

2P077

一定温度下におけるアポミオグロビンのアミロイド凝集体形成過程

○小泉 将治¹、平井 光博¹、井上 勝晶²、三浦 圭子² (¹ 群大・工、² JASRI)

アルツハイマー病を含むアミロイド疾患は、蛋白質がβシートを介して形成するアミロイド線維が、神経細胞に凝集・沈着し、これらの変化が神経機能障害を引き起こすためと考えられている。また近年、種々の蛋白質がアミロイド線維を形成することが見出されており、アミロイド線維形成機構の解明はアミロイド疾患の治療・予防という医学上のみならず、蛋白質化学上からも非常に重要な問題となっている。しかし、現在このような蛋白質のアミロイド線維への形成過程や形成速度における溶媒及び温度条件などとの関連性が多く議論されているが、アミロイド凝集過程における詳細な構造的な知見は乏しい。

本研究では、アミロイド線維形成のモデル蛋白質として、アポミオグロビン (apoMb) を用いて、X線広角溶液散乱測定を行い、熱構造転移過程におけるapoMbの変性・凝集による、アミロイド線維の形成過程について、蛋白質の分子内構造の変化からアミロイド線維への成長過程に至るまでの観測を行った。前年度の年会では、昇温過程におけるapoMbの熱構造転移によるアミロイド凝集体形成過程のpH依存性に関して報告し、アミロイド凝集におけるcross-β構造及びスタッキング構造の成長が、各pHにおいて55℃付近で現れることを示した。今回これらの実験結果を基に、一定温度下(55℃)で長時間(〜7日間)にわたりインキュベーションを行い、アミロイド凝集体の形成に起因するピークが中・広角領域($q \sim 0.6, \sim 1.3$ (1/Å))に確認できたことから、これらの散乱パターンを領域別に解析し、アミロイドβ蛋白質のアミロイド線維の形成過程についての検討を行った。以上のことから、apoMbの熱構造転移過程におけるアミロイド線維の形成機構及び蛋白質の立体構造変化について報告する。

M.Koizumi, M.Hirai, K.Inoue and K.Miura : Formation process of amyloid aggregates of apomyoglobin under constant temperature.

2P079

スタフィロコッカスクレアーゼの折り畳み過程におけるサブドメイン間相互作用形成の検証

○鬼塚 正義、上久保 裕生、山崎 洋一、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質創成)

スタフィロコッカスクレアーゼ (SNase) はN末端ドメインとC末端ドメインの2つのサブドメインで構成される。現在までに、天然構造を安定化するサブドメイン間の長距離相互作用には、W140を中心としたC末端疎水性クラスターの形成が必須である事を示してきた。しかし、折り畳み過程における長距離相互作用形成段階は明らかにされていない。サブドメイン間の長距離相互作用が折り畳みのどの段階で形成されるかを検証する事は、比較的分子量が大きな蛋白質の折畳み機構を理解する上で重要である。SNaseの内部配列欠損体Δ114-119はドメインスワップした二量体を形成する事が知られている。両サブユニットにおける各サブドメインの相対配置は野生型と一致している。これは分子内でのサブドメイン間相互作用が分子間サブドメイン相互作用へと変化した結果である。ドメイン間の長距離相互作用が折り畳みに重要な役割を担っているとすれば、Δ114-119の巻き戻り過程において非天然構造状態で二量体を形成する中間体が蓄積される事が考えられる。上記の予測を検証する為、以下の実験を行った。

蛍光ストップフローを用いて、Δ114-119の酸変性状態からの巻き戻り過程を観測した。蛋白質濃度は0.025~0.4mg/mLに変化させた。結果、バースト相を含む4つの速度相が観測され、第三成分と第四成分の速度定数は蛋白質濃度に依存的に増加した。 $(k_3 = 2.6 \times 10^{-3} \sim 2.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}, k_4 = 4.0 \times 10^{-4} \sim 5.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$ これは、第三成分以降の反応が、二量体形成に関与する事を示しており、それぞれ $I_{\text{Monomer}} \rightarrow I_{\text{Dimer}} \rightarrow N_{\text{Dimer}}$ の過程に相当すると考えられる。当日はΔ114-119の実験から得られた結果を基に、野生型折り畳みの分子機構を議論する。

