OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Comprehensive understanding of protein folding and misfolding
Author(s)	野地, 真広
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76403
rights	© 2019 Noji et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC-BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
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　（野地　真広　　）	
論文題名	Comprehensive understanding of protein folding and misfolding （蛋白質フォールディングとミスフォールディングの包括的理解）

論文内容の要旨

変性した蛋白質は固有の高次構造を失った状態にあり、1950年代にAnfinsenが示したように可逆的にリフォールドして天然構造を取り戻すことができる。言い換えれば、蛋白質は熱力学的に最安定な天然構造へと自発的に折り畳まれるということであり、この「Anfinsenのドグマ」は蛋白質科学の根幹をなす基本原理の一つとして広く知られている。一方でAnfinsenのドグマに反して変性蛋白質が天然構造とは全く異なる高次構造へと折り畳まれ、凝集物を形成するミスフォールディング現象も存在する。蛋白質のミスフォールディングは様々な疾患との密接な関連が報告されており、特にアミロイド線維の形成はアルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとした神経変性疾患との関連から盛んに研究が行われている。しかしながらその形成メカニズムは完全には解明されておらず、特にフォールディングとミスフォールディングとを分け隔てる要因については未だ理解されていない。

本研究では透析アミロイドーシス関連蛋白質のβ2mをはじめ、17種類の蛋白質・ペプチドについて加熱を用いたアミロイド線維形成実験を行った。それぞれの線維形成挙動の観察により、フォールディングの世界とミスフォールディングの世界とを分け隔てる要因を明らかにすることを目指した。主に用いた手法はアミロイド線維形成過程の追跡に最も広く用いられている「ThTアッセイ」であり、蛍光分光光度計による測定で蛍光強度の増大によってアミロイド線維形成を確認することができる。なおサンプルの温度コントロールのために、使用した蛍光分光光度計のセルホルダーにはペルチェ素子を取り付けた。その他、CDスペクトル測定による二次構造確認やTEMを用いた凝集形態観察も行った。

中性条件下でのβ2mの加熱では、攪拌の有無によって不可逆なアミロイド線維形成と可逆的な変性過程とがそれぞれ観察された。温度と塩濃度を様々に変えて実験を行うとともに、コンピュータ上での計算も行うことで相図を用いた現象の理解を試みた結果、アミロイド線維形成が起こること自体がβ2mの天然状態を不安定化させていることが明らかとなった。同様の現象が他の蛋白質でも見られるかどうか検証したところ、β2mと同程度の大きさの球状蛋白質では攪拌の有無による結果の違いが明確だったのに対し、より小さなペプチドでは攪拌に依存しないアミロイド線維形成が見られ、巨大な天然変性蛋白質では攪拌に依存しないアモルファス性の凝集が観察された。一連の実験の中で、アミロイドーシス患者の体内からはアミロイド線維が検出される一方、これまでin vitroでの全長のアミロイド線維形成が不可能とされてきた野生型TTRが酸性での加熱と攪拌によって顕著にアミロイド線維を形成することも見出した。

以上の結果より、過飽和の維持が変性蛋白質の可逆的なリフォールドを支配し、過飽和の解消が不可逆なミスフォールディングをもたらすことが示唆された。また、過飽和の安定性（エネルギー障壁）の度合いによってミスフォールディング反応が攪拌に依存的か否か決まると考え、凝集挙動の違いが相図上でのトランジションの違いとして容易に理解可能であることを明らかにした。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（野　地　真　広）	
論文審査担当者	（職）　氏　名 主査　教授　後藤祐児 副査　教授　橋爪章仁 副査　教授　栗栖源嗣

論文審査の結果の要旨

蛋白質の機能的な立体構造は、アミノ酸一次構造によって決まる熱力学的な最安定状態とみなされ、それを提唱したAnfinsenにちなみ、「Anfinsenのドグマ」として蛋白質科学の重要な原理の一つとなっている。一方で蛋白質がアミロイド線維を形成するミスフォールディング現象は、さまざまな疾患と関連することから、盛んに研究が行われているが、フォールディングとミスフォールディングの関係については不明な点が多い。本論文ではフォールディングの世界とミスフォールディングの世界とを結びつけることを目指し、合計 17 種類の蛋白質・ペプチドについて温度に注目した凝集を調べた。

まず、卵白の主成分であるオバルブミンがアミロイドコアを含みつつ、アモルファスな凝集を形成することを示した。そしてトリプシン分解によってアミロイドコアを同定し、これが他のセルピン蛋白質でも保存されていることを示した。次に、透析アミロイドーシスの原因蛋白質であるβ２ミクログロブリンが、中性 pH で加熱と撹拌によりアミロイド線維を形成することを発見した。これより、過飽和こそがフォールディングとミスフォールディングとを隔てる要因であることを示した。そして過飽和の役割の一般性を検証するために、様々な蛋白質・ペプチドを用いたアミロイド線維形成実験を行い、蛋白質・ペプチド間の違いが過飽和の程度の違いにあることを示した。

本論文では、これまで曖昧であった蛋白質フォールディングとミスフォールディングの関係性が過飽和によって理解可能であり、両者が地続きの世界であることを示した。本研究で得られた知見は、蛋白質の構造物性の理解を深めるものであり、疾患に関連する研究分野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。