

静電相互作用により会合した Dengue Virus ED3 タンパク質凝集体の物性と免疫原性の評価		
黒田研究室	学籍番号: 16251005	大川 真実

[背景・目的]

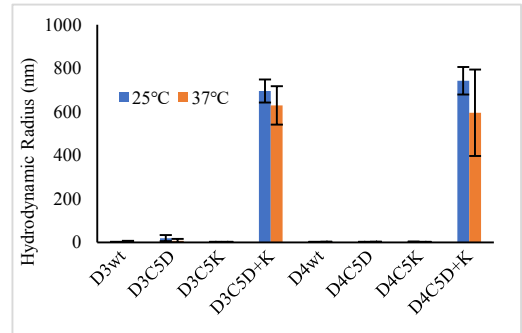
タンパク質の凝集は、単量体で存在するときは免疫原性を持たないタンパク質の免疫原性を増強させることもあると報告されている。タンパク質凝集が免疫原性を引き起こすメカニズムは解明されておらず、0.1~10 μ m の粒子の評価が重要視されている。当研究室では、タンパク質の構造に影響を与えることなく溶解性を制御する 5~7 残基の短いペプチドタグ(SCP タグ: Solubility Controlling Peptide Tag)を用いている。先行研究で、3 型 Dengue Virus 由来エンベロープタンパク質第 3 ドメイン(D3ED3)に疎水性 SCP タグを付加した変異体は野生型よりも粒子半径、免疫原性を上昇させた。本研究では D3ED3 に加え、4 型 Dengue Virus 由来 ED3 タンパク質(D4ED3)をモデルタンパク質として使い、酸性 SCP タグと塩基性 SCP タグを付加した変異体を混合したときの物性と免疫原性を評価した。

[手法]

D3ED3、D4ED3 の野生型(D3wt 及び D4wt)、各 ED3 タンパク質に SCP タグとして C 末端にアスパラギン酸 5 残基またはリシン 5 残基を付加した変異体(D3C5D、D3C5K、D4C5D 及び D4C5K)を実験に用いた。物性を解析するために動的光散乱法(DLS)測定、円偏光二色性(CD)スペクトル測定を行った。免疫応答実験では Jcl:ICR マウスに対して 7 日毎にタンパク質を 30 μ g ずつ 5 回または 7 回皮下注射で投与した。投与 4 日後に尾部から採血し、ELISA 法を用いて血清中の抗 D3ED3 または抗 D4ED3 IgG 力価を測定した。物性測定、免疫応答実験はすべてバッファー濃度 10mM リン酸+25mM 塩化ナトリウム水溶液 (pH7.0)、タンパク質濃度 0.3mg/mL(C5D と C5K の混合サンプル (D3C5D+D3C5K 及び D4C5D+D4C5K)は各タンパク質濃度 0.15mg/mL)で行った。

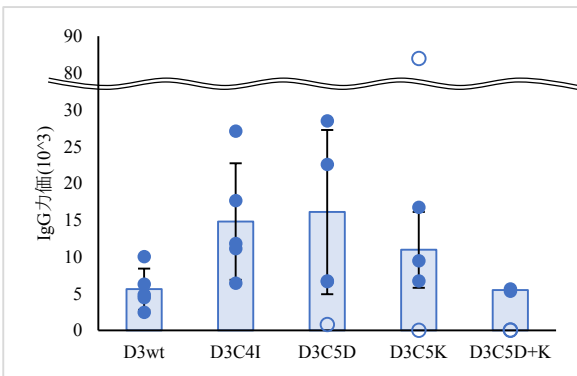
[結果・考察]

DLS 測定の結果、D3C5D+D3C5K 及び D4C5D+D4C5K が半径 500nm 以上の凝集を形成した(図 1)。これは SCP タグの付加により極性を持った D3C5D(pI=5.15)と D3C5K(pI=9.35)の間で生じた静電相互作用によるものと考えられ、4 型についても同様のことが言える。また CD スペクトル測定の結果、3 型 4 型ともに wt と C5D+C5K で二次構造含有量は同様であった。免疫応答実験では、D3C5D+D3C5K は D3wt と比較して抗 D3ED3 IgG 力価に

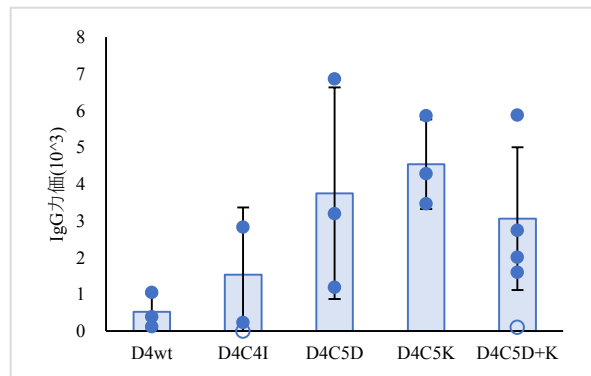


(図 1)DLS 測定結果

顕著な差がみられなかった(図 2)。一方で、D4C5D+D4C5K は抗 D4ED3 IgG 力価を D4wt と比較して約 6 倍に向上させた(図 3)。これらのことから SCP タグ付加により形成されるタンパク質凝集の大きさと免疫原性の強さには相関があるとは一概には言えず、今後も検討が必要であることが示唆された。



(図 2)D3ED3 変異体に関する免疫応答実験結果



(図 3)D4ED3 変異体に関する免疫応答実験結果

(図 3)及び(図 4)の平均値は白丸プロットのマウスのデータを除いて算出した