1P077

Separate peptide regions are structured in fibrils of hen lysozyme disulfide-deficient variant

○橘 秀樹¹、木村 雅也²、瀧沢 岳¹、瀬川 新一² (¹神戸大・理、²関西学院大・理工)

Amyloid-like protofibrils are spontaneously formed from hen lysozyme disulfide-deficient variant protein OSS. High-pressure NMR study has suggested that several hydrophobic residues are involved in the fibrillation process of OSS [Niraula, Konno, Li, Yamada, Akasaka & Tachibana (2004) PNAS 101,4089]. Here, to determine the peptide regions structured in the fibrils we have carried out NMR-detected hydrogen-exchange measurements which are strategically similar to those introduced by Goto group a few years ago. 15 N-labeled OSS protofibrils formed in 20 mM sodium acetate, pH 4.0, 30 mM NaCl at 25 deg.C were precipitated by ultracentrifuge, suspended in deuterated 20 mM sodium acetate, pD* 4.0, 30 mM NaCl, in D₂O, and HD-exchanged for various times at either 4 or 25 deg.C. HSQC spectra were taken in 95 % DMSO, 5 % D₂O, pD* 5.5, and residue-wise protection was evaluated from the temporal decrease in the amount of individual unexchanged amides. Protections were primarily found in four peptide regions: W28-S36, G54-S60, N106-W111, and V120-R128. In the native structure of WT lysozyme, these regions nearly correspond to B-helix, beta2-beta3 strands, D-helix, and C-terminal 3-10 helix, respectively. The fractional amount of structured region, 26-30 %, is comparable to that of the increase in beta-structure on fibrillation estimated by CD spectroscopy, which suggests that these peptide regions adopt beta-structure in the fibrillar state.

H.Tachibana, M.Kimura, T.Takizawa and S.Segawa : Separate peptide regions are structured in fibrils of hen lysozyme disulfide-deficient variant

1P079

βラクトグロブリンのアミロイド線維形成機構とフォールディング反応の関係

○浜田 大三¹、田中 直毅²、田中 俊樹³、柳原 格^{1,4}、Pawar Amol⁴、Vendruscolo Michele⁴、Dobson Christopher⁴ (¹大阪府母子センター・免疫、²京都工繊・繊維・高分子、³名工大・おもひ領域、⁴Dept Chem, Univ. Cambridge)

【序】一般的に生合成される蛋白質はそのアミノ酸配列に特異的な立体構造へと折れたたまることでその機能を発揮する。しかしながら蛋白質は不活性な凝集体をしばしば形成する。生体内で形成されるアミロイド凝集体は様々な病気と関連する。一方、病気とは関係ない蛋白質でも適当な条件下を選ぶことでアミロイド線維を形成する。

【目的】本研究の目的は非病原性アミロイド線維を形成するβラクトグロブリンをモデルとし、そのアミロイド線維形成機構と折れたたみ反応機構との相関性について明らかにすることである。

【結果】蛋白質加水分解酵素、化学修飾法を用いてアミロイド構造の解析を行った。その結果、加水分解耐性を示す領域はAストランド、C末端αヘリックス領域に相当するのに対し、化学修飾耐性部位はG,H,Iストランド領域にあることがわかった。これらの領域に相当するペプチドのいくつかはアミロイド線維を形成したが、Aストランドで作られたアミロイド線維のみが、蛋白質全長の線維形成を促進した。

【結論】Aストランド領域はβラクトグロブリンの折れたたみ中間体において、非天然αヘリックス構造を形成するが、G-Hストランド周辺で天然構造に似た立体構造が形成されている。アミロイド線維形成反応は中間状態を安定化する溶媒条件下で起きることから、Aストランド周辺の溶媒露出がアミロイド線維形成の引きがねになると示唆される。アミノ酸配列からはG,H,Iストランド周辺が高いアミロイド形成能を持つと予想されるが、生体内条件では、同時に周辺のS-S結合等により天然構造に近い構造が安定化されるため、アミロイド線維形成が抑制されていると考えられる。

D. Hamada, N. Tanaka, T. Tanaka, I. Yanagihara, A. Pawar, M. Vendruscolo and C. Dobson : Mechanism of amyloid formation by beta-lactoglobulin and its relationship with its folding process

