B161

フィブリル構造形成における基本構造モデル

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

近年、アルツハイマー病やプリオン、透析アミロイドーシスなど、さまざまなヒト変性疾患には、アミロイドフィブリルと呼ばれるタンパク質凝集体の組織への沈着が関係していると報告されている。本研究ではRNaseの一種barnaseのM1フラグメント(BM1)(AQVINTFDGVADYLLQTYHKL 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的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CDスペクトル、チオフラビンTの蛍光を利用したフィブリル検出および電子顕微鏡による観察の結果は、 β -ストランド2本がGly9付近においてターン構造で折りかえした形の逆平行 β シート構造を有すること、及びその分子が面方向に積層してフィブリルが形成されているモデルで合理的に説明できるものであることが明らかになった。このモデルでは疎水性残基が列状に並んでいることから、それらの疎水性相互作用がフィブリルの構造を決める最も基本的特徴であると推定される。おそらくフィブリル長軸方向にもシート面間においてもこれらの残基間で疎水性相互作用による高次の構造安定化が起きていることが考えられ、フィブリルの幅やらせん周期など決める要因でもあると推定される。

M.Saiki, S.Honda, K.Kawasaki, D.Zhou, T.Konakahara, H.Morii : Model of essential structure for Amyloid-Fibrils formation

B163

蛋白質の共有結合的凝集と非共有結合的凝集の過程間相互作用

○今野 卓^{1,2}、森井 孝³、伊倉 宏司⁴ (¹福井医大・生理1、²CREST、³京大・エネルギー理工研、⁴京工繊大・繊維・応用生物)

生体内で生起する蛋白質凝集過程には、共有結合的機序によるものと非共有結合的機序によるものの2種がある。前者の主要例は、transglutaminase (TGase) 群によって触媒される架橋反応である。分子過程としては大きく異なる両機序の持つ共通点として注目すべきは、立体構造を失った変性状態にある蛋白質を凝集過程に引き込む傾向が、いずれにおいても強い点にある。従って、変性蛋白質の処理過程など、ある種の生体内の複合的状況下においては、両機序間の拮抗もしくは協同の存在が想定される。よって、両機序の共存の帰結として如何なるタイプの複合的凝集過程が加速もしくは抑制されるかは、物質科学的及び生物学的観点から、詳細に検討されるべきである。この我々は、前者の観点に立った分子物性的な検討を行うため、アミロイド型・非アミロイド型双方を含む複数の凝集性蛋白質を用い、組織型TGaseによる架橋反応と非共有結合性凝集が共存する試験管内実験系を構築し、そこで実現される複合的凝集過程を、詳細に解析した。

T. Konno, T. Morii, K. Ikura : Interaction between covalent and non-covalent protein aggregation processes

B162

ウシ・ β ラクトグロブリンアミロイド線維形成における非天然 α ヘリックス領域の役割

○浜田 大三¹、柳原 格¹、田中 俊樹²、田中 祥悟²、田中 直毅³、高木 昌宏⁴、白木 賢太郎⁴ (¹大阪府母子センター・免疫、²名工大・物質工学、³京工繊大・繊維、⁴北陸先端大・材料科学)

【序】アミロイド線維形成は通常、老化現象とリンクした病気の原因と考えられている。一方、多くの病気との関係が報告されていない蛋白質でアミロイド線維が形成されることが、分かってきた。つまり、すべてのポリペプチド、蛋白質がアミロイド線維形成能を有することが示唆される。

このようなアミロイド線維を形成するモデル蛋白質の一つとして、我々はウシ・ β ラクトグロブリンを用いて研究を行ってきた。通常、特定のアミノ酸領域が、アミロイド線維核の中核となると考えられている。そのような領域について検討するため、今回、我々は、 β ラクトグロブリンの折れたたみ反応初期に形成される非天然の α ヘリックス構造を占めるアミノ酸領域に相当するペプチドを合成し、そのアミロイド線維形成における役割について調べた。

【結果】上記ペプチドを5 M尿素, pH7, 37℃で保温した。アミロイド線維形成について、チオフラビンT蛍光、フーリエ変換赤外分光法、透過型電子顕微鏡、及び原子間力顕微鏡などにより調べたところ、保温10-20日後に線維の存在が確認された。また、同ペプチドにより出来たアミロイド線維を核として β ラクトグロブリン溶液に添加するとアミロイド形成反応が促進された。

【考察】今回の実験でAストランド領域が、アミロイド線維構造核の少なくとも一部を占めることが示唆された。天然状態においてこの領域は比較的揺らぎの大きな疎水コア領域に属する。今回の結果から、このような物理化学的性質が、蛋白質アミロイド線維形成を促進する要因となることが示唆される。

D. Hamada, I. Yanagihara, T. Tanaka, S. Tanaka, N. Tanaka, M. Takagi and K. Shiraki : Role of nonnative alpha helical sequence for the formation of beta-lactoglobulin

B164

構造安定性から見たアミロイド線維構造の多様性

○岡本 梓¹、成本 武弘¹、茶谷 絵理¹、星野 大¹、長谷川 一浩²、内木 宏延^{2,3}、後藤 祐児^{1,3} (¹阪大・蛋白研、²福井医大・第二病理、³CREST/JST)

【目的】 β 2ミクログロブリンは本来MHCクラスIの成分として機能する蛋白質であるが、長期血液透析患者においてはしばしばアミロイド線維を形成し、透析アミロイドーシスと呼ばれる病気を引き起こす。このアミロイド線維の形成は試験管内において効率よく再現することができ、さらに塩濃度に依存して形状の異なる線維を形成することが明らかになっている。しかしながらこれらのアミロイド線維がどのような機構で形成、安定化されているのかは明らかにされていない。そこで本研究では異なる条件下で形成されるアミロイド線維についてその安定性に注目し、解析を行なった。【結果と考察】pH2.5の酸性条件において100mMと400mMの異なる塩化カリウム濃度条件下でアミロイド線維形成反応を行なった。その結果、低塩濃度下ではモノマー蛋白質のみでは線維形成反応は起こらないが、線維の超音波破砕液(種)を添加することで核依存的に重合し、幅約15nmの直線状の典型的なアミロイド線維を形成した。一方、高塩濃度下では種を加えることなしに自発的に重合し、より細い(幅約2nm)フレキシブルなフィラメント状の線維が得られた。これらは形状だけでなくチオフラビンTの蛍光値やCDスペクトルも異なることを確認した。これらのアミロイド線維を塩酸グアニジン変性させCDスペクトル、チオフラビンTの蛍光を用いて解析したところ、転移曲線は多くの球状蛋白質の変性反応と同様に協同的に進行し、シグモイド状の形状を示すことが明らかになった。さらに見かけの変性の中点は二つの線維で大きく異なっており、フィラメント状の線維の方がより低濃度で変性することがわかった。このことから直線状の線維に比べてフィラメント状の線維は不安定であり、異なる条件で形成させたアミロイド線維は形状だけでなく安定性についても異なることが明らかになった。

A.Okamoto, T.Narimoto, E.Chatani, M.Hoshino, K.Hasegawa, H.Naiki, Y.Goto : Various stability of amyloid fibrils formed under different conditions