

Title	Direct observation of β 2-microglobulin amyloid fibrils
Author(s)	小澤, 大作
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49720
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	小 澤 大 作		
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)		
学位記番号	第 2 2 6 8 7 号		
学位授与年月日	平成 21 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	Direct observation of β_2 -microglobulin amyloid fibrils (β_2 ミクログロブリンアミロイド線維の直接観察)		
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 長谷 俊治 教授 吉川 和明 准教授 高橋 聡		

論文内容の要旨

研究の背景

蛋白質はアミノ酸配列に従い特有の立体構造（天然構造）に折りたたまれてその機能を発揮する。しかし、天然構造は唯一の安定構造ではなく、アミロイド線維というもう一つの規則的な安定構造をとる蛋白質の存在が明らかになってきた。アミロイド線維は、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り、さまざまな疾患に関与していることが知られている。透析アミロイドーシスは長期血液透析患者に高頻度で発症する合併症であり、 β_2 ミクログロブリン (β_2 -m) からなるアミロイド線維の沈着が原因となって発症する。治療法を確立する上でも、生理的条件下で形成される β_2 -m アミロイド線維の特性を理解することは重要である。

本研究では、生体内で形成される β_2 -m アミロイド線維の特性についてのさらなる知見を得るために、全反射蛍光顕微鏡とアミロイド線維特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T (ThT) を使い、中性 pH 条件下で形成される β_2 -m および β_2 -m を限定分解することで得られる 22 残基のペプチドフラグメント(K3)のアミロイド線維の直接観察を行った。

結果と考察

全反射蛍光顕微鏡と ThT を用いることで、他の手法では測定することが困難な一線維レベルでのアミロイド線維の形態や伸長速度、伸長方向等の情報をリアルタイムで得ることができる。そのため、アミロイド線維の特性や伸長機構の解明に有効な手法だと考えられる。はじめに、中性 pH、サンプルチューブ内で伸長させた β_2 -m および K3 線維の顕微鏡観察を行ったところ、ThT に由来する線維

の蛍光像が得られた。次に、スライドガラス上であらかじめ伸長させた β_2 -m および K3 線維の観察を行うと、放射状に伸長した線維の蛍光像が観察された。ところが、線維のリアルタイム伸長観察を行ったところ、 β_2 -m 線維はほとんど伸長せずに伸長が停止した。さらに K3 線維では観察の過程で線維が徐々に消失していくという現象が見られた。これは K3 線維の分解ではないかと考えられた。そこで、レーザー光の照射による K3 線維の消失の詳細について調べた。蛍光測定用のセル内で K3 線維へのレーザー光照射を行い、照射後の K3 線維の分析を行なった。超遠心分析、質量分析の結果から、レーザー光照射により K3 線維が分解されていることが明らかになった。この K3 線維の分解機構はガン治療に用いられる光線力学療法の反応機構に類似していると考えられた。光線力学療法は光増感剤を介した活性酸素の発生によりガン細胞を攻撃するという手法である。そのため、活性酸素の一つである一重項酸素の関与を調べたところ、レーザー光照射により ThT を介して一重項酸素が発生していることが明らかになった。

以上より、体内投与が可能な ThT のような光増感剤を開発し、アミロイド線維を特異的に分解することができれば、この方法はアミロイド病治療への新たな戦略となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

アミロイド線維は、天然構造とは異なる構造を持った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り、さまざまな疾患に関与する。透析アミロイドーシスは長期血液透析患者に高頻度で発症する合併症であり、 β_2 ミクログロブリンがアミロイド線維を形成して沈着することが原因となって発症する。本研究では、 β_2 ミクログロブリンが形成するアミロイド線維の特性を明らかにするために、全反射蛍光顕微鏡とアミロイド線維特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T を用いて、中性 pH 条件下で形成される β_2 ミクログロブリンおよびその断片である K3 ペプチドのアミロイド線維の直接観察を行った。

アミロイド線維のリアルタイム伸長観察を行ったところ、 β_2 ミクログロブリン線維はほとんど伸長せずに伸長が停止した。さらに K3 線維では伸長が停止した後、観察の過程で線維が徐々に消失した。そこで、レーザー光の照射による K3 線維の消失現象について詳細に調べた。その結果、レーザー光照射によりチオフラビン T を介して一重項酸素が発生し、これによって K3 線維が分解されていることが明らかになった。そして、チオフラビン T のような特性をもち、体内投与が可能な光増感剤を開発することにより、アミロイド線維を特異的に分解することができれば、アミロイド病治療への新たな戦略となることを示唆した。

本論文は、レーザー光の照射によるアミロイド線維の破壊を観察し、その分子機構を調べた初めての論文であり、さらにはアミロイド病治療の新たな可能性も示唆した。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。