3P041

β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成におけるジスルフィド結合の役割

○大橋 祐美子¹、萩原 義久^{1,2}、Gennadiy Kozhukh¹、星野 大¹、長谷川 一浩³、山口 格³、内木 宏延³、菅野 誉士⁴、川合 知二⁴、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 産総研・人間系特別研究体、³ 福井医大・第二病理、⁴ 阪大・産研)

MHCクラスIの一成分である β 2 ミクログロブリン (β 2 M) は、長期血液透析患者に高頻度で発症する透析アミロイドーシスの原因蛋白質である。本研究では、 β 2 Mを用いて、構造、安定性、アミロイド線維形成におけるS-S結合の役割を調べた。

【構造、安定性におけるS-S結合の役割】分子内部に一つだけ存在するS-S結合を還元した還元型 β 2 Mと、還元後シスタミン (SH-CH₂-CH₂-NH₂) によって修飾したシスタミン- β 2 Mを作製し、円二色性 (CD)、一次元NMRなどによりその立体構造を調べた。その結果、中性pHでは還元型 β 2 Mは、天然型 β 2 Mと似た構造であり、シスタミン- β 2 Mは崩れた構造であった。これは、シスタミンの立体障害のためと考えられる。アミロイド線維伸長反応の進行する酸性pHでは全て変性しており、大きな違いは見られなかった。さらに、塩酸グアニジンによる変性実験からS-S結合が β 2 Mの安定化に大きく寄与していることが分かった。

【アミロイド線維形成におけるS-S結合の役割】天然型 β 2 Mはアミロイド線維核の存在下で、pH 2.5においてアミロイド線維伸長反応を起こすことがチオフラビン T (ThT) の蛍光を用いた系で確認できる。同様の実験を、還元型 β 2 Mとシスタミン- β 2 Mを用いて行なったところ、ThTの蛍光強度の増加はほとんど見られなかった。そこで原子間力顕微鏡 (AFM) で、天然型 β 2 Mと還元型 β 2 Mのアミロイド線維伸長反応後の溶液を観察したところ、全く異なる形状をもった線維が確認できた。また、天然型 β 2 Mと還元型 β 2 Mを混在させて線維伸長を観察したところ、還元型 β 2 Mが天然型 β 2 Mの線維伸長の競争阻害剤として働いていることが分かった。

Y.Ohashi, Y.Hagihara, G.Kozhukh, M.Hoshino, K.Hasegawa, I.Yamaguchi, H.Naiki, T.Kanno, T.Kawai, Y.Goto : Role of the intrachain disulfide bond of beta2-microglobulin on its amyloid fibril formation.

3P043

NMRを用いた β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成の分子機構に関する研究

○加藤 秀典¹、星野 大¹、Gennadiy Kozhukh¹、長谷川 一浩²、内木 宏延²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 福井医大・第二病理)

β 2 ミクログロブリン (β 2 m) は長期透析患者の体内にアミロイド線維を形成して沈着し、様々な病気を引き起こすことが知られている。これまでの研究により *in vitro* では、pH 2.5の酸性条件下において最も効率よく線維伸長が進行することが知られている。一方、最近の我々の研究により、分子内に存在する一本のSS結合を還元することにより典型的なアミロイド線維を形成能が失われることが明らかになっている。そこで、本研究では多次元NMRを用い、線維形成能に違いのみられるSS結合酸化型と還元型 β 2 mを作製し、pH 2.5における両者の構造を詳細に解析することにより、線維形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。測定には、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* による発現系を用いて作製した¹³C,¹⁵N- β 2 mを使用した。まず、pH 7における天然状態を解析し、発現した β 2 mが溶液中において結晶と同様の β シート構造をとっていることを明らかにした。次に典型的なアミロイド線維形成能のみられる酸化型について、主鎖の帰属を行った。そして、得られた化学シフト値を文献から得られるランダムコイル状態の化学シフト値と比較したところ、分子全体にわたって顕著な差はみられず、酸性では高度に変性したランダムコイル構造に近いことが示唆された。また、還元型についても同様の解析を行い、両者を比較したところ、化学シフト値の差が大きい残基はSS結合の近傍にほぼ局限していることがわかった。さらに、緩和測定を行い速い時間オーダーでの運動性を調べたところ、酸化型ではSS結合の間のループ部分の運動性が著しく抑えられているのに対し、還元型では分子全体にわたり一様に運動性が高いことが明らかになった。発表では、このような差が線維形成能の違いにどうしてつながるのかを考察したいと考えている。

