

アミロイド科学の新世界

李 映 昊, 小 澤 大 作, 後 藤 祐 児

アミロイド線維はタンパク質の規則的な超分子重合体であり、その沈着はアルツハイマー病、プリオン病、透析アミロイドーシスなど、アミロイドーシス（あるいはアミロイド病）と総称される様々な疾患に関わっている。アミロイド線維を理解し、アミロイドーシスの治療や予防法を開発するためには、構造生物学を中心とするタンパク質科学と医学の連携が必須である。この10年間、両領域の連携によりアミロイド線維の研究は急速に発展した。これまで謎に包まれていたアミロイドーシスの実体が、タンパク質の構造や物性に基づいて理解されようとしている。本総説ではこれらの背景と共に、筆者らが行って来たアミロイド線維の全反射蛍光顕微鏡観察、部分体積測定に基づく構造モデルの提案、レーザー照射によるアミロイド線維の分解について紹介する。アミロイド研究の展開は、アミロイドーシスの感染についての深刻な懸念をもたらすと共に、機能性アミロイドの夢も広げている。これらを含めて、今後のアミロイド線維研究の将来を展望する。

1. はじめに

タンパク質はアミノ酸のつながった高分子鎖（ひも）であり、折りたたまれて固有の立体構造（天然構造, native structure）を形成する。この構造形成過程をフォールディング反応と呼び、その逆をアンフォールディング反応と呼ぶ（図1）¹⁾。Anfinsen, C.B. (1972年ノーベル化学賞) はリボヌクレアーゼAのフォールディング反応を研究して、天然構造が熱力学的に最も安定な状態であることを提案した（Anfinsenのドクマ）²⁾。以来、タンパク質のフォールディング反応を理解することは、タンパク質科学の重要な課題となってきた^{3,4)}。

他方、タンパク質がミスフォールディングして、線維状の超分子重合体であるアミロイド線維を形成することに注目が集まっている（図1）。アミロイド線維は様々なアミ

ロイドーシスの原因となる⁵⁾。その歴史は1854年組織から取り出した凝集体がヨウ素デンプン反応を示したことから、Virchow, R.によって“アミロイド”と命名されたことにさかのぼる⁶⁾。アミロイド線維（医学用語として、“繊維”ではなく“線維”を用いる）が沈着する疾患は、アミロイドーシス（あるいはアミロイド病）と総称される。

1980年Glenner, G.C.により、アミロイドーシスは個々の病気に特有のアミロイド前駆体タンパク質が、 β シート構造に富むアミロイド線維を形成して沈着した病態であることが示された。現在までにプリオン病、アルツハイマー病、透析アミロイドーシスなどに関わる40種類ものアミロイド線維が報告されている⁷⁾。なお、以前アミロイド線維の沈着は細胞外と考えられていたが、最近ではパーキンソン病やハンチントン病など細胞内の沈着にも拡張され、アミロイド線維の総数は大幅に増えた。

他方、タンパク質科学において、1980年代後半には、凝集しやすいモルテン・グロビュール (molten globule) 状態、大腸菌内のタンパク質凝集体である封入体 (inclusion body) が問題となり、1990年代に入ると凝集を抑制する分子シャペロンに関する研究が活発に行われた。これらを通じて、タンパク質異常凝集に対する問題意識が高まっていった。加えて、1995年世界的に注目された英国のウシ海綿状脳症 (BSE) を始め、ヒトのクロイツフェルト・ヤ

大阪大学蛋白質研究所 蛋白質構造生物学研究部門 蛋白質構造形成研究室 (〒561-0081 大阪府吹田市山田丘3-2)

New world of amyloid science

Young-Ho Lee, Daisaku Ozawa and Yuji Goto (Laboratory of Protein Folding, Division of Protein Structural Biology, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

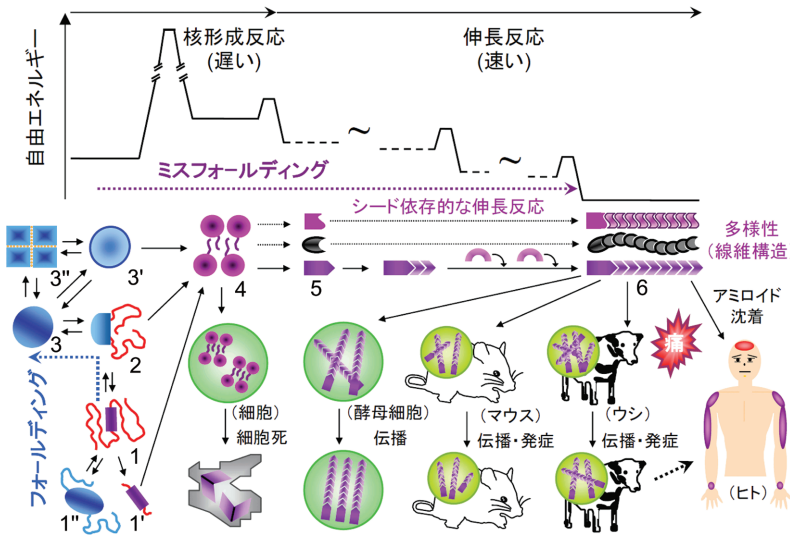


図1 タンパク質のフォールディングとアミロイド線維の形成、アミロイドーシスの発症と伝播
 1: 変性状態, 1': アミロイド形成能が高い短いポリペプチド, 1'': 天然変性 (natively unfolded or intrinsically disordered) タンパク質, 2: 中間体, 3: 天然状態, 3'': 天然状態が揺らぎアミロイド形成能が高まった状態, 3'': 機能性オリゴマー, 4: 核(オリゴマー), 5: シード(鋳型), 6: アミロイド線維.
 フォールディングの経路は1→2→3であり, ミスフォールディング経路の一つは1→2→4→5→6. 代表的なアミロイド前駆体タンパク質として, アミロイドβペプチド (1'), αシヌクレインとプリオンタンパク質 (1''), リゾチーム (3'), トランスサイレチン (3'') がある.

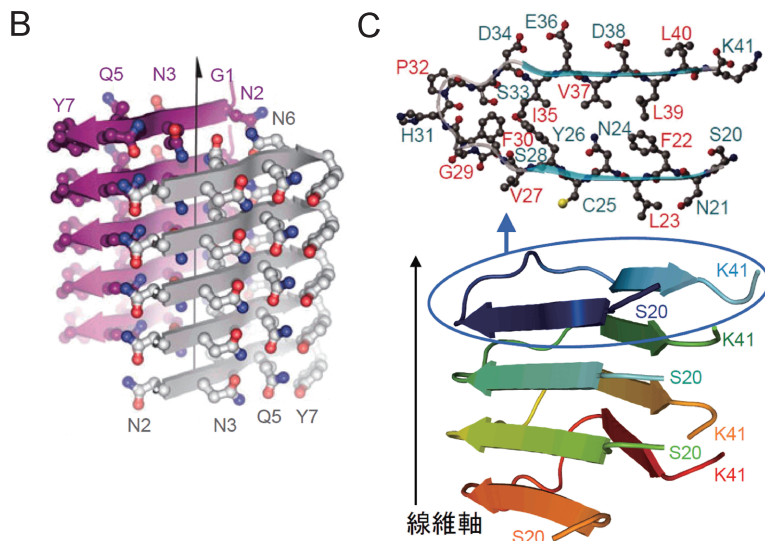
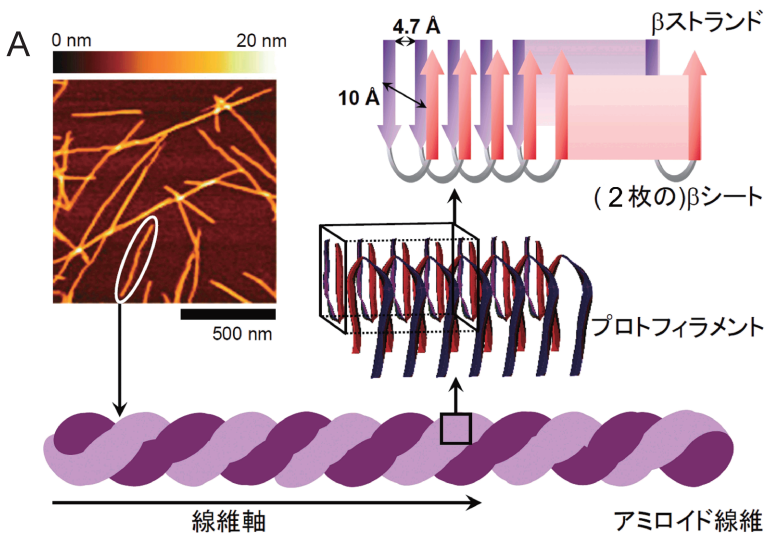


