

リゾチーム及び好塩性タンパク質
を用いたアミロイド線維形成機構
の解明

徳永 雄平

2014

目次

第一章 序論	
I-1 アミロイド線維とは	…9-13
第二章 HEWL によるアミロイド線維形成実験	
II-1 緒論	…14
II-2 実験方法と材料	
II-2-1 サンプルの調製方法	
II-2-2 THT による蛍光強度測定	…15
THT stock solution の調製	
THT 溶液の調製	
THT による蛍光強度測定	
II-2-3 円二色性 CD スペクトルによるタンパク質の二次構造の測定	…16
II-2-4 TEM を用いたアミロイド線維の観察	…16-17
リンタングステン酸の調製方法	
サンプルの調製方法	
サンプルの蒸着	
サンプルの観察	
II-2-5 AFM を用いたアミロイド線維の観察	…17
サンプルの調製方法	
II-2-6 Glycine/SDS-PAGE によるアミロイド線維の解析	…17
II-3 結果	…18
II-3-1 THT 蛍光強度測定による HEWL アミロイド線維形成の時間変化	
II-3-2 HEWL アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定	…19
II-3-3 HEWL アミロイド線維の TEM と AFM 用いた形態観察	…20
II-3-4 HEWL アミロイド線維の Glycine/SDS-PAGE による解析	…21
II-4 考察	…22
第三章 HEWL アミロイド線維形成量の検討	
III-1 緒論	…23
III-2 実験方法と材料	
III-2-1 サンプルの調製方法および超遠心分離	

III-2-2	OD ₂₈₀ の吸光係数の測定によるタンパク濃度の決定	
III-2-3	アミロイド線維の分光学的手法による測定およびTEMによる形態観	…24
III-2-4	Tricine/SDS-PAGEによるアミロイド線維の解析	
III-3	結果	…25
III-3-1	HEWLアミロイド線維形成量の測定	
III-3-2	HEWLアミロイド線維の超遠心後のTHTによる蛍光強度測定	…26
III-3-3	HEWLアミロイド線維の超遠心後の円二色性CDスペクトルによる 二次構造の測定	…27
III-3-4	HEWLアミロイド線維の超遠心後のTEMによる形態観察	…28
III-3-5	HEWLアミロイド線維の超遠心後のTricine/SDS-PAGEによる解析	…29
III-4	考察	…30
第四章	HEWL-K peptideによるアミロイド線維形成の検討	
IV-1	緒論	…31
IV-2	HEWLおよびK peptideのアミノ酸配列	…32
IV-3	実験方法と材料	…33
IV-3-1	合成ペプチドのデザイン	
IV-3-2	HEWL-K peptideによるアミロイド線維形成方法	
IV-3-3	HEWL-K peptideのアミロイド線維形成量の検討	
IV-3-4	OD ₂₈₀ の吸光係数の測定によるタンパク濃度の決定	…34
IV-3-5	アミロイド線維の分光学的手法による測定およびTEM・AFMによる形態 観察	
IV-3-6	ANSを用いた蛍光スペクトル測定	
IV-3-7	トリプトファン残基の蛍光スペクトル測定	…35
IV-3-8	アクリルアミドを用いたトリプトファン残基の蛍光強度 Quenching 実験	
IV-4	結果	…36
IV-4-1	HEWL-K peptideによるアミロイド線維形成	…36-37
IV-4-2	HEWL-K peptide 変異体によるアミロイド線維形成	…38-39
IV-4-3	HEWL-K peptide および変異体 アミロイド線維 のTHTによる蛍光強度 測定	…40

IV-4-4	HEWL-K peptide および変異体アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定	…42
IV-4-5	HEWL-K peptide および変異体アミロイド線維の TEM と AFM を用いた形態観察	…43
IV-4-6	HEWL- K peptide アミロイド線維形成中の ANS を用いた蛍光スペクトル測定	…44
IV-4-7	HEWL-K peptide アミロイド線維形成中のトリプトファン残基の蛍光強度の変化	…45
IV-4-8	アクリルアミドを用いたトリプトファン残基蛍光の Quenching 実験	…46
IV-4-9	HEWL-Kpeptide アミロイド線維形成量の測定	…47
IV-4-10	HEWL-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定	…48
IV-4-11	HEWL-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM による形態観察	…49
IV-5	考察	…50
第五章	Human-lysozyme 由来 K-peptide におけるアミロイド線維形成の検討	
V-1	緒論	…51
V-2	実験方法と材料	…52
V-2-1	合成ペプチドのデザイン	
V-2-2	Human-K peptide のアミロイド線維形成方法	
V-2-3	Human-K peptide のアミロイド線維形成促進効果の検討	
V-2-4	Human-K peptide のアミロイド線維形成量の検討	…53
V-2-5	アミロイド線維の光散乱による測定	
V-2-6	アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM による形態観察	
V-3	結果	…54
V-3-1	Human-K peptide アミロイド線維の THT による蛍光強度測定	
V-3-2	Human-K peptide アミロイド線維の光散乱測定	…55
V-3-3	Human-K peptide アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定	…56

V-3-4	Human-K peptide アミロイド線維の TEM による形態観察	…57
V-4	Human-K peptide によるアミロイド線維形成促進効果の検討	…58
V-4-1	Human-K peptide seeding 効果による円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定	
V-4-2	Human-K peptide seeding 効果による TEM を用いた形態観察	…59
V-4-3	Human-K peptide アミロイド線維形成量の測定	…60
V-4-4	Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後の円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定	…61
V-4-5	Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM によるアミロイド線維の形態観察	…62
V-5	Human-K peptide 変異体によるアミロイド線維形成	…63
V-5-1	実験方法と材料	
V-5-2	結果	…64-65
V-6	考察	…66
第六章	好塩菌・好塩性酵素についての説明	
VI-1	近年のアミロイド線維研究の動向について	…67-68
VI-2	好塩菌の種類	…69
VI-3	中度・高度好塩菌浸透圧調製の違い	…69-70
VI-4	好塩性酵素の特徴	…71-72
VI-5	中度好塩菌について	…73
VI-6	HP (Histidine rich metal-binding protein) の機能	…74-76
第七章	高温・酸性条件による His-HP のアミロイド線維形成の検討	
VII-1	緒論	…77
VII-2	実験材料と方法	…78
VII-2-1	His-HP の発現方法	
VII-2-2	His-HP の精製方法	
VII-2-3	高温・酸性条件下におけるアミロイド線維形成	
VII-2-4	HPLC (逆相カラムおよびニッケルカラム) によるペプチド断片の精製	…79
VII-2-5	エドマン分解法によるペプチドのアミノ酸配列の決定	…80
VII-2-6	TOF-MS による分子量の解析	

VII-2-7	合成ペプチドを用いたサンプルの調製方法	
VII-2-8	アミロイド線維の超遠心分離	
VII-2-9	OD ₂₈₀ の吸光係数の測定によるタンパク濃度の決定	…81
VII-2-10	アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM・AFM による形態観察	
VII-2-11	Tricine/SDS-PAGE によるアミロイド線維の解析	
VII-3	結果	…82
VII-3-1	THT による蛍光強度測定 (高温・酸性条件下でのアミロイド線維形成)	
VII-3-2	酸性・中性条件下での His-HP の二次構造および酸性条件下でアミロイド線維形成した場合の二次構造の変化	…83
VII-3-3	高温・酸性条件下にて形成したアミロイド線維の TEM による形態観察	…84
VII-3-4	Tricine/SDS-PAGE による His-HP の断片化の確認	…85
VII-3-5	His-HP アミロイド線維 (高温・酸性条件) の遠心と超遠心 (14k/60k) を用いた分析	…86-87
VII-3-6	His-HP 高温・酸性条件により断片化されたペプチド解析	…88-91
	peak I-A ペプチドの解析	
	peak I-B ペプチドの解析	
	peak II-C-1, C-2 ペプチドの解析	
VII-3-7	高温・酸性条件下で形成した His-HP アミロイド線維形成量の測定	…92
VII-3-8	His-HP アミロイド線維超遠心後の THT による蛍光強度測定	…93
VII-3-9	His-HP 超遠心後アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定	…94
VII-3-10	His-HP 超遠心後アミロイド線維の TEM による形態観察	…95
VII-3-11	His-HP 超遠心後アミロイド線維の Tricine/SDS-PAGE による解析	…96
VII-4	考察	…97
第八章	TFE 添加による中性条件下での His-HP (full length) のアミロイド線維形成の検討	
VIII-1	緒論	…98

VIII-2	実験方法と材料	
VIII-2-1	TFE 添加による中性条件下でのアミロイド線維形成	
VIII-2-2	アミロイド線維の分光学的手法による測定およびTEMによる形態観察	
VIII-2-3	Tricine/SDS-PAGE による解析	…99
VIII-2-4	TFE20%添加で形成したアミロイド線維の超遠心分離	
VIII-2-5	TFE20%添加で形成したアミロイド線維形成量の測定	
VIII-3	結果	…100
VIII-3-1	TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の THT による蛍光強度測定	
VIII-3-2	TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定	…101
VIII-3-3	TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の Tricine/SDS-PAGE による解析	…102
VIII-3-4	TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の TEM による形態観察	…103-104
VIII-3-5	TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の線維形成量の測定	…105
VIII-3-6	TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後における THT スペクトル測定	…106
VIII-3-7	TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後における CD スペクトル測定	…107
VIII-3-8	TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後における TEM による形態観察	…108
VIII-4	考察	…109
第九章	HEWL と His-HP のアミロイド線維形成機構の比較	
IX-1	緒論	…110
IX-2	実験方法	
IX-2-1	アミロイド線維形成方法(酸性条件化)	
	HEWL サンプル調製方法	
	His-HP サンプル調製方法	…111

IX-2-2	アミロイド線維形成方法(中性条件化)	
	HEWL 調製方法	
	His-HP 調製方法	
IX-2-3	アミロイド線維の超遠心分離	…112
IX-2-4	アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM による形態観察	
IX-3	結果	…113
IX-3-1	HEWL と His-HP のアミロイド線維形成速度の比較	
IX-3-2	超遠心を用いた HEWL と His-HP のアミロイド線維形成状態(酸性条件)の比較	…114-115
IX-3-3	超遠心を用いた HEWL と His-HP のアミロイド線維形成状態(中性条件)の比較	…116-117
IX-4	考察	…118
第十章	総合討論	…119-122
X I	参考文献	…122-129
X II	謝辞	…130
X III	本論文の主体となる報分	…131

略語

HEWL: Hen egg white lysozyme

THT: Thioflavin T

CD: Circular dichroism

TEM: Transmission electron microscopy

AFM: Atomic force microscopy

Glycine/SDS-PAGE: Glycine/SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Tricine/SDS-PAGE : Tricine/SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Trp62: HEWL の 62 番目のトリプトファン残基

ANS: 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

His-HP: His-tag-Histidine rich metal-binding protein

C. salexigens : *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043

TOF-MS: Time-of-flight mass spectrometric

TFE: 2,2,2-Trifluoroethanol

f. c: final concentration

Gdn-HCl: Guanidine-HCl

第一章 序論

I-1 アミロイド線維とは

高齢化社会の到来に伴い高齢者の認知症がクローズアップされて久しい。認知症の主因となるアルツハイマー型認知症患者の脳には老人斑（アミロイドベータタンパク質： $A\beta$ の沈着像）が出現する。このようにして広く知られる単語名となったアミロイドとは、タンパク質が変性・ミスフォールディングで会合、凝集し形成された規則的な重合体でありアミロイド線維とも呼ばれる。タンパク質科学的には、アミロイド前駆体タンパク質の β ストランドが線維軸と直行する方向に規則的配列をしたクロス β シート構造をとり、それが寄り集まってプロトフィラメントを形成し、さらにプロトフィラメントが束になってアミロイド線維を形成する (Fig. 1-1)。「①コンゴレッドで赤橙色に染色される。②偏光顕微鏡下で緑色偏光を示し、電子顕微鏡下で線維構造が観察される。③円二色性測定でベータ構造が確認される。」などの点が充足されることがアミロイド線維の定義条件となっている。アミロイド線維沈着により起こる疾患はアミロイドーシスと呼称されるアルツハイマー病だけでなく透析アミロイドーシス、プリオン病、ハンチントン病、パーキンソン病など多岐にわたる (Table. 1-1) (1, 2)。現在では病気と関連のないタンパク質やペプチドの多くがアミロイド線維を形成することが明らかとなっており、タンパク質の基本構造の一つがアミロイド線維であるという考えに収束されつつある。結晶成長に類似のアミロイド線維の形成は、核形成とそれに続く伸長反応の二段階でおこる。十分な濃度で前駆体タンパク質が存在しても容易に核形成が起こるわけではない。しかし核が形成されるや、前駆体タンパク質単量体の連続的結合により伸長反応は速やかに進行し線維が伸長する。核形成と伸長反応の速度は前駆体タンパク質の種類・溶媒条件により大きく変化する。興味深いことにあらかじめ線維化させたアミロイド線維を超音波破碎して seeds とし、単量体前駆体タンパク質に添加すると、核形成を待たずアミロイド線維形成が促進される (Fig. 1-2) (2-5)。いくつかの前駆体が会合した可溶性のオリゴマーと考えられている核の構造及び物性の詳細は不明であるが、アミロイド β ペプチド、プリオンタンパク質などの線維形成初期の段階で現れるオリゴマーは強い細胞毒性を持つと報告されている。つまりアミロイドーシスの病態はアミロイド線維に起因するものではなく、前駆体であるオリゴマーによることが提案されている (6)。

本研究にて使用するヒトリゾチームにおいてもアミロイドーシスが報告されており 1997 年に初めてヒトリゾチームでアミロイド線維が形成されることが報告されている (7)。ヒトリゾチームは、約 14kDa の球状タンパク質で、細菌のプロ

テオグリカンを分解する酵素であり血液、母乳、涙など体液に含まれ抗菌タンパク質として生体防御に深く関わっている。ヒトリゾチームは遺伝的変異によるアミノ酸の置換 (I56T F57I W64R D67H) によりアミロイド線維を生じ全身性アミロイドーシスを引き起こすことが知られている (Fig. 1-3) (8-10)。その変異は α ドメインと β ドメインを結ぶ疎水性領域に集中してみられ、変異によってタンパクが構造変化をおこし、疎水性の高い領域の表面への露出により分子の会合が起こり結果的にアミロイド線維を形成すると考えられている (8)。

一方でニワトリリゾチーム (HEWL) はヒトリゾチームのホモログでありヒトリゾチームと同様のタンパク構造をもち高温・酸性条件下のような過酷な条件、あるいは変性剤・有機溶媒などを添加することによってアミロイド線維を形成することが報告されている (Fig. 1-4) (11-13)。それ以降、ニワトリリゾチームはヒトリゾチームのモデルタンパク質として、アミロイド線維形成機構について詳細に研究されてきた (14-16)。過去の文献においては、Trp62 がアミロイド線維形成に重要な役割をはたしていることが示唆されているが (17, 18)、HEWL のアミロイド線維形成機構の解明には至っていない。そこで、モデルタンパク質として、HEWL を使用し、リゾチームのアミロイド線維形成機構の解明を目的として、特に線維形成に深く関わっていると考えられるコア領域における線維形成 peptide の同定およびアミノ酸残基の重要性を検証することを目的とした。さらに、部分変性した HEWL が高い凝集性を示すことから、タンパク質の凝集性と規則的な凝集体であるアミロイド線維形成の関係を明らかにするために、可溶性が高く不可逆的なタンパク質凝集体を作りにくい好塩性細菌由来の好塩性金属結合タンパク質 (His-rich metal binding protein : HP) を用いて、アミロイド線維形成条件を検討し、HEWL のアミロイド線維形成機構と比較した。

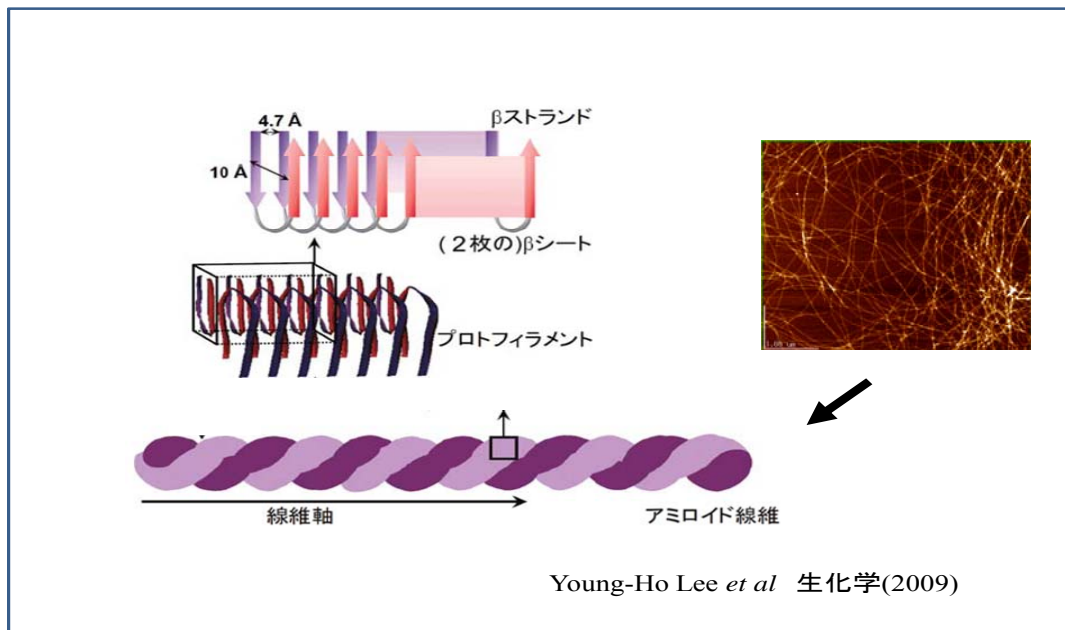


Fig. 1-1 アミロイド線維の構造

Table. 1-1 ヒトアミロイドーシスとアミロイド前駆体タンパク質

アミロイド線維	前駆タンパク質	全身性(S)/限局性(L)	アミロイドーシス
AL	免疫グロブリンL鎖	S	ALアミロイドーシス
AH	免疫グロブリンH鎖	S, L	ALアミロイドーシス
Aβ ₂ M	β ₂ ミクログロブリン	S	透析アミロイドーシス
ATTR	トランスサイレチン	S	家族性アミロイドニューロパチー I・II型
AGe1	ゲルソリン	S	家族性アミロイドニューロパチー (FAPIV)
AFib	フィブリノーゲンA	S	家族性腎アミロイドーシス
ACys	シスタチンA	S	遺伝性アミロイド性脳出血
Aβ	アミロイドβペプチド	L	アルツハイマー病
AprP	プリオンタンパク質	L	プリオン病・クロイツフェルト・ヤコブ病
ACal	(プロ)カルシトニン	L	甲状腺髄様癌
AIAPP	アミリン	L	II型糖尿病
AANF	心房ナトリウム利尿ペプチド	L	限局性心房性アミロイド
AIns	インスリン	L	インスリノーマ
AMed	ラクトアドヘリン	L	大動脈アミロイドーシス
ALac	ラクトフェリン	L	角膜アミロイドーシス
A(<i>tbn</i>)	<i>tbn</i>	L	歯原性腫瘍

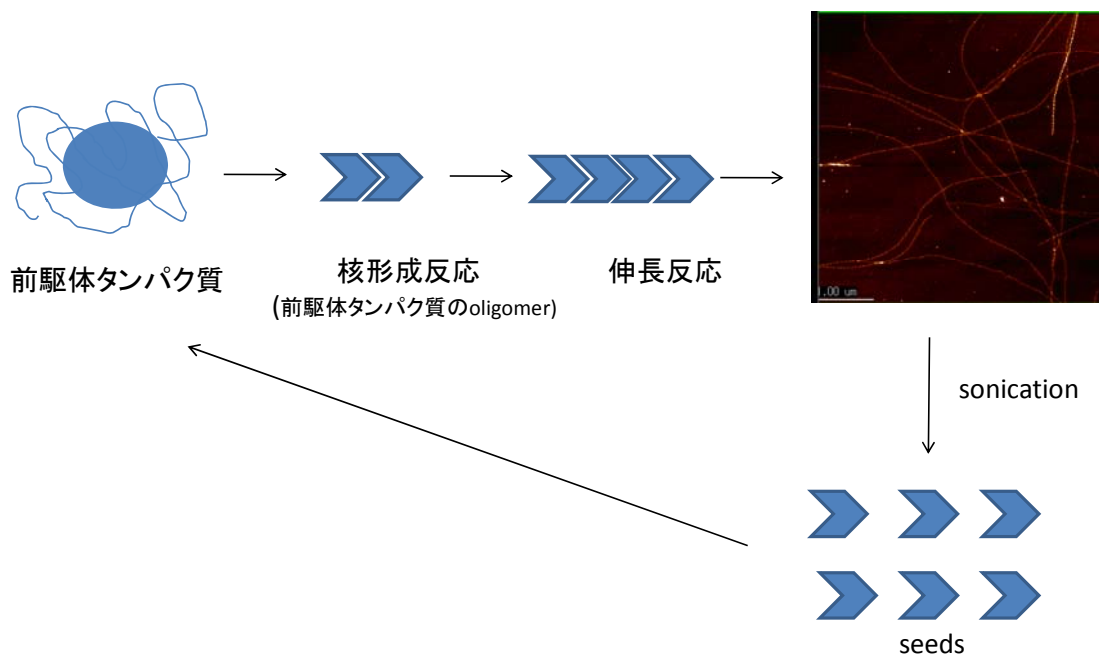
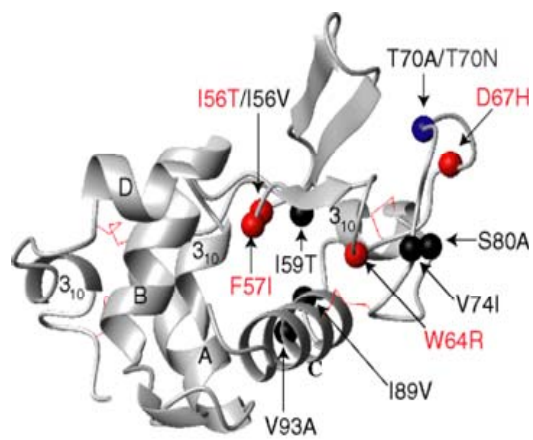


Fig. 1-2 推定されるアミロイド線維形成機構と seeds の役割



Kumita.JR *et al* FBSE Journal(2006)

Fig.1-3 Wild type Human-lysozyme の三次構造と病原性アミノ酸変異



PDB 3IJV

Fig.1-4 HEWL の三次構造

第二章 HEWL によるアミロイド線維形成実験

II-1 緒論

アミロイド線維の形成は結晶成長と類似しており、核形成と伸長反応の二段階からなる。現在のところプリオンタンパクのみが伝染、伝播することがわかっているが、いくつかのアミロイド線維形成前駆体タンパク質は、試験管内であれば、あらかじめ形成されたアミロイド線維を超音波破碎して(これを seeds と呼ぶ)前駆タンパク質に添加すると核形成がスキップされ速やかに線維が伸長することが知られている (Seeds 依存性アミロイド線維反応) (3-5)。HEWL は、高温・酸性条件下にてアミロイド線維を形成することが知られているが(14)、本実験では、酸性・高温条件下で HEWL (monomer) に seeds を添加することにより、アミロイド線維形成促進効果を示すか検討をおこなった。

II-2 実験方法と材料

II-2-1 サンプルの調製方法

HEWL (和光、6 回結晶) を 10mg 秤量し、50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) にて溶解した (f. c 10 mg/ml)。調製したサンプルを 58 °C で 14 日間 incubation し、アミロイド線維を形成させる。THT の蛍光強度測定と TEM にてアミロイド線維の形成を確認後、超音波破碎の処理 (sonication) を行いアミロイド線維を断片化し、seeds として使用した。Sonicator は、(Branson sonifier250・超音波ホモジナイザー・セントラル科学貿易) を使用し (Output 1 dutycycle 10% 50 回 sonication する。)断片化した seeds を終濃度 50 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0) に溶解した Monomer の HEWL (f. c 2 mg/ml に 1 or 4% (v/v) に添加する。58°C で incubation (As one Incubater IC-450AL) を行い、THT の蛍光測定、CD スペクトル、TEM、AFM、Glycine/SDS-PAGE によるアミロイド線維形成の評価を行った。タンパク濃度の測定は、280nm 時の吸光係数を用いた。

II-2-2 THT による蛍光強度測定

THT stock solution の調製

ミリ Q 水に THT を 1 mM になるよう溶解した。0.22 μm のマイクロシリンジフィルターで濾過滅菌したものを stock solution として使用した。

THT 溶液の調製

0.2 M PB (phosphate buffer) pH 6.7 を作製し、PB は f.c 50 mM (pH 6.7) THT は f.c 10 μM になるように調製して THT 溶液を作製した。

THT による蛍光強度測定

調製した THT 溶液を 240 μl とってサンプルを 10 μl 加えて軽く手で攪拌した。96well マイクロプレートリーダー (costor 社の黒プレート) に 200 μl ずつ分注して測定を行い time course をとった。corona microplate reader fluorescence spectrophotometer (Hitachi Japan) を用いて測定を行った。測定条件は、励起 435nm 蛍光 485nm、半値幅 5nm 測定感度 $\times 10$ 多点 25 回 温度 25°C で行った。

II-2-3 円二色性 CD スペクトルによるタンパク質の二次構造の測定

20 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) を作製し、サンプルをタンパク質濃度 0.1 mg/ml になるよう希釈した。(アミロイドを形成した buffer と同じ buffer で希釈した) 希釈したサンプルを光路長 0.1cm セルにいれ、Jasco 社製の J-715 Spectropolarimeter を用いて CD スペクトルの測定を行った。スキャン範囲 260nm~200nm、Scan speed は(4 秒毎)に 10 nm/min で行い、積算 4 回で測定を行った。得られた CD スペクトルは、JWSSE-480 型 タンパク二次構造解析プログラム (JASCO J-800 for windows) で解析を行った。

II-2-4 TEM を用いたアミロイド線維の観察

リンタングステン酸の調製方法

1%濃度のリンタングステン酸溶液 (Wako) を調製する。1N KOH を調製し、1N KOH を用いてリンタングステン酸溶液を pH 7.0 に調製した。使用前は、0.22 μ m のマイクロシリンジフィルターを使ってろ過した。使用期限は、1 週間とした。

サンプルの調製方法

アミロイドサンプルを 10 μ l とってミリ Q 水で 20~40 倍に希釈した。エクセルサポートフィルム (銅 200 メッシュ・日新 EM 社) にサンプルを 5 μ l のせて、1 分後、先を細く切った、ろ紙でゆっくり吸い取った。(メッシュの上にサンプルが少し残るようにする。) 1%リンタングステン酸を 5 μ l のせ 30 秒後にろ紙で完全に吸い取った。シリカゲルを入れた真空ベルジャーに 1 日おいて乾燥させたあと TEM にて観察をおこなった。

サンプルの蒸着

真空蒸着装置 (真空デバイス VE1010) を使用してカーボン蒸着をおこなった。カーボンは、真空蒸着用カーボン (応研商事株式会社 5mmx100mm 4 本入り) を使用した (19)。

サンプルの観察

蒸着後、透過型電子顕微鏡 H-7000 形 (Hitachi) にてアミロイド線維の観察を行った (19)。

II-2-5 AFM を用いたアミロイド線維の観察

サンプルの調製方法

雲母盤を (日新 EM) 試料台に両面テープで貼りつけ、碧かい面が平らになるように雲母をスコッチテープで一枚剥がす。アミロイドサンプルを $10\ \mu\text{l}$ とってミリ Q で 40~80 倍に希釈した。雲母に $5\ \mu\text{l}$ のサンプルをのせる。バキュームデシケータで 5 分間、溶液を乾燥させ JEOL JSPM-5200 (日本電子) を用いてタッピングモードで測定を行った。カンチレバーは、OMCL-AC160TS (olympus) を使用した (共振周波数は 300kHz spring constant 26 N/m)。測定条件は、スキャン速度は $660\sim 1\ \mu\text{seconds}$ 、スキャン範囲は $5\ \mu\text{m}$ で、ピクセル数 512×512 にて行った。線維形状・高さの解析は、Win SPM system ver. 6.03 を用いて解析を行った (20)。

II-2-6 Glycine /SDS-PAGE によるアミロイド線維の解析

Glycine/SDS-PAGE (21) を用いてアミロイド線維の解析を行った。分離ゲルは、12.5%濃度のポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパク質を Glycine/SDS サンプル buffer で 0.5mg/ml に希釈し、 90°C で 5 分加熱後ポリアクリルアミドゲルに適量タンパクをアプライした。定電流 25mA で約 1 時間泳動した。染色液を用いてそれぞれ一時間染色後、10%酢酸にて 1 時間脱色を行った。

II-3 結果

II-3-1 THT 蛍光強度測定による HEWL アミロイド線維形成の時間変化

Fig. 2-1 は、HEWL に seeds を 1%および 4%添加したものおよび seeds 無添加の HEWL を酸性・58°Cで incubation したサンプルをアミロイド線維と特異的に反応する THT を用いて蛍光強度を測定したものである。横軸はインキュベートの日にち、縦軸は蛍光強度を示している。HEWL に seeds を 1%あるいは 4%添加することにより 3 日目より蛍光強度の増加が認められ 10 日目ではほぼ一定状態になることが確認された。一方で seeds 無添加の HEWL は、8 日目までは蛍光強度の増加が確認できず、8 日以降に THT の増加が確認できた。

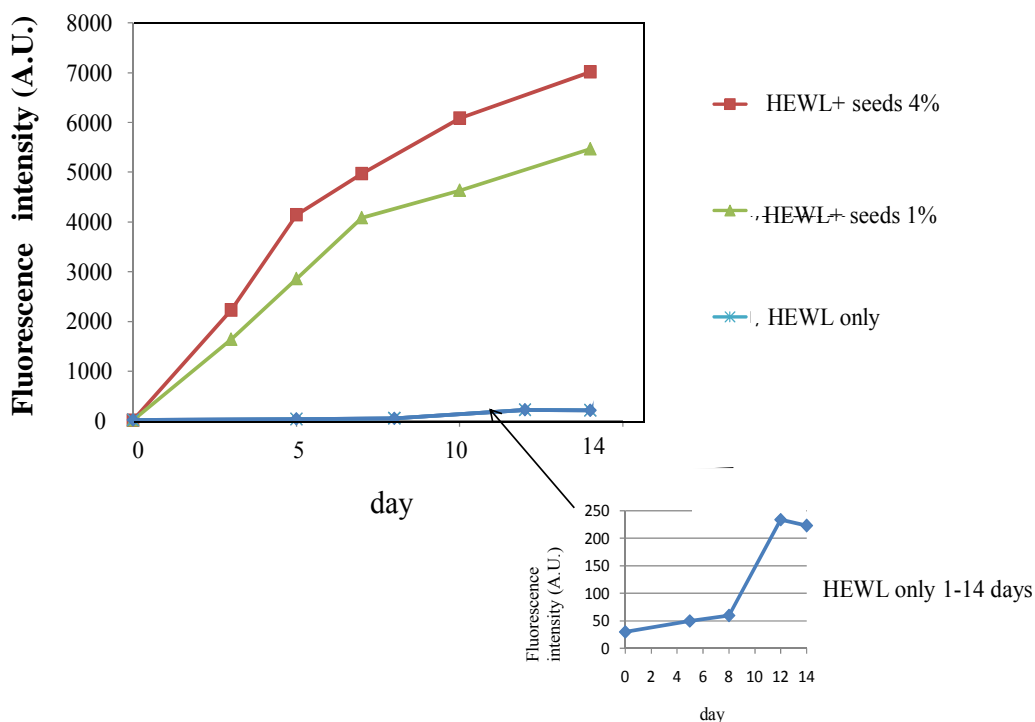


Fig. 2-1 THT 蛍光強度測定による HEWL アミロイド線維形成の時間変化

II-3-2 HEWL アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

Fig. 2-2 は、HEWL に seeds を 1% および 4% 添加したものおよび seeds 無添加の HEWL を酸性・58°C で incubation したサンプルを 20 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0) を用いてタンパク濃度 0.1mg/ml の濃度に希釈して測定を行った CD スペクトルの結果である。横軸は、測定波長を縦軸は mol Ellipticity を示している。seeds 無添加の HEWL の場合 0 日目は、208nm 付近で負の極大を示しているが、日数が経過するにつれて短波長側にスペクトルが shift していくことが確認できる。一方で seeds を添加した場合、1% および 4% 共に 5 日目から 208nm 付近の負の極大が減少しているため、 α ヘリックス構造が減少していることが示唆された。

