

系統的変異体合成と動的散乱法による アミロイド集合体形成機構の解明

座安瑞希, 穂本光弘, 佐伯政俊

山口東京理科大学 工学部 [〒756-0884 山口県山陽小野田市大学通 1-1-1]

1. 緒言

アミロイド病は、アミロイド線維の集合体であるアミロイドの沈着が発症の原因であると言われ、そのメカニズムの解明が必要とされている。アミロイド線維は、タンパク質の構造異常により形成されたβシートの積層からなる、タンパク質の種類によらない幅 10 nm の微細状の線維であるが、興味深いことに、アミロイド形成性タンパク質である barnase の M1 モジュール (BM24) の C 末端 3 残基 (Asp, Asn, Tyr) を欠損させたペプチド (BM21) では、幅 20 nm の線維を形成すると報告されている¹⁾。BM24 は、1-18 番残基が線維形成の核となるβシートを形成しているため、欠損させた 3 残基は線維形成の核ではないが、線維及びアミロイドの形態に影響していることが考えられる。そこで本研究では、3 残基が与える影響を調べるため各種変異体ペプチドを設計し、変異の種類と位置が与える結果から、線維及びアミロイド形成機構を解明することを目的とした。

2. 実験方法

これまでに、アミロイド線維の形成には 24 残基目の Tyr が関与していることが明らかにされている。そこで、Tyr 残基の性質の評価のために、疎水性が高い脂肪族側鎖の Leu に置換したペプチド (BM24YL)、Tyr とは異なる芳香環側鎖を有する Phe に置換したペプチド (BM24YF) を設計した。また、側鎖のかさ高さによる影響の評価のために、Asp と同じ性質だが側鎖が長い Glu に置換したペプチド (BM24DE)、同様に Asn を Gln に置換したペプチド (BM24NQ) を設計し、さらに、側鎖の電荷の影響を評価するために負電荷の Asp を正電荷の Arg に置換したペプチド (BM24DR) を設計した (図 1)。調製した各種ペプチドは、0.1 mM 経過観測溶液として保存した。これらをβシートに特異的に結合し強い蛍光を発する試薬チオフラビン T を用いた蛍光測定と、動的散乱 (DLS) 法を用いた粒

子径の測定の 2 種類を行い、溶液中でのアミロイド様凝集の有無とその大きさを評価した^{2), 3)}。

3. 実験結果

Tyr 残基の性質を評価するペプチド BM24YL, BM24YF では、蛍光強度は増大し、DLS 測定の結果は、粒子径の大きさが BM24YL < BM24YF < BM24 であった。次に、側鎖のかさ高さの影響を評価するペプチド BM24DE, BM24NQ では、蛍光強度は増大せず、アミロイド線維を形成しなかった。側鎖の電荷の影響を評価するペプチド BM24DR では蛍光強度は増大し、DLS 測定では、BM24 よりも大きい 500 nm 以上の大きな粒子径が観測された。

4. 考察

BM24YL, BM24YF および BM24DR は、蛍光強度の増大から、アミロイド線維を形成したと考えられる。また、それぞれの粒子径の大小関係から、アミロイドの形成には、Tyr や Phe が持つ芳香環側鎖の相互作用が寄与していること、電荷の違いによる影響が考えられる。また、BM24DE, BM24NQ は蛍光強度の増大が見られなかったことから、側鎖のかさ高さは線維形成を妨げる要因であると考えられる。

5. 結言

アミロイド線維の形成には、疎水性側鎖の相互作用が必要であり、側鎖のかさ高さは形成を妨げていることが示唆された。また、アミロイド形成には、芳香環側鎖の相互作用が寄与しており、電荷の違いが影響していると示唆された。

文 献

- 1) Saiki, M., et al.: Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Liner Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains. *J.Mol.Biol.*, **348**, 983-998, 2005.
- 2) Saiki, M., et al.: Structural stability of amyloid fibrils depends on the existence of the peripheral sequence near the core cross-β region. *FEBS Letters.*, **589**, 3541-3547 (2015).
- 3) Saiki, M., Akimoto, M.: Evaluation of the structural stability of amyloid fibrils by dynamic light scattering. *J Biorheol.*, **29**, 24-27(2015).

BM24 A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P D N Y
 BM21 A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P
 (BM24NQ) BM24YL A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P D N L
 BM24YF A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P D N F
 BM24DE A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P E N Y
 BM24NQ A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P D Q Y
 BM24DR A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P R N Y

図1 変異体ペプチドのアミノ酸配列

※下線太字はBM24の配列から変異させたアミノ酸