



Title	Structural Characterization of Folding Intermediate of β 2-Microglobulin Using Solution-state NMR
Author(s)	亀田, 篤司
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48761
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	かめ だ あつ し 亀 田 篤 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 1 7 7 8 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structural Characterization of Folding Intermediate of β_2 - Microglobulin Using Solution-state NMR (溶液 NMR を用いた β_2 ミクログロブリンのフォールディング中間体の 構造に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教 授 後藤 祐児 (副査) 教 授 佐藤 尚弘 准教授 四方 俊幸

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】 生体内において蛋白質は特有の構造を獲得し機能を発現する。しかし近年、アミロイド線維と呼ばれる天然構造とは別の安定構造が多くの疾病に関与することが明らかとなってきた。透析アミロイドーシスに係る β_2m も線維形成することが知られている蛋白質の一つである。アミロイド病の発症リスクの予測や予防には線維形成機構の解明が必要である。線維形成には部分的な変性が必要であると考えられているため、蛋白質の天然構造形成過程を詳細に調べるのが有効な手段であると考えられる。 β_2m ではフォールディング中間体の一つが線維形成しうることが報告されている。本研究では β_2m のアミロイド前駆体構造と考えられている中間体 I_2 の構造を溶液 NMR を用いて調べ、フォールディングおよびアミロイド形成の分子機構を解明することを目的とした。

【結果と考察】 β_2m は変性状態から二つの中間体を経て天然状態に至る。変異体の実験から二つ目の長寿命な中間体 I_2 は非天然の *trans*-Pro32 により安定化されていて、4℃で3時間程度の寿命を持つことを報告した。 I_2 から天然状態への構造変化を調べるために、全残基をモニターできる ^{15}N HSQC を連続的に測定したところ、時間経過とともに I_2 由来の信号は徐々に消失し、天然状態由来の信号が強度を増していった。時間 0 に外挿した強度（バースト相強度）は残基に違いが見られ、Pro32 近傍のループ領域と β 領域で値が小さく、反対側のループでは値が大きかった。バースト相強度は I_2 と天然状態の信号の重なりによるものであり、その大きさが環境の類似性を示すと考えられた。

さらに、 I_2 固有の構造を調べるために、 I_2 の直接観測を行った。しかし、信号帰属には数日必要であるため、三重共鳴実験は困難であった。そこで、無細胞蛋白質合成系と残基特異的標識法を組み合わせることで観測される核を減らし、測定時間を短縮した。一次元測定で残基間相関を得ることで、三時間程度での帰属が可能となり、 I_2 での Phe、Leu、Val の信号帰属ができた。

I_2 では分子内 SS 結合を隔てて Pro32 と反対側は、二面角や主鎖水素結合はほぼ天然様の構造を形成していたが、残りの β 領域および一部のループ領域では信号が観測されず、動的に多様性のある状態であることが示唆された。この、部分的な構造の不安定性が β_2m のアミロイド化に関与していることが推測される。

【結言】 溶液 NMR を用いて中間体の構造を高分解能で調べることができた。 I_2 に存在する Pro32 付近の動的構

造がアミロイド原性領域を露出させ、分子間での相互作用を形成させると推測される。このことから、アミロイドーシス発症の予防にはこの領域の安定化が一つの候補として考えられる。また、今回用いた残基特異的標識法および帰属戦略は、蛋白質の遅いフォールディング機構の解明に有用であると期待できる。

論文審査の結果の要旨

生体内において蛋白質は特有の天然構造を獲得し機能を発現する一方、アミロイド線維と呼ばれる天然構造とは別の安定構造を形成し、多くの疾病に関与する。透析アミロイドーシスの原因となる $\beta 2$ ミクログロブリンも、アミロイド線維を形成する。線維形成には部分的な変性が必要であり、アミロイドーシス発症の分子機構を理解するには、原因蛋白質のフォールディング反応を研究することが重要である。本論文では $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド前駆体と考えられる中間体に焦点を当てた研究を行い、フォールディングおよびアミロイド形成の分子機構を解明することを目的とした。

本論文では、 $\beta 2$ ミクログロブリンのフォールディング反応が、32番目のプロリン残基のシストランス異性によって制御されていることを明らかにした。フォールディング反応を ^{15}N HSQC スペクトルを中心とする溶液 NMR の手法によって解析することにより、非天然のプロリン異性体を含む中間体の特徴を明らかにした。さらに、無細胞蛋白質合成系によって残基特異的標識を行った $\beta 2$ ミクログロブリンを合成し、中間体の詳細な構造を解析した。その結果、中間体においては、32番目のプロリン残基と反対側の領域は天然様の構造を形成しているが、残りの領域は未完成であり、かつ動的に揺らいでいることを示した。この部分的な不安定性が $\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド化に関与していることを推定した。

本論文は、アミロイド原因蛋白質のフォールディング中間体の詳細な構造を、溶液 NMR や残基特異的標識蛋白質を駆使して高分解能で調べた初めての論文である。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。