2I1415

野生型トランスサイレチンと変異体の構造安定性

○竹内 誠、松原 公明、水口 峰之、河野 敬一（富山医薬大・薬）

アミロイドーシスは、不溶性アミロイドが全身の諸臓器や組織の細胞外に沈着する疾患である。本研究では、家族性アミロイドーシス (FAP) 原因物質であるトランスサイレチン (TTR) のアミロイド形成について研究した。以前に行われた研究により、突然変異によって TTR のアミノ酸配列が変化すると、アミロイドが形成しやすくなると考えられており、これまでに 80 種類以上の FAP 誘発 TTR 変異体が発見されている。本研究では、FAP を誘発する TTR 変異体 (Leu58His, Leu58Arg, Thr59Lys, Glu61Lys) を作成し、それらの物理化学的性質を野生型と比較した。これらの変異体は、立体構造上ループ D・E 上に位置したアミノ酸残基が塩基性アミノ酸に変異している。TTR 変異体の発現プラスミドは、QuikChange TMSite-directed mutagenesis kits (Stratagene 社) を用いて作製した。完成した TTR 発現プラスミドで形質転換した大腸菌 M15 を大量培養し、菌体画分を破碎後、可溶成分をニッケルカラムにより精製した。天然条件下における TTR は 4 量体として存在するが、pH を変化させることによってダイマーやモノマーへと変化していくことがすでにわかっている。精製した wild-type TTR と 4 種類の変異体について、様々な pH における単量体、二量体、四量体の存在比を SDS-PAGE で解析したところ、変異体はモノマーになりやすい傾向があることがわかった。また、これらの変異体の円二色性スペクトルを測定したところ、2 次、3 次構造ともに wild-type との違いはなかった。しかしながら、尿素による変性過程を調べたところ、変異体の安定性は wild-type より低いことがわかった。また、チオフラビン結合による蛍光測定によってアミロイド形成を調べたところ、変異体は wild-type よりもアミロイドを形成しやすくなっていることがわかった。年会では、突然変異による立体構造変化とアミロイド形成との関係について議論したい。

M.Takeuchi, K.Matubara, M.Mizuguchi, K.Kawano : Structural stability of wild-type and variant of transthyretins.

2I1445

バルナーゼフラグメントのフィブリル構造形成における各残基の効果

○佐伯 政俊^{1,2}、小中原 猛雄¹、川崎 一則²、周 徳山^{2,3}、本田 真也²、森井 尚之²（¹東理大・理工、²産総研・分子細胞、³重慶神経研）

プリオン病やアルツハイマー病などのように、タンパク質のコンフォメーション異常によって引き起こされるタンパク質凝集集合体（不溶性のアミロイドフィブリル）が関わっているとされる疾病が多数報告されている。そこで本研究では RNase の一種 barnase の M1 フラグメント (BM1) (AQVIN TFDGV ADYLQ TYHKL PDNY, 24 残基) を対象としてアミロイドフィブリル形成の解析を行った。BM1 は pH7.5 で溶解した後、経時的に集合体を形成し、これに伴い CD スペクトルで 207nm に負のピークを示す特有の二次構造をとることが報告されている。我々はこのようなアミロイドフィブリル形成の一般機構を明らかにするために、BM1 の各種変異体を合成し、フィブリル形成における残基間および分子間相互作用の解明を試みた。各種変異体を用いた実験により、(i) 荷電性残基である Asp の変異がフィブリル形成の至適 pH 域に関わりがあること、(ii) Val3、Ile4、Val10、Leu14 の残基の疎水性相互作用がフィブリル形成に重要であること、(iii) 1-20 残基部分で主に構造が形成されていることなどが明らかとなった。結果を総合すると、各分子は β -ストランド 2 本がターン構造で折り返した形の β -シート型と推定される。フィブリル構造は、 β -シート型分子がシート面方向に多数連続集積してプロトフィラメントを形成し、そのプロトフィラメントがさらにいくつか積層集合して形成されていると考えられる。電顕観察の結果、フィブリルはいずれも左ねじれのらせん構造で、いくつかの変異体では幅の広いリボン状のフィブリルを形成していた。また、これらの CD スペクトルは 215nm に負の極大をもつ β -シート型で、207nm にピークを持つ wild-type と興味深い差異を示した。

