

【背景・目的】

デングウイルスは、熱帯地方において公衆衛生上の問題となっているデング熱/デング出血熱の原因となっているウイルスである。デングウイルスは 4 つの血清型に分類される。デングウイルスのエンベロープ糖タンパク質はウイルスの宿主細胞への侵入に関わるタンパク質で、三つのドメインから構成されている。特に、その第 3 ドメイン (以下、ED3) には中和抗体の認識部位と宿主細胞膜上の受容体結合部位が存在するとされており、ED3 の構造や物性を解明することはデングウイルスの研究に対して重要な意味を持つ。本研究で用いる ED3 配列の 310 番目、387 番目の内部残基を置換させた 1~2 残基置換体は、デング 3 型 (DEN3) と 4 型 (DEN4) の分子進化を議論した先行研究において、その置換が ED3 の熱安定性と抗体との相互作用に大きく影響することが明らかにされている。その過程で、構造モデルにおいて側鎖の衝突が予測された変異体は、変性温度及び常温で測定した ELISA による抗体との相互作用強度が低下しており両者が相関することが示された。本研究では抗体相互作用強度と安定性、及び置換による原子間の衝突の関係をより詳細に議論するため、変性剤による変性曲線の解析から ED3 変異体の常温での安定性を評価した。

【方法】

DEN3 ED3, DEN4 ED3 について、野生型配列とそれぞれ 310 番目、387 番目の残基を置換した 5 種類の変異体の計 12 種類のタンパク質 (DEN3 wt, II, ML, IL, VL, MI / DEN4 wt, II, IL, VI, MI, VL) を研究対象とした。これらのデング変異体を大腸菌で発現させ精製した。精製したサンプルは、変性剤尿素に対する安定性の評価のため CD 測定を行った (タンパク濃度は 10 μM、変性剤尿素の濃度が 0~8 M、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5)、25 °C)。得られた各スペクトルで、楕円率の差の大きかった 231 nm のシグナルを尿素濃度に対して表示し、その解析から 25 °C の水溶液中 (尿素濃度 = 0 M) での安定性を評価した。

【結果・考察】

各変性剤濃度での CD スペクトルに等吸収点が見られたことから ED3 変異体は二状態変性していると仮定した。スペクトル差の大きい波長 (231 nm) でのモル楕円率の変化を尿素濃度に対してプロットし、変性曲線を作成した (図 1)。変性曲線から変性中点の尿素濃度 (C_m) を求め、先行研究で CD の熱変性曲線から得られた熱変性中点温度 (T_m) の比較から、両者が示す安定性の順序に見られた。さらに、25 °C における尿素濃度ゼロでの安定性を評価するため、変性曲線から得られた各濃度での変性タンパク質の割合から平衡定数 K_D を求め、各濃度での変性ギブズエネルギー ΔG_D を求めた。各濃度での ΔG_D を変性剤濃度に対してプロットすることで、濃度ゼロの時のギブズエネルギー ΔG_D^{H2O} の値を外挿した。25 °C で得られた ΔG_D^{H2O} と ELISA 強度を比較したところ、 T_m 値と ELISA 強度との相関と同様の相関が見られた (図 2)。以上のことから、DEN3, 4 各変異体の常温・非変性剤条件の安定性を示すことができ、変異体の構造変化が安定性及び抗体との相互作用に影響することが推測できた。

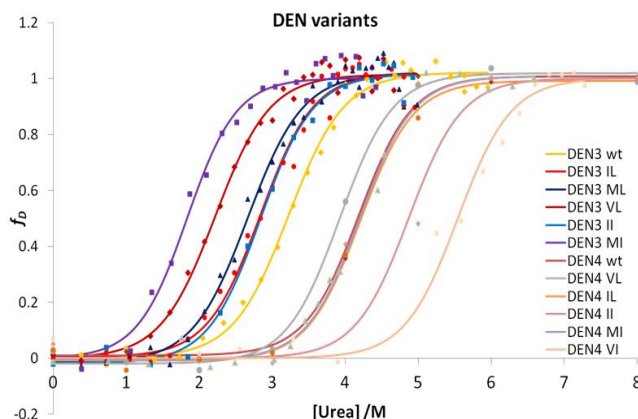


図 1 DEN3, 4 の尿素濃度に対する変性曲線

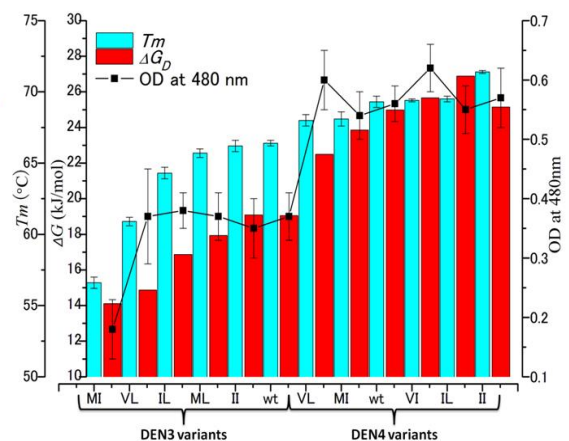


図 2 各変異体の $T_m, \Delta G_D^{H2O}$ と ELISA 比較