli, Josef Ecsödi, Werner Boll, Kari Cantell & Charles Weissmann Shigekazu Nagata, Hideharu Taira, Alan Hall, Lorraine Johnsrud, Michel Streuli, Josef Ecsödi, Werner Boll KC& CW (1980) Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284, 316–320.
- 89 Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL & Walter MR (1996) Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha$  (2b) revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4, 1453–1463.
- 90 DeFelippis MR, Alter LA, Pekar AH, Havel HA & Brems DN (1993) Evidence for a Self-Associating Equilibrium Intermediate during Folding of Human Growth Hormone. *Biochemistry* 32, 1555–1562.

#### 発表論文

Miyafusa T, Shibuya R, Nishima W, Ohara R, Yoshida C & Honda S (2017) Backbone circularization coupled with optimization of connecting segment in effectively improving the stability of granulocyte-colony stimulating factor. *ACS Chem. Biol.* 12, 2690–2696. Copyright © 2017 American Chemical Society.

Shibuya R, Miyafusa T, Honda S (2019) Stabilization of backbone-circularized protein is attained by synergistic gains in enthalpy of folded structure and entropy of unfolded structure. *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.15092. Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Inc.

## 謝辞

本研究は、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修士課程および博士課程在学中、本田真也教授のご指導の下行われました。本田真也先生には、本論文の研究計画から論文の執筆まで、懇切丁寧なご指導をいただきました。また、小さな疑問や興味に対しても寛大にかつ時間をかけて議論していただくことにより、より多くの考える機会と、充実した研究環境を与えてくださいました。深く御礼申し上げます。

本論文副査でメディカル情報生命専攻の富田野乃准教授、深井周也准教授、富田耕造教授、富井健太郎教授、工学系研究科バイオエンジニアリング専攻/化学生命工学専攻の津本浩平教授には、専攻の中間報告、予備審査会、および本審査会を通して、大変貴重なアドバイスを頂きました。深く御礼を申し上げます。

学術論文の共著者である産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 タンパク質デザイン研究グループ 宮房孝光研究員には、実験の組み立て方、蛋白質工学の実験手法、論文執筆を含む研究に必要なスキルや考え方について、一からご指導いただきました。ここに感謝申し上げます。また、同じく学術論文の共著者である当時産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 分子細胞育種研究グループ 本田研究室に所属されていた二島渉博士、吉田屋也博士、大原璃恵氏に感謝いたします。

メディカル情報生命専攻 生命機能分子工学分野の宮崎健太郎教授には、研究計画と学生生活、学術論文および博士論文執筆に関して大変有意義なアドバイスを頂きました。深く感謝申し上げます。

産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 分子細胞育種研究グループ 本田研究室の渡邊秀樹主任研究員、大石郁子契約研究員をはじめとする皆様、また当時本田研究室でご助言をくださいました今村比呂志博士、塚本雅之博士をはじめとする皆様の日々の温かいご指導と議論により、充実した研究生活を送ることが出来ました。深く感謝申し上げます。

最後に、心配しながらも常に的確なアドバイスをくれた父、健康を気遣い温かく見守ってくれた母、日々話を聞き支えとなってくれた妹に感謝いたします。

2020 年 3 月  
渋谷 理紗