



Title	Study on Interactively-Induced Function of A β and Liposome under Stress Condition
Author(s)	吉本, 則子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46783
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 吉 本 則 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 19821 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 17 年 9 月 30 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

基礎工学研究科化学系専攻

学 位 論 文 名 Study on Interactively-Induced Function of A β and Liposome under Stress Condition
(ストレス条件下で相互作用的に誘起される A β - リポソームの機能に関する研究)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 久保井亮一

(副査)

教 授 金田 清臣
助教授 馬越 大

教 授 田谷 正仁

教 授 原田 明

論 文 内 容 の 要 旨

Anfinsen により、タンパク質は特定のアミノ酸配列に基づいた最安定の 3 次構造に folding することが証明されている。タンパク質は、この特有の 3 次構造に folding した際にのみ、その機能を発現するものと考えられてきた。この為、多くの研究ではタンパク質の 3 次構造に基づいた機能に主眼が置かれてきた。しかしながら、近年、生体内においては、最安定の 3 次構造に folding した場合のみならず、folding 中間体である molten globule 状態、さらに unfold 状態などの、それぞれの構造状態で異なった生理学的な機能を有するタンパク質が報告されている。これらのタンパク質の構造状態は、基質、核酸、補酵素、生体膜などの種々のリガンドとの結合によって安定化されているものと考えられている。従って、タンパク質はこれまで考えられてきた以上に多くの潜在的な機能を有しており、その機能は種々のリガンドによって調節される可能性がある。生体膜も、また、外部環境因子を認識して非線形に構造・機能を変化させるストレス応答機能を有している。本研究では、タンパク質やリポソーム (モデル生体膜) の両者が、ストレス負荷条件において相互認識することで発現する潜在的な機能について実験的に検討した。

第 1 章では、リポソームや、スマートポリマー分子集合体などのモデル生体膜を用いて、熱ストレスを負荷した際の、膜流動性や局所的疎水性の変化がタンパク質の活性に及ぼす影響を定量的に解析した。スマートポリマー分子集合体を用いてモデル生体膜を模倣した場合においても、膜流動性・局所的疎水性に応じて炭酸脱水酵素・lysozyme の活性化・再活性化が誘導された。さらに、タンパク質に対するシャペロン機能に必要な特性因子は、リポソーム・スマートポリマー分子集合体ともに共通しており、工業的に応用可能な人工シャペロン設計指針が示された。また、膜流動性の高いリポソームの共存下でストレス負荷する事により、膜との相互作用によって catalase の活性が増加する事が示された。

第 2 章では、ストレスを負荷することで、膜流動性の低下したリポソームとタンパク質間の相互作用を、固定化リポソームクロマトグラフィーおよびリポソーム誘電分散解析法を用いて定量的に評価した。この結果、分子内水素結合強度 ρ 値の低いアミロイド性タンパク質がストレス負荷したリポソームと強く相互作用し、その認識能力を有する

ことを明らかにした。

第3章では、タンパク質が、ストレスを負荷されたリポソーム膜上で発現する機能を、アミロイド性タンパク質の一つである $A\beta$ の酵素活性に基づいて検討した。 Cu を捕捉した $A\beta$ によるリポソーム膜上でのコレステロール酸化反応速度を解析した結果、リポソームの膜流動性に応じて基質親和性が変化することが示された。以上より、これまで生理学的な機能が明確でなかった $A\beta$ の機能を明らかにするとともに、これがストレス負荷条件におけるリポソームの膜流動性に応じて制御される事が示された。以上の研究成果は、生体膜とタンパク質のストレス負荷条件における相互作用および構造変化が、両者の潜在的な機能を引き出すことを示しており、ストレス応答型の生体素子の開発に重要な指針を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

タンパク質はそれぞれアミノ酸配列に基づいた特定の最安定な3次構造に folding する (Anfinsen) が、近年 Prusiner らにより、全く異なるアミノ酸配列のペプチドがアミロイド (線維性凝集体) と呼ばれる類似した構造を形成する事が報告されている。このことから、タンパク質はこれまで考えられてきた構造・機能以外に多くの潜在機能を有していることが示唆される。さらに、タンパク質の構造状態は、基質、核酸、補酵素、生体膜などの種々のリガンドとの結合によって制御されていると予想され、特に、生体膜は生体細胞の構造・機能を考える上で必須不可欠な要素であり、さらには、外部環境の変化 (ストレス) を認識して非線形に構造・機能を変化させるストレス応答機能を有している。

本研究では、タンパク質とモデル生体膜 (リポソーム) がお互いのストレス負荷状態を認識する機能に着目し、タンパク質とリポソームが相互認識 (相互作用) して誘起される機能の解析・利用手法を確立する事を目的としている。特に、水素結合安定性 (ρ 値) の異なるタンパク質を標準物質として用いて、リポソーム膜の水素結合安定性が定量的に評価されている。第1章では、 ρ 値の高いタンパク質の水素結合強度が低下した構造中間体 (MG 状態) がモデル生体膜との疎水性相互作用により安定化された結果、(1) CAB、TG の再活性化収率が増加し、(2) 熱/酸化ストレス負荷条件において Catalase/SOD が活性を保持していることを示した。第2章では、膜の水素結合強度安定化能を示すパラメータを実験的に決定する手法について検討されている。 ρ_{pr} 値の異なるタンパク質とリポソームとの相互作用を、(i) 固定化リポソームクロマトグラフィーと (ii) 誘電分散解析を用いて定量的に評価した。その知見に基づき、リポソーム膜の水素結合強度安定化能を示すパラメータ m_{ip} を実験的に決定した。特に、膜上のコレステロールクラスターに高い水素結合安定化能があることが示された。第3章では、 m_{ip} 値の高いリポソーム膜上で安定化された $A\beta$ の潜在的機能を明らかにした。 $A\beta$ は Cu を捕捉し、二次構造変化を通じてコレステロール酸化酵素として機能することを示し、特に、 m_{ip} 値の高い膜上では、コレステロールに対する高い基質親和性 ($1/K_m$) を有することを示した。

以上の研究成果は、(1) タンパク質が温度や pH などの環境変動 (ストレス) を利用する、あるいは、水素結合強度の低い構造体を形成することで、生体膜上で構造と機能を多様化させていること、(2) $A\beta$ - Cu 錯体が膜上における酸化によりコレステロールの代謝を促進していること、(3) 水素結合の安定性を指標としたリポソーム-タンパク質複合体を用いた材料設計に応用できることを明らかにした。よって、博士 (工学) の学位論文として価値のあるものと認める。