

## 体積および圧縮率から見たアミロイド線維

橘 秀樹<sup>#1</sup>、月向邦彦<sup>2</sup>、中村明博<sup>2</sup>、松尾光一<sup>2</sup>、Abdul Raziq Abdul Latif<sup>3</sup>、荒賀麻里子<sup>3</sup>、河野良平<sup>3</sup>、赤坂一之<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup>神戸大学大学院理学研究科  
神戸市灘区六甲台 1-1

<sup>2</sup>広島大学大学院理学研究科  
東広島市鏡山 1-3-1

<sup>3</sup>近畿大学生物理工学部  
和歌山県紀の川市西三谷 930

\*E-mail: akasaka@waka.kindai.ac.jp

# 現 近畿大学生物理工学部

第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム抄録集

2008年3月21日受付/2008年3月28日受理

### 要旨

ジスルフィド結合を欠損させたニワトリリゾチーム変異体は自発的に集合してアミロイド様線維をつくる。この初期会合体はモノメリックユニット 1 モルあたり 100 mL の体積減少をともなって加圧により可逆的に解離する。この変異蛋白質のモノマー状態およびプロトフィラメント状態での部分比容積は 0.684 ならびに 0.724 mL g<sup>-1</sup>、それぞれの状態での断熱圧縮率係数は -7.48 ならびに 1.35 Mbar<sup>-1</sup> であり、プロトフィラメント状態は大きな体積を持ち、かつ圧縮されやすい状態であることが示された。プロトフィラメントの解離速度は加圧によって大きく上昇し、活性化部分モル体積ならびに活性化部分モル圧縮率は、それぞれ、-50 mL mol<sup>-1</sup> ならびに -0.013 mL mol<sup>-1</sup> bar<sup>-1</sup> といずれも負の値をとる。これは解離の遷移状態では線維中に存在した空隙の部分的な水和が起こっていることを示唆する。

キーワード：アミロイドプロトフィラメント、リゾチーム、高圧、体積、圧縮率

### 1. はじめに

アミロイド形成は蛋白質の立体構造が天然構造から逸脱して凝集することに端を発する[1]。典型的なアミロイド線維は、いわゆるクロスベータ構造をとったプロトフィラメントが何本か縊り合わさってできている [2,3]。教科書などにも見かけるこの構造はなかなか見事であるし、アミロイド病には一般にこのような線維構造の形成が付随していることは確かであるけれど [4]、この線維構造の形成がアミロイド病の、直接にせよ間接にせよ、原因になっているかどうかは実はそれほど明らかではなく、いくつかのアミロイド病原因蛋白質については、その典型的なアミロイド線維ではなく、むしろ構造未解明のオリゴマー会合体の方が感染性が高い、という報告もなされている [5]。したがって、完成されたアミロイド線維の形態の詳細な研究と同様に、プロトフィラメントの研究やその形成の初期反応の研究もまた大事ということになる。

リゾチームは体内各所や分泌液に広く存在するが、その変異体は家族性のアミロイド病

の原因蛋白質であることが見出されている[6,7]。この変異体の物理的安定性は野生型ヒトリゾチームにくらべて低下していて、熱処理や有機溶媒・変性剤処理に際して立体構造が天然型の構造から逸脱しやすく、それが引き金となってアミロイド線維形成に至ることが示唆されている [8]。では、アミノ酸配列はそのまま、リゾチーム中のジスルフィド結合を欠損させることで天然立体構造の安定性を低めたら、どのようなことになるであろうか？我々は、ジスルフィド結合をすべて欠損させたニワトリリゾチーム変異体 (OSS) [9,10]が、変性剤を含まない通常の非変性溶液条件下で変性構造をとること、ベータシート構造を持つ沈降定数 17 S の水溶性の前駆会合体を形成すること、長期間のインキュベーションによりプロトフィラメントやアミロイド様線維をつくることを見出し、この系がアミロイド線維形成のモデル系として有用なことを示してきた (Fig.1) [11]。ここでは、加圧実験を交えて得られた、OSS 変異体線維状集合体の体積や圧縮率に関する、ここ数年の間に得られた知見を概説し考察を加えたい。

