The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study on interprotein interactions for electron transfer complexation and amyloid fibrillation
Author(s)	木下, 岬
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69369
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　木下　岬　）	
論文題名	Study on interprotein interactions for electron transfer complexation and amyloid fibrillation (電子伝達複合体およびアミロイド線維形成における蛋白質間相互作用の研究)

論文内容の要旨

蛋白質は極めて重要な生体分子の一つであり、高度に調節された分子間相互作用を形成することで特有の機能性を発揮し、様々な生命機能を示す。また、立体構造を失った蛋白質間では異常な分子間相互作用が発生し、様々な疾患の原因となるアミロイド線維等の凝集が誘発される。このように蛋白質の分子間相互作用は、生物学・病理学的に重要な研究課題であるが、その原理や調節に関する詳細な理解は得られていない。本研究は機能的な電子伝達複合体形成と、病原的な蛋白質間相互作用であるアミロイド線維形成に着目し、蛋白質間相互作用の新しい知見を得ることを目的とした。

電子伝達複合体の研究では、ferredoxin(Fd)と酵素間の電子伝達複合体形成に関わる蛋白質間相互作用を調査した。Fdは光化学系Iより受容した電子を多数の酵素に分配し、その際に複合体を形成することで効率的な電子伝達を行う。先行研究よりFdと酵素間で形成される静電相互作用が複合体形成の駆動力であると考えられていた。[1] しかし近年、非静電相互作用も複合体形成に重要な役割を担う可能性が見出された。[2] 本研究では、非静電相互作用に関与するFd部位に着目し、パートナー酵素の一つであるFd-$NADP^+$還元酵素(FNR)との電子伝達複合体形成における非静電相互作用の重要性を調べた。注目したFdの非静電領域に対して網羅的な変異導入とそれらを用いた活性測定を行ったところ、活性が大きく低下するS43Dと増加するS43Wの二つの変異体を取得した。この2種類の変異体Fdと野生型Fdを用いたMichaelis-Menten解析の結果、変異によるFNR活性の増減は蛋白質間の親和性を示すK_mで調節されていた。そこで等温滴定型熱測定(ITC)を用い、FdとFNR間の解離定数(K_d)を求めたところ、K_dもK_mと同様の変化を示し、FdとFNR間の非静電相互作用が親和性に影響することが示された。また核磁気共鳴分光法を用いた測定より、親和性の変化が結合様式の変化に起因することが示された。以上の結果より、静電的-非静電的、両方の相互作用が複合体形成に重要であり、親和性の調節を介して活性を制御することを示した。

[3] 次にFdとFNR間相互作用の環境変化に対する調節機構を調べた。葉緑体内の環境は、植物のおかれる環境に依存して変化する。この環境変化がFNR活性に顕著な変化を与えることが報告された一方で、[4] 活性に必要なFd:FNR複合体形成に着目した環境変化への応答性の研究は少なく、詳細な理解が欠如している。そこで当研究ではFdとFNRを用い、葉緑体内で変化するpH、塩濃度、温度に対応した蛋白質間相互作用の変化を、ITCを用いて熱力学的に調査した。pH及び塩濃度の上昇は、エンタルピー変化(ΔH)を有利にし、エントロピー変化(ΔS)を不利にすることで、親和性を低下させた。また同時に、複合体界面の面積と相関する熱容量変化(ΔC_p)への影響が観測された。一方、温度変化は親和力と熱力学的パラメータに大きな影響を与えなかった。pHの上昇や塩濃度の増加に伴う有利なΔHの変化は、静電相互作用の改良と充填密度(パッキング)の改善を示唆し、このため結合様式が変化しΔC_p値が変化すると解釈された。しかし、非静電相互作用には不利な影響を与え、ΔSが不利になり、正味の親和性が低下すると考えた。また、親和性が増加する条件では高いΔHを示すため、結合反応の活性化エネルギーが高くなり、FNR活性に不利に働くと考えられる。結論として、FdとFNRの相互作用は、環境変化に対する調節機構による静電相互作用と非静電相互作用の微調整を行い、FNR活性に適した複合体の形成を促すことが示唆された。[5]

