1P045

アミロイド β ペプチドの金属誘起分子間会合におけるチロシン残基の役割

○三浦 隆史、鈴木 紀代子、竹内 英夫（東北大・院薬）

【目的】アミロイド β (A β) と金属イオンの相互作用は、アルツハイマー病の原因となるアミロイド線維形成において主要な役割を持つと考えられ、特に、Zn(II) と Fe(III) は A β を凝集させる強い効果を持つことが知られている。我々は、Zn(II) による凝集の際に、アミノ末端領域の3個のヒスチジン (His) 残基が A β の主要な金属結合部位となることを見出している。本研究では、A β に1残基のみ含まれるチロシン (Tyr10) が、Fe(III)、Zn(II) による A β の分子間会合に関与する可能性をラマン分光法を用いて検討した。

【結果】pH 7.4 において、A β に Fe(III) イオンを添加すると褐色の沈殿を生じた。上清と沈殿を分離した後、各々の 514.5 nm 励起ラマンスペクトルを測定したところ、上清からは金属と結合していない A β の、沈殿からは金属と結合したチロシネート (Tyr⁻) のスペクトルがそれぞれ得られた。後者は、可視領域の Tyr⁻ → Fe 電荷移動吸収に共鳴することにより Tyr⁻ の散乱強度が顕著に増大したものである。Fe(III) の水溶性がより高い pH 5.8 で同様の実験を行なったところ、上清から得られたスペクトルに Tyr⁻ の共鳴ラマンバンドと他のペプチド部分の非共鳴ラマンバンドが共に観測された。このスペクトルの解析から、3 個の His は Fe(III) と結合していないことが明らかとなり、Fe(III) の主な結合部位は Tyr10 のフェノール酸素であることが示された。一方、Zn(II) と Tyr⁻ の複合体は可視部に電荷移動吸収を有さないため、可視光励起では共鳴ラマンバンドを与えないが、244 nm 励起の紫外共鳴ラマンスペクトルにおいては、Zn(II) の Tyr10 への結合を確認することができた。ただし、Tyr への結合は大過剰な Zn(II) の存在下で生じる凝集固体中においてのみ形成されることから、Zn(II) による A β 凝集の主な原因ではないと考えられる。

T. Miura, K. Suzuki and H. Takeuchi : Role of a tyrosine residue in metal-induced aggregation of the amyloid beta-peptide

1P047

Zn(II) が誘起するアミロイド β 分子間会合の Cu(II) による阻害効果

○鈴木 紀代子、三浦 隆史、竹内 英夫（東北大院・薬）

アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド β (A β) は β シート構造を形成することにより分子間で会合し、神経細胞毒性を示すと考えられている。金属イオンは A β 分子間会合を引き起こす因子となる。特に、Zn(II) の A β に対する凝集能は他の金属と比べて顕著であることが知られている。我々は、Zn(II) は His(N τ) を配位子とするペプチド分子間架橋を形成するために A β を凝集させること、Cu(II) はアミド窒素と His(N π) を配位子とする安定な分子内キレートを形成するために A β の溶解性を保たせることを明らかにした¹⁾。本研究では、Cu(II) がこのような結合様式の違いにより Zn(II) による A β 分子間会合を阻害する効果を持つかどうか検討した。

Cu(II) 非存在下では A β の顕著な凝集を生じる濃度の Zn(II) 存在下でも、Cu(II) が共存する場合 A β の凝集が抑制されることが明らかになった。特に Cu(II) が A β に対してモル比で4倍程度存在すると、A β はほとんど凝集しなくなった。A β -Zn(II)-Cu(II) 混合溶液のラマンスペクトルから、アミド窒素と His(N π) の Cu(II) へのキレート配位は Zn(II) 存在下でも形成されており、Zn(II) はこの分子内キレートを破壊せずに His(N τ) に結合することが示された。Cu(II) による分子内キレートが Zn(II) による分子間架橋に優先して形成されるため、A β の溶解性が維持されることが考えられる。一方、大過剰の Cu(II) が存在すると、Zn(II) の存在に関わらず A β は顕著に凝集した。沈殿した複合体のラマンスペクトルから、この凝集は Cu(II) が Tyr のフェノール酸素に結合することにより引き起こされることが示された。以上の結果から、A β の溶解性を維持するためには、Cu(II) と A β の比が適切に保たれることが特に重要であると考えられる。(1)Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., and Takeuchi, H. (2000) Biochemistry 39, 7024-7031.

