2P073

アルカリ性領域における熱変性状態からのバクテリオロドプシン再生実験

○杉山 浩之¹、横山 泰範¹、ガンガ D ギミリ²、園山 正史¹、美宅 成樹¹ (¹ 名大院・工・マテリアル理工、² 東京農工大・工・生命工学)

バクテリオロドプシン (bR) はプロトンポンプ機能を果たす上でレチナールの光異性化をスイッチとしている。このレチナールを加水分解し bR から分離することでアポタンパク質であるバクテリオオプシン (bO) が得られる。bO に再び全トランスレチナールを加えるとレチナールは bO と結合し bR が 70 % ほど自発的に再生する。このレチナールの分解と結合のサイクルについてタンパク質側に変化を加えることでその結合や構造変化の様子について調べようと考えた。これまでに中性において 2 つの異なる方法で熱変性状態の bO からの再生実験を行った。第一に bO をある高温の状態にしてインキュベーションした後、急冷し室温でレチナールを加え bR を再生させた。第二に bO を高温まで上げた後、高温のままレチナールを加え再生させた。二つの実験を比較して第二の実験のほうが高温領域の再生率が高くこの差は熱により bO の構造が大きく揺らいでいることが原因ではないかと考えた。そしてカイネティクス測定から求めた速度成分の数や活性化エネルギーの考察から結合の様子や揺らぎについて議論してきた。今回、アルカリ性領域において bO の安定性やレチナールの結合性、そして高温での構造揺らぎはどのようなものであるか調べるためにアルカリ性での再生実験を行った。その結果 pH7 付近でのみ 70% 程度の高い再生率を示すことや、さらに高アルカリ性になると pH10 以上から再生率は減少しはじめた。またアルカリ性での高温の揺らぎの大きさはそれぞれの pH で大きく異なった。アルカリ性での bR の再生率の減少や揺らぎの大きさは構造の変化とどのように関係しているのかを調べたところ二次構造が変化していることがわかりこれが大きく関係していると考えられる。また天然の bR に比べ結合前の bO や結合後の再生 bR はどのように違うのかを考察した。

H.Sugiyama, Y.Yokoyama, G.D.Ghimire, M.Sonoyama and S.Mitaku : Regeneration of Bacteriorhodopsin from thermally unfolded Bacteriorhodopsin at alkaline pH.

2P075

超音波による β_2 -ミクログロブリンのアミロイド線維形成誘導

○大橋 祐美子^{1,2}、木原 美穂¹、内木 宏延²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 福井大・医)

クラス I 主要組織適合性抗原の軽鎖である β_2 -ミクログロブリンは血液透析患者体内で高濃度に蓄積し、透析アミロイドーシスを引き起こす。透析アミロイドーシスとは、長期血液透析患者に高頻度で発症する合併症であり、アミロイド線維化した β_2 -ミクログロブリンが関節部位に沈着し、痛みや屈曲障害を招く。 β_2 -ミクログロブリンのアミロイド線維形成は、試験管内で再現することが可能であり、核形成と伸長の二段階の反応から成る。しかし、第一段階である核形成は非常に起こりにくい反応であり、攪拌等の刺激を必要とする。この研究では、超音波が β_2 -ミクログロブリンの線維形成に及ぼす影響について、酸性条件と低濃度 SDS 存在下の中性条件において調べた。両条件の β_2 -ミクログロブリン溶液に、超音波を断続的にあて続けることにより、ラグタイムの後、速やかな線維形成がチオフラビン T 蛍光を用いて観察できた。ラグタイムは酸性条件で約 1 時間、中性条件 (SDS 存在下) で約 30 時間であり、この間に光散乱や原子間力顕微鏡で確認できるような大きさの凝集体が形成されることはなかった。また、超音波により誘導された線維は、酸性、中性でそれぞれ直径約 3 nm、7 nm と異なるものであった。さらに、線維形成後も続けて超音波をあて続けることで、酸性線維は分断されて粉々になるが、中性線維は線維同士の会合が促進されることが分かった。以上の様な条件による挙動の違いは、線維形成前のモノマー構造の違い、そして総電荷の違いが大きく効いているものと考えられる。