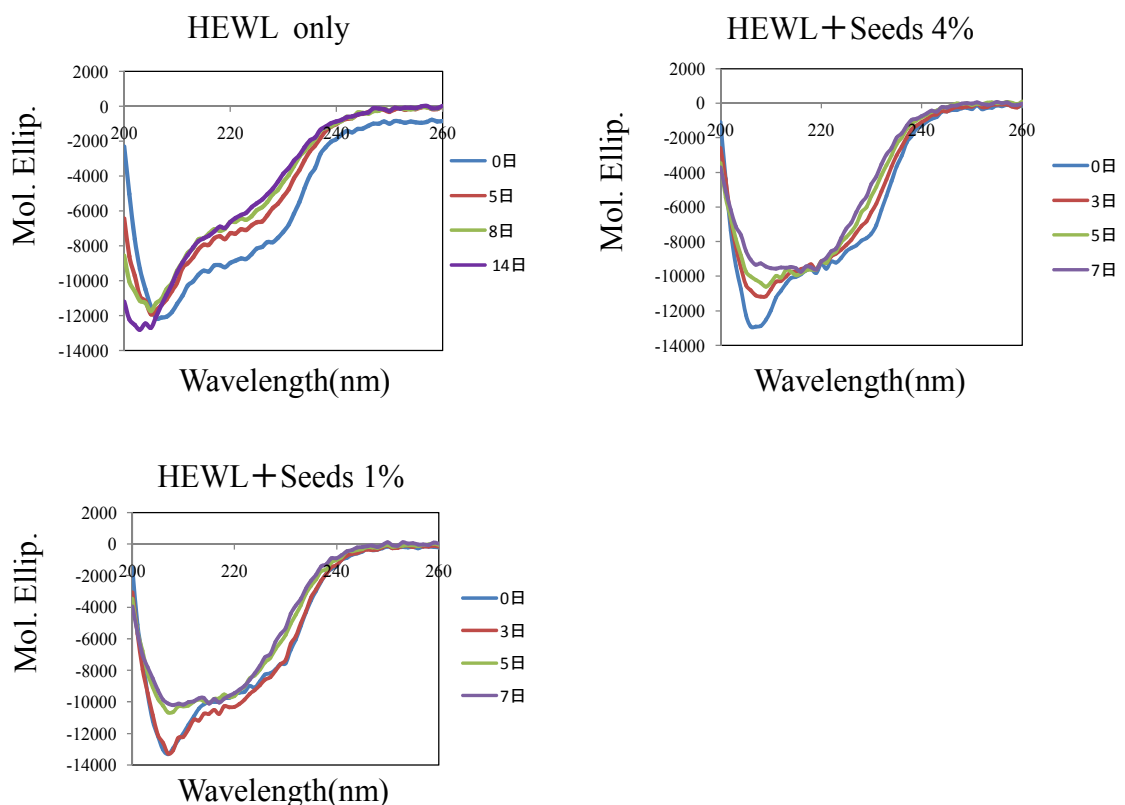


Fig. 2-2 HEWL アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

II-3-3 HEWL アミロイド線維の TEM と AFM を用いた形態観察

Fig. 2-3 は、HEWL に seeds を 1% および 4% 添加したものと seeds 無添加の HEWL を酸性・58°C で incubation したサンプルを TEM と AFM を用いてアミロイド線維の観察をおこなった結果である。スケールは AFM は 1 μm TEM は 0.5 μm である。seeds 無添加の場合、incubation をはじめて 12 日目にてアミロイド線維を確認することができた。一方で seeds を添加した場合 1% および 4% 添加したのものにも 3 日目で多くの線維形成が確認することができ、seeds を添加することによりアミロイド線維形成が促進されていることが確認できた。

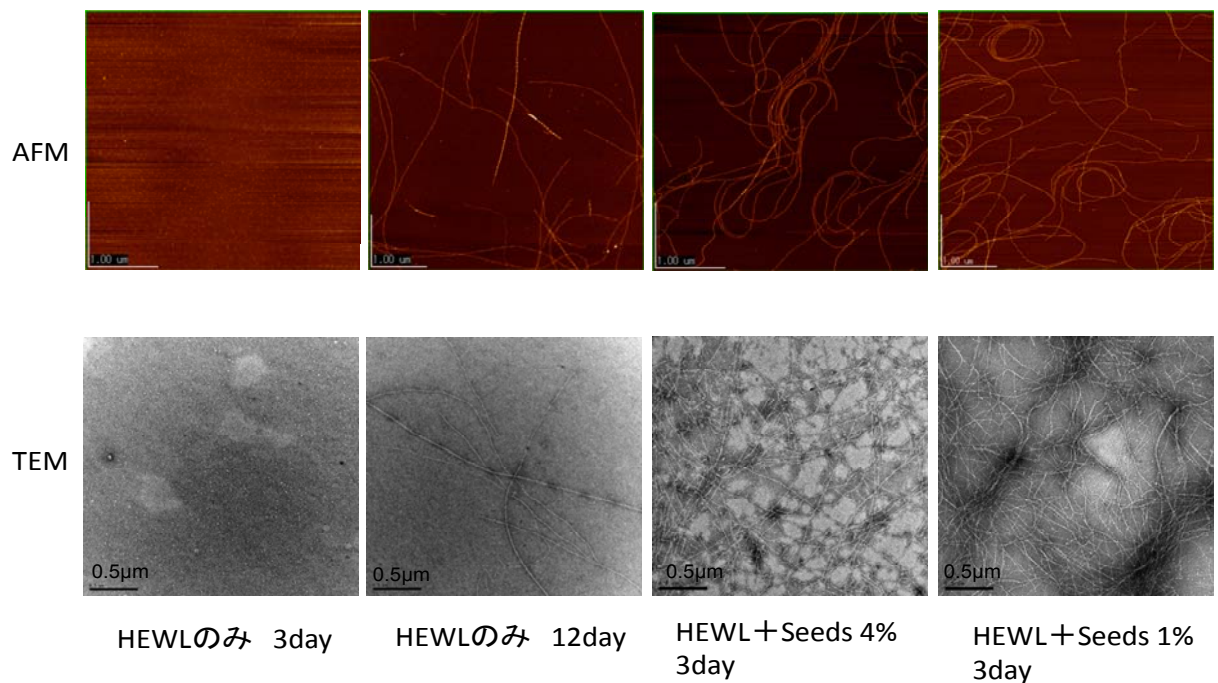


Fig. 2-3 HEWL アミロイド線維の TEM と AFM を用いた形態観察

II-3-4 HEWL アミロイド線維の Glycine /SDS-PAGE による解析

Fig. 2-4 は、HEWL に seeds を 1% および 4% 添加したものおよび seeds 無添加の HEWL を酸性・58°C で incubation したサンプルをタンパク量 5 μ g アプライし、定電流 25mA で電気泳動した結果である。12.5% のポリアクリルアミドゲルを使用した。Seeds を添加・無添加の HEWL とともに、日数が経過していくと HEWL がペプチドに断片化していることが確認できた。THT による蛍光強度の増加、CD スペクトルによる二次構造の変化、TEM と AFM の顕微鏡観察の結果から HEWL がペプチドに断片化されることによってアミロイド線維が形成されると考えられる。

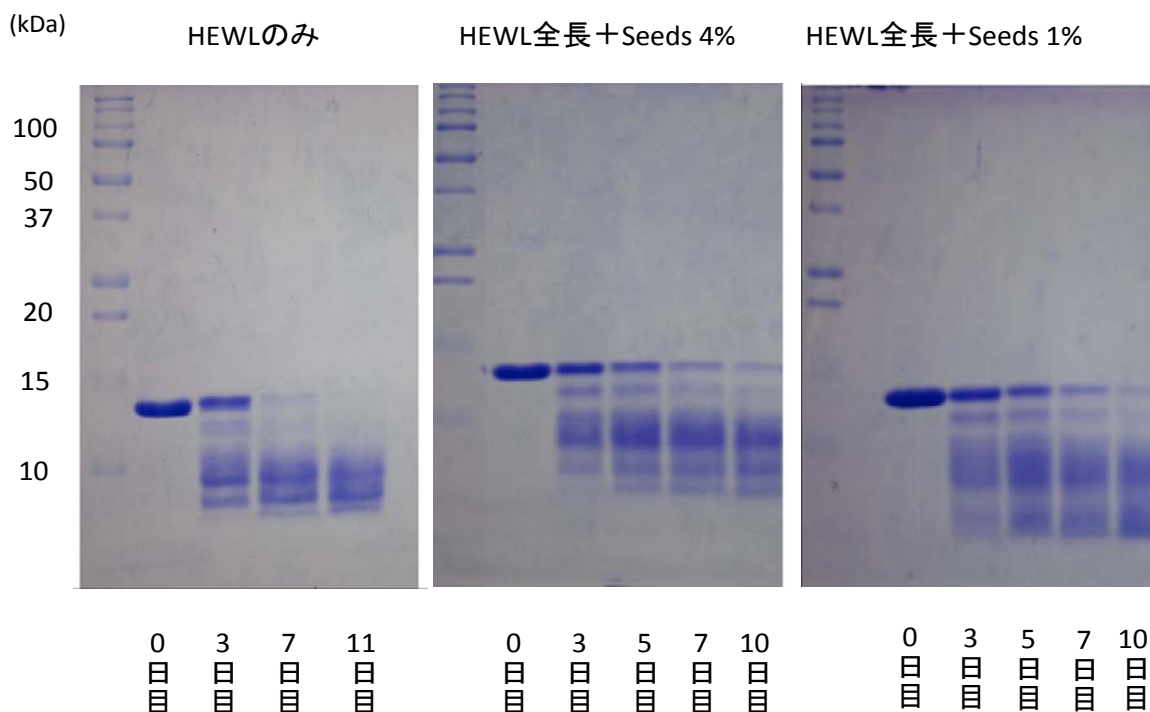


Fig. 2-4 HEWL アミロイド線維の Glycine/SDS-PAGE による解析

II-4 考察

アミロイド線維形成は、結晶成長に似た反応であり核形成と伸長反応の二段階でおこる。核形成は容易には起きないが一旦核が形成されると前駆体タンパク質の結合により伸長反応は速やかに進行することが知られている。今回検討した HEWL (全長) のアミロイド線維形成の場合、seeds 無添加では、10 日目以降に THT の蛍光強度が増加し、AFM・TEM を用いた顕微鏡観察によりアミロイド線維形成が確認できたことより、核形成のためのラグタイムが生じ線維形成に約 10 日間の時間を要したと考えられる。一方で HEWL に seeds を添加した場合、3 日ですみやかに線維形成された。これは、seeds を添加したことにより核形成の段階がスキップされ、その後の線維伸長反応が速やかに進行したため、早い段階でのアミロイド形成の促進効果がみられたと考えられる。また、Glycine/SDS-PAGE の結果より、日数が経過していくと HEWL がペプチドに断片化していることが確認でき、それと同時にアミロイド線維形成がおこっているため今回の実験条件である酸性・高温の場合、HEWL が変性後、ペプチドに断片化されアミロイド線維が形成されているということが分かった。しかし、上記でおこなった各種測定法では、アミロイドの線維量の定量性を確認できないため、第三章にて超遠心によるアミロイド線維の定量実験を行った。

第三章 HEWL アミロイド線維形成量の検討

III-1 緒論

第二章にて、各種測定方法により HEWL は酸性・高温条件化でアミロイド線維を形成し、seeds はアミロイド形成促進効果を有していることがわかった。しかし、TEM などでの観察は、線維形成を観察するには強力な手法であるが、ネイティブな HEWL から実際にどのくらいのアミロイド線維が形成されたかの定量性については不確実な部分が多い。そこで HEWL を酸性・高温条件下でアミロイド線維を形成したサンプルの超遠心を行いアミロイド線維形成量の検討を行った。(22)

III-2 実験方法と材料

III-2-1 サンプルの調製方法および超遠心分離

HEWL50mg をミリ Q 水にて溶解する (50mg/ml)。0.2M Glycine-HCl buffer (pH 2.0) および HEWL を f.c 50 mM と 10mg/ml になるようそれぞれ溶解し、そこに断片化した seeds を 2%(v/v) 添加した (Seeds の作製方法は、II-2-1 を参照)。58°C で 14 日間 incubation し (アズワン incubater L002-84)、その後、超遠心分離をおこなった。タンパク濃度の測定は、OD_{280nm} の吸光係数を用いた。遠心分離機は、Beckman optima-TL を使い 60,000rpm (150,000g) 4°C 5 時間おこなった。遠心分離したサンプルを上清と沈澱にわけ、その後の測定を行った。

III-2-2 OD₂₈₀ の吸光係数の測定によるタンパク濃度の決定

遠心分離したサンプルの上清と沈澱の OD₂₈₀ を測定しタンパク濃度を決定した。超遠心前のサンプルは 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 100 倍希釈し、OD₂₈₀ を測定後タンパク濃度を決定した。超遠心後の沈澱は 50 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0) を 200 μ l 添加し、ボルテックスでよく攪拌して懸濁した。懸濁した溶液を 20 mM Glycine-HCl buffer (pH 2.0) で 200 倍希釈、上清は 50 倍希釈して OD₂₈₀ を測定し、タンパク濃度を決定した。

Ⅲ-2-3 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM によ

る形態観察

タンパク濃度を決定した超遠心前、超遠心後の上清、沈殿の各サンプルを THT による蛍光スペクトル測定、CD スペクトルによる二次構造の解析、TEM による線維の観察を行った。(これらの方法はそれぞれⅡ-2-2～Ⅱ-2-4)に記載した方法で行った。

Ⅲ-2-4 Tricine/SDS-PAGE によるアミロイド線維の解析

Tricine/SDS-PAGE (23)を用いて超遠心後の上清、沈殿のサンプルのアミロイド線維の解析を行った。分離ゲルは、16.5%濃度のポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパク質を Glycine/SDS サンプル buffer でそれぞれ希釈し、90℃で5分加熱後ポリアクリルアミドゲルにアプライした。定電圧(100V)で約 1.5 時間泳動して染色液を用いてそれぞれ一時間染色後、10%酢酸にて1時間脱色した。

Ⅲ-3 結果

Ⅲ-3-1 HEWL アミロイド線維形成量の測定

HEWL 1mg/ml 溶液の OD₂₈₀ は、2.669 と計算される。Table. 1-2 の結果は、HEWL アミロイド線維のサンプルを超速心にかけて上澄みと沈澱にわけ適宜希釈して測定を行い HEWL のアミロイド線維形成量を算出した結果である。Table. 1-2 の結果から上澄み画分は、総タンパク量が 7.3mg であったが、TEM の線維観察にてアミロイド線維は確認できず、不定形 (Amorphous) の沈澱が多く観察された。一方で沈澱画分は、総タンパク量が 1.6mg であったが TEM の線維観察では、アミロイド線維が確認でき、CD スペクトルにおいても β シート構造を確認することができた。以上の結果より HEWL を高温・酸性条件下でアミロイド線維を作製した場合、全タンパク量の約 14.6% のアミロイド線維が形成されていると推定された。

Table. 1-2 HEWL アミロイド線維形成量

	蛋白濃度 (mg/ml)	容量 (ml)	総蛋白量 (mg)
Total (HEWL)	10.94 mg/ml	1ml	10.94mg
Surpernatant	7.3mg/ml	1ml	7.3mg
Precipitate	8.1mg/ml	0.2ml	1.62mg

Ⅲ-3-2 HEWL アミロイド線維の超遠心後の THT による蛍光強度測定

Fig. 3-1 は、超遠心をおこなった上清と沈澱画分および超遠心前のサンプルを THT を用いて蛍光スペクトル測定をおこなった結果を示す。沈澱画分のサンプルは、超遠心前のサンプルより蛍光ピークが、2 倍ほど低いものの 485nm 付近に蛍光ピークを示した。一方で上澄み画分は THT の蛍光強度の増加が認められなかった。以上の結果より沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆された。よって次に、超遠心前のサンプルおよび上清と沈澱画分を用いて CD スペクトルによるタンパクの二次構造解析を行った。

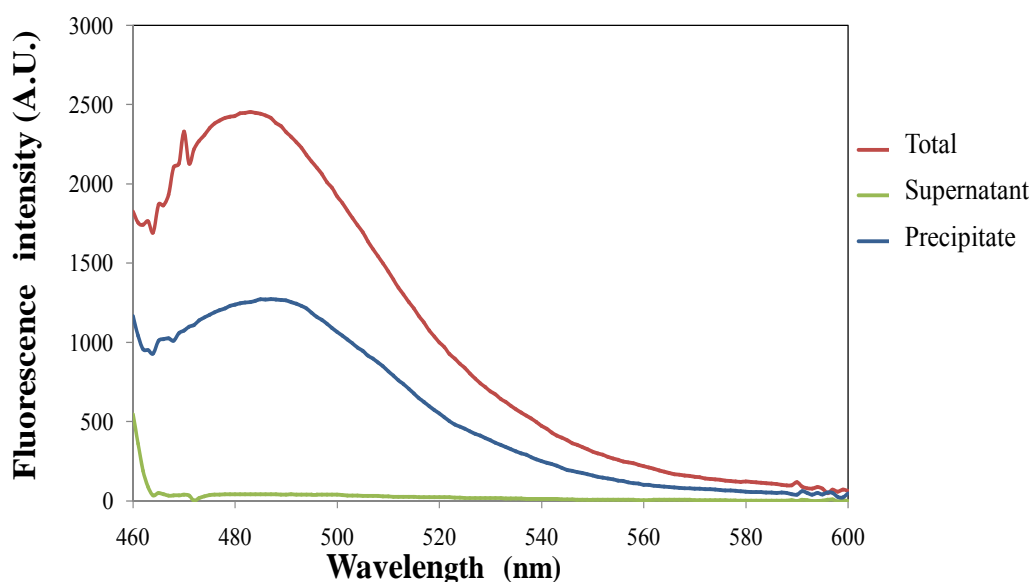


Fig. 3-1 HEWL アミロイド線維の超遠心後の THT による蛍光強度測定

III-3-3 HEWL アミロイド線維の超遠心後の円二色性 CD スペクトル

による二次構造の測定

THT による蛍光強度測定にて沈澱画分に蛍光強度の増加が確認できたので、次に CD スペクトルによる二次構造の解析を行った。Fig. 3-2 に示した結果より遠心前のサンプルは、CD スペクトルにおいては 208nm, 222nm 付近に負の極大ピークが確認できるだけで、典型的な β シート構造を示す 216nm 付近にはピークが確認できなかった。超遠心後の上澄みサンプルは二次構造のスペクトルが認められなかった。しかし一方で、超遠心後の沈殿画分のサンプルを測定すると β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できた。以上の結果から CD スペクトルにおいても THT の結果と一致して、アミロイド線維は沈澱画分に収集されると考えられる。次に TEM を用いてアミロイド線維の直接観察を行った。

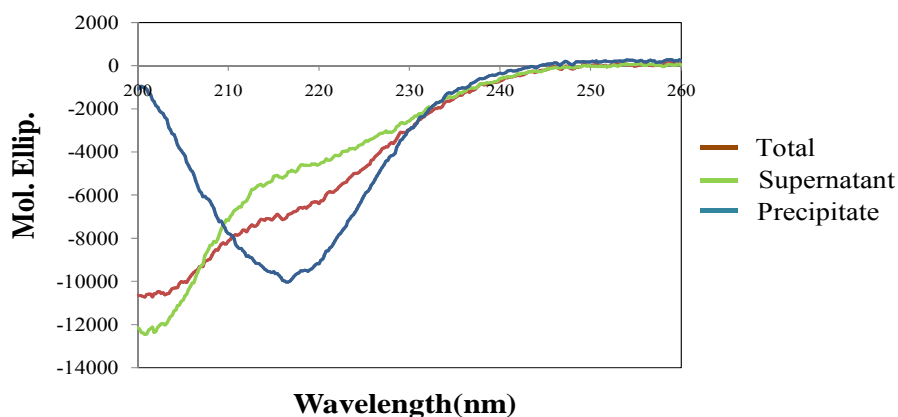


Fig. 3-2 HEWL アミロイド線維の超遠心後の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

III-3-4 HEWL アミロイド線維の超遠心後の TEM による形態観察

THT による蛍光強度測定および CD スペクトルによる二次構造の解析の結果よりアミロイド線維は沈澱画分に回収されていると予想されたので、TEM による線維観察を行った。まず始めに上清画分にはアミロイド線維は全く観察できず、不定形の凝集体が確認できた (Fig. 3-3)。一方、沈澱画分には多量のアミロイド線維が確認できた。以上の結果から、超遠心を行うことにより、沈澱画分にアミロイド線維が観察された。またシーズを添加してない HEWL を高温・酸性条件下においてアミロイド線維を形成させると、アミロイド線維と凝集体が混合したものとなり、非常にヘテロジェネシティが高いことがわかった。

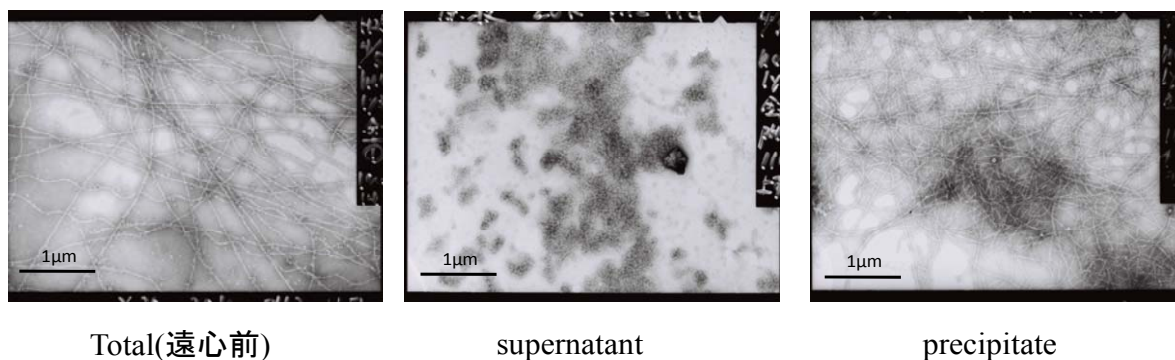


Fig. 3-3 HEWL アミロイド線維の超遠心後の TEM による形態観察

III-3-5 HEWL アミロイド線維の超遠心後の Tricine/ SDS-PAGE によ

る解析

Tricine/SDS-PAGE の結果より上澄み画分には、3.5～6 kDa に加水分解されたペプチド断片が確認できた。特に 6kDa および 4kDa 付近に濃いバンドが確認できる。14.3kDa 以下は、バンドがスメアになっている。沈澱画分においては、6kDa 付近に濃いバンドが確認できる。TEM の線維観察において、アミロイド線維が確認でき、CD スペクトルにおいても β 構造をとっていたため、この結果より HEWL がペプチドまで加水分解することによって線維形成されていることがわかった。

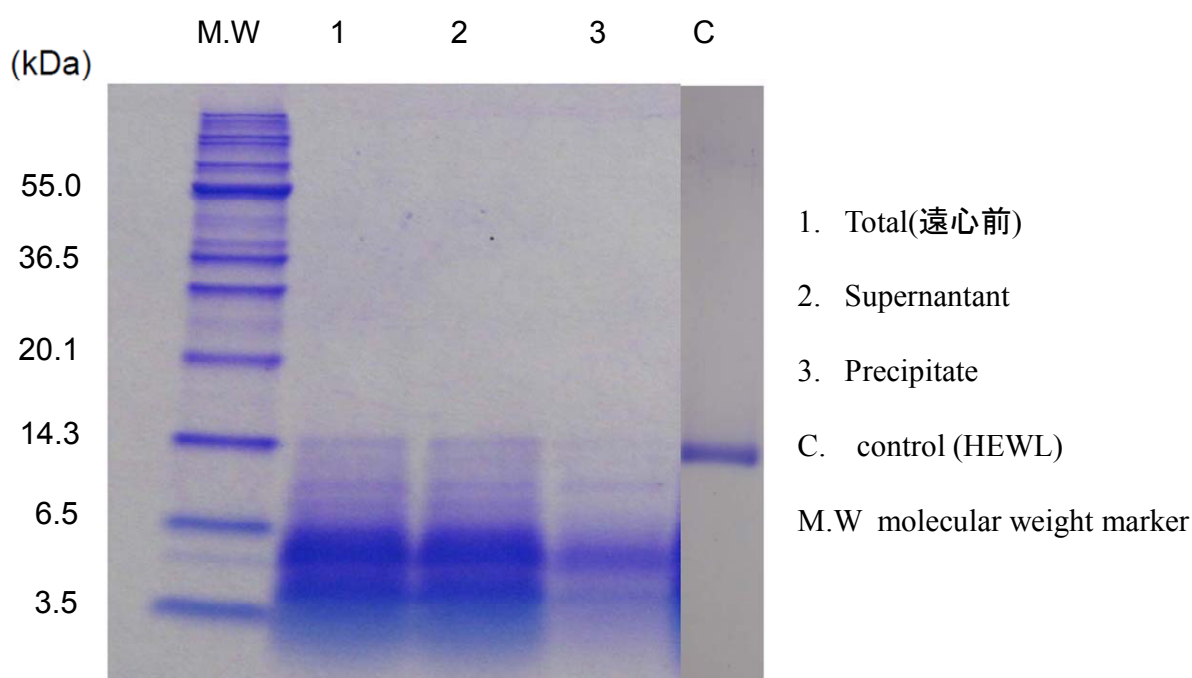


Fig. 3-4 HEWL アミロイド線維の超遠心後の Tricine/SDS-PAGE による解析

III-4 考察

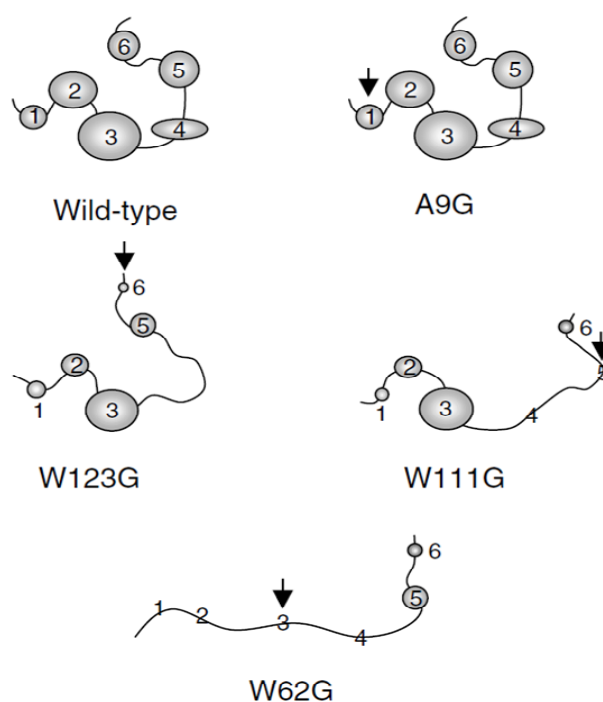
HEWL を酸性・高温条件化におきアミロイド線維を形成した場合のサンプルを超遠心することによりアミロイド線維の定量実験を行った。まず始めにアミロイド線維を形成したサンプルを 60,000rpm・5 時間にて超遠心を行ない、遠心を行なう前のサンプルと、超遠心後の上清と沈殿画分の OD₂₈₀ の吸光度測定を行った。タンパク量をそれぞれ算出し、超遠心前は、10.94mg 上清画分は、7.3mg、沈殿画分は 1.6mg となった。続いて、上清画分を原液にてサンプル調製を行い TEM にて線維観察をおこなったがアミロイド線維は全く観察できず、不定形の凝集体が確認できた。さらに、この上清を用いて Tricine/SDS-PAGE (Fig. 3-4) を行うと HEWL 全長がペプチド断片まで分解されていることが確認できたため、この結果とあわせて考察すると、HEWL が高温・酸加水分解され、それによってできたペプチド断片がペプチド分子間で相互作用をおこし amorphous な凝集体を形成している可能性が推察された。THT による蛍光強度測定と CD スペクトルによる二次構造解析においても上清画分は、超遠心前のサンプルと比較すると蛍光強度の増加は認められず、 β シート構造も確認できなかったため、この凝集体はアミロイド線維とは異なるものであることが示唆された。

また OD₂₈₀ の結果からタンパク量が 7.3mg であったため、上澄み画分には多くの凝集体が形成されていると考えられた。一方で沈殿画分は、TEM による線維観察を行なうとアミロイド線維様を観察することができた。THT 蛍光強度測定においても、485nm 付近に蛍光ピークを示し、CD スペクトル測定の結果からも β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できたため、超遠心によって、沈殿画分にアミロイド線維が沈殿していることが確認できた。また、沈殿画分の Tricine/SDS-PAGE においても加水分解によって、HEWL 全長がペプチド断片まで分解されていることが確認できたので、高温・酸加水分解されることによってアミロイド線維が形成されることがわかった。しかし、Tricine/SDS-PAGE の結果および OD₂₈₀ のタンパク量の測定から沈殿画分には 1.6mg と全タンパク量の 10.94mg から約 14.6%のアミロイド線維しか形成されていないため、この条件下ではアミロイド線維形成効率は高くないことが示された。以上の結果より HEWL を高温・酸性条件下においてアミロイド線維を形成させると、アミロイド線維と不規則・不定形の凝集体が混合して形成され、非常にヘテロジェネシティが高いことが確認できた。また、HEWL 全長がペプチド断片まで分解されてアミロイド線維が形成されることがわかった。そこで次章にて、我々の研究室にて同定された(24)アミロイド線維形成コア領域と考えられるペプチドのアミロイド線維形成における重要性を調べた。

第四章 HEWL- K peptide によるアミロイド線維形成の検討

IV-1 緒論

HEWL は II の結果のように一般的に高温・酸性条件下でアミロイド線維を形成することが知られているが、4つのジスルフィド結合を還元するか、あるいはすべての Cys を Ala に変異させることでもアミロイド線維を形成できることがわかっている (17-18)。Fig. 4-1 のように、還元アルキル化によりすべての SS 結合を消失させ 1 本鎖にしたリゾチームは疎水性残基からなるクラスターが 6 つ存在する。この変性状態の場合、8M 尿素中でさえもクラスター形成が確認されている。(変性状態でも二次構造を保持している)しかし、三番目のクラスターにある Trp62 をグリシンに置換すると (W62G) 変性構造が破壊されアミロイド線維が形成されなくなることが報告されており、Trp62 がアミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることがわかっている (17-18)。さらに HEWL は 49-101 領域の 52 残基でのアミロイド線維形成領域が同定されており、この領域が HEWL のアミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている (15)。

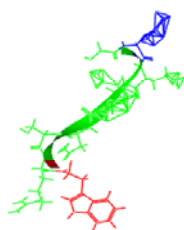
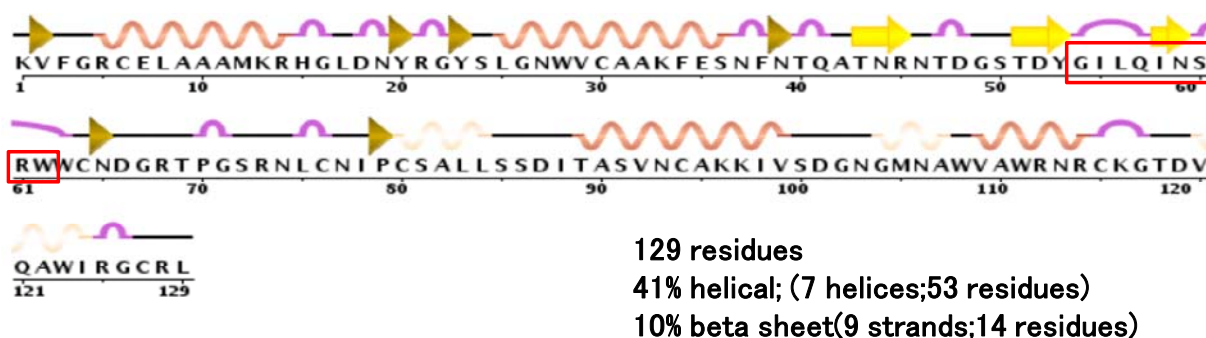


Mishima et al. BBRC(2007)