1P078

天然蛋白質のアミノ酸配列に見るフォールディング中間体の不安定化機構

○磯貝 泰弘 (理研・城生体金属科学研究室)

ミオグロブリンのアポ体は、これまで多くのフォールディング実験に用いられており、よくキャラクタライズされている反応中間体を経由してネイティブ状態に折りたたまれる。本研究では、天然蛋白質のアミノ酸配列とフォールディング特性の関係を調べるために、マッコウジラミオグロブリンの疎水性コア変異体を作成し、塩酸グアニジンを用いて変性実験を行った。全てのIleをLeu、全てのIleとValをLeuに置換した2つの変異体は、野生型に比べて、どちらの中間体も安定化する一方、ネイティブ状態が不安定化した。したがって、疎水性アミノ酸の組成は、ミオグロブリンのフォールディング特性を決めるのに重要である。そこで、フォールディング特性に対する各疎水性残基のアミノ酸配列中での部位特異性を調べるために、全18残基のLeu、9残基のIle、8残基のValのサイトの内、それぞれ4つのサイト(計12部位)を選び、ミックスコドンを用いて、等確率でそれらのアミノ酸を入れ替えた。セレクションすることなく得られた4つの変異体は、ほぼ同様な変性曲線を示し、中間体とネイティブ状態の両方が安定化した。これらの安定化は、コアを構成するアミノ酸側鎖の構造エントロピー増大に起因すると考えられる(Isogai et al., Protein Eng. 15, 555-560, 2002)。今回得られた結果は、天然のアミノ酸配列がフォールディング中間体を不安定化するように選ばれており、それによって協同的な折りたたみ反応を実現していることを示す。中間体の形成は、大きな球状蛋白質が正しく折りたたまれるのに不可欠なステップであるが、過度に安定な中間体は、細胞内でミスフォールドした分子重合体の形成を促進する。従って、中間体の不安定化は、分子進化の淘汰圧となり得る。

Y. Isogai : Native protein sequences are designed to destabilize their folding intermediates

1P080

ニガウリトリプシンインヒビター変性中間体の部位特異的コンフォメーション変化

○松本 周三¹、高橋 大輔¹、西本 悦子¹、木村 誠²、山下 昭二¹ (¹九大院・農・植資科、²九大院・農・生機科)

タンパク質はその変性/巻き戻りの過程でMG、あるいはPre-MG状態など幾つかの中間状態が存在することが知られている。これら中間状態におけるタンパク質の構造、分子動力学特性、生理学的役割を明らかにすることは、タンパク質の立体構造の構築原理を理解する上で、また、タンパク質のミスフォールディングに起因する疾病を克服するために不可欠な情報を提供することになる。我々は、これまでニガウリ種子から得られる、アミノ酸残基数68のトリプシンインヒビター(BGTI)を用い、立体構造上異なる部位に存在する2個のTrp残基の蛍光スペクトル、蛍光消光、蛍光偏光解消、DAS (Decay Associated Spectrum)の特性を調べ、BGTIがその変性中間状態において部位特異的なコンフォメーション変化を示すことを明らかにしてきた。特にBGTIは立体構造の形成や安定化の要因である変性中間状態、MG状態を取る。その際にトリプシンとの結合に関与するループの近傍で、より稼動的なゆるい構造を示したのに対し、フォールド状態で比較的密な構造をもつα-helix付近では、一時的により密な構造を示した。変性中間状態でのコンフォメーションの二相性を示すこれらの知見は、現在知られている中間状態とは相容れない。このため、今回はBGTIの各部位の変化をさらに詳細に検証した。Trp残基(Trp9およびTrp54)をそれぞれ個別にPheに置換したBGTI-W9F、W54Fを調製し、Trp9、Trp54近傍のBGTI内でのペプチド要素間相互作用、タンパク質内運動運動、タンパク質表面での水和の状態をサブピコ秒レーザー励起時間分割蛍光法により解析した。これらの結果に基づき、グアニジン塩酸塩によるBGTIの変性/巻き戻り中間状態の部位特異的構造変化について議論する。

S.Matsumoto, D.Takahashi, E.Nishimoto, M.Kimura and S.Yamashita : Site-specific conformational changes during unfolding/folding of BGTI