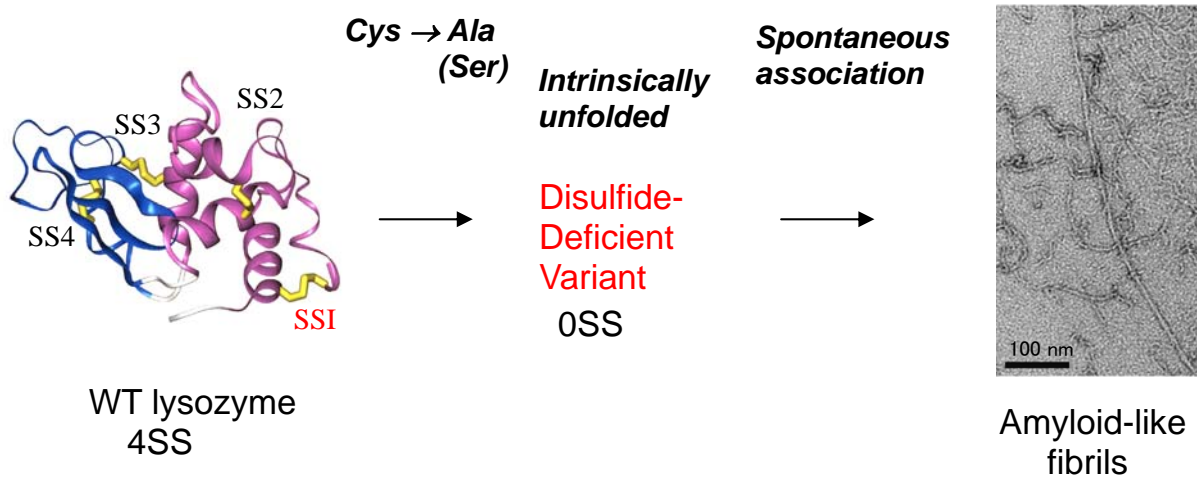


Fig.1. When the four disulfide bonds of WT lysozyme (left) are removed by alanine or serine substitution for cysteinyl residues, an intrinsically unfolded disulfide-deficient variant ‘OSS’ is obtained (middle), which spontaneously self-associates to form amyloid fibrils (thick filament) and amyloid protofilaments (thin winding filament) on prolonged incubation (right) [11].

## 2. 初期会合体形成の平衡論

変異体 OSS の  $^{15}\text{N}$  標識されたものを用いた高圧 NMR 実験により (Fig.2)、マレイン酸ナトリウム、pH 2、中で生成する 17 S 会合体は加圧により可逆的に解離することがわかった：すなわち、常圧近くの 30 bar では会合のために HSQC スペクトルに各アミドピークはほとんど見えないが、それらは 200-300 bar から現れ始め、1000 bar においては、最終的に 2000 bar で観測される飽和ピーク体積のほぼ 9 割の大きさに達する。圧力変化に伴うこのピーク体積分率の増加が、会合体と解離平衡になっているモノマー状態 OSS 蛋白質の存在比の増加を表す。化学量論的個数の OSS モノマー分子が同時に会合して 17 S 体を形成すると考えた場合の熱力学的解析から、その安定性および解離にともなう体積減少は、モノメリックユニット 1 モルあたり、それぞれ、23 kJ および 53 mL と計算され、これらの値が最初に報告された。その後、走査プローブ顕微鏡観察によりこのマレイン酸ナトリウム、pH 2、溶液条件下での初期会合生成物はアミロイドプロトフィラメント様の形態であることが判明したので、会合体形成機構としてポリマー端へのモノマー付加という機構を採り、それに基づいて熱力学的解析を行ったところ、安定性および解離にともなう体積減少のより妥当な値としては、モノメリック

ユニット 1 モルあたり、それぞれ、24 kJ および 100 mL であることがわかっている。

一般に蛋白質の立体構造形成（フォールディング）にともなって蛋白内空隙の生成と水和の変化がおこり、部分モル体積が増加することが知られている [12]。前節で述べた、蛋白質単量体ユニットが常圧で自己会合して線維状超分子構造を形成する場合も、蛋白内 and/or 蛋白間会合界面の空隙の生成と水和の変化によって体積が増加し、圧力の印加により、その逆の方向、つまり体積が減少する単量体への解離反応がおこっている訳である。部分モル体積減少量の  $100 \text{ mL mol}^{-1}$  という値は、フォールディングにともなう部分モル体積変化の報告値と同レベルの大きさであり、線維形成にともなう空隙・水和の変化がかなり大きいことを示している。