Fig. 4-1 Wild-type および変異体 HEWL の還元アルキル化中の構造

IV-2 HEWL および K peptide のアミノ酸配列

IV-1 で説明したように、HEWL のアミロイド線維形成には Trp62 がアミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることがわかっているが最近、我々の研究室にてアミロイド形成コア領域と予想される Trp62 を含む 9 残基からなる peptide (54G-62W) を精製した (赤で囲んだ領域) (24)。この peptide はトリプシン・キモトリプシン分解物から精製された 9 残基の peptide であり、疎水性のアミノ酸残基が多く強い自己凝集作用をもつことが特徴である (24)。第四章ではこの 9 つのアミノ酸残基からなる peptide (HEWL-K peptide) を用いてアミロイド線維形成条件の検討を行った。またさらにコア領域におけるアミノ酸残基の重要性、すなわちアミロイド線維形成においてどのアミノ酸残基が重要であるかということの詳細に検討した。



GILQINSRW(54-62)

K-peptide containing 62W from hen lysozyme

Fig. 4-2 HEWL アミノ酸配列

IV-3 実験方法と材料

IV-3-1 合成ペプチドのデザイン

HEWL の 54th から 62th アミノ酸残基 HEWL54-62 (GILQINSRW) の 9 残基のペプチド (K peptide) およびポジティブ control として HEWL50-62 (STDYGILQINSRW) を合成し実験に使用した。また、K peptide のアミロイド線維形成にどのアミノ酸残基が重要であるかを調べるために K peptide の derivatives peptide (以下 6 つのペプチド) を用いた。

HEWL55-62 (ILQINSRW), HEWL56-62 (LQINSRW), HEWL54-61 (GILQINSR), HEWL54-60 (GILQINS), HEWL56-64 (GILQINSRG), HEWL56-64 (GILQINSGW) を用いた。

IV-3-2 HEWL-K peptide によるアミロイド線維形成方法

各ペプチドを dimethyl sulfoxide (DMSO) で 2.5 mg/25 μ l (100 mg/ml) にとかし stock solution を調製した。Stock solution は pre aggregation を防ぐため毎回調製した。20 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0), 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0), 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に f.c 2 mg/ml になるように溶解する (サンプルを調製したときに DMSO の f.c が 0.1% になるようにする)。37°C に静置してインキュベーション (SANYO incubater L002-84) した。

IV-3-3 HEWL-K peptide のアミロイド線維形成量の検討

K peptide stock solution を用いて 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) にペプチドが f.c 2 mg/ml になるように溶解した。(サンプルを調製したときに DMSO の終濃度が 0.1% になるようにする) 調製したサンプルを 37°C で 14 日間 incubation しアミロイド線維を形成させ、これを seeds として使用した。(seeds 調製の条件は II-2-1 を参照) 断片化した seeds を f.c 20 mM acetate buffer (pH 4.0) に溶解した K peptide (f.c 2 mg/ml) に 2% (v/v) 添加した。37°C で 7 日間 incubation し、その後、超遠心分離をおこなった。タンパク濃度の測定は、OD₂₈₀ nm 時の吸光係数を用いた。超遠心分離機は、optima-TL を用い 60,000 rpm (150,000g) 4°C 5 時間おこなった。

IV-3-4 OD₂₈₀の吸光係数の測定によるタンパク濃度の決定

遠心分離したサンプルの上清と沈澱の OD₂₈₀ を測定しタンパク濃度を決定した。超遠心前のサンプルは 20 mM acetate buffer (pH 4.0) で 50 倍希釈し、OD₂₈₀ を測定後タンパク濃度を決定した。遠心後の沈澱は 20 mM acetate buffer (pH 4.0) を 200 μ l 添加し、ボルテックスでよく攪拌して懸濁した。懸濁した溶液を 20 mM acetate buffer (pH 4.0) で 50 倍希釈し、上清は 25 倍希釈して OD₂₈₀ を測定後タンパク濃度を決定した

IV-3-5 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM・AFM による形態観察

アミロイド線維を形成した各サンプルを THT による蛍光強度測定、CD スペクトルによる二次構造の解析、TEM および AFM による線維観察を行い比較検討を行った。測定はそれぞれ II-2-2~5 に記載した方法で行った。

IV-3-6 ANS を用いた蛍光スペクトル測定

20 mM glycine-HCl buffer (pH 2.2) に ANS を終濃度 100 μ M になるように調製して ANS 溶液を作製する。タンパク量は 80 μ g/ml で測定する。(Corona microplate reader fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Japan) を用いて測定を行った。96well マイクロプレートリーダー (costor 社) に 200 μ l ずつ分注して測定を行い time course をとった。測定条件は、励起 380nm で行い蛍光スペクトル 400 ~600nm、半値幅 5nm 測定感度 x10 温度 25°C で行った (25)。

IV-3-7 トリプトファン残基の蛍光スペクトル測定

20 mM glycine-HCl buffer (pH 2.2) に タンパク量を終濃度 $80 \mu\text{g/ml}$ になるように調製して測定する。測定条件は、励起 295nm で行い蛍光スペクトル 320~440nm、半値幅 5nm 測定感度 $\times 10$ 温度 25°C で行った(25)。

IV-3-8 アクリルアミドを用いたトリプトファン残基の蛍光強度

Quenching 実験

20 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.0) に タンパク量を終濃度 $80 \mu\text{g/ml}$ になるように調製した。そこに 10mM 2-(N)-cyclohexylamino-ethanesulfonic acid (CHES)-NaOH (pH 9.0) にとかしたアクリルアミドを終濃度 0~0.5M それぞれ分注して、よく混ぜ、遮光して 5 分室温でインキュベートする。その後、励起 295nm で蛍光スペクトル測定を 320~440nm で行い、半値幅 5nm 測定感度 $\times 10$ 温度 25°C の条件を用いて行った。Quenching data は Stern-Volmer equation(25)で分析した。

IV-4 結果

IV-4-1 HEWL- K peptide によるアミロイド線維形成

Fig. 4-3 は、HEWL のアミロイド線維形成コア領域と考えられる K peptide を用いて線維形成実験を行なったものである。K peptide を酸性・中性・アルカリ性の buffer にそれぞれ溶解し 37°Cにて静置 incubation した場合、K peptide は、酸性条件 (pH 4.0)にて7日で多量に線維化することがわかった。さらに pH を上げて pH 2.0 で incubation をおこなった場合ほとんど線維化は確認できなかった。中性条件においては、20 mM の Phosphate Buffer (pH 7.0)に溶解すると、すぐに凝集し線維化した。pH 4.0 にて形成された線維と比較すると線維量は少なく、線維の長さも短いことが TEM 観察より確認できた。さらに興味深いことは、線維中に amorphous (非特異的)な凝集体が混在していることである。中性条件の場合、線維形成と同時に非特異的な凝集もおこっていることがこの結果より示唆される。アルカリ性 pH 9.0 の条件にした場合線維化は確認できず amorphous な凝集体のみが観察された。以上の結果より K peptide は pH 4.0 にてもっともきれいに線維化することが示唆された。

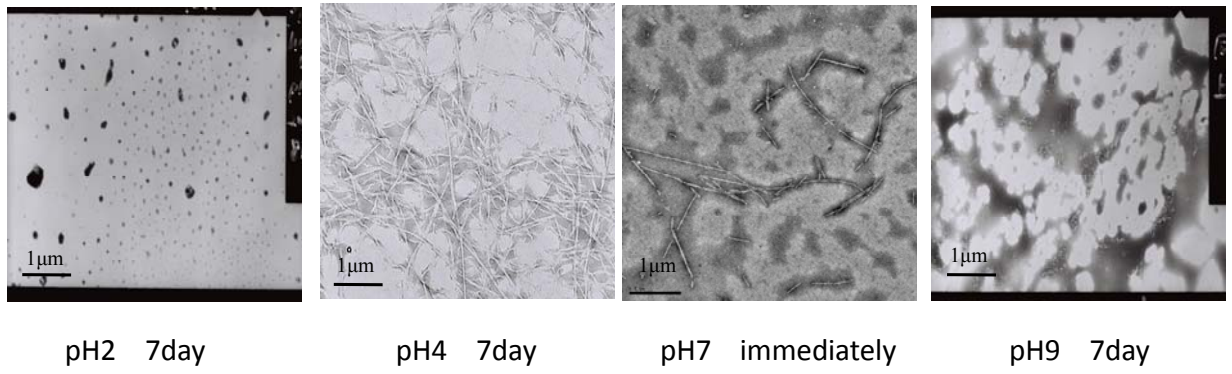


Fig. 4-3 HEWL- K peptide によるアミロイド線維形成

IV-4-2 HEWL-K peptide 変異体によるアミロイド線維形成

K peptide は酸性条件にて線維化することがわかったので、つぎにどの K peptide のアミノ酸残基がアミロイド線維形成には重要であるかを調べるために K peptide の変異体を合成し実験に使用した。Table. 1-3 の結果は、K peptide に 4 残基付加させた 13 残基のペプチド (STDY-K peptide) をポジティブコントロールに、C 末・N 末側から欠損あるいは、置換させた合成ペプチドをサンプル調製して、1 週間 37°C で incubation し電顕観察を行い線維形成量を比較したものである。STDY-K peptide は、親水性の増強により、buffer への溶解度を上げ、速い非特異的な凝集体形成を抑え、特異的なアミロイド線維への規則的な凝集反応を促進できると考え用いることとした。K peptide においては pH 4.0 にて最も線維化することが確認できた。K peptide の N 末端側に 4 残基付加した 13 残基のペプチドも同様に酸性条件にて線維化をした。このペプチドは、K peptide よりも容易に短時間で線維化した。次に K peptide のアミノ酸を欠損・あるいは置換したペプチドについて検討を行なった。まずは C 末端側の Trp62 をグリシンに置換した。すると線維がほとんど形成されなくなった。また、N 末端・C 末端側からアミノ酸残基を欠損させたもの、Trp62 あるいはアルギニンのアミノ酸をそれぞれ置換させたペプチドに関しても、ほとんど線維化は認められなかった。以上の結果より、K peptide は線維形成の必須領域であり core 領域であると考えられた。また Trp62 がアミロイド線維形成に重要であるという過去の文献から、特に Trp62 に着目し、STDY-K peptide 及び K peptide の Trp62 をグリシンに置換させたペプチドを用いて、線維形成が認められる pH 4.0 の条件にて、TEM・AFM・THT・CD スペクトルによる解析を行い、それぞれさらに詳細な比較検討をおこなった。(HEWL 全長で形成したアミロイド線維も同時に比較した)。

Table. 1-3 HEWL-K peptide変異体によるアミロイド線維形成

等電点	Peptide name	pH2	pH4	pH7	pH9
6.5	STDYGILQINSRW	+++ (G)	++ (G)	-	-
11.0	K GILQINSRW	+-	++ (G)	+(A)	+- (A)
9.9	1 GILQINSRY	-	-	-(L)	+- (A)
6.1	2 GILQINSRW	+	+	-(A)	-(A)
11.0	3 GILQINSR	-	+-	-(A)	-(L)
6.1	4 GILQINS	-	-(L)	-(L)	-
11.0	5 ILQINSRW	-	+	+- (A)	+- (A)
11.1	6 LQINSRW	-	-	-(L)	-(L)

線維量 非常に多い 60~100% +++ 多い 30~60% ++ 少しある 5~30% +
 ほとんどない 5%以下 +- ない 0% -
溶液の物性 (G) ゲル化 (A) 凝集 (L)少量の凝集

IV-4-3 HEWL-K peptide および変異体のアミロイド線維の THT によ

る蛍光強度測定

Fig. 4-4 は、アミロイド線維と特異的に反応する THT による蛍光強度測定の結果である HEWL の場合、lag time が非常に長く 10 日以降に THT の蛍光強度が増加し、TEM おいても線維形成が確認できる。線維が形成されるまで lag time がある理由としてアミロイドの形成反応は、核形成と伸長反応の二段階からなり、核形成に非常に時間がかかるため lag time が長くなる。しかし、核が形成されると伸長反応が加速度的に進むためこのような結果になる。一方で、アミロイド形成のコア領域と思われる K peptide の領域を含む STDY-K peptide の場合、HEWL に比べて、コア領域が表面上にでているため、ペプチド同士での相互作用がおこりやすく、lag time がほとんどなくアミロイド線維が形成されたためと考えられる。K peptide の場合においては、THT の蛍光強度は、多少 lag time はあるものの 4 日で上昇した。TEM の結果で、7 日で線維化が確認できた。Trp62 をグリシンに置換した場合のペプチドにおいては、1 カ月以上 incubate しても THT の蛍光強度の増加が認められなかった。なお、STDY-K peptide を control として用いた理由は、前述の疎水性の高い K peptide に比べ、COO⁻や OH という親水基をもつアミノ酸 4 残基を付加することにより、ペプチド全体がより親水性を獲得すると考えたからである。親水性の増強により buffer 溶液への溶解度が増し、不規則な疎水的相互作用による非特異的な不定形凝集体形成が減少し、結果的に規則的なアミロイド線維形成が促進されるものと予想した。

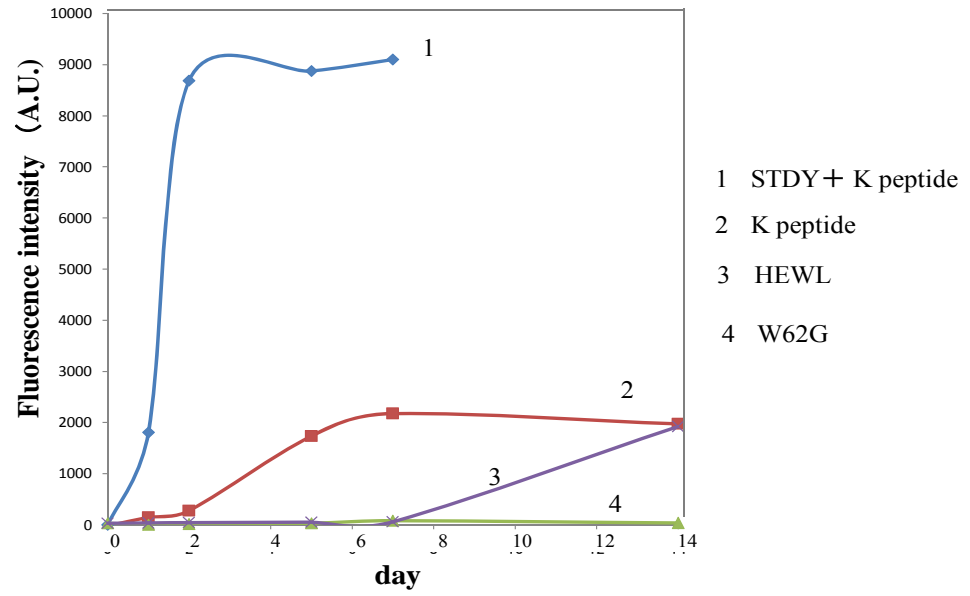


Fig. 4-4 HEWL-K peptide および変異体のアミロイド線維の THT による蛍光強度測定

IV-4-4 HEWL-K peptide および変異体のアミロイド線維の円二色性

CD スペクトルによる二次構造の測定

Fig. 4-5 は、CD スペクトルによる二次構造の解析の結果である。HEWL の場合、Fig. 2-2 が示すように 0 日目は、208nm 付近で負の極大を示しているが、日数が経過するにつれて短波長側にスペクトルが shift していくことが確認できた。一方、K peptide の場合、CD スペクトルにおいて、0 日目は、構造をとっていないが、1 週間後に 216nm に負のピークをとり β シート構造をとっていることが確認できる。これにより、アミロイド線維が形成されていることが示唆される。また 230nm 付近に特徴的な正のピークが観察された。これは、アミロイド線維において Trp62 が aromatic-stacking している可能性を示唆している。またポジティブコントロールである 13 残基の peptide の場合も同様の結果であると考えられる。最後に Trp62 をグリシンに置換させたペプチドの場合、THT では、蛍光強度の増加が確認できず CD スペクトルにおいても 14 日まで測定してシグナルがみとめられなかった。

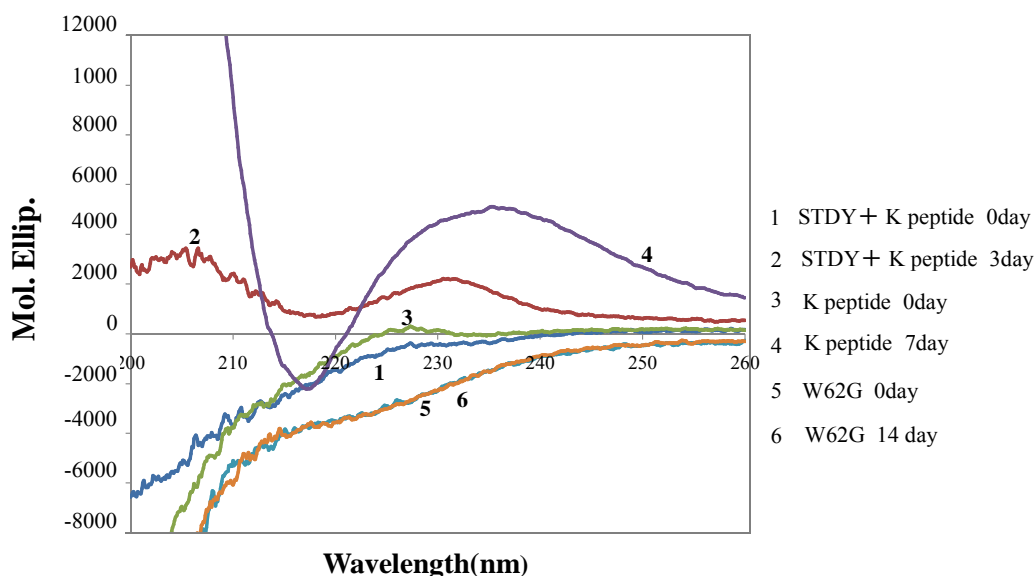


Fig. 4-5 HEWL-K peptide および変異体アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

IV-4-5 HEWL-K peptide および変異体アミロイド線維の TEM と AFM

を用いた形態観察

Fig. 4-6 は、TEM と AFM による線維観察の結果である。HEWL 全長を 58°C pH 2.0 で 10 日 インキュベーションすると細長い線維が確認できた。一方で K peptide の場合 37°C pH 4.0 で 1 週間インキュベーションすると全長で形成した線維よりも非常に剛直な線維が形成されることがわかった。STDY-K peptide の場合は、3 日で容易に線維化することが確認された。また全長、K peptide の線維と比較して線維の形状は似ているが短いことがわかった。最後に Trp62 をグリシンに置換した場合、アミロイド線維が形成されなかった。これは、THT で蛍光強度の値がみられないことと CD スペクトルにおいて二次構造のスペクトルがみられなかった結果と一致していた。

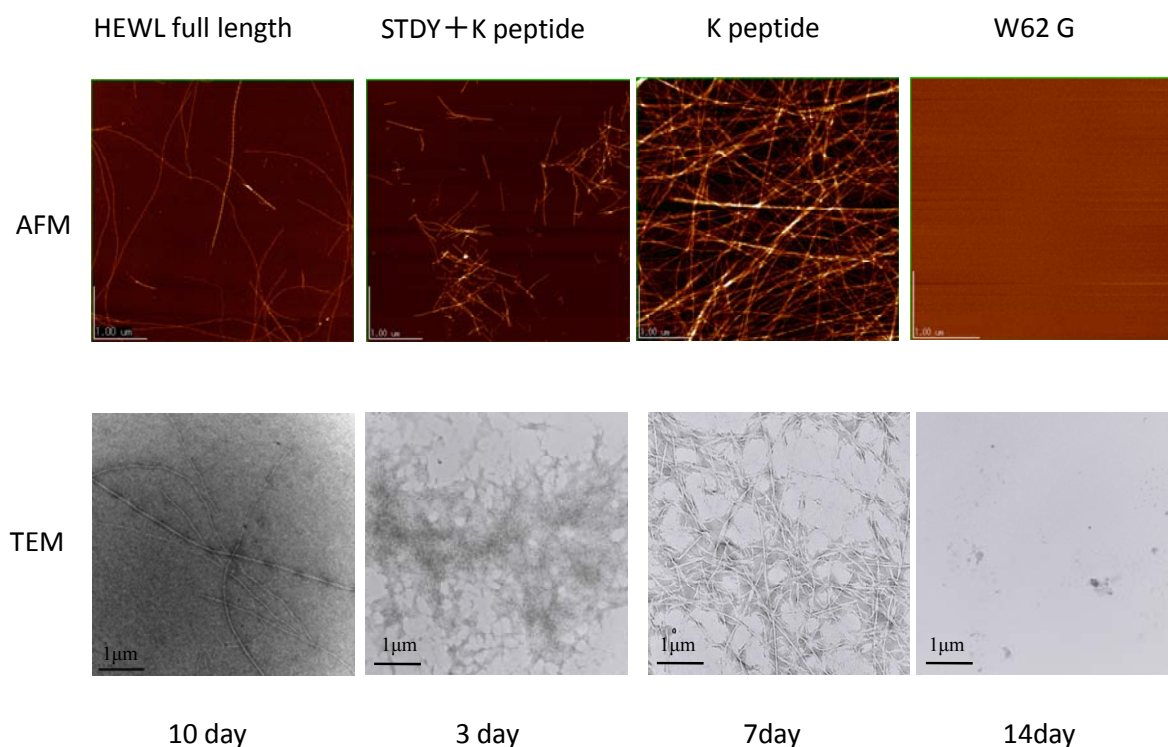


Fig. 4-6 HEWL-K peptide および変異体アミロイド線維の TEM と AFM を用いた形態観察

IV-4-6 HEWL- K peptide アミロイド線維形成中の ANS を用いた蛍

光スペクトル測定

Fig. 4-7 は、K peptide を用いて pH 4.0 にてアミロイド線維を形成させたときの線維の構造変化を ANS による結合アッセイにて測定した結果である。線維形成が 4 日、7 日、14 日と徐々に進んでいくと蛍光スペクトルが短波長側にシフトしているため形成された線維の表面疎水性があがっていることが推察される。これは、線維が形成される間にトリプトファン以外の疎水性アミノ酸が表面上にさらされ表面疎水性が上がったため、ANS が結合してスペクトルが短波長側にシフトしたと推察された。

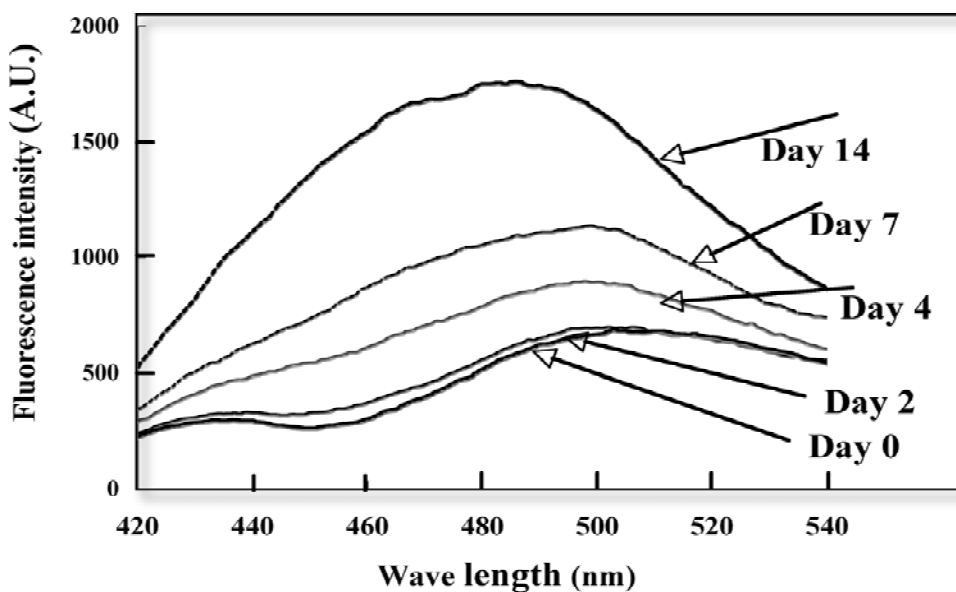


Fig. 4-7 HEWL- K peptide アミロイド線維形成中 ANS を用いた蛍光スペクトル測定

IV-4-7 HEWL-K peptide アミロイド線維形成中のトリプトファン

残基の蛍光強度の変化

今までの結果より K peptide は、線維形成されていくときに Trp62 が aromatic stacking することによって線維形成しているということが示唆されているのでトリプトファン残基の蛍光強度測定を行うことにより、アミロイド形成時のトリプトファン残基周辺の環境を調べた。Fig. 4-8 の結果から、線維形成されていくと、徐々に、蛍光スペクトルが短波長側にシフトしているのが確認できる。これは、トリプトファン残基周辺の環境が非極性側の環境に移ったためこのような結果になったと考えられた。

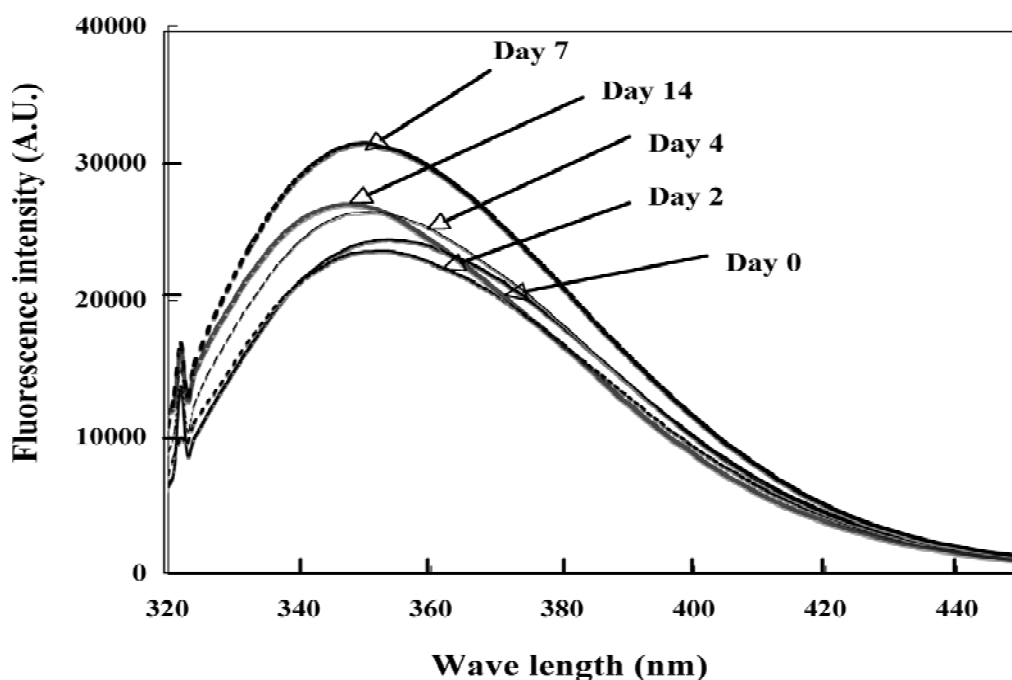


Fig. 4-8 HEWL-K peptide アミロイド線維形成中のトリプトファン残基の蛍光強度の変化

IV-4-8 アクリルアミドを用いたトリプトファン残基蛍光の

Quenching 実験

Fig. 4-9 は、アクリルアミドによるトリプトファン蛍光の消光実験の結果である。この実験は、アクリルアミドを加えていくことにより、トリプトワンの蛍光を quenching し、蛍光強度の強さを測定する実験である。アミロイドが形成されていない、Day 0 日目の場合は、低濃度のアクリルアミドでトリプトワンの蛍光は quenching されている。しかし、アミロイドが形成された Day 7 日目では、トリプトファンが非極性側に移って、トリプトワンの蛍光強度が上がっている。そのため、トリプトワンの蛍光をクエンチングするためには、より高濃度のアクリルアミドが必要となり Fig. 4-9 のような結果になったと考えられた。

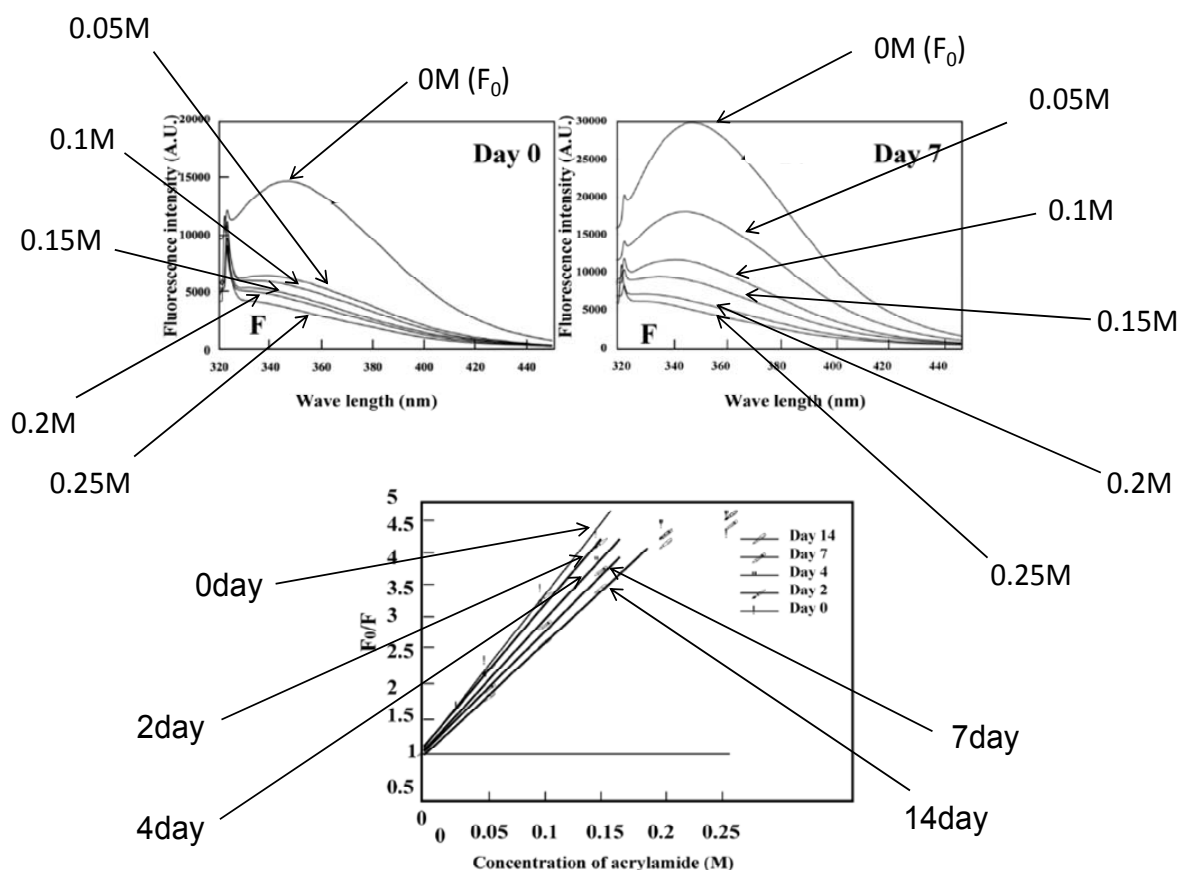


Fig. 4-9 アクリルアミドを用いたトリプトファン残基蛍光の Quenching 実験

IV-4-9 HEWL-K peptide アミロイド線維形成量の測定

HEWL-K peptide の 1mg/ml 溶液の OD₂₈₀ は、5.06 と計算される。Table.1-4 の結果は HEWL-K peptide のアミロイド線維のサンプルを超速心にかけて上澄みと沈澱にわけ適宜希釈して測定を行いアミロイド線維形成量を算出した結果である。

Table.1-2 の結果から上澄み画分は、総タンパク量が 1.08mg であった。一方で沈澱画分は、総タンパク量が 0.65mg となり以上の結果より HEWL-K peptide を酸性条件下 (pH4.0) で incubation し、アミロイド線維を作製した場合、全タンパク量から約 40%のアミロイド線維が形成されていることが示唆された。

Table.1-4 HEWL-K peptide アミロイド線維形成量

	蛋白濃度 (mg/ml)	容量 (ml)	総蛋白量 (mg)
Total (K-pep)	1.72mg/ml	1ml	1.72mg
Surpernatant	1.08mg/ml	1ml	1.08mg
Precipitate	3.25mg/ml	0.2ml	0.65mg

