2P041

固体 NMR によるグルカゴンのアミロイド様線維形成機構の解明

○藤田 英樹¹、西村 勝之²、内藤 晶² (¹ 横浜国大・院工、² 横浜国大・工学研究院)

グルカゴンはペプチドホルモンであり、膵臓のランゲルハンス島から分泌され、肝臓でグリコーゲンの分解を促し、血糖値を高める働きをする。また、グルカゴンはアミロイド様の線維形成をすることが分かっている。中性条件では不溶であるが酸性条件で可溶でありアミロイド様線維を形成する。本研究では、グルカゴンのアミロイド様線維形成速度および線維構造を固体 NMR を用いて解析し、アミロイド様線維形成の分子機構の解明を目的とした。グルカゴンは固相法により合成し逆相 HPLC により精製した。[1-¹³C]Gly⁴, [3-¹³C]Ala¹⁹, [1-¹³C]Leu¹⁴ グルカゴンを酢酸水溶液 (pH 3.3) に溶解させ 10 mg/ml の濃度に調整した。グルカゴンの Gly⁴、Ala¹⁹ 部位の信号を DD-MAS、CP-MAS で測定し Ala¹⁹ の信号強度を時間に対してプロットしたところ、線維形成は 1. 平衡反応でモノマーからミセルを形成する反応、に引き続く速段階の 2. 核形成 3. 線維成長が起こる二段階反応モデルを考えた。この反応モデルを用いてグルカゴンの Gly⁴ のカルボニル炭素と Ala¹⁹ メチル炭素のアミロイド様線維形成における反応速度解析を行った結果、核形成反応では 10^{-8} (s⁻¹)、線維成長反応では 10^{-5} (s⁻¹M⁻¹) の速度定数が得られ、核形成反応が線維成長反応に比べ非常に速い反応であることが分かった。Leu¹⁴ 部位の信号は Gly⁴ や Ala¹⁹ に比べて信号強度が弱く、ランダムコイルで柔らかい構造を持つことが分かった。この結果から全体的な線維構造として両末端が β-シート構造中央部位がシートとシートをつなぐグループであることが示唆された。また本研究では臨界ミセル濃度を仮定してモデルを形成したが、Gly⁴、Ala¹⁹ 部位においてミセルの信号が観測された可能性が認められたので二段階反応機構を支持する結果となった。

H.Fujita, K.Nishimura, A.Naito : Analysis of amyloid fibril formation in glucagon as studied by solid state NMR

2P043

Protein interactions among neck proteins, gp13/gp14, and the connector protein, gp15, of bacteriophage T4

○Akhter Tahmina、金丸 周司、有坂 文雄 (東工大院・生命理工・生物プロセス)

After DNA is packaged into the head, a neck is formed at the portal vertex to be ready for tail attachment. Gp13 and gp14 constitute the neck part of the head. On the other hand, tail assembly is completed by the association of gp3 and gp15. Gp3 is considered to stop the tube polymerization and gp15 forms a connector on top of the tail which binds to the head. Gp15, when overexpressed, forms a hexamer with a ring structure*).

Last year, we reported that gp13 was successfully cloned and overexpressed in a soluble form. The results of analytical ultracentrifugation indicated that it is a monomer in solution. When gene 13 was co-expressed with gene 14, gp13 was co-eluted with gp14 in a void volume of gel filtration, indicating that they associate into a large soluble aggregates. Analytical ultracentrifugation (AUC) also indicated inhomogeneous oligomers with the major species of 16.5 S. It was also shown that gp15 and gp13 do not interact.

This time, we have cloned gene 14 separately from gene 13. After trials of various cultivation conditions, gene 14 was successfully expressed in a soluble form. Purification of gp14 was performed through several steps of chromatographies. The result of gel filtration indicated that it is most likely a dimer. Further characterization of the oligomer by AUC is under way.

