

氏名	河野良平		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	工第18号		
学位授与の日付	平成21年3月21日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	アミロイドフィブリル解離の速度論ならびに遷移状態の体積特性		
論文審査委員(主査)	教授	橘	秀樹
(副主査)	教授	赤坂	一之
(副主査)	教授	矢野	史子

蛋白質は立体構造を形成して機能する。この立体構造形成過程をフォールディングと呼ぶ。アミロイド病においては、何らかの原因で立体構造が不安定になり部分的に変性した蛋白質が、分子間でβシート構造を形成して凝集し、フィブリルを形成することが近年明らかになってきた。さらに、このアミロイドフィブリル形成はアミロイド病原蛋白質のみならず、より広く蛋白質一般の持つ性質ではないかと考えられている。実際、ニワトリリゾチーム中のCysをAlaまたはSerに置換し、4つのジスルフィド結合を全て欠損させた変異体(OSS)は、安定性の低下のため、通常の溶液条件でほとんど変性状態にあるが、分子間βシート構造を持つ会合体を自発的に形成し、長期間のインキュベーションによりアミロイド様のフィブリルをつくる。このOSSフィブリルはモノマーと比較して高体積状態にあり、高圧力の印加によってモノマーへと解離し、減圧によって再会合する。ここに審査に付された河野良平の研究は、ニワトリリゾチームのOSS変異体ならびに1本のジスルフィド結合を持つ4種の1SS変異体を用いて、アミロイドフィブリルの形成・解離の速度論的解析および体積特性の解析を行ったものである。

本論の第III章第1節において、まず、より解析の容易な解離反応について述べている。一旦高い蛋白質濃度で形成させたOSSフィブリルを、十分に希釈し再会合がおこらないような低蛋白質濃度条件にして、トリプトファン蛍光を指標として高圧下での解離反応を観測している。解離にともない、蛍光強度は約半分減少し、蛍光放出スペクトルの赤色移動が見られた。これはフィブリル中で疎水的な環境にあったトリプトファン残基が解離により溶媒へ露出することを示している。見かけの解離速度定数 k_{app} は加圧によって大きく上昇し、50 MPa で 0.0020 min^{-1} であったものが400 MPa では 0.0354 min^{-1} に高まる。解離速度定数の圧力依存性を $k_{app} = (k_s T/h) \exp(-(\Delta G^\ddagger + \Delta V^\ddagger (P-P^\circ) - (\Delta \kappa^\ddagger / 2) (P-P^\circ)^2) / RT)$ 式に回帰することによって、フィブリル状態から解離の遷移状態への移行に際しての0.1 MPaでの活性化体積 ΔV^\ddagger が -50 ml mol^{-1} 、ならびに活性化圧縮率 $\Delta \kappa^\ddagger$ が $-0.013 \text{ ml mol}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ と、いずれも負の値として求められた。これはアミロイドフィブリルが体積の大きい圧縮されやすい特性を持つことを示す一方、解離の遷移状態でアミロイドフィブリルの体積が減少し、かつ、より圧縮されにくい状態をとることを意味し、遷移状態ではフィブリル中に存在した空隙の部分的な水和が起こることを示唆している。

次に、第2節において、OSSアミロイドフィブリル形成の速度論的解析、特に初期会合反応の解析ならびにフィブリル体積特性の成熟期間依存性の解析を行なっ

ている。会合反応のタイムコースをゲルろ過クロマトグラフィーで調べたところ、フィブリル量の増加の半完了時間は 1.5 hr であった。これは、会合反応にともなう蛍光強度増加の半完了時間である 1.9 hr とほぼ一致した。また、原子間力顕微鏡下でのフィブリル様会合体の総量の増加のタイムコースにも一致した。しかし、円二色性分光から得られる β シート構造の増加の半完了時間はそれらより遅く、5.8 hr であった。すなわち、モノマーの物理的会合が起こった後に、それに遅れてサブユニット間の β 構造が構築・増加してゆくことがわかった。しかしながら、原子間力顕微鏡下でのフィブリル様会合体の形態には、それらの長さが伸長すること以外には、 β 構造の遅い構築に相当するような変化は見られない。そこで、0.67 から 168 hr までの様々な成熟期間で得られたフィブリルに体積特性上の変化があるかどうかを高圧蛍光測定によって調べた。その結果、成熟期間の短いフィブリルにおいては、負の活性化体積および活性化圧縮率ともにその絶対値が大きく、成熟期間の増加にともない活性化体積および活性化圧縮率の絶対値が減少することがわかった。その減少の半減期はそれぞれ、16.6 hr と 9.2 hr であり、前述の β 構造構築の半完了時間に近かった。この結果は、遷移状態の同一性を仮定すれば、フィブリルの β 構造量の増加に平行する成熟期間の増加にともない、分子間隙などを含むフィブリルの体積は減少し、かつ、より圧縮されにくい状態に移行することを意味する。

