3PA013

ヒトリソチームの *in vitro* でのアミロイド繊維形成
○郷田秀一郎¹、高野和文¹、山縣ゆり子²、眞木さおり³、
難波啓一^{3,4}、油谷克英¹
(¹阪大蛋白研、²阪大・院薬、³ERATO、JST、⁴松下国際研)

アミロイドーシスは、蛋白質がアミロイド繊維と呼ばれる不溶性繊維状の沈殿を形成し、人体の組織に損傷を与える病気である。我々は、ニワトリ卵白リソチームが、高エタノール濃度溶液中でアミロイド状の沈殿を形成することを昨年の年会で報告した。同様の構造変化がヒトリソチームで起こるかどうかが、野生型、アミロイド性部位特異的変異型(D67H 及び I56T)、N末端にEAEAの4残基が付加したもの(以後EAEAリソチームと呼ぶ)で行った。

構造変化を観察するため、各ヒトリソチーム(0.1 mg/ml)の種々のエタノール濃度溶液を作成し、far-uv CDスペクトルを測定した。エタノールの濃度の増加と共に、ヘリックス含量の増加がみられ、より濃度が高くなると、溶液は白濁した。ヘリックス含量の増加後、沈殿の起こるエタノール濃度は野生型、EAEAリソチーム、D67H、I56Tで、それぞれ65%、60%、50%、50%であった。

アミロイド性の検証は、コンゴレッド染色、電子顕微鏡観察、X線回折測定を行った。EAEAリソチーム(10 mg/ml)は50 %エタノール溶液中で沈殿を生じ、その沈殿を用いてアミロイド形成の検証を行った。全てのデータが、アミロイド特性を示すものであった。電子顕微鏡で観察された繊維状の沈殿は、ニワトリ卵白リソチームのアミロイド繊維と形態がよく似ている繊維状のものや、大きな球状のものが観察された。特に、X線回折の結果からは、アミロイド繊維のβストランド間のスペーシングに由来する4.7Å回折点が、ニワトリ卵白リソチームのそれよりも高い強度で観察された。

以上の結果は、アミロイドーシスの原因となる変異型ヒトリソチームとともに野生型、EAEAヒトリソチームが高エタノール濃度溶液中でアミロイド繊維形成をすることが確認された。このように、アミロイド形成を人為的にコントロールできる条件を発見したことは、今後のアミロイド形成機構の研究に役立つと思われる。

S. Goda, K. Takano, Y. Yamagata, S. Maki, K. Namba, & K. Yutani : Amyloid fibril formation of human lysozyme *in vitro*.

3PA015

超好熱菌の Pyrrolidone Carboxyl Peptidase の安定化に寄与している埋もれた解離性残基
○小笠原京子・手塚正教・油谷克英 (阪大蛋白研)

超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* の Pyrrolidone Carboxyl Peptidase(PCP) は、208 残基、分子量 22.8K のサブユニットから構成されるホモテトラマーである。本蛋白質は、常温菌の相同蛋白質に比べて、熱および変性剤に対して著しく高い安定性を有している。我々は、この高い安定性は、変性速度の著しい低下に由来することを示した(Biochemistry (1998) 37, 17537.)。しかし、どの残基が、また、どのような安定化因子が、本蛋白質の高い安定性・変性速度の低下の要因になっているかはまだ解き明かされていない。

PCP の酸変性速度も著しく遅く、pH2.6 近傍の異常 pK をもって酸変性することがわかっている。このことは、埋もれた荷電残基が本蛋白質の変性速度の低下、つまり安定化に関与していることを示唆している。本研究では、PCP 分子内部に完全に埋もれている 3 個の酸性残基(79Glu, 92Asp, 192Glu)が PCP の安定化に果たす役割を追究した。

サブユニット内に含まれる 2 個の Cys は、部分的に S-S 結合を形成して、変性機構を複雑にするので、142 と 188 位の Cys を Ser に置換した変異型(PCP/OSH)を用いて、内部に埋もれている酸性残基をそれぞれ Ala に置換した変異型(OSH/E79A, OSH/D92A, OSH/E192A)を作製した。それらの熱安定性を、VP-DSC を用いた熱測定によって調べた。

OSH/E192A の変性温度は、PCP/OSH の値よりも 5 °C 低かった。OSH/E79A と OSH/D92A の変性温度は PCP/OSH の値よりも 2 °C 低かった。このことは、分子内部に完全に埋もれている酸性残基が、PCP の安定化に寄与していることを示している。これらの残基が安定化因子として働く理由を本蛋白質の構造と関連させて考察する。

K. Ogasahara, M. Tezuka, and K. Yutani: Role of buried acidic residues in stabilization of pyrrolidone carboxyl peptidase from hyperthermophile.