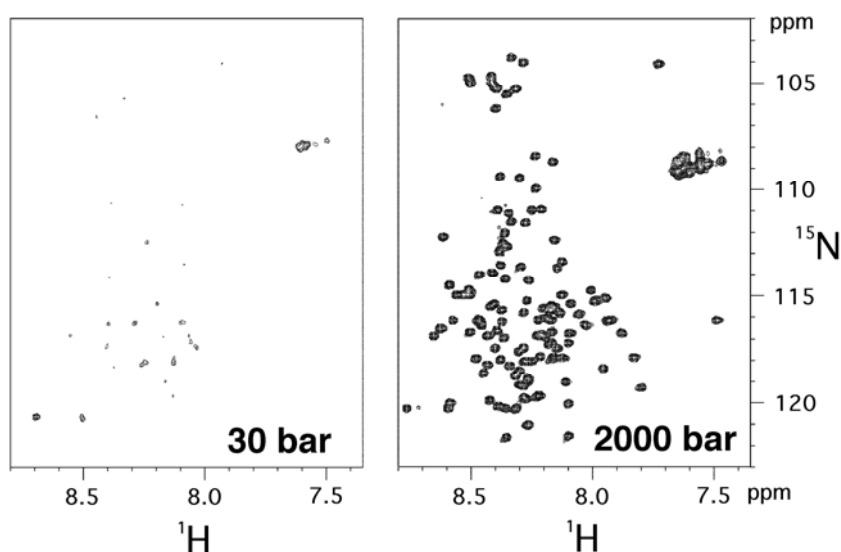


Fig.2.  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HSQC spectra of  $7.6 \text{ mg ml}^{-1}$  OSS solution at nearly ambient (left panel) and high (right) pressures. The protein solution in 50 mM sodium maleate, pH 2.0, was incubated for one day at ambient pressure to form OSS assemblies prior to the NMR measurement, which was carried out at a series of pressures from 30 to 2000 bar and back from 2000 to 30 bar, among which only two spectra at extreme pressure values were shown here [11].

前述の圧力変化に伴う HSQC ピーク体積の増加を、低圧力領域で残基毎に少し詳しくみると、会合には疎水残基が優先的に関与していることがわかる。つまり、ほとんど変性した状態をとっている OSS 変異体の線維状集合反応は、分子内の疎水的な部位が他の分子の疎水的な部位と相互作用することにより会合体が形成され、ベータシート構造形成と共役して規則的に会合・伸長してアミロイド様線維形成に至ると考えられる。

なお、上述の 17S 会合体形成に用いられた溶液条件とは多少異なる条件下であるが、7 ヶ月という長期のインキュベーションで得られた長い OSS 線維も高圧で解離し、脱圧により再会合することが示されている [13,14]。また、短期（2日）、中期（2週間）のインキュベーションで得られた、より短い OSS 線維の見掛けの解離速度は非常に高くなる事から、線維の形成反応はポリマー端へのモノマーの付加だけでなく、インキュベーション期間の増加とともに、ポリマーの端部を介してのポリマー間会合も起こり、結果として、解離反応に直接関与する解離端の総濃度が減少していることが示唆された。

