

## 振動分光法で明らかにするアミロイド線維の構造構築原理

(岡崎統合バイオ<sup>1</sup>, 阪大蛋白研<sup>2</sup>) ○平松 弘嗣<sup>1</sup>, 後藤 祐児<sup>2</sup>, 北川 禎三<sup>1</sup>

**序** 従来、蛋白質の天然構造はペプチド鎖の最安定構造であると考えられてきた。近年、一定条件下で蛋白質が天然構造を失って、太さ 10nm 程度、長さ数 $\mu\text{m}$  の針状凝集体 (アミロイド線維) を形成する現象が見いだされた。この特徴は蛋白質の種類によらず共通である。また、線維は $\beta$ シート構造を基本骨格とすることがこれまでに知られている。

アミロイド線維中での蛋白質の構造を明らかにし、天然構造との類似点および相違点を検討することは、蛋白質構造の安定性を議論する上で非常に意義深い。しかしながら、線維中の蛋白質構造に関しては不明な点が多い。本研究では、ペプチドからなるアミロイド線維に関して線維中でのペプチド構造を研究対象とし、アミロイド線維の構造構築原理を検討した。

**実験** アミロイド線維形成能力を持つ蛋白質  $\beta_2$ -ミクログロブリンから切り出した 3 種類のフラグメント #21-29 [<sup>21</sup>NFLNCYVSG<sup>29</sup>], #21-31 [<sup>21</sup>NFLNCYVSGFH<sup>31</sup>], #20-41 (K3) [<sup>20</sup>SNFLNCYVSGF-HPSDIEVDLLK<sup>41</sup>] のアミロイド線維を試料として用いた。それぞれのフラグメントは NaCl 100 mM の存在下、中性 pH、37°C、48 時間程度で自発重合により線維化する (以下では各フラグメントの線維を fA[#21-29], fA[#21-31], fAK3 と記す)。各線維に関して赤外吸収およびラマンスペクトルを測定した。ペプチド主鎖の <sup>12</sup>C=O 基を、一残基だけ <sup>13</sup>C=O 基に同位体置換することで、スペクトル上でその残基のバンドを残りの残基の寄与と分離できる。この測定から残基単位の情報が得られる。各フラグメントに関して同位体置換を行った試料を数点ずつ準備し、上記伸長条件で線維を形成して赤外吸収スペクトルを測定した。

**結果**  $\beta$ シートは 1610-1640 $\text{cm}^{-1}$ , ランダム構造は 1640-1660 $\text{cm}^{-1}$ , 非 $\alpha$ 非 $\beta$ 構造は >1660 $\text{cm}^{-1}$  に C=O 伸縮振動 (アミド I) バンドを与えることが経験的に知られている。この経験則を基に、各線維に関して二次構造含有量を決定した (表 1)。またラマンスペクトルに SS 伸縮振動バンドが現れ、波数位置が 495 $\text{cm}^{-1}$  程度であったことから (結果未掲、表 2) 線維にはペプチド 2 量体が含まれることが示された。

各二次構造と一次配列との対応を決定する目的で、

表 1 二次構造含有量

sample	Secondary structure (position / $\text{cm}^{-1}$ )		
	†	random	$\beta$ -sheet
fA[#21-29]	0 (-)	1.0(1655)	1.2(1631) 6.2 (1628) 0.6(1627)
fA[#21-31]	2.3 (1662)	3.5 (1644)	2.9 (1632) 2.3 (1626)
fAK3	7.2 (1660)	2.4 (1645)	4.5 (1633) 7.9 (1622)

Expected error on the derived number of residue is nearly 15% mainly due to uncertainty of fitting parameters.

† non- $\alpha$ -non- $\beta$  but random structures including turn, bulge, loop, and others.

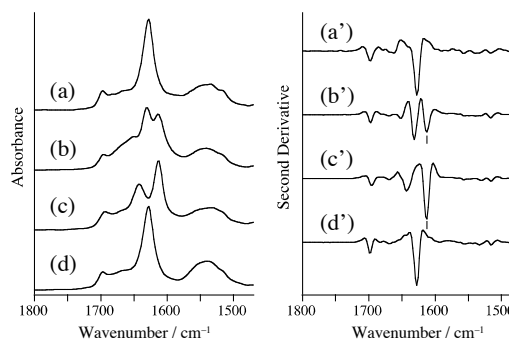


図 2 fA[#21-29] の同位体置換種の赤外吸収スペクトルおよび二次微分。(a,a') 同位体置換なし、(b,b') F22 置換体、(c,c') L23 置換体、(d,d') G29 置換体。

同位体置換種のアミロイド線維に関して赤外吸収スペクトルを測定した(図2~4)。同位体置換を行った場合、アミド I バンドは質量効果および遷移双極子相互作用により、二次構造に特異的な波数位置にバンドを与えることが知られている(ランダム構造 1625-1610 $\text{cm}^{-1}$ 、 $\beta$ シート 1610-1585 $\text{cm}^{-1}$ )。観測された  $^{13}\text{C}=\text{O}$  バンドの波数位置と帰属を表2に示す。

