

L1211-02	高温条件下で変性した DEN4 ED3 の可逆的なオリゴマー形成の一残基置換による阻害				
	氏名	早乙女友規	主査	黒田	副査

【 背景・目的 】

可逆的な二状態の熱変性は、小型球状蛋白質の生物物理学的な特徴とみなされてきた。ところが、4型 Dengue ウイルス由来エンベロープ蛋白質第3ドメイン (DEN4 ED3) の DSC (示差走査熱量計) 測定を行ったところ、二本の吸熱ピークが観測され、DEN4 ED3 の熱転移は多段階で進行することが分かった。本研究では、DEN4 ED3 の高温でのオリゴマー形成が複雑な熱転移メカニズムの原因であると考え、高温でのオリゴマー形成を阻害することで熱転移メカニズムの単純化につながると推測した。その仮説を立証するため、以下の実験を行った。

【 方法 】

DEN4 ED3 の X 線結晶構造 (PDB: 3WE1) を解析したところ、結晶中でのダイマー形成において Val 380 間での相互作用が大きく影響しているとわかった。そこで Val 380 を Ala、Ser、Thr、Asn、Lys といった疎水性の低いアミノ酸に置換することで5種類の変異体を作製した。CD (円偏光二色性)、AUC (分析用超遠心)、DLS (動的光散乱)、DSC 測定を行い、異なる温度での DEN4 ED3 野生型および変異体のオリゴマー状態および熱転移メカニズムを解析した。以上の実験を通して、Val 380 の一残基置換が DEN4 ED3 の高温でのオリゴマー形成および熱転移メカニズムに及ぼす影響を調べ、二者の関係性について考察した。

【 結果および考察 】

DLS 測定の結果、DEN4 ED3 野生型の R_h (流体力学的半径) は温度上昇に伴い二倍以上増加したのに対して、DEN4 ED3 変異体の R_h は僅かに増加した。高温での R_h の値に大きな差が見られたことから、DEN4 ED3 野生型の高温でのオリゴマー形成は、Val 380 の一残基置換によって阻害されたと考えられる。また、DSC 測定の結果、DEN4 ED3 野生型では 90°C 以上の高温で二本目の吸熱ピークが観測されていたが、DEN4 ED3 変異体では単一の吸熱ピークが観測された (図 1)。したがって、DEN4 ED3 の高温でのオリゴマー形成を阻害したことで、熱変性メカニズムの単純化に成功したとみなせる。

【 結論 】

野生型 DEN4 ED3 は熱変性したときオリゴマーを形成し、さらに高温ではオリゴマーが解離することが分かった。このような複雑なメカニズムの熱転移は、従来の小型球状蛋白質の熱測定では前例が無く、非常に珍しい現象である。また、DEN4 ED3 変異体では同様の現象が見られなかったことから、高温での可逆的なオリゴマー形成は、僅か一残基のアミノ酸を置換することで効果的に阻害できると考えられる。

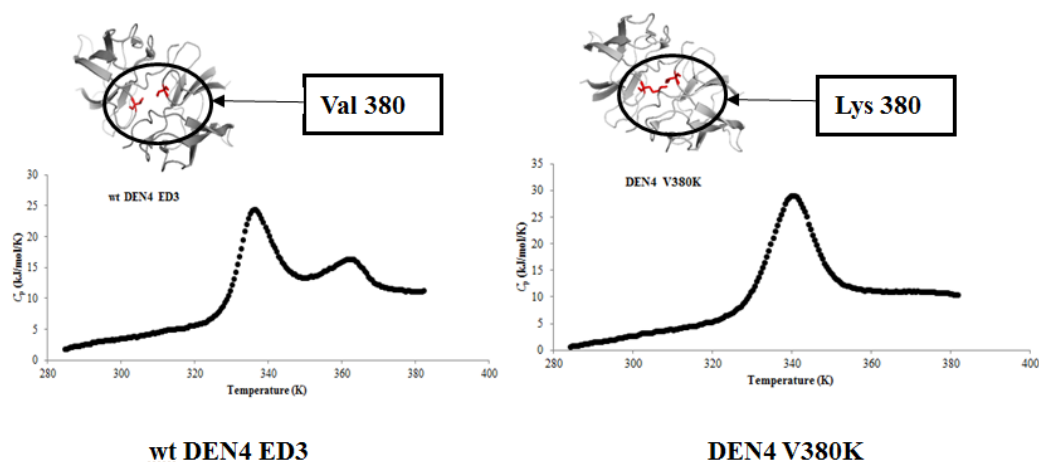


図 1. 野生型 DEN4 ED3 (左) と DEN4 V380K (右) の DSC データ