### 3. 初期線維形成に伴う体積変化および圧縮率変化

前節においては、圧力による解離を示す分光学的データの熱力学解析からモノマーが会合し

て線維を形成する際の部分モル体積変化量を示した。我々はさらに、それぞれの状態における OSS 蛋白質の部分モル体積ならびに圧縮率（断熱圧縮率）の絶対値を、OSS モノマーから出発して自発的にアミロイド様線維が形成される過程の超精密な密度測定および音速測定によって直接的に求めた (Fig. 3) [15]（これは、アミロイド線維に関しては世界で初めての測定報告となったものである）：すなわち、OSS 蛋白質溶液の密度は線維化反応の進行にともなって減少し、そのデータから、OSS 蛋白質の部分比容積がモノマー状態およびプロトフィラメント状態で、それぞれ、 $0.684$  ならびに  $0.724 \text{ mL g}^{-1}$  と求まる。この増加分  $0.040 \text{ mL g}^{-1}$  は部分モル体積にして  $570 \text{ ml mol}^{-1}$  もの増加に相当する。また、OSS 蛋白質溶液の超音波伝播速度は線維化反応の進行にともなってやはり減少し、そのデータを基に、OSS 蛋白質の断熱圧縮率係数はモノマー状態およびプロトフィラメント状態で、それぞれ、 $-7.48$  ならびに  $1.35 \text{ Mbar}^{-1}$  と求まる。すなわち OSS プロトフィラメント状態では OSS モノマー状態（変性状態）と比べて非常に大きな体積を持ち、かつ圧縮されやすい状態であることがわかる。

