2PA133

構造物を基盤とした抗原抗体相互作用における
塩橋の役割の考察

○白石充典¹、津本浩平¹、近藤英昌²、松島正明³、熊谷泉¹
(1 東北大・院工、2 北工研、3 現・山之内製薬)

我々は蛋白性抗原と抗体の相互作用を、蛋白質間分子認識のモデルとして捕らえ、結合部位における非共有結合の蛋白質間相互作用に対する寄与について、部位特異的変異導入ならびに相互作用解析を組み合わせて議論してきた。本研究では、ニトリ卵白リンチーム (HEL) とそのモノクローナル抗体 HyHEL10 Fv 断片の相互作用において、塩橋形成に関与している VH 鎖の Asp32 ならびに Asp96 に対して変異導入をほどこした変異体 (HD32A 変異体、HD96A 変異体および二重変異体) を作製し、HEL に対する親和性の測定、HEL との複合体の X 線結晶構造解析により、HyHEL10 Fv-HEL 複合体における塩橋形成の役割について考察することを目指している。

前年度年会では、これら変異体の調製と相互作用の解析について報告したほか、単変異体の抗原との複合体についてその結晶構造を報告した。その結果は、①酵素活性阻害度から、HD96A 変異体の HEL に対する結合能は野生型に比べてほとんど変化がなかったのに対して、HD32A 変異体は若干の低下、二重変異体は顕著な低下が見られた。②どの変異体も野生型とほぼ同じ条件下で HEL との複合体の結晶が得られた。③構造解析の結果、HD32A 変異体、HD96A 変異体とも全体構造に大きな変化は見られなかったが、HD32A 変異体においては CDR-H1 のループに大きな構造変化が見られ、HD96A 変異体では抗体側の構造変化はほとんど見られず、96 位の側鎖付近に水分子が配位していた。

今回は、HD32A 変異体、HD96A 変異体の複合体構造のより詳細な解析結果、並びに新たに二重変異体の構造についての解析結果も加え、HyHEL-10-HEL 複合体における塩橋欠損の効果について議論する。

M. Shiroishi, K. Tsumoto, H. Kondo, M. Matsushima, I. Kumagai:
Role of salt bridge formation in HyHEL-10 Fv-HEL complex: Based on structural analysis of mutant Fv fragments

2PA135

アルツハイマー病βアミロイド線維の試験管内伸長反応におけるβペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用解析
○長谷川一浩、小俣三郎 (新潟大学、自然科学研究科)
内木宏延 (福井医大、病理学第二講座)

【目的】アルツハイマー病患者脳に蓄積するβアミロイド線維 (fAβ) 形成について、βペプチド 1-42 (Aβ(1-42)) が核となり、これにβペプチド 1-40 (Aβ(1-40)) が重合して線維を形成すると提唱されている。我々は、試験管内アミロイド線維の形成反応のモデルとして、重合核依存性重合モデルを用い、Aβ(1-42) と Aβ(1-40) の線維形成における相互作用をチオフラビン T を用いた分光蛍光定量法により解析した。

【結果】(1) 線維形成反応。Aβ(1-42)、或いは Aβ(1-40) を pH7.5、37°C で反応させると、蛍光はシグモイド曲線を描いて増加した。アミロイドを自発的に形成する Aβ(1-40) と Aβ(1-42) を混合した時、重合反応速度は濃度依存的に低下した。アミロイドを自発的に形成しない Aβ(1-40) に Aβ(1-42) を添加した時には、Aβ(1-42) が線維形成を開始させた。(2) 線維伸長反応。合成 Aβ を重合させ、fAβ を作成した。a) 同種の fAβ と Aβ を pH7.5、37°C で反応させると、一次反応形式に従い lag time なしに重合した。b) アミロイドを自発的に形成しない Aβ(1-40) に fAβ(1-42) を添加した時には、fAβ(1-42) が核となり線維形成を開始させたが、fAβ(1-42) を核として用いた場合に比べ反応速度は遅かった。(3) fAβ(1-42) と fAβ(1-40) は異なった線維形態を示した。各反応系における主要な線維の形態は、添加した核ではなく主成分の Aβ のものと一致した。

