

短いペプチドタグを付加した Dengue ウイルス由来 ED3 における会合状態の評価

黒田研究室

学籍番号：13251070

三浦 史帆

【 背景・目的 】

近年、タンパク質の会合体の制御は医薬品分野において重要と考えられている。例えば 2 残基の置換により皮下注射後の単量体への解離を速めたインスリンリスプロ^[1]や、高濃度抗体医薬品の会合体を解離させることによりその粘性を低下させ注入時間を短縮させる手法^[2]などが注目されている。このような会合体形成の制御機構を解明するために、当研究室ではタンパク質に短いペプチド(SCP; Solubility Controlling Peptide)タグを付加し、溶解性や会合体形成について研究してきた。本研究では、3 型 Dengue ウイルス由来エンベロープタンパク質第 3 ドメイン(D3ED3)に SCP タグを付加し、それらの物性および生化学的安定性を評価し、会合体形成と生化学的安定性の相関から SCP タグの会合体形成への寄与の解明を試みた。

【 手法 】

モデルタンパク質として D3ED3 を用い、その 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 Ile4 残基(C4I)、Asp5 残基(C5D)、Lys5 残基(C5K)を付加した 3 種類の変異体及び野生型(wt)を用いた。動的光散乱測定(DLS, 25/ 37°C, PBS バッファ(pH7.4)/ 酢酸バッファ(pH4.7))を用いて各変異体の会合体形成を調べ、円偏光二色性(CD)スペクトル測定(PBS バッファ)で二次構造含量を調べた。そして、限定分解法(キモトリプシン, PBS バッファ/ ペプシン, 酢酸バッファ)により生化学的安定性を評価した。各測定においてタンパク質は 0.3mg/mL に調製した。

【 結果及び考察 】

DLS 測定結果(図 1)から、PBS バッファ条件下では D3C4I 及び D3C5D は会合体を形成しており、D3C4I はタグ間の疎水性相互作用により、D3C5D は塩基性の D3ED3(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。これは、酢酸バッファ条件下で D3C4I が会合体を形成していることや D3C5D が会合体を形成していないことも一致した。また、CD スペクトル測定より、各変異体が同様の二次構造含量であり、会合状態でも構造が保たれていることを確認した。そして、キモトリプシンによる限定分解では、D3wt、D3C5D、D3C5K、D3C4I の順に安定であった(図 2)。ペプシンを用いた限定分解による生化学的安定性は、D3C4I、D3C5D、D3wt、D3C5K の順であり(図 3)、DLS で大きな会合体が観測されるほど生化学的にも安定であった。そのため、会合体形成と生化学的安定性に相関があると考えられた。D3 において、キモトリプシン・ペプシンは切断部位が類似しているため両者の限定分解は各 DLS の傾向と一致すると予想したが、キモトリプシンに対する安定性は、DLS の傾向と一致しなかった。以上より、SCP タグのような数残基の付加であっても会合体形成の制御が可能と言えた。

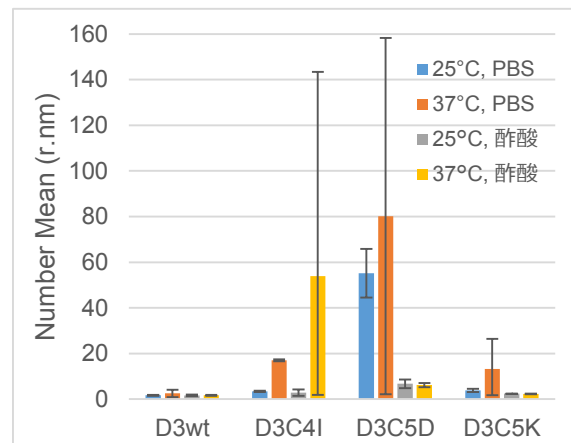


図 1. DLS 結果

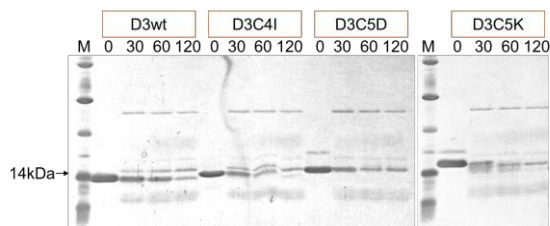


図 2. キモトリプシンによる限定分解結果

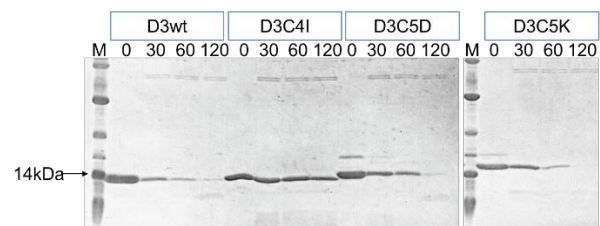


図 3. ペプシンによる限定分解結果

(M: マーカー / 0, 30, 60, 120: サンプル回収時間(分))

[1] Diane L. Bakaysa *et al.* (1996) *Protein Science*, 5, 2521-2531

[2] Naoto Inoue *et al.* (2014) *Mol. Pharmaceutics*, 11(6), 1889-1896