1P061

高圧蛍光法を用いた amyloid 様繊維の解離プロセス

○Abdul Raziq Abdul Latif¹、橘 秀樹²、赤坂 一之¹ (¹ 近大・生物理工、² 神戸大)

ABSTRACT Protein aggregate yields the amyloid fiber that leads to amyloidosis diseases, such as Alzheimer's, prion and tumor, the mechanism of the dissociation of these fibrils still immature. Here, we have examined amyloid-like fibrils at a concentration of 2.097 μ M (30 μ g/ml) formed from a naturally unfolded protein, the genetically engineered disulfide-deficient variant (OSS) incubated for approximately ten months. Using high hydrostatic pressure fluorescence measurements, we analyzed the kinetic parameters of the dissociation of the amyloid-like fibrils into a monomers in the pressure range 30-4000 bars at 25 $^{\circ}$ C as shown by the spectral shift of the intrinsic fluorescence. The dissociation process was monitored by the substantial change in activation volume (dV^*) of -50.566 ± 1.60 ml mol⁻¹. The dissociation rate constant at 30 bar was $k = 2.33 \times 10^{-3}$ min⁻¹ and under approximately 4 kbars was increased (~ 15 times) to $k = 3.54 \times 10^{-2}$ min⁻¹. The decrease in the fluorescence intensity in the direction of the red shift with time and the concomitant increase of the emission wavelength from 340.0nm to 348.0nm show that some tryptophan residues become more buried in the fibril state than in the monomeric state. Reference Niraula et al. PNAS 101, 4089-4093(2004)

A.Abdul Latif,H.Tachibana and K.Akasaka : Dissociation processes of amyloid-like fibrils studied by high pressure fluorescence technique

1P063

Protein disulfide isomerase によるインシュリンのジスルフィド結合の還元反応と凝集体形成反応の速度論的相関

○前田 良輔¹、竹田 直弘¹、阿度 和克¹、堀部 智久³、菊池 正和²、谷口 吉弘¹ (¹ 立命館大・理工、² 立命館大・情報理工、³ La Trobe Univ.)

タンパク質の凝集体形成機構の解明は、生命科学において極めて重要な課題である。特に Alzheimer 病, BSE, プリオン病のようなタンパク質のコンフォメーション病は、タンパク質の異常な凝集が主な病因であるとされている。そのため、タンパク質の凝集体の形成挙動や生成した凝集体の分子論的な検討は、上述した病因解明の点からも意義深い。これまで、タンパク質の凝集機構に関する研究では主に熱、圧力、pH、変性剤、有機溶媒などのストレスをタンパク質に与えることで、タンパク質を変性させて凝集体を形成した。本研究ではタンパク質内のジスルフィド結合(S-S結合)に関する酸化・還元・異性化を触媒する酵素である protein disulfide isomerase (PDI) によるインシュリンのS-S結合の還元反応に伴って生じる凝集体に着目し、その還元反応と凝集体形成反応間の速度論的な相関について検討した。PDIは牛肝臓から精製し、還元反応は還元型グルタチオンの存在下で、NADPHを補酵素とするグルタチオンレダクターゼと共役させて行った(リン酸緩衝液, pH 7.5)。還元反応の追跡は、紫外可視分光光度計を用いNADPHの酸化に伴う340 nmにおける吸光度の減少によって行い、凝集体の形成挙動は500 nmにおける濁度の上昇を観測した。PDIによるインシュリンのS-S結合の還元反応は、その初期段階では340 nmにおけるNADPHの単調減少が観察され、その後500 nmにおける濁度の上昇が現われ、凝集体はシグモイド曲線を示しながら生成した。これらの反応は温度やPDIおよびインシュリン濃度に依存し、興味深い相関を示した。また、得られた凝集体の2次構造特性やアミロイド線維化の可能性についても議論する予定である。

R. Maeda, N. Takeda, K. Ado, T. Horibe, M. Kikuchi, and Y. Taniguchi : Kinetic correlation between insulin reduction and its aggregation induced by protein disulfide isomerase

1P062

アミロイド β タンパク質-GM1 ガングリオシド間相互作用の可視化

○若林 真樹、松崎 勝巳(京大院・薬学研究科)

