2I1630

β 2ミクログロブリンの天然構造を構成する各 β ストランドのアミロイド線維形成における役割

○千葉 剛¹、萩原 義久²、日暮 卓志^{1,3}、長谷川 一浩⁴、内木 宏延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 CREST/JST、⁴ 福井医大・第二病理)

【背景と目的】 β 2-ミクログロブリン (β 2M) は、高等脊椎動物の細胞膜表面に発現しているMHCクラスI分子の一成分であり、長期血液透析患者組織に沈着するアミロイド線維の主要構成蛋白質として見い出されている。しかし、この蛋白質がどのような分子機構により水溶性の天然構造を変化させアミロイド線維を形成するのかは明らかにされていない。本研究では、 β 2Mの天然構造を構成する各 β ストランドに着目し、アミロイド形成におけるその役割を調べた。

【方法】X線結晶構造解析やNMR測定から天然型 β 2Mの三次元構造には7本の β ストランドが存在していることが知られている。この β ストランドのそれぞれに、 β 構造破壊能を持つプロリン残基を導入し(V9P, L23P, L39P, H51P, L65P, V82P, V93P)、変異が立体構造に及ぼす影響を円二色性(CD)により調べた。さらに各変異体のアミロイド線維伸長反応をチオフラビンT(ThT)の蛍光変化を用いて測定し、その線維形成能を天然型 β 2Mと比較した。

【結果と考察】プロリン残基を導入したにも関わらず、いくつかの変異体(V9P, L39P, H51P)はpH8.0において天然型 β 2Mと類似した構造を取っていた。これらの変異体については、プロリン残基への変異により水素結合を切断しても、蛋白質の全体の構造にはあまり影響しないことが分かった。アミロイド線維伸長反応を測定したところ、V9P変異体では速くなり、L39P、H51P、L65P変異体では遅くなった。これより、各 β ストランドのアミロイド線維形成に於ける重要性はそれぞれのストランドで異なることが明らかとなった。

T. Chiba, Y. Hagihara, T. Higurashi, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto : Amyloid fibril formation of beta2-Microglobulin proline mutants

2I1700

X線および中性子小角散乱によるニワトリ卵白リゾチームのアミロイド線維形成過程の研究

○藤原 悟¹、松本 富美子^{1,2}、若林 克三³、米澤 康滋⁴ (¹ 原研・先端基礎研究センター、² 理研・播磨、³ 阪大院・基礎工、⁴ 筑波技短大)

アルツハイマー病等のアミロイドーシスに特徴的なアミロイド線維は、広く種々の蛋白質において in vitro で形成されることが明らかになってきた。アミロイド形成機構の解明はアミロイド疾患の治療、予防だけでなく、foldingや安定性に関係した蛋白質の性質そのものを考える上でも重要である。ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)は高エタノール濃度溶液中でアミロイド線維を形成する[1]。我々は種々のエタノール濃度及び蛋白質濃度における HEWL 溶液の X 線小角散乱実験を行い、HEWL のアミロイド形成は 2 量体の形成、プロトフィラメントの形成、そしてアミロイド線維の形成という過程からなることを明らかにした[2]。我々は今回、それぞれの過程の時間変化を X 線および中性子小角散乱法により調べた。秒から分のオーダーの比較的速い過程である 2 量体の形成及びプロトフィラメントの形成を X 線散乱、時間から日のオーダーの遅い過程であるアミロイド線維の形成を中性子散乱により追跡した。X 線散乱実験は、KEK・PF ビームライン BL-15A を、中性子散乱実験は原研 JRR-3M の中性子小角散乱装置 SANS-J を用いて行った。得られた時分割散乱曲線のギニエプロットおよび断面のギニエプロットによる解析を行い、それぞれの過程における慣性半径(断面の慣性半径)および会合度の変化を明らかにした。2 量体およびプロトフィラメント形成過程には lag time が存在すること、プロトフィラメントの会合により進行するアミロイド線維形成過程には静電相互作用が関係していることが示された。

[1] Goda et al., Protein Science 9 (2000), 369.

[2] 米澤ら、日本生物物理学会第 38 回年会 (2000).

