

京都大学	博士 (工学)	氏名	西澤 菜由
論文題目	Physicochemical Characterization of Physiological Aspects of Protein Structure (生理学的側面から見たタンパク質構造の物理化学的特性評価)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、生理学的側面から見たタンパク質構造の物理化学的特性評価についての研究成果をまとめたものである。本論文は序論ならびに本章 3 章を含む全 5 章から構成されている。</p> <p>第 1 章は序論であり、タンパク質の相互作用を支配する代表的な要因について説明している。特に本論文で着目しているのはタンパク質の構造変化・静電相互作用・化学環境の 3 つの要因である。これらの要因が複合的に作用することによってタンパク質の機能が決定されるため、要因を個別に解析することで生命現象をタンパク質の機能性の観点から正確かつ包括的に理解することが可能となる。はじめに一般的なタンパク質の構造変化とタイムスケールおよびその変化を観測する最適な溶液 NMR 法を記述している。続いて、タンパク質の静電相互作用の重要性とアミノ酸の性質を示している。最後に、3 つ目の要素として化学物質・pH・無機イオンパラメータの細胞内における生理的役割について述べている。とくに本論文では細胞内に含まれる化合物の代表としてアデノシン三リン酸(ATP)に着目し、その生理機能やタンパク質を安定化させる新たな機能について解説する。これらの生理学的側面からみた 3 つの要素を各章の導入としている。</p> <p>第 2 章では、まずタンパク質間相互作用に焦点をあて、主に遅い状態変化の速度論的研究を行うためのアミノ残基選択的な NMR 緩和実験である「<math>F_1F_2</math>-selective ZZ-exchange 法」の開発について記述している。この手法では、タンパク質の単一のアミドピークを Hartmann-Hahn 交差分極(CP)によって選択することで、ピンポイントに NMR ピークを検出することが可能である。そのため結果として得られるスペクトルには、選択的に励起されたピークに由来する磁化を持つ少数のピークのみが含まれており、NMR スペクトルの解釈が従来よりも簡便となる。この手法を p62 UBA ドメインの単量体-二量体転移に適用することで、従来手法では二状態の存在比が偏ったり、交換ピークが <math>^{15}\text{N}</math> 化学シフト軸または <math>^1\text{H}</math> 化学シフト軸方向に重なったりするせいで解析が困難であった測定系において本測定法の利点を実証した。</p> <p>第 3 章では、タンパク質の静電相互作用に着目し、電気泳動 NMR 法を用いて外部環境の pH 変化に応じたタンパク質の実効電荷について記述している。実効電荷はある距離または電場から検出される電荷であり、タンパク質がイオン交換樹脂や生理的細胞膜などの物理的に帯電した表面と相互作用するかを決定する電荷である。現在まで議論されてきた電荷は溶液中のイオンが存在しない場合の電荷、つまり正味の電荷であ</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	西澤 菜由
<p>るため、実際の溶液中タンパク質の電荷を評価するためには実効電荷を測定する必要がある。したがって本章では電気泳動 NMR 法と拡散 NMR 法を用いて、細胞内に存在するタンパク質であるユビキチンと細胞外に存在するタンパク質である牛血清アルブミンの実効電荷の観測を行った。結果、タンパク質は細胞内外問わず、機能に重要な実効電荷を広い pH で維持できることが示唆された。この効果は対イオンの縮合に起因しており、実際の溶液中のイオンはタンパク質の帯電した表面で縮合する傾向から、実効電荷が低下する現象を表している。この効果は通常合成ポリマーではよく見られるが、タンパク質ではほとんど議論されておらず、本観測が世界初となる。</p> <p>第 4 章では、細胞内に 2-8 mM と高濃度で存在する生体分子である ATP に着目し、その新たな機能について述べている。先行研究において ATP がタンパク質のアミロイド線維化を阻害することが明らかにされており、また、ATP 濃度の低下とタンパク質のアミロイド線維化が引き起こす神経変性疾患との関連性が報告されたことから、ATP のアミロイド線維化阻害能の分子基盤の解明は、神経変性疾患の治療法開発に重要な知見となることが期待される。本論文では溶液 NMR を主体とした詳細な解析の結果、ATP はアミロイド線維化しやすいタンパク質だけでなく様々なタイプのタンパク質(球状タンパク質と天然変性タンパク質)と相互作用し、タンパク質の水和に影響を与えることを示した。さらに、複数の物理学的手法を用いることで ATP が低塩かつ高濃度条件でミセル状の凝集体を形成することを明らかにした。弱い ATP-タンパク質相互作用と ATP 凝集体の形成は両者ともシグモイド濃度依存性を示すため、相互に関連していることが示唆される。これらの結果より、ATP はタンパク質の表面、とくに凝集しやすい可能性のある溶媒にさらされた柔軟な領域を保護し、タンパク質の凝集しやすい領域によるクラスター化傾向を打ち消す結果、タンパク質のオリゴマー形成の確率が低下し、凝集が防止されるという抗凝集特性のモデルを提唱している。ATP-タンパク質相互作用は、ATP の両親媒性に由来するため、高分子による細胞内クラウディングだけでなく、細胞内の小さな可溶化分子による抗クラウディングも今後の重要な研究領域となることが期待される。</p> <p>第 5 章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。本論文で得られた知見はタンパク質構造の物理化学的特性を評価するうえで非常に重要な役割を果たすことが期待できる。</p>			

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、生理学的側面から見たタンパク質構造の物理化学的特性評価についての研究成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. アミノ残基選択的な NMR 緩和実験である「 $F_1F_2$ -selective ZZ-exchange 法」を開発した。この手法を p62 UBA ドメインの単量体-二量体転移に適用することで、従来の手法では二つの状態の存在比が偏ったり、交換ピークが  $^{15}\text{N}$  化学シフト軸または  $^1\text{H}$  化学シフト軸方向に重なったりするため解析が困難であった測定系において、本測定法の有効であることを実証した。
2. 溶液中の実効電荷の観測により、タンパク質が広い pH 領域において実効電荷を保存することを明らかにした。主に電気泳動 NMR 法を用いた解析により、細胞内タンパク質および細胞外タンパク質は、いずれも pH 6-8 の pH 領域間で安定な電荷を保持しており、生理的な pH 値の変動に対してタンパク質の機能を遮蔽していることが明らかとなった。
3. ATP が様々なタンパク質と弱く非特異的に相互作用することを明らかにした。さらに、高濃度では ATP がミセル状の凝集体を形成し、タンパク質との相互作用を高めることを観測した。また ATP はタンパク質の表面、特に凝集しやすい溶媒にさらされた柔軟な領域の表面を覆い隠すことができ、タンパク質の凝集しやすい領域での凝集を抑制する傾向を打ち消すことができることを示唆した。

以上、本論文はタンパク質構造の生理学的現象に関与する物理化学的環境による影響を静電相互作用・構造変化、生体小分子との相互作用等の複数の観点から詳細に解析した成果であり、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。