アルツハイマー病の発症にはアミロイド β タンパク質(A β)の神経細胞への凝集が大きく関与していると考えられており、当研究室ではガングリオシドクラスターを介したA β の凝集モデルを提唱している[1,2]。GM1 ガングリオシド(GM1)は神経系の細胞膜に豊富に存在している糖脂質であり、脂質ラフトと呼ばれるスフィンゴミエリン・コレステロールが豊富なドメイン中で、コレステロール濃度依存的にクラスターを形成する。可溶性のA β はこのガングリオシドクラスターに結合することで、 β シートに富むコンフォメーションへと変化する。そしてこの結合型A β が核(seed)となってA β の凝集が促進されると考えている。本研究では神経細胞モデルであるPC12を用いて細胞膜表面でのGM1とA β の相互作用の可視化を試みた。A β (1-40)のN末端にfluoresceinを結合させたfluorescein-A β (F-A β)とPC12をインキュベート後、GM1特異的に結合するcholera toxin B subunitのAlexa flour 647 conjugates (CTX-B-AF647)でGM1をラベルすることにより、PC12の細胞膜表面上でのGM1とA β の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。F-A β の蛍光はCTX-B-AF647の蛍光が強く観察される領域でのみ観察され、膜表面のGM1-richな領域にA β が局在していることが示唆された。また、F-A β の結合量は時間、濃度依存的に大きくなり、A β の凝集による細胞死を示唆するような細胞全体に広がるF-A β の蛍光も数多く観察された。[1]Kakio et al. Biochemistry. 41, 7385-90. (2002) [2]Kakio et al. J.Biol.Chem. 276, 24985-90.(2001)

M.Wakabayashi, K.Matsuzaki : Visualization of the interaction between amyloid-beta-protein and GM1-ganglioside.

1P064

PDIの構造とそのインシュリン還元反応に及ぼす温度効果

○阿度 和克¹、前田 良輔¹、堀部 智久³、菊池 正和²、竹田 直弘¹、谷口 吉弘¹ (¹ 立命館大・理工、² 立命館大・情報理工、³ La Trobe Univ.)

Protein disulfide isomerase (PDI) は、基質タンパク質のチオールジスルフィド間の酸化、還元、異性化反応を触媒し、タンパク質の立体構造形成を促進する。また、変性タンパク質やミスフォールディングしたタンパク質の凝集を抑制するシャペロン活性も有する多機能タンパク質である。これまでPDIの研究は、主に生化学的な機能を中心に研究が進められてきた。近年、NMR法による溶液中のPDIの立体構造に関する研究により、ドメイン構造が明らかにされた。一方、PDIの構造と機能の両面から温度および圧力効果を研究した報告はなされていない。本研究では、基質タンパク質にインシュリンを用いて、PDIによるインシュリン分子内のジスルフィド結合の還元反応ならびにPDIの構造に及ぼす温度効果を検討した。その結果、45 $^{\circ}$ C付近で活性が最大になり、65 $^{\circ}$ Cではほぼ失活することが明らかとなった。また、活性に及ぼす温度効果から活性化エネルギーは、63.5 kJ/mol、頻度因子は、 4.65×10^6 s⁻¹となった。さらにPDIの二次及び三次構造に及ぼす温度効果について、CDスペクトル、蛍光スペクトルを用い、熱変性曲線を作成した。その結果、CDスペクトルから30 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C付近でPDIの α -ヘリックスのわずかな減少が見られ、小さな構造変化があることが示唆され、65 $^{\circ}$ C以上でスペクトルが変化しない状態に至った。一方、蛍光スペクトルでは、CDスペクトルで観測された30 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C付近のわずかな構造変化は見られず、熱変性は2状態転移を示し、70 $^{\circ}$ C以上ではほぼスペクトルは変化しなくなった。活性は45 $^{\circ}$ Cまでは増加傾向にあり、45 $^{\circ}$ C以上の温度で引き起こる二次構造の大幅な減少と三次構造の崩壊によって、PDIの活性が大きく低下することが確認された。

K.Ado, R.Maeda, T.Horibe, M.Kikuchi, N.Takeda and Y.Taniguchi : Temperature effects on the structure of PDI and reduction rate of insulin by PDI