以上、0SS 変異体でのアミロイドフィブリルの解離と会合について述べてきたが、次にフィブリル形成に対するジスルフィド結合導入の効果を解析する。一般にジスルフィド結合の形成は蛋白質の天然の立体構造を安定化するので、アミロイドフィブリルの形成を阻害する筈である。しかし、ジスルフィド結合の架かる場所によってその効果が異なるかもしれない。そこで、ここでは、1 本のジスルフィド結合を異なる場所にもつ、ニワトリリゾチーム 1SS 変異体 4 分子種 (1SS(6-127)、1SS(30-115)、1SS(64-80)、1SS(76-94)) を用いた。

まず、第 3 節において、これら 4 種の 1SS 変異体のアミロイドフィブリル形成反応を比較した。原子間力顕微鏡で観察された 4 種のフィブリルの形態は後述のようにわずかな差異が見られるものの、ほぼ 0SS 変異体フィブリルと同様であった。しかし、これらの会合速度は大きく異なり、3 桁に及ぶ差異があった。すなわち、1SS(76-94) は 0SS とほぼ同じ会合速度を示したが、1SS(30-115) および 1SS(64-80)

は 1 桁高い会合速度を示し、逆に 1SS(6-127) は 2 桁低い会合速度を示した。高い会合速度を示した 1SS 変異体中のジスルフィド結合 Cys30-Cys115 および Cys64-Cys80 は、以前の研究で、それらの近くの二次構造形成と関連する比較的安定な局所的立体構造形成と共役していることが知られている。つまり、正常なフォールディングに寄与するジスルフィド結合が、異常なフォールディングと考えられているアミロイドフィブリル形成にプラスに働く場合があることが示された。一方、フィブリル形成を大きく阻害したジスルフィド結合 Cys6-Cys127 は分子の N 末端と C 末端領域を繋いでおり、より大きな立体構造形成と共役していることが知られている。すなわち Cys6-Cys127 の形成は正常なフォールディングの経路にのみ関与していると考えられる。この結果は、効率良くフィブリル形成するには、N 末端と C 末端領域がお互いに立体配置的に離れることが必要であることを示している。さらに溶液 X 線小角散乱法により、高い分解能でこれら 1SS 変異体のアミロイドフィブリルの直径を調べたところ、1SS(6-127) 変異体フィブリルのみ特異的に直径が減少していた。つまりジスルフィド結合 Cys6-Cys127 による N 末端と C 末端領域の近接は、フィブリル形成を大きく阻害すると同時に、フィブリル内の蛋白質ペプチド分節の立体配置を変えていると思われる。

最後に第 4 節において、1SS 体 4 分子種が形成するフィブリルの体積特性を調べている。全ての 1SS フィブリルは加圧により解離する。その中で、1SS(30-115) フィブリルは最も解離が遅く、その負の活性化体積と活性化圧縮率は絶対値で最大であった。これは 1SS(30-115) フィブリルが柔らかいことを示しており、1SS(30-115) で特異的に見られるリング状フィブリルのような、わずかに異なる形態との関連が示唆された。対照的に 1SS(6-127) フィブリルと 1SS(64-80) フィブリルの活性化体積は絶対値で小さく、圧縮率も非常に小さかった。これらのフィブリルは固い状態であると思われる。

以上、本研究はリゾチームジスルフィド結合変異体と高圧力実験を用いて、フィブリル形成時にモノマーの物理的会合に遅れて β 構造が構築されること、フィブリルは圧縮されやすく空隙を多く含む構造であるが、 β 構造構築にともないフィブリル内空隙が減少し、フィブリルは固い構造に移行すること、フィブリル解離の遷移状態では空隙の水和が起こること、アミロイドフィブリル形成速度やフィブリルの体積特性に対するジスルフィド結合の効果が、その架かる部位によって大きく異なることを示したものである。

