

2P097

## 時間分解 EPR 法を用いたヒトインスリンの 線維化によるドッキング構造変化の観測

(神戸大院理<sup>1</sup>・分子研<sup>2</sup>)

○安倍知花<sup>1</sup>, 立川貴士<sup>1</sup>, 茶谷絵理<sup>1</sup>, 森俊文<sup>2</sup>, 斉藤真司<sup>2</sup>, 小堀康博<sup>1</sup>

### Time-resolved EPR study on docking structure of human insulin undergoing fibrillation

(Kobe University<sup>1</sup>, Institute for Molecular Science<sup>2</sup>)

○Tomoka Abe<sup>1</sup>, Takashi Tachikawa<sup>1</sup>, Eri Chatani<sup>1</sup>, Toshifumi Mori<sup>2</sup>, Shinji Saito<sup>2</sup>, Yasuhiro Kobori<sup>1</sup>

#### 【序】

アミロイド線維はタンパク質の異常凝集体であり、アルツハイマー病等の原因物質であることが報告されている。この凝集体は複雑な巨大構造体であることから、アミノ酸残基の局所構造や線維形成機構など、未解明な部分が多い。本研究では、アミロイド線維化によるタンパク質の構造変化と電子伝達機能の関係性を明らかにすることを目的として時間分解電子スピン共鳴法(TREPR)による測定を行った。測定ではヒトインスリン(Figure 1b)をモデルタンパク質として用い、このインスリンに結合するリガンドとして、9,10-anthraquinone-1-sulfonate (AQ1S<sup>-</sup>)(Figure 1a)を用いた。リガンド-アミノ酸残基間の光誘起電子移動過程を低温条件下にて観測し、電荷分離状態での立体配置及びその電子的環境を線維化前後で比較することで線維化の影響を調べると共に、分子動力学計算によって詳細な結合位置とドッキング構造の安定性を推定した。

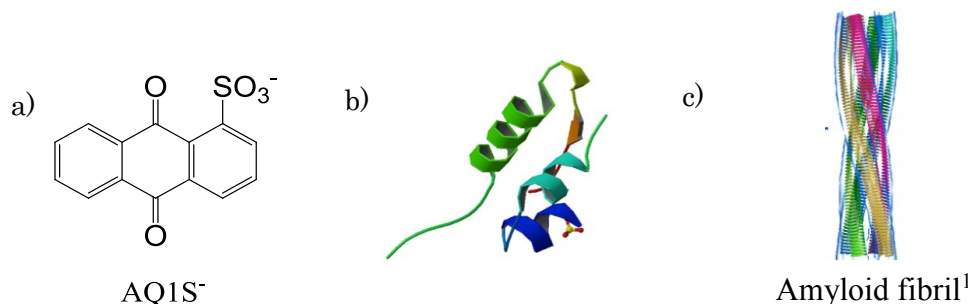


Figure 1. Structures of a) 9,10-Anthraquinone-1-sulfonate(AQ1S<sup>-</sup>), b) Human insulin and c) amyloid fibril

#### 【実験】

時間分解 EPR 計測：最終濃度がそれぞれ、インスリン 0.5 mM, AQ1S<sup>-</sup> 0.5 mM となるように酸性溶液 (25 mM HCl 水溶液 : glycerol = 1:1) に溶解させた後、Freeze-pump-thaw cycle にて冷却脱気を行った。線維化用にはインスリン溶液を 75°C で加熱し、チオフラビン T 蛍光を測定することで線維形成を確認した。時間分解 EPR の測定温度は 100 K とし、励起光源は Nd:YAG laser 第三高調波 (波長 355 nm, パルス幅 5 ns) を用いた。

分子動力学(MD)計算：インスリンの初期構造には X 線構造解析から得られている結晶構造を用いた。(PDBID:1GUJ) AQ1Sは Gaussian03 にて B3LYP/6-31G\*による構造最適化により得た。MD プログラムには Amber を用いた。AQ1Sの部分電荷を決定した後、インスリンとのドッキング構造を作成し、溶媒の影響も考慮してエネルギー最小化計算、加熱平衡化、npt、nvt 計算を行い系のトラジェクトリーを得た。

### 【結果と考察】

Figure 2 にレーザー照射後 800 ns におけるインスリン-AQ1S複合体の TREPR スペクトルを示す。天然状態と線維状態の両者においてマイクロ波の放出を表す全放出(E)型のスペクトルを得た。

これらの信号は g 因子から AQ1S<sup>•-</sup>とインスリン中のチロシン残基間のプロトン共役電子移動反応によって生成したラジカル対 (AQ1S<sup>2•-</sup>-TYR<sup>•</sup>)に同定された。三重項電子スピン分極移動モデル<sup>2</sup>

に基づいたシミュレーション解析結果を赤色で示している。Figure 2 の両スペクトルを比較すると、線維化後は 330 mT~340 mT にわたる線幅の大きな信号が消失し、さらに中心付近のシャープな信号成分の線幅が減少している。この線幅の減少はラジカル対の双極子間相互作用(D)が弱くなっていることを示しており、アミロイド線維化によってラジカル間距離が増加したことが分かる。解析により得られた D 値の値から、天然状態では 1.5 nm 程度のラジカル対間距離が得られ、チロシン残基から AQ1S<sup>•-</sup>へとタンパク質主鎖を介した長距離電子移動反応が起きていると考えられる。線維化が起きるとインスリンの $\alpha$ ヘリックス領域は $\beta$ シート構造へと二次構造が変化するので、この構造変化がラジカル間距離の増大に寄与しているのではないかと考えられる。また交換相互作用の値から、線維化により電子的相互作用も減少することが明らかとなった。

さらに、インスリン天然状態における AQ1S<sup>•-</sup>の結合位置を特定するため MD 計算を実行したところ、ValB18 や LeuB17 の疎水性領域に AQ1S<sup>•-</sup>の芳香環が結合することが示され、上記のタンパク質主鎖を介する長距離電子移動を説明することができた。以上の結果および、NMR 法による測定結果から線維化前後の立体配置とリガンドの結合部位の変化について考察する。

### 【参考文献】

1. J. L. Jimenez et al, *PNAS*. **2002**, 99, 9196-9201
2. Y. Kobori et al, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14621-14630.

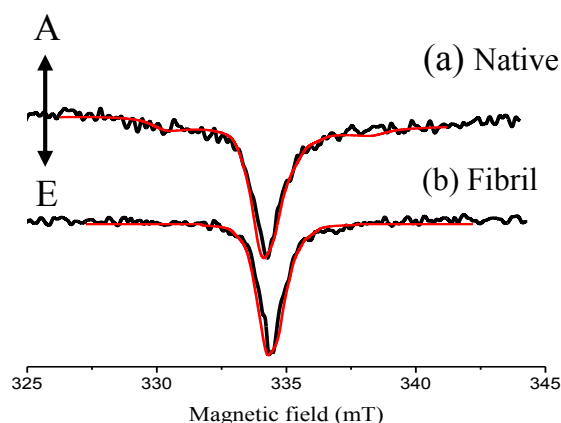


Figure 2. Time-resolved EPR spectra of native insulin-AQ1S<sup>•-</sup> (a) and fibril insulin-AQ1S<sup>•-</sup> at 800 ns after laser irradiation at 100 K.