図2 アミロイド線維の基本構造モデル

(A) アミロイド線維の階層的な構造。左上: $\beta 2$ -m のアミロイド線維の原子間力顕微鏡画像 (上棒: 線維の高さが階調色で示されている)。1本のアミロイド線維は, 図では2本のプロトフィラメントからなる。プロトフィラメントでは, 線維軸に対して垂直に β ストランドが積み重なってクロス β 構造をとる。 β ストランド間は 4.7 \AA , β シート間は約 10 \AA である。(B) クロス β スパイン構造 (PDB ID: 1YJP)。向いあった β シートが, 側鎖間の相互作用によってジッパーのように密にかみ合って線維軸方向に伸長している [文献 21 より転載]。(C) 固体 NMR 解析から構築した K3 ペプチドのアミロイド線維構造 (PDB ID: 2E8D) [文献 23 より転載]。(上) 線維における K3 モノマーの構造。(下) 4分子の積み重なり。K3 ペプチドは“ β ストランド-ループ- β ストランド”の基本構造をとる。

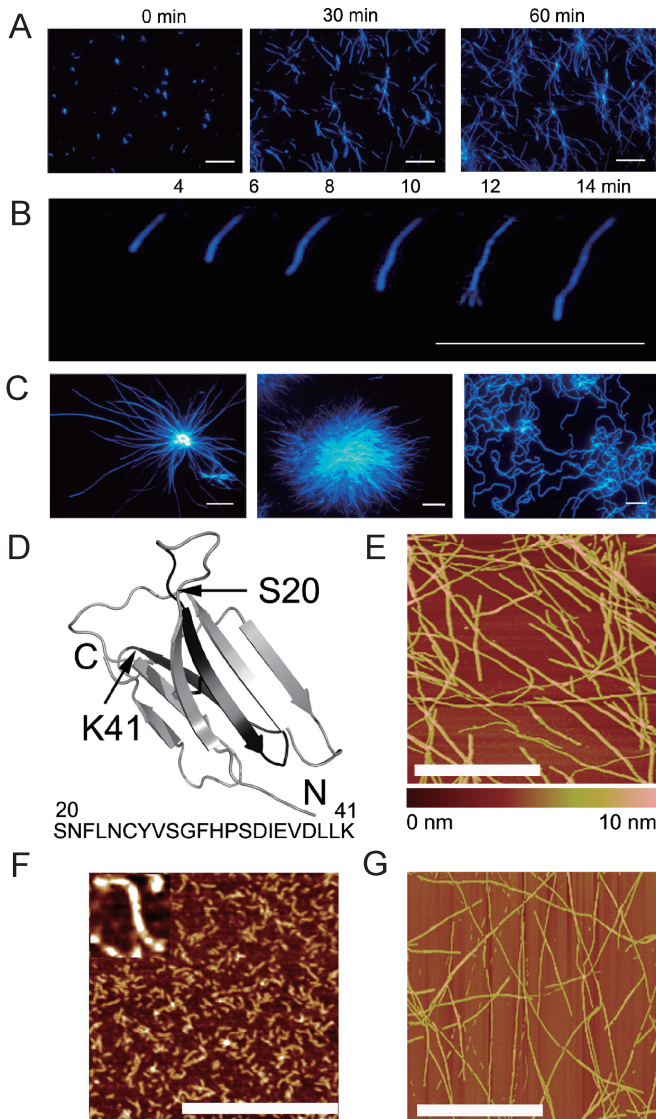


図3 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) と原子間力顕微鏡 (AFM) 観察によるアミロイド線維画像

(A~C) TIRFM による Aβ (1-40) の線維画像. (A, B) シードに依存した伸長反応 [文献 14 より許可を得て転載]. (C) シード非存在下での伸長反応によって作られた様々な形態. スライドガラス表面の形状やアミロイド線維形成条件の少しの違いによって, 多様な形態の線維を形成した [文献 48 より許可を得て転載]. (D) β2-m の天然状態 (PDB ID: 2d4f) と K3 の配列. K3 の β2-m における位置を濃い灰色で表示. 成熟型 (E), 未成熟型 (F) アミロイド線維の AFM 画像. (G) K3 が形成する成熟アミロイド線維の AFM 画像. スケールバーは 10 μm (A~C) と 1 μm (E~G). 線維の高さは階調色で示されており (E~G), そのスケールは AFM 画像 (E) の下に表されている.

コブ病 (CJD) やヒツジのスクレイピーなどのプリオン病の原因が, 線維状の規則正しい構造をもつ凝集体であることが示唆された. アミロイドーシスはフォールディング異常が引き起こす病気 (フォールディング病) の代表的例として, タンパク質科学者の興味をひき, 1990 年代より,

