

4C01

ラマン分光法によるインスリンアミロイド線維の天然化過程の解析
(関西学院大学*, 大阪大学**) ○古川達也*, 山本茂樹**, 尾崎幸洋*

Raman Spectroscopy Study on Naturation Process of Insulin Amyloid Fibril
(Kwansei Gakuin University*, Osaka University**)
○Tatsuya Furukawa*, Shigeki Yamamoto**, Yukihiro Ozaki*

【序論】アミロイド線維はタンパク質の天然構造が崩れ、 β シート構造からなる凝集体を形成したものであり、アルツハイマー病やパーキンソン病、狂牛病などに深く関係していると言われている。インスリンは加熱することでアミロイド線維を形成することが知られており、アミロイド線維の良いモデルとして研究されてきた^[1]。しかし、アミロイド線維への変性過程における二次構造は未だ明らかとなっていない。本研究では、ラマン分光法を用いてウシ由来インスリンがアミロイド線維から天然状態へ回復する過程のタンパク質構造変化を調べた。アミド I およびアミド III 振動、さらにチロシン側鎖由来のピークの時間変化から、アミロイド線維の天然化過程における主鎖および側鎖の構造変化の解明を試みた。

【実験方法】インスリンを 0.1 M 塩酸水溶液に溶解させ、天然状態のインスリン水溶液を作製し、そのラマンスペクトルを測定した。

インスリン水溶液をガラスキャピラリーに封入し、湯浴を用いて各温度(55, 60, 70, 80, 90°C)において 20 分加熱した。その直後(湯浴から取り出した後、1 分経ってから測定)を 0 分とし、室温においてラマンスペクトルの測定を行った。また、室温において放置した試料が変性状態から天然状態へ回復する過程を測定した。

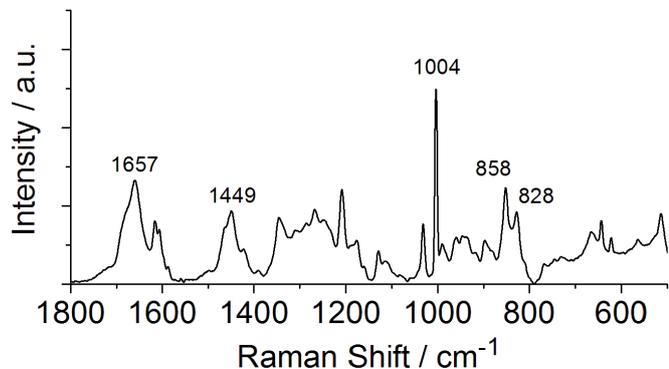


図1 天然状態のインスリンのラマンスペクトル

【結果・考察】天然状態のインスリンのラマンスペクトルを示した(図 1)。1657 cm^{-1} のピークは α ヘリックス構造に特徴的なピークと帰属されており^[2]、天然状態のインスリンの主な二次構造は α ヘリックス構造であるといえる。55°C で加熱変性させたインスリンが天然状態へ変化する際の時間変化ラマンスペクトルを示した(図 2)。加熱直後のアミド I のピーク位置は β シート構造に特徴的なピーク^[2]である 1668 cm^{-1} に観測されたが、室温において 12 時間放置した試料については、 α ヘリックス構造に特徴的なピークである 1657 cm^{-1} に観測された。加熱後に 12 時間放置したインスリン試料は、天然状態に回復したと考えられる。インスリンのア

ミロイド状態から天然状態への構造変化をラマンスペクトルによって観測することが出来た。

加熱直後のインスリンアミロイド線維のアミドIのピーク位置は、加熱温度に依存して変化した(図 3)。55–70°C で加熱したインスリンは 1669 cm⁻¹ 付近に、80°C および 90°C で加熱した場合は 1673 cm⁻¹ 付近とより高波数側にピークが観測された。さらに、55–70°C で加熱し 12 時間放置したインスリンでは、アミドIのピークが加熱前と同じ位置に観測されたのに対し、80°C および 90°C で加熱したインスリンでは 12 時間放置してもピーク位置に変化がみられなかった。80°C および 90°C で加熱したインスリンは 12 時間放置しても天然状態に回復しなかったと考えられる。ランダムコイル構造を主とするタンパク質のアミドIのピークは、βシート構造に特徴的なピークである 1668 cm⁻¹ よりも高波数側に観測される^[2]ことから、80°C および 90°C で加熱したインスリンはアミロイド線維ではなく、ランダムコイル構造に変性したと考えられる。

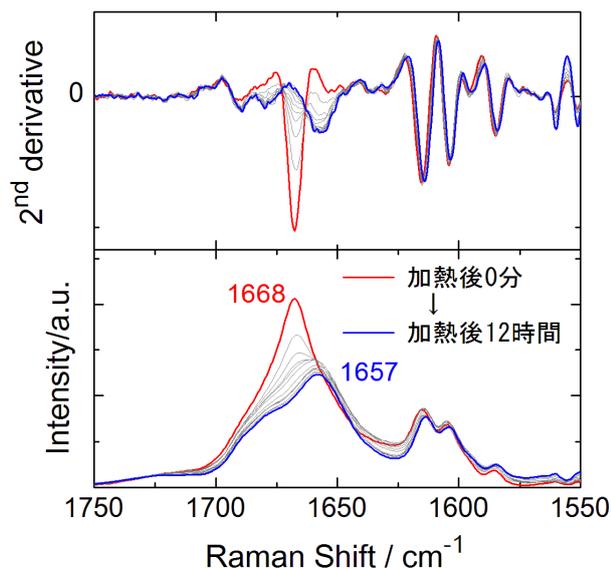


図 2 アミド I 領域の時間変化スペクトル

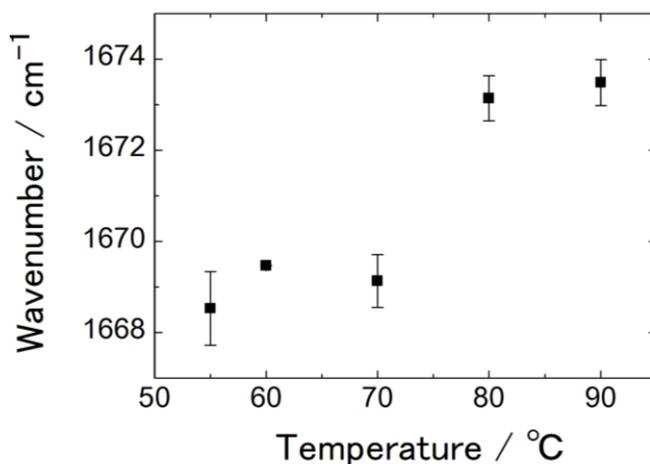


図 3 アミド I のピーク位置における加熱温度依存性

[1]M. Bouchard, J. Zurdo, E.J. Nettleton, C.M. Dobson, C.V. Robinson, *Protein Sci.*, **2000**, 9, 1960-1967.

[2]N.C. Maiti, M.M. Apetri, M.G. Zagorski, P.R. Carey, V.E. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2399-2408.