The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study of the effects of ultrasonication on amyloid fibrils
Author(s)	吉村, 優一
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59454
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【58】

氏　　名	吉　村　優　一（よし むら ゆう いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（理学）
学 位 記 番 号	第　２５２２０　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 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Study of the effects of ultrasonication on amyloid fibrils （超音波がアミロイド線維へ与える効果に関する研究）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　後藤　祐児 （副査） 教　授　鬼塚　清孝　　教　授　栗栖　源嗣

論 文 内 容 の 要 旨

【概要】

蛋白質の凝集構造のひとつであるアミロイド線維は、アルツハイマー病や II 型糖尿病などの重篤な疾病に関与している。アミロイド線維は、核形成および伸長の二段階で形成されるが、核形成のエネルギー障壁が高いため、自発的なアミロイド線維形成は起こりにくく、その形成反応には長いラグタイムが存在する。一方、試料を撹拌することで、核形成のエネルギー障壁が低下し、線維形成のラグタイムは短縮される。超音波は非常に有効な撹拌手法であり、同時に、超音波はアミロイド線維を断片化する効果も併せ持つ (図 1A)。一般的に、アミロイド線維は巨大で不均一なサイズ分布をもつことから、従来の蛋白質研究に使われる多くの解析手法の適用が困難であるが、超音波を与えることで微細かつ均質なサイズのアミロイド線維の調製が可能である (図 1A)。本研究では、(1) 超遠心分析を用いて、超音波処理したアミロイド線維の分子サイズを推定し、(2) 得られた微細なサイズのアミロイド線維を核磁気共鳴法 (NMR) を用いて直接観察した。さらに、(3) アミロイド線維と不定形凝集物のそれぞれにおいて、その形成過程で核形成相のエネルギー障壁の有無を調べるために、超音波を利用した。試料は、透析アミロイド病の原因蛋白質である β_2-ミクログロブリン (β2m) を用いた。

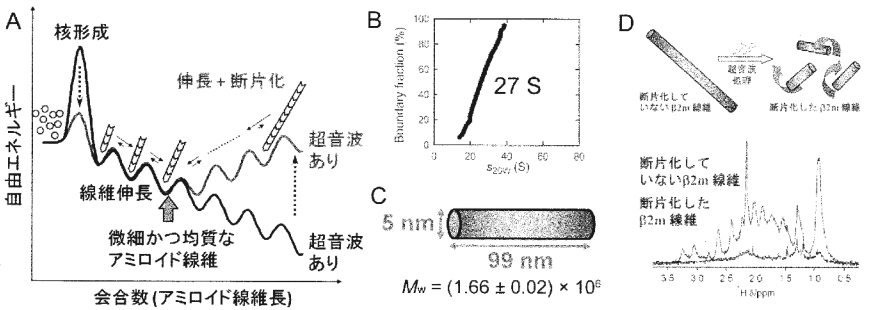

図 1. 超音波処理条件下で作製したアミロイド線維の解析例。(A) 超音波による線維形成誘導および断片化の概念図。(B) 超音波誘導β2m 線維の沈降平衡解析。(C) 棒状モデルを仮定したときの超音波誘導β2m 線維のサイズ。(D) 超音波で断片化したβ2m 線維の ^{1}H NMR スペクトル。

【1. 超遠心分析による分子サイズの推定】

超遠心分析法は大きく分けて、沈降速度法と沈降平衡法の二通りの測定方法がある。沈降速度法では、沈降係数や拡散係数が求められる。一方、沈降平衡法では、分子の形状に依らず、その分子量を求めることができる。また、本実験では超音波発生装置として ELESTEIN (Elekon, Tokyo) を用いた。1 分間の超音波パルス (20 kHz, 350 W) および 2 分間の静置を交互に繰り返すことにより、微細な β2m 線維を作製した。得られた試料の沈降速度解析より、その沈降係数は約 27 S で、比較的狭い沈降係数の分布を持つことがわかった (図 1B)。さらに、沈降平衡解析より、その平均分子量は $(1.66 \pm 0.02) \times 10^6$ であることが明らかとなった。アミロイド線維の形状が棒状であると仮定し、その大きさを 5.0 nm × 99 nm と見積もった (図 1C)。

