

(続紙 1)

京都大学	博士（エネルギー科学）	氏名	井上 雅文
論文題目	自己組織化タンパク質の構造体形成制御		
（論文内容の要旨） 本論文は、自己組織化タンパク質によるナノ構造体形成の分子機構の解明と、ナノ構造体の安定性・大きさ・形状の制御機構の理解を目的として、アミロイド繊維を形成するタウタンパク質リン酸化体由来するアミノ酸配列を含むペプチドを化学合成して使用することにより、リン酸化によるアミロイド繊維形成の制御およびアミロイド繊維表面のリン酸基を利用した機能性バイオエネルギー材料の構築法に関して研究をすすめ、多くの有用な知見を得た結果についてまとめたもので、全8章からなっている。 第1章は序論であり、タンパク質によるアミロイド繊維形成をタンパク質自己組織化の例としてとらえ、タウタンパク質を中心に概説している。アミロイド繊維はタンパク質がβシート構造を形成し規則正しく配列化した直径約10 nm, 長さ数μmの安定な繊維状構造体であり、その高い安定性と規則性から、機能性バイオエネルギー材料として応用が期待される。アミロイド繊維の応用には、繊維の長さ、幅、形状等の制御が重要である点、および、アミロイド繊維はアルツハイマー病をはじめとする重篤な疾患にも関与している点について論じている。 第2章では、タウタンパク質の微小管結合部位第3リピート由来の凝集性配列であるVQIVYKを含む6アミノ酸からなるPHF6ペプチドを用いて、チロシンのリン酸化がペプチド凝集特性に及ぼす影響を解析し、チロシンのリン酸基と隣接するリシン残基との分子内あるいはβシート間での電荷対形成が繊維形成の促進につながる分子機構を提唱した。 第3章では、凝集性ペプチドにより形成されたアミロイド繊維の尿素耐性を調べることにより、チロシンのリン酸化が繊維安定性に及ぼす影響を解析した。チロシンをリン酸化したPHF6ペプチドによって形成されたアミロイド繊維は高い尿素耐性を示すことを定量的に明らかにすることにより、前章で提唱したチロシンのリン酸基とリシン側鎖のεアミノ基との電荷対形成が繊維構造の安定化につながる分子機構の妥当性を示した。 第4章では、ペプチド中でのリン酸基の位置がペプチドによる繊維形成に及ぼす効果に着目した。タウタンパク質中の微小管結合部位第3リピートに存在するVQIVYK配列のN末端側に存在するセリン残基は、生体内でリン酸化を受けることが示唆されている。このセリン残基を含む7アミノ酸からなるSVQIVYKペプチド（SPHF6）およびそのリン酸化体のアミロイド繊維形成反応を解析し、セリンおよびチロシンのリン酸化がペプチドによる繊維形成に及ぼす影響を考察した。チロシンのリン酸化はSPHF6ペプチドの繊維形成を促進したが、セリンのリン酸化はその繊維形成を阻害した。また、SPHF6ペプチドのセリンとチロシンの両方をリン酸化した場合には、繊維形成は著しく阻害された。これらの結果から、リン酸基の位置と組み合わせによってアミ			

ロイド繊維形成におけるリン酸化の効果が異なることが明らかになった。また、これらのリン酸化ペプチドにより形成されたアミロイド繊維はクロス β 構造もしくは β サンドイッチ構造を基本骨格とすることを、各ペプチドが形成したアミロイド繊維のX線回折様式から明らかにした。クロス β 構造もしくは β サンドイッチ構造を基本骨格とした分子モデルをもとにして、アミロイド繊維の安定性と形状が変化する構造形成機構を提唱した。

第5章では、タウタンパク質の微小管結合部位第2リピートに存在する凝集性配列VQIINKを含む6アミノ酸からなる PHF6_2 ペプチドならびにVQIINKのC末端側配列KLDLSを含むPHF6_2Sペプチド中のセリン残基をリン酸化したペプチドのアミロイド繊維形成反応を解析した。PHF6_2Sペプチドは、KLDLS配列中のセリンをリン酸化することによって中性条件では繊維形成が阻害され、酸性条件では繊維形成が促進された。このpH依存的な繊維形成について、リン酸基の電荷状態に依存した制御機構を提唱した。