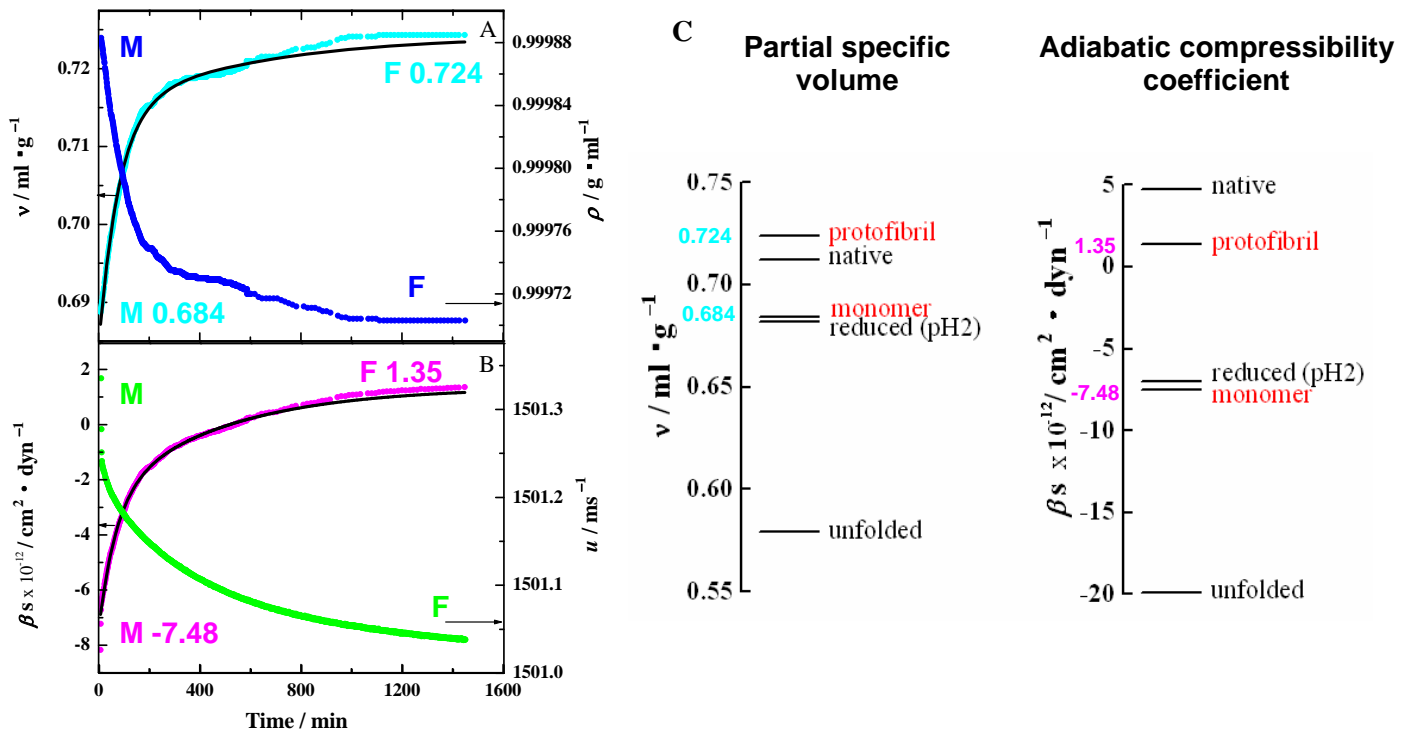


Fig.3. A. Density  $\rho$  (right ordinate) of the OSS solution ( $5.07 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $20 \text{ mM}$  sodium acetate,  $\text{pH } 4.0$ ,  $30 \text{ mM}$  sodium chloride) was measured starting from monomeric state (M) to the completion of fibril formation (F). The partial specific volume  $v$  of OSS (left ordinate) was calculated with  $v = (1/c) [(1 - (\rho - c) / \rho_0)]$ . B. Adiabatic compressibility coefficient  $\beta$  was calculated from the measured ultrasonic velocity  $u$  (right ordinate) and density with  $\beta = 1/\rho u^2$ . The partial specific adiabatic compressibility coefficient  $\beta_s$  of OSS (left ordinate) was calculated with  $\beta_s = (\beta_0/cv) [\beta/\beta_0 - (\rho - c)/\rho_0]$ . C. Comparison of volume and compressibility coefficient of OSS monomeric and fibrillar states with those of other conformational states [15].

これらの値をリゾチームのいろいろなコンフォメーション状態での値と比べてみよう (Fig.3 C) [16]。まず、遺伝子工学的的手法によってジスルフィド結合を除いている OSS 蛋白質のモノマー状態は、蛋白化学的手法によってジスルフィド結合を除いたリゾチームのモノマー状態 (pH 2) と部分比容積および断熱圧縮率係数の両者においてよく一致している。しかし、これら intrinsically unfolded 状態の部分比容積および断熱圧縮率係数は、グアニジン塩酸の作用で変性して小さな体積と負の圧縮率をもち完全水和に近い状態のそれらに比べてずっ

と大きい。つまり、intrinsically unfolded 状態はかなりの残存構造を含み、完全水和からは大きく隔たる構造であることがわかる。一方、OSS 蛋白質の線維状態の部分比容積  $0.724 \text{ mL g}^{-1}$  は天然状態の値  $0.712$  よりも大きい。他方、OSS 蛋白質線維状態の正の圧縮率係数  $1.35 \text{ Mbar}^{-1}$  は OSS モノマー状態の負の圧縮率係数  $-7.48$  から大きく増加したものではあるが、天然リゾチームの圧縮率係数  $4.7$  よりも低い。このひとつの解釈としては、OSS 線維状態は天然リゾチームに比べて多量の空隙を含む一方、水和表面積も広いということかも知れない。

#### 4. 線維解離反応の遷移状態の体積および圧縮率

さらに進んで線維形成の速度論も興味深い課題であるが、線維の伸長のみに着目する系を構築するにせよ、核形成と伸長反応の両者をまともに取り入れるにせよ、会合反応の速度論解析はそう簡単ではない。他方、解離反応の場合は、一旦ある程度高い蛋白濃度で形成させた線維を、十分に希釈し再会合がおこらないような低蛋白濃度条件下で解離を行えば、その取り扱いと比較的簡単なものになる。幸いなことにリゾチームは、その天然型の量子収率は低いものの、蛋白内の蛍光発色団としてトリプトファン残基を複数個含むので、以下に示すように、高圧下・希薄溶液中での線維の解離を蛍光測定によりモニターできる [17]。