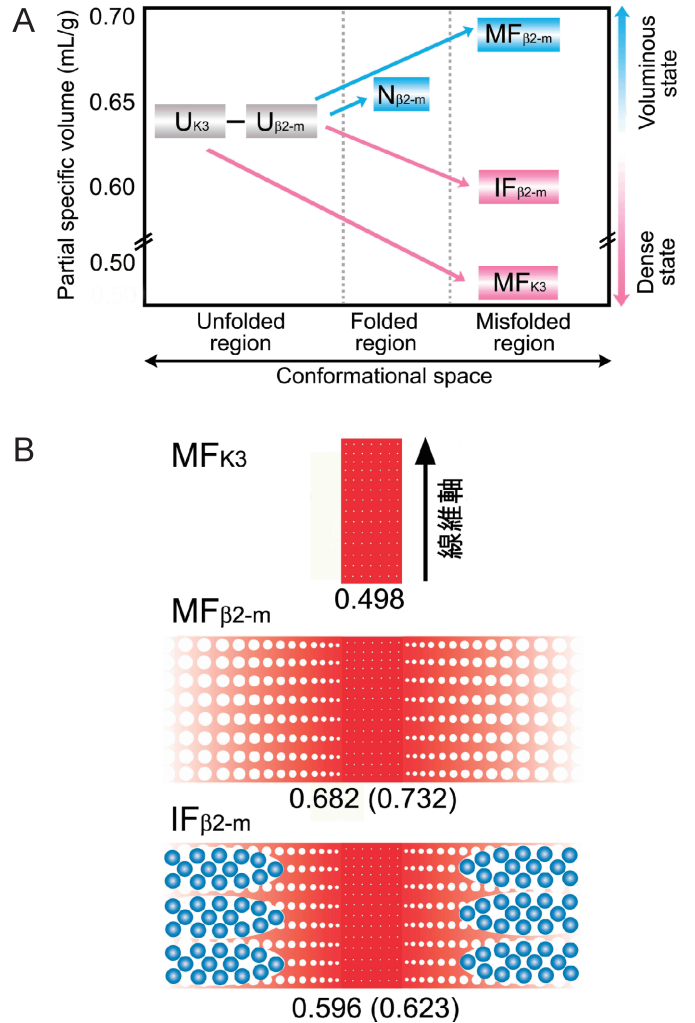


図4 アミロイド線維形成に伴う偏比容の変化とアミロイド線維の構造モデル

(A) 様々な構造状態の偏比容. 正の体積変化を伴う反応は青, 負はマゼンタで示す. フォールディング反応の体積変化は正であるが, アミロイド線維形成では, 正と負の両方がある. (B) MF_{K3} (上), MF_{β2-m} (中), IF_{β2-m} (下) の構造モデル. 各線維構造の下の数値は, それぞれの偏比容. そして, 括弧内の数値は MF_{K3} を除いた領域に相当する線維の偏比容 (本文参照). 白い球は空隙を, 青い球は水分子を表す. 赤い長方形で示すコア構造 (MF_{K3}) は, MF_{β2-m} (中) と IF_{β2-m} (下) にも存在すると考えた.

アミロイド線維は医学とタンパク質科学との両面から研究されるようになった. その結果, アミロイド線維の研究は飛躍的に発展した^{5,7,8}. 生化学や生物物理分野の研究者の参入により, アミロイド線維の基本構造, 線維形成の機構, 線維形成の抑制に関する基本的な理解が深まった. 医

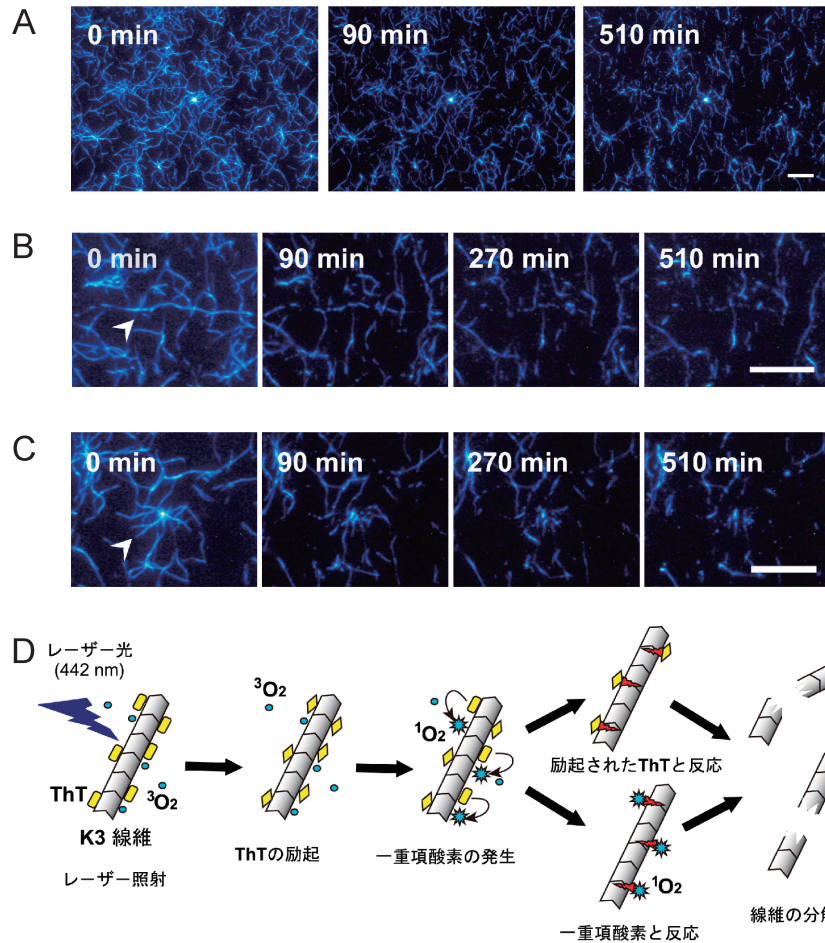


図5 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) で観察されたレーザー照射による K3 線維の破壊と分解機構

レーザー照射時間による全体の画像 (A) とその拡大画像 (B, C). 白い矢印で示されている K3 線維の分解過程が示されている. スケールバーは 10 μm . (D) レーザー照射による K3 線維の分解機構.

学とタンパク質科学の融合研究の成功例は、プリオン病と関連してノーベル賞を受賞した Prusiner, S.B. (1997 年, 医学・生理学) や Wüthrich, K. (2002 年, 化学賞) に見ることができる.

本稿では、アミロイド線維の基本構造や形状、形成機構の概要を述べる。次に筆者らのグループから報告された研究例を紹介する。そしておわりにアミロイド線維研究の課題と将来を展望する。

2. アミロイド線維の形成機構

生理的な条件においてタンパク質は安定な天然構造を保つ。しかし、何らかの理由で天然構造が崩れると、タンパク質は凝集する。一般には、タンパク質の凝集はゆで卵の白身のように不規則であるが、特定のタンパク質は特定の条件下において、規則的なアミロイド構造を形成する。後述するようにアミロイド線維の形成には疎水的相互作用や水素結合、温度、塩濃度、pH などの環境因子、さらには

脂質や他のタンパク質などの生体内因子が深く関わる。アミロイド形成能力の高いタンパク質やそのような配列を予測しようとする試みがなされているが、決定的なものはない^{9,10)}。

アミロイド線維の形成は物質の結晶形成に類似した反応であり、マクロ的に眺めると核形成反応と伸長反応の2段階から成る (図1)^{5,7)}。核形成過程はエネルギー障壁が高く、線維形成反応における律速段階である。一旦、核が形成されると単量体が次々に結合し、線維は迅速に伸長する。前駆体タンパク質の種類や溶媒条件によって核形成と伸長反応の速度は大きく変化する。

超音波処理によって断片化した線維 (鋳型, シード) を単量体溶液に加えると、核形成段階を経ずに伸長反応が進行する (図1)。核はいくつかの前駆体が会合した可溶性の多量体 (オリゴマー) と考えられるが^{11,12)}、構造や物性の詳細は不明である。アミロイド β ($A\beta$) ペプチド、タウ/プリオンタンパク質、シヌクレインの線維形成の初期

段階で現れるオリゴマーは強い細胞毒性をもつ。これらのアミロイドーシスの病態は、アミロイド線維に起因するのではなく、その前駆体であるオリゴマーによることが提案されている^{11,12)}。

