1P009

カルシウム結合におけるS100B蛋白質ペプチド骨格部の溶媒へのアクセシビリティの変化

○村山 幸市¹、松田 禎行² (¹岐阜大院・医・分子生理、²北教大・旭川・地域環境教育)

S100B蛋白質は、カルシウム結合性蛋白質であり、脳中や神経細胞中に多く存在する。その立体構造は、2つの単量体が2回回転軸により繰り返された2量体の構造を持つ。各単量体にはそれぞれ、C末端側に通常の12残基からなるEFハンドと、N末端側に14残基からなるS100ハンドの2種類のカルシウム結合部位が存在し、シグナル伝達を行っている。またS100B蛋白質がカルシウムとの相互作用により、その立体構造を変化させることは良く知られている。今回、我々はS100B蛋白質とカルシウム結合について赤外分光法により詳細に検討した。赤外分光法は、蛋白質の二次構造に非常に敏感であるため、蛋白質の構造変化の研究に広く利用されている。通常赤外分光法による蛋白質の研究は、目的の蛋白質の重水素交換を行い、アミドI'領域を用いて調べられている。今回我々は、アミドII領域についても更に検討した。その結果、S100Bはカルシウム結合に伴いアミドI'とアミドII'の強度比が大きく変化することが分かった。これはカルシウム結合に伴いS100B蛋白質のペプチド骨格部が溶媒へのアクセシビリティを増すためと考えられる。本発表では、カルボキシル基のイオン結合状態との関連についても詳細に検討し報告する。

K.Murayama and S.Matsuda : Accessibility of solvent to peptide backbone of S100B on calcium binding

1P011

サルモネラ菌べん毛繊維のラマン光学活性スペクトルによる解析

○内山 具典¹、園山 正史²、濱田 嘉昭³、大澤 研二¹ (¹ 群大・院工・ナノ材料、² 名大・院工・応用物理、³ 放送大)

バクテリアのべん毛繊維はフラジェリンが重合してできており、左巻きらせん形をとる正常型と変異体から作られる直線形などがある。直線形には繊維構造を作る素繊維の傾きからL型とR型があり、それぞれL型とR型の変異体フラジェリンが重合している。らせん形のべん毛はL型とR型の素繊維の割合によって様々な形をとり、正常型を含む左巻きや右巻きのピッチの異なるものがある。本研究ではべん毛繊維構造の構築や多型変換に関与するフラジェリンの構造変化を解析するために、直線形とらせん形のべん毛繊維のラマンおよびラマン光学活性(ROA)スペクトルの測定を行った。

ラマンスペクトル測定はタンパク質分子の局所的な構造を示す情報を、左右円偏光のラマン散乱光強度の差を検出するROAスペクトルはタンパク質分子間あるいは分子内セグメント間の相対的な位置関係や相互作用を反映する情報を示し、特にべん毛については周期性を持つ分子運動の有無を検出できると期待される。

フラジェリン単量体と繊維状態の重合体を測定した結果、どの試料もラマンスペクトルはほぼ同じなのに、ROAスペクトルは重合体の中でもL型直線形べん毛にのみ強いピークを示した。これらの結果よりL型直線形べん毛はある周期性に由来する特異な光学活性を示す構造をとると考えられる。しかし、L型とR型のフラジェリンを共重合させた繊維、L型直線形べん毛繊維を切断した試料、左巻きらせんでピッチの長い試料を測定した結果、L型直線形でなく、ある程度の長さを持った繊維からしか強いピークは検出されなかった。これらのことから、強いROAスペクトルはフラジェリン分子配列の方向性や繊維の長軸に沿った周期構造が関係すると考えられる。

T.Uchiyama, M.Sonoyama, Y.Hamada, K.Oosawa : Analysis of *Salmonella* Flagellar Filaments with Raman Optical Activity Spectra