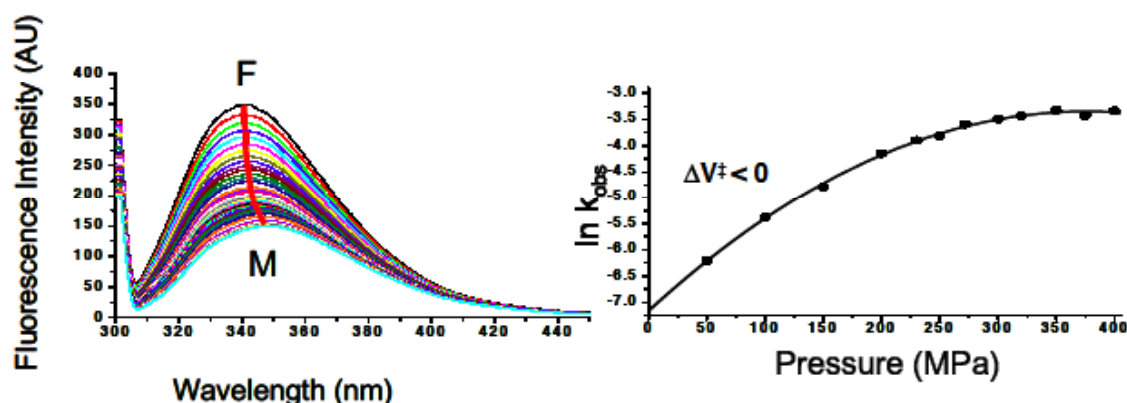


Fig.4. Decrease and red-shift of the intrinsic fluorescence of OSS,  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  in 20 mM sodium acetate, 30 mM sodium chloride, pH 4.0, on dissociation from fibrillar (F) to monomeric (M) states at 350 MPa recorded from 10 to 240 min after the start of reaction with an interval of 2 min (left panel), and a semi-logarithmic plot of the observed dissociation rate against pressure (right) [17].

まず、OSS 線維中でトリプトファン残基は疎水環境にあり、天然リゾチームに比べて量子収率が 3.43 倍に上昇していることがわかった。そして、加圧によって OSS モノマーに解離すると蛍光強度が約半分に減少するとともに、蛍光放出スペクトルの赤色移動が見られ、線維中で疎水環境にあったトリプトファン残基が線維の解離により水溶媒へ露出することがわかった。次に、蛍光強度減少のタイムコースを見ると、それを蛍光初強度と終強度で規格化したものは単一指数関数で記述でき、それから求まる見かけの解離速度定数  $k_{\text{app}}$  が加圧によって大きく上昇し、50 MPa で  $0.0020 \text{ min}^{-1}$  であったものが 400 MPa では  $0.0354 \text{ min}^{-1}$  に高まることがわかった。

この解離速度定数の圧力依存性の測定結果を  $k_{\text{app}} = (k_{\text{B}}T/h) \exp(-(\Delta G^{\ddagger} + \Delta V^{\ddagger} (P-P^0) - (\Delta \kappa^{\ddagger}/2) (P-P^0)^2)/RT)$  式に回帰することにより、解離反応の遷移状態への移行に際しての活性化部分モル体積  $\Delta V^{\ddagger}$  ならびに活性化部分モル圧縮率 (遷移状態の部分モル圧縮率から基底状態の部分モル圧縮率を引いたもの)  $\Delta \kappa^{\ddagger}$  が、それぞれ、 $-50 \text{ mL mol}^{-1}$  (0.1 MPa において) な

らびに $-0.013 \text{ mL mol}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ といずれも負の値として求められた。これはアミロイド様線維についての活性化部分モル体積ならびに活性化圧縮率の初めての測定報告である。解離の遷移状態でアミロイド線維の体積が減少し、より圧縮されにくい状態をとるのは、恐らく、その状態では線維中に存在した空隙の部分的な水和が起こっていることを示しているのであろう。

さて、先の見かけの解離速度定数  $k_{\text{app}}$  は集団としての線維群からのモノマーの脱離を見ているわけであるから、ポリマー 1 分子の端からのモノマー 1 分子の解離の速度定数  $k$  に比例はするけれども同一のものではない。これはポリマーの重量分率が一定であっても長いポリマーが少数存在する場合と短いポリマーが多数存在する場合に解離して出てくるモノマー量を想像してみればわかる。実際に、高圧蛍光実験に用いたアミロイドプロトフィラメントの長さの分布を調べたところ、モノマー付加伸長機構で理論的に予想される平衡分布である指数関数型になっていた。つまり、 $i$  個のモノマーからなる線維の数濃度  $C_i$  は  $r^{i-1}$  ( $r < 1$ ) に比例する。いくつかの仮定のもとに、線維の長軸に沿ってモノマー 1 個分が占める長さを  $2 \text{ nm}$  と推定すると、公比  $r=0.995$  となっており、数平均の平均重合度は約 200 であった。幸いなことに、ポリマーの長さ分布が等比数列に従う場合、見かけの解離速度定数  $k_{\text{app}}$  と 1 分子レベルでの intrinsic な解離速度定数  $k$  との間には、公比  $r$  を介して、 $k_{\text{app}} = k(1-r)$  という簡単な関係式が成り立つことが示される。つまり、分布が長い方へ裾をひく ( $r$  が 1 に近い) ほど見かけの解離は遅くなる。今の場合、 $k_{\text{app}} = k(1-0.995) = 0.005k$  である。これと高圧解離データを常圧に外挿して得られる  $k_{\text{app}}$  値より、常圧においては  $k = 0.149 \text{ min}^{-1}$ 、つまり、約 6.7 分に 1 回しかモノマーが解離しないことが導かれる。

