

アミロイド形成配列を導入したモデルタンパク質の立体構造評価 Structural analyses of β -rich model proteins with amyloid forming sequences

真壁幸樹*, 堀裕基

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学専攻, 〒992-8510 米沢市城南 4-3-16

Koki Makabe* and Yuki Hori

Yamagata University, 4-3-16 Jyonan, Yonezawa, 992-8510, Japan

1 はじめに

アルツハイマー病などの神経変性疾患に関与していると考えられている蛋白質の凝集体、アミロイドの形成機構に関する分子レベルでの理解は重要である。しかしながら、アミロイド線維はタンパク質もしくはペプチドが自己組織化して生成した不溶の凝集体であるために通常の溶液系の測定方法を用いることが出来ず、アミロイドの構造形成原理には不明な点が多い。この限界を乗り越えるために、我々は蛋白質工学的アプローチを用いてペプチドが自己組織化した β シート会合体を一般的な測定系が適用可能である球状蛋白質中に構築した (Peptide Self-Assembly Mimics; PSAM と命名) ^{1,2}。このようにして作製された PSAM をモデルシステムとして用いて、様々なアミロイド形成配列を導入した変異体を作り出す。立体構造解析からアミロイド形成配列がどのような構造変化を引き起こすか解明を目指した。

本研究ではアミロイドを形成することが既知の α B クリスタリンの部分配列 KVKVLGDVIEV(K11V)の中心配列 VLGDV を PSAM へ移植した変異体を構築した。K11V は以前の報告でシンドリンと呼ばれるバレル状の構造を形成することが知られている。興味深いのは配列の中心にある Gly 残基が β バレル構造でも中心に位置していることである。 β シート中の Gly 残基は安定性を減少させることが知られており、その構造的役割を明らかにするために、PSAM 中に K11V の中心部分配列 VLGDV を移植した。

2 実験

VLGDV 配列を移植した PSAM 変異体 PSAM-VLGDV1、中心の Gly 残基を Ala に変異した PSAM-VLGDV1-G122A、野生型 OspAsm1 の 122T を Gly へ変異させた OspAsm1-T122G の三種類の変異体を遺伝子工学的に構築し、大腸菌発現系を用いて作製した。得られた試料を蒸気拡散法によって結晶化を行い、PF のビームライン BL-5A にて回折データを収集した。

3 結果および考察

PSAM-VLGDV1 の結晶構造を分解能 1.90 Å で決定した。野生型である OspAsm1 の C 末端ドメイン

と構造を重ね合わせると、大きく N 末端ドメインの相対配置が変化していることがわかった (図 1)。これは VLGDV 配列の導入により、 β 9 ストランド前後で β シートの湾曲が変化したためであった。

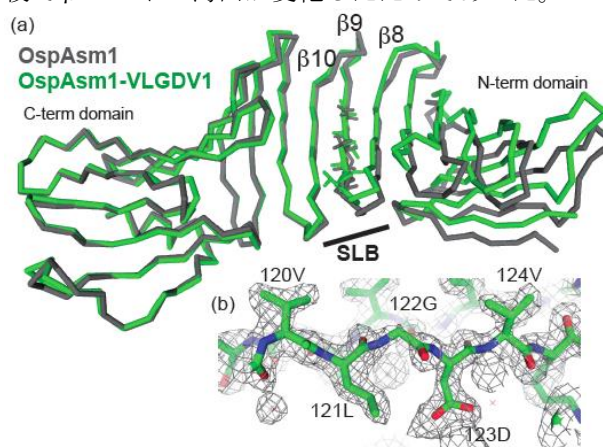


図 1 OspAsm1-VLGDV1 結晶構造。(a)OspAsm1-VLGDV1 (緑)、OspAsm1 (黒)の C α トレースを C 末端ドメインで重ね合わせている。変異導入部位は側鎖も示した。(b) 変異を導入した VLGDV 部位の電子密度マップ (等高線レベル: 1.1 σ)。

β シート中の Gly 残基は構造を不安定化することが知られている。このため、VLGDV 配列中央の Gly 残基が β シートの構造変化に影響を与えていると考えられた。そこで、OspAsm1-VLGDV1 の 122Gly を Ala に置換した変異体 PSAM-VLGDV1-G122A を作製し結晶構造を 1.60 Å で決定した (図 2)。驚いたことに、G122A の単変異で OspAsm1-VLGDV1 で観察された β シートのねじれが解消し、PSAM-VLGDV1-G122A の構造は野生型と一致した。このことから 122 番目の Gly が構造変化に重要な役割を果たしていることがわかる。

そこで、野生型 OspAsm1 に T122G 単変異を導入し、単変異で構造が変化するか検討した。作製した変異体 OspAsm1-T122G の結晶構造を 1.20 Å で決定した (図 2)。野生型との構造重ね合わせの結果、122 位での Gly 置換は野生型構造を変化させないことがわかった。

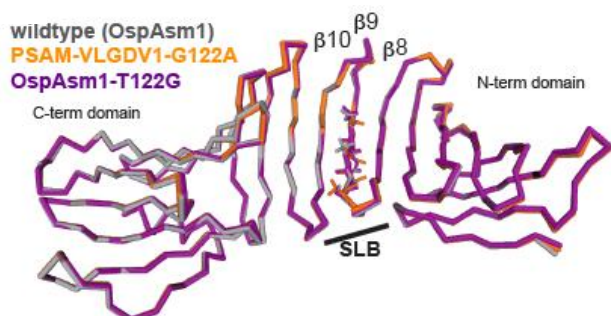


図2 PSAM-VLGDV1-G122A 及び OspAsm1-T122G の結晶構造。PSAM-VLGDV1-G122A (オレンジ)、OspAsm1-T122G (紫)、OspAsm1 (黒) の C α トレースを C 末端ドメインで重ね合わせている。変異導入部位は側鎖も示した。

4 まとめ

α B クリスタリン由来配列アミロイド形成配列 VLGDV をモデル蛋白質の β シート領域に導入した変異体を作製し構造を決定した。結果、 β シートの屈曲に大きな変化が観察された。この変異体の 122Gly を Ala に変異させると構造変化が解消されたため、122Gly は構造変化に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、野生型 OspAsm1 へ T122G 単変異を導入しても構造は変化しないことから、VLGDV の 5 残基からなる配列が構造変化を誘導するのに必須であることが明らかとなった。このような特徴はアミロイド形成配列に一般的に観察されるのか、現在、様々なアミロイド形成配列を導入した変異体の構造解析を行っている。

謝辞

OspA 発現ベクターはニューヨーク大学小出昌平教授よりご恵与いただきました。感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Makabe *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 17753 (2006)
- [2] K. Makabe *et al.*, *J Mol Biol.* **378**, 459 (2008)

* makabe@yz.yamagata-u.ac.jp