アミロイド線維形成の分子機構を理解するには、線維末端と単量体の間や、線維あるいはプロトフィラメント間の相互作用（疎水性相互作用や静電的な力）の詳細な研究が必要となる^{10,13-17)}。加えて、前駆体タンパク質やポリペプチドの構造安定性や揺らぎも重大な因子であることは、家族性アミロイドーシスをもたらすアミノ酸変異の多くが、原因タンパク質の天然構造を不安定化させる変異であることから明らかである^{7,18)}。また、生体において原因タンパク質が高度に蓄積した条件下（アミロイド形成に関して過飽和条件下）においてシーディングが起きると、アミロイドーシスの発症が促進されることも予測される。

3. アミロイド線維の立体構造と多様性

アミロイド線維の基本的な形態は、幅が約10~15nmで長さ数 μm の分枝しない針状構造である（図2A, 3）^{19,20)}。従来からのX線線維回折や電子顕微鏡解析に加え、固体NMRやアミロイドペプチドの微結晶を基にした構造解析が進み、アミロイド線維の原子レベルでの立体構造が明らかになりつつある（図2B, C）²¹⁻²⁹⁾。

3-1. 立体構造

アミロイド線維は階層的な立体構造をもつ（図2A）。基本構造は線維軸と直行する方向に β ストランドが規則的に配列したクロス β 構造であり、これらが何本か束になって、1本のプロトフィラメントを形成する³⁰⁾。さらに何本かのプロトフィラメントが束になって太いアミロイド線維を形成する。X線線維回折の結果から、 β シートを構成する β ストランドの間隔は約4.7Åであり、 β シート間は約10Åである³¹⁾。クロス β 構造モデル以外の構造モデルとしては、 β シートがらせん状に積みあがる β らせんモデルが注目されている^{32,33)}。

酵母プリオンSup35のアミロイド原性の高いコア領域に相当する7残基のペプチドGNNQQNYは単結晶を形成する。Nelsonらはこれをアミロイド微結晶としてX線結晶解析を行い、原子レベルの構造情報を得た²¹⁾。このペプチドはアミロイド線維軸の方向ヘジッパーのように密に充填したコア構造を形成していた（図2B）。さらに、Sawayaらは30種類のアミロイド性ペプチドのアミロイド微結晶の原子構造を明らかにした²²⁾。その内13種類はジッパーのように密に充填されたコア構造を形成していた。アミロイドペプチドの微結晶を基にしたモデルでは、側鎖同士の密なパッキングの重要性が提案されている。しかし、後述べるように、これが大きなタンパク質のアミロイド線維

に一般的かどうかは疑問である。短い断片からなる線維ではなく、球状タンパク質の全長からなる線維のX線結晶解析が期待されるが、容易ではないであろう。

現在、アミロイド線維の立体構造解析手法として特に期待されているのが固体NMRである。固体NMRは溶液NMRの欠点である高分子量の限界がなく、結晶構造解析の前提となる単結晶が不要である。 $\text{A}\beta$ ^{25,29)}、 $\beta 2$ ミクログロブリン（ $\beta 2\text{-m}$ ）のK3ペプチド²³⁾、CA150²⁷⁾、HET-sプリオン²⁸⁾、 α シヌクレイン²⁶⁾などのアミロイド線維の構造が固体NMRによって明らかにされた。これらに共通するのは、“ β ストランド-ループ- β ストランド”の基本構造であり、これが線維軸に対して（多くの場合平行 β シートを形成して）積み重なることによってアミロイド線維ができあがっていた（図2）。

3-2. 多様性

一つのタンパク質やペプチドの形成する線維の形態や物性は、生成条件により異なり、このような線維の多様性（polymorphism）が疾患の多様性をもたらすことが示唆されている（図1, 図3）^{26,34,35)}。アミロイド線維の形態の観測には、電子顕微鏡に加えて原子間力顕微鏡（atomic force microscopy, AFM）が一般的に用いられる（図2, 3）。例えば $\text{A}\beta$ アミロイド線維では、何本かの剛直なプロトフィラメントが束になったアミロイド線維に加え、フレキシブルなプロトフィラメントがらせん形に巻いた構造もしばしば観測される^{19,26,32,34,35)}。興味深いことに、アミロイド線維にらせん構造が見られる場合は、ほとんどが左巻きである。

シードに依存して線維が形成される条件下では、多様な形態の中で特定のものが選択され、成長し、伝播する（図1）。いくつかの形態が競争的に形成する条件下でシーディングを繰り返すと、速度論的、自由エネルギー的に適した線維が生き残る（適応もしくは成熟）³⁶⁻³⁸⁾。これらは、アミロイド線維の形成機構の本質的な特徴である。天然構造は進化の結果できあがったものであり、側鎖同士のパッキングは最適化されている³⁹⁾。他方、アミロイド線維においては、側鎖のパッキングは分子全体としては必ずしも最適化されていない⁴⁰⁾。その結果、線維構造の多様性が生み出されると考えている（5. アミロイド線維の体積の項を参照）。

3-3. 揺らぎ

タンパク質の揺らぎを明らかにすることは、その構造や物性、機能を理解する上で特に重要な課題であり、このことはアミロイド線維にも当てはまる。溶液NMRの利点は、溶液中におけるタンパク質の構造や揺らぎ情報が残基レベルで獲得できる点である⁴¹⁾。しかし、分子量5万を超えると分解能や感度が著しく落ちるので、アミロイド線維

のような超分子量の異常凝集体には適用が困難である。

星野らは水素/重水素 (H/D) 交換反応とジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide) 溶媒中での NMR 測定を組み合わせた方法を開発し、 β 2-m のアミロイド線維と天然状態の内部構造を比べた⁴²⁾。天然構造のループ領域を含め、両末端以外の残基の多くが交換から保護されていた。これより、全長 β 2-m 線維の内部では広範な水素結合ネットワークが形成されており、主鎖間の水素結合が線維の安定性に重要な役割を果たすことがわかった。この方法は線維の安定性やコア構造を調べる強力な方法として幅広く普及している^{26,43,44)}。

4. アミロイド線維伸長の直接観察

筆者らのグループでは、全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) とアミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素であるチオフラビン T (thioflavin T, ThT) を組み合わせた一線維伸長観察法を開発した^{14,45)}。これによりアミロイド線維伸長の様子を一線維レベルでリアルタイムに追跡することが可能となった (図 3A~C)^{13,46~48)}。A β ペプチドの線維が3本のプロトフィラメントから構成されることを示す興味深い画像も得られた (図 3B)。また、生体膜の影響を調べるため、表面電荷を変えたスライドガラス上で伸長反応を観察したところ、強くマイナス電荷を帯びた表面では、球状のスフェライト構造が観測された (図 3C の中央)⁴⁸⁾。生体内のリン脂質膜は負に帯電しているため、生体内でもペプチドと膜が相互作用することでスフェライト構造の形成が示唆される。

他方、同様の条件下で、シードを用いない自発的なアミロイド形成を観察したところ、スフェライト以外にもさまざまな興味深い形態が出現した。シードに依存した伸長反応に比べ (図 3A, B)、自発重合では核形成反応が環境に強く依存することが示唆された (図 3C)。

5. アミロイド線維の体積

5-1. タンパク質の天然構造と体積の研究

体積は分子内部の空隙 (void) や水和状態を反映する基本的な物理量である^{49~52)}。これまで、タンパク質の折りたたみ反応やリガンドとの相互作用を理解するために、体積に関する数多くの研究が行われてきた^{49~57)}。筆者らはアミロイド線維の構造や物性を理解するためには、体積を測定することが重要と考えた。