論文審査結果の要旨

アミロイド病で見られるフィブリル形成の機構の解明は、アミロイド病原蛋白質のみならず蛋白質一般の問題として、広い視野で捉えた蛋白質の立体構造形成研究の重要な一分野である。アミロイドフィブリル形成には蛋白質立体構造の不安定性や変性構造が関与していることは確かであるが、モノマー蛋白質の初期会合から分子間での β シート構造形成、フィブリルの成熟に至る過程には未解明の問題が多い。ここに博士論文審査に付された河野良平の研究は、これらの解明を目的としている。具体的には、ニワトリリゾチーム中のCysをAlaまたはSerに置換し4本のジスルフィド結合の全てを欠損させた変異体(OSS)や、4本のうちの1本のジスルフィド結合を残した4種類の1SS変異体のアミロイドフィブリル形成反応を対象として、高圧蛍光法・円二色性分光・原子間力顕微鏡観察・ゲルろ過クロマトグラフィー・溶液X線小角散乱法などの手法を用い、アミロイドフィブリルの形成・解離の速度論的解析および体積特性の解析を行ったものである。

本論の第III章第1節においては、まずOSS変異体について、フィブリル状態とモノマー状態でのトリプトファン残基の蛍光量子収率や局所環境の違いを明らかにし、その違いを利用して、加圧下でのフィブリルの解離促進を明確に示している。解離速度の圧力依存性の定量的解析から、アミロイドフィブリルは体積が大きく圧縮されやすい特性を持つこと、解離の遷移状態でアミロイドフィブリルの体積が減少し、より圧縮されにくい状態をとること、遷移状態ではフィブリル中に存在した空隙の部分的な水和が起こることを示している。アミロイドフィブリルの解離に関する活性化体積と活性化圧縮率の報告は世界に先駆けたものであり、その意義は大きい。また、指数関数に従う重合度分布をもつフィブリル溶液全体の測定から得られる見かけの解離速度と1分子端からの解離の速度定数との関係を明らかにした点も評価できる。

第2節においては、OSSアミロイドフィブリル形成の初期においてモノマーの物理的会合が起こりフィブリル様会合体が形成されるものの、サブユニット分子間の β 構造の形成は物理的会合と同時に起こらず、それに遅れることを示している。これはサブユニット分子の会合を、通常よく行なわれているチオフラビン蛍光や円二色性などの分光学的手法だけではなく、ゲルろ過クロマトグラフィーによるフィブリル量の直接定量や原子間力顕微鏡下のフィブリル定量を行なった、フィブリル溶液の精密密度測定結果との比較を行ったために明らかにできた

成果である。また、計算機科学分野で同様の予測がなされており、その実証につながるものと評価できる。さらにこの β 構造の構築・増加がフィブリルの体積特性の変化に反映されるという発見、すなわち、0.67から168hrまでの様々な成熟期間で得られたフィブリルにおいて、成熟期間の増加にともない活性化体積および活性化圧縮率の絶対値が減少する、という知見は圧力を用いた手法によって初めて明らかにできた、貴重なものである。遷移状態の同一性を仮定して得られる、フィブリルの β 構造量の増加に平行する成熟期間の増加にともない、分子間隙などを含むフィブリルの体積が減少し、より圧縮されにくい状態に移行する、という知見は、アミロイドフィブリルの後期成熟過程に関する新規性の高い知見である。

以上はジスルフィド結合を全て欠損させたOSS変異体について得られた成果であるが、次に第3節および第4節において、4本のうちの1本のジスルフィド結合を残した4種類の1SS変異体を用いた解析を行っている。一般にジスルフィド結合の形成は蛋白質の天然の立体構造を安定化するので、これらの1SS変異体ではアミロイドフィブリルの形成が阻害される筈である。しかしながら、これら4種の1SS変異体フィブリルの形態はほぼOSS変異体フィブリルと同様であったものの、これらの会合速度は大きく異なり、3桁に及ぶ差異があり、特に1SS(30-115)および1SS(64-80)変異体ではジスルフィド結合の無い場合よりも1桁高い会合速度を示した。この知見は、アミロイド病原蛋白質にジスルフィド結合を含むものが少なくないことと関連して非常に興味深い。逆に1SS(6-127)は2桁低い会合速度を示し、効率良くフィブリルを形成するには、N末端とC末端領域が立体構造上、離れることが必要であることを明確にした。さらに溶液X線小角散乱法により、1SS(6-127)変異体フィブリルのみ特異的に直径が減少していること、そして、第4節では1SS体4分子種が形成するフィブリルの体積特性がジスルフィド結合の架かっている部位によって大きく異なることが報告されているが、これらの知見は他に類例の少ない、非常にユニークなものである。

以上、河野良平による本研究は、リゾチームジスルフィド結合変異体と高圧力実験を用いて、アミロイドフィブリル形成反応におけるモノマー蛋白質の初期会合から、分子間 β シート構造形成、フィブリルの成熟に至る過程で多くの新知見を得たものであり、博士(工学)論文として価値あるものと認める。