Y. Ohhashi, M. Kihara, H. Naiki, Y. Goto : Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of beta₂-microglobulin

2P074

固体 NMR による β_2 ミクログロブリンのフラグメントが形成するアミロイド線維の構造解析

○岩田 健太郎¹、藤原 敏道¹、松本 陽¹、阿久津 秀雄¹、内木 宏延²、後藤 祐次¹ (¹ 阪大・蛋白研・CREST/JST、² 福井大・医・CREST/JST)

アミロイド線維とは、様々な蛋白質が自己凝集して秩序高い構造を形成した線維状の凝集物である。これらの線維は、多くの病気に関係していると考えられている。しかし、アミロイド線維は不溶性で結晶化しない性質から、その原子レベルでの構造解析は非常に困難であるため、その形成・安定化の機構は未解明である。本研究では、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β_2 ミクログロブリンを限定分解して得られる Ser20-Lys41 (K3) フラグメントが形成するアミロイド線維の構造を固体 NMR で原子レベルの解析することを目的とした。¹³C/¹⁵N で均一標識した K3 フラグメントを 20 % (v/v) TFE 10 mM HCl で線維を形成させ、遠心回収したアミロイド線維を用いて固体 NMR の測定を行った。残基内および残基間の相関スペクトルからピークの帰属を行い、構造の乱れた部分を除いた残基の帰属が完了した。得られた化学シフトの値から、二面角予測プログラム TALOS を用いて線維中での K3 分子の二面角を予測した。結果、K3 は β_2 ミクログロブリンで形成するストランドよりも長い 2 本の β ストランドと、それに挟まれたループ構造をとることが示された。 β シート間のパッキングの情報は固体 NMR のみでは得られないが、原子間力顕微鏡 (AFM) で線維の直径を測定し、X 線線維回折による β シート間の距離情報を得ることにより、K3 の線維は 2 枚の β シートがループによりつながった β strand-loop- β strand モチーフをとることが明らかになった。現在、¹³C 同士の間の距離を測定することによって、更なる構造の精密化を進めている。

K.Iwata, T.Fujiwara, Y.Matsuki, H.Akutsu, H.Naiki, Y.Goto : The Structural Model for the Amyloid Fibril Formed by β_2 -microglobulin Fragment Based on Solid-state NMR

2P076

基板との相互作用が A β (1-40) アミロイド線維形成及び伸長に及ぼす影響

○伴 匠人^{1,2}、森垣 憲一²、内木 宏延^{3,4}、後藤 祐児^{1,4} (¹ 阪大・蛋白研、² 産総研・関西センター、³ 福井大・医、⁴ CREST/JST)

【序】生体内に於ける amyloid β (A β) アミロイド線維形成には、糖質や脂質、他の共存蛋白質との相互作用が関連すると考えられている。一方、*in vitro* に於ける原子間力顕微鏡観察や蛍光顕微鏡観察から、線維の長さや形態、その伸長速度が、サンプルチューブ内で形成した線維と観察基板上で形成した線維とは異なることが知られている。蛍光顕微鏡観察の観察基板として広く使われる石英は、その表面特性を化学修飾により変えることができるので、表面相互作用の及ぼす影響を解析するのに有用である。本研究では、疎水性相互作用と静電相互作用に注目し、これらの相互作用が A β (1-40) アミロイド線維形成及び伸長に与える影響について調べた。

【実験】A β (1-40) モノマーの自発重合反応による線維形成と、seed (アミロイド線維の超音波処理断片) が存在する伸長反応を全反射蛍光顕微鏡と蛍光色素チオフラビン T を用いて観察した。基板表面へのモノマー及び線維の吸着挙動を調べるために、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 測定を行った。

【結果及び考察】疎水性基板やプラス電荷を帯びた基板上では、アミロイド線維形成や伸長が観察されなかった。これに対して、マイナス電荷を帯びた基板上では、修飾に用いた化学種の特性や修飾方法に関わらず、線維の形成や伸長が観察された。直接観察から、A β (1-40) アミロイド線維形成及び伸長は、マイナス電荷を帯びた基板上で促進されることが明らかになった。また QCM 測定より、マイナス電荷を持つ基板上でのモノマー及び線維の粘弾性が、他の基板上よりも低いことが分かった。以上の結果より、モノマー及び seed の基板への吸着の度合いが、アミロイド線維の形成及び伸長に大きく影響を与えることが示唆された。

T.Ban, K.Morigaki, H.Naiki, Y.Goto : Effects of surface interaction on the A β (1-40) amyloid fibril formation and growth