体積の研究では、偏比容 (v°) という物理量を用いて議論を進める。偏比容は溶質 1g が占める ml 単位の体積で定義され、いくつかの因子が寄与する^{49~52)}。

$$v^\circ = v_{\text{geo}} + v_{\text{cav}} + \Delta v_{\text{hyd}} + v_{\text{therm}} \quad (1)$$

v_{geo} は幾何学的な体積であり、分子固有のファンデル

ワールス体積や排除体積によって決まる。 v_{cav} はタンパク質が立体構造を形成した場合に生じる空隙である。そこで、 v_{geo} や v_{cav} はタンパク質の体積に正の寄与をする。 Δv_{hyd} は水和による体積変化を表し、電荷性もしくは極性のアミノ酸残基は電縮 (electrostriction) により負の体積変化を示す (体積は減少する)。疎水性残基の水和は正あるいは負の体積変化を表すことが報告されており、まだ議論の余地がある。 v_{therm} はタンパク質や溶媒分子の振動による温度体積であり、タンパク質の体積に正の寄与をする。タンパク質のみかけの体積はこれらの因子の相殺によって決まる。

偏比容は温度や pH などの周辺環境によって変わるが、一般に天然構造は 0.7ml/g 前後の値をとる^{54~56)}。そして、天然構造が変性すると偏比容は低下する。特に、変性に伴う溶媒露出面積 (accessible surface area, ASA) の増加は、タンパク質の体積に負の寄与をする (変性すると体積が減少する) と報告されているが、式 (1) の各項の寄与を定量的に決めることは困難である。

既に述べたようにアミロイドペプチドの微結晶はクロス β スパインと呼ばれる密なパッキングを示した^{21,22)}。この結果は、アミロイド線維の形成に伴い偏比容が減少することを示唆する。近年、アミロイド線維形成に伴う体積変化を調べたいくつかの研究が報告された^{58~62)}。密にパッキングしたコア構造を示唆する例として、家族性アミロイドポリニューロパチーの原因タンパク質であるトランスサイレチン (transthyretin, TTR) がある^{59,62)}。TTR の 11 残基のペプチド (TTR₁₀₅₋₁₁₅) からなるアミロイド線維の体積は、全長の TTR からなる線維の体積より小さかった (より密なパッキング)。他方、インスリンでは線維形成に伴う体積の減少が⁶¹⁾、リゾチーム変異体では体積の増加が見出された⁵⁸⁾。

このような不一致は、アミロイド線維の多様な構造を反映している可能性が高い。つまり、先に述べたように、同じ一次配列をもつポリペプチド鎖でも、溶媒条件や生成条件の違いによって線維形態が異なる。タンパク質の天然構造は、進化の結果、分子内が密にパッキング (できるだけ空隙のない) するように最適化された状態である。ところが、一旦天然構造が壊れて主鎖間の水素結合によって形成される線維構造では、全ての領域において密なパッキングは期待できない。また、この不完全なパッキングにより、多様な線維構造が形成される可能性がある。これらを明らかにするには、精度の高い研究が必要となる。

5-2. β 2-m のアミロイド線維形成に伴う体積変化

筆者らは振動式密度計の測定から得られる体積 (偏比容) を用いて、線維構造の“多様性”や“コア構造”に関する系統的な研究を行った⁶³⁾。測定には、全長 β 2-m (99 残基)

とアミロイド性の高い K3 ペプチド (Ser20-Lys41, 22 残基) を使用した (図 3D). 全長 $\beta 2\text{-m}$ は, 形態が異なる 2 種類の線維を形成する. それらは, 太くて長い典型的な成熟線維 (mature fibril; $\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$) と, 高塩濃度 (200 mM NaCl) 条件下で生成する細くて曲がった未成熟線維 (immature fibril; $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$) である (図 3E, F)^{20, 64~66}. K3 ペプチドは細くて長い成熟型アミロイド線維 (MF_{K3}) を生成した (図 3G). 本研究では, 特に線維の分散と残存単量体の割合に注意した. つまり, アミロイド線維は数百個以上の分子が重合した超分子凝集体であり, 沈殿が生じると体積 (偏比容) 測定障害となる. 加えて, 残存単量体の補正が重要である. 分析用超遠心機を用いて優れた分散状態と残存単量体の割合を確認し, 残存単量体の補正を行うことによって精度の高い偏比容の値を得た.

まず, 酸変性した $\beta 2\text{-m}$ ($\text{U}_{\beta 2\text{-m}}$) から天然構造 ($\text{N}_{\beta 2\text{-m}}$) へのフォールディングによる偏比容の変化は正 (0.016ml/g) であった (図 4). この体積増加は ASA の減少と分子内の空隙の発生による. 特に, ASA の減少は水和を減少させ体積を増加させる. 次に, $\text{U}_{\beta 2\text{-m}}$ から $\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$ へのアミロイド線維形成に伴う偏比容の変化は 0.046ml/g であり, $\text{U}_{\beta 2\text{-m}}$ から $\text{N}_{\beta 2\text{-m}}$ への変化より更に大きかった (図 4). この体積上昇はアミロイド線維 $\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$ の分子内に, 圧縮可能な真空の空隙が $\text{N}_{\beta 2\text{-m}}$ より多く存在するためと考えられる. これらの結果は筆者らのグループの以前の研究と一致する^{23, 67, 68}.

次にアミロイドのコア構造の体積を調べるために, MF_{K3} の偏比容をもとめたところ, U_{K3} から MF_{K3} へのアミロイド形成は偏比容の大きな減少を伴った (図 4). つまり, MF_{K3} は極めて密にパッキングしたコア構造をもっていた. この結果は意外であったが, MF_{K3} の全領域が H/D 交換から強く保護されていることと一致する⁶⁵.

他方, 未成熟線維 $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の形成に伴い, 偏比容はわずかに減少した. おそらく $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ は, $\text{N}_{\beta 2\text{-m}}$ や $\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$ に比べて広範囲に水和された状態であり, ASA の変化による体積の増大は小さかったものと考えられる. 加えて, $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の分子内部には, MF_{K3} のようなコア構造が存在するため, 全体として体積が減少したと解釈できる. $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の H/D 交換の結果から, 単量体の 30% の残基が水素結合を形成する⁶⁵. 中でも K3 に相当する領域が強く保護されており, 今回の結果と一致する.

以上より, フォールディングによる体積の増加と異なり, アミロイド線維形成では, 線維の異なる形態によって体積変化も多様であることがわかってきた (図 4).

5-3. 体積変化に基づく構造モデル

偏比容を基に, MF_{K3} , $\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$, $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の線維構造モデルを提案した (図 4). まず, MF_{K3} は, 空隙の少ない密なパッ

キング (偏比容は 0.498ml/g) をしている. ちなみに天然構造の偏比容は 0.7ml/g 程度である.

$\text{MF}_{\beta 2\text{-m}}$ は, 線維の中心に MF_{K3} に相当するコア構造をもち, コアの周辺には圧縮することが可能な空隙がある. 得られた偏比容は 0.682ml/g であり, 球状タンパク質がとる値の範囲に入るが, 同じ溶媒条件下で測定した $\beta 2\text{-m}$ の天然構造の値 (0.652ml/g) より大きい. $\beta 2\text{-m}$ の配列から, コア構造に相当する K3 の 22 残基を除いた 77 残基の偏比容を計算すると 0.732ml/g であり, 空隙を多く含むことが推定される.