IV-4-10 HEWL-K peptide アミロイド線維の 超遠心後サンプルの

円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

Fig. 4-11 は、K peptide にてアミロイド線維を形成させ、超遠心後のサンプルを CD スペクトルによる二次構造の解析を行ったものである。結果より遠心前のサンプルは、典型的な β シート構造を示す 216nm 付近にはピークが確認できた。また、超遠心後の沈殿画分のサンプルにおいても β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できた。これは、超遠心によって、アミロイド線維が沈殿画分に濃縮されているためと考えられる。一方で上澄み画分は二次構造のピークが認められなかった。以上の結果から沈殿画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆できる。よって次に TEM を用いてアミロイド線維の直接観察を行った。

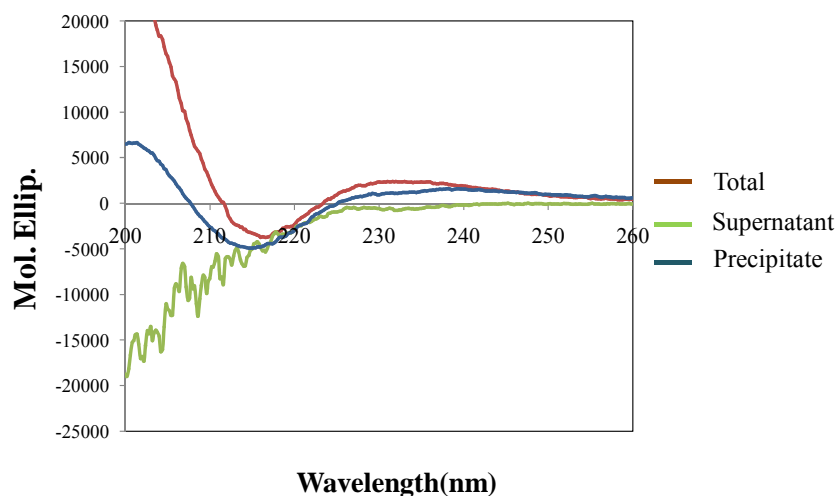


Fig. 4-11 HEWL-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

IV-4-11 HEWL-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM

による形態観察

CD スペクトルによる二次構造の解析の結果にて沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆されたので、TEM による線維観察を行った。まず始めに上清画分を原液にてサンプル調製を行い TEM にて線維観察をおこなった。その結果、短いアミロイド線維が少量観察された。一方で沈澱画分には、10 倍希釈のサンプルで、多量の長いアミロイド線維が確認できた。amorphous 凝集体はほとんど確認できなかった。上澄み画分に短い線維が残っているが、CD スペクトルの結果において二次構造のピークがみとめられないので、非常に少量の線維のみが上澄み画分に残っていると結果から示唆された (Fig. 4-12)。

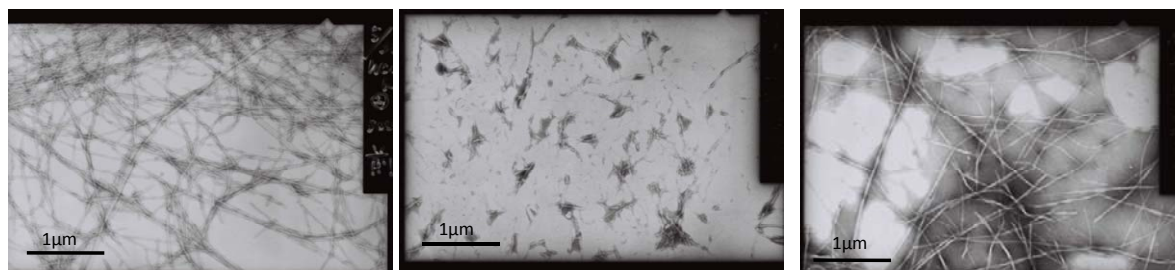


Fig. 4-12 HEWL-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM による形態観察

IV-5 考察

HEWL のアミロイド線維形成には Trp62 がアミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることが過去の文献よりわかっている。今回、我々の研究室にてアミロイド形成コア領域と予想されるトリプトファンを含む 9 つのアミノ酸残基からなる peptide (54-62) を合成した。本章では、K peptide のアミロイド線維形成条件を探り、この 9 残基のペプチド領域がアミロイド線維形成にどのように関与しているか詳細に検討をおこなった。また、アミロイド線維形成において、ペプチド領域のどのアミノ酸残基が重要であるか検討した。まずはじめに、K peptide のアミロイド形成条件を検討した。K peptide を酸性・中性・アルカリ性の buffer にそれぞれ溶解し 37°C にて静置 incubation した場合、K peptide は、酸性条件 (pH4) にて多量に線維化することがわかった。THT の蛍光強度測定においても 4 日以降に蛍光強度の増加がみられ、同時に CD スペクトルにおいても 216nm 付近に負のピークが確認でき β シート構造をとっていることがわかった。また、230nm 付近に特徴的なポジティブなピークが観察され、これは Trp62 がペプチド分子を寄せ集める、driving force になって Trp62 が aromatic stacking することによってアミロイド線維を形成している可能性があるかと推察された。また超遠心によるアミロイド線維の回収実験により全ペプチドの約 40% のペプチドがアミロイド線維を形成することがわかった。また K peptide のアミノ酸を欠損・あるいは置換したペプチドについても検討を行なった。C 末端側の Trp62 をグリシンに置換した場合、THT、CD スペクトル TEM による線維観察より線維がほとんど形成されないことがわかった。これは、変異体リゾチームを用いた過去の報告 (W62G を置換した場合) と一致する (17)。また、N 末端・C 末端側からアミノ酸残基を欠損させたものあるいはアミノ酸をそれぞれ置換させたペプチドに関しても、同様に線維化は認められなかった。以上の結果より、Trp62 は HEWL のアミロイド線維形成に重要なアミノ酸であることを確認した。また 9 残基をさらに削ったものや変異させたものは線維を形成しないことからこの領域がアミロイド線維形成コア領域であると結論づけた。

第五章 Human-lysozyme 由来 K peptide におけるアミロイド線維形

成の検討

V-1 緒論

第四章の結果より HEWL- K peptide が、アミロイド線維形成コア領域であることが示唆された。Human-lysozyme は、HEWL とアミノ酸配列で約 60%の相同性を示すので、同じ K peptide の領域がアミロイド線維形成コア領域である可能性が高いと予想される。そこで、Human-lysozyme のアミノ酸配列からアミロイド線維を形成しやすいアミノ酸領域を予想する prediction soft である walts(<http://waltz.switchlab.org/>)を用いて、アミロイド線維形成領域の予想を行った。すると、K peptide よりも 2 残基短い(53G-59S) 7 残基の領域がアミロイド線維を形成する可能性が高い領域と予想され、HEWL- K peptide の領域を含んでいた。そこで、まずは、Human-lysozyme 由来 K peptide(53G-61Y)を合成し、この 9 残基の peptide が HEWL-K peptide の場合と同様に線維形成能を有しているかアミロイド線維形成条件を検討した。

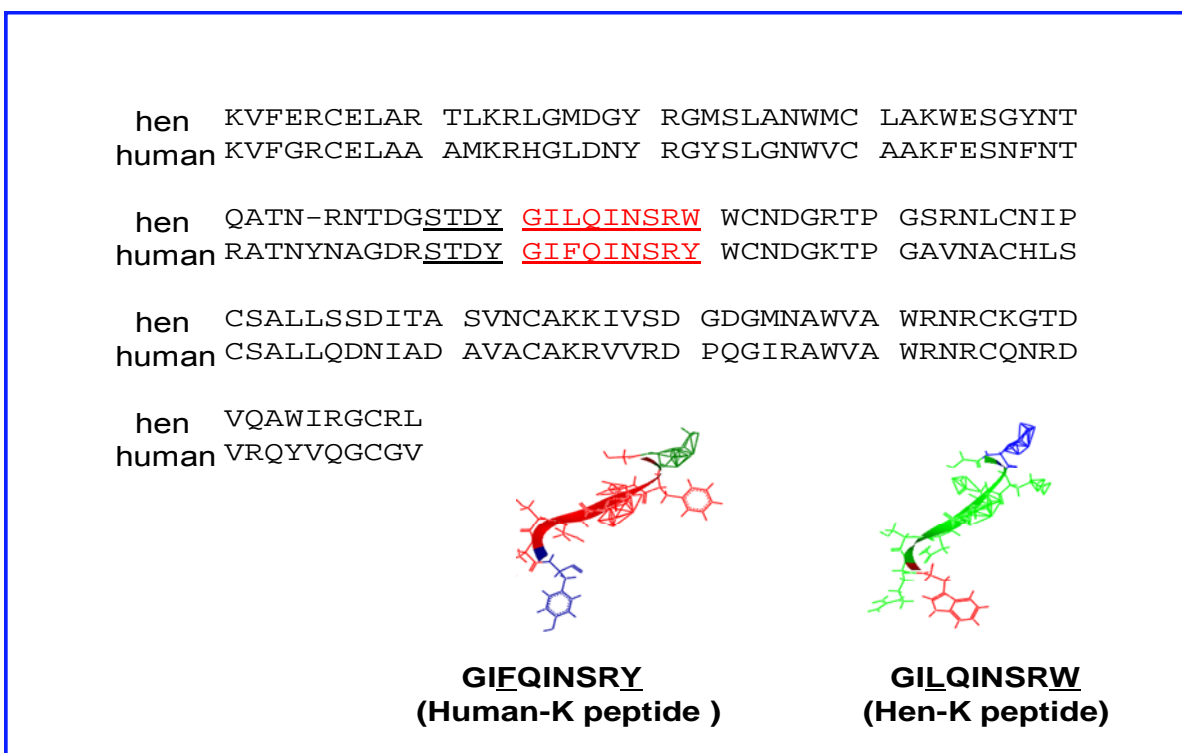


Fig. 5-1 HEWL と Human-lysozyme のアミノ酸配列 アライメント

V-2 実験方法と材料

V-2 -1 合成ペプチドのデザイン

Human-lysozyme の 53 番目 から 61 番目の アミノ酸残基 Human-lyz53-62 (GIFQINSRY) の peptide (Human-K peptide) を合成し実験に使用した。

V-2 -2 Human-K peptide のアミロイド線維形成方法

各ペプチドを DMSO で 2.5mg/25 μ l (100mg/ml) に溶解し stock solution を作製した。Stock solution は pre aggregation を防ぐため毎回調製した。

50 mM sodium acetate buffer (pH4.0) に NaCl と Human-K peptide を f.c 50 mM および 2 mg/ml になるように溶解した (サンプルを調製したときに DMSO の f.c が 0.1% になるようにする)。37°C に静置して incubation (SANYO incubater L002-84) した。

V-2 -3 Human-K peptide のアミロイド線維形成促進効果の検討

V-2-2 で調製したペプチドサンプルを 37°C で 14 日間 incubation し、アミロイド線維を形成させ、これを seeds として使用した。Seeds は Branson sonifier250 (超音波ホモジナイザー・セントラル科学貿易) を使用し (II-2-1 参照) sonication することによって作製した。50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) に 50 mM NaCl と K peptide を f.c 2 mg/ml になるように調製し、そこへ seeds を 2 % 添加し (V/V) 37°C で 14 日間 incubation する。

V-2 -4 Human-K peptide のアミロイド線維形成量の検討

V-2 -3 の方法で調製したサンプルを超遠心分離して上澄みと沈殿に分離した。超遠心機は、optima-TL を用い 60,000rpm(150,000g) 4℃で5時間遠心した。遠心分離したサンプルの上清と沈殿の OD₂₈₀ を測定しペプチド濃度を測定した。超遠心前のサンプルは 20 mM acetate buffer (pH 4.0) で 20 倍希釈、上清は原液で測定しペプチド濃度を決定した。沈殿は 20 mM acetate buffer (pH4.0) を 200 μl 添加し、ボルテックスでよく攪拌して懸濁した。懸濁した溶液を 20 mM acetate buffer (pH 4.0) で 40 倍希釈し OD₂₈₀ を測定してペプチド濃度を決定した。

V-2 -5 アミロイド線維の光散乱による測定

FP-6600(日本分光 蛍光光度計)を使用し 2mg/ml の K peptide より生成したアミロイドを 5 倍希釈し、励起および散乱光波長を 350nm にして 25℃で測定した。slit 幅は励起 slit 5nm ・散乱光 slit 2nm でそれぞれ測定した。

V-2 -6 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM による形態観察

アミロイド線維を形成した各サンプルを THT による蛍光強度測定、CD スペクトルによる二次構造の解析、TEM による線維観察を行い比較検討を行った。方法はそれぞれ II-2-2~II-2-5 に記載した方法で行った。

V-3 結果

V-3-1 Human-K peptide アミロイド線維の THT による蛍光強度測定

Fig. 5-2 は、Human-K peptide に NaCl を添加してアミロイド線維を形成させ THT 蛍光強度を測定した結果である。蛍光強度に明確な差は見られないが、日にちの経過によってわずかながら蛍光強度の増加が認められた。一方で、0 日目(ペプチドを buffer に溶かして溶解直後の測定をおこなった。)ですでに蛍光強度の値が確認された。これは、50 mM の NaCl を添加しているため凝集物が、形成されそれによって蛍光強度が増加している可能性が考えられる。よって TEM 観察などその他の手法で確認する必要があると考えられる。

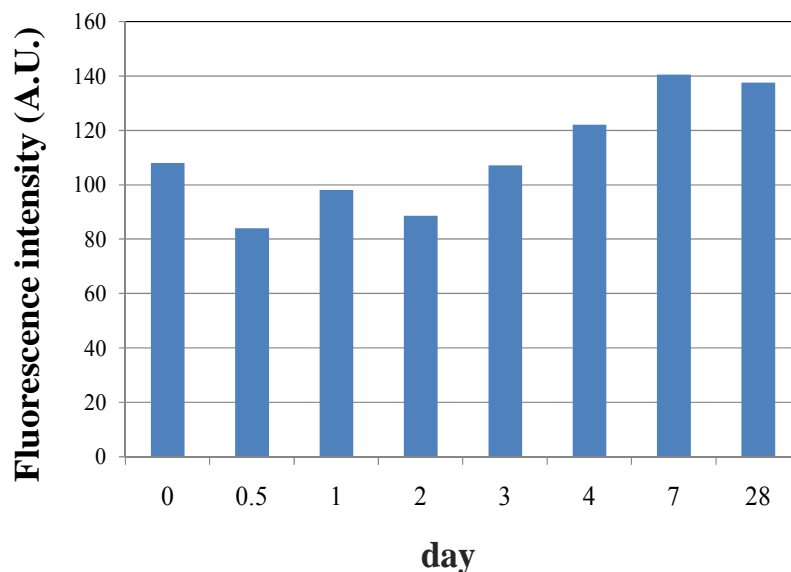


Fig. 5-2 Human-K peptide アミロイド線維の THT による蛍光強度測定

V-3-2 Human-K peptide アミロイド線維の光散乱測定

THT による蛍光強度測定で蛍光強度に明確な差が見られなかったため、光散乱強度測定を行った (Fig. 5-3)。赤の棒グラフが Human-K peptide を添加したもので、青のグラフは K peptide を添加していないサンプルである。結果より、0 日目は、光散乱強度の増加は認められないが、Human-K peptide が添加されている方は、5 日目から蛍光強度の増加がみられる。これより、日にちが経過していくと、アモルファスな凝集物が形成されている可能性が示唆された。しかし、光散乱法を用いた測定のみでは、Human-K peptide がアミロイド線維を形成しているかどうか不明瞭なので、次に、CD スペクトルを用いた二次構造解析をおこなった。

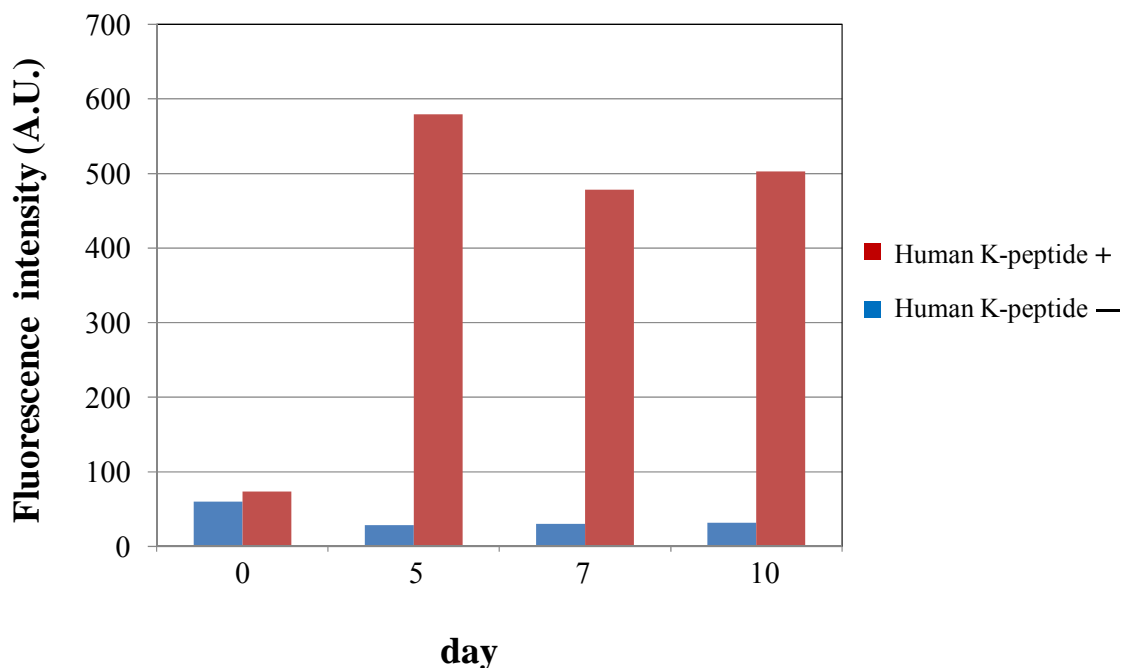


Fig. 5-3 Human-K peptide アミロイド線維の光散乱測定

V-3-3 Human-K peptide アミロイド線維の円二色性 CD スペクトル

ルを用いた二次構造の測定

Fig. 5-4 は、Human-K peptide に NaCl を添加してアミロイド線維を形成させ、CD スペクトルを用いてペプチドの二次構造解析をおこなった結果である。CD スペクトルにおいて、0 日目は、構造をとっていないが、5 日目から次第に構造の変化が認められ、10 日で 216nm 付近に負のピークをとり β シート構造をとっていることが確認できた。この結果により、アミロイド線維が形成されていると推察された。また HEWL-K peptide と異なり、230nm 付近にポジティブな正のピークが確認できず、二次構造のピークに違いがみられた。よって Human-K peptide で形成されたアミロイド線維は、HEWL-K peptide の場合と比較すると線維構造や線維形成メカニズムに相違があることが示唆された。

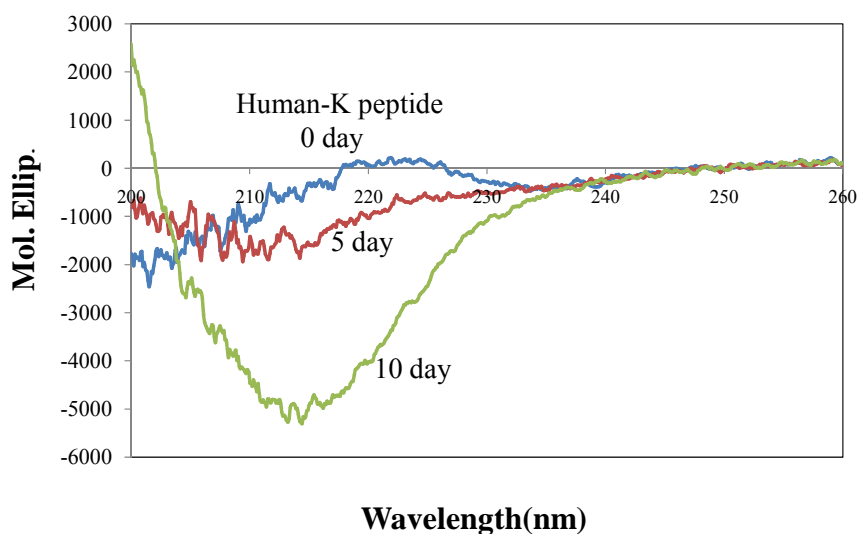


Fig. 5-4 Human-K peptide アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定

V-3-4 Human-K peptide アミロイド線維の TEM による形態観察

Fig. 5-5 は、Human-K peptide でアミロイド線維を形成させ TEM にて観察を行った結果である。VI-3-1 の THT の測定にて、0 日で蛍光強度の増加が確認されていたが、TEM 観察を行うと、線維は観察されず、線維形成されていなかった。5 日目から徐々に線維が形成されはじめ 10 日で多くの線維形成が確認できた。これは、V-3-3 の CD スペクトルの結果を反映させるものとなった。

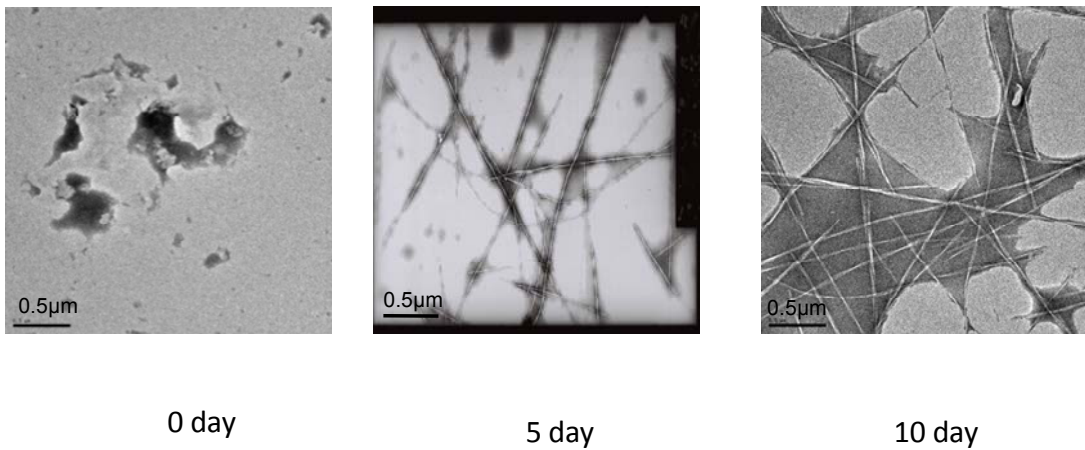


Fig. 5-5 Human-K peptide アミロイド線維の TEM による形態観察

V-4 Human-K peptide によるアミロイド線維形成促進効果の検討

Human-K peptide も HEWL-K peptide と同様にアミロイド線維が形成されることが確認できた。そこで、Human-K peptide がアミロイド線維としての性質を有しているかどうかを確認するために、Human-K peptide のアミロイド線維形成促進効果 (seeds 依存性線維伸長反応) 実験を行った。

V-4-1 Human-K peptide seeding 効果による円二色性 CD スペク

トルを用いた二次構造の測定

Fig. 5-6 は、Human-k peptide のアミロイド線維に seeds を 2% 添加した場合と seeds 無添加の場合でアミロイド線維を形成させた場合の CD スペクトルの結果である。Seeds を添加した場合、seeds 無添加の場合に比べると 216nm 付近により深い負のピークがみられ β シート構造をとっていることがわかり、K-peptide のアミロイド線維形成が促進されている可能性が示唆された。seeds 無添加の場合は 10 日で、216nm にネガティブなピークのスペクトルが観察された。

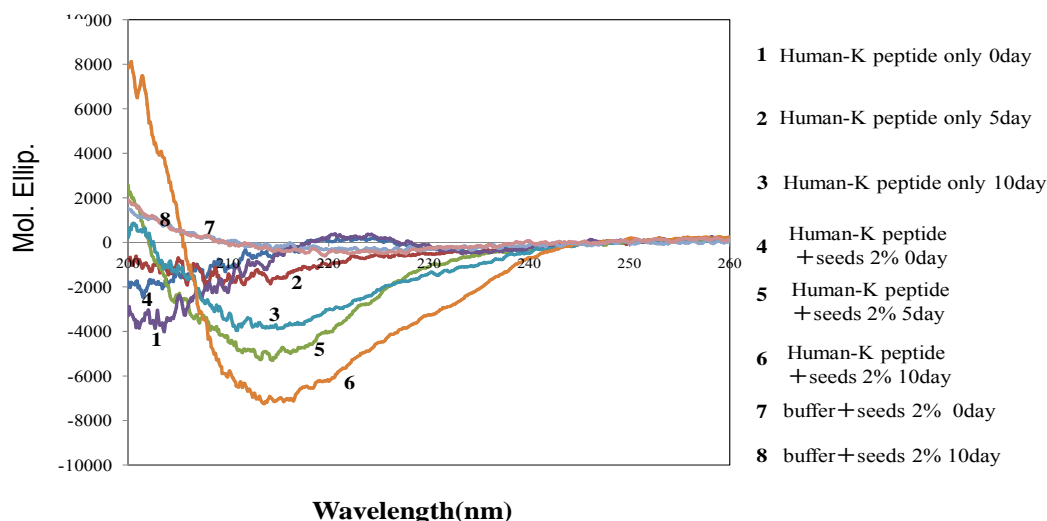


Fig. 5-6 Human-K peptide seeding 効果による円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定

V-4-2 Human-K peptide seeding 効果による TEM を用いた形態観察

Fig. 5-7 は、Human-K peptide に seeds を 2% 添加したものおよび seeds 無添加の human-K peptide を 37°C で incubation したサンプルを TEM を用いてアミロイド線維の観察をおこなった結果である。seeds 無添加の場合、incubation をはじめて 2 日目ではアミロイド線維の形成を確認することはできなかった。一方で、seeds を 2% 添加した場合 2 日目で線維形成が観察され、seeds を添加することによりアミロイド線維形成が促進されていることが確認できた。

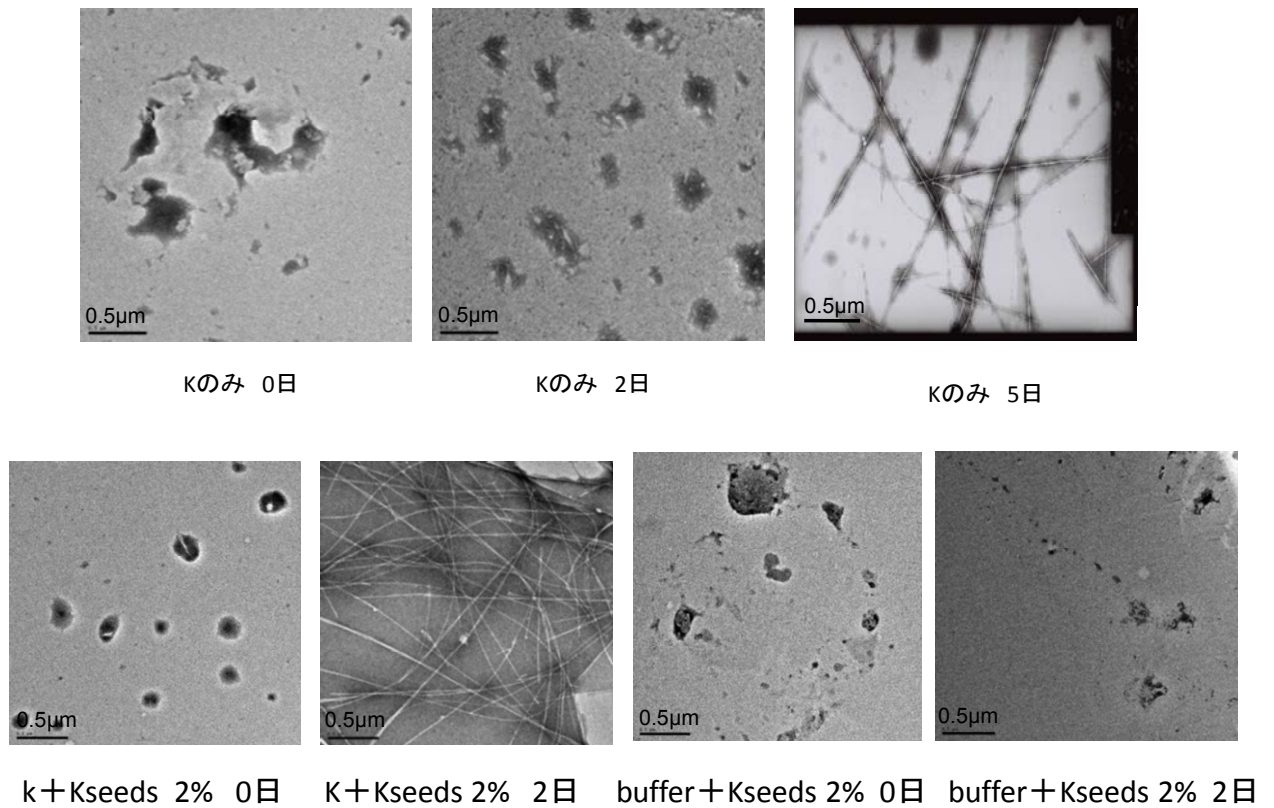


Fig. 5-7 Human-K peptide seeding 効果による TEM を用いた形態観察

V-4-3 Human-K peptide アミロイド線維形成量の測定

Human-K peptide の 1mg/ml 溶液の OD₂₈₀ は、1.35 と計算される。Table.1-5 の結果は Human-K peptide のアミロイド線維のサンプルを超遠心にかけて上澄みと沈澱にわけ適宜希釈して測定を行いアミロイド線維形成量を算出した結果である。Table.1-5 の結果から上澄み画分は、0.15mg であった。一方で沈澱画分は、総タンパク量が 1.03mg となり、以上の結果より Human-K peptide を酸性条件下 (pH4.0) で incubation し、アミロイド線維を作製した場合、全ペプチドの約 90% がアミロイド線維を形成していることがわかった。

Table.1-5 Human-K peptide アミロイド線維形成量

	蛋白濃度 (mg/ml)	容量 (ml)	総蛋白量 (mg)
Total (K-pep)	1.37mg/ml	1ml	1.37mg
Surpernatant	0.15mg/ml	1ml	0.15mg
Precipitate	5.03mg/ml	0.2ml	1.03mg

V-4-4 Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後の円二色性 CD

スペクトルを用いた二次構造の測定

Fig. 5-8 は、Human-K peptide にてアミロイド線維を形成させ、超遠心後のサンプルを CD スペクトルを用いて二次構造の解析を行ったものである。結果より遠心前のサンプルは、典型的な β シート構造を示す 216nm 付近にはピークが確認できた。また、超遠心後の沈殿画分のサンプルにおいても β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できた。一方で上澄み画分はスペクトルのピークが認められなかった。以上の結果から沈殿画分にアミロイド線維が含まれている可能性が示唆できる。よって次に TEM を用いてアミロイド線維の直接観察を行った。

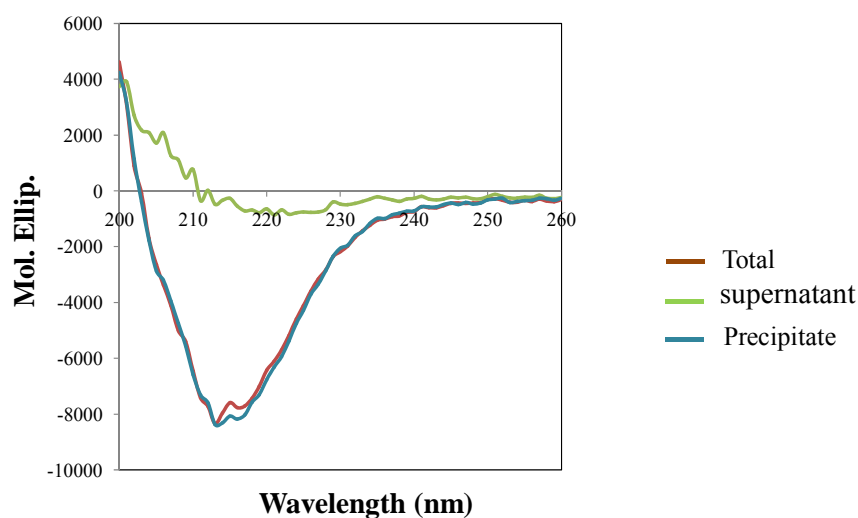


Fig. 5-8 Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後の円二色性 CD スペクトルを用いた二次構造の測定

V-4-5 Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM

による形態観察

CD スペクトルによる二次構造の解析の結果から沈澱画分にアミロイド線維が含まれることが示唆されたので、TEM による線維観察を行った (Fig. 5-9)。上清画分を原液にてサンプル調製を行い TEM にて線維観察をおこなった。その結果、amorphous 凝集体もアミロイド線維も全く観察されなかった。これは、上清の CD スペクトルの結果と一致していた。一方で沈澱画分には、明確なアミロイド線維が確認できた。また amorphous 凝集体は確認できなかった。以上の結果より、HEWL-K peptide の場合と比較するとほぼ純粋なアミロイド線維が沈澱画分に沈澱していることがわかった。



