The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Mechanism of Protein Misfolding
Author(s)	Goda, Shuichiro
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169139
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　郷　田　秀一郎（ごう だ しゅういちろう）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学位記番号　第　15178　号

学位授与年月日　平成12年3月24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 Protein Misfolding
（蛋白質のミスフォールディングの機構）

論文審査委員　（主査）
教　授　後藤　祐児

（副査）
教　授　倉光　成紀　　教　授　谷澤　克行　　助教授　油谷　克英

論文内容の要旨

アミロイドーシスは蛋白質のフォールディングの異常に起因する病気であり、蛋白質が生体内で繊維状沈殿を形成することによって発症する。多くの種類の蛋白質が病因となるが、それらの間で、アミノ酸配列や立体構造に相同性は見られていない。しかし、繊維状沈殿は以下の共通の特徴を示す。(1) Congo red で染色し、偏光顕微鏡下で観察すると緑色の複屈折を示す (2) 電子顕微鏡で観察すると、直径約100Åの繊維状である (3) X線回折像は、4.7Åと約10Åに回折点を生じる。

最近、ヒトリゾチームの一残基置換型（156T or D67H）がアミロイドーシスの病因蛋白質の一つであることが報告された。ヒトリゾチームはその特性について詳細に研究されており、アミロイド繊維形成の研究のモデル蛋白質として適している。そこで、本研究では、アミロイド性変異体ヒトリゾチームが *in vitro* でアミロイド繊維形成する条件を検索し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

ChapterⅡではメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いたヒトリゾチームの発現系の構築を行った。

ChapterⅢでは、*in vitro* でのアミロイド繊維形成の条件を検索した。その結果、アミロイド性ヒトリゾチーム（156T）の高濃度エタノール溶液中での沈殿物が、コンゴレッド染色とX線回折の測定を基に、アミロイド繊維を形成していることが分かった。更に、ヒトリゾチームの野生型及びその変異体（EAEA－lysozyme、アミロイド性変異の EAEA－lysozyme、EAEA－156T）も高濃度エタノール溶液中でアミロイドを形成することも分かった。

アミロイド繊維形成速度を蛋白質濃度0.1mg／mL、エタノール濃度80%、25℃で調べた。試料には、野生型、及び安定性の異なる3種類の変異体（156T、EAEA－lysozyme、EAEA－156T）を用いた。その結果、EAEA－156T と EAEA は15分以内、156T は8時間以内にアミロイド繊維を形成したのに対して、野生型は30時間経ってもこの条件では形成しなかった。これらの結果は、安定性の低下がアミロイド繊維形成の原因であることを示唆している。また、熱測定結果より、EAEA は156T よりも安定性が高かったが、アミロイド形成速度は速かった。このことはアミロイド繊維形成速度が安定性のみによって決まるものではなく、そのアミノ酸配列の変化によってアミロイド繊維形成の傾向性が変化することを示している。

ChapterⅣではアミロイドーシスとは関係のないニワトリ卵白リゾチームを用いて、高濃度エタノール溶液中でアミロイド繊維が形成するかどうかを確かめた。蛋白質濃度5mg／mL、85%エタノール溶液中で、遠紫外部 CD スペクトルは典型的な β 構造を示す215nm 付近に単一の負の極大を示した。同条件下で、近紫外部 CD スペクトルは立

体構造の崩壊を示していた。蛋白質濃度10mg／mL、エタノール濃度90％で放置したところ、一週間後に溶液はゲル状となり、10mM NaCl では即座に沈殿を生じた。その沈殿を試料に Congo red 染色、X線回折、電子顕微鏡観察を行った結果、それらはアミロイド繊維を形成していた。また、沈殿は水中で再び溶解し、酵素活性を回復した。この結果は、ニワトリ卵白リゾチームのエタノール溶液中でのアミロイド繊維形成は可逆であることを示している。

以上の結果は、アミロイド繊維形成は変性状態を経て、起こることを示している。更に、アミロイド繊維形成はアミロイドーシスとは関係のない通常の球状蛋白質でも、ある条件下でおこる蛋白質共通の特性であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

本論文では、アミロイド性変異体ヒトリゾチームのアミロイド形成反応を研究した。生体外でのアミロイド形成条件として、高濃度エタノール溶液条件を発見した。更にアミロイド形成はニワトリ卵白リゾチームでも見られ、球状蛋白質のある条件下での共通の性質であることを示した。本論文は、アミロイド繊維形成の分子機構の解明に重要な知見を与えるものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものとして認める。