

Title	Study on the mechanism of amyloid fibril formation with $\beta$ 2-microglobulin and Islet amyloid polypeptide
Author(s)	柳, 浩太郎
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59430">https://hdl.handle.net/11094/59430</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	柳 浩太郎
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 25209 号
学位授与年月日	平成24年3月22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 mechanism of amyloid fibril formation with $\beta$ 2-microglobulin and I $\beta$ let amyloid polypeptide ( $\beta$ 2 ミクログロブリンと膝島アミロイドポリペプチドを用いたアミロイド線維形成機構の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 高木 淳一 教授 藤原 敏道 准教授 池上 貴久

## 論文内容の要旨

## 【研究の背景】

タンパク質は天然構造と異なる構造を持ち規則的に重合したアミロイド線維を形成することが知られている。アミロイド線維が原因となる疾患はアミロイドーシスと総称され、アルツハイマー病など 20 種類以上が確認されている。それらは根本的な治療法が確立しておらず、アミロイドーシスの予防法や治療法の確立のためにはアミロイド線維形成機構の解明が必須である。

先行研究から、生体膜が線維形成を促進することや、モノマータンパク質が線維末端に相互作用し、伸長することが示されている。しかし現在、これらの詳細な機構は分かっていない。そこで本研究では、線維形成機構の物理化学的理解を目指し、以下の実験を行った。

## 【結果と考察】

## (1) アルコールを用いた膝島アミロイドポリペプチドの線維形成

本研究は膝島アミロイドポリペプチド(IAPP)をモデルとして用いた。IAPP は疎水性の高いペプチドホルモンで、II 型糖尿病を進行させる一因と考えられている。本研究では、低濃度でクラスターを形成するヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP)を用い、HFIP のクラスター形成が IAPP のアミロイド線維形成に与える影響について研究した。

アミロイド線維形成量の HFIP 濃度依存性を測定すると、HFIP がクラスターを形成する濃度で最大値が観測さ

れた。つまり、HFIP のクラスター形成が線維形成に必須であることが分かった。また、中性の HFIP 非存在下ではアミロイド線維のほか不定形の凝集物を形成した。中性条件では酸性条件に比べ、IAPP の表面電荷が弱まり、静電反発も弱まるため、不定形な凝集物を形成したと考えられる。つまり、不定形な凝集物の形成を、静電反発が阻害することも規則的なアミロイド線維形成の重要な要素であると考えられる。

(2)  $\beta$  2 ミクログロブリンの線維伸長機構の解明

2 つ目の実験として、 $\beta$  2 ミクログロブリン( $\beta$ 2m)の線維形成過程を調べた。先行研究から、酸変性  $\beta$ 2m は残存構造を持つこと、また、線維形成過程の中で、モノマーが線維と相互作用し、過渡的な中間体を形成することも示されている。本研究では酸変性  $\beta$ 2m の構造状態および、中間体モノマーの線維との相互作用領域の同定を目的とした。

まずは、酸変性  $\beta$ 2m の構造状態を調べるため、尿素滴定実験と溶液 NMR の緩和分散法を行った。尿素滴定、緩和分散実験の結果、酸変性  $\beta$ 2m は部分変性状態と完全変性状態の 2 状態間の平衡にあり、約 65%のモノマーが部分変性状態で存在していることが分かった。また、尿素非存在下での緩和分散実験により、40 番・70 番残基付近で構造変化していることが分かった。

続いて、中間体  $\beta$ 2m の線維との相互作用領域の同定のため、酸変性  $\beta$ 2m をアミロイド線維共存下で、交差飽和転移実験(TCS 法)を行った。その結果、40 番・70 番残基付近で線維と相互作用していることが判明した。この領域は緩和分散実験で観測された、構造変化をしている残基と一致し、構造変化している残基が線維と相互作用していることを示した。先行研究の結果と本研究の結果とあわせて考えると、溶液中に存在する分子種のうち、最も疎水表面を露出している完全変性したモノマーが優先的に線維と相互作用していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

タンパク質が規則的に重合したアミロイド線維が原因となる疾患はアミロイドーシスと総称され、アルツハイマー病や II 型糖尿病をはじめ、さまざまなものがある。アミロイドーシスの予防や治療法の確立のためには、アミロイド線維形成機構の解明は必須である。本研究では、II 型糖尿病に関わる膝島アミロイドポリペプチド(IAPP)と、透析アミロイドーシスに関わる  $\beta$  2 ミクログロブリン( $\beta$ 2m)を用いて、アミロイド線維形成機構を研究した。

IAPP の研究では、生体膜のモデルとしてヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP)のクラスター形成が IAPP のアミロイド線維形成に与える影響を解析した。その結果、HFIP のクラスター表面にペプチドが集合し、ペプチドの局所濃度が上がることによって線維形成が促進されることを示した。また、不定形な凝集物形成の阻害も規則的な線維形成に重要であることを示した。次に溶液 NMR のさまざまな手法によって  $\beta$ 2m の線維形成反応を解析した。緩和分散法によって、酸変性  $\beta$ 2m には、部分変性状態と完全変性状態の 2 状態間の平衡が存在することを示した。重水素交換実験と交差飽和転移実験を基に、完全変性状態が優先的に線維と相互作用していることを示した。

本論文では、2 種類のアミロイド線維形成タンパク質の線維形成反応を調べ、相互作用に重要な相互作用や、相互作用を担う構造状態を明らかにした。本論文はアミロイド線維形成機構の解明に大きく貢献するものであり、よって、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認められる。