

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	竹原 清日
論文題目	Studies on the mechanism for the formation of neuroserpin polymers causing dementia （認知症を引き起こすニューロセルピンのポリマー形成機構についての研究）		
（論文内容の要旨）			
ニューロセルピンは脳内で多量に分泌されるセルピン(セリンプロテアーゼインヒター) スーパーファミリーに属するタンパク質で、脳内のセリンプロテアーゼ(tPA : tissue-type plasminogen activator)を阻害し、記憶や感情の制御に関与すると考えられている。セルピンにはポリマー化して肝硬変、肺気腫、血栓症などの疾患を引き起こす変異体が数十種類確認されており、ニューロセルピンでも5種類の変異体がポリマー化し、若年性認知症を引き起こす事が知られている。これらの疾患の多くは病原性変異体保有者のみが発病する遺伝病であるが、罹患者数が多く、治療方法の開発が急がれている。これらの発症機構には、セルピンの阻害活性発現の際に起こる構造変化(ループ挿入)とポリマー化が関係していると考えられている。そこで本論文は、構造生物学的アプローチによりニューロセルピンのポリマー形成機構の解明を試みた。本論文の内容は以下のように要約される。 第一章では、X線結晶構造解析により初めて野生型ヒト・ニューロセルピンの構造を決定した。ニューロセルピンの野生型は生理的条件下でもポリマー化することが<i>in vitro</i>で確認されている唯一のセルピンで、凝集しやすいために結晶化が難しく、これまで結晶構造の報告は無かったが、添加剤等を工夫する事で結晶化に成功した。得られた構造から、ニューロセルピンに特有の8残基から成るオメガグループ構造がtPAの阻害活性に寄与することを明らかにした。さらに、他のセルピンとの構造比較からポリマー化に関与する部位を2箇所特定し、それらを置換した変異体が生理的条件下ではポリマー化しないことを明らかにした。また、それらの変異体の中で、L162Kの結晶構造を決定し、野生型ニューロセルピンがポリマー化する最大の要因は、ループ挿入に重要なストランド5A近傍が他のセルピンに比べ不安定であることを明らかにした。 第二章では、ニューロセルピンのポリマー化経路を検討した。ニューロセルピンの病原性変異体のうち、50才前後で認知症を発症するS49P、10代前半で発症するH338R、および認知症を発症しない野生型について、ポリマー化とリフォールディングの速度を蛍光および限定加水分解などにより解析した。その結果、野生型は中間体I₁、I₂を経て速やかにネイティブ型にまでリフォールディングするのに対して、病原性変異体はI₂まではリフォールディングできるが、I₂からネイティブ型へのリフォールディング速度が極めて遅く、ネイティブ型の収率も低いことが明らかになった。さらに、中間体I₂の精製に成功し、I₂からセルピン特有のポリマーが形成されることを見いだした。以上の結果から、病原性変異体は認知症の発症年齢が早いものほど中間体からネイティブ型へのフォールディングが困難であるため、中間体からポリマーが形成されやすく、認知症を引き起こすことを明らかにした。さらに、ポリマーの前駆体である中間体I₂が創薬のターゲットとして重要であることも示した。 ニューロセルピンはネイティブ型からもポリマーを形成する。そこで、ネイティブ型を加熱することにより得られるポリマーとリフォールディング中間体から形成されるポリマーの性質を比較した結果、両者は本質的に同等である事が示唆された。これによりネイティブ型からのポリマー化はフォールディング中間体へのアンフォールディング反応である事が推定された。			

第三章では、ニューロセルピンポリマーの構造特性を検討した。ニューロセルピンのポリマーの構造がアンチトロンビンにおいて提唱されているドメインスワップモデルと一致するかどうか検証するため、S-S架橋でストランド5Aと6Aを固定し、ドメインスワップが妨げられるように設計した変異体を調製し、そのポリマー形成能を調べたところ、予想に反してポリマー化が起こった。生じたポリマーのS-S架橋を調べた結果、再形成されたS-S結合はほとんどが同じ分子内の5A-6A間で形成されており、ニューロセルピンのポリマーの構造は、アンチトロンビンにおいて提唱されている構造とは異なり、より広範囲のドメインスワップにより形成される可能性が示唆された。この結果は、プロテアーゼを用いた限定加水分解の実験からも支持されるものであった。

上記の結果に基づいて、認知症を引き起こすニューロセルピンについて、ポリマー形成に寄与する構造要因およびポリマー化機構を明らかにした。

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)

ニューロセルピンはセルピン(セリンプロテアーゼインヒビター)スーパーファミリーに属し、その病原性変異体はポリマー化しやすく、若年性認知症を引き起こす。これまでニューロセルピンの結晶構造の報告は無く、治療法も見つかっていない。本論文は、構造生物学的アプローチによりニューロセルピンのポリマー形成に寄与する構造要因およびポリマー化機構を明らかにしたものである。評価すべき主要な点は以下のように要約される。

1. 野生型ニューロセルピンの立体構造をX線結晶構造解析により初めて明らかにした。その結果、本タンパク質の阻害活性の発現に重要な構造要因とポリマー化に必須な構造要因を明らかにした。また、ポリマー化に関与するアミノ酸残基の変異体であるL162Kの結晶構造を決定し、ニューロセルピンが野生型でもポリマー化する要因がループ挿入に重要なストランド5A近傍の安定性にあることを明らかにした。
2. リフォールディング解析により、認知症の発症年齢が早い変異体ほど、リフォールディング速度が遅く、リフォールディング効率も悪いことを明らかにした。また、精製したリフォールディング中間体からセルピン特有のポリマーが形成されることを見だし、この中間体が創薬の新たなターゲットとして重要であることを示した。
3. S-S架橋分析により、ニューロセルピンのポリマーの構造はアンチトロンビンにおいて提唱されているセルピンポリマーの構造とは異なることを明らかにした。さらに、限定加水分解の結果などから、ニューロセルピンのポリマーはアンチトロンビンにおいて提唱されているポリマーよりもドメインスワップが広範囲に生じることを示した。

以上のように、本論文は、ニューロセルピンの結晶構造を決定し、本タンパク質のポリマー化に関わる構造要因およびポリマー化機構を明らかにし、創薬のターゲットとなるフォールディング中間体の捕捉にも成功したものであり、構造生物学、細胞生化学、生体高分子学、病理学などに寄与するところが多い。

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、平成23年1月13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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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