5-48

鶏卵白 lysozyme のアミロイド線維形成におよぼす溶媒の影響

日大生産工(院)　○須々木 尚子
日大生産工　高橋 大輔，日大生産工　和泉 剛

1. 緒言

近年，タンパク質の構造異常を原因とした疾患が数多く報告されている。これらはコンフォメーション病と呼ばれており，その代表としてクロイツフェルト-ヤコブ病やアルツハイマー病などを始めとするアミロイドーシスの存在がある。アミロイドーシスは，アミロイド線維とよばれるタンパク質の構造体が体内の様々な部位に沈着することで生じる疾患の総称である。

アミロイド線維は前駆体となるタンパク質の構造を問わず，枝分かれのない構造を形成する。これはタンパク質間のβ-シート領域の規則的な凝集によって引き起こされる。以上から，アミロイド線維はタンパク質の基本的な構造の 1 つである可能性が示唆されているが，その機構はその大半が未だ不明確である [1]。したがって，アミロイド線維の形成機構や構造物性の理解が，アミロイドーシスの根本的な治療法を確立するための重要な課題となる。

Zako らは，還元処理によってジスルフィド結合を一部切断したウシ insulin が柔軟なヌードル状のアミロイド線維を形成することが報告されている [2]。また当研究室においても，金属イオンを含むメタノールおよびエタノール水溶液に鶏卵白 lysozyme を添加し，40℃一定で 60 日間放置してアミロイド線維を形成した結果，それぞれ直鎖状と環状のアミロイド線維が形成されることを報告している [3]。アミロイド線維の形成に影響する要因として温度や濃度，イオンの種類，pH などが知られているが，鶏卵白 lysozyme については，65℃一定で pH 2.0 の塩酸中で種々のアミロイド線維を形成することが報告されている [4]。そこで本研究では，鶏卵白 lysozyme について，酸性条件にしたアルコール溶媒を用いてアミロイド線維の形成を試みた。さらに，試料中のアミロイド線維の形成状態を評価した。

2. 実験

2-1　試薬

サンプルタンパク質として鶏卵白由来の lysozyme を用いた。また，添加する金属イオンとして塩化カリウム(LiCl)および塩化カルシウム($CaCl_2$)，溶媒としてメタノール，エタノールおよび希塩酸(pH 2.0)を用いた。

2-2　サンプル溶液の調製

LiCl を溶解させた希塩酸(pH 2.0)をメタノールおよびエタノールに添加し，アルコール濃度 90 %(v/v)の溶液(I=0.001 mol dm^{-3})を調製した。この溶液を用いて，2.0 g dm^{-3} lysozyme 溶液を調製した。これを 40℃の恒温槽で放置したものをサンプル溶液とした。また，$CaCl_2$ を用いて，同様のサンプル溶液を調製した。

2-3　チオフラビン T(Th T)によるアミロイド線維の検出

Tris-HCl 緩衝液(I=0.001 mol dm^{-3}, pH 7.0)を用いて 50 μM Th T 溶液を調製した。サンプル溶液 0.045 cm^3 に Th T 溶液 0.955 cm^3 を添加し，実験開始より 57 日後に蛍光スペクトル測定を行った。なお，励起波長は 450 nm とした。

The effect of solvents for amyloid fibril formation of Hen-egg white lysozyme

Naoko SUSUKI, Daisuke TAKAHASHI and Tsuyoshi IZUMI

2-4 コンゴーレッド(CR)によるアミロイド線維の検出

Tris-HCl 緩衝液(I=0.001 mol dm^{-3}, pH 7.0)を用いて 10 μM CR 溶液を調製した。サンプル溶液 0.045 cm^3 に CR 溶液 0.955 cm^3 を添加し, 実験開始日から 1 日毎に吸光スペクトル測定を行った。