H.Katou, M.Hoshino, K.Gennadiy, K.Hasegawa, H.Naiki and Y.Goto : Role of disulfide bond in the amyloid fibril formation of beta2-microglobulin by NMR

3P042

脱重合とジスルフィド結合の還元反応から見た β 2-ミクログロブリンアミロイド線維の安定性

○洪 東杓¹、長谷川 一浩²、内木 宏延²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 福井医大)

β 2-ミクログロブリン (β 2M) は長期透析患者組織に沈着するアミロイド線維の主成分蛋白質である。我々はメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いた β 2Mの大量発現系を構築し、アミロイド線維形成機構について研究している。In vitroでモノマー β 2Mのみでは線維は形成されないが、酸性pHにおいてシードが存在すると線維形成が見られる。しかし、分子内のジスルフィド結合が還元された β 2Mは線維形成能が顕著に低下する1)。一方、酸性条件で高濃度の塩が存在すると自発的に形成されるプロトフィブリルのようなものをアミロイド線維として紹介した例もある2)。本研究ではジスルフィド結合の還元反応に着目し、アミロイド線維とプロトフィブリルの構造安定性について、逆相HPLCとThioflavin T(ThT)の蛍光測定を用いて検討した。モノマー β 2Mとアミロイド線維のジスルフィド結合の還元反応をpH 8.5, DTT 50mMの条件下で行い逆相HPLCで還元率を調べた。モノマーではジスルフィド結合はほとんど還元されないが、アミロイド線維では1時間後に約50%が還元された。酸性で作られた β 2Mアミロイド線維は、中性pHで脱重合しモノマーになる。ThT蛍光測定を用いた脱重合反応の実験ではDTTが無による違いは見られなかった。また、脱重合反応の経時変化は同じ条件での還元反応の経時変化と一致した。このことは還元反応が脱重合後の中間的な構造で起きていることを示唆し、したがって、線維上での β 2Mのジスルフィド結合は還元反応から保護されていると考えられる。他方、高濃度の塩の存在下で作られたプロトフィブリルは、電顕観察からもアミロイド線維とは違う細くて柔らかい形状をしており、中性pHで脱重合も還元もされやすい不安定な構造であった。1) 大橋ら; 第38回年会1A11002) McParland et al., Biochemistry 39 (2000) 8735-8746

D.-P. Hong, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto : Stability of beta2-Microglobulin Amyloid Fibrils Analyzed by Depolymerization and Reduction of the Disulfide Bond

3P044

β 2 ミクログロブリンアミロイド線維に対するアルコールの効果

○中岡-廣田 奈美¹、長谷川 一浩²、内木 宏延²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 福井医大・医・病理第2)

<はじめに> 本研究では長期血液透析患者にみられるアミロイドーシスの原因蛋白質である β 2 ミクログロブリンのアミロイド線維を材料としてアルコールによる凝集溶解効果を調べた。なお、 β 2 ミクログロブリンは99アミノ酸残基からなる蛋白質であり、クラスI主要組織適合性抗原を構成する。

<実験方法・結果> 線維伸長反応は酸性条件で行った。酸性条件下において、 β 2 ミクログロブリンアミロイド線維に対してさまざまなアルコールの種類と濃度を添加したときのCD、チオフラビンT蛍光および光散乱の時間変化を調べた。また、 β 2 ミクログロブリンの単量体に対しても同様な測定を行った。CDとチオフラビンT蛍光測定結果から、過去の我々の研究においても強い効果の示すHexafluoroisopropanol (HFIP) がアミロイド線維溶解効果をもつことがわかった。しかし、溶解は完全ではなく、透過型電子顕微鏡観察によってアミロイド線維が残存していることがわかった。また、超遠心分析法で調べた結果、溶解産物は10分子程度の集合体であることがわかった。それに対して臨床治療に使用されるDimethyl sulfoxide (DMSO) を低濃度添加した場合、溶解効果が顕著ではないが、約80%以上の濃度ではHFIP以上のアミロイド溶解効果が見られた。また、電子顕微鏡観察においてアミロイド線維はほとんど観察されなかった。超遠心分析法によって、溶解産物の分子量がモノマー程度であることが確認された。

<考察> HFIPは疎水的な溶媒であるのに対し、DMSOは極性の強い溶媒である。DMSOによってアミロイド線維が溶解することから、アミロイド線維内の蛋白質間は疎水的相互作用に加え、静電的相互作用で結合していることが示唆された。

N. Hirota-Nakaoka, K. Hasegawa, H. Naiki and Y. Goto : The Effect of Alcohol on beta2-Microglobulin Amyloid Fibrils