



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Establishing a Novel Mechanism of Amyloid Fibrillation in Promiscuous Systems                                                                         |
| Author(s)    | 牟田, 寛弥                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2018, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/69376">https://hdl.handle.net/11094/69376</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 牟田 寛弥 )

## 論文題名

Establishing a Novel Mechanism of Amyloid Fibrillation in Promiscuous Systems

(複雑な系におけるアミロイド線維形成の新規メカニズムの確立)

## 論文内容の要旨

## &lt;背景&gt;

アミロイド線維（以下、単に線維と表記）は、アルツハイマー病などの難病に関連する。線維は、遅い核形成と速い成長反応を経て形成される。線維形成反応は、結晶に類似した構造（クロスβ構造）への相転移と解釈できる。この相転移は、超音波照射により効果的に促進できる (1)。しかし、詳細な線維の形成機構は、未解明である。

本論文では、「アルコール存在下でのインスリン線維形成の観察 (研究テーマ①)」と、「β<sub>2</sub>-ミクログロブリン (β<sub>2</sub>m) とその断片 K3 の混在する系での線維形成 (研究テーマ②)」を報告する。

## &lt;研究テーマ①&gt;

NaCl 0.1 M 在下で pH が 2.0 と 4.8 の各条件において、インスリン溶液 (1.5 mg/mL) に対し、超音波照射によるアミロイド形成の誘発を観察した。アルコール溶剤として、2,2,2-トリフルオロエタノールまたは、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールの2種類を用いた。円偏光二色性スペクトル、およびフーリエ変換赤外吸収スペクトルを用いて、二次構造を解析した。

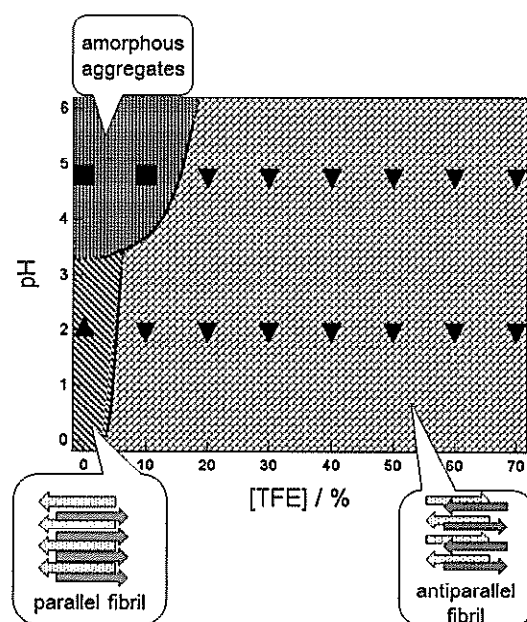
結果、凝集物中の主な構造は、平行βシート線維 (parallel fibril) と、反平行βシート線維 (antiparallel fibril) と、多型が存在する (図 A)。溶液 pH とアルコール濃度に依存したインスリンの凝集物中の主要な構造を表した相図 (図 A) を描くことにより、過飽和による準安定状態の強固さが凝集形成を支配していると分かった。

## &lt;研究テーマ②&gt;

透析アミロイドーシスに関連する蛋白質であるβ<sub>2</sub>mについて、蛋白質間相互作用が線維形成に与える影響を考えるうえで特徴的な現象が観察できた。β<sub>2</sub>m全長分子と、そのアミロイド原生の高い配列をAchromobacterプロテアーゼIIにより切り出した断片K3が混在すると、pH 2.0、NaCl 0.1 Mの条件でK3の線維形成能が弱まる。これには、β<sub>2</sub>mとK3の間に働く弱い相互作用が関与している。弱い相互作用を観察するため、K3を常磁性ラベルし、常磁性の影響を受けた箇所、β<sub>2</sub>mのNMR信号が減衰する現象（常磁性緩和）を用いた。常磁性緩和による減衰をβ<sub>2</sub>mの溶液構造 (3) にマッピングしたところ、弱い相互作用とβ<sub>2</sub>mの酸性での残存構造との関連性が示唆される結果になった。β<sub>2</sub>mは酸性でも構造をある程度とり、K3と相互作用する。K3はβ<sub>2</sub>mと相互作用することで、線維以外の構造にトラップされ、線維形成が阻害される。弱い相互作用により、蛋白質の凝集性が制御されるというメカニズムが分かった。

## &lt;総括&gt;

これらの結果から、線維形成は蛋白質のコンフォメーションに関わらず、溶液の相転移と解釈できること。そして、生体内などの複雑な系においては、弱い相互作用が凝集性の制御に関わっているということが分かった。



【図 A】超音波照射後の凝集物の多型を表した相図

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 牟 田 寛 弥 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |     |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | (職) | 氏 名 |         |
| 論文審査担当者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 主 査 | 教授  | 後 藤 祐 児 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 副 査 | 教授  | 今 田 勝 巳 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 副 査 | 教授  | 中 川 敦 史 |
| 論文審査の結果の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |     |         |
| <p>アミロイド線維は、アルツハイマー病をはじめとする様々な難病に伴って蓄積することから、その生成機構に関する研究が盛んに行われてきた。その結果、アミロイド線維は、原因蛋白質が、相転移現象によって析出することによって形成すると考えられているが、その詳細については、未解明な部分が多い。本論文では、アミロイド線維の形成機構を相転移現象として理解することを目標として、アルコール中でのインスリンのアミロイド線維形成反応と、<math>\beta 2</math>ミクログロブリンとその断片が混在する系でのアミロイド線維形成反応を研究した。</p> <p>インスリンは酸性 pH、トリフルオロエタノール、あるいはヘキサフルオロイソプロパノールの存在下で、アルコール濃度に依存して、アミロイド線維を形成した。それらの構造を円二色性スペクトル、原子間力顕微鏡などを用いて調べ、アルコール濃度と蛋白質濃度に対する様々な構造状態の相図を作成した。そして、過飽和による準安定状態の強固さがアミロイド線維形成を支配していることを明らかにした。次に、<math>\beta 2</math>ミクログロブリンとその断片ペプチド K3 のアミロイド線維形成を、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、常磁性ラベルの影響によって NMR 信号が減衰する現象 (常磁性緩和) を用いて調べた。その結果、断片ペプチド K3 の強いアミロイド性は、異種の蛋白質との弱い相互作用によって、抑制されることを明らかにした。以上より、アミロイド線維形成は、溶質の過飽和溶液からの析出の相転移現象であるが、混在する他の溶質との弱い相互作用に強く影響される現象であり、生体内などの複雑な系においてはこれらを考慮することが重要であることを示した</p> <p>本論文は蛋白質凝集の分子機構を、生物物理的、蛋白質科学的に追求したものであり、蛋白質の構造物性の理解を深めると共に、疾患に関連する研究分野の進展にも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。</p> |     |     |         |