【総括】Aβ(1-42) と Aβ(1-40) が共存する場合、相互作用した上でアミロイド線維形成を行うことが示された。また、生体内におけるアミロイド線維形成において、Aβ(1-42) が主要な役割を果たしていることが示唆された。

K. Hasegawa, S. Omata, H. Naiki : Aβ(1-42) and Aβ(1-40) in amyloidogenesis

2PA134

βラクトグロブリンの等温滴定熱量計による解離会合系の解析

○櫻井一正、相本三郎、後藤裕児
(大阪大学蛋白質研究所)

ウシβラクトグロブリン (bLG) は中性付近では会合してダイマーを形成し、酸性下では解離してモノマーになる傾向が強い。しかし、その酸性溶液中の塩濃度が高くなるに従って、再びダイマーを形成することが知られている。bLG は酸性溶液中では正に帯電することによって静電的な反発を及ぼしあいモノマーとなるが、塩を加えることによって反発力が遮蔽されダイマーを形成すると考えられる。また、塩酸グアニジンを加えると高濃度では変性剤としての効果をうけbLG は変性するが、低濃度では塩としての効果によってダイマーを形成することが示唆されている。これらの詳細を理解するために、酸性溶液中でのbLGBの会合反応を、等温滴定熱量計 (ITC) で測定した。はじめに、25°C で塩化ナトリウムを用いて測定を試みたが、高濃度を必要としたため反応を完結させることができなかった。そこで、蛋白質の正電荷に対して塩化物イオンより効果的に相互作用すると考えられている過塩素酸イオンを用いた。過塩素酸ナトリウムを用いた測定を行ったところ、ダイマーの形成を反映したと思われる約-100 kJ/mol の熱量変化を観測できた。この値は、報告されている値 (30°C、約-90 kJ/mol) とほぼ一致した。

図 1 ITC による反応熱の測定

K. Sakurai, S. Aimoto, Y. Goto : An Analysis of Reversible Self-Association Reactions of β-Lactoglobulin by Isothermal Titration Calorimeter

2PA136

Physical interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its export substrates.

○Tohru Minamino, Robert M. Macnab (Yale University, Dept. of MB&B)

Most component proteins of the *Salmonella* flagellar structure are exported to their final destinations via the type III flagellar export apparatus. We found that mutations in six membrane proteins, FlhA, FlhB, FlhC, FlhD, FlhE and FlhF and two soluble proteins, FlhG and FlhH, result in inhibition of export, suggesting that they are general components of the type III flagellar export apparatus (1). In addition, another soluble protein, FlhI is required for the export of a subset of export substrates which are called the rod/hook-type proteins (1).

In this study, we have examined the cytoplasmic components, FlhH, FlhI and FlhJ, and the soluble cytoplasmic domains of FlhA (FlhAc) and FlhB (FlhBc) to understand the molecular mechanism of the early stage of the type III flagellar export process. We showed that overproduction of several of these proteins, most notably FlhH, FlhBc, and FlhJ, caused the inhibition of motility of wild-type cells in swarm tests and inhibition of the export of substrates such as the hook protein FlgE. In several cases, when we co-overproduced two export components, this reduced the inhibition caused by overproduction of either component alone. We purified N-His-FLAG-tagged FlhAc, FlhBc, FlhH, FlhI and FlhJ, the rod-hook-type export substrates, N-His-FLAG-tagged FlgE (a basal-body protein), FlgG (rod protein) and FlgD (hook-capping protein), FlgE (hook protein) and the filament-type export substrates, N-His-FLAG-tagged FlgK (the first hook-filament junction protein), FlgL (the second hook-filament junction protein), FlhD (filament cap protein) and FlhC (flagellin). Using these purified proteins, we examined physical interactions among them by affinity blotting. We found that in many cases they interacted with each other. None of them interacted significantly with three control proteins, the cytoplasmic domain of MotA (a protein involved in flagellar rotation but not flagellar assembly), ovalbumin, or chymotrypsinogen A. We propose that the soluble components of the export apparatus are involved in dynamic interaction with their export substrates.

1. Minamino, T. and Macnab, R. M. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1388-1394.