第6章では、タウタンパク質の微小管結合部位第3リピートに存在する6アミノ酸からなる凝集性配列VQIVYK (PHF6) のN末端側に存在するアミノ酸の化学的性質に着目した。リン酸化セリンもしくはリシンをPHF6のN末端に付加したペプチドを合成し、それらのアミロイド繊維形成反応を解析した。それぞれのペプチドは単独では凝集性が低かったが、両ペプチドを混合することによって、ペプチド単独では凝集しない条件においても繊維形成が促進された。これらの結果をもとにして、複数のペプチド間の静電相互作用がアミロイド繊維形成の制御につながる分子機構を論じた。

第7章では、アミロイド繊維表面を機能性分子によって特異的に修飾し、アミロイド繊維を機能性ナノバイオ材料として利用する方法論を検討した。アミロイド繊維表面のリン酸基を認識する化合物を利用して金コロイドにより繊維表面を修飾できることを明らかにし、リン酸基を介して様々な機能性分子をアミロイド繊維表面の特定部位に導入する方法論を開発した。

第8章は本論文の総括である。本論文は、タンパク質の自己組織化による組織体形成の制御に取り組んだものである。修飾アミノ酸を導入したペプチドを化学合成し、系統的にペプチドの電荷数と電荷の位置がペプチドの繊維構造体形成に及ぼす効果について解析し、アミノ酸のリン酸化によってペプチドが形成する繊維構造体の安定性および形状の制御が可能であることを初めて明らかにした。ペプチドを用いて明らかにしたアミロイド形成機構をもとにして、タンパク質による繊維状構造体形成を理解することが可能になる。特に、リン酸化・脱リン酸化の操作によってタンパク質中の電荷の位置や組み合わせを選択的に変えることにより、様々な安定性や形状を持つタンパク質繊維状構造体の形成を溶液中で制御することが可能であると考えられる。さらに形状や分子配置を制御したタンパク質構造体表面に機能性分子や酵素を配列・集積化することにより、高効率かつクリーンなエネルギー変換を可能にするナノバイオエネルギー材料の創製が期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、タンパク質自己組織化により形成されたナノ構造体形成機構の解明を目的とし、アミロイド繊維を形成するタウタンパク質リン酸化体由来の合成ペプチドを用いて、リン酸化によるアミロイド繊維の安定性・大きさ・形状の制御機構と、リン酸基を利用した機能性バイオエネルギー材料の構築法に関する研究を行った結果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. タウタンパク質のアミロイド形成をになう微小管結合部位第3リピートに存在するPHF6ペプチド (VQIVYK) を用いて、チロシンリン酸化がペプチドの繊維形成におよぼす影響を解析し、チロシンのリン酸基と隣接するリシン残基との分子内あるいは β シート間での電荷対形成が繊維形成の促進につながる分子機構を提唱した。

2. チロシンをリン酸化したPHF6ペプチドが高い尿素耐性を有するアミロイド繊維を形成することを定量的に解析し、チロシンのリン酸基とリシン側鎖の ϵ アミノ基との電荷対形成が繊維構造の安定化につながる機構を明らかにした。

3. SPHF6ペプチド (SVQIVYK) のチロシンリン酸化は繊維形成を促進したが、セリンリン酸化はその形成を阻害し、ともにリン酸化した場合には、繊維形成が著しく阻害された。これらの結果をもとにして、リン酸基の位置と組み合わせがクロス β 構造を基本骨格とするアミロイド繊維形成を支配する分子機構を提唱した。

4. タウタンパク質の微小管結合部位第2リピートに存在する凝集性配列 VQIINK 近傍のセリンをリン酸化したペプチドのpH依存的な繊維形成を解析し、リン酸基の電荷状態によってアミロイド繊維形成が制御されることを明らかにした。

5. 凝集性配列 VQIVYK のN末端にリン酸化セリンもしくはリシンを付加したペプチドは、単独では凝集性が低かったが、両ペプチド共存下では繊維形成が著しく促進された。これにより、タウタンパク質中のアミノ酸配列間の静電相互作用がアミロイド繊維形成の制御につながる機構を提唱した。

6. アミロイド繊維表面のリン酸基を認識する化合物を利用して、繊維表面に金コロイドを導入し、リン酸基を介して様々な機能性分子をアミロイド繊維表面に導入する手法を開発した。

以上、本研究では、修飾アミノ酸を系統的に導入したペプチドを化学合成し、ペプチド中の電荷数と電荷の位置がペプチド繊維構造体の安定性と形状に及ぼす効果およびそれらを制御する機構を分子レベルで明らかにした。これらの成果から、タンパク質繊維構造体形成を支配する物理化学的機構と構造的因子の解明に大きな貢献を行ったと評価する。

よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成22年2月26日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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