アミロイド線維は構造が崩れた不安定な蛋白質間で発生する誤った蛋白質間の相互作用によって形成される。現在まで線維の構造や形成機構の多くの研究が報告されたが、熱力学や速度論的観点からの機構の解明、また線維多型の形成原理に関する理解は不十分である。当研究室の先行研究では、ITCを用いた線維形成の熱量測定を提案し、アミロイド線維形成の機構を熱力学的に説明した。[6] 本研究では解析手法をさらに改良することで、線維の核形成反応と伸長反応の速度論的な解析方法を導入し、透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ2-microglobulin（β2m）アミロイド線維形成の反応環境への応答機構を、熱力学的かつ速度論的に調査した。反応環境として線維形成時の攪拌速度と分子クラウディング効果に着目した。全ての条件で、β2m線維形成は発熱反応を示し、ΔHで駆動される反応であった。しかし、速い攪拌速度や、高いクラウディング状態ではより大きな発熱が観測され、アミ

ロイド線維内のパッキングが高いことが見出された。また、攪拌速度は核形成速度を上昇させ、伸長速度には影響を与えず、クラウディン効果は、核形成速度を上昇させたが、伸長速度を減少させた。異なるΔHはβ2mが反応環境依存的に構造の異なる線維を形成したことを示唆する。この線維の構造多型は、速度論的に制御された核形成反応で調節され、環境依存的に異なる線維核が形成されたためだと考えられる。このようにITCを用いた線維形成解析により、線維形成機構を熱力学・速度論の視点から調査でき、また熱量という指標から線維の構造情報とともに線維多型の理解ができた。

蛋白質間相互作用は正常・異常に関わらず、非常に厳密な調節を受けているといえる。この調節は、蛋白質構造のように進化の過程で何度も繰り返されてきた改善によって生物が取得したと考えられる。また、アミロイド線維形成は多型形成によって、環境変化に対する柔軟性をもつことが示唆される。

[参考文献]

[1] Kurisu et al., *Nat. Struct. Biol.* (2001) [2] Kim et al., *Biochem. J.* (2016) [3] Kinoshtia et al., *Biochim. Biophys. Acta* (2015) [4] Diakonova et al., *Physical Biology* (2016) [5] Kinoshita et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) [6] Ikenoue and Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014)

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　木　下　岬　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	後 藤 祐 児
	副 査	教授	栗 栖 源 嗣
	副 査	教授	高 木 淳 一
	副 査	講師	李 映 昊

論文審査の結果の要旨

蛋白質は高度に調節された分子間相互作用によって特有の機能を発揮し、様々な生命機構を担う。他方、構造を失った蛋白質間の異常な分子間相互作用によって、様々な疾患の原因となるアミロイド線維などの凝集が誘発される。しかしながら分子間相互作用の原理や調節に関する詳細な理解は得られていない。本論文では、機能的な電子伝達複合体形成と、病気に関わるアミロイド線維に着目して、蛋白質の分子間相互作用の新たな知見を得ることを目的とした研究を行った。

まず、フェレドキシンとフェレドキシン $NADP^+$還元酵素(FNR)との電子伝達複合体形成を、いくつかのフェレドキシン変異体を作製して、酵素活性、等温滴定熱測定、核磁気共鳴分光法などにより調べた。その結果、静電的相互作用と非静電的相互作用の両方の相互作用が複合体形成に重要であり、親和性の調節を介して活性を制御していることを示した。

次に葉緑体内の環境変化のモデルとして、pH、塩濃度、温度を変化させて、フェレドキシンと FNR の相互作用を、等温滴定熱測定を用いて詳細に調べた。その結果、環境変化によって静電的相互作用と非静電的相互作用の微調整が起こり、FNR 活性に適した複合体が起きていることを、相互作用のエンタルピー変化、エントロピー変化、熱容量変化などの熱力学的パラメータによって示した。

誤った相互作用の例として、透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ２ミクログロブリンのアミロイド線維形成反応を、等温滴定熱量計を用いて調べた。アミロイド線維形成の熱力学的パラメータとともに、速度論的パラメータを解析することにより、アミロイド線維に多型が存在することを示した。

以上、本論文は蛋白質の正常および異常分子間相互作用を構造と物性の両面から研究したものであり、静電的相互作用と非静電的相互作用の両方の重要性、環境変化に対する柔軟性、多様性を提唱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。