B089

単一チャネル分子の電流―動態同時計測にむけて：KcsA チャネル測定系の開発

○清水 啓史^{1,2}、宮崎 拓也^{1,3}、井上 史子¹、奥村 泰章^{1,3}、山田 克幸^{1,2}、今野 卓^{1,2}、佐々木 裕次^{1,3}、老木 成稔^{1,2}
(¹JST/CREST 佐々木チーム、² 福井医大分子生理、³Spring-8/JASRI 生物医学G)

チャネル分子の立体構造が次々に明らかになっている。1998 年の KcsA (2 回膜貫通型カリウムチャネル) を始め、カルシウム依存性カリウムチャネル (2 回膜貫通型)、電位依存性カリウムチャネル (6 回膜貫通型) など原核生物由来のチャネルが結晶化されてきた。このような静的構造を基にして、機能を生み出す動的構造変化を追求するために、チャネル分子は単一チャネル電流記録と構造変化を同時記録できるという点で優れた対象である。佐々木らが開発した DX(T) (Diffracted X-ray tracking) 法でチャネルの動態を測定するための実験系を開発した。放線菌由来 KcsA チャネルを大腸菌で大量培養、精製し、リポソーム (POPE[palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-ethanolamine]: POPG[palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-glycerol] = 7.5:2.5) に再構成した。200 mM KCl (pH 4.0/7.0) 溶液中、脂質平面膜法の一つである改良 tip-dip 法で単一チャネル電流を測定した。低い開確率と弱い電位依存性を示す単一チャネル電流を記録した。白色 X 線による回折スポットを高い S/N 比で観察するために、放射光ビームが通過する水層をできる限り薄くするチェンバーを設計した。先端に脂質平面膜を形成した tip-dip 電極を、漏斗状石英ガラスの先端近くまで下ろしてくる。石英ガラス断面が 300 μ m 以下の位置でビームを当てた。現在、放射光ビーム照射に伴う様々なノイズを除去しつつある。立体構造変化のプロープとなる金のナノ結晶を KcsA チャネルに結合させるために、KcsA 分子にシステイン残基を導入した。現在、KcsA 分子の様々なシステイン変異体を作製し、金結晶を作用させた際の電流変化を tip-dip 法で測定することによって金結晶の最適な結合部位を探っている。

H. Shimizu, T. Miyazaki, F. Inoue, Y. Okumura, K. Yamada, T. Konno, Y. C. Sasaki and S. Oiki : Towards simultaneous recordings of ionic currents and dynamics from a single molecule of KcsA potassium channel.

B091

昆虫サイトカイン GBP の変異導入によるレセプター結合および活性発現機構の解析

○吉田 正暢¹、設楽 邦夫¹、松原 公明¹、河野 隆英¹、相沢 智康²、早川 洋一³、熊木 康裕²、水口 峰之¹、出村 誠²、新田 勝利²、河野 敬一¹ (¹ 富山医大・薬、² 北大・理、³ 北大・低温研)

growth-blocking peptide (GBP) は、寄生蜂の一種であるカリヤコマユバチによって寄生されたアワヨトウ蛾幼虫血液から単離された、アミノ酸 25 残基のペプチドである。当初 GBP は、宿主の成長を阻害する物質として単離されたが、その後の研究から宿主遺伝子由来のペプチドで寄生時以外にも発現しており、低濃度で幼虫の発育促進、高濃度で成長阻害作用を示すことが明らかとなってきた。また GBP は、培養細胞に対する増殖活性や血球細胞刺激活性など複数の生物活性を有することも分かっていた。NMR による構造解析から、GBP の 3 次構造は、1 本のジスルフィド結合と疎水性相互作用によって短い逆平行 β シート構造を形成するコア領域と、N 末端 6 残基および C 末端 3 残基のフレキシブル領域から成ることがわかっている。これまでの研究から、2 次構造を形成するコア領域のみならず、収束した構造を持たない末端領域内の残基も活性発現において必要であることが明らかとなっている。また、最近の部位特異的導入による変異体実験から、コア領域と N 末端の活性残基とを連結しているリンカー領域 (Gly5、Gly6) におけるフレキシビリティが活性発現において重要な役割を担っていることもわかってきた。さらに本研究では、活性を持たない末端残基削除型変異体を用いての競合実験によるレセプター結合活性測定に成功し、N 末端領域内アミノ酸残基がレセプター結合に与える影響について検討を行った。その結果、コアの立体構造のみならず、N 末端領域内の Phe3 がレセプター相互作用において必須残基であることが明らかとなった。これらの結果よりレセプターとの結合モデルに関する有力な知見を得ることができたので報告する。なお、本研究の一部は生研機構基礎技術推進事業により行われた。