3. 結果および考察

40 ℃一定で放置したサンプル溶液を用いて, Th T および CR によるアミロイド線維の検出測定を行った。図 1 および図 2 に，Th T 試薬によるメタノールおよびエタノール溶媒に $CaCl_2$ を添加したサンプル試薬の蛍光強度の変化を示す。490 nm においてピーク強度の増加が確認された。また，LiCl を添加した試料でも同様にピーク強度の増加が確認されている(データ未掲載)。Th T は単独では大きな蛍光強度を示さないが，アミロイド線維との結合に伴い蛍光強度が大きく増加することが報告されている [5)]。すなわち酸性条件時，メタノールおよびエタノールの両溶媒下において lysozyme のアミロイド線維の形成が示唆された。しかし，CR による検出測定ではアミロイド線維の形成が確認できなかった（データ未掲載)。一方，中性条件の試料では Th T および CR の両測定法によってアミロイド線維の形成が確認されている [3)]。

Th T および CR は，線維の長軸に対して垂直に配列させたβ-シートに特異的に結合すると考えられている [6)]。これより，酸性条件で存在が示唆されたアミロイド線維は，中性条件で得られた線維とβ-シート配列の積層様式が異なっていると考えられる。

講演会では，得られたアミロイド線維を原子間顕微鏡により観察し，溶媒環境が形態におよぼす影響について併せて報告する。

4. まとめ

10 %(v/v)の希塩酸を含むメタノールおよびエタノールの両溶媒下において lysozyme のアミロイド線維の形成が示唆された。また，酸性条件下では，中性条件で得られる線維とアミロイド線維を形成しているβ-シートの積層構造が異なると考えられる。

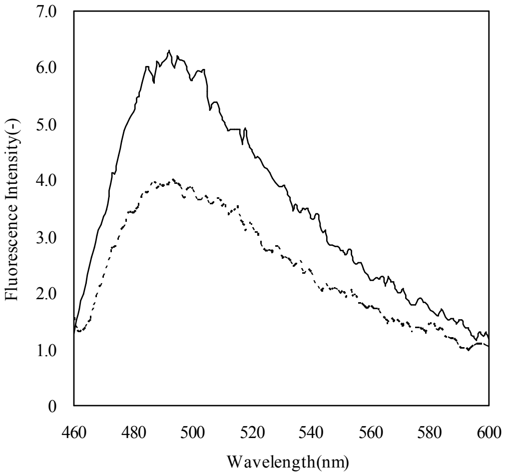

Fig.1 Fluorescence spectra of Th T in the absence(*broken line*) and presence(*solid line*) of N-Lyz in Methanol solution containing Ca(Ⅱ).

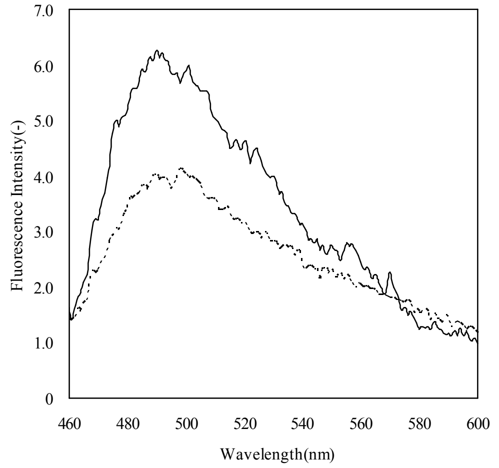

Fig.2 Fluorescence spectra of Th T in the absence(*broken line*) and presence(*solid line*) of N-Lyz in Ethanol solution containing Ca(Ⅱ).

5. 参考文献

1)後藤祐児ら，タンパク質化学，*(株)化学同人*，(2005)，303-312

2)T. Zako, et al, *Biophys. J.*(2009) **96**, 3331-3340

3)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", (2005),48-63

4) Krabs M.R.H, et al, *J. Mol. Biol.*(2000)**300**, 541-549

5)LeVine, H., *Protein Sci.*(1993) **2**, 404-410

6)Krabs M.R.H, et al, *J. Strut. Biol.*(2005)**149**, 30-37