## 5. おわりに

立体構造をきちんととった天然蛋白質の内部ではアミノ酸残基がきっちりと充填されていてほとんど隙間がない、というのは 1, 2 世代前の教科書的知識であろうが、実はそれは事実ではなく、蛋白質内部にはいくらかの空隙が存在し、完全に変性・水和した状態に比べるとたとえば 1% 程度 (部分モル体積が  $10000 \text{ mL}$  なら  $100 \text{ mL}$  の増分) 大きい体積を持ち、圧縮率も増大している [12]。そしてこの空隙の存在が蛋白質立体構造の動力学的揺動の要となり、機能発現に重要な役割を果たしているらしいことが、蛋白質を対象に残基レベルの情報を得る本格的な高圧 NMR 法を開発してきた赤坂らによって示されている [18]。この総説で述べてきたように、蛋白質間の相互作用によって形成される線維構造などの超分子会合体も、完全に解離・変性・水和した状態に比べてはもちろんのこと、解離しただけのモノマー状態に比べて大きい体積と圧縮率を持つ。構造を形成するという事は実は空隙も形成するという事であるかのようにさえ思える。

アミロイド線維形成へのこのようなアプローチ、体積や圧縮率の報告は始まったばかりであり、さらに多くの知見を急いで得なければならない状況にある。たとえばアミロイド様線維構造といってもいろいろなものがあり、線維の多型と体積・圧縮率との関連が調べられなければならない。アミロイド性のヒト変異リゾチームの報告以降、ヒトリゾチームならびにニワトリリゾチームの 4 本のジスルフィド結合をもつ野生型の場合でも、特殊な条件下で太く真っ直ぐなアミロイド線維を作ることが報告されている [19,20]。一方、そのジスルフィド結合還元解裂型は穏やかな条件下で細くて曲がったアミロイド線維を作る。後者の部分モル体積ならびに圧縮率に関する情報を我々が報告してきた訳であるが、前者の野生型に関してはその生成条件が特殊という理由もあって報告はまだである。同様の問題は後藤らが  $\beta$  2-microglobulin アミロイド線維について扱っている [21]。この問題には、変異体間でアミロイドプロトフィラメント形成速度に 3 桁にも及ぶ開きを持つことが最近判明した、ジスルフィド結合を 1 本だけ持つニワトリリゾチームの 4 種の 1SS 変異体を用いた体積・圧縮率等の比較検討も有益な情報を提供するであろう。さらに、圧力をより一層高めていった場合に、負の活性化圧縮率変化から理論的に予測されるように、解離速度が実際に減少に転じるかどうか

かの実証も将来の重要な課題である。

## 謝辞

本研究は科学研究費補助金〈特定領域研究 No. 18031040〉、農林水産省「牛海綿状脳症（BSE）及び人獣共通感染症の制圧のための技術開発」プロジェクト、および文部科学省「私立大学学術研究高度化推進事業（学術フロンティア）」の支援の基に行われたものである。