Total(遠心前)

supernatant

precipitate

Fig. 5-9 Human-K peptide アミロイド線維の超遠心後サンプルの TEM による形態観察

V-5 Human K-peptide 変異体によるアミロイド線維形成

V-3-1～V-4-5の結果から Human K-peptide は HEWL K-peptide の場合と同様にアミロイド線維を形成することがわかり Human-lysozyme におけるアミロイド形成コア領域である可能性示唆された。そこで Human K-peptide においてどのアミノ酸残基がアミロイド線維形成に重要であるか検討をおこなった。

Human K-peptide と HEWL K-peptide を比較すると HEWL の 56F が L に 62W が Y に置換されている。また computer シミュレーションにより 7 残基・6 残基の peptide でアミロイド線維を形成する可能性が報告されている (27) (28) ので Table. 1-3 にて線維形成をするか検討をおこなった。

V-5-1 実験方法と方法

Human-K peptide および変異 peptide をそれぞれ、DMSO で 100 mg/ml (2.5 mg/25 μ l) になるように溶かす。DMSO に溶かした peptide を 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0), 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.0), 50 mM phosphate sodium buffer (pH 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に終 f.c 2mg/ml になるようにそれぞれ溶解する。(NaCl は無添加) (サンプルを調製したときに DMSO の f.c が 0.1%になるようにする)。37°C に静置して incubation (SANYO incubater L002-84) する。

V-5-2 結果

これまでの結果より、HEWL-K peptide および Human-K peptide は pH4 において最も良く線維化するのでこの条件にて比較検討を行った。Table. 1-6 の結果より 56Leu-62Tyr (#2)、56Leu-62Gly (#3) の組み合わせの場合線維は形成されない。しかし、56Leu-62Trp (#1 HEWL-K peptide) の場合は線維形成がみられるので 62 番目のトリプトファンが線維形成に重要であるということが示唆された。一方で、62Tyr あるいは 62Gly であっても 56Leu を 56Phe に置換した 56Phe-62Tyr (#5 Human-K peptide)、56Phe-62Gly (#6) では若干線維形成しにくいものの線維化がみられた。この結果より Human-K peptide のアミロイド線維形成には 56 残基目のフェニルアラニンが強く関与している可能性が示唆された。HEWL-K peptide の場合、芳香族アミノ酸であるトリプトファンが線維形成に強く関与していることと、一般的に芳香環をもったアミノ酸残基は線維形成をしやすいことが報告されているのでこれらの事実もフェニルアラニンが Human-K peptide の線維形成に重要な役割を果たしているという実験結果とよく一致した。一方、ペプチドの残基数については、Human-K peptide の C 末端のアミノ酸を欠損させた 7 残基の peptide、C 末端・N 末端のアミノ酸残基をそれぞれ欠損させた 6 残基の peptide は Computer simulation (27) においては、線維形成の可能性が示唆されていたが、実際に今回検討した条件においては線維形成を示さなかった。また今回さらに短い 5 残基のペプチドも試したが線維形成はみられなかった。よって HEWL-K peptide と同様に 9 つのアミノ酸残基が線維形成の最小単位であることが示唆された。

Table. 1-6 Human K-peptide 変異体によるアミロイド線維形成

Peptide name	pH2	pH4	pH7	pH9	
#1 GILQINSRW(HEWL)	±	++	+	±	
#2 GILQINSRY	-	-	-	±	
#3 GILQINSRG	-	-	-	±	
#4 GIFQINSRW	-	+	-	-	
#5 GIFQINSRY(Human)	-	+	±	±	
#6 GIFQINSRG	-	+	±	-	
#7 GIFQINS(文献25)	±	±	±	±	
#8 IFQINS(文献26)	±	±	±	±	
#9 FQINS	±	±	±	±	
非常に多い 60~100%	+++	多い 30~60%	++	少しある 10~30%	+
ほとんどない 10%以下	±	ない 0%	-		

V-6 考察

本章では、Human-K peptide のアミロイド線維形成条件を探り、この9残基のペプチド領域がアミロイド線維形成にどのように関与しているか詳細に検討をおこなった。また、アミロイド線維形成において、ペプチド領域のどのアミノ酸残基が重要であるか検討した。まずはじめに、Human-K peptide のアミロイド形成条件を検討した。Human-K peptide は、酢酸 buffer (pH 4.0) に 50 mM~100 mM の NaCl を添加することによって多量に線維化することがわかった。THT の蛍光強度測定においては、明確な蛍光強度の増加が確認できなかったが、CD スペクトル・TEM による形態観察を行うことによってアミロイド線維を形成していることがわかった。CD スペクトルにおいては 216nm 付近に負のピークが確認でき β シート構造をとっていることがわかった。しかし、HEWL-K peptide のときとは異なり 230nm 付近にポジティブなピークが観察されず、線維構造や線維形成メカニズムに相違があることが予想された。つぎに Human-K peptide のアミロイド線維形成促進効果 (seeds 依存性線維伸長反応) 実験を行った。CD スペクトルと TEM の結果より Human-K peptide で作ったアミロイド線維を Human-K peptide にたいして seeds として添加するとアミロイド線維形成が促進されることがわかり、これより Human-K peptide の線維がアミロイド線維としての性質を有していることがわかった。また超遠心によるアミロイド線維の回収実験により全ペプチドの約 90% のペプチドがアミロイド線維を形成することがわかった。

最後に Human-K peptide のアミノ酸を欠損・あるいは置換したペプチドについても検討を行なった。Table.1-6 の結果より、フェニルアラニンが Human-K peptide のアミロイド線維形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また9残基をさらに削った peptide が線維を形成しないことからこの9残基の領域が Human-lysozyme のアミロイド線維形成コア領域であると結論づけた。Human-lysozyme においては、アミロイド線維形成領域の詳細な検討がなされておらず Frare *et al* (29) により 76 残基からなる長いペプチドが、アミロイド線維中に検出されているのみである。今回検証した Human-K peptide は上記 Frare *et al* のペプチド領域に含まれた領域であることが明らかになった。

第六章 好塩菌・好塩性酵素についての説明

VI-1 近年のアミロイド線維研究の動向について

アミノ酸がペプチド結合したポリペプチド鎖が折りたたまれて立体構造を形成する反応をフォールディング反応と呼ぶ。立体構造をとった native なタンパク質は、機能性をもち、熱力学的に最も安定な状態といわれている。しかし、タンパク質が熱や酸などにより変性し、partially unfolded 構造をとると凝集物を形成し沈澱しやすくなる。その凝集には、主に疎水的相互作用によっておこる不規則な amorphous な凝集と、ポリペプチド鎖の主鎖間の水素結合によって、クロスβシート構造をとる、規則的な凝集のアミロイド線維がある (Fig. 6-1)。このような凝集体が形成された場合、生体内ではそれらを分解する機能が働き、amorphous な凝集の場合、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。しかし、アミロイド線維は、構造が非常に強固であるため分解されずらく、その結果、神経系や細胞などに沈着してアミロイドーシスをひきおこす病的要因となる。このため、いままでアミロイド線維は、病気を引き起こす特殊な構造体という認識がなされていた。しかし、最近の研究において、細菌や真菌類、昆虫なども、アミロイド線維を形成することが報告されていて (30)、グラム陰性菌である大腸菌やサルモネラ菌においては、アミロイド線維がバイオフィルム形成に寄与していると報告されてる (30, 31)。このようにアミロイド線維が病原因子としてだけでなく、細菌類などにおいて機能的に働いていることが明らかになりつつある。また、病気とは、関係のないタンパク質やペプチドにおいてもアミロイド線維を形成することが知られており (32, 33) アミロイド線維は、タンパク質やペプチドがとりうる基本的な構造形態であるという考えが現在では提唱されている。このように近年アミロイド線維に対する認識が変化しつつある。

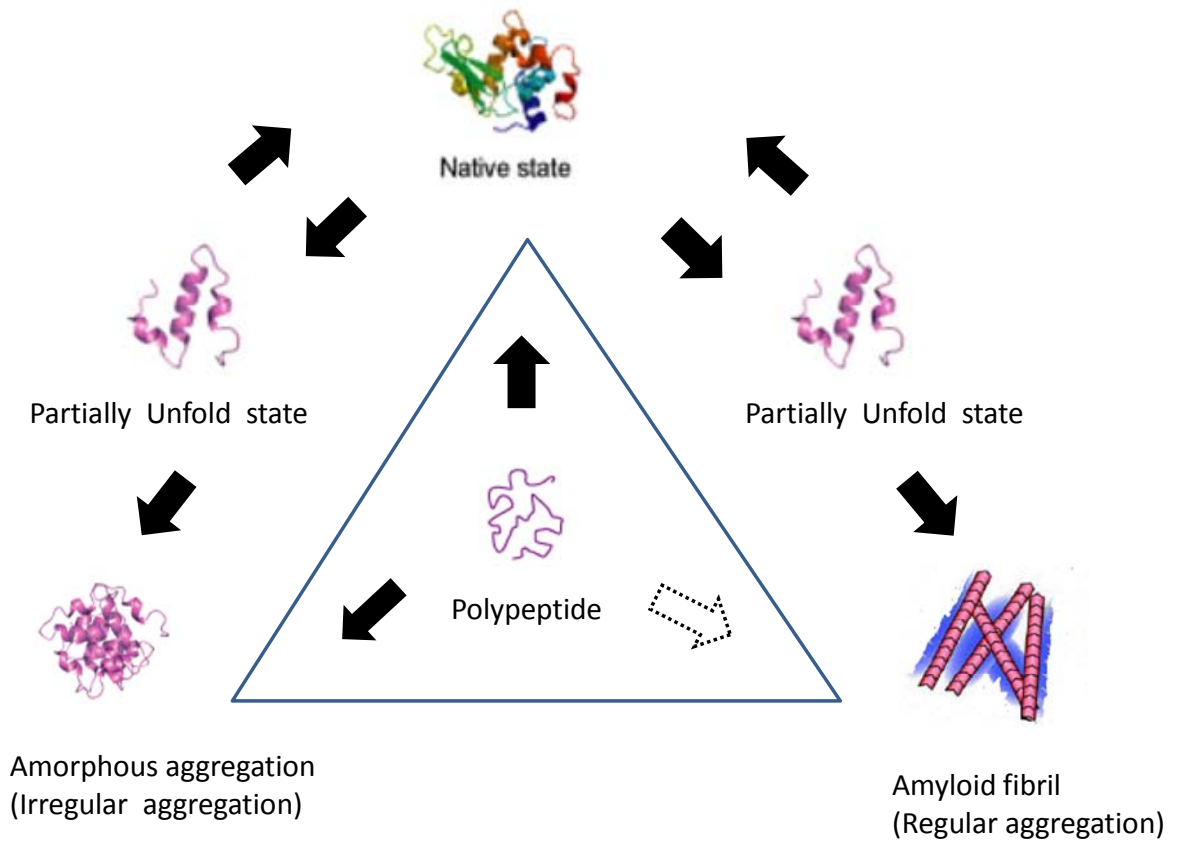


Fig. 6-1 タンパク質の Folding 反応および凝集形成

VI-2 好塩菌の種類

好塩性微生物（好塩菌）は、味噌、醤油、漬物に代表される高塩濃度の発酵食品、人工的な塩田、イスラエルの死海に代表される塩湖などから分離される極限環境微生物として知られている。好塩菌は塩を好む微生物の一群で、それぞれ生育塩濃度が異なり Kushner (34) らによって Table. 1-7 のように定義されている。

Table. 1-7 好塩菌の種類

	Optimum NaCl
Extreme halophilic	2.5M~5.2M
Moderate halophile	0.5M~2.5M
Slight halophile	0.2M~0.5M
Non-halophile	0M~0.2M

VI-3 中度好塩菌・高度好塩菌における浸透圧調製の違い

好塩菌は塩濃度に適応するため、大きく分けて二つの戦略をとることが知られている (33)。ひとつは、salt-in 戦略とよばれ、外界の高塩濃度に匹敵する無機物である K^+ 、 Cl^- などを細胞内に取り込み浸透圧調製を行う。これは、高度好塩菌に顕著にみられる戦略である (35, 36)。一方で中度好塩性細菌、耐塩性酵母をはじめ、多くの生物は、適合溶質とよばれる物質を細胞内蓄積して浸透圧調製および細胞内酵素の保護を行う salt-out 戦略をとる (37)。適合溶質には、糖、ポリオール類、アミノ酸類、エクトイン類、ベタイン類などがしられタンパク質を安定化させ熱や凍結による変性を防ぐ役割を果たしている (35, 38)。Fig. 6-2 は、高度好塩菌の Salt-in 戦略および中度好塩菌の Salt-out 戦略を模式図で示したものである。

好塩菌の浸透圧調整機構

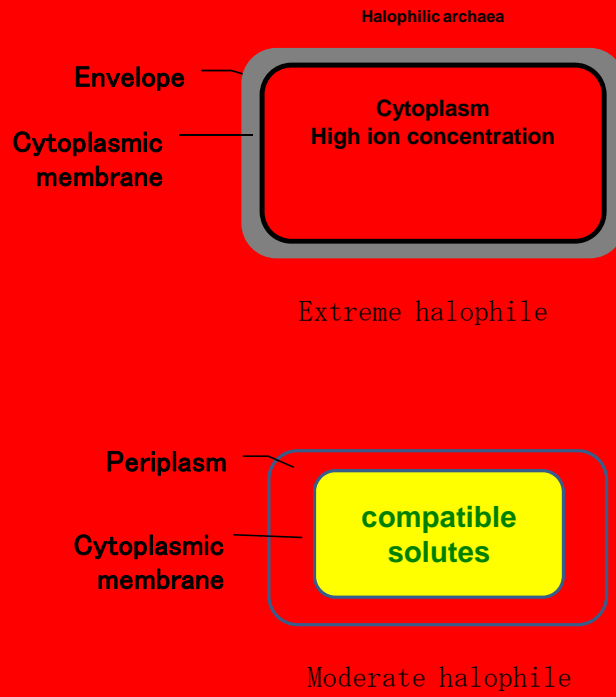


Fig. 6-2 中度好塩菌・高度好塩菌における浸透圧調整メカニズム

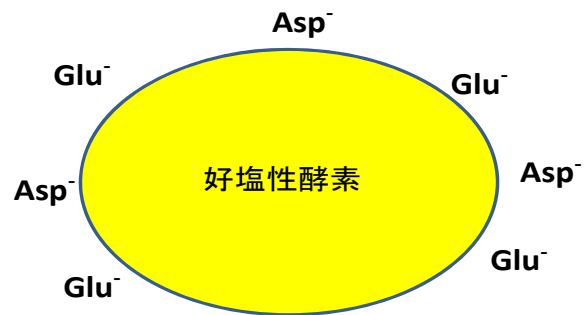
VI-4 好塩性酵素の特徴

好塩菌は細胞質内に高濃度の塩を蓄積する。一般的な好塩性酵素の定義はその由来種が好塩性であり、またはその活性、安定性、可溶性に塩を要求する酵素となっている (38)。好塩性酵素のアミノ酸配列の大きな特徴は、

1. 酸性アミノ酸 (Asp、Glu) 含量が多い。逆に塩基性アミノ酸含量が低い。
2. 疎水性アミノ酸 (Val、Leu、Ile、Phe) 含量が少ない。
3. それを補うかのように Gly や Ser が多い。

と報告されている (38, 39)。

しかし、ゲノムワイドにみた好塩性、中温性、好熱性生物由来酵素のアミノ酸組成を統計学的に比較すると、酸性アミノ酸 (特に Asp) 含量の過多はよく見られるものの、他の傾向はあまり顕著には見られない (40)。好塩性酵素に共通してみられる高い水溶性は、タンパク質表面の酸性アミノ酸に因ると考えられる。アミノ酸残基のカルボキシル基は生理的 pH で解離し負電荷を持つ。そのため、酸性アミノ酸残基の含量が多い好塩性酵素は幅広い(弱酸性以上の pH 領域)でタンパク質分子全体が負に荷電する。その結果可溶性があがり塩析されにくくなっている (39)。周りのイオン濃度が低くなると、タンパク質表面の負電荷どうしの反発と、コア構造の緩みがおこり、変性に向かうものが多く、つまり低塩濃度では不安定な酵素であるといわれている。よって好塩性酵素は安定化に塩を要求すると考えられている。好塩性酵素の周りに多量に塩イオンが存在すると好塩性タンパク質表面の負電荷を遮蔽して電荷どうしの反発によるタンパク質構造のゆるみや崩壊、構造の不安定化を防ぐ。これは、少ない疎水性アミノ酸残基からなる好塩性タンパク質内部のコア構造が高濃度の塩による塩析効果により堅固に折り畳まれるためと考えられる (41)。このように好塩性酵素は、塩の効果によって安定な高次構造をとっていると推察される (Fig. 6-3)。中度好塩性細菌由来の酵素は、主として細胞内酵素、ペリプラズム画分酵素 (グラム陰性のみ) 細胞外酵素に分類される。細胞内酵素は外部環境ほど極端な高濃度の塩環境下にはなく非好塩性酵素との違いはあまりみられない。それに対して菌体外酵素は高塩濃度にさらされることから高い好塩性を持つと考えられる。



構造的特徴

好塩性酵素は、酸性アミノ酸を多く含む

酸性アミノ酸はタンパク表面に存在する。

大きくマイナスに偏った電荷



高い可溶性、非凝集性、構造可逆性

Fig. 6-3 好塩性酵素の性質

VI-5 中度好塩菌について

中度好塩菌は温度や培地組成といった培養条件によって塩要求性や耐塩性を変えるものも多く、非常に幅広い塩濃度に適応する。5~20%の NaCl 培地で最も良く生育し、グラム陽性・陰性菌、球・桿菌、有性・無性孢子菌、運動性あり、なしと非常に多岐に分布している(42)。分離源は主に塩蔵の魚、肉、皮革や塩蔵用塩水である。Table. 1-8 は代表的な中度好塩菌の分離源、至適塩濃度を示している(43)。

Table. 1-8 中度好塩菌の分離源、至適塩濃度

菌株	分離源	増殖可能塩濃度	増殖至適塩濃度
<i>Halobacteroides halobius</i>	グレートソルト湖の沈殿物	0.34~0.51 M	2.2 M
<i>Halobacteroides halobius</i>	死海の沈殿物	1.4~2.8 M	1.5~2.5 M
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	塩蔵肉	0.5~4.0 M	0.75~1.5 M
<i>Pediococcus halophilus</i>	塩蔵魚、醤油諸味	0~3.4 M	0.85 M
<i>Micrococcus halobius</i>	醤油諸味、粗製塩	0.5~4.0 M	1.0~2.0 M

VI-6 HP(Histidine rich metal-binding protein)の機能

中度好塩菌である *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043(グラム陰性菌)は、中度好塩菌で初めて全 genome が解析された菌株である。HP(Histidine rich metal-binding protein)は *C. salexigens* DSM 3043 がペリプラズム画分に分泌する金属結合タンパク質であり、補足した Zn^{++} などの金属イオンを ABC transporter にわたす役割を担っていると推察される (Fig. 6-4)。ABC-Transporter(ATP-binding cassette Transporter)は ATP のエネルギーを用いて物質 (ビタミン・糖質、イオン・ペプチド・その他、代謝にかかわる物質)の輸送を行う膜タンパク質である。HP は *Treponema pallidum* (梅毒菌) が生成する亜鉛結合タンパク TroA に構造が類似しておりアミノ酸配列で約 30%の相同性を持っている (Fig. 6-5)。TroA は活性中心に binding pocket を一つもっており、この部分に亜鉛が結合することが知られている。一方で HP は、134 残基目からの HDHD の繰り返し配列が特徴的で、Ni, Zn, Cu などがこの部分に結合すると考えられている (Fig. 6-6)。構造的な特徴としては、酸性アミノ酸がタンパクの表面上に多く、構造に可逆性があり、非凝集性を示し、可溶性が非常に高い。塩のない状態では、マイナスチャージの反発により構造が flexible であることが示唆される。逆に塩存在下 (0.5M~2.0M) では、好塩性タンパク質内部のコア構造が塩析効果により堅固に折り畳まれ、安定な高次構造をとっていると推察される (44)。

TroA (PDB1TOA)
Zinc Binding Protein

Modeling

Halophilic
His-rich protein

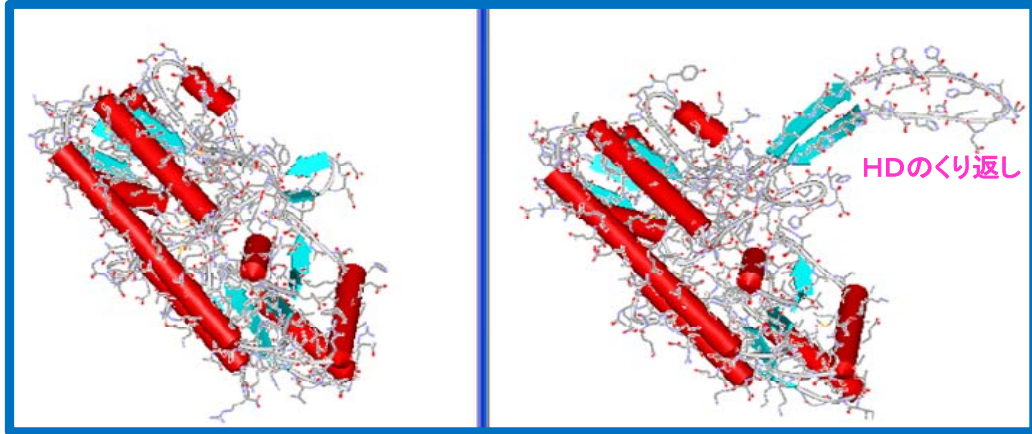


Fig. 6-6 His-HP タンパク質の modeling

第七章 高温・酸性条件による His-HP のアミロイド線維形成の検討

VII-1 緒論

好熱性・好塩性微生物のような極限環境微生物は極限性タンパク質をつくることが知られている。これら極限環境微生物が作り出すタンパク質は一般的に熱や、種々のストレスに対して高い安定性を示す。しかしこのような安定性の高いタンパク質においてもある条件におくことによりアミロイド線維を形成することが報告されている(45)。以前より極限環境微生物の一種である好塩性細菌(中度・高度好塩菌)が生成する酵素・タンパク質について種々の性質検討がおこなわれてきた(46-50)。好塩性酵素の特徴は、酸性アミノ酸が多く、等電点(pI)が低いことがあげられ、相対的に疎水性アミノ酸が少ないことである。実際、今回使用する中度好塩菌である *C. salexigens* が生成する HP は pI が 4.3 で、中性付近においては、酸性アミノ酸がマイナスチャージを帯びており、タンパク全体の net charge がマイナスの荷電に大きく偏っている。そのため、例えばタンパク質が、熱変性などによるアンフォールドな構造をとったとしてもマイナスチャージの反発により高い可溶性をほこり、変性しても凝集しないで巻き戻る高い構造可逆性を保証している(44)。このように好塩性タンパク質は非常に可溶性が高いため、規則的な凝集体であるアミロイド線維を形成する傾向は低いと予想される。そこで、七章での実験目的は、第一にこのような非常に可溶性の高いタンパク質で、凝集体であるアミロイド線維が形成するのかどうか検討を行った。第二に、部分変性した HEWL が高い凝集性を示すことから、タンパク質の凝集性と規則的な凝集体であるアミロイド線維形成の関係を明らかにするために、非凝集性の高い好塩性タンパク質を用いて、アミロイド線維形成条件を検討し、HEL におけるアミロイド線維形成過程と比較検討した。

VII-2 実験方法と材料

VII-2-1 His-HP の発現方法

まず *C. salexigens* DSM 3043 の全 chromosome DNA から PCR で HP の遺伝子を増幅した。Vector pET15b に HP 遺伝子を挿入し、*E. coli* に形質転換を行いクローニングした。(pET15b-HP の構築) タンパクの発現には *E. coli* BL21 を用いた。培養培地は、大腸菌の場合 LB-ampicillin(100 μ g/ml)培地を使用した。*C. salexigens* は 2 M NaCl を含む肉エキス培地で培養した(44)。

VII-2-2 His-HP の精製方法

クローニングした大腸菌を 0.1mM の IPTG を含む 1L の LB-ampicillin(100 μ g/ml)培地で 18°C、over night で培養した。集菌したものを PN buffer(50 mM Na-phosphate buffer pH7.4 containing 0.15M NaCl)100ml で懸濁して 20 mM imidazole と peotase インヒビターを添加して sonication をかけた。16,000g で 20 分遠心後、上澄み溶液を PN buffer で 2 倍希釈したあと、His Trap FF column(GE Healthcare 5ml)にアプライした。そして、カラムに結合したタンパクを PN buffer に 20, 50, 100, 200, 300 mM と入れた imidazole にて溶出した。His-HP は 100-200mM imidazole で溶出した(44)。

VII-2-3 酸性条件下におけるアミロイド線維形成

精製した His-HP を、50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) 4°C で一日透析を行い、その後、f.c 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) にタンパクが f.c 7 mg/ml になるように溶解した。調製したサンプルを 58°C で 14 日間 incubation し、アミロイド線維の形成を行った。THT 蛍光強度測定と TEM にてアミロイド線維形成を確認後、超音波破碎の処理(sonication)を行いアミロイド線維を断片化し、seeds として使用した。II-2-1 で示した条件で断片化した seeds を終濃度 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) に溶解した Monomer の His-HP (3.2mg/ml) に 2% および 4%(v/v) 添加する。58°C で 8 日間 incubation を行った。タンパク質濃度の測定は、280nm の吸光度測定を用いた。

VII-2-4 HPLC(逆相カラムおよびニッケルカラム)によるペプチド断

片の精製

VII-2-3の方法で作製した seeds を f.c 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) に溶解した Monomer の His-HP (3.5mg/ml)に 2%(v/v)添加した。58°Cで1カ月 incubation し、形成させたアミロイド線維を 1 時間 14,000rpm(12,500g) と 60,000rpm(150,000g)で遠心し、上澄みと沈殿画分に分離した。14,000rpm させた方の沈殿フラクションを用いて peptide 分析をおこなった。まず、沈殿画分を 8M Gdn-HCl で over night で溶解した。次に Hisx6-Tag を含む peptide を精製するために、Ni-NTA column(10 mM Na-phosphate buffer pH 7.4, containing 20 mM NaCl にて平衡化)にアプライした。同 buffer にて洗浄後、ニッケルカラムに結合した peptide を 0.1%TFA にて溶出した。同カラムから溶出したサンプルと素通り画分のサンプルを下記の方法で、Octyl-80Ts 逆相カラムにてもう一度精製を行った。TSK-guard column(Octyl-80Ts, TOSOH 19012)を装着した TSK-Octyl-80Ts 逆相カラム(0.46x15cm, TOSOH 0017344)を用いてペプチドを単離精製した。ペプチドは、215nm と 280nm の吸光度で検出した。Running buffer は 14.5%のアセトニトリルと 0.1%TFA, カラムからの溶出は 14.5-59.5%のアセトニトリル-0.1%TFA の linear gradient にておこなった。溶媒の流速は 0.8ml/min でおこなった。

VII-2-5 エドマン分解法による peptide のアミノ酸配列の決定

逆相カラムにて単離精製したペプチドを乾燥させ、Tricine/SDS-PAGE をおこなった。電気泳動にて分離したペプチドのバンドを PVDF 膜を用いてブロッキングを行った。その後、コマシーブルーで染色し、メタノールを用いて脱色したあとペプチドのバンドの切り出しをおこなった。切り出し後、N-末端のアミノ酸配列分析をおこないアミノ酸配列を決定した。

VII-2-6 TOF-MS による分子量の解析

逆相カラムで精製した peptide の分子量を TOF-MS (time-of-flight mass spectrometric) (Bruker Daltonics Autoflex Speed TOF/TOF-KG) を用いて決定した。Octyl-80Ts カラムにて精製分離したペプチドを乾燥させ、55%アセトニトリル/0.1%TFA/H₂O に溶解した。α-シアノーヒドロキシケイ皮酸を 67%アセトニトリル/0.033%TFA/H₂O でとかし、上記で調製したペプチド 溶液と等量まぜ Target plate (MTP384 Target plate polished steel TF) において測定をおこなった。

VII-2-7 合成ペプチド を用いたサンプルの調製方法

アミロイド線維形成 prediction soft である Walts を用いてアミロイド線維形成能が高いと予想されるペプチド配列を予想してペプチドを合成した。His-HP26-35 (SVVASFSILG), His-HP73-89 (EADLFVVNGLHFEGWLD), His-HP229-238 (AFGYFANAYG) を合成し使用した。各ペプチドを DMSO で 2.5mg/25 μl (100mg/ml) にとかし stock solution を作製した。Stock solution は pre aggregation を防ぐため毎回調製した。20 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0), 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.0), 20 mM phosphate sodium buffer (pH 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に f.c 2mg/ml になるように溶解した (サンプルを調製したときに DMSO の f.c 0.1% になるようにした)。37°C に静置して 7 日間 incubation した。

VII-2-8 アミロイド線維の超遠心分離

VII-2-3 の方法で作製した seeds を f.c 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) に溶解した Monomer の His-HP (3.5mg/ml) に 2%(v/v) 添加した。58°C で 1 カ月 incubation を行った。アミロイド線維サンプルを 60,000rpm (150,000g)、4°C、5 時間で遠心を行った。超遠心後、上澄みと沈澱にわけてアミロイド線維形成量を定量した。

VII-2-9 OD₂₈₀の吸光係数によるタンパク濃度の決定

60,000rpm で5時間、超遠心分離した His-HP アミロイドサンプルの上清と沈澱の OD₂₈₀ を測定しタンパク濃度を決定した。超遠心前のサンプルは 20mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) で5倍希釈、超遠心後のアミロイドサンプル上清は2倍希釈してタンパク濃度を測定した。沈澱は50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) を1ml 添加し、ボルテックスでよく攪拌して懸濁した。懸濁した溶液を20mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) で5倍希釈し OD₂₈₀ を測定後タンパク濃度を決定した。

VII-2-10 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM・AFM による形態観察

アミロイド線維を形成した各サンプルを THT による蛍光強度・蛍光スペクトル測定、CD スペクトルによる二次構造の解析、TEM、AFM による線維観察を行い比較検討を行った。方法はそれぞれ II-2-2~5 に記載した方法で行った。

VII-2-11 Tricine /SDS-PAGE によるアミロイド線維の解析

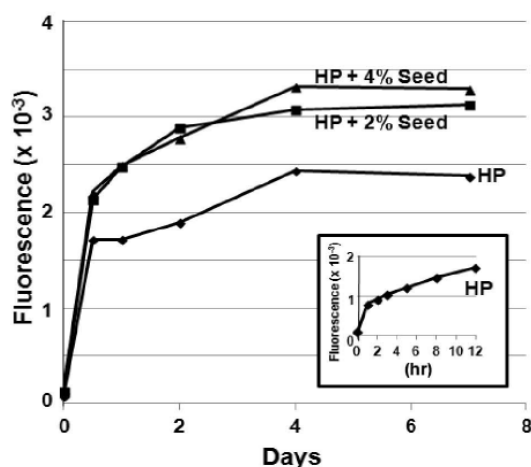
高温・酸性 (pH 2.0) 条件にて形成させたアミロイド線維を1時間遠心し (14,000rpm と 60,000rpm) 上澄みと沈殿画分にわけた。その後、両サンプルを Tricine/SDS-PAGE (23) を用いて解析を行った。分離ゲルは、アクリルアミド f.c 16.5%濃度のポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパクを Glycine/SDS サンプル buffer でそれぞれ希釈し、90℃で5min 加熱後ポリアクリルアミドゲルにアプライした。定電圧で100V で泳動した。その後、染色液を用いて染色後、10% 酢酸にて1時間脱色を行った。

VII-3 結果

VII-3-1 THT による蛍光強度測定（高温・酸性条件下でのアミロイド線維形成）

Fig. 7-1 は、His-HP を pH2.0、58°C で incubation したサンプルを THT を用いて蛍光強度と蛍光スペクトルを測定したものである。(A) の蛍光強度は横軸は日にち、縦軸は蛍光強度を示している。一方(B) の蛍光スペクトルは横軸は波長、縦軸は蛍光スペクトルを示している。(A) は Seeds を添加していない His-HP のみの結果で、12 時間以内で最大値の約 70% まで THT の蛍光強度の増加が認められた。1 時間の incubation でさえ 30% の蛍光強度の増加がみとめられ 4 日で定常状態となった。また seeds を 2% あるいは 4% 添加した場合、seeds 無添加の His-HP と比較して約 1.4 倍の THT 蛍光強度の増加が確認された。Seeds を添加することにより線維形成が促進されていることが予想される。(B) の蛍光スペクトル (non-seeds His-HP の結果) も同様に、時間が経過するごとに、徐々に蛍光スペクトルの上昇が確認できるので時間依存的にアミロイド線維が形成されていると予想される。

