

Title	Studies of amyloid fibril formation induced by ultrasonication
Author(s)	宗, 正智
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34058
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (宗 正 智)

論文題名

Studies of amyloid fibril formation induced by ultrasonication
(超音波によるアミロイド線維形成機構の研究)

論文内容の要旨

背景

蛋白質の凝集現象は細胞骨格などの組織形成や伝達物質の備蓄・放出などの生体機能をつかさどるも、アミロイド線維沈着や白内障の濁りなどのように異常凝集をして疾病を引き起こすものなどがある。また、結晶構造解析で用いられるように天然構造のまま結晶が析出する現象などもあり、蛋白質の凝集現象は様々である。蛋白質凝集の形成機構や構造を明らかにすることは、その制御あるいは医薬品の品質管理、工業利用にも応用できると考えられる。本研究では蛋白質凝集の形態の一つであるアミロイド線維に着目し研究を行った。

本研究では、線維形成機構の解明を目的とし、モデル蛋白質として透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β_2 ミクログロブリンを用い、実験を行った。

アミロイド線維形成は結晶化反応とよく似た反応であり、蛋白質濃度が溶解度を超えた溶液(過飽和溶液)で起こる蛋白質の析出反応であると考えられる。線維形成には、核形成相と伸長相があり、核形成の非常に高いエネルギー障壁のために、長時間の線維を作らない潜伏期間がある。核形成相では蛋白質溶液は過飽和状態となっており、ひとたび線維核ができると速やかに伸長反応が進み過飽和状態は解消される。これまで、線維形成実験を速やかに行わせるために様々な攪拌方法がとられてきたが、超音波がその最たるものであることが当研究室で見いだされた。しかし、その詳細な機構は解明されていない。本研究では超音波のどのような効果が線維形成に有効にはたしているかを明らかにしようとした。

結果と考察

(線維形成促進に関わる超音波の効果)

超音波は液中でキャビテーションバブルを発生させる。さらに、これが原因となって局所的超高温・超高压、OHラジカルの生成、溶液の攪拌、せん断力の発生などの効果が現れる。超音波強度や周波数を変化させることで気泡の大きさや量を変化させることができる。超音波強度や周波数を変えた線維形成実験の結果より、線維形成のラグタイムと超音波強度(音圧)の間に相関が見られた。また、線維形成に適した周波数が存在することが示唆された。さらに、塩濃度を変えて溶解度を変化させた自発線維形成実験では、塩濃度が高く溶解度が下がるほど線維さらには不定形凝集ができやすくなった。これらの結果から、アミロイド線維形成が過飽和状態の蛋白質溶液で起こり、超音波はキャビテーション気泡の発生や振動により、気液界面での蛋白質凝集を促進していると考えられる。超音波照射により線維核が一度できると、断片化による二次核形成も加わり、線維は速やかに伸長し、溶液の過飽和状態は解消されると考えることができる。

(ハイスループットアッセイ系の構築)

アミロイド線維の研究において、線維形成反応が遅いということや、形成された線維が不均一な高分子量複合体で不溶性であることから実験結果の再現性が低いという問題があった。網羅的な研究あるいは創薬スクリーニングのためには、実験時間の短縮や高い再現性が要求される。そのため、線維形成時間を短縮するため超音波処理の方法を改良した。また、線維検出のためのアミロイド特異的な蛍光試薬であるチオフラビンTの蛍光測定を多数の試料で一度に行うことができるプレートリーダーを超音波照射装置と共に使用することで、一度に多くの検体で速やかに線維形成の実験ができる実験系を構築した。しかし、96ウェルプレートを用いたことによって超音波強度がウェルごとにバラつき、線維形成時間にバラつきが生じた。このバラつきをプレートの回転および脱気装置を用いた超音波伝播の効率化によって解消し、均一な線維形成反応を成し遂げた。この実験系を用いることで、実験の効率化が期待できる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏・名 (宗 正 智)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 後 藤 祐 児
	副 査 教授 高 木 淳 一
	副 査 教授 藤 原 敏 道
	副 査 准教授 荒 田 敏 昭
論文審査の結果の要旨	
<p>アミロイド線維はアルツハイマー病や透析アミロイドーシスなどアミロイドーシスと総称されるさまざまな疾患に関わる線維状の凝集体であり、物質の結晶と同様に、過飽和条件において核形成と伸長反応によって形成する。既に超音波によって自発的なアミロイド線維形成の促進されることがわかっていたが、その原理は不明であった。</p> <p>論文では、超音波と蛍光マイクロプレートリーダーを併用することによって、透析アミロイドーシスの原因となる$\beta 2$ミクログロブリンのアミロイド線維形成反応を解析した。シードに依存しない自発的なアミロイド線維形成を、超音波と96穴のプレートを用いることによって、簡便かつ迅速に解析することが可能になった。さまざまな条件で実験を行うことによって、アミロイド線維形成に重要な因子を検証した。プレートの回転、超音波強度の計測、脱気の効果、超音波周波数変化の影響などを調べた結果、アミロイド線維形成の促進の原因が、超音波によって発生する気泡表面での蛋白質の凝集にあることを推定した。さらに気泡表面に相当する生体内因子によって、アミロイド線維が形成され、アミロイドーシスの発症に至ることを議論した。</p> <p>以上、本論文では、超音波によってアミロイド線維形成を効率よく計測する方法を確立すると共に、アミロイド線維形成機構の原理に迫った。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>	