M.Yoshida, K.Shitara, K.Matsubara, T.Kouno, T.Aizawa, Y.Hayakawa, Y.Kumaki, M.Mizuguchi, M.Demura, K.Nitta and K.Kawano : Mutational analysis of receptor activation and binding mechanism of insect cytokine, GBP

B090

病因性変異型 S112I トランスサイレチンの構造安定性とアポトーシス誘導

○松原 公明、水口 峰之、川口 泰永、青木 孝裕、斎藤 隆幸、河野 敬一 (富山医大・薬)

【目的】家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、アミロイド繊維が全身の諸臓器に沈着することによって障害を引き起こす常染色体優性遺伝性疾患である。本研究では FAP の原因となる変異型蛋白質 S112I トランスサイレチン (S112I TTR) のアミロイド形成機構を解明するため、その構造安定性を解析した。また近年アミロイドと神経細胞死の関連が注目されていることから、神経芽細胞腫 IMR32 への細胞死誘導についても解析を行った。【方法】天然型 TTR 及び S112I TTR について、SDS-PAGE 及びゲル濾過法による 4 次構造解析、CD 測定とアクリルアミドクエンチングによる 2 次構造、3 次構造解析を行った。また、尿素による変性過程について CD と Trp 蛍光測定を用いて検討し、天然型 TTR と S112I の構造安定性を比較した。更に pH3.4~7.4 の条件下でのアミロイド形成量を測定した。また上記の実験と平行して、神経芽細胞腫 IMR32 にアミロイド β ペプチド、天然型 TTR、S112I TTR を添加し、TUNEL 測定等を用いてアポトーシス誘導について調べた。【結果】解析の結果、S112I TTR は溶液中において天然型のような 4 量体構造ではなく 2 量体構造を有しているが、2 次構造は天然型と比較して大きく変化していないことが判明した。また、構造安定性の比較をおこなった結果、天然型と変異型の間に大きな差は見られなかった。このことから Trp79 近傍が、すなわち TTR の疎水性コア領域周辺の構造は 2 量体構造であっても保持されていること予想された。更に S112I TTR は天然型とは異なり、中性 pH でアミロイド様構造 (プロトフィラメント) を形成することが明らかとなったことから、2 量体構造がアミロイド形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、IMR32 細胞での TUNEL 測定を行ったところ、S112I TTR はアミロイド β ペプチドと同様に、神経細胞死を誘導していることが判明した。

K.Matsubara, M.Mizuguchi, Y.Kawaguchi, T.Aoki, T.Saitoh and K.Kawano : Structural stability and apoptosis-inducing effect of the pathogenic mutant S112I transthyretin.

B092

市販ヒト血清アルブミン (HSA) 標品における SH 基の酸化還元状態の不均一性

○根川 常夫¹、松山 幸枝²、今井 一²、村山 幸一¹、桑田 一夫¹、恵良 聖一¹ (¹ 岐阜大・医・蛋白高次機能学、² 岐阜大・教育・保健体育)

血清アルブミンの市販標品は、種々のリガンドや薬剤に対する結合実験あるいは細胞・組織培養の際の添加剤として多用されている。また臨床分野では精製されたヒト血清アルブミン (HSA) はおもに膠質浸透圧維持のために輸液用アルブミン製剤として使用されている。HSA は 34 番目に Cys 残基 (Cys-34) を一個有しているが、この残基がフリーな状態のものをメルカプトアルブミン (還元型アルブミン, HMA)、血中のチオール化合物とジスルフィド結合したものをノンメルカプトアルブミン (酸化型アルブミン, HNA) とよび、生体内のアルブミンはこの HMA と HNA との混合物よりなっている。われわれはこれまでにこの HSA を HMA と HNA とに分離・観測できる HPLC 分析法を確立し、種々の疾患における HSA の SH 基の酸化還元状態の変化について研究してきた。ところで、研究用 HSA 標品は現在数社より市販されているが、いずれもまず献血によるヒト血清を大量採取・プール後、Cohn の低温エタノール法によって得たフラクション・ファイブからスタートしている。このフラクション・ファイブを、結合不純物・脂肪酸除去操作後さらに熱処理による混入ウイルス失活等を経て精製・販売されている (その際、精製プロセスが多いほど高価で販売されている)。今回われわれは 2 社 8 種類の市販 HSA 標品の SH 基の酸化還元状態の不均一性を分析した。その結果驚くことに、精製プロセスが多くて高純度といわれているものほど酸化状態が進み、とくに不可逆的なスルフェン酸、スルフィン酸、スルホン酸に変化した HNA (超酸化型アルブミン) の顕著な増加が観測された。従ってこのような市販 HSA 標品を用いた研究を行う際には、このような分子不均一性の存在を認識あるいは考慮したうえで研究を行う必要性があると考えられた。

T. Negawa, Y. Matsuyama, H. Imai, K. Murayama, K. Kuwata, S. Era : Heterogeneity of the redox state of commercial HSA products