

## ヒトカルシトニン構成ペプチドを用いたアミロイド形成凝集機構 に対するイオン強度と pH の影響

東京理大・薬

○笠井 崇央, 和田 崇, 阪口 知代, 南 賀子, 島田 洋輔, 後藤 了

### Ionic Strength and pH Influence an Amyloidogenic Mechanism by the Fragment Peptide of Human Calcitonin

○Takahiro Kasai, Takashi Wada, Tomoyo Sakaguchi, Yoshiko Minami,  
Yohsuke Shimada, Satoru Goto  
*Fac. Pharm. Sci., Tokyo Univ Sci.*

**【Abstract】** In recent years, it has been reported that diseases such as Alzheimer's disease, prion disease, and type II diabetes, which are refractory diseases, are caused by aggregation of fibrous proteins. But the aggregation mechanism is not fully understood, even though being well studied. In the previous study, we showed the correlation between aggregation of insulin and lysozyme and two of ionic strength and pH. To verify this generality, we also focused on human calcitonin (hCT) of amyloidogenic protein. It has also been reported that a part of the amino acid segment of hCT which is a peptide hormone, DFNKF segment is involved in amyloid aggregation. In this study, we analyzed the aggregation behaviors of DFNKF from the influence of ionic strength and pH and aimed to elucidate the aggregation mechanism.

#### 【背景・目的】

アミロイドはタンパク質の自己組織的な凝集により形成されると報告されている。その凝集過程では、アミロイド前駆体の形成が確認されており、線維形成は結果的に生じるものと考えられている。[1] しかし、どのようにアミロイド線維を形成するのかは未解決である。先行研究において、アミロイド形成タンパク質であるインスリンおよびリゾチームのアミロイド形成に pH やイオン強度 ( $I$ ) との関係性が示され、両者どちらも高 pH かつ低イオン強度、あるいは低 pH かつ高イオン強度でアミロイド形成が促進されることが示された。そこで、同じくアミロイド形成タンパク質のヒトカルシトニン (hCT) に注目した。ペプチドホルモンである hCT のアミノ酸配列 DFNKF (Fig. 1) 部位がアミロイドの凝集に関与することが報告されている。[2] 本研究では DFNKF ( $pI \approx 6.0$ ) とインスリン ( $pI \approx 5.3$ ) における凝集を pH やイオン強度の影響から解析し、タンパク質凝集機構の解明を目的とした。

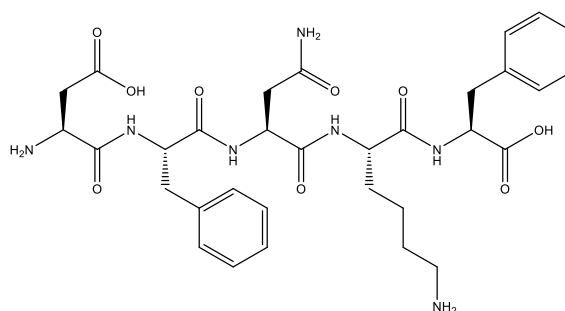


Fig. 1. DFNKF の構造

## 【方法】

所定の pH、イオン強度で調製した緩衝液を用いてインスリン溶液を調製した。363 K、45 min 静置、298 K、30 min 振盪を 3 サイクル行った。アミロイド形成確認のためチオフラビン T (ThT) 染色による蛍光光度計を、立体構造の確認のため ATR-FTIR を用いた。

## 【結果・考察】

インスリンに対する ThT 染色 (Fig. 2) による蛍光は、 $pI \gg pH$  のときでは高イオン強度で蛍光が強く見られ、 $pI$  および、 $pI \ll pH$  のときは低イオン強度で蛍光が強く見られたことから、pH、イオン強度によるアミロイドの凝集促進が確認された。FTIR では、凝集前では  $1652 \text{ cm}^{-1}$  にピークが見られたが、凝集後では  $pI \gg pH$  のとき高イオン強度で  $1630 \text{ cm}^{-1}$  に、 $pH \ll pI$  のとき低イオン強度で  $1630 \text{ cm}^{-1}$  が見られた。このことから立体構造が  $\alpha$ -helix 構造や random coil 構造から  $\beta$ -sheet 構造への構造転移していることが確認された。 $pI$  前後で立体構造の変化が見られていることから、分子の電荷が起因して凝集が起こっていることが考えられた。これから、ヒトカルシトニン hCT における凝集の最小単位である DFNKF について同様の検討を行い、アミロイド凝集機構と分子内の電荷の関係を報告する。

