

## Lysozymeのアミロイド線維形成におよぼす金属イオンの影響

日大生産工(院) ○朝本 紘充  
日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

### 【緒論】

狂牛病をはじめとするプリオン病は、プリオンと呼ばれるタンパク質の変性に起因する致死性の神経変性疾患である。変性により生じた病原性プリオンタンパク質は、 $\beta$ -シート構造に富み、その構造部分が規則的に配列、凝集することでアミロイド線維を形成する<sup>1)</sup>。こうしたアミロイド線維によって引き起こされる疾患群を、一般的にアミロイドーシスと呼び、アルツハイマー病もこれに該当する。この場合の原因物質は膜タンパク質からの分離で生成するアミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )と呼ばれるタンパク質である。

近年、A $\beta$ により形成されたアミロイド線維中にCu(II)などの金属イオンがそれ以外の周辺環境よりも約5倍の高濃度で存在していることが明らかとなった。これより、生体内に存在する金属イオンがアミロイド線維の形成に深く関与している可能性が示唆された。

これまで、本研究室ではアミロイド線維形成能をもつNative Lysozyme (N-Lyz)をモデルタンパク質として用い、メタノールおよびエタノール水溶液中での高次構造変化を分光学的手法により解析することで、*in vitro*におけるアミロイド線維の形成機構について検討を行なった。その結果、N-Lyzは一価の金属陽イオンから成るLiCl添加系溶媒中において $\beta$ -シート化を起こし、これに伴い層状のアミロイド線維を形成した(Fig.1)。

本報では、アミロイド線維の形成機構におよぼす金属イオンの影響を明らかにするため、一価の金属陽イオンおよび価数の異なるCa(II), Cu(II), およびAl(III)の塩化物を添加した溶媒中におけるN-Lyzの高次構造変化の検討について報告する。

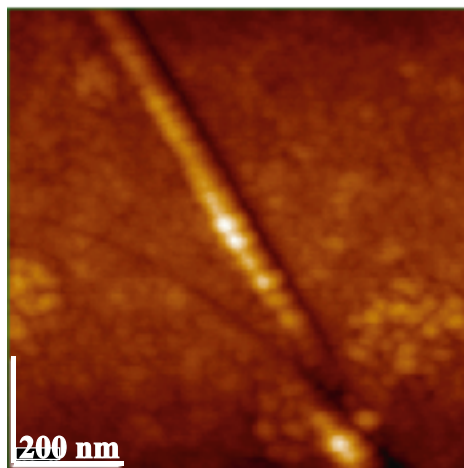


Fig.1. Atomic Force Micrograph of Amyloid fibrils formed by N-Lyz.

### 【実験】

メタノールおよびエタノール水溶液中におけるN-Lyzの高次構造変化を円偏光二色性(CD)および蛍光スペクトル測定より検討した。また、同系にイオン強度  $I = 0.001$  (mol/dm<sup>3</sup>)の LiCl, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>およびAlCl<sub>3</sub>を添加した系でのN-Lyzの高次構造変化についても同様に検討した。一連の実験において、N-Lyz濃度は0.2 (g/dm<sup>3</sup>)と一定にした。このとき、N-Lyzを含むアルコール水溶液は、40°Cの恒温槽で所定の時間放置してから各測定に用いた。

また、 $\beta$ -シート化が確認された各種塩添加系溶媒を用いて、濃度1.0~5.0 (g/dm<sup>3</sup>) N-Lyz水溶液を調製し、アミロイド線維形成に及ぼすN-Lyz濃度の影響について検討した。このとき、Congo Red (CR)添加系での紫外可視(UV-VIS)吸収スペクトルおよびThioflavine T (Th T)添加系での蛍光スペクトル測定よりアミロイド線維の検出を行なった。