【2. 核磁気共鳴 (NMR) における信号広幅化の解消】

構造生物学の分野において、溶液 NMR は蛋白質の構造やダイナミクスを調べるための手法として用いられる。しかし、分子サイズの大きな試料では、NMR 信号の緩和が速いため、スペクトルの感度および分解能が悪く、解析が困難である。本研究では、断片化していない β2m 線維および断片化した β2m 線維の 1 次元 ^{1}H NMR スペクトルをそれぞれ測定した。断片化していない β2m 線維では広幅化して検出されない NMR 信号を、断片化することにより先鋭化することができた (図 1D)。次に、^{15}N 同位体標識したβ2m (^{15}N-β2m) を用いて、^{1}H-^{15}N 相関スペクトルを測定し、断片化した線維の運動性をアミノ酸残基レベルで調べた。N 末端の主鎖信号 (Ile1, Gln2, Arg3, Thr4, Lys6) が検出されたことから、β2m 分子の N 末端は溶液中で構造をとっておらず他の領域と比べて運動性が高いことがわかった。

【3. アミロイド線維と不定形凝集物の区別】

アミロイド線維は、結晶の形成と同様に、核依存性伸長モデルで説明される。しかし、実際の *in vitro* でのアミロイド線維形成実験では、アミロイド線維とは異なる不定形凝集物がしばしば混在する。本研究では、不定形凝集物がアミロイド線維と同様の経時変化で形成されるかどうかを観察した。酸性条件下で、β2m は塩濃度に依存してアミロイド線維 (≤ 500 mM NaCl) および不定形凝集物 (> 500 mM NaCl) を形成する。低塩濃度でのβ2m 線維形成のラグタイムは、超音波照射により短縮された。また、シードを添加すると、ラグタイムは消失し、シード依存的な伸長反応が観察された。以上のことから、アミロイド線維形成には核形成における高いエネルギー障壁が存在し、低過飽和の準安定状態の溶液中で形成されることが示唆される。一方、高塩濃度でのβ2m 不定形凝集物形成において、ラグタイムは観察されなかった。また、超音波照射やシード添加によるキネティクスの変化も見られなかった。以上のことから、不定形凝集物の形成において、高いエネルギー障壁は存在せず、溶液は高過飽和であることが明らかとなった。本実験結果より、アミロイド線維形成および不定形凝集物形成において、結晶形成における溶解度曲線 (相図) が適用可能であると示唆される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

蛋白質の凝集体のひとつであるアミロイド線維は、アルツハイマー病や透析アミロイドーシスをはじめとする重篤な疾病に関与している。その構造や物性を研究することは重要であるが、巨大でサイズの不均一であることから、従来の蛋白質研究に使われる多くの研究手法の適用が困難であった。本研究では、超音波がアミロイド線維に与える「線維の断片化」と「線維形成の促進」という相反する効果を利用して、アミロイド線維の構造と物性を研究した。試料は透析アミロイ

ド病の原因蛋白質であるβ_2ミクログロブリンを用いた。

アミロイド線維の溶液 NMR スペクトルを測定することは一般に困難である。アミロイド線維を超音波によって断片化することにより、N末端領域の NMR スペクトルが測定可能となることを示した。アミロイド線維においてN末端付近は特定の構造をとっておらず、運動性の高いことが明らかになった。

アミロイド線維の形成は、核依存性伸長モデルで説明される。しかし、実際のアミロイド形成実験においては、不定形の凝集物が混在する。超音波やシーディングによる形成の促進効果を指標として、アミロイド線維と不定形凝集物の形成を区別した。不定形凝集の形成においては、高いエネルギー障壁が存在しないことを明らかにした。

本論文は、超音波の効果を利用して、アミロイド線維の構造物性と形成機構を調べ、アミロイド研究の新たの方法論を開発すると共に、アミロイド線維と不定形凝集を区別する新たな概念を提案した。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。