

L1112-15	短いペプチドタグの付加によるデングウイルス由来エンベロープタンパク質 第3ドメインの会合状態および免疫原性への効果				
	氏名	三浦 史帆	主査	黒田	副査

【背景】

近年開発が進められている組換えタンパク質を用いたワクチンにおいては免疫原性の低さが課題となっている。ヒトに対し認可されているアジュバントは限られており、免疫原性を向上させる新たな手段もまた発展途上である。一方でタンパク質製剤が精製・輸送・保管時に subvisible ($< 100 \mu\text{m}$) な会合体を形成することによって強い免疫応答が引き起こされる数多くの例を受け、FDA (Food and Drug Administration, アメリカ食品医薬品局) は $2\sim 10 \mu\text{m}$ の会合体のスクリーニングを推奨している。

当研究室ではタンパク質に $3\sim 7$ 残基の短いペプチド (SCP; Solubility Controlling Peptide) タグを付加し溶解性や会合体形成を制御する技術を開発してきた。本研究では、3型デングウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメイン (D3ED3) をモデルタンパク質として用い、SCP タグの付加による会合状態および免疫原性への効果を評価することを目的とした。

【実験手法】

D3ED3のC末端にリンカーとして Gly2 残基を付加し、更に SCP タグとして Ile3 残基 (C3I)、Ile4 残基 (C4I)、Asp5 残基 (C5D)、Lys5 残基 (C5K) を付加した4種類の変異体及び野生型 (wt) を用いた。動的光散乱 (DLS) 測定により会合体形成を、円偏光二色性 (CD) 分光法により二次構造含量を調べた。また、各変異体を Jcl:ICR マウスに投与し血清中の抗 D3ED3 IgG 量を ELISA 法により測定した。全ての実験はタンパク質濃度 0.3 mg/mL , PBS バッファー (pH 7.4) で行った。

【結果および考察】

DLS 測定より D3C4I および D3C5D が会合体を形成しており (Fig.1)、D3C4I は疎水性相互作用により、D3C5D は塩基性の D3ED3 ($\text{pI}=7.94$) と酸性タグ間の静電的相互作用によると考えられる。また、CD スペクトル測定より D3C4I のみが 25°C で他変異体と異なるスペクトルを示し (Fig.2)、部分変性していた。免疫応答実験の結果、D3C4I および D3C5D は D3wt と比較して IgG 産生量を約4倍に向上させた (Fig.3)。以上より DLS の粒子径およびマウスにおける免疫原性の傾向が一致し、会合体形成により免疫原性が向上したことが示唆された。

【結論】

C4I および C5D タグによって会合体が形成され、免疫原性が向上した。この結果は SCP タグのような数残基の付加によって免疫原性の向上が可能であることを示しており、組換えタンパク質を用いたワクチンにおける免疫増強法としての応用が期待されるとともに、本研究の会合体は FDA がスクリーニングを推奨する会合体の粒子径の10分の1以下であったことから、タンパク質製剤のスクリーニング・保管方法を定める上で重要な知見である。

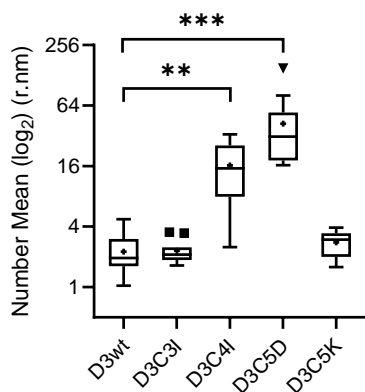


Fig. 1 25°C での粒子径

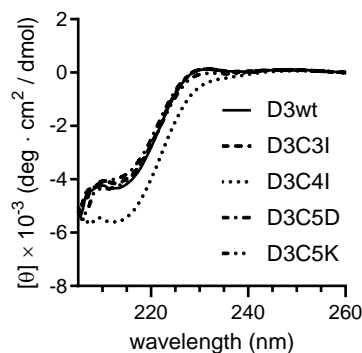


Fig. 2 25°C での二次構造含量

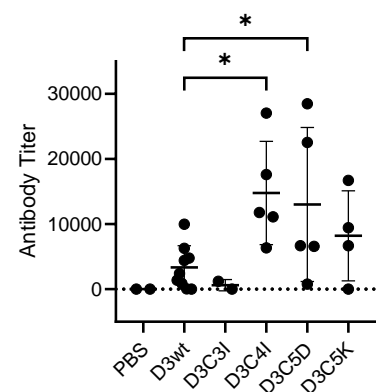


Fig. 3 マウスの IgG 産生量

Fig. 1: n (測定回数) = 14 (D3wt), 11 (D3C3I), 20 (D3C4I), 17 (D3C5D), 18 (D3C5K), “+”: Mean
 Fig. 3: n (マウス数) = 2 (PBS), 9 (D3wt), 2 (D3C3I), 5 (D3C4I), 5 (D3C5D), 4 (D3C5K), Error bar: SD
 $p < 0.05$ (*), 0.01 (**), 0.001 (***) (ダネットの検定)