

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 渋谷 理紗

### 序論

蛋白質は、低分子で代替できない反応の特異性や高い活性を持つ。その有用性の高さから蛋白質は医薬品として用いられている。一方で、蛋白質は構造安定性やコロイド安定性が低いという問題がある。非天然構造の蛋白質は、機能の低下や身体への悪影響、および保管安定性や生体内安定性の低下を導く。安全で有用性の高い蛋白質医薬品を製造するためには、これらの恐れを取り除けるような構造安定性とコロイド安定性の高い蛋白質が求められる。

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。主鎖環状化は配列の改変を最小限に抑えたまま構造安定化できるため、予期せぬ構造変化や免疫原性のおそれが少ないという利点がある。しかし、主鎖環状化を用いた蛋白質の合理的な設計手法は確立されていない。構造安定性の高い主鎖環状化蛋白質を設計するためには、主鎖環状化が蛋白質に与える効果を正確に理解する必要がある。

本研究では、主鎖環状化蛋白質の設計手法の確立に向けて、主鎖環状化が蛋白質に与える安定化効果の解明を研究目的とした。対象蛋白質として、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor; G-CSF) を用いた。G-CSF は好中球数を維持させる役割を持ち、好中球減少症の治療薬として使用されている。しかし、構造安定性とコロイド安定性が低いため、これらの安定性の向上が課題の一つとなっている。

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た構造である。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。また、作製した環状化 G-CSF について、熱安定性や熱力学的安定性の測定、結晶構造解析、分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、主鎖環状化が蛋白質に与える安定化効果を解析した。

### 本論

#### 1. 環状化 G-CSF の作製

本田らは、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。

本研究は、その解析結果を受けて、2, 5, 9 アミノ酸のターンがヒト G-CSF に適した環状化末端のアミノ酸数と推測し、主鎖環状化 G-CSF をデザインした。研究に用いたのは、主鎖環状化末端のアミノ酸数がそれぞれ 2, 5, 9 アミノ酸になるように調節した 3 種の環状化 G-CSF (それぞれ C163, C166, C170) 、末端の長さを調節せずに結合させた環状化 G-CSF (C177) 、直鎖状 G-CSF (L175) の計 5 種の G-CSF である。

発現させた蛋白質の精製後、ポリアクリルアミド電気泳動と質量分析の確認によって主鎖環状化 G-CSF が単離精製できていることを確認した。また、表面プラズモン共鳴法により、環状化 G-CSF の G-CSF 受容体結合活性が維持されていたことを確かめた。

## 2. 環状化 G-CSF の天然構造と変性構造の評価

まず、円偏光二色性 (CD) スペクトルを用いて、環状化 G-CSF (C163, C166, C170, C177) と直鎖状 G-CSF の天然構造の二次構造を比較した。環状化 G-CSF と L175 は同様の二次構造含有量であった。

次に、結晶構造解析を用いて、C166 とヒト野生型 G-CSF の天然構造の三次構造を比較した。その結果、環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF のフォールド構造を維持 ( $\text{RMSD}_{\text{C}\alpha} = 0.86 \text{ \AA}$ ) したまま、主鎖環状化したことがわかった (図 1)。

超遠心分析を用いて、溶液中における天然状態と変性状態の三次構造の分子サイズも比較した。C166 と L175 を 0 M および 5 M グアニジン塩酸塩 (GdnHCl) の条件下で透析することによって、天然状態と変性状態における C166 と L175 を得た。2 つの G-CSF の分子サイズを比較した結果、天然状態における 2 つの G-CSF の分子サイズは同様であった。一方、変性状態において、C166 は L175 に比べてコンパクトな分子サイズであることがわかった。C166 は、N 末端と C 末端を結合することによって、鎖の広がりが抑えられたと考えられる。

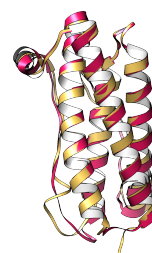


図 1. C166 (赤) (PDB: 5ZO6) とヒト野生型 G-CSF (黄) の重ね合わせ

### 3-1. 溶液中の構造安定性の評価

以下の 2 つの手法を用いて、環状化が溶液中の G-CSF に与える構造安定化効果を調べた。

まず、CD スペクトル測定を用いた変性中点温度 ( $T_m$  値) の算出によって、4 種の環状化 G-CSF と L175 の熱安定性を比較した。環状化 G-CSF の  $T_m$  値は L175 の  $T_m$  値に比べて増大した。特に、C166 の  $T_m$  値が最も高かった (図 2)。

次に、熱力学的安定性を比較するために、0–6 M の GdnHCl 溶液を含む緩衝液で透析したサ

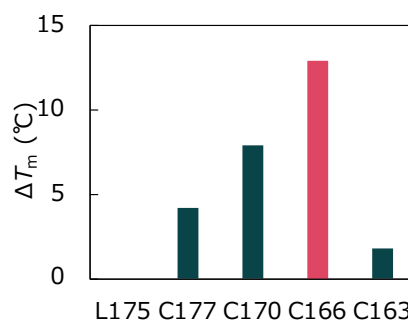


図 2. 見かけの変性中点温度 ( $T_m$  値) の比較。  $\Delta T_m = T_{m, \text{circ G-CSF}} - T_{m, \text{L175}}$  である。