Masatoshi Saiki, Takeo Konakahara, Kazunori Kawasaki, Deshan Zhou, Shinya Honda, Hisayuki Morii : Effect of Amino Acid Residues on Fibril Formation of the Fragment of Barnase

2I1430

リゾチーム 2SS 変異体：2SS[64-80,76-94] に残る部分秩序構造解析

○平井 健一¹、坂本 恵子¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹（¹関学大・理工、²神戸大・理）

蛋白質のフォールディング反応における中間体構造を調べるために S-S 結合を欠損させたニフトリリゾチームを研究している。 α ドメイン内に架かる S-S 結合 [C6-C127, C30-C115] を欠損させ、 β ドメイン内に架かる S-S 結合 [C64-C80, C76-C94] を残したリゾチーム 2SS 変異体:2SS[64-80,76-94] の溶液中での ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定したところ、非天然状態特有のスペクトルが得られた。しかし、S-S 結合を全て欠損させた 0SS 変異体に比べると β ドメイン内に S-S 結合が架かっているために部分的な秩序構造が残っていると考えられる。水溶液中で水素ラベルしたサンプルを DMSO 溶液中で二次元 HSQC スペクトルを測定して各残基の水素交換反応に対する保護因子を測定する。その研究のためにはまず、DMSO 中での 2SS [64-80,76-94] のピークの帰属が必要であり、今回は HSQC スペクトルの帰属について報告する。DMSO 溶液中における 2SS[64-80,76-94] の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定したところ 105 個のピークが確認された。帰属方法としては、TOCSY-HSQC で残基内のピークパターンから残基の特定を行い、NOESY-HSQC からプロトンの NN 相関、 α N 相関を見つけて出すことで隣接残基の同定を試みた。しかし非天然状態では、スペクトルがアミノ酸固有の領域に集中しておりこれだけでは正確な帰属が困難であったために新たに HSQC-NOESY-HSQC スペクトルを測定した。これは主鎖 NH の ¹⁵N とそれに隣接する ¹⁵N との相関が得られるため、困難だったピークの帰属が正確に行えるようになった。この方法で現在 80 個以上の帰属に成功している。学会ではピークの帰属をさらに完全なものにして報告する。

K.Hirai, K.Sakamoto, Y.Noda, H.Tachibana and S.Segawa : Structural Analysis of Residual Structures in a 2SS-variant of Lysozyme : 2SS[64-80 , 76-94]

2I1500

ジヒドロ葉酸還元酵素の網羅的変異解析：熱転移に及ぼす影響

○高橋 尚、山子 知織、竹縄 辰行、巖倉 正寛（産総研・蛋白質デザイン G）

蛋白質の立体構造は種々の相互作用によって安定化されている。この蛋白質を更に安定化させるために 1 アミノ酸置換による変異を導入すると、意図した以外の相互作用の形成を引き起こし、結果として不安定化してしまうことがしばしば起こる。このような予期せぬ相互作用の形成を予測、回避することは、その複雑さゆえに難しく、このことが蛋白質の改良や設計を困難にしている主な原因ではないだろうか。この困難を解決するひとつのアプローチとして、その複雑な相互作用からは独立して安定化に寄与するような部分を見出し、その部分のみに着目すれば問題を限定することができる。立体構造におけるそのような部分の探索として、現在まで主に 1 アミノ酸置換変異体を作成しその安定性と置換基の性質との関係を明らかにする調査が試みられているが、従来のようにあらかじめ限定したいくつかの部位をわずか数種のアミノ酸で置換した数種の変異体、あるいはアラニンスキャンのような方法では変異の影響を断片的にしか捕らえることができない。したがって我々は、1 アミノ酸置換による変異の影響を網羅的に解析することを目的として、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の 1 アミノ酸置換変異体を網羅的に作成（約 300 種）し、変異と熱転移の関係を調べた。その結果、多くの変異体は 3 状態を示すが、ある部位については変異に対して 2 状態的な転移に変化することや、低温側の T_m は主に Loop subdomain での変異に影響を受けやすく、高温側の T_m は主に Adenosine-binding subdomain での変異に影響を受けやすいことなどが明らかになった。これらの知見の蓄積によって変異の影響の全体像を明確に描くことは、網羅的変異解析によってはじめて可能となり、蛋白質の改良、設計のための重要な知見を与えることが期待される。

H.Takahashi,C.Yamane,T.Takenawa and M.Iwakura : Comprehensive Mutation Analysis of Dihydrofolate Reductase (an effect on Thermal transition)