

L1112-16	<b>H3N2 亜型インフルエンザウイルス RBD タンパク質の 大腸菌発現における中間体の解析</b>				
	氏名	堀 秀俊	主査	黒田	副査

【背景】 組み換えタンパク質製剤は抗体や酵素への応用はもちろん、近年ではサブユニットワクチンへの応用も注目されている。特に、感染力が強いインフルエンザウイルスワクチンでは、爆発的な感染拡大に対応できる安価で大量生産可能な製造手法への応用に注目が集まっている。本研究では、現行の鶏卵を用いた弱毒化生ワクチンにおいて効果が低いとされる H3N2 亜型ウイルスのサブユニットワクチン開発を目的として研究を行った。一般によくフォールディングされた天然型タンパク質に対し、ミスフォールドやジスルフィド結合の形成不全を起こした非天然型タンパク質は、比較的疎水性であることが知られている。これはフォールディングの際に内側に折りたたまれる疎水性アミノ酸残基が露出すること由来すると考えられている。また、天然構造を持つタンパク質は同じペプチド鎖からなる構造のなかでエネルギー的に最も安定であるという知見から、逆相 HPLC ピークは最も大きなタンパク質ピークに続き、中間体やミスフォールド型タンパク質の小さなピークが観測されるということが一般的な理解である。このような知見を踏まえ、H3N2RBD タンパク質の特異な HPLC ピークを示す二種類のタンパク質について、研究を行った。

【手法】 大腸菌発現系において、H3N2 亜型インフルエンザウイルス HA1 の RBD タンパク質を精製した。精製時逆相 HPLC により観測された二種類のタンパク質ピークをそれぞれ分取し、DLS、SLS、CD 測定などの物性測定を行った。また、ESI による質量分析を行い、目的タンパク質のジスルフィド結合の有無を調べた。さらに、弱酸性溶液中で酵素処理を行い、立体構造の安定性比較と、酵素処理ペプチド断片の質量分析を行い、ジスルフィド結合の特定を行った。

【結果】 CD, Trp 蛍光測定により得られた二次構造や三次構造を示すスペクトルには、二種類のタンパク質の間に大きな違いは見られなかった。さらに ESI-TOF-MS の示す分子量には 1 Da の違いもなく、どちらのタンパク質も天然型タンパク質同様に 2 本のジスルフィド結合を形成していることが示された。これに対し、疎水性を示すメジャーピークは弱酸性溶液中において酵素に対し、抵抗性を示した。さらに、メジャーピーク由来タンパク質を酵素処理したタンパク質断片の中から、天然型ジスルフィド結合由来のフラグメントが発見された。

【結論】 精製過程において観測された二種類の HPLC ピークのうち、天然型の構造を有しているものは、メジャーピークのタンパク質であることが示された。これにより、H3N2RBD は天然型ジスルフィド結合を形成する天然型タンパク質よりも親水性の高い、同タンパク質由来の HPLC ピークが存在するという、非常に珍しいタンパク質であることが示唆された。

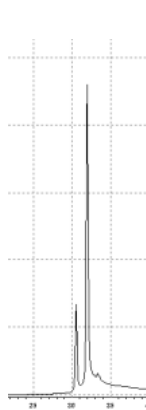


Fig.1 HPLC ダブルピーク

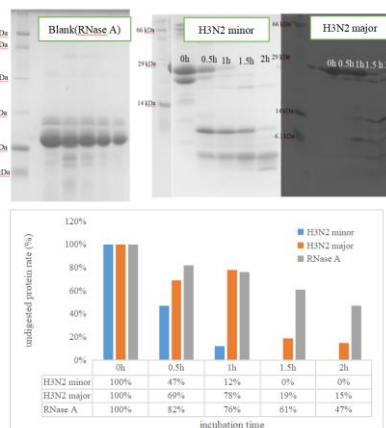


Fig.2 ペプシン消化に対する抵抗性の違い

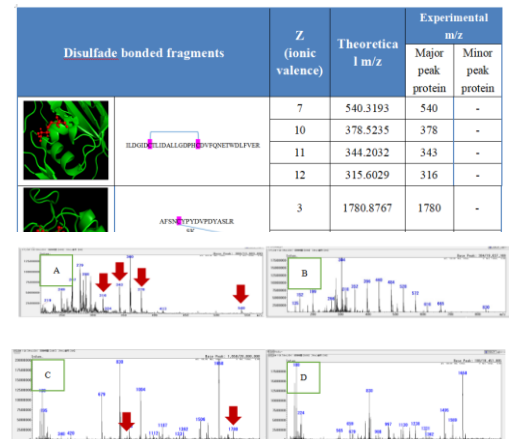


Fig.3 LC-MS によるフラグメント解析