

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	首藤 佑輔
論文題目	Protein Structural Dynamics under Physical and Chemical Perturbations (物理的・化学的摂動下におけるタンパク質の構造ダイナミクス)		
(論文内容の要旨)			
タンパク質は、酵素反応の触媒、分子輸送、シグナル伝達など多様な生命機能を担っており、その機能発現は固有の立体構造と動的な構造変化に依存している。一方、神経変性疾患では、タンパク質が本来の構造変化の経路から逸脱し、異常凝集体を形成することが主要な病因の一つとして考えられている。しかし、凝集体形成の分子機構は未だ十分に解明されていない。これは、タンパク質自身の性質に加え、生体内で常に作用する化学的・物理的摂動が、構造揺らぎや会合過程にどのように影響を及ぼすかを同時に捉える必要があるためである。 本研究では、化学的摂動として ATP 濃度変化、物理的摂動として電場の影響に着目し、パーキンソン病関連タンパク質 α シヌクレインの凝集機構がこれらの摂動によってどのように制御されるかを原子レベルで解明することを目的とした。そのために、残基分解能で構造・相互作用およびそのダイナミクスを評価でき、スピン緩和や化学交換を通じて幅広い時間スケールの情報を与える核磁気共鳴 (NMR) 法と、原子分解能でナノ秒オーダーの分子運動を追跡可能な分子動力学 (MD) 法を相補的に用いた。さらに、従来の溶液 NMR 測定系に電場印加機構を組み込み、電場下での高分解能測定を可能とする高分解能の電場印加 NMR (E-NMR) 装置を新規に開発するとともに、電場印加時のタンパク質の挙動を記述可能な分子動力学 (E-MD) 法を整備し、計算と実験の両面から解析を行った。 第2章では、電場に対するタンパク質および水分子の応答の一般性を検証するため、正味電荷を持たないユビキチンを対象として E-MD 解析を行った。外部電場により分子内水素結合の揺らぎが増大し、二次構造の端に位置するループや末端などの柔軟部位において局所的な構造変化が誘起されることを示した。また、水分子の解析から、バルク水は電場方向へ容易に配向する一方、タンパク質表面の水和水はタンパク質との相互作用により配向が制限されることを見出した。このバルク水と水和水の応答差がタンパク質表面にトルクを与え、構造揺らぎを増幅し得ることが示唆された。 第3章では、ATP 高濃度条件下での凝集抑制 (ハイドロトロプ作用) の分子基盤を、α シヌクレインを対象に NMR 滴定、並進拡散測定、および MD 法を用いて検討した。その結果、ATP のアデニン環は α シヌクレイン全体と弱く非特異的に相互作用する一方、三リン酸基は N 末端のリジン残基など特定部位と相対的に強く相互作用することが明らかとなった。これらの局所的かつ多様な相互作用の重なりにより、ATP 存在下では α シヌクレインの構造が全体として伸長することが示された。これらの結果に基づき、低濃度では三リン酸基主導の結合が優勢であり、高濃度ではアデニン環による多数の弱い結合が寄与するという階層的結合機構 (Hierarchical Binding Hydrotrope Mechanism) を提唱した。 第4章では、電場が α シヌクレインの凝集過程に与える影響を実験的に検証す			

るため、高分解能 E-NMR 法を新規に開発した。通常の NMR 試料管内に電極を配置し、クライオプローブによる高感度測定と同期してパルス電場を印加することで、溶液中での高分解能測定を可能にした。この手法により、電場印加時に α シヌクレインの N 末端および C 末端領域でシグナル強度低下と化学シフト変化が生じることをリアルタイムで観測した。また、電子顕微鏡観察およびチオフラビン T アッセイから、電場曝露下ではアミロイド線維ではなく非線維性の可溶性オリゴマーが形成されることを示した。さらに、CLEANEX-PM 法による水素交換解析から、ATP 存在下では、 α シヌクレイン表面の水分子とアミドプロトンとの交換が部分的に抑制されることが認められた。一方で、電場印加によりこの水和の抑制傾向が緩和されることが示され、ATP と電場が α シヌクレインの分子内相互作用および会合過程に対して拮抗的に作用することが示唆された。以上の結果から、電場という物理的摂動が、 α シヌクレインの分子内相互作用および会合過程を再構築し、アミロイド線維形成とは異なる凝集経路を選択的に誘導することが、実験的に示された。これらの知見は、神経変性疾患におけるタンパク質凝集を、単一因子ではなく細胞内で同時に作用する摂動のバランスとして理解するための視点を与える。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、生体内でタンパク質が受ける化学的・物理的摂動のうちATP濃度変化と電場に注目し、構造ダイナミクスおよび凝集挙動に与える影響を、実験と計算を組み合わせた物理化学的手法により解析したものである。申請者は、核磁気共鳴(NMR)法と分子動力学(MD)法を相補的に用い、摂動に伴う微細な構造変化や過渡的相互作用の機構を原子レベルで解析し、分子論的理解を与えた。研究対象として神経変性疾患関連タンパク質 α シヌクレインを扱い、環境変動を考慮した凝集機構理解に資する点で意義が大きい。評価すべき点として以下の3点があげられる。

1. 正味電荷を持たないユビキチンを対象に電場印加MD(E-MD)解析を行い、外部電場が分子内水素結合の揺らぎを増大させ、ループや末端など柔軟部位に局所構造変化を誘起することを示した。さらに、バルク水と水和水の配向応答差がタンパク質表面にトルクとして作用し得ることを見出し、電場曝露効果の一般的描像を与えた。
2. ATPのハイドロトロープ効果について、三リン酸基を介した相対的に強い部位選択的相互作用と、アデニン環を介した多数の弱い非特異的相互作用の双方が寄与することを、NMR滴定・並進拡散測定・MD解析に基づき明らかにした。提唱した階層的結合機構(Hierarchical Binding Hydrotrope Mechanism)は、ATPによる凝集抑制を分子論的に理解する枠組みとして有用である。
3. 溶液NMR測定系に電場印加機構を組み込み、高分解能で電場曝露下測定を可能とするE-NMR法を新規に構築した。これにより α シヌクレインのスペクトル変化をリアルタイムで捉え、電子顕微鏡観察およびチオフラビンTアッセイと併せて、電場下でアミロイド線維とは異なる非線維性オリゴマー形成へ向かう凝集経路を示した。さらに、ATP存在下で電場曝露効果に変調されることを示し、化学的摂動と物理的摂動が凝集過程に及ぼす相互作用の重要性を示唆した。

以上より、本論文は、ATP濃度変化と電場という生体内で変動する摂動が、タンパク質の構造ダイナミクスと凝集過程をどのように変化させるかを計算と実験の両面から原子レベルで示した点で高く評価でき、独創性も認められる。とりわけE-NMR法の構築とE-MD解析は方法論的意義が大きく、神経変性疾患研究に加えて、タンパク質科学・生物物理学、溶液NMR法の計測・装置開発、計算化学を用いたタンパク質の構造動態解析、ならびにタンパク質の凝集体形成に関わる研究の発展に寄与するところ大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和8年1月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)