

Lysozyme の構造安定性に及ぼす Ethanol 濃度と金属イオンの影響

日大生産工 (院) ○池田 昌祥

日大生産工 高橋 大輔・和泉 剛

【緒論】

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。

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特徴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。Human Lysozyme は家族性非神経性アミロイドーシスの原因タンパク質である。Human Lysozyme の 2 つの変異型 (D67H, I56T) がアミロイド線維形成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⁾。中でも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ーシス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。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おり、タンパク質凝集は金属イオンによる構造変化が影響していると考えられる。

そこで本研究ではタンパク質試料としてニワトリ卵白由来の Lysozyme を、変性剤試料として Ethanol を用い、金属塩を添加した系の DSC 測定から構造の安定性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、塩化銅(II)二水和物、塩化マンガン(II)四水和物、塩化マグネシウムを金属イオン濃度が 35 μ M になるように添加した。金属を添加した溶液を用い、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。また、系の繰り返し測定及び異なる走査速度での測定を行った。

塩化銅(II)二水和物、塩化マンガン(II)四水和物、塩化カルシウムを添加した 10~90 vol% の Ethanol-水混合溶媒を用い、350 μ M Lysozyme 溶液を調製した。溶液調製から 15 分後に温度一定条件下における DSC 測定を行った。測定温度は生体内に近い 313 K に設定した。

【結果及び考察】

Native Lysozyme の系で昇温時の繰り返し測定を行った結果、同様の DSC 曲線が得られた。また、走査速度に対するピーク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結果が見られた。これにより金属イオンが Lysozyme に結合もしくは相互作用していても熱変性の可逆性に影響を示さないことが示唆された。

昇温時の各変性温度 (ΔT_d) における熱力学量を Table 1 に示す。金属イオン添加系では変性温度が 2 つに分かれた。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。金属イオン存在下では、 ΔC_p の値が Native Lysozyme より低い値を示している。これは変性時に要する熱量が減少した事を示す。また、Mn 添加系の 301.4K 前後のピークは生体内よりも低温に位置しており、生体内条件での変性が示唆される。また、Mn 添加系では $\Delta \Delta G$ が正の値を示しており、構造が Native よりも不安定になっていると分かる。Mn の価数による影響を検討するために Mg を用いたが、Mn とほぼ同一の DSC 曲線を描いた。そのため、Mn による熱力学量への影響は価数によるものではないと考えられる。

313 K 一定条件下での各 Ethanol 濃度における Lysozyme の熱力学量を Table 2 に示す。Ethanol 濃度の増加に伴い ΔH が低下し、60 vol% と 70 vol% を境にピークの吸熱と発熱が入れ替わっている。これは Ethanol 濃度により変性後の構造が異なる可能性を示唆している。また、70 vol% 付近から α -helix 構造の含有率が増加すると報告されており⁶⁾、Table 2 に見られるマイナスの ΔH は α -helix 構造の増加に起因すると考えられる。90 vol% では熱量にほぼ変化が無く、ピークとして観測されなかった。アミロイド線維の段階的な形成反応が Ethanol 濃度の増加に伴い促進されるため⁷⁾、ピークとして観測される反応が溶液調製から測定開始までの 15 分間で終了したために観測されなかったと考えられる。

60 vol% 以下では Ethanol 濃度が低下するにつれピーク強度が低下し、緩やかな曲線を描いた。また、60 vol% を中心に最も大きなマイナスの ΔG を示した。そのため、60 vol% 付近で最も構造が不安定になり、変性が促進されていると考えられる。

これらの結果より、極性の変化や金属イオンが Lysozyme の構造安定性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

Table 1 Thermodynamic data for the thermal denaturation of lysozyme in the presence of Cu and Mn ion (283-363 K)

Conc. (μ M)		ΔT_d (K)	ΔC_p (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (at 325.2K) (kJ/mol)
Cu	Mn				
0	0	325.2	0.626	1.995	-
35.00	0	320.0	0.333	1.519	-0.357
		327.6	0.005	0.033	
26.25	8.75	326.2	0.498	7.693	0.643
17.50	17.50	353.5	0.421	6.969	0.119
8.75	26.25	338.6	0.562	9.383	0.333
0	35.00	301.4	0.038	0.031	1.071
		339.1	0.245	3.869	

$$\Delta \Delta G : \Delta G(\text{Native Lysozyme}) - \Delta G(\text{Native Lysozyme} + \text{Metal Ions})$$

Table 2 Thermodynamic data for the isothermal denaturation of lysozyme in various ethanol conc. at 313 K

Ethanol Conc. (vol%)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol K)	ΔG (kJ/mol)
10	0.31×10^{-3}	-0.10×10^{-6}	-0.06×10^{-3}
20	2.23×10^{-3}	-0.71×10^{-6}	-0.44×10^{-3}
40	0.97×10^{-3}	-0.31×10^{-6}	-0.19×10^{-3}
50	9.15×10^{-3}	-2.92×10^{-6}	-1.83×10^{-3}
60	34.60×10^{-3}	-11.05×10^{-6}	-6.92×10^{-3}
70	-173.60×10^{-3}	55.45×10^{-6}	34.71×10^{-3}
80	-173.00×10^{-3}	55.26×10^{-6}	34.60×10^{-3}
90	0	0	0

【参考文献】

- 1) Shinichi Kitamura *et al.*, *Biochemistry*, 28, 3788-3792, 1989
- 2) Patrick Connelly *et al.*, *Biochemistry*, 30, 1887-1891, 1991
- 3) Cui-Qing Hu *et al.*, *Biochemistry*, 31, 1643-1647, 1992
- 4) D.R. Booth *et al.*, *Nature*, 385, 787-793, 1997
- 5) Kenji Sasahara *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 352, 700-711, 2005
- 6) 朝本紘充 平成 17 年度修士論文 *in vitro* における Lysozyme のアミロイド線維形成機構の解明
- 7) Yasushige Yonezawa *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 323, 237-251, 2002