

複数変異導入 Dengue ウイルス由来 ED3 に対するモデリングと熱安定性評価		
黒田研究室	学籍番号 : 13251056	萩原 くるみ

【背景・目的】

Dengue ウイルスは 4 つの血清型 (D1~D4) に分類され、最初に感染した血清型と異なる血清型に感染すると Dengue ショック症候群を起こす場合がある。エピトープ領域(抗体認識部位)と受容体結合部位の両者は、3 つのドメインから成る Dengue ウイルスのエンベロープタンパク質の第 3 ドメイン (ED3) に座位しており、ED3 は血清型特異的免疫応答において重要である。当研究室の先行研究で、D3 と D4 のエピトープ領域を入れ替えた変異体を作製し、交差反応と抗体認識特異性の解析を行った。D3ED3 の 310 残基目の Val を D4ED3 の Met に置換すると (D3\_V310M)、M310 が I387 と強く衝突し、熱安定性が低下することが明らかとなった (野生型 D3ED3 では V310、I318、I387、野生型 D4ED3 では M310、T318、L387)。一方、D4ED3 で見られるように 310 残基目が Met で 387 残基目が Ile でも、318 残基目が Thr であれば原子間衝突が減少すると推測できた。そこで、本研究では I318 を、D4ED3 で見られる側鎖の小さい Thr に置換し、モデリングと円偏光二色性分光 (CD) で熱安定性が改善するか検証した。

【研究方法】

計算的手法において、D3ED3、D3\_V310M、D3ED3 の 310 残基目を Val から Met に、318 残基目を Ile から Thr に置換した変異体 (D3\_V310M\_I318T) を Coot でモデリングし、D3\_V310M と D3\_V310M\_I318T では 310 残基目、387 残基目のそれぞれの rotamer を全て組み合わせ、D3ED3 を含めて Molprobity を用いて原子間衝突を評価した。実験的検証としては、3 つの変異体を作製し、その熱安定性を、CD を用いて検証した (タンパク質濃度 : 10 $\mu$ M、溶媒 : リン酸緩衝液 (20mM、pH7.0))。

【結果及び考察】

モデリングでは、全ての 310、387 残基目の rotamer の組み合わせにおいて、318 残基目の変異後、原子間衝突は完全になくなることはなかったが、clashscore は減少し、安定性が向上すると期待された。その内、D3ED3 より clashscore が低い rotamer の組み合わせが 3 通り見つかった (表 1)。CD 測定において変性中点温度 ( $T_m$ ) が表 2 の通りになり、318 残基目の変異を入れるとさらに不安定化することがわかった (図 1)。したがって、318 残基目を Ile から Thr に置換することで、モデリングでは安定性の向上が期待されたが実際は不安定化した。この矛盾が生じた理由として、318 残基目の Ile を Thr に置換した際、主鎖構造に微小な移動が生じたことと、疎水性アミノ酸 (Ile) を性質が異なる極性アミノ酸 (Thr) に置換したため、モデリングでは予測できなかった微細な構造変化が生じたことが考えられる。また、高い温度因子を除いた clashscore のみを計算すると、半数以上の組み合わせが変異後、clashscore が増加したことも考えられる。以上、本研究から主鎖構造を固定したホモロジーモデリングの限界が見出される結果となった。

表 1 M310(mtp)、I387(mm)における

clashscore

D3ED3	8.49
D3_V310M	11.09
D3_V310M_I318T	7.85

表 2 各タンパク質の変性中点温度 ( $T_m$ )

D3ED3	66.88 $^{\circ}$ C
D3_V310M	56.24 $^{\circ}$ C
D3_V310M_I318T	41.32 $^{\circ}$ C

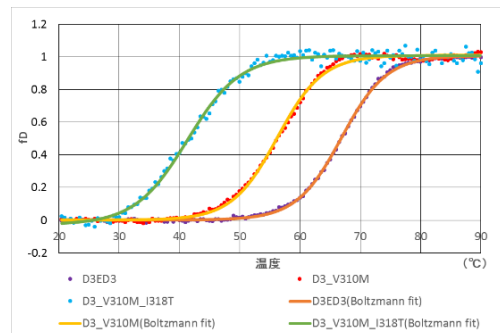


図 1 CD 測定