(A) Time course of Tht fluorescence



(B) Tht fluorescence spectra

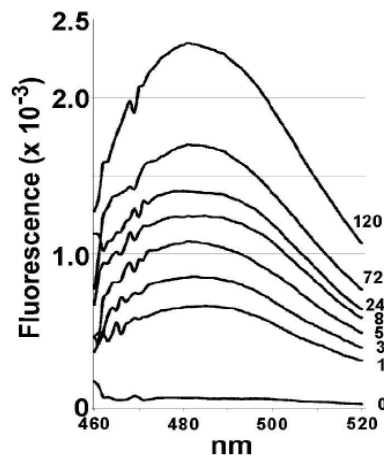


Fig. 7-1 THT による蛍光強度測定（高温・酸性条件下でのアミロイド線維形成）

VII-3-2 酸性・中性条件下での His-HP の二次構造および酸性条件下

でアミロイド線維形成した場合の二次構造の変化

Fig. 7-2 (C) の (1) は 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析した His-HP を 20 mM glycine-HCl (pH 2.0) 、20 mM Tris-HCl (pH 7.8) でそれぞれ希釈をおこない、直後に CD スペクトルを測定した結果である。タンパク濃度は 0.1mg/ml で測定をおこなった。pH7.8 の場合 208nm と 222nm 付近に負のピークが確認され α -ヘリックスの含量が 26% 、 β シートの含量が 14%であった。一方で、pH2.0 の場合 218nm 付近に負のピークを示した。 α -ヘリックスの含量が 19%、 β シートの含量が 20%となった。(C) の (2) は、酸性 (pH2.0) 58°C で 4 日間 incubation したサンプルを測定した結果である。タンパク濃度は 0.1mg/ml で測定をおこなった。0 日目は、216nm 付近で負の極大を示しているが、日数が経過するにつれて短波長側にスペクトルが shift していくことが確認された。

(C) Time course of CD spectra

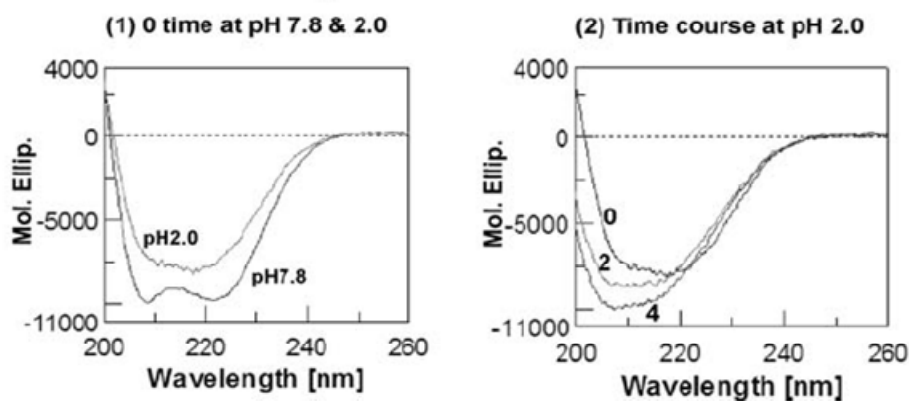


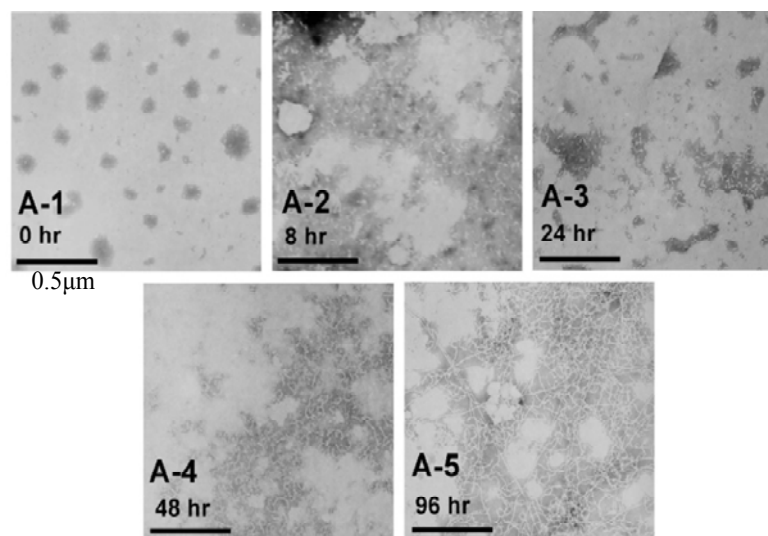
Fig. 7-2 酸性・中性条件下での His-HP の二次構造および酸性条件下でアミロイド線維形成した場合の二次構造の変化

VII-3-3 高温・酸性条件下にて形成したアミロイド線維の TEM によ

る形態観察

Fig. 7-3 は TEM を用いてアミロイド線維の観察をおこなった結果である。図中の A-1 は His-HP のみ (seeds 無添加) B-2 は His-HP に seeds を 2% 添加したものである。HP のみの場合 8 時間で多くの短い線維が確認でき、24~48 時間と時間が経過するごとに線維伸長が認められた。96 時間で明確な長い線維がドミナントになり、その中に短い線維も混在していることが観察された。一方、HP に seeds を添加した場合、seeds 無添加の場合と比較すると線維形成がよりはやく、24 時間ですでに長い線維が形成された。さらに 48 時間 incubation すると多量の長い線維が確認できるようになった。これより seeds を添加することによりアミロイド線維形成が促進されることがわった。

A-1. non seeds



B-1. +seeds 2%

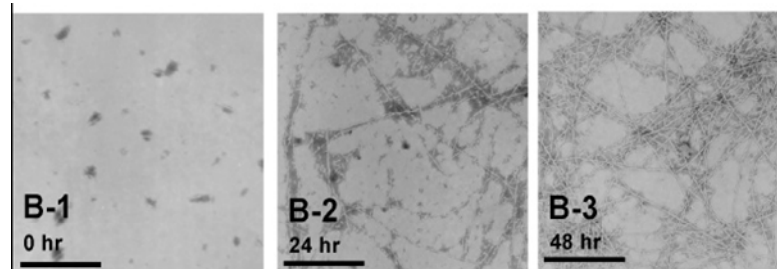


Fig. 7-3 高温・酸性条件下にて形成したアミロイド線維の TEM による形態観察

VII-3-4 Tricine/SDS-PAGE による His-HP の断片化の確認

Fig. 7-4 は、酸性・58°Cで incubation した His-HP を Tricine/SDS-PAGE を行った結果である。定電圧 100V で電気泳動し、16.5%のポリアクリルアミドゲルを使用した。His-HP は、時間を追うごとに急速に分解していることがわかる。これは、AspのC末端側のペプチド結合が加水分解されているためだと予想される。約3時間の incubation で intact-HP の約半分が酸加水分解されている。12h で intact-HP がほぼ見えなくなるぐらいになり、48h 後には、16, 15, 12, 6.5kDa のペプチドがドミナントになる。HEWL の場合は同じ条件で intact-HEWL が約半分に酸加水分解されるまで、2日かかるので、それと比較すると加水分解の速度が非常に早くペプチド断片に切れやすいことがわかる。THT による蛍光強度の増加、CD スペクトルによる二次構造の変化、TEM の結果から His-HP がペプチドに断片化されることによってアミロイド線維が形成されると考えられる。よってこのあとの項より、どの部分のペプチドにてアミロイド線維が形成されているのかを明らかにするために、逆相クロマトグラフィ・TOF-MAS などの手法を用いてペプチド解析を行った

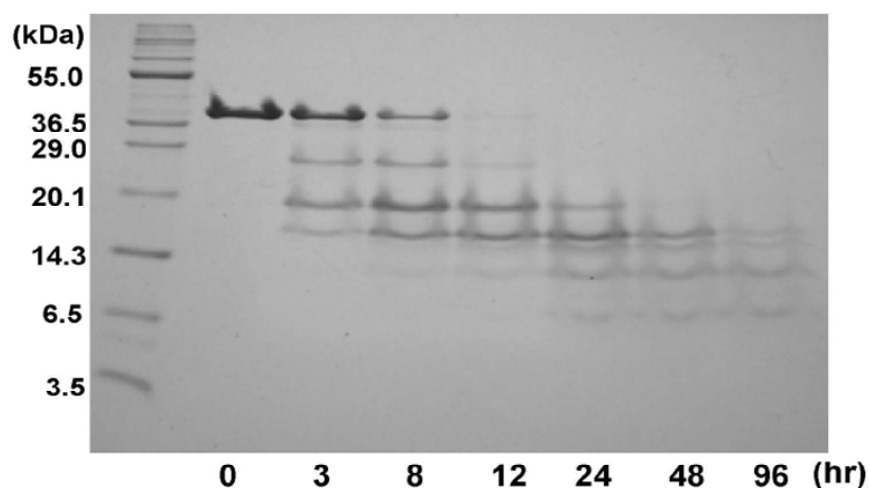


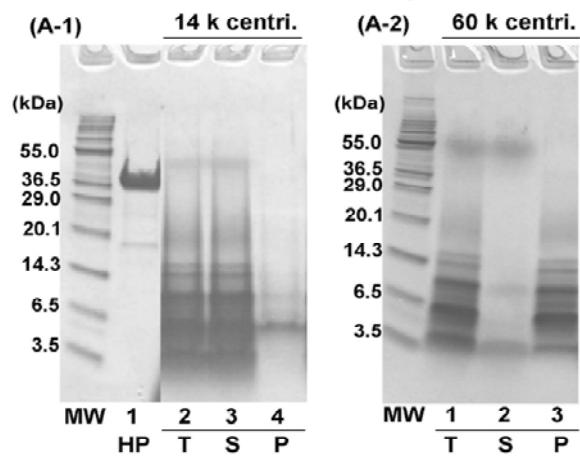
Fig. 7-4 Tricine/SDS-PAGE による His-HP の断片化の確認

VII-3-5 His-HP アミロイド線維(高温・酸性条件)の遠心と超遠心

(14k/60k) を用いた分析

Fig. 7-5 は、His-HP を酸性・58°Cで一カ月 incubation してアミロイド線維を形成させたサンプルを遠心し、沈澱画分をトリシン電気泳動と TEM を用いて解析したものである。サンプルの遠心は 14,000rpm (12,500g) と 60,000rpm (15,000g) でそれぞれ一時間おこなった。(A)はトリシン電気泳動を行った結果であり、遠心を加える前の total のタンパクサンプルは、20, 16, 15, 12, 6.5, 3.5kDa に major バンドが確認でき、両者にほとんど違いは認められなかった。しかし、沈澱画分を比較した場合 60,000rpm は、ほぼすべてのアミロイド線維が沈澱画分におちているのに対して、14,000rpm では、主に 6.5kDa 付近に major バンドが確認された。また(B)の TEM の観察においても 60,000rpm では、沈澱に長い線維と短い線維が混合しているのに対して、14,000rpm では、長い線維のみが観察でき両者に差異が確認された。以上の結果より、14,000rpm の沈澱サンプルの方が、60,000rpm に比べて、ヘテロジェネシティが少なく、より均一な線維を分離できておりペプチド解析を行いやすいと考えられるため、この沈澱サンプルを用いて、ペプチドの解析をおこなった。

(A) Tricin-SDS-PAGE of centrifuged sample



1. HP: His-HP
2. T: Total
3. S: Supernatant
4. P: Precipitate

(B) TEM of precipitated fraction

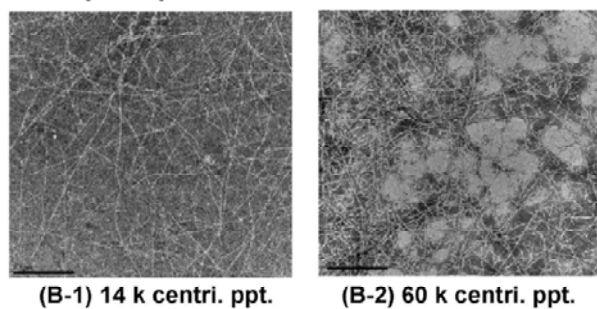


Fig. 7-5 His-HP アミロイド線維 (高温・酸性条件)の遠心と超遠心を用いた解析

VII-3-6 His-HP 高温・酸性条件により断片化されたペプチド解析

Fig. 7-6 は、酸性 (pH2) ・ 58°Cにてアミロイド線維を形成させた His-HP サンプルを 14,000rpm にて 1 時間遠心を行い、その沈殿画分を Glycine-HCl buffer (pH 2.0) で懸濁し、その後、8M Gdn-HCl で溶解して、逆相クロマトグラフィにかけて分離したものである。Octyl-80Tc カラムを用いて 14.5-59.5%のアセトニトリル-0.1%TFA の linear gradient をかけ溶出を行うと二つの major ピーク (peak I と peak II) が確認できた。peak I はアセトニトリル 44.2%、peak II は 46.0% で溶出できた。

(Peak I -A ペプチドの解析)

Fig. 7-6、(A) の peak I の場合、Tricine/SDS-PAGE にて 2 種類のペプチドが含まれていることが予想されたので、まずは、濃度の濃いバンド Peak I -A (6.5KDa) を PVDF 膜にてブロッキングを行い、切り出しをして、エドマン分解法によりペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、その peptide は His-tag を含む N 末端領域であることがわかった。Fig. 7-6 (B) の (G2-D55・lineA)

そこで、ニッケルカラムを用いて、まずは、His-tag を含むペプチドの分離をおこなった。0.1%TFA でニッケルカラムから溶出後、再度 Octyl-80Ts カラムにて精製をおこなった。その後、精製したペプチドを用いて TOF-MS を行い分子量を決定した。(Fig. 7-6、(C) の peak A、分子量 5638)

また精製したペプチドがアミロイド線維を形成をするか、アミロイド線維の再形成をおこなった。その結果、酸性条件 (pH 2.0) にて線維化することが TEM の観察にて明らかになった (Fig. 7-7 (A) の peakA)。さらにアミロイド線維形成 prediction soft Walts (<http://waltz.switchlab.org/>) にて Fig. 7-6 の (B) の SVV10 peptide の配列部分がアミロイド線維を形成しやすいということが予想された。そこでその配列の合成ペプチドを作製しアミロイド線維形成をさせ、TEM にて観察を行った。すると酸性条件 (pH 2.0) にて線維化しやすいことがわかった (Fig. 7-7 の (B) SVVASFSILG)。

(Peak I -B ペプチドの解析)

Fig. 7-6、(A)の Peak Iに含まれていたニッケルカラムに結合しない非吸着画分 (Peak I -B)を Octyl-80Ts カラムをつかって逆相クロマトグラフィを行い精製した。精製したペプチドの Tricine/SDS-PAGE を行うと 3.5kDa 付近にバンドが確認できた。その後、ブロテイングを行い、エドマン分解法により Peak I -B のアミノ酸配列を決定した (Fig. 7-6、(B)の L76-D109・line B)。また TOF-MS を行い分子量を決定した (Fig. 7-6、(C)の peak B、分子量 3710)。

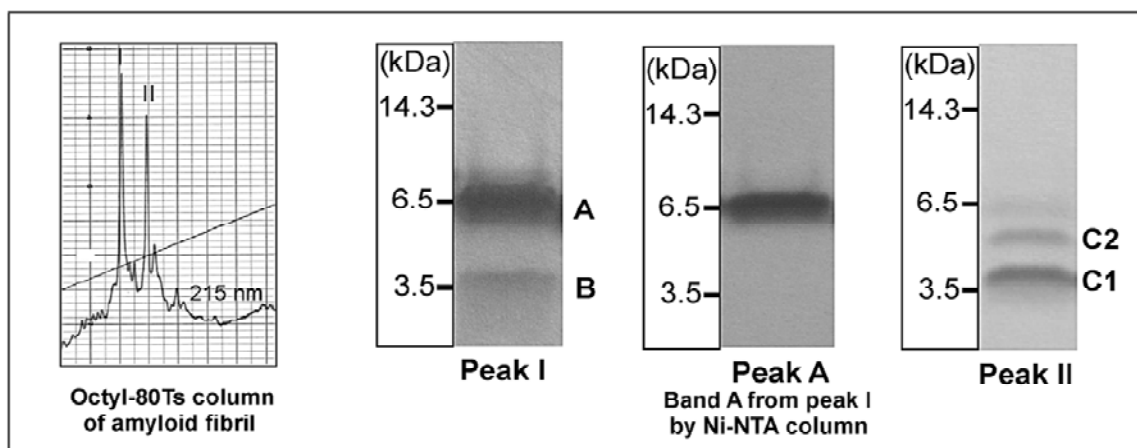
精製したペプチドによるアミロイド線維形成の再形成は、ペプチドの精製量が少なかったため行わなかった。Waltsによる配列の予想は、Fig. 7-6の(B)の EAD17 peptide の配列部分が線維形成しやすいと予想された。このペプチドにおいても合成ペプチドを作製しアミロイド線維形成をさせ、TEMにて観察を行うと、酸性条件 (pH 2.0)にて線維化しやすいことがわかった。Fig. 7-7 の (B) EADLFVVNGLHFEGWLD

(peak II -C-1. C-2 ペプチドの解析)

Fig. 7-6、(A)の Peak IIに含まれていたニッケルカラムに結合しない非吸着画分 Peak II C-I と Peak II C-IIを Octyl-80Ts カラムをつかって逆相クロマトグラフィにて精製した。精製したサンプルの Tricin/SDS-PAGE を行うと Peak IIは 4kDa、5kDa 付近に二つのバンドが確認できた。そこで、それぞれのバンドを PVDF 膜にてブロテイングを行い、切り出し後、エドマン分解法によりペプチドのアミノ酸配列を決定した。Peak II C-Iは Fig. 7-6 Bの (A68-D109・line C1)配列と一致することがわかった。Peak II C-IIは Fig. 7-6 Bの (A207-N235・line C2)のアミノ配列と一致した。また、TOF-MSにより分子量を決定し、Fig. 7-6 peak C1分子量 4471・peak C2分子量 3252 となった。次に、このペプチドを用いてアミロイド線維の再構成をおこなった。このペプチドも酸性条件 (pH2.0)で線維化を示した (Fig. 7-7 (A) peakC)。Waltsによる配列の予想は、AFGYFANAYG の配列部分が最も線維形成しやすいと予想された (Fig. 7-6 (B)の AFG10 peptide)。この peptide においても合成 peptide を作製しアミロイド線維形成をさせた。これを TEM で観察した場合、酸性・中性条件では、不溶化して amorphous な沈澱となったが、弱アルカリ側 (pH 8.0)の pH で線維化を示した (Fig. 7-7 の (B) AFGYFANAYG)。以上の結果より、His-HP を酸性・高温条件でアミロイド線維を形成した場合 4つの断片化されたペプチドで線維化している可能性が示唆さ

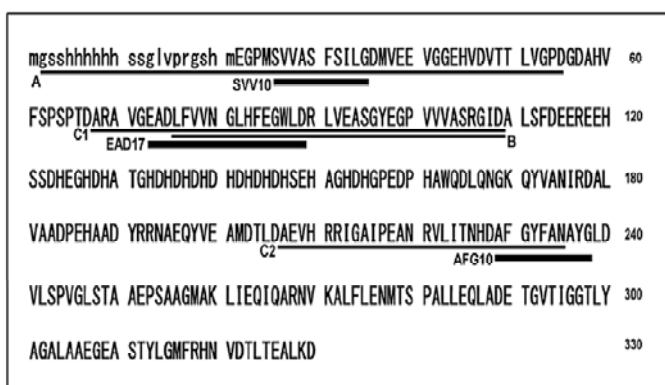
れた。次にモノマーの His-HP から実際にどのくらいのアミロイド線維が形成されたかを知るために、アミロイド線維を形成したサンプルの超遠心 (60,000rpm、5 時間) を行い、超遠心前のサンプルから算出したタンパク濃度と超遠心後の上澄み、沈澱画分のタンパク濃度を比較することで、アミロイド線維形成量の定量をおこなった。

(A) Peptide analysis of amyloid fibril



Identification of peptides in fibrils precipitated and their predicted core region

(B)

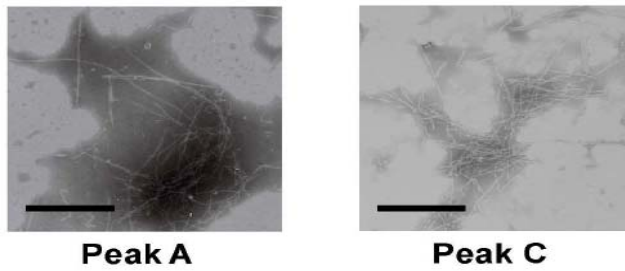


(C)

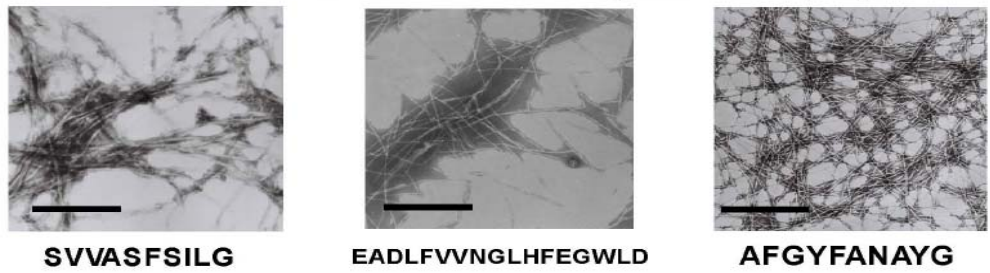
Peak	TOF-MS data	Peptide	Cal. MS*
Peak A	5638.0	G2-D55 (line A)	5637.1
Peak B	3710.3	L76-D109 (line B)	3702.1
Peak C (1)	4474.2	A68-D109 (line C1)	4471.9
Peak C (2)	3253.3	A207-N235 (line C2)	3252.6

Fig. 7-6 His-HP ペプチド断片の逆相カラムによる解析

(A) TEM observation of reconstituted fibril



(B) TEM observation of fibril from synthetic peptides



(C) AFM observation of fibrils from synthetic peptides

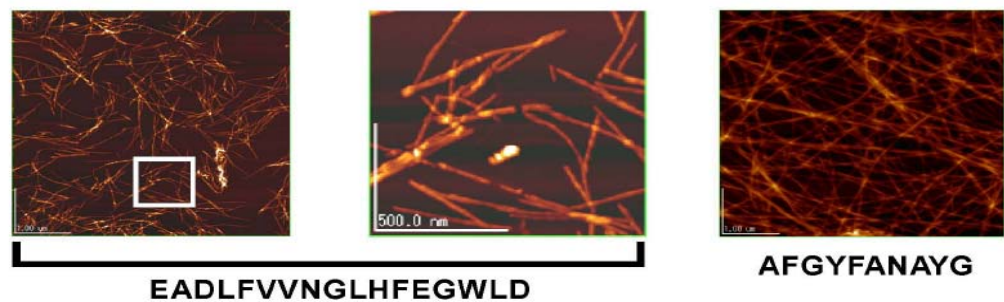


Fig. 7-9 His-HP アミロイド線維形成コアペプチドによる線維形成

VII-3-7 高温・酸性条件下で形成した His-HP アミロイド線維形成量

の測定

His-HP の 1mg/ml 溶液の OD₂₈₀ は 0.64 と計算される。Table. 1-9 の結果は His-HP のアミロイド線維のサンプルを超速心にかけて上澄みと沈澱にわけ適宜希釈して測定を行いアミロイド線維形成量を算出したものである。Table. 1-9 の結果から上澄み画分は、総タンパク量が 2.3mg であった。一方で沈澱画分は、総タンパク量が 1.61mg となり、沈澱画分には約 42%, 上澄み画分には 58%のタンパク量があることがわかった。以上の結果より全タンパク量の約 4 割のアミロイド線維が形成されていることがわかった。HEWL の場合、2 割の線維形成量だったため、酸性・高温条件下で His-HP は HEWL よりもアミロイド線維を形成しやすいことが示された。

Table. 1-9 高温・酸性条件下で形成した His-HP アミロイド線維形成量の測定

	蛋白濃度(mg/ml)	容量(ml)	総蛋白量(mg)
Total (HP)	3.5mg/ml	1ml	3.5mg
Surpernatant	2.3mg/ml	1ml	2.3mg
Precipitate	1.61mg/ml	1ml	1.61mg

VII-3-8 His-HP アミロイド線維超遠心後の THT による蛍光強度測定

定

超遠心をおこなった上清と沈澱画分および超遠心前のサンプルについて THT を用いて蛍光スペクトル測定をおこなった。沈澱画分のサンプルは、485nm 付近に蛍光ピークを示した。一方で上澄み画分は THT の蛍光強度の増加が認められなかった (Fig. 7-8)。以上の結果より沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆された。よって次に、超遠心前のサンプルおよび上清と沈澱画分を用いて CD スペクトルによる二次構造解析を行った。

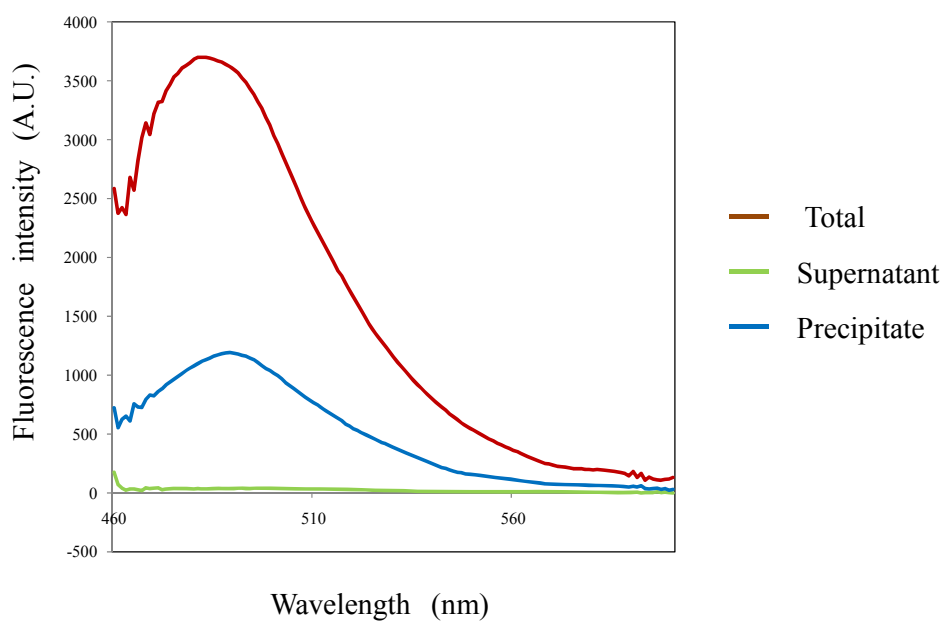


Fig. 7-8 His-HP アミロイド線維超遠心後の THT による蛍光強度測定

VII-3-9 His-HP ミロイド繊維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

Fig. 7-9 より遠心前の His-HP サンプルは、CD スペクトルにおいては 208nm 付近に負の極大ピークが確認できるだけで、典型的な β シート構造を示す 216nm 付近にはピークが確認できなかった。一方、超遠心後の上澄み画分のサンプルは二次構造のスペクトルが確認できなかった。しかし、超遠心後の沈殿画分のサンプルを測定すると β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できた。これは超遠心を行ったためアミロイド線維が沈殿区分に濃縮されたためと考えられる。以上の結果から CD スペクトルにおいても THT の結果と併せ、沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆された。よって次に TEM を用いてアミロイド線維の直接観察を行った。

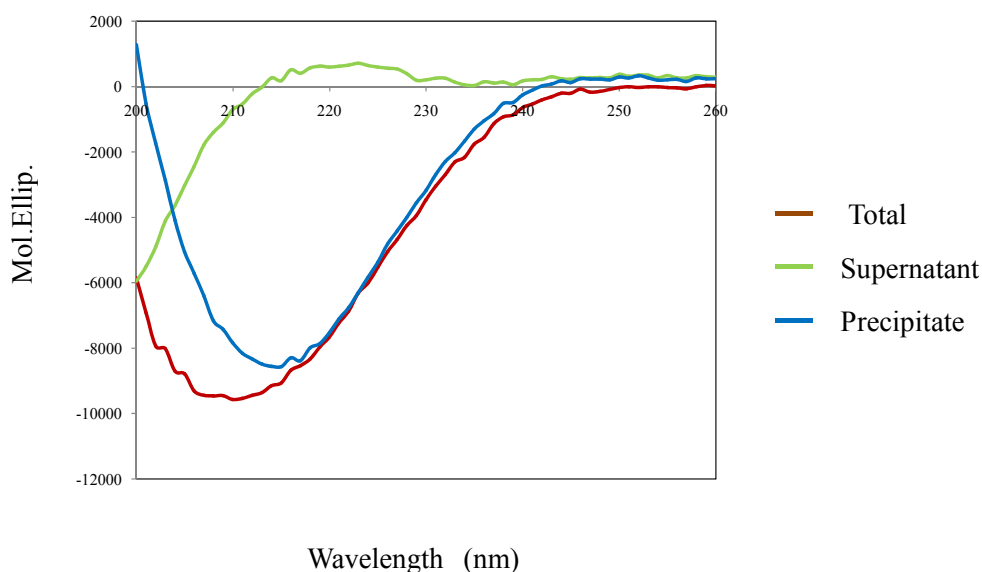
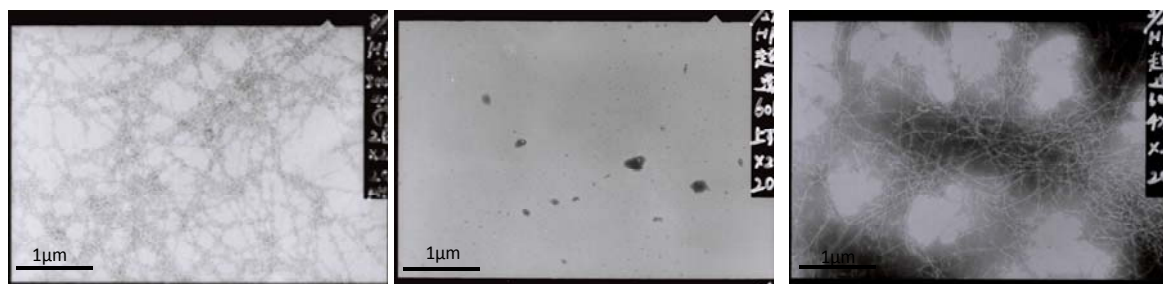


Fig. 7-9 His-HP アミロイド線維の円二色性 CD スペクトルによる二次構造の測定

VII-3-10 His-HP 超遠心後アミロイド線維の TEM による形態観察

THT による蛍光強度測定および CD スペクトルによる二次構造の解析の結果にて沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆されたので、TEM による線維観察を行った (Fig. 7-10)。上清画分を TEM を用いて線維観察を行うと、HEWL の場合と異なり、amorphous 凝集体が全く確認確認できなかった。一方で沈澱画分には、多量の長いアミロイド線維が確認できた。以上の結果より HEWL と比較して His-HP を高温・酸性条件下においてアミロイド線維を形成させると、amorphous な凝集体は形成されず、アミロイド線維のみが形成されていることが明らかになり非常に均一性が高いことがわかった。



Total(遠心前)

supernatant

precipitate

Fig. 7-10 His-HP 超遠心後アミロイド線維の TEM による形態観察

VII-3-11 His-HP 超遠心後アミロイド線維の Tricine/SDS-PAGE によ

る解析

Fig. 7-10 の Tricine/SDS-PAGE の結果より上清画分には、加水分解されたペプチド断片がほとんど確認できなかった。一方で沈澱画分には、20, 16, 15, 12, 6.5, 3.5kDa と細かく加水分解されたペプチドが確認された。TEM の線維観察において、アミロイド線維が確認でき、CD スペクトルにおいても β シート構造をとっていたため、沈澱画分にアミロイド線維が沈澱していることがわかった。また、Tricine/SDS-PAGE のバンド・パターンは、60,000rpm、1時間超遠心した場合と結果はほとんどかわらなかった。

