

21-31 ペプチドのアミロイド線維構造の研究

(統合バイオサイエンスセンター¹、大阪大学蛋白研²、福井医科大学³)○平松弘嗣¹、後藤祐児²、内木宏延³、北川禎三¹

序) いくつかのたんぱく質およびペプチドに関して、一定条件の下で針状凝集物(アミロイド線維)が形成されることが知られている。近年、原子間力顕微鏡や電子顕微鏡などを用いた測定から、アミロイド線維の形状はそれを構成するたんぱく質やペプチドの種類によらずほぼ類似しており、太さ十数 nm、長さ数 μm 程度であることが明らかになった。X 線構造解析の結果から、針状凝集物の内部には、構造の長軸に直交したストランドからなる β シートが含まれていることが分かっているが、これまで、アミロイド線維に含まれるペプチド鎖の分子構造の詳細は明らかではない。アミロイド線維構造の安定性を議論する上で、ここに含まれるペプチド鎖コンフォメーションに関する情報を得ることは非常に重要である。本研究では、配向サンプルを形成して赤外吸収直線偏光二色性測定を行うことにより、構造を明らかにすることを試みた。

方法) β_2 -ミクログロブリンの 21-31 ペプチド(NFLNCYVSGFH)を用いて実験を行った。アミロイド線維の伸長反応条件は既報に従った[1]。伸長反応と遠心分離(15,000rpm, 4°C, 45 min)を数回繰り返した後、チオフラビン T(ThT)染色液を用いて沈殿物を染色し、蛍光顕微鏡により像を観察した(図1)。励起光波長は 458nm、蛍光検出波長は $500 \pm 20\text{nm}$ とした。ThT 色素はアミロイド線維に特異的に結合して蛍光強度が増大することから、蛍光顕微鏡で観察される像はアミロイド線維の分布を表す。沈殿物の小片の中に、励起偏光に依存して蛍光強度が明らかに異なる試料(図1a,b 破線丸囲み、顕著な例を図1c,d に示す)が含まれることを見いだした。この

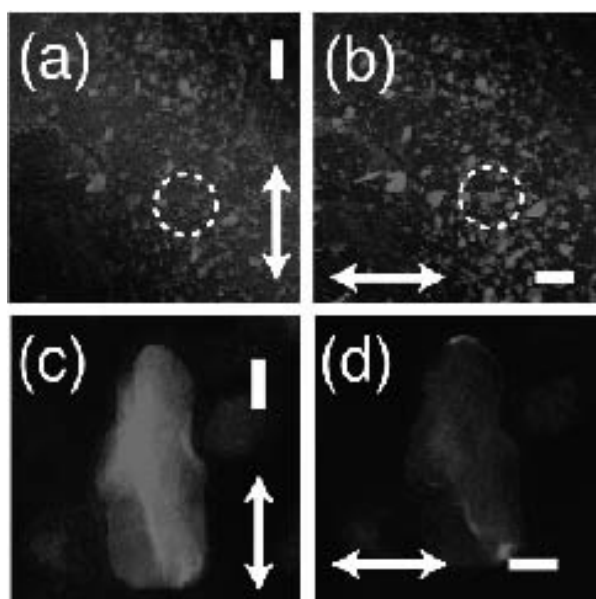


図1 アミロイド線維配向試料
スケールバーは $200 \mu\text{m}$ (a,b)および $16 \mu\text{m}$ (c,d)。

試料に関して赤外顕微鏡(Nicolet, Continuum)を用いて赤外吸収直線偏光二色性を測定した。

結果・考察) 赤外吸収直線偏光二色性の測定結果を図2に太線で示す。(a),(b)はそれぞれ、2つの測定結果の線形結合として得られる赤外吸収スペクトルおよび差スペクトルである。蛍光強度に励起偏光依存性が見られない試料点に関しては、直線偏光二色性は見られなかったことから、アミロイド線維の配向と ThT 色素の配

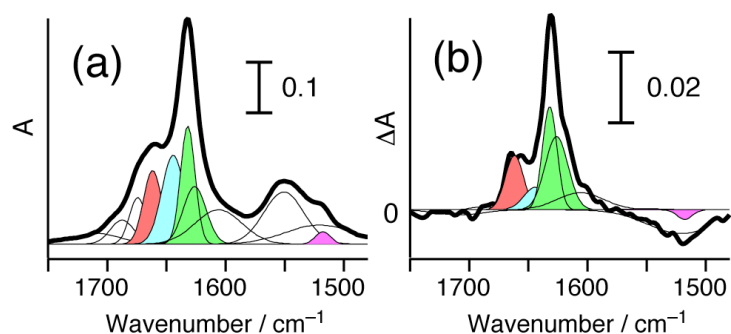


図2 β_2m 21-31 ペプチドフィブリル実験結果
(a) 赤外吸収スペクトル (太線)、構成要素 (細線)
(b) 差スペクトル (太線)、構成要素 (細線)

向には関連があると考えられる。図2b に示す差スペクトルにおいて、アミド I およびアミド II バンドが異なる二色性を示すことから、測定した試料の内部でアミロイド線維が配向していることが示唆される。赤外吸収スペクトルに現れるアミド I バンドを構成要素に分解し(図2a 細線)、これらのバンドの増減(図2b 細線)を用いて差スペクトルを再現した。これらの結果から、アミド I バンドを構成するそれぞれのバンドに関して、波数位置、面積、赤外吸収二色比を得た(表1)。ここでは、二色比が最大のバンドに関して $\alpha=0^\circ$ を仮定して配向パラメータを $f=0.067$ と決定し、この値を用いて行った解析結果を示している。バンドの波数位置、面積、二色比からそれぞれ二次構造の種別、残基数、配向軸に対する C=O バンド遷移モーメントの方向、に関する情報を得ることができる。実験結果は、ペプチド構造が「配向軸に平行 ($\alpha=0^\circ$) な C=O 基 2残基」「配向軸から 27° 傾いた C=O 基 3残基」「ランダムコイル構造 4残基」「 β シートあるいは β バルジ 2残基」を含むことを示す。また Tyr 側鎖に帰属される 1517cm^{-1} のバンドにおいては $\alpha=90^\circ$ であることから、Tyr26 は構造が固定された部分(ランダムコイル以外)に含まれることが示唆される。

Ser28,Gly29 が β バルジであると仮定し[2]、ペプチド構造を推定した(図3)。C 末端2残基を取り除いてもアミロイド線維形成能力は変化しないのに対し N 末端2残基を取り除くとアミロイド線維形成能力が減少するという実験結果[1]はモデル B を支持する。ここに示したモデルが平行 β シート、逆平行 β シートのいずれを形成するか、という点に関しても議論の余地がある。

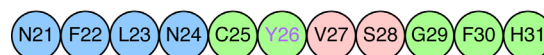
表1 解析に用いたパラメータ

波数/cm-1	1662	1644	1632	1626	1517
帰属	*	R	β	β	Tyr
面積/AU	21	31	27	21	
残基数	2.3	3.5	2.9	2.3	
二色比	1.12	1.04	1.14	1.22	0.88
角度	32°	47°	27°	0° †	90°

* β -turn あるいは β -bulge

† 0° とした。 $f=0.067$ 。

Model A



Model B

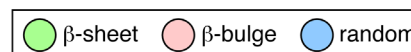


図3 可能な構造