

デングウイルス由来の ED3 ドメインの熱安定性と会合状態についての解析

黒田研究室

学籍番号： 11251038

氏名：早乙女 友規

【背景】

デングウイルス由来エンベロープ蛋白質第3ドメイン(ED3)には2つのエピトープ領域が存在し、宿主細胞への侵入や抗体認識に関係している。よって、この蛋白質の構造や物性を解析することは、デングウイルスの感染機構や免疫的な生体防御機構について新たな知見を得るために重要とされる。先行研究では4型デングウイルス由来 ED3 (DEN4)の結晶構造を決定しており、その構造安定性を調べるため、本研究では DSC (示差走査熱量計)測定による熱安定性の評価を試みた。その結果、特殊な二次構造含量や熱力学的性質を有することが判明し、DEN4 の熱変性が解離・会合を伴うという可能性が示唆された。そこで CD (円偏光二色性)測定と SEC (サイズ排除クロマトグラフィー)測定を合わせて行い、会合状態を調べることで、DEN4 が解離・会合を伴う熱変性を示す可能性について検証した。

【方法】

DSC 測定：pH4.1-5.1、蛋白質濃度 60 μM、温度範囲 10-120°Cで熱容量の温度変化を測定した。**CD 測定**：pH4.1-5.1、蛋白質濃度 5-50 μM、温度範囲 20-95°Cで楕円率の温度変化を測定した。**SEC 測定**：pH4.1-5.1、蛋白質濃度 5-20 μM、温度 25°Cで検出されたピークの保持時間と面積から、モノマーとダイマーの比率を算出した。

【結果および考察】

DSC 測定：通常的小型球状蛋白質は二状態の熱変性を示すのに対して、DEN4 は pH4.1-5.1 で三状態の熱変性を示している(Figure A)。DEN4 がシングルドメイン蛋白質であり熱変性過程で中間体が存在する可能性が低いことを考慮すると、DEN4 の熱変性が解離・会合を伴う可能性が示唆された。**CD 測定**：DEN4 の熱変性は可逆的かつ走査速度に依存しないことから、測定は平衡状態で行われたと示唆された。したがってルシャトリエの原理を適用でき、蛋白質濃度の増加に伴い変性中点温度が低下した(Figure B)傾向と合わせて考えると、DEN4 は会合を伴う可逆的な熱変性を示している ($nN \leftrightarrow D_n$) と考えられる。**SEC 測定**：温度 25°C、蛋白質濃度 10 μM の条件で DEN4 のダイマー比率は 60%以上であり、常温ではダイマーを形成しやすいことがわかった。また蛋白質濃度の増加に伴いダイマー比率が高くなったのに対してモノマー比率は低くなったことから、常温でモノマーとダイマーは平衡状態にある ($2N \leftrightarrow N_2$)と考えられる。

【結論】

DEN4 は常温でダイマーを形成しやすく、高温では会合を伴う可逆的な熱変性を示している ($2nN \leftrightarrow nN_2 \leftrightarrow D_{2n}$)ことが分かった。天然状態でダイマーを形成している蛋白質が、熱変性によってモノマーに解離せず、逆にダイマー同士が会合するという熱変性機構は非常に珍しく、その原理を調べることは蛋白質の構造・機能を自由に設計するための生命工学研究において重要と考えられる。今後は特定のアミノ酸残基を置換し、会合体を形成しない DEN4 変異体を作製することで、会合を伴う可逆的な熱変性のメカニズムを原子レベルで解析したい。