3PA014

超好熱菌トリプトファン合成酵素βサブユニットの安定性
○日置雄策^{1,3}、小笠原京子¹、石田真巳²、倉光成紀³、油谷克英¹
¹阪大・蛋白研、²東水大・水産、³阪大・院理

【目的】バクテリアのトリプトファン合成酵素(TSase)は、2種のサブユニットから構成されるαβ複合体酵素である。超好熱菌(*Pyrococcus furiosus*)のTSaseのα、βサブユニットのアミノ酸配列は、*E. coli*のそれらとそれぞれ32%、58%の相同性がある。また、αβ複合体の酵素活性の至適温度は90℃近傍で非常に高温である。超好熱菌TSaseの高温適応の分子機構を知るために、まず安定性を評価する必要がある。本研究では、*P. furiosus*のβサブユニット(Pβ)の熱変性と塩酸グアニジン(GuHCl)変性を調べ、*E. coli*のβサブユニット(Ecβ)と安定性の比較を行った。

【方法】熱変性はカロリメトリー(VP-DSC, 1K/minの昇温速度)、塩酸グアニジン(GuHCl)変性は222nmのCD値を測定することによって調べた。

【結果】カロリメトリーから得たPβの変性温度(T_m)は、pH8.3では113.3℃でEcβの T_m と比べて33℃高かった。Pβの T_m は酸性領域でpHの低下とともに急激に低下した。また、PβのGuHCl変性曲線(25℃, pH7)は、転移領域におけるマイナスのCD値は日を追って減少し、平衡に達するのに1ヶ月以上を要した。このことは、Pβの変性速度が著しく遅いことを示している。Pβ、Ecβともに、GuHCl変性曲線は2状態変性モデルで解析できず、変性過程に複数の状態が存在することが示唆された。また、Pβの変性中点のGuHCl濃度は2.8M、Ecβのそれは0.8Mであり熱変性と同様に安定性の違いが見られた。Pβの熱および変性剤に対する著しく高い安定性について、Ecβとのアミノ酸配列の差異等から考察する。

Y. Hioki, K. Ogasahara, M. Ishida, S. Kuramitsu, K. Yutani: Stability of β Subunit of Tryptophan Synthase from Hyperthermophile

3PA016

出芽酵母のプリオンSup35のアミロイド繊維形成の実時間蛍光顕微鏡観察

○岸元愛子・田口英樹・井上雄嗣・吉田賢右
(東工大・資源研)

タンパク性の感染因子プリオンは、自己触媒的に正常型から異常型Sup35へ構造変換し、結果としてアミロイド様繊維を形成する。このようなプリオン現象は、もともとスクレイパーなど哺乳類の神経疾患の研究に端を発するが、最近では、酵母においてもプリオンのな挙動をする因子が知られてきた。しかし、プリオンタンパク質の構造変換や繊維形成のメカニズムは、ほとんど不明である。そこで我々は出芽酵母のプリオン様因子Sup35を用いて、プリオン繊維の形成機構の解析を試みた。

Sup35のN末254残基はプリオンの伝播に必須のフラグメントである。それにHisaとCysを結合させたもの(Sup35NM)を大腸菌で発現させ、精製した。このSup35NMがアミロイド様繊維を形成することは、Congo-Redとの結合、光散乱などによって確認した。次に、蛍光顕微鏡で繊維形成を直接観察するため、C末端に導入したCysに蛍光色素であるテトラメチルローダミン(TMR)、オレゴングリーン(OG)をラベルした。この蛍光ラベルはSup35NMの繊維形成に影響しなかった。

プリオン繊維が成長する様子は以下のようにして観察した。あらかじめ作っておいたOG-Sup35NM繊維をガラス板に固定する。ガラス板への固定は、OG-Sup35NM繊維に混ざったビオチン化Sup35NMとガラス表面に吸着させたビオチン化カゼインをストレプトアビジンを介して結合させることで行った。その後、TMR-Sup35NMモノマーを注入する。実験の結果、緑(OG)のプリオン繊維の端から赤(TMR)の繊維が成長する様子を直接観察することに成功した。この実験系を用いてプリオン繊維の成長の方向性および成長速度の分布などを解析している。

A. Kishimoto, H. Taguchi, Y. Inoue, M. Yoshida : Realtime microscopic observation of prion-fiber growth using yeast prion Sup35