OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Study on the Thermodynamics of Protein Aggregation
Author(s)	池之上, 達哉
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56067
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（池之上　達哉）	
論文題名	Study on the Thermodynamics of Protein Aggregation （蛋白質凝集の熱力学に関する研究）

論文内容の要旨

蛋白質は天然構造の形成とは異なる折り畳み（ミスフォールディング）によってアミロイド線維という線維状の異常凝集体を形成する。アミロイド線維はアルツハイマー病や、パーキンソン病など、アミロイド病と総称される30種類以上の疾患の原因となり、アミロイド病を分子レベルで理解するためにも線維形成の特性やメカニズムを解明することは重要な課題となっている。アミロイド線維の構造的特徴は次第に明らかになりつつあるが、線維形成の熱力学的な理解は乏しい。本論文ではアミロイド線維の温度変性実験や熱量測定実験により熱力学的安定性についての理解を新たに得ることを目的とし、アミロイド線維形成の熱力学の確立を目指した。

初めに温度変化に伴うアミロイド線維の変性（蛋白質モノマーに解離すること）を用いることで熱力学的な安定性を評価した。円偏光二色性測定や原子間力顕微鏡などを用いて、アミロイド線維の構造が0 - 110℃の範囲での温度変化でどのように変化するかを網羅的に調べた。蛋白質としてパーキンソン病の原因となるαシヌクレイン（αSN）を初めとする6種類のアミロイド原性蛋白質を使用した。その結果、すべてのアミロイド線維は60 ℃以上で蛋白質モノマーへと不可逆的に解離（高温変性）した。このことから、高温における熱変性は蛋白質の種類によらず、アミロイド線維に一般的な特性であることがわかった。一方、20 ℃以下の低温では興味深いことにαSNアミロイド線維のみが低温変性し、モノマーに可逆的に解離することがわかった。αSN線維の低温変性を支配する要因を特定するために変異体蛋白質との比較や等温滴定型熱量計（ITC）による反応の熱量測定を行った。その結果、αSN線維の低温変性を支配する要因が線維構造に埋もれる荷電残基にあることを明らかにした。以上の網羅的実験から球状蛋白質とは異なるアミロイド線維の低温変性メカニズムを解明した。

次に熱量測定実験により熱力学的安定性についての理解を新たに得ることを目的とした。そのために、ITCによる熱量測定を用いた蛋白質凝集の定性的・定量的な解析方法を確立した。また、この手法を用いて巨視的な分子形態が異なる凝集での熱力学的な違いを理解し、蛋白質フォールディングとアミロイド線維形成と不定形凝集をそれぞれ定量的に区別することを目的とした。ITCにより、透析アミロイドーシスの原因であるβ2ミクログロブリンの線維形成に付随する反応熱の正確な測定に成功した。線維の自発形成はラグタイムのあと、発熱を伴った。様々な蛋白質濃度、あるいは様々な温度における線維形成の熱力学的パラメータが得られ、エンタルピー変化（ΔH）から蛋白質相互作用の強さ、熱容量変化（ΔC_p）から溶媒露出表面積、エントロピー変化（ΔS）から相互作用の自由度、自由エネルギー変化（ΔG）から安定性を厳密に評価し、比較した。その結果は天然状態よりも全体として側鎖の相互作用が少ない、主鎖の影響が優位な線維構造（クロスβ構造）モデルと一致した。また、不定形凝集の熱力学的パラメータについても決定し、フォールディング、アミロイド線維形成、不定形凝集の比較を可能にした。不定形凝集とアミロイド線維は、天然状態と比べると非常に安定であり、2つの凝集の構造形成はエンタルピー的に不利であるがエントロピー的に有利な反応であることが定量的に示された。これらの結果から、ITCは蛋白質のフォールディングとミスフォールディングの熱力学を包括的に明らかにする有望な手法であることが示された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（池之上　達哉）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	後藤　祐児
	副 査　教授	青島　貞人
	副 査　教授	山口　浩靖
	副 査　講師	李　映昊

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患にはアミロイド線維が関与する。その構造的特徴が明らかになりつつある一方で線維形成の熱力学的な理解は乏しかった。本論文では温度変性実験や熱量測定実験を行い、アミロイド線維の熱力学的安定性を研究した。

アミロイド線維の温度変性を用いた研究では温度に対する安定性を網羅的に調べ、アミロイド線維の熱安定性の全体像を描くことに初めて成功した。その中でパーキンソン病に関わる α シヌクレインのアミロイド線維は 20 ℃以下で低温変性し、モノマーに可逆的に解離することを発見した。この結果は生体内での線維の分解・除去という点でも非常に意義深い。次に熱量測定を用いた研究を行い、等温滴定型熱量計が蛋白質のフォールディングとミスフォールディングの熱力学を包括的に明らかにする有望な手法であることを示した。これはアミロイド線維形成の熱力学を確立する第一歩であり、既存の方法で明らかにできなかった生命現象の基礎の解明につながる重要な成果である。

以上、本論文はアミロイド線維を中心とする蛋白質異常凝集の理解の新たな地平を切り開く先駆的なものであり、関連分野の進展に大きく貢献する優れた成果である。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。