

デングウイルスエンベロープタンパク質第3ドメインの一残基置換が及ぼす生物物理学的特性の変化

黒田研究室	学籍番号: 21261082	内田奈成
-------	----------------	------

[背景・目的] 組み換えタンパク質製剤は、特異性の高さや低副作用といった利点を持つ一方で、凝集・会合体による免疫応答の増強や低い免疫原性が課題となっている。近年、アミノ酸1残基の置換がタンパク質の物性や免疫応答に与える影響が注目され、特定の変異が安定性や抗体との相互作用を改善する可能性が示唆されている。本研究では、3型デングウイルス(Den3)由来エンベロープタンパク質第3ドメイン(D3ED3)及びD4ED3(4型(Den4)同タンパク質)を用いて実験を行った。305~311残基はエンベロープ領域に属し、先行研究により、V303、L304、L306、E307、V308が抗D3ED3モノクローナル抗体との相互作用に関与することが明らかになっている。そこで、本研究では、電荷の観点から305残基に、外部と接触可能な表面積(ASA)の観点から309残基に変異を導入し(表1)、その影響が生物物理学的特性に及ぼす変化を評価した。これにより、製剤の品質向上やワクチン設計における免疫原性制御の指針を提供することを目指す。

[手法] Den3とDen4の野生型と変異体(D3K305D、D3S309A、D4D305K、D4A309S)を大腸菌により発現し、タンパク質精製を行った。野生型と変異体を含めた6種類それぞれのタンパク質に対して物性を評価するため、DLS(動的光散乱)測定、SLS(静的光散乱)測定、CD(円偏光二色性)測定、プロテアーゼ限定分解を行い、粒子径、二次構造、化学的安定性について比較した。また、1残基置換が及ぼす影響について考察した。

[結果・考察] 精製したタンパク質の粒子径について、DLS測定・SLS測定の結果によると、変異に野生型と比較して大きな差は見られず、アミノ酸1残基置換による会合体形成などの影響は生じなかつたと考えられる。CD測定による熱安定性の評価では、65°C前後で変性した。D4D305Kは50°Cの時点でスペクトルに変化が生じ、置換することで熱安定性が低くなつた。305番目がAspからLysに置換され、306番目のLysとの間で正電荷同士の静電的反発が起こつた可能性が高い。この静電的反発が、タンパク質の局所構造や熱安定性を低下させたと考えられる。T_m測定(図1)では、305残基の変異についてD3ED3では安定性を上昇させ、D4ED3では低下させた。LysとAspの置換によって周囲の電化環境が変化し影響を与えたと考えられる。プロテアーゼに対する感受性を比べると、温度変性曲線と相關していた。本研究の結果から、1残基置換による粒子半径や二次構造に有意的な差は見られなかつたが、305残基目の電荷変化を伴う変異は化学的安定性や熱安定性に影響を及ぼした。今後は変異による免疫応答への影響を評価するため、ELISA(酵素結合免疫吸着法)やフローサイトメトリーを行いたい。

残基	Den3			Den4		
	D3wt	D3K305D	D3S309A	D4wt	D4D305K	D4A309S
305	K	D	K	D	K	D
306	K	K	K	K	K	K
307	E	E	E	E	E	E
308	V	V	V	M	M	M
309	S	S	A	A	A	S
310	E	E	E	E	E	E
311	T	T	T	T	T	T

表1.変異箇所の比較。

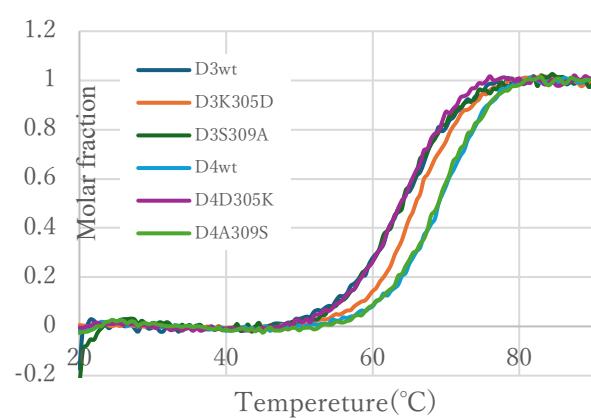


図1.各温度変性のグラフ