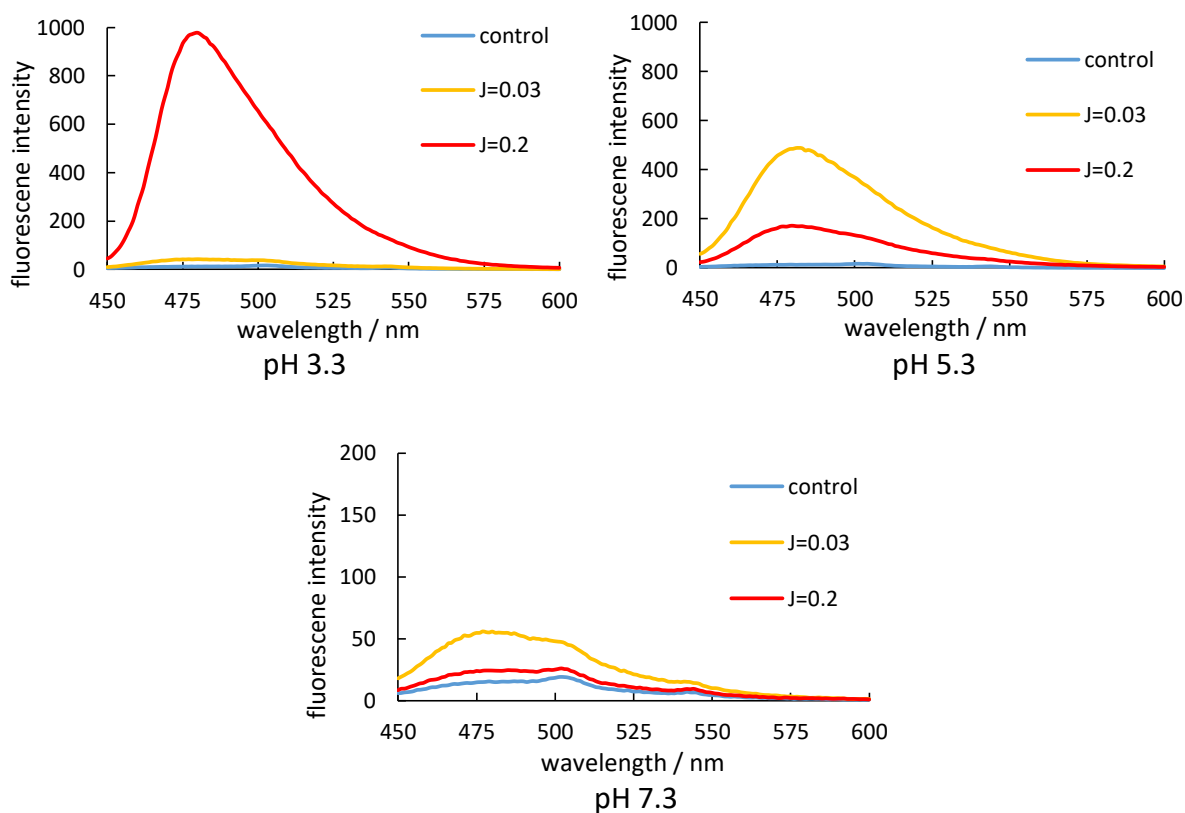


Fig. 2. ThT 蛍光における pH、 $J$  の変化に対するインスリンのアミロイド形成確認

## 【参考文献】

- [1] Chatani, E.; et al., *J. Biol. Chem.*, **289**, 10399–10410 (2014).
- [2] Meital Rechtes *et al.*, *J. BIOL.CHEM.* **277**, 3 (2002).