K. Suzuki, T. Miura and H. Takeuchi : Inhibitory effect of Cu(II) on Zn(II)-induced aggregation of amyloid beta peptide

1P046

鳥類プリオン蛋白質 PHNPGY リピートの立体構造研究

○松嶋 範男¹、吉田 均²、熊木 康裕²、引地 邦男²、中田 充夫² (¹札幌医大・保健医療学部、²北大院・生物科学)

哺乳類プリオン蛋白質の N 末端領域には、オクタペプチド PHGGG-WGQ が5回繰り返したリピート配列 (タンデムリピート) が存在する。我々はモデルペプチドを用いた NMR 解析により、HGGGW でヒチジンとトリプトファンの側鎖が互いに近接したループ構造、GWGQ で β ターン構造を形成していることを示した (1)。一方、鳥類プリオン蛋白質では、哺乳類のものとは異なりヘキサペプチド PHNPGY が9回繰り返したタンデムリピートが存在する。昨年の生化学会において、鳥類プリオン蛋白質のモデルペプチドを用いた NMR 解析の結果を報告した。本年度では、さらに詳しい NMR 解析および Protein Data Bank(PDB) を用いての β -ターン解析をおこなったので、それらの結果を報告する。NMR 測定に用いた試料は、8 残基の HNPGYPHN と 20 残基の RQPGYPHNPGYPHNPGYPHN である。測定結果は、Tyr-Pro のペプチド結合がシスとトランスの2つのコンフォメーションを形成することを示した。8 残基ペプチドのトランス型において、Tyr-5 のアミドプロトンがケミカルシフトの温度係数および重水交換、Gly-4 と Tyr-5 のアミドプロトンの NOE、Pro-3 側鎖の δ プロトンと Tyr-5 のアミドプロトンの NOE が観測された。このことは、NPGY でタイプ I の β ターンを形成していることを示す。また、8 残基ペプチドのシス型は、NPGY において β ターンを形成し、同時に GYPH においてタイプ IV の β ターンが形成することが示唆された。PDB による β -ターン解析の結果は、XYPH (X は任意のアミノ酸) はタイプ IVb の β ターンを選択的にとるように思われる。(1) Yoshida H, Matsushima N, Kumaki Y, Nakata M, Hikichi K. J. Biochem (Tokyo). 128(2):271-281 (2000).

N.Matsushima,H.Yoshida,Y.Kumaki,K.Hikichi,M.Nakata : Structural study of PHNPGY repeat in avian prion

1P048

二次元近赤外相関分光法による卵白アルブミンの酸変性過程の研究: 水和状態と二次構造変化の同時観測

○村山 幸市¹、根川 常夫¹、林 知也¹、桑田 一夫¹、恵良 聖一¹、尾崎 幸洋² (¹岐阜大・医・第2生理、²関学大・理・化学)

著者は、二次元近赤外相関分光法により酸水溶液中での卵白アルブミンの変性過程を調べた。この新しい方法によりタンパク質の水和状態と二次構造変化を同時に観測することができた。pH 2.4~pH 5.4 の範囲において1, 2, 3, 4, 5%の卵白アルブミン水溶液の近赤外スペクトルを測定し、各 pH に対して濃度を振動とした二次元相関スペクトルを計算した。4850-4200 cm⁻¹ 領域では、pH 5.4 から pH 3.6 で同時相関スペクトルに著しい変化が見られた。pH 5.0 で 4265 cm⁻¹ に見られた側鎖のバンドは pH 3.6 で完全に消失した。これは pH の減少とともに卵白アルブミンの側鎖が微視的な環境変化にさらされている事を示している。また 4600 cm⁻¹ 付近のアミド基によるバンドは pH 3.0 から pH 2.4 でブロードニングしながら低波数シフトした。これは卵白アルブミンのアミド基の水素結合の強さが変化することを示している。また pH 2.8 以下ではアミド基と側鎖のバンドの強度は水のバンド強度と逆位相で変化することも見出された。一方 7500-5350 cm⁻¹ 領域では、pH 2.8 から pH 2.6 で著しい変化が起こる。pH 2.6 では自由水によるバンドと結合水によるバンドの自己相関ピーク強度は弱くなり、結合水のバンドとアミド基によるバンドの相互相関ピークが非常に強く現れた。これは pH 2.8 から pH 2.6 の範囲で水和状態が大きく変化していることを示している。

K.Murayama,T.Negawa,T.Hayashi,K.Kuwata,S.Era and Y.Ozaki : Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy Study of Ovalbumin in Acidic pH Region