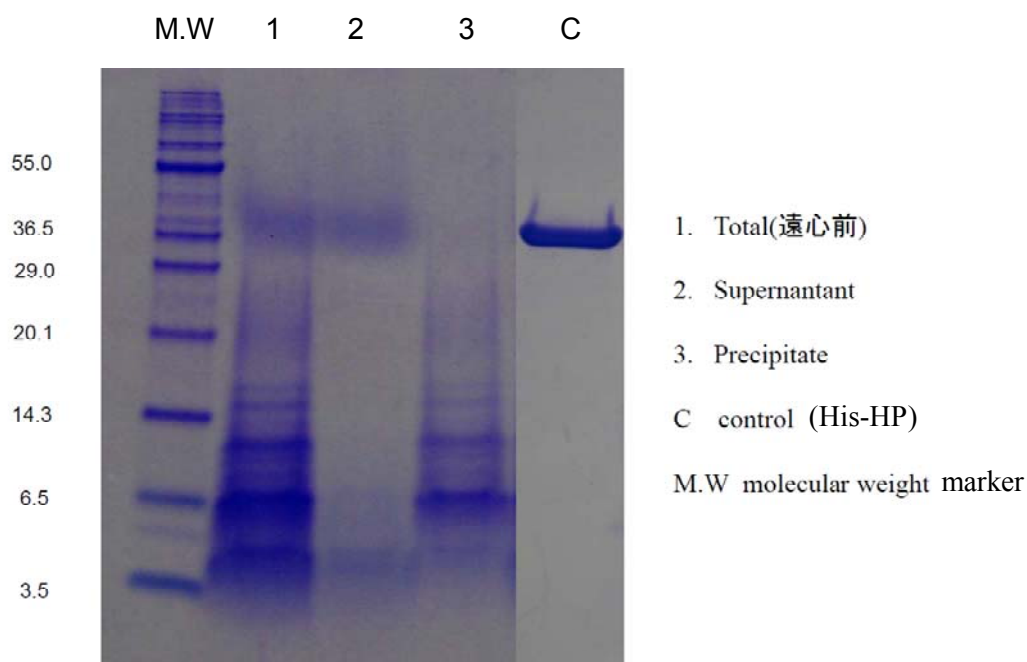


Fig. 7-10 His-HP 超遠心後アミロイド線維の Tricine/SDS-PAGE による解析

VII-4 考察

好塩性酵素のような非常に可溶性の高いタンパク質を用いて、凝集物であるアミロイド線維が形成されるのかどうか検討を行った。アミロイド線維形成は、58°C・酸性条件下にておこなった。seeds 無添加の HP は、8 時間で total の 60% まで THT の蛍光強度の増加がみられた。そのサンプルの形態観察を TEM でおこなうと、多量の短い線維が確認できた。また、Tricine/SDS-PAGE で解析すると、4 時間で intact-HP の約半分が加水分解されていて、24 時間で、16~3.5kDa のペプチドまで断片化されていた。以上の結果より、HP が急速に加水分解をおこなうことによって線維形成されていることが示唆された。そこで次に、遠心をおこない、沈澱画分の分析を行うことにより、アミロイド形成コア領域の同定を行った。遠心 (14000rpm, 1 時間) した沈澱画分を逆相カラムにかけて、peptide の分離精製をおこなった。すると、2G-55D、L76-D109、A68-D109、A207-N235 と 4 つのペプチド断片が精製できた。そして、このペプチドからアミロイド線維形成の再構成をおこないアミロイド線維を形成させることができたので、この peptide 領域部分が、His-HP のアミロイド線維形成コア領域であると示唆された。アミロイド線維形成 prediction soft である Walts から予測された 3 つの合成 peptide でもアミロイド線維を形成したことから、この領域が非常に重要であると結論づけた。また、精製されたペプチドは 5 か所のアスパラギン酸、1 か所のアスパラギンで酸加水分解されていることがわかった。アスパラギン酸の C 末端側のペプチド結合は、酸加水分解を受けやすいということが報告されており、His-HP は全配列の内 10%がアスパラギン酸であるため、より酸加水分解を受けやすいと考えられた。その結果 HP は、アミロイド線維を形成しやすいと考えられる。また超遠心をおこないアミロイド線維形成量を測定すると、沈澱画分には約 42%, 上澄み画分には 58%の蛋白量が測定された。よって全タンパク量から、約 4 割のアミロイド線維が形成されていることがわかった。HEWL の場合、2 割の線維形成量だったため、この結果からも His-HP はアミロイド線維を形成しやすいことが証明された。以上の結果より、His-HP を酸性・高温条件下でアミロイド線維を形成させた場合、急速に His-HP の加水分解が進み、ペプチドに断片化されることによって、早く線維形成されていると推察された。しかし、この条件下では、ペプチドまで分解された状態でアミロイド線維が形成され、ペプチドを構成するアミノ酸の性質に依存して線維形成がおこっているので、His-HP 全長でアミロイド線維ができているという証明にはならない。次章で、His-HP が加水分解を起さずに線維形成をする条件を検討した。

第八章 TFE 添加による中性条件下での His-HP (full length) のアミ

ロイド線維形成の検討

VIII-1 緒論

七章にて、高温・酸性条件で incubation することで、His-HP が急速に加水分解をおこしアミロイド線維を形成することが示唆された。しかし、この条件では、ペプチドまで分解された状態でアミロイド線維が形成されているので、ペプチドのアミノ酸の性質に依存してアミロイド線維が形成されている可能性が高く、His-HP 全長でアミロイド線維ができていないという証明にはならない。そこで、この章では、His-HP が加水分解をおこさない条件(低温・中性条件)にてアミロイド線維を形成するか検討を行った。またアミロイド線維形成の誘導剤として、よく用いられる 2, 2, 2, -Trifluoroethanol (TFE) を使用した。

VIII-2 実験方法と材料

VIII-2-1 TFE 添加による中性条件下でのアミロイド線維形成

精製した His-HP (VII-2-2 参照) を 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で一日透析を行った。透析したタンパクを 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に f.c 5mg/ml になるように溶解した。さらにその溶液に防腐剤であるアジ化ナトリウムを (f.c 3mM) と 10~40% の TFE をそれぞれ添加した。その後、25°Cにて incubation を行った。タンパク濃度の測定は、280nm 時の吸光係数を用いた。

VIII-2-2 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM による形態観察

アミロイド線維を形成した各サンプルを THT による蛍光強度測定、CD スペクトルによる二次構造の解析、TEM による線維観察を行い比較検討を行った。測定はそれぞれ II-2-(2~5) に記載した方法で行った。

VIII-2-3 Tricine/SDS-PAGE による解析

Tricine/SDS-PAGE (23)を用いて超遠心後の上清、沈澱のサンプルのアミロイド線維の解析を行った。分離ゲルは、16.5%濃度のポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパクを Glycine/SDS サンプル buffer でそれぞれ希釈し、90°Cで5min加熱後ポリアクリルアミドゲルにアプライした。定電圧(100V)で約1.5時間泳動して、染色液を用いて染色後、10%酢酸にて1時間脱色を行った。

VIII-2-4 TFE20%添加で形成したアミロイド線維の超遠心分離

His-HP アミロイド線維サンプルを 60,000rpm(150,000g), 4°C, 5時間超遠心を行った。超遠心後、上澄みと沈澱にわけてアミロイド線維形成量を定量した

VIII-2-5 TFE20%添加で形成したアミロイド線維形成量の測定

60,000rpmで5時間、超遠心分離した His-HP アミロイドサンプルの上清と沈澱の OD₂₈₀ 吸光度を測定しタンパク濃度を決定した。超遠心前のアミロイドサンプルは20%の TFE を含んだ 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) で20倍希釈、超遠心後のアミロイドサンプル上清は同 buffer で10倍希釈して測定をおこないタンパク濃度を決定した。沈澱は20%の TFE を含んだ、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) を200 μl 添加し、ボルテックスでよく攪拌して懸濁する。懸濁した溶液を20% TFE を含んだ 50 mM Tris-HCl (pH 7.8) で40倍希釈し OD₂₈₀ の吸光度を測定後タンパク濃度を決定した。

VIII-3 結果

VIII-3-1 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の THT による蛍光強度測定

Fig. 8-1 は、His-HP に TFE を 0~40% 添加して、中性 (pH 7.8)、25°C で incubation したサンプルを THT を用いて蛍光強度を測定したものである。横軸はインキュベーション時間、縦軸は蛍光強度を示している。His-HP に TFE を 10% あるいは 20% 添加することにより、急速に、THT の蛍光強度の増加が認められ 4 日目ではほぼ定常状態に達することが確認された。TFE 30% の場合、8 日目で少し蛍光強度が増加したが、TFE 0% あるいは 40% 添加した場合は、THT の増加はみとめられなかった。以上の結果より、His-HP に TFE を 10% あるいは 20% 添加することにより、アミロイド線維が形成している可能性が示唆されたので、次に CD スペクトルによる His-HP の二次構造解析を行った。

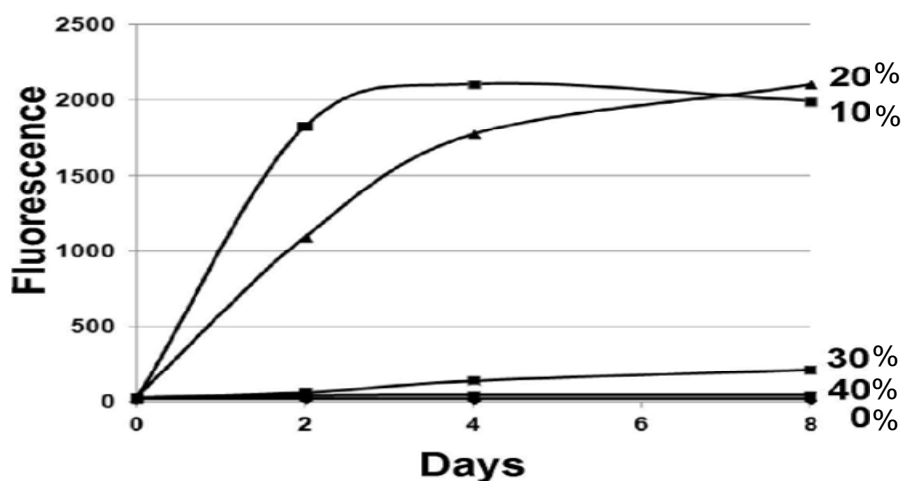


Fig. 8-1 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の THT による蛍光強度測定

VIII-3-2 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の CD

スペクトルによる二次構造の測定

Fig. 8-2 は、His-HP、中性 (pH 7.8) に TFE を 0~40% 添加して、25°C で incubation したサンプルを CD スペクトルを用いて二次構造解析をしたものである。His-HP に TFE を添加した場合、0 日目は、TFE 無添加の His-HP と比較すると、TFE の濃度がふえるにつれて α ヘリックス構造がふえていることが確認できる。日を追って、His-HP に 20% の TFE を添加した場合のスペクトル変化が特に顕著で、4 日から 8 日と時間をへるごとに β シート構造に変化していることが確認できた。10% においてもほぼ同様の結果がえられた。一方で、TFE を 30、40% 添加した場合、8 日たっても、ほとんど、 α ヘリックス構造からの変化は認められなかった。また、TFE 無添加の場合も、8 日たっても構造変化は確認できなかった。

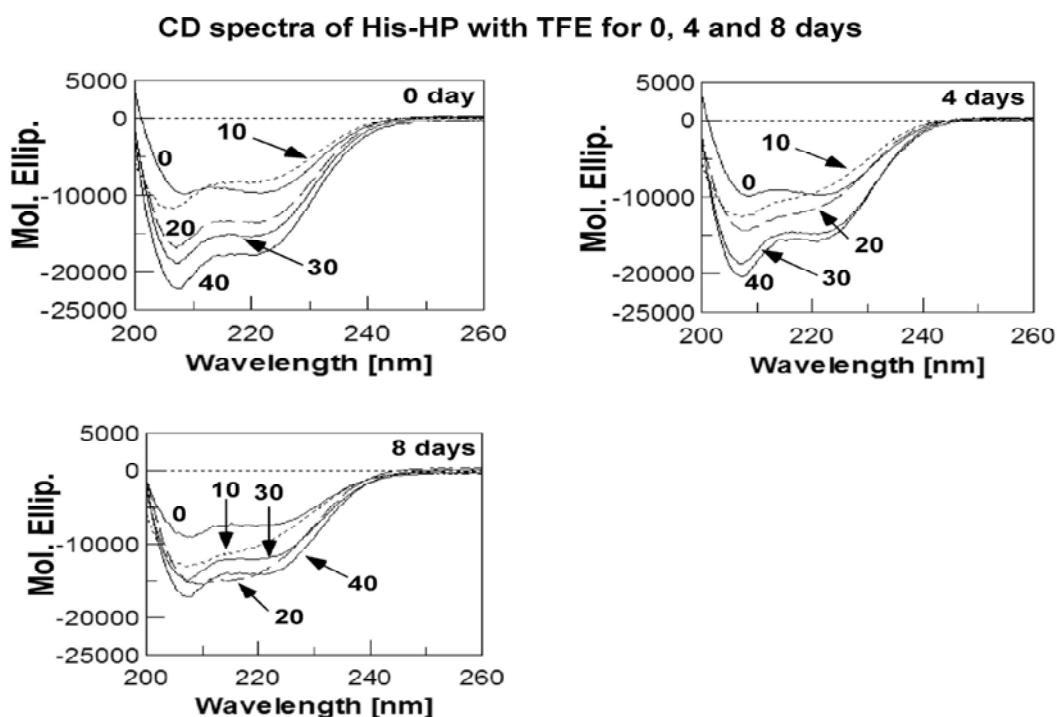


Fig. 8-2 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の CD スペクトルによる二次構造の測定

VIII-3-3 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の

Tricine/ SDS-PAGE による解析

Fig. 8-3 は、His-HP、中性(pH 7.8) に TFE を 0~40%添加して、25°Cで 8 日間 incubation した各サンプルを Tricin/SDS-PAGE によって解析したものである。結果より、どの条件においても、加水分解は、認められなかった。酸性・高温条件下よりもよりマイルドな条件であるためこのような結果になったと考えられる。次に実際に線維形成されているかを確認するために TEM による形態観察をおこなった。

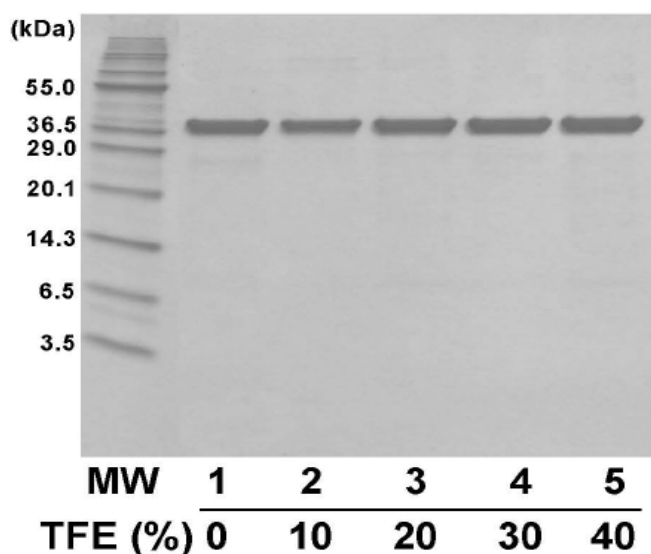


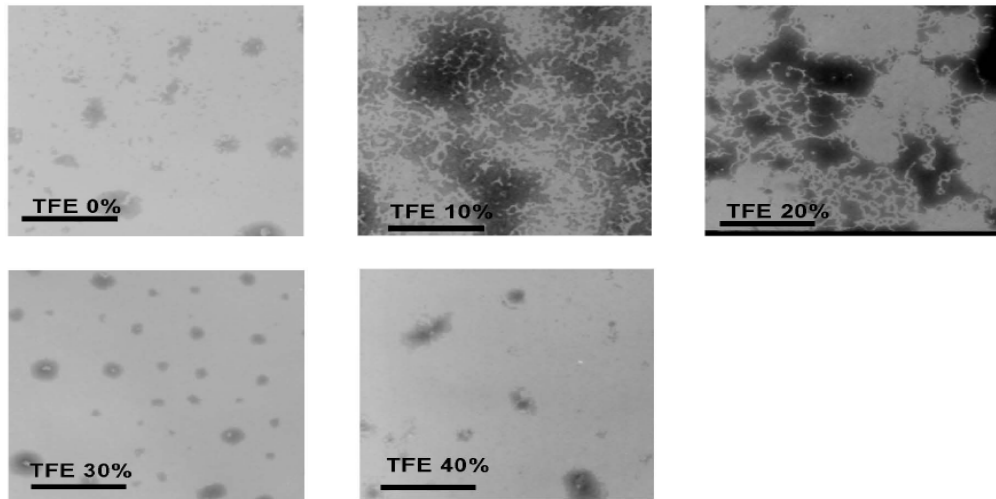
Fig. 8-3 TFE 添加による His-HP アミロイド線維の Tricine/SDS-PAGE による解析

VIII-3-4 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の TEM

による形態観察

Fig. 8-4 は、TEM による線維観察の結果である。TFE 無添加、30% と 40%は、線維化していないが、TFE を 10% あるいは 20%添加すると、酸性条件とは異なり、短い縮れた線維を形成することがわかった。さらに、食塩を添加していくと塩析効果により線維形成が増強され、短い線維とともに、細長い線維も形成されることがわかった。以上の結果より、中性条件において、TFE を添加することにより、加水分解を起こさずに線維化を誘導することができた。次にモノマーの His-HP から実際にどのくらいのアミロイド線維が形成されたかを確認するために、アミロイド線維を形成したサンプル (His-HP with TFE20%) の超遠心 (60,000rpm、5 時間)を行い、超遠心前のサンプルから算出したタンパク濃度と超遠心後の上澄み、沈澱画分のタンパク濃度を比較することで、アミロイド線維形成量の定量をおこなった。

(A) His-HP incubated with 0~40% TFE in 50 mM Tris-HCl buffer, pH7.8, at 25 °C



(B) Effects of 50 and 100 mM NaCl on fibril formation of His-HP incubated with 20% TFE

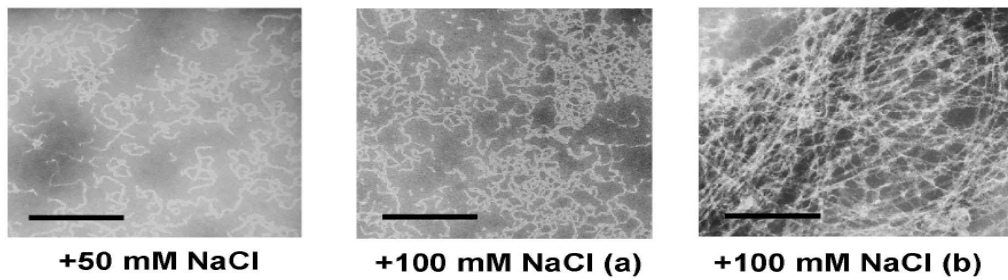


Fig. 8-4 TFE 添加による His-HP アミロイド線維(full length)の TEM による形態観察

VIII-3-5 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維のアミロイ

ド線維形成量の測定

His-HP の 1mg/ml 溶液の OD₂₈₀ は 0.64 と計算される。Table. 1-10 の結果は His-HP のアミロイド線維のサンプルを超速心にかけて上澄みと沈澱にわけ適宜希釈して測定を行いアミロイド線維形成量を算出したものである。Table. 1-10 の結果から上澄み画分は、総タンパク量が 2.17mg であった。一方で沈澱画分は、総タンパク量が 2.75mg となり以上の結果より沈澱画分には全タンパク量から、約 50% のアミロイド線維が形成されていることがわかった。

Table. 1-10 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維のアミロイド線維形成量の測定

	蛋白濃度(mg/ml)	容量(ml)	総蛋白量(mg)
Total (HP)	5.21mg/ml	1ml	5.21mg
Surpernatant	2.17mg/ml	1ml	2.17mg
Precipitate	13.75mg/ml	0.2ml	2.75mg

VIII-3-6 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後

における THT 蛍光スペクトル測定

His-HP に TFE20% 添加しアミロイド線維を形成させたサンプルの超遠心をおこない上澄みと沈澱にわけた。Fig. 8-5 は、上澄みと沈澱画分および超遠心前のサンプルを THT を用いて蛍光スペクトル測定をおこなったものである。沈澱画分のサンプルは、超遠心前のサンプルより蛍光スペクトルピークが、やや低いものの 485nm 付近に蛍光ピークを示した。一方で上澄み画分はほとんど THT の蛍光スペクトルの増加が認められなかった。以上の結果より沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆された。よって次に、超遠心前のサンプルおよび上清と沈澱画分を用いて CD スペクトルによるタンパクの二次構造解析を行った。

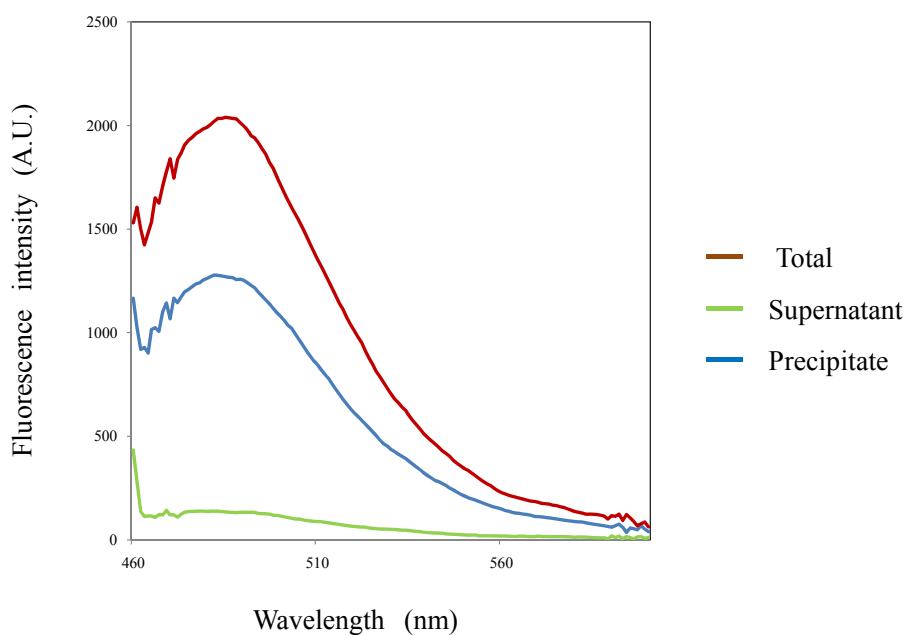


Fig. 8-5 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後 における THT 蛍光 スペクトル測定

VIII-3-7 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後

における円二色性 CD スペクトル測定

Fig. 8-6 の結果より遠心前の His-HP サンプルは、CD スペクトルにおいては 208nm および 220nm 付近に負の極大ピークが確認でき α -ヘリックス構造を含むことが示唆される。超遠心後の上澄み画分のサンプルにおいてもほぼ同様の結果がえられた。一方で、超遠心後の沈殿画分のサンプルを測定すると β シート構造を示す 216nm 付近に負の極大ピークが確認できた。しかし、Fig. 7-9 に示した酸性・高温条件での 216nm のピークはシャープなピークではなく、なだらかなスペクトルをとり α ヘリックス構造も含んでいることが示唆された。以上の結果から CD スペクトルにおいても THT の結果と併せて、沈澱画分にアミロイド線維が沈澱している可能性が示唆できる。よって次に TEM を用いてアミロイド線維の直接観察を行った。

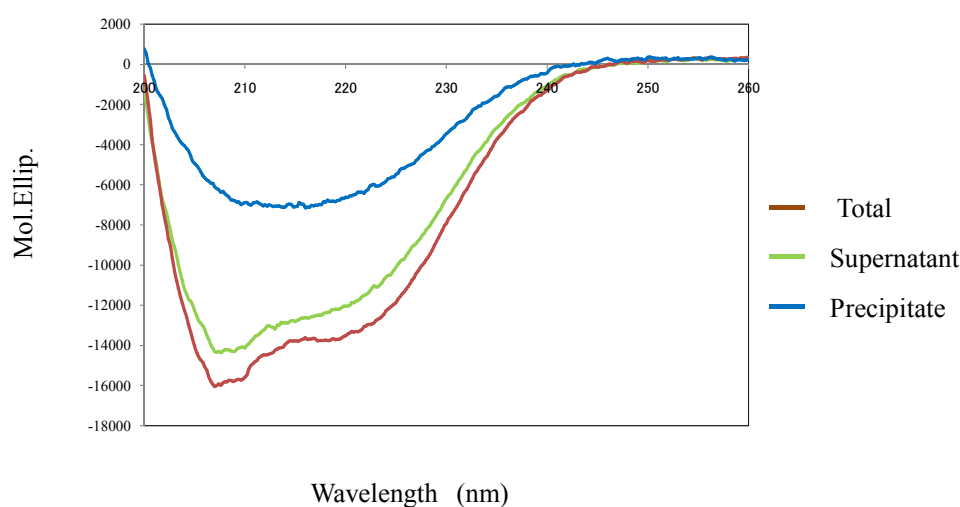


Fig. 8-6 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後における円二色性 CD スペクトル測定

VIII-3-8 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後

における TEM による形態観察

THT による蛍光強度測定および CD スペクトルによる二次構造の解析の結果にて沈澱画分にアミロイド線維が沈殿している可能性が示唆されたので、TEM 透過型顕微鏡による線維観察を行った (Fig. 8-7)。まず始めに上清画分を TEM を用いて線維観察をおこなった。その結果、酸性条件下の場合と同様に上澄みには、線維が全く確認できなかつた。一方で沈澱画分には、多量の短いアミロイド線維が確認できた。His-HP を中性条件下においてアミロイド線維を形成させると、amorphous な凝集体はほとんど形成されず、アミロイド線維のみが形成されることがわかつた。

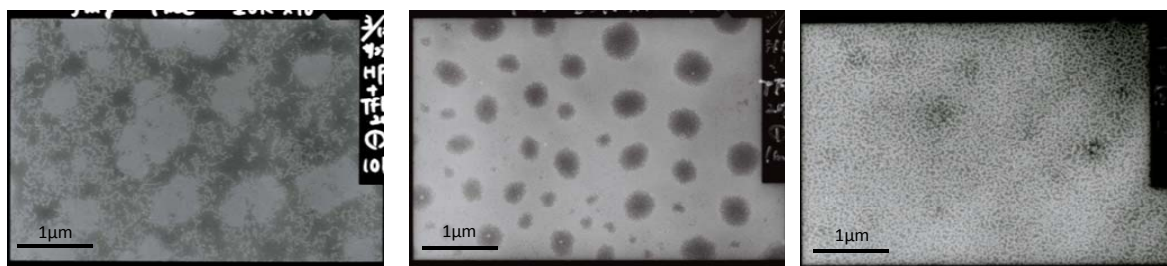


Fig. 8-7 TFE20%添加によって形成されたアミロイド線維の超遠心後 TEM における形態観察

VIII-4 考察

高温・酸性条件で incubation することで、His-HP が急速に酸加水分解をおこし、容易にアミロイド線維を形成することがわかった。しかし、この条件では、ペプチドまで分解された状態でアミロイド線維が形成されているので、ペプチドのアミノ酸の性質に依存してアミロイド線維が形成されている可能性が高い。そこで、この章では His-HP が加水分解をおこさない条件 (25°C・中性条件) にアミロイド線維形成誘導剤として、よく用いられる 2,2,2,-Trifluoroethanol (TFE) を添加しアミロイド線維形成条件を検討した。His-HP に TFE を 10% or 20% 添加することにより、急速に、THT の蛍光強度の増加が認められ 4 日目ではほぼ定常状態に達することが確認された。TFE30% の場合、8 日目で少し蛍光強度が増加したが、TFE 0%, 40% 添加した場合は、THT の増加はみとめられなかった。その後、8 日目まで incubation したサンプルをトリシン電気泳動によって解析を行うと、どのサンプルも、加水分解は、認められなかった。次に、CD スペクトルを用いた His-HP の二次構造解析を行うと、TFE を添加した直後は、TFE 無添加に比べて、TFE の濃度がふえるにつれて α ヘリックス構造が増えていることが確認された。一方、20%TFE 存在下での構造変化が顕著であり 4 日から 8 日と時間をへるごとに β シート構造に変化していることがわかる。10% においてもほぼ同様の結果がえられる。TFE を 30, 40% 添加した場合、8 日たっても、ほとんど α ヘリックス構造からの変化は認められなかった。また、TFE 無添加の場合も、8 日たっても構造変化は確認できなかった。TEM を用いて線維観察を行うと、TFE 無添加、30%, 40% は、線維化していないが、TFE を 10% あるいは 20% 添加すると、酸性条件とは異なり、短い、縮れた線維を形成することが確認された。さらに、食塩を添加していくと塩析効果により線維形成が enhance され、短い線維とともに、細長い線維も形成されることがわかった。超遠心によるアミロイド線維形成量を推定したところ全タンパク質量の約 50% のアミロイド線維が形成されていると予想された。以上の結果より、中性条件において、TFE を添加することにより、加水分解を起こさずに線維化を誘導することができた。これは、TFE が His-HP の構造を変化させ、10~20% 濃度で中間体構造をとり β シート構造を形成するためと考えられる。もしくは、TFE は水よりも極性が小さいため、TFE の添加によってタンパクの溶解度が減少して析出し線維化したためと示唆された。また、30~40% 添加した場合に線維化を示さない理由としては、TFE が本来もっている α ヘリックス構造誘導作用により、より強力に α ヘリックス構造が誘導されたためと考えられた。

第九章 HEWL と His-HP のアミロイド線維形成状態の比較

IX-1 緒論

七・八章の結果より、His-HP は、非凝集性が高いので、アミロイド線維を形成しにくいと予想していたが、アミロイド形成モデルタンパク質として使用される HEWL よりも、酸性条件・中性条件で容易に、線維形成するということがわかった。そこで、His-HP と非常に凝集性の強い HEWL とのアミロイド線維形成状態の比較をおこなった。

IX-2 実験方法

IX-2-1 アミロイド線維形成方法(酸性条件下)

HEWL サンプル調製方法

HEWL(和光、6回結晶)を 35mg 秤量しミリ Q にて溶解した。(35mg/ml)
0.2M Glycine-HCl buffer (pH 2.0) および Monomer の HEWL を f. c 50 mM and 3.5mg/ml)になるようそれぞれ溶解し、そこに断片化した seeds を 2%(v/v)添加する (Seeds の作製方法は、II-2-1 を参照)。58°C で 1 カ月 incubation し (As one incubater L002-84)、その後、超遠心分離をおこなった。タンパク濃度の測定は、 OD_{280} の吸光度を測定した。遠心分離機は、optima-TL を用い 60,000rpm (150,000g) 4°C 5 時間おこなった。遠心分離したサンプルを上清と沈澱にわけ、その後の測定を行った。

His-HP サンプル調製方法

精製した His-HP (VII-2-2 参照) を、50mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) で一日透析を行った。f. c 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) にタンパクが f. c 7mg/ml になるように溶解する。調製したサンプルを 58 °C で 14 日間 incubation し、アミロイド線維を形成させた。THT 蛍光強度測定と TEM にてアミロイド線維形成を確認後、超音波破碎の処理 (sonication) を行いアミロイド線維を断片化し、seeds として使用した。Sonicator を使用し (Output 1 dutycycle 10% 50 回 sonication した)断片化した seeds を 50mM glycine-HCl buffer (pH 2.0) に溶解した Monomer の His-HP (f. c 3.5mg/ml) に 2% (v/v) 添加し 58 °C で 1 カ月 incubation を行った。タンパク濃度の測定は、280nm 時の吸光係数を用いた。

IX-2-2 アミロイド線維形成方法(中性条件化)

HEWL 調製方法

HEWL (和光、6 回結晶) を 20mg 秤量し、ミリ Q にて溶解した。(20mg/ml)
50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に f. c 5mg/ml になるように溶解した。
さらにその溶液に終濃度 3mM のアジ化ナトリウムと 10~40% の TFE をそれぞれ添加した。その後、25 °C にて 8 日間 incubation を行い、その後、超遠心分離をおこなった。タンパク濃度の測定は、280nm の吸光係数を用いた。