M.Onitsuka, H.Kamikubo, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : Implication of the long range interaction formation between the two sub-domains during the folding process of staphylococcal nuclease

2P078

Photoactive Yellow Proteinにおけるアミロイド線維形成

○坂本 亜沙美、山崎 洋一、白井 久美子、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

蛋白質はアミノ酸の一次配列により決定された正しい立体構造にフォールディングして機能を果たしている。ところが、いくつかの蛋白質は誤ったフォールドの結果、様々な疾患の原因となるアミロイド線維を形成する。また、近年、疾患に直接関係した蛋白質だけでなく、種々の蛋白質が条件次第でアミロイド線維を形成することも知られてきている。アミロイド線維形成メカニズムの解明は、疾患の治療・予防という医学上の問題のみならず、蛋白質フォールディングの見地からも重要な問題であるといえる。

本研究では、紅色光合成細菌に存在する光受容蛋白質 Photoactive yellow protein (PYP) を用いて、アミロイド線維の形成能の確認と、アミロイド線維形成の鍵となる初期状態における線維核形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

現在まで、PYPはアミロイド線維の形成を示唆する結果はあったが、明確にはされていなかった。そこで我々はチオフラビン-T蛍光染色、電子顕微鏡、遠紫外CDスペクトルを用いて酸性条件下のPYPがアミロイド線維を形成することを示し、新規のアミロイド蛋白質であることを確認した。これらの結果よりpHや塩濃度が線維形成の立ち上がり速度に影響を及ぼしていることが確認できた。また、形成した線維形状にPYPの特徴である発色団(p-クマル酸)の有無による違いが見られた。発色団を持たない場合のみ、太い束状構造が見られた。このような線維形成の速度、形状の違いは、初期構造の違いが作用している可能性が考えられる。酸性条件下におけるPYPの二次構造含量は、PYPの光反応における活性種であるM中間体に近く、この構造状態が線維形成能を持つものであることが示唆される。本年会では、定常光照射下における線維形成の違いについても議論したい。

A.Sakamoto, Y.Yamazaki, K.Shirai, H.Kamikubo, Y.Imamoto and M.Kataoka : Amyloid fibrils formation of photoactive yellow protein

2P080

Growth and Dissociation of Protofibrils from A Disulfide-Deficient Variant of Hen Lysozyme using AFM and 1H NMR

○河野 良平¹、鎌足 雄司²、橋 秀樹³、赤坂 一之¹ (¹ 近畿大・生物理工、² 岐阜大・人獣感染防御研、³ 神戸大・理)

A genetically engineered disulfide-deficient variant of hen lysozyme (OSS), in which the eight Cys residues are replaced by Ser or Ala, is intrinsically denatured in its monomeric state. The OSS is reported to spontaneously form an amyloid-like fiber under mild acidic conditions with certain ionic strength (Niraura et al, PNAS 101, 4089, 2004). Examination by AFM reveals that the OSS forms protofibrils (Kamatari et al., J. Mol. Biol., in press, 2005). In the present work, we have studied the growth and the size distribution of protofibrils from OSS using atomic force microscopy (AFM). Under a solution condition containing 20mM sodium acetate and 30mM NaCl, pH4.0, the OSS molecules at 5 mg/mL form protofibrils which grows rapidly (within a few hours) up to 150 nm. During this time, CD spectral changes take place from random-coil to beta form. The length distribution of the protofibril approximately follows an exponentially decreasing function of length as theoretically predicted. Pressure-jump real-time 1H NMR was applied to study the kinetic process of association and dissociation of OSS. The experiments show that the formation of the protofibrils is fully reversible under pressure. The profile of the protofibril growth observed by AFM and the kinetic process observed by NMR are consistent with the two growth mechanisms of the protofibrils, i.e., the addition of monomers to the termini of the protofibrils at the early phase of the growth and the end-to-end joining of already grown protofibrils at the later phase of the growth.

R.Kono, Yuji.O.Kamatari, H.Tachibana and K.Akasaka : Growth and Dissociation of Protofibrils from A Disulfide-Deficient Variant of Hen Lysozyme using AFM and 1H NMR