日大生産工(院)	○朝本	紘充		
日大生産工	高橋	大輔,	和泉	剛

【緒論】

狂牛病をはじめとしたプリオン病, 痴呆症と も呼ばれるアルツハイマー, これらはすべて, あるタンパク質が変性し, 凝集することで生 成されるアミロイド線維が引き起こす神経変 性疾患である。この凝集は, タンパク質中のβ-シート構造の増加に起因するといわれている¹⁾。

プリオン病の場合,未知の因子によって,プ リオンタンパク質が強固なβ-シート構造部分を 多量に含む病原性プリオンタンパク質へと変 性する(Fig.1)。その後,それ自身が鋳型となっ て,まわりに存在するプリオンタンパク質の 構造を変性させる。こうして,増殖した病原 性プリオンタンパク質中のβ-シート構造部分同 士が寄り集まり,β-シート構造が規則正しく配 列された凝集体であるアミロイド線維が形成 される。この一連のアミロイド線維形成機構は, すべてのアミロイド性疾患に共通している。

また, *in vitro*におけるタンパク質のAlcohol変 性は, タンパク質研究の初期の段階から知ら れており, 最近では, 1,1,1-trifluoroethanol (TFE) が, α -ヘリックスを安定化させる作用の 強い溶媒として注目を集めている²⁾。このよ うに, 目的とする高次構造にタンパク質を変 性させるうえで, Alcoholは極めて優れた変性 剤である。

本研究では、アミロイド線維形成能をもつ Lysozymeを、MethanolおよびEthanol水溶液に 溶解し、各種無機塩を添加してアミロイド線 維を形成させた。これにより、Lysozymeによ るアミロイド線維形成のための至適条件(Methanol・Ethanol濃度、無機塩の種類、無機塩濃度、 Lysozyme濃度)およびその形成機構について検 討した。

【実験】

試料として, SIGMA社製のLysozyme, 変性 剤として, 和光純薬製のMethanol, Ethanolおよ びLiCl, NaCl, KCl, NH₄Clを使用した。Lyso-



Fig.1 Denaturation from Cellular PrP to Scrapie PrP.



Fig.2 Structure of Congo Red dye.

zymeの高次構造変化は、円偏光二色性(CD), および蛍光スペクトル測定より検討した。一 連の実験において、Lysozyme濃度は0.2 g/dm³ と一定にした。また、Lysozyme濃度1.0~5.0 g/dm³のAlcohol水溶液を調製し、アミロイド線 維形成能に及ぼすLysozyme濃度(g/dm³)の影響 について検討した。Alcohol水溶液は40[°]Cの恒 温槽で所定の時間放置した後、アミロイド線 維検出薬であるCongo Red [和光純薬製](Fig.2) を添加し、紫外可視(UV-VIS)吸収スペクトル を測定した³⁾。

【結果および考察】

CD測定より、2種のAlcohol共にLysozyme変 性能を有することが確認された。いずれの系 においても、Alcohol濃度40%以上でα-ヘリッ

Specific denaturation of Lysozyme in alcohols containing system

Hiromichi ASAMOTO, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

クス構造への変性が現れた(Fig.3)。また,それ 以降,Alcohol濃度の増加に依存して,Lysozymeのα-ヘリックス構造含有率は増加した(Fig.3)。 とくに,Ethanol系においては28.8%(Ethanol 0%)から59.1%(Ethanol 98%)へと,2倍以上の増 加を示した。さらに,この2つの系に無機塩を 添加したところ,β-シート構造への変性が確認 された。このとき,Methanol,Ethanolどちらの 系においても,LiClが最も効果的にβ-シート 構造への変性を促進させた。

また、蛍光測定より、F maxはAlcohol濃度40 %を境にしてブルーシフトからレッドシフトへ の転換を示した(Fig.4)。

以上のことから、Alcohol濃度40%以上では、 AlcoholとLysozymeの疎水性基間の相互作用が 強まり、Lysozymeの立体構造を安定化させて いた疎水性ドメインが破壊され、内部に存在 していたアミノ酸残基が表面に露出したと考 えられる。また、比誘電率の低いAlcohol水溶 液中では、Lysozyme側鎖間の静電気的相互作 用が強まり、α-ヘリックス構造が著しく増大 した。そして無機塩による電荷遮蔽効果により、 側鎖間の静電気的相互作用が弱められ、β-シー ト構造に変性したと考えられる。この場合の 無機塩の種類に依存した電荷遮蔽効果の違いは、 カチオンの離液順列に従うものと考えられる。

また、UV測定において、Lysozyme濃度1.0~ 5.0 g/dm³のEthanol水溶液は541 nm付近に特有 のピークを現した。これより、アミロイド線 維の存在が確認された(Fig.5)。また、Lysozyme 濃度が4.0 g/dm³以上では、スペクトル強度が 低下傾向にあることから、Lysozymeの系外へ の析出が生じたと考えられる。Methanol系にお いても同様の結果が得られた。

これより、アミロイド線維形成能はLysozyme 濃度、すなわち、溶液中での変性Lysozymeの 分子間距離に依存すると考えられる。

講演の際には、アミロイド線維蛍光プローブ であるThioflavine T を用いたアミロイド線維検 出についても発表する予定である。

【参考文献】

- 1) Kazuo Kuwata , *PROTEIN NUCLEIC ACID* AND ENZYME , 47 , (2002) , pp.1292-1298
- 2) Hirota, N, et.al., *J.Mol.Biol*, 275, (1998) pp.365-378
- 3) W.E.Klunk, *Methods in enzymology*, (1999) pp.285-305
- 4) Irantu Pallares, et al., *J.Mol.Biol*, 342, (2004) pp.321-331



Alcohol concentration (v/v %)





Fig.5. Absorption spectra of denatured Lysozyme solutions in the presence of CR . CR concentration : $0.5 \ \mu M$