*) Li Zhao, S. Kanamaru & F. Arisaka J.Bacteriol. 185:1693-1700 (2003)

A. Akhter, S. Kanamaru and F. Arisaka : Protein interactions among neck proteins, gp13/gp14, and the connector protein, gp15, of bacteriophage T4

2P042

固体高分解能 NMR によるヒトカルシトニンペプチド DFNKF のアミロイド様線維構造解析

○大道寺 謙悟¹、藤田 英樹¹、井上 良三²、西村 勝之³、内藤 晶³ (¹ 横浜国大・院工、² 兵庫県立大・院理、³ 横浜国大・工学研究院)

アミノ酸 32 残基のペプチドホルモンであるヒトカルシトニン (hCT) は骨粗鬆症の治療薬として重要な役割を担うが、水溶液中で容易にアミロイド様線維形成をする性質をもつため治療薬として使用することが難しい。本研究では、hCT 分子中央部 5 残基からなる D¹⁵F¹⁶N¹⁷K¹⁸F¹⁹ が線維形成の最小ユニットであることが知られているので、このフラグメントを用いて hCT 線維形成の分子機構線維構造を明らかにすることを目的とした。DFNKF を固相法で合成し、HPLC で精製したペプチドを線維形成試料とした。固体 NMR 分光器を用いてモノマー成分を DD-MAS 法で検出し、線維成分を CP-MAS 法で検出した。¹³C 等方化学シフト値を解析した結果、Phe¹⁶ 近傍において、線維化前はランダムコイル、線維化後は β シートへ構造転移が起こっていることが分かった。本研究で対象とした DFNKF については、線維成分である CP-MAS 信号が一定時間経過して後に成長したことから、二段階自己触媒反応モデルを用いて反応速度定数を解析した。この結果、Wt-hCT に比べて DFNKF フラグメントの線維成長速度定数は 1000 倍遅くなることが判明した。また、酸性条件下ではより線維成長速度が遅くなることも分かった。REDOR 法で得られた原子間距離情報より、形成された hCT DFNKF フラグメント線維は平行 β シート構造を形成していることが分かった。次に Phe による π-π スタッキングの影響を調べるため Phe を Leu に置換した 3 種類のミュータント (DFNKL, DLNKF, DLNKL) について線維形成実験を行った結果、全てのミュータントにおいて線維化は起こらなかった。このことから、線維形成には Phe による π-π スタッキングが大きく関わっていることが分かった。

K.Daidoji, H.Fujita, R.Inoue, K.Nishimura, A.Naito : Structural analysis of amyloid fibril formed in human calcitonin peptide DFNKF as revealed by ¹³C solid-state NMR spectroscopy

2P044

ペプチダーゼ処理により生じるコラーゲン会合体の微細構造と高次構造の変化

○森本 康一¹、國井 沙織²、柴野 三智子³、齋藤 卓也^{1,2} (¹ 近畿大・生物理工・生物工、² 近畿大院・生物理工・生物工、³ 近畿大・医・細菌)

[目的] 生体内に最も多く存在する構造タンパク質であるコラーゲンは、*in vitro* でも自発的に自己会合して規則的な線維を形成することが知られる。しかしながら、コラーゲンの線維形成メカニズムはまだ完全に理解されていない。本研究では、ニワトリ由来 I 型コラーゲンのテロペプチド領域をペプチダーゼにて分解し、得られた産物の会合体の構造を種々の方法で比較・分析した。[方法] ニワトリの皮部から 10% 酢酸水溶液により抽出した酸可溶性 I 型コラーゲンをペプシンで限定加水分解してアテロコラーゲン (A) を、アクチニジンで限定加水分解して AP-コラーゲン (B) を調製した [1]。5% SDS-PAGE とヘパリンとの親和性により、A と B の構成鎖と分子形態を調べた。中性 pH 下での各会合体の微細構造と高次構造を走査型電子顕微鏡 (SEM)、抗コラーゲン抗体を用いた ELISA、コラーゲナーゼ (MMP-1) 分解物の SDS-PAGE により調べた。[結果] A と B の構成鎖は分子内架橋の有無による相違が認められたが、分子構造はともに 3 重らせん構造であった。SEM により、A は典型的な線維構造、B は 3 次元微細網目構造を形成することが観察され、高次構造の著しい変化が示された。ELISA の結果より、抗コラーゲン抗体の A と B 会合体に対する反応性は明らかに違っていた。また、A と B のコラーゲナーゼ分解産物の種類と量は大きく異なり、両会合体の局所的な微細構造の差異が示唆された。現在、これら分解産物の 2 次元電気泳動による配列解析を試みている。以上の結果より、ペプチダーゼ処理コラーゲンの自己会合物は高次構造が大きく変化だけでなく、局所的な微細構造も変化することが明らかになった。[1] Morimoto, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem, 68 (2004).

K.Morimoto, S.Kunii, M.Shibano and T.Saito : Evidence for nanostructural and superstructural differences of peptidase-treated collagen matrices