## 参考文献

- [1] Dobson, C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24: 329-332.
- [2] Jimenez, J.L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. and Saibil, H. R. (1999) Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the structure packing. *EMBO J.* 18: 815-821.
- [3] Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B. and Fraser, P. E. (2000) The protofibril substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300: 1033-1039.
- [4] Sipe, J. D. and Cohen, A. S. (2000) History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* 130: 88-98.
- [5] Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. and Caughey, B. (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* 437: 257-261
- [6] Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C. F., Terry, C. J., Feast, T. G., Zalin, A. M. and Hsuan, J. J. (1993). Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362: 553-557.
- [7] Valleix, S., Drunat, S., Philit, J. B., Adoue, D., Piette, J. C., Droz, D., MacGregor, B., Canet, D., Delpech, M. and Grateau, G. (2002). Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family. *Kidney Int* 6: 907-912.
- [8] Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. and Pepys, M. B. (1997). Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385: 787-793.
- [9] Tachibana, H. (2000). Propensities for the formation of individual disulfide bonds in hen lysozyme and the size and stability of disulfide-associated submolecular structures. *FEBS Letters* 480: 175-178.
- [10] Tachibana, H. and Segawa, S. (2004) Disulfide-bond associated protein folding. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Nalwa, H. S.(ed.), American Scientific Publishers, Vol.2, pp 443–473.
- [11] Niraula, T. N, Konno, T., Li, H., Yamada, H., Akasaka, K. and Tachibana, H. (2004) Pressure-dissociable reversible assembly of intrinsically denatured lysozyme is a precursor for amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 4089–4093.
- [12] Royer, C. A. (2002) Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1595: 201-209.
- [13] Kamatari, Y. O., Yokoyama, S., Tachibana, H. & Akasaka, K. (2005). Pressure-jump NMR study of dissociation and association of amyloid protofibrils. *J Mol Biol* 349: 916-921.
- [14] 鎌足雄司 (2007) タンパク質の解離・会合を圧力で制御する. *生物物理* 47: 12-16.
- [15] Akasaka, K., Latif, A. R. A., Nakamura, A., Matsuo, K., Tachibana, H. and Gekko, K. (2007). Amyloid protofibril is highly voluminous and compressible. *Biochemistry* 46: 10444-10450.
- [16] Gekko, K., Kimoto, A. and Kamiyama, T. (2003) Effects of disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility, and expansibility changes during reduction. *Biochemistry* 42: 13746-13753.
- [17] Abdul Latif, A. R., Kono, R., Tachibana, H. and Akasaka, K. (2007). Kinetic Analysis of Amyloid Protofibril Dissociation and Volumetric Properties of the Transition State. *Biophys J* 92: 323-329.
- [18] Akasaka, K. (2006) Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem. Rev.* 106: 1814-1835.

- [19] Morozova-Roche, L. A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D. B., Joniau, M. and Dobson, C. M. (2000). Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *J Struct Biol* 130: 339-351.
- [20] Krebs, M. R., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., Robinson, C. V. and Dobson, C. M. (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *J Mol Biol* 300: 541-549.
- [21] Chatani, E., Kato, M., Kawai, T., Naiki, H. and Goto, Y. (2005). Main-chain dominated amyloid structures demonstrated by the effect of high pressure. *J Mol Biol* 352: 941-51.



## Volume and Compressibility of Amyloid Fibrils

Hideki Tachibana<sup>#1</sup>, Kunihiko Gekko<sup>2</sup>, Akihiro Nakamura<sup>2</sup>, Koichi Matsuo<sup>2</sup>, Abdul Raziq Abdul Latif<sup>3</sup>, Mariko Araga<sup>3</sup>, Ryouhei Kono<sup>3</sup> and Kazuyuki Akasaka<sup>\*3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodai 1-1, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University, Kagamiyama 1-3-1, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan*

<sup>3</sup>*Department of Biotechnological Science, School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Nishimitani 930, Kinokawa 649-6493, Japan*

*\*E-mail: akasaka@waka.kindai.ac.jp*

*# Present address: Department of Biotechnological Science, School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University*

Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure  
Bioscience and Biotechnology

Received 21 March 2008/Accepted 28 March 2008

### Abstract

Intrinsically unfolded hen lysozyme disulfide-deficient variant spontaneously forms amyloid-like fibrils. Its early assembly reversibly dissociates under high hydrostatic pressure with a partial molar volume decrease of 100 mL per monomeric unit. The partial specific volumes of the monomeric and protofibrillar states are 0.684 and 0.724 mL g<sup>-1</sup>, respectively, and the adiabatic compressibility coefficient of these states are -7.48 and 1.35 Mbar<sup>-1</sup>, which indicates that the protofibrillar state is highly voluminous and compressible. Pressure accelerates the dissociation of protofibrils with a negative activation volume of -50 ml mol<sup>-1</sup> and a negative activation compressibility of -0.013 ml mol<sup>-1</sup> bar<sup>-1</sup>, which suggests that partial hydration of existing voids takes place in the transition state of dissociation reaction.

**Keywords** : amyloid protofilament, lysozyme, high pressure, volume, compressibility