フレキシブルな未成熟線維 $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の偏比容は 0.596ml/g であった. この中心に MF_{K3} に相当するコア構造 (0.498 ml/g) が存在すると考えると, コア構造以外の偏比容は 0.623ml/g と計算された. この値は変性したタンパク質の値に近く, 多くが水和されていることを示す. このような $\text{IF}_{\beta 2\text{-m}}$ の体積の特徴が, フレキシブルな線維形態をもたらすと考えられる.

5-4. レーザー照射によるアミロイドの破壊

多くのタンパク質は, 中性 pH 条件下では天然構造をとるため容易にはアミロイド線維を形成しない. そこで, *in vitro* におけるアミロイド線維の研究は, 主に酸性 pH あるいは高温条件で行われてきた^{23, 64, 67~72}. しかしながらアミロイド線維のより深い理解のためには, 生理的な条件での研究が必要である^{37, 73~75}. $\beta 2\text{-m}$ については, 近年, 低濃度のドデシル硫酸ナトリウムを添加することで, 生理的条件に近い中性 pH 条件下での線維形成が可能になった⁷⁴. また, K3 ペプチドは中性 pH 条件下でも自発的にアミロイド線維を形成する^{14, 73}. そこで, 前述の TIRFM と ThT を併用することにより, $\beta 2\text{-m}$ および K3 ペプチドのアミロイド線維の直接観察を, 中性 pH 条件下において行おうとした⁷⁶.

はじめに, 中性 pH, スライドガラス上であらかじめ伸長させた $\beta 2\text{-m}$ および K3 線維の観察を行うと, 放射状に伸長した線維の蛍光像が観察された. ところが, 線維のリアルタイム伸長観察を行ったところ, $\beta 2\text{-m}$ 線維はほとんど伸長しなかった. さらに K3 線維では伸長が停止した後, 線維が徐々に消失していくという現象が見られた (図 5). 伸長の停止や消失はレーザー光強度を弱くすることで抑えられたことから, TIRFM を用いたリアルタイム観察におけるレーザー光照射が線維に影響を及ぼしたことが示唆された.

K3 線維の消失は線維の分解によると考えられた. アミロイド病の治療のためには, アミロイド線維の分解法を開発することは重要である. そこで, 予想外ではあったが, レーザー光の照射による K3 線維の消失についてさらに調べた. まず, あらかじめスライドガラス上で伸長させた

K3線維に対して、レーザー光を断続的に照射した。その結果、断続的な照射に伴い、線維の断断化を伴う消失像が観察された(図5A~C)。次に、蛍光測定用のセル内でK3線維へのレーザー光照射を行い、照射後にK3線維を分析した。AFM観察、超遠心分析、質量分析の結果から、K3線維は一部分解されており、K3ペプチドよりも分子量の小さい分解物も含まれていた。分解にはThTが必須であった。

レーザー光照射によるK3線維の分解機構は、がん治療に用いられる光線力学療法の反応機構に類似している。光線力学療法では、光増感剤を介して活性酸素を発生させ、がん細胞を攻撃する^{77,78)}。そこで、活性酸素の一つである一重項酸素の関与を調べたところ、レーザー光照射によりThTを介して一重項酸素が発生していることが明らかになった(図5D)。さらに、アミノ酸分析により、発生した一重項酸素はK3ペプチドのヒスチジン残基等を攻撃していることが示唆された。ThTのような光増感剤を用いれば、アミロイド線維を特異的に分解することができるかもしれない。この方法はアミロイドーシス治療への新たな戦略として期待される。

6. アミロイド線維研究の課題と展望

図3に示すようなアミロイド線維伸長のリアルタイム画像を見ていると興味は尽きない。いったい線維の成長端で何が起きているのだろうか。いつ、どのような条件でこのような特異的な線維構造ができるのだろうか。それがどのようにして疾病を引き起こすのだろうか。現在、特に重要な課題として、以下の点があげられる(図6)。

6-1. 構造と形成機構の解明

アミロイド線維はタンパク質によらずクロスβシートを基本とする共通の基本構造をもっている。しかし、その詳細な原子構造や、異なったタンパク質の作るアミロイド線維の構造上の違いなどは不明である。本稿で述べたように固体NMR^{23~29,79)}、溶液NMRと重水素交換を組み合わせた方法^{26,42~44,65,80)}、電子顕微鏡、X線結晶解析^{21,22)}など、さまざまな手法によってさらに解析を進めることが必要である^{36,81)}。

アミロイドの構造物性で特に重要な特徴は、アミロイド線維の形成反応が物質の結晶形成と類似している点である。天然構造の自発的な分子内構造形成とは全く異なり、アミロイド線維は分子間相互作用によって強固に安定化されており、より安定な立体構造である可能性が高い。また、分子間相互作用がもたらす構造の多様性によって、プリオン感染の複雑な病態が説明できると期待される⁸²⁾。

6-2. アミロイドーシスの予防と治療

病気とは全く関係のない様々なタンパク質がアミロイド線維を形成する。このことは、私たちがアミロイドーシスを発症するリスクを含むタンパク質と共存している可能性を示唆する。透析アミロイドーシスはそのことを示す象徴的な例である。透析アミロイドーシスは血液透析という優れた医療がもたらした、思いもしなかった疾病である。透析アミロイドーシスのような医原病を未然に防ぐには、リスクの高いタンパク質を知ることが必要である。

現在、生じている深刻な懸念はアミロイドーシスの感染、伝播である^{83~87)}。現実には、感染性のアミロイドーシ

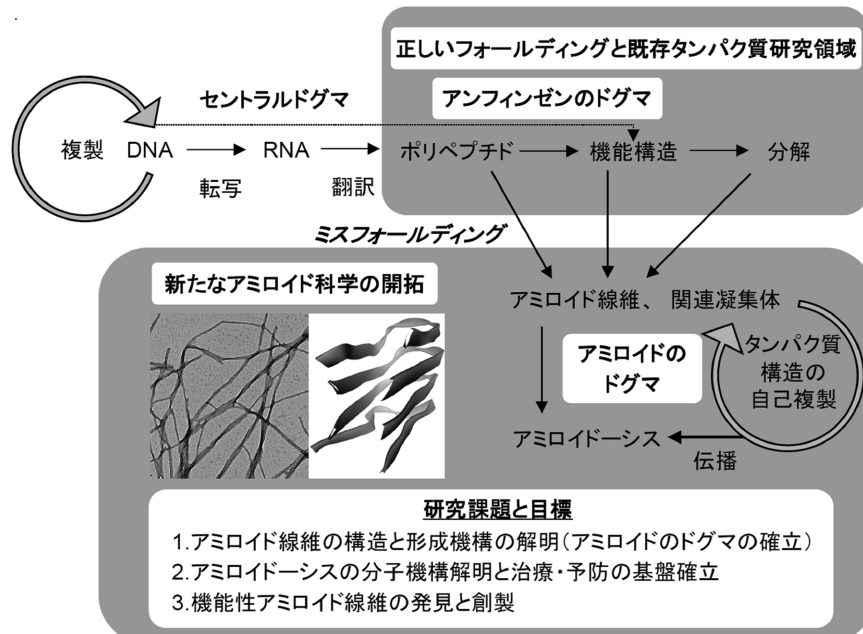


図6 生物科学における「アミロイド科学の新世界」の位置付けと研究課題

スプリオン病だけであるが、試験管内の実験では、アミロイド線維は物質の結晶成長と同じようにシーディングによって伝播する。実際、アミロイド発症能を高めたマウスでは、アミロイド線維は感染性を示す。これまで非伝播性と分類された他のアミロイドーシスでも「アミロイド線維による伝播」の起きることが示唆されている。アミロイドーシスの感染・非感染の仕組みを明らかにすることが重要である。

