

**デング由来 ED3 蛋白質における非天然ジスルフィド結合の形成による  
ミスフォールドの蛋白質工学的な抑制**

黒田研究室

学籍番号：14251083

山本 裕子

**【背景・目的】**

一般的に蛋白質のミスフォールドは、ジスルフィド結合を形成するシステインが 4 つ以上、つまりジスルフィド結合の組み合わせが 3 通り以上存在し、誤ったシステイン対で結合が形成されてしまったときに生じる。4 型デングウイルス由来エンベロープ蛋白質第 3 ドメイン (DEN4ED3) は 11.4kDa の小型球状蛋白質である。当研究室の先行研究において、DEN4ED3 はジスルフィド結合を一つしか持っていないにも関わらず、ジスルフィド結合によってミスフォールドしうることが示唆されている。本研究ではそのミスフォールドの機構を探る。

X 線結晶構造解析から、ジスルフィド結合を形成しているシステインに隣接した 331 番目のプロリン (P331) のみが cis 体であった。この P331 が trans 体をとっており、ジスルフィド結合により cis-trans 異性化がロックされてできなくなったものがミスフォールドを形成してしまっているのではないかと考えた。また、3 本のジスルフィド結合を形成するウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) のフォールディング実験において、その N 末端に付加されているシステインを含む 13 残基のアミノ酸から成るプロ配列が、誤った組み合わせのジスルフィド結合のリシャップリングを促進することが報告されている<sup>1</sup>。

そこで、本研究では DEN4ED3 に同様のプロ配列を付加することで、ジスルフィド結合の再形成の促進とそれによるプロリンの異性化、ひいてはミスフォールドの形成の抑制を試みた。

**【手法】**

DEN4ED3 において N 末端の方がジスルフィド結合に近いので、プロ配列を N 末端に付加した。この変異体を DEN4cystag とし、円偏光二色性分光 (CD) 測定でその二次構造の割合を調べ、ミスフォールド形成割合を野生型 (wt) と比較することでミスフォールド形成抑制に対するプロ配列の寄与を評価した。

**【結果・考察】**

CD 測定の結果より、DEN4cystag は wt と比較すると完全に変性していた (図 1)。この原因を探るために、還元剤を加えずに SDS-PAGE を行なったが (図 2)、monomer の分子量付近に濃いバンドがあったことから分子間ジスルフィド結合による変性ではないことがわかった。そこで、MALDI-MASS により分子量を確認したところ (図 3)、理論的な分子量 (12169.78Da) よりも 37Da 大きい分子量が測定され、これが酸素分子二つ分の 32Da と近いことから、システインのスルフィン化が変性の原因だと考えた。元より DEN4ED3 は酸化に長い時間を要することから、DEN4cystag を精製する際にも 37°C、36 時間という条件で酸化しており、この長い酸化時間のため 3 つ含まれていたシステインのうち 2 つはジスルフィド結合を、もう一つのシステインがスルフィン化したものと考えられる。3 つのシステインのうちどれがスルフィン化したかについてはさらなる探求の必要がある。以上の結果により、変異体 DEN4cystag を作成することには成功したが、当初の目的であったミスフォールド形成の抑制を達成することはできなかった。

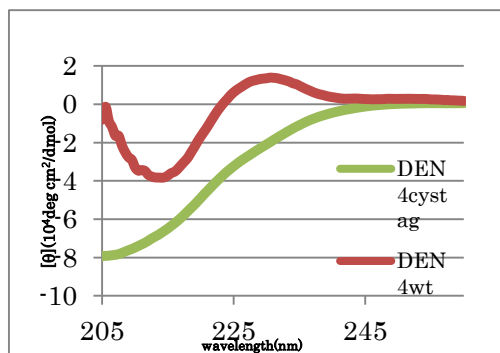


図 1. DEN4cystag と DEN4wt の CD 測定結果

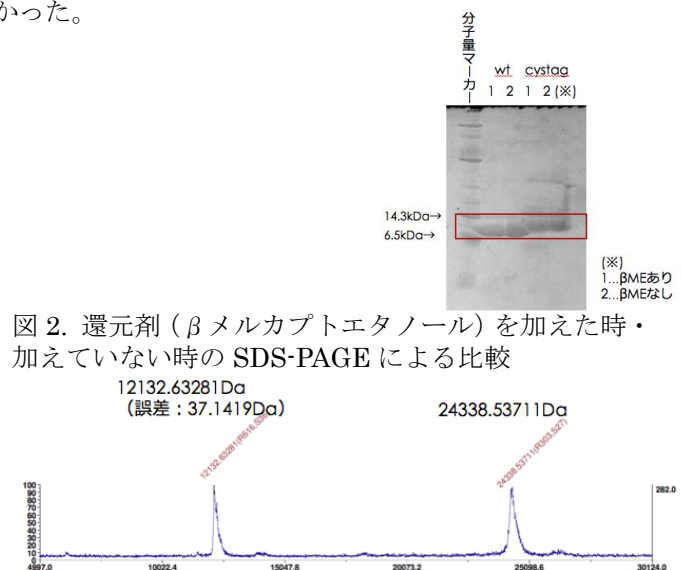


図 2. 還元剤 (βメルカプトエタノール) を加えた時・加えていない時の SDS-PAGE による比較

図 3. DEN4cystag の MALDI-MASS 測定結果

<sup>1</sup> Jonathan S. Welsman and Peter S. Kim (1992) The Pro Region of BPTI Facilitates Folding. *Cell* 71, 841-851