His-HP 調製方法

精製した His-HP (VII-2-2 の方法参照) を 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) で一日透析を行う。透析したタンパクを 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) に終濃度 5mg/ml になるように溶解した。さらにその溶液に終濃度 3 mM のアジ化ナトリウムと 10~40% の TFE をそれぞれ添加した。その後、25 °C にて 8 日間 incubation を行いその後、超遠心分離をおこなった。タンパク濃度の測定は、280nm の吸光係数を用いた。

IX-2-3 アミロイド線維の超遠心分離

His-HP と HEWL のアミロイド線維サンプルを 60,000rpm, 4℃, 5 時間で超遠心を行った。超遠心後、上澄みと沈澱にわけて比較をおこなった。

IX-2-4 アミロイド線維の分光学的手法による測定および TEM による形態観察

上澄みと沈澱にわけた各サンプルを THT による蛍光強度測定, CD スペクトルによる二次構造の解析, TEM による線維観察を行い比較検討を行った。測定はそれぞれ II-2(2~5)に記載した方法で行った。

IX-3 結果

IX-3-1 HEWL と His-HP のアミロイド線維形成速度の比較

Fig. 9-1 は、His-HP、HEWL をそれぞれ酸性・中性条件で incubation した場合 (seeds 添加なし) の THT 蛍光強度の結果である。酸性条件の場合、HEWL は、lag time が非常に長く、8 日以降から徐々に蛍光強度の増加が確認できる。一方で、His-HP は、1 日の incubation で全体の約 7 割まで蛍光強度が増加しており、TEM の観察からも HEWL に比べて非常に線維形成しやすいことが示唆された。中性条件における TFE20% 添加の場合は、HEWL は、amorphous な凝集体しか形成されない。His-HP は、酸性のときとは異なり、線維が短いが線維形成していることが示唆された。以上の結果より、His-HP は、HEWL よりも、酸性条件・中性条件で容易に、線維形成するということが示唆された。そこで、次に、超遠心を用いてアミロイド線維形成機構を比較した。

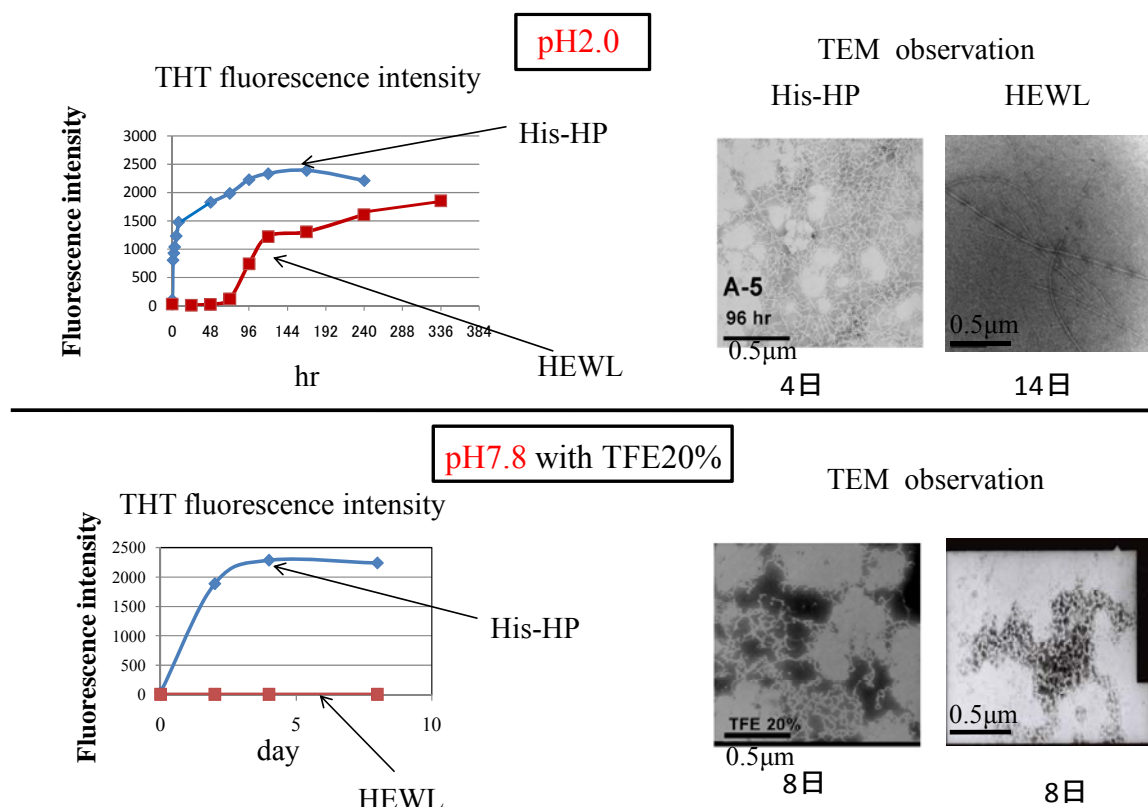


Fig. 9-1 HEWL と His-HP のアミロイド線維形成速度の比較

IX-3-2 超遠心を用いた HEWL と His-HP のアミロイド線維形成機構

(酸性条件)の比較

Fig. 9-2 は、His-HP、HEWL をそれぞれ酸性条件下で incubation しアミロイド線維を形成させたものを超遠心して、上清と沈澱において各種解析を行った結果である。まず、TEM で比較すると、沈澱には、両サンプルとも細長い線維が確認できた。THT の蛍光ピークと CD による β シートを示すピークより、これらはアミロイド線維であることが示唆された。しかし、両サンプルの上清画分を観察した場合に相違がみられ、HEWL に凝集体が観察された。THT でこの上澄み溶液を測定した場合、蛍光スペクトルがはず、CD スペクトルにおいても β シート構造のピークが確認できなかつたので、これは、アミロイド線維ではなく、不規則な凝集体であることが推察された。これより HEWL は、線維形成時に、アミロイド線維だけではなく、不規則な凝集体を形成していることがわかつた。一方で His-HP の場合、上澄みには、HEWL のような凝集体は全く観察されなかつた。His-HP は、HEWL とは異なり、アミロイド線維形成時に、不規則な凝集体を作らずに、均一にアミロイド線維が形成されていることが示唆された。以上の結果より、高温・酸性条件という同条件下で、両者の線維形成過程に相違がみられた。

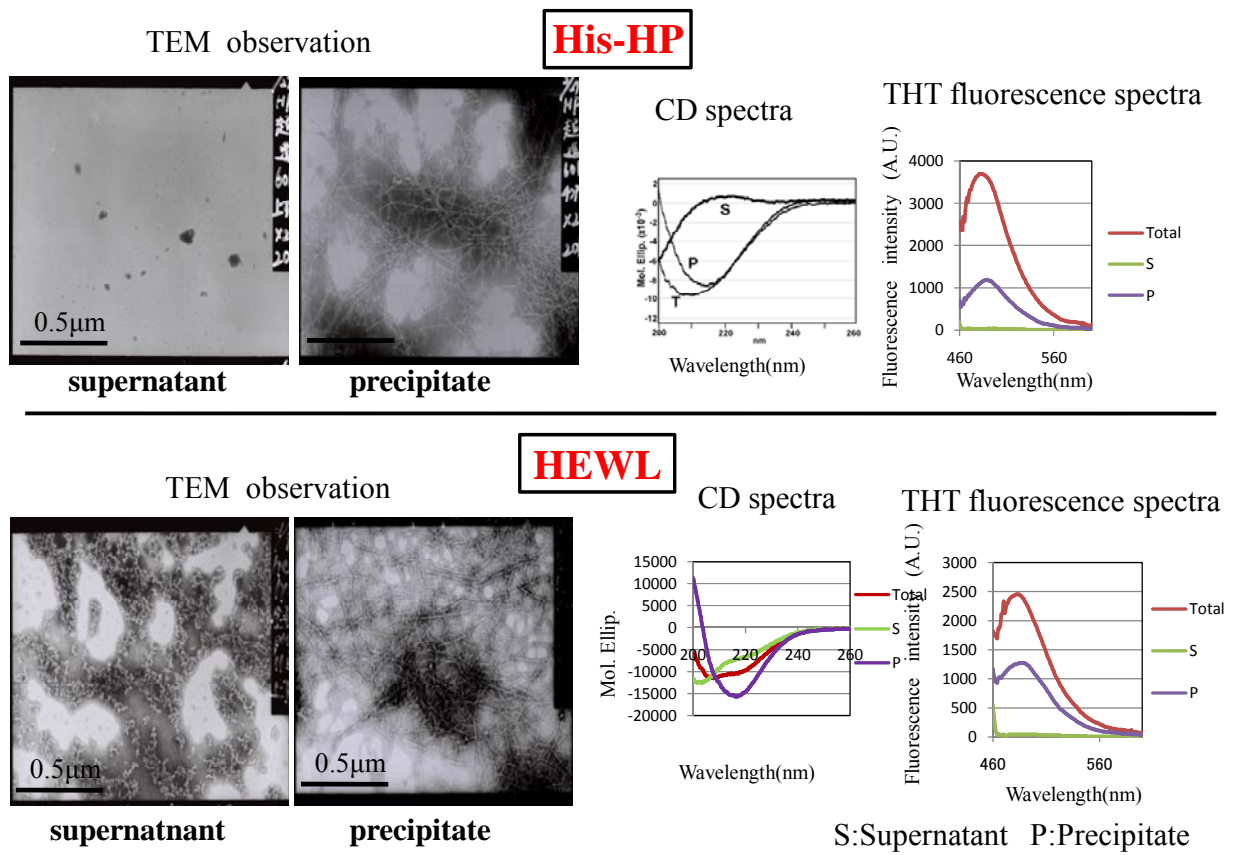


Fig. 9-2 超遠心を用いたHEWLとHis-HPのアミロイド線維形成機構(酸性条件)の比較

IX-3-3 超遠心を用いた HEWL と His-HP のアミロイド線維形成状態

(中性条件)の比較

Fig. 9-3 は、His-HP と HEWL を中性 pH 7.8 で TFE を 20%添加し、25°Cでアミロイド形成をしたサンプルの、比較をおこなった。このサンプルも超遠心を行い、上澄みと沈澱の解析をおこなった。まず、His-HP の沈澱画分の線維は、THT で蛍光ピーク、CD では 216nm の β シート構造のピークが確認できたので、アミロイド線維であることがわかった。上澄み画分には、酸性条件下のときと同じように、凝集体は全く観察されなかった。一方 HEWL の場合、アミロイド線維は確認できず amorphous な凝集体のみが観察された。THT で蛍光スペクトルのピークがみられず、CD スペクトルでも β シート構造のピークが確認できないので、この塊は、アミロイド線維ではなく、amorphous な凝集体である可能性が示唆された。また、HEWL の場合、TFE を 10~40%添加したすべての条件でアミロイド線維形成は認められなかった。以上の結果より、中性条件の場合、HP は酸性条件のときと同様に、アミロイド線維形成時に、不規則な凝集体をつくらずに、均一にアミロイド線維が形成されていることが示唆された。

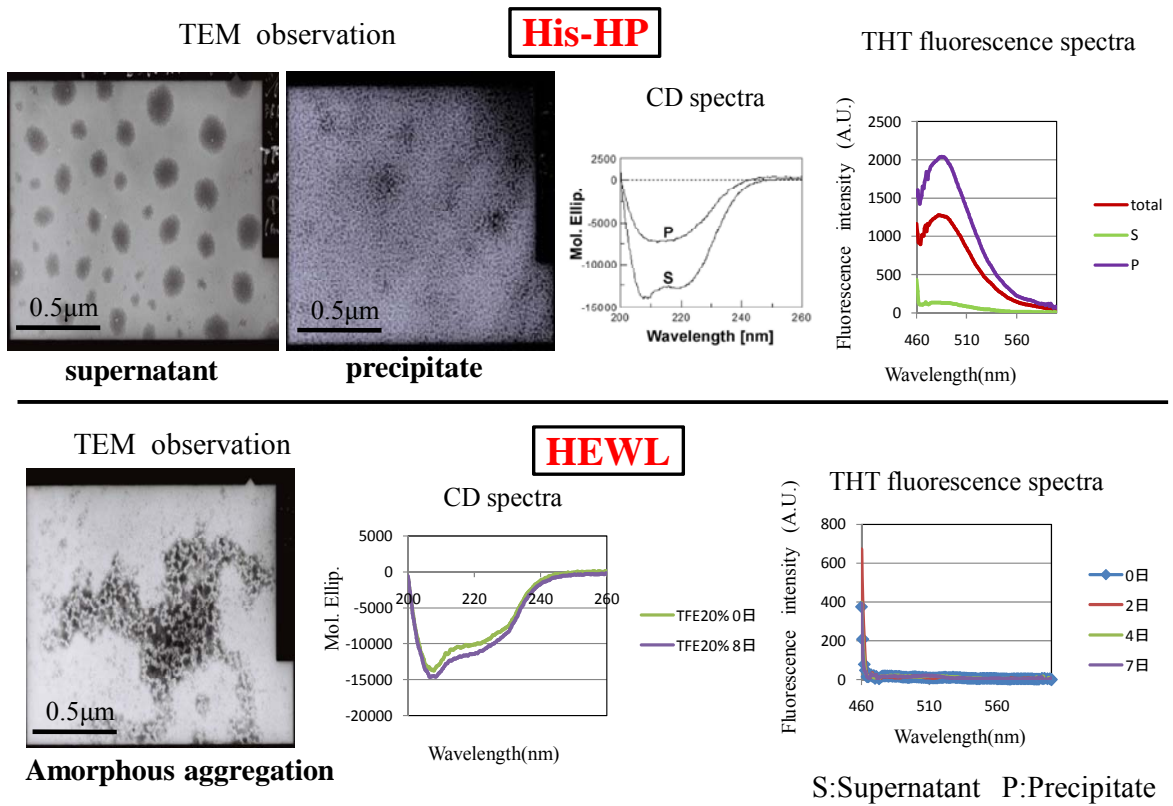


Fig. 9-3 超遠心を用いた HEWL と His-HP のアミロイド線維形成状態(中性条件)の比較

IX-4 考察

His-HP は、酸性・中性条件ともに、HEWL とは異なり、不規則な凝集体をつくらずに、均一にアミロイド線維が形成されていることが示唆された。これは、HEWL は凝集性が高いドメインが多いので、様々な相互作用によって核を作る頻度が高く、そのため、規則的な線維凝集だけではなく、不規則な凝集も作りやすいためと推察される。しかし、逆に His-HP は、水に溶けやすく多量のマイナス電荷を持つタンパク質なのでタンパク質分子間の不可逆的な相互作用の頻度が低く、いろいろな種類の凝集体を作る核ができにくいと考えられる。よって His-HP の場合、核は、形成しにくいながらも核を形成できる条件を見つければ、(ここでは、TFE20%を添加した場合)均一な核しかできないので、不規則な凝集体は作らず、均一な線維しかできないと考えられる。また、HP は、早く、容易にしかも均一に線維形成できるため、アミロイド線維形成のメカニズムを研究する上で、解析を行いやすく、有用なアミロイド形成モデルタンパク質であることが示唆された。

第十章

総合討論

本研究における主要な成果は(1)HEWLの酸性・高温条件下におけるアミロイド線維形成コア領域を同定したことと(2)非常に可溶性が高く非凝集性の強い好塩性タンパク質がアミロイド線維を形成しやすく、アミロイド線維形成モデルタンパク質となりうることを証明したことである。前者は二章～五章にまとめた研究結果の中に多くの成果をえることができた。また後者においても、七・八章でHEWLと比較すると非常にアミロイド線維を形成しやすいことがわかり特に、九章においてHEWLとHPのアミロイド線維形成状態を比較することで線維形成過程における新たな知見をえることができた。HEWLの酸性・高温条件下におけるアミロイド線維形成コア領域を同定するために行った多くの検討から得られた特筆すべき重要な成果は以下の三つである。まず、第一にアミロイド形成コア領域と考えられる9残基のペプチド(K peptide)を同定したことである。HEWL-K peptideは、pH 4の条件にて最もよく線維形成し、かつ非常に剛直な線維が形成されることがわかった。第二にK peptideの線維形成には、Trp62が重要な役割を果たしているということがわかったことである。K peptideのTrp62を置換あるいは欠損させるとTHTによる蛍光強度測定・CDスペクトル・AFM・TEMの結果からアミロイド線維を形成しなくなる。この結果から線維形成にはTrp62が必須であることを確証づけることができた。またTrp62があることによってCDスペクトルにおいて230nm付近に非常に特徴的なスペクトルをとることもわかった。これは、Trp62がペプチド分子を寄せ集める、driving-forceになってTrp62がAromatic-stackingすることによってアミロイド線維を形成している可能性があるかと推察される。さらにANS、トリプトファン残基の蛍光強度測定、アクリルアミドを用いたトリプトファン残基の蛍光 Quenching 実験より、線維形成が進んでいくとTrp62が非極性環境化におかれていることもわかり、よってHEWL-K peptideがアミロイド線維を形成する場合、Trp62が非極性環境におかれ、Aromatic stackingによってクロスβシート構造をつくり線維を形成していると予想される。第三にHuman-K peptideにおいても線維形成をすることができたことである。Human-lysozymeは、HEWLとアミノ酸配列で約60%の相同性を示すので、ヒトにおけるK peptideの相同領域がアミロイド線維形成コア領域である可能性が高いと予想された。そこで、Human-lysozymeのアミノ酸配列からアミロイド形成 prediction soft である Walts(<http://waltz.switchlab.org/>)を用いて、アミロイド形成領域の予想を行った。するとHEWL-K peptideを含む領域が検出された。そこで、実際に線維

形成条件を検討すると、Human K-peptide は線維形成に若干時間を用するものの HEWL-K peptide のときと同様にアミロイド線維を形成することがわかった。また HEWL-K peptide 自身に対して seeding 効果を示す事がわかったためアミロイド線維としての性質を有していることもわかった。しかし、CD スペクトルの結果から、HEWL-K peptide とは異なり Aromatic-stacking によるシグナルが確認できなかったため、線維構造や線維形成メカニズムに相違があることが予想された。以上三つの結果をまとめると HEWL の酸性・高温条件下でのアミロイド線維形成の場合、HEWL-K peptide が非常に重要な役割を果たしていることがわかった。過去の文献(15)より約 50 残基のペプチドにて線維形成することが報告されていたが線維形成機構についての詳細は不明であった。しかし、今回 9 残基のペプチドで線維形成するということを証明することができたことは、リゾチームの線維形成のメカニズムを解明する上で非常に意義があると考えられる。次に好塩性タンパク質によるアミロイド線維形成について得られた知見については以下の二点があげられる。まず、第一に好塩性タンパク質である His-HP は酸性条件及び・中性条件下 TFE 添加で容易に線維化することがわかったことである。*in vitro* の系でアミロイド線維形成をおこなうときの一般的な方法である高温・酸性条件下での検討をおこなった場合 THT による蛍光強度測定・TEM による形態観察・Tricine/SDS-PAGE の結果から His-HP が急速に加水分解をおこなうことによって線維形成されていることが示唆された。そこで次に、アミロイド形成コア領域を同定するために遠心をおこない沈澱画分の分析を行った。すると、2G-55D、L76-D109、A68-D109、A207-N235 の 4 つのペプチド断片が精製できた。このペプチドからアミロイド線維の再構成をおこない、さらにアミロイド線維形成 prediction soft である Walts から予測し合成した 3 つのペプチドにおいても線維化することわかったので、この領域が線維形成に非常に重要であることをより強く確証づけることができた。また、精製されたペプチドは 5 か所のアスパラギン酸、1 か所のアスパラギンで加水分解されていることがわかった。アスパラギン酸の C 末端側のペプチド結合は、酸加水分解を受けやすいということが報告されており、His-HP は全 sequence の内 10%がアスパラギン酸であるため、極めて酸加水分解を受けやすいとかがえられる。その結果 HP は、アミロイド線維を形成しやすいと考えられた。しかし、この条件下では、ペプチドまで分解された状態でアミロイド線維が形成され、ペプチドを構成するアミノ酸の性質に依存して線維形成がおこっているため、非常に非凝集性が高い His-HP 全長でアミロイド線維ができているという証明にはならなかった。そこで、次に His-HP が加水分解を起こさずに線維形成をする条件を検討した。His-HP が加水分解をおこさない条件(25°C・中性条件)にアミロイド線維形成誘導剤として、よく用いられる TFE (2, 2, 2, -Trifluoroethanol)を添加しアミロイド線維

形成条件を検討すると中性条件においては、TFE を添加することにより、加水分解を起こさずに線維化を誘導することができた。これは、TFE が His-HP の構造を変化させ、10~20%濃度で中間体構造をとり β シート構造を形成するためと考えられる。もしくは、TFE は水よりも極性が小さいため、TFE の添加によってタンパクの溶解度が落ちて析出し線維化したものと考えられる。以上の結果より His-HP は、非凝集性が高いので、アミロイド線維を形成しにくいと予想していたが、酸性・中性両条件においてともに線維化しやすいことがわかった。第二に His-HP は、HEWL とは異なり線維形成時に非特異的な凝集体(amorphous 凝集体)を形成しにくいということがわかったことである。His-HP と非常に凝集性の強い HEWL とのアミロイド線維形成状態の比較をおこなうと、His-HP は、第八章の結果から酸性・中性条件ともに、不規則な凝集体をつくらずに、均一にアミロイド線維が形成されていることがわかった。His-HP は、水に溶けやすく多量のマイナス電荷を持つタンパク質なのでタンパク質分子間の不可逆的な相互作用の頻度が低く、様々な種類の凝集体を作る核ができにくいためと考えられる。His-HP の場合、核は、できにくいながらも核を形成できる条件をみつければ、(ここでは、TFE20%を添加した場合)均一な核しかできないので、不規則な凝集体は作らず、均一な線維を形成する可能性が高いと考えられる。以上、第一・二の結果をまとめると好塩性タンパク質である HP は、HEWL と比較すると早く、容易にしかも均一に線維の形成がおこるため、アミロイド線維形成のメカニズムを研究する上で、解析を行いやすく、有用なアミロイド形成モデルタンパク質であることが示唆された。

X I 参考文献

- (1) Young-Ho Lee, Ozawa D, Goto y. 生化学 . 第 81 卷, 第 8 号, 677-687, 2009
- (2) Goto y. 細胞工学 . Vol.26, No.2, 2007
- (3) Naiki H, Higuchi K, Nakakuki K, Takeda T.
Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization *in vitro*.
Lab Invest. 1991;65:104-110.
- (4) Naiki H, Nakakuki K.
First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension *in vitro*.
Lab Invest. 1996;74:374-383.
- (5) Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K and Gejyo F
Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension *in vitro*
Amyloid. 1997;4:223-232
- (6) Glabe C.G.
Structural classification of toxic amyloid oligomers.
J Biol Chem. 2008;283:29639-29643.
- (7) Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty, Nguyen O, Blake CC, Terry CJ.
Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis.
Nature. 1993;362:553-557.
- (8) Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CC, Pepys MB.
Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis.
Nature. 1997;385:787-793.

- (9) Morozova-Roche LA, Zurdo J, Spencer A, Noppe W, Receveur V, Archer DB, Joniau M, Dobson CM.
Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants.
J Struct Biol. 2000;130:339-351.
- (10) Kumita JR, Johnson RJ, Alcocer MJ, Dumoulin M, Holmqvist F, McCammon MG, Robinson CV, Archer DB, Dobson CM
Impact of the native-state stability of human lysozyme variants on protein secretion by *Pichia pastoris*.
FEBS J. 2006;273:711-720.
- (11) Vernaglia BA, Huang J, Clark ED.
Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme.
Biomacromolecules. 2004;5:1362-1370.
- (12) Goda S, Takano K, Yamagata Y, Nagata R, Akutsu H, Maki S, Namba K, Yutani K.
Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution.
Protein Sci. 2000;9:369-375.
- (13) Holley M, Eginton C, Schaefer D, Brown LR.
Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution.
Biochem Biophys Res Commun. 2008;373:164-168.
- (14) Krebs MR, Wilkins DK, Chung EW, Pitkeathly MC, Chamberlain AK, Zurdo J, Robinson CV, Dobson CM.
Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain.
J Mol Biol. 2000;300(3):541-549.

- (15) Frare E, Polverino De Laureto P, Zurdo J, Dobson CM, Fontana A.
A highly amyloidogenic region of hen lysozyme.
J Mol Biol. 2004;340:1153-1165.
- (16) Mishra R, Sörgjerd K, Nyström S, Nordigården A, Yu YC, Hammarström P.
Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation
but decelerated by intact protein binding and conversion.
J Mol Biol. 2007;366:1029-1044.
- (17) Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Imoto T, Ueda T.
Amyloid formation in denatured single-mutant lysozymes where residual structures
are modulated.
Protein Sci. 2006;15:2448-2452.
- (18) Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Imoto T, Ueda T.
A particular hydrophobic cluster in the residual structure of reduced lysozyme
drastically affects the amyloid fibrils formation.
Mishima T, Ohkuri T, Monji A, Imoto T, Ueda T.
Biochem Biophys Res Commun. 2007;356:769-772.
- (19) 日本顕微鏡学会編 電顕入門ガイドブック改訂版
株式会社国際文献印刷社, 2011
- (20) 横川雅俊・吉村成弘・竹安邦夫
タンパク質・核酸・酵素 Vol. 49 No. 11 2004 1607-1614
- (21) Laemmli UK.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 1970;227:680-685.
- (22) Higurashi T, Yagi H, Mizobata T, Kawata Y.
Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension
prefer different degrees of molecular compactness.
J Mol Biol. 2005;351:1057-1069.

- (23) Schagger H, von Jagow G.
Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Anal Biochem. 1987;166(2):368-379.
- (24) Sugimoto Y, Kamada Y, Tokunaga Y, Shinohara H, Matsumoto M, Kusakabe T, Ohkuri T, Ueda T.
Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils.
Biochem Cell Biol. 2011;89:533-544.
- (25) Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y.
Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils.
Int J Biol Sci. 2013;9:219-227.
- (26) Haas W, MacColl R, Banas JA.
Circular dichroism analysis of the glucan binding domain of *Streptococcus mutans* glucan binding protein-A.
Biochim Biophys Acta. 1998;1384:1121-20.
- (27) Chen HF.
Aggregation mechanism investigation of the GIFQINS cross-beta amyloid fibril.
Comput Biol Chem. 2009;33:41-45.
- (28) Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D, Eisenberg D.
The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:4074-4078.
- (29) Frare E, Mossuto MF, Polverino de Laureto P, Dumoulin M, Dobson CM, Fontana A.
Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis.
J Mol Biol. 2006;361:551-561.
- (30) Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW.
Functional amyloid-from bacteria to humans.
Trends Biochem Sci. 2007;32:217-224.

- (31) Kelly Schwartz *et al*
Microbial amyloidosis-functions and interactions and interactions within the host
Current Opinion in Microbiology.2012,16:1-7
- (32) Aso Y, Shiraki K, Takagi M.
Systematic analysis of aggregates from 38 kinds of non disease-related proteins:
identifying the intrinsic propensity of polypeptides to form amyloid fibrils.
Biosci Biotechnol Biochem. 2007;71:1313-1321.
- (33) Liu WT, Lin SC, Chou WI, Liu TH, Pan RL, Tzou DL, Hua TE, Chang MD.
Identification and characterization of a novel fibril forming peptide in fungal starch
binding domain.
Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:966-970.
- (34) Kushner D.J.
Microbial Life in Extreme Environments
Academic Press,London, Ltd., United Kingdom , 1978,317-368,
- (35) Pflüger K, Müller V.
Transport of compatible solutes in extremophiles.
J Bioenerg Biomembr. 2004;36:17-24.
- (36) Oren A, Heldal M, Norland S, Galinski EA.
Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic
bacterium *Salinibacter ruber*.
Extremophiles. 2002;6:491-498.
- (37) Ventosa A, Nieto JJ, Oren A.
Biology of moderately halophilic aerobic bacteria.
Microbiol Mol Biol Rev. 1998 ;62:504-544.
- (38) Brown,A.D. Bacteriological Reviews1976,40,803-806
- (39) Madern D, Ebel C, Zaccai G.
Halophilic adaptation of enzymes.
Extremophiles. 2000;4:91-98.

- (40) Lanyi J.K.
Bacteriological Review. , 1974, 38, 272-290
- (41) Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, Nishikawa K.
Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria.
J Mol Biol. 2003;327:347-357.
- (42) BAXTER RM.
An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of
Halobacterium salinarium.
Can J Microbiol. 1959;5:47-57.
- (43)大島泰郎監修
サイエンスフォーラム, 1991
- (44) Yamaguchi R, Arakawa T, Tokunaga H, Ishibashi M, Tokunaga M.
Halophilic properties of metal binding protein characterized by high histidine
content from *Chromohalobacter salexigens* DSM3043.
Protein J. 2012 ;31:175-183.
- (45) Yutani K, Takayama G, Goda S, Yamagata Y, Maki S, Namba K, Tsunasawa S,
Ogasahara K.
The process of amyloid-like fibril formation by methionine aminopeptidase from a
hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*.
Biochemistry. 2000;39:2769-2777.
- (46) Ishibashi M., Tokunaga H., Hiratsuka K., Yonezawa Y., Tsurumaru H., Arakawa
T.Tokunaga M.
NaCl-activated nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaeon.
FEBS Letters.2001:493: 134-138
- (47) Ishibashi M., Arakawa T., Philo J.S., Sakashita K., Yonezawa Y., Tokunaga H., &
Tokunaga M..
Secondary and quaternary structural transition of the halophilic archaeon
nucleoside diphosphate kinase under high and low-salt conditions.
FEMS Microbiology Letters,2002:216: 235-241

- (48) H.Tokunaga , M.Ishibashi M, T.Arakawa , M.Tokunaga
Highly efficient renaturation of beta-lactamase isolated from moderately halophilic bacteria.
FEBS Lett 2004: 558:7–12.
- (49) T.Arakawa ,H.Tokunaga , R.Yamaguchi, M.Tokunaga
High solubility supports efficient refolding of thermally unfold beta-lactamase
Int J Biol Macromol .2010: 47:706-709
- (50) R.Yamaguchi, Y.Inoue, H. Tokunaga, M. Ishibashi , T. Arakawa,J.Sumitani, T. Kawaguchi, M. Tokunaga
Halophilic characterization of starchbinding domain from *Kocuria varians* α -amylase.
Int J Biol Macromol.2012,:50:95-102
- (51) Fabrizio Chiti, P.Webster,N.Taddei,C.M.Dobson.
Designing conditions for in vitro formation amyloidprotofilaments and fibrils.
Proc.Natl.Acad.Sci.1999 :196 :3590-3594
- (52) Jason P Schmittschamit ,J.Martin scholtzet .
The role of protein stability, solubility, and net charge in amyloid fibril formation.
amyloidprotofilaments amyloid fibrils formation.
Protein.Sci.2003: 12 :2374-2378
- (53) Greenfield N, Fasman GD.
Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation..
Biochemistry. 196;8:4108-4116.
- (54) Yoshimura Y , Lin Yuxi, Yagi H, Lee Yong-Ho, Kitayama H, Sakurai K. So M. Ogi H.Naiki H. Goto Y.
Distinguishing crystal-like amyloid fibril and glass-like amorphous aggregates from their Kinetics of formation.
Proc.Natl.Acad.Sci.2012: 109 :36:14446-14451

(55) Chiti F and C.M.Dobson.

Protein misfolding, functional amyloid, and human disease
Annu Rev Biochem .75:333-366

(56) C.M.Dobson

Protein folding and misfolding
Nature .426:884-890

X II 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇切なご指導を賜りました鹿児島大連合農学研究科 応用生命科学専攻 杉元康志 教授に深く感謝申し上げます。また、ご指導とご協力をいただきました鹿児島大学獣医学科 松元光春 教授、鹿児島大学機器分析室 十川三臣氏、大阪大学 八木寿梓 助教授、ご協力をいただきました鹿児島大学連合農学研究科 応用生命科学研究室の皆様にお礼申し上げます。

さらに本論文をまとめるにあたり、ご校閲を賜りました鹿児島大学 大塚彰 准教授、佐賀大学 渡邊啓一教授、鹿児島大学 玉置尚徳教授、佐賀大学 光富勝 教授に厚くお礼申し上げます。

XIII 本論文の主体となる報文

(1) Tokunaga Y, Sakakibara Y, Kamada Y, Watanabe K, Sugimoto Y.
Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils.
Int J Biol Sci. 2013;9:219-227.

(2) Tokunaga Y, Matsumoto M, Tokunaga M, Arakawa T, Sugimoto Y.
Amyloid fibril formation in vitro from halophilic metal binding protein: Its high
solubility and reversibility minimized formation of amorphous protein aggregations.
Protein Sci. 2013.;22:1582-1591.