

短いペプチドタグ付加による Dengue ウイルス由来の ED3 ドメインの会合状態の制御		
黒田研究室	学籍番号：11251058	竹内厚貴

[背景・目的]

タンパク質の会合はタンパク質工学、医学、薬学などに関係する重要な現象であり、そのメカニズムを理解し、制御することが望まれる。当研究室では短いペプチドタグをタンパク質の末端に付加することでタンパク質の溶解性を制御する研究をしているが、一部の変異体では会合状態に変化が見られていた。本研究では当研究室で研究の対象としている Dengue ウイルス由来のエンベロープ糖タンパク質第3ドメイン (DEN ED3) の末端に疎水性または親水性アミノ酸からなる短いペプチドタグを付加することで、その会合状態を制御することを目的とした。

[研究方法]

まず DEN ED3 の血清型の一つである DEN3ED3 の野生型 (wt) の C 末端にリンカーとしてグリシン 2 残基を付加した変異体 (C2G) と、その先にイソロイシン、アスパラギン酸、あるいはリシンが 3 個もしくは 5 個連なったペプチドタグを付加した変異体 (C3I, C5I, C3D, C5D, C5K) を作製・精製した。続いて PBS buffer (150 mM NaCl, pH 7.3, 少量のカリウムを含む)、または Phosphate buffer (500 mM NaCl, pH 7.3, カリウムを含まない) 下、これらの変異体および wt について、初期濃度が 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml となるよう調製し、25°C で長時間 (0, 6, 12, 24, 48 時間) の静置後も上清濃度が維持されるかを調べた。最後に動的光散乱測定 (DLS) により長時間 (1, 6, 24 時間) の静置後分子粒径を測定することで、付加したペプチドタグによって会合状態が変化しているかを調べた。

[結果・考察]

長時間の静置後、C3I と C5I に関しては上清濃度の減少が見られたが、wt も含めた他の 5 種類の変異体については上清濃度の減少は見られなかった (図 1)。このことからこれら 2 変異体については大きな会合体が形成されていることが予想された。

DLS の結果、PBS buffer における初期濃度 0.2, 0.4 mg/ml に関しては静置開始から 1, 6 時間後の測定において C5I が最も大きな会合体を形成し、24 時間後までほぼ同じ大きさを保った (図 2)。その後、時間の経過とともに C3I の会合体が大きさを増し、24 時間後には 530 量体となった。wt と C3D にも大きくなる傾向が見られ、一方 C5D と C5K に関しては 24 時間後も大きさは小さいまま保たれた。0.8 mg/ml では 0.2, 0.4 mg/ml と異なり、変異体間の差はあまり見られなかったが、24 時間後に C3D と C3I が 400 量体以上の大きさとなった。Phosphate buffer では C5I の大きさが安定なことが PBS buffer と共通していたが、時間に伴う会合数の増減が激しかった。以上より、C5I タグによって会合数を大きく、C5D および C5K によって会合数を小さく、長時間安定に保つことに成功した。また、24 時間の静置を必要とするが C3I により会合数を非常に大きくすることに成功した。

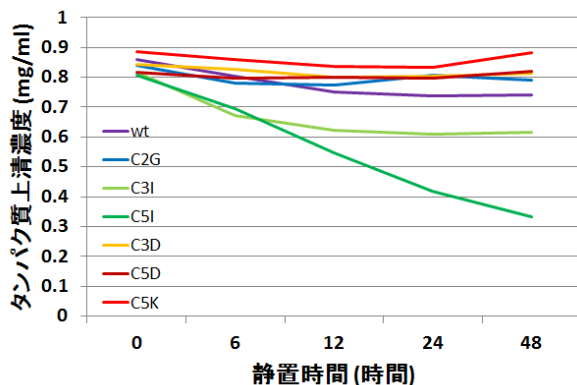


図 1 長時間静置後の上清濃度測定 (PBS buffer, 初期濃度 0.8 mg/ml)

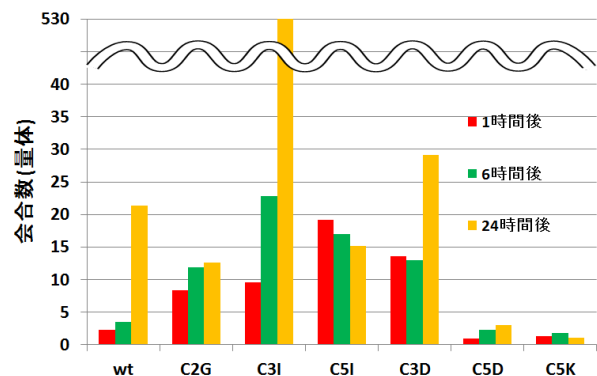


図 2 DLS による長時間静置後の分子粒径測定 (PBS buffer, 初期濃度 0.4 mg/ml)