

デングウイルス由来の ED3 ドメインの熱安定性と会合状態についての解析

黒田研究室

学籍番号： 11251038

氏名：早乙女 友規

【背景】

デングウイルス由来エンベロープ蛋白質第3ドメイン(ED3)には2つのエピトープ領域が存在し、宿主細胞への侵入や抗体認識に関係している。よって、この蛋白質の構造や物性を解析することは、デングウイルスの感染機構や免疫的な生体防御機構について新たな知見を得るために重要とされる。先行研究では4型デングウイルス由来ED3(DEN4)の結晶構造を決定しており、その構造安定性を調べるため、本研究ではDSC(示差走査熱量計)測定による熱安定性の評価を試みた。その結果、特殊な二次構造含量や熱力学的性質を有することが判明し、DEN4の熱変性が解離・会合を伴うという可能性が示唆された。そこでCD(円偏光二色性)測定とSEC(サイズ排除クロマトグラフィー)測定を合わせて行い、会合状態を調べることで、DEN4が解離・会合を伴う熱変性をする可能性について検証した。

【方法】

DSC測定: pH4.1-5.1、蛋白質濃度60 μM、温度範囲10-120°Cで熱容量の温度変化を測定した。**CD測定**: pH4.1-5.1、蛋白質濃度5-50 μM、温度範囲20-95°Cで楕円率の温度変化を測定した。**SEC測定**: pH4.1-5.1、蛋白質濃度5-20 μM、温度25°Cで検出されたピークの保持時間と面積から、モノマーとダイマーの比率を算出した。

【結果および考察】

DSC測定: 通常の小型球状蛋白質は二状態の熱変性をするのに対して、DEN4はpH4.1-5.1で三状態の熱変性をしていた(Figure A)。DEN4がシングルドメイン蛋白質であり熱変性過程で中間体が存在する可能性が低いことを考慮すると、DEN4の熱変性が解離・会合を伴う可能性が示唆された。**CD測定**: DEN4の熱変性は可逆的かつ走査速度に依存しないことから、測定は平衡状態で行われたと示唆された。したがってルシャトリエの原理を適用でき、蛋白質濃度の増加に伴い変性中点温度が低下した(Figure B)傾向と合わせて考えると、DEN4は会合を伴う可逆的な熱変性をしている($nN \leftrightarrow D_n$)と考えられる。**SEC測定**: 温度25°C、蛋白質濃度10 μMの条件でDEN4のダイマー比率は60%以上であり、常温ではダイマーを形成しやすいうことがわかった。また蛋白質濃度の増加に伴いダイマー比率が高くなつたのに対してモノマー比率は低くなつたことから、常温でモノマーとダイマーは平衡状態にある($2N \leftrightarrow N_2$)と考えられる。

【結論】

DEN4は常温でダイマーを形成しやすく、高温では会合を伴う可逆的な熱変性をしている($2nN \leftrightarrow nN_2 \leftrightarrow D_{2n}$)ことが分かった。天然状態でダイマーを形成している蛋白質が、熱変性によってモノマーに解離せず、逆にダイマー同士が会合するという熱変性機構は非常に珍しく、その原理を調べることは蛋白質の構造・機能を自由に設計するための生命工学研究において重要と考えられる。今後は特定のアミノ酸残基を置換し、会合体を形成しないDEN4変異体を作製することで、会合を伴う可逆的な熱変性のメカニズムを原子レベルで解析したい。

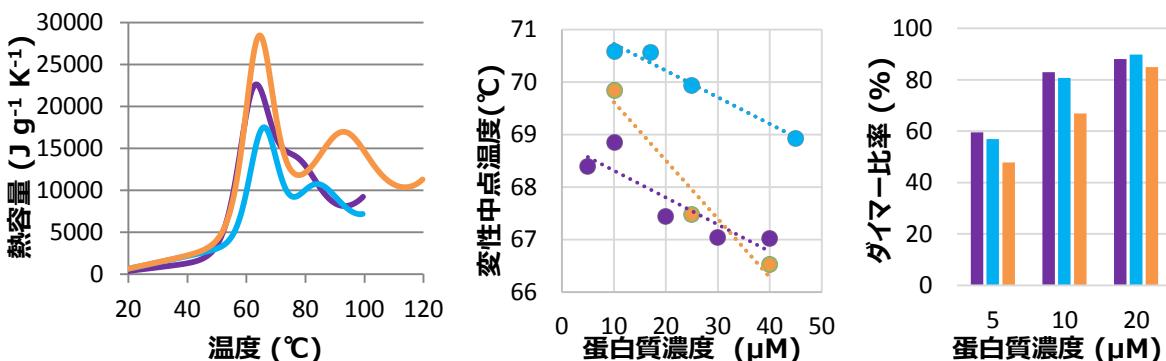


Figure. DEN4 の熱安定性と会合状態のプロファイル

A (左): DSC測定により得られた熱容量曲線

B (中): CD測定により得られた蛋白質濃度と変性中点温度の相関

C (右): SEC測定により得られた蛋白質濃度とダイマー比率の相関