

Title	Study on the formation and inhibition of amyloid fibrils of $\beta 2$ -microglobulin
Author(s)	山本, 香織
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48775
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山本香織
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 21769 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 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Study on the formation and inhibition of amyloid fibrils of $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2$ ミクログロブリンのアミロイド線維形成とその阻害に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 吉川 和明 准教授 池上 貴久

論文内容の要旨

[研究の背景]

蛋白質の天然構造は生理的条件下において蛋白質が形成する唯一かつ最も安定な構造であると考えられてきた。しかし、アミロイド線維とよばれる、天然構造とは異なる折りたたみを有する蛋白質の凝集体が、様々な病気の原因物質として発見されてきた。それらの病気はアミロイド病とよばれ、現在 20 種類以上が確認されている。アミロイド線維の形成機構やその阻害方法を解明することは、アミロイド病の予防や治療法の開発のために重要である。

本研究では、長期血液透析患者に頻発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 ($\beta 2$ -m) を、モデル蛋白質として用いた。 $\beta 2$ -m は分子内にジスルフィド (SS) 結合を 1 つもつ。この SS 結合は天然状態やアミロイド線維においては蛋白質内部に埋もれて還元剤の影響を受けにくい、変性剤などで構造が壊れた状態では容易に還元される。私は、線維形成過程における中間体を還元剤で攻撃すれば、SS 結合が速やかに還元されてアミロイド線維の形成を阻害することが出来るのではないかと考えた。本研究では、中性条件 (pH 7.0) における $\beta 2$ -m の線維形成に対する還元剤の阻害効果を中心に調べた。

[実験および結果]

本研究では、これまでの研究によって確立されてきた以下の 3 種類の条件を用いて、還元剤による阻害効果を検証した。1) 断片化した線維 (シード) の添加。2) 超音波の照射。3) 高塩濃度 (1 M NaCl) 存在下において 37°C で 24 時間攪拌した後、90°C まで加熱する。1)、2) では、線維形成を促進する効果を持つドデシル硫酸ナトリウム (SDS) またはトリフルオロエタノール (TFE) のいずれかを添加し、37°C で実験を行った。また、還元剤には、ジチオスレイトール (DTT) とシステインの 2 種類を用いた。線維形成の有無の確認は、アミロイド線維に特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T (ThT) の蛍光および電子顕微鏡、円二色性分光法 (CD) を用いて行った。

いずれの条件でも、還元剤存在下では ThT 蛍光の上昇が抑えられ、CD からは線維とは異なる二次構造を示すスペクトルが得られた。反応後の溶液を電子顕微鏡で観察すると、シード添加または超音波処理を行った場合はアモルファスな凝集体が観察された。一方、高塩濃度中で攪拌・加熱を行った場合は還元剤存在下でも線維が観察されたが、

ThT 蛍光値が低いことから、形成された線維は少ないと解釈される。以上の結果より、*in vitro* における β 2-m アミロイド線維形成に対する還元剤の阻害効果が確認された。また、高速液体クロマトグラフィーを用いて SS 結合の還元を確認したところ、天然状態では還元されにくかったが、本研究で用いた条件では速やかに還元された。これは、化学変性や熱変性によって SS 結合が溶媒に露出したためと解釈される。部分的な構造変化は β 2-m の線維形成を誘発する要因の 1 つと考えられている。還元剤はそのような線維形成が起こりやすい条件において、その能力を発揮する有効な阻害薬となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

天然構造は、蛋白質の唯一かつ最も安定な構造であると考えられてきた。しかし近年、アミロイド線維とよばれる、特異的で安定な凝集体が、様々な病気の原因物質として発見されている。アミロイド線維の形成機構やその阻害方法を解明することは、アミロイド病の予防や治療法の開発のために重要である。本論文では、長期血液透析患者に頻発する透析アミロイドーシスの原因となる β 2 ミクログロブリンを用いて、アミロイド線維の形成機構や阻害に関する研究を行った。

β 2 ミクログロブリンは分子内にジスルフィド (SS) 結合を 1 つもつ。この SS 結合は天然状態やアミロイド線維においては蛋白質内部に埋もれており、還元剤による切断を受けにくい、変性剤などで構造が壊れた状態では容易に還元される。本論文では、線維形成の中間体を還元剤で攻撃すれば、SS 結合が速やかに還元されてアミロイド線維の形成を阻害することが出来るのではないかと考えた。いくつかの反応条件において、還元剤であるジチオスレイトールとシステインの効果を検証した。その結果、これらの還元剤が、 β 2 ミクログロブリンのアミロイド前駆体における SS 結合を効率よく切断することにより、線維形成を阻害することを明らかにした。また、等温滴定量熱計を用いて、アミロイド線維形成を測定することにはじめて成功し、線維形成に伴うエンタルピー変化、エントロピー変化、比熱変化などの熱力学量を明らかにし、線維の構造や安定性の機構を推定した。

本論文は、 β 2 ミクログロブリンの SS 結合に着目し、還元剤がアミロイド線維形成を阻害することを明らかにすると共に、アミロイド線維形成の分子機構の理解を進展させた重要な論文である。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。