S. Fujiwara, F. Matsumoto, K. Wakabayashi and Y. Yonezawa : Small-angle X-ray and neutron scattering study of the amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme

2I1645

β 2ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の構造安定性の解析

○成本 武弘¹、星野 大¹、Jozsef Kardos¹、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・病理第二)

<序論> β 2ミクログロブリン (β 2M) は長期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の一つとして知られている。in vitro では、37℃・pH 2.5 の酸性条件下において重合核依存的に最も効率良くアミロイド線維伸長が進行することが知られている。この伸長反応はチオフラビン T (ThT) の蛍光測定より確認できる。これまで蛋白質の構造安定性の研究は多くなされているが、アミロイド線維の安定性に関してはまだ不明な点が多い。

<実験・結果>本研究では β 2Mの天然状態とアミロイド線維の構造安定性を変性剤である塩酸グアニジンを用いて Trp の蛍光スペクトル、円二色性(CD)、ThT の蛍光測定により検討した。 β 2M は酸性条件では変性し、アミロイド線維は中性条件では脱重合反応が起こる。このため、塩酸グアニジンによる変性反応を天然状態は中性条件下(pH 7.0)、アミロイド線維は酸性条件下(pH 2.5)で測定した。この結果よりアミロイド線維の可溶化は蛋白質の変性反応と同じように可逆的な反応として取り扱えることがわかった。それらを塩酸グアニジン濃度に対してプロットし、それぞれの自由エネルギー変化(ΔG)を求め安定性の検討を行なった。その結果、アミロイド線維は β 2M よりも安定性が高いことがわかった。また、疎水性相互作用により蛋白質の構造を安定化する硫酸アンモニウムを加えて同様の測定を行なったところ、硫酸アンモニウムによる安定化の効果はアミロイド線維に対するほうがより大きかった。

<考察>アミロイド線維は硫酸アンモニウムにより安定化されることからアミロイド線維内の蛋白質間の結合には水素結合だけでなく疎水的相互作用も大きく寄与していることが示唆された。

T.Narimoto,M.Hoshino,J.Kardos,K.Hasegawa,H.Naiki,Y.Goto : Analysis of Structural Stability of beta2-Microglobulin Amyloid Fibrils

2I1715

超遠心分析による T4 ファージ分子シャペロン gp57A の会合平衡

Ali Said¹、岩淵 紀介¹、Schuck Peter²、○有坂 文雄¹ (¹ 東工大院・生命理工・生命情報、² NIH, U.S.A.)

T4 ファージの gp57A はファージのコードする分子シャペロンで尾線維及び小尾線維の線維状構造形成に必要である。本蛋白質は 79 残基からなる蛋白質で、円二色性の測定から、90% 以上が α ヘリックスであることが明らかである。以前、我々は本蛋白質が四量体であると発表した、その後、いくつかの分子種が速い動的平衡にあることが明らかになった。平衡状態にある分子種の同定は、濃度が高くなるほどより大きな会合体を形成するために困難であった。今回、この平衡系を広い濃度範囲及び pH、温度範囲で沈降速度法により測定し、著者の一人の Peter Schuck が開発した "sedfit" および "sedphat" で解析した結果、1-2-4-8-16 モデルは排除され、1-2-6-12 または 1-3-6-12 モデルがフィットすることが示された。さらに、sedphat により両モデルによる $f(f_0)$ の値を検討した結果、1-3-6-12 モデルが最もよくフィットするという結論に達した。他方、城所らによる DSC (differential scanning microcalorimetry) の測定結果によれば、熱変性は高度に可逆的で 51℃ と 64℃ に 2 つの転移が認められ、51℃ では 6 量体から 3 量体への解離、64℃ では 3 量体が 1 量体に解離する考えるとデータがよく説明できることが分かった。以上の結果から、最終的に 1-3-6-12 モデルが正しく、通常の条件下では 3 量体と 6 量体が主要な分子種で平衡にあると結論された。また、Sedphat で得られる K1-3 と K3-6 の van't Hoff プロットの結果から、1 量体-3 量体間の平衡が温度に強く依存するのに対して、3 量体-6 量体間の平衡は温度には依存しない。

S.Ali, N.Iwabuchi, P.Schuck and F.Arisaka : Rapid association equilibrium of gp57A of bacteriophage T4 as analyzed by analytical ultracentrifugation