

各種金属イオン添加系における Lysozyme の熱安定性

日大生産工 (院) ○池田 昌祥

日大生産工 高橋 大輔・和泉 剛

【緒論】

近年、タンパク質凝集はアルツハイマー病や狂牛病をはじめとし、プリオン病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、クロイツフェルト・ヤコブ病など、様々な疾患の原因となっている。これらは、タンパク質の構造が変化することで起こる疾患であることからコンフォメーション病と呼ばれる。こういったコンフォメーション病には明確な治療法がないのが現状である。コンフォメーション病の原因としてアミロイドの形成及び沈着が挙げられる。アミロイド線維は不溶性のタンパク質凝集体で、原因となるタンパク質には変異体や変性体が存在する。変異体の存在がコンフォメーション病の発症率を増加させる事が判明しており、変異体の安定性について議論することはコンフォメーション病の発症機構について解明する上で非常に重要であるといえる。

タンパク質は高度に組織的な構造を持っており、その構造の安定化・不安定化に pH やアミノ酸残基間相互作用など種々の要因が寄与している。そのため、タンパク質の構造安定化の自由エネルギーはそれらの総和となり、5~15 kcal/mol 程度となる¹⁾²⁾³⁾。ここで、アミノ酸置換や pH 変化、金属イオンの結合などのわずかな変化が生じると、構造に影響を及ぼし、自由エネルギーに著しい変化を示すことが考えられる。構造変化を起こしたタン

パク質はヘリックス内部の疎水性部位の露出、疎水性相互作用などにより凝集体形成を引き起こす可能性を持つ。

また、プリオン病の患者の脳内では銅イオンの減少とマンガンイオンの増加が報告されている。そのためタンパク質凝集における金属イオンの影響について検討する必要がある。

Human Lysozyme は家族性非神経性アミロイドシスの原因タンパク質である。Human Lysozyme の2つの変異型 (D67H, I56T) が発症の原因とされており、天然状態の構造から凝集して cross- β 型への変換を伴うアミロイドを形成することが報告されている⁴⁾。特にニワトリ卵白由来の Lysozyme はアミロイド線維形成能を有することからアミロイド線維に関する研究のモデルタンパク質として頻繁に用いられている。そこで本研究ではニワトリ卵白由来の Lysozyme を用い、金属イオン添加系タンパク質の DSC 測定を行う。得られた DSC 曲線から金属イオンによる構造の安定化、不安定化について熱力学的に議論する。

【実験】

リン酸緩衝液(pH = 7.0, I = 0.05)を調製した。また、緩衝溶液を調製する段階で塩化銅(II)二水和物、塩化マンガン(II)四水和物を金属イオン濃度が 35 μ M になるように添加した。これらの溶液を用い、35 μ M Lysozyme 溶液を調製した。示差走査熱量測定装置 *micro-DSC*

を用いてこれらの溶液の DSC 測定を行った。測定後、系を一旦走査前の温度に戻し、繰り返し測定を行った。また、走査速度を変化させ測定を行った。

【結果及び考察】

Native Lysozyme の系で繰り返し測定を行った結果、最初と同様の DSC 曲線が得られた。また、走査速度に対するピーク温度の依存性も見られず、熱力学的に取り扱うことの妥当性が得られた。金属イオンを含む系においても同様の可逆性が見られた。

昇温過程における金属イオン添加系 Lysozyme 溶液の DSC 曲線を Fig.1 に示した。金属イオンの添加系では変性温度が 2 つに分かれた。これらは金属イオンの結合量の違いや結合による構造変化などから生じていると考えられる。また、各変性温度(Tg)における定圧熱容量(ΔC_p)を Table 1 に示した。これより、 ΔC_p の値が Native Lysozyme と比較して低い値を示していることが分かる。これは変性時に要する熱量が減少した事を示している。また、Mn 添加系の 301.5 K 前後のピークは生体内よりも低温に位置する。つまり、塩の存在により生体内の条件においてタンパク質が構造変化を生じている可能性がある。

佐々原らは、アミロイド線維は熱によりアンフォールディングする系もあり、その変性温度は Native の熱変性時よりも高温側にシフトすることを報告している⁵⁾。そのため低温側のピークが Native からの熱変性を示しており、高温側のピークが金属イオンにより変性した Lysozyme の熱変性ピークと考えられる。

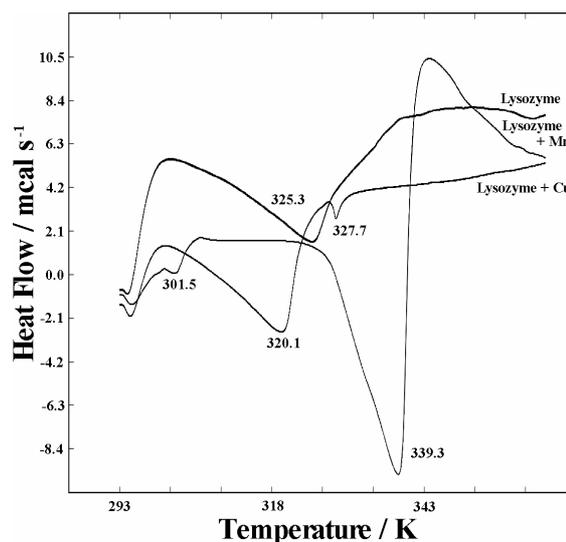


Fig.1 DSC curves of lysozyme solutions with various metal ions at pH 7.0

Table 1 Thermodynamic data for the thermal denaturation of lysozyme in the presence of Cu and Mn ion

Sample	Td (K)	ΔC_p (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)
Native Lysozyme	325.2	2.63	8.38
Lysozyme+Cu	320.0	1.40	6.38
Lysozyme+Mn	301.4	0.16	0.13
	339.1	1.03	16.25

【参考文献】

- 1) Shinichi Kitamura *et al.* (1989) *Biochemistry*, 28, 3788-3792
- 2) Patrick Connelly *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30, 1887-1891
- 3) Cui-Qing Hu *et al.* (1992) *Biochemistry*, 31, 1643-1647
- 4) D.R.Booth *et al.* (1997) *Nature*, 385, 787-793
- 5) Kenji Sasahara *et al.* (2005) *J. Mol. Biol.*, 352, 700-711