1P010

CD、AFM、蛍光分光測定によるHuPrP^C(23-231)のオリゴマー構造の特性○佐々木 健¹、ジョティ ガイクワッド¹、赤坂 一之¹、北本 祥²、橋口 周平²、杉村 和久² (¹ 近大院・生物理工学研究科・生物工学専攻、² 鹿児島大院・工学部・生体工学科)

Monomer to oligomer transition is a key to understanding the molecular mechanism of the transformation of PrP^C to PrP^{Sc}. Recently, the method of preparation of b-sheet-rich forms of PrP^C has been reported for both intact and reduced Human Prion Protein HuPrP^C (90-231) [1,2]. In the present work, we have similarly prepared the b-rich forms of HuPrP^C (23-231) with and without the reduced disulfide bond and tried to characterize their structures and stability by using CD, fluorescence and Atomic Force Microscopy. The CD spectra clearly showed that the original alpha-rich structure of HuPrP^C (23-231) had turned into a beta-rich structure. The AFM images showed many globular shaped spots, which suggested the formation of oligomeric HuPrP^C (23-231) without forming fibrils. The solution containing the oligomeric HuPrP^C (23-231) showed strong fluorescence from eight Trp residues, which upon dilution, sharply decreased with time. After the dilution, the globular shaped spots in AFM have disappeared, suggesting the dissociation of the oligomers into monomeric species.

[1] Reversible Conversion of Monomeric Human Prion Protein Between Native and Fibrilogenic Conformations, G. S. Jackson, L. L. P. Hosszu, A. Power, A. F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C. J. Craven, J. P. Waltho, A. R. Clarke, and J. Collinge, Science 283: 1935-1937. 1999[2] Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid, I.V. Baskakov, G. Legname, M.A. Baldwin, S.B. Pruciner, F.E. Cohen, J. Biol. Chem. 277: 21140-21148, 2002

K. Sasaki, J. Gaikwad, K. Akasaka, S.Kitamoto, S.Hashiguchi and K.Sugimura : Characterization of oligomeric forms of human Prion Protein HuPrP^C(23-231) by CD, AFM, and Fluorescence spectroscopy.

1P012

赤外分光法を用いたβ2-ミクログロブリンフラグメントのアミロイド線維構造のpH依存性

○呂 明¹、平松 弘嗣²、後藤 祐児³、北川 禎三^{1,2} (¹ 総研大、² 岡崎統合バイオ、³ 阪大蛋白研)

In the formation of amyloid fibril formation balancing between the main chain and side chain interactions are considered to play an essential role. pH dependence of fibrilization efficiency of b2-Microglobulin (b2m), maximum at pH 2.5, should be related to side chain interactions, so that it is interesting to examine a scheme of this point. For this purpose, pH dependence of fibrilization of the interacting segments of b2m fibril (proposed in our previous study) has been examined by IR spectroscopy. Three fragments (#21-31, #32-41 and #20-41(K3)) have been chosen as samples. K3 includes three kinds of interaction, aromatic, hydrophilic and electrostatic; #21-31 has only the former two whereas #32-41 has the latter two. Experiments are done under two conditions (pH 6.0 and 2.5). Secondary structure contents are estimated from fitting-analysis on amide I band of IR absorption spectrum of fibrils, and location of secondary structure on the primary sequence has been determined by 13C- isotope labeled samples. The b- sheet content of fibril at pH 6.0 and 2.5 are 14.6 and 15.5 for K3 and 7.0 and 7.5 for #21-31, respectively. The #32-41 did not form a fibril. These results are successfully explained in terms of the side chain effect, i.e. the stability of aromatic interaction and pH dependence of electrostatic interaction. The former is important as the first step of fibrilization because the fibrilization (b- sheet formation) property of #32-41 fragment appears extremely low.

M. Lu, H. Hiramatsu, Y. Goto and T. Kitagawa : pH dependence of amyloid fibril structures of b2-microglobulin fragment peptides investigated by IR spectroscopy