以上の結果を基に、線維構造のモデルを構築し、各フラグメントの天然構造中での二次構造(表2)と比較した。天然構造中で#22-28に分布する $\beta$ ストランド、および#29-35に分布するループ構造は線維中でよく保存されていること、#36-41の $\beta$ ストランドはfAK3においては保持されていないことがわかった。

アミロイド線維中と天然構造中でのアミノ酸配列の二次構造選択性の相違を検討した。今回の結果は、二次構造選択性が主に芳香族側鎖に由来する場合(例えば#22-28領域; $\beta$ シート選択性)や主に親水性側鎖に由来する場合(例えば#29-34領域;ループ選択性)は天然構造と線維構造がほぼ一致し、また選択性が主に荷電側鎖に由来する場合(例えば#36-41; $\beta$ シート選択性)には両構造は必ずしも一致しないことを示している。静電的相互作用は周辺に存在する電荷の符号によって引力にも斥力にもなり得るためと考えられる。

この結果は、荷電側鎖間相互作用以外の側鎖間相互作用は「天然構造中」「一次配列からの予想」「アミロイド線維中」でよく一致するものであることを示しており、線維の二次構造構築原理として重要な知見である。

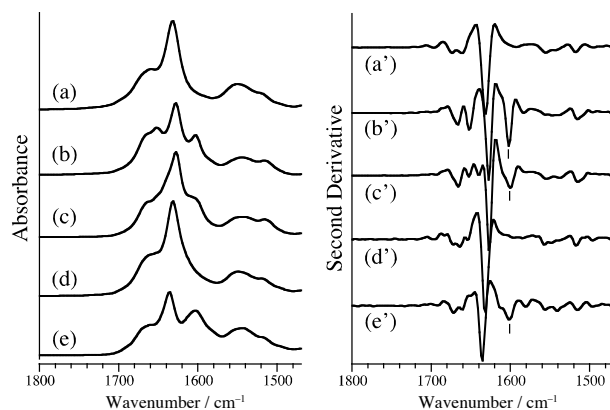


図3 fA[21-31]の同位体置換種の赤外吸収スペクトルおよび二次微分。(a,a')同位体置換なし、(b,b')F22置換体、(c,c')L23置換体、(d,d')G29置換体、(e,e')F22&V27置換体。

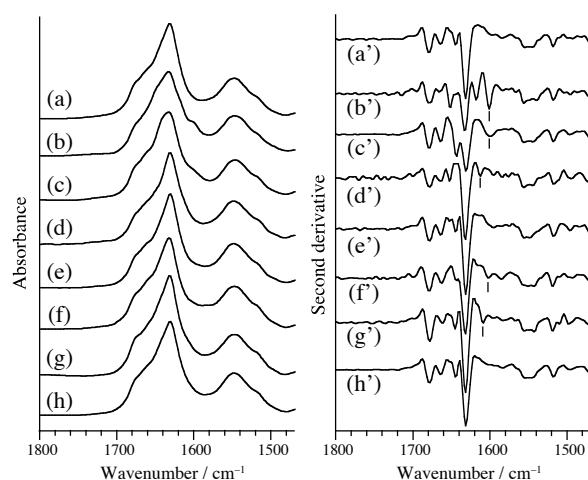


図4 fAK3の同位体置換種の赤外吸収スペクトルおよび二次微分。(a,a')同位体置換なし、(b,b')F22置換体、(c,c')V27置換体、(d,d')G29置換体、(e,e')P32置換体、(f,f')I35置換体、(g,g')V37置換体、(h,h')L39置換体。

表2 実験結果から決定した波数位置と帰属(網掛部分は $\beta$ シート)。

Residue	Secondary structure in protein*	Peak position / $\text{cm}^{-1}$ , secondary structure in fibril		
		fA[#21-29]	fA[#21-31]	fAK3
S20	loop	—	—	—
N21	loop	—	—	—
F22	$\beta$	1614 $\beta$	1603 $\beta$	1601 $\beta$
L23	$\beta$	1612 $\beta$	1601 $\beta$	—
N24	$\beta$	—	—	—
C25	$\beta$	494 S-S	493 S-S	498 S-S
Y26	$\beta$	—	—	—
V27	$\beta$	—	1603 $\beta$	1601 $\beta$
S28	$\beta$	—	—	—
G29	loop	random	random	1612 R
F30	loop	—	—	—
H31	loop	—	—	—
P32	loop	—	—	random
S33	loop	—	—	—
D34	loop	—	—	—
I35	loop	—	—	1603 $\beta$
E36	$\beta$	—	—	—
V37	$\beta$	—	—	1608 $\beta$
D38	$\beta$	—	—	—
L39	$\beta$	—	—	random
L40	$\beta$	—	—	—
K41	$\beta$	—	—	—

\* 結晶構造 [Bjorkman et al, *Nature* 1987, 329, 506-512]