また、形成したアミロイド線維の表面形状を原子間力顕微鏡(AFM)測定より観察した。

---

Effect of metal ion on the amyloid fibrils formation of lysozyme

Hiromichi ASAMOTO, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

【結果および考察】

CD測定より、N-Lyzは70%(v/v)以上の高濃度アルコール水溶液中において、S-S結合の開裂に伴う $\alpha$ -ヘリックス化を起こした(Fig.2)。また、これらの系にLiClを添加した結果、70%(v/v)以上の水溶液中において $\beta$ -シート化が誘起され、90%(v/v)のときにその含有率は最大値を示した(Fig.3)。NaCl, KCl添加系においてもN-Lyzは同様の変性挙動を示した。Fig.2で示された $\alpha$ -ヘリックス化は、アルコール水溶液におけるポリペプチドの形態変化に関する報告と同様に、溶液の過小な比誘電率により誘起された分子鎖内での水素結合形成に起因するものである。また、Fig.3で示された $\beta$ -シート化は、N-Lyzの表面電荷がLi(I)により遮蔽され、水素結合が分子鎖間に転移したことで誘起されたと推察される。次に、濃度90%(v/v)のアルコール水溶液にCaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>およびAlCl<sub>3</sub>を添加した系におけるN-Lyzの高次構造変化について検討した。CD測定より、CaCl<sub>2</sub>添加系において、メタノール水溶液中では48時間後、エタノール水溶液中では36時間後にN-Lyzは $\beta$ -シート特有の218nm近傍になだらかな負のピークをもつスペクトルを示した(Fig.4)。一方、CuCl<sub>2</sub>添加系においては、同価数の金属陽イオンを有するにも関わらず、どちらのアルコール水溶液中においても $\beta$ -シート化は誘起されず、 $\alpha$ -ヘリックス特有の209nmと222nm近傍に負のピークをもつスペクトルを保持したままであった(Fig.5)。AlCl<sub>3</sub>添加系においてもN-Lyzは同様の挙動を示した。同価数のCa(II)とCu(II)の間で生じた $\beta$ -シート構造への変性効果の違いは、金属陽イオンの錯形成能の違いによるものであると考えられる。今回用いた金属陽イオンのなかで、Cu(II)はイオン半径、結合半径共に最小であり、N-Lyz側鎖との間における錯形成能はCa(II)よりも低いことが推察される。講演の際には、Cu(II)およびAl(III)のアミロイド線維形成に対する抑制効果の有無についても併せて報告する。

【参考文献】

- 1) Kazuo Kuwata, *PROTEIN NUCLEIC ACID AND ENZYME*, 47, (2002), pp.1292-1298

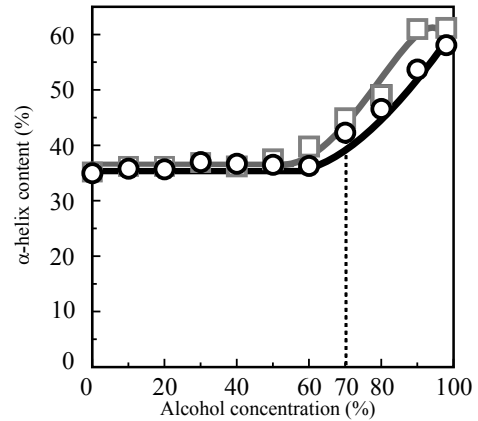


Fig.2. Change in  $\alpha$ -helix content (%) of N-Lyz with concentration of Methanol(O) and Ethanol(□).

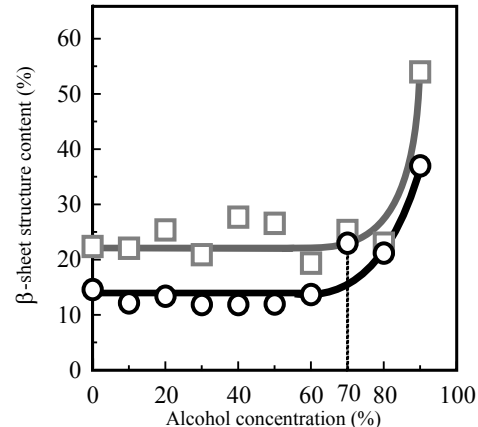


Fig.3. Change in  $\beta$ -sheet content (%) of N-Lyz with concentration of Methanol(O) and Ethanol(□).

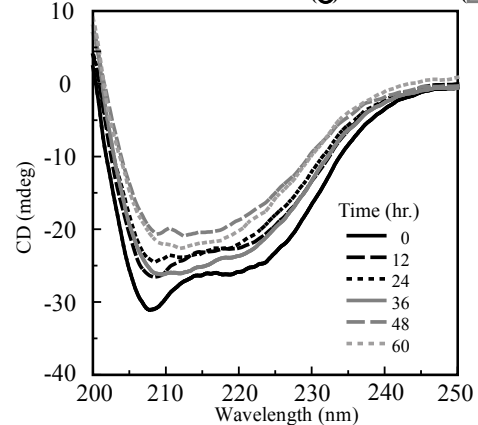


Fig.4. Time course of change in CD spectra of N-Lyz in Ethanol solution containing CaCl<sub>2</sub> ( $l = 0.001 \text{ mol/dm}^3$ )

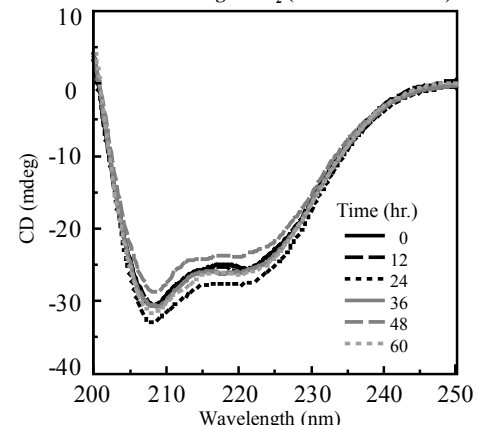


Fig.5. Time course of change in CD spectra of N-Lyz in Ethanol solution containing CuCl<sub>2</sub> ( $l = 0.001 \text{ mol/dm}^3$ )