6-3. 機能性アミロイド

夢も広がる。アミロイド線維の均質性や剛直性、ボトムアップ型形成機構を、自己組織化、ナノテクノロジーの素材として利用しようとする試みが盛んになっている。アミロイド線維は、外部環境やアミノ酸配列を工夫することにより、形成や破壊を制御することが可能である。アミロイド線維をナノワイヤーの鋳型に利用することができるかもしれない。また、アミロイド線維が液晶として挙動することも報告されている⁸⁸⁻⁹⁰⁾。アミロイド線維は、溶液の流れによって配向し、特徴的な偏光特性を示す⁹¹⁾。最近では、アミロイド線維が生体に有利に働いている場合も示唆されており、これらを含めて「機能性アミロイド (functional amyloid)」という用語が提唱されている⁹²⁾。さらには、アミロイドの難溶性を利用すると持続性の高い優れた薬ができるのではないかと提案もされている⁹³⁾。

7. おわりに

アミロイドーシスは高齢化社会や高度医療社会において特に深刻な疾病であり、緊急の医学的対策や一層の基礎研究が必要である。この研究領域を牽引してきた Dobson, C. M. (Cambridge 大学) によると、「アミロイドーシスは人類の進化が終わった後で生じた病気 (post-evolutionary disease)」である⁵⁾。いわば、アミロイドーシスは高齢化社会や高度医療社会がもたらした疾病である。これを解決し、さらには共生への道を開くことは科学の重要な研究課題である。現在、さまざまな分野の研究者の参入によって、アミロイド線維のタンパク質科学研究は正に佳境に入りつつある。医学領域において長年にわたって謎であったアミロイドーシスの実体が、タンパク質の物理化学の問題として明らかになりつつある。アミロイドーシスの感染に関する危惧は深刻であるが、タンパク質科学としては実に興味深い現象である。

しかしながら、実際の病態は複雑であり決して一筋縄では解決しない。本質はタンパク質にあっても、それを左右する様々な生体内外の因子が関与することも明らかである。特に、アミロイドーシスの感染には格別の配慮が必要であるが、タンパク質科学の観点から積極的に取り組むべき課題であることは間違いない。そして、タンパク質科学

としてのアミロイド研究を生体内、病態へ還元することが重要である。各領域の研究者がいつそう連携して研究を推進することにより、アミロイドーシスの予防、治療の基盤確立、タンパク質のより包括的な理解が可能になる。さらに、機能性アミロイドの夢も広がる。タンパク質科学と医学の融合によって開拓するアミロイド科学の新世界に期待したい。

謝辞

本稿で述べた研究は、内木宏延氏、伴匡人氏、八木寿梓氏、蛋白質研究所構造形成研究室メンバーとの共同研究であり、各氏に感謝する。

文 献

- Baldwin, R.L. (2007) *J. Mol. Biol.*, **371**, 283-301.
- Sela, M., White, F.H., Jr., & Anfinsen, C.B. (1957) *Science*, **125**, 691-692.
- Fersht, A.R. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 650-654.
- Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S., & Weikl, T.R. (2008) *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 289-316.
- Dobson, C.M. (2003) *Nature*, **426**, 884-890.
- Sipe, J.D. & Cohen, A.S. (2000) *J. Struct. Biol.*, **130**, 88-98.
- Chiti, F. & Dobson, C.M. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 15-22.
- Dumoulina, M. & Bader, R. (2006) *Protein. Pept. Lett.*, **13**, 213-217.
- Cafilisch, A. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 437-444.
- Bemporad, F., Calloni, G., Campioni, S., Plakoutsi, G., Taddei, N., & Chiti, F. (2006) *Acc. Chem. Res.*, **39**, 620-627.
- Avidan-Shpalter, C. & Gazit, E. (2006) *Amyloid*, **13**, 216-225.
- Glabe, C.G. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 29639-29643.
- Ban, T., Hoshino, M., Takahashi, S., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2004) *J. Mol. Biol.*, **344**, 757-767.
- Ban, T., Yamaguchi, K., & Goto, Y. (2006) *Acc. Chem. Res.*, **39**, 663-670.
- Schmittschmitt, J.P. & Scholtz, J.M. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 2374-2378.
- Monseiller, E., Ramazzotti, M., Taddei, N., & Chiti, F. (2008) *PLoS. Comput. Biol.*, **4**, e1000199.
- Raman, B., Chatani, E., Kihara, M., Ban, T., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H., Rao Ch, M., & Goto, Y. (2005) *Biochemistry*, **44**, 1288-1299.
- O'Sullivan, D.B., Jones, C.E., Abdelraheim, S.R., Brazier, M. W., Toms, H., Brown, D.R., & Viles, J.H. (2009) *Protein Sci.*, **18**, 410-423.
- Arimon, M., Diez-Perez, I., Kogan, M.J., Durany, N., Giral, E., Sanz, F., & Fernandez-Busquets, X. (2005) *Faseb J.*, **19**, 1344-1346.
- McParland, V.J., Kad, N.M., Kalverda, A.P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M.G., Sunde, M., & Radford, S.E. (2000) *Biochemistry*, **39**, 8735-8746.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riekel, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005) *Nature*, **435**, 773-778.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M.,

- Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., Madsen, A.O., Riek, C., & Eisenberg, D. (2007) *Nature*, **447**, 453–457.
- 23) Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H., & Goto, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 18119–18124.
- 24) Jaroniec, C.P., MacPhee, C.E., Bajaj, V.S., McMahon, M.T., Dobson, C.M., & Griffin, R.G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 711–716.
- 25) Petkova, A.T., Ishii, Y., Balbach, J.J., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Delaglio, F., & Tycko, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 16742–16747.
- 26) Vilar, M., Chou, H.T., Luhrs, T., Maji, S.K., Riek-Loher, D., Verel, R., Manning, G., Stahlberg, H., & Riek, R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 8637–8642.
- 27) Ferguson, N., Becker, J., Tidow, H., Tremmel, S., Sharpe, T. D., Krause, G., Flinders, J., Petrovich, M., Berriman, J., Oschkinat, H., & Fersht, A.R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 16248–16253.
- 28) Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., & Riek, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 17342–17347.
- 29) Petkova, A.T., Yau, W.M., & Tycko, R. (2006) *Biochemistry*, **45**, 498–512.
- 30) Shivaprasad, S. & Wetzel, R. (2004) *Biochemistry*, **43**, 15310–15317.
- 31) Makin, O.S. & Serpell, L.C. (2005) *Febs J.*, **272**, 5950–5961.
- 32) Jimenez, J.L., Guijarro, J.I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M., & Saibil, H.R. (1999) *Embo J.*, **18**, 815–821.
- 33) Nelson, R. & Eisenberg, D. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 260–265.
- 34) Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N., & Fandrich, M. (2008) *J. Mol. Biol.*, **386**, 869–877.
- 35) Paravastu, A.K., Petkova, A.T., & Tycko, R. (2006) *Biophys. J.*, **90**, 4618–4629.
- 36) Chatani, E. & Goto, Y. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1753**, 64–75.
- 37) Kihara, M., Chatani, E., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12012–12018.
- 38) Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kawai, T., Naiki, H., & Goto, Y. (2005) *J. Mol. Biol.*, **352**, 952–960.
- 39) Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., & Chan, H.S. (1995) *Protein Sci.*, **4**, 561–602.
- 40) Fandrich, M. & Dobson, C.M. (2002) *Embo J.*, **21**, 5682–5690.
- 41) Lee, Y.H., Tamura, K., Maeda, M., Hoshino, M., Sakurai, K., Takahashi, S., Ikegami, T., Hase, T., & Goto, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 5959–5967.
- 42) Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 332–336.
- 43) Carulla, N., Caddy, G.L., Hall, D.R., Zurdo, J., Gairi, M., Feliz, M., Giralt, E., Robinson, C.V., & Dobson, C.M. (2005) *Nature*, **436**, 554–558.
- 44) Olofsson, A., Lindhagen-Persson, M., Sauer-Eriksson, A.E., & Ohman, A. (2007) *Biochem. J.*, **404**, 63–70.
- 45) Ban, T. & Goto, Y. (2006) *Methods Enzymol.*, **413**, 91–102.
- 46) Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 16462–16465.
- 47) Ban, T., Morigaki, K., Yagi, H., Kawasaki, T., Kobayashi, A., Yuba, S., Naiki, H., & Goto, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33677–33683.
- 48) Yagi, H., Ban, T., Morigaki, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2007) *Biochemistry*, **46**, 15009–15017.
- 49) Chalikian, T.V. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 207–235.
- 50) Chalikian, T.V. & Breslauer, K.J. (1998) *Biopolymers*, **48**, 264–280.
- 51) Chalikian, T.V., Totrov, M., Abagyan, R., & Breslauer, K.J. (1996) *J. Mol. Biol.*, **260**, 588–603.
- 52) Chalikian, T.V., Volker, J., Anafi, D., & Breslauer, K.J. (1997) *J. Mol. Biol.*, **274**, 237–252.
- 53) Sasahara, K., Sakurai, M., & Nitta, K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **291**, 693–701.
- 54) Gekko, K. (1991) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **302**, 753–771.
- 55) Gekko, K., Kimoto, A., & Kamiyama, T. (2003) *Biochemistry*, **42**, 13746–13753.
- 56) Gekko, K. & Noguchi, H. (1979) *Phys. Chem.*, **83**, 2706–2714.
- 57) Silva, J.L., Oliveira, A.C., Gomes, A.M., Lima, L.M., Mohana-Borges, R., Pacheco, A.B., & Foguel, D. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 250–265.
- 58) Akasaka, K., Latif, A.R., Nakamura, A., Matsuo, K., Tachibana, H., & Gekko, K. (2007) *Biochemistry*, **46**, 10444–10450.
- 59) Foguel, D., Suarez, M.C., Ferrao-Gonzales, A.D., Porto, T.C., Palmieri, L., Einsiedler, C.M., Andrade, L.R., Lashuel, H.A., Lansbury, P.T., Kelly, J.W., & Silva, J.L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 9831–9836.
- 60) Smirnovas, V., Winter, R., Funck, T., & Dzwolak, W. (2005) *J. Phys. Chem. B*, **109**, 19043–19045.
- 61) Smirnovas, V., Winter, R., Funck, T., & Dzwolak, W. (2006) *Chemphyschem*, **7**, 1046–1049.
- 62) Dirix, C., Meersman, F., MacPhee, C.E., Dobson, C.M., & Heremans, K. (2005) *J. Mol. Biol.*, **347**, 903–909.
- 63) Lee, Y.H., Chatani, E., Sasahara, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 2169–2175.
- 64) Hong, D.P., Gozu, M., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 21554–21560.
- 65) Yamaguchi, K., Katou, H., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 559–571.
- 66) Katou, H., Kanno, T., Hoshino, M., Hagihara, Y., Tanaka, H., Kawai, T., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2002) *Protein Sci.*, **11**, 2218–2229.
- 67) Chatani, E., Kato, M., Kawai, T., Naiki, H., & Goto, Y. (2005) *J. Mol. Biol.*, **352**, 941–951.
- 68) Kardos, J., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 55308–55314.
- 69) Chatani, E., Naiki, H., & Goto, Y. (2006) *J. Mol. Biol.*, **359**, 1086–1096.
- 70) Kozhukh, G.V., Hagihara, Y., Kawakami, T., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 1310–1315.
- 71) Chiba, T., Hagihara, Y., Higurashi, T., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 47016–47024.
- 72) Ohhashi, Y., Hagihara, Y., Kozhukh, G., Hoshino, M., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Naiki, H., & Goto, Y. (2002) *J. Biochem.*, **131**, 45–52.
- 73) Ohhashi, Y., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 10814–10821.
- 74) Ohhashi, Y., Kihara, M., Naiki, H., & Goto, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 32843–32848.
- 75) Kihara, M., Chatani, E., Iwata, K., Yamamoto, K., Matsuura, T., Nakagawa, A., Naiki, H., & Goto, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31061–31069.
- 76) Ozawa, D., Yagi, H., Ban, T., Kameda, A., Kawakami, T., Naiki, H., & Goto, Y. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 1009–1017.

- 77) Giuliano, E.A., Ota, J., & Tucker, S.A. (2007) *Vet. Ophthalmol.*, **10**, 337-343.
- 78) Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1776**, 86-107.
- 79) Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A.B., Riek, R., & Meier, B.H. (2008) *Science*, **319**, 1523-1526.
- 80) Hoshino, M., Katou, H., Yamaguchi, K., & Goto, Y. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1886-1899.
- 81) 八木寿梓, 桜井一正, 後藤祐児 (2007) 蛋白質核酸酵素, **52**, 1445-1453.
- 82) Wetzel, R., Shivaprasad, S., & Williams, A.D. (2007) *Biochemistry*, **46**, 1-10.
- 83) Westermark, P. & Westermark, G.T. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **363**, 3701-3705.
- 84) Solomon, A., Richey, T., Murphy, C.L., Weiss, D.T., Wall, J. S., Westermark, G.T., & Westermark, P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 10998-11001.
- 85) Zhang, B., Une, Y., Fu, X., Yan, J., Ge, F., Yao, J., Sawashita, J., Mori, M., Tomozawa, H., Kametani, F., & Higuchi, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 7263-7268.
- 86) Zhang, H., Sawashita, J., Fu, X., Korenaga, T., Yan, J., Mori, M., & Higuchi, K. (2006) *Faseb J.*, **20**, 1012-1014.
- 87) Krammer, C., Kryndushkin, D., Suhre, M.H., Kremmer, E., Hofmann, A., Pfeifer, A., Scheibel, T., Wickner, R.B., Schatzl, H.M., & Vorberg, I. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 462-467.
- 88) Corrigan, A.M., Muller, C., & Krebs, M.R. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 14740-14741.
- 89) Cherny, I. & Gazit, E. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 4062-4069.
- 90) Stevenson, C.L., Bennett, D.B., & Lechuga-Ballesteros, D. (2005) *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1861-1880.
- 91) Adachi, R., Yamaguchi, K., Yagi, H., Sakurai, K., Naiki, H., & Goto, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 8978-8983.
- 92) Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., & Kelly, J.W. (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 217-224.
- 93) Maji, S.K., Schubert, D., Rivier, C., Lee, S., Rivier, J.E., & Riek, R. (2008) *PLoS Biol.*, **6**, 240-252.
-