

L1211-3	日本脳炎ウイルス EnvD3 の物理的性質及び免疫原性に金属イオンが与える影響					
	氏名	森越 菜々香	主査	黒田	副査	長澤・野口・山岸

【背景】1980年代初頭の医薬品としての組み換えヒトインスリンの導入以来、タンパク質治療薬の臨床使用は劇的に増加した。近年では mRNA ワクチンに次ぐ SARS-CoV-2 に対するワクチンとして組換えタンパク質ワクチンが日本で製造販売承認を受ける等、組換えタンパク質を用いたワクチン開発も進展している。組換えタンパク質ワクチンは生ワクチン等と比較して製造コストや病原性の復帰リスクの低さといった利点がある一方で免疫原性の低さが課題となっている。そこで我々はタンパク質の会合体に着目した。タンパク質製剤において会合体の形成は予期せぬ免疫応答を誘導するリスク因子として懸念されているが、会合体形成の制御が可能となればワクチンシーズとして応用できると考えられる。本研究では会合体形成の手段としてヒスチジンと金属イオンの相互作用に着目し、日本脳炎ウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメイン (JEV ED3) をモデルタンパク質として用いて、ヒスチジンタグを付加したタンパク質と金属イオンによる会合体形成、免疫原性への影響について評価した。

【手法】JEVED3 の野生型(JEV wt)、N 末端に His タグを付加した変異体(JEV His)を用いた。動的光散乱(DLS)測定、静的光散乱(SLS)測定により会合体形成、円偏光二色性(CD)測定により二次構造の評価、トリプトファン蛍光測定により三次構造の評価をそれぞれ行った。さらに実験に用いた金属イオンについて MTT アッセイにより濃度と生体への影響について評価した。そして、Jcl:ICR マウスに JEV wt と JEV His を投与し、ELISA 法を用いて血漿中の抗 JEVED3 IgG 抗体量をモニタリングした。

【結果・考察】JEVHis は 5μM のコバルト、ニッケル、亜鉛、銅を添加することで会合体を形成した (Fig.1)。これらの会合体は His タグと非常に低濃度な金属イオンの錯体形成により誘導されたものであると考えられる。また、会合体形成の有無によらず高次構造に変化が見られたことから (Fig.2)、金属イオンの添加は二次構造に影響を与えることが示唆されたが、スペクトルの形状は保っていることから構造変化は部分的であると考えられる。免疫応答実験の結果、JEVwt + Co, JEVHis + Co は 3 回の投与、JEVwt + Ni は 4 回の投与により JEVwt と比較して免疫原性が増強し (Fig.3)、免疫記憶細胞の発現率も増加した。この結果より、特定の金属イオンがアジュバントとして機能することが示唆された。

【結論】タンパク質の会合体は免疫原性を増強することが知られているが、本研究結果では会合の有無ではなく、金属イオンの種類に影響されると考えられ、特にコバルトの添加では野生型、His タグ付加変異体に関わらず免疫原性が向上し、免疫記憶細胞の発現率も増加した。この結果より低濃度のコバルトがアジュバントとして機能する可能性が示唆された。次のステップとして、細胞とウイルスを用いた中和能実験やタンパク質の投与量等の条件を変更した免疫応答実験を行うことで、コバルトの有用性をより詳細に検討することが可能となるのではないかと考える。

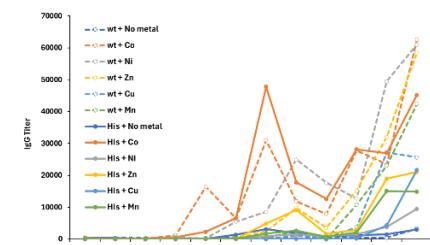
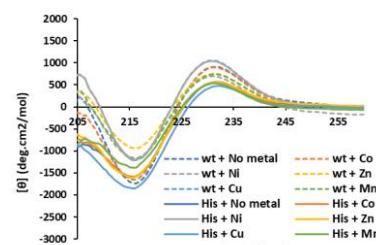
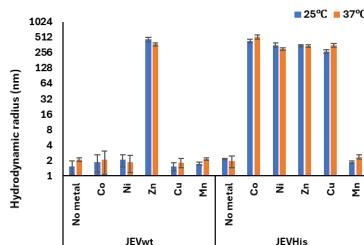


Fig.1| JEVwt/His+各金属イオンの粒子半径

Fig.2| JEVwt/His+各金属イオンの二次構造

Fig.3| IgG 抗体価の推移

いずれの実験もタンパク質濃度 0.3mg/mL、PBS バッファー(pH7.4)、金属イオン濃度 5μM のサンプル条件で行った。