

大腸菌発現系を用いた FIPV-2 受容体結合ドメイン (RBD) の精製と物性評価		
黒田 研究室	学籍番号:22261032	氏名小泉友理夏

[背景]

猫伝染性腹膜炎 (FIP) は、猫コロナウイルス (FCoV) の変異株である FIP ウイルス (FIPV) によって引き起こされる致死率の高い疾患である。特に血清型 II 型 (FIPV2) は、猫腸コロナウイルス (FECV) と犬コロナウイルス (CCV) の遺伝子再組換えにより生じ、スパイクタンパク質 (S タンパク質) を介して宿主細胞へ感染する致死性の高い型である。RBD は複雑な立体構造とジスルフィド結合を有しており、精製が困難である。そのため、物性測定とその物性把握が課題となっている。

[目的]

本研究の目的は、大腸菌発現系を用いた FIPV2-RBD の最適な発現・精製プロトコルを確立し、得られた目的タンパク質の物理化学的性(可逆性)を明らかにすることである。これにより、将来的な FIP 治療の基礎知見を得ることを目指す。

[実験方法]

本研究では、迅速かつ安価に大量調製が可能な大腸菌発現系を採用した。実験は既存の FIPV I -RBD の精製プロトコルを参考に精製を行った。目的タンパク質の回収を容易にするため、アフィニティークロマトグラフィーに有用な His タグ (ポリヒスチジンタグ) を付加した発現ベクターを構築し、高純度な His タグ付き RBD (以下、目的タンパク質)の単離を試みた。また、既存の FIPV I -RBD プロトコルの各実験過程での条件を都度変更し、精製量の向上を目指した。精製後、単離したタンパク質の物性測定(DLS, SLS, CD, トリプトファン蛍光測定、熱変性曲線)を行い、得られた物理化学的性質から目的タンパク質の精製を確認した。

[結果・展望]

既存のプロトコルから、実験を重ねたところ、以下の、表 1 の条件に変更することで精製量が既存の約 4 倍に向上した。また、目的タンパク質を DLS, SLS, CD, トリプトファン蛍光測定、熱変性曲線, MALDI-TOF MS をバッファー(HEPES, pH 4.0, 10mM)で測定をおこなったところ、このバッファー条件下では、温度変化に関わらずモノマーを維持し、それに伴う可逆性があることが示された。同条件により得たデータをもとに算出した熱変性温度は 57°Cを示した。BESTSEL を用いて算出した、実験で精製した目的タンパク質の二次構造含量(表2)は、理論値と誤差 2%以内で一致し、このわずかな誤差は His タグの影響だと考えた。MALDI-TOF MS にて測定を行った、精製したタンパク質の分子量も目的タンパク質と一致したことより、精製は成功したと考えた。以上より、得た物性結果から、FIPV-2 RBD は、I 型とは異なる高い構造安定性をもつと考えた。この強固な物性こそが、過酷な宿主内環境 (体温・酸性度) においても感染力を維持し、I 型と比べて高い致死性を引き起こす要因であると考えた。本研究で明らかにした強固な物性は、『生体内での抗原としての安定性』に直結すると考えられます。今後はマウス実験系を活用し、この高安定な RBD が、実際に高い中和抗体を誘導できる次世代ワクチン抗原となり得るかを検証を行う。

表 1 既存プロトコルと改良プロトコルの比較

	Existing protocol	Improvement Protocol
Competent cell	BL21(DE3)pLysS	T7 Shuffle
Transformation	30°C 24h	37°C 16h
Air Oxidation	48h	36h

表 2 実測値と配列から計算した二次構造比率の比較

Secondary structure	Measured values 10mM HEPES pH 5.3 Ratio	Theoretical value Ratio
Helix	6.20%	6.50%
Antiparallel	34.1%	36.0%
Parallel	0.00%	0.00%
Others	59.7%	57.5%