



Title	Mechanism of the Amyloid Fibril Formation of $\beta$ 2-Microglobulin
Author(s)	大橋, 祐美子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45622">https://hdl.handle.net/11094/45622</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	おお  はし  ゆみ  こ 大 橋  祐 美 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 19212 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Mechanism of the Amyloid Fibril Formation of $\beta_2$ -Microglobulin ( $\beta_2$ ミクログロブリンのアミロイド線維形成機構)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児  (副査) 教授 吉川 和明 教授 高木 淳一

#### 論 文 内 容 の 要 旨

アミロイド線維とは蛋白質が分子間で相互作用し、線維状に連なった会合体である。現在、約 20 種のアミロイド線維が関わりとされる疾病が確認されているが、アミロイド病治療の基盤となる詳細な線維構造や線維形成機構は未だ不明であり解明が待たれている。長期血液透析患者に頻発する合併症である透析アミロイドーシスは、Class I MHC の軽鎖にあたる  $\beta_2$  ミクログロブリン ( $\beta_2$ M) がアミロイド線維を形成し、関節部位に蓄積する病気であり、痛みや屈曲障害を招く。本研究では、 $\beta_2$ M の線維形成機構の解明の足がかりとして以下の実験を行った。

①  $\beta_2$ M のアミロイド線維形成におけるジスルフィド結合の役割  $\beta_2$ M の立体構造は、典型的なイムノグロブリンフォールドであり、二枚の  $\beta$  シートが一本のジスルフィド結合によってつながれている。このジスルフィド結合を切断した還元型  $\beta_2$ M は、native 構造と近い構造を保持していたが、その安定性は大きく低下することが分かった。アミロイド線維に特異的に結合し、蛍光を発する色素チオフラビン T (ThT) の蛍光を用いたアミロイド線維伸長実験では、還元型  $\beta_2$ M はアミロイド線維を形成しないことが示された。原子間力顕微鏡観察で、酸化型  $\beta_2$ M から成る線維は太く、直線的なものであったのに対して、還元型  $\beta_2$ M では非常に細くフレキシブルな線維状凝集体が確認できた。この結果から、 $\beta_2$ M の典型的なアミロイド線維の形成にはジスルフィド結合が必要であることがわかった。

②  $\beta_2$ M フラグメント K3 のアミロイド線維形成  $\beta_2$ M のアミロイド線維を *in vitro* で作製する場合、酸性 pH でさらに線維核 (シード) を添加する必要がある。一方、以前当研究室で発見された 22 残基の  $\beta_2$ M フラグメント K3 (Ser20-Lys41) は、酸性条件で自発的に線維形成することが明らかになっていた。そこで、ThT を用いて K3 の自発的線維形成の pH 依存性を調べたところ、K3 は中性 pH を最大として、広い pH 領域で線維を形成することが明らかとなった。中性付近で形成された K3 線維は全長  $\beta_2$ M 線維と比較して、直径は約半分と細かったが、直線的でかつ螺旋構造を持つことが電子顕微鏡観察から分かった。このことから、全長  $\beta_2$ M も中性付近で線維形成できる可能性が示唆された。また、分子間ジスルフィド結合でつながった K3 ダイマーの線維形成反応を観察した。その結果、K3 ダイマーは、K3 モノマーと比較し、線維形成速度、ThT 蛍光強度の両面において、大きく増加することが分かり、ここでもジスルフィド結合の重要性が示された。

③ 超音波による全長  $\beta_2$ M のアミロイド線維形成誘導 激しく攪拌する等の様々な凝集促進刺激がアミロイド線維形成を誘導することが知られている。ここでは超音波処理によって全長  $\beta_2$ M の線維形成誘導が可能であるか否かを調

べた。酸性条件下の全長 $\beta 2M$ に、核を加えず、断続的に超音波をあて続けたところ、ラグタイムの後、アミロイド線維形成が確認できた。また、原子間力顕微鏡による経時変化観察から、超音波によって線維が誘導され、更に超音波によってその線維が破壊されていく様子が観察できた。ここでは、線維以外の不定形な会合体は形成されておらず、アミロイド線維のみが選択的に形成していた。これは、他の凝集促進刺激を用いた線維形成誘導では見られない現象であり、分子間の相互作用の少ない不安定な会合体は超音波の凝集体破壊効果によって成長前に破壊されてしまう結果であると考えられる。

以上の結果から、ジスルフィド結合が線維形成において重要な役割を担っていること、そして、*in vitro*、中性 pH で $\beta 2M$ の線維形成が起こらないのは、その天然構造が線維形成の鍵となる領域 (K3 に含まれる領域) を露出させないことが原因であると示唆された。さらに、超音波の様な蛋白質の凝集促進刺激は線維核形成を容易にすることが分かった。ここで得られた結果は $\beta 2M$ のアミロイド線維形成機構を探る上で非常に重要なヒントであると言える。

### 論文審査の結果の要旨

現在、アミロイド線維に関わる約 20 種類のアミロイド病が知られているが、アミロイド線維の詳細な構造や形成機構、アミロイド病における役割は、明らかにされていない。本論文では、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を対象として、アミロイド線維形成の分子機構を解析した。ジスルフィド結合を還元した蛋白質、ペプチドフラグメントを用いて、アミロイド線維形成の因子を明らかにした。また、超音波処理により、アミロイド線維が形成できることを発見した。本論文は、アミロイド線維形成の分子機構の理解を進展させる独創的なものであり、関連分野に大きく貢献する優れた成果である。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと認める。