

短いペプチドタグを付加したデングウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメインの物性評価

黒田研究室

学籍番号：12251031

佐々木 英之

【背景・目的】

デングウイルス由来エンベロープタンパク質は三つのドメインから構成され、特に第3ドメイン(ED3)はエピトープ領域を持っている。そのため、デングウイルスの免疫機構などを解明するうえで重要であると考えられる。本研究室では会合状態など物性の違いがデングウイルスの免疫応答にどのような影響を与えるのかに注目している。この研究を行う上でED3の物性を変化させることが重要であるが、先行研究においてタンパク質への短いペプチドタグの付加が溶解度や会合状態に影響を与えることが示唆されている。そこで、本研究では、DEN3ED3(D3)とDEN4ED3(D4)のC末端に同一数残基のアミノ酸を付加したタンパク質を用いてDLS(動的光散乱法)、SEC(サイズ排除クロマトグラフィー)により測定し、物性の違いを評価した。

【研究方法】

D3とD4のC末端にリンカーとしてグリシン2残基を付加した変異体(C2G)、さらにその先に同一アミノ酸を3残基もしくは5残基を付加した変異体(C3I,C5D,C5K)を用いた。そして、タンパク質濃度0.8mg/ml、5mMリン酸バッファー(0mMNaCl,100mMNaCl又は300mMNaClを含むPH7.3)のサンプルを用意した。これらを25℃もしくは37℃で1時間インキュベーションした後、20分間遠心(20000g,25℃又は37℃)をし、その後、DLSで平均分子サイズ、SEC(300mMNaClのみ)でダイマーの割合とテトラマーの割合を計測した。

【結果及び考察】

まず、DLSの結果は図1と図2のようになった。グラフを見ると、D4では25℃、37℃ともにタグの付加、塩濃度の違いによる分子サイズの違いは見られなかった。これは、D4は結晶構造においてダイマーを形成していることが予測されているが、このダイマーが非常に安定であるためであると考えられる。D3においては、全体的な傾向としては、25℃に比べ37℃の方が平均分子サイズが大きくなっている。次にSECでは分子量からダイマーの割合とテトラマーの割合を求めたが、D3とD4ともにC5Dにおいてダイマーの割合が低くなっていることが分かった。D3(等電点=pI 7.94)、D4(等電点=pI 7.96)ともに塩基性タンパク質であるが、これに酸性のペプチドタグを付加したことにより、タグと静電的相互作用をしており、不安定になっていることが考えられる。またD3においては25℃より37℃でダイマーの割合が減少しテトラマーが増加する傾向が見られたが、D3C5Kは37℃でもダイマーが高い割合で存在しテトラマーをほとんど形成しないことがわかった。C5KはC5Dとは異なり、塩基性タンパク質に塩基性タグを付加していることになるので、静電的な反発がテトラマー形成を防いでいることが示唆される。

DLSとSECの結果を統合すると、D3については25℃に比べ37℃の方がテトラマーを形成している割合が大きくなり、平均分子サイズが大きくなっていることが分かった。D4については25℃でも37℃でもタグの種類に関わらずダイマーの割合が高いままで平均分子サイズが大きくなることはなかった。以上から、本研究での目的であるタグの付加による会合状態などの物性の変化はあまり見られなかった。今後の課題としては今回とは異なるアミノ酸タグを付加し、会合度の変化を確かめることが必要である。

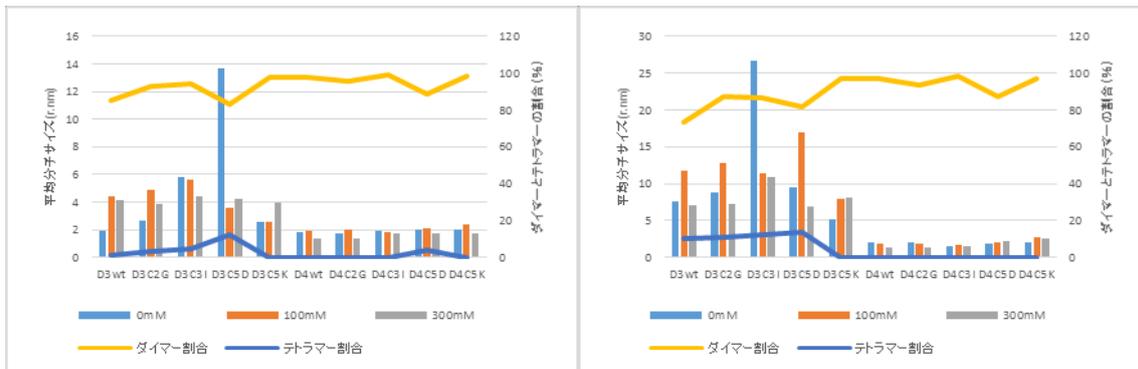


図1 25℃でのDLS (平均分子サイズ) とSEC (ダイマーとテトラマー割合) の結果

図2 37℃でのDLS (平均分子サイズ) とSEC (ダイマーとテトラマー割合) の結果