

京都大学	博士 (工学)	氏名	岩川 直都
論文題目	Dynamic Structural Changes of Proteins Revealed by NMR Spectroscopy Under Physicochemical Perturbations (物理化学的摂動下における NMR 法によるタンパク質の動的構造変化に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、様々な生命現象に関連するタンパク質の動的な構造変化を、物理化学的な摂動条件を用いて解析した結果をまとめたものであって、四部からなっている。</p> <p>第一部は序論であり、前半ではタンパク質の立体構造の重要性および構造変化の意義について解説している。構造変化は酵素活性等、タンパク質が機能を獲得するのに不可欠である一方で、誤った構造変化 (ミスフォールディング) によりアミロイド線維と呼ばれる異常凝集体を形成すると、神経変性疾患を引き起こすことが知られている。このアミロイド線維形成について過去の研究で明らかにされている知見を、物理化学的な研究手法とともに概説している。第一部の後半では、本論文で取り扱う 2 種類のタンパク質 (superoxide dismutase 1 (SOD1) および ShK) について、それぞれの疾患との関連やこれまでに明らかとなっている知見について記述している。</p> <p>第二部は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすとされる SOD1 のアミロイド線維形成に関する研究をまとめたものであり、3 つの章で構成されている。まず第一章では、高濃度の生体高分子で混雑した環境である細胞内における SOD1 のアミロイド線維形成機構に関する研究を行った。細胞内の混雑環境を、高濃度のリゾチームを添加することにより模倣し、その環境でアミロイド形成実験を行うことで、混雑した環境において SOD1 のアミロイド線維形成が抑制されることを明らかにした。さらに、各種核磁気共鳴分光 (NMR) 測定により、線維形成に直接関係しない構造状態が安定化されることがこの原因であることを明らかにした。細胞内環境は、単一の混雑分子ではなく、タンパク質や核酸等、様々な高分子で混雑しているため、本研究で明らかとなったアミロイド形成の抑制がそのまま細胞内で観測されるとは限らないが、細胞内でのアミロイド形成機構を理解するための一助となると考えられる。第二章および第三章では、近年我々が開発した高感度 Rheo-NMR 法を用いて、SOD1 のアミロイド形成過程を詳細に解析した研究結果をまとめた。第二章では、アミロイド形成に伴う SOD1 の二次元 NMR スペクトルの時間変化から、天然構造中の 3_{10} ヘリックス構造がアミロイド形成に先立って壊れること、また、N 末端および C 末端領域がオリゴマー中において高い柔軟性を持つことを明らかにした。さらに、Rheo-NMR 法を用いた CLEANEX-PM 測定により、変性構造の SOD1 の一部で、溶媒との間の水素交換が抑制されることを明らかにした。これは、この領域を介して分子間で相互作用し、線維の核形成を行うためであると考察された。ここで明らかにされた残基分解能での SOD1 のアミロイド形成過程に関する知見は、これまでの手法では取得困難な、世界初の知見であると考えられる。さらに</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	岩川 直都
<p>第三章では、線維形成の中間体であるオリゴマーに結合するとされる thioflavin T (ThT) という蛍光色素の Rheo-NMR スペクトル変化を解析することで、SOD1 のオリゴマーを観測する新規手法を確立した。特に、オリゴマー状態は、高い毒性を有すると考えられているが、過渡的に形成することなどを理由として、その検出方法は限られていた。この構造状態を検出可能にする本手法は、今後の SOD1 のアミロイド形成機構の解明および ALS 発症機構の解明に貢献すると考えられる。第二部で得られた知見は、SOD1 のアミロイド形成機構の理解に重要であるとともに、ここで確立された Rheo-NMR 法を用いた新規解析手法は、SOD1 に限らず、あらゆるタンパク質のアミロイド形成過程を解析する上での新規手法として幅広く応用されることが期待される。</p> <p>第三部では、カリウムチャンネルに結合し、その機能を阻害することで自己免疫疾患の治療薬としての応用が期待されている ShK ペプチドの動的構造変化を解析した。ShK がカリウムチャンネルに結合する際、Lys22 および Tyr23 が重要であるとされているにも関わらず、天然構造においてはこれらの残基は表面に露出しておらず、結合する際に構造変化が必要であると予測されてきた。本研究では、高圧 NMR 法を用いることで ShK の動的構造変化を原子分解能で解析した。NMR 化学シフトの圧力依存性から、高エネルギー状態においては、Cys17-Cys32 間のジスルフィド結合の結合角が天然構造から変化していることを明らかにした。さらに、分子動力学計算を行うことで、この結合角の変化が Lys22 および Tyr23 を含む α ヘリックスの再配置を誘起し、カリウムチャンネルへの結合を可能にすることを示した。</p> <p>第四部は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、圧力・せん断力・混雑環境という物理化学的摂動を用いてタンパク質の動的な構造変化を解析した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 異常凝集体形成により筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こす superoxide dismutase (SOD1) は、細胞内を模倣した混雑条件において凝集体形成が抑制されることを明らかにした。これは、混雑分子により凝集体形成とは直接関係しない構造状態 (off-pathway 状態) が安定化されるためであることを各種核磁気共鳴分光 (NMR) 測定により明らかにした。
2. 新規 Rheo-NMR 法を用いることにより、SOD1 が凝集体形成する際の構造やダイナミクスの変化を原子分解能で解明した。特に、天然構造中の 3_{10} ヘリックス構造が変性に先立ちほどけることや、線維の核形成に重要な複数のアミノ酸残基の特定は、将来的に、SOD1 の凝集体形成を阻害する ALS 治療薬を開発する上で重要な知見となると考えられる。
3. 毒性が最も高いとされていながらも、検出が困難である凝集体形成の中間体 (オリゴマー) 状態を、特異的に結合する蛍光色素 (thioflavin T) の NMR シグナルを観察することにより観測する新規手法を確立した。
4. 自己免疫疾患の治療薬候補として臨床試験が進められている ShK ペプチドが、薬理活性を獲得する際に必要とされる動的な構造変化を、高圧 NMR 法を用いることにより明らかにした。ShK 内に存在する 3 つのジスルフィド結合のうちの 1 つ (Cys17-Cys32) の結合角の変化が、カリウムチャンネルへの結合に重要であるとされる Lys22 を含む α ヘリックスの再配置を引き起こす機構を提唱した。この知見は、ShK ペプチドの治療薬としての活性をさらに高める上で重要な知見となりうる。

以上、本論文は、疾患発症の理解や治療法開発に重要であるがこれまで知見の少なかったタンパク質の動的構造変化を微視的な視点から詳細に解析したものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 2 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。