サンプルの蛍光測定を行った。実験の結果、熱安定性と同様に、C166、C177、L175 の順に熱力学的安定性が高いことがわかった。

環状化 G-CSF は、2.で観察されたように、変性状態の鎖エントロピーが下がったことによって自由エネルギー差が増大し、構造安定化したと考えられる。

### 3-2. 分子内水素結合の評価

3-1. より、C166 が最も構造安定であることがわかった。C166 の高い構造安定性の要因を理解するために、C166 と野生型 G-CSF に存在する分子内結合数と相互作用数を比較した。結晶構造中において、C166 は野生型 G-CSF に比べて環状化末端領域およびヘリックスを形成する水素結合数が増大したことがわかった。さらに、MD シミュレーションにより得た平衡状態における構造群 (MD 構造セット) を用いて、平衡状態における C166 と L175 の分子内水素結合数を調べた。結晶構造と同様に、C166 は L175 に比べて環状化末端領域およびヘリックスを形成する水素結合数が増大した。この分子内水素結合数の増大が、天然状態における C166 の構造安定化に寄与したと考えられる。

### 3-3. 非共有結合エネルギーによる構造安定性の評価

C166 を構造安定化させたメカニズムをさらに調べるために、3種の力場を用いてエネルギー計算を行った。AMBER 力場および CHARMM 力場を用いた非共有結合エネルギー計算では、C166 は L175 に比べて静電相互作用エネルギーが増大していることがわかった。この結果は、C166 の水素結合による構造安定化効果を示していると考えられる。次に、FoldX 力場を用いて自由エネルギー差計算を行った。C166 の構造安定化は、第一に主鎖環状化による主鎖の構造エントロピー、第二に主鎖の水素結合エネルギーによって構造安定化していた。

## 4. 凝集性の評価

バイオ医薬品の保管安定性は、蛋白質の凝集性に大きく依存する。主鎖環状化が凝集性に与える影響を調べるために、以下の三つの手法を使って実験を行った。

まず、4-70°Cの熱に対する凝集性（熱耐性）を調べた。熱耐性は熱安定性・熱力学的安定性と同様に、C166、C177、L175 の順に高いことが分かった。

次に、長期 (5 日) 間の熱に対する凝集性（長期凝集性試験）を調べた。50°Cでインキュベートした C166 と L175 の単量体量の時間経過を測定した。その結果、L175 に比べて C166 の長期凝集性が抑えられたことがわかった。

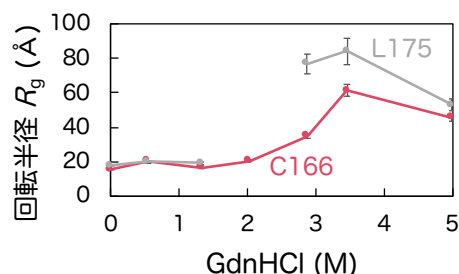


図 3. GdnHCl 濃度依存的な凝集体の大きさの変化。GdnHCl 2 M における L175 のサンプルは白濁したため測定していない。

さらに、X線小角散乱を用いて、C166とL175に含まれる凝集体の有無と大きさを調べた。3-1.と同様に、0-5 M GdnHClを含む緩衝液で透析したC166とL175を準備した。実験の結果、C166は1.5-3.4 M GdnHClにおける凝集体の形成が著しく抑えられていた(図3)。

環状化によって、熱およびGdnHClに対するG-CSFの凝集性が減少したことがわかった。凝集性の違いは、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。

## 5. 環状化末端の構造と分子内水素結合の評価

1.の通り、環状化G-CSFは、ヒトG-CSFの局所構造を維持するようにデザインされた変異体である。デザインした環状化G-CSFの構造が適切にデザインできていたかどうかを評価するために、C166の環状化末端のターンの三次元構造や水素結合が形成された位置を調べた。

その結果、C166のMD構造セットの水素結合の形成位置と頻度は、C166のデザインに使用したヘリックスターンヘリックス構造(ヒット構造)と同様の特徴を持つことがわかった。ターン構造は、水素結合の形成位置と二面角によって分類できる。C166のMD構造セットとヒット構造のターンは、どちらもタイプIの $\beta$ ターンであることがわかった。この結果は、PDBの局所構造における水素結合の形成位置と頻度の情報を用いて、ターン構造をデザインすることが可能であることを示唆する。

## 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の凝集性も顕著に減少させた。環状化によって凝集を促す変性構造の数が制限されたために凝集速度が抑えられ、コロイド安定